

# ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ РОБОТИ

УДК 577.23

## ВЛИЯНИЕ АКТИВАТОРА АТР-ЗАВИСИМОГО $K^+$ -КАНАЛА НА ТРАНСМЕМБРАННЫЙ ОБМЕН КАЛИЯ И ОБРАЗОВАНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В УСЛОВИЯХ ОТКРЫВАНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПОРЫ

О. В. АКОПОВА, Л. И. КОЛЧИНСКАЯ, В. И. НОСАРЬ, В. А. БУРЫЙ,  
И. Н. МАНЬКОВСКАЯ, В. Ф. САГАЧ

Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев;  
e-mail: a-dubensky@mail.ru

Изучено влияние диазоксиды (DZ) – активатора митохондриального АТР-зависимого  $K^+$ -канала ( $K^+_{АТР}$ -канала) на трансмембранный обмен  $K^+$  в митохондриях печени крыс и образование активных форм кислорода (АФК) в условиях открывания митохондриальной поры (mitochondrial permeability transition pore, МРТР). Установлено, что под действием DZ происходит активация  $K^+$ -цикла (входа  $K^+$  и  $K^+/H^+$ -обмена) с максимальным эффектом в области  $\leq 500$  нМ DZ. Показано, что открывание МРТР приводит также к активации  $K^+$ -цикла при одновременной активации циклического транспорта  $Ca^{2+}$ . В отсутствие деполяризации  $Ca^{2+}$ -цикл поддерживается работой МРТР и  $Ca^{2+}$ -унипортера. Активация  $K^+$ -цикла при открывании МРТР обусловлена стимуляцией  $K^+/H^+$ -обмена, однако дальнейшее ускорение  $K^+/H^+$ -обмена под действием DZ приводит к ингибированию МРТР. Показано также, что DZ снижает скорость образования АФК при открывании МРТР в митохондриях печени. Сделан вывод, что уменьшение продукции АФК, как и активация  $K^+/H^+$ -обмена, являются составляющими комплексного механизма ингибирования МРТР под действием активатора  $K^+_{АТР}$ -канала.

**К л ю ч е в ы е с л о в а:** митохондриальная пора,  $K^+_{АТР}$ -канал,  $K^+/H^+$ -обмен,  $Ca^{2+}$ -цикл, активные формы кислорода, митохондрии печени крыс.

**И**сследование биоэнергетических эффектов потенциалзависимого транспорта  $K^+$  началось в 60-ые годы прошлого столетия. Однако в работах 60–80-ых годов изучение потенциалзависимого транспорта  $K^+$  представляло скорее теоретический интерес, поскольку считали, что эндогенная система потенциалзависимого входа  $K^+$  в митохондриях отсутствует. Открытие АТР-зависимого  $K^+$ -канала ( $K^+_{АТР}$ -канала) [1] и выявление кардиопротекторных эффектов его фармакологических активаторов (диазоксиды, пинацидила, никорандила и др.) [2, 3] вызвало интерес самых широких кругов исследователей, изучающих транспорт калия и его влияние на митохондриальные функции.

Известно, что в митохондриях присутствует система трансмембранного обмена  $K^+$ , включающая потенциалзависимый вход  $K^+$  через

$K^+$ -каналы [4] и электронейтральный выход  $K^+$  через  $K^+/H^+$ -обменник, которые вместе образуют митохондриальный  $K^+$ -цикл [5]. АТР-зависимый вход  $K^+$  через  $K^+_{АТР}$ -канал составляет значительную долю транспорта  $K^+$  в митохондриях, и его физиологическая значимость в настоящее время не вызывает сомнений. Исследования последнего времени, в том числе и наши собственные, показали, что АТР-зависимый транспорт  $K^+$  является физиологически важным модулятором митохондриальных функций и энергозависимых процессов в митохондриях: дыхания [6–8], митохондриального объема [5], циклического транспорта  $K^+$  [8], транспорта  $Ca^{2+}$  [9], синтеза АТР [7, 10, 11] и продукции активных форм кислорода (АФК) [12, 13].

Активаторы  $K^+_{АТР}$ -канала оказывают цитопротекторные эффекты в разных типах клеток,

и их действие близко к феномену ишемической адаптации (preconditioning) [2, 3, 14]. Полагают, что и механизм ишемической адаптации включает активацию  $K^+_{ATP}$ -канала [14, 15]. По мнению исследователей, защитное действие активаторов  $K^+_{ATP}$ -канала направлено на подавление активности митохондриальной циклоспоринчувствительной поры (mitochondrial permeability transition pore, МРТР), открывание которой ведет к индукции апоптоза и некроза клеток [16]. Предполагаемый комплексный защитный механизм включает ограничение входа  $Ca^{2+}$  [9], регуляцию митохондриального объема [5] и продукции АФК [12, 13]. Однако роль каждого из этих эффектов в ингибировании МРТР под действием активаторов  $K^+_{ATP}$ -канала всё ещё не вполне доказана.

Известно, что АФК являются триггерами открывания МРТР и могут многократно усиливать ее активность по механизму положительной обратной связи, ROS-induced ROS release [17]. В то же время, опубликованные в литературе данные не дают однозначного представления о роли АТР-зависимого входа  $K^+$  в регуляции митохондриальной продукции АФК. К настоящему времени показано как снижение [12, 18], так и повышение продукции АФК [13] под действием фармакологических активаторов  $K^+_{ATP}$ -канала. Соответственно, предлагаются и возможные механизмы цитопротекторных эффектов активаторов  $K^+_{ATP}$ -канала, которые в качестве центрального звена включают подавление МРТР. Так, по мнению авторов работ [12, 18], механизм защиты клеток от апоптоза под действием активаторов  $K^+_{ATP}$ -канала непосредственно обусловлен снижением образования АФК в митохондриях, в результате чего происходит ингибирование МРТР и предотвращение апоптоза кардиомиоцитов. Однако, по мнению Гарлида, в работах которого показано повышение продукции АФК при активации  $K^+_{ATP}$ -канала митохондрий сердца, кардиопротекторный эффект активаторов обусловлен активацией митохондриальной протеинкиназы С пероксидом водорода, образующимся в матриксе вследствие входа  $K^+$ , фосфорилированием анионного канала VDAC и блокированием МРТР [15].

Во многих работах уменьшение продукции АФК под действием активаторов  $K^+_{ATP}$ -канала объясняют «мягким разобщением» дыхательной цепи вследствие активации  $K^+$ -цикла митохондрий, по аналогии с «мягким» протонофор-

ным разобщением дыхательной цепи, которое снижает продукцию АФК в митохондриях [19]. Однако авторы цитируемых работ не приводят данных в подтверждение того, что снижение продукции АФК как-либо связано с  $K^+$ -циклом митохондрий. Кроме того, отмечают целый ряд побочных эффектов диазоксида, не обусловленных активацией  $K^+_{ATP}$ -канала. В частности, в наших работах показано неспецифическое повышение входа  $K^+$  под действием диазоксида [8, 11]. Известно также, что диазоксид может подавлять дыхание митохондрий [20] и в высоких концентрациях обладает протонофорными свойствами [6].

Ранее мы показали, что диазоксид активирует митохондриальный  $K^+/H^+$ -обмен [8,21] и активация  $K^+/H^+$ -обмена сопровождается ингибированием МРТР [11, 21]. Поскольку активность МРТР зависит также и от продукции АФК, целью настоящей работы было продолжить исследование влияния диазоксида на трансмембранный обмен  $K^+$  в митохондриях печени и изучить влияние этого активатора  $K^+_{ATP}$ -канала на образование АФК в условиях открывания митохондриальной поры.

### Материалы и методы

В опытах использовали белых крыс линии Вистар с массой тела 200–250 г. Печень промывали охлажденным 0,9%-ым раствором КСl (4 °С), измельчали и гомогенизировали в 5-кратном объеме среды: 250 мМ сахарозы, 20 мМ трис-НСl буфера, 1 мМ ЭДТА (рН 7,4). Для выделения митохондрий гомогенат центрифугировали 7 мин при 700 g (4 °С); затем супернатант центрифугировали 15 мин при 11 000 g (4 °С). Осадок суспендировали в небольшом объеме среды без добавления ЭДТА и хранили на льду при 4 °С. Содержание протеина определяли методом Лоури.

Светопоглощение регистрировали при 520 нм, начиная с внесения митохондрий в среду инкубации (120 мМ КСl, 2 мМ трис-НСl-буфера (рН 7,4), 5 мМ глутамата Na, 1 мМ  $KH_2PO_4$ ; конечная концентрация протеина 0,3 мг/мл).

Изменение концентрации добавленного  $Ca^{2+}$  в среде регистрировали в присутствии 35 мкМ  $Ca^{2+}$ -индикатора, арсеназо-III с помощью спектрофотометра USB-2000 (Ocean Optics, США), используя стандартную двухволновую методику регистрации при  $\lambda$  654 и 700 нм.

Мембранный потенциал регистрировали спектрофотометрически [22] при  $\lambda$  510 и 525 нм в присутствии 10 мкМ сафранина в среде инкубации. Амплитуду изменения поглощения выражали в % от контроля (энергизованные митохондрии в нулевой момент времени).

Для определения изменений рН матрикса, обусловленных транспортом  $K^+$ , митохондрии нагружали рН-чувствительным зондом 2',7'-бис-(2-карбокситетил)-5(6)-карбокситетилфлуоресцеином, (BCECF, конечная концентрация 10 мкМ) [23]. Пробы инкубировали 10 мин (37 °С), после чего отмывали от зонда. Аликвоты (0,3 мг/мл протеина) вносили в среду инкубации и регистрировали флуоресценцию BCECF при длинах волн возбуждения и эмиссии 509 и 535 нм. Находили разность между интенсивностью флуоресценции зонда (F) и базальной флуоресценцией ( $F_0$ ), которую определяли путем экстраполяции кинетических кривых к нулевому моменту времени. Количественную оценку изменений рН и транспорта протонов проводили с помощью калибровочных кривых, полученных методом потенциометрического титрования аликвот суспензии митохондрий добавлением раствора HCl в присутствии  $5 \cdot 10^{-6}$  М ротенона и  $10^{-6}$  М CCCP с помощью стеклянного микроэлектрода, при параллельной регистрации флуоресценции BCECF в тех же условиях.

Образование АФК изучали по изменению флуоресценции дихлорофлуоресцеина [13]. Для этого митохондрии нагружали нефлуоресцирующим проникающим зондом, 2',7'-дигидродихлорофлуоресцеин диацетатом (DCFH-DA), который гидролизует в матриксе до непроникающего производного (дигидрофлуоресцеина), и после окисления митохондриальными АФК образует дихлорофлуоресцеин (DCF). Суспензию митохондрий нагружали DCFH-DA (конечная концентрация 200 мкМ) в течение 20 мин при 37 °С; после загрузки пробы и отмывки зонда (путем переосаждения митохондрий), суспензию хранили на льду. Аликвоты суспензии (количество протеина 1 мг/мл) вносили в среду инкубации, флуоресценцию DCF регистрировали при длинах волн возбуждения и эмиссии 504 и 525 нм. Из величины флуоресцентного сигнала (F) вычитали базальную флуоресценцию ( $F_0$ ), которую находили путем экстраполяции кинетических кривых к нулевому моменту времени.

Потребление кислорода изучали в стандартных условиях полярографическим методом

в закрытой ячейке с платиновым электродом при 26° (конечная концентрация протеина 1,5–2 мг/мл).

Диазоксид вносили в среду в заданных концентрациях. В зависимости от условий эксперимента в среду также вносили:  $CaCl_2$ , 1 мкМ циклоспорина А, ЭДТА, 5 мМ 4-аминопиридина (4-АП),  $10^{-5}$  М глибенкламида, 1 мМ  $MgCl_2$ , 0,3 мМ АТФ,  $5 \cdot 10^{-6}$  М ротенона,  $10^{-6}$  М CCCP (конечные концентрации). Олигомицин вносили в количестве 1 мкг/мг протеина.

В работе использовали Na-глутамат,  $Na_2$ -АТФ, трис (основание), циклоспорин А (Fluka, Швейцария), диазоксид, 4-аминопиридин, глибенкламид, ротенон, олигомицин, арсеназо-III, CCCP, ЭДТА, 2',7'-бис-(2-карбокситетил)-5(6)-карбокситетилфлуоресцеин (BCECF), сафранин, 2',7'-дигидродихлорофлуоресцеин диацетат (DCFH-DA) (Sigma, США) и другие реактивы марки чда. Растворы готовили на бидистилляте. Достоверность результатов оценивали с помощью парного *t*-критерия Стьюдента.  $P < 0,05$  считали статистически значимой величиной.

### Результаты и обсуждение

*Влияние активатора  $K^+_{ATP}$ -канала на  $K^+$ -цикл в митохондриях печени крыс.* Известно, что в присутствии проникающих анионов (фосфат, ацетат и др.) транспорт  $K^+$  через мембрану митохондрий сопряжен с переносом воды [24]. Набухание вследствие входа  $K^+$  в матрикс и сокращение объема вследствие высвобождения  $K^+$  сопряжены с соответствующими изменениями светопоглощения суспензии, снижением при набухании и повышением при уменьшении объема митохондрий [5]. Это дает возможность спектрофотометрической регистрации обеих стадий  $K^+$ -цикла – потенциалзависимого входа  $K^+$  и его выхода через  $K^+/H^+$ -обменник в среду. Ранее мы показали [8], что после аккумуляции  $K^+$  в матриксе наступает состояние стационарного равновесия между входом и выходом  $K^+$ , которое соответствует стационарной скорости дыхания в состоянии 4 (при отсутствии ADP) и без изменения объема митохондрий (рис. 1, А, I). Мы предложили подход, позволяющий оценить влияние активатора  $K^+_{ATP}$ -канала на митохондриальный  $K^+/H^+$ -обмен и выявить вклад  $K^+_{ATP}$ -канала в трансмембранный обмен  $K^+$  путем селективного блокирования  $K^+_{ATP}$ -канала глибенкламидом и блокирования потенциалзависимых  $K^+$ -каналов

митохондрий их неселективным блокатором 4-аминопиридином (4-AP) [8].

Так, в отсутствие  $\text{Ca}^{2+}$  и циклоспоринчувствительного набухания митохондрий, изменения митохондриального объема в основном обусловлены циклическим транспортом  $\text{K}^+$  [5]. В отсутствие блокаторов  $\text{K}^+$ -каналов регистрируемая скорость изменения светопоглощения

и митохондриального объема,  $V_0$  (рис. 1, А, 1) определяется суммой скоростей выхода  $\text{K}^+$  через  $\text{K}^+/\text{H}^+$ -обменник ( $V_{\text{K/H}}$ ), входа катиона через  $\text{K}^+_{\text{АТР}}$ -канал ( $V_{\text{КАТР}}$ ) и потенциалзависимые  $\text{K}^+$ -каналы ( $V_{\text{К}}$ ):  $V_0 = V_{\text{K/H}} - V_{\text{КАТР}} - V_{\text{К}}$  (1). После селективного блокирования  $\text{K}^+_{\text{АТР}}$ -канала глибенкламидом скорость изменения светопоглощения ( $V_1$ ) равна разности скоростей выхода  $\text{K}^+$  через

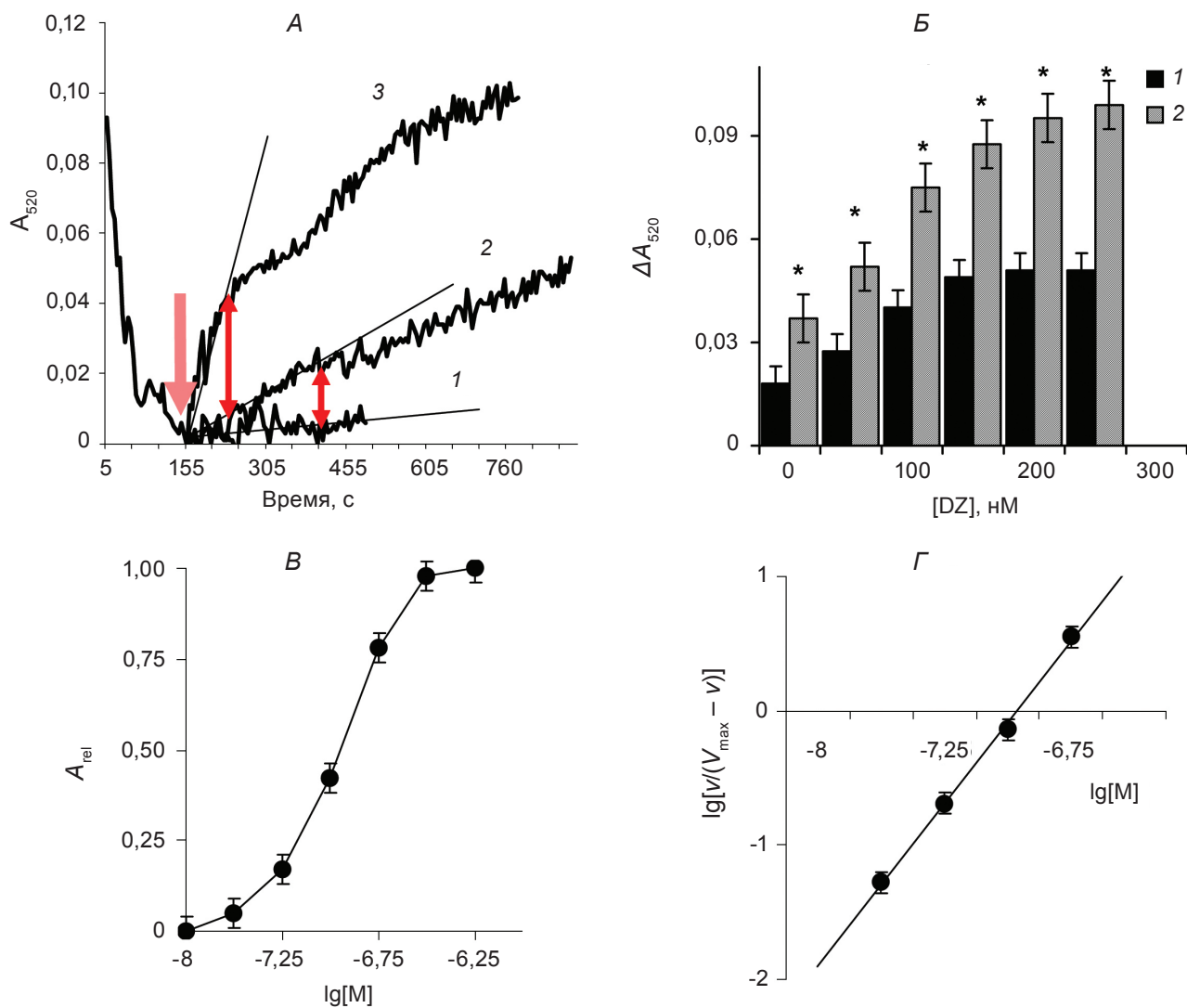


Рис. 1. Влияние блокаторов  $\text{K}^+$ -каналов на светопоглощение суспензии митохондрий. А – светопоглощение регистрировали в отсутствие блокаторов (1) и после внесения глибенкламида (2), глибенкламида и 4-AP (3). Б – амплитуда изменения поглощения после внесения глибенкламида (1) и 4-AP (2). В – влияние DZ на изменение поглощения после блокирования входа  $\text{K}^+$ , в относительных единицах,  $\Delta A_{\text{rel}} = (A - A_0)/(A_{\text{max}} - A_0)$ . Г – линеаризация концентрационной зависимости (В) в координатах Хилла. В среду инкубации вносили: 1 мМ ЭДТА,  $10^{-5}$  М глибенкламида, 5 мМ 4-AP.  $M \pm t$ ,  $n = 6$ ; \*  $P < 0,05$ , достоверно относительно столбцов (1). По оси абсцисс: время, с (А); концентрация DZ, нМ (Б); логарифм концентрации DZ, [М] (В, Г). По оси ординат: светопоглощение суспензии,  $A_{520}$  усл. ед. (А); амплитуда изменения поглощения,  $\Delta A_{520}$  (Б); относительное изменение амплитуды поглощения,  $\Delta A_{\text{rel}}$  (В); координаты Хилла:  $\lg[A/(A_{\text{max}} - A)]$  (Г)

K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-обменник и входа через K<sup>+</sup>-каналы:  $V_1 = V_{K/H} - V_K$  (2). Блокирование K<sup>+</sup><sub>АТР</sub>-канала совместно с потенциалзависимыми K<sup>+</sup>-каналами приводит к тому, что наблюдаемая скорость изменения светопоглощения ( $V_2$ ) обусловлена в основном работой K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-обмена:  $V_2 = V_{K/H}$  (3). Таким образом, из соотношений (1) и (2) следует, что начальная скорость изменения светопоглощения, обусловленная активностью K<sup>+</sup><sub>АТР</sub>-канала в момент его блокирования равна разности начальных скоростей, регистрируемых в отсутствие блокаторов и после внесения глибенкламида:  $V_{K_{АТР}} = V_1 - V_0$  (4). Из (2) и (3) соответственно следует, что скорость изменения светопоглощения, обусловленная активностью потенциалзависимых K<sup>+</sup>-каналов, равна разности начальных скоростей, регистрируемых после внесения 4-АР совместно с глибенкламидом ( $V_2$ ) и после внесения глибенкламида ( $V_1$ ):  $V_K = V_2 - V_1$  (5). Следует отметить, что условия спектрофотометрической оценки активности K<sup>+</sup><sub>АТР</sub>-канала близки к условиям полярографического метода, который часто используют [6, 7]. Данный подход позволяет выявить вклад K<sup>+</sup><sub>АТР</sub>-канала и АТР-независимых K<sup>+</sup>-каналов в K<sup>+</sup>-цикл в момент их блокирования соответствующими блокаторами.

Как показано нами ранее [8], внесение диазоксидов приводит к активации K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-обмена и повышению начальной скорости и амплитуды сокращения объема митохондрий после блокирования K<sup>+</sup>-каналов глибенкламидом, а также глибенкламидом и 4-АР (рис. 1, Б, столбцы 1, 2). Для оценки активирующего эффекта диазоксидов на K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-обмен амплитуду изменения светопоглощения после совместного внесения глибенкламида и 4-АР выражали в относительных единицах:  $\Delta A_{rel} = (\Delta A - \Delta A_0) / (\Delta A_{max} - \Delta A_0)$ , где  $\Delta A_0$  – изменение светопоглощения после блокирования входа K<sup>+</sup> в контроле, а  $\Delta A_{max}$  – при максимальной активирующей концентрации диазоксидов;  $\Delta A$  – значения, полученные при разных концентрациях DZ (рис. 1, В). Линеаризация установленной зависимости в координатах Хилла дает кажущуюся величину константы активации  $K_{1/2} \sim 130$  нМ диазоксидов (рис. 1, Г).

Судя по результатам экспериментов, активация K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-обмена диазоксидом (рис. 1, Б–Г) происходит в области тех же концентраций активатора  $\leq 500$  нМ, при которых по нашим данным наблюдается ускорение дыхания в состоянии 4 ( $K_{1/2} \sim 140$  нМ [11]), в соответствии с

активацией циклического транспорта K<sup>+</sup> – входа K<sup>+</sup> и K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-обмена. Как мы уже отмечали прежде [8, 11], дальнейшее повышение концентрации DZ не приводит ни к дальнейшей активации K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-обмена, ни к увеличению ускорения дыхания митохондрий. Таким образом, максимальная активация K<sup>+</sup>-цикла происходит в области низких, наномолярных, концентраций диазоксидов. Это указывает на высокое сродство K<sup>+</sup><sub>АТР</sub>-канала нативных изолированных митохондрий к диазоксиду и соответствует данным литературы, согласно которым активация реконструированного K<sup>+</sup><sub>АТР</sub>-канала митохондрий печени диазоксидом происходит в наномолярной области концентраций активатора ( $K_{1/2} \sim 350$  нМ [25]). По нашим данным, АТР-зависимый вход K<sup>+</sup> составляет  $\sim 30\%$  потенциалзависимого входа K<sup>+</sup> в митохондриях печени [8]. При этом, несмотря на высокое сродство диазоксидов к K<sup>+</sup><sub>АТР</sub>-каналу, регистрация светопоглощения показывает также активацию АТР-независимого входа K<sup>+</sup> при тех же концентрациях диазоксидов (рис. 1, Б, столбцы 2), что мы отмечали уже ранее [8, 11]. Этот вывод согласуется с результатами регистрации дыхания в состоянии 4. Так, путем селективного блокирования K<sup>+</sup><sub>АТР</sub>-канала Mg:АТР мы показали, что АТР-зависимая и АТР-независимая компоненты скорости дыхания в состоянии 4 составляют  $4,0 \pm 1,0$  и  $9,0 \pm 1,2$  в нативных митохондриях и, соответственно,  $7,6 \pm 1,3$  и  $12,6 \pm 1,5$  нг-ат. О·мин<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> в присутствии 500 нМ диазоксидов при использовании глутамата в качестве субстрата дыхания [11].

Чтобы убедиться в справедливости выводов, сделанных на основании спектрофотометрических и полярографических данных, нами также была поставлена задача изучить влияние диазоксидов на активность K<sup>+</sup><sub>АТР</sub>-канала и митохондриальный K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-обмен путем регистрации транспорта протонов в митохондриях. Известно, что транспорт K<sup>+</sup> в митохондриях сопровождается эквивалентным (1 : 1) противоположно направленным транспортом ионов H<sup>+</sup> – из матрикса в среду при накоплении K<sup>+</sup> и из среды в матрикс в ходе K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-обмена. Эти транспортные процессы, в свою очередь, сопровождаются изменениями рН матрикса – защелачиванием вследствие выхода протонов и закислением в результате работы K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-обменника [13, 26]. Влияние диазоксидов на транспорт протонов и рН матрикса изучали с помощью рН-чувствительного флуоресцентного зонда BCECF.

На рис. 2 представлены типичные данные, характеризующие влияние модуляторов потенциалзависимого входа  $K^+$  на изменение рН матрикса митохондрий ( $\Delta pH_i$ ). Диазоксид вносили в концентрации 500 нМ, соответствующей максимальной активации  $K^+$ -цикла. Изучали влияние активатора  $K^+_{ATP}$ -канала на начальную скорость транспорта  $H^+$  ( $V_0$ ) и изменение рН матрикса ( $\Delta pH_i$ ) в ходе накопления  $K^+$  (рис. 3, А, Б) и высвобождения катиона через  $K^+/H^+$ -обменник в среду (рис. 3, В, Г). АТР-зависимую компоненту транспорта протонов оценивали путем блокирования  $K^+_{ATP}$ -канала, активированного 500 нМ диазоксидом,  $Mg \cdot ATP$ , а также путем реактивации канала, заблокированного  $Mg \cdot ATP$ , внесением 50 мкМ диазоксидом. Количественную оценку проводили с помощью калибровочных кривых, полученных в присутствии  $Mg^{2+}$  и  $Mg \cdot ATP$ .

Как и при использовании полярографического метода [11], полученные результаты показывают, что  $Mg^{2+}$  блокирует значительную часть потенциалзависимого входа  $K^+$  (рис. 3, А, Б, столбцы 1, 2) и подавляет  $K^+/H^+$ -обмен (рис. 3, В, Г, столбцы 1, 2), что согласуется с данными литературы. В подтверждение наших прежних выводов о недостаточной селективности диазоксидом [8, 11] регистрация рН<sub>i</sub> также выявляет активацию не только  $K^+_{ATP}$ -канала (рис. 3, А, Б, столбцы 4), но и АТР-независимого входа  $K^+$  (рис. 3, А, Б, столбцы 1, 2). Так, вклад нативного и активированного 500 нМ ДЗ  $K^+_{ATP}$ -канала в  $V_0$  транспорта  $H^+$  в условиях потенциалзависимого входа  $K^+$  составляет  $44,0 \pm 5,0$  и  $64,0 \pm 6,0$  нмоль  $H^+ \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ , что близко к результатам приведенной выше полярографической оценки, которая (с учетом стехиометрии К/О = 10) дает 40 и 76 нмоль  $K^+ \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ . При этом, по нашим данным, реактивация  $K^+_{ATP}$ -канала 50 мкМ ДЗ в присутствии  $Mg \cdot ATP$  не повышает вклад  $K^+_{ATP}$ -канала в  $V_0$  транспорта протонов и  $\Delta pH_i$  (рис. 3, А, Б, столбцы 4, 5). В присутствии 500 нМ ДЗ повышается также скорость входа протонов в матрикс (рис. 3, В, столбцы 1, 2) и амплитуда изменения рН в результате накопления  $K^+$  (рис. 3, Б, столбцы 1, 2), что свидетельствует как о повышении входа  $K^+$ , так и об активации  $K^+$ -цикла митохондрий. Активация  $K^+_{ATP}$ -канала диазоксидом также приводит к повышению его вклада в транспорт протонов и  $\Delta pH_i$  (рис. 3, А–Б, столбцы 4).

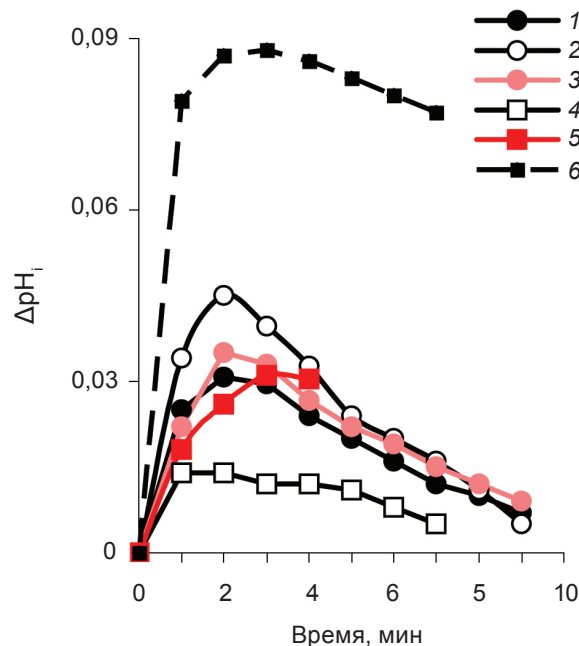


Рис. 2. Влияние модуляторов транспорта  $K^+$  на рН матрикса митохондрий, типичные зависимости. В среду инкубации вносили: 0,01 мМ ЭДТА (1–6), 500 нМ ДЗ (2), 1 мМ  $MgCl_2$ , 500 нМ ДЗ (3),  $Mg \cdot ATP$  в отсутствие либо в присутствии 500 нМ ДЗ (4),  $Mg \cdot ATP$ , 50 мкМ ДЗ (5), 50 мкМ ДЗ (6). По оси абсцисс: время, мин; по оси ординат: изменение рН от момента внесения митохондрий ( $\Delta pH_i$ )

Обращает на себя внимание сильное защелачивание матрикса под действием 50 мкМ диазоксидом, свидетельствующее о резком повышении входа  $K^+$  по сравнению с таковым в нативных митохондриях (рис. 2, кривые 1, 5). При этом вклад реактивированного  $K^+_{ATP}$ -канала в транспорт  $H^+$  остается на уровне АТР-зависимой компоненты транспорта, активированной 500 нМ диазоксидом (рис. 2, кривые 3–5; рис. 3, А, Б, столбцы 4, 5). Это означает, что большая часть активированного высокими концентрациями диазоксидом входа  $K^+$  происходит за счет АТР-независимого транспорта катиона и относится к неспецифическим эффектам ДЗ. Кроме того, высокие концентрации ДЗ, как показывают данные, ингибируют  $K^+/H^+$ -обмен (рис. 2, кривые 1, 6), что объясняет наблюдаемое нами ранее отсутствие активации  $K^+$ -цикла высокими концентрациями ДЗ при регистрации светопоглощения и дыхания митохондрий. Подавление

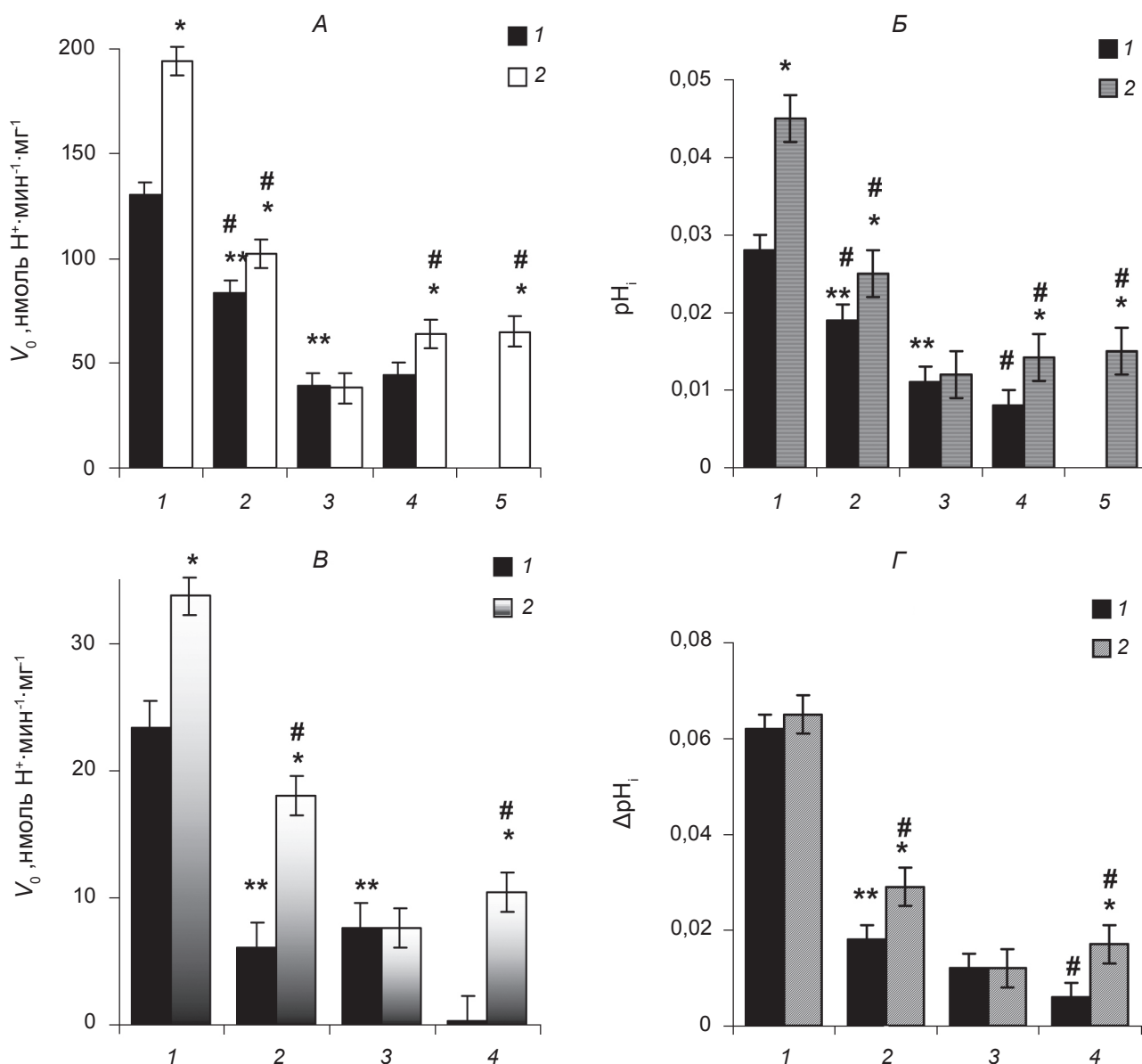


Рис. 3. Влияние модуляторов трансмембранного обмена  $K^+$  на  $V_0$  транспорта протонов и изменение  $pH$  матрикса ( $\Delta pH_i$ ) в условиях накопления (А, Б) и выхода  $K^+$  (В, Г).  $V_0$  и  $\Delta pH_i$  определяли в отсутствие (черные столбцы 1) и в присутствии 500 нМ DZ (белые и серые столбцы 2) при внесении в среду следующих добавок: 0,01 мМ ЭДТА (1–5), 1 мМ  $Mg^{2+}$  (2),  $Mg\text{-}ATP$  (3). Определяли разность показателей в присутствии  $Mg^{2+}$  и  $Mg\text{-}ATP$  (4), а также после внесения 50 мкМ DZ в присутствии  $Mg\text{-}ATP$  (5).  $M \pm t$ ,  $n = 6$ . \*  $P < 0,05$ , достоверно относительно контроля в отсутствие DZ (1–4, черные столбцы 1); #  $P < 0,05$ , достоверно относительно контроля в присутствии  $Mg\text{-}ATP$  (столбец 1,3); \*\*  $P < 0,05$ , достоверно относительно контроля, в отсутствие добавок (столбец 1,1)

$K^+/H^+$ -обмена также может объяснять и отмеченное торможение дыхания под действием диазоксидов [20]. Таким образом, результаты, полученные с помощью ВСЕСФ, подтверждают вывод об активации  $K^+$ -цикла митохондрий наномолярными концентрациями диазоксидов и свидетель-

ствуют об активации АТР-независимого входа  $K^+$  помимо  $K^+_{ATP}$ -канала в отсутствие  $Mg\text{-}ATP$ .

Влияние МРТР на трансмембранный обмен ионов в митохондриях. Открывание МРТР, как уже было показано нами [11], приводит к одновременной активации циклического транспорта

$K^+$  и  $Ca^{2+}$ . На рис. 4 приведены результаты регистрации изменения митохондриального объема и светопоглощения, концентрации  $Ca^{2+}$  в среде и ионов  $H^+$  в матриксе (рис. 4, А–В) под действием модуляторов  $K^+$ - и  $Ca^{2+}$ -циклов в условиях обратимого открывания МРТР, не сопровождаемого деполяризацией митохондрий (рис. 4, Г). Результаты экспериментов показывают, что  $K^+$ -цикл совместно с МРТР участвует в поддержании равновесного митохондриального объема в стационарном состоянии, которое устанавливается после открывания МРТР и набухания митохондрий, и при котором скорость изменения светопоглощения ( $V_0$ ) практически равна нулю (рис. 4, А, I). Как и в случае одного лишь  $K^+$ -цикла (рис. 1, А) блокирование отдельных компонент транспорта позволяет выявить их участие в регуляции объема митохондрий. Так, внесение неселективного блокатора потенциалзависимых  $K^+$ -каналов 4-АР приводит к повышению светопоглощения (рис. 4, А, 2), что указывает на участие  $K^+$ -каналов в регуляции объема матрикса при открывании МРТР. Таким образом, в равновесных условиях в регуляции объема матрикса участвуют МРТР,  $K^+$ -каналы и  $K^+/H^+$ -обмен, которые и определяют наблюдаемую скорость изменения светопоглощения (рис. 4, А, I):

$$V_0 = V_{K/H} - V_{MPTP} - V_K \quad (1),$$

где  $V_{K/H}$  – скорость сокращения объема вследствие  $K^+/H^+$ -обмена,  $V_{MPTP}$  и  $V_K$  – скорость набухания вследствие работы МРТР и  $K^+$ -каналов. После блокирования  $K^+$ -каналов в регуляции митохондриального объема участвуют только  $K^+/H^+$ -обмен и МРТР (рис. 4, А, 2):

$$V_1 = V_{K/H} - V_{MPTP} \quad (2).$$

Блокирование МРТР циклоспорином А (рис. 4, А, 3) приводит к тому, что наблюдаемое повышение светопоглощения и уменьшение объема митохондрий происходит в результате работы  $K^+/H^+$ -обмена в условиях одновременного входа  $Ca^{2+}$  в матрикс ( $V_2 = V_{K/H}$  (3)) либо в условиях полного удаления  $Ca^{2+}$  ЭДТА ( $V_3 = V_{K/H}$  (4)), после чего  $K^+/H^+$ -обмен восстанавливает митохондриальный объем до первоначального (рис. 4, А, 4). Как показано [21], вход  $Ca^{2+}$  в матрикс после внесения циклоспорина А (рис. 4, Б, 2) приводит к ингибированию  $K^+/H^+$ -обмена и снижает амплитуду сокращения объема митохондрий (рис. 4, А, 3, 4).

Как следует из (1) и (2), доля  $K^+$ -каналов в регуляции объема митохондрий определяется разностью скоростей изменения светопоглощения в отсутствие блокаторов ( $V_0$ ) и в момент блокирования  $K^+$ -каналов 4-АР ( $V_1$ ):  $V_K = V_1 - V_0$ . В то же время, вклад МРТР соответствует циклоспоринчувствительной разности начальных скоростей изменения объема в отсутствие и в присутствии циклоспорина А (рис. 4, А, 2, 3):  $V_{MPTP} = V_2 - V_1$ . Циклоспоринчувствительное изменение объема митохондрий оценивали в условиях одновременного блокирования  $K^+$ -каналов 4-АР. Внесение блокатора  $K^+$ -каналов показывает их участие в поддержании равновесного объема при открывании МРТР. 4-АР не влияет на циклоспоринчувствительный транспорт  $Ca^{2+}$  (рис. 4, Б) и соответственно на оценку вклада МРТР в регуляцию объема матрикса.

Согласно данным (рис. 4, Б), при открывании МРТР происходит также активация  $Ca^{2+}$ -цикла, который поддерживается одновременной работой МРТР и  $Ca^{2+}$ -унипортера. Открывание МРТР вследствие входа  $Ca^{2+}$  в матрикс приводит к циклоспоринчувствительному высвобождению  $Ca^{2+}$  (рис. 4, Б, I) и приводит к стационарному равновесию, при котором наблюдаемая скорость транспорта  $Ca^{2+}$  ( $V_0$ ) является результатом одновременной работы  $Ca^{2+}$ -унипортера ( $V_{Ca}$ ), МРТР ( $V_{MPTP}$ ) и  $Ca^{2+}/H^+$ -обмена ( $V_{Ca/H}$ ) и равна нулю. Активностью  $Ca^{2+}/H^+$ -обмена в условиях эксперимента можно пренебречь, из чего следует, что  $V_0 = V_{MPTP} - V_{Ca}$  (5). Блокирование МРТР позволяет регистрировать вход  $Ca^{2+}$  через  $Ca^{2+}$ -унипортер (рис. 4, Б, 2):  $V_1 = V_{Ca}$  (6). Соответственно из (5), активность МРТР определяется суммой скоростей  $V_1 + V_0$ , и поскольку  $V_0 = 0$ ,  $V_{MPTP} = V_1$ . Поэтому вход  $Ca^{2+}$  в матрикс после блокирования МРТР циклоспорином А свидетельствует о функциональной активности как МРТР, так и  $Ca^{2+}$ -унипортера, которые вместе поддерживают  $Ca^{2+}$ -цикл при открывании МРТР.

Если равновесное распределение  $Ca^{2+}$  поддерживается работой только  $Ca^{2+}$ -транспортных систем, то в регистрируемом распределении ионов  $H^+$  после выхода  $Ca^{2+}$  через пору участвует также и  $K^+$ -цикл (рис. 4, Б). Скорость транспорта протонов в состоянии равновесия ( $V_0$ ) равна сумме скоростей их входа в матрикс через пору ( $V_{MPTP}$ ), выхода из матрикса вследствие потенциалзависимого входа  $Ca^{2+}$  через  $Ca^{2+}$ -унипортер



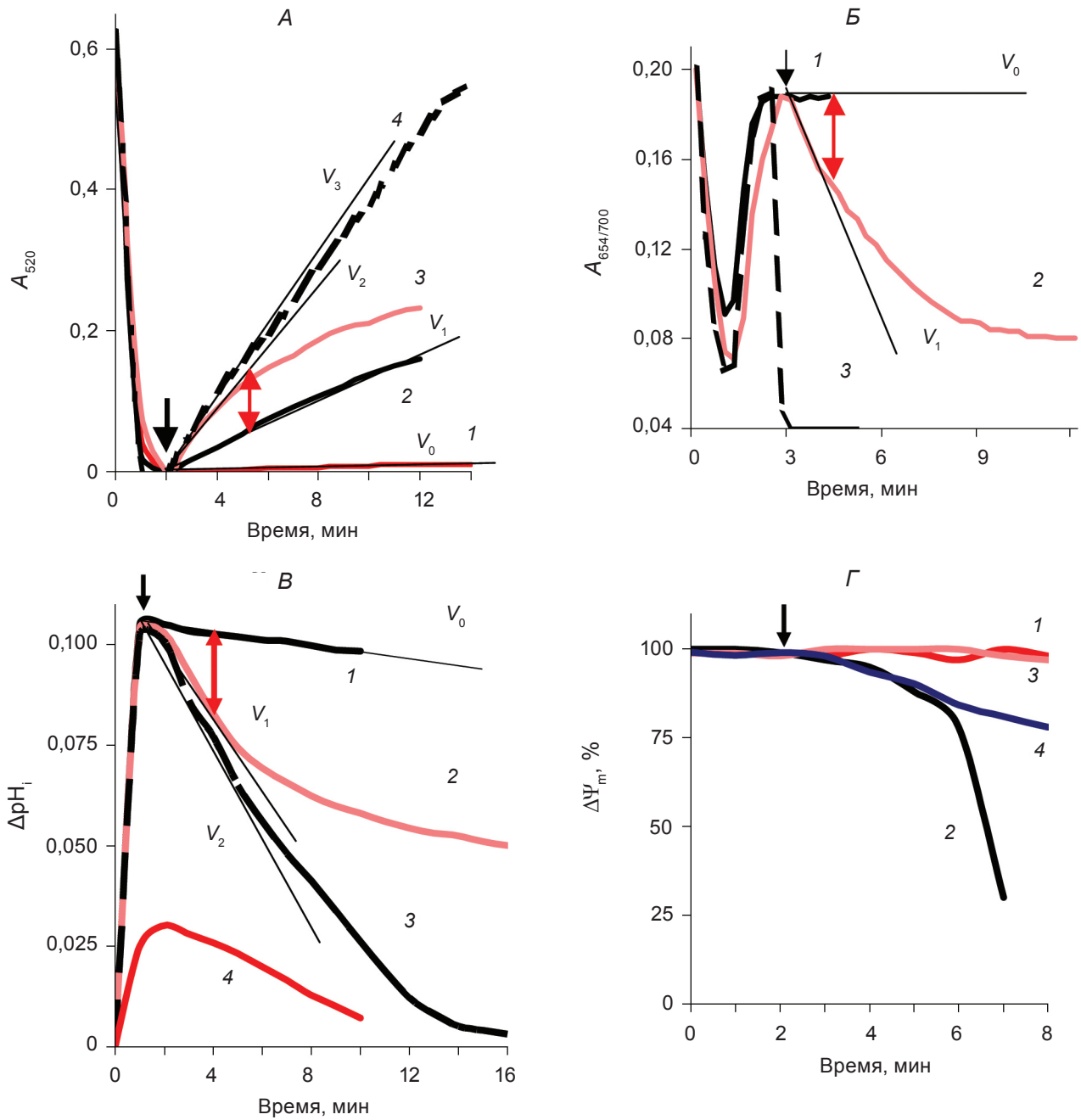


Рис. 4. Влияние модуляторов МРТР и транспорта  $K^+$  на светопоглощение суспензии митохондрий (А), концентрацию  $Ca^{2+}$  в среде (Б), рН матрикса (В) и мембранный потенциал митохондрий печени (Г). Изменение параметров регистрировали от момента внесения митохондрий в среду. Внесение 4-АР (А, кривые 2–4), циклоспорина А (А, кривая 3; Б, В, кривые 2; Г, кривая 3), 0,01 мМ ЭДТА (Б, В, кривая 3; А, Г, кривая 4) указано стрелкой.  $Ca^{2+}$  вносили в среду инкубации в концентрации 10 мкМ. В, кривая 4 – митохондрии вносили в среду в присутствии 0,01 мМ ЭДТА. Г, кривые 1 и 2 соответствуют внесению митохондрий в среду в присутствии (1) и в отсутствие (2) циклоспорина А. По оси абсцисс: время, мин; по оси ординат: светопоглощение,  $A_{520}$  (А); поглощение в присутствии арсеназо-III,  $A_{654/700}$  (Б); изменение рН матрикса,  $\Delta pH_i$  (В); мембранный потенциал,  $\Delta\Psi_m$ , % от контроля. За 100% принимали  $\Delta\Psi_m$  в начальный момент времени. Стрелкой обозначена циклоспоринчувствительная разность начальных скоростей изменения параметров, пояснения в тексте

( $V_{Ca}$ ), а также входа в матрикс в результате  $K^+/H^+$ -обмена ( $V_{K/H}$ ):  $V_0 = V_{Ca} - V_{K/H} - V_{MPTP}$  (7). Блокирование МРТР циклоспорином А (рис. 4, В, 2) приводит к входу протонов в матрикс вследствие работы  $Ca^{2+}$ -унипортера и  $K^+/H^+$ -обмена:  $V_1 = V_{Ca} - V_{K/H}$  (8). Из приведенных соотношений следует, что как и в других случаях (рис. 4, А, В), активность МРТР характеризуется разностью скоростей транспорта ионов  $H^+$  в отсутствие и в присутствии циклоспорина А (рис. 4, В, 1, 2):  $V_{MPTP} = V_1 - V_0$  (9). Как и в случае светопоглощения, элиминация  $Ca^{2+}$ -цикла позволяет регистрировать вход протонов в матрикс вследствие работы  $K^+/H^+$ -обмена (рис. 4, А, 4; В, 3):  $V_2 = V_{K/H}$  (10). Открывание МРТР приводит к активации  $K^+/H^+$ -обмена (рис. 4, В, 3, 4), что соответствует данным, полученным при регистрации светопоглощения, которые показывают повышение скорости и амплитуды сокращения объема митохондрий по сравнению с контролем (рис. 1, А, 3; рис. 4, А, 4). Скорость транспорта протонов в матрикс возрастает с  $23,0 \pm 4,0$  нмоль  $H^+ \cdot мин^{-1} \cdot мг^{-1}$  до  $60 \pm 7$  нмоль  $H^+ \cdot мин^{-1} \cdot мг^{-1}$ , что соответствует наблюдаемому нами ранее ускорению дыхания в состоянии 4 при открывании МРТР по сравнению с контролем от  $11,5 \pm 1,2$  до  $28 \pm 2$  нг-ат. О-мин<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> [11]. Таким образом, активация  $K^+$ -цикла при открывании МРТР происходит за счет активации  $K^+/H^+$ -обмена, тогда как ускорение  $Ca^{2+}$ -цикла обусловлено работой МРТР. Следует отметить, что открывание МРТР приводит к более сильному защелачиванию матрикса (рис. 4, В, 1–3) по сравнению с контролем в бескальциевой среде (рис. 4, В, 4). Согласно с данными литературы, наблюдаемый эффект можно объяснить одновременным входом  $K^+$  и  $Ca^{2+}$  в случае МРТР, большим связыванием катионов в матриксе и высвобождением большего количества ионов  $H^+$  из матрикса в среду, что и ведет к повышению  $pH_i$  [13, 26]. При этом быстрый трансмембранный обмен ионов  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  и  $H^+$ , несмотря на активацию  $K^+/H^+$ -обмена, поддерживает высокий стационарный уровень внутримитохондриального  $pH$  (рис. 4, В, 1).

Известно, что скорость дыхания в состоянии 4 контролируется циклическим транспортом протонов,  $H^+$ -циклом, в котором скорость выхода протонов вследствие работы дыхательной цепи равна скорости потенциалзависимого входа ионов  $H^+$  в матрикс через  $H^+$ -проводящие структуры мембраны [27]. При открывании

МРТР циклический транспорт  $Ca^{2+}$ , поддерживаемый МРТР и  $Ca^{2+}$ -унипортером, вносит вклад в скорость дыхания и  $H^+$ -цикл митохондрий, поскольку вход  $Ca^{2+}$  в матрикс сопровождается эквивалентным выходом  $H^+$  вследствие работы дыхательной цепи, тогда как выход  $Ca^{2+}$  через пору сопровождается входом  $H^+$  в матрикс вследствие показанного нами ранее циклоспоринчувствительного  $Ca^{2+}:H^+$ -обмена [28].

Как показано выше (рис. 4, В), стационарная скорость дыхания в условиях функционально активной МРТР поддерживается равенством скоростей входа  $Ca^{2+}$  через унипортер и высвобождения через пору. Поскольку обе компоненты в равной мере обеспечивают  $Ca^{2+}$ -цикл, блокирование каждой из них должно в равной мере снижать скорость дыхания митохондрий. Сказанное подтверждается результатами блокирования МРТР и  $Ca^{2+}$ -унипортера соответственно циклоспорином А и рутениевым красным, которые показывают примерно равный их вклад в скорость дыхания митохондрий (рис. 5, А, столбцы 1, 2).

*Влияние активатора  $K^+_{ATP}$ -канала на образование АФК в условиях открывания МРТР.* Согласно результатам эксперимента активация  $K^+_{ATP}$ -канала диазоксидом приводит к снижению вклада циклоспоринчувствительной компоненты как в скорость дыхания, так и в регуляцию митохондриального объема (рис. 5, А, В), что свидетельствует о подавлении функциональной активности МРТР. Наблюдается корреляция между активацией  $K^+/H^+$ -обмена с повышением концентрации диазоксида (рис. 1, В, В) и снижением активности МРТР (рис. 5, В, столбцы 1, 2). В то же время возрастает циклоспориннечувствительная компонента регуляции митохондриального объема, обусловленная активностью  $K^+/H^+$ -обмена (рис. 5, В, 1, 2). Закономерно сделать вывод, что повышение активности  $K^+/H^+$ -обмена под действием активатора  $K^+_{ATP}$ -канала приводит к ингибированию МРТР.

Согласно с существующими представлениями подавление МРТР лежит в основе цитопротекторного действия активаторов  $K^+_{ATP}$ -канала [2, 3, 12, 15]. Однако молекулярные механизмы блокирования МРТР при активации  $K^+_{ATP}$ -канала все еще неясны. Можно предположить, что комплексная модуляция функционального состояния митохондрий приводит в действие целый ряд механизмов, ведущих к ингибированию

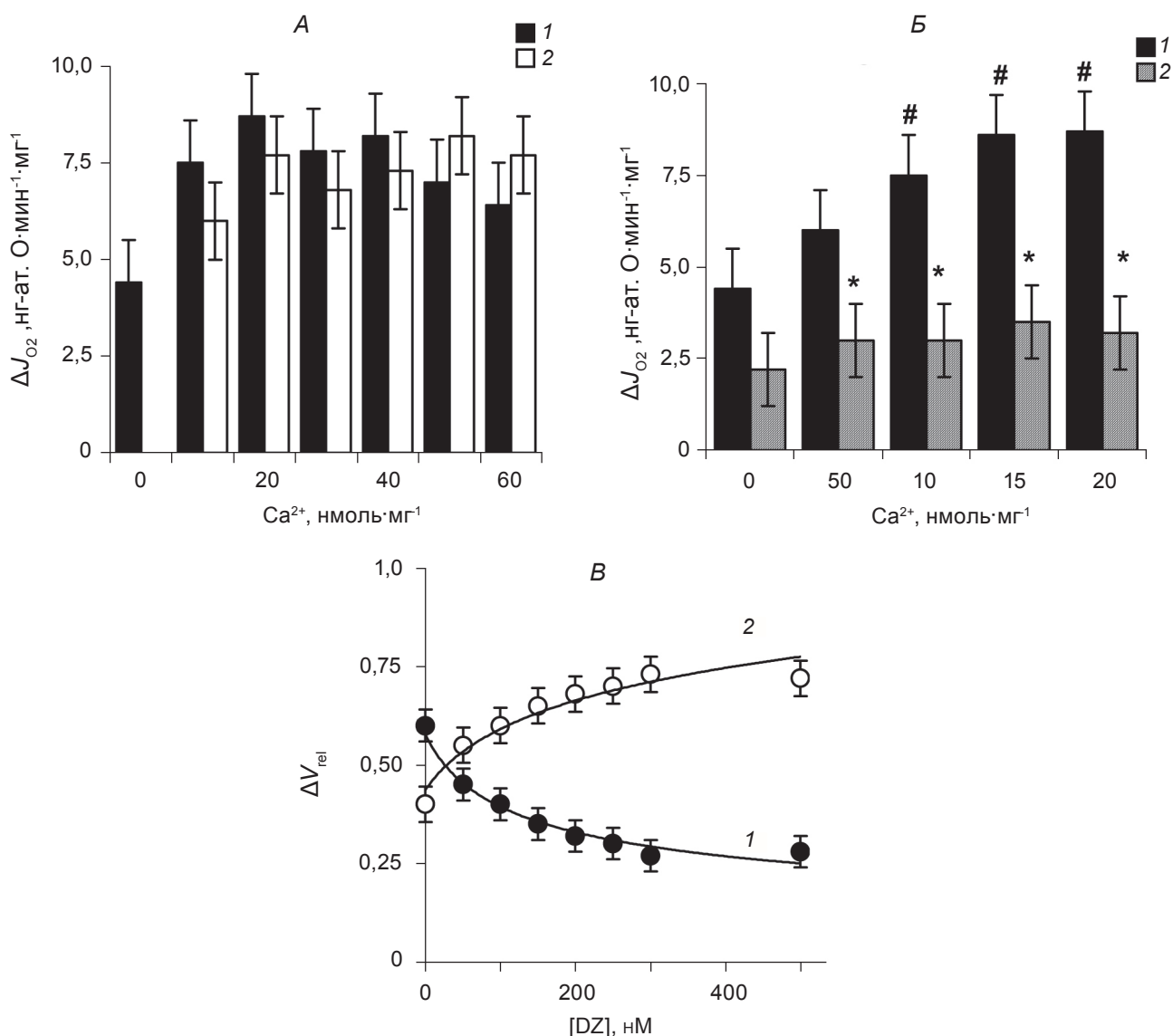


Рис. 5. Влияние DZ на циклоспоринчувствительную компоненту скорости дыхания и сокращения объема митохондрий. А – Вклад МРТР (1) и Ca<sup>2+</sup>-унипортера (2) в скорость дыхания в состоянии 4 оценивали по разности, соответственно, в отсутствие и в присутствии 1 мкМ циклоспорина А (1) и 10 мкМ рутениевого красного (2). Б – Влияние DZ на циклоспоринчувствительную компоненту скорости дыхания оценивали в отсутствие (1) и в присутствии 500 нМ DZ (2). В – Вклад МРТР и K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-обмена в начальную скорость сокращения объема (ΔV<sub>rel</sub>) оценивали в относительных единицах, принимая максимальную скорость сокращения объема после блокирования МРТР и K<sup>+</sup>-каналов (V<sub>2</sub> – V<sub>0</sub>) за 1. В этом случае вклад МРТР (ΔV<sub>1</sub>) и K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-обмена (ΔV<sub>2</sub>) в регуляцию объема митохондрий соответственно составляет: ΔV<sub>1</sub> = (V<sub>2</sub> – V<sub>1</sub>)/(V<sub>2</sub> – V<sub>0</sub>) и ΔV<sub>2</sub> = (V<sub>1</sub> – V<sub>0</sub>)/(V<sub>2</sub> – V<sub>0</sub>) (рис. 4, А, пояснения в тексте). Ca<sup>2+</sup> вносили в концентрации 10 мкМ. M ± t, n = 4; \*P < 0,05, достоверно относительно столбцов 1; #P < 0,05, достоверно относительно нулевого значения в отсутствие добавленного Ca<sup>2+</sup> (Б, столбцы 1). По оси абсцисс: количество добавленного Ca<sup>2+</sup>, нмоль·мг<sup>-1</sup> (А, Б); концентрация DZ, нМ (В)

МРТР, и активация K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-обмена под действием диазоксидом (рис. 1, В, рис. 5, В, 2) является не единственной причиной наблюдаемого уменьшения активности МРТР (рис. 5, Б, столбцы 2).

Известно, что АФК являются триггерами открывания МРТР, и ее активность регулируется АФК, которые продуцируются в митохондриях [17]. Поэтому для выявления механизмов регу-

ляции МРТР в условиях активации  $K^+_{ATP}$ -канала и  $K^+$ -цикла представляет интерес изучить влияние диазоксидов на образование АФК в условиях одновременного открывания МРТР. Скорость образования АФК регистрировали после установления стационарной скорости дыхания в состоянии 4, которую контролировали полярографически.

В отсутствие субстрата окисления скорость образования АФК митохондриями печени близка к нулю (данные не приведены). Окисление субстрата (глутамата) сопровождается линейным возрастанием флуоресценции DCF (рис. 6, А, 1–4), которое свидетельствует о постоянной скорости окисления зонда образующимися АФК, а также об определенном стационарном уровне АФК, который поддерживается одновременной работой дыхательной цепи и систем метаболизма АФК в матриксе [29].

Согласно с результатами эксперимента внесение диазоксидов в концентрации, соответствующей максимальной активации  $K^+/H^+$ -обмена и  $K^+$ -цикла, приводит к заметному снижению скорости образования АФК (рис. 6, А, 3, 4). Максимальное количество АФК образуется в контроле, в присутствии циклоспорина А (рис. 6, А, 1), тогда как минимальное – в условиях открывания МРТР при одновременной активации  $K^+$ -цикла митохондрий диазоксидом (рис. 6, А, 4; Б, столбец III, 1). Дыхательный контроль (рис. 6, Б, столбцы I–III, 2) оценивали как отношение скорости разобщенного дыхания к скорости дыхания в состоянии 4 [30]. Наблюдается соответствие между снижением скорости образования АФК в состоянии 4 (рис. 6, Б, столбцы I–III, 1), снижением дыхательного контроля (рис. 6, Б, столбцы I–III, 2) и повышением скорости дыхания (рис. 6, Б, столбцы I–III, 3). Поскольку по нашим данным указанные процессы не сопровождаются деполяризацией мембраны во время эксперимента, можно сделать вывод, что активация  $K^+$ -цикла и  $K^+/H^+$ -обмена под действием активатора  $K^+_{ATP}$ -канала, сопровождаемая ускорением трансмембранного обмена ионов  $H^+$ , является основной причиной снижения продукции АФК в митохондриях печени. Это позволяет объяснить снижение продукции АФК ускорением дыхания, транспорта электронов и циклического транспорта протонов в условиях одновременной активации  $K^+$ - и  $Ca^{2+}$ -циклов митохондрий при резком разобщении дыхательной

цепи вследствие активации трансмембранного ионного обмена (рис. 6, Б, столбцы III, 2, 3).

По данным литературы, рН матрикса является важным фактором регуляции АФК в митохондриях [13, 31], однако однозначные представления о регуляторных механизмах контроля продукции АФК в условиях потенциалзависимого транспорта и трансмембранного обмена катионов все еще отсутствуют. Так, в работах Гарлида показана корреляция между повышением  $pH_i$  и возрастанием продукции АФК в условиях АТР-зависимого входа  $K^+$  в митохондриях сердца [13, 15]. В то же время, наблюдаемое нами снижение продукции АФК в условиях активации  $K^+/H^+$ -обмена также согласуется с опубликованными данными. Так, показано снижение продукции АФК в митохондриях печени под действием  $K^+/H^+$ -ионофора – нигерицина [31]. Известно, что нигерицин снимает трансмембранную разность рН,  $\Delta pH$ , что приводит к повышению  $\Delta \Psi_m$  при постоянной величине электрохимического потенциала протонов,  $\Delta \mu H^+$  [31]. Поэтому наиболее вероятным механизмом снижения продукции АФК под действием нигерицина является относительное закисление матрикса, которое, само по себе, подавляет образование супероксида [32]. По-видимому, подобный механизм действует и в случае активации эндогенного  $K^+/H^+$ -обмена под действием диазоксидов. Хотя активация АТР-зависимого входа  $K^+$  не устраняет трансмембранную разность рН, а, напротив, повышает ее в результате аккумуляции  $K^+$  в матриксе (рис. 2, 2), последующая активация  $K^+/H^+$ -обмена (рис. 2, 2; рис. 3, В, Г, столбцы 1, 4) приводит к снижению продукции АФК, что в особенности проявляется при одновременном открывании МРТР. Выше мы уже отмечали, что в условиях открывания МРТР происходит намного большее защелачивание матрикса, чем в контроле, в бескальциевой среде (рис. 4, В, 1, 4). При этом одновременная активация  $K^+$ -цикла под действием DZ приводит к образованию минимального количества АФК (рис. 6, Б, столбцы III, 1). Можно высказать предположение, что, как и в случае синтеза АТР [33], для образования АФК важен не столько рН объемной фазы (матрикса), сколько локальные градиенты рН, образующиеся в поверхностном слое мембраны, где как раз и локализованы основные редокс-активные сайты дыхательной цепи [29]. Эти локальные градиенты рН могут устраняться при акти-

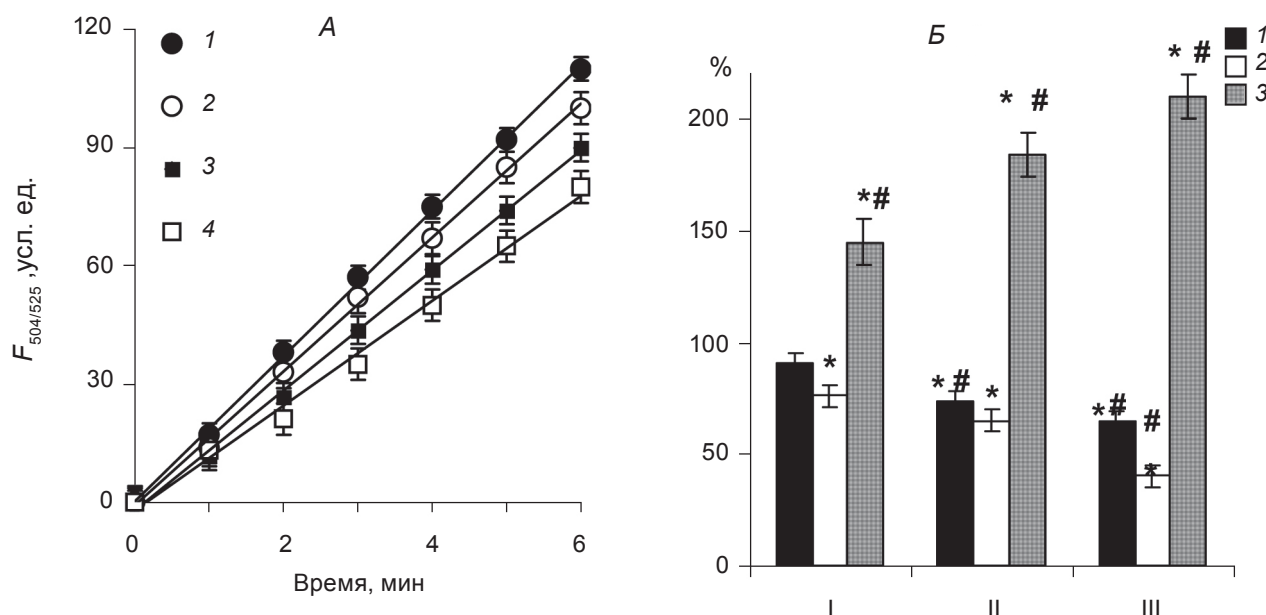


Рис. 6. Влияние диазоксидна на скорость образования АФК в митохондриях печени. А – изменение флуоресценции DCF, типичные зависимости. Б – скорость образования АФК (столбцы I–III, 1), дыхательный контроль (столбцы I–III, 2) и скорость дыхания в состоянии 4 (столбцы I–III, 3) в % относительно контроля. За 100% принимали значения, полученные в присутствии циклоспорина А. В среду инкубации вносили следующие добавки: 10 мкМ CaCl<sub>2</sub> (А, Б) циклоспорин А (А, кривая 1), циклоспорин А, 500 нМ DZ (А, кривая 3; Б, столбцы II), 500 нМ DZ (А, кривая 4; Б, столбцы III). М ± m, n = 4. \* P < 0,05, достоверно относительно контроля; # P < 0,05, достоверно относительно столбцов I. По оси абсцисс: время, мин (А); по оси ординат: флуоресценция DCF, F<sub>504/525</sub>, усл. ед. (А); показатели в % от контроля (Б)

вации K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-обмена и циклического транспорта протонов в условиях одновременной активации K<sup>+</sup>- и Ca<sup>2+</sup>-циклов митохондрий, что и объясняет независимое от рН<sub>i</sub> снижение продукции АФК под действием активатора K<sup>+</sup><sub>АТР</sub>-канала.

Таким образом, результаты экспериментов показывают, что, несмотря на участие МРТР в разобщающем эффекте (рис. 6, Б, столбцы III), активация K<sup>+</sup>-цикла диазоксидом снижает ее функциональную активность (рис. 5, Б, столбцы 2). Возможно, уменьшение продукции АФК является составляющей комплексного феномена подавления активности МРТР под действием активатора K<sup>+</sup><sub>АТР</sub>-канала, и наблюдаемый ингибиторный эффект активации K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-обмена усиливается одновременным снижением продукции АФК. Хотя по нашим данным открывание МРТР уже само по себе активирует K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-обмен в митохондриях (рис. 4, А, В), его дальнейшая активация диазоксидом, может играть роль механизма обратной связи, действие которого направлено на подавление МРТР либо ограниче-

ние ее функциональной активности. Показанное нами одновременное ингибирование системы окислительного фосфорилирования [11] под действием активатора K<sup>+</sup><sub>АТР</sub>-канала в физиологических условиях может являться дополнительным регуляторным механизмом, служащим для поддержания низкой концентрации АТР и высокой активности K<sup>+</sup><sub>АТР</sub>-канала, которая путем активации K<sup>+</sup>-цикла и понижения продукции АФК поддерживает МРТР в состоянии низкой функциональной активности.

Показано, что кардиопротекторное действие активаторов K<sup>+</sup><sub>АТР</sub>-канала, как и эффект ишемической адаптации, является комплексным феноменом, приводящим в действие сложную систему регуляторных механизмов клетки, включающую сигнальные клеточные механизмы, такие как активация протеинкиназ [15]. Для окончательного выявления механизмов регуляции МРТР в условиях активации K<sup>+</sup><sub>АТР</sub>-канала потребуется еще немало усилий исследователей. В то же время результаты проведенных нами

експериментів дають основания полагать, что установленные эффекты диазоксида – как активация  $K^+/H^+$ -обмена, так и снижение продукции АФК, – являются составляющими комплексного феномена ингибирования МРТР и вносят вклад в цитопротекторные эффекты фармакологических активаторов  $K^+_{ATP}$ -канала.

**ВПЛИВ АКТИВАТОРА АТР-ЗАЛЕЖНОГО  $K^+$ -КАНАЛУ НА ТРАНСМЕМБРАННИЙ ОБМІН КАЛІЮ І УТВОРЕННЯ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ В УМОВАХ ВІДКРИВАННЯ МІТОХОНДРІАЛЬНОЇ ПОРИ**

*О. В. Аконова, Л. І. Колчинська, В. І. Носар, В. А. Бурій, І. М. Маньковська, В. Ф. Сагач*

Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця  
НАН України, Київ;  
e-mail: a-dubensky@mail.ru

Досліджено вплив активатора мітохондріального АТР-залежного  $K^+$ -каналу ( $K^+_{ATP}$ -каналу) діазоксида (DZ) на трансмембранний обмін  $K^+$  в мітохондріях печінки щурів і утворення активних форм кисню (АФК) в умовах відкриття мітохондріальної пори (mitochondrial permeability transition pore, МРТР). Встановлено, що за дії DZ відбувається активація  $K^+$ -циклу (входу  $K^+$  та  $K^+/H^+$ -обміну) з максимальним ефектом в області  $\leq 500$  нМ DZ. Показано, що відкриття МРТР також призводить до активації  $K^+$ -циклу у разі одночасної активації циклічного транспорту  $Ca^{2+}$ . За відсутності деполаризації  $Ca^{2+}$ -цикл підтримується роботою МРТР і  $Ca^{2+}$ -уніпортера. Активація  $K^+$ -циклу під час відкриття МРТР обумовлена стимуляцією  $K^+/H^+$ -обміну, однак подальше прискорення  $K^+/H^+$ -обміну під дією DZ призводить до інгибування МРТР. Показано також, що DZ знижує швидкість утворення АФК під час відкриття МРТР в мітохондріях печінки. Дійшли висновку, що зменшення продукції АФК, як і активація  $K^+/H^+$ -обміну, є складовими комплексного механізму інгибування МРТР під дією активатора  $K^+_{ATP}$ -канала.

**Ключові слова:** мітохондріальна пора,  $K^+_{ATP}$ -канал,  $K^+/H^+$ -обмін,  $Ca^{2+}$ -цикл, активні форми кисню, мітохондрії печінки щурів.

**THE EFFECT OF ATP-DEPENDENT  $K^+$ -CHANNEL OPENER ON TRANSMEMBRANE POTASSIUM EXCHANGE AND REACTIVE OXYGEN SPECIES PRODUCTION UPON THE OPENING OF MITOCHONDRIAL PORE**

*O. V. Akopova, L. I. Kolchinskaya, V. I. Nosar, V. A. Bouryi, I. N. Mankovska, V. F. Sagach*

Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: a-dubensky@mail.ru

The effect of mitochondrial ATP-dependent  $K^+$ -channel ( $K^+_{ATP}$ -channel) opener diazoxide (DZ) on transmembrane potassium exchange and reactive oxygen species (ROS) formation under the opening of mitochondrial permeability transition pore (MPTP) was studied in rat liver mitochondria. The activation of  $K^+$ -cycling ( $K^+$ -uptake and  $K^+/H^+$ -exchange) by DZ was established with peak effect at  $\leq 500$  nM. It was shown that MPTP opening as well resulted in the activation of  $K^+$ -cycling together with simultaneous activation of  $Ca^{2+}$ -cycle in mitochondria. In the absence of depolarization  $Ca^{2+}$ -cycle is supported by MPTP and  $Ca^{2+}$ -uniporter. The stimulation of  $K^+/H^+$ -exchange by MPTP opening led to the activation of  $K^+$ -cycle, but further activation of  $K^+/H^+$ -exchange resulted in MPTP inhibition. Under the same conditions the decrease in mitochondrial ROS production was observed. It was proposed that the decrease in ROS formation together with  $K^+/H^+$ -exchange activation could be the constituents of the complex effect of MPTP inhibition induced by  $K^+_{ATP}$ -channel opener.

**Key words:** mitochondrial pore,  $K^+_{ATP}$ -channel,  $K^+/H^+$ -exchange,  $Ca^{2+}$ -cycle, reactive oxygen species, liver mitochondria rats.

1. Inoue I., Nagase H., Kishi K., Higuti T. // Nature. – 1991. – **352**. – P. 244–247.
2. Oldenburg O., Cohen M. V., Yellon D. M., Downey J. M. // Cardiovasc. Res. – 2002. – **55**. – P. 429–437.
3. O'Rourke B. // Circ. Res. – 2004. – **94**. – P. 420–432.
4. Szewczyk A., Jarmuszkiewicz W., Kunz W. // IUBMB Life. – 2009. – **61**. – P. 134–143.
5. Garlid K. D., Paucek P. // Biochim. Biophys. Acta. – 2003. – **1606**. – P. 23–41.

6. Kowaltowski A. J., Seetharaman S., Paucek P., Garlid K. D. // *Am. J. Physiol.* – 2001. – **280**. – H649–H657.
7. Cancherini D., Trabuco L. G., Reboucas N. A., Kowaltowski A. J. // *Am. J. Physiol.* – 2003. – **285**. – P. F1291–F1296.
8. Акопова О. В., Носарь В. И., Бурый В. А. и др. // *Биохимия*. – 2010. – **75**, № 9. – С. 1273–1283.
9. Murata M., Akae M., O'Rourke B., Marban E. // *Circ. Res.* – 2001. – **89**. – P. 891–898.
10. Kopustinskiene D. M., Liobikas J., Skemiene K. et al. // *Cell Physiol. Biochem.* – 2010. – **25**. – P. 181–186.
11. Акопова О. В., Носарь В. И., Бурый В. А. и др. // *Укр. біохім. журн.* – 2013. – **85**, № 3. – С. 38–51.
12. Facundo H. T. F., dePaula J. G., Kowaltowski A. J. // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 2005. – **37**. – P. 75–82.
13. Andrukhiv A., Costa A. D., West I. C., Garlid K. D. // *Am. J. Physiol.* – 2006. – **291**. – P. H2067–H2074.
14. Миронова Г. Д., Качаева Е. В., Крылова И. Б. и др. // *Вестн. РАМН*. – 2007. – **2**. – С. 44–50.
15. Costa A. D. T., Garlid K. D. // *Am. J. Physiol.* – 2008. – **295**. – P. H874–H882.
16. Kroemer G., Reed J. C. // *Nature Med.* – 2000. – **6**. – P. 513–519.
17. Zorov D. B., Juhaszova M., Sollott S. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – **1757**. – P. 509–517.
18. Ferranti R. F., da Silva M. M., Kowaltowski A. J. // *FEBS Lett.* – 2003. – **536**. – P. 51–55.
19. Miva S., Brand M. D. // *Biochem. Soc. Trans.* – 2003. – **31**. – P. 1300–1301.
20. Comelli M., Metelli G., Mavelli I. // *Am. J. Physiol.* – 2007. – **292**. – P. H820–H829.
21. Акопова О. В. // *Укр. біохім. журн.* – 2011. – **83**, № 3. – С. 46–55.
22. Akerman K. E. O., Wikstrom M. K. F. // *FEBS Lett.* – 1976. – **68**, N 2. – P. 191–197.
23. Jung D. W., Davis M. H., Brierley G. P. // *Anal. Biochem.* – 1989. – **178**. – P. 348–354.
24. Tedeschi H. // *J. Biophys. Biochem. Cytol.* – 1959. – **6**. – P. 241–252.
25. Garlid K. D., Paucek P., Yarov-Yarovoy V. et al. // *J. Biol. Chem.* – 1996. – **271**. – P. 8796–8799.
26. Massari S., Azzone G. F. // *Eur. J. Biochem.* – 1970. – **12**. – P. 301–309.
27. Brown G. C. // *FASEB J.* – 1992. – **6**. – P. 2961–2965.
28. Акопова О. В. // *Укр. біохім. журн.* – 2008. – **80**, № 3. – С. 40–47.
29. Murphy M. P. // *Biochem. J.* – 2009. – **417**. – P. 1–13.
30. Rottenberg H. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1979. – **549**. – P. 225–253.
31. Lambert A. J., Brand M. D. // *J. Biol. Chem.* – 2004. – **279**. – P. 39414–39420.
32. Liu Sh.-S. // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 1999. – **31**. – P. 367–376.
33. Солодовникова И. М., Юрков В. И., Тоньшин А. А., Ягужинский Л. С. // *Биофизика*. – 2004. – **49**. – С. 47–56.

Получено 04.09.2013