

О. В. АКОПОВА¹, Л. И. КОЛЧИНСКАЯ¹, В. И. НОСАРЬ¹, В. А. БУРЫЙ¹,
И. Н. МАНЬКОВСКАЯ¹, В. Ф. САГАЧ¹

ВЛИЯНИЕ ИНДУЦИРОВАННОГО ВАЛИНОМИЦИНОМ ВХОДА КАЛИЯ НА ОБРАЗОВАНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В МИТОХОНДРИЯХ МОЗГА КРЫС

Поступила 05.08.13

Изучено влияние потенциалзависимого входа калия, индуцированного валиномицином, на образование активных форм кислорода (АФК) в препаратах изолированных митохондрий мозга крыс. В присутствии валиномицина с повышением концентрации K^+ в среде стационарная скорость образования АФК снижалась. Сделан вывод, что снижение продукции АФК в митохондриях мозга обусловлено деполяризующим эффектом потенциалзависимого входа K^+ . Результаты экспериментов указывают на потенциалзависимый механизм регуляции образования АФК в условиях калийиндуцированной деполяризации мембраны валиномицином в митохондриях ткани мозга.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: калий, мембранный потенциал, активные формы кислорода (АФК), митохондрии мозга.

ВВЕДЕНИЕ

Потенциалзависимый вход ионов калия является универсальным процессом, обеспечивающим модуляцию функций митохондрий. Всё возрастающее число экспериментальных работ, публикуемых в последние годы, свидетельствует о значительном интересе, который вызывает названный феномен. Результаты этих работ, как и наших собственных исследований, указывают на то, что потенциалзависимый вход калия в матрикс митохондрий, опосредуемый митохондриальными калиевыми каналами, регулирует потребление кислорода [1–4], объем матрикса [1], мембранный потенциал [3, 5] и основные энергозависимые процессы в митохондриях – синтез АТФ [3, 6, 7] и транспорт Ca^{2+} [5, 8]. Вход K^+ также существенно влияет на образование активных форм кислорода – АФК [9, 10].

К настоящему времени идентифицированы четыре типа калиевых каналов во внутренней мембране митохондрий – АТФ-зависимые калиевые каналы (K^+_{ATP} -каналы), кальцийактивируемые калиевые каналы высокой проводимости ($ВК_{Ca}$ -каналы), по-

тенциалзависимые калиевые каналы (K_v 1.1 и K_v 1.3) и калийпроводящие твин-поры TASK-3 [11]. Однако, как известно, в митохондриальной мембране присутствуют множество калиевых каналов еще не идентифицированных типов [11], физиологическая роль которых неясна. По имеющимся данным, АТФ-зависимый вход K^+ физиологически более значим, чем другие типы калиевой проводимости, и его биоэнергетические аспекты наиболее изучены [1, 12]. Полагают, что хорошо известные кардио- и нейропротекторные эффекты активаторов K^+_{ATP} -каналов, близкие к таковым ишемической адаптации (preconditioning) [13, 14], базируются на регуляции образования АФК, триггеров открывания митохондриальной поры [15] и индукции клеточно-го апоптоза [16].

Митохондрии являются основными производителями АФК в клетке [17, 18]. Известно, что интенсивность образования АФК зависит от метаболического и функционального состояния митохондрий и в значительной мере обусловлена работой дыхательной цепи [17, 19]. Установлено, что основная доля продукции супероксида – первичного свободнорадикального продукта восстановления кислорода, образуемого в митохондриях, – приходится на комплексы I и III дыхательной цепи. Высокий мембранный потенциал и восстановленное состояние пулов пиримидиновых нуклеотидов и убихинона,

¹ Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев (Украина).

Эл. почта: a-dubensky@mail.ru (О. В. Акопова).

а также цитохрома *b* в комплексе III способствуют высокой продукции АФК [17, 19–21]. В условиях гиперполяризации мембраны транспорт электронов по градиенту редокс-потенциала в определенных участках дыхательной цепи становится термодинамически невыгодным. Это ведет к «утечке электронов» к кислороду в редокс-активных сайтах – FMN-связывающем сайте I комплекса [22] и наружном сайте связывания убихинона Q_0 в комплексе III, где супероксид образуется вследствие аутоокисления убисемихинона, $CoQ^{\bullet-}$ (предполагаемого свободно-радикального интермедиата Q-цикла) [18, 23].

Хотя, по мнению большинства исследователей, цитопротекторные эффекты фармакологических активаторов калиевых каналов во многом обусловлены регуляцией уровня митохондриальной продукции АФК [9, 10], изучение непосредственного влияния таких активаторов на образование АФК в изолированных митохондриях привело к неоднозначным результатам. Сообщалось, что в митохондриях сердца может наблюдаться как снижение [10], так и повышение выхода АФК [9] под действием активаторов K^+ _{АТР}-каналов. Активация VK_{Ca} -каналов вызывала снижение продукции АФК в митохондриях мозга [24], но в митохондриях сердца образование АФК усиливалось [25]. Цитопротекторные эффекты активаторов калиевых каналов, обусловленные подавлением активности митохондриальных пор, интерпретировали как результат либо уменьшения [10], либо усиления продукции АФК [9]. В первом случае механизм защиты объясняли непосредственным уменьшением вероятности открывания поры вследствие снижения продукции АФК [10]. Во втором же случае предполагалось, что защитный механизм основан на активации митохондриальной изоформы протеинкиназы C, а это также в итоге ведет к блокированию поры в митохондриях [26]. Очевидно, однако, что вопрос о роли калиевых каналов в регуляции образования АФК в митохондриях в настоящее время еще не решен. Противоречивость экспериментальных данных, приведенных в литературе, может объясняться как существенной спецификой биоэнергетических эффектов транспорта K^+ в клетках разных типов, так и неспецифичностью влияний фармакологических активаторов калиевых каналов [11]. Все это затрудняет идентификацию регуляторных механизмов влияния потенциалзависимого входа K^+ на продукцию АФК в митохондриях.

Согласно данным литературы [3, 9, 27], биоэнергетические эффекты потенциалзависимого вхо-

да K^+ в митохондрии хорошо воспроизводятся K^+ -ионофором валиномицином. При концентрациях, обеспечивающих существенное повышение калиевой проводимости мембраны, какого-либо неспецифического действия валиномицина на митохондрии не выявлено. Это дает возможность использовать валиномицин для изучения непосредственных влияний модуляции транспорта K^+ на митохондриальные функции. В нашей работе мы изучали влияние потенциалзависимого входа K^+ , индуцированного валиномицином, на образование АФК в митохондриях мозга крыс.

МЕТОДИКА

В опытах использовали белых крыс линии Вистар с массой тела 200–250 г. После декапитации головной мозг изымали, промывали охлажденным (4 °C) 0.9 %-ным раствором KCl, измельчали и гомогенизировали в пятикратном объеме среды, содержащей в себе 250 мМ сахарозы, 20 мМ Tris-HCl-буфера, 1 мМ ЭДТА и 1 мг/мл БСА (pH 7.4). Для выделения митохондрией гомогенат центрифугировали 7 мин при 1000g и температуре 4 °C, полученный супернатант – 15 мин при 12000g и той же температуре. Осадок суспендировали в небольшом объеме среды без добавления ЭДТА и БСА и хранили на льду (4 °C). Содержание белка определяли по методу Лоури.

Образование АФК оценивали по изменению флуоресценции дихлорофлуоресцеина, как было описано нами ранее [28]. Для этого митохондрии загружали нефлуоресцирующим проникающим зондом 2',7'-дигидродихлорофлуоресцеина диацетатом (DCFH-DA), который затем гидролизует в матриксе до непроникающего производного (дигидрофлуоресцеина) и, после окисления митохондриальными АФК, образует дихлорофлуоресцеин (DCF). Суспензию митохондрией загружали DCFH-DA (конечная концентрация 200 мкМ) в течение 20 мин при 37 °C; после загрузки пробы и отмывания внешнего зонда путем переосаждения митохондрией суспензию хранили на льду. Аликвоты суспензии с количеством белка 1 мг/мл вносили в среду инкубации (300 мМ сахарозы, 2 мМ Tris-HCl-буфера (pH 7.4), 5 мМ Na-сукцината, 1 мМ NaH_2PO_4 , 1 мкМ циклоспорина A, 15 мкМ $CaCl_2$). KCl вводили до необходимых концентраций, поддерживая осмолярность на уровне 300 мосмоль/л путем добавления сахарозы в соответствующих количествах. Интенсив-

ность флуоресценции DCF измеряли при длинах волн возбуждения и эмиссии 504 и 525 нм соответственно. Из величины флуоресцентного сигнала (F) вычитали интенсивность базальной флуоресценции (F_0), обусловленной внесением митохондрий в среду инкубации. Базальное значение находили путем экстраполяции кинетических кривых к нулевому моменту времени.

Мембранный потенциал митохондрий (количество белка в пробах 1 мг/мл) измеряли в присутствии 10 мкМ сафранина при длинах волн возбуждения и эмиссии 495 и 586 нм соответственно [3]. Находили разность между величинами флуоресцентного сигнала и базальной флуоресценции деполяризованных митохондрий после внесения $5 \cdot 10^{-6}$ М ротенона и 10^{-6} М СССР.

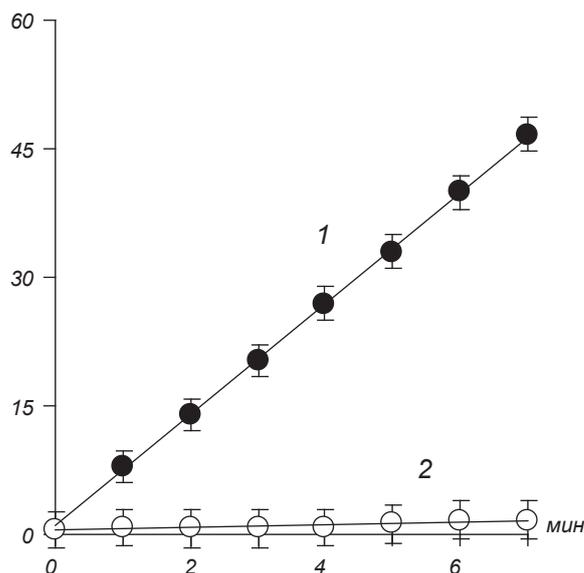
Для определения изменений рН матрикса, обусловленных транспортом K^+ , митохондрии загружали рН-чувствительным зондом 2',7'-бис-(2-карбоксиэтил)-5(6)-карбоксифлуоресцеином (VCECF, конечная концентрация 10 мкМ), как было описано нами ранее [5]. Пробы инкубировали 10 мин при 37 °С, после чего отмывали от зонда. Аликвоты (0.5 мг/мл белка) вносили в среду инкубации и измеряли интенсивность флуоресценции VCECF; длины волн возбуждения и эмиссии составляли соответственно 509 и 535 нм. Находили разность между интенсивностями флуоресценции зонда (F) и базальной флуоресценции (F_0), которую определяли путем экстраполяции кинетических кривых к нулевому моменту времени. Изменения рН и транспорта протонов количественно оценивали с помощью калибровочных кривых, полученных с применением потенциометрического титрования аликвот суспензии митохондрий путем добавления HCl в присутствии $5 \cdot 10^{-6}$ М ротенона и 10^{-6} М СССР (использовали стеклянный микроэлектрод) при параллельной регистрации флуоресценции VCECF в тех же условиях.

Потребление кислорода изучали в стандартных условиях с применением полярографического метода в закрытой ячейке объемом 1 мл с платиновым электродом (температура 26 °С, конечная концентрация белка 1.5 мг/мл). Для регистрации мембранного потенциала, рН и интенсивности дыхания использовали среду следующего состава (в миллимолях на 1 л): сахароза – 300, Tris-HCl-буфер (рН 7.4) – 2, Na-сукцинат – 5, NaH_2PO_4 – 1 и ЭДТА – 0.01 мМ. KCl доводили до необходимых концентраций, поддерживая осмолярность на уровне 300 мосмоль/л.

В работе использовали Na-сукцинат, Tris-основание, циклоспорин А («Fluka», Швейцария), 2',7'-дигидродихлорофлуоресцеина диацетат (DCFH-DA), 2',7'-бис-(2-карбоксиэтил)-5(6)-карбоксифлуоресцеин (VCECF), сафранин, ЭДТА, ротенон, малонат, карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразон – СССР («Sigma», США) и другие реактивы (степень чистоты – ч. д. а.). Растворы готовили на бидистиллированной воде. Достоверность межгрупповых различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента; $P < 0.05$ считали свидетельством статистической значимости. В тексте и подписях к рисункам приведены значения средних \pm ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Образование АФК в митохондриях мозга (рис. 1) регистрировали после установления стационарной скорости дыхания в состоянии 4 в присутствии субстрата окисления и в отсутствие АДФ. Установление и поддержание стационарного состояния контролировали полярографически в параллельных экспериментах, как описывалось ранее [28]. В



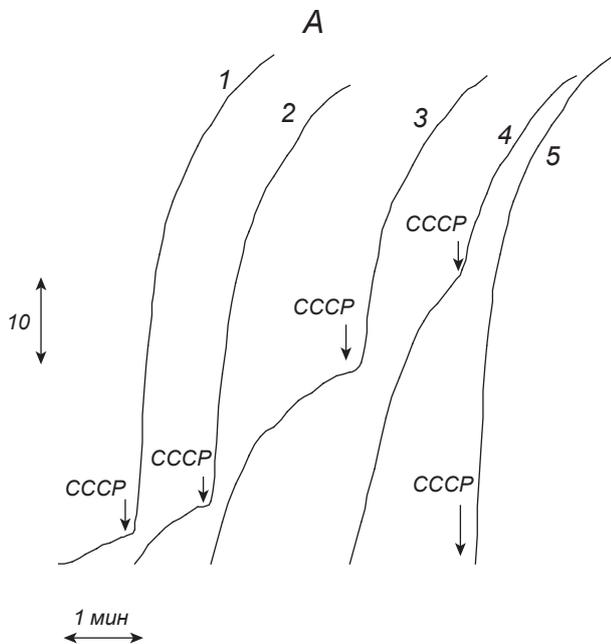
Р и с. 1. Изменения интенсивности флуоресценции дихлорофлуоресцеина ($F_{504/525}$, усл. ед.) во времени (мин) в присутствии (1) и в отсутствие (2) субстрата окисления (типичный пример). Достоверность линейной аппроксимации значений для кривой 1 $R^2 = 0.9995$. $n = 4$.

Р и с. 1. Зміни інтенсивності флуоресценції дихлорофлуоресцеїну (ум. од.) в часі в присутності (1) та за відсутності (2) субстрату окиснення (типовий приклад).

отсутствие Ca^{2+} величина флуоресцентного сигнала в препаратах митохондрий мозга была близка к нулю. Поэтому флуоресценцию DCF регистрировали после добавления в среду 15 мкМ Ca^{2+} в отсутствие ЭДТА и в присутствии циклоспорина А. Добавление Ca^{2+} в условиях блокирования митохондриальной поры не влияло на мембранный потенциал митохондрий.

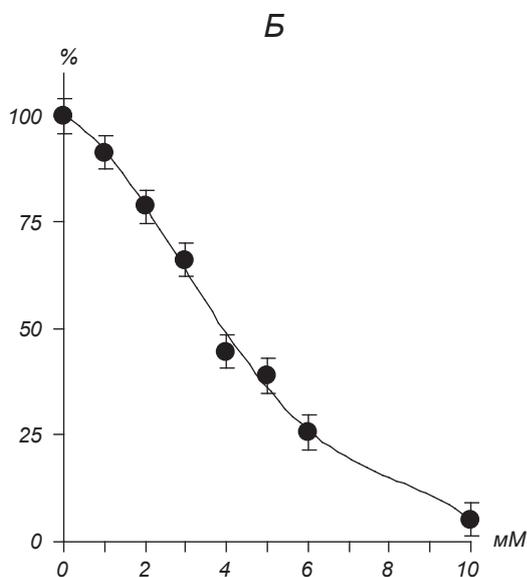
Как показали полученные данные, окисление субстрата в состоянии 4 сопровождается повышением флуоресценции DCF с постоянной (стационарной) скоростью (рис. 1, 1), что свидетельствует об образовании АФК в митохондриях. Из литера-

туры известно, что в матриксе и межмембранном пространстве митохондрий функционирует сложная система метаболизма АФК, в которую входят супероксид-дисмутаза (Mn- и Cu,Zn-SOD), каталаза, глутатион и ряд других физиологически значимых антиоксидантных и прооксидантных факторов [17, 21]. Образование АФК в дыхательной цепи сопровождается их дальнейшим превращением в митохондриях. В то же время в отсутствие субстрата окисления и при блокировании транспорта электронов скорость образования АФК близка к нулю (2), что позволяет связать образование АФК, наблюдаемое в условиях нашего эксперимента, с работой дыхательной цепи. Постоянная скорость накопления флуоресцирующего продукта (DCF) свидетельствует о том, что образование АФК поддерживается на определенном стационарном уровне, обеспечиваемом одновременной работой дыхательной цепи

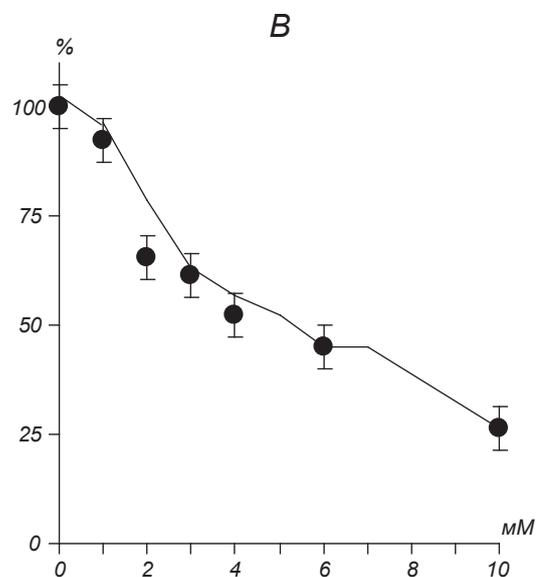


Р и с. 2. Влияние валиномицина на мембранный потенциал (А, В) и скорость образования активных форм кислорода – АФК (В) в митохондриях мозга в присутствии калия.

KCl вводили в концентрациях, указанных на оси абсцисс (мМ), валиномицин – в концентрации 10^{-7} М. А – типичные зависимости изменения флуоресценции сафранина (усл. ед.) после внесения валиномицина в среду; стрелками указано внесение 10^{-6} М CCCP. Концентрации K^+ 1 (1), 1.5 (2), 3 (3), 5 (4) и 120 (5) мМ. Б – зависимость нормированного мембранного потенциала митохондрий (%) от концентрации K^+ (мМ) в присутствии валиномицина. В – влияние валиномицина на нормированную скорость образования АФК (%) в присутствии калия (мМ). $n = 6$ (Б, В).



Р и с. 2. Вплив валиномицину на мембранный потенциал (А, В) та швидкість утворення активних форм кисню (В) у митохондриях мозку в присутності калію.

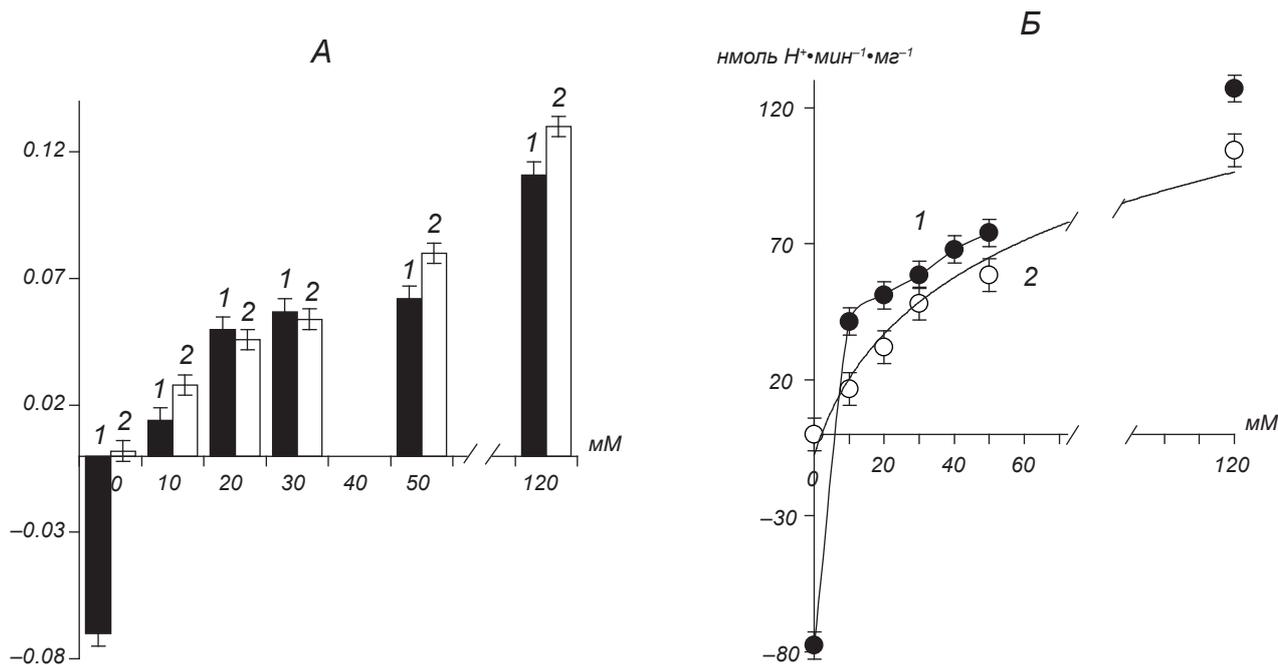


и митохондриальных систем метаболизма АФК [17, 21]. Таким образом, использование DCF как флуоресцентного маркера АФК [9, 10] позволяет регистрировать изменения их стационарного уровня в ходе окисления субстрата дыхания.

Влияние потенциалзависимого транспорта K^+ на образование АФК в митохондриях мозга изучали в условиях валиномицининдуцированного входа указанных ионов в матрикс энергизованных митохондрий. Известно, что в физиологических условиях концентрации калия в митохондриях и цитозоле примерно равны, составляя порядка 120–150 мМ [29]. Валиномицин обеспечивает диффузию K^+ по градиенту концентрации данного катиона. Направление транспорта K^+ (в матрикс либо, наоборот, в среду) в присутствии валиномицина зависит от величины мембранного потенциала митохондрий [30]. Сказанное справедливо и для калиевых каналов клеточных мембран [30]. Поэтому концентрации K^+ в среде подбирали таким образом, чтобы обеспечить потенциалзависимый вход этих ионов в матрикс при внесении валиномицина в суспензию митохондрий. Параллельно регистрировали изменения рН матрикса (pH_i), сопутствующие транспорту

K^+ в матрикс либо высвобождению калия из митохондрий.

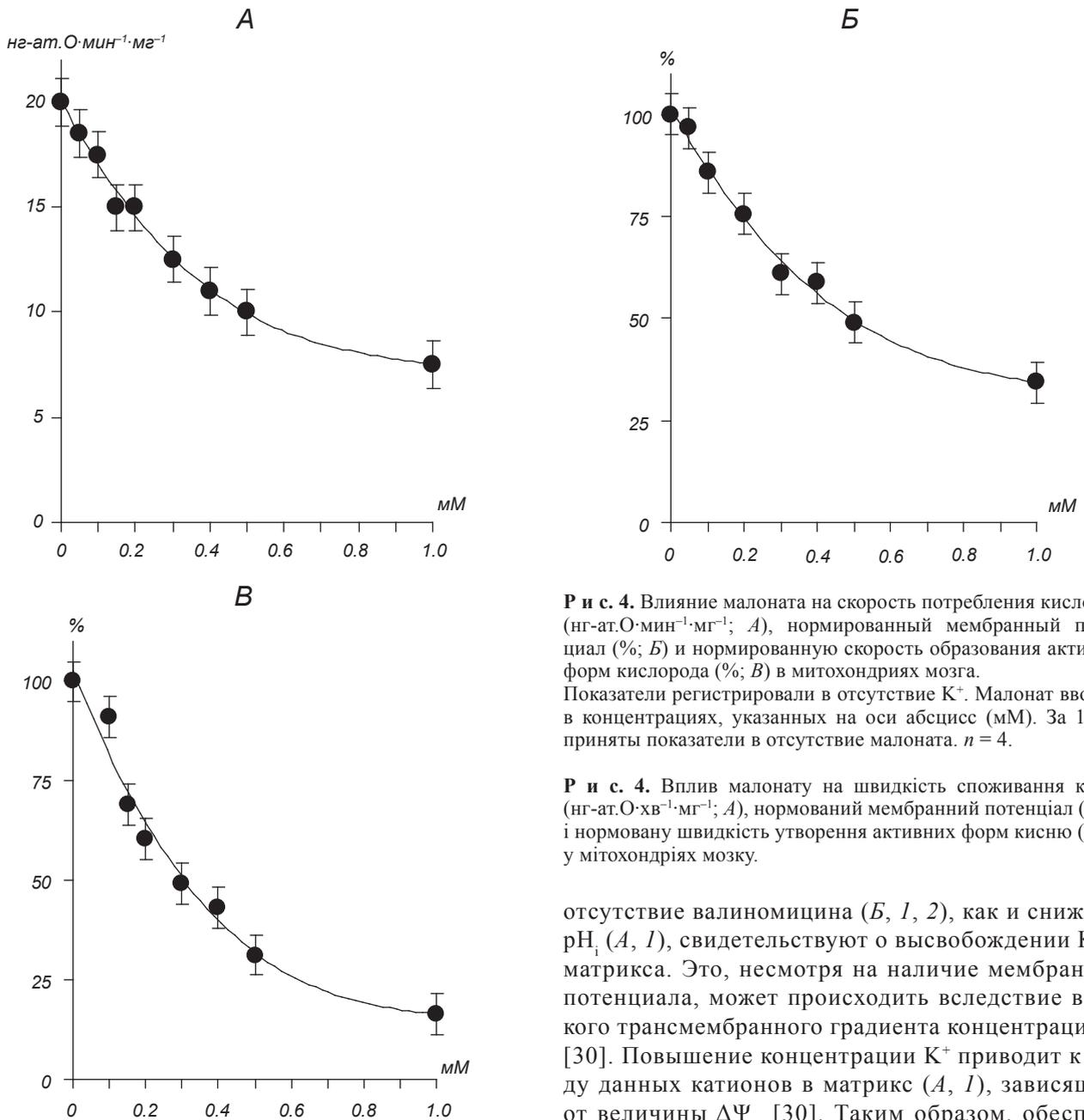
Внесение валиномицина в среду инкубации, содержащую в себе калий в разных концентрациях, приводило к усилению флуоресценции сафранина, что свидетельствует о снижении $\Delta\Psi_m$ (рис. 2, А). Для оценки деполяризующего эффекта валиномицина определяли скорость изменения флуоресценции сафранина после внесения валиномицина в среду. Степень деполяризации нормировали относительно максимального эффекта, регистрируемого после внесения 10^{-6} М СССР либо валиномицина в присутствии 120 мМ K^+ (А, 5). При низких концентрациях добавленного K^+ внесение валиномицина в среду практически не приводило к деполяризации (А, 1, 2). Деполяризующий эффект усиливался по мере повышения концентрации K^+ в среде (А, 3–5, Б). Известно, что в митохондриях транспорт K^+ в матрикс приводит к эквивалентному высвобождению протонов из внутримитохондриальной среды [31], а это, в свою очередь, вызывает защелачивание последней. Повышение pH_i свидетельствовало об аккумуляции K^+ в митохондриях. Поэтому в присутствии валиномицина высвобождение прото-



Р и с. 3. Влияние потенциалзависимого входа K^+ на pH_i матрикса (pH_i) и начальную скорость выхода протонов в митохондриях мозга.

Показаны относительные изменения pH_i (А) и V_0 выхода H^+ ($nmol\ H^+ \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$; Б) в присутствии (1) и в отсутствие (2) валиномицина за вычетом показателей в контроле (среда без калия). КСІ вводили в концентрациях, указанных на оси абсцисс (мМ), валиномицин – в концентрации 10^{-7} М. $n = 6$.

Р и с. 3. Вплив потенціалзалежного входу K^+ на pH_i матриксу (pH_i) та початкову швидкість виходу протонів у мітохондріях мозку.



Р и с. 4. Влияние малоната на скорость потребления кислорода (нг-ат.О·мин⁻¹·мг⁻¹; *A*), нормированный мембранный потенциал (%; *B*) и нормированную скорость образования активных форм кислорода (%; *B*) в митохондриях мозга.

Показатели регистрировали в отсутствие К⁺. Малонат вводили в концентрациях, указанных на оси абсцисс (мМ). За 100 % приняты показатели в отсутствие малоната. *n* = 4.

Р и с. 4. Вплив малонату на швидкість споживання кисню (нг-ат.О·хв⁻¹·мг⁻¹; *A*), нормований мембранный потенциал (%; *B*) і нормовану швидкість утворення активних форм кисню (%; *B*) у митохондріях мозку.

нов и повышение pH_i при деполяризующих концентрациях К⁺ являются следствием валиномицини-ндуцированного входа К⁺ в матрикс митохондрий (рис. 3, *A*, *B*, 1), что согласуется с литературными данными [9]. В отсутствие валиномицина повышение pH_i и выход Н⁺ обусловлены входом К⁺ через калийпроводящие структуры мембраны (*A*, 2, *B*, 2).

В отсутствие К⁺ внесение валиномицина в среду приводило к закислению матрикса по сравнению с контролем (рис. 3, *A*, 1). «Отрицательная» скорость транспорта Н⁺ в отличие от контрольных значений в

отсутствие валиномицина (*B*, 1, 2), как и снижение pH_i (*A*, 1), свидетельствуют о высвобождении К⁺ из матрикса. Это, несмотря на наличие мембранного потенциала, может происходить вследствие высокого трансмембранного градиента концентраций К⁺ [30]. Повышение концентрации К⁺ приводит к входу данных катионов в матрикс (*A*, 1), зависящему от величины $\Delta\Psi_m$ [30]. Таким образом, обеспечиваемый валиномицином вход К⁺ обуславливает деполяризацию митохондрий, зависящую от значений $\Delta\Psi_m$ и концентрации К⁺ в среде (рис. 2, *B*).

Проведенная параллельно с оценкой влияния валиномицина на $\Delta\Psi_m$ (рис. 2, *B*) регистрация интенсивности флуоресценции DCF показала, что скорость окисления зонда в присутствии валиномицина снижается при том же диапазоне концентраций К⁺, при котором наблюдается снижение $\Delta\Psi_m$ (*B*). Полученные данные свидетельствуют о том, что деполяризация мембраны митохондрий в присутствии валиномицина приводит к снижению ста-

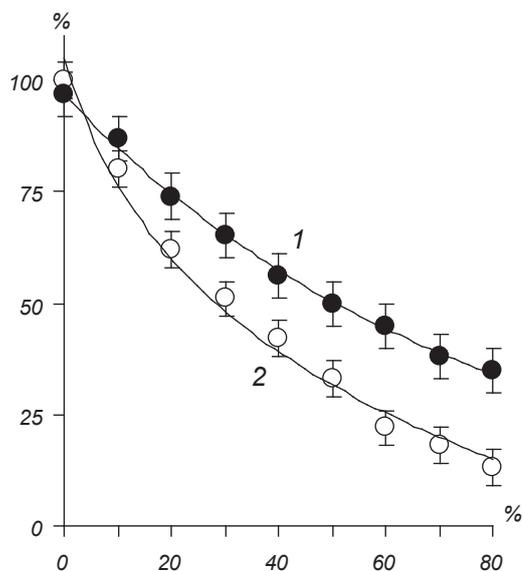
ционарной скорости образования АФК (Б, В).

Справедливость этого вывода подтверждается также результатами, полученными в условиях деполяризации мембраны под действием малоната. Согласно результатам такого эксперимента, ингибирование сукцинат-дегидрогеназы (рис. 4, А) сопровождается деполяризацией мембраны митохондрий (Б). Снижение $\Delta\Psi_m$, как и в случае потенциалзависимого входа K^+ , ведет к снижению скорости образования АФК в метаболическом состоянии 4 (В).

Различают потенциалзависимые и потенциалнезависимые механизмы образования АФК в митохондриях [21]. Относительно слабую зависимость от значений $\Delta\Psi_m$ обнаруживают процессы образования АФК, обусловленные восстановлением пула NADH/NAD⁺ либо образованием убисемихинона (CoQ•-) в Q-цикле [17, 21]. Известно, что при использовании сукцината как субстрата дыхания высокий выход АФК возможен вследствие обратного транспорта электронов от сукцината к FMN-связывающему сайту I комплекса с соответствующим восстановлением пиридиновых нуклеотидов [17, 21, 22]. Обратный транспорт электронов термодинамически невыгоден, поскольку требует высоких величин электрохимического потенциала протонов $\Delta\mu_{H^+}$, генерируемого дыхательной цепью митохондрий. Поэтому образование АФК вследствие обратного транспорта электронов обнаруживает сильную зависимость от $\Delta\Psi_m$ и подавляется ротеноном, который связывается в убихинонсвязывающем сайте I комплекса, тем самым блокируя последний [22]. Однако в условиях проведенного нами эксперимента внесение ротенона в среду инкубации не приводило к уменьшению уровня продукции АФК в митохондриях мозга. Поэтому наблюдаемое уменьшение выхода АФК (рис. 2, В) не обусловлено подавлением обратного транспорта электронов, которое должно происходить при снижении мембранного потенциала митохондрий.

Следует отметить, что в условиях прямого транспорта электронов продукция АФК также зависит от $\Delta\Psi_m$, поскольку образование супероксида (с учетом редокс-потенциала пары $O_2/O_2\cdot^-$) определяется величиной редокс-потенциала сайтов дыхательной цепи, участвующих в образовании АФК [17]. В частности, показана зависимость редокс-потенциала цитохрома *b* и степени восстановления пула убихинона (CoQH₂/CoQ) от $\Delta\Psi_m$ и $\Delta\mu_{H^+}$ в митохондриях [20, 32].

Результаты нашего определения влияния потен-



Р и с. 5. Влияние деполяризующего эффекта валиномицина (1) и ингибирования дыхания малонатом (2) на скорость образования активных форм кислорода (АФК) в митохондриях мозга.

Нормированные значения деполаризации (%) определяли как разность нормированного потенциала в контроле и в присутствии валиномицина и малоната соответственно. За 100 % приняты мембранный потенциал и скорость образования АФК в отсутствие валиномицина и малоната (контроль). *n* = 6.

Р и с. 5. Вплив деполаризуючого ефекту валіноміцину (1) і малонату (2) на утворення активних форм кисню в мітохондріях мозку.

циалзависимого входа K^+ и малоната на митохондриальную продукцию АФК свидетельствуют о близких зависимостях скорости образования АФК от величины деполаризующего эффекта (рис. 5). Это указывает на зависимость механизма продукции АФК от $\Delta\Psi_m$ в условиях калийиндуцированной деполаризации митохондрий. Некоторое расхождение результатов, наблюдаемое в области низких потенциалов в условиях деполаризации малонатом и валиномицином, может объясняться значительной разностью pH_i при равных уровнях деполаризующих эффектов. Подавление активности дыхательной цепи малонатом должно приводить к снижению pH_i по сравнению с контролем по мере торможения процесса транспорта электронов, тогда как повышение входа K^+ в присутствии валиномицина вызывает защелачивание матрикса (рис. 3, А, 1). Это уже само по себе способствует протеканию реакции с образованием супероксида [20].

Таким образом, регуляция интенсивности образования АФК в условиях валиномицининдуцированного входа K^+ в митохондриях мозга реа-

лизуется путем модуляции уровня мембранного потенциала последних. Деполяризация митохондрий вследствие потенциалзависимого входа K^+ является основной причиной снижения продукции АФК в условиях прямого транспорта электронов в дыхательной цепи. Результаты наших экспериментов позволяют сделать вывод, что потенциалзависимый вход K^+ , равным образом наблюдаемый и в физиологических условиях, может предотвращать гиперпродукцию АФК и оказывать нейропротекторное влияние при состояниях, связанных с нарушением окислительного метаболизма в митохондриях нейронов мозга.

Исследования проводились в соответствии с положениями Международной конвенции по защите животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Страсбург, 1985), а также в соответствии с положениями Комитета по биоэтике Института физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины.

Авторы настоящей статьи – О. В. Аكوпова, Л. И. Колчинская, В. И. Носарь, В. А. Бурый, И. Н. Маньковская и В. Ф. Сагач – подтверждают отсутствие у них конфликта интересов.

Роботу частково виконано за фінансової підтримки комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України “Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій”.

О. В. Аكوпова¹, Л. И. Колчинська¹, В. И. Носарь¹, В. О. Бурый¹,
И. М. Маньковська¹, В. Ф. Сагач¹

ВПЛИВ ІНДУКОВАНОГО ВАЛІНОМІЦИНОМ ВХОДУ КАЛІЮ НА УТВОРЕННЯ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ В МІТОХОНДРІЯХ МОЗКУ ЩУРІВ

¹ Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).

Резюме

Досліджено вплив потенціалзалежного входу калію, індукованого валіноміцином, на утворення активних форм кисню (АФК) у препаратах ізольованих митохондрий мозку щурів. У присутності валіноміцину з підвищенням концентрації K^+ стаціонарна швидкість утворення АФК знижувалася. Зроблено висновки, що зниження продукції АФК у митохондриях мозку зумовлено деполяризуючим ефектом потенціалзалежного входу K^+ . Результати експериментів вказують на потенціалзалежний механізм регуляції утворення АФК в умовах калійіндукованої деполяризації мембрани валіноміцином у митохондриях тканини мозку.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. A. D. T. Costa, C. L. Quinlan, A. Andrukhiv, et al., “The direct physiological effects of mitoK_{ATP} opening on heart mitochondria,” *Am. J. Physiol.*, **290**, H406-H415 (2006).
2. A. J. Kowaltowski, S. Seetharaman, P. Paucek, et al., “Bioenergetic consequences of opening ATP-sensitive K⁺-channel of heart mitochondria,” *Am. J. Physiol.*, **280**, H649-H657 (2001).
3. D. Cancherini, L. G. Trabuco, N. A. Reboucas, et al., “ATP-sensitive K⁺ channels in renal mitochondria,” *Am. J. Physiol.*, **285**, F1291-F1296 (2003).
4. О. В. Аكوпова, В. И. Носарь, В. А. Бурый и др., “Влияние активатора АТФ-зависимого K⁺-канала на потребление кислорода и K⁺-цикл в митохондриях печени крыс”, *Биохимия*, **75**, № 9, 1273-1283 (2010).
5. О. В. Аكوпова, Л. И. Колчинская, В. И. Носарь и др., “Влияние потенциалзависимого входу калия на аккумуляцию кальция в митохондриях мозга крыс”, *Биохимия*, **78**, № 1, 106-117 (2010).
6. D. M. Kopustinskiene, J. Liobikas, K. Skemiene, et al., “Direct effects of K_{ATP} channel openers pinacidil and diazoxide on oxidative phosphorylation of mitochondria *in situ*,” *Cell Physiol. Biochem.*, **25**, 181-186 (2010).
7. О. В. Аكوпова, В. И. Носарь, В. А. Бурый и др., “Влияние активатора АТФ-зависимого K⁺-канала на функциональное состояние и открывание циклоспоринчувствительной поры в митохондриях печени крыс”, *Укр. біохім. журн.*, **85**, № 3, 38-51 (2013).
8. M. Murata, M. Akao, B. O'Rourke, et al., “Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix Ca²⁺ overload during simulated ischemia and reperfusion: possible mechanism of cardioprotection,” *Circ. Res.*, **89**, 891-898 (2001).
9. A. Andrukhiv, A. D. Costa, I. C. West, et al., “Opening mitoK_{ATP} increases superoxide generation from complex I of the electron transport chain,” *Am. J. Physiol.*, **291**, H2067-H2074 (2006).
10. H. T. F. Facundo, J. G. de Paula, and A. J. Kowaltowski, “Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels prevent oxidative stress, permeability transition and cell death,” *J. Bioenerg. Biomembranes*, **37**, 75-82 (2005).
11. A. Szewczyk, W. Jarmuszkiewicz, and W. Kunz, “Mitochondrial potassium channels,” *IUBMB Life*, **61**, 134-143 (2009).
12. H. T. F. Facundo, M. Fornazari, and A. J. Kowaltowski, “Tissue protection mediated by mitochondrial K⁺ channels,” *Biochim. Biophys. Acta*, **1762**, 202-212 (2006).
13. D. W. Busija, Zs. Lacza, N. Rajapakse, et al., “Targeting mitochondrial ATP-sensitive potassium channels – a novel approach to neuroprotection,” *Brain Res. Rev.*, **46**, 282-294 (2004).
14. Г. Д. Миронова, Е. В. Качаева, И. Б. Крылова и др., “Митохондриальный АТФ-зависимый калиевый канал. Роль канала в защите сердца от ишемии”, *Вестн. РАМН*, № 2, 44-50 (2007).
15. D. B. Zorov, M. Juhaszova, and S. J. Sollott, “Mitochondrial ROS-induced ROS release: An update and review,” *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 509-517 (2006).
16. G. Kroemer, L. Galuzzi, and C. Brenner, “Mitochondrial membrane permeabilization in cell death,” *Physiol. Rev.*, **87**, 99-163 (2007).
17. M. P. Murphy, “How mitochondria produce reactive oxygen

- species," *Biochem. J.*, **417**, 1-13 (2009).
18. J. F. Turrens, "Mitochondrial formation of reactive oxygen species," *J. Physiol.*, **552**, 335-344 (2003).
 19. S. S. Korshunov, V. P. Skulachev, and A. A. Starkov, "High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria," *FEBS Lett.*, **416**, 15-18 (1997).
 20. Shu-sen Liu, "Cooperation of a "reactive oxygen cycle" with the Q cycle and the proton cycle in the respiratory chain-superoxide generating and cycling mechanisms in mitochondria," *J. Bioenerg. Biomembranes*, **31**, 367-376 (1999).
 21. А. Ю. Андреев, Ю. Е. Кушнарева, А. А. Старков, "Метаболизм активных форм кислорода в митохондриях", *Биохимия*, **70**, № 2, 246-264 (2005).
 22. V. G. Grivennikova and A. D. Vinogradov, "Generation of superoxide by the mitochondrial complex I," *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 553-561 (2006).
 23. D. Han, E. Williams, and E. Cadenas, "Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space," *Biochem. J.*, **353**, 411-416 (2001).
 24. B. Kulawiak, A. P. Kudin, A. Szewczyk, et al., "BK channel openers inhibit ROS production of isolated rat brain mitochondria," *Exp. Neurol.*, **212**, 543-547 (2008).
 25. A. Heinen, A. K. S. Camara, M. Aldakkak, et al., "Mitochondrial Ca²⁺-induced K⁺ influx increases respiration and enhances ROS production while maintaining membrane potential," *Am. J. Physiol.*, **292**, C148-C156 (2006).
 26. A. D. T. Costa and K. D. Garlid, "Intramitochondrial signaling: interactions among mitoK_{ATP}, PKCε, ROS, and MPT," *Am. J. Physiol.*, **295**, H874-H882 (2008).
 27. G. Debska, A. Kicinska, J. Skalska, et al., "Opening of potassium channels modulates mitochondrial function in rat skeletal muscle," *Biochim. Biophys. Acta*, **1556**, 97-105 (2002).
 28. О. В. Акопова, Л. И. Колчинская, В. И. Носар, et al., "The effect of mitochondrial permeability transition pore opening on reactive oxygen species production in rat brain mitochondria," *Укр. біохім. журн.*, **83**, № 6, 46-55 (2011).
 29. K. E. O. Akerman and M. K. F. Wikstrom, "Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential," *FEBS Lett.*, **68**, 191-197 (1976).
 30. *Мембраны: ионные каналы*, под ред. Ю. А. Чизмадзе, Мир, Москва (1981).
 31. S. Massari and G. F. Azzone, "The mechanism of ion translocation in mitochondria. Coupling of K⁺ and H⁺ fluxes," *Eur. J. Biochem.*, **12**, 301-309 (1970).
 32. A. Swida-Barteczka, A. Woyda-Ploszczyca, F. E. Sluse, et al., "Uncoupling protein 1 inhibition by purine nucleotides is under control of the endogenous ubiquinone redox state," *Biochem. J.*, **424**, 297-306 (2009).