УДК 577.23

ВЛИЯНИЕ АКТИВАТОРА АТР-ЗАВИСИМОГО K^+-КАНАЛА ДИАЗОКСИДА НА ЦИКЛОСПОРИНЧУВСТВИТЕЛЬНУЮ ПОРУ В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ КРЫС

О. В. АКОПОВА

Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев;
e-mail: luko@biph.kiev.ua

Изучено влияние активатора митохондриального АТР-зависимого K^+-канала ($K^+_{АТР}$-канала) диазоксида (DZ) на открывание циклоспоринчувствительной поры (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) в митохондриях печени крыс. В отсутствие DZ открывание поры приводит к ускорению циклического транспорта K^+ и Ca^{2+}, который поддерживается одновременной работой K^+-каналов и K^+/H^+-обменника, а также – Ca^{2+}-унипортера и митохондриальной поры как механизмов входа и выхода K^+ и Ca^{2+}. Показано, что под действием DZ, независимо от MPTP, происходит активация обеих составляющих K^+-цикла: энергозависимого накопления K^+ и K^+/H^+-обмена. При этом установлено, что активация трансмембранного обмена K^+ диазоксидом в условиях одновременного открывания MPTP приводит к частичному ингибированию MPTP. Предложен методический подход к оценке функциональной активности MPTP в условиях активации $K^+_{АТР}$-канала.

Установлено, что полное подавление MPTP циклоспорином А вслед за ее открытием приводит к возврату Ca^{2+} в матрикс и ингибированию K^+/H^+-обмена по мере накопления Ca^{2+}. Тем самым, в результате экспериментов выявлена важная физиологическая функция MPTP, которая заключается в активации трансмембранного ионного обмена (K^+ и Ca^{2+}) при одновременном поддержании низких концентраций Ca^{2+} в матриксе и может иметь определяющее значение для протекания энергозависимых процессов в митохондриях.

Ключевые слова: $K^+_{АТР}$-канал, диазоксид, Ca^{2+}, K^+, транспорт, митохондриальная пора.

Кардиопротекторные и цитопротекторные эффекты активаторов митохондриального АТР-зависимого K^+-канала ($K^+_{АТР}$-канала) находят все более широкое подтверждение в экспериментальных и клинических исследованиях [1–4]. Достижения последних лет в области создания новых и применения уже известных фармакологических препаратов этой группы объясняют неуклонно растущий интерес к $K^+_{АТР}$-каналу митохондрий, его роли в регуляции трансмембранного обмена K^+ и к митохондриальной системе транспорта K^+ в целом.

Известно, что K^+-транспортная система митохондрий, находящаяся во внутренней мембране органелл, включает K^+-каналы и K^+/H^+-обменник [5, 6]. K^+ входит в матрикс через K^+-каналы и высвобождается через K^+/H^+-обменник в цитозоль. В физиологических условиях митохондриальный K^+-цикл [5] служит механизмом обмена K^+ между матриксом и средой. Представления о физиологической значимости митохондриального K^+-цикла сложились в литературе сравнительно недавно. По-видимому, то обстоятельство, что содержание K^+ в матриксе и цитозоле примерно одинаково (120–150 мМ [7,8]), и трансмембранный градиент ионов K^+ практически отсутствует, в течение десятилетий приводило к недооценке роли циклического транспорта K^+ в митохондриальной физиологии. Однако накопленный к настоящему времени объем экспериментальных данных убеждает в том, что трансмембранный обмен K^+ в митохондриях имеет важное физиологическое значение [1,5].

Вход K^+ в матрикс энергизованных митохондрий через K^+-каналы и неспецифическим путем так называемой «утечки K^+» (K^+-leak), даже при отсутствии трансмембранного градиента K^+, обусловлен высоким мембранным потенциалом, достигающим ~ -170 мВ [9]. Подобный отрицательный со стороны матрикса мембранный потенциал, согласно уравнению Нернста, мог бы создавать 1000-кратный градиент концентраций K^+, разрушительный для митохондрий, как отмечают, в частности, и авторы [10]. Этого, однако, не происходит, поскольку накопление K^+ в матриксе лимитируется кинетическими характеристиками K^+-аккумулирующей системы митохондрий

(такими как K_m, константа скорости транспортного процесса, максимальная скорость транспорта V_{max}, которая в митохондриях к тому же ограничена максимальной скоростью потребления кислорода и переноса электронов в дыхательной цепи [11]). Кроме того, перегрузке митохондрий ионами K^+ препятствует система, выводящая K^+ из матрикса, K^+/H^+-антипорт [5,10]. Поэтому накопление K^+ в митохондриях происходит до тех пор, пока скорость входа K^+ через K^+-каналы не уравнивается со скоростью выхода K^+ через K^+/H^+-обменник, что отвечает условиям стационарного равновесия между входом и выходом K^+, постоянной скорости энергозависимого входа K^+ в матрикс при циклическом транспорте K^+ и установлению постоянной скорости дыхания в состоянии 2 по Чансу [5, 11, 12]. Таким образом, согласованная работа K^+-каналов и K^+/H^+-обменника, составляющих митохондриальный K^+-цикл [5], необходима для поддержания физиологически допустимых концентраций K^+ в митохондриях, регуляции объема органелл и внутримитохондриального pH.

Поскольку энергозависимый транспорт катионов в матрикс связан со скоростью потребления кислорода определенными стехиометрическими соотношениями [11, 12], ускорение транспорта K^+ в K^+-цикле митохондрий приводит к повышению скорости дыхания, что выражается в так называемом «мягком разобщении» [13, 14] дыхательной цепи, при котором повышается доля потенциальной энергии, расходуемой на энергозависимый транспорт K^+. Согласно сложившимся в науке представлениям, «мягкое разобщение» дыхательной цепи вследствие активации K^+-цикла [4] лежит в основе большинства известных кардио- и цитопротекторных эффектов фармакологических активаторов $K^+_{АТР}$-канала (пинацидила, диазоксида, кромакалима, никорандила и др. [15–18]). И все же вопрос о непосредственном механизме и клеточных мишенях терапевтического действия этих препаратов и поныне остается дискуссионным.

Так, полагают, что основными составляющими защитного механизма клеток вследствие повышения АТР-зависимого входа K^+ в матрикс митохондрий является ограничение энергозависимого накопления Ca^{2+} [19], уменьшение продукции активных форм кислорода, АФК [20], подавление открытия циклоспоринчувствительной поры [19–21] и соответственно – минимизация масштабов и последствий индукции клеточного апоптоза [22]. В то же время, в работах Гарлида и соавторов представлены данные, согласно которым ингибирование MPTP под действием активаторов $K^+_{АТР}$-канала обусловлено не понижением, а напротив – повышением продукции АФК вследствие притока K^+ через $K^+_{АТР}$-канал, активации митохондриальной изоформы протеинкиназы С (PKCε) гидропероксидом и фосфорилирования потенциалзависимого анионного канала, одного из структурных элементов поры [23]. Очевидно, что ввиду неоднозначности опубликованных экспериментальных результатов, во многом зависящих от условий эксперимента, предлагаемые в литературе механизмы клеточной защиты пока что не выходят за рамки научных гипотез. Так, даже факт подавления MPTP, основной предполагаемой мишени цитопротекторного действия активаторов $K^+_{АТР}$-канала, нельзя считать безусловно доказанным, поскольку известны данные, свидетельствующие о повышении энергозависимого входа Ca^{2+} и активации MPTP под действием активатора $K^+_{АТР}$-канала диазоксида [24]. Таким образом, вопрос о роли активаторов $K^+_{АТР}$-канала в регуляции открытого состояния MPTP окончательно не решен в современной науке, и это заставляет исследователей неоднократно возвращаться к его рассмотрению.

Следует отметить, что существующая неоднозначность данных о влиянии активаторов $K^+_{АТР}$-канала на открытие MPTP может быть обусловлена еще и тем обстоятельством, что пора, которая в физиологических условиях выполняет функцию одного из ионообменных механизмов митохондриальной мембраны, циклоспоринчувствительного Ca^{2+}/H^+-обмена [25], открытие которой к тому же сопровождается значительным набуханием матрикса, может влиять на циклический транспорт K^+ и тем самым выступать модулятором эффектов, обусловленных активацией $K^+_{АТР}$-канала. Как правило, митохондриальную пору рассматривают в качестве основного фактора индукции клеточного апоптоза и развития различных патологических состояний организма [26, 27]. При этом роль MPTP в регуляции клеточных функций в нормальных физиологических условиях все еще не получила должного освещения в литературе. Поныне остается неизученной возможная роль MPTP как модулятора систем трансмембранного ионного обмена в митохондриях, в частности, системы трансмембранного обмена K^+. В то же время, практическое использование активаторов $K^+_{АТР}$-канала в клинике требует оценки функциональных и биоэнергетических последствий их примене-

ния в условиях одновременного открывания митохондриальной поры. Поэтому целью данной работы было оценить влияние активатора $K^+_{АТР}$-канала, диазоксида, на трансмембранный обмен K^+ в условиях открывания циклоспоринчувствительной поры, а также изучить влияние диазоксида непосредственно на открытие поры в митохондриях печени крыс.

Материалы и методы

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

Светопоглощение регистрировали при 520 нм, начиная с внесения митохондрий в среду инкубации (120 мМ KCl, 5 мМ Tris-HCl-буфера (pH 7,4), 4 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, по разности светопоглощения при 654 и 690 нм.

В среду инкубации в зависимости от условий эксперимента также вносили: 500 нМ диазоксида, 10 мкМ $CaCl_2$, 1 мкМ циклоспорина А, 1 мМ ЭДТА, 5мМ 4-аминопиридина (4-АП), $5 \cdot 10^{-6}$ М глибенкламида (конечные концентрации).

В работе использовали Na-глутамат, Tris (основание), циклоспорин А (Fluka, Швейцария), диазоксид, 4-АП, глибенкламид, арсеназо-III, ЭДТА (Sigma, США) и другие реактивы марки осч и чда. Растворы готовили на бидистилляте. Достоверность результатов оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. $P < 0,05$ считали статистически значимой величиной.

Результаты и обсуждение

В физиологических условиях K^+ входит в матрикс энергизованных митохондрий через K^+-каналы и высвобождается через K^+/H^+-обменник, антипорт, что в совокупности составляет митохондриальный K^+-цикл [5]. В присутствии проникающих анионов (фосфата, ацетата и др.) транспорт K^+ сопровождается трансмембранным переносом воды [28,29], который приводит к значительным изменениям митохондриального объема: набуханию в ходе аккумуляции K^+ и сокращению при высвобождении K^+ из митохондрий в среду. Набухание и сокращение объема матрикса сопровождается изменением светопоглощения суспензии изолированных митохондрий [28, 29], что позволяет проводить спектрофотометрическую регистрацию обеих стадий K^+-цикла.

Известно, что энергозависимая аккумуляция K^+, сопровождаемая входом воды, набуханием матрикса и активацией K^+/H^+-обмена происходит до установления состояния стационарного равновесия между входом и выходом K^+ и уравнивания скоростей входа K^+ через K^+-каналы и выхода катиона через K^+/H^+-антипорт [5], что соответствует наблюдаемому в эксперименте отсутствию изменений митохондриального объема после завершения накопления K^+ (рис. 1, *А*, кривая *1*). Об установлении стационарного равновесия свидетельствует и тот факт, что внесение неселективного блокатора K^+-каналов, 4-аминопиридина (4-АР) приводит к сдвигу равновесия в сторону выхода K^+ и сокращения митохондриального объема (рис. 1, *А*, кривая *2*). При этом, исходя из условий равновесия и равенства скоростей входа и выхода K^+, блокирование K^+-каналов неселективным блокатором, 4-АР должно приводить к выходу K^+ со скоростью, равной скорости входа K^+ в матрикс через каналы, блокируемые 4-АР. В то же время, блокирование $K^+_{АТР}$-канала селективным блокатором, глибенкламидом (рис. 1, *А*, кривая *3*) должно приводить к высвобождению K^+ из митохондрий со скоростью, равной скорости АТР-зависимого входа K^+ в матрикс в момент блокирования канала. С помощью подобного подхода ранее [30] мы показали способность глибенкламида блокировать, а диазоксида – активировать $K^+_{АТР}$-канал в отсутствие Mg·АТР (рис. 1, *Б*), а также обнаружили высокую чувствительность $K^+_{АТР}$-канала нативных митохондрий к диазоксиду, и установили, что активация K^+-цикла митохондрий в отсутствие Mg·АТР происходит в области очень низких наномолярных концентраций этого активатора ($K_{1/2}$~140 нМ). В то же время, мы обнаружили недостаточную селективность диазоксида как активатора $K^+_{АТР}$-канала, которая в отсутствие Mg^{2+} и АТР проявляется в неспецифическом повышении K^+-проводимости митохондриальной мембра-

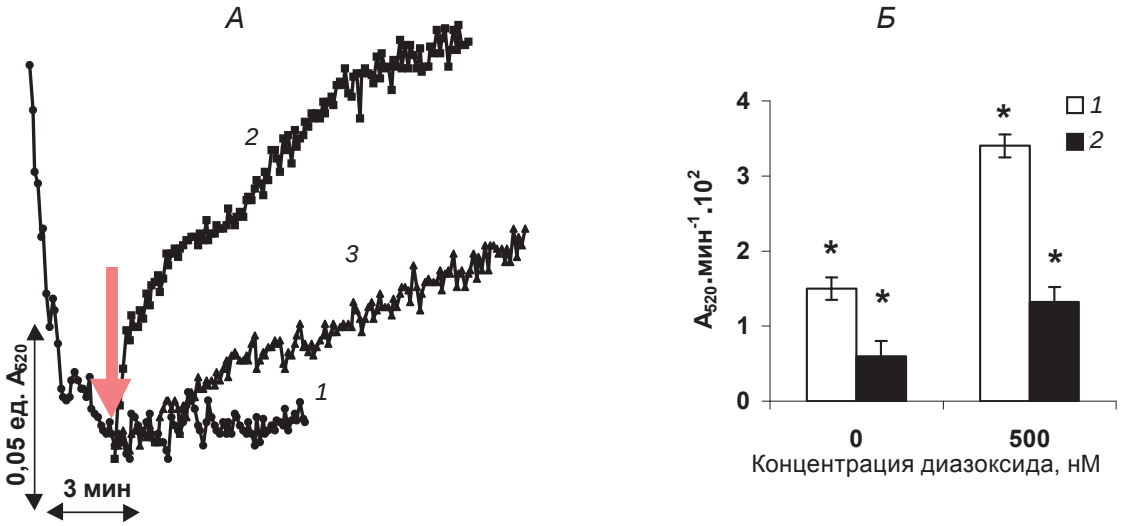

*Рис. 1. Влияние активатора (диазоксида) и блокаторов K^+-каналов (4-аминопиридина, 4-AP (1) и глибенкламида (2)) на светопоглощение суспензии митохондрий. **А**: временная зависимость изменения светопоглощения в контроле в отсутствие (1) и после внесения блокаторов 4-AP (2) и глибенкламида (3). Блокаторы вносили, как указано стрелкой; приведены типичные кривые. Кривые 2, 3 соответствуют регистрации светопоглощения после внесения блокаторов. **Б**: начальная скорость сокращения митохондриального объема (A_{520}·мин$^{-1}$) после внесения 4-AP (1) и глибенкламида (2) в отсутствие и в присутствии 500 нМ диазоксида. Среда инкубации: 120 мМ KCl, 5 мМ Tris-HCl-буфера (pH 7,4), 4 мМ глутамата Na, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ KH_2PO_4; конечная концентрация протеина 0,3 мг/мл. Митохондрии вносили в среду, содержащую диазоксид в заданной концентрации; 4-AP и глибенкламид вносили в концентрациях 5 мМ и 5·10^{-6} М соответственно. $M \pm m$, $n = 6$; $P < 0,05$. * Изменения достоверны относительно контроля. По оси абсцисс: время, мин (А), концентрация диазоксида (Б); по оси ординат: светопоглощение суспензии при 520 нм (А); начальная скорость изменения светопоглощения (A_{520}·мин$^{-1}$·10^2)*

ны и активации АТР-независимой компоненты входа K^+, не блокируемой глибенкламидом, в той же области концентраций диазоксида [30]. При этом, как установлено нами, активация циклического транспорта K^+ наномолярными концентрациями диазоксида, ≤500 нМ (повышенное накопление K^+, сопровождаемое увеличением набухания, ускорением дыхания в состоянии 2 и активацией K^+/H^+-обмена) не приводит к митохондриальной деполяризации, что согласуется и с данными литературы [1]. Эта особенность диазоксида как активатора трансмембранного обмена K^+, не сопровождаемого деполяризацией мембраны в области его наномолярных концентраций, представляет интерес для дальнейшего изучения биоэнергетических эффектов, обусловленных активацией K^+-цикла в нативных изолированных митохондриях.

Как мы уже отмечали выше, митохондриальная пора является одной из основных предполагаемых мишеней терапевтического действия активаторов $K^+_{АТР}$-канала. Поэтому нельзя не учитывать, что практическое применение активаторов $K^+_{АТР}$-канала в клинике происходит в условиях одновременного открывания МРТР. Принимая во внимание необходимость оценки подобных эффектов и что МРТР может являться модулятором ионообменных механизмов в митохондриях, в данной работе была поставлена задача изучить влияние открытия циклоспоринчувствительной поры на основные компоненты трансмембранного ионного обмена в условиях активации $K^+_{АТР}$-канала.

Спектрофотометрическая регистрация изменений митохондриального объема показывает, что в присутствии Ca^{2+} накоплению этого катиона в матриксе сопутствует высокоамплитудное набухание митохондрий, намного превышающее набухание вследствие энергозависимого накопления K^+ в бескальциевой среде (рис. 1, рис. 2, *А*, *Б*). Одновременно с набуханием, вызванным открытием митохондриальной поры и обменом вещества между матриксом и средой, вслед за накоплением Ca^{2+} происходит его высвобождение из митохондриального матрикса через пору, находящуюся в открытом состоянии (рис. 2, *В*, *Г*, кривые 1; *Д*, столбцы *1*, *2*). Как высокоам-

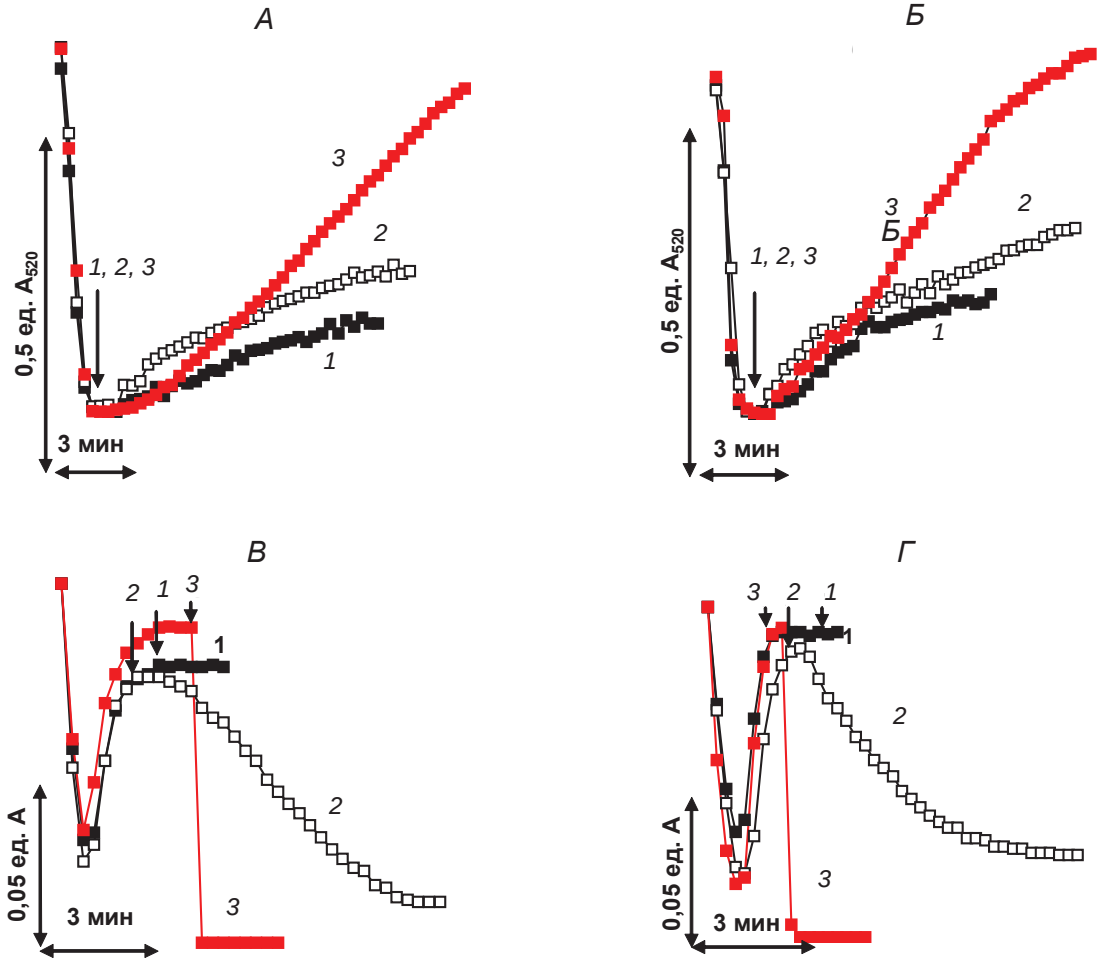

*Рис. 2. Влияние активатора $K^+_{АТР}$-канала, диазоксида, и блокатора K^+-каналов, 4-аминопиридина (4-АР) на светопоглощение суспензии митохондрий (А, Б) и изменение концентрации Ca^{2+} в среде (В–Д). Регистрацию начинали от внесения митохондрий (0,3 мг протеина) в среду инкубации в отсутствие (А, В) и в присутствии (Б, Г) 500 нМ диазоксида: 120 мМ KCl, 5 мМ Tris-HCl-буфера (pH 7,4), 4 мМ глутамата Na, 1 мМ KH_2PO_4, 10 мкМ $CaCl_2$. После завершения набухания, накопления Ca^{2+} и его выхода через пору (Д, столбцы 1, 2) в среду вносили следующие добавки: 5 мМ 4-АР (А–Г кривые 1); 5 мМ 4-АР, 1 мкМ циклоспорина А (А–Г, кривые 2; Д, столбцы 3); 5 мМ 4-АР, 1 мкМ циклоспорина А, 1 мМ ЭДТА (А–Г, кривые 3). Внесение 4-АР (1), 4-АР и циклоспорина А (2), 4-АР, циклоспорина А и ЭДТА (3) на рисунках А–Г указано стрелкой. Циклоспорин А вносили одновременно с 4-АР после завершения накопления и выхода Ca^{2+} в среду (В, Г, кривые 2; Д, столбцы 1, 2). $M \pm m$, $n = 6$; $P < 0,05$. * Изменения достоверны относительно контроля. В качестве контроля принимали накопление Ca^{2+} при внесении митохондрий в среду в присутствии 1 мкМ циклоспорина А: 38,0 ± 1 ,2 нмоль Ca^{2+}·$мг^{-1}$ протеина. В условиях открывания поры между накоплением Ca^{2+} (столбец 1), его выходом через пору (столбец 2) и возвратом в матрикс после внесения 1 мкМ циклоспорина А (столбец 3) достоверных различий не было.*

По оси ординат: светопоглощение при 520 нм (А, Б), разность светопоглощения при 654–690 нм в присутствии 35 мкМ арсеназо-III (В, Г), количество Ca^{2+}, нмоль·$мг^{-1}$ (Д); по оси абсцисс: время, мин (А–Г)

плитудное набухание, так и выход Ca^{2+} после его накопления в митохондриях устраняются предварительным внесением в среду циклоспорина А, ингибитора поры [25].

Как уже отмечалось выше (рис. 1, кривая *1*), в условиях, исключающих открытие поры, отсутствие изменений митохондриального объема (и светопоглощения суспензии) после завершения набухания свидетельствует об установлении равновесия между входом и выходом K^+, которое поддерживается одновременной работой K^+-каналов и K^+/H^+-обменника. Внесение неселективного блокатора K^+-каналов, 4-АР, приводит к демаскированию одной из компонент K^+-цикла, K^+/H^+-обмена, выходу K^+ через K^+/H^+-обменник в среду и сокращению объема матрикса (рис. 1, кривая *2*). В условиях открывания поры отсутствие изменений светопоглощения после набухания митохондрий, вызванного распределением вещества между матриксом и средой, также указывает на установление равновесного состояния, в поддержании которого, в числе прочих механизмов, принимает участие K^+-цикл. Об этом, как и ранее, свидетельствует сокращение матриксного объема после внесения 4-АР (рис. 2, *А*, *Б*, кривая *1*), которое относительно невелико и составляет ~30% изменения объема, вызванного набуханием. Приведенные данные показывают, что несмотря на открытие неселективной митохондриальной поры, часть ионов K^+ продолжает входить в матрикс через K^+-каналы, участвующие в регуляции митохондриального объема и поддержании равновесия между входом и выходом K^+.

Таким образом, изменения митохондриального объема в условиях открывания МРТР определяются набуханием митохондрий вследствие переноса низкомолекулярных соединений и воды через неселективные поры как и вследствие входа K^+ через K^+-каналы, а также сокращением объема матрикса в результате работы K^+/H^+-обмена, выводящего ионы K^+ в среду. В условиях, отвечающих установлению стационарного равновесия и отсутствию изменений митохондриального объема наблюдаемая скорость изменения светопоглощения (V) равна нулю и скорость сокращения матрикса, обусловленная работой K^+/H^+-обменника ($V_{K/H}$), равна скорости набухания, которая определяется совместной работой МРТР ($V_{МРТР}$) и K^+-каналов (V_K):

$$V = V_{K/H} - V_{МРТР} - V_K = 0, \quad (1)$$

откуда

$$V_{K/H} = V_K + V_{МРТР}. \quad (2)$$

После неселективного блокирования K^+-каналов 4-АР ($V_K = 0$) наблюдаемая скорость сокращения объема митохондрий (V) равна:

$$V = V_{K/H} - V_{МРТР}. \quad (3)$$

Таким образом, с учетом условий равновесия ($V_{K/H} = V_K + V_{МРТР}$ (2)), скорость сокращения объема матрикса после блокирования K^+-каналов по абсолютной величине становится равной компоненте скорости набухания, обусловленной входом K^+ через K^+-каналы, блокируемые 4-АР:

$$V = V_K. \quad (4)$$

Исходя из тех же условий (1), одновременное блокирование МРТР и K^+-каналов, соответственно, циклоспорином А и 4-АР, должно приводить к демаскированию K^+/H^+-обмена, при котором наблюдаемая скорость изменения митохондриального объема (1) становится равной скорости сокращения объема матрикса вследствие работы K^+/H^+-обменника: $V = V_{K/H} = V_K + V_{МРТР}$ (2).

С учетом сказанного, очевидно, что открытое состояние митохондриальной поры препятствует адекватной оценке основных характеристик трансмембранного обмена K^+ из-за присутствия компоненты, обусловленной диффузией воды, низкомолекулярных веществ и ионов K^+ через пору в матрикс митохондрий ($V_{МРТР}$). Поэтому для демаскирования K^+/H^+-обмена в условиях набухания и повышения неспецифической проницаемости митохондриальной мембраны пору блокировали циклоспорином А после завершения набухания и высвобождения Ca^{2+} в среду (рис. 2, *А–Г*, кривые *2*). Митохондриальную пору подавляли также путем удаления Ca^{2+} с помощью ЭДТА (рис. 2, *А*, *Б*, кривые *3*). При этом следует отметить, что после блокирования МРТР и неспецифической проницаемости мембраны митохондрий наблюдаемое изменение объема и светопоглощения обусловлено одним лишь транспортом K^+.

Известно, что вскоре после открытия митохондриальная пора сохраняет чувствительность к циклоспорину А, а кроме того может быть переведена в закрытое состояние при связывании Ca^{2+} хелаторами: ЭДТА, ЭГТА [31]. Сказанное подтверждается и в условиях проведенного эксперимента (рис. 2, *А*, *Б*): внесение в среду циклоспорина А приводит к закрытию поры, о чем свидетельствует как возврат Ca^{2+} в матрикс через Ca^{2+}-унипортер, так и отсутствие его повторного высвобождения в среду (рис. 2, *В*, *Г*, кривая *2*). При этом по-

вторный вход Ca^{2+} чувствителен к рутениевому красному и не наблюдается при деполяризации мембраны ротеноном, что говорит о наличии мембранного потенциала, достаточного для работы Ca^{2+}-унипортера. Возврат Ca^{2+} в матрикс после перевода поры в закрытое состояние с помощью циклоспорина А также показывает, что при открывании поры происходит активация циклического транспорта Ca^{2+} в митохондриях вследствие одновременной работы Ca^{2+}-унипортера как механизма энергозависимого входа Ca^{2+} и митохондриальной поры как пути выхода этого катиона, что соответственно приводит к установлению стационарного равновесия между содержанием Ca^{2+} в матриксе и в среде (рис. 2, *В*, *Г*, кривая *1*), которое соответствует наблюдаемому отсутствию изменений концентрации Ca^{2+} и сдвигается в сторону входа Ca^{2+} в матрикс через унипортер после закрытия поры (рис. 2, *В*, *Г*, кривые *1*, *2*; 2, *Д*, столбцы *3*).

В свою очередь, блокирование митохондриальной поры циклоспорином А, как и следовало ожидать, приводит к значительному повышению начальной скорости сокращения митохондриального объема вследствие выхода K^+ через K^+/H^+-обменник после внесения блокатора K^+-каналов (рис. 2, *А*, *Б*, кривая *2*). Таким образом, представленные данные свидетельствуют о циклоспоринчувствительной компоненте трансмембранного обмена K^+ соответствующей, вероятно, диффузии K^+ в матрикс через пору, открытое состояние которой препятствует восстановлению митохондриального объема после внесения 4-АР (рис. 2, *А*, *Б*, кривые *1*, *2*). При этом блокирование поры циклоспорином А приводит к повышению начальной скорости выхода K^+ на величину, соответствующую скорости циклоспоринчувствительной «утечки» K^+ через пору в митохондриальный матрикс.

В то же время, полное удаление Ca^{2+} с помощью ЭДТА (рис. 2, *А*, *Б*, кривая *3*) приводит не только к закрытию поры, но и к восстановлению митохондриального объема до 80–90% от первоначального уровня за счет работы K^+/H^+-обмена после блокирования входа K^+ 4-АР. О закрытии поры в последнем случае свидетельствует независимость результатов эксперимента от присутствия циклоспорина А: его внесение вместе с ЭДТА не влияет на наблюдаемую скорость повышения светопоглощения (рис. 2, *А*, *Б*, кривая *3*). Сравнение кривых изменения светопоглощения после блокирования поры циклоспорином А и ЭДТА (рис. 2, *А*, *Б*, кривые *2*, *3*) показывает, что после внесения циклоспорина А в среду восстановление митохондриального объема происходит лишь частично (рис. 2, *А*, *Б*, кривые *2*, *3*). Поэтому представляет интерес более детально проанализировать влияние накопления Ca^{2+} в матриксе после блокирования МРТР циклоспорином А на высвобождение K^+ из митохондрий, индуцированное блокатором K^+-каналов.

Как показывают результаты эксперимента, независимо от присутствия диазоксида, после блокирования МРТР циклоспорином А происходит почти полный возврат ионов Ca^{2+}, высвободившихся через пору, в митохондриальный матрикс (рис. 2, *В*, *Г*, кривые *2*; 2, *Д*, столбцы *3*). При этом вместе с накоплением Ca^{2+} (рис. 3, *А*, кривая *1*) наблюдается снижение скорости выхода K^+ из матрикса а также его ограниченное высвобождение в среду (рис. 3, *А*, кривые *2*, *3*), что свидетельствует об ингибировании K^+/H^+-обмена. Оба процесса протекают в одних и тех же временных рамках, как показывают параметры кинетических кривых, найденных по данным светопоглощения для аккумуляции Ca^{2+} ($C(t) = C_\infty (1 - e^{-kt})$; $t_{1/2} = 3{,}0 \pm 0{,}5$ мин; C_∞ соответствует выходу кривой на постоянный уровень) и высвобождения K^+ после блокирования МРТР циклоспорином А ($C(t) = (C - C_\infty)e^{-kt}$, $t_{1/2} = 3{,}3 \pm 0{,}8$ мин), полученные графически путем линеаризации соответствующих зависимостей в полулогарифмических координатах. Согласно их оценке, половинное накопление Ca^{2+} в митохондриях соответствует ~50%-му ингибированию K^+/H^+-обмена (рис. 3, *Б*), тогда как при полном удалении Ca^{2+} (рис. 2, *А–Г*, рис. 3, *А*, кривые *3*) скорость выхода K^+ в том же временном интервале остается почти постоянной, без учета лаг-фазы, предваряющей выход K^+ после внесения в среду ЭДТА, природа которой не вполне ясна (рис. 2, *А*, *Б*, кривые 3). Таким образом, после удаления Ca^{2+} с помощью ЭДТА, закрытия поры и устранения циклоспоринчувствительной утечки K^+, как и в отсутствие МРТР, происходит практически полное блокирование входа K^+ и восстановление первоначального объема митохондрий за счет работы K^+/H^+-обмена. В то же время, закрытие поры циклоспорином А в присутствии Ca^{2+} и возврат Ca^{2+} в матрикс приводят к ингибированию K^+/H^+-обмена, которое снимается при связывании ионов Ca^{2+} либо их удалении из митохондрий через пору в среду, что указывает на важную роль МРТР в регуляции трансмембранного обмена K^+ путем снижения концентрации Ca^{2+} в митохондриальном матриксе.

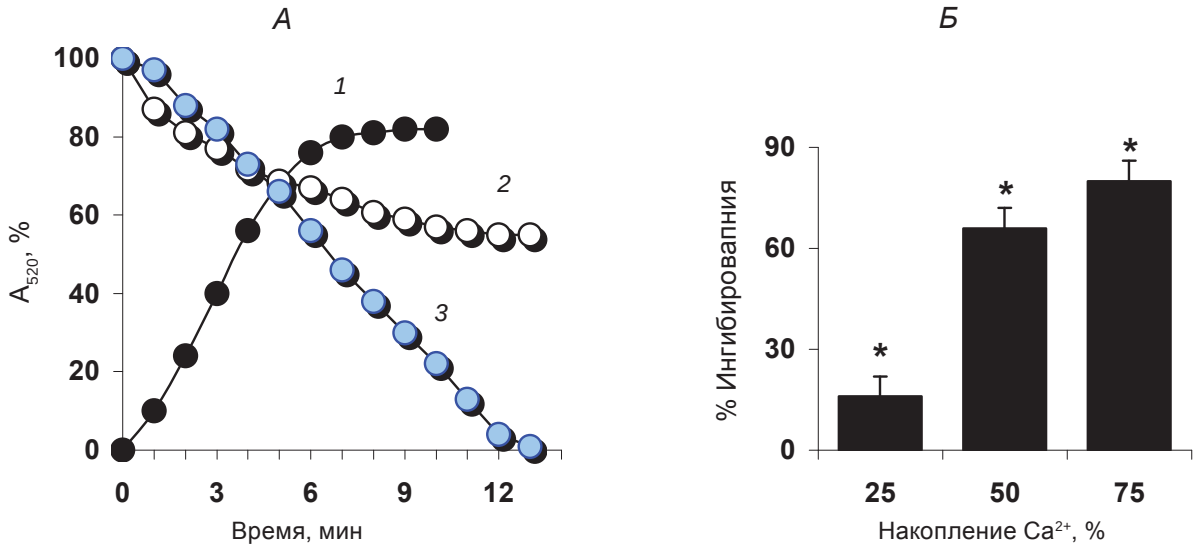

*Рис. 3. Накопление Ca^{2+} в митохондриях и высвобождение K^+ из матрикса после блокирования MPTP. **А**: изменение содержания ионов Ca^{2+} (1) и K^+ в митохондриях после внесения в среду циклоспорина А и 4-АР (1, 2), циклоспорина А, 4-АР и ЭДТА (3). Изменение концентрации K^+ и Ca^{2+} в митохондриях определяли по данным светопоглощения и выражали в %. За 100% принимали: максимальное накопление добавленного Ca^{2+} в присутствии 1 мкМ циклоспорина А (кривая 1); максимальную величину изменения светопоглощения ΔA_{520} после внесения ЭДТА, циклоспорина А и 4-АР (кривая 3). Кривая 2 рассчитана в % от максимального изменения ΔA_{520}. В случае Ca^{2+} светопоглощение регистрировали в присутствии 35 мкМ арсеназо-III, 654–690 нм. **Б**: Ингибирование K^+/H^+-обмена (%) в ходе аккумуляции Ca^{2+} в митохондриях. % ингибирования находили как разность скоростей сокращения митохондриального объема в отсутствие и в присутствии Ca^{2+} в среде. За 100% принимали скорость изменения светопоглощения после связывания Ca^{2+} ЭДТА и внесения циклоспорина А и 4-АР в моменты времени, соответствующие количеству поглощенного Ca^{2+}, %. $M \pm m$, $n = 6$; $P < 0,05$. * Изменения достоверны относительно контроля. Скорость сокращения объема митохондрий в присутствии и в отсутствие Ca^{2+} находили путем графического дифференцирования соответствующих кривых (рис. 3, А, кривые 2, 3). Среда инкубации: 120 мМ KCl, 5 мМ Tris-HCl-буфера (pH 7,4), 4 мМ глутамата Na, 1 мМ KH_2PO_4, 10 мкМ $CaCl_2$. По оси абсцисс: время, мин (а), накопление Ca^{2+}, % (Б); по оси ординат: изменение светопоглощения, % (А), ингибирование K^+/H^+-обмена, % (Б)*

Результаты спектрофотометрической регистрации изменения объема митохондрий также позволяют изучить влияние активатора $K^+_{АТР}$-канала, диазоксида, на открытие митохондриальной поры на основании анализа начальных скоростей выхода K^+ после блокирования K^+-каналов 4-АР. С учетом того, что в условиях блокирования неселективной проницаемости мембраны циклоспорином А сокращение объема матрикса происходит только вследствие K^+/H^+-обмена, который восстанавливает объем митохондрий до первоначального, можно принять, что разность между начальной скоростью уменьшения матриксного объема и повышения светопоглощения в присутствии и в отсутствие циклоспорина А после блокирования K^+-каналов 4-АР соответствует скорости пассивной диффузии ионов K^+ в матрикс через митохондриальную пору и может служить показателем ее открытого состояния. При этом начальная скорость сокращения митохондриального объема после внесения неселективного блокатора K^+-каналов в присутствии циклоспорина А соответствует начальной скорости выхода ионов K^+ путем K^+/H^+-обмена.

Приведенные соображения позволяют проанализировать роль активатора $K^+_{АТР}$-канала, диазоксида, в регуляции трансмембранного обмена K^+ в условиях открывания MPTP и оценить его влияние на функциональную активность собственно поры, на основании данных, характеризующих циклоспоринчувствительную диффузию ионов K^+ в матрикс митохондрий. С этой целью, как указано выше, была найдена зависимость разности начальных скоростей сокращения митохондриального объема после внесения блокатора

K^+-каналов в условиях открытого состояния митохондриальной поры и после ее блокирования циклоспорином А (рис. 2, *А*, *Б*, кривые *1*, *2*) от концентрации диазоксида (рис. 4). Согласно полученным результатам, в присутствии диазоксида повышаются как начальная скорость, так и амплитуда сокращения объема митохондрий, что свидетельствует об активации K^+/H^+-обмена, независимо от митохондриальной поры (рис. 2, *А*, *Б*, кривая *1*). При этом разность начальных скоростей выхода K^+ в присутствии и в отсутствие циклоспорина А, характеризующая открытое состояние митохондриальной поры, в присутствии активатора $K^+_{АТР}$-канала снижается (рис. 4, область *1*). В то же время повышается циклоспориннечувствительная компонента начальной скорости выхода K^+ (рис. 4, область *2*). Следует отметить, что митохондриальная пора оказывается чувствительной к действию низких концентраций диазоксида (50–500 нМ), отвечающих диапазону концентраций, при которых по нашим данным происходит активация $K^+_{АТР}$-канала нативных изолированных митохондрий [30].

Таким образом, результаты проведенных экспериментов показывают, что активация K^+АТР-канала диазоксидом приводит к частичному ингибированию МРТР, которое усиливается с повышением концентрации активатора. Поскольку активация $K^+_{АТР}$-канала не снижает накопления небольших добавок Ca^{2+} (10 мкМ; рис. 2, *В*, *Г*, кривая *1*; 2, *Д*, столбцы *1*), можно сделать вывод, что в используемых экспериментальных условиях ингибирование МРТР не является следствием уменьшения входа Ca^{2+} в матрикс митохондрий, как это часто предполагают в литературе [19–21]. Хотя полученные данные не позволяют в точности установить природу ингибирующего эффекта, обращает на себя внимание обратная зависимость между активацией K^+/H^+-обмена и неселективной циклоспоринчувствительной проницаемостью митохондриальной мембраны (рис. 4). Учитывая, что согласно литературным данным [32], сокращение митохондриального объема уже само по себе приводит к подавлению МРТР, можно высказать предположение, что активация K^+/H^+-обмена и уменьшение объема матрикса, обусловленное выходом K^+, являются одной из вероятных причин частичного ингибирования митохондриальной поры под действием диазоксида (рис. 4), которая до сих пор практически еще не обсуждалась в литературе [3, 4, 19–23].

Роль ионообменных механизмов, K^+/H^+- и Ca^{2+}/H^+-обмена, в регуляции открытого состояния митохондриальной циклоспоринчувствительной поры, МРТР, требует дальнейшего более детального исследования. В то же время, для регуляции биоэнергетических функций митохондрий и биоэнергетики клетки в целом важным следствием активации $K^+_{АТР}$-канала в условиях индукции МРТР является показанная в настоящей работе одновременная активация циклического транспорта K^+ и Ca^{2+}. Циклический транспорт Ca^{2+} поддерживается одновременной работой поры и Ca^{2+}-унипортера, тогда как K^+-цикл – работой K^+/H^+-антипортера и K^+-каналов, включая $K^+_{АТР}$-канал. Одним из основных условий активации трансмембранного обмена K^+, по-видимому, является снижение содержания Ca^{2+} в матриксе мито-

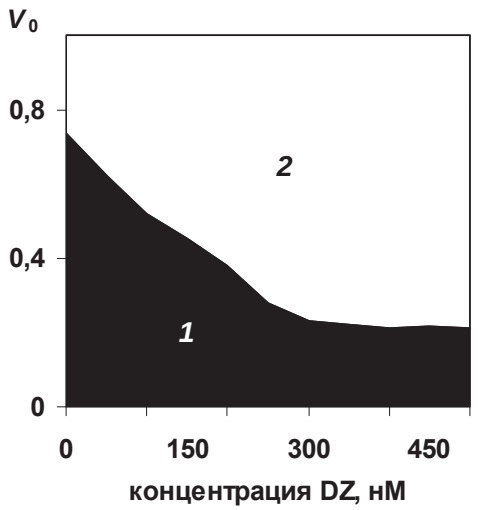

Рис. 4. Влияние диазоксида на относительную долю циклоспоринчувствительной, v_1 (1) и циклоспориннечувствительной, v_2 (2) компонент начальной скорости сокращения объема митохондрий (v_0) после внесения блокатора K^+-каналов, 4-АР, в среду инкубации: 120 мМ KCl, 5 мМ Tris-HCl-буфера (pH 7,4), 4 мМ глутамата Na, 1 мМ KH_2PO_4, 10 мкМ $CaCl_2$. Диазоксид вносили в среду в указанных концентрациях; n = 6, изменения достоверны относительно контроля ($P < 0,05$). Долю циклоспоринчувствительной компоненты находили по разности начальных скоростей сокращения митохондриального объема в отсутствие и в присутствии циклоспорина А и выражали в относительных единицах. Начальную скорость сокращения объема митохондрий после внесения циклоспорина А и 4-АР принимали за 1: $v_0 = v_1 + v_2 = 1$, где $v_1 = V_1/(V_1 + V_2)$; $v_2 = V_2/(V_1 + V_2)$, где V_1 и V_2 – абсолютные значения начальных скоростей сокращения объема митохондрий по данным светопоглощения. По оси ординат: начальная скорость изменения светопоглощения в относительных единицах; по оси абсцисс: концентрация диазоксида, нМ

хондрий вследствие его высвобождения через пору в среду. В то же время, открытое состояние МРТР, при одновременной работе Ca^{2+}-унипортера, позволяет поддерживать высокую скорость трансмембранного обмена Ca^{2+}, что, в частности отражается в высокой скорости потребления кислорода (данные не приведены). Элиминация Ca^{2+}-цикла и удаление ионов Ca^{2+} из матриксного пространства митохондрий приводит к демаскированию K^+/H^+-обмена и восстановлению митохондриального объема, что указывает на обратимость его регуляции. Таким образом, результаты проведенного исследования обнаруживают важную физиологическую функцию МРТР, которая заключается в активации трансмембранного ионного обмена (K^+ и Ca^{2+}) при одновременном поддержании низкого содержания Ca^{2+} в матриксе, что является возможной причиной показанного нами ранее [33] снижения продукции АФК в митохондриях в условиях открывания митохондриальной поры *in vivo*. Последующее ускорение K^+-цикла под действием активаторов $K^+_{АТР}$-канала, возможно, начинает играть роль механизма обратной связи, усиление которого ведет к подавлению МРТР и может служить инструментом регуляции открытого состояния циклоспоринчувствительной поры и процессов, зависящих от энергетического статуса митохондрий, таких как синтез АТР и продукция АФК, что с вероятностью объясняет эффективность применения этих фармакологических препаратов в клинике. Более глубокое понимание роли трансмембранного обмена K^+ в регуляции МРТР, как и механизмов, лежащих в основе кардиопротекторного действия активаторов $K^+_{АТР}$-канала, требует дальнейших, тщательных и настойчивых исследований.

ВПЛИВ АКТИВАТОРА АТР-ЗАЛЕЖНОГО K^+-КАНАЛУ ДІАЗОКСИДУ НА ЦИКЛОСПОРИНЧУТЛИВУ ПОРУ В МІТОХОНДРІЯХ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ

О. В. Акопова

Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ;
e-mail: luko@biph.kiev.ua

Досліджено вплив активатора мітохондріального АТР-залежного K^+-канала ($K^+_{АТР}$-канала) діазоксиду (DZ) на відкриття циклоспоринчутливої пори (mitochondrial permeability transition pore (MPTP) в мітохондріях печінки щурів. За відсутності DZ відкриття пори призводить до прискорення циклічного транспортування K^+ й Ca^{2+}, яке підтримується одночасною роботою K^+-каналів та K^+/H^+-обмінника, а також – Ca^{2+}-уніпортера і мітохондріальної пори як шляхів входу та вивільнення катіонів. Показано, що за дії DZ, незалежно від МРТР, відбувається активація обох складових K^+-циклу: енергозалежної акумуляції K^+ та K^+/H^+-обміну. При цьому встановлено, що активація трансмембранного обміну K^+ за дії DZ призводить до часткового інгібування МРТР. Запропоновано методичний підхід до оцінки функціональної активності МРТР в умовах активації $K^+_{АТР}$-каналу.

Встановлено, що повернення Ca^{2+} до матриксу після пригнічення МРТР циклоспорином А слідом за відкриттям пори супроводжується інгібуванням K^+/H^+-обміну, яке відбувається в міру надходження Ca^{2+} до мітохондрій. Таким чином, результати дослідження виявляють важливу фізіологічну функцію МРТР, яка полягає у підтриманні низьких концентрацій Ca^{2+} у матриксі за одночасної активації трансмембранного іонного обміну (K^+ та Ca^{2+}), яка може мати визначальне значення для перебігу енергозалежних процесів у мітохондріях.

Ключові слова: $K^+_{АТР}$-канал, діазоксид, Ca^{2+}, K^+, транспортування, мітохондріальна пора.

THE INFLUENCE OF ATP-DEPENDENT K^+-CHANNEL DIAZOXIDE OPENER ON THE OPENING OF MITOCHONDRIAL PERMEABILITY TRANSITION PORE IN RAT LIVER MITOCHONDRIA

O. V. Akopova

Bogomolets Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: luko@biph.kiev.ua

Summary

The influence of mitochondrial ATP-dependent K^+-channel ($K^+_{АТР}$-channel) opener, diazoxide (DZ) on the mitochondrial permeability transition pore (MPTP) opening in rat liver mitochondria is studied. In the absence of DZ the MPTP opening leads to the increase in the rate of K^+- and Ca^{2+}-cycling supported by the simultaneous functioning of K^+-channels and K^+/H^+-antiporter, and also Ca^{2+}-uniporter together with MPTP as the cations influx and efflux pathways.

Independent of MPTP opening, the activation of both constitutes of K^+-cycle, K^+-uptake as well as K^+/H^+-exchange, by DZ is observed. It is shown that the activation of transmembrane exchange of K^+, combined with MPTP opening, results in partial inhibition of the latter. A simple methodical approach for the estimation of DZ influence on the open state of mitochondrial pore is proposed.

It is shown that MPTP closure followed by Ca^{2+} reentry to the matrix is accompanied by the K^+/H^+-exchange inhibition which takes place in the same timeframes as the increase in matrix Ca^{2+} content. Relevant to physiological conditions, an important physiological function of MPTP is revealed, that is the maintenance of relatively low matrix level of Ca^{2+} accompanied by the acceleration of transmembrane ion exchange (K^+ and Ca^{2+}) which could strongly influence the energy state and energy-dependent processes in mitochondria.

Key words: K^+_{ATP}-channel, diazoxide, Ca^{2+}, K^+, transport, mitochondrial permeability transition pore.

1. *Garlid, K. D.* // Basic Res. Cardiol. – 2000. – **95**. – P. 275–279.
2. *Oldenburg O., Cohen M. V., Yellon D. M., Downey J. M.* // Cardiovasc. Res. – 2002. – **55**. – P. 429–437.
3. *Facundo H. T., Fornazari M., Kowaltowski A. J.* // Biochim. Biophys. Acta. – 2006. – **1762**. – P. 202–212.
4. *Миронова Г. Д., Качаева Е. В., Копылов А. Т.* // Вестн. РАМН 2007. – **2**. – С. 34–43.
5. *Garlid K. D., Paucek P.* // Biochim. Biophys. Acta. – 2003. – **1606**. – P. 23–41.
6. *Bernardi P.* // Physiol. Rev. – 1999. – **79**. – P. – 1127–1155.
7. *Rottenberg H.* // Eur. J. Biochem. – 1970. – **15**. – P. 22–28.
8. *Moore C. L.* // Curr. Top. Bioenerg. – 1971. – **4**. – P. 191–236.
9. *Akerman K. E. O., Wikstrom M. K. F.* // FEBS Lett. – 1976. – **68**. – P. 191–197.
10. *Bernardi P., Azzone G. F.* // Biochim. Biophys. Acta. – 1983. – **724**. – P. 212–223.
11. *Mitchell P., Moyle J.* // Biochem. J. – 1967. – **105**. – P. 1147–1162.
12. *Beavis A. D.* // J. Biol. Chem. – 1987. – **262**. – P. 6165–6173.
13. *Miwa S., Brand M. D.* // Biochem. Soc. Trans. – 2003. – **31**. – P. 1300–1301.
14. *Skulachev V. P.* // Biochim. Biophys. Acta. – 1998. – **1363**. – P. 100–124.
15. *Das B., Sarkar C.* // Pharmacol. Res. – 2003. – **47**. – P. 447–461.
16. *Puddu P. E., Garlid K. D., Monti F. et al.* // Cardiovasc. Drug Rev. – 2000. – **18**. – P. 25–46.
17. *Sato T., Costa A. D., Saito T. et al.* // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2006. – **316**. – P. 182–188.
18. *Sato T., Sasaki N., O'Rourke B., Marban E.* // J. Am. Coll. Cardiol. – 2000. – **35**. – P. 514–518.
19. *Murata M., Akao M., O'Rourke B., Marban E.* // Circ. Res. – 2001. – **89**. – P. 891–898.
20. *Facundo H. T. F., dePaula J. G., Kowaltowski A. J.* // J. Bioenerg. Biomembr. – 2005. – **37**. – P. 75–82.
21. *Holmuhamedov E. L., Jovanovic S., Dzeja P. et al.* // Am. J. Physiol. – 1998. – **275**. – P. H1567–H1576.
22. *Busija D. W., Lacza Z., Rajapakse N. et al.* // Brain Res. Rev. – 2004. – **46**. – P. 282–294.
23. *Costa A. D. T., Garlid K. D.* // Am. J. Physiol. – 2008. – **295**. – P. H874–H882.
24. *Katoh H., Nishigaki N., Hayashi H.* // Circulation. – 2002. – **105**. – P. 2666–2671.
25. *Акопова О. В.* // Укр. біохім. журн. – 2008. – **80**, № 3. – С. 40–47.
26. *Kroemer G., Zamzami N., Susin S. A.* // Immunol. Today. – 1997. – **18**. – P. 44–51.
27. *Skulachev V. P.* // Mol. Asp. Med. – 1999. – **20**. – P. 139–184.
28. *Beavis A. D., Brannan R. D., Garlid K. D.* // J. Biol. Chem. – 1985. – **260**. – P. 13424–13443.
29. *Tedeschi H.* // J. Biophys. Biochem. Cytol. – 1959. – **6**. – P. 241–252.
30. *Акопова О. В., Носарь В. И., Бурый В. А. и др.* // Биохимия. – 2010. – **75**. – P. 1273–1283.
31. *Petit P. X., Goubern M., Diolez Ph. et al.* // FEBS Lett. – 1998. – **426**. – P. 111–116.
32. *Nogueira V., Devin A., Walter L. et al.* // J. Bioenerg. Biomembr. – 2005. – **37**. – P. 25–33.
33. *Акопова О. В., Коцюруба А. В., Харламова О. М. та ін.* // Фізіол. журн. – 2010. – **56**, № 4. – С. 76–85.

Получено 28.02.2011