УДК 576.311.347 577.352.4

РЕГУЛЯЦІЯ ФУНКЦІОНУВАННЯ АТР-ЧУТЛИВОГО K^+-КАНАЛУ МІТОХОНДРІЙ МІОМЕТРІЯ АКТИВНИМИ ФОРМАМИ КИСНЮ

О. Б. ВАДЗЮК, Ю. Ю. МАЗУР, С. О. КОСТЕРІН

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України,Київ;
e-mail: vadzyuk@biochem.kiev.ua

У попередніх роботах, виконаних на ізольованих мітохондріях матки щурів, нами було показано функціонування АТР-чутливого K^+-каналу (мітоК$_{ATP}$). Його регуляція у клітинах міометрія не є достатньо вивченою. Тому дослідження активації мітоК$_{ATP}$ в умовах окисного стресу є актуальним.

Відомо, що активні форми кисню (АФК), які генеруються за окисного стресу, можуть не тільки індукувати апоптоз, але також опосередковувати захист клітини від стресу. Активацію мітоК$_{ATP}$ АФК, що забезпечує виживання клітини в умовах окисного стресу, було показано на клітинах мозку та серця. Але відомостей стосовно регуляції АФК цієї структури у клітинах матки немає. Тому метою нашої роботи було дослідження впливу АФК на активацію мітоК$_{ATP}$ у клітинах матки щурів.

Окисний стрес в ізольованих міоцитах щурів індукували ротеноном (50 мкМ). Було продемонстровано масоване утворення АФК та гіперполяризацію мітохондріальної мембрани у присутності ротенону. Активація мітоК$_{ATP}$ селективним активатором діазоксидом призводила до деполяризації мітохондріальної мембрани, яка усувалась селективним блокатором цієї структури глібенкламідом (20 мкМ). Діазоксид виявляв дозозалежний ефект на потенціал мітохондрій в діапазоні концентрацій від 500 нМ до 75 мкМ. Максимальний ефект спостерігається при 25 мкМ діазоксиду. Уявна константа спорідненості діазоксиду до мітоК$_{ATP}$ ($\langle K_{1/2}\rangle_p$) у присутності ротенону становить $(1,24 \pm 0,21)\cdot10^{-6}$ М. Діазоксид також деполяризує мітохондріальну мембрану в умовах нормоксії, але $\langle K_{1/2}\rangle$ в цьому разі є більшою і становить $(5,01 \pm 1,47)\cdot10^{-6}$ М.

Скавенджер активних форм кисню (АФК) N-ацетилцистеїн (NAC)(0,5–1 мМ) успішно попереджає деполяризацію мітохондріальної мембрани діазоксидом в умовах окисного стресу, спричиненого ротеноном. Одержані нами дані свідчать, що зв'язування АФК N-ацетилцистеїном в умовах окисного стресу попереджає активацію мітоК$_{ATP}$. Дійшли висновку, що АФК регулюють активність мітоК$_{ATP}$.

Ключові слова: мітохондрії, АТР-чутливий K^+-канал, діазоксид, активні форми кисню.

Патологічні умови, що супроводжуються масованим утворенням АФК, зазвичай негативно впливають на життєдіяльність клітини та органа в цілому [1]. Окислювальний стрес пов'язаний із розвитком хвороб м'язової тканини серця, судин, патологій травної та репродуктивної системи [1–3]. Для репродуктивної системи окислювальний стрес може мати особливо згубні наслідки. Так, із окислювальним стресом пов'язують порушення нормального перебігу вагітності, зокрема прееклампсію та затримку внутрішньоутробного розвитку плода [4].

На клітинах серця було виявлено, що наслідки ішемії–реперфузії, яка супроводжується, як відомо, надмірним утворенням АФК, успішно усувались речовиною, яка активує АТР-чутливий K^+-канал плазматичної мембрани [5]. Тому дослідники звернули увагу на його активацію в умовах переокислення як на потенційний фактор, що визначає захист клітини від наслідків стресу.

Якщо структура, функціонування та регуляція АТР-чутливих K^+-каналів плазматичної мембрани є об'єктом досліджень протягом багатьох десятиліть, то існування аналогів у мітохондріях (мітоК$_{ATP}$) тривалий час дослідниками ставилось під сумнів у зв'язку з відсутністю достовірних даних щодо молекулярної ідентифікації їхніх субодиниць. Лише в останнє десятиліття було показано наявність глібенкламідчутливих (субтип SUR2) та каналоутворюючих (субтип Kir6x) субодиниць у внутрішній мембрані мітохондрій мозку та серця [6, 7]. Крім того, на інтактних мітохондріях тканин нирок та серця було показано АТР-чутливе транспортування іонів K в матрикс мітохондрій [8–10]. Також виявилось, що діазоксид, який активує АТР-чутливі канали плазматичної мембрани клітин серця та печінки у мілімолярному діапазоні концентрації, має на декілька порядків нижчу уявну константу спорідненості до мітоК$_{АТР}$ [11]. На цілих клітинах було показано, що внесення діазоксиду в мікромолярних концентраціях в умовах окислювального стресу успішно попереджає індукцію апоптозу [12]. Тому роль мітоК$_{АТР}$ АТР-чутливих K^+-каналів в умовах окислювального стресу є об'єктом інтенсивних досліджень протягом останніх років. Показано, що за патологічних станів, які супроводжуються в т.ч. і збільшеним утворенням АФК, активація мітоК$_{АТР}$ відбувається у відповідь на стрес і усуває негативні для клітини наслідки дії надмірних концентрацій АФК [8, 13, 14]. Також виявилось, що складний взаємозв'язок між АФК та активацією мітоК$_{АТР}$ може опосередковуватись АФК-чутливими ензимами, зокрема протеїнкіназою Cε [15, 16]. Авторами [13, 16, 17] продемонстровано, що, протеїнкіназа Cε за активації АФК, у свою чергу, може активувати мітоК$_{АТР}$. Це свідчить, що АФК можуть відігравати двояку роль в окислювальному стресі. З одного боку, широко відома здатність їх пошкоджувати клітинні структури [18], з іншого, – АФК можуть відігравати роль клітинних месенджерів, що опосередковують захист клітини від стресу [8]. Зокрема, таку роль АФК було показано для клітин серця та головного мозку [13, 19]. Враховуючи вищенаведені факти, цілком зрозуміло, що дослідження регуляції мітоК$_{АТР}$ в умовах окислювального стресу є досить перспективним.

Функціонування мітоК$_{АТР}$ інтенсивно досліджується на клітинах серця, нервової системи, печінки [13, 17, 19], але існує досить мало відомостей стосовно функціонування цього каналу у клітинах матки, хоча його наявність на плазматичній мембрані було показано у роботах [20, 21]. У дослідженні, проведеному на міометрії людини [21] була доведена наявність каналоутворюючої Kir6.1 і регуляторних субодиниць – SUR1 та SUR2B. Причому чутливою до діазоксиду є лише SUR2B-субодиниця, яка містить сайт зв'язування з цим активатором [22]. Також у роботі [20] було показано експресію в міометрії щурів каналоутворюючої субодиниці Kir 6.1 і регуляторних субодиниць типів SUR2B та SUR1. Тобто функціонування АТР-чутливого K^+-каналу плазматичної мембрани міоцитів матки не викликає сумнівів. Але, проаналізувавши джерела літератури, ми не знайшли робіт, що стосуються функціонування та регуляції цієї структури саме в мітохондріях міометрія.

У попередніх роботах нами було показано функціонування K^+-каналу, що має властивості мітоК$_{АТР}$, в ізольованих мітохондріях міометрія [23, 24]. Активація цього каналу діазоксидом в умовах нормоксії призводить до деполяризації внутрішньої мембрани та збільшення об'єму мітохондрій, причому обидва ці ефекти усуваються блокатором каналу глібенкламідом [24]. Дослідження активності та регуляції мітоК$_{АТР}$ у клітинах міометрія в умовах підвищеної продукції АФК досі залишається відкритим. Зокрема, у вивчених нами джерелах літератури ми не знайшли даних про те, чи виявляють АФК подібний вплив на активацію мітоК$_{АТР}$ у клітинах матки так само як у клітинах серця та головного мозку [13, 19].

Враховуючи роль окислювального стресу в розвитку патології репродуктивної системи [4], в цій роботі ми поставили завдання дослідити роль АФК в регуляції активності мітоК$_{АТР}$ у клітинах міометрія.

Матеріали і методи

Одержання клітин міометрія. Матку щура поміщали в розчин Хенкса А (рН 7,4, 36 °С) (мМ): NaCl – 136,9, KCl – 5,36, KH_2PO_4 – 0,44, $NaHCO_3$ – 0,26, Na_2HPO_4 – 0,26, глюкоза – 0,01%, HEPES (рН 7,4, 37 °С) – 10,0, $CaCl_2$ – 1,26, $MgCl_2$ – 0,4, $MgSO_4$ – 0,4. Тканину нарізали на дрібні шматочки (2 × 2 мм) і відмивали від крові й іонів Ca^{2+} протягом 15 хв у розчині Хенкса В (рН 7,4, 36 °С) (мМ): NaCl – 136,9, KCl – 5,36, KH_2PO_4 – 0,44, $NaHCO_3$ – 0,26, Na_2HPO_4 – 0,26, глюкоза – 0,01%, HEPES (рН 7,4, 37 °С) – 10,0, $CaCl_2$ – 0,03. Відмиті частинки тканини інкубували протягом 20 хв при температурі 36 °С в 5 мл середовища на основі розчину В, що додатково містив 0,1% колагенази, 0,1% БСА та 0,01% соєвого інгібітора трипсину. Середовище дисоціації видаляли, до тканини додавали 10 мл розчину В та піпетували протягом 5 хв. Цикл інкубування з колагеназою та піпетування повторювали 5 разів.

Розчин В після третього–п'ятого піпетування, що містив окремі клітини, відбирали для подальшої роботи. Одержану суспензію клітин центрифугували двічі при 80 g протягом 10 хв. Після центрифугування суспензію пропускали через нейлоновий фільтр. Кількість клітин рахували за допомогою камери Горяєва після фарбування трипановим синім. Клітини зберігали в розчині Хенкса В за кімнатної температури.

Утворення АФК досліджували спектрофлуориметрично з використанням зонда дихлорофлуоресцеїну діацетату (5 мкМ). Флуоресценцію зонда збуджували за довжини хвилі 504 нм, реєстрували – при 520 нм. Нефлуоресціююча та мембранопроникна форма дихлорофлуоресцеїну – 2,7-дихлорофлуоресцин діацетат – легко проходить крізь плазматичну мембрану та деацетилюється всередині клітини неспецифічними клітинними естеразами у мембранонепроникний 2,7-дихлорофлуоресцин. Під час окислення активними формами кисню 2,7-дихлорофлуоресцин перетворюється у флуоресцентну форму – дихлорофлуоресцеїн [25]. Концентрація зонда в середовищі дорівнювала 5 мкМ. Кількість клітин у пробі становила 1 млн/мл. Ротенон вносили у пробу перед додаванням аліквоти розчину зонда. У контрольну пробу вносили відповідну аліквоту ДМСО також перед додаванням зонда.

Мембранний потенціал мітохондрій досліджували спектрофлуориметрично з використанням потенціалчутливого зонда $DioC_6(3)$. Флуоресценцію зонда реєстрували за довжини хвилі збудження 490 нм та випромінювання 510 нм. Для контролю саме мітохондріальної компоненти мембранного потенціалу для кожної проби прописували контрольну пробу, до якої, крім діючих речовин, вносили 33 мкМ СССР. СССР-нечутливу компоненту з контролю віднімали, в подальшому працювали лише із СССР-чутливою, тобто мітохондріальною компонентою мембранного потенціалу. Діазоксид, СССР, глібенкламід та ротенон розчиняли в ДМСО, а N-ацетилцистеїн – у бідистиляті. Концентрації діючих речовин дорівнювали (мМ): ротенон – 0,05, NAC – 0,5 та 1, глібенкламід – 0,02, діазоксид – 0,05 (в окремих дослідах концентрацію діазоксиду змінювали, точні концентрації зазначено в підписах до рисунку). Всі діючі речовини перед додаванням зонда вносили в середовище інкубації об’ємом 1,5 мл, що містило 1 млн клітини у 1 мл. Концентрований розчин зонда $DioC_6(3)$ готували в етанолі; в середовище інкубації вносили аліквоту 10 мкл до кінцевої концентрації 150 нМ. Реєстрацію флуоресцентного сигналу починали з моменту внесення аліквоти зонда.

Кінетичний аналіз дії діазоксиду проводили в діапазоні концентрацій від 500 нМ до 75 мкМ. Апроксимацію кінетичних кривих зростання флуоресцентної відповіді потенціалчутливого зонда при різних концентраціях діазоксиду проводили у термінах хімічної реакції першого порядку, використовуючи відношення:

$$I = I_{max} (I - e^{-kt}),$$

де I та I_{max} – миттєва та максимальна (платова у часі) флуоресцентна відповідь зонда, k – уявна константа швидкості процесу (вимірюється у c^{-1}), t – час. Відповідно до цього рівняння константу швидкості k розраховували як від’ємне значення тангенса кута нахилу графіка, лінеаризованого в напівлогарифмічних координатах $\{\ln[(I_{max} - I)/I_{max}];\ t\}$ (коефіцієнт кореляції 0,9–0,99). Початкову швидкість V_0 (% за с) розраховували за рівнянням $V_0 = (dI/dt)_{t=0} = k \cdot I_{max}$. За 100% приймали платове значення флуоресценції зонда за відсутності діазоксиду у присутності або за відсутності ротенону. Платові значення флуоресценції при різних концентраціях діазоксиду вираховували у відсотках від 100%.

Уявну константу активації мітоK_{ATP} діазоксидом(‹$K_{1/2}$›) розраховували у модифікованих координатах Хілла, використовуючи рівняння

$$\lg [(V_0 - V_{0d})/(V_0 - V_{dpl})] = n \lg I - n \lg K,$$

де V_0 – початкова швидкість реакції в середовищі без діазоксиду, V_{0d} – початкова швидкість реакції у середовищі з різними концентраціями діазоксиду, V_{dpl} – початкова швидкість реакції в середовищі з максимальними діючими концентраціями діазоксиду (25–75 мкМ).

Кінетичний аналіз результатів та побудову графіків проводили із використанням програми Microcal Origin, версія 5.0 (Microcal Software Inc., США).

У роботі було використано речовини: ротенон, діазоксид, глібенкламід, N-ацетилцистеїн, СССР, 2,7-дихлорофлуоресцин діацетат (DCF) виробництва Sigma – Aldrich, США, 3,3′-дигексилоксакарбоціанінйодид ($DiOC_6(3)$ (Fluka, Швейцарія).

Результати та обговорення

Дослідження утворення АФК в міоцитах матки за дії ротенону. Як речовину, яка може індукувати АФК, було використано ротенон. У деяких роботах продемонстровано індукцію АФК цією речовиною в мітохондріях кардіоміоцитів [26]. Вважається, що причиною цього є блокування переносу електронів у комплексі І [26]. Для того, щоб безпосередньо з’ясувати, чи індукує ротенон АФК у мітохондріях міоцитів, ми використали чутливий до АФК флуоресцентний зонд дихлорофлуоресцеїн діацетат. Виявилось, що у присутності ротенону (50 мкМ) (рис. 1, крива *2*) в середовищі інкубації флуоресцентна відповідь зонда через 200 с інкубації є у чотири рази вищою, ніж за аналогічних умов, але без ротенону (рис. 1, крива *1*). Тобто наші дані, в сукупності з даними інших авторів, підтверджують індукцію АФК ротеноном.

Мембранний потенціал мітохондрій клітин міометрія щурів досліджували спектрофлуориметрично з використанням потенціалчутливого зонда $DiOC_6(3)$ (150 нМ) (рис. 2, крива *1*). У паралельні проби вносили протонофор СССР 33 мкМ, що повністю знімає потенціал на внутрішній мітохондріальній мембрані (рис. 2, крива *2*). Далі СССР-нечутливу компоненту віднімали. Одержані значення флуоресценції відображали потенціал мітохондріальної мембрани в умовних одиницях флуоресценції.

Використовуючи підібрані нами умови реєстрації мембранного потенціалу мітохондрій, ми дослідили вплив на нього ротенону. Ротенон (50 мкМ), доданий до середовища інкубації міоцитів безпосередньо перед вимірюванням, зумовлює істотне зростання флуоресцентної відповіді зонда порівняно з контролем (рис. 3, крива *1*, *4*), що свідчить про гіперполяризацію мітохондріальної мембрани в його присутності. Гіперполяризацію мітохондріальної мембрани за дії ротенону також було показано в роботі [27]. Скавенджер АФК N-ацетилцистеїн (NAC) знімає гіперполяризуючий ефект ротенону на мітохондріальну мембрану (рис. 3, крива *2*, *3*). Причому його дія є концентраційнозалежною.

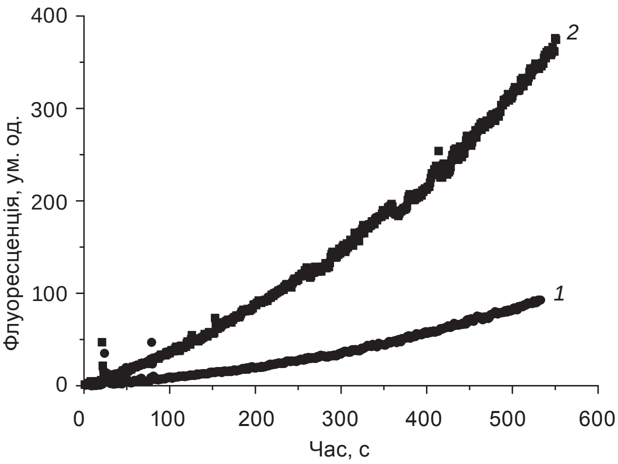

Рис. 1. Індукція ротеноном АФК у суспензії міоцитів матки. 1 – стандартні умови інкубації; 2 – середовище інкубації містить 50 мкМ ротенону. Наведено дані типового експерименту

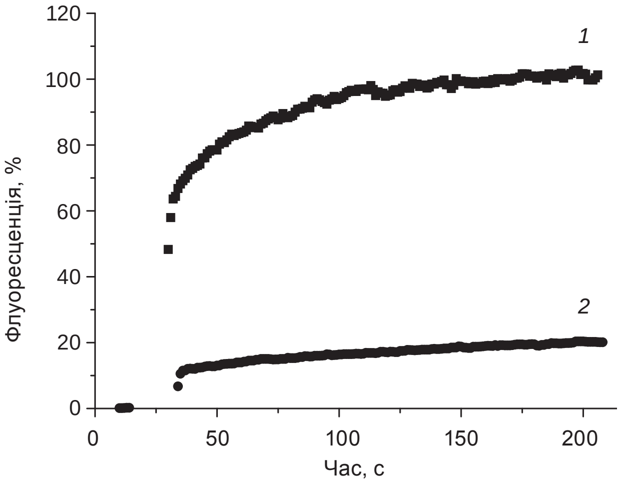

Рис. 2. Реєстрація СССР-чутливого мембранного потенціалу в міоцитах матки. 1 – флуоресцентна відповідь зонда $DioC_6(3)$ у стандартному середовищі інкубації у присутності ротенону; 2 – в умовах, наведених в 1, але з додаванням 33 мкМ протонофору СССР. СССР вносили у середовище інкубації перед додаванням зонда. За 100% приймали платове значення флуоресцентної відповіді зонда в середовищі інкубації із клітинами, що містило ротенон (50 мкМ)

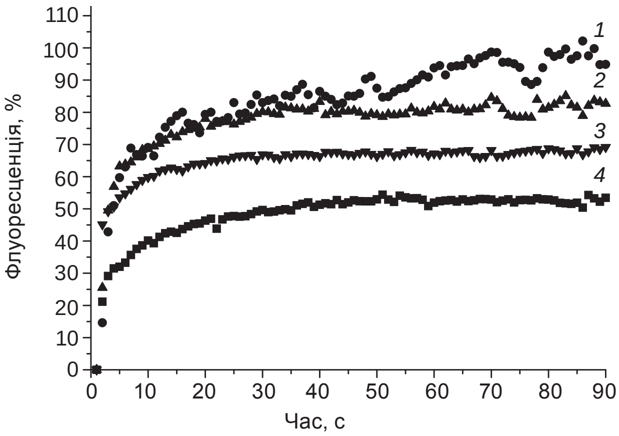

Рис. 3. Вплив ротенону та NAC на мембранний потенціал мітохондрій міометрія. На рис. 3–5 всі криві – флуоресцентна відповідь зонда $DioC_6(3)$, тобто компонента із СССР-чутливою, а саме мітохондріальною. 1 – флуоресцентна відповідь зонда в середовищі інкубації, що містить міоцити, у присутності ротенону. Криві 2 та 3 одержано у присутності ротенону (50 мкМ) та NAC у концентрації 500 мкМ та 1 мМ відповідно; 4 – флуоресцентна відповідь зонда в середовищі інкубації, що містить міоцити (без ротенону). Тут і далі (рис. 4–5) за 100% приймали платове значення СССР-чутливої компоненти флуоресцентної відповіді зонда в середовищі інкубації, що містило ротенон (50 мкМ)

Але за відсутності ротенону NAC не впливає на потенціал мітохондрій (дані не наведено). Гіперполяризація за дії ротенону успішно усувається речовиною, яка інактивує АФК, про що свідчать дані, наведені на рис. 3. Отже, порівнюючи результати, одержані з потенціалчутливим зондом і з даними, одержаними за допомогою АФК-чутливого зонда, ми можемо зробити висновок, що чутлива до N-ацетилцистеїну гіперполяризація мітохондрій за дії ротенону опосередкована суперпродукцією АФК.

Дослідження активації мітоК$_{ATP}$ у клітинах матки в умовах суперпродукції АФК. Метою роботи було дослідження активації мітоК$_{ATP}$ в умовах інтенсивного утворення АФК. Активацію мітоК$_{ATP}$ у клітинах матки вивчали, реєструючи зміну потенціалу мітохондріальної мембрани за дії селективного активатора діазоксиду. Раніше на фракції ізольованих мітохондрій міометрія, використовуючи метод протокової цитометрії, нами було продемонстровано деполяризацію мітохондріальної мембрани за активації мітоК$_{ATP}$ діазоксидом, яка успішно знімається блокатором каналу глібенкламідом і спостерігається лише у KCl-вмісному середовищі, що свідчить про селективність дії цих речовин саме на досліджуваний нами канал [24].

Внесення діазоксиду (500 нМ – 50 мкМ) у середовище інкубації клітин міометрія у присутності ротенону (50 мкМ) призводить до концентраційнозалежної деполяризації мітохондріальної мембрани (рис. 4). Причому деполяризуючий ефект діазоксиду спостерігається навіть за мінімальної використаної нами концентрації (500 нМ) (рис. 4, крива *1*, *2*). При концентраціях 25–50 мкМ діазоксиду спостерігається максимальний ефект, відбувається зменшення платового значення флуоресценції зонда приблизно в 1,5 раза по відношенню до контролю (рис. 4, крива *4*).

Внесення селективного блокатора мітоК$_{ATP}$ глібенкламіду (20 мкМ) разом із діазоксидом (50 мкМ) у присутності ротенону (50 мкМ) приводить до повернення потенціалу мітохондрій до контрольних значень (рис. 5, крива *1*–*3*). Відповідь на селективний блокатор каналу – глібенкламід – свідчить, що деполяризація мітохондрій в цьому разі спричинена саме активацією мітоК$_{ATP}$. Ці дані підтверджуються дослідженнями на ізольованих мітохондріях матки [24].

За відсутності в середовищі інкубації ротенону також спостерігається деполяризація мембрани діазоксидом, але за наявності більших його концентрацій (від 1 мкМ) (дані не наведено).

Кінетичний аналіз впливу АФК на активацію мітоК$_{ATP}$ діазоксидом. Для розрахунку уявних констант активації було

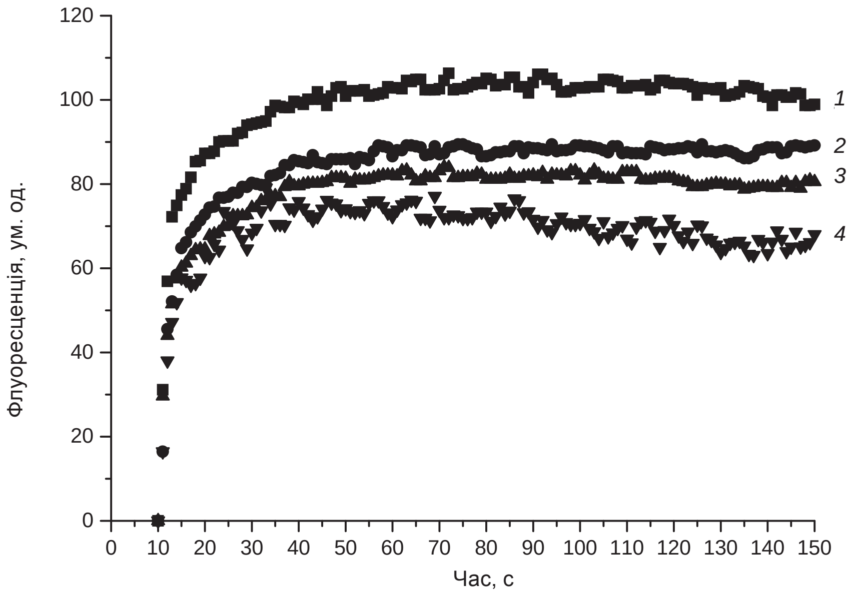

Рис. 4. Вплив різних концентрацій діазоксиду на мембранний потенціал мітохондрій міометрія у присутності ротенону. 1 – флуоресцентна відповідь зонда DioC$_6$(3) у стандартному середовищі інкубації, що містить міоцити, з додаванням ротенону. Криві 2, 3 та 4 одержано у присутності концентрацій діазоксиду: 500 нМ, 1 мкМ, 25 мкМ відповідно

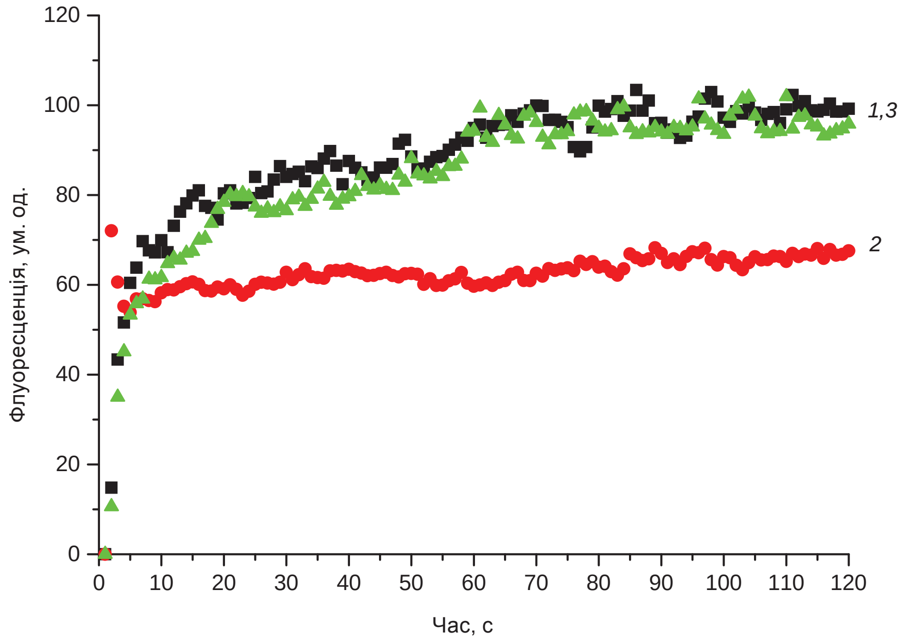

Рис. 5. Блокатор каналу глібенкламід попереджає деполяризацію мембрани мітохондрій міометрія, спричинену діазоксидом у присутності ротенону. 1 — стандартне середовище інкубації; 2 — як 1, але з 50 мкМ діазоксиду; 3 — як 1, але із 50 мкМ діазоксиду та 20 мкМ глібенкламіду

підраховано значення початкових швидкостей зростання флуоресцентного сигналу у присутності різних концентрацій діазоксиду за термінів необоротної хімічної реакції першого порядку (рис. 6). Значення V_0 у присутності та за відсутності ротенону вірогідно не відрізняються і дорівнюють 5,72 ± 1,15%/с та 5,12 ± 0,75%/с відповідно. У присутності 1 мкМ діазоксиду ротенону в середовищі інкубації значення V_0 зменшується більше ніж на 30% і

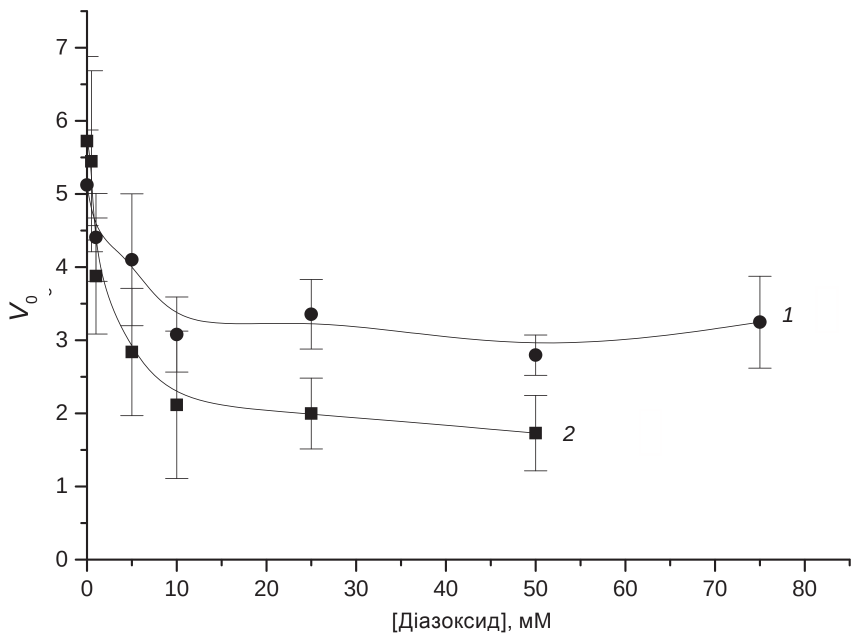

Рис. 6. Концентраційна залежність впливу діазоксиду на початкові швидкості (V_0) зростання флуоресцентної відповіді потенціалчутливого зонда у стандартному середовищі інкубації (1) та в середовищі інкубації з додаванням ротенону (50 мкМ) (2)

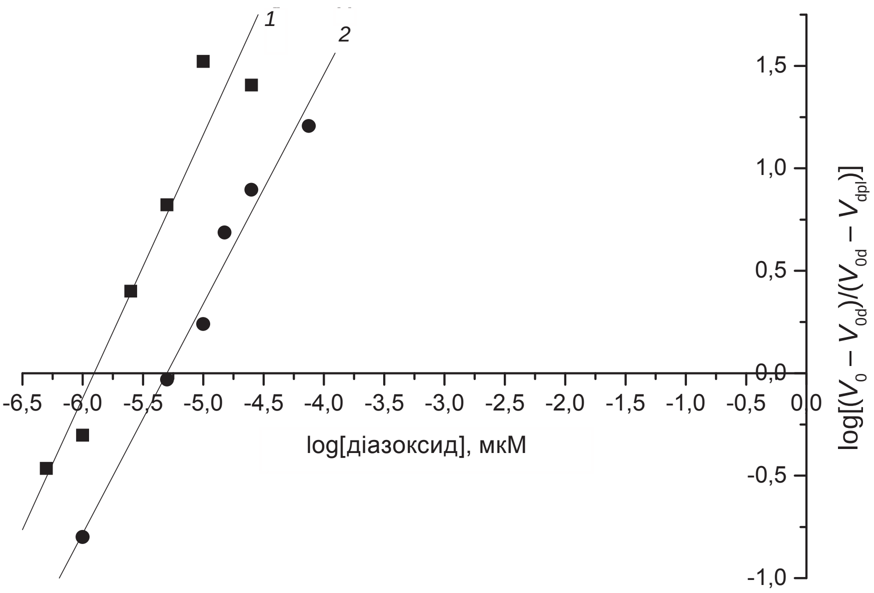

Рис. 7. Використання модифікованих координат Хілла для підрахунку уявних констант активації мітоK$_{ATP}$ діазоксидом та коефіцієнтів кооперативності у присутності та за відсутності ротенону. 1 — середовище інкубації з додаванням ротенону (50 мкМ), 2 — стандартні умови інкубації (без ротенону). Коефіцієнти кореляції у графіках 1 та 2 становили 0,95 та 0,98 відповідно

становить 3,87 ± 0,79%/с, а за відсутності ротенону значення V_0 зменшується лише на 15% і становить 4,40 ± 0,60%/с. При концентраціях діазоксиду 25—50 мкМ значення V_0 виходить на плато.

Використовуючи значення V_0 за різних концентрацій діазоксиду, ми вирахували уявні константи активації каналу діазоксидом у присутності та за відсутності ротенону в модифікованих координатах Хілла (див.

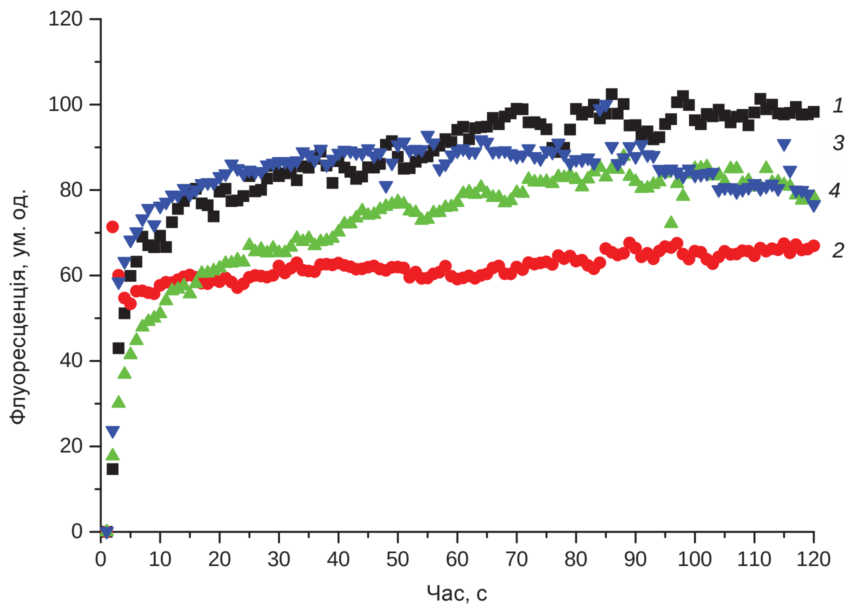

Рис. 8. Скавенджер АФК NAC знімає деполяризацію мітохондріальної мембрани, спричинену діазоксидом у присутності ротенону. 1 — стандартне середовище інкубації з додаванням 50 мкМ ротенону; 2 — як 1, але у присутності діазоксиду 50 мкМ; 3 та 4 — середовище інкубації, яке містило 50 мкМ ротенон, 50 мкМ діазоксид та NAC у концентрації 1 та 0,5 мМ відповідно

«Матеріали і методи» *Кінетичний аналіз*). Ми виявили, що значення уявної константи активації діазоксидом мітоK$_{ATP}$ у присутності ротенону ($‹K_{1/2}›_р$) у 4 рази нижче, ніж за його відсутності ($‹K_{1/2}›$). $‹K_{1/2}›_р$ становить $(1{,}24 \pm 0{,}21)\cdot10^{-6}$ М, тоді як $‹K_{1/2}›$ дорівнює $(5{,}01 \pm 1{,}47)\cdot10^{-6}$ М (рис. 7, криві 1, 2), причому значення константи активації мітоK$_{ATP}$ діазоксидом в умовах нормоксії відповідає даним літератури. Так, константа спорідненості діазоксиду до мітоK$_{ATP}$ інтактних мітохондрій печінки становить 2,3 мкМ [28], а для реконструйованого мітоK$_{ATP}$ кардіоміоцитів – 0,49 мкМ [11]. Таким чином, в умовах суперпродукції АФК активація мітоK$_{ATP}$ відбувається при менших концентраціях діазоксиду. Коефіцієнт Хілла в умовах нормоксії та окислювального стресу приблизно однаковий та становить 1,12 та 1,06 відповідно. Це свідчить, що стехіометрія зв'язування діазоксиду із регуляторною субодиницею відповідає відношенню 1 : 1 та залишається незмінною незалежно від умов.

За нашими даними NAC дозозалежно відновлює потенціал мітохондріальної мембрани, деполяризованої діазоксидом у присутності ротенону (рис. 8). За наявності N-ацетилцистеїну (0,5 та 1 мМ) в середовищі інкубації, що містить ротенон (50 мкМ) та діазоксид (50 мкМ) спостерігається дозозалежне підвищення платових значень флуоресценції, причому 1 мМ NAC відновлює відповідь потенціалчутливого зонда до контрольних значень (рис. 8, криві *1*, *2*, *3*, *4*). Дані, наведені на рис. 8, свідчать, що усунення АФК скавенджером із середовища інкубації попереджає активацію діазоксидом мітоK$_{ATP}$, що додатково підтверджує нашу гіпотезу про активацію мітоK$_{ATP}$ активними формами кисню в умовах їхньої суперпродукції за дії ротенону.

Проаналізувавши дані літератури, що стосуються регуляції мітоK$_{ATP}$ у різних тканинах, можна дійти висновку, що функціонування мітоK$_{ATP}$ має більш суттєве значення для виживання клітини в умовах окислювального стресу, ніж в умовах нормоксії. Оскільки зростання концентрації АФК у клітині може призвести до незворотного пошкодження ензимів та клітинних мембран, активація мітоK$_{ATP}$ для клітини за цих умов є питанням життя або смерті. Оскільки роль мітоK$_{ATP}$, в тому числі, полягає в усуненні негативних наслідків переокислення у клітині, то нам вважається цілком логічним, що для активації мітоK$_{ATP}$ умови суперпродукції АФК є сприятливішими. Той факт, що константа активації каналу за цих умов є в декілька разів нижчою, ніж в умовах нормоксії, також є додатковим доказом цього припущення. Таким чином, дані, одержані нами в цій роботі, свідчать, що АФК регулюють активність мітоK$_{ATP}$ у клітинах матки.

Слід взяти до уваги, що у взаємодії АФК та мітоK$_{ATP}$ можуть бути один або більше посередників, тобто структур, які також активуються АФК або індукують АФК [13, 16, 17]. Зокрема, було показано наявність протеїнкінази Cε у міжмембранному просторі мітохондрій, яка збільшує продукцію АФК мітохондріями, та, взаємодіючи із протеїнкіназою G, може активувати канал, що призводить до інгібування мітохондріальної пори, індукованої високими концентраціями АФК [15, 16]. Тобто мітоK$_{ATP}$ за тонко відрегульованої взаємодії з іншими структурами є ланкою складного ланцюга регуляції клітинних процесів. Отже, вивчення цієї складної взаємодії потребує подальшого глибокого дослідження.

Робота виконана за рахунок коштів гранту № 5.18.4.1 Державної цільової науково-технічної програми «Нанотехнології та наноматеріали» та гранту № 31-2011 цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій».

РЕГУЛЯЦИЯ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ АТР-ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО K$^+$-КАНАЛА МИТОХОНДРИЙ МИОМЕТРИЯ АКТИВНЫМИ ФОРМАМИ КИСЛОРОДА

О. Б. Вадзюк, Ю. Ю. Мазур, С. А. Костерин

Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;
e-mail: vadzyuk@biochem.kiev.ua

В предыдущих работах на митохондриях, изолированных из клеток матки крыс, нами было показано функционирование АТР-чувствительного K$^+$-канала (митоK$_{ATP}$). Поскольку регуляция данного канала недостаточно исследована, изучение активации митоK$_{ATP}$ в условиях окислительного стресса является актуальным.

Известно, что активные формы кислорода (АФК), образующиеся при окислительном стрессе, могут не только индуцировать апоптоз, но и способствовать защите клеток от стресса. Активация митоK$_{ATP}$ АФК, обеспечивающая выживание клетки в условиях окислительного стресса, была показана на клетках мозга и сердца. Но данных о регуляции АФК этих каналов в клетках матки нет. Поэтому целью данной работы было исследование влияния АФК на активацию митоK_{ATP} в клетках матки крыс.

Окислительный стресс в изолированных миоцитах крыс индуцировали ротеноном. Было продемонстрировано массированное образование АФК и гиперполяризация митохондриальной мембраны в присутствии ротенона. Следствием активации митоK_{ATP} селективным активатором диазоксидом была деполяризация митохондриальной мембраны, которая нивелировалась блокатором канала – глибенкламидом. При действии диазоксида в диапазоне концентраций от 500 нМ до 75 мкМ наблюдалось дозозависимое влияние на потенциал митохондрии. Максимальный эффект был достигнут при 25 мкМ диазоксида. Значение константы ассоциации ($\langle K_{1/2}\rangle_p$) диазоксида к митоK_{ATP} в присутствии ротенона было $1{,}24 \pm 0{,}21 \cdot 10^{-6}$ М. Диазоксид также деполяризовал митохондриальную мембрану в условиях нормоксии, но $\langle K_{1/2}\rangle$ в этом случае была выше – $5{,}01 \pm 1{,}47 \cdot 10^{-6}$ М.

Скавенджер АФК N-ацетилцистеин (NAC) предупреждал деполяризацию митохондриальной мембраны диазоксидом в условиях окислительного стресса, вызванного ротеноном. Наши результаты свидетельствуют, что инактивация АФК NAC предотвращает активацию митоK_{ATP} в условиях окислительного стресса. Сделан вывод, что АФК регулируют активность митоK_{ATP}.

К л ю ч е в ы е с л о в а: митохондрии, АТР-чувствительный K^+-канал, диазоксид, активные формы кислорода.

REGULATION OF THE MITOCHONDRIAL ATP-SENSITIVE POTASSIUM CHANNEL IN RAT UTERUS CELLS BY ROS

O. B. Vadzyuk, Yu. Yu. Mazur, S. O. Kosterin

Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: vadzyuk@biochem.kiev.ua

S u m m a r y

In previous study we demonstrated the presence of ATP-sensitive potassium current in the inner mitochondrial membrane, which was sensitive to diazoxide and glybenclamide, in mitochondria isolated from the rat uterus. This current was supposed to be operated by mitochondrial ATP-sensitive potassium channel (mitoK_{ATP}). Regulation of the mitoK_{ATP} in uterus cells is not studied well enough yet.

It is well known that the reactive oxygen species (ROS) can play a dual role. They can damage cells in high concentrations, but they can also act as messengers in cellular signaling, mediating survival of cells under stress conditions. ROS are known to activate mitoK_{ATP} during the oxidative stress in the brain and heart, conferring the protection of cells. The present study examined whether ROS mediate the mitoK_{ATP} activation in myometrium cells.

Oxidative stress was induced by rotenone. ROS generation was measured by 2′,7′-dichlorofluorescin diacetate. The massive induction of ROS production was demonstrated in the presence of rotenone. Hyperpolarization of the mitochondrial membrane was also detected with the use of the potential-sensitive dye $DiOC_6$ (3,3′-dihexyloxacarbocyanine iodide). Diazoxide, a selective activator of mitoK_{ATP}, depolarized mitochondrial membrane either under oxidative stress or under normal conditions, while mitoK_{ATP} blocker glybenclamide effectively restored mitochondrial potential in rat myocytes. Estimated $\langle K_{1/2}\rangle$ value for diazoxide to mitoK_{ATP} under normoxia was four times higher than under oxidative stress conditions: $5.01 \pm 1.47 \cdot 10^{-6}$ M and $1.24 \pm 0.21 \cdot 10^{-6}$ M respectively.

The ROS scavenger N-acetylcysteine (NAC) successfully eliminates depolarization of mitochondrial membrane by diazoxide under oxidative stress. These results suggest that elimination of ROS by NAC prevents the activation of mitoK_{ATP} under oxidative stress. Taking into account the higher affinity of diazoxide to mitoK_{ATP} under stress conditions than under normoxia, we conclude that the oxidative stress conditions are more favourable than normoxia for the activation of mitoK_{ATP}. Thus we hypothesize that the ROS regulate the activity of the mitoK_{ATP} in myocytes.

K e y w o r d s: mitochondrial ATP-sensitive K^+-channel, diazoxide, reactive oxygen species.

1. *Valko M., Leiter D., Moncol J. et al.* // Intern. J. Biochem. Cell Biol. – 2007. – **39**. – P. 44–84.
2. *Chung D., Caruso R. L.* // Toxicol. Sci. – 2006. – **93**, N 1. – P. 172–179.
3. *Rezaie A., Parker R. D., Abdollahi M.* // Dig. Dis. Sci. – 2007. – **52**, N 9. – P. 2015–2021.
4. *Al-Gubory K. H., Fowler P. A., Garrel C.* // Int. J. Biochem. Cell Biol. – 2010. – **42**. – P. 1634–1650.

5. *Richer C., Pratz J., Mulder P., Mondot S. et al.* // Life Sci. – 1990. – **47**, N 19. – P. 1693–1705.
6. *Lacza Z., Snipes J. A., Kis B. et al.* // Brain Res. – 2003. – **994**, N 1. – P. 27–36.
7. *Sinngh H., Hudman D., Lawrence C. L. et al.* // Cell. Cardiol. – 2003. – **35**. – P. 433–435.
8. *Facundo H. T. F., Paula J. G., Kowaltowski A. J.* // Free Radic. Biol. Med. – 2007. – **42**. – P. 1039–1048.
9. *Cancherini D., Trabuco L., Rebousac N., Kowaltowski A.* //Am. J. Physiol. Renal Physiol. – 2003. – **285**. – P. F1291–F1296.
10. *Costa A., Quinlan C.L., Andrukhiv A. et al.* // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2006. – **290**. – P. H406–H415.
11. *Garlid K., Paucek P., Yarov-Yarovoi V.* // Circ. Res. – 1997. – **81**. – P. 1072–1082.
12. *Akao M., Ohler A., Brian O'Rourke, Marban E.* // Ibid. – 2001. – **88**. – P. 1267–1275.
13. *Lebuffe G., Schumacker P. T., Shao Z. H. et al.* // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2003. – **284**. – P. H299–H308.
14. *Simerabet M., Robin E., Aristi I. et al.* // Brain Res. – 2008. – **1240**. – P. 177–184.
15. *Pain T., Yang X. M., Critz S. D. et al.* // Circ. Res. – 2000. – **87**. – 460–466.
16. *Costa A. D. T., Jakob R., Costa C. L. et al.* // J. Biol. Chem. – 2006. – **281**, N 30. – P. 20801–20808.
17. *Costa A., Garlid K.* // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2008. – **295**. – P. H874–H882.
18. *Martin K. R., Barrett J. C.* // Hum. Exp. Toxicol. – 2002. – February 21, P. 71–75.
19. *Liang H.-W., Xia Q., Bruce I. C.* // Brain Res. – 2005. – **1042**. – P. 169–175.
20. *Chien E. K., Zhang Y. Z., Furuta H., Hara M.* // Am. J. Obstet. Gynecol. – 1999. – **180**. – P. 1121–1126.
21. *Curley M., Cairns M. T., Freil A. M.* // Mol. Hum. Reprod. – 2002. – **8**, N 10. – P. 941–945.
22. *Shi N.-Q., Ye B., Makielski J. C.* // J. Mol. Cell. Cardiol. – 2005. – **39**. – P. 51–61.
23. *Вадзюк О. Б., Костерин С. А.* // Укр. біохім. журн. – 2008. – **80**, № 5. – С. 45–51.
24. *Вадзюк О. Б., Костерин С. О.* // Там само. – 2010. – **82**, № 4. – С. 40–47.
25. *Gomes A., Fernandes E., Lima J. L. F. C.* // J. Biochem. Methods. – 2005. – **65**. – P. 45–80.
26. *Ide T., Tsutsui H., Kinugawa S. et al.* // Circ. Res. – 1999. – **85**. – P. 357–363.
27. *Bonsi P., Calabresi P., De Persis C. et al.* // Exp. Neurol. – 2004. – **185**, N 1. – P. 169–181.
28. *Garlid K., Paucek P., Yarov-Yarovoy V.* // J. Biol. Chem. – 1996. – **271**, N 15. – P. 8796–8799.

Отримано 04.05.2011