

О.Б. Вадзюк

Вплив діазоксиду на мембранний потенціал мітохондрій та утворення активних форм кисню в клітинах матки щурів

Показано часткову деполаризацію мітохондріальної мембрани клітин матки щурів активатором аденозинтрифосфатчутливого калієвого каналу ($K_{ATФ}$ -каналу) діазоксидом. Деполаризувальний його ефект усувався речовиною, що блокує цей канал, – глібенкламідом. Дослідивши концентраційнозалежний вплив діазоксиду на потенціал мітохондріальної мембрани, ми вираховували значення уявної константи активації $K_{ATФ}$ -каналу мітохондрій (міто $K_{ATФ}$ -каналу) матки щурів діазоксидом, яке становило $(5,01 \pm 1,47) \cdot 10^{-6}$ моль/л. Також було продемонстровано збільшення вмісту активних форм кисню (АФК) під впливом діазоксиду, що ефективно усувалося глібенкламідом. Зроблено висновок, що активація міто $K_{ATФ}$ -каналу у клітинах матки щурів частково зменшує потенціал мітохондріальної мембрани та посилює генерацію АФК.

Ключові слова: діазоксид, мітохондріальний аденозинтрифосфатчутливий калієвий канал, активні форми кисню, мембранний потенціал, матка.

ВСТУП

Аденозинтрифосфат (АТФ)-чутливі калієві канали ($K_{ATФ}$ -канали) відіграють важливу роль у функціонуванні гладеньких м'язів [11, 17]. Є дані, що активація саме цього типу калієвих каналів бере участь у регуляції їх скоротливої активності [11, 17, 19]. Функціонування $K_{ATФ}$ -каналів плазматичної мембрани клітин міоцитів є об'єктом інтенсивних досліджень [4, 7], але роль і властивості їх аналогів (міто $K_{ATФ}$ -каналів) у мітохондріальній мембрані міоцитів матки залишаються невивченими. Функціонування міто $K_{ATФ}$ -каналів інтенсивно досліджується на клітинах серця, нервової системи, нирок [2, 3, 6, 8]. Зокрема, було показано, що активація цієї структури у мітохондріях селективним активатором діазоксидом призводить до збільшення об'єму їх матриксу [6, 8], попередження індукції апоптозу [6], інтенсифікації дихання та збільшення концентрації АТФ [3].

© О.Б. Вадзюк

Дані щодо впливу активації міто $K_{ATФ}$ -каналу на мембранний потенціал мітохондрій суперечливі [2, 11, 14]. Зокрема, Busija та співавт. [2] показали часткову деполаризацію мітохондріальної мембрани (т. зв. “mild uncoupling” або м'яке роз'єднання) клітин мозку діазоксидом. Деякі автори [11] вважають, що невелике зменшення мембранного потенціалу мітохондрій при активації каналу діазоксидом опосередковує протекторний ефект цього активатора при ішемії. Але іншими дослідниками було показано, що захист міоцитів від метаболічного інгібування за допомогою активації каналу діазоксидом не опосередковується змінами мембранного потенціалу мітохондрій [14]. Як відомо з літературних джерел, вхід іонів К у мітохондріальний матрикс, спричинений активацією міто $K_{ATФ}$ -каналів діазоксидом, може інтенсифікувати транспорт електронів у електронно-транспортному ланцюзі [3].

Відомо, що активні форми кисню (АФК) можуть відігравати роль клітинних месенджерів, що не тільки за фізіологічних умов регулюють важливі для клітини метаболічні шляхи [18] та розслаблення гладеньких м'язів [19], але також опосередковують захист клітини в умовах стресу [5, 6, 15, 18]. Деякі автори [12, 15] вказують, що при ішемічному та фармакологічному прекодиціюванні, для яких показана протекторна роль, помірно збільшується вміст АФК, в результаті чого активуються структури та ферменти, функціонування яких попереджує пошкодження клітини при масованому утворенні АФК, котре спостерігається в умовах ішемії–реперфузії. Дані досліджень [5, 6, 12, 15] свідчать, що у механізмах опосередкованого АФК захисту клітин задіяна активація мітоК_{АТФ}-каналу. Продемонстровано [5, 6], що АФК активують останній у кардіоміоцитах, функціонування якого в свою чергу призводить до збільшення продукції АФК, які далі активують протеїнкіназу С (ПКС). Зокрема, Nassouna та співавт. [12] демонструють, що кардіопротекторний ефект діазоксиду усувається інгібітором ПКС α , що вказує на те, що мітоК_{АТФ}-канал регулює активність ПКС α у кардіоміоцитах. Автори [5, 6, 12, 15] вважають, що у регуляції задіяні АФК, генерація яких відбувається у відповідь на активацію мітоК_{АТФ}-каналів. Хоча подібні ефекти були показані для мітоК_{АТФ}-каналів кардіоміоцитів і клітин мозку, але досі невідомо, як впливає їхня активація на генерацію АФК у клітинах матки.

Метою нашої роботи було дослідити вплив активатора мітоК_{АТФ}-каналу діазоксиду на утворення АФК та утримання потенціалу внутрішньої мембрани мітохондрій ізольованих клітин матки щурів.

МЕТОДИКА

Суспензію міоцитів матки невагітних щурів отримували за стандартною методикою з

використанням 0,1%-ї колагенази, 0,1%-го бичачого сироваткового альбуміну та 0,01%-го соєвого інгібітора трипсину [16]. Кількість клітин рахували за допомогою камери Горяєва після фарбування трипановим синім. Склад середовища інкубації був таким (ммоль/л): NaCl – 136,9, KCl – 5,36, KН₂РO₄ – 0,44, NaHCO₃ – 0,26, Na₂НРO₄ – 0,26, глюкоза 0,01%, HEPES – 10, CaCl₂ – 0,03; рН 7,4, 37 °С.

Мембранний потенціал досліджували спектрофлуориметрично з використанням потенціалчутливого зонда 3,3'-дигексильоксикарбоціанін йодид (DiOC6(3)) ("Fluka", США). Флуоресценцію DiOC6(3) реєстрували при довжині хвилі збудження 490 нм і випромінювання 510 нм. Для контролю саме мітохондріальної компоненти мембранного потенціалу для кожної проби прописували контрольну пробу, до якої, крім діючих речовин, вносили 30 мкмоль/л СССР ("Sigma-Aldrich", США). СССР-нечутливу компоненту з контролю віднімали, далі працювали лише з чутливою, тобто мітохондріальною компонентою мембранного потенціалу. Концентрація зонда у середовищі інкубації становила 150 нмоль/л. Флуоресцентний сигнал реєстрували з моменту внесення аліквоти розчину зонда. Кількість клітин у пробі була 1 млн/мл.

Дію діазоксиду ("Sigma-Aldrich", США) вивчали у діапазоні концентрації від 1 до 75 мкмоль/л. Апроксимацію кінетичних кривих зростання флуоресцентної відповіді потенціалчутливого зонда при різних концентраціях діазоксиду проводили у термінах хімічної реакції першого порядку, використовуючи відношення $I = I_{\max} (1 - e^{-kt})$, де I та I_{\max} – миттєва та максимальна (платова у часі) флуоресцентна відповідь зонда, k – уявна константа швидкості процесу (вимірюється у секундах у мінус першому ступені), t – час. Відповідно до цього рівняння константу швидкості k розраховували як від'ємне значення тангенса кута нахилу графіка, лінеаризованого у напівло-

гарифмічних координатах $\{\ln[(I_{\max} - I)/I_{\max}]; t\}$ ($r = 0,9-0,99$). Початкову швидкість V_0 (відсоток за секунду) розраховували за рівнянням $V_0 = (dI/dt)_{t=0} = k \cdot I_{\max}$.

Уявну константу активації мітоК_{АТФ}-каналу діазоксидом ($\langle K_{1/2} \rangle$) розраховували у модифікованих координатах Хілла, використовуючи рівняння $\lg [(V_0 - V_{0d})/(V_{0d} - V_{dpl})] = n \lg I - n \lg K$, де V_0 , V_{0d} та V_{dpl} – початкова швидкість реакції у середовищі без діазоксиду, з різними його концентраціями та у середовищі з максимальними діючими концентраціями (50–75 мкмоль/л) відповідно.

Утворення АФК досліджували спектрофлуориметрично з використанням зонда дихлорофлуоресцеїну діацетату (DCF; “Sigma-Aldrich”, США). Флуоресценцію зонда збуджували при довжині хвилі 504 нм, реєстрували при 520 нм. Концентрація зонда у середовищі становила 5 мкмоль/л. Кількість клітин у пробі була 1 млн./мл. Флуоресцентний сигнал реєстрували з моменту внесення аліквоти розчину зонда. Всі діючі речовини (крім N-ацетил цистеїну – НАС) розчиняли у диметилсульфоксиді та вносили у середовище перед додаванням

зонда. У контрольну пробу додавали відповідну аліквоту диметилсульфоксиду також перед додаванням зонда.

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

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Внесення аліквоти селективного активатора мітоК_{АТФ}-каналів діазоксиду у кінцевій концентрації 50 мкмоль/л у середовище інкубації, що містило міоцити, призводило до часткового зменшення потенціалу мітохондріальної мембрани відносно контролю, що реєструвалося за зниженням значень флуоресценції потенціалчутливого зонда (рис. 1, 1, 2). Але наявність у середовищі інкубації блокатора К_{АТФ}-каналів глібенкламід (20 мкмоль/л) попереджала викликану діазоксидом деполаризацію мембрани мітохондрій (див. рис.1, 2, 3). Оскільки дія діазоксиду повністю усувається глібенкламідом, це означає, що зменшення потенціалу мітохондріальної мембрани спричинене саме

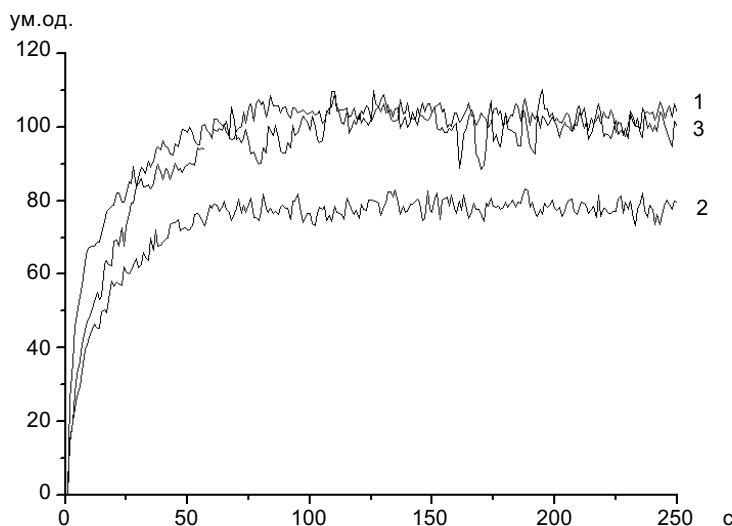


Рис. 1. Дія ефекторів аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів діазоксиду та глібенкламід на мембранний потенціал мітохондрій:

1 – флуоресцентна відповідь зонда DiOC 6(3) у стандартному середовищі інкубації, що містить клітини; 2 – те саме з додаванням діазоксиду (50 мкмоль/л); 3 – з додаванням діазоксиду (50 мкмоль/л) і глібенкламід (20 мкмоль/л)

активацією мітоК_{АТФ}-каналів. Утримання мітохондріями мембранного потенціалу має важливе значення для функціонування самих мітохондрій і клітини в цілому. Потенціал на мітохондріальній мембрані регулює, в т.ч. таку важливу функцію мітохондрій, як транспорт іонів кальцію [3, 13]. Показано [13], що м'яке роз'єднання у відповідь на дію діазоксиду пригнічує накопичення Ca²⁺ у матриксі мітохондрій. Цей ефект може мати суттєве значення для виживання клітини в умовах стресу, оскільки попереджає індукцію іонами кальцію мітохондріальної пори перехідної проникності.

Для того щоб визначити <K_{1/2}> активації діазоксидом мітоК_{АТФ}-каналів матки щурів, ми дослідили вплив цього активатора на потенціал мембрани мітохондрій у широкому діапазоні його концентрацій (1–75 мкмоль/л; див. рис. 2, 1–5). Виявилося, що діазоксид дозозалежно зменшував мембранний потенціал мітохондрій, причому при концентраціях 25–50 мкмоль/л спостерігався максимальний ефект (див. рис. 2, 4, 5).

Використовуючи кінетичний аналіз, були вираховані k зростання флуоресцентної відповіді зонда у термінах необоротної хімічної реакції першого порядку та розра-

ховані значення початкової швидкості (V₀) за рівнянням V₀ = k·I_{max}, де I_{max} – платове значення флуоресценції зонда за відсутності діазоксиду. Залежність значення V₀ від концентрації діазоксиду представлена на рис. 3,а. Використавши V₀ за різних концентрацій діазоксиду ми вираховали <K_{1/2}> (див. рис. 3,б). Значення <K_{1/2}> міоцитів матки щурів у використаних нами умовах становило (5,01 ± 1,47)·10⁻⁶ моль/л, що збігається з літературними даними. Так, константа спорідненості діазоксиду до мітоК_{АТФ}-каналу до інтактних мітохондрій печінки становить 2,3 мкмоль/л [9], а для мітоК_{АТФ}-каналу кардіоміоцитів – 0,8 мкмоль/л [10]. Коефіцієнт Хілла становив 1,12. Це свідчить, що стехіометрія взаємодії діазоксиду з мітоК_{АТФ}-каналом становить 1:1.

Відомо, що АФК утворюються у клітині постійно за нормальних умов [18]. У використаних нами умовах, що відповідають умовам нормоксії, при внесенні DCF у середовище інкубації, що містить міоцити, його флуоресценція зростає у часі (рис. 4, 1). Причому таке посилення флуоресцентного сигналу є чутливим до скавенджера АФК NAC. За його наявності

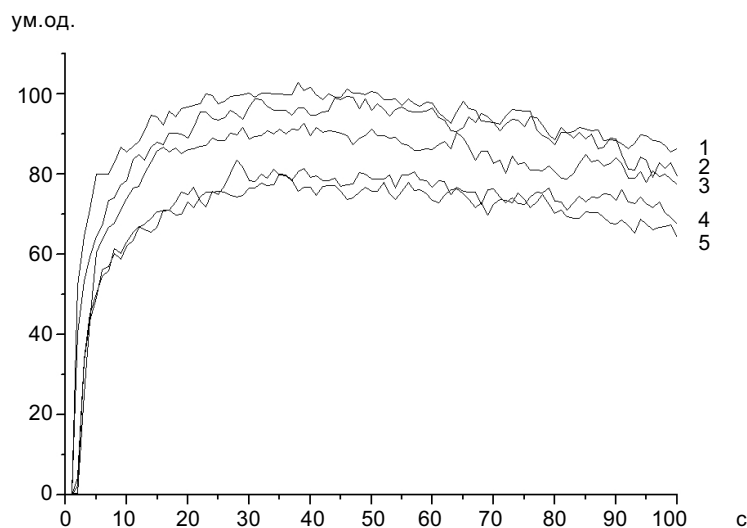


Рис. 2. Вплив різних концентрацій діазоксиду на мембранний потенціал мітохондрій: 1 – флуоресцентна відповідь зонда DіoC6(3) у стандартному середовищі інкубації, що містить міоцити. Криві 2, 3, 4 та 5 отримані за наявності таких концентрацій діазоксиду: 1, 5, 25 та 50 мкмоль/л відповідно.

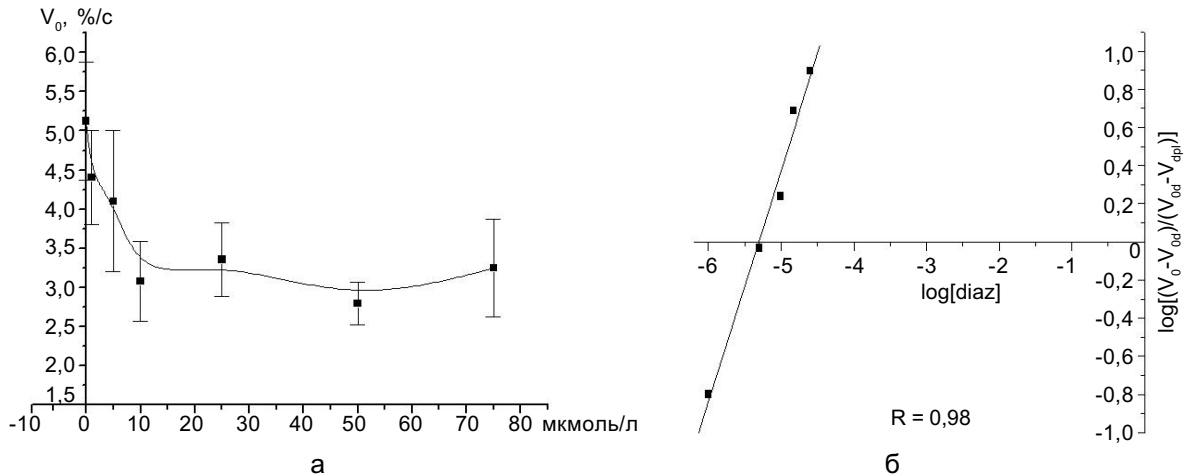


Рис. 3. Концентраційна залежність впливу діазоксиду на початкові швидкості зростання флуоресцентної відповіді потенціалчутливого зонда DіоС6(3) (а); використання модифікованих координат Хілла для розрахунку уявної константи активації діазоксидом аденозинтрифосфатчутливого калієвого каналу мітохондрій міометрія (б)

у дозі 1 ммоль/л, що усуває дію АФК, збільшення флуоресценції DCF не спостерігалось. Внесення діазоксиду у середовище інкубації призводило до більш інтенсивного зростання флуоресценції DCF, ніж у стандартних умовах (див. рис. 4, 1, 2). Але при наявності у середовищі інкубації блокаторів мітоК_{АТФ}-каналів глібенкламід або 5-гідроксидеканоату разом з діазок-

сидом (див. рис. 4, 3, 4), зростання флуоресценції DCF уповільнювалось і майже відповідало контрольним умовам, тобто без діазоксиду (див. рис. 4, 1, 3, 4). Причому без діазоксиду ні глібенкламід, ні 5-гідроксидеканоат не впливали на утворення АФК у міоцитах матки. А, отже, зміни флуоресценції АФК-чутливого зонда при внесенні діазоксиду свідчать про збіль-

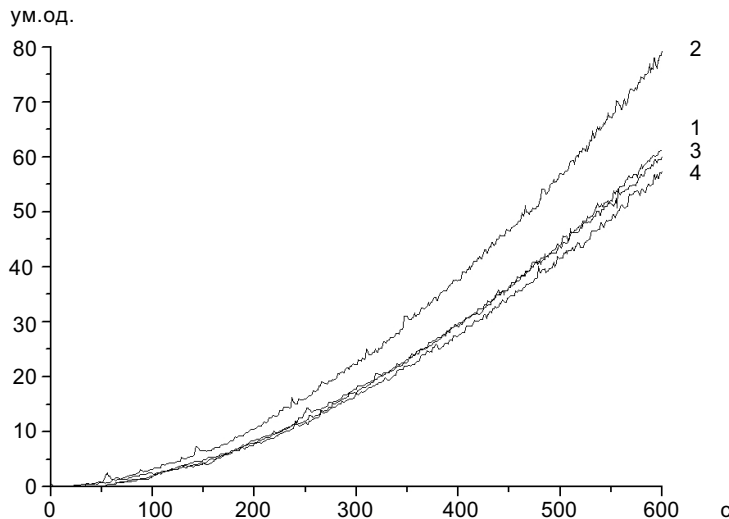


Рис. 4. Вплив діазоксиду на утворення активних форм кисню (АФК) у міоцитах матки шурів: 1 – вимірювання утворення АФК у стандартному середовищі інкубації, що містить клітини, за допомогою флуоресцентного зонду DCF; 2 – генерація АФК при додаванні діазоксиду. Діазоксид (50 ммоль/л) було додано перед внесенням аліквоти розчину зонду; 3, 4 – блокатори мітохондріальних аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів глібенкламід (20 ммоль/л) та 5-НД (200 ммоль/л) відповідно, знімають збільшення утворення АФК під дією діазоксиду. Блокатори вносили разом з діазоксидом перед додаванням аліквоти розчину зонда

шення продукції АФК у міоцитах матки щурів у відповідь на активацію мітоK_{АТФ}-каналу.

Таким чином, нами показано, що активація діазоксидом мітоK_{АТФ}-каналів у клітинах матки щурів призводить до часткової деполаризації мембрани мітохондрій і збільшення вмісту АФК. Одержані результати дають змогу припускати, що опосередкований активацією мітоK_{АТФ}-каналів захист клітини в умовах стресу [1] може бути зумовлений частковим роз'єднанням внутрішньої мітохондріальної мембрани. Показана нами генерація АФК у міоцитах матки у відповідь на активацію мітоK_{АТФ}-каналів також може мати важливе фізіологічне значення, оскільки, як відомо, вони є клітинними месенджерами, які беруть участь у таких важливих процесах, як м'язове скорочення та регуляція активності багатьох ензимів, задіяних у захисті клітини в умовах стресу [18, 20].

О. Б. Вадзюк

ВЛИЯНИЕ ДИАЗОКСИДА НА МЕМБРАННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МИТОХОНДРИЙ И ОБРАЗОВАНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В КЛЕТКАХ МАТКИ КРЫС

Показана частичная деполаризация митохондриальной мембраны миоцитов матки крыс активатором аденозинтрифосфат (АТФ)-чувствительного калиевого канала (K_{АТФ}) диазоксидом. Деполаризирующее влияние диазоксида снижалось глибенкламидом, известным блокатором этого канала. Изучив концентрационнонезависимое влияние диазоксида на потенциал митохондриальной мембраны, мы рассчитали значение кажущейся константы активации K_{АТФ}-канала митохондрий миометрия крыс (митоK_{АТФ}) диазоксидом, которое составило $(5,01 \pm 1,47) \cdot 10^{-6}$ моль/л. Также было продемонстрировано увеличение концентрации активных форм кислорода под действием диазоксида, которое эффективно снималось глибенкламидом. Сделан вывод, что активация митоK_{АТФ}-канала в клетках матки крыс частично уменьшает потенциал митохондриальной мембраны и увеличивает продукцию активных форм кислорода.

Ключевые слова: диазоксид, митохондриальный аденозинтрифосфатчувствительный калиевый канал, активные формы кислорода, мембранный потенциал, матка.

O. B. Vadzyuk

EFFECTS OF DIAZOXIDE ON THE MITOCHONDRIAL MEMBRANE POTENTIAL AND ROS GENERATION IN RAT UTERUS CELLS

In the present study we demonstrate partial depolarization of the mitochondrial inner membrane from the rat uterus cells upon activation of mitochondrial ATP-sensitive K⁺-channel (mitoK_{ATP}) with diazoxide. The estimated affinity constant of diazoxide to mitoK_{ATP} from rat uterus cells is $(5.01 \pm 1.47) \cdot 10^{-6}$ M. We also observed an enhanced generation of reactive oxygen species after addition of diazoxide. Both effects were effectively eliminated by glybenclamide, blocker of the ATP-sensitive K⁺ channel. Our results indicate that activation of mitoK_{ATP} in rat uterus cells leads to a partial depolarization of mitochondrial membrane and an increase in ROS concentration. Key words: diazoxide, mitochondrial ATP-sensitive K⁺-channel, reactive oxygen species, membrane potential, uterus.

Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Akao M., Ohler A., O'Rourke B., Marban E. Mitochondrial ATP-sensitive Potassium Channels inhibit apoptosis induced by oxidative stress in cardiac cells // *Circulat. Res.* – 2001. – **88**. – P. 1267–1275.
2. Busija D., Katakam P., Rajapakse N.C., Kis B., Grover G., Domoci F., Bari F. Effects of ATP-sensitive potassium channel activators diazoxide and BMS-191095 on membrane potential and reactive oxygen species production in isolated piglet mitochondria // *Brain Res. Bull.* – 2005. – **66**. – P. 85–90.
3. Cancherini D., Trabuco L., Rebousac N., Kowaltowski A. ATP-sensitive K⁺-channels in renal mitochondria // *Amer. J. Physiol. Renal. Physiol.* – 2003. – **285**. – P. F1291–F1296.
4. Chien E.K., Zhang Y.Z., Furuta H., Hara M. Expression of adenosine triphosphate-sensitive potassium channel subunits in female rat reproductive tissues: overlapping distribution of messenger ribonucleic acid for weak inwardly rectifying potassium channel subunit 6.1 and sulfonylurea-binding regulatory subunit 2 // *Amer. J. Obstet. Gynecol.* – 1999. – **180**. – P. 1121–1126.
5. Costa A., Garlid K. Intramitochondrial signalling: interactions among mitoKatp, PKCe, ROS, and MPT // *Amer. J. Physiol. Heart Circulat. Physiol.* – 2008. – **295**. – P. H874–H882.
6. Costa A., Jacob R., Costa C., Andrukhiv K., West I., Garlid K. The mechanism by which the mitochondrial ATP-sensitive K⁺-channel opening and H₂O₂ inhibit the mitochondrial permeability transition // *J. Biol. Chem.* – 2006. – **281**, №30. – P. 20801–20808.
7. Curley M., Cairns M.T., Freil A.M. Expression of mRNA transcripts for ATP-sensitive potassium channels in human myometrium // *Mol. Hum. Reprod.* –

2002. – **8**, № 10. – P. 941–945.
8. Facundo H.T.F., Paula J.G., Kowaltowski A.J. Mitochondrial ATP-sensitive K^+ -channels are redox sensitive pathways that control reactive oxygen species production // *Free Radical Biol. and Med.* – 2007. – **42**. – P. 1039–1048.
 9. Garlid K., Paucek P., Yarov-Yarovoy V. The mitochondrial K_{ATP} -channel as a receptor for potassium channel openers // *J. Biol. Chem.* – 1996. – **271**. – №15. – P. 8796–8799.
 10. Garlid K. Paucek P., Yarov-Yarovi V. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K^+ -channels // *Circul. Res.* – 1997. – **81**. – P.1072–1082.
 11. Hanley P. J., Daut J. K_{ATP} -channels and preconditioning: A re-examination of the role of mitochondrial K_{ATP} channels and an overview of alternative mechanisms // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 2005. – **39**. – P. 17–50.
 12. Hassouna A., Matata B. M., Galinanes M. PKCe is upstream and PKCa is downstream of mitoKATP-channels in the signal transduction pathway of ischemic preconditioning of human myocardium // *Amer. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2004. – **287**. – P C1418–C1425.
 13. Holmuhamedov E., Wang L., Terzic A. ATP-sensitive K^+ -channel openers prevent Ca^{2+} overload in rat cardiac mitochondria // *J. Physiol.* – 1999. – **519**. – P. 347–360.
 14. Lawrence C.L., Billups B. B., Rodrigo G.C., Standen N.B. The K_{ATP} -channel opener diazoxide protects cardiac myocytes during metabolic inhibition without causing mitochondrial depolarization or flavoprotein oxidation // *Brit. J. Pharmacol.* – 2001. – **134**. – P. 535–542.
 15. Lebuffe G., Schumacker P.T., Shao Z.H., Anderson T., Iwase H., Vanden Hoek T.L. ROS and NO trigger early preconditioning: relationship to mitochondrial K_{ATP} -channel // *Amer. J. Physiol. Heart Circulat. Physiol.* – 2003. – **284**. – P. H299–H308.
 16. Mollard P., Mironneau J., Amedee T. Electrophysiological characterization of single pregnant rat myometrial cells in short-term primary culture // *Amer. J. Physiol.* – 1986. – **19**, №1. – P.C. 47–54.
 17. Shien C.C., Coghlan M., Sullivan J. Gopalakrishnan M. Potassium channels: molecular defects, diseases, therapeutic opportunities // *Pharmacol. Rev.* – 2000. – **52**, №4. – P. 557–593
 18. Signal transduction by reactive oxygen and nitrogen species. Pathways and chemical principles. Eds by Forman H. J., Fucuto J., M. Torres. – New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Kluwer Acad. Publish., 2004. – P. 411.
 19. Teramoto N. Physiological roles of ATP-sensitive K^+ -channels in smooth muscle // *J. Physiol.* – 2006. – **572**, №3. – P. 617–624.
 20. Warren A.Y., Matharoo-Balls B., Shaw R.W. Hydrogen peroxide and superoxide anion modulate pregnant human myometrial contractility // *Reproduction.* – 2005. – **130**. – P. 539–544.

In-т біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ
E-mail: vadzyuk@biochem.kiev.ua;
olga_vadzyuk@hotmail.com

Матеріал надійшов до редакції 02.09.2011