

ВЛИЯНИЕ ПОТЕНЦИАЛЗАВИСИМОГО ТРАНСПОРТА КАЛИЯ НА МЕМБРАННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МИТОХОНДРИЙ МОЗГА КРЫС

О. В. АКОПОВА, В. И. НОСАРЬ, Л. И. КОЛЧИНСКАЯ,
И. Н. МАНЬКОВСКАЯ, М. К. МАЛЫШЕВА, В. Ф. САГАЧ

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

Изучено влияние потенциалзависимого входа калия на трансмембранную разность потенциалов ($\Delta\Psi_m$) в митохондриях мозга крыс. Показано, что в диапазоне концентраций K^+ 0–120 мМ потенциалзависимый вход K^+ в матрикс митохондрий приводит к повышению скорости дыхания и митохондриальной деполяризации. Блокаторы K^+_{ATP} -канала, глибенкламид и 5-гидроксидеканоат, блокируют ~35% потенциалзависимого входа K^+ в митохондриях мозга. Блокирование K^+_{ATP} -канала приводит к реполяризующему эффекту, составляющему ~20% от контроля, что согласуется с установленной в эксперименте зависимостью $\Delta\Psi_m$ от скорости потенциалзависимого входа K^+ . Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют, что функциональная активность K^+_{ATP} -канала играет физиологически важную роль в регуляции мембранного потенциала и энергозависимых процессов в митохондриях мозга.

Ключевые слова: K^+ , транспорт, K^+_{ATP} -канал, мембранный потенциал, потребление кислорода, митохондрии мозга.

Согласно современным научным представлениям, функциональное состояние физиологически значимых систем организма в значительной мере определяется функциональным состоянием митохондрий, продуцирующих основную часть энергетического ресурса клетки — АТФ. Биоэнергетика клетки и протекание процессов, наиболее важных для жизнедеятельности организма (синтез АТФ, регуляция цитозольного Ca^{2+} , продукция активных форм кислорода, АФК) зависит от трансмембранной разности потенциалов на внутренней мембране этих органелл, которая генерируется в ходе окисления субстратов дыхательной цепи [1–4]. Сопряженность между окислением субстратов и генерацией мембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$) в первую очередь обусловлена молекулярной организацией комплексов, в активных центрах которых протекают редокс-реакции, и для которых векторный трансмембранный перенос протона из матрикса в среду сопряжен с каталитическим циклом этих энзимов-оксидоредуктаз. Свободная энергия, высвобождаемая в ходе окислительно-восстановительной реакции, вследствие трансмембранного переноса протонов против градиента концентраций H^+ , преобразуется в потенциальную энергию, электрохимический потенциал протонов ($\Delta\mu_{H^+}$), основными компонентами которого являются собственно

мембранный потенциал ($\Delta\Psi_m$) и трансмембранный градиент концентраций протонов (ΔpH) [1]: $\Delta\mu_{H^+} = \Delta\Psi + (2,3RT/F)\Delta pH$ (1). Таким образом, электрохимический потенциал протонов ($\Delta\mu_{H^+}$) создается вследствие переноса заряда в электрическом поле мембраны и трансмембранного перераспределения концентрации H^+ . Слагаемое, включающее трансмембранный протонный градиент, ΔpH , обусловлено изменением свободной энергии вследствие трансмембранного переноса протонов: $[H^+]_i \leftrightarrow [H^+]_o$ (2). Поскольку изменение свободной энергии в результате переноса протонов (ΔG_i) связано с константой равновесия ионного обмена (2): $\Delta G_i = -RT \ln K_p$, где константа равновесия $K_p = [H^+]_o/[H^+]_i$ (3), выражение (1) для электрохимического потенциала протонов, $\Delta\mu_{H^+}$, помимо мембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$) включает и трансмембранный протонный градиент (ΔpH), что вытекает из уравнения ионного обмена (2,3): $\Delta G_i = 2,3RT\Delta pH$. Поскольку ΔpH по литературным данным находится в пределах ~0,2–0,4 единиц [3], компонента $\Delta\mu_{H^+}$, обусловленная трансмембранным обменом протонов, может составлять ~12–24 мВ, и основной вклад в $\Delta\mu_{H^+}$ вносит мембранный потенциал, достигающий ~180 мВ [2,4].

Электрохимический потенциал протонов является движущей силой важнейших энергозависимых процессов, в первую очередь, окис-

лительного фосфорилирования и транспорта катионов [1–4]. Трансформация энергии, высвобождаемой в ходе превращения субстрата в $\Delta\mu_{H^+}$, и далее идущей на электрофоретический транспорт катионов и синтез АТР, в частности, обуславливает сопряженность между потреблением кислорода (который восстанавливается в ходе окисления субстрата дыхания) и транспортом катионов, а также количеством синтезированного АТР. Количественно энергетическое сопряжение между окислением субстрата и транспортом катионов выражается в определенных стехиометрических пропорциях между потреблением кислорода и переносом положительного заряда в матрикс энергизованных митохондрий [1, 5].

В реальных условиях энергетические превращения в митохондриях неизбежно сопровождаются энергетическими потерями, обусловленными различными механизмами утечки: утечки электронов, ведущей к образованию продуктов неполного, одноэлектронного восстановления кислорода, АФК [6], а также утечки протонов и катионов (proton leak, K^+ -leak) в матрикс из среды [4, 7] вследствие нарушения барьерных функций митохондриальной мембраны. Один из парадоксов биоэнергетических превращений в митохондриях заключается в повышении «утечки», неспецифической диффузии катионов и протонов в матрикс митохондрий, с ростом $\Delta\Psi_m$ вследствие нелинейного характера зависимости скорости диффузии заряженных частиц от $\Delta\Psi_m$ и ее резкого повышения в области высоких абсолютных значений потенциала [4, 8, 9]. Таким образом, мембранный потенциал митохондрий, являющийся основной компонентой электрохимического потенциала протонов, обеспечивает протекание важнейших энергозависимых процессов клетки, а также сопряженного с ними неспецифического транспорта катионов и протонов, что ведет к разобщению энергетического сопряжения в этих органеллах. Поскольку энергозависимый транспорт катионов использует свободную энергию, которая высвобождается в ходе редокс-реакций и преобразуется в $\Delta\mu_{H^+}$, входу катионов в матрикс сопутствует митохондриальная деполяризация и разобщение дыхательной цепи.

Калий — преобладающий катион внутриклеточной среды и митохондриального матрикса, его концентрация в цитозоле достигает 120–150 мМ [10, 11]. Трансмембранный градиент концентраций K^+ между матриксом и внутриклеточной средой практически отсутствует. Возможно, именно по этой причине,

а также потому, что митохондриальную мембрану считали мало проницаемой для K^+ , митохондриальному транспорту K^+ ранее уделяли недостаточно внимания, не предполагая его участия в регуляции митохондриальных функций. С открытием АТР-зависимого K^+ -канала (K^+_{ATP} -канала) и выявлением цитопрокторных эффектов его фармакологических активаторов [12–14] интерес исследователей к митохондриальной системе потенциалзависимого транспорта K^+ резко возрос. Несмотря на это, физиологическая роль этой системы, как и отдельных типов K^+ -каналов, еще далеко неясна.

Известно, что потенциалзависимый транспорт K^+ в матрикс связан с функциональной активностью митохондриальных K^+ -каналов, которая может различаться в разных типах клеток [15–17]. К настоящему времени идентифицированы четыре типа каналов внутренней мембраны митохондрий: K^+_{ATP} -канал, Ca^{2+} -активируемый K^+ -канал высокой проводимости, K_{Ca} -канал, потенциалзависимые K^+ -каналы (K_v 1.1, K_v 1.3) и K^+ -проводящая твинпора TASK-3 [12]. В то же время известно, что в митохондриальной мембране присутствует множество еще неидентифицированных типов K^+ -проводимости [12]. Можно предположить, что различие биофизических свойств определяет и различную физиологическую роль K^+ -каналов митохондрий в норме и при патологии. Кроме того, можно высказать предположение, что проводимость разных типов K^+ -каналов может, соответственно, по-разному регулироваться физиологически активными агентами, что также может определять различие физиологических функций этих каналов в клетке.

Для понимания физиологических функций митохондриального транспорта K^+ необходимо в полной мере оценить его биоэнергетические эффекты в разных типах клеток и влияние на другие энергозависимые и потенциалзависимые процессы (синтез АТР, транспорт Ca^{2+} , продукцию АФК). В данной работе была поставлена задача изучить влияние потенциалзависимого входа калия на мембранный потенциал митохондрий мозга крыс.

Материалы и методы

В опытах использовали белых крыс линии Вистар с массой тела 200–250 г. Мозг промывали охлажденным 0,9%-ным раствором КСl (4 °C), измельчали и гомогенизировали в 5-кратном объеме среды (250 мМ сахарозы, 20 мМ трис-НСl-буфера, 1 мМ ЭДТА, 1 мг/мл БСА, рН 7,4). Для выделения митохондрий го-

могенат центрифугировали 7 мин при 1000 g (4 °C). Затем супернатант центрифугировали 15 мин при 12000 g (4 °C). Осадок суспендировали в небольшом объеме среды без добавления ЭДТА и БСА и хранили на льду при 4 °C. Содержание протеина определяли методом Лоури.

Мембранный потенциал митохондрий (1 мг протеина на мл) регистрировали в среде инкубации в присутствии 10 мкМ сафранина, длина волн возбуждения и эмиссии 495 и 586 нм [18]. Находили разность между величиной флуоресцентного сигнала и базальной флуоресценцией деполяризованных митохондрий после внесения в среду 10^{-6} М протонофора СССР.

Потребление кислорода изучали в стандартных условиях полярографическим методом в закрытой ячейке объемом 1 мл с платиновым электродом при 26 °C (конечная концентрация протеина 1,5 мг/мл). Регистрировали стационарную скорость дыхания при окислении субстрата дыхания (V_4^S), после внесения митохондрий в среду инкубации: 2 мМ трис-НСI-буфера (рН 7,4), 5 мМ сукцината Na, 1 мМ NaH_2PO_4 , 1 мМ ЭДТА. КСI вносили в концентрациях 0–120 мМ, поддерживая осмолярность на уровне 300 мосмоль/л добавлением соответствующих концентраций сахарозы. Блокаторы $\text{K}^+_{\text{АТР}}$ -канала: глибенкламид и 5-гидроксидеканоат (5-HD) вносили в концентрациях 10^{-5} М и $2 \cdot 10^{-4}$ М, олигомицин вносили в количестве 2 мкг/мг протеина.

В работе использовали Na-сукцинат, трис (основание) (Fluka, Швейцария), сафранин, глибенкламид, 5-гидроксидеканоат натрия, ЭДТА, ротенон, $\text{Na}_2\text{-АТР}$, олигомицин, цитохром *c*, карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразон (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

Потенциалзависимый вход K^+ может вызывать достаточно широкий спектр биоэнергетических эффектов в митохондриях. Известно, что транспорт K^+ в матрикс, сопровождаемый входом воды и набуханием митохондрий, может приводить к разрыву наружной мембраны и выходу цитохрома *c* из межмембранного пространства [19, 20], что одновременно с блокированием транспорта электронов и гиперпродукцией активных форм кислорода (АФК) [20, 21]

повышает риск индукции клеточного апоптоза [22]. В физиологических условиях транспорт K^+ опосредован разными типами митохондриальных K^+ -каналов. В литературе, в частности, отмечают разные, иногда противоположные, эффекты АТР-зависимого транспорта K^+ на синтез АТР [14, 15, 17], образование АФК [18, 24], дыхание митохондрий [15–17, 25] и мембранный потенциал [15–17, 25]. Как показали результаты наших собственных исследований [26, 27], повышение АТР-зависимого входа K^+ под действием активатора $\text{K}^+_{\text{АТР}}$ -канала, диазоксида, не влияет на мембранный потенциал митохондрий печени крыс, однако повышает скорость дыхания вследствие активации циклического транспорта K^+ (входа K^+ и K^+/H^+ -обмена). Отсутствие влияния АТР-зависимого входа K^+ на мембранный потенциал митохондрий сердца и печени отмечали и другие авторы [17], тогда как в митохондриях почек, мозга и скелетных мышц активаторы $\text{K}^+_{\text{АТР}}$ -канала вызывали митохондриальную деполяризацию [15, 16, 28]. По-видимому, одной из причин наблюдаемых различий биоэнергетических эффектов потенциалзависимого входа K^+ могут быть различия в плотности распределения K^+ -каналов в мембране митохондрий, выделенных из разных тканей [13, 25]. Поэтому в настоящей работе была поставлена задача изучить влияние потенциалзависимого входа K^+ и его АТР-зависимой компоненты на мембранный потенциал митохондрий мозга крыс.

С учетом высоких физиологических внутриклеточных концентраций K^+ , влияние потенциалзависимого входа K^+ на мембранный потенциал изучали в диапазоне его концентраций 0–120 мМ. Влияние K^+ на скорость дыхания изучали в условиях стационарного состояния 4, которое устанавливается после внесения митохондрий и первоначального накопления K^+ из среды, и соответствует стационарному равновесию между потенциалзависимым входом K^+ и его выходом через K^+/H^+ -обменник [4]. Регистрировали стационарную скорость дыхания при окислении сукцината, V_4^S .

Как показывают результаты эксперимента, повышение концентрации K^+ в среде приводит к снижению мембранного потенциала митохондрий мозга (рис. 1, 1). В то же время, с повышением концентрации K^+ возрастает стационарная скорость дыхания митохондрий (рис. 2). Известно, что между скоростью трансмембранного переноса положительного заряда в энергизованных митохондриях и скоростью потребления кислорода существуют

стехиометрические соотношения, зависящие от комплекса дыхательной цепи, на котором происходит окисление субстрата [1, 5] и потенциалзависимый транспорт катионов в матрикс сопровождается повышением скорости дыхания. Следует отметить, что хотя выход цитохрома *c* вследствие аккумуляции K^+ может являться одной из причин митохондриальной деполяризации, он приводил бы к торможению дыхания и транспорта K^+ в митохондриях. Внесение цитохрома *c* в среду инкубации (50 мкг/мг протеина) не устраняло деполяризующего эффекта K^+ . Наблюдаемое ускорение дыхания, которое неизбежно замедлялось бы в случае выхода цитохрома *c*, указывает на повышение скорости потенциалзависимого транспорта K^+ . По данным литературы, при окислении сукцината соотношение между скоростью потребления кислорода и потенциалзависимого транспорта однозарядного катиона составляет 1 : 6 [5]. Это дает возможность оценить скорость трансмембранного переноса K^+ на основании полярографической регистрации изменения концентрации кислорода в среде инкубации [15, 17, 25]. Как показывают данные, в отсутствие K^+ скорость дыхания не равна нулю (рис. 2), что отчасти обусловлено базальной утечкой протонов в препаратах митохондрий. Поэтому, для полярографической оценки скорости транспорта K^+ , из скорости дыхания, регистрируемой в присутствии K^+ , вычитали скорость дыхания митохондрий без добавленного калия, предполагая аддитивность вклада базальной утечки протонов и транспорта K^+ в скорость дыхания.

Зависимость скорости транспорта K^+ от концентрации катиона в среде представлена на рис. 3. Приведенная концентрационная зависимость имеет гиперболический характер (рис. 3, а), свидетельствующий об отсутствии кооперативных эффектов при связывании K^+ митохондриями (коэффициент взаимодействия равен 1), что соответствует известному уравнению Михаэлиса [29]:

$$v = V_{\max} [K^+]/(K_{1/2} + [K^+]), \quad (I)$$

где $[K^+]$ – концентрация K^+ в среде, V_{\max} – максимальная скорость транспорта, $K_{1/2}$ – константа, соответствующая связыванию 50% K^+ -связывающих центров. Гиперболический характер зависимости (I) позволяет оценить основные кинетические характеристики потенциалзависимого входа K^+ (V_{\max} и $K_{1/2}$) путем линеаризации уравнения (I) в двойных обратных координатах:

$$1/v = (K_{1/2}/V_{\max}) \cdot [K^+]^{-1} + 1/V_{\max}. \quad (II)$$

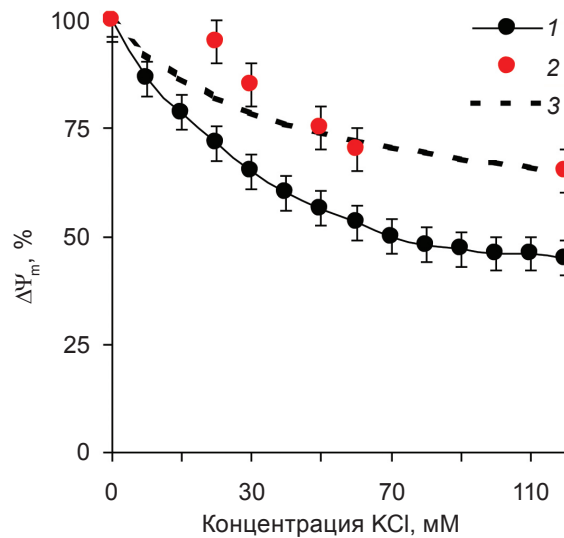


Рис. 1. Влияние K^+ на мембранный потенциал митохондрий мозга крысы. 1 – контроль; 2 – в присутствии 5-HD; 3 – зависимость, полученная в предположении 30%-го блокирования входа K^+ ($M \pm t$, $n = 6$)

Найденные из графика (рис. 3, б) величины ($K_{1/2} = 33,0 \pm 2,2$ мМ, $V_{\max} = 175,0 \pm 3,1$ нмоль K^+ ·мин⁻¹·мг⁻¹) близки к соответствующим характеристикам потенциалзависимого транспорта K^+ , приводимым в литературе для митохондрий, выделенных из сердца [23] и печени [30, 31] крыс. Можно предположить, что несмотря на присутствие множества типов K^+ -каналов в мембране митохондрий, имеет место аддитивность в связывании ионов калия

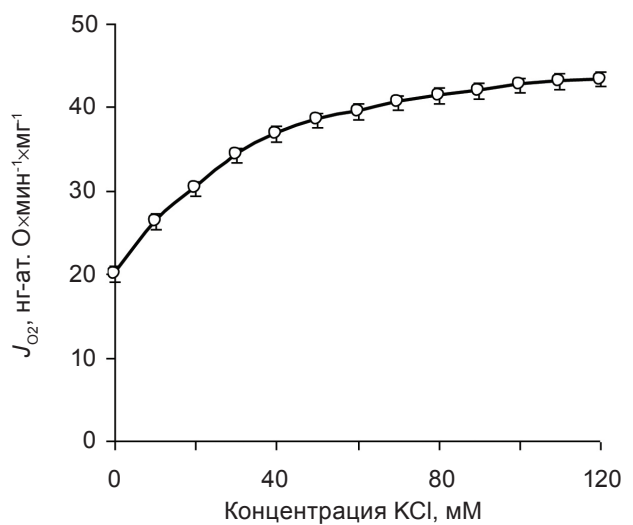


Рис. 2. Влияние концентрации K^+ на скорость потребления кислорода в митохондриях мозга в состоянии 4 по Чансу ($M \pm t$, $n = 4$)

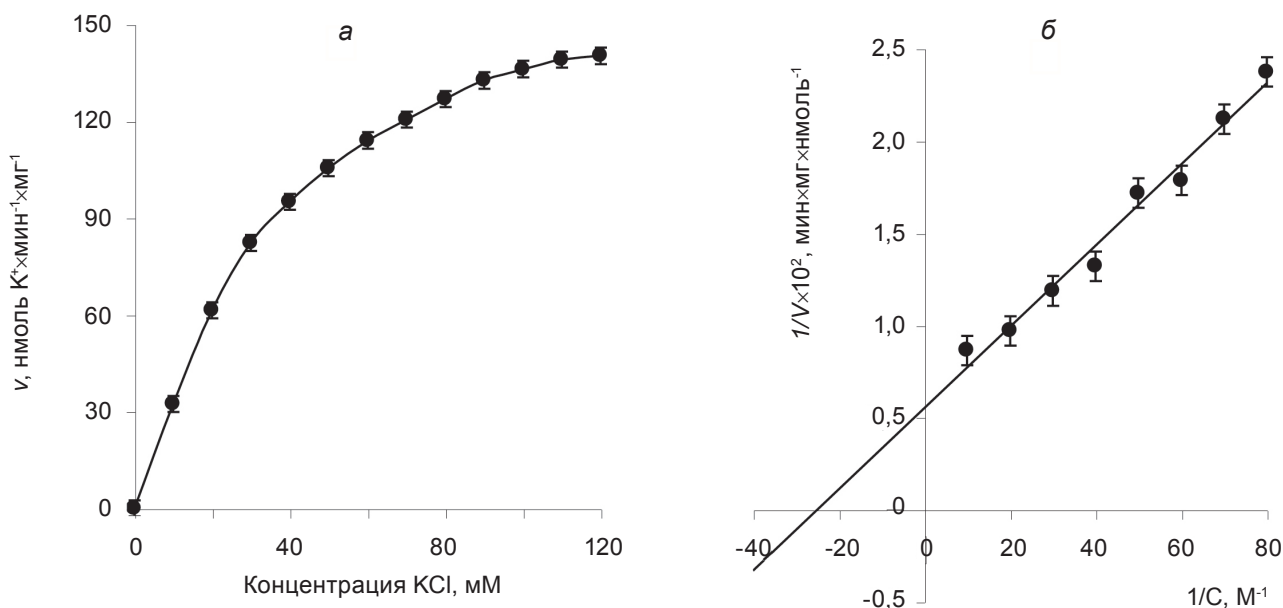


Рис. 3. Влияние концентрации K^+ в среде на потенциалзависимый транспорт K^+ в энергизованных митохондриях. Скорость транспорта K^+ оценивали из полярографических данных, принимая соотношение K^+/O равным 6 (а). Кинетические характеристики потенциалзависимого транспорта K^+ в митохондриях мозга оценивали путем линеаризации зависимости (а) в двойных обратных координатах (б) ($M \pm t$, $n = 4$); коэффициент корреляции $R^2 = 0,9816$

K^+ -проводящими структурами мембраны, при отсутствии кооперативного взаимодействия между центрами связывания.

Таким образом, повышение концентрации калия в среде приводит к повышению скорости потенциалзависимого транспорта K^+ в матрикс и диссипации мембранного потенциала митохондрий. Зависимость мембранного потенциала от скорости транспорта K^+ , установленная на основании экспериментальных данных (рис. 4, 1) достаточно хорошо аппроксимируется прямой, что согласуется с работами [15, 17] и свидетельствует о достоверной корреляции между повышением скорости транспорта и K^+ -индуцированной деполяризацией в митохондриях мозга крыс.

Поскольку повышение скорости транспорта K^+ сопровождается также и повышением скорости дыхания, доля потенциальной энергии, генерируемой при окислении субстрата и расходуемой на транспорт K^+ , возрастает, что приводит к разобщению дыхательной цепи. Из энергетического сопряжения и количественных соотношений между окислением субстрата, потреблением кислорода и транспортом катионов в митохондриях, в частности следует, что максимальная скорость транспорта, индуцированного внесением разобщителя, прямо пропорциональна скорости

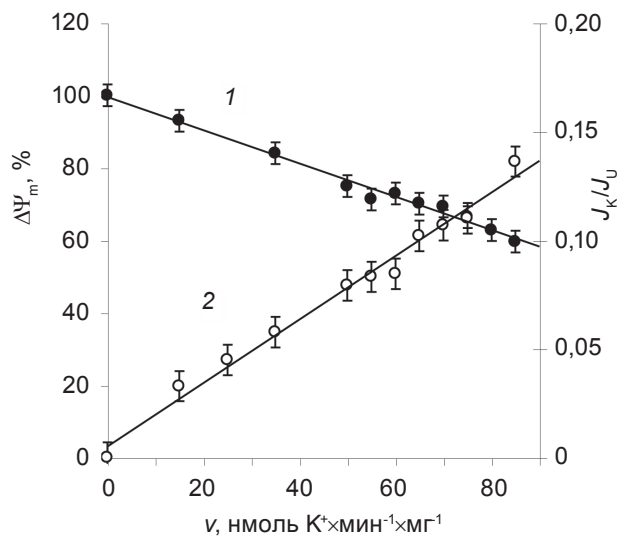


Рис. 4. Влияние потенциалзависимого транспорта K^+ на мембранный потенциал и разобщение дыхательной цепи в митохондриях мозга крыс. Зависимость $\Delta\Psi_m$ от скорости транспорта K^+ , V_K (1) находили из зависимостей $\Delta\Psi_m$ и V_K от концентрации K^+ в среде; разобщающий эффект K^+ оценивали как отношение скорости транспорта K^+ в состоянии 4 к максимальной скорости транспорта в присутствии СССР (J_K/J_0). Коэффициент корреляции $R^2 = 0,9876$ (1) и $0,9858$ (2) соответственно ($M \pm t$, $n = 4$)

разобщенного дыхания. Поэтому для оценки разобщающего эффекта входа K^+ в качестве показателя разобщения использовали соотношение между скоростью потенциалзависимого входа K^+ в энергизованных митохондриях (J_K) и максимальной скоростью транспорта 1-зарядного катиона, найденной из скорости разобщенного дыхания митохондрий (J_U). Выбранное соотношение, по нашему мнению, является более адекватным показателем разобщения, чем часто используемый дыхательный контроль (V_3/V_4^{ATP}), поскольку скорость ADP-стимулированного дыхания (V_3) ограничена скоростью синтеза АТФ и зависит от активности АТФ-синтазы, тогда как скорость дыхания в состоянии 4 (V_4^{ATP}) в значительной мере зависит от скорости гидролиза АТФ и гидролитической активности АТФ-азы митохондрий, и может не в полной мере отражать влияние транспорта катионов на скорость дыхания. Сказанное в особенности относится к K^+ , потенциалзависимый транспорт которого в матрикс может ингибировать систему окислительного фосфорилирования митохондрий [14, 15]. В отличие от V_3 , которая лимитирована активностью АТФ-синтазы, скорость дыхания, разобщенного протонофором, соответствует максимальной скорости окисления субстрата митохондриями и условиям, когда свободная энергия, высвобождаемая при окислении субстрата, расходуется на транспорт протонов. Ввиду сказанного, для оценки разобщающего эффекта транспорта K^+ мы использовали отношение скорости K^+ -стимулированного дыхания к скорости дыхания, разобщенного СССР. Внесение олигомицина достоверно не влияло на скорость дыхания при окислении субстрата V_4^S , что полностью исключает влияние эндогенного АТФ и стимулированной им гидролитической активности АТФ-азы. Зависимость J_K/J_U от скорости потенциалзависимого транспорта K^+ (рис. 4, 2) показывает, что разобщение дыхательной цепи возрастает с повышением скорости транспорта катиона. При этом K^+ -индуцированное разобщение коррелирует с митохондриальной деполяризацией вследствие входа K^+ (рис. 4, 1).

Как уже отмечалось выше, деполяризующий эффект транспорта K^+ может различаться, в зависимости от типа клеток [15–17, 23, 28]. Согласно литературным данным, в митохондриях мозга экспрессия K^+ _{АТФ}-канала и плотность его распределения в мембране этих органелл намного выше, чем в митохондриях других тканей (сердца, печени [13, 25]). Поэтому представляет интерес выяснить роль K^+ _{АТФ}-

канала в регуляции мембранного потенциала митохондрий мозга. С этой целью была поставлена задача выяснить вклад K^+ _{АТФ}-канала в потенциалзависимый транспорт K^+ в митохондриях мозга с помощью селективных блокаторов – глибенкламида и 5-гидроксидекановой кислоты (5-HD). Долю АТФ-зависимого транспорта K^+ также оценивали путем блокирования K^+ _{АТФ}-канала АТФ в присутствии Mg^{2+} . Скорость АТФ-зависимого транспорта K^+ , как и ранее, оценивали полярографическим методом как глибенкламид-, 5-HD- либо Mg -АТФ-чувствительную компоненту скорости дыхания.

Согласно результатам эксперимента, блокирование K^+ _{АТФ}-канала приводит к замедлению скорости дыхания (рис. 5). Блокирование K^+ _{АТФ}-канала глибенкламидом и 5-HD показывает, что его вклад в потребление кислорода в митохондриях мозга достигает $31 \pm 2\%$, что составляет $13,2 \pm 1,2$ нг-ат. О-мин⁻¹-мг⁻¹. Эта оценка подтверждается также при селективном блокировании K^+ _{АТФ}-канала АТФ в присутствии 1 мМ Mg^{2+} (рис. 5, столбцы 1, 4, 5) с его последующей реактивацией активатором K^+ _{АТФ}-канала, диазоксидом и повторным блокированием реактивированного канала глибенкламидом (рис. 5, столбцы 6, 7). При этом АТФ-зависимая компонента транспорта составляет $13,9 \pm 1,4$ нг-ат. О-мин⁻¹-мг⁻¹. Погрешности в определении вклада K^+ _{АТФ}-канала в скорость транспорта, по нашему мнению, обусловлены не только недостаточной точностью метода, но возможно неспецифическими эффектами блокаторов K^+ _{АТФ}-канала, часто отмечаемыми в литературе [12]. Приведенная оценка скорости АТФ-зависимого входа K^+ из полярографических данных (~ 79 нмоль K^+ -мин⁻¹-мг⁻¹) намного превышает соответствующую величину, установленную ранее для митохондрий сердца крыс (~ 30 нмоль K^+ -мин⁻¹-мг⁻¹ [17]), что согласуется с данными о повышенной экспрессии K^+ _{АТФ}-канала в митохондриях мозга [25].

Следует отметить выявленный нами высокий вклад АТФ-независимой составляющей, блокируемой Mg^{2+} , в скорость потребления кислорода в митохондриях мозга: $17,7 \pm 0,9$ нг-ат. О-мин⁻¹-мг⁻¹, что составляет примерно 42% скорости дыхания (рис. 5, столбцы 1, 2). Известно, что Mg^{2+} блокирует потенциалзависимые K^+ -каналы митохондрий и плазматических мембран [32, 33]. Поэтому возможно, что значительную долю АТФ-независимого транспорта K^+ составляют потенциалзависимые K^+ -каналы. Высокий вклад АТФ-независимых K^+ -каналов в потенциалзависимый транс-

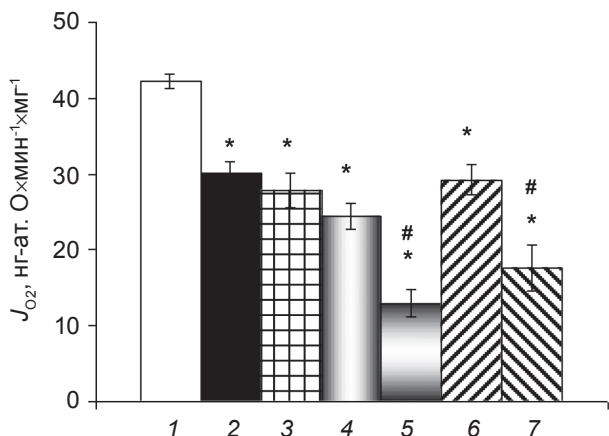


Рис. 5. Влияние блокаторов K^+ _{ATP}-канала на скорость потребления кислорода в митохондриях мозга: 1 – контроль, 2 – глибенкламид, 3 – 5-HD. Mg^{2+} вносили в концентрации 1 мМ (4), АТФ вносили в концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ М в присутствии 1 мМ Mg^{2+} и олигомицина, 2 мкг/мг протеина (5–7); активатор K^+ _{ATP}-канала, диазоксид вносили в концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ М (6, 7); глибенкламид вносили в отсутствие Mg -АТФ (2) а также в присутствии Mg -АТФ и диазоксида (7). $M \pm m$, $n = 4$; $P < 0,05$; * достоверно относительно контроля; # достоверно относительно 4,6

порт K^+ в митохондриях мозга, превышающий вклад K^+ _{ATP}-канала, позволяет высказать предположение о важной роли АТФ-независимого транспорта K^+ в регуляции функционального состояния и энергозависимых процессов в митохондриях мозга, требующее дальнейшей экспериментальной проверки.

Существенный вклад K^+ _{ATP}-канала в транспорт K^+ в митохондриях мозга, дает основания предположить, что наблюдаемый нами деполяризующий эффект входа K^+ (рис. 1, 1) также в значительной мере обусловлен активностью K^+ _{ATP}-канала. Чтобы убедиться в справедливости данного предположения, было изучено влияние блокатора K^+ _{ATP}-канала, 5-HD, на мембранный потенциал митохондрий мозга (рис. 1, 2). Как показали результаты эксперимента, блокирование K^+ _{ATP}-канала восстанавливает мембранный потенциал, и реполяризующий эффект составляет около 20% от контроля. Экспериментальные данные близки к результатам оценки реполяризующего эффекта блокирования K^+ _{ATP}-канала на основании приведенной выше зависимости мембранного потенциала от скорости транспорта K^+ (рис. 4, 1). Как мы уже отмечали, достаточно высокая погрешность методов, вместе с

возможными неспецифическими эффектами блокаторов K^+ _{ATP}-канала, не позволяет достичь абсолютного совпадения эксперимента с расчетной зависимостью (рис. 1, 2, 3). Несмотря на это, оценка реполяризующего эффекта в предположении блокирования 40% входа K^+ (рис. 1, 3) хорошо согласуется с результатом блокирования K^+ _{ATP}-канала 5-HD (рис. 1, 2), что одновременно является подтверждением справедливости полученной нами зависимости $\Delta\Psi_m$ от скорости транспорта K^+ в митохондриях мозга, как и надежности оценки вклада K^+ _{ATP}-канала в потенциалзависимый транспорт K^+ .

Следует отметить, что использованный нами метод расчета скорости транспорта K^+ из полярографических данных неоднократно применялся разными авторами [15, 17, 25]. Он основан на стехиометрических коэффициентах, найденных путем независимой регистрации скорости валиномицин-индуцированного входа K^+ и дыхания (например, [5]). В последнее время все чаще отмечают роль потенциалзависимых Cl^- -каналов в регуляции митохондриальных функций, в том числе, объема матрикса и $\Delta\Psi_m$ [34]. Cl^- , как и K^+ , являются преобладающими ионами электролитного состава матрикса. Хотя литературные сведения о механизмах регуляции митохондриальных Cl^- -каналов еще очень ограничены, известно, что Cl^- -каналы и выход Cl^- из матрикса активируются при деполяризации, которая в условиях нашего эксперимента происходит вследствие входа K^+ . Поскольку валиномицин-индуцированный вход K^+ также сопровождается деполяризацией, можно предположить, что при этом одновременно открываются потенциалзависимые Cl^- -каналы. Однако, даже если активность Cl^- -каналов и влияет на скорость транспорта K^+ , то не влияет на стехиометрию K^+/O , которая установлена путем независимой непосредственной регистрации транспорта K^+ и дыхания. Сказанное оправдывает расчет скорости транспорта K^+ из скорости дыхания с использованием известных стехиометрических коэффициентов, не зависящих от активности митохондриальных Cl^- -каналов, поскольку она уже учтена в соотношении K^+/O , найденном экспериментальным путем.

Полученные нами данные указывают на непосредственную связь регистрируемых изменений $\Delta\Psi_m$ с транспортом K^+ и активностью K^+ -каналов: деполяризацией при входе K^+ и реполяризацией при его частичном блокировании блокаторами K^+ _{ATP}-канала. Деполяризующий и реполяризующий эффекты, зависящие от входа K^+ при изменении концентрации KCl в каждом случае изучали при одной и той же

концентрації Cl^- (рис. 1, криві 1, 3; рис. 5). Расчет реполяризуючого ефекта на основі залежності $\Delta\Psi_m(V_K)$ добре збігається з ефектом блокатора (рис. 1). Сказане дозволяє безумовно зв'язати спостережувані ефекти з установленними залежностями з потенціалзалежним входом K^+ .

Таким образом, результати проведених експериментів показують важливу роль потенціалзалежного входу K^+ в регуляції мембранного потенціалу мітохондрій мозку. При цьому встановлено, що мембранний потенціал мітохондрій мозку в значительній мірі залежить від функціональної активності K^+ _{АТФ}-канала, фармакологічна модуляція якою, як активація, так і блокування, може служити інструментом націленої регуляції енергозалежних процесів в мітохондріях мозку крив.

ВПЛИВ ПОТЕНЦІАЛЗАЛЕЖНОГО ТРАНСПОРТУ КАЛІЮ НА МЕМБРАННИЙ ПОТЕНЦІАЛ МІТОХОНДРІЙ МОЗКУ ЩУРІВ

*О. В. Акіпова, В. І. Носар,
Л. І. Колчинська, І. М. Маньковська,
М. К. Малишева, В. Ф. Сагач*

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

Досліджено вплив потенціалзалежного входу калію на трансмембранну різницю потенціалів ($\Delta\Psi_m$) у мітохондріях мозку щурів. Показано, що в діапазоні концентрацій K^+ 0–120 мМ потенціалзалежний вхід K^+ у матрикс мітохондрій призводить до підвищення швидкості дихання та мітохондріальної деполаризації. Блокатори K^+ _{АТФ}-каналу, глібенкламід та 5-гідроксидеканоат, блокують близько 35% потенціалзалежного входу K^+ в мітохондріях мозку. Блокування K^+ _{АТФ}-каналу призводить до реполяризації мембрани мітохондрій мозку близько 20% від контролю, що узгоджується із експериментально одержаною залежністю $\Delta\Psi_m$ від швидкості потенціалзалежного входу K^+ . Результати проведених досліджень свідчать, що функціональна активність K^+ _{АТФ}-каналу відіграє фізіологічно важливу роль в регуляції мембранного потенціалу та енергозалежних процесів у мітохондріях мозку.

Ключові слова: K^+ , транспорт, K^+ _{АТФ}-канал, мембранний потенціал, споживання кисню, мітохондрії мозку.

THE EFFECT OF POTENTIAL-DEPENDENT POTASSIUM UPTAKE ON MEMBRANE POTENTIAL IN RAT BRAIN MITOCHONDRIA

*O. V. Akopova, V. I. Nosar,
L. I. Kolchinskaya, I. N. Mankovska,
M. K. Malysheva, V. F. Sagach*

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

The effect of potential-dependent potassium uptake on the transmembrane potential difference ($\Delta\Psi_m$) in rat brain mitochondria has been studied. It was shown that in potassium concentration range of 0–120 mM the potential-dependent K^+ -uptake into matrix leads to the increase in respiration rate and mitochondrial depolarization. ATP-dependent potassium channel (K^+ _{АТФ}-channel) blockers, glibenclamide and 5-hydroxydecanoate, block ~35% of potential-dependent potassium uptake in the brain mitochondria. It was shown that K^+ _{АТФ}-channel blockage results in membrane repolarization by ~20% of control, which is consistent with experimental dependence of $\Delta\Psi_m$ on the rate of potential-dependent potassium uptake. Obtained experimental data give the evidence that functional activity of K^+ _{АТФ}-channel is physiologically important in the regulation of membrane potential and energy-dependent processes in brain mitochondria.

Key words: K^+ , transport, K^+ _{АТФ}-channel, membrane potential, oxygen consumption, brain mitochondria.

1. Mitchell P. // Nature. – 1961. – **191**. – P. 144–148.
2. Скулачев В. П. Трансформация энергии в биомембранах. – М.: Наука, 1972. – 203 с.
3. Brookes P. S., Yoon Y., Robotham J. L. et al. // Am. J. Physiol. – 2004. – **287**. – P. C817–C833.
4. Garlid K. D., Paucek P. // Biochim. Biophys. Acta. – 2003. – **1606**. – P. 23–41.
5. Beavis A. D. // J. Biol. Chem. – 1987. – **262**. – P. 6165–6173.
6. Murphy M. P. // Biochem J. – 2009. – **417**. – P. 1–13.
7. Brand M. D., Affourtit Ch., Esteves T. et al. // Free Radical Biol. Med. – 2004. – **37**. – P. 755–767.
8. Stucki J. W. // Eur. J. Biochem. – 1976. – **68**. – P. 551–562.
9. Liu Sh.-S. // J. Bioenerg. Biomembr. – 1999. – **31**. – P. 367–376.

10. Akerman K. E. O., Wikstrom M. K. F. // FEBS Lett. — 1976. — **68**. — P. 191–197.
11. Moore C. L. // Curr. Top. Bioenerg. — 1971. — **4**. — P. 191–236.
12. Szewczyk A., Kajma A., Malinska D. et al. // FEBS Lett. — 2010. — **584**. — P. 2063–2069.
13. O'Rourke B. // Circ. Res. — 2004. — **94**. — P. 420–432.
14. Facundo H. T., Fornazari M., Kowaltowski A. J. // Biochim. Biophys. Acta. — 2006. — **1762**. — P. 202–212.
15. Cancherini D., Trabuco L. G., Rebouzas N. A., Kowaltowski A. J. // Am. J. Physiol. — 2003. — **285**. — P. F1291–F1296.
16. Debska G., Kicinska A., Skalska J. et al. // Biochim. Biophys. Acta. — 2002. — **1556**. — P. 97–105.
17. Kowaltowski A. J., Seetharaman S., Paucek P., Garlid K. D. // Am. J. Physiol. — 2001. — **280**. — P. H649–H657.
18. Facundo H. T. F., dePaula J. G., Kowaltowski A. J. // J. Bioenerg. Biomembr. — 2005. — **37**. — P. 75–82.
19. Costa D. T. A., Quinlan C. L., Andrukhiv A. et al. // Am. J. Physiol. — 2006. — **290**. — P. H406–H415.
20. Starkov A. A., Polster B. M., Fiskum G. // J. Neurochem. — 2002. — **83**. — P. 220–228.
21. Cai J., Jones D. P. // J. Biol. Chem. — 1998. — **273**. — P. 11401–11404.
22. Gogvadze V., Robertson J. D., Enoksson M. et al. // Biochem. J. — 2004. — **378**. — P. 213–217.
23. Aon M. A., Cortassa S., Wei A.-Ch. et al. // Biochim. Biophys. Acta. — 2010. — **1797**. — P. 71–80.
24. Andrukhiv A., Costa A. D., West I. C., Garlid K. D. // Am. J. Physiol. — 2006. — **291**. — P. H2067–H2074.
25. Bajgar R., Seetharaman S., Kowaltowski A. J. et al. // J. Biol. Chem. — 2001. — **276**. — P. 33369–33374.
26. Акопова О. В., Носарь В. И., Бурый В. А. и др. // Биохимия. — 2010. — **75**. — С. 1273–1283.
27. Акопова О. В. // Укр. біохім. журн. — 2011. — **83**, № 3. — С. 37–47.
28. Debska G., May R., Kicinska A. et al. // Brain Res. — 2001. — **892**. — P. 42–50.
29. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. — М.: Мир, 1982. — Т. 1. — 392 с.
30. Beavis A. D., Lu Y., Garlid K. D. // J. Biol. Chem. — 1993. — **268**. — P. 997–1004.
31. Szewczyk A., Wojcik G., Nalecz M. J. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1995. — **207**. — P. 126–132.
32. Мембраны: ионные каналы / Сб.: под ред. Ю. А. Чизмадзе. — М.: Мир, 1981. — 320 с.
33. Karus A., Szaszi K., Kaldi K. et al. // J. Biol. Chem. — 1990. — **265**. — P. 18063–18066.
34. Tomaskova Z., Ondrias K. // FEBS Lett. — 2010. — **584**. — P. 2085–2092.

Получено 28.09.2012