

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ФЛОКАЛИНА НА ДЫХАНИЕ И КАЛИЕВЫЙ ТРАНСПОРТ МИТОХОНДРИЙ СЕРДЦА И ПЕЧЕНИ КРЫС

© 2016 г. Н.В. Хмиль* ****, О.С. Горбачёва* **, Р.Б. Струтинский***, М.О. Коробейникова* **, Н.В. Белослудцева* **, С.В. Мурзаева**, Г.Д. Миронова* **

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, Пуцино Московской области, ул. Институтская, 3;

**Пуцинский государственный естественно-научный институт, 142290, Пуцино Московской области, пр. Науки, 3;

***Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, 01024, Киев, ул. Богомольца, 4, Украина;

****Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, 61077, Харьков, пл. Свободы, 4, Украина
E-mail: mironova40@mail.ru

Поступила в редакцию 01.07.16 г.

Исследовано влияние препарата флокалина, обладающего кардиопротекторным свойством, на скорость дыхания митохондрий сердца и печени крыс в разных функциональных состояниях, эффективность окислительного фосфорилирования, а также скорость транспорта калия в этих органеллах. Установлено, что флокалин в концентрациях 7–30 мкМ в калийсодержащей среде стимулирует дыхание митохондрий сердца и печени крыс в состояниях V_2 и V_4 в присутствии сукцината в качестве субстрата дыхания. В отсутствие ионов калия в среде инкубации флокалин не оказывает влияния на дыхание митохондрий в этих состояниях. Изучение функционирования системы калиевого транспорта показало, что флокалин в исследуемых концентрациях дозозависимо активирует АТФ-зависимый транспорт ионов калия в митохондриях сердца и печени крыс. Полученные данные указывают на то, что кардиопротекторное действие флокалина может быть связано с активацией АТФ-зависимого калиевого канала внутренней мембраны митохондрий.

Ключевые слова: флокалин, митохондрии, митохондриальный АТФ-зависимый калиевый канал, кардиопротекция.

Известно, что сердечно-сосудистые заболевания являются одной из основных проблем, изучаемых современной медициной. В последнее время для лечения этих заболеваний стали широко использоваться различные модуляторы калиевых и кальциевых каналов, играющих ключевую роль в механизмах адаптации организма к гипоксии и защите сердца от ишемических повреждений [1,2]. Большая роль при этом уделяется митохондриальному АТФ-зависимому калиевому каналу и поиску активаторов этого канала [3–5].

Совместными усилиями сотрудников лабораторий О.О. Мойбенко и Л.М. Ягупольского была разработана технологическая схема синтеза нового кардиопротекторного препарата флокалина – производного пинацидила [6]. Показано, что этот препарат при острой экспериментальной ишемии/реперфузии миокарда имеет выраженные кардиопротекторные свойства и уменьшает у животных размер инфаркта миокарда по срав-

нению с контролем без введения препарата на 42% [7]. Предполагается, что одним из механизмов кардиопротекции при этом может быть увеличение соотношения cNOS/iNOS, а также угнетение активности патологических в условиях ишемии ферментов липоксигеназы и фосфолипазы A_2 [6]. Кроме того, этими же авторами было показано, что флокалин способствует нормализации нарушений показателей биоэнергетического метаболизма в ишемизированном головном мозге, восстанавливая уровень адениловых нуклеотидов и креатинфосфата на фоне снижения метаболического ацидоза и роста содержания глюкозы [8].

Так как флокалин является фторсодержащим производным пинацидила – известного активатора АТФ-зависимого калиевого канала, расположенного как на клеточной (цитокАТФ), так и на митохондриальной (митокАТФ) мембранах [4], в задачу данной работы входило исследование влияния этого препарата

на функционирование митохондрий и, в частности, на работу митоКАТФ-канала.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Митохондрии выделяли из печени и сердца половозрелых самцов крыс линии Wistar массой 220–250 г общепринятым методом дифференциального центрифугирования. Среда выделения для митохондрий печени крыс содержала 210 мМ маннитола, 70 мМ сахарозы, 0,1% бычьего сывороточного альбумина, 0,5 мМ ЭГТА, 30 мМ НЕРЕС-КОН (рН 7,4). Среда выделения для митохондрий сердца крыс содержала 210 мМ маннитола, 70 мМ сахарозы, 2 мМ ЭГТА, 1 мг/мл альбумина, 10 мМ НЕРЕС-NaOH (рН 7,4).

Дыхание митохондрий оценивали с помощью двухкамерного оксиграфа Охуграф 2К (Oroboros Instruments, Австрия), позволяющего проводить высокоточные измерения кислорода в небольшом количестве биологического материала при низком парциальном давлении кислорода. Измерения проводили при 26°C при постоянном перемешивании в инкубационной среде объемом 2,1 мл. В зависимости от целей исследования были использованы две среды инкубации: 1) 60 мМ KCl, 5 мМ KH_2PO_4 , 1 мМ ЭГТА, 10 мМ НЕРЕС/КОН (рН 7,4) (KCl-содержащая среда); 2) 100 мМ сахарозы, 50 мМ маннитола, 60 мМ KCl, 5 мМ KH_2PO_4 , 2,5 мМ MgCl_2 , 0,5 мМ ЭГТА, 10 мМ НЕРЕС-КОН (рН 7,4) (среда, лишенная ионов калия). Концентрация митохондриального белка в пробе составляла ~ 0,5–1 мг/мл. Скорость дыхания митохондрий определяли в различных метаболических состояниях: V_2 – скорость дыхания при окислении субстрата (5 мМ янтарной кислоты + 2,5 мМ глутаминовой кислоты), V_3 – скорость фосфорилирующего окисления в присутствии 200 мМ АДФ, V_4 – скорость дыхания после фосфорилирования всего добавленного АДФ, $V_{\text{ДНФ}}$ – скорость разобщенного дыхания в присутствии 50 мкМ 2,4-динитрофенола. Скорости митохондриального дыхания выражали в нг-атомах O за 1 мин в расчете на 1 мг белка митохондрий.

ДНФ-индуцированный выход K^+ из митохондрий, отражающий работу митоКАТФ-канала в обратном направлении, изучали с помощью K^+ -селективного электрода («НикоАналит», Россия) и установки «Record4» (Россия) в ячейке объемом 1 мл при 26°C и постоянном перемешивании [9]. Среда инкубации митохондрий содержала 170 мМ сахарозы, 80 мМ маннитола, 5 мМ Na_2HPO_4 , 10 мМ трис-HCl (рН 7,4). Концентрация митохондриального белка в ячейке составляла 0,5–1,5 мг/мл. Выход K^+ из митохондрий индуцировали добавлением в среду инкубации 50 мкМ 2,4-динитрофенола.

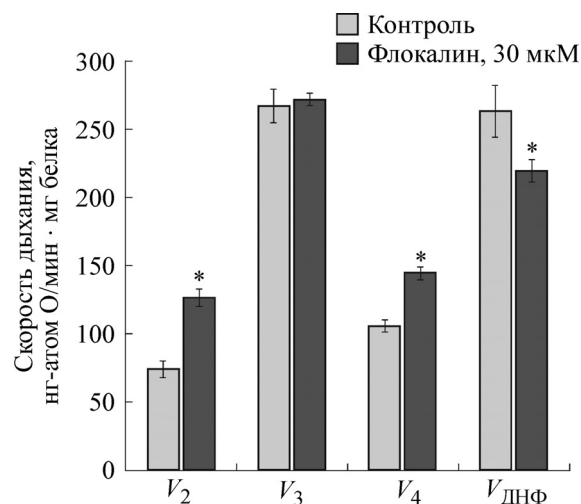


Рис. 1. Влияние флокалина на дыхание митохондрий сердца крыс в разных функциональных состояниях в KCl-содержащей среде инкубации. Приведены средние значения \pm стандартное отклонение ($n = 6$). * $P < 0,05$, отличия статистически достоверны по сравнению с контролем.

Скорость выхода ионов калия из митохондрий выражали в нМ/(мин·мг белка).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе было исследовано действие флокалина на энергетический и ионный обмен в митохондриях сердца и печени крыс.

Ранее было показано, что флокалин обладает кардиопротекторным эффектом, однако молекулярный механизм его действия до сих пор остается неизвестным. Для его выяснения в первой части работы мы изучили влияние флокалина на дыхание и эффективность окислительного фосфорилирования в митохондриях сердца экспериментальных животных, так как нормальное энергообеспечение сердца является основным фактором, определяющим предохранение сердца от ишемических повреждений.

Как видно из рис. 1, флокалин в калийсодержащей среде активизирует несопряженное дыхание (V_2 и V_4), не оказывая при этом влияния на дыхание в присутствии АДФ (V_3) при использовании янтарной кислоты в качестве субстрата дыхания. На разобщенное дыхание в присутствии ДНФ флокалин также не оказывает существенного влияния.

Ускорение свободного дыхания при наличии в среде ионов калия может быть связано с активацией транспорта данных ионов в митохондриях. С целью проверки этого предположения мы исследовали влияние флокалина на дыхание митохондрий сердца крыс в среде,

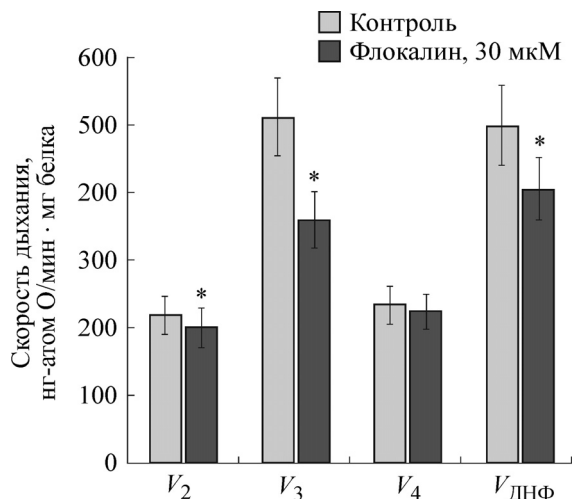


Рис. 2. Влияние флокалина на дыхание митохондрий сердца крыс в разных функциональных состояниях в среде инкубации без K^+ . Приведены средние значения \pm стандартное отклонение ($n = 6$). * $P < 0,05$, отличия статистически достоверны по сравнению с контролем.

не содержащей ионов калия (рис. 2). Было установлено, что при отсутствии ионов калия в среде инкубации исследуемый препарат не вызывает активацию скоростей V_2 и V_4 . Это подтверждает наше предположение о том, что ускорение митохондриального дыхания после добавления флокалина может быть связано с активацией энергозависимого транспорта калия в митохондриях, обеспечиваемого работой митоКАТФ.

Таким образом, из полученных результатов можно сделать вывод о том, что повышение скоростей дыхания V_2 и V_4 является следствием стимуляции циклического транспорта K^+ через внутреннюю митохондриальную мембрану. Полученные данные согласуются с результатами работ [10,11] о том, что активатор митоКАТФ-канала – диазоксид, практически не влияя на мембранный потенциал митохондрий, стимулирует скорость несопряженного дыхания митохондрий.

В работе также изучено влияние флокалина на дыхание митохондрий печени крыс. Как видно на рис. 3, препарат стимулирует, но в меньшей степени по сравнению с митохондриями сердца, несопряженное дыхание (V_2 и V_4) и незначительно ингибирует дыхание в присутствии АДФ (V_3) митохондрий печени крыс при использовании сукцината в качестве субстрата дыхания. Согласно полученным данным флокалин практически не оказывает влияния на разобщенное дыхание. Замена ионов калия в среде инкубации на натрий не снимала эффекта флокалина на дыхание митохондрий печени. Следовательно, эффект флокалина проявляется

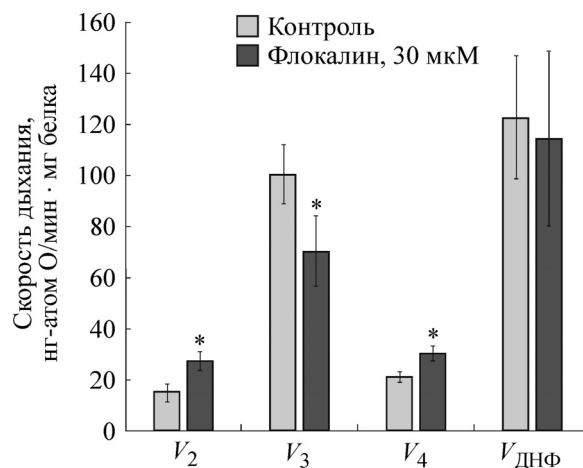


Рис. 3. Влияние флокалина на дыхание митохондрий печени крыс в разных функциональных состояниях в KCl-содержащей среде инкубации. Приведены средние значения \pm стандартное отклонение ($n = 5$). * $P < 0,05$, отличия статистически достоверны по сравнению с контролем.

по-разному в зависимости от типа ткани, из которой были выделены митохондрии. Флокалин оказывает действие, подобное активаторам митоКАТФ, выраженное в большей мере в митохондриях сердца, чем в митохондриях печени.

Проведенное нами прямое измерение калиевого транспорта в митохондриях сердца и печени крыс подтвердило наше предположение об активирующем действии флокалина на работу митоКАТФ-канала. С помощью калий-селективного электрода была определена скорость ДНФ-индуцированного выхода K^+ из митохондрий сердца и печени крыс. Следует подчеркнуть, что данный метод позволяет регистрировать обращение работы АТФ-зависимого калиевого канала, происходящее вследствие резкого снижения мембранного потенциала митохондрий при добавлении разобщителя окислительного фосфорилирования. Это дает возможность определять работу канала независимо от энергетического состояния митохондрий, которое, как было обнаружено, меняется под действием флокалина. Таким образом, выход ионов калия в этом случае происходит по концентрационному градиенту (в среде инкубации ионы калия отсутствуют) и независимо от присутствия субстрата дыхания. Этот транспорт ингибируется в присутствии 1–2 мМ АТФ [9]. Предварительно мы показали, что преинкубация митохондрий с флокалином в концентрациях до 60 мкМ не влияет на содержание ионов калия в этих органеллах за время проведения эксперимента, т.е. исследуемый препарат не вызывает выхода ионов калия из митохондрий в отсутствие разобщителя.

Как видно из рис. 4, флокалин в микромолярных концентрациях (7–30 мкМ) дозозависимо повышает скорость ДНФ-индуцированного выхода ионов калия из митохондрий как сердца (а), так и печени (б) крыс. Эти исследования подтвердили предположение о том, что флокалин способен активировать АТФ-зависимый транспорт калия в митохондриях.

В последнее время ведется активный поиск новых активаторов митоКАТФ, так как они обладают выраженным кардиопротекторным действием [12–14]. В нашей лаборатории был обнаружен природный активатор канала – УДФ [3], который наравне с половыми гормонами может активировать митоКАТФ в физиологических условиях, обеспечивая кардиопротекцию [15–18]. В настоящей работе мы изучили вновь синтезированный препарат флокалин, обладающий кардиопротекторным свойством, и показали, что он вызывает небольшое разобщение дыхания митохондрий, а также активирует митоКАТФ.

Механизм кардиопротекторного действия активаторов каналов до сих пор окончательно не выяснен. Предложены три различных механизма защиты сердца от ишемии при активации митоКАТФ. Полагают, что эти активаторы предупреждают распад АТФ в результате стимуляции входа K^+ в митохондрии, так как известно, что при набухании митохондрий усиливается окисление жирных кислот и увеличивается скорость продукции АТФ [19,20]. Предположение о том, что набухание митохондрий в результате входа K^+ оказывает кардиопротекторный эффект, подтверждается также и тем, что активация других митохондриальных K^+ -каналов, например Ca^{2+} -активируемого калиевого канала, также предупреждает ишемические повреждения [21].

Второй возможный механизм кардиопротекторного действия активаторов митоКАТФ связывают с тем, что при стимуляции этого канала наблюдается снижение концентрации Ca^{2+} в митохондриях, что уменьшает вероятность открытия митохондриальной поры и предупреждает гибель кардиомиоцитов [22–25].

Третий механизм может быть связан с влиянием активаторов канала на снижение уровня активных форм кислорода, образуемых митохондриями в повышенном количестве при продолжительной ишемии. При активации канала в митохондриях усиливается циклизация ионов калия [26], что приводит к слабому разобщению митохондрий, так как вход K^+ является потенциал-зависимым процессом. В то же время известно, что скорость образования активных форм кислорода зависит от степени восстановленности дыхательной цепи. Показано, что сни-

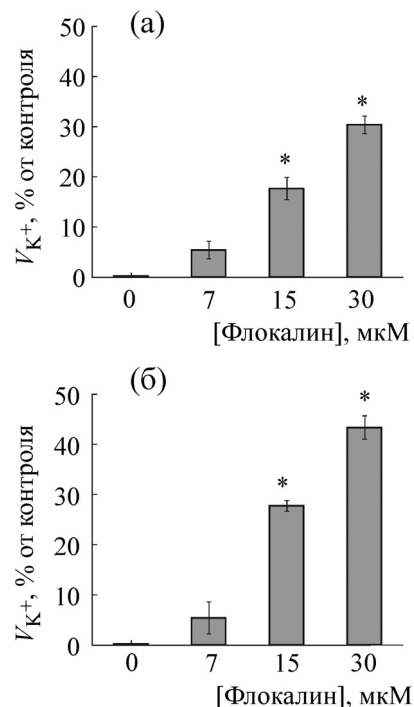


Рис. 4. Флокалин дозозависимо стимулирует ДНФ-индуцированный выход ионов K^+ из митохондрий сердца (а) и печени (б) крыс. Приведены средние значения \pm стандартное отклонение ($n = 3$). * $P < 0,05$, отличия статистически достоверны по сравнению с контролем.

жение мембранного потенциала в митохондриях на 10% приводит к уменьшению скорости образования активных форм кислорода в них на 70% [27]. Известно, что увеличение выше нормы количества активных форм кислорода в митохондриях в результате избыточной восстановленности дыхательной цепи, наблюдаемое при гипоксии, может быть причиной необратимого повреждения клеток. Однако предварительная обработка активаторами митоКАТФ подавляет их образование [28,29].

Полученные в работе данные говорят в пользу механизма кардиопротекторного действия активаторов митоКАТФ, связанного со снижением содержания активных форм кислорода в митохондриях, и показывают, что флокалин вызывает разобщение митохондрий, так как активирует свободное дыхание, т.е. может снижать потенциал на внутренней митохондриальной мембране, что, в свою очередь, ведет к уменьшению скорости образования АФК в митохондриях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 16-15-00157), Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-04-00692),

ДПННИТ (гос. задание № 2014/281/2495) и гранта Правительства Российской Федерации (договор № 14.Z50.31.0028).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. C. Wang, S. M. Hu, H. Xie, et al., *Braz. J. Med. Biol.* **48**, 528 (2015).
2. E. J. Park, J. H. Bae, S. Y. Kim, et al., *Biochem. Pharmacol.* **67** (6), 1089 (2004).
3. G. Mironova, A. Negoda, B. Marinov, et al., *J. Biol. Chem.* **279** (31), 32562 (2004).
4. Г. Д. Миронова, Е. В. Качаева, И. Б. Крылова и др., *Вестн. РАМН* **2**, 44 (2007).
5. M. Laskowski, B. Augustynek, B. Kulawiak, et al., *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics* **1857**, 1247 (2016).
6. O. O. Moibenko, R. B. Strutynskiy, L. M. Yagupolskii, et al., *Sci. Innov.* **5** (1), 80 (2009).
7. R. B. Strutynskiy, R. A. Rovenets', O. P. Neshcheret, et al., *Fiziol. Zh.* **57** (1), 55 (2011).
8. O. M. Denysiuk, *Buk. Med. Herald.* **1** (57), 131 (2011).
9. O. V. Baranova, Y. Y. Skarga, A. E. Negoda, and G. D. Mironova, *Biochemistry* **65**, 218 (2000).
10. О. В. Аكوпова, В. И. Носарь, В. А. Бурый и др., *Биохимия* **75**, 1273 (2010).
11. A. J. Kowaltowski, S. Seetharaman, P. Paucek, and K. D. Garlid, *Am. J. Physiol.* **280**, 649 (2001).
12. L. Testai, S. Rapposelli, A. Martelli, et al., *Med. Res. Rev.* **35**, 520 (2015).
13. T. Chen, Y. Deng, X. Liao, et al., *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, **32**, 462 (2015).
14. H. O. Altunkaynak and M. Tecder-Unal, *Bratisl. Lek. Listy* **116**, 567 (2015).
15. I. B. Krilova, E. V. Kachaeva, O. M. Rodionova, et al., *Exp. Gerontol.* **41**, 697 (2006).
16. И. Б. Крылова, В. В. Бульон, Е. Н. Селина и др., *Бюл. федерального центра сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова* **44** (2012).
17. Ch. Tsai, Sh. Su, T. Chou, and T. Lee, *J. Pharmacol. Experim. Ther.* **301**, 234 (2002).
18. E. Fikret, M. Guido, N. Gassanov, et al., *Circulation* **110** (19): 3100 (2004).
19. G. Grover and K. Garlid, *J. Mol. Cell. Pharmacol.* **32**, 677 (2000).
20. A. P. Halestrap, *Biochim. Biophys. Acta* **973** (3), 355 (1989).
21. W. Xu, Y. Liu, S. Wang, et al., *Science* **298**, 895 (2002).
22. Y. Liu, T. Sato, J. Seharaseyon, et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **874**, 27 (1999).
23. E. Holmuhamedov, L. Wang, and A. Terzic, *J. Physiol. (Lond.)* **519**, 347 (1999).
24. M. Murata, M. Akao, B. O'Rourke, and E. Marban, *Circ. Res.* **89**, 891 (2001).
25. P. Korge, H. M. Honda, and J. N. Wiess, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 3312 (2002).
26. P. Schönfeld, S. Gerke, R. Bohnensack, and L. Wojtczak, *Biochim. Biophys. Acta* **1604**, 125 (2003).
27. S. S. Korshunov, V. P. Skulachev, and A. A. Starkov, *FEBS Lett.* **416** (1), 15 (1997).
28. T. Pain, X. Yang, S. Critz, et al., *Circ. Res.* **87**, 460 (2000).
29. J. Zweier, J. Flaherty, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 1404 (1987).

Study of the Effects of Flocalin on Respiration and Potassium Transport of Rat Heart and Liver Mitochondria

N.V. Khmil* ****, O.S. Gorbacheva* **, R.B. Strutinskiy***, M.O.Korobeynikova* **, N.V. Belosludtseva* **, S.V. Murzaeva**, and G.D. Mironova* **

**Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Pushchino State University, prosp. Nauki 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

****Bogomolets Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, ul. Bogomoltsa 4, Kiev, 01024 Ukraine*

*****Karazin Kharkiv National University, pl. Svobody 4, Kharkiv, 61077 Ukraine*

The effects of the drug flocalin possessing cardioprotective properties on the respiration rates of rat heart and liver mitochondria in different functional states, the efficiency of oxidative phosphorylation, as well as the transport of potassium ions in these organelles were studied. It was found that flocalin at concentrations of 7–30 μM stimulated respiration of rat heart and liver mitochondria in V_2 and V_4 states in the presence of succinic acid as respiration substrate in a potassium-containing medium. In the absence of potassium ions in the incubation medium, flocalin had no effect on mitochondrial respiration in these states. Studying the functioning of potassium transport system revealed that flocalin at these concentrations dose-dependently activated the ATP-dependent transport of potassium ions in rat heart and liver mitochondria. The data obtained indicate that the cardioprotective effect of flocalin can be associated with activation of the ATP-dependent potassium channel of the inner mitochondrial membrane.

Key words: flocalin, mitochondria, mitochondrial ATP-dependent potassium channel, cardioprotection