

УДК 612.08

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ АКТИВАТОРОВ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО АТФ-ЗАВИСИМОГО КАЛИЕВОГО КАНАЛА С ПОМОЩЬЮ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО ИНДИКАТОРА AMPLEX RED

© 2013 г. С. В. Мурзаева*, С. П. Белова**, Г. Д. Миронова**

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, 142290

**Пущинский государственный университет, Пущино, 142290

e-mail: svmurzaeva@rambler.ru

Поступила в редакцию 19.12.2012 г.

Проведено тестирование адаптогенов – антигипоксантов, участвующих в активировании митохондриального АТФ-зависимого калиевого канала (миток_{АТФ}), на окисление флуорогенного индикатора Amplex Red (AR) в пероксидазной системе. Показано, что экстралайф, гипоксен, таурин и синтетический антиоксидант ионол по активности ингибирования флуоресценции располагаются в ряд: экстралайф > гипоксен > ионол > таурин и их действие зависит от концентрации. Расчетные показатели K_i флуоресценции показывают быструю и медленную фазы ингибирования окисления AR экстралайфом и гипоксеном. Быстрая фаза происходит в присутствии микродоз адаптогенов (0.05–3 мкг/мл) и связана с конкуренцией за H₂O₂, что согласуется с нашими предыдущими данными об активировании миток_{АТФ} такими дозами адаптогенов, связанными с расходом H₂O₂. Медленная фаза характерна высоким концентрациям адаптогенов и ионола и связана с конкуренцией за феноксил радикалы резорфуфина, образуемые при окислении AR. Полученные результаты дают основание использовать высокочувствительную модельную пероксидазную систему с AR для предварительной оценки веществ, обладающих свойствами активаторов миток_{АТФ} канала.

DOI: 10.7868/S0555109913040107

Митохондриальный АТФ-зависимый калиевый канал (миток_{АТФ}), имеющий белковую природу, осуществляет перенос ионов калия во внутреннюю мембрану митохондрий [1, 2]. В настоящее время установлено, что активация миток_{АТФ} способствует адаптации животных к гипоксии и защите сердца при ишемических повреждениях миокарда [3–6]. По данным ряда авторов, активация миток_{АТФ} каналов приводит к снижению продукции активных форм кислорода (АФК) в митохондриях, генерация которых существенно возрастает как при ишемии, так и при гипоксии [3, 7]. Предполагается, что открытие миток_{АТФ} каналов, активирует вход калия во внутреннюю мембрану митохондрий, поддерживая общий калиевый цикл, в результате стимулируется работа дыхательной цепи, восстанавливается нарушенный синтез АТФ, снижается накопление АФК и, в итоге, нормализуется гомеостаз клеток [3, 8].

Известен целый ряд фармацевтических препаратов, гормонов, редокс-агентов, которые могут активировать миток_{АТФ} каналы и являются потенциальными кардиопротекторами [9–11]. В нашей лаборатории систематически проводятся исследования по поиску природных и синтетических модуляторов митохондриальных энергозависимых калиевых каналов [6, 12, 13]. Перспективными в

этом направлении являются адаптогены – антигипоксанты, обладающие широким спектром физиологической активности. Ранее нами было показано, что адаптогены: гипоксен (полидигидрооксифенилентиосульфонат натрия, ГП), экстралайф (кверцитинсодержащий препарат, ЭЛФ) и таурин (β-аминоэтансульфоновая кислота) в микродозах активируют миток_{АТФ} [8, 14–16]. Активирование канала малыми концентрациями ЭЛФ и ГП (0.05–3.0 мкг/мл) сопровождается снижением скорости образования H₂O₂ в митохондриях, тогда как их повышенные концентрации (>5 мкг/мл) ингибируют активность миток_{АТФ} и увеличивают производство H₂O₂ [8, 15]. Дозозависимое действие ЭЛФ и ГП, связанное с уменьшением и усилением образования H₂O₂ в митохондриях, указывает на их участие в модулировании энергозависимых калиевых каналов. Одним из возможных механизмов модулирования миток_{АТФ} канала адаптогенами являются их антиоксидантные и прооксидантные свойства, зависящие от концентрации агентов, которые можно выявить в более простых пероксидазных модельных системах. Известно, что окисление веществ в пероксидазных системах осуществляется с участием H₂O₂ и свободных радикалов, указывающих на такие свойства [17–19].

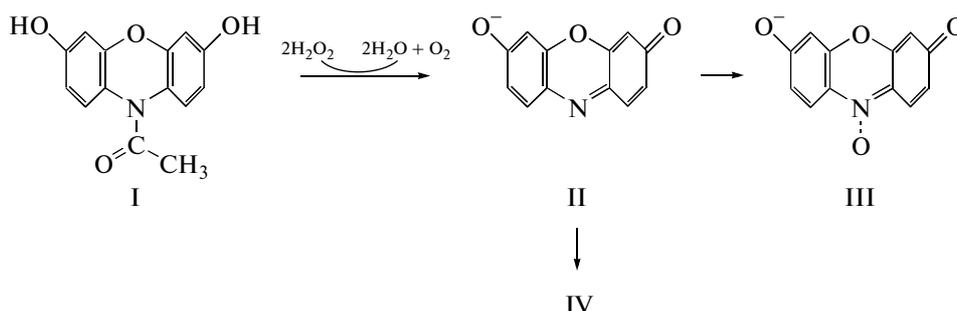


Рис. 1. Химические превращения AR в пероксидазной системе с пероксидом водорода [23].

I – Amplex Red (не флуоресцирует), II – резорурфин (флуоресцирует), III – резазурин (не флуоресцирует), IV – неизвестные продукты, полимеризованные из резорурфина, структура которых не известна.

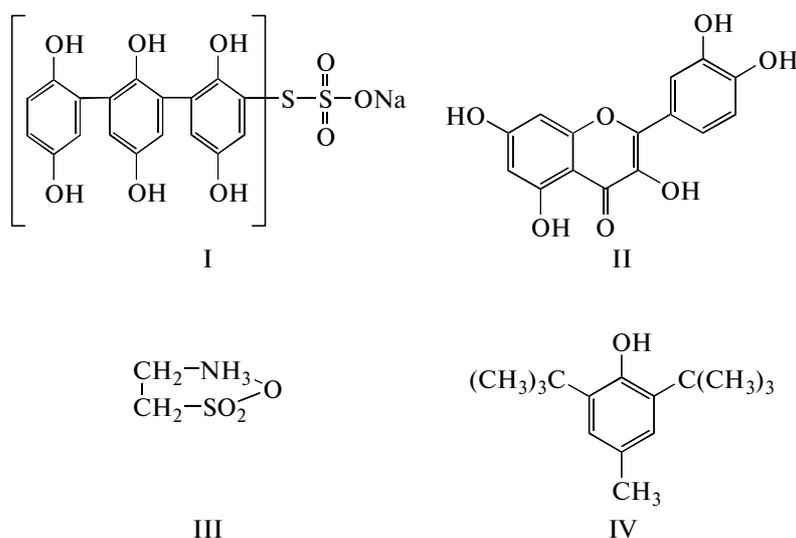


Рис. 2. Химическая структура адаптогенов – антиоксидантов.

I – гипоксен, II – кверцитин, III – таурин, IV – ионол.

В последнее время предпринята попытка применения высокочувствительной пероксидазной системы с флуорогенным индикатором Amplex Red (10-ацетил-3,7-дигидроксифеноксазин, **AR**) для выявления антиоксидантных свойств биологически активных веществ и лекарственных препаратов [20–21]. **AR** при окислении пероксидазой из корней хрена (**ПХ**, **КФ** 1.11.1.7) с участием H_2O_2 превращается в интенсивно флуоресцирующий продукт резорурфин (рис. 1) [20–23]. Промежуточными продуктами пероксидазного окисления **AR** являются феноксил радикалы резорурфина [20]. Альтернативные субстраты пероксидазы могут ингибировать окисление красителя, конкурентно расходуя H_2O_2 , либо окисляться с участием феноксил радикалов резорурфина [20, 21, 24]. Показано, что реакция с участием свободных радикалов зависит от химической природы и концентрации пероксидазных субстратов и происходит по мере накопления AR^{\cdot} [20].

Исследуемые нами адаптогены **ЭЛФ**, **ГП** и таурин, активирующие мито $\text{K}_{\text{АТФ}}$ канал, различаются по химической структуре (рис. 2). **ГП** и **ЭЛФ** (содержащий кверцитин) способны окисляться в пероксидазной системе с участием H_2O_2 , поскольку несут в себе химическую структуру фенольных соединений и сульфидов, обладающих повышенным сродством к пероксидазе [17–19]. Таурин менее активен в окислительно-восстановительных реакциях, так как обладает устойчивыми ковалентными связями [25], он был менее активен при активировании мито $\text{K}_{\text{АТФ}}$ [16], поэтому следовало ожидать меньшую окислительную активность его в пероксидазной системе, по сравнению с фенольными соединениями. Для уточнения антирадикальных свойств в модельной пероксидазной системе в данной работе мы использовали ионол (2,6-дитрет-бутил-4-метилфенол) – один из основных представителей группы синтетических антиоксидантов, нейтрализующих свободные радикалы [26,

27]. В предварительных опытах, проведенных нами, ионол так же, как ЭЛФ, ГП и таурин, усиливал энергозависимое набухание митохондрий, связанное с активацией митоK_{АТФ} канала, но только при повышенных концентрациях — 50–100 мкг/мл (данные не опубликованы). Сравнение окисления AR в присутствии ионола и адаптогенов с помощью модельной пероксидазной системы предоставляет возможность оценить антиоксидантный механизм их действия, связанный с расходом H₂O₂ и нейтрализацией свободных радикалов, и понять возможный механизм адаптогенного действия при гипоксии в качестве модуляторов митоK_{АТФ} каналов.

Цель работы — проведение сравнительного анализа окисления флуорогенного индикатора Amplex Red в присутствии адаптогенов: экстралайфа, гипоксена, таурина и ионола, нейтрализующего свободные радикалы, для выявления антиоксидантных свойств указанных адаптогенов в пероксидазной модельной системе связанных с расходом пероксида водорода и антирадикальным действием.

МЕТОДИКА

Использовали реактивы: АТФ, НЕРЕС, трис, сахароза, KН₂РO₄, ЭГТА, Amplex Red (“Molecular Probes”, США), ионол (2,6-ди-трет-бутил-4-метил-фенол) производства (“Sigma”, США), КСl — (“Merck”, Германия), пероксидаза хрена — “НИЦ РОСБИО” (Россия), пероксид водорода — “Фармацевтическая фабрика Санкт-Петербурга”, гипоксен, хроматографически очищенный, — “Корпорация Олифен” (Россия), Экстралайф (сухой экстракт курильского чая) и таурин — (Россия).

Окисление Amplex Red регистрировали по флуоресценции образующегося резорифина при возбуждении светом 563 нм (щель 2.5 нм) и эмиссии 587 нм (щель 2.5 нм) при термостатировании 36°C и постоянном перемешивании [22, 28]. Измерения проводили на флуориметре “Cary” (США). Кинетику флуоресценции регистрировали в течение 3 мин. Реакционная среда содержала (мМ): КСl — 120, KН₂РO₄ — 5, MgCl₂ — 2, НЕРЕС-КОН — 10, рН 7.3, ЭГТА-1, а также — 1 ед/мл пероксидазы хрена, 5–7 мкМ Amplex Red. Реакцию начинали добавлением 1–1.4 нмоль H₂O₂/2.4 мл. Количество расходуемого H₂O₂ рассчитывали по калибровочной кривой со стандартным раствором пероксида водорода, концентрацию которого определяли по поглощению E₂₄₀ = 43 М⁻¹ см⁻¹ [21].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В работах с флуорогенным индикатором Amplex Red многие авторы отмечают его высокую специфичность в пероксидазной системе к пероксиду водорода, указывая на зависимость от рН, время проведения реакции, соотношения

концентраций красителя, фермента и H₂O₂ [20–23, 28]. В данной работе применены условия реакции, использованные нами в предыдущих исследованиях, при определении скорости образования H₂O₂ в митохондриях [8, 15], в соответствии с оптимальными условиями других авторов [22–23, 28]. На рис. 3 (а, б, в) показаны результаты обработки метода окисления Amplex Red в модельной пероксидазной системе. Видно, что необходимым условием линейной зависимости флуоресценции является повышенное отношение концентрации красителя к пероксиду водорода, не менее чем в 2–10 раз (рис. 3а), но очень высокие концентрации — в 20 и 40 раз (11–22 мкМ AR и 0.5 мкМ H₂O₂) снижали начальную скорость окисления AR (рис. 3б).

Оптимальными условиями пероксидазного окисления Amplex Red, в наших опытах, были концентрации красителя — 5–7 мкМ и пероксидазы — 1 ед. активности на 1 мл, при которых аликвоты пероксида водорода — 1–1.4 нмоль, добавленные 2–3 раза в реакционную среду, показывали стабильный и пропорциональный уровень начальной скорости возрастания флуоресценции в течение 3–4 мин. Последующие добавки H₂O₂ снижали флуоресценцию (рис. 3в), что могло быть связано с окислением самого резорифина в пероксидазной системе свободными радикалами, образуемыми в пероксидазной системе с течением времени [20–23].

Далее, исследовали концентрационные влияния ЭЛФ, ГП, таурина и ионола на окисление AR в пероксидазной модельной системе. Диапазон используемых концентраций адаптогенов применен в соответствии с нашими ранними работами по влиянию этих биологически активных веществ на активность митоK_{АТФ} канала [8, 14–16]. На рис. 4 (а, б) показано снижение флуоресценции резорифина в присутствии ЭЛФ и ГП, указывающее на ингибирование окисления AR. Следует отметить, что заметное ингибирование адаптогенами происходило в области малых концентраций 0.5–3.0 мкг/мл. Наибольшую активность в ингибировании флуоресценции проявлял ЭЛФ. Полностью подавить окисление AR в пероксидазной системе адаптогенами не удавалось. При повышенных концентрациях ЭЛФ окисление красителя оставалось на уровне 25–40, а с ГП — до 50%.

Одной из причин ингибирующего эффекта ЭЛФ и ГП на окисление AR могла быть конкуренция за H₂O₂ при взаимодействии этих веществ с активным пероксидазным комплексом I (ПХ–H₂O₂). Доказательством этому служат опыты с ЭЛФ и ГП, показывающие, что добавление этих агентов в систему после того, как H₂O₂ была израсходована на окисление AR, уровень флуоресценции не изменялся в течение 4–10 мин даже при многократном увеличении их концентраций (рис. 4в, 4г). В то же время новая добавка H₂O₂

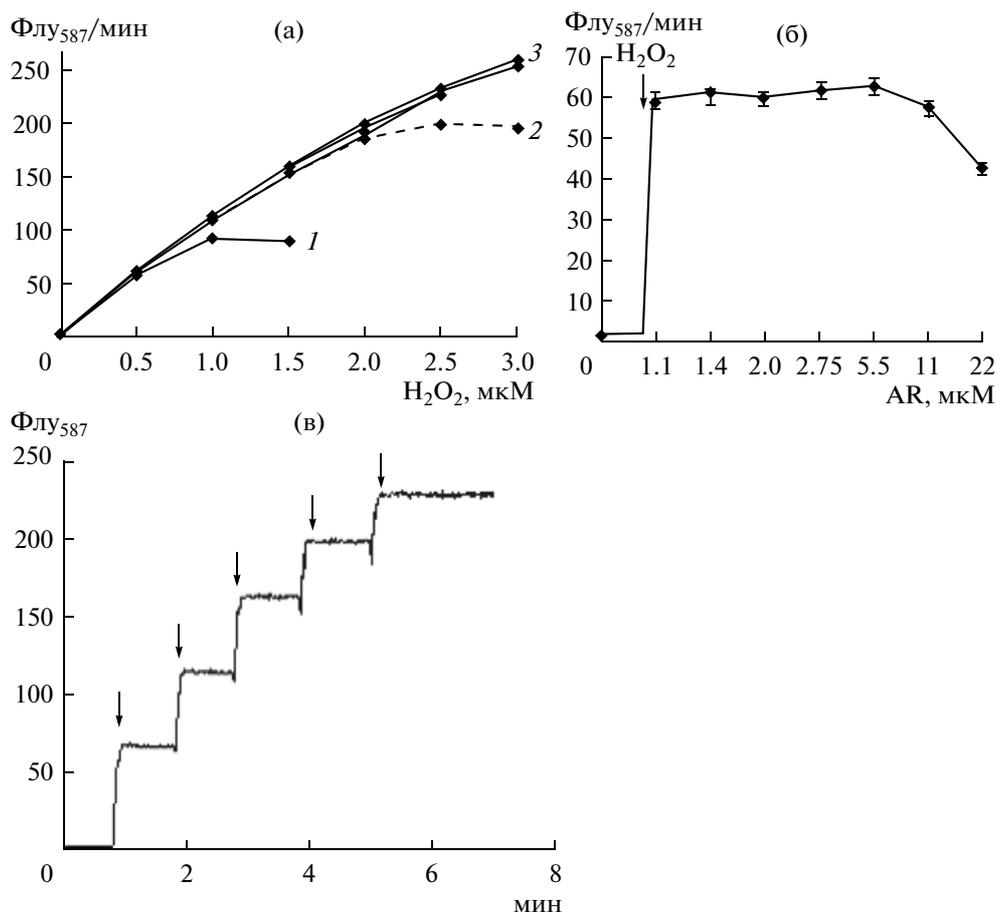


Рис. 3. Окисление AR в пероксидазной системе.

а – зависимость от концентрации H₂O₂ при разных концентрациях AR, мкМ (1 – 1, 2 – 2.75, 3 – 5.5, 7, 11); б – зависимость от концентрации AR при одной и той же добавке аликвоты H₂O₂ (1.4 нмоль/2.4 мл); в – изменение концентрации от H₂O₂ во времени при концентрации AR – 5 мкМ, стрелки – внесение H₂O₂ (1.4 нмоль).

увеличивала флуоресценцию, но на меньший уровень. Это говорит о том, что ГП и ЭЛФ, являясь субстратами ПХ, при своем окислении, с одной стороны, расходуют H₂O₂, выступая в роли конкурентных ингибиторов, а с другой, возможно, взаимодействуют с образующимися радикалами в системе, уменьшая концентрацию окисленного красителя. Оба типа реакций в пероксидазных системах с AR в присутствии разных субстратов пероксидазы убедительно доказаны в работах [20–21]. Методом ЭПР показано, что окисление альтернативных субстратов пероксидазы, добавленных в среду с феноксил радикалами резорфина, характеризуются определенными периодами индукции, так как требуют накопления окисленного AR (резорфин) [20].

Для выяснения характера свободнорадикального взаимодействия ЭЛФ и ГП в пероксидазной системе при окислении AR мы провели анализ кинетических параметров их ингибирующего действия. На рис. 5 представлены зависимости обратной начальной скорости флуоресценции от возрастающей концентрации ЭЛФ и ГП в коор-

динатах Диксона [29]. Как видим, линейные зависимости характеризуются изломом, отражающим разнородное связывание адаптогенов со свободными радикалами в пероксидазной системе [18–19, 27]. При концентрациях ЭЛФ – 0.005–1 и 1–8, ГП – 0.005–3 и 3–8 мкг/мл связывание субстратов-ингибиторов, до и после излома, характеризуются разной скоростью реакции ингибирования. При малых концентрациях оба ингибитора взаимодействуют конкурентно с красителем, так как кривые до излома пересекаются на оси ординат в одной точке. Из этого следует, что они взаимодействуют с комплексом ПХ–H₂O₂, что отражает конкуренцию за H₂O₂. С возрастанием концентраций адаптогенов кривые после излома пересекают ось ординат в разных точках. Такой тип кривой соответствует неконкурентному ингибированию [19, 29], связанному с взаимодействием свободных радикалов субстратов пероксидазы, образующихся с течением времени в пероксидазной системе [19–21].

В таблице представлены кинетические параметры ингибирования окисления AR пероксидом водорода с участием ГП и ЭЛФ. Так, для ГП до из-

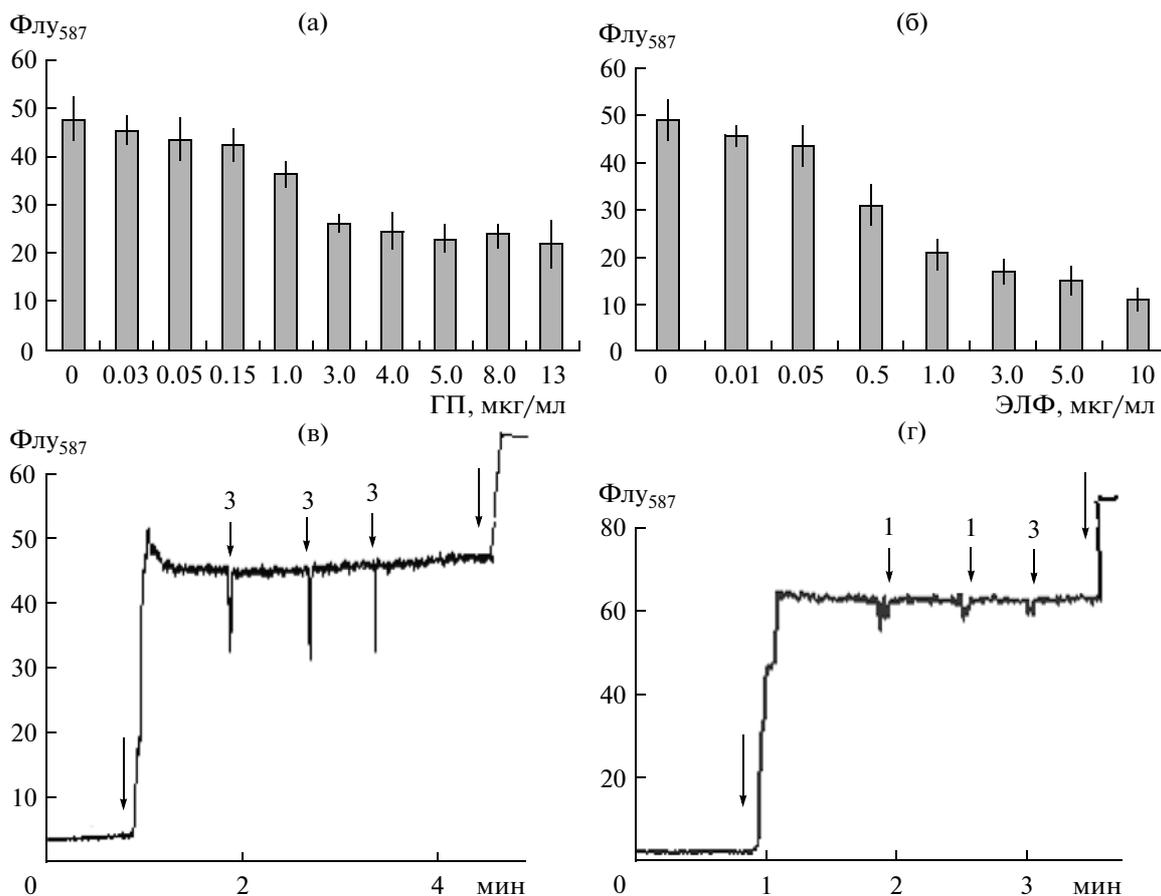


Рис. 4. Концентрационные зависимости влияния ГП (а) и ЭЛФ (б) на флуоресценцию окисленного АР (резорурфин) в пероксидазной системе (реакцию начинали добавлением H_2O_2 , 1,4 нмоль), в – ГП, г – ЭЛФ. Цифры над стрелками показывают концентрацию (мкг) добавленного адаптогена через 1–2 мин после расходования H_2O_2 , стрелки – внесение H_2O_2 . Даны средние значения опытов ($n = 4$) с каждым адаптогеном.

лома и после излома $K_i = 0.31$ и 15.16; для ЭЛФ – 0.099 и 1.39 соответственно. Следовательно, K_i для ГП по двум центрам связывания с радикалами в пероксидазной системе с АР в 3 и 11 раз был выше по сравнению с ЭЛФ. Таким образом, показатели K_i , до и после излома кривых, подтверждают большую эффективность ингибирования окисления АР ЭЛФ, по сравнению с ГП. Важно отметить, что процесс ингибирования окисления АР адаптогенами происходит в два этапа – быстрая и медленная фазы. Первая происходит при малых концентрациях адаптогенов и связана с конкуренцией за активный комплекс $ПХ-H_2O_2$, то есть за H_2O_2 . Вторая, медленная фаза, происходит при повышенных концентрациях ингибиторов и отражает конкуренцию за феноксил радикалы резорурфина.

Действие таурина и ионола на пероксидазное окисление АР отличалось по сравнению с ЭЛФ и ГП. Таурин, добавленный в инкубационную среду до и после расхода пероксида, практически не влиял на окисление АР (рис. 6а, 6в). Эти результаты свидетельствовали в пользу того, что таурин не окислялся пероксидазным комплексом I, по

крайней мере, не конкурировал с АР за H_2O_2 в течение первых минут реакции. Однако новые последующие добавки H_2O_2 в систему на фоне высоких концентраций таурина приводили к уменьшению возрастания флуоресценции (рис. 6в), так же, как в случае с ЭЛФ и ГП. Эти результаты показывают, что высокие концентрации таурина с течением времени тоже способствуют уменьше-

Количественные параметры ингибирования окисления АР (5 мкМ) пероксидом водорода в пероксидазной системе в присутствии ГП и ЭЛФ

| Условие | [InH], мкг/мл | K_i , мкг/мл |
|---------------|---------------|----------------|
| ГП до излома | 3.4 | 0.31 |
| после излома | 153.0 | 15.6 |
| ЭЛФ до излома | 1.0 | 0.099 |
| после излома | 14.0 | 1.39 |

Примечание: K_i , вычислены по уравнению: $[InH] = K_i ([S]/K_M + 1)$, где [InH] – отрезок, отсекаемый на оси абсцисс и характеризующий эффективную концентрацию ингибитора [19, 29], [S] = [АР], K_M – константа Михаэлиса в отсутствие ингибитора.

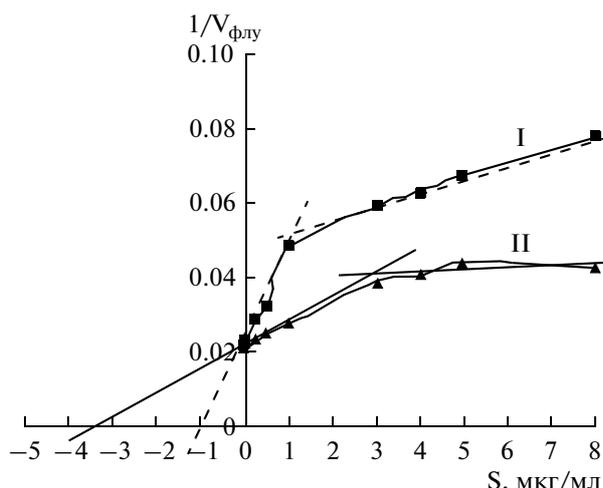


Рис. 5. Зависимость обратной начальной скорости флуоресценции резорурфина (окисление AR) от концентрации ЭЛФ (I) и ГП (II) в пероксидазной системе.

нию образованного резорурфина в пероксидазной системе, но слабее, по сравнению с фенольными структурами.

Известный синтетический антиоксидант — ионол, в отличие от ЭЛФ и ГП, ингибировал флуоресценцию AR особенно при повышенных концентрациях — 10–100 мкг на мл. Этот эффект наблюдали как при одновременном внесении ионола в реакционную среду с AR (когда реакцию начинали H_2O_2), так и при добавлении его в пероксидазную систему после расхода пероксида (рис. 6б, 6г). Новое добавление H_2O_2 в систему на фоне высоких концентраций ионола усиливало флуоресценцию на меньший уровень, чем в отсутствие ионола, что сходно по действию с повышенными концентрациями ЭЛФ, ГП и таурина.

Сравнение действия ионола и таурина с ЭЛФ и ГП указывает на разный механизм их окисления в пероксидазной системе, что отражается на скорости реакции ингибирования окисления AR. Как отмечалось выше, адаптогены ЭЛФ и ГП интенсивно используют H_2O_2 для своего окисления, конкурентно ингибируя окисление AR при малых концентрациях (0.05–3 мкг/мл). Этот путь осуществляется запуском системы пероксидом водорода в начальные минуты, затем происходит медленная фаза окисления образуемыми радикалами резорурфина при повышенных концентрациях адаптогенов. Расчетные показатели констант ингибирования подтверждают такой двухступенчатый путь (быстрая и медленная фазы) ингибирования окисления AR экстралайфом и гипоксеном, обладающими повышенным сродством к пероксидазе.

Что касается таурина и ионола, то для них, видимо, характерна медленная фаза окисления, происходящая при повышенных концентрациях агентов, связанная со свободными радика-

лами, которые появляются в системе с некоторым лаг-периодом [15, 19–20]. Основанием этому служит меньшая реакционная способность этих веществ по сравнению с активными фенольными соединениями, обладающими высоким окислительно-восстановительным потенциалом [30, 31]. Так, антиоксидант ионол является пространственнозатрудненным фенолом, в его структуре имеется лишь одна активная гидроксильная группа, остальные замещены метильными группировками (см. рис. 2). Ионол взаимодействует преимущественно со свободными радикалами, прерывая цепные радикальные реакции [26, 27].

Таурин также обладает устойчивыми ковалентными связями, мешающими ему проявлять окислительно-восстановительные свойства [30]. Этот природный метаболит приобретает реакционную способность только при присоединении к аминогруппе других химически активных веществ и группировок, которые могут быстро реагировать с тиольными и тиоэфирными группами атомов, а также с дисульфидными мостиками в молекулярных мишенях [25, 32]. Возможно, повышение реакционной способности молекул таурина происходит при взаимодействии с митохондриями, более сложными системами, чем пероксидазные, поэтому в митохондриях мы наблюдали незначительные эффекты активирования мито K_{ATP} канала микромолярными концентрациями таурина [16].

Исходя из полученных результатов, отметим, что пероксидазная система с высокочувствительным флуорогенным индикатором AR неоднозначно реагирует на добавление ЭЛФ, ГП, таурина и ионола. По активности ингибирования окисления AR в пероксидазной системе исследуемыми агентами их можно расположить в ряд: ЭЛФ > ГП > ионол > таурин и их действие в сильной степени зависит от концентрации. Ориентируясь на предыдущие наши работы, можно заметить прямую корреляцию действия малых концентраций (0.05–3 мкг/мл) ЭЛФ и ГП на активность мито K_{ATP} канала [8, 15–16] и ингибирование окисления AR в пероксидазной системе, связанного с конкуренцией за H_2O_2 с преимуществом ЭЛФ > ГП. Таурин и ионол более инертны при окислении красителя, их действие связано с высокими концентрациями (15–50–100 мкг/мл) и проявляется медленнее по времени, что указывает на взаимодействие с феноксил радикалами резорурфина, образуемыми в пероксидазной системе.

Таким образом, по скорости ингибирования окисления AR в пероксидазной системе при определенных концентрациях испытуемых агентов можно судить об их антиоксидантных свойствах как по пероксидазному типу — быстрая фаза, так и по свободнорадикальному — медленная фаза. Быстрая фаза связана с расходом H_2O_2 . Конкурентное ингибирование окисления красителя при малых концентрациях исследуемых

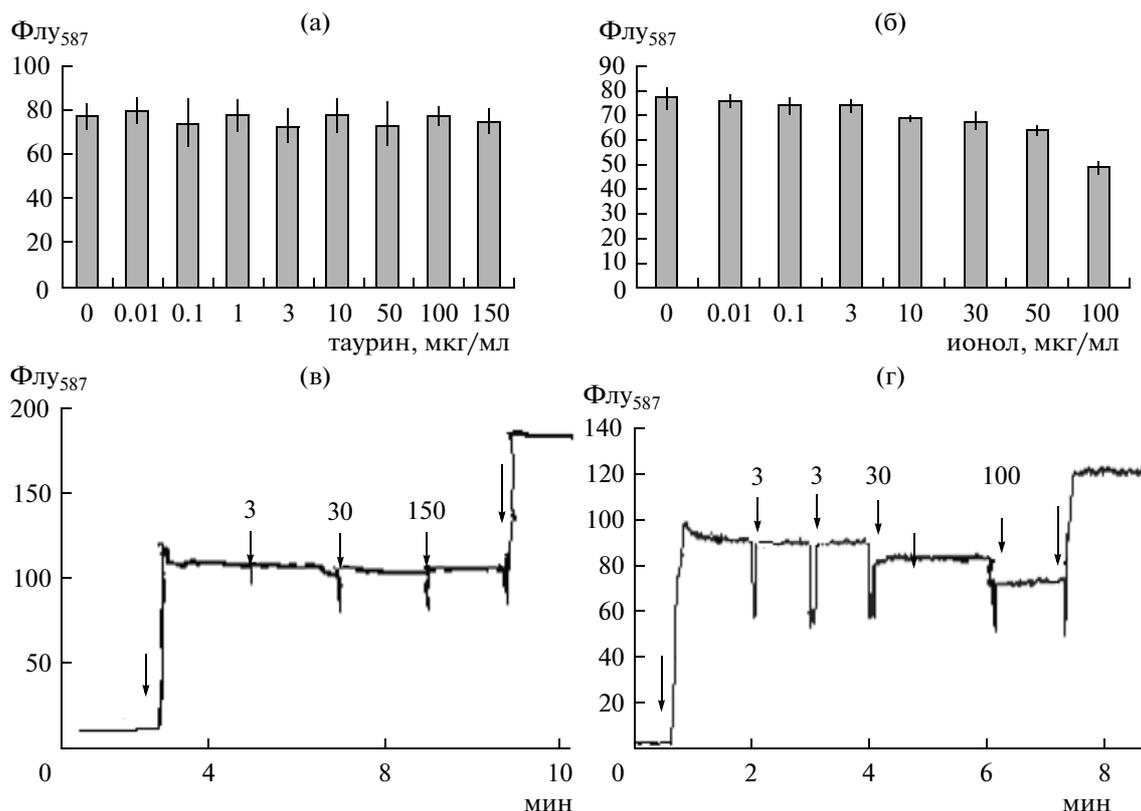


Рис. 6. Концентрационные зависимости влияния таурина (а) и инозола (б) на флуоресценцию окисленного АР (резорурфина) в пероксидазной системе (реакцию начинали добавлением H_2O_2 , 1,4 нмоль).

(в) — таурин, (г) — инозол. Цифры над стрелками показывают концентрацию (мкг) добавленного адаптогена через 1–2 мин после расходования H_2O_2 , стрелки — внесение H_2O_2 . Даны средние значения опытов ($n = 4$) с каждым адаптогеном.

агентов за H_2O_2 дает основание предположить активирование этими веществами мито $\text{K}_{\text{АТФ}}$ канала, принимающего участие в регулировании образования АФК в митохондриях.

Использование активаторов мито $\text{K}_{\text{АТФ}}$ канала является принципиально новым подходом к предупреждению и лечению инфаркта миокарда. Превентивное и лечебное антиишемическое действие исследуемых препаратов — активаторов мито $\text{K}_{\text{АТФ}}$, связанное со снижением скорости образования АФК, накопление которых является патогенным фактором при многих сердечных заболеваниях, весьма актуально. Роль их в коррекции патологии трудно переоценить, поскольку сердечные заболевания являются одной из основных причин смертности в технически развитых странах. Однако применение больших доз лечебных препаратов часто приводит к побочным отрицательным эффектам. На примере исследуемых нами адаптогенов, ингибирующих окисление АР при повышенных дозах (15–100 мкг/мл) в модельной пероксидазной системе, можно видеть, что их действие связано с свободнорадикальным типом окисления. Несмотря на положительное антиоксидантное действие адаптогенов при таких концентрациях, они, безусловно, проигрывают с точки зрения применения в качестве

активаторов мито $\text{K}_{\text{АТФ}}$ канала, поскольку реакция их замедлена и опасна проявлением прооксидантного действия.

Полученные в работе данные позволяют сделать вывод о практическом использовании модельной пероксидазной системы с АР для предварительной оценки концентрационного действия веществ — адаптогенов, обладающих свойствами активаторов мито $\text{K}_{\text{АТФ}}$ канала. Метод высокочувствительный, прост в выполнении, позволяет провести тестирование большого числа изучаемых биологически активных веществ, минуя трудоемкую процедуру выделения митохондрий.

Работа выполнена при финансовой поддержке АВЦП “Развитие научного потенциала высшей школы (2012–2014)” № 4.3010.2011.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Inoue N., Nagase H., Kishi K., Higuti T. // Nature. 1991. V. 352. № 6332. P. 244–247.
2. Paucek P., Mironova G.D., Mandi F., Beavis A., Woldegregoris G. // J. Biochem. 1992. V. 267. № 36. P. 26062–26069.
3. Garlid K.D., Dos Santos P., Xie Z., Paucek P. // Biochem. Biophys. Acta. 2003. V. 1606. № 1–3. P. 1–21.

4. Vanden Hoek T.L., Becker L.B., Shao Z., Li C., Schumacker P.T. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. № 29. P. 18092–18098.
5. Grover G.J., Garlid K.D. // *J. Mol. Cell Cardiol.* 2000. V. 32. № 4. P. 677–695.
6. Krylova I.B., Kachaeva E.V., Rodionova O.M., Negoda A.E., Evdokimova N.R., Balina M.I., Sapronov N.S., Mironova G.D. // *Exp. Gerontology.* 2006. V. 41. № 7. P. 697–703.
7. Ferranti R., da Silva M.M., Kowaltowski A.J. // *FEBS Lett.* 2003. V. 536. № 1–3. P. 51–55.
8. Mironova G.D., Shigaeva M.I., Gritsenko E.N., Murzaeva S.V., Gorbacheva O.S., Germanova E.L., Lukyanova L.D. // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2010. V. 42. № 6. P. 492–503.
9. Liu Y., Sato T., O'Rourke B., Marban E. // *Circulation.* 1998. V. 97. № 24. P. 2463–2469.
10. Sato T., Sasaki N., O'Rourke B., Marban E. // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2000. V. 35. № 2. P. 514–518.
11. Tsai Ch., Su Sh., Chou T., Lee T. // *J. Pharmacol. and Experim. Therap.* 2002. V. 301. № 1. P. 234–440.
12. Grigoriev S.M., Skarga Y.Y., Mironova G.D., Marinov B.S. // *Biochem. Biophys. Acta.* 1999. V. 1410. № 1. P. 91–96.
13. Mironova G.D., Negoda A.E., Marinov B.S., Paucek P., Costa A.D.T., Grigoriev S.M., Skarga Y.Y., Garlid K.D. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 31. P. 32562–32568.
14. Миронова Г.Д., Шигаева М.И., Белослудцева Н.В., Гриценко Е.Н., Белослудцев К.Н., Германова Э.Л., Лукьянова Л.Д. // *Бюл. экспер. биол.* 2008. Т. 146. № 8. С. 195–199.
15. Мурзаева С.В., Абрамова М.Б., Попова И.И., Гриценко Е.Н., Миронова Г.Д., Лежнев Э.И. // *Биофизика.* 2010. Т. 55. № 5. С. 814–822.
16. Мурзаева С.В., Белослудцева Н.В., Гавровская Л., Миронова Г.Д. // *Биофизика.* 2008. Т. 53. № 6. С. 962–966.
17. Метелица Д.И., Карасева Е.И. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2007. Т. 43. № 5. С. 537–564.
18. Еремин А.Н., Литвинчук А.В., Метелица Д.И. // *Биохимия.* 1996. Т. 61. № 4. С. 664–679.
19. Метелица Д.И., Еремин А.Н., Свиридов Д.О., Камышиников В.С. // *Биохимия.* 2001. Т. 66. № 5. С. 628–639.
20. Reszka K.J., Wagner B.A., Burns C.B., Britigan B.E. // *Anal. Biochem.* 2005. V. 342. № 2. P. 327–337.
21. Rodrigues J.V., Gomes C.M. // *Free Radical Biology and Medicine.* 2010. V. 49. № 1. P. 61–66.
22. Zhou M., Diwu Z., Panchuk-Voloshina N., Haugland R. // *Anal. Biochem.* 1997. V. 253. № 2. P. 162–168.
23. Towne V., Will M., Oswald B., Zhao Q. // *Anal. Biochem.* 2004. V. 334. № 2. P. 290–296.
24. Gorris H.H., Walt D.R. // *J. Amer. Chem. Soc.* 2009. V. 131. № 17. P. 6277–6282.
25. Рашупкин Д.И., Мурина М.А., Кравченко Н.Н., Сергиенко В.И. // *Биофизика.* 2007. Т. 52. № 3. С. 527–533.
26. Бурлакова Е.Б., Хохлов А.П. // *Биологические мембраны.* 1985. Т. 2. № 6. С. 557–565.
27. Миненкова Е.А., Барсель В.А., Пичугин В.В., Гагарина А.Б., Евтеева Н.М., Парамонова М.Ю., Майкова Г.Г. // *Изв. РАН. Сер. биол.* 1996. № 2. С. 147–152.
28. Votyakova T.V., Reynolds I.J. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2004. V. 431. № 1. P. 138–144.
29. Келети Т. *Основы ферментативной кинетики.* М.: Мир, 1990. С. 183–188.
30. Лукьянова Л.Д., Германова Э.Л., Лыско А.И. // *Вестник РАН.* 2007. № 2. С. 55–62.
31. Смирнов В.С., Кузьмич М.К. // *Гипоксен.* СПб. М.: ФАРМиндекс, 2001. 104 с.
32. Рашупкин Д.И., Мурина М.А. // *Биофизика.* 2011. Т. 56. № 5. С. 945–954.

Determination of the Antioxidant Properties of Activators of Mitochondrial ATP-Dependent Potassium Channels with the Amplex Red Fluorescent Indicator

S. V. Murzaeva^a, S. P. Belova^b, and G. D. Mironova^b

^a *Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

^b *Pushchino State University, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

e-mail: svmurzaeva@rambler.ru

Received December 19, 2012

Abstract—The effect of adaptogens—antihypoxants that participate in the activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels (mitoK_{ATP}) at the oxidation of the Amplex Red (AR) fluorescent indicator in a peroxidase system was tested. It was shown that Extralife, Hypoxen, taurine, and synthetic antioxidant ionol can be arranged in the following row, according to the fluorescence inhibition activity: Extralife > Hypoxen > ionol > taurine; their effect was shown to be concentration-dependent. The calculated K_i value of fluorescence indicators demonstrate fast and slow phases of inhibition of the AR oxidation by Extralife and Hypoxen. The fast phase occurs in the presence of microdoses (0.05–3 μg/mL) of adaptogens and is related to the competition for H₂O₂, which is in agreement with our previous data on the mitoK_{ATP} activation by doses of adaptogens related to the H₂O₂ consumption. The slow phase is characteristic of high adaptogen and ionol concentrations and is related to the competition for phenoxyl radicals of resorufin formed during AR oxidation. The obtained results allow one to suggest the application of a highly sensitive model peroxidase system with AR for the preliminary testing of compounds activating mitoK_{ATP} channels.