

СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ АТФ-ЗАВИСИМОГО КАЛИЕВОГО КАНАЛА В МИТОХОНДРИЯХ ПО ВЛИЯНИЮ НА НИХ АТФ

© 2019 г. Н.В. Хмиль* ***, А.А. Мосенцов* **, М.И. Шигаева*, Г.Д. Миронова* **

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

**Пуцинский государственный естественно-научный институт,
142290, Пушкино Московской области, просп. Науки, 3

***Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, 61077, Харьков, пл. Свободы, 4, Украина

*E-mail: nat-niig@yandex.ru

Поступила в редакцию 04.07.2019 г.

После доработки 04.07.2019 г.

Принята к публикации 12.07.2019 г.

Проведено сравнение двух методов, используемых для изучения работы функционирования митохондриального АТФ-чувствительного калиевого канала, играющего важную роль в физиологии клетки и в особенности в кардио- и нейропротекции. Показано, что спектрофотометрический метод, наиболее часто используемый для изучения этого канала и влияния его модуляторов, имеет ряд ограничений и дает в основном качественную оценку. Предложена модификация этого метода, благодаря которой получаемые кривые изменения оптической плотности имеют линейный характер, что позволяет количественно оценить изменение оптической плотности и, как следствие, более точно определить влияние различных модуляторов. Определена концентрация полумаксимального ингибирования для АТФ ($IC_{50_АТФ}$), скорости калиевого транспорта, регистрируемого двумя различными методами в митохондриях печени крыс. Значение $IC_{50_АТФ}$ составило 23 мкМ в случае прямого измерения 2,4-динитрофенол-индуцированного выхода калия с помощью калий-селективного микроэлектрода и 400 мкМ – при использовании спектрофотометрического метода. Полученные данные позволяют говорить о том, что регистрация 2,4-динитрофенол-индуцированного выхода калия может быть более эффективным методом оценки АТФ-зависимого транспорта ионов калия в митохондриях.

Ключевые слова: ДНФ-индуцированный транспорт калия, митохондрии, набухание митохондрий, митохондриальный АТФ-зависимый калиевый канал, кардиопротекция.

DOI: 10.1134/S0006302919050132

Изучение транспорта ионов калия, как основного катиона цитозоля и митохондриального матрикса, имеет большое функциональное значение. Особое внимание сейчас уделяется изучению работы митохондриального АТФ-чувствительного калиевого канала (митокАТФ), играющего важную роль в физиологии клетки и особенно в кардио- и нейропротекции [1,2]. Установлено, что митокАТФ-канал участвует в развитии апоптоза, в защите сердца, мозга и других тканей от ишемии [2,4]. В последнее время доказано, что митокАТФ-канал участвует в коррекции нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Паркинсона и болезнь Альцгеймера [3,5].

Сокращения: митокАТФ – митохондриальный АТФ-чувствительный калиевый канал, ДНФ – 2,4-динитрофенол.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что активация митокАТФ-канала играет важную роль в несократительном термогенезе при выходе животных из состояния зимней спячки [6], участвует в защите сердца от ишемии [7–9], влияет на развитие воспалительного процесса [10], защищает ткани от развития гипоксии при повышенных физических нагрузках [11]. В последнее время появилось большое количество публикаций, направленных на поиск активаторов этого канала [12–15].

Спектрофотометрическая оценка калий- и АТФ-зависимого набухания митохондрий является самым распространенным методом, используемым для оценки работы митохондриального КАТФ-канала и влияния на нее модуляторов [16]. Однако из-за нелинейного характера кривых на-

бухания митохондрий, регистрируемых этим методом, количественная оценка входа калия затруднена, поэтому получаемые результаты носят часто лишь качественный характер [17]. Кроме того, этот метод требует использования гипотонической среды инкубации митохондрий.

В настоящей работе показано, что метод набухания может успешно использоваться и для количественной оценки, благодаря изменению порядка проведения эксперимента. Кроме того, ранее в нашей лаборатории был разработан принципиально новый метод оценки АТФ-зависимого транспорта калия в митохондриях, который оценивался с помощью K^+ -селективного электрода по выходу этого катиона в присутствии разбавителя окислительного форфорилования 2,4-динитрофенола (ДНФ) [19]. В настоящей работе проведено сравнение эффективности использования упомянутых выше двух методов (набухания и ДНФ-индуцированного транспорта калия) для изучения работы мито K_{ATP} -канала, а также характера ингибирующего влияния физиологических концентраций АТФ на транспорт этого катиона в митохондриях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение митохондрий. Митохондрии печени крыс выделяли из гомогената печени 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). Концентрацию белка определяли по методу Лоури [18], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

Вход ионов калия в митохондрии определяли по скорости набухания митохондрий в гипотонической среде, содержащей 50 мМ KCl, 5 мМ NaH_2PO_4 , 0,1 мМ ЭГТА, 5 мкМ цитохрома *c*, 10 мМ НЕРЕС (рН 7,4). Кинетику набухания регистрировали на спектрофотометре UV-2450 (Shimadzu, Япония) по изменению оптической плотности суспензии митохондрий при длине волны 520 нм при постоянном перемешивании и термостатировании при 26°C. Набухание митохондрий инициировали двумя способами. В первом случае применяли общепринятый метод, при котором реакцию запускали добавлением митохондрий в кювету, содержащую среду инкубации и субстраты дыхания (5 мМ сукцината, 2 мкМ ротенона). Во втором случае реакцию запускали добавлением 5 мМ сукцината в ту же среду инкубации, содержащую митохондрии. Концентрация митохондриального белка в ячейке составляла 0,2–0,3 мг/мл.

ДНФ-индуцированный выход K^+ из митохондрий, отражающий работу мито K_{ATP} -канала в обратном направлении, изучали с помощью K^+ -селективного валиномицинового электрода («НикоАналит», Россия), не регистрирующего другие ионы, включая натрий, и установки «Record4» (Россия) в ячейке объемом 1 мл при 26°C и постоянном перемешивании [19]. Этот метод был разработан нами ранее, причем мы учитывали, что мито K_{ATP} -канал, встроенный в бислойную липидную мембрану, может работать в двух направлениях [19]. Измерения проводили в изотонической среде, содержащей 180 мМ сахарозы, 70 мМ маннитола, 5 мМ Na_2HPO_4 , 10 мМ трис-HCl (рН 7,4). Концентрация митохондриального белка в ячейке составляла 0,5–1,0 мг/мл. Выход K^+ из митохондрий индуцировали добавлением в среду инкубации 50 мкМ 2,4-динитрофенола, который способствовал снижению положительного потенциала на мембране митохондрий, создаваемого вышедшим ионом, что облегчало дальнейший выход K^+ . Скорость выхода ионов калия из митохондрий выражали в $nM/min^{-1} \cdot mg \text{ белка}^{-1}$.

Использованные реактивы. В работе использовали: сахарозу, ЭДТА, ЭГТА, трис, НЕРЕС, АТФ, ADP, ДНФ, олигомицин, цитохром *c* (Sigma, США). Остальные реактивы были отечественного производства квалификации ос.ч. и х.ч.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

АТФ-зависимый калиевый канал является физиологически важным каналом, отвечающим за сохранение структуры митохондрий, а также участвующим в адаптации организма к гипоксии. В связи с этим в настоящее время широко изучается активность работы этого канала и возможность его модуляции при помощи природных и фармакологических модуляторов с целью стимулирования процессов адаптации клетки к воздействию различных повреждающих факторов. Основным и общепринятым методом, который используется для изучения активности этого канала, является метод динамической спектрофотометрии, базирующийся на изменении светорассеяния суспензии митохондрий в результате их набухания в гипотонической среде [17,20,21]. Обычно активность канала определяется изменением оптической плотности при добавлении митохондрий в кювету, содержащую среду и субстраты дыхания. Получаемые спектры поглощения имеют нелинейный характер и используются в основном для качественного анализа (рис. 1а). Это затрудняет сравнение полученных результатов, особенно в случае изучения влияния различных модуляторов канала, а также измерения ак-

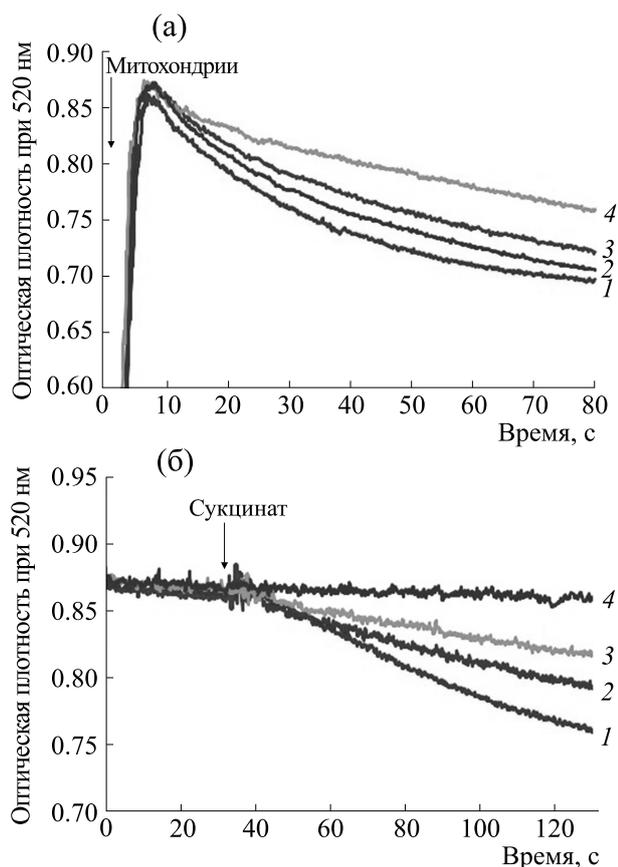


Рис. 1. Типичные кривые изменения оптической плотности суспензии митохондрий печени крысы в зависимости от времени в контроле и после добавления разных концентраций АТФ. (а) – Измерения проводили общепринятым методом (реакция запускается добавлением митохондрий): 1 – контроль, 2 – 0,25 мМ АТФ, 3 – 0,5 мМ АТФ, 4 – 1 мМ АТФ. (б) – Измерения проводили модифицированным в нашей лаборатории методом (реакция запускается добавлением субстрата): 1 – контроль, 2 – 0,5 мМ АТФ, 3 – 1 мМ АТФ, 4 – без добавления субстрата.

тивности мито K_{ATP} -канала при различных физиологических и патологических состояниях.

Нами была предложена модификация этого метода, заключающаяся в том, что изменение оптической плотности определяется после добавления субстрата дыхания в кювету, содержащую среду и митохондрии. В данном случае кривые изменения оптической плотности, особенно их начальная часть, имеют линейный характер (рис. 1б), что позволяет количественно оценить изменение оптической плотности и, как следствие, более точно определить влияние различных модуляторов на работу канала.

На рис. 2 представлены данные по определению параметров АТФ-зависимого выхода ионов калия с помощью K^+ -селективного электрода.

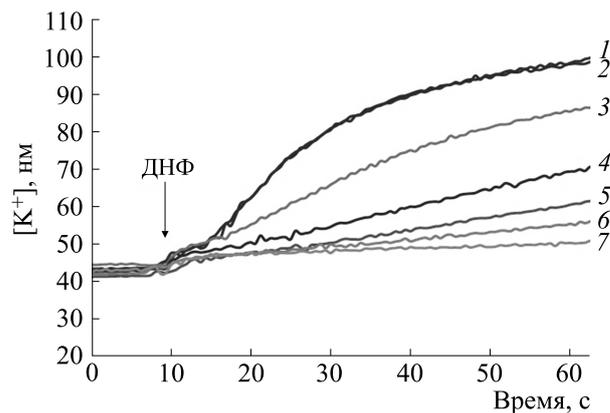


Рис. 2. Пример полученных потенциометрическим методом типовых кривых кинетики выхода ионов калия в среду инкубации, не содержащую калий. Стрелкой отмечен момент добавления ДНФ (50 мкМ). Обозначение кривых: 1 – контроль (без добавок); 2–7 – в среде инкубации присутствует 2,5, 5,0, 50, 100, 200 и 500 мкМ АТФ соответственно.

Этот выход осуществляется по градиенту ионов калия, так как в митохондриях находится 140 мМ КСl, а в среде инкубации ионы калия отсутствуют. Ранее было установлено, что канал может работать в обоих направлениях [22], калий начинает выходить через митохондриальную мембрану по своему градиенту, создавая снаружи на мембране положительный потенциал. Этот потенциал сбрасывается добавлением разбавителя окислительного фосфорилирования, что облегчает дальнейший выход иона из митохондрий. Калий выходит до тех пор, пока не уравнивается градиент его концентрации между митохондриями и средой, что видно по добавлению тритона X-100. В нашем случае мы стимулируем выход ионов калия добавлением в среду, не содержащую этот ион, разбавителя окислительного фосфорилирования 2,4-динитрофенола (рис. 2). Однако другие разбавители окислительного фосфорилирования также стимулируют выход калия.

Используя представленные выше методы регистрации транспорта калия в митохондриях, мы провели исследования по влиянию физиологических концентраций АТФ на этот транспорт. Сравнение полученных при этом данных показало, что более эффективным является метод ДНФ-индуцированного выхода калия, так как АТФ при его использовании практически полностью ингибирует транспорт калия, в то время как спектрофотометрический метод дает в среднем 50–60% ингибирования (рис. 3). Из этого следует, что последний метод, наряду с АТФ-зависимым транс-

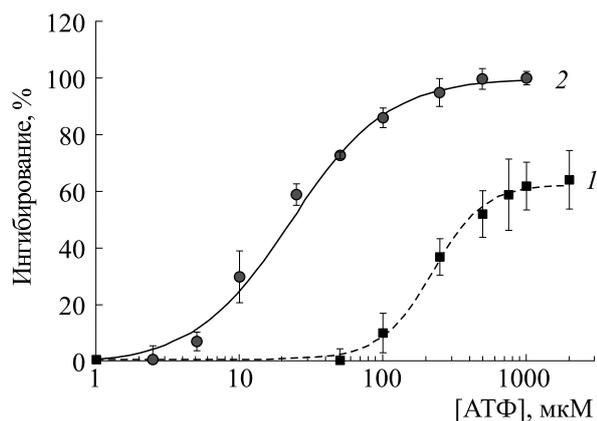


Рис. 3. Зависимость изменения оптической плотности суспензии митохондрий печени крысы (кривая 1) и скорости ДНФ-индуцированного выхода ионов калия (кривая 2) от концентрации АТФ. Представлены средние значения семи экспериментов с двумя-тремя повторами в каждом \pm стандартная ошибка.

портом калия, регистрирует и независимый от АТФ транспорт этого иона.

Кроме того, расчет показал, что концентрация полумаксимального ингибирования (IC_{50}), как показатель эффективности работы ингибитора, в нашем случае АТФ, составила ~ 23 мкМ АТФ для ДНФ-индуцированного выхода калия, в то время для спектрофотометрического метода она была равна 400 мМ АТФ. Следует подчеркнуть, что данные, полученные с использованием калий-селективного электрода, согласуются с результатами, полученными на встроенном в липосомы митохондриальном АТФ-чувствительном калиевом канале [23].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные позволяют говорить о потенциальной возможности и целесообразности более широкого применения ДНФ-индуцированного выхода калия для изучения как скорости транспорта ионов калия в митохондриях, так и количества калия в них. Кроме этого, модифицированный в нашей лаборатории спектрофотометрический метод, в котором реакция запускается не добавлением митохондрий, а добавлением субстрата, также может эффективно использоваться для изучения работы АТФ-зависимого калиевого канала, позволяя количественно оценить влияние на нее активаторов и ингибиторов этого канала.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и ис-

пользования животных при выполнении работы были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. K. Garlid, P. Paucek, V. Yarov-Yarovoy, et al., *Circ. Res.* **81** (6), 1072 (1997).
2. L. Testai, S. Rapposelli, A. Martelli, et al., *Med. Res. Rev.* **35** (3), 520 (2015).
3. K. Peng, J. Hu, J. Xiao, et al., *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis Dis.* **1864** (4, Pt A), 1086 (2018).
4. P. Duan, J. Wang, Y. Li, et al., *Int. J. Mol. Med.* **42** (5), 2709 (2018).
5. Y. Son, K. Kim, and H. R. Cho, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **500** (2), 504 (2018).
6. Г. Д. Миронова, Н. И. Федотчева, Ю. Ю. Скарга и М. Н. Кондрашова, в сб. *Механизмы зимней спячки* (Пушино, 1987), сс. 39–47.
7. I. V. Krilova, E. V. Kachaeva, O. M. Rodionova, et al., *Exp. Gerontol.* **41** (7), 697 (2006).
8. И. Б. Крылова, В. В. Бульон, Е. Н. Селина и др., *Бюл. Федерального центра сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова*, № 5, 44 (2012).
9. Е. В. Розова, И. Н. Маньковская и Г. Д. Миронова, *Биохимия* **80** (8), 1186 (2015).
10. G. D. Mironova, M. O. Khrenov, E. Y. Talanov, et al., *Arch. Biochem. Biophys.* **654**, 70 (2018).
11. И. Н. Маньковская, В. И. Носарь, О. С. Горбачева и др., *Биофизика* **59** (5), 941 (2014).
12. R. Ockaili, F. Salloum, J. Hawkins, and R. Kukreja, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **283**, 1263 (2002).
13. Г. Д. Миронова, Е. В. Качаева, М. И. Балина и др., *Вестн. РАМН* **2**, 44 (2007).
14. G. Mironova, A. Negoda, B. Marinov, et al., *J. Biol. Chem.* **279** (31), 32562 (2004).
15. M. Laskowski, B. Augustynek, B. Kulawiak, et al., *Biochim. Biophys. Acta. Bioenergetics* **1857**, 1247 (2016).
16. A. P. Wojtovich, D. M. Williams, M. K. Karcz, et al., *Circ. Res.* **106** (7), 1190 (2010).
17. C. O. Smith, K. Nehrke, and P.S. Brookes, *Biochem. J.* **474** (12), 20674 (2017).
18. O. Lowry, N. Rosebrough, A. Farr, and R. Randall, *J. Biol. Chem.* **193** (1), 265 (1951).
19. О. В. Баранова, Ю. Ю. Скарга, А. Е. Негода и Г. Д. Миронова, *Биохимия* **65** (2), 86 (2000).
20. K. Garlid and A. Beavis, *J. Biol. Chem.* **260** (25), 13434 (1985).
21. A. Beavis, R. Brannan, and K. Garlid, *J. Biol. Chem.* **260** (25), 13424 (1985).
22. I. Inoue, H. Nagase, K. Kishi, and T. Higuti, *Nature* **352** (6332), 244 (1991).
23. P. Paucek, G. Mironova, F. Mahdi, et al., *J. Biol. Chem.* **267**, 26062 (1992).

A Comparison of Impact of ATP factor on Mitochondrial Function Using Different Methods for Measuring Activity of ATP-Sensitive Potassium Channel in Mitochondria

N.V. Khmil* ***, A.A. Mosencov* **, M.I. Shigaeva*, and G.D. Mironova* **

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

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

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

We compared two methods for estimating functional activity of the mitochondrial ATP-sensitive potassium channel that plays an important role in cell physiology and, in particular, in cardio and neuroprotection. It has been shown that a spectrophotometric method, which is often used to study potassium channel function and the impact of its modulators has a number of limitations and principally provides qualitative assessment. Here, we proposed a modification of this method, whereby the absorbance curves can be linearized. This makes it possible to obtain a reliable quantitative assessment of changes in optical density and, as a consequence, to more accurately determine the impact of various modulators. The half maximal inhibitory concentration of ATP (IC_{50_ATP}) for the rate of potassium transport in rat liver mitochondria was determined using two different methods. The IC_{50_ATP} value was equal to 23 μ M when a direct measurement of the 2,4-dinitrophenol-induced K^+ efflux with a potassium-selective microelectrode was performed, and to 400 μ M using spectrophotometric method. The data obtained suggest that the measurement of the 2,4-dinitrophenol-induced K^+ efflux can be more efficient method for evaluating ATP-dependent potassium transport in mitochondria.

Keywords: 2,4-dinitrophenol-induced potassium efflux, swelling, mitochondria, mitochondrial ATP-dependent potassium channel, cardioprotection