

7. Dawson T.L., Gores G.J., Nicminene A.-L., Herman B., Lemasters J.J. Mitochondria as a source of reactive oxygen species during reductive stress in rat hepatocytes // *Am. J. Physiol.* – 1993. – V.264. – №4 Pt1. – P.C961-C967.
8. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford: Clarendon Press. – 1989. – 543 p.
9. Harris E.D. Regulation of antioxidant enzymes // *FASEB J.* – 1992. – V.6. – №9. – P.2675-2683.
10. Konstantinov A.A., Reskin A.V., Popova E.Y., Khomutov G.B., Ruuge E.K. Superoxide generation by the respiratory chain of tumor mitochondria // *Biochim. Biophys. Acta* – 1987. – V.894. – №1. – P.1-10.
11. Lushchak V.I. Oxidative stress in bacteria, in: *Oxidative Stress at Molecular, Cellular and Organ Levels*, eds P. Johnston, A.A. Boldyrev, Research Singpost, Trivandrum, India, 2002. – P.45-65.
12. Lushchak V.I., Lushchak L. P., Mota A. A., Hermes-Lima M. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation // *American J. Physiol.* – 2001. – V.280. – №1. – P.R100-R107.
13. McCord J.M. Oxygen-derived free radicals in post-ischemic injury // *New Engl. J. Med.* – 1985. – V.312. – №3. – P.159-163.
14. Stadtman E.R. Protein oxidation and aging // *Science.* – 1992. – V.257. – №5074. – P.1220-1224.
15. Storey K.B. Oxidative stress: animal adaptations in nature // *Braz. J. Med. Biol. Res.* – 1996. – V.29. – P.1715-1733.

Volodymyr Lushchak

ACTIVATED OXYGEN SPECIES IN BIOLOGICAL SYSTEMS

The main roots of generation and degradation of reactive oxygen species in biological systems are characterized. The imbalance between two sets of processes is called oxidative or reductive stress. Specificity of mentioned stresses in pro- and eukariotic organisms as well as some perspectives of research in this field have been discussed.

*Галина Ткаченко, Наталія Кургалюк,
Олександр Іккерт, Сергій Гордій*

ВПЛИВ МОДУЛЯТОРІВ АТФ-ЧУТЛИВИХ КАЛІЄВИХ КАНАЛІВ НА ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН МІТОХОНДРІЙ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ: РОЛЬ ТРАНСАМІНАЗНИХ РЕАКЦІЙ

АТФ-чутливі калієві канали були відкриті А.Номою у 1983 році на ізольованих мембранах кардіоміоцитів мурчаків [9]. З тих пір увага дослідників та фармакологів зосереджена на встановленні їх структури, механізмів функціонування і регуляції активності. Виявлено, що цей тип каналів має виняткове значення у забезпеченні взаємозв'язку між матаболічним статусом і збудливістю мембрани клітини, а у деяких типах клітин (попе-

речносугасті і гладкі м'язи, нейрони, β -клітини підшлункової залози) опосередковує дію гормонів і трансмітерів. K_{ATP} канали активуються у відповідь на метаболічний стрес, викликаний зниженням рівня АТФ у клітині [7].

Відомо, що резистентність організму до гіпоксії різного генезу обумовлена функціональними змінами мітохондріальних ферментних комплексів, які за умов зниженого парціального тиску кисню виконують роль регулятора і модулятора основних кисень-залежних процесів організму [3]. Метою нашої роботи було дослідження впливу активатора K_{ATP} каналів пінацидилу, блокаторів цих каналів глібенкламід і толбутамід на показники функціонального стану мітохондрій печінки, пов'язаних із роллю субстратів дихального ланцюга мітохондрій, які забезпечують інтенсивне переамінування, у щурів з різною резистентністю до гіпоксії.

Матеріали і методи

Дослідження проведено на 48 щурах-самцях лінії Вістар масою 0,2-0,22 кг, які утримувались в умовах віварію на стандартному раціоні. Перед дослідженням щурів поділили на дві групи з високою (ВР) і низькою резистентністю (НР) до гіпоксії за методом В.Я.Березовського [1]. З цією метою тварин помішали у барокамеру, в якій створювали розрідження повітря, що відповідає висоті "підйому" на висоту 11000 м над рівнем моря. Час виживання за цих умов, які оцінювали за появою другого агонального вдиху або судом, слугував показником резистентності. Для щурів із ВР він складав 7-9 хв, а для НР – до трьох. У дослідженнях щурів використовували після 14-добової перерви з метою реабілітації. Після цього тваринам парентерально вводили: 1 мл фізіологічного розчину (контроль), пінацидил (0,06 мг/кг), глібенкламід (1 мг/кг) або толбутамід (1 мг/кг). Час дії препаратів складав 30 хв, після чого тварин швидко декапітували.

Мітохондрії (МХ) печінки виділяли методом диференціального центрифугування зі збереженням нативності ізольованих органел. Процеси дихання та окиснювального фосфорилування досліджували полярографічним методом [4] з використанням закритого електрода Кларка і полярографічного аналізатора РА-7. Середовище гомогенізації містило для печінки (в мМ): $KCl - 120$, $K_2CO_3 - 2$, $HEPES - 10$, $EGTA - 1$, $pH 7,2$. Функціональний стан МХ досліджували методом Чанса та Вільямса [6]. Середовище інкубації містило (в мМ): $KCl - 120$, $KH_2PO_4 - 2$, $HEPES - 10$, $pH 7,2$. Як субстрати окиснення використовували 3 мМ глутамат і 3мМ піруват, 3мМ піруват і 2,5мМ малат. У інгібіторному аналізі додатково використовували з цими субстратами окиснення 2мМ амінооксиацетат – інгібітор переамінування. Дихання стимулювали додаванням 200 мкМ АДФ. За отриманими полярограмами розраховували: швидкість фосфорилуючого (в метаболічному стані 3 за Чансом, V_3) та контрольованого (в метаболічному стані 4, V_4) дихання МХ, дихальний контроль за Чансом (V_3/V_4), коефіцієнт ефективності фосфорилування АДФ/О та швидкість фосфори-

Г.Ткаченко, Н.Курзалюк, О.Івкерт, С.Гордій. Вплив модуляторів АТФ-чутливих калієвих каналів на функціональний стан мітохондрій печінки шурів: роль трансаміназних реакцій лювання V_{ϕ} [6; 7]. Концентрацію білка вимірювали за Лоурі [8]. Інтенсивність процесів ліпопероксидації оцінювали за нагромадженням ТБК-реактивних продуктів у тканині печінки [5]. Результати досліджень обробляли статистично, використовуючи критерій t Стьюдента.

Результати досліджень та їх обговорення

Як засвідчують результати наших досліджень, вихідні механізми функціонального стану МХ печінки у тварин з різною резистентністю до гіпоксії значно відрізняються. Передусім це стосується величин V_3 , спряженості процесів дихання і фосфорилування та ефективності процесів окиснювального фосфорилування (ОФ), які є значно вищими саме для шурів з ВР. Отримані зміни досліджено за умов окиснення 3мМ глутамату і 3мМ пірувату, 3мМ пірувату і 2,5мМ малату і наведено у таблицях 1 і 2. Таким чином, вихідні механізми фізіологічної реактивності, які можуть модифікувати стан процесів мітохондріального енергозабезпечення, повинні враховуватися за умов дослідження впливу різних фармакологічних препаратів.

Досліджено, що парентеральне введення активатора K_{ATP} каналів пінацидилу спричиняло виражену активацію мітохондріального дихання печінки, яке стосувалося передусім групи тварин із НР, при окисненні субстратів глутамату і пірувату на 32,74% ($P < 0,05$). Зокрема, це стосувалося збільшення величини дихального контролю за Чансом, але не ефективності процесів окиснювального фосфорилування (АДФ/О). Остання залишалась зниженою на 10,8% порівняно з контролем, проте досліджені зміни мали лише тенденцію до вірогідності. Для групи тварин із ВР введення пінацидилу супроводжувалося зниженням як величини дихального контролю (на 21,55%, $P < 0,05$), так і АДФ/О. Отже, парентеральне введення екзогенного активатора K_{ATP} каналів засвідчило різноспрямовані ефекти впливу, які обумовлені різним вихідним функціональним станом організму (низька і висока резистентність до гіпоксії).

Оцінка ролі трансаміназних реакцій через переамінування, яке викликане окисненням субстратів глутамату і пірувату, супроводжувалося неоднозначними ефектами функціонального стану МХ під впливом інгібітора переамінування амінооксиацетату (АОА). Зокрема, для групи тварин із НР за цих умов досліджено зниження показника дихального контролю, що засвідчує величина спряженості процесів дихання і окиснювального фосфорилування у МХ, на 15,18% ($P > 0,05$), проте ці зміни проходили на тлі вірогідного зростання інтенсивності поглинання кисню на 66,18% ($P < 0,01$). Для тварин із ВР вірогідних змін зазначених параметрів досліджено не було. Отже, досліджені різнонаправлені зміни окиснення субстратів глутамату і пірувату у МХ, які пов'язані з функціонуванням аланінамінотрансферази, показують незначну роль цього метаболічного шляху перетворень у контрольній групі тварин.

Основною для розуміння механізму дії різних фармакологічних препаратів, наприклад, активаторів K_{ATP} каналів, які використовуються у

клінічній практиці як потужні кардіопротекторні засоби, є оцінка ролі блокаторів цих каналів [7]. Блокатори $K_{AT\Phi}$ каналів (похідні сульфонілсечовини) уже понад 50 років використовуються як засоби, які стимулюють секрецію інсуліну у хворих на цукровий діабет II типу. Разом із тим, лише у 1985 році дослідники виявили клітинні структури, з якими взаємодіють ці сполуки, і зовсім недавно – молекулярні механізми дії похідних сульфонілсечовини. Виявилось, що останні комплексується з певними ділянками трансмембранних доменів субодиниць $K_{AT\Phi}$ каналу. Так, блокатор цих каналів глібенкламід комплексується з першими п'ятьма, а толбутамід – з 12-17 трансмембранними каналними доменами, що свідчить про модульну структурну і функціональну організацію $K_{AT\Phi}$ каналів [10]. Тому, можливо, парентеральні ефекти впливу двох зазначених блокаторів $K_{AT\Phi}$ каналів були нерівнозначними для двох груп шурів в оцінці ролі протікання реакцій переамінування.

Таблиця 1. Зміни показників АДФ-стимульованого дихання мітохондрій печінки шурів із різною резистентністю до гіпоксії під впливом пінацидилу, глібенкламіду і толбутаміду при окисненні 3мМ глутамату, 2,5мМ малату та інгібітора переамінування 1мМ амінооксинацетату ($M \pm m, n=6$)

Умови досліджу	Дихальний контроль, V_3/V_4	АДФ/О, мкмоль АДФ/нг ат О	Дихальний контроль, V_3/V_4	АДФ/О, мкмоль АДФ/нг ат О
	3 мМ глутамат і 2,5 мМ малат		3 мМ глутамат, 2,5 мМ малат і 1 мМ амінооксинацетат	
Контроль				
НР	3,75±0,21	2,26±0,11	2,56±0,17	2,67±0,14
ВР	3,79±0,24	2,54±0,13	2,23±0,16	1,13±0,07
Пінацидил				
НР	3,90±0,28	1,36±0,07*	2,15±0,09	1,37±0,08*
ВР	2,21±0,21*	1,63±0,12*	3,14±0,14*	1,04±0,04
Глібенкламід				
НР	2,53±0,18*	1,37±0,11*	2,39±0,11	1,24±0,08*
ВР	2,20±0,16*	1,34±0,12*	1,75±0,10*	1,31±0,07
Толбутамід				
НР	3,34±0,20	1,24±0,10*	2,33±0,13*	1,55±0,09*
ВР	1,82±0,13*	1,04±0,05*	2,37±0,11	1,31±0,09

Примітка: тут і далі * – достовірні зміни між введенням препаратів і контролем.

Якщо для тварин із НР під впливом глібенкламідом не досліджено зниження величини дихального контролю, то для особин із ВР воно становило 27,87% ($P<0,01$) порівняно з контролем. Аналогічне зниження отримали в групі тварин із ВР під впливом толбутаміду. У всіх випадках незалежно від резистентності до гіпоксії показано вірогідне зниження величини ефективності процесів ОФ. Таким чином, дія блокаторів $K_{AT\Phi}$ каналів

Г.Ткаченко, Н.Кургалюк, О.Люкерт, С.Гордій. Вплив модуляторів АТФ-чутливих калієвих каналів на функціональний стан мітохондрій печінки шурів: роль трансаміназних реакцій спрямована на зниження поглинання кисню ізольованими МХ і ефективності його утилізації.

Під впливом інгібітора переамінування АОА у МХ печінки спостерігали підвищення величини дихального контролю у тварин із НР при введенні гілбенкламіду на 24,91% ($P < 0,05$) та толбутаміду – лише на 2,81%. Протилежні зміни досліджено для тварин із ВР: під впливом обох блокаторів встановлено близьке до вірогідного зниження зазначеного показника на 18,83% (дія глібенкламіду) і на 34,42% ($P < 0,01$) (дія толбутаміду). Для обидвох блокаторів K_{ATP} каналів показано достовірне зниження величини ефективності ОФ, що може засвідчувати про ушкодження функціонування органел.

Вивченню ролі процесів переамінування за участю аспартатаміно-трансферази, що показує окиснення субстратів глутамату і малату, присвячений наш наступний етап роботи (табл.2). Відомо, що підвищення стійкості до дії гіпоксичних ушкоджень на мітохондріальному рівні визначене функціонуванням “швидкого” циклу Кребса і механізмами його “шунтування”. Дослідженнями показано, що роль шунта відіграє аспартатаміно-трансфераза, активність якої вища від активності вузьких етапів циклу – цитратсинтази та ізоцитратдегідрогенази – і повністю може зіставлятися з активністю сукцинатдегідрогенази [2].

Таблиця 2. Зміни показників АДФ-стимульованого дихання мітохондрій печінки шурів із різною резистентністю до гіпоксії під впливом пінацидилу, глібенкламіду і толбутаміду при окисненні 3мМ глутамату, 3мМ пірувату та інгібітора переамінування 1мМ амінооксиацетату ($M \pm m$, $n=6$)

Умови дослуду	Дихальний контроль, V_3/V_4	АДФ/О, мкмоль АДФ/нг ат О	Дихальний контроль, V_3/V_4	АДФ/О, мкмоль АДФ/нг ат О
	3 мМ глутамат і 3 мМ піруват		3 мМ глутамат, 3 мМ піруват, 1 мМ амінооксиацетат	
Контроль				
НР	3,36±0,18	1,39±0,07	2,85±0,20	2,31±0,16
ВР	3,48±0,15	1,36±0,07	3,08±0,24	1,33±0,12
Пінацидил				
НР	4,46±0,21*	1,24±0,04	3,13±0,18	1,29±0,10*
ВР	2,73±0,18*	1,34±0,05	3,20±0,24	1,37±0,09
Глібенкламід				
НР	3,42±0,21	1,03±0,07*	3,56±0,23*	0,82±0,04*
ВР	2,51±0,18*	0,86±0,04*	2,50±0,17	0,74±0,04*
Толбутамід				
НР	2,86±0,20	1,01±0,05*	2,93±0,25	0,90±0,05*
ВР	2,63±0,17*	0,76±0,04*	2,02±0,14*	0,89±0,03*

Примітка: тут і далі * – достовірні зміни між введенням препаратів і контролем.

Введення пінацидилу супроводжувалося вірогідним зниженням величини дихального контролю на 41,69% ($P < 0,01$) у групі тварин із ВР і АДФ/О в обидвох групах тварин. Інгібітор переамінування АОА у групі тварин із НР викликав з тенденцією до вірогідності зниження показника дихального контролю, а у групі тварин із ВР, навпаки, достовірно підвищення цього значення. АДФ/О незалежно від резистентності до гіпоксії залишалася зниженою.

Отже, активатор K_{ATP} каналів реалізує ефекти впливу через трансміназний шлях постачання субстратів у цикл Кребса, оскільки він нівелювався введенням інгібітора переамінування. Це підтверджують також наші результати дослідів щодо парентерального введення блокаторів K_{ATP} каналів глібенкламід і толбутамід.

Зазначені зміни полягали у зниженні величин спряженості та ефективності процесів дихання та окиснювального фосфорилування у МХ. Однак зростання швидкості окиснювального фосфорилування супроводжується вірогідним зниженням спряженості дихання у МХ і його ефективності, що може виступати однією з причин інтенсифікації процесів ліпопероксидації (рис. 1).



Рис. 1. Вміст ТБК-реактивних продуктів у тканині печінки за умов введення пінацидилу, глібенкламід і толбутамід у щурів із різною резистентністю до гіпоксії.

Отже, отримані нами результати можуть вказувати на принципово різні шляхи реалізації впливу блокаторів K_{ATP} каналів на процеси дихання і окиснювального фосфорилування у мітохондріях печінки тварин, що залежать від генетично обумовленої резистентності до гіпоксичного фактора. Активация мітохондріального дихання у тварин із НР, отримана нами при використанні субстратів окиснення глутамату і малату, може бути пов'язана з відомою роллю аспаратамінотрансферази і опосередковує ефекти

Г.Ткаченко, Н.Кургальюк, О.Іккерт, С.Гордій. Вплив модуляторів АТФ-чутливих калієвих каналів на функціональний стан мітохондрій печінки щурів: роль трансаміназних реакцій активаторів K_{ATP} каналів у мітохондріях. Це може бути важливим чинником у корекції процесів гіпоксичного ушкодження, що супроводжує розвиток і перебіг багатьох патологічних станів організму.

1. Березовський В.Я. Риси індивідуальності в реакції на гіпоксію // Фізіол. журн. АН УРСР – 1975. – 21, №3. – С.371-376.
2. Кондрашова М.Н. Трансаміназний цикл окислення субстратів в клітці як механізм адаптації к гіпоксії // Фармакологическая коррекция гипоксических состояний. – М., 1989. – С.51-70
3. Лукьянова Л.Д. Биознергетическая гипоксия: понятие, механизмы и способы коррекции // БЭБиМ. – 1997. – 124, №9. – С.244–254.
4. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. – М.: Наука, 1973. – 221 с.
5. Тимирбулатов Т.А., Селезнев С.И. Метод повышения интенсивности свободнорадикального окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение // Лаб. дело. – 1988. – №4. – С.209-211.
6. Chance B., Williams G. The respiratory chain and oxidative phosphorylation // Adv. Enzymol. – 1956. – 17. – P.65-134.
7. Grover G., Garlid K. ATP-sensitive potassium channels: a review of their cardioprotective pharmacology // J. Mol. Cell Cardiol. – 2000. – 32. – P.677-695.
8. Lowry O.H., Rosenbrough N. H., Farr A.L., Kondall R.J. Protein measurement with Folin protein reagent // J. Biol. Chem. – 1952. – 193, №2. – P.265-275.
9. Noma A. ATP-sensitive K^+ channels in cardiac muscle // Nature. – 1983. – 305. – P.147-148.
10. Ashcroft F., Gribble F. ATP-sensitive K^+ channels and insulin secretion: their role in health and disease // Diabetologia – 1999. – 42, №8. – P.903-919

G.Tkachenko, N.Kurhalyuk, O.Ikkert, S.Hordii

MODULATORS OF ATP-SENSITIVE POTASSIUM CHANNELS INFLUENCE IN MITOCHONDRIAL FUNCTIONAL STATE OF LIVER: ROLE OF TRANSAMINASE REACTION

On Wistar rats with different resistance to hypoxia have been studied role of transaminase energy support ways in mitochondria with using such substrates of oxidation as glutamate and piruvate (alaninaminotransferase), glutamate and malate (aspartaminotransferase) under injection of ATP-sensitive potassium channels opener (pinacidil) and blockers (glibenclamide, tolbutamide). We used inhibitor of transaminase reaction 1 mM amino-oxiacetate. The influence of pinacidil mediated by transaminase way deal with functional activity of aspartataminotransferase. Effects of ATP-sensitive potassium channels blockers deal with decreasing of respiratory ratio, efficacy of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria and intensification of lipid peroxidation processes.