

С.М. Пивовар, В.І. Коржов, Р.Б. Струтинський, Л.М. Ягупольський,  
О.О. Мойбенко

## Вплив фторвмісних активаторів мітохондріальних аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів на окисне фосфорилування

*Механізми кардіопротекторного діяння активаторів мітохондріальних аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів ( $K_{ATФ}$ -каналів) і, в частині, їх вплив на мітохондріальне дихання, осталися мало вивченими. В даній роботі досліджено діяння нових фторсодержащих аналогів діазоксида (ДіазоФм і ДіазоФп) – потенціальних активаторів мітохондріальних  $K_{ATФ}$ -каналів – на окислювальне фосфорилування в ізолюваних мітохондріях печінки миші. Показано, що ДіазоФп і ДіазоФм (30 мкмоль/л) надають менше виражене (в 2,5 і 1,4 рази відповідно) інгібуюче діяння на АДФ-стимульоване дихання порівняно з діазоксидом при використанні сукцинату натрію як субстрату окислення. Крім того, фторсодержащі активатори мітохондріальних  $K_{ATФ}$ -каналів незначительно зменшують активність сукцинатдегідрогенази (на 7 %), тоді як діазоксид – на 27 %. Виявлено, що ДіазоФп активує АДФ-стимульоване дихання при використанні як субстрату окислення  $\alpha$ -кетоглутарату натрію. В той же час активатори  $K_{ATФ}$ -каналів зменшують дихальний коефіцієнт, що свідчить про деяке розбиття дихання і фосфорилування. Цей ефект інгібуюється при наявності 5-гідроксидеконової кислоти і не залежить від використаного субстрату окислення. Таким чином, фторсодержащі активатори  $K_{ATФ}$ -каналів надають менше виражене інгібуюче вплив на дихальну ланку мітохондрій, в частині на комплекс II, порівняно з діазоксидом, що відкриває можливість дослідити роль активації  $K_{ATФ}$ -каналів в механізмі кардіопротекції. Активація мітохондріальних  $K_{ATФ}$ -каналів, яка призводить до розбиття окислювального фосфорилування, може бути одним з механізмів прекодиціонування.*

### ВСТУП

Відомо, що АТФ-чутливі калієві канали ( $K_{ATФ}$ -канали) відіграють важливу роль у захисті міокарда при ішемічно-реперфузійних пошкодженнях серця [26, 27], однак даний механізм кардіопротекції не повністю з'ясовано. Також залишається недостатньо дослідженим вплив активації цих каналів на функції мітохондрій. Відомо, що внаслідок відкриття мітохондріальних  $K_{ATФ}$ -каналів, які розташовані на внутрішній мембрані мітохондрій, іони калію надходять до матриксу мітохондрій, що супровод-

жується збільшенням проникності внутрішньої мембрани до води і фосфату [9, 21] та зміною мембранного потенціалу мітохондрій [16, 23]. Це може певним чином впливати на такі функції мітохондрій, як дихання та фосфорилування. Так, показано, що введення щурам парентерально діазоксида чи пінацидилу за 30 хв до виділення мітохондрій посилює окисне фосфорилування та, особливо, збільшує спряжене дихання та фосфорилування [7, 8]. Водночас є дані, що активатори  $K_{ATФ}$ -каналів, зокрема діазоксид і пінацидил

© С.М. Пивовар, В.І. Коржов, Р.Б. Струтинський, Л.М. Ягупольський, О.О. Мойбенко

значно пригнічують АДФ-стимульоване дихання при додаванні їх до суспензії мітохондрій [16, 20, 23, 27]. Таким чином, існує певне протиріччя: з одного боку, активація мітохондріальних  $K_{\text{АТФ}}$ -каналів стимулює окисне фосфорилування, а з іншого – активатори цих каналів – його пригнічують.

Дані літератури свідчать, що деякі активатори мітохондріальних  $K_{\text{АТФ}}$ -каналів здатні не лише їх відкривати, але й мають інші властивості [17–19]. Так, у праці Hanley та співавт. [17] показано, що діазоксид інгібує комплекс II, а пінацидил – комплекс I дихального ланцюга мітохондрій, тобто активатори  $K_{\text{АТФ}}$ -каналів мають змогу прямо впливати на дихальний ланцюг мітохондрій: наприклад, діазоксид (у концентрації більше ніж 100 мкмоль/л) може інгібувати активність сукцинатдегідрогенази (СДГ) [29]. Крім того, активатори  $K_{\text{АТФ}}$ -каналів можуть діяти як протонифори і, таким чином, викликати роз'єднання дихання та фосфорилування [19].

У попередніх наших працях показано, що фторвмісні аналоги діазоксиду – ДіазоФп і ДіазоФм, проявляють свою вазодилаторну дію через активацію  $K_{\text{АТФ}}$ -каналів судинних гладеньком'язових клітин [5], та подібно до діазоксиду можуть мати кардіопротекторні властивості [4], однак їх вплив на функціонування мітохондрій, та, зокрема, на окисне фосфорилування, лишається недослідженим.

Метою нашої роботи було дослідити вплив фторвмісних активаторів  $K_{\text{АТФ}}$ -каналів на окисне фосфорилування в мітохондріях печінки.

## МЕТОДИКА

Мітохондрії печінки шурів виділяли методом диференційного центрифугування [22] в середовищі такого складу (ммоль/л): сахароза – 250,0, ЕДТА – 1,0. Окисне фосфорилування вивчали за допомогою полярографічного методу вимірювання погли-

нання кисню [6], у цьому разі використовували відкритий платиновий електрод, що обертається. Вимірювали такі показники: V2 – швидкість дихання при додаванні субстрату окиснення (сукцинат чи  $\alpha$ -кетоглутарат натрію в концентрації 10 ммоль/л) або поглинання кисню в метаболічному стані 2 за Чансом [10], V3 – швидкість дихання після добавки АДФ (200 мкмоль/л) – АДФ-стимульоване дихання або поглинання кисню в метаболічному стані 3 за Чансом, V4 – контрольоване дихання або поглинання кисню в метаболічному стані 4 за Чансом, Vф – швидкість фосфорилування, АДФ/О – коефіцієнт ефективності фосфорилування, ДК – дихальний контроль. V2, V3 та V4 виражали в наноатомах О за 1 хв на 1 мг білка, а Vф – у наномолях АДФ за 1 хв на 1 мг білка.

Фторвмісні аналоги діазоксиду в концентрації 30 мкмоль/л добавляли в інкубаційне середовище, яке містило суспензію мітохондрій (2,5 мг білка). В експериментах використовували інкубаційне середовище такого складу (ммоль/л): сахароза – 150,0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 5,0,  $\text{MgCl}_2$  – 25,0,  $\text{KCl}$  – 75,0.

У дослідах з вивченням дії фторвмісних аналогів діазоксиду мітохондрії преінкубовували з інгібітором мітохондріальних  $K_{\text{АТФ}}$ -каналів 5-гідроксидеканоевою кислотою (5-ГДК, 200 мкмоль/л) і через 1 хв додавали ДіазоФп і ДіазоФм.

З метою порівняння властивостей фторвмісних аналогів діазоксиду з відомими активаторами  $K_{\text{АТФ}}$ -каналів в усіх експериментах використовували діазоксид в аналогічній концентрації.

Вміст білка в суспензії мітохондрій визначали за методом Лоурі [22].

Визначення активності сукцинатдегідрогенази (СДГ) здійснювали спектрофотометричним методом, описаним Єщенко та Вольським [1].

Солі, використані для приготування середовища виділення та інкубаційного середовища, а також  $\alpha$ -кетоглутарат натрію, діазоксид та 5-ГДК були вироб-

ництва фірми “Sigma Chemical” (США). Нові фторвмісні активатори  $K_{ATФ}$ -каналів та їх розчинник – диметилацетамід були синтезовані в Інституті органічної хімії НАН України. Фторвмісні аналоги відрізняються від діазоксиду наявністю фторвмісної групи, яка у випадку з ДіазоФп розташована в пара-положенні цієї молекули, тоді як у випадку з ДіазоФм – у мета-положенні по відношенню до атома азоту.

Результати дослідження обробляли методом варіаційної статистики з використанням критерію  $t$  Стьюдента. Значення  $P < 0,05$  розглядали як статистично достовірні.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Враховуючи той факт, що властивості мітохондріальних  $K_{ATФ}$ -каналів у серці, нирках, печінці та головному мозку суттєво не відрізняються [9, 28], для більш повного

дослідження наслідків відкриття та ролі цих каналів у функціонуванні мітохондрій ми використовували суспензію ізольованих мітохондрій печінки щурів.

Нами встановлено, що вплив фторвмісних активаторів  $K_{ATФ}$ -каналів (ДіазоФп та ДіазоФм) у концентрації 30 мкмоль/л на окисне фосфорилування в ізольованих мітохондріях печінки щурів залежить від використаного субстрату окиснення. Так, при окисненні сукцинату натрію ДіазоФп і ДіазоФм зменшували  $V_3$  на 13,4 та 23,9 % відповідно, тоді як при додаванні діазоксиду значення  $V_3$  зменшувалося на 33,6 % ( $P < 0,05$ ) порівняно з контролем. Тобто пригнічення АДФ-стимульованого дихання ( $V_3$ ) при дії фторвмісних аналогів діазоксиду (ДіазоФп і ДіазоФм) було в 2,5 ( $P < 0,05$ ) та 1,4 рази менше, ніж при дії діазоксиду (табл. 1). Аналогічно змінювався і показник  $V_f$  при дії активаторів  $K_{ATФ}$ -каналів, а

**Таблиця 1. Вплив активаторів АТФ-чутливих калієвих каналів на окисне фосфорилування в мітохондріях печінки щурів ( $M \pm m$ )**

Схема досліджу	АДФ-стимульоване дихання ( $V_3$ )	Контрольоване дихання ( $V_4$ )	Швидкість фосфорилування ( $V_f$ )	Дихальний контроль (ДК)	Коефіцієнт ефективності фосфорилування (АДФ/О)
Сукцинат натрію					
Контроль (n=17)	45,12±4,93	10,87±1,62	87,90±7,30	4,46±0,37	1,93±0,15
Діазоксид (n=6)	29,94±1,67*	10,56±1,18	71,65±10,48	3,26±0,49	1,77±0,17
ДіазоФп (n=10)	39,08±2,52**	10,21±0,84	79,90±5,64	4,06±0,36	2,06±0,13
ДіазоФм (n=9)	34,34±3,92	9,78±1,69	82,24±9,20	3,94±0,31	2,00±0,14
$\alpha$ -Кетоглутарат натрію					
Контроль (n=9)	34,53±3,26	9,93±1,41	95,18±7,46	3,75±0,57	2,84±0,21
Діазоксид (n=7)	36,19±2,55	12,54±1,70	90,24±5,90	3,25±0,23	2,54±0,16
ДіазоФп (n=7)	46,15±4,49*	15,16±1,94	100,31±8,42	3,340±0,32	2,64±0,11
ДіазоФм (n=6)	40,85±3,93	11,64±1,87	95,05±6,01	3,49±0,51	2,63±0,17

\*  $P < 0,05$  порівняно з контролем

\*\*  $P < 0,05$  порівняно з дією діазоксиду

саме зменшувався на 18,5, 9,0 та 6,0 % при додаванні до мітохондрій діазоксиду, ДіазоФп і ДіазоФм відповідно.

Водночас при використанні  $\alpha$ -кетоглутарату натрію введення в інкубаційне середовище ДіазоФп і ДіазоФм супроводжувалося збільшенням АДФ-стимульованого дихання порівняно з контролем – на 33,6 ( $P<0,05$ ) та 18,3 % відповідно, тоді як при дії діазоксиду цей показник практично не змінювався (див. табл. 1).

Таким чином, V3 зменшується лише при використанні сукцинату натрію, що може свідчити про пригнічення активаторами калієвих каналів активності СДГ. Дійсно, при інкубуванні мітохондрій з діазоксидом протягом 5 хв нами встановлено зменшення активності СДГ на 26,6% ( $n=9$ ,  $P<0,05$ ; рис. 1), тоді як при дії фторвмісних аналогів діазоксиду цей показник практично не змінювався (лише на 7 %).

Таким чином, фторвмісні аналоги діазоксиду і, зокрема, більшою мірою ДіазоФп, позбавлені характерної для діазоксиду властивості інгібувати активність СДГ та, ймовірно, менше впливають на комплекс II дихального ланцюга мітохондрій.

Дані літератури свідчать, що при ішемії та стресі зменшується окиснення НАД-

залежних субстратів (наприклад  $\alpha$ -кетоглутарату) та посилюється окиснення сукцинату натрію як компенсаторної ланки [3, 7]. Виходячи з такої точки зору, фторвмісні активатори  $K_{ATФ}$ -каналів можуть бути більш ефективними порівняно з діазоксидом саме при використанні їх з метою корекції патологічних станів.

Однак слід відмітити, що активатори  $K_{ATФ}$ -каналів незалежно від використаного субстрату дихання зменшували ДК (див. табл.1; рис.2). Так, діазоксид зменшував ДК на 26,9 і 13,3 %; ДіазоФп – на 9 та 10,9 %; ДіазоФм – на 11,2 і 7 % при використанні сукцинату та  $\alpha$ -кетоглутарату натрію, відповідно. Оскільки 5-ГДК пригнічувала вплив активаторів на ДК (рис. 2) це може означати, що зменшення цього показника відбувається внаслідок активації мітохондріальних  $K_{ATФ}$ -каналів. Дійсно, дані літератури свідчать, що діазоксид та ішемічне прекондиціонування зумовлюють роз'єднання дихання та окисного фосфорилування у вихідних умовах [26]. Це зумовлено наступними причинами: при відкриванні мітохондріальних  $K_{ATФ}$ -каналів виникає деполяризація мембрани, яка відповідно супроводжується збільшенням поглинання кисню, а також зменшенням синтезу АТФ [11, 13].

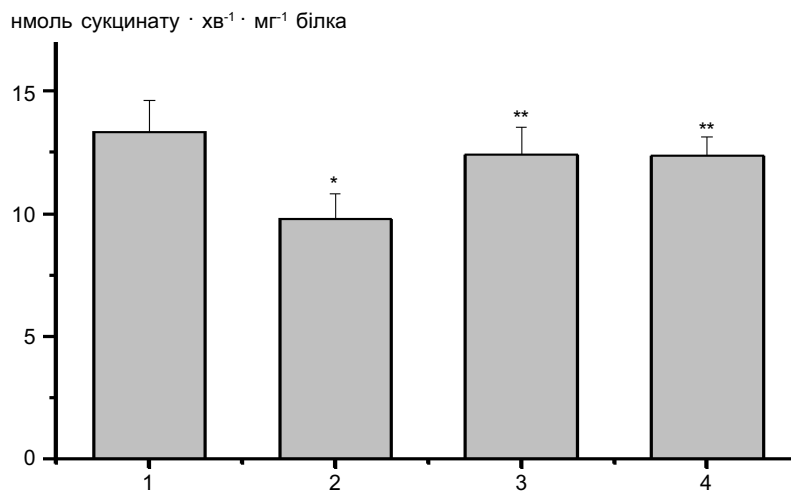


Рис.1. Вплив активаторів АТФ-чутливих калієвих каналів на активність сукцинатдегідрогенази ізольованих мітохондрій печінки: 1 – контроль, 2 – діазоксид, 3 – ДіазоФп, 4 – ДіазоФм. \*  $P<0,05$  по відношенню до контролю, \*\*  $P<0,05$  по відношенню до дії діазоксиду

Також слід відмітити, що таке зменшення ДК супроводжується збільшенням V4 при використанні НАД-залежного субстрату окиснення, а саме на 16,8, 44,2 (P<0,05) та 23,8 % при дії діазоксиду, ДіазоФп та ДіазоФм відповідно (див. табл. 1). Зменшення ДК і збільшення V4 може свідчити про часткове роз'єднання процесів дихання та фосфорилування, а також, можливо, про посилення вільнорадикальних процесів, що особливо виражено при дії ДіазоФп. Підтвердженням цього може бути те, що зафіксоване нами збільшення V3 (при використанні  $\alpha$ -кетоглутарату натрію як субстрату дихання) не супроводжується змінами швидкості фосфорилування, тобто незважаючи на поглинання мітохондріями молекул кисню ефективність фосфорилування не змінюється, наслідком чого може бути утворення вільних радикалів. Таким чином, додавання ДіазоФп до суспензії мітохондрій може призводити до збільшення утворення вільних радикалів при використанні  $\alpha$ -кетоглутарату натрію.

Короточасне збільшення вмісту вільних радикалів у міокарді при активації  $K_{ATP}$ -

каналів за фізіологічних умов, а саме перед моделюванням ішемії–реперфузії міокарда, розглядається як один із механізмів кардіопротекторної дії активаторів  $K_{ATP}$ -каналів [26]. Таке збільшення може виступати другорядним месенжером і тригером ішемічного прекодиціювання [30].

У наших експериментах також показано, що інгібітор мітохондріальних  $K_{ATP}$ -каналів – 5-ГДК може певним чином впливати на окисне фосфорилування як при використанні ФАД- так НАДН-залежних субстратів (табл. 2). Так, V4 збільшувалася на 22 і 24,5 % при використанні  $\alpha$ -кетоглутарату та сукцинату як субстратів дихання, що відповідно супроводжувалося зменшенням ДК – на 27,2 та 26,6 %. 5-ГДК знижував – V3, Vф та АДФ/О, однак такі зміни не перевищували 10 %. Аналіз полярографічної кривої свідчить, що зменшення спряженості дихання та фосфорилування при дії 5-ГДК відбувається внаслідок збільшення поглинання кисню в стані 4 (V4). Це також підтверджуються тим, що коефіцієнт Ларді (V3/V2) незначно зменшувався порівняно з контролем – на 13,3 і 14 %

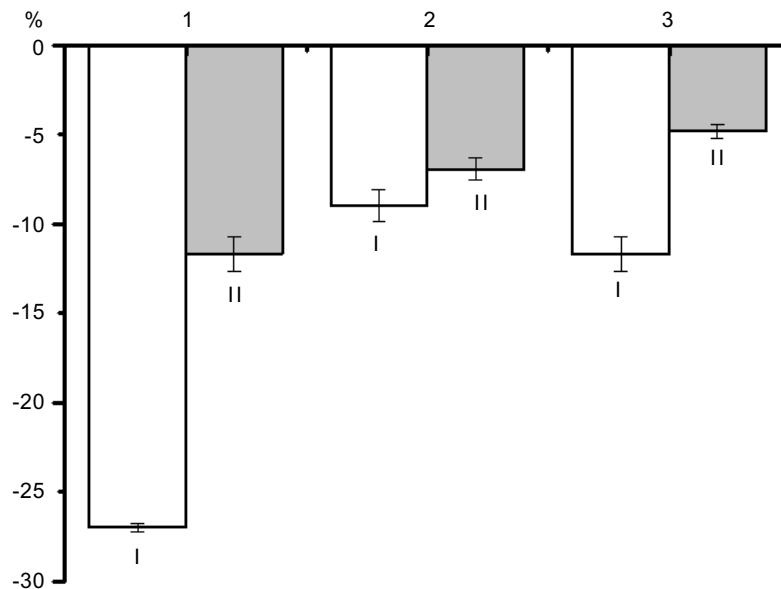


Рис.2. Зміна дихального контролю при дії активаторів  $ATP$ -чутливих калієвих каналів до (I) та після інгібування мітохондріальних  $K_{ATP}$ -каналів за допомогою 5-гідроксидеканоевої кислоти (II). Субстратом дихання був сукцинат натрію: 1 –діазоксид, 2 – ДіазоФп, 3 –ДіазоФм

при використанні сукцинату та  $\alpha$ -кетоглутарату натрію. Таким чином, при інкубуванні мітохондрій з 5-ГДК зафіксовано збільшення V4, що узгоджується з даними інших авторів про те, що інгібітори  $K_{ATP}$ -каналів, зокрема глібенкламід, збільшують поглинання кисню в стані 4 за Чансом [14,24].

Уперше неспецифічну дію 5-ГДК на дихальний ланцюг мітохондрій, а саме її включення в  $\beta$ -окиснення ненасичених жирних кислот показано Hanley та співавт. [17]. В останніх їх роботах [18, 24] активно обговорюється можливість 5-ГДК при дії КоА-синтази перетворюватись у цитозолі у 5-ГДК-КоА-синтазу та надходити до матриксу мітохондрій і включатись у  $\beta$ -окиснення ненасичених жирних кислот, що відповідно і буде впливати на функціонування мітохондрій. Однак, незважаючи на такі дослідження, 5-ГДК ефективно використовується як інгібітор ішемічного прекодиціонування, а також для дослідження ролі мітохондріальних  $K_{ATP}$ -каналів у механізмах кардіопротекції [27]. Це пов'язано з тим, що не лише 5-ГДК, а, ймовірно, і 5-ГДК-КоА-синтаза може інгібувати мітохондріальні  $K_{ATP}$ -канали [21, 26].

У наступній серії експериментів ми досліджували вплив активаторів  $K_{ATP}$ -каналів

на окисне фосфорилювання мітохондрій, які були преінкубовані з 5-ГДК (200 мкмоль/л). Застосування активаторів  $K_{ATP}$ -каналів на фоні дії 5-ГДК призводить до збільшення V2, V3 та V4 порівняно з контролем (у цьому разі дія 5-ГДК) і ці зміни не залежать від використаного нами субстрату дихання та супроводжуються зменшення значень показників АДФ/О та ДК. Тобто, з одного боку, відбувається посилення поглинання кисню (про це свідчить збільшення V3), а з іншого – процес роз'єднання дихання та фосфорилювання (зменшення ДК, АДФ/О та збільшення V4).

Отримане нами підвищення V2, V3, V4 при дії активаторів та інгібітора мітохондріальних  $K_{ATP}$ -каналів можна пояснити лише включенням 5-ГДК або її похідних у  $\beta$ -окиснення жирних кислот, внаслідок чого електрони передаються в дихальний ланцюг мітохондрій на рівні коензиму Q, [18], що, можливо, і потребує додаткового акцептора електронів – кисню. Таке передавання електронів на рівні коензиму Q може компенсувати часткове інгібування дихального ланцюга мітохондрій, викликане діазоксидом [26]. Дійсно, порівняння дії використаних активаторів  $K_{ATP}$ -каналів до та після преінкубації мітохондрій з 5-ГДК

**Таблиця 2. Вплив інгібітора мітохондріальних  $ATP$ -чутливих калієвих каналів – 5-гідроксидеканосвої кислоти (200 мкмоль/л) на окисне фосфорилювання**

Схема досліджу	Субстратне дихання (V2)	АДФ-стимульоване дихання (V3)	Контрольоване дихання (V4)	Дихальний контроль (ДК)	Швидкість фосфорилювання (Vф)	Коефіцієнт ефективності фосфорилювання (АДФ/О)
Сукцинат натрію						
Контроль (n=12)	15,25±1,48	45,12±4,93	10,28±0,79	4,46±0,37	87,90±7,30	1,93±0,15
5-ГДК (n=6)	15,16±1,00	40,33±3,79	12,81±1,15	3,27±0,44	77,375±7,00	1,89±0,14
$\alpha$ -Кетоглутарат натрію						
Контроль (n=9)	13,56±1,15	34,53±3,26	9,9±1,14	3,75±0,57	95,18±7,46	2,84±0,21
5-ГДК (n=6)	14,36±1,24	31,75±2,82	12,07±1,27	2,73±0,31	81,72±7,06	2,69±0,38

свідчить про деяке збільшення V2, V3, та V4 при використанні сукцинату, тоді як при використанні  $\alpha$ -кетоглутарату натрію ці показники збільшувалися лише при застосуванні діазоксиду. Таким чином, 5-ГДК зменшує вплив використаних нами речовин на дихальний ланцюг мітохондрій.

Ще одним з пояснень отриманих нами результатів є двоякий вплив  $K^+$  на біоенергетичні процеси в мітохондріях. Відомо, що одновалентні катіони ( $K^+$  та  $Na^+$ ) в фізіологічному діапазоні концентрацій (до 60 ммоль/л) стимулюють дихання та окисне фосфорилування [2]. Ґрунтуючись на таких дослідженнях і враховуючи відсутність даних про незворотне інгібування мітохондріальних  $K_{ATP}$ -каналів, імовірно припустити, що в нашому випадку при використанні інгібітора (5-ГДК) та активаторів  $K_{ATP}$ -каналів значно зменшується кількість відкритих  $K_{ATP}$ -каналів, тобто до матриксу мітохондрій надходить невелика кількість іонів калію, що і викликає стимуляцію окисного фосфорилування. Дійсно,  $K^+$  спочатку збільшує швидкість поглинання  $O_2$  та синтез АТФ, а в міру його накопичення в матриксі мітохондрій відбувається процес їх набухання, що призводить до роз'єднання дихання та фосфорилування.

З літератури відомо, що бімакалім (активатор  $K_{ATP}$ -каналів) зменшує синтез АТФ у нативних мітохондріях, а глібенкламід і 5-ГДК блокують його вплив [13]. Аналогічні дані були отримані Djeza та співавт. [12], який показав, що при наявності в інкубаційному середовищі інгібітора мітохондріальних  $K_{ATP}$ -каналів діазоксид збільшує рух електронів через комплекс II дихального ланцюга мітохондрій порівняно з дією самого діазоксиду і це характерно саме при використанні сукцинату натрію.

Таким чином, нами показано, що фторвмісні аналоги діазоксиду мають менш виражений прямий вплив на дихальний ланцюг мітохондрій, що дає можливість дослідити безпосередню роль мітохондріальних  $K_{ATP}$ -каналів у механізмах кардіо-

протекції. В наших експериментах активація  $K_{ATP}$ -каналів призводить до роз'єднання окисного фосфорилування, що можливо є одним з механізмів кардіопротекції.

## ВИСНОВКИ

1. Інгібітор мітохондріальних  $K_{ATP}$ -каналів 5-ГДК здійснював роз'єднувальний вплив на окисне фосфорилування, про що може свідчити збільшення контрольованого дихання (метаболічний стан 4 за Чансом) і зменшення ДК.

2. Нами підтверджено, що діазоксид пригнічує АДФ-стимульоване дихання за умов окиснення сукцинату натрію та практично не впливає при  $\alpha$ -кетоглутараті натрію, тобто дія діазоксиду може бути опосередкована інгібуванням активності СДГ.

3. Фторвмісні аналоги діазоксиду також проявляють тенденцію до зменшення активності СДГ, проте їх дія менше виражена, що супроводжується збільшенням АДФ-стимульованого дихання при використанні  $\alpha$ -кетоглутарату натрію як субстрату окиснення.

4. Активація  $K_{ATP}$ -каналів за допомогою діазоксиду або ДіазоФп чи ДіазоФм зумовлювала роз'єднання дихання та фосфорилування як при використанні сукцинату, так і  $\alpha$ -кетоглутарату натрію.

**S.N Pyvovar, V.I. Korzhov., R.B Strutinskii, L.M. Yagupolskii, A.A. Moibenko**

## THE INFLUENCE OF THE FLUOR-CONTAINING MITOCHONDRIAL $K_{ATP}$ CHANNELS OPENERS ON THE OXIDATIVE PHOSPHORILATION

The cardioprotective mechanism of  $K_{ATP}$  channel openers and especially their influence on mitochondrial respiration has not been clarified yet. In this article we investigated the effect of DiazoFm and DiazoFp, the new fluor-containing analogues of diazoxide and the potential mitochondrial  $K_{ATP}$  channel openers, on the oxidative phosphorylation in the isolated mitochondria. It was shown that the influence of  $K_{ATP}$  channel openers on ADP-stimulated oxygen consumption (State 3) depended on the substrates we used (succinate or 2-oxoglutarate sodium). We

have shown that the depression of State 3 was less when we used DiazoFm (30 mM) and DiazoFp (30 mM) in comparison with Diazoxide in experiments where succinate was used. The fluor-containing  $K_{ATP}$  channels openers did not significantly change the activity of succinate dehydrogenase in comparison with diazoxide (it decreased succinate dehydrogenase activity by 27%). Thus, the fluor-containing analogues of diazoxide did not significant influence on the complex II of the respiratory chain. In the other experiments when we used 2-oxoglutarate sodium as an oxidative substrate, DiazoFp increased ADP-stimulated oxygen consumption by 33%. All the studied  $K_{ATP}$  openers have an uncoupling effect, regardless the substrates we used. This effect was more significant when we used succinate as a substrate. We have shown that the uncoupling effect of oxidative phosphorylation is a consequence of  $K_{ATP}$  channels activation. This statement was proved by 5-hydroxydecanoate (200 mM) with depressed influence of Diazoxide and its fluor-containing analogues.

Conclusion. The fluor-containing  $K_{ATP}$  channels openers had not direct influence on the respiratory chain in mitochondria, but activation mitochondrial  $K_{ATP}$  channels by them lead to uncoupling phosphorylation and respiration.

*O. O. Bogomolets Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Єщенко Н.Д., Вольский Г.Г. Определение количества янтарной кислоты и активности сукцинатдегидрогеназы. – В кн.: Методы биохимических исследований – Л.: Изд-во Ленинград. ун-та. – 1982. – С. 207–212.
2. Кудзина К.Ю., Евтодиенко Ю.В. Реконструкция  $K^+$ -транспортующей системы митохондрий на искусственных фосфолипидных мембранах // Биофизика. – 1974. – **19**, №5. – С. 765–766.
3. Лукьянова Л.Д. Роль биоэнергетических нарушений в патогенезе гипоксии // Патол. физиология. и эксперим. терапия. – 2004. – №2. – С. 2–11.
4. Нагібін В.С., Досенко В.Є., Пивовар С.М. та ін. Фторований аналог діазоксиду попереджає апоптоз неонатальних кардіоміоцитів під час аноксії-реоксигенації // Фізіол. журн. – 2004. – **50**, №3. – С. 3–8.
5. Пивовар С.М., Струтинський Р.Б., Ягупольський Л.М., Мойбенко О.О. Дослідження механізму дії нових фторвмісних аналогів діазоксиду на судинний тонус // Там само. – № 2. – С. 27–33.
6. Практикум по биохимии / Под ред. С.Е. Северина и Г.А. Соловьевой. – М.: Изд-во Москов. ун-та, 1989. – С. 480–483.
7. Ткаченко Н.М., Мойбенко О.О., Кургалюк Н.М. Вплив модуляторів АТФ-чутливих калієвих каналів і інтервальної гіпоксії на мітохондріальне дихання при стресі // Укр. біохім. журн. – 2003. – **75**, №6. – С. 15–22.
8. Ткаченко Г.М., Кургалюк Н.М., Кордунська О.Є. Роль діазоксиду в процесах мітохондріального енергозабезпечення печінки залежно від індивідуальної фізіологічної резистентності у шурів // Клін. та експерим. патологія. – 2004. – **3**, № 2. – С. 468–470.
9. Cancherini D.V., Trabuco L.G., Reboucas N.A., Kowaltowski A.J. ATP-sensitive  $K^+$  channels in renal mitochondria // Amer. J. Physiol. Renal. Physiol. – 2003. – **285**, №6 – P. 1291–1296.
10. Chance B., Williams G.R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation // Adv. Enzymol. – 1956. – **17**. – P. 65–134.
11. Crestanello J.A., Doliba N.M., Babsky A.M. et al. Opening of potassium channels protects mitochondrial function from calcium overload // J. Surg. Res. – 2000. – **94**. – P. 116–123.
12. Dzeja P.P., Bast P., Ozcan C. et al. Targeting nucleotide-requiring enzymes: implications for diazoxide-induced cardioprotection // Amer. J. Physiol. Heart Circulat. Physiol. – 2003. – **284**. – P. 1048–1056.
13. Eells J.T., Henry M.M., Gross G.J., Baker J.E. Increased mitochondrial KATP channel activity during chronic myocardial hypoxia is cardioprotection mediated by improved bioenergetics? // Circulat. Res. – 2000. – **87**. – P. 915–921.
14. Fernandes M.A, Santos M.S., Moreno A.J. et al. Glibenclamide interferes with mitochondrial bioenergetics by inducing changes on membrane ion permeability // J. Biochem. Mol. Toxicol. – 2004. – **18**, №3. – P. 162–169.
15. Garlid K.D., Paucek P., Yarov-Yarovoy V. et al. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive  $K^+$  channels: possible mechanism of cardioprotection // Circulat. Res. – 1997. – **81**. – P. 1072–1072.
16. Grimmsmann T. Rustenbeck I. Direct effects of diazoxide on mitochondria in pancreatic B-cells and on isolated liver mitochondria // Brit. J. Pharmacol. – 1998. – **123**. – P. 781–788.
17. Hanley P.J., Mickel M., Loffler M. et al. KATP channel-independents targets of diazoxide and 5-hydroxydecanoate in the heart // J. Physiol. – 2002. – **542**, №3. – P. 735–741.
18. Hanley P.J., Drose S., Brandt U. et al. 5-Hydroxydecanoate is metabolised in mitochondria and creates a rate-limiting bottleneck for {beta}-oxidation of fatty acids // J. Physiol. – 2004. – **562**, Pt 2. – P. 307–318.
19. Holmuhamedov E.L., Jahangir A. Potassium channel openers are uncoupling protonophores: implication in cardioprotection // FEBS Lett. – 2004. – **568**, № 1–3. – P. 167–170.
20. Holmuhamedov E.L., Jovanovic S., Dzeja P.P. et al. Mitochondrial ATP-sensirive  $K^+$  channels modulate cardiac mitochondrial function // Amer. J. Physiol. Heart Circulat. Physiol. – 1998. – **275**. – P. 1567–1576.
21. Jaburek M., Yarov-Yarovoy V., Paucek P., Garlid K.D. State-dependent inhibition of the mitochondrial  $K_{ATP}$



- channel by glyburide and 5-hydroxydecanoate // J. Biol. Chem. – 1998. – **273**, № 22. – P. 13578–13582.
22. Lowry O.H., Rosenbrough N., Farr A.L., Randall R.I. Protein measurement with the Folin phenol reagent // Ibid. – 1951. – **193**, № 1. – P. 265–275.
23. Lambert N., Idahl L.-A., Ammon H.P.T. K-ATP channel independent effects of pinacidil on ATP production in isolated cardiomyocyte or pancreatic  $\beta$ -cell mitochondria // Biochem. Pharmacol. – 2003. – 65. – P. 1835–1841.
24. Lim K.H.H., Javadov S.A., Das M. et al. The effects of ischaemic preconditioning, diazoxide and 5-hydroxydecanoate on rat heart mitochondrial volume and respiration // J. Physiol. – 2002. – **545**, №. 3. – P. 961–974.
25. Mamon S., Roucou X., Rigoulet M., Guerin M. Stimulation of oxidative phosphorylation by electrophoretic  $K^+$  entry associated to electroneutral  $K^+/H^+$  exchange in yeast mitochondria // Biochim. et Biophys. Acta. – 1995. – **1231**. – P. 282–288.
26. Minners J., McLeod C.J., Sack M.N. Mitochondrial plasticity in classical ischemic preconditioning-moving beyond the mitochondrial  $K_{ATP}$  channel // Cardiovasc. Res. – 2003. – **59**, №1. – P. 1–6.
27. O'Rourke B. Evidence for mitochondrial  $K^+$  channels and their role in cardioprotection // Circulat. Res. – 2004. – **94**. – P.420–432.
28. Paucek P., Mironovae G., Mahdi F. et al. Reconstitution and partial purification of the glibenclamide-sensitive, ATP-dependent  $K^+$  channel from rat liver and beef heart mitochondria // J. Biol. Chem. – 1992 – **267**, № 36. – P. 26062–26069.
29. Schafer G., Wegener C., Portenhauser R., Bojanovski D. Diazoxide, an inhibitor of succinate oxidation // Biochem. Pharmacol. – 1969. – **18**. – P. 2678–2681.
30. Tritto I., D'Andrea D., Eramo N. et al. Oxygen radicals can induce preconditioning in rabbit hearts // Circulat. Res. – 1997. – **80**. – P. 743–748.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;  
Ин-т орган. хімії НАН України, Київ*

*Матеріал надійшов до  
редакції 29.04.2005*