

Участь кальційзалежних калієвих каналів великої провідності в модуляції параметрів дихання мітохондрій міокарда докозагексаєсновою кислотою

О.С. Панасюк, О.І. Бондаренко

Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАН України; e-mail: panasiuk@biph.kiev.ua

Досліджували вплив докозагексаєсної кислоти (ДГК), ω -3 поліненасиченої жирної кислоти (ПНЖК), на параметри дихання ізольованих мітохондрій серця щурів та роль мітохондріальних кальційзалежних калієвих каналів великої провідності (ВКСа) в реалізації цих ефектів. Із застосуванням методу patch-clamp показано, що функціональні ВКСа-канали експресуються на внутрішній мітохондріальній мембрані кардіальних клітин і їх активність збільшується при додаванні ДГК. Було досліджено роль мітохондріальних ВКСа-каналів в модуляції параметрів дихання мітохондрій. Слід відмітити, що за наявності 10 мкмоль/л Ca^{2+} , додавання ДГК до суспензії мітохондрій призводило до зменшення швидкості поглинання кисню мітохондріями у функціональному стані V4. Зменшення дихального контролю (ДК) у відповідь на додавання Ca^{2+} було менш вираженим за наявності ДГК. Такий самий ефект викликав активатор ВКСа-каналів NS1619. Інгібітор ВКСа-каналів паксилін (1 мкмоль/л) повністю пригнічував вплив ДГК та NS1619 на ДК. Таким чином, мітохондріальні ВКСа-канали залучені в реалізації впливу ДГК на процеси дихання мітохондрій.

Ключові слова: мітохондрії; поліненасичені жирні кислоти; калієві канали.

ВСТУП

Давно відомо про позитивний вплив споживання ω -3 поліненасичених жирних кислот (ПНЖК) на частоту виникнення серцево-судинних захворювань [1]. Хоча механізми, які забезпечують такий ефект до кінця не з'ясовані, літературні дані вказують на те, що він значною мірою може пояснюватись не лише дією на плазматичну мембрану клітин міокарда, але й на мітохондрії [2, 3].

Різке зростання вмісту мітохондріального Ca^{2+} (т. з. Ca^{2+} -перенавантаження) спричинює серцеву дисфункцію через загибель кардіоміоцитів. Два ключові механізми, які призводять до пошкодження кардіоміоцитів при зростанні вмісту Ca^{2+} - це генерація мітохондріями активних форм кисню (АФК) та відкриття мітохондріальної пори транзитної проникності (МППП).

Досить тривалий час активація мітохондріальних та сарколемальних АТФ-залежних

© О.С. Панасюк, О.І. Бондаренко

калієвих каналів (K_{ATP} -каналів) вважалась основним кардіопротекторним механізмом і чимало досліджень присвячено вивченню кардіозахисної дії їх активаторів [4]. Крім K_{ATP} -каналів у серцевому м'язі є й інші типи K^+ -каналів, зокрема Ca^{2+} -залежні K^+ -канали великої провідності (ВКСа), наявність яких нещодавно була підтверджена на внутрішній мембрані мітохондрій серця, але не на плазматичній мембрані [5]. Найновіші дослідження вказують про залучення мітохондріальних ВКСа-каналів у кардіопротекцію під час ішемічно-реперфузійного пошкодження серця [2, 6, 7]. Залежність активності ВКСа-каналів від концентрації внутрішньоклітинного кальцію і мембранного потенціалу, а також здатність транслювати динаміку концентрації вільного кальцію у зміни мембранного потенціалу робить ці канали важливою сигнальною системою як в мітохондрах, так і в судинних клітинах [7, 8]. Визначення впливу ω -3

ПНЖК на функціональний стан мітохондрій, параметри дихання та ролі мітохондріальних ВКСа-каналів у реалізації ефектів ω -3 ПНЖК є важливим для розширення сучасних уявлень щодо механізмів кардіопротекції.

Один із представників ПНЖК класу ω -3 є докозагексаєнова кислота (ДГК). Вона є складовою ліпідів більшості тканин тварин. Кардіопротекторний ефект ДГК та інших представників ω -3 ПНЖК реалізується завдяки покращенню ендотеліязалежного розслаблення та кардіогемодинаміки, функції лівого шлуночка [9], попередженню або зменшенню реперфузійних пошкоджень серця [2, 10]. Молекулярні механізми цих сприятливих ефектів пояснювали антиоксидантними та протизапальними властивостями ПНЖК, такими як зменшення продукції простагландинів та посилення системи антиоксидантного захисту [10]. Раніше ми показали, що додавання у зовнішній розчин ДГК призводить до гіперполяризації ендотеліальних клітин і підвищення активності плазмалемальних ВКСа-каналів [11]. Метою нашої роботи було дослідити вплив ДГК на активність мітохондріальних ВКСа-каналів та виявити їх можливу участь в опосередкованні захисного прояву ω -3 ПНЖК на параметри дихання мітохондрій кардіоміоцитів при перенавантаженні Ca^{2+} .

МЕТОДИКА

Експерименти проводили на дорослих білих щурах-самцях лінії Вістар масою близько 250 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. Дослідження проведені з урахуванням Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист тварин, які використовуються для експериментальних цілей (Страсбург, 1986).

Дослідження впливу ДГК на поодинокую активність мітохондріальних ВКСа-каналів було проведено на мітопластах, виділених з культури кардіальних клітин лінії HL-1, на

базі Інституту молекулярної біології і біохімії Медичного Університету м. Грац (Австрія). Клітини вирощували в середовищі Ігла в модифікації Дульбекко (DMEM) з додаванням 10% бичачої сироватки, і підтримували в інкубаторі при 37°C в атмосфері 5% CO_2 .

Мітохондрії з культури кардіальних клітин лінії HL-1 виділяли диференційним центрифугуванням. Клітини суспендували в буфері (ммоль/л): цукроза – 200, тріс-MOPS – 10 ЕГТА – 1 та інгібітор протеази (1:50, P8340 «Sigma», Австрія); рН доводили до 7,2 за допомогою тріс та гомогенізували тefлоновим гомогенізатором. Залишок клітин осаджували при 900g впродовж 10 хв. Супернатант центрифугували при 3000g впродовж 20 хв. Осад з мітохондріями промивали та знов центрифугували при 7000g впродовж 15 хв.

Мітопласти отримували 10-хвилинною інкубацією ізольованих мітохондрій в гіпотонічному розчині такого складу (ммоль/л): 5 – HEPES, 5 – цукрози, 1 – ЕГТА. рН доводили до 7,2 за допомогою КОН, як описано нами раніше [12]. Після інкубації ізотонічність відновлювали додаванням (1:5 об'єму) гіпертонічного розчину такого складу (ммоль/л): 750 – KCl, 80 – HEPES, 1 – ЕГТА; рН доводили до 7,2 за допомогою КОН. Ізольовані мітопласти виглядали як прозорі везикули з залишками зовнішньої мембрани. Мітопласти візуалізували за допомогою оптичного інвертованого мікроскопа при збільшенні у 630 разів.

Мітохондрій серця виділяли диференційним центрифугуванням як описано раніше [3, 13]. Реєстрацію поглинання кисню ізольованими мітохондріями серця проводили з використанням закритого електрода Кларка та прилада оксиграф («Hansatech», Велика Британія). Середовище інкубації (CI) містило (ммоль/л): 120 – KCl, 10 – тріс-HCl, 10 – KH_2PO_4 ; рН 7,2. Як субстрат окиснення використовували 10 ммоль/л сукцинату натрію. Активне дихання ізольованих мітохондрій ініціювали додаванням 400 мкмоль/л АДФ. Обсяг камери був 1 мл.

За отриманими записами обчислювали

параметри дихання мітохондрій: стан дихання у відносному спокої (V2), швидкість фосфорилуючого (у метаболічному стані 3 за Чансом, V3) та контрольованого (в метаболічному стані 4, V4) дихання мітохондрій, дихальний контроль (ДК) за Чансом (V3/V4) коефіцієнт ефективності фосфорилування АДФ/О [13]. Швидкість споживання кисню наведена в наномолях O_2 на $1 \text{ хв}^{-1} \text{ на } 1 \text{ мг}^{-1}$ білка. Концентрація білка становила 1 мг/мл , яку визначали за методом Бредфорда. ДГК, NS1619 та паксилін розчиняли в 96%-му спирті до концентрацій 30, 30 та 10 ммоль/л відповідно. NS1619 та паксилін були придбані у «Alomone Labs» (Ізраїль); ДГК- у «Sigma Aldrich» (Австрія).

Скляні мікроелектроди для проведення електрофізіологічних експериментів виготовляли з боросилікатного скла із зовнішнім діаметром $1,5 \text{ мм}$. Після оплавлення кінчиків та наповнення розчином із складом, наведеним нижче, опір піпеток становив $7\text{--}10 \text{ МОм}$. Піпеточний розчин містив (ммоль/л): $\text{KCl} - 140$, $\text{HEPES} - 10$, $\text{EGTA} - 5$. Концентрацію вільного Ca^{2+} доводили до 10 мкмоль/л додаванням $4,93 \text{ ммоль/л CaCl}_2$. Склад зовнішнього розчину був аналогічним. Струми реєстрували за допомогою підсилювача (EPC7, “List Electronics”, Німеччина) в конфігурації mitoplast-attached. Аналіз результатів проводили з використанням програмного забезпечення Clampex і Clampfit pClamp (V9.2, Axon Instruments).

Експериментальні результати представлені як середнє значення $\pm \text{s.e.m}$. Статистичну обробку проводили з використанням критерію t Стьюдента (парний або непарний у відповідних випадках), значення $P < 0,05$ розглядали як вірогідні.

РЕЗУЛЬТАТИ

ДГК збільшує активність ВКСа-каналів внутрішньої мембрани мітохондрій кардіальних клітин H1-1

Застосування конфігурації mitoplast-attached

до ізольованих мітопластів у симетричних за калієм розчинах дало змогу виявити поодинокую активність великої провідності ($\sim 300 \text{ пС}$). При збільшенні значень потенціалу фіксації від $+20$ до $+80 \text{ мВ}$, активність каналу збільшувалася (див. рис. 1, а), що доводить потенціалзалежність каналу. Суперфузія мітопластів розчином, що містив 1 ммоль/л EGTA без додавання Ca^{2+} , призводила до пригнічення активності (див. рис. 1. б), що також говорить про Ca^{2+} -залежність каналу. Додавання ДГК до ізольованих мітопластів збільшувало активність каналів при фіксованому потенціалі і концентрації кальцію без суттєвих змін амплітуди струму каналів. Додавання у зовнішній розчин паксиліну (3 мкмоль/л), селективного інгібітора ВКСа-каналів, призводило до пригнічення активності каналу (див. рис. 1, в). Таким чином, отримані результати дали змогу ідентифікувати функціональну активність ВКСа-каналів на внутрішній мембрані мітохондрій кардіальних клітин і виявити, що ДГК має прямий потенціуючий вплив на їх активність.

Участь ВКСа-каналів у захисному ефекті ω -3 ПНЖК на параметри дихання мітохондрій міокарда при високих концентраціях кальцію

Додавання ДГК (3 мкмоль/л) до суспензії мітохондрій у номінально безкальцієвому розчині призводило до зменшення швидкості дихання в стані V3 на $38,1\%$ (з $99,79 \pm 6,82$ до $61,75 \pm 5,29 \text{ нмоль } O_2 \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка, див. рис. 2, б), V4 достовірно не змінилось (з $22,26 \pm 1,5$ до $23,5 \pm 4,23 \text{ нмоль } O_2 \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка, див. рис. 2, в), ДК зменшився на $29,5\%$ (з $4,5 \pm 0,2$ до $3,2 \pm 0,35$) порівняно з контролем (див. рис. 2, г).

Додавання до суспензії мітохондрій активатора ВКСа-каналів NS1619 (30 мкмоль/л) призводило до стимуляції швидкості дихання в станах V2 на $20,4\%$ (з $44,19 \pm 2,24$ до $53,18 \pm 4,38 \text{ нмоль } O_2 \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка, див. рис. 2, а) та V4 на $40,61\%$ (з $22,26 \pm 1,51$ до $31,32 \pm 5,82 \text{ нмоль } O_2 \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка, див. рис. 2, в). У номінально безкальцієвому розчині спостерігалось зменшення ДК на $40,71\%$ з $4,54$

$\pm 0,21$ до $2,69 \pm 0,28$ (див. рис. 2, г). Отримані результати узгоджуються з даними літератури [9]. Швидкість дихання в стані V3 в наших дослідах не змінювалась (див. рис. 2, б).

Надалі ми досліджували чи впливає підвищення вмісту кальцію у розчині на ефекти ДГК та NS1619 на параметри дихання мітохондрій. Після додавання у розчин $10 \text{ мкмоль/л Ca}^{2+}$ швидкість дихання в стані V3 знижувалась на $25,4\%$ (від $99,79 \pm 6,82$

до $79,58 \pm 3,87 \text{ нмоль O}_2 \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка, див. рис. 2, б). NS1619 не усував негативний вплив Ca^{2+} на V3 (NS1619: $73,25 \pm 10,98 \text{ нмоль O}_2 \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка, див. рис. 2, б), але усував вплив Ca^{2+} на V4 (контроль: $22,26 \pm 1,51$, Ca^{2+} : $35,08 \pm 4,96$, NS1619: $17,87 \pm 1,27 \text{ нмоль O}_2 \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка, див. рис. 2, в), та на ДК (контроль: $4,54 \pm 0,2$, Ca^{2+} : $2,58 \pm 0,21$, NS1619: $3,61 \pm 0,41$, див. рис. 2, г).

Дія ДГК (3 мкмоль/л) перед додаванням

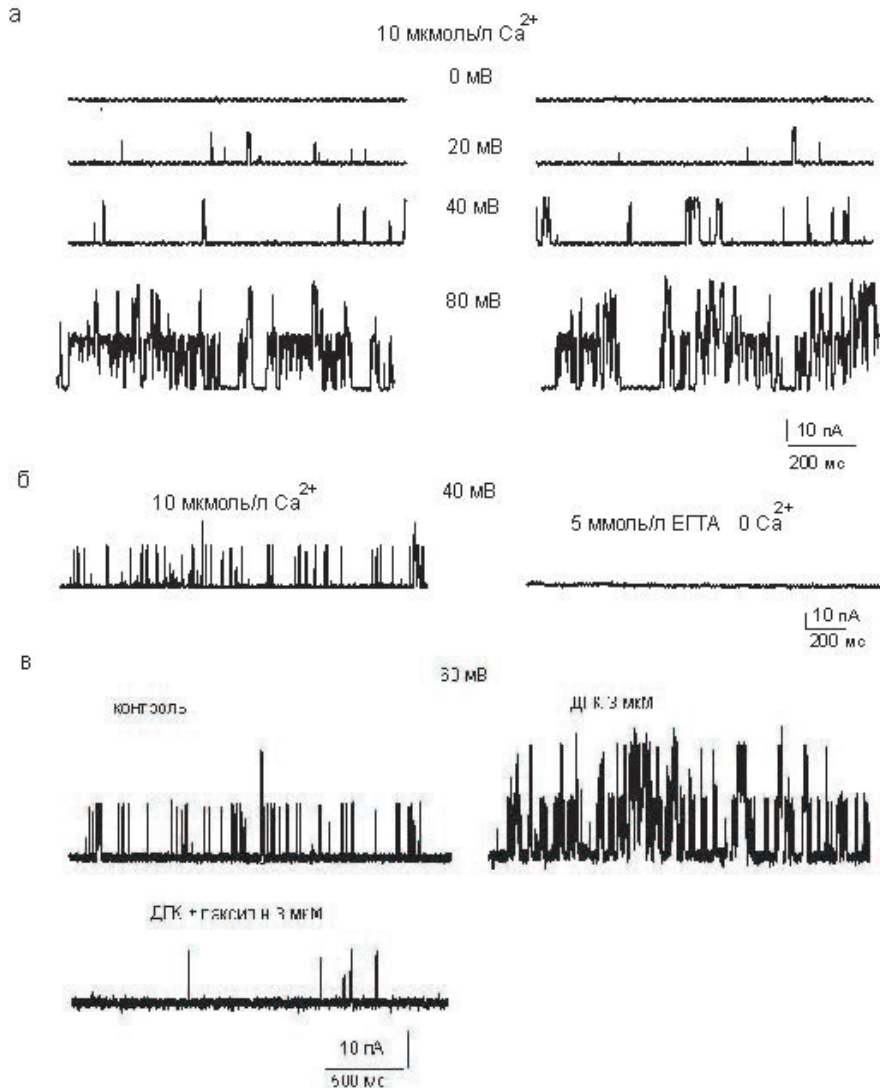


Рис. 1. Докозагексаснова кислота (ДГК) збільшує активність ВКСа-каналів внутрішньої мембрани мітохондрій (ВММ) кардіальних клітин HI-1.

а – калієві струми через ВКСа-канали ВММ при різних підтримуючих потенціалах. Конфігурація mitoplast-attached. б – струми при $10 \text{ мкмоль/л Ca}^{2+}$ та після хелатування Ca^{2+} . в – струми до та після додавання ДГК (праворуч) та ДГК в комбінації з паксиліном (знизу)

Ca²⁺ (10 мкмоль/л) в середовище інкубації (СІ) попереджала подальше зниження дихання в стані V3 (58 ± 3,69 щодо 61,75 ± 5,29 нмоль O₂·хв⁻¹·мг⁻¹ білка, див. рис. 2, б). Зменшення дихального контролю (ДК) у відповідь на додавання Ca²⁺ (з 4,54 ± 0,21 до 2,58 ± 0,21) було менш вираженим (з 3,2 ± 0,35 до 3,35 ± 0,31, див. рис. 2, г). За наявності ДГК зростання V4 у відповідь на додавання Ca²⁺ не спостерігалось, а V4 підвищилася з 23,5 ± 4,23 до 28,78 ± 4,41 нмоль O₂·хв⁻¹·мг⁻¹

білка, в той час як за відсутності ДГК вона зростала з 22,26 ± 1,51 до 35,08 ± 4,96 нмоль O₂ (див. рис. 2, в).

Інгібітор ВКСа-каналів паксилін (1 мкмоль/л) не попереджав зростання V2 у відповідь на дію Ca²⁺ за наявності NS1619 (див. рис. 2, а) та зменшення V3 (див. рис. 2, б), але відмінив захисний вплив NS1619 при V4 (35 ± 5,82 нмоль O₂·хв⁻¹·мг⁻¹ білка, див. рис. 2, в.) та ДК (2,11 ± 0,17, див. рис. 2, г). У разі дії ДГК, паксилін нівелював захист від Ca²⁺ на ДК

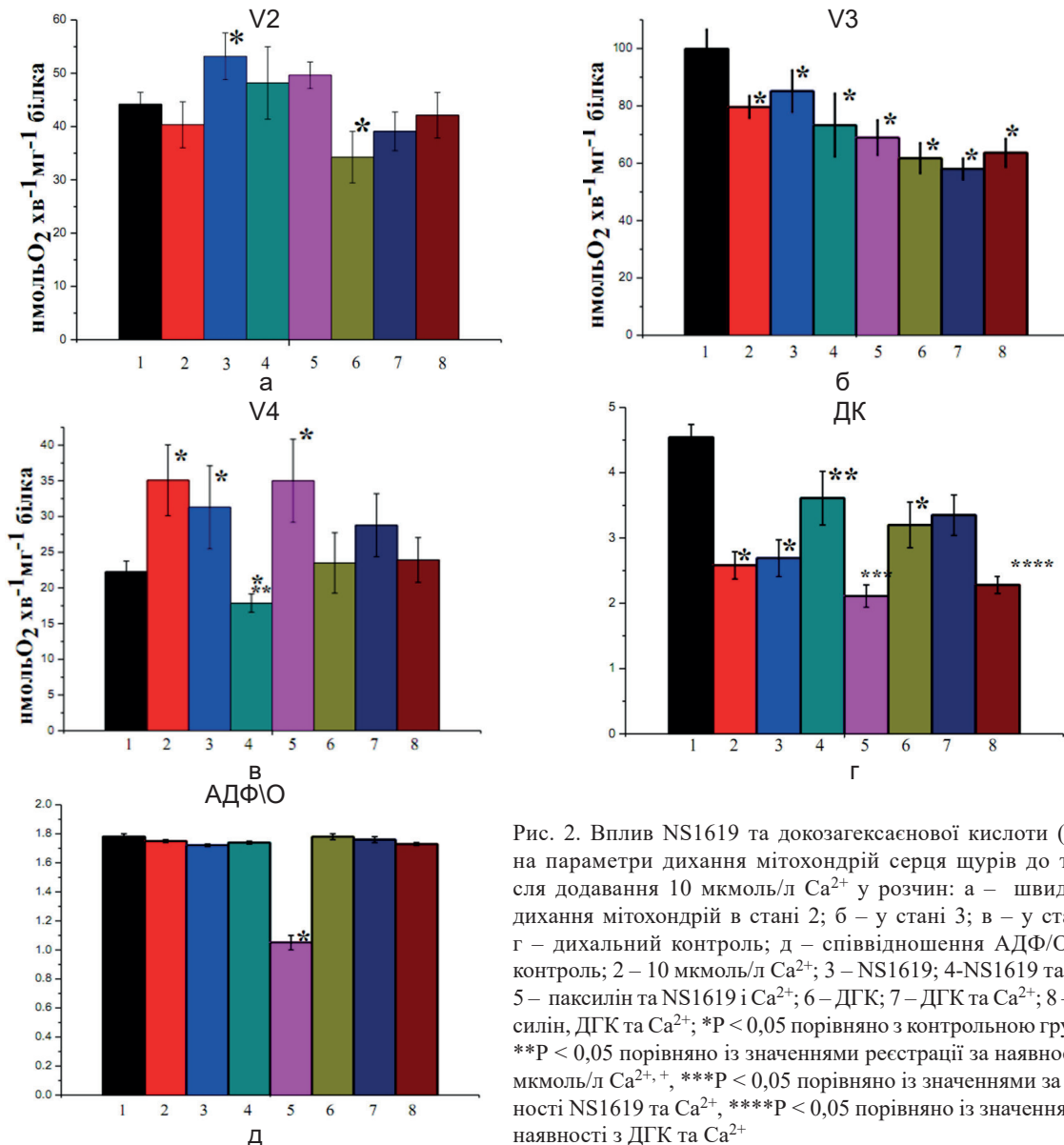


Рис. 2. Вплив NS1619 та докозагексанової кислоти (ДГК) на параметри дихання мітохондрій серця щурів до та після додавання 10 мкмоль/л Ca²⁺ у розчин: а – швидкість дихання мітохондрій в стані 2; б – у стані 3; в – у стані 4; г – дихальний контроль; д – співвідношення АДФ/О. 1 – контроль; 2 – 10 мкмоль/л Ca²⁺; 3 – NS1619; 4 – NS1619 та Ca²⁺; 5 – паксилін та NS1619 і Ca²⁺; 6 – ДГК; 7 – ДГК та Ca²⁺; 8 – паксилін, ДГК та Ca²⁺; *P < 0,05 порівняно з контрольною групою, **P < 0,05 порівняно із значеннями ресстрації за наявності 10 мкмоль/л Ca²⁺, ***P < 0,05 порівняно із значеннями за наявності NS1619 та Ca²⁺, ****P < 0,05 порівняно із значеннями за наявності з ДГК та Ca²⁺

($2,28 \pm 0,13$ щодо $3,35 \pm 0,31$, див. рис. 2, г), але не зміг при станах дихання V3 ($63,62 \pm 4,9$ проти $58,14 \pm 3,69$ нмоль $O_2 \cdot xv^{-1} \cdot mg^{-1}$ білка, див. рис. 2, б) та V4 ($23,91 \pm 3,14$ проти $28,78 \pm 4,41$ нмоль $O_2 \cdot xv^{-1} \cdot mg^{-1}$ білка, див. рис. 2, в). Паксилін знижував відношення АДФ/О при дії NS1619, але не за впливу ДГК (рис. 2, д).

ОБГОВОРЕННЯ

Раніше нами показано, що дієта з додаванням ω -3 ПНЖК захищає мітохондрії від Ca^{2+} -індукованого набухання [3], що свідчить про здатність жирних кислот пригнічувати чутливість МПТП до відкриття. Оскільки відомо, що активація калієвих каналів внутрішньої мітохондріальної мембрани має кардіопротекторний вплив [4], і Ca^{2+} -індуковане надходження калію в мітохондрії стимулює їх дихання [14], в цій роботі ми досліджували можливе залучення мітохондріальних ВКСа-каналів в модуляцію мітохондріального дихання ДГК. Літературні дані щодо впливу ω -3 ПНЖК на дихання мітохондрій при Ca^{2+} -перенавантаженні відсутні. Також немає літературних даних стосовно ролі мітохондріальних ВКСа-каналів у регуляції дихання мітохондрій при Ca^{2+} -перенавантаженні.

Нами показано, що ВКСа-канали є на внутрішній мітохондріальній мембрані кардіальних клітин і додавання ДГК призводить до збільшення їх активності. Якщо припущення, що захисна дія ω -3 ПНЖК на мітохондрії опосередкована дією ВКСа-каналів правильно, то при порівнянні параметрів дихання мітохондрій мають бути спільні риси у відповідях на ω -3 ПНЖК та Ca^{2+} та на дію активатору ВКСа-каналів NS1619 та Ca^{2+} .

Результати наших досліджень вказують на схожі риси впливу ДГК і NS1619 на параметри дихання мітохондрій міокарда. Так, за наявності обох агентів зростання V4 при додаванні Ca^{2+} повністю пригнічувалось. Також спостерігалось зменшення ДК у відповідь на додавання Ca^{2+} і воно було менш вираженим. Захисна дія ДГК і NS1619 на

ДК за наявності 10 мкмоль/л Ca^{2+} попереджувалась впливом паксиліну. Ці результати свідчать про залучення мітохондріальних ВКСа-каналів у регуляцію дихання мітохондрій в стані V4 при дії ДГК та NS1619.

Нами були також виявлені і деякі відмінності впливу ДГК та NS1619 на показники дихання мітохондрій. Так, тільки дія ДГК, але не NS1619, попереджувала зниження V3 при Ca^{2+} -перенавантаженні; при стані дихання V4 паксилін відміняв захисну дію NS1619, але не вплив ДГК. У разі введення паксиліну знижувалося відношення АДФ/О при дії NS1619, але не ДГК.

За даними деяких досліджень, NS1619 (30 мкмоль/л) прискорює дихання мітохондрій в станах V2 та V4, причому блокатор ВКСа-каналів паксилін нівелював цей ефект [14]. За наявності пірувату як субстрату, NS1619 в концентрації 10, 20 і 30 мкмоль/л не впливав на стан V3 дихання, але при концентрації 50 мкмоль/л він значно його зменшував. За наявності сукцинату кожна з цих концентрацій NS1619 призводила до зменшення швидкості дихання в стані V3. Будь-яка концентрація NS1619 дещо зменшувала ДК при дії всіх субстратів, вказуючи на м'яке роз'єднання. За наявності сукцинату, паксилін не блокував вплив NS1619 на швидкість дихання в стані V3. Тобто ці дані [14] демонструють, що відкривання ВКСа-каналів прискорює швидкість дихання в станах V2 та V4, але не впливає на V3. Результати наших досліджень стосовно дії NS1619 на показники дихання мітохондрій узгоджуються з даними вказаних авторів.

Очевидно, що біоенергетика мітохондрій та гомеостаз кальцію складно взаємодіють [15]. Загальновідомо про кальцієву чутливість ключових ферментів циклу трикарбонових кислот. Відомо, що різке зростання вмісту мітохондріального Ca^{2+} спричинює серцеву дисфункцію через загибель кардіоміоцитів. Два ключові механізми, які призводять до пошкодження кардіоміоцитів при зростанні вмісту Ca^{2+} - це генерація мітохондріями АФК та відкриття МПТП [15]. Прискорення

активності циклу трикарбонових кислот за наявності Ca^{2+} призводить до посиленого витоку електронів і, таким чином, до формування АФК на електронно-транспортному ланцюгу. Також мітохондріальне Ca^{2+} -перенавантаження пригнічує глутатіонредуктазу – антиоксидант матриксу.

У дослідках на мітохондріях мозку [16] було показано, що Ca^{2+} інгібує дихання вже у концентрації $5 \cdot 10^{-7}$ моль/л, причому часо- та концентраційнозалежно. В наших дослідках з сукцинатом як субстратом, Ca^{2+} в концентрації 10 мкмоль/л, знижував швидкість дихання мітохондрій серця в стані V3, прискорював в стані V4 та зменшував ДК. Літературні дані стосовно впливу ω -3 ПНЖК на дихання мітохондрій не є однозначними. Так, повідомлялося, що дієта збагачена ω -3 ПНЖК не впливає на швидкість дихання мітохондрій в станах V3, V4, ДК та АДФ/О [17]. З іншого боку, показано, що годування щурів дієтою, збагаченою ω -3 ПНЖК, призводить до зменшення швидкості дихання в станах V3, V4, та ДК [18]. Причина цих неузгоджень не є зрозумілою. Один з можливих механізмів дії ω -3 ПНЖК на функцію ВКСа-каналів – це пряма взаємодія молекул жирних кислот і білка каналу чи білків, асоційованих з ним. Альтернативно, жирні кислоти можуть змінювати ліпідні властивості мембрани, впливаючи на взаємодію білок – ліпід [19].

Хоча NS1619 вважається досить селективним активатором ВКСа-каналів, деякі дані літератури свідчать, що він викликає апоптоз. Вказані вище відмінності в дії NS1619 та ДГК можуть пояснюватись впливом як NS1619, так і ДГК на ВКСа-незалежні механізми. Проте пригнічення паксиліном впливу ДГК на показники дихання, зокрема відновлення швидкості дихання в стані V3, свідчить про залучення мітохондріальних ВКСа-каналів у модуляцію мітохондріального дихання ω -3 ПНЖК. Таким чином, показано залучення мітохондріальних ВКСа-каналів у реалізацію ефектів ДГК на процеси дихання мітохондрій.

Acknowledgments. This study was supported by Swiss National Science Foundation (IZ73ZO_152578/1, to A. I. Bondarenko) and Austrian Science Fund (P27238-B27, to A. I. Bondarenko).

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.

О.С. Панасюк, А.И. Бондаренко

УЧАСТИЕ КАЛЬЦИЙЗАВИСИМЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ БОЛЬШОЙ ПРОВОДИМОСТИ В МОДУЛЯЦИИ ПАРАМЕТРОВ ДЫХАНИЯ МИТОХОНДРИЙ МИОКАРДА ДОКОЗАГЕКСАЕНОВОЙ КИСЛОТОЙ

Исследовали влияние докозагексаеновой кислоты (ДГК), ПНЖК класса ω -3, на параметры дыхания изолированных митохондрий и роль митохондриальных кальцийзависимых калиевых каналов большой проводимости (ВКСа) в реализации этих эффектов. С применением метода patch-clamp было показано, что функциональные ВКСа-каналы экспрессируются на внутренней митохондриальной мембране кардиальных клеток и их активность увеличивается при добавлении ДГК. Была исследована роль митохондриальных ВКСа-каналов в регуляции процессов дыхания митохондрий. Показано, что в присутствии 10 мкмоль/л Ca^{2+} , добавление ДГК приводит к уменьшению скорости поглощения кислорода митохондриями, уменьшение дыхательного контроля было менее выраженным. Качественно такой же эффект вызвал NS1619, активатор ВКСа-каналов. Ингибитор ВКСа-каналов паксилин отменял защитное влияние ДГК и NS1619 на показатели ДК в присутствии 10 мкмоль/л Ca^{2+} . Сделан вывод, что митохондриальные ВКСа-каналы участвуют в реализации эффектов ДГК на процессы дыхания митохондрий.

Ключевые слова: митохондрии; полиненасыщенные жирные кислоты; калиевые каналы.

O.S. Panasiuk, A.I. Bondarenko

ВКСА CHANNELS MEDIATE THE EFFECTS OF DOCOSAHExAENOIC ACID ON THE RESPIRATION PARAMETERS OF MYOCARDIAL MITOCHONDRIA AT HIGH CALCIUM CONCENTRATIONS

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, NAS Ukraine, Kyiv; e-mail: panasiuk@biph.kiev.ua

Omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) provide protection against myocardial damage in ischemia-reperfusion.

However, the mechanisms that provide cardioprotection are not fully understood. In this study, we investigated the effect of docosahexaenoic acid (DHA), a member of omega -3 PUFA, on mitochondrial respiration parameters and the role of mitochondrial calcium-dependent potassium channels of large conductance (BKCa) in the implementation of these effects. Using the patch-clamp method, it was shown that functional BKCa channels are expressed in the inner mitochondrial membrane of cardiac cells and their activity increases with the addition of DHA. We investigated the role of mitochondrial BKCa channels in the regulation of mitochondrial respiratory processes. In experiments with isolated mitochondria from rat hearts, we showed that DHA prevented an increase in the respiratory rate of mitochondria in the V4 state and a decrease in the respiratory control elicited by addition of 10 μM Ca^{2+} . Qualitatively the same effect was caused by NS1619, the BKCa opener. In the presence of 10 μM Ca^{2+} , the BKCa channel inhibitor paxilin (1 μM) prevented the protective effect of DHA and NS1619 on the parameters of respiratory control. We conclude that mitochondrial BKCa channels are involved in the implementation of the effects of DHA on mitochondrial respiration.

Key words: mitochondria; polyunsaturated fatty acids; potassium channels.

REFERENCES

- Bjerregaard P, Dyerberg J. Mortality from ischaemic heart disease and cerebrovascular disease in Greenland. *J Epidemiol.* 1988;17:3.
- Jasova M, Kancirova I, Waczulikova I, Ferko M. Mitochondria as a target of cardioprotection in models of preconditioning. *J Bioenerg Biomembr.* 2017;49:357-68.
- Panasiuk O, Shysh A, Bondarenko A, Moibenko O. Omega-3 polyunsaturated fatty acid-enriched diet differentially protects two subpopulations of myocardial mitochondria against Ca^{2+} -induced injury. *Exp Clin Cardiol.* 2013; 18:e60-e64.
- O'Rourke B. Evidence for mitochondrial K^+ channels and their role in cardioprotection. *Circ Res.* 2004;94:420-32.
- Singh H, Stefani E, Ligia T. Intracellular BK_{Ca} (iBK_{Ca}) channels. *J Physiol.* 2012. 590. 23:5937-47.
- Frankenreiter S, Bednarczyk P, Kniess A. cGMP-elevating compounds and ischemic conditioning provide cardioprotection against ischemia and reperfusion injury via cardiomyocyte-specific BK channels. *Circulation.* 2017;136(24):2337-55.
- Bentzen B, Olesen SP, Rønn L. BK channel activators and their therapeutic perspectives. *Front Physiol.* 2014 Oct;9;5:389.
- Sagach V, Bondarenko A, Bazilyuk O, Kotsuruba A. Endothelial dysfunction: possible mechanisms and ways of correction. *Exp Clin Cardiol.* 2006;11(2):107.
- Frenoux JM, Prost ED, Belleville JL, Prost JL. A polyunsaturated fatty acid diet lowers blood pressure and improves antioxidant status in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr.* 2001;131:39-45.
- Farias JG, Carrasco-Pozo C, Carrasco Loza R, Sepulveda N, Alvarez P, Quezada M, Quinones J, Molina V, Castillo RL. Polyunsaturated fatty acid induces cardioprotection against ischemia-reperfusion through the inhibition of NF-kappaB and induction of Nrf2. *Exp Biol Med.* 2017;242:1104-14.
- Panasiuk O, Bondarenko A. Membrane cholesterol determines the stimulatory effect of omega-3 PUFA on BK channel activity. *Pharmacologia.* 2015;6:31-7.
- Bondarenko OI. Study of calcium channels in the mitochondrial membrane of endothelial cells. *Fiziol Zh.* 2014;60(1):64-9. [Ukrainian].
- Chance B, Williams GR. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem.* 1956;17:65-134.
- Heinen A, Camara AK, Aldakkak M. Mitochondrial Ca^{2+} -induced K^+ influx increases respiration and enhances ROS production while maintaining membrane potential. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292:C148-C56.
- Murphy MP. How understanding the control of energy metabolism can help investigation of mitochondrial dysfunction, regulation and pharmacology. *BBA.* 2001;1504:1-11.
- Pandya JD, Nukala VN, Sullivan PG. Concentration dependent effect of calcium on brain mitochondrial bioenergetics and oxidative stress parameters. *Front Neuroenerget.* 2013;5:10.
- O'Shea KM, Khairallah RJ, Sparagna GC. Dietary omega-3 fatty acids alter cardiac mitochondrial phospholipid composition and delay Ca^{2+} -induced permeability transition. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;47:819-27.
- Pepe S, Tsuchiya N, Lakatta EG. PUFA and aging modulate cardiac mitochondrial membrane lipid composition and Ca^{2+} activation of PDH. *Am J Physiol.* 1999;276:149-58.
- Clarke AL, Petrou S, Walsh JV. Modulation of BK_{Ca} channel activity by fatty acids: structural requirements and mechanism of action. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002;283:1441-53.

*Матеріал надійшов
до редакції 22.09.2020*