

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 612.3: 612.26: 612.814:612.015.3

©Кургалюк, Ткаченко

### КОРРЕКЦИЯ ПРОЦЕССОВ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ДЫХАНИЯ МОДУЛЯТОРАМИ АТР-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ В УСЛОВИЯХ СТРЕССА У КРЫС С РАЗНОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ К ГИПОКСИИ

*Н.Н. Кургалюк<sup>1</sup>, Г.М. Ткаченко<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Институт Биологии и Охраны Среды Поморской Педагогической Академии,  
г. Слупск, Польша, ul. Arciszewskiego 22b, 76-200 Slupsk, Poland;  
факс: (059) 84 05 475; эл. почта: kurhalyuk@pap.edu.pl

<sup>2</sup>Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого,  
Украина, 79010 г. Львов, Ул. Пекарская, 69

Исследовали влияние активатора АТР-чувствительных калиевых каналов ( $K_{ATP}$ ) - пинацидила (0,06 мг/кг) и блокатора глибенкламида (1 мг/кг) у крыс с разной резистентностью к гипоксии в условиях эмоционального стресса на ADP-стимулированное дыхание митохондрий миокарда и печени по Чансу, активность сукцинатдегидрогеназы и процессы пероксидного окисления липидов. Использовали следующие субстраты окисления: 0,35 мМ сукцинат, 1 мМ  $\alpha$ -кетоглутарат, а в дополнительном анализе также ингибиторы митохондриального ферментного комплекса I (10 мкМ ротенон) и сукцинатдегидрогеназы (2 мМ малонат). Установлено, что стресс сопровождается активацией окисления сукцината на фоне снижения эффективности окисления  $\alpha$ -кетоглутарата, возрастающей активности сукцинатдегидрогеназы, интенсификации процессов свободнорадикального окисления. Это изменение выражено сильнее в группе животных с низкой резистентностью к гипоксии. Парентеральное введение активатора  $K_{ATP}$  каналов оказывало протекторный эффект на процессы митохондриального энергообеспечения при стрессе. Это выражается в повышении эффективности окисления  $\alpha$ -кетоглутарата, оцениваемого по сопряжённости процессов дыхания и фосфорилирования (дыхательный контроль по Чансу), значения ADP/O на фоне снижения активности сукцинатдегидрогеназы и интенсивности ПОЛ. Сделан вывод, что активатор  $K_{ATP}$  каналов пинацидил снижает негативные последствия интенсивного окисления сукцината и связанные с влиянием катехоламинов при стрессе митохондриальные дисфункции, повышая эффективность кислород-зависимых процессов при преимущественном окислении  $\alpha$ -кетоглутарата. Последнее определяется в ингибиторном анализе и нивелируется под влиянием глибенкламида - блокатора данного типа каналов.

**Ключевые слова:**  $K_{ATP}$ -каналы, пинацидил, глибенкламид, ADP-стимулированное дыхание, стресс, резистентность к гипоксии.

**ВВЕДЕНИЕ.** С целью снижения негативных эффектов стрессового повреждения мембран используются многочисленные фармакологические препараты - стимуляторы эндогенных протекторных механизмов. Как показано исследованиями последних лет, важная роль отводится активаторам кислород-зависимых процессов в митохондриях при состояниях, сопровождающихся их нарушением и интенсификацией свободнорадикального окисления. Такими агентами могут выступать активаторы АТР-чувствительных калиевых ( $K_{АТР}$ ) каналов, кардио- и гепатопротекторные свойства которых показаны при различных патологических состояниях [1, 2]. Использование модели - животных с высокой и низкой резистентностью к гипоксии, на наш взгляд, может быть эффективным способом оценки врождённых высоких и низких генетически обусловленных адаптационных возможностей у таких животных [3, 4].

Ранее была показана протекторная роль активаторов данного типа каналов в условиях ишемического preconditionирования, связанного с протекторным влиянием коротких периодов ишемии, в процессах адаптации миокарда к длительной ишемии и предупреждения развития инфаркта, ограничения апоптических и некротических изменений в тканях [5]. По современным представлениям, во время первоначального (т. е. preconditionирующего) ишемического эпизода кардиомициты начинают выделять аденозин и брадикинин. Эти вещества активизируют специфичные мембранные миокардиальные рецепторы, что в свою очередь вызывает активацию универсального внутриклеточного мессенджера - протеинкиназы С. Под её влиянием АТР-зависимые калиевые каналы гладкомышечных клеток сосудов и кардиомицитов, закрытые в норме, открываются [6]. По этой причине при повторной ишемии миокарда происходит снижение его метаболической активности, уменьшается скорость расщепления АТР, замедляется гликогенолиз и снижается скорость нарастания внутриклеточного ацидоза. Иными словами, ишемическое preconditionирование оказывает энергосберегающее действие, которое проявляется в улучшении микроциркуляции, уменьшении постишемической миокардиальной дисфункции и желудочковых аритмий. Причем не только у животных, но, как доказали исследования на открытом сердце во время операций ангиокоронарного шунтирования, и у людей.

С этими каналами связан не только физиологический защитный эффект preconditionирования. С ними связано и сахароснижающее действие препаратов сульфонилмочевины: закрывая АТР-зависимые калиевые каналы плазматических мембран  $\beta$ -клеток поджелудочной железы, они одновременно открывают кальциевые каналы, благодаря чему повышается концентрация внутриклеточного кальция и инициируется выброс инсулина [7]. Но выборочно, исключительно на калиевые каналы  $\beta$ -клеток, действуют далеко не все препараты сульфонилмочевины. Производные сульфонилмочевины первого поколения, не обладая высокой селективностью к панкреатическим рецепторам, могут блокировать и кардиоваскулярные калиевые каналы, что приводит к нарушению защитного механизма, способствует развитию аритмий и противодействует расширению коронарных артерий при ишемии.

В литературе отсутствуют данные относительно роли модуляторов  $K_{АТР}$  каналов в условиях стресса в зависимости от индивидуальной резистентности к гипоксии. К сожалению, плюсы и минусы использования производных сульфонилмочевины изучены также недостаточно. Поэтому цель нашего исследования - оценка корригирующего влияния активатора  $K_{АТР}$  каналов пинацидила и их блокатора - глибенкламида на процессы митохондриального энергообеспечения митохондрий миокарда и печени, активность сукцинатдегидрогеназы и интенсивность процессов липопероксидации у крыс в условиях стресса, отличающихся исходными механизмами физиологической реактивности.

**МЕТОДИКА.** Исследования проведены на крысах-самцах Вистар 0,2-0,22 кг, разделенных на группы с высокой (ВР) и низкой (НР) резистентностью к гипоксии по методу В.А.Березовского [8]. Животных использовали в эксперименте не ранее 14-дней после разделения. Всего было 6 групп по 6 животных в каждой (6 с высокой и 6 с низкой резистентностью к гипоксии соответственно).

С целью моделирования стрессовых условий крыс помещали на 30 мин в камеру, заполненную водой (22°C) с сеткой. Расстояние от воды до сетки составляло только 5 см [9]. Уровень воды в камере был таким, что не позволял животным с целью отдыха опираться на задние лапы. Животные могли или плавать или висеть, уцепившись за сетку. Предложенная авторами [9] модель является формой острого эмоционального стресса, связанного с пребыванием животных в эстремальных условиях.

Группа I состояла из контрольных крыс (ВР и НР), которым вводили 1 мл физраствора. Животным группы II за 30 мин до стресса вводили физиологический раствор, группы III - пинацидил, 0,06 мг/кг („Sigma”, США), группы IV - глибенкламид, 1 мг/кг („Sigma”, США). Время действия препаратов составляло 30 мин, после чего животных декапитировали.

Митохондрии печени и миокарда выделяли методом дифференциального центрифугирования как описано нами ранее [10, 11]. Среда гомогенизации для печени содержала (в ммоль/л): KCl - 120, HEPES - 10, EGTA - 1, pH 7,2. Среда гомогенизации для миокарда содержала (в ммоль/л): KCl - 180, 0,5% БСА, HEPES - 10, EGTA - 10, pH 7,2 [12].

Процессы дыхания и окислительного фосфорилирования исследовали полярографическим методом [13] с использованием закрытого электрода Кларка и полярографического анализатора LP-7. Среда инкубации для печени содержала (в ммоль/л): KCl - 120,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 2, HEPES - 10, pH 7,2. Среда инкубации для миокарда содержала (в ммоль/л): трис-HCl - 30, KCl - 125, NaCl - 10,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 5,  $\text{MgCl}_2$  - 1,5, EGTA - 3, pH 7,2 [14]. В качестве субстратов окисления использовали 0,35 мМ сукцинат и 1 мМ  $\alpha$ -кетоглутарат. В случае ингибиторного анализа с этими субстратами окисления использовали ингибиторы: митохондриального комплекса I (МФК I) - 10 мкМ ротенон, а также сукцинатдегидрогеназы - 2 мМ малонат. Дыхание стимулировали добавлением 200 мкМ ADP (конечная концентрация). Температура инкубации - 26°C. По полученным полярограммам рассчитывали: скорость фосфорилирующего (в метаболическом состоянии 3 по Чансу,  $V_3$ ) и контролируемого (в метаболическом состоянии 4 по Чансу,  $V_4$ ) дыхания митохондрий, дыхательный контроль по Чансу ( $V_3/V_4$ ), коэффициент эффективности фосфорилирования ADP/O.

Интенсивность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по содержанию ТБК-активных продуктов (продуктов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой) в миокарде, печени и крови [15], активность сукцинатдегидрогеназы методом [16]. Результаты опытов обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Ранее нами и другими авторами определены максимальные исходные величины функционирования митохондрий (МХ) миокарда, печени, мозга у животных с высокой исходной резистентностью к гипоксии [17, 18]. Изменения основных параметров ADP-стимулированного дыхания МХ при окислении сукцината (СКЦ) и  $\alpha$ -кетоглутарата (КГЛ) приведены в таблице 1.

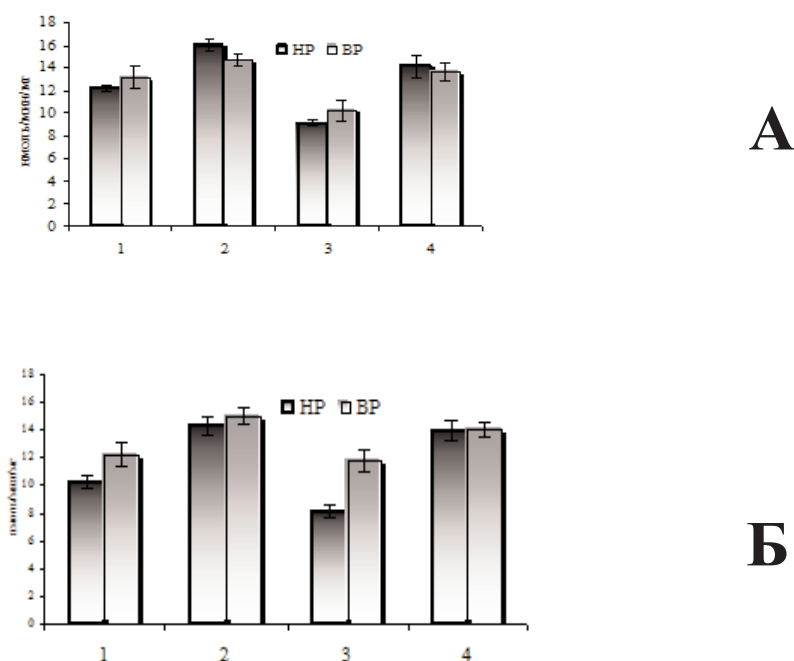
## КОРРЕКЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ДЫХАНИЯ ПРИ СТРЕССЕ

Таблица 1. Влияние пинацидила и глибенкламида на показатели ADP-стимулированного дыхания митохондрий миокарда крыс с разной резистентностью к гипоксии в условиях стресса. Субстраты окисления: 0,35 мМ сукцинат и 1 мМ  $\alpha$ -кетоглутарат.

Условия опыта	$V_3$ , нг ат. О на 1мг белка	Дыхательный контроль, $V_3/V_4$	ADP/O, мкМ ADP/нг ат О
<b>0,35 мМ сукцинат</b>			
Контроль НР	52,76±4,67	2,30±0,17	1,32±0,07
ВР	62,04±5,15	2,77±0,14	1,96±0,12
Стресс НР	74,68±5,21*	2,82±0,18	1,79±0,14*
ВР	67,21±5,37	2,60±0,15	1,50±0,09*
Пинацидил и стресс НР	82,29±6,31	3,82±0,24**	2,07±0,14
ВР	78,57±8,12	3,63±0,29**	2,10±0,15**
Глибенкламид и стресс НР	78,80±6,21	1,87±0,09**	1,04±0,05**
ВР	63,05±5,71	1,50±0,04**	1,12±0,04**
<b>1 мМ <math>\alpha</math>-кетоглутарат</b>			
Контроль НР	30,84±2,57	2,91±0,21	1,91±0,10
ВР	44,74±3,98	3,62±0,24	1,68±0,11
Стресс НР	46,59±3,78*	3,51±0,29	1,78±0,15
ВР	43,52±3,94	2,93±0,25	2,36±0,18*
Пинацидил и стресс НР	68,41±5,28**	3,84±0,25	2,52±0,18**
ВР	75,24±8,87**	4,15±0,38**	2,41±0,21
Глибенкламид и стресс НР	56,03±5,47	2,04±0,12**	0,98±0,06**
ВР	33,12±2,79	1,78±0,15**	0,91±0,04**

Примечание: Здесь и далее: \* - результаты относительно стресса и контроля достоверны ( $p < 0,05$ ); \*\* - результаты достоверны относительно стресса и введения препаратов. Представлены средние значения  $\pm$  ошибка средней. В каждой группе было по 6 животных

В условиях стресса в двух группах животных показана активация фосфорилирующего дыхания при окислении СК и КГЛ, которая отмечена на разных уровнях. Так, для животных с НР изменения состояли в достоверном увеличении значения  $V_3$  на 41,54% ( $p < 0,05$ ) при окислении СК и на 21,32% ( $p < 0,05$ ) при окислении КГЛ на фоне увеличения активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) (рис. 1). Если для животных с НР при стрессе установлено достоверное увеличение эффективности использования кислорода при окислении СКЦ на 35,6% ( $p < 0,05$ ), то в группе животных с ВР, наоборот, установлено достоверное снижение этого показателя (на 23,5%, ( $p < 0,05$ )) относительно данных контроля. Указанные изменения осуществлялись при достоверном повышении ADP/O в группе животных с ВР на 43% ( $p < 0,01$ ) при окислении КГЛ.



**Рисунок 1.**

Изменения активности сукцинатдегидрогеназы в миокарде (А) и печени (Б) крыс с разной резистентностью к гипоксии под влиянием модуляторов  $K_{ATP}$ -каналов и стресса.

Условные обозначения. Тут и ниже:

1 - контроль, 2 - стресс, 3 - пинацидил и стресс, 4 - глибенкламид и стресс.

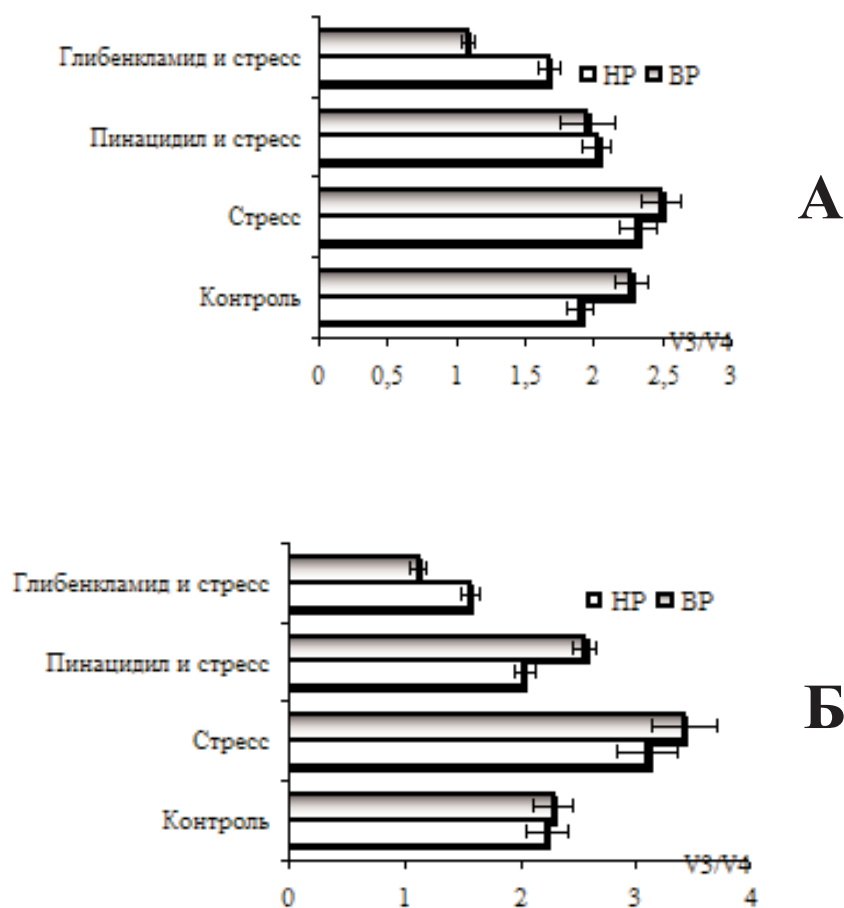
Нами показано ранее [19], что модель стресса, предложенная авторами [9], является моделью катехоламинового (прежде всего адреналинового) повреждения функциональных систем, поскольку сопровождается достоверным повышением содержания в крови подопытных животных уровня адреналина без изменения предшественников его биосинтеза (норадреналина, ДОФА и дофамина). Кардиотоксический эффект катехоламинов определяется независимо от того, введены ли они извне или имеет место чрезмерная продукция их при возбуждении симпатно-адреналовой системы [20], как, например, в нашем случае, при стрессе.

Эффекты активатора  $K_{ATP}$  каналов пинацидила при стрессе в наших исследованиях показали, что отсутствие достоверных изменений ADP-стимулированного дыхания при окислении СКЦ сопровождается значительным увеличением дыхательного контроля по Чансу в обеих группах (на 35,5%, ( $p < 0,05$ ) для HP и 39,6% ( $p < 0,05$ ) для BP соответственно), а для особей с BP также и значением ADP/O (на 40%, ( $p < 0,01$ )).

При введении пинацидила перед стрессом процессы ADP-стимулированного дыхания МХ миокарда в наших опытах сопровождались преимущественным окислением КГЛ относительно СКЦ и достоверным снижением активности СДГ. Так, независимо от индивидуальной реактивности на гипоксию показана значительная активация фосфорилирующего дыхания в состоянии  $V_3$  (на 46,8% ( $p < 0,01$ ) для HP и на 72,9% ( $p < 0,01$ ) для BP), а также дыхательного контроля для BP и ADP/O в группе с HP в этих условиях. Парентеральное введение ингибитора данного типа каналов глибенкламида перед стрессом вызывает необратимые функциональные нарушения параметров функционирования органелл. Последнее выражено сильнее в группе животных с BP при окислении КГЛ на фоне повышения активности СДГ.

## КОРРЕКЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ДЫХАНИЯ ПРИ СТРЕССЕ

Известно, что окисление СКЦ под влиянием различных функциональных нагрузок организма сопровождается “монополизацией” дыхательной цепи МХ и проходит более интенсивно по сравнению с другими субстратами [18, 21], например, КГЛ. Этот факт определил проведение нами дополнительного анализа с использованием ингибитора МФК I ротенона и СДГ - малоната, представленных на рисунках 2 и 3. Гиперпродукция симпатической нервной системы снижает устойчивость организма к стрессу, поскольку адреналин осуществляет более сильное влияние на аденилатциклазную систему чем норадреналин, что, в дальнейшем, ведет к повреждению компенсаторных реакций. Это обусловлено генетически детерминированными особенностями обмена веществ, связанными с преобладанием холинергических регуляторных влияний [20]. Таким образом, функционирование  $K_{ATP}$  каналов имеет принципиальную роль при стрессе, оказывая кардиопротекторный эффект путем активации окисления прежде всего КГЛ при повышении эффективного, сопряженного с синтезом АТФ дыхания.



**Рисунок 2.**

Ротенон-чувствительная компонента значения дыхательного контроля по Чансу ( $V_3/V_4$ ) при окислении сукцината (А) и малонат-чувствительная при окислении  $\alpha$ -кетоглутарата (Б) митохондрий миокарда крыс под влиянием пинацидила и глибенкламида в условиях стресса.



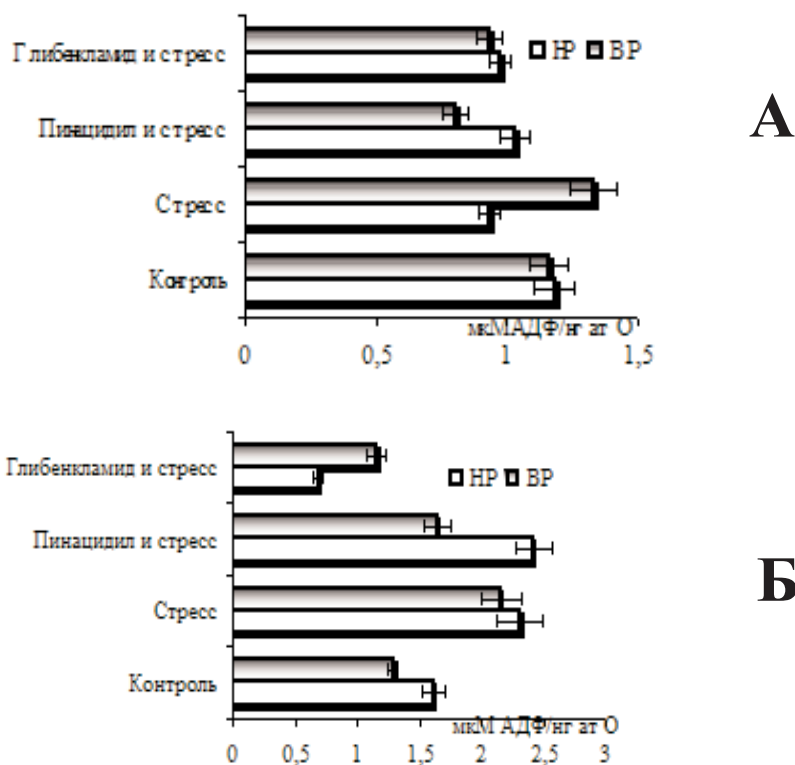


Рисунок 3.

Ротенон-чувствительная компонента значения ADP/O при окислении сукцината (А) и малонат-чувствительная при окислении  $\alpha$ -кетоглутарата (Б) митохондрий миокарда крыс под влиянием пинацидила и глибенкламида в условиях стресса.

Результаты наших исследований позволили нам определить новые механизмы реализации эффектов модуляторов  $K_{ATP}$  каналов в условиях стресса. Так, значения ротенон-чувствительной компоненты сопряжения процессов дыхания и фосфорилирования при окислении СКЦ составляла для группы животных с НР 12,9%, а для ВР значительно выше - 21,7%; малонат-зависимое дыхание с использованием КГЛ сопровождалось повышением значения дыхательного контроля по Чансу на 38,6% для НР и на 48,9% для особей с ВР.

Парентеральное введение пинацидила перед стрессом сопровождается снижением ротенон-зависимого дыхания при использовании СКЦ и малонат-зависимого-КГЛ. В этих условиях уровень изменений определялся индивидуальной резистентностью к гипоксии: в первом случае он составлял 12,9% для НР и 21,7% для ВР, а во втором - был значительно выше: 34% для НР и 24,9% для ВР соответственно.

Анализ значения ADP/O в двух группах особей при стрессе также значительно изменялся: заметно снижалось ротенон-зависимое дыхание на СКЦ (на 21,2% для НР) и увеличивалось малонат-чувствительное для КГЛ (на 42,6% для НР и 67,4% для ВР). Последний факт свидетельствует о том, что активация окисления СКЦ, индуцируемого значительным выбросом адреналина при стрессе, снижает роль NAD-зависимых субстратов окисления. Пинацидил в наших исследованиях в большей степени модифицировал ротенон-чувствительную компоненту значения ADP/O для группы животных с ВР, составляющую 39,8%. В этом случае малонат-зависимое дыхание при окислении СКЦ - только 22,7%. Таким образом, процессы эффективного использования кислорода для синтеза

## КОРРЕКЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ДЫХАНИЯ ПРИ СТРЕССЕ

макроэргов в дыхательной цепи МХ в условиях стресса связаны с возрастанием функциональной роли  $K_{ATP}$  каналов и преимущественного окисления КГЛ, что повышает резистентность клетки к оксидативному стрессу, вызванному катехоламинами.

Большая часть исследований относительно оценки влияния модуляторов  $K_{ATP}$  каналов поведена на миокарде, что позволило определить ряд важных аспектов их влияния при повреждениях сердца. Но не менее важным является также влияние модуляторов указанного типа каналов на другие органы, например, печень. В таблице 2 приведены параметры митохондриального дыхания печени при использовании пинацидила и глибенкламида в условиях стресса у животных, отличающихся по показателю чувствительности к острой гипоксии. Результаты наших экспериментов позволяют утверждать, что во время стресса пинацидил оказывает защитное действие, корригируя процессы энергообеспечения путём повышения интенсивности окисления КГЛ относительно СКЦ на фоне снижения интенсивности процессов ПОЛ (рис. 4, 5).

Таблица 2. Показатели ADP-стимулированного дыхания митохондрий печени крыс под влиянием пинацидила и глибенкламида в условиях стресса.

Условия опыта	Дыхательный контроль, $V_3/V_4$	ADP/O, мкМ ADP/нг ат О	Дыхательный контроль, $V_3/V_4$	ADP/O, мкМ ADP/нг ат О
	0,35 мМ сукцинат		1 мМ $\alpha$ -кетоглутарат	
Контроль				
НР	3,14±0,24	1,42±0,10	4,12±0,30	2,68±0,14
ВР	3,28±0,20	1,90±0,14	4,96±0,27	2,92±0,18
Стресс				
НР	3,54±0,29	1,24±0,11	3,29±0,17*	2,39±0,12*
ВР	3,63±0,17	1,40±0,13*	3,42±0,24*	2,37±0,11
Пинацидил и стресс				
НР	4,01±0,25	2,16±0,18**	4,79±0,18**	2,87±0,16**
ВР	3,96±0,29	1,92±0,14**	4,82±0,14**	2,65±0,15
Глибенкламид и стресс				
НР	1,33±0,15**	0,98±0,18	1,67±0,10**	1,85±0,08**
ВР	2,39±0,19**	1,37±0,12	2,30±0,16**	1,61±0,13

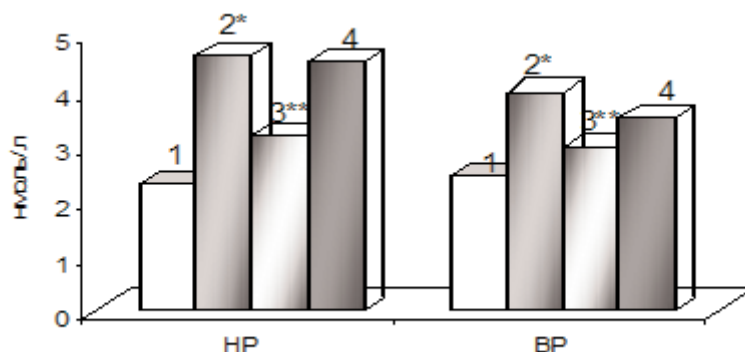


Рисунок 4.

Содержание ТБК-активных продуктов в крови крыс с высокой и низкой резистентностью к гипоксии под влиянием пинацидила и глибенкламида при стрессе.



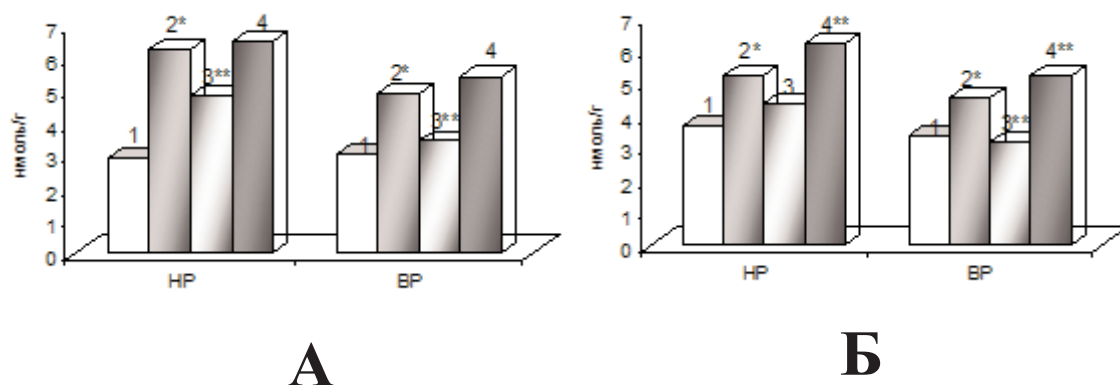


Рисунок 5.

Содержание ТБК-активных продуктов у печени (А) и миокарде (Б) крыс с разной резистентностью к гипоксии под влиянием пинацидила и глибенкламида при стрессе.

Катехоламиновое повреждение функциональных систем организма при стрессе, как для МХ миокарда, так и для печени, сопровождается значительным снижением эффективности окислительных процессов и более выражено для животных с НР. Известно, что окисление СКЦ под влиянием функциональных нагрузок происходит интенсивнее, сопровождается “монополизацией” дыхательной цепи МХ и снижением окисления КГЛ в общем метаболическом окислении. Вычленение роли NAD-зависимых субстратов (СКЦ и ротенон), как и малонат-зависимой компоненты окисления КГЛ, позволяет оценить основные характеристики ADP-стимулированного дыхания под влиянием пинацидила и глибенкламида в условиях стресса.

Так, показано, что ротенон-зависимая компонента окисления СКЦ МХ печени (дыхательный контроль) у крыс с НР в условиях стресса значительно возрастает (на 55,7%,  $p < 0,01$ ), а малонат-зависимый вклад в окисление КГЛ, наоборот, снижается на 86,6% ( $p < 0,01$ ). Это свидетельствует об ограничении роли NAD-зависимого окисления в условиях стресса. Эффекты влияния пинацидила для печени, как и для МХ миокарда, связаны с повышением эффективности окисления КГЛ, чем СК в группе с низкой резистентностью к гипоксическому фактору и достоверно возрастали на 45,6% и 20,1% для значений дыхательного контроля и ADP/O соответственно.

Показано, что негативная роль катехоламинового повреждения миокарда и других функциональных систем организма, сопровождающаяся явлениями ишемии [20], сопутствует стрессам различной этиологии, углубляя энергодефицит и ацидоз клеток, приводя в конечном результате к их некрозу. Этим процессам в определенной степени могут препятствовать защитные механизмы клетки, направленные прежде всего на ограничение использования АТР в миофибриллах и возрастающей ролью аденозина. Если в норме АТР-чувствительные калиевые каналы закрыты при достаточном уровне АТР, то недостаточный синтез макроэрга сопровождается их открытием и активацией дыхательной цепи МХ, изменяя подвижность убихинона. Выживание кардиомиоцитов в короткие периоды ишемии связано также с возрастающей ролью аденозина [22], образующегося в околочелюточном пространстве вследствие некомпенсированного распада АТР. Сосудорасширяющий эффект аденозина улучшает кровоснабжение зоны некроза, но он оказывается коротким по продолжительности. В этих условиях выходит на первый план другая особенность действия аденозина, связанная с блокадой адренорецепторов на мембранах кардиомиоцитов. Это позволяет кардиомиоцитам экономно расходовать “наличный” запас энергии в неблагоприятный период [5, 6].

Препараты сульфонилмочевины, к которым относится ингибитор  $K_{ATP}$  каналов глибенкламид [23], представляют основную группу лекарств, применяемых для лечения сахарного диабета типа II. Эти препараты относятся к секретогенам инсулина, и основное их сахароснижающее действие связано со стимуляцией образования и высвобождения инсулина из островков поджелудочной железы. В последние годы полностью расшифрован механизм действия препаратов сульфонилмочевины на стимуляцию секреции инсулина  $\beta$ -клетками поджелудочной железы. Эти препараты связываются с соответствующими рецепторами, локализованными на мембранах  $\beta$ -клеток, изменяют активность  $K^+$ -АТФазы, способствуют закрытию  $K_{ATP}$  каналов и повышению отношения уровней АТФ/АДП в цитоплазме, приводящего к деполяризации мембраны. Это, в свою очередь, способствует открытию вольтажзависимых  $Ca^{2+}$ -каналов, повышению уровня цитозольного кальция и стимуляции  $Ca^{2+}$ -зависимого экзоцитоза секреторных гранул, в результате которого происходит высвобождение содержимого секреторной гранулы в межклеточную жидкость и кровь [23]. Последний этап секреции инсулина находится под контролем кальций/кальмодулинзависимой протеинкиназы II. Таким образом, мишенью действия препаратов сульфонилмочевины являются АТФ-чувствительные калиевые каналы, которые состоят из рецептора к сульфонилмочевине [белок с молекулярной массой 140-кДа (SUR)] и специфического белка - (KIR6.2).

Чувствительность АТФ-зависимых калиевых каналов миокардиоцитов к глибенкламиду значительно (примерно в шесть раз) ниже, чем в  $\beta$ -клетках поджелудочной железы. Именно этим фактом и объясняется снижение смертности от инфаркта миокарда при приеме препаратов сульфонилмочевины I поколения при лечении глибенкламидом. В то же время есть мнение о нецелесообразности назначения препарата диабетикам в остром периоде инфаркта миокарда, поскольку он обладает выраженным аритмическим действием, обусловленным способностью закрывать АТФ-зависимые калиевые каналы миокардиоцитов и предотвращать чрезмерную потерю калия клетками миокарда. А желудочковые аритмии, как известно, являются одной из главных причин смерти в остром периоде инфаркта миокарда.

Наши опыты на животных позволяют утверждать, что глибенкламид в условиях стресса ограничивает, а в некоторых случаях, необратимо нарушает процессы энергоснабжения и снижает эффективность кислород-зависимых процессов, вызывая окислительный стресс в клетках. Указанные изменения сопровождаются активацией окисления СКЦ и СДГ, снижением сопряжения процессов дыхания и фосфорилирования на фоне активации процессов свободнорадикального окисления как в крови, так и тканях. Особенно отмечено, что в условиях стресса для организмов с низким уровнем адаптационных возможностей (например, крысы с низкой резистентностью к гипоксии) влияние блокатора АТФ-чувствительных калиевых каналов значительно нарушает физиологические защитные механизмы, связанные с использованием кислорода в митохондриях. Последнее связано с ограничением как сопряжения процесса дыхания и фосфорилирования, так и его эффективности, и, возможно, является результатом нарушения функциональной целостности митохондрий.

Наши эксперименты относительно влияния пинацидила при стрессе свидетельствуют о преобладающем окислении КГЛ при стрессе, что, в свою очередь, связано с усилением холинергических регуляторных влияний. Известно, что умеренное преобладание парасимпатических влияний на уровне организма является одним из факторов индивидуальной стойкости к гипоксии и окислительного стресса, вызванного значительными дозами катехоламинов [3, 10, 20].

Таким образом, полученные нами результаты относительно эффективного влияния активатора АТФ-чувствительных калиевых каналов пинацидила на функционирование митохондриальных процессов в миокарде и печени позволяют повышать резистентность животных с НР в условиях стресса. Последнее

осуществляется возрастанием экономизации работы дыхательной цепи митохондрий. Это позволяет поддерживать эффективность процессов энергообеспечения на фоне усиливающегося повреждения мембран катехоламинами при стрессе. Эффекты влияния пинацидила при стрессе связаны с преобладающим окислением  $\alpha$ -кетоглутарата в общем биологическом окислении и ограничением интенсивности процессов липопероксидации.

## ЛИТЕРАТУРА

1. McCully J.D., Levitsky S. (2003) Ann. Thorac. Surg., **75**, 667-673.
2. Gross G.J. (2000) Basic Res. Cardiol., **95**, 280-284.
3. Лукьянова Л.Д., Романова В.Е., Чернобаева Г.Н. (1991) Бюл. эксперим. биол. и мед., №7, 49-51.
4. Кургалюк Н.Н. (2001) Физиол. журн., **47**, № 3, 64-72.
5. O'Rourke (2000) Circ. Res., **87**, 845-855.
6. Feng J., Li H., Rosenkranz E.R. (2002) Mol. Cell. Biochem., **233**, 133-138.
7. Miki T., Nagashima K., Seino S. (1999) J. Mol. Endocrinol., **22**, 113-123.
8. Березовский В.А. (1975) Напряжение кислорода в тканях животных и человека.: Наукова думка, Киев.
9. Бондаренко О.Н., Бондаренко О.А., Манухина Е.Б. (1999) Бюлл. экспер. биол. мед., **126**, 157-160.
10. Ткаченко Г.М., Мойбенко А.А., Кургалюк Н.Н. (2003) Укр. биохим. журн., **75**(6), 115-122.
11. Кургалюк Н.Н., Ткаченко Г.М. (2004) Укр. биохим. журн., **76**(3), 79-84.
12. Lass A., Agarwal S., Sohal R. (1997) J. Biol. Chem., **272**, 19199-19204.
13. Франк Г.М., Кондрашова М.Н. (ред.) (1973) Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. Наука, Москва.
14. Borutaite V., Brown G. (1996) Biochem. J., **315**, 295-299.
15. Тимирбулатов Т.А., Селезнев С.И. (1986) Лаб. дело, № 4, 209-211.
16. Прохорова М.Н. (ред.) (1982) Методы биохимических исследований. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, с. 207-212.
17. Кургалюк Н.Н. (2001) Физиол. журн., **47**, № 2, 52-59.
18. Лукьянова Л.Д. (2000) Вестник РАМН, №9, 3-12.
19. Кургалюк Н.Н., Мишунина Т.М., Серебровская Т.В., Колесникова Е.Э. (2002) Эндокринология, **7**, 73-76.
20. Маркова Е.А. (1998) Миокардиодистрофия и реактивность организма. Тернополь.
21. Кондрашова М.Н. (2000) Митохондрии, клетки и активные формы кислорода. Пушино. 71-74.
22. Downey J.M., Liu G.S., Thornton J.D. (1993) Cardiovasc. Res., **27**, 3-8.
23. Pausek P., Mironova G., Mahdi F. et al. (1998) Am. J. Physiol., **274**, 25-37.

Поступила: 11. 05. 2005.

**CORRECTION OF MITOCHONDRIAL RESPIRATION PROCESSES IN RATS WITH  
DIFFERENT RESISTANCE TO HYPOXIA UNDER STRESS BY MODULATORS OF  
ATP-SENSITIVE POTASSIUM CHANNELS**

*N.N. Kurhalyuk<sup>1</sup>, G.M. Tkachenko<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Pomeranian Pedagogical University, Inst. Biology and Environmental Protection,  
Depart. Zoology and Animals Physiology, ul. Arciszewskiego 22b, 76-200 Slupsk, Poland;  
fax: (059) 84 05 475; e-mail: kurhalyuk@pap.edu.pl

<sup>2</sup>Danylo Galitski National Medical University of Lviv, ul. Pekarskaya, 69, Lviv, 79010 Ukraine

The effects of the activator of ATP-sensitive potassium channels ( $K_{ATP}$ ) pinacidil (0.06 mg/kg) and the blocker of these channels glibenclamide (1 mg/kg) were investigated using liver and heart mitochondria isolated from rats exhibiting high (HR) or low-resistance (LR) to hypoxia. The animals were subjected to emotional stress. Stress caused activation of mitochondrial succinate oxidation, the decrease of efficiency of alpha-ketoglutarate oxidation and intensification of lipid peroxidation (LPO). These changes were more pronounced in the LR-animals. Administration of pinacidil protected mitochondria under conditions of stress, whereas glibenclamide abolished these changes.

**Key words:**  $K_{ATP}$  channels, pinacidil, glibenclamide, resistance to hypoxia, oxidative phosphorylation, stress.