

The role of mitochondria in preconditioning of heart induced by diazoxide. New insight into the molecular mechanism

Úloha mitochondrií v preconditioningu srdca indukovaného diazoxidom. Nový pohľad na molekulárny mechanizmus

Jašová M¹, Ferko M¹, Kancirová I¹, Muráriková M¹, Námer P², Waczulíková I³, Slezák J^{1,4}, Ziegelhöffner A¹

¹Ústav pre výskum srdca SAV, Centrum excelentnosti kardiovaskulárnych vied, Bratislava, Slovenská republika

Jašová M, Ferko M, Kancirová I, Muráriková M, Námer P, Waczulíková I, Slezák J, Ziegelhöffner A. **The role of mitochondria in preconditioning of heart induced by diazoxide. New insight into the molecular mechanism.** Cardiology Letters 2014;23(3):228–233

Abstract. Diazoxide (DZX), which was assumed to act predominantly as an opener of the ATP-dependent potassium channels (K_{ATP}) in mitochondrial membranes, is frequently utilised in the induction of pharmacological preconditioning of the myocardium in an experiment. However, recent findings have revealed that DZX acts more as an activator of the protein kinase C ϵ (PKC ϵ) and that opening of the mitochondrial K_{ATP} channels is its secondary effect only. Moreover, DZX also acts as an inhibitor of the Krebs cycle at the level of succinate dehydrogenase. A similar type of inhibition also occurs in hypoxia and ischemia. The aim of our study was to search for such an effect of DZX on the mitochondria, which supposedly is directly responsible for the contribution of mitochondria to an increased ischemic tolerance of the myocardium. Experiments were performed on isolated heart mitochondria from 9–11 weeks old male Wistar rats exposed to the effect of DZX concentrations in the range of 0–7 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Starting with the concentration of 3.5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ DZX induced a dose-dependent increase in the activity of the mitochondrial Mg^{2+} -ATPase (the mitochondrial ATP synthase was estimated in a reversed direction of its reaction), expressed in μmol of the inorganic phosphate liberated by ATP splitting x mg mitochondrial protein $^{-1}$ x h $^{-1}$. Increase in the enzyme activity reached statistical significance ($p < 0.05$) at the DZX concentrations of 5, 6 and 7 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ and it was not accompanied by any considerable change in fluidity of the mitochondrial membrane. This pointed to a direct interaction of DZX with the enzyme molecule. Investigation by means of enzyme kinetics confirmed a direct, non-competitive stimulatory effect of DZX on the activity of the mitochondrial Mg^{2+} -ATPase. Results indicate that the improved production of energy, enabled via stimulation of the Mg^{2+} -ATPase activity, represents a direct mechanism by which heart mitochondria may participate in the DZX-induced preconditioning of the myocardium. Fig. 5, Tab. 1, Ref. 11, Online full text (Free, PDF) www.cardiology.sk

Key words: mitochondria – diazoxide – preconditioning – membrane fluidity – mitochondrial Mg^{2+} -ATPase

Jašová M, Ferko M, Kancirová I, Muráriková M, Námer P, Waczulíková I, Slezák J, Ziegelhöffner A. **Úloha mitochondrií v preconditioningu srdca indukovaného diazoxidom. Nový pohľad na molekulárny mechanizmus.** Cardiology Letters 2014;23(3):228–233

Abstrakt. Diazoxid (DZX), prevažne označovaný ako otvárač draslíkových od ATP-závislých kanálov (K_{ATP}) v membránach mitochondrií, sa často využíva na indukciu experimentálneho farmakologického preconditioningu v myokarde. Ďalšie štúdie však ukázali, že DZX pôsobí vo väčšej miere ako aktivátor proteínkinázy C ϵ

Z ¹Ústavu pre výskum srdca SAV, Centrum excelentnosti kardiovaskulárnych vied, ²Ústavu polymérov SAV, Bratislava, ³Katedry jadrovej fyziky a biofyziky, Fakulta matematiky, fyziky a informatiky, Univerzita Komenského v Bratislave a ⁴Slovenskej zdravotníckej univerzity v Bratislave, Slovenská republika

Do redakcie prišlo dňa 21. januára 2014; prijaté dňa 24. januára 2014
Adresa pre korešpondenciu: Mgr. Magdaléna Jašová, Ústav pre výskum srdca SAV, Dúbravská cesta 9, 841 04 Bratislava 4, e-mail: jasovam@gmail.com

(PKCε) a otvorenie mitochondriových K_{ATP} kanálov je iba jeho sekundárnym účinkom. Navyše, DZX účinkuje aj ako inhibítor Krebsovho cyklu na úrovni sukcinátdehydrogenázy, k čomu dochádza aj v hypoxii a ischémii. Cieľom predloženej práce bolo odhaliť taký účinok DZX na mitochondrie, ktorý by bezprostredne súvisel s ich príspevkom ku zvýšeniu ischemickej tolerance myokardu. Experimenty sa uskutočnili na izolovaných mitochondriách zo srdca 6 – 11-týždňových potkanov, samcov kmeňa Wistar. Mitochondrie boli vystavené účinku narastajúcich koncentrácií DZX medzi 0 – 7 mol.l⁻¹. Od koncentrácie 3,5 μmol.l⁻¹ DZX postupne zvyšoval aktivitu mitochondriovej Mg^{2+} -ATPázy (mitochondriovej ATP syntázy stanovenej v obrátenom smere jej reakcie), vyjadrenej v μmol anorganického fosfátu uvoľneného štiepením ATP x mg mitochondriového proteínu⁻¹ x h⁻¹. Nárast aktivity enzýmu dosiahol štatistickú významnosť ($p < 0,05$) pri koncentrácii DZX 5, 6 a 7 μmol.l⁻¹ a nebol sprevádzaný významnejšou zmenou fluidity mitochondriovej membrány. To poukázalo na priamu interakciu DZX s molekulou enzýmu. Vyšetrenie pomocou enzýmovej kinetiky potvrdilo priamy, nekompetitívny stimulačný efekt na aktivitu mitochondriovej Mg^{2+} -ATPázy. Výsledky naznačujú, že zlepšená produkcia energie umožnená prostredníctvom stimulácie aktivity Mg^{2+} -ATPázy predstavuje priamy mechanizmus, ktorým sa srdcové mitochondrie môžu podieľať na preconditioningu myokardu indukovanom s DZX. Obr. 5, Tab. 1, Lit. 11, Online full text (Free, PDF) www.cardiology.sk

Kľúčové slová: mitochondria – diazoxid – preconditioning – membránová fluidita – mitochondriová Mg^{2+} -ATPáza

Preconditioning (PC) myokardu je ešte stále otvorenou a diskutovanou problematikou, ktorá pre možné riziká ostáva aj naďalej bez širšieho klinického využitia (1).

Jednou z možností navodenia PC je použitie farmák, tzv. farmakologický PC. Z viacerých liečiv, ktorými možno indukovať farmakologický PC, sme sa zamerali na diazoxid (DZX), pôvodne označovaný ako otvárač K_{ATP} -kanálov v membránach mitochondrií (2).

Pôvodná predstava o molekulárnych procesoch, ktorými DZX ako otvárač mitochondriových K_{ATP} -kanálov v myokarde pôsobí, však nebola schopná efekt navodený po podaní DZX v plnej miere uspokojivo vysvetliť. Ukázalo sa totiž, že DZX pôsobí v mitochondriách aj ako inhibítor Krebsovho cyklu, a to na úrovni sukcinátdehydrogenázy (3). V dôsledku toho sa do dýchacieho reťazca dostáva omnoho menej substrátu na oxidovanie, čo sa prejaví tak na spomalení toku elektrónov smerom k terminálnej oxidácii, ako aj na zhoršenom vytváraní transmembránového protónového gradientu. Všetky tieto zmeny sú v podstate negatívne, pretože vedú k zníženej produkcii energie vo forme ATP. Ich výsledkom je však zvýšená rezistencia myokardu proti hypoxii a ischémii, čo predstavuje adaptačnú odpoveď myokardu na zmenené podmienky. Okrem toho, porucha Krebsovho cyklu je spojená aj so zvýšenou tvorbou voľných radikálov v mitochondriách (3). K týmto poznatkom pribudol aj nález, že DZX pôsobí vo väčšej miere ako aktivátor proteínkinázy Cε (PKCε) a otvorenie mitochondriových K_{ATP} kanálov je iba jeho sekundárnym účinkom (4).

Na základe uvedených údajov sme predpokladali, že DZX môže mať aj ďalšie, doposiaľ nepoznané účinky, ktoré by mohli tie nepriaznivé kompenzovať a zodpovedať tak za jeho schopnosť zvýšiť ischemickú toleranciu myokardu. Preto cieľom tejto štúdie bolo skúmať ďalšie možné interakcie DZX s mitochondriami myokardu, ktoré by prispeli ku stabilizácii ich funkcie.

Legalita experimentov

Výskumný projekt bol v súlade s požiadavkami Štátnej veterinárnej správy, podľa zbierky zákona č. 289/2003 o veterinárnej starostlivosti na ochranu zvierat používaných na pokusné alebo iné vedecké účely. Experimenty boli tiež v súlade s nariadením vlády podľa zbierky zákona č. 377/2012 a s vyhláškou podľa Zbierky zákona č. 436/2012. Experimenty schválila etická komisia Ústavu pre výskum srdca SAV, kde boli následne aj vykonané.

Experimentálne zvieratá

Použitých bolo 37 samcov potkana laboratórneho (*Rattus norvegicus*) kmeňa Wistar s hmotnosťou 250 ± 20 g, vo veku 9 – 11 týždňov. Zvieratá pochádzali z chovnej stanice Dobrá voda a boli umiestnené v klietkach (maximálne päť jedincov v klietke), v podmienkach prirodzeného svetelného režimu (D:N, 12:12), pri teplote 21 °C – 23 °C. Krmené boli štandardnou peletovou potravou s prístupom k vode *ad libitum*.

Metódy

Anestéza

Pred uskutočnením každého experimentu boli pokusné zvieratá anestetizované tiopentalom ($50 - 60$ mg.kg⁻¹, i. p., Sigma-Aldrich, Nemecko) spolu s heparínom (500 IU, i. p., Léciva, Česká republika), na zabránenie vzniku krvných zrazenín.

Izolácia mitochondrií

Mitochondrie z myokardu boli izolované metódou diferenciálnej centrifugácie (5). Po excízii bolo srdce vložené

do heparinizovaného fyziologického roztoku NaCl (CentralChem, Slovenská republika). Po odstránení tukových častí, perikardu, artérií a vén bol myokard rozstrihaný na kašovitú hmotu za prítomnosti malého množstva izolačného roztoku so zložením: 180 mmol.l⁻¹ KCl (CentralChem, Slovenská republika), 4 mmol.l⁻¹ EDTA (Serva, Nemecko), 1 % albumín (Sigma-Aldrich, Nemecko), pH = 7,4, upravené pomocou kyseliny trichlóroctovej (TCA) (Serva, Nemecko). Rozstrihané tkanivo bolo potom zaliate 20 ml ľadového izolačného roztoku. Pridala sa proteáza (Sigma-Aldrich P-6141, Nemecko) v množstve 2,5 mg.g⁻¹ tkaniva. Ďalej sme tkanivo jemne homogenizovali v sklo-teflónovom homogenizátore, v ľadovom kúpeli počas troch minút. Pripravený homogenát bol za chladu následne centrifugovaný počas 10 minút pri 1 000 xg. Získaný pelet bol resuspendovaný v 20 ml izolačného média bez proteázy a opakovane sцентрифugovaný ako v predchádzajúcom. Pelet obsahujúci hrubú mitochondriovú frakciu a nečistoty bol odstránený a supernatant obsahujúci mitochondrie bol 15 minút centrifugovaný pri 5 000 xg. Získaný pelet tvoriaci mitochondriovú frakciu bol potom prepláchnutý resuspendovaním v izolačnom médiu bez albumínu a opäť stočený pri 5000 xg počas 15 minút.

Stanovenie bielkovín v izolovanej frakcii mitochondrií

Množstvo bielkovín v mitochondriovej frakcii bolo stanovené Lowryho metódou (6).

Stanovenie aktivity Mg²⁺-ATPázy mitochondrií

Aktivita mitochondriovej Mg²⁺-ATPázy reprezentuje aktivitu ATP syntázy stanovenú v prítomnosti iónov Mg²⁺ v obrátenom smere reakcie, t. j. v smere štiepenia molekúl ATP. Aktivita enzýmu bola stanovená spektrofotometricky (Shimadzu, Japan) pri vlnovej dĺžke 700 nm ako množstvo P_i uvoľneného pri štiepení ATP za jednotku času pri teplote 37 °C v 1 ml reakčného média so zložením v (mmol.l⁻¹): 250 imidazolového tlmivého roztoku (Serva, Nemecko), pH = 7,4; 40 MgCl₂ (CentralChem, Slovenská republika); 40 ATP-Tris (Sigma-Aldrich, Nemecko); 50 µg mitochondriového proteínu s koncentráciou 1 µg.µl⁻¹ v prítomnosti a neprítomnosti 0,1 mmol.l⁻¹ 2,4-dinitrofenolu (DNP) (Sigma-Aldrich, Nemecko). Reakcia sa začala pridaním ATP a zastavená bola pridaním 1 ml ľadovej 12 % TCA.

Vplyv DZX (Sigma-Aldrich, Nemecko) na aktivitu mitochondriovej Mg²⁺-ATPázy bol určený jeho priamym pridaním do reakčnej zmesi na stanovenie enzýmu. Dostatočná interakcia bola zabezpečená 10 minútovou predinkubáciou DZX s mitochondriami pri teplote 37 °C. DZX sa pridával v stúpajúcom koncentračnom rozpätí 0 – 7 µmol.l⁻¹ pri zachovanom objeme reakčnej zmesi 1 ml. Po ukončení predinkubácie sa enzýmová reakcia začala pridaním ATP. Pre slabšiu rozpustnosť bol DZX rozpustený v zmesi dimetylsulfoxidu

(DMSO) (Serva, Nemecko) a vody v pomere 1 : 1. Tento základný roztok sa v ďalšom riedil podľa vopred pripravenej škály koncentrácií vždy tak, aby sa zachoval výsledný objem pridaného roztoku DZX 200 µl.

Stanovenie fluidity lipidovej dvojvrstvy mitochondriovej membrány

Fluidita lipidovej vrstvy mitochondriovej membrány bola stanovená meraním fluorescenčnej anizotropie (Perkin Elmer, USA) lipofilnou fluorescenčnou sondou 1,6-difeny-1,3,5-hexatrién (DPH, Sigma-Aldrich). Na základe svojej afinity sonda vniká medzi lipidy mitochondriovej membrány a signál, ktorý sonda poskytuje, odráža rozsah pohybu molekúl sondy, ktorý závisí od fluidity lipidov. Meraná anizotropia fluorescence DPH je k fluidite v nepriamoúmernom vzťahu.

Izolované mitochondrie boli resuspendované do konečnej koncentrácie proteínu 0,5 mg.ml⁻¹ v roztoku obsahujúcom 180 NaCl; 4 EDTA (Serva, Nemecko), pH = 7,4 a boli označené 0,25 µmol.l⁻¹ roztokom DPH rozsuspendovaným v zmesi acetónu a vody v pomere 1 : 250. Vzorky boli inkubované pri teplote 22 ± 1 °C, fluorescencia bola stanovená pri excitačnej vlnovej dĺžke 360 nm a pri emisnej vlnovej dĺžke 425 nm. Fluorescenčná anizotropia bol stanovená podľa Shinitzky (7).

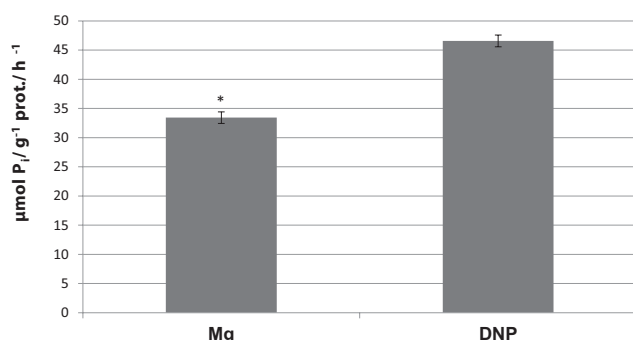
Štatistická analýza

Namerané hodnoty prezentujeme ako priemerné hodnoty ± stredná chyba priemeru (SEM). Rozdiely medzi jednotlivými skupinami sme vyhodnotili metódou viacnásobných porovnávaní pri významnom globálnom teste analýzy variancie (ANOVA). V prípade nenormálneho rozdelenia údajov sme použili neparametrickú analýzu variancie Kruskal-Wallisov test pre nepárový dizajn, alebo Friedmanov test pre párové porovnania. Pre testovanie významnosti vzťahov sme použili metódu lineárnej regresie so súčasným testovaním tzv. vplyvných bodov. Významnosť rozdielov v stredných hodnotách indikujeme v grafoch nasledovne: * p < 0,05, ** p < 0,01 a ***p < 0,001.

Výsledky

Aktuálna a totálna aktivita mitochondriovej Mg²⁺-ATPázy

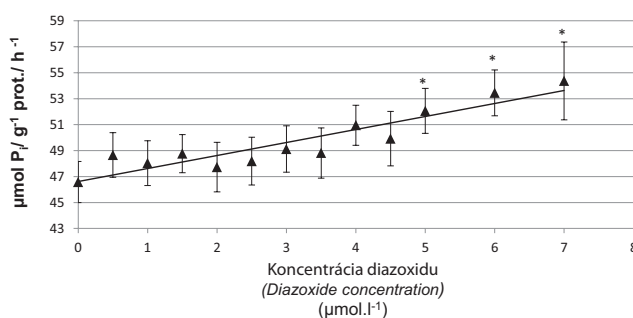
Membrány intaktných mitochondrií nie sú priepustné pre ióny Mg²⁺. Ak sa však ióny Mg²⁺ dostanú do mitochondrie, dôjde k obráteniu smeru reakcie ATP-syntázy a enzým začne pracovať ako Mg²⁺-ATPáza. Preto aktivita mitochondriovej Mg²⁺-ATPázy, stanovená v preparáte izolovaných mitochondrií, sa týka len tej časti mitochondrií, ktoré majú narušenú integritu membrány. Táto aktivita sa



Obrázok 1 Aktuálna a totálna aktivita Mg^{2+} -ATPázy vo frakcii mitochondrií izolovaných zo srdca potkanov

Figure 1 Actual activity of Mg^{2+} -ATPase and total activity of Mg^{2+} -ATPase in the preparation of isolated mitochondria from rat hearts

Mg – aktuálna aktivita Mg^{2+} -ATPázy (actual activity of the Mg^{2+} -ATPase), DNP – totálna (DNP-stimulovaná) aktivita Mg^{2+} -ATPázy (total (DNP-stimulated) activity of the Mg^{2+} -ATPase). Výsledky sú vyjadrené ako aritmetický priemer $\pm$ SEM. Porovnania: Mg vs. DNP, * $p < 0,05$, $n = 8$. (Results are given as means $\pm$ S.E.M. Comparisons: Mg vs. DNP, * $p < 0,05$, $n = 8$).



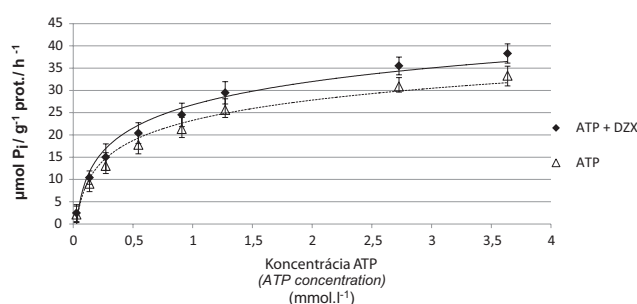
Obrázok 2 Modulácia aktivity DNP-stimulovanej Mg^{2+} -ATPázy mitochondrií zo srdca potkana stúpajúcimi koncentraciami diazoxidu (DZX)

Figure 2 Rat heart mitochondrial DNP-stimulated Mg^{2+} -ATPase activity modulated by the increasing concentrations of DZX

Výsledky sú udávané ako aritmetický priemer $\pm$ SEM. Porovnania: 0 μmol DZX vs. 5 μmol DZX, 0 μmol DZX vs. 6 μmol DZX, 0 μmol DZX vs. 7 μmol DZX, * $p < 0,05$; $n = 8$ (Results are given as means $\pm$ S.E.M. Comparisons: 0 μmol DZX vs. 5 μmol DZX, 0 μmol DZX vs. 6 μmol DZX, 0 μmol DZX vs. 7 μmol DZX, * $p < 0,05$; $n = 8$)

označuje ako aktuálna aktivita Mg^{2+} -ATPázy, na rozdiel od aktivity totálnej, ktorú možno stanoviť v prípade sprístupnenia membrán všetkých mitochondrií pre ióny Mg^{2+} . V našich experimentoch sme to dosiahli pridaním DNP, odpojovača oxidačnej fosforylácie. Rozdiel medzi aktuálnou a totálnou aktivitou Mg^{2+} -ATPázy, vyjadrený v percentách, potom udával aj podiel intaktných mitochondrií v daných preparátoch zo srdca potkanov.

V našich frakciách izolovaných mitochondrií zo srdca zdravých potkanov tvoril podiel intaktných mitochondrií, určený z pomeru aktivít aktuálnej a totálnej Mg^{2+} -ATPázy, v priemere 28,24 % (**obrázok 1**).



Obrázok 3 Aktivácia mitochondriovej Mg^{2+} -ATPázy zo srdcových mitochondrií stúpajúcou koncentráciou ATP v prítomnosti a neprítomnosti 7 μmol . l⁻¹ diazoxidu (DZX)

Figure 3 Activation of mitochondrial Mg^{2+} -ATPase by the increase in the concentrations of ATP both in the presence and absence of DZX

Použitá ATP bolo 3,6 mmol . l⁻¹ v 1 ml inkubačného média. Jednotlivé body aktivít sú vyjadrené ako aritmetický priemer $\pm$ SEM. Porovnania: ATP vs. ATP + DZX; $p > 0,05$; $n = 7$ (ATP), $n = 7$ (ATP + DZX). [3,6 mmol.l⁻¹ ATP in 1 ml incubation medium was used. Individual points of activities are given as arithmetic mean $\pm$ SEM. Comparisons: ATP vs. ATP+DZX, $p > 0,05$; $n = 7$ (ATP), $n = 7$ (ATP + DZX)].

Vplyv diazoxidu na aktivitu mitochondriovej DNP-stimulovanej Mg^{2+} -ATPázy

Z výsledkov zobrazených v **obrázku 2** vyplýva, že od koncentrácie 3,5 μmol.l⁻¹ bola aktivita mitochondriovej totálnej Mg^{2+} -ATPázy stimulovaná stúpajúcimi koncentraciami DZX. Štatisticky významné zvýšenie ($p < 0,05$) aktivity Mg^{2+} -ATPázy sa dosiahlo v prítomnosti koncentrácií DZX 5 μmol.l⁻¹ (11,76 %), 6 μmol.l⁻¹ (14,75 %) a 7 μmol.l⁻¹ (16,72 %), v porovnaní s aktivitou neovplyvneného enzýmu.

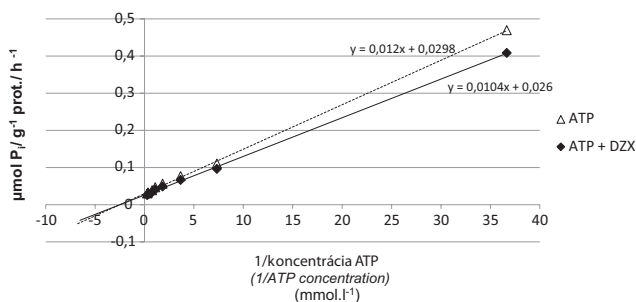
Výšetrovanie charakteru interakcie DZX s mitochondriovou Mg^{2+} -ATPázou

Na zistenie charakteru interakcie DZX s mitochondriovou Mg^{2+} -ATPázou sme vybrali najvyššiu použitú koncentráciu DZX (7 μmol.l⁻¹), ktorá preukázala štatisticky významné zvýšenie aktivity mitochondriovej Mg^{2+} -ATPázy.

Rýchly časový priebeh reakcie (minúty) poukazuje na reakciu chemickú. Vyšetrenie reakčnej kinetiky aktivácie mitochondriovej Mg^{2+} -ATPázy jej vlastným substrátom, čiže s ATP, v prítomnosti konštantného množstva (7 μmol.l⁻¹) DZX (**obrázok 3**) ukázalo, že stimulačný efekt DZX je rovnaký v celom koncentračnom rozsahu aktivácie enzýmu s ATP.

Údaje získané pri aktivácii mitochondriovej Mg^{2+} -ATPázy s ATP v prítomnosti a neprítomnosti DZX, graficky analyzované v systéme Lineweaver – Burk (**obrázok 4**) ukázali, že stimulácia enzýmu s DZX zvyšuje len maximálnu rýchlosť (V_{max}), pričom Michaelisovu konštantu (K_m) enzýmovej reakcie nemení.

Z porovnania výsledných hodnôt maximálnej rýchlosti aktivity Mg^{2+} -ATPázy zo srdcových mitochondrií v neprítomnosti



Obrázok 4 Znáznornenie aktivácie Mg^{2+} -ATPázy v srdcových mitochondriách stúpajúcimi koncentraciami ATP v prítomnosti a neprítomnosti $7 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ diazoxidu (DZX) podľa Lineweaver-Burka

Figure 4 Lineweaver-Burk plot for the activity Mg^{2+} -ATPase of mitochondria induced by the increase in ATP concentrations both in the presence and absence of diazoxide (DZX)

Použitá ATP bolo $3,6 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ v 1 ml inkubačného média. Jednotlivé body sú udávané ako aritmetický priemer $\pm$ SEM. Porovnania: ATP vs. ATP + DZX; $n = 7$ (ATP), $n = 7$ (ATP + DZX). [$3,6 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ATP in 1 ml incubation medium was used. Each point is given as arithmetic mean $\pm$ SEM. Comparisons: ATP vs. ATP + DZX; $n = 7$ (ATP), $n = 7$ (ATP + DZX)].

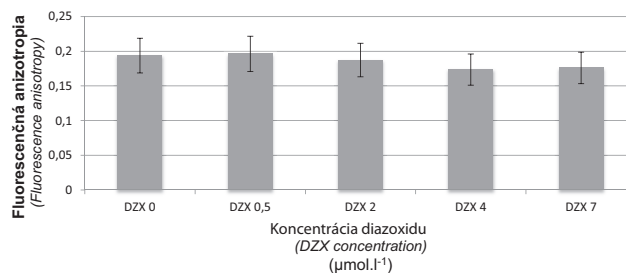
DZX a v prítomnosti $7 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ DZX, vyplýva 14,60 %-né zvýšenie aktivity enzýmu v prítomnosti $7 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ DZX. Porovnanie kinetických parametrov modulácie Mg^{2+} -ATPázy zo srdcových mitochondrií s DZX je obsiahnuté v **tabuľke 1**.

Fluidita lipidovej dvojvrstvy v membránach mitochondrií

Fluidita lipidovej dvojvrstvy mitochondriovej membrány sa merala fluorescenčnou anizotropiou v prítomnosti a neprítomnosti DZX. Stúpajúce koncentrácie DZX indukovali mierny 8,3 %-ný pokles fluorescenčnej anizotropie v membránach mitochondrií v prítomnosti najvyššej použitej koncentrácie DZX ($7 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) (**obrázok 5**). Pokles anizotropie poukazuje na zvyšovanie fluidity mitochondriovej membrány v prítomnosti DZX, avšak nedosahuje úroveň štatistickej signifikancie ($p > 0,05$).

Diskusia

Súčasný stav znalostí o preconditioningu vyvolaného s DZX naznačuje, že táto zlúčenina má veľmi komplexný mechanizmus účinku, čím sa znižuje pravdepodobnosť jej skorého klinického využitia. Skúmanie molekulárneho mechanizmu účinku DZX však poukázalo na viaceré, predtým neuvažované procesy, ktoré sa na indukcii PC podieľali. Z tohto hľadiska bolo preto užitočné pokračovať v skúmaní mechanizmu účinku DZX, s cieľom odhaliť procesy využiteľné pri vyvolaní farmakologického PC inými induktormi.



Obrázok 5 Zmeny fluorescenčnej anizotropie DPH v membránach srdcových mitochondrií vyvolané stúpajúcimi koncentraciami diazoxidu (DZX)

Figure 5 Dependence of changes in the fluorescence anisotropy of DPH in the rat heart mitochondrial membranes on the concentration of diazoxide (DZX)

Výsledky sú vyjadrené ako aritmetický priemer $\pm$ SEM; $n = 7$. (Results are given as arithmetic mean $\pm$ SEM; $n = 7$).

V predchádzajúcich výskumoch sa ukázalo, že otvorenie K_{ATP} kanála (8) ani inhibícia sukcinátdehydrogenázy (3) a napokon ani voľné radikály (9) vznikajúce v súvislosti s inhibíciou Krebsoho cyklu nie sú bezprostredným činiteľom, ktorý vyvolá zvýšenie rezistencie myokardu proti hypoxii či ischémii.

V predloženej štúdií sme sa preto zamerali na ďalší kľúčový faktor, na mitochondriovú Mg^{2+} -ATPázu. Stanovovaním aktivity tohto enzýmu sa vlastne určuje katalytická aktivita ATP-syntázy.

Z technických príčin sa Mg^{2+} -ATPsyntáza stanovuje v obrátenom smere jej reakcie, čiže v smere štiepenia molekúl ATP, čo možno dosiahnuť v prítomnosti iónov Mg^{2+} . Membrány intaktných mitochondrií nie sú pre ióny Mg^{2+} priepustné, a preto sa aktivita Mg^{2+} -ATPázy dá stanoviť len v tej časti danej populácie mitochondrií, ktorých membrána sa pri izolácii narušila (5). Tento dostupný podiel Mg^{2+} -ATPázovej aktivity sa označuje ako aktuálna Mg^{2+} -ATPázová aktivita na rozdiel od totálnej aktivity, ktorá zahŕňa ATPázovú aktivitu všetkých mitochondrií. Pomer medzi aktuálnou a totálnou aktivitou mitochondriovej Mg^{2+} -ATPázy možno preto využiť aj na určenie podielu intaktných mitochondrií v danom preparáte. Preparáty mitochondrií, ktoré sme v predkladanom experimente použili, obsahovali priemerne 28,24 % intaktných

Tabuľka 1 Porovnanie hodnôt K_m a V_{max} v prítomnosti a neprítomnosti $7 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ diazoxidu (DZX)

Table 1 Comparison of values of K_m and V_{max} in the presence and absence of $7 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ diazoxide (DZX)

	ATP	ATP + DZX
V_{max}	33,560	38,460
K_m	0,403	0,400

K_m – Michaelisova konštanta (Michaelis constant), V_{max} – maximálna rýchlosť aktivity enzýmu (maximum speed of enzyme activity), DZX – diazoxid, ATP – adenozíntrifosfát (adenosine triphosphate)

mitochondrií schopných vytvárať membránový potenciál a tým zabezpečiť proces oxidačnej fosforylácie (**obrázok 1**). Tento výsledok bol v súlade s údajmi v našich predchádzajúcich experimentoch, v ktorých sa javil dostačujúci aj na stanovenie oxidačnej fosforylácie (5, 10, 11).

Vplyv stúpajúcich koncentrácií DZX na aktivitu DNP-stimulovanej Mg^{2+} -ATPázy sa sledoval v mitochondriách izolovaných zo srdc zdravých potkanov kmeňa Wistar. Rozsah použitých koncentrácií DZX sa upravil tak, aby DMSO potrebný pri rozpúšťaní DZX neinterferoval so stanovením aktivity Mg^{2+} -ATPázy a neovplyvnil ani fluiditu mitochondriovej membrány. Zistilo sa, že stúpajúce množstvá DZX počnúc od $3,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ stimulujú aktivitu Mg^{2+} -ATPázy koncentračne závislým spôsobom. Štatisticky významná stimulácia enzýmu ($p < 0,05$) sa dosiahla pri koncentrácii DZX $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (11,76 %), $6 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (14,75 %) a $7 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (16,72 %) (**obrázok 2**). Koncentrácia DZX $7 \mu\text{mol.l}^{-1}$, v ktorej prítomnosti sme zaznamenali najvyšší nárast aktivity enzýmu spomedzi všetkých použitých koncentrácií DZX, bola aplikovaná aj pri ďalších stanoveniach.

Paralelne s testovaným vplyvom DZX na aktivitu Mg^{2+} -ATPázy sa testovala aj fluidita mitochondriovej membrány. Avšak ani pri najvyššej použitej koncentrácii DZX nebola zaznamenaná významná zmena fluidity (**obrázok 5**). To naznačuje, že zmeny aktivity mitochondriovej Mg^{2+} -ATPázy indukované s DZX súviseli primárne s interakciou enzýmu s DZX a neboli spôsobené vplyvom fluidity mitochondriovej membrány.

Typ tejto interakcie bol testovaný aktiváciou mitochondriovej Mg^{2+} -ATPázy stúpajúcimi koncentraciami ATP v prítomnosti a neprítomnosti $7 \mu\text{mol.l}^{-1}$ DZX. Grafické znázornenie tejto závislosti v systéme podľa Michaelis-Mentena, ako aj ďalšia linearizácia krivky podľa Lineweaver-Burka a z nej získané kinetické konštanty (**tabuľka 1**) K_m a $V_{\max}$ odhalili, že DZX pôsobí ako nekompetitívny stimulátor mitochondriovej Mg^{2+} -ATPázy (**obrázky 3, 4**). Z toho vyplýva, že DZX interaguje s molekulou Mg^{2+} -ATPázy bezprostredne. K tejto interakcii nedochádza v aktívnom mieste, čiže v ATP-väzbovom mieste enzýmu, ale na inom mieste jeho molekuly.

Z uvedených výsledkov vyplýva, že DZX sekundárne indukuje PC viacerými mechanizmami. Interakciou s molekulou mitochondriovej Mg^{2+} -ATPázy však priamo stimuluje aktivitu tohto enzýmu, čoho pravdepodobným dôsledkom je zlepšenie spojenia medzi oxidáciou a fosforyláciou v mitochondriách myokardu. Tento poznatok môže byť zaujímavý okrem kardiológov aj pre kardiovaskulárnych farmakológov a farmaceutov.

S podporou grantov: VEGA: 2/0101/12, 2/0094/12, 2/0054/11, 2/027/11, 2/0207/11

KEGA 003 UK – 4/2012, APVV – 0102 – 11, APVV – LPP – 0393 – 09.

Literatúra

1. Ravingerová T, Pancza D, Ziegelhöffer A, Styk J. Preconditioning modulates susceptibility to ischemia-induced arrhythmias in rat heart: The role of α -adrenergic stimulation and K(ATP) channels. *Physiol Res* 2002;51:109-119.
2. Matejčíková J, Kuchárska J, Pinterová M, Pancza D, Ravingerová T. Protection against ischemia-induced ventricular arrhythmias and myocardial dysfunction conferred by preconditioning in the rat heart: Involvement of mitochondrial KATP channels and reactive oxygen species. *Physiol Res* 2009;58:9-19.
3. Lenzen S, Panten U. Characterization of succinate dehydrogenase and α -glycerophosphate dehydrogenase in pancreatic islets. *Biochem Medicine* 1983;30:349-356.
4. Kim M-Y, Kim MJ, Yoon IS, Ahn JH, Lee SH, Baik EJ, Moon C-H, Jung Y-S. Diazoxide acts more as a PKC- ϵ activator, and indirectly activates the mitochondrial KATP channel conferring cardioprotection against hypoxic injury. *Br J of Pharmacol* 2006;149:1059-1070.
5. Ferko M, Gvozďjaková A, Kuchárska J, Mujkošová J, Waculíková I, Styk J, Ravingerová T, Ziegelhöffer-Mihalovičová B, Ziegelhöffer A. Functional remodeling of heart mitochondria in acute diabetes: Interrelationships between damage, Endogenous protection and adaptation. *Gen Physiol Biophys* 2006;25:397-413.
6. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
7. Shinitzky M. Membrane fluidity in malignancy. Adversative and recuperative. *Biochim Biophys Acta* 1984;738:251-261.
8. Matejčíková J, Ravingerová T, Pancza D, Čarnická S, Kolář F. Mitochondrial KATP opening confers protection against lethal myocardial injury and ischaemia-induced arrhythmias in the rat heart via PI3K/Akt-dependent and independent mechanisms. *Can J Physiol Pharmacol* 2009;87:1055-1062.
9. Maleková L, Komínková V, Ferko M, Štefánik P, Križanová O, Ziegelhöffer A, Szewczyk A, Ondráš K. Bongkrekic acid and atractyloside inhibits chloride channels from mitochondrial membranes of rat heart. *Biochim Biophys Acta* 2007;1767:31-44.
10. Ziegelhöffer A, Ravingerová T, Styk J, Tribulová N, Volkovová K, Seboková J, Brierer A. Diabetic cardiomyopathy in rats: biochemical mechanisms of increased tolerance to calcium overload. *Diabetes Res Clin Pr* 1996;31:93-103.
11. Ziegelhöffer A, Waculíková I, Ravingerová T, Ziegelhöffer-Mihalovičová B. Augmented energy transfer in rat heart mitochondria: Compensatory response to abnormal household of energy in acute diabetes. In: Pierce GN, Nagano M, Zahradka P, Dhalla NS.(Eds). *Atherosclerosis, hypertension and diabetes*. Boston: Kluwer Academic Publisher; 2003:439-453.