

УДК 577.352.5

РЕЄСТРАЦІЯ K^+ -РІВНОВАЖНОГО ПОТЕНЦІАЛУ НА ПЛАЗМАТИЧНІЙ МЕМБРАНІ КЛІТИН МІОМЕТРІЯ І ВИВЧЕННЯ ЙОГО МОДУЛЯЦІЇ NO_x ТА H_2O_2 МЕТОДОМ ПРОТОВОЇ ЦИТОМЕТРІЇ

Г. В. ДАНИЛОВИЧ, Ю. В. ДАНИЛОВИЧ, В. Ф. ГОРЧЕВ

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: danylovych@biochem.kiev.ua

Доведено перспективність застосування протокової цитометрії із використанням потенціалчутливого зонда 3,3'-дигексилосикарбоцианіну [$DiOC_6(3)$] для дослідження формування K^+ -рівноважного мембранного потенціалу на експериментальній моделі везикул плазматичної мембрани міометрія у присутності валіноміцину. Визначена цим методом величина трансмембранного потенціалу сумірна з розрахованою за рівнянням Нернста. Пероксид водню та NO_2^- , ймовірно, підвищують проникність мембрани для K^+ і призводять до дисипації раніше наведеного потенціалу. Цей ефект відсутній за наявності в середовищі нітропрусида натрію.

Одержані нами результати підтверджують припущення щодо посилення пасивного транспортування іонів калію крізь сарколему за дії вищезазначених сполук і, відповідно, до реполяризації мембрани та зниження рівня збудливості сарколеми.

Ключові слова: K^+ -рівноважний мембранний потенціал, сарколема, пероксид водню, оксиди азоту, протокова цитометрія.

Дослідження останніх років свідчать про можливу участь оксидів азоту і пероксиду водню у процесах тривалої релаксації міометрія на тлі зменшеної чутливості до утероконстрикторних агентів, що спостерігається під час вагітності за підвищеного рівня прогестерону у тканинах матки (прогестеронова блокада). NO_x та H_2O_2 іноді виявляють односпрямовану функціональну активність, зокрема зумовлюють релаксацію клітин міометрія [1–5]. Одним із механізмів міорелаксаційного ефекту вважають активацію Ca^{2+} -залежних K^+ -каналів сарколеми оксидом азоту шляхом окислення функціонально важливих сульфгідрильних груп або протеїнкіназа G-залежними шляхами. Активація K^+ -каналів, імовірно, пов'язана з дією H_2O_2 — фактора, що гіперполяризує гладенькі м'язи. Зважаючи на незначну роль cGMP у механізмах релаксації міометрія за дії оксиду азоту та пероксиду водню [2, 3], актуальності набуває вивчення їхнього безпосереднього впливу на мембрану, передусім на пасивне транспортування крізь неї K^+ та на трансмембранний потенціал.

Досить зручною моделлю для вивчення впливу потенціалу на обмін катіонів є везикули плазматичної мембрани. Раніше в наших експериментах було встановлено, що фракція плазматичних мембран клітин міометрія свині

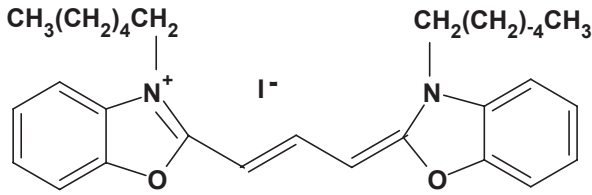
містить близько 80% везикульованих фрагментів [6, 7]. Цю модель апробовано в багатьох дослідженнях з вивчення дії хімічних речовин на сарколему [8].

Отже, метою роботи було довести, застосовуючи потенціалчутливий флуоресцентний зонд 3,3'-дигексилосикарбоцианін [$DiOC_6(3)$] і методи спектрофлуориметрії та протокової цитометрії, можливість формування трансмембранного потенціалу $\Delta\phi$, який за значенням відповідав би розрахованому за рівнянням Нернста, та дослідити можливий вплив нітрит-аніонів, нітропрусида натрію та пероксиду водню на його величину.

Матеріали і методи

Фракцію сарколеми виділяли з міометрія свині методом диференційного центрифугування у градієнті густини сахарози як описано у статті [9]. Раніше нами було виявлено, що одержана фракція плазматичних мембран має, переважно, везикульовану структуру [6, 7].

Вміст протеїну визначали методом М. Bradford [10]. Середнє значення його в мембранній фракції становило 1,5–3,6 мг/мл. Мембранний потенціал реєстрували за зміною інтенсивності флуоресценції потенціалчутливого зонда 3,3'-дигексилосикарбоцианіну [$DiOC_6(3)$].



Препарат везикул сарколеми попередньо врівноважували упродовж 15–18 год при 4 °С в середовищі, що містило 300 мМ КСІ і 20 мМ НЕРЕС-Tris (рН 7,4).

Зміни флуоресценції DiOC₆(3) методом спектрофлуориметрії ($\lambda_{36} = 450$ нм, $\lambda_{\text{фл}} = 506$ нм) вивчали за допомогою спектрофлуориметра Signe-4M (Латвія) в середовищі (об'єм 2 мл), що містило: 5 мкМ DiOC₆(3), 20 мМ НЕРЕС-Tris (рН 7,4; температура – 37 °С), 150 мкг/мл протеїну і 0,5 мкМ валіноміцину. Потенціал певного значення створювали внесенням до розчину КСІ в різних концентраціях (температура – 37 °С), розрахованих за рівнянням Нернста, а іонну силу доводили до 300 мМ додаванням холінхлориду (ChCl) – варіанти експерименту 1–7:

1. 300 мМ $[K^+]_i$ /300 мМ $[K^+]_e$ ($\Delta\phi = 0$ мВ),
2. 300 мМ $[K^+]_i$ /250 мМ $[K^+]_e$ + 50 мМ $[Ch^+]_e$ ($\Delta\phi = -4,9$ мВ),
3. 300 мМ $[K^+]_i$ /200 мМ $[K^+]_e$ + 100 мМ $[Ch^+]_e$ ($\Delta\phi = -10,8$ мВ),
4. 300 мМ $[K^+]_i$ /150 мМ $[K^+]_e$ + 150 мМ $[Ch^+]_e$ ($\Delta\phi = -18,5$ мВ),
5. 300 мМ $[K^+]_i$ /100 мМ $[K^+]_e$ + 200 мМ $[Ch^+]_e$ ($\Delta\phi = -29,3$ мВ),
6. 300 мМ $[K^+]_i$ /50 мМ $[K^+]_e$ + 250 мМ $[Ch^+]_e$ ($\Delta\phi = -47,8$ мВ),
7. 300 мМ $[K^+]_i$ /30 мМ $[K^+]_e$ + 270 мМ $[Ch^+]_e$ ($\Delta\phi = -61,5$ мВ).

K^+ -рівноважний потенціал у везикулярній мембранній системі визначали у присутності 0,5 мкМ валіноміцину (Val). Значення K^+ -рівноважного потенціалу обчислювали за рівнянням Нернста:

$$\Delta\phi = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K^+]_e}{[K^+]_i}, \quad (1)$$

де $[K^+]_e$ та $[K^+]_i$ – концентрація іонів калію поза везикулами та всередині них відповідно.

У разі застосування протокового цитометра COULTER EPICS XLTM (Beckman Coulter, США) з аргонним лазером ($\lambda_{36} = 488$ нм, $\lambda_{\text{фл}} = 510$ нм) значення K^+ -рівноважного потенціалу $\Delta\phi$ обчислювали при 23 °С (варіанти досліду 1–7):

1. 300 мМ $[K^+]_i$ /300 мМ $[K^+]_e$ ($\Delta\phi = 0$ мВ),
2. 300 мМ $[K^+]_i$ /250 мМ $[K^+]_e$ + 50 мМ $[Ch^+]_e$ ($\Delta\phi = -4,6$ мВ),
3. 300 мМ $[K^+]_i$ /200 мМ $[K^+]_e$ + 100 мМ $[Ch^+]_e$ ($\Delta\phi = -10,3$ мВ),
4. 300 мМ $[K^+]_i$ /150 мМ $[K^+]_e$ + 150 мМ $[Ch^+]_e$ ($\Delta\phi = -17,5$ мВ),
5. 300 мМ $[K^+]_i$ /100 мМ $[K^+]_e$ + 200 мМ $[Ch^+]_e$ ($\Delta\phi = -27,8$ мВ),
6. 300 мМ $[K^+]_i$ /50 мМ $[K^+]_e$ + 250 мМ $[Ch^+]_e$ ($\Delta\phi = -45,3$ мВ),
7. 300 мМ $[K^+]_i$ /30 мМ $[K^+]_e$ + 270 мМ $[Ch^+]_e$ ($\Delta\phi = -58,3$ мВ).

Концентрація пероксиду водню, нітрит-аніонів та нітропрусиду натрію (NPS) становила 50 мкМ. Для визначення впливу оксидів азоту та пероксиду водню на K^+ -рівноважний потенціал використовували емпіричні формули. Інтенсивність флуоресценції DiOC₆(3) розраховували у відносних одиницях (відн. од.), що відповідали б залежності флуоресцентної відповіді зонда від значення $\Delta\phi$, обчисленого за рівнянням Нернста.

Варіанти експериментів:

- Контроль:

$$\text{Ефект (відн. од.)} = \frac{\Delta PkPosX_{100}}{\Delta PkPosX_{300}}, \quad (2)$$

де $\Delta PkPosX_{300}$ – різниця між положеннями піків до та після внесення до середовища валіноміцину при $\Delta\phi = 0$ мВ ($[K^+]_i = [K^+]_e = 300$ мМ); $\Delta PkPosX_{100}$ – різниця між положеннями піків до та після внесення валіноміцину при $\Delta\phi = -27,8$ мВ (300 мМ $[K^+]_i$ /100 мМ $[K^+]_e$ + 200 мМ $[Ch^+]_e$).

-Вплив H_2O_2 , NO_2^- та NPS на флуоресценцію зонда за наявності градієнта K^+ на мембрані:

$$\text{Ефект (відн. од.)} = \frac{\Delta PkPosX_{100(\text{ефектор})}}{\Delta PkPosX_{300(\text{ефектор})}}, \quad (3)$$

де $\Delta PkPosX_{300(\text{ефектор})}$ – різниця між положеннями піків до та після внесення ефекторів (H_2O_2 , NO_2^- , NPS) за відсутності градієнта іонів калію ($[K^+]_i = [K^+]_e = 300$ мМ); $\Delta PkPosX_{100(\text{ефектор})}$ – різниця між положеннями піків до та після внесення H_2O_2 , NO_2^- , NPS за наявності градієнта K^+ , спрямованого із внутрішньовезикулярного середовища назовні (300 мМ $[K^+]_i$ /100 мМ $[K^+]_e$ + 200 мМ $[Ch^+]_e$).

- Дія H_2O_2 , NO_2^- , NPS на флуоресценцію зонда за наявності наведеного трансмембранного потенціалу (-27,8 мВ):

$$\text{Ефект (відн. од.)} = \frac{\Delta PkPosX_{100(Val+ефектор)}}{\Delta PkPosX_{300(Val+ефектор)}}, \quad (4)$$

де $\Delta PkPosX_{300(Val+ефектор)}$ – різниця між положеннями піків до та після внесення валіноміцину, H_2O_2 , NO_2^- і NPS – за відсутності градієнта іонів калію ($[K^+]_i = [K^+]_e = 300$ мМ); $\Delta PkPosX_{100(Val+ефектор)}$ – різниця між положеннями піків до та після внесення валіноміцину, H_2O_2 , NO_2^- і NPS – за наявності градієнта K^+ (300 мМ $[K^+]_i/100$ мМ $[K^+]_e + 200$ мМ $[Ch^+]_e$).

- Вплив валіноміцину на флуоресцентну відповідь зонда після попереднього оброблення везикул H_2O_2 , NO_2^- та NPS:

$$\text{Ефект (відн. од.)} = \frac{\Delta PkPosX_{100(ефектор+Val)}}{\Delta PkPosX_{300(ефектор+Val)}}, \quad (5)$$

де $\Delta PkPosX_{300(ефектор+Val)}$ – різниця між положеннями піків до та після внесення валіноміцину у присутності в середовищі H_2O_2 , NO_2^- , NPS та за відсутності градієнта іонів калію ($[K^+]_i = [K^+]_e = 300$ мМ); $\Delta PkPosX_{100(ефектор+Val)}$ – різниця між положеннями піків до та після внесення валіноміцину у присутності H_2O_2 , NO_2^- , NPS і наявності градієнта K^+ (300 мМ $[K^+]_i/100$ мМ $[K^+]_e + 200$ мМ $[Ch^+]_e$).

Для статистичного аналізу одержаних даних використовували пакет стандартних програм IBM PC.

У роботі застосовували такі реактиви: NEPES (Sigma, США), трис-гідроксиметил-амінометан (Reanal, Угорщина), тритон X-100 (Merk, Німеччина), ЕГТА, 3,3'-дигексилокси-карбоціанін (Fluka, Швейцарія). Інші реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації чда та хч.

Результати та обговорення

Реєстрація K^+ -рівноважного потенціалу на мембрані везикул сарколеми. Реєстрацію трансмембранного потенціалу здійснювали за допомогою ліпофільного і позитивно зарядженого потенціалчутливого зонда $DiOC_6(3)$, що належить до ціанінових барвників [11]. Максимум його флуоресценції в буферному розчині (20 мМ NEPES-Tris, 300 мМ KCl) становить 500 нм, а спектр збудження флуоресценції – має два максимуми (450 та 488 нм). Інтенсивність флуоресценції зонда лінійно зростає в межах 0–26 мкМ з подальшим насиченням зі збільшенням його концентрації. Внесення суспензії везикул до реакційного середовища підвищує інтенсивність флуоресценції та зміщує її максимум до довгохвильової області (506 нм), що, ймовірно, пояснюється

зв'язуванням $DiOC_6(3)$ з мембранами. Для вибору оптимального співвідношення концентрації зонда та суспензії мембран досліджували залежність інтенсивності флуоресценції зонда від концентрації та кількості протеїну у пробі (50, 100 та 150 мкг/мл). Максимальну інтенсивність флуоресценції зареєстровано при 5 мкМ концентрації зонда та вмісті протеїну 150 мкг/мл суспензії плазматичних мембран. Для створення трансмембранного потенціалу суспензію везикул із 300 мМ іонів калію у внутрішньовезикулярному середовищі вносили до буферного розчину, концентрація K^+ у якому становила від 30 до 300 мМ.

Одержані нами дані свідчать (рис. 1, а), що внесення суспензії везикул до реакційного середовища спричинює помірне зростання інтенсивності флуоресценції $DiOC_6(3)$. Відповідно до даних літератури [12, 13] швидкий вихід K^+ із везикул за градієнтом концентрації після внесення до середовища валіноміцину зумовлює створення на внутрішній поверхні везикулярної мембрани від'ємного заряду, внаслідок чого позитивно заряджені молекули зонда акумулюються у внутрішньовезикулярному середовищі. Це може спричинити короткотривалий спалах світіння зонда. Як впливає з результатів типового експерименту (рис. 1, а), валіноміцин дійсно індукує істотний спалах флуоресценції, який ми умовно позначили ΔF . На другій стадії процесу зонд димеризується через високу концентрацію всередині везикул, що, у свою чергу, зумовлює стрімке гасіння флуоресценції (ΔI) [12, 13], причому ступінь її залежить від величини градієнта K^+ , спрямованого із внутрішнього середовища везикул до позавезикулярного. Пізніше спостерігається повільне зростання інтенсивності флуоресценції, яке, ймовірно, пов'язано з дисипацією потенціалу на мембрані.

Нами встановлено, що базальна флуоресценція $DiOC_6(3)$ та її інтенсивність після внесення до середовища суспензії везикул майже не залежить від концентрації іонів калію в буферному розчині (графічні дані не наведено). Водночас, на величину спалаху флуоресценції зонда у присутності валіноміцину впливає концентрація в ньому K^+ . Але криві залежності відносної зміни флуоресценції зонда ($\Delta F/F_0$) та величини потенціалу, обчисленого за рівнянням Нернста ($-\Delta\phi$), від зміни концентрації K^+ ззовні везикул повністю не збігаються (рис. 1, б). Отже, відносне зростання флуоресценції на першому етапі акумуляції зонда безпосередньо не пов'язане з величиною обчисленого трансмембранного потенціалу. Однак дані літератури свідчать [11], що існує

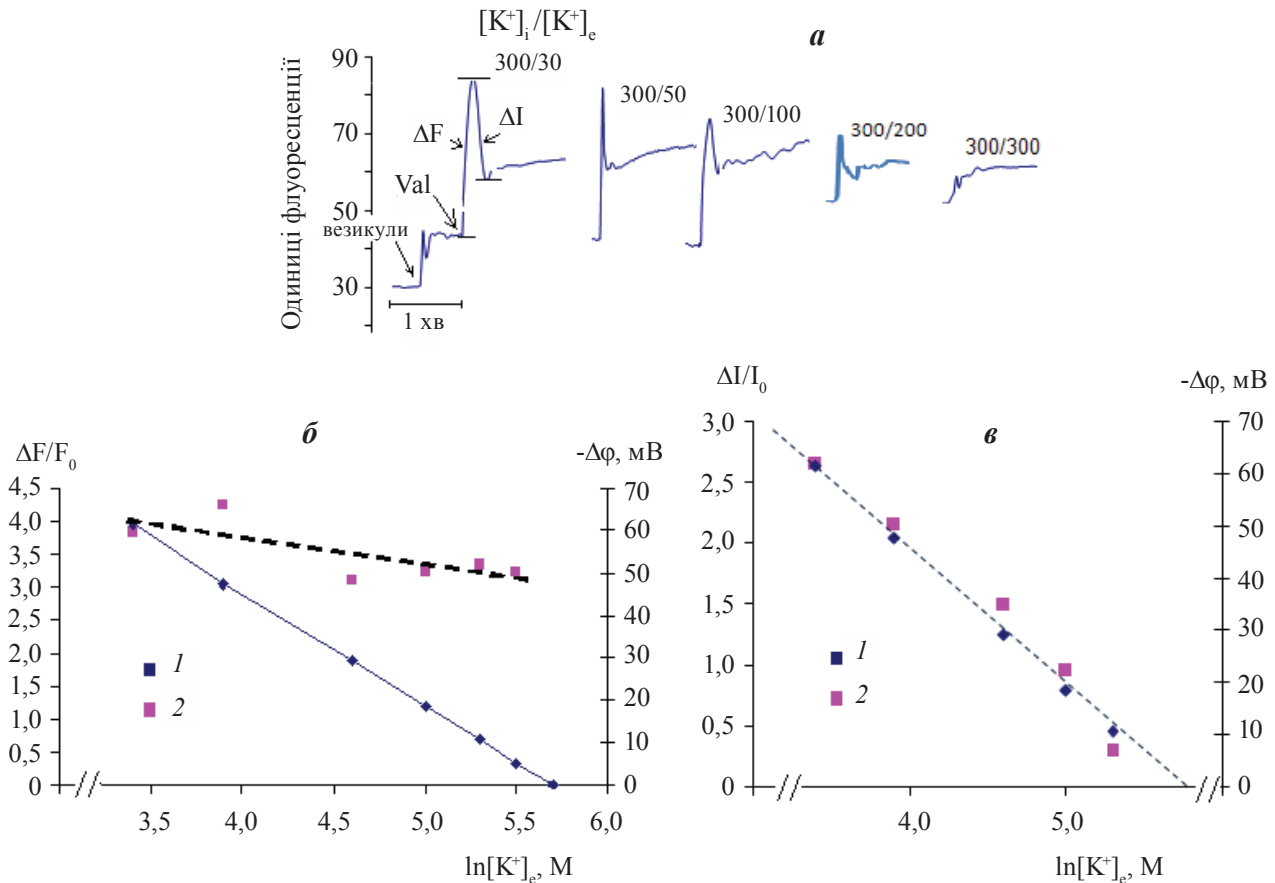


Рис. 1. Реєстрація K^+ -рівноважного мембранного потенціалу на мембрані везикул сарколеми із використанням потенціалчутливого флуоресцентного зонда $DiOC_6(3)$ ($Val - 0,5 \mu M$ валиноміцину): а – флуоресцентна відповідь зонда, яка залежить від величини калієвого градієнта, спрямованого у позавезикулярне середовище; б – вплив $[K^+]_e$ на відносну інтенсивність ($\Delta F/F_0$) спалаху флуоресценції $DiOC_6(3)$ при внесенні валиноміцину до середовища інкубації; в – вплив $[K^+]_e$ на відносну інтенсивність ($\Delta I/I_0$) гасіння флуоресценції $DiOC_6(3)$ після внесення валиноміцину до середовища інкубації. 1 – Значення $\Delta\phi$, розраховане за рівнянням Нернста при $37^\circ C$; 2 – везикули типу $[K^+]_i/[K^+]_e + [Ch^+]_e$; F_0 та I_0 – зміни інтенсивності флуоресценції при $\Delta\phi = 0$ мВ ($[K^+]_i = [K^+]_e = 300$ мМ), ΔF та ΔI – зміни інтенсивності флуоресценції залежно від концентрації позавезикулярного калію ($[K^+]_o/[K^+]_e + [Ch^+]_e$)

пряма залежність між димеризацією зонда, гасінням флуоресценції та величиною $\Delta\phi$ на мембрані. Інтенсивність гасіння флуоресценції збільшується зі зменшенням концентрації K^+ в зовнішньому середовищі (зі збільшенням $\Delta\phi$). У цьому разі крива залежності відносного гасіння флуоресценції зонда ($\Delta I/I_0$) майже збігається із кривою відповідної залежності $\Delta\phi$, обчисленого за рівнянням Нернста, від зміни концентрації K^+ у позавезикулярному просторі (рис. 1, в). Отже, на мембрані везикул формується K^+ -рівноважний потенціал (всередині них від'ємний), значення якого визначається величиною калієвого градієнта.

У присутності детергенту – 0,1%-го дигітоніну – флуоресцентна відповідь зонда аналогічна такій, як у везикулах типу 300 мМ

$[K^+]_i/300$ мМ $[K^+]_e$, так і 300 мМ $[K^+]_i/30$ мМ $[K^+]_e + 270$ мМ $[Ch^+]_e$. Це свідчить, що в разі порушення цілісності везикул сарколеми потенціал не формується.

Отже, флуоресцентний потенціалчутливий зонд $DiOC_6(3)$ можна використовувати для реєстрації K^+ -рівноважного трансмембранного потенціалу $\Delta\phi$, який за величиною є сумірним із потенціалом, розрахованим за рівнянням Нернста.

Використання методу протокової цитометрії уможливорює якісний та кількісний аналіз біологічних та фізичних властивостей клітин і субклітинних структур за кількома параметрами одночасно: розміром (величиною прямого світлорозсіювання FS), гранулярністю (бічним світлорозсіюванням SS) і інтенсивністю флуо-

ресцентного сигналу при різних довжинах хвиль у видимому діапазоні спектра (FL1-FL4) [14–15]. У цих дослідженнях використовували канал флуоресценції FL1. На рис. 2 репрезентовано типові результати дослідів. Положення піка PkPosX відповідає інтенсивності флуоресценції більшості везикул у загальній популяції. Зміщення PkPosX залежить від значення калієвого градієнта, який спрямовується із внутрішньовезикулярного середовища: відстань між положеннями контрольного піка (PkPosX₀ – везикули + зонд) та піка після додавання валіноміцину (PkPosX_{val} – везикули + зонд + Val) зменшується зі збільшенням градієнта калію. Через 2–3 хв відбувається поступова дисипація наведеного потенціалу Δφ, що визначається зміщенням PkPosX у напрямку збільшення інтенсивності флуоресценції

(вправо). Відповідні криві залежності інтенсивності флуоресценції від часу за різних значень початкового потенціалу наведено на рис. 3. Чим менше значення наведеного потенціалу (градієнт K⁺), тим більше зростання інтенсивності, оскільки дисипація градієнта також прискорюється. Внесення до середовища інкубації з наведеним потенціалом Δφ = -45,3 мВ (300 мМ [K⁺]_i/50 мМ [K⁺]_e + 250 мМ [Ch⁺]_e) 0,05%-го тритону X-100 призводить до зміни положення піка в бік підвищення інтенсивності флуоресценції. Водночас, за відсутності потенціалу на мембрані зміщення піка не спостерігається (графічні дані не наведено). У подальших дослідженнях ми обчислювали різницю між інтенсивністю флуоресценції до (PkPosX₀) та після додавання валіноміцину (PkPosX_{val}), що характеризує флуоресцентну

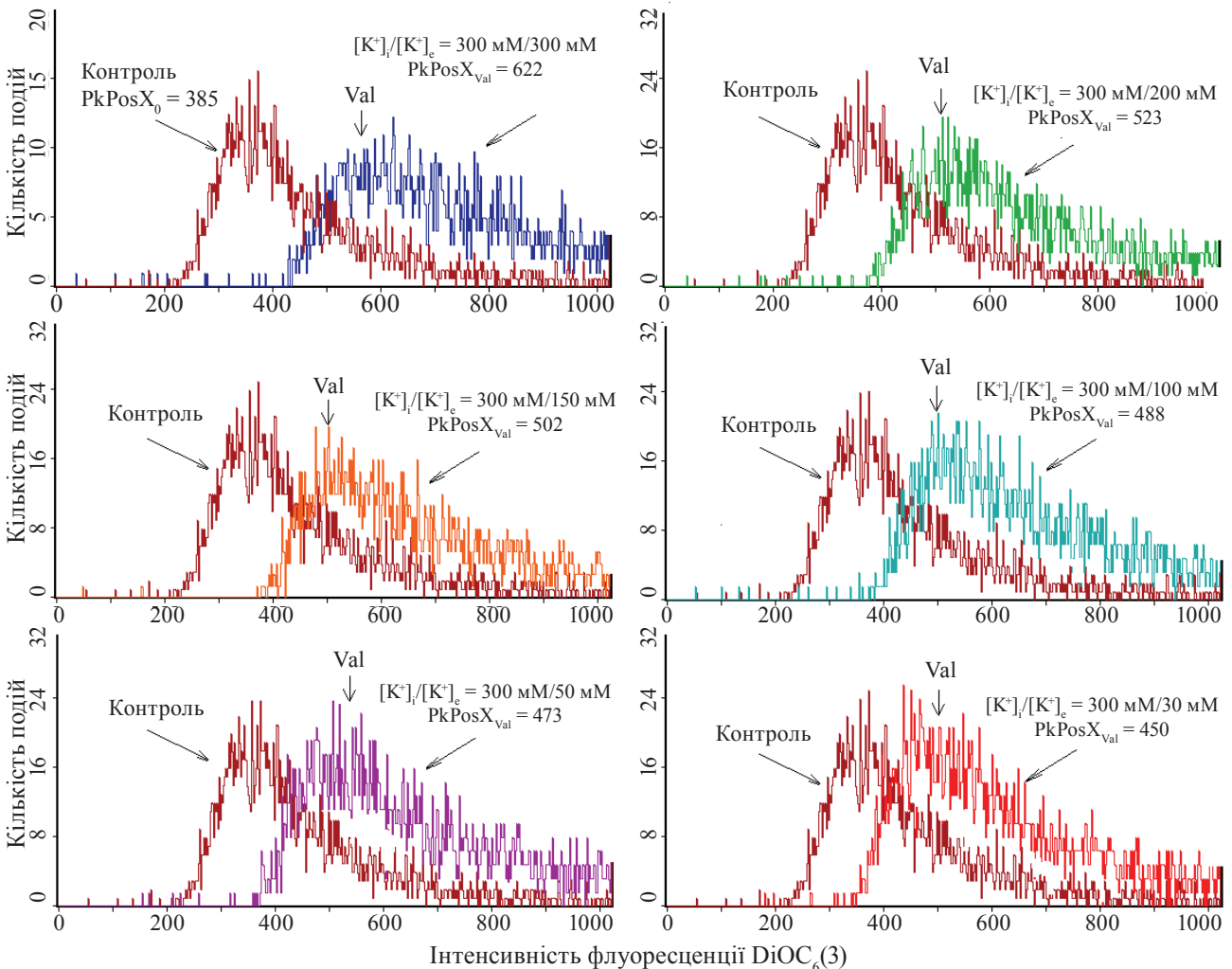


Рис. 2. Вплив 0,5 мкМ валіноміцину (Val) на флуоресценцію DiOC₆(3). PkPosX₀ – інтенсивність флуоресценції DiOC₆(3) перед внесенням до середовища інкубації валіноміцину, PkPosX_{val} – інтенсивність флуоресценції DiOC₆(3) після його внесення. Дані типового дослідів

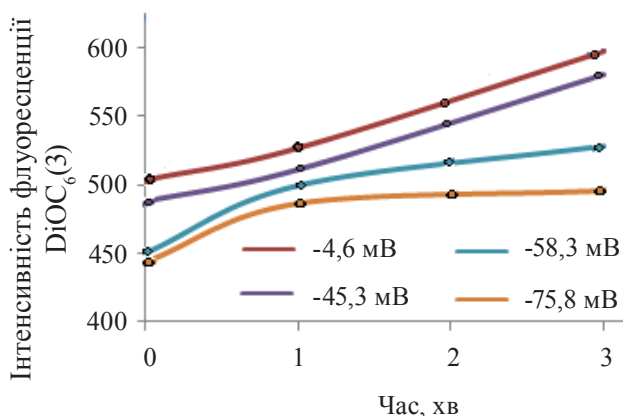


Рис. 3. Динаміка зміни інтенсивності флуоресценції $\text{DiOC}_6(3)$ після внесення валіноміцину до суспензії везикул. Дані типового експерименту

відповідь $\text{DiOC}_6(3) - \Delta \text{PkPosX}_n$ – при неоднаковій концентрації іонів калію в середовищі. Таким чином:

$$\Delta \text{PkPosX}_n = \text{PkPosX}_{\text{val}} - \text{PkPosX}_0,$$

де n – концентрація K^+ в мМ в середовищі інкубації.

Відповідно до одержаних даних було побудовано калібрувальну криву, яка віддзеркалює взаємозв'язок між флуоресцентною відповіддю зонда при різних концентраціях K^+ в середовищі та величиною потенціалу, обчисленого за рівнянням Нернста (рис. 4). Як випливає з рис. 4, пряма залежність між флуоресцентною відповіддю зонда та розрахованим $\Delta\phi$ спостерігається лише при зміні наведеного потенціалу – від $-58,3$ мВ до $-10,3$ мВ. У разі зменшення потенціалу (тобто зниженні градієнта K^+) спостерігається відхилення від

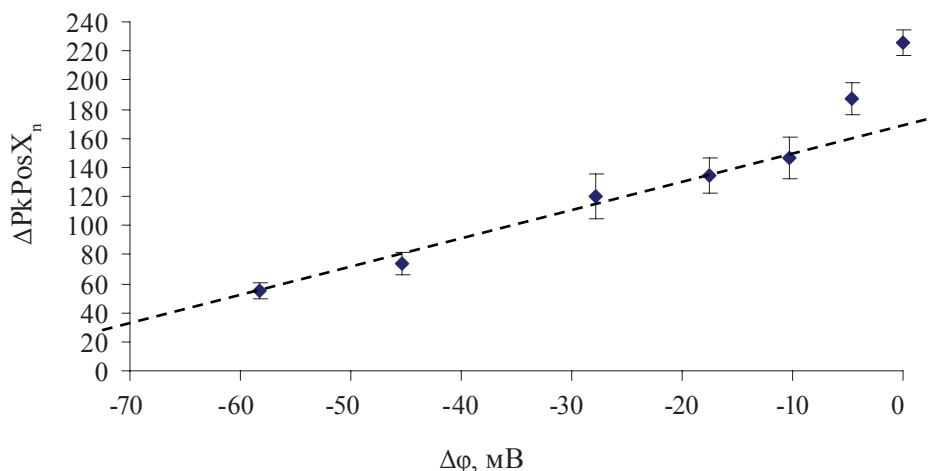


Рис. 4. Залежність флуоресцентної відповіді зонда (ΔPkPosX_n) від значення $\Delta\phi$, обчисленого за рівнянням Нернста ($M \pm m$, $n = 5$); коефіцієнт кореляції $r = 0,97 \pm 0,02$

лінійної залежності, що потребує подальшого з'ясування. Величина відносної флуоресцентної відповіді зонда (виражена у відн. од.) при зміні концентрації K^+ від 30 до 200 мМ у позавезикулярному середовищі наближається до значень $\Delta\phi$, розрахованих за рівнянням Нернста (рис. 5).

Отже, проведені експерименти з використанням потенціалчутливого зонда $\text{DiOC}_6(3)$ свідчать про можливість тестування штучного K^+ -рівноважного потенціалу $\Delta\phi$ на мембрані везикул сарколеми міоцитів методом протокової цитометрії, який за значенням відповідає потенціалу, обчисленого за рівнянням Нернста.

Вивчення впливу нітрит-аніонів, NPS і H_2O_2 на флуоресценцію зонда $\text{DiOC}_6(3)$ в разі формування K^+ -рівноважного трансмембранного потенціалу у везикульованій фракції сарколеми. Проведеними дослідженнями встановлено, що за відсутності градієнта K^+ і, відповідно, трансмембранного потенціалу валіноміцин, H_2O_2 , NO_2^- та NPS істотно впливають на інтенсивність флуоресценції $\text{DiOC}_6(3)$, унаслідок чого спостерігається зміщення піків кривих у координатах – кількість подій, інтенсивність флуоресценції $\text{DiOC}_6(3)$ – в бік інтенсивності, тобто в напрямі підвищення квантового виходу (типові результати дії H_2O_2 наведено на рис. 6; для інших речовин напрям зміщення піків аналогічний). Імовірно, це явище можна пояснити впливом досліджуваних сполук на взаємодію зонда з мембраною, оскільки, згідно з даними літератури та результатами наших експериментів, наведених вище, квантовий вихід $\text{DiOC}_6(3)$ в разі взаємодії із протеїн-ліпідними комплексами зростає. Зазначені вище попередні дослідження обумовили доцільність ви-

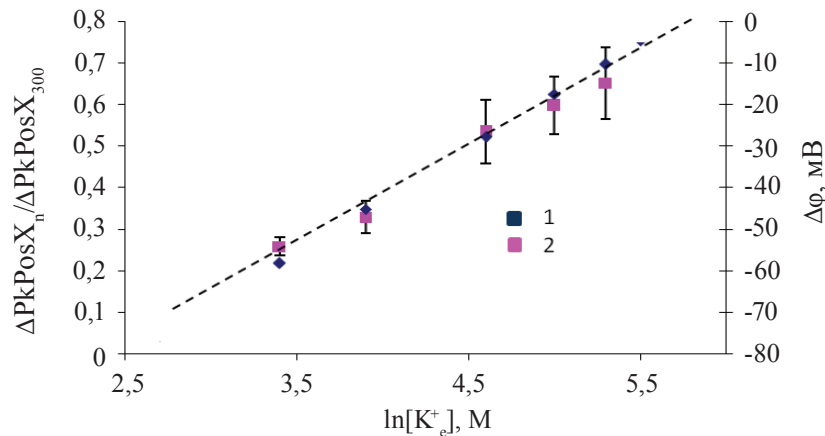


Рис. 5. Вплив $[K^+]_e$ на флуоресцентну відповідь $DiOC_6(3)$: $\Delta PkPosX_{300}$ – різниця між положеннями піків при $\Delta\phi = 0$ мВ ($[K^+]_i = [K^+]_e = 300$ мМ), $\Delta PkPosX_n$ – різниця між положеннями піків при неоднакових значеннях $\Delta\phi$ ($[K^+]_i/[K^+]_e + [Ch^+]_e$). 1 – величина $\Delta\phi$, розрахована за рівнянням Нернста (температура 23 °С), 2 – везикули типу $[K^+]_i/[K^+]_e + [Ch^+]_e$ ($M \pm m, n = 5$). Коефіцієнт кореляції $r = 0,98 \pm 0,03$

раження наших подальших результатів у відн. од. флуоресценції. Цей спосіб обчислення враховує неспецифічні зміни флуоресцентної відповіді (емпіричні формули наведено в розділі «Матеріали і методи»). Розподіл інтенсивності флуоресценції в координатах FL1/SS (інтенсивність флуоресценції, бічне світлорозсіювання, рис. б) свідчить, що під час експериментів структура везикул залишається стабільною, а змінюється лише інтенсивність флуоресценції зонда.

Для з'ясування впливу оксидів азоту і пероксиду водню на інтенсивність флуоресценції зонда та $\Delta\phi$ було вибрано такі варіанти постановки експериментів (відповідні результати наведено на рис. 7):

1. Контроль. Відношення флуоресцентної відповіді $DiOC_6(3)$ у присутності на мембрані градієнта K^+ (300 мМ $[K^+]_i$ / 100 мМ $[K^+]_e + 200$ мМ $[Ch^+]_e$, $\Delta\phi = -27,8$ мВ) до флуоресцентної відповіді зонда за відсутності градієнта ($[K^+]_i = [K^+]_e = 300$ мМ, $\Delta\phi = 0$ мВ). Емпіричну формулу (2) наведено в «Матеріалах і методах».

2. Дія H_2O_2 , NO_2^- , NPS на флуоресценцію зонда (відн. од.) у присутності градієнта K^+ , але за відсутності валіноміцину, тобто попередньої відсутності потенціалу на мембрані). Емпірична формула (3).

3. Вплив H_2O_2 , NO_2^- , NPS у разі внесення їх до середовища інкубації та формування $\Delta\phi = -27,8$ мВ на мембрані (тобто після внесення валіноміцину до середовища). Емпірична формула (4).

4. Флуоресцентна відповідь $DiOC_6(3)$ у присутності градієнта K^+ на мембрані і послі-

довному додаванні до середовища H_2O_2 , NO_2^- , NPS та валіноміцину. Емпірична формула (5).

Значення флуоресцентної відповіді $DiOC_6(3)$ у відн. од. за наявності градієнта K^+ (300 мМ $[K^+]_i$ / 100 мМ $[K^+]_e + 200$ мМ $[Ch^+]_e$) становило $0,63 \pm 0,07$ ($n = 14$) і відповідало $\Delta\phi = -27,8$ мВ, обчисленого за рівнянням Нернста (контроль, варіант експерименту 1). Одиницею вважали флуоресцентну відповідь зонда за відсутності градієнта іонів калію ($[K^+]_i = [K^+]_e = 300$ мМ, $\Delta\phi = 0$ мВ). Виявлено, що H_2O_2 та NO_2^- , найімовірніше, підвищують проникність мембрани до іонів калію, що приводить до можливої поляризації мембрани та відповідної зміни величини флуоресцентної відповіді зонда, яка досягає розрахованої для $\Delta\phi = -27,8$ мВ (варіант експерименту 2). Цього ефекту не виявлено в дослідах із NPS.

Внесення H_2O_2 та NO_2^- до середовища інкубації після утворення потенціалу на плазматичній мембрані (варіант експерименту 3), вірогідно, спричинює дисипацію штучно наведеного потенціалу, оскільки величина флуоресцентної відповіді наближається до 1 (відсутність потенціалу). Внесення NPS на флуоресцентну відповідь ($\Delta\phi$) не впливає. У варіанті досліду 4 після попереднього внесення до середовища інкубації пероксиду водню (перед додаванням валіноміцину) флуоресцентна відповідь зонда, а отже $\Delta\phi$ і K^+ -проникність, вірогідно підвищується ($0,50 \pm 0,06$, $n = 5$) порівняно з потенціалом, сформованим за дії лише валіноміцину. Це дає підставу припустити, що мембранні механізми формування потенціалу за участю валіноміцину та H_2O_2 за штучного градієнта K^+ на мембрані неодна-

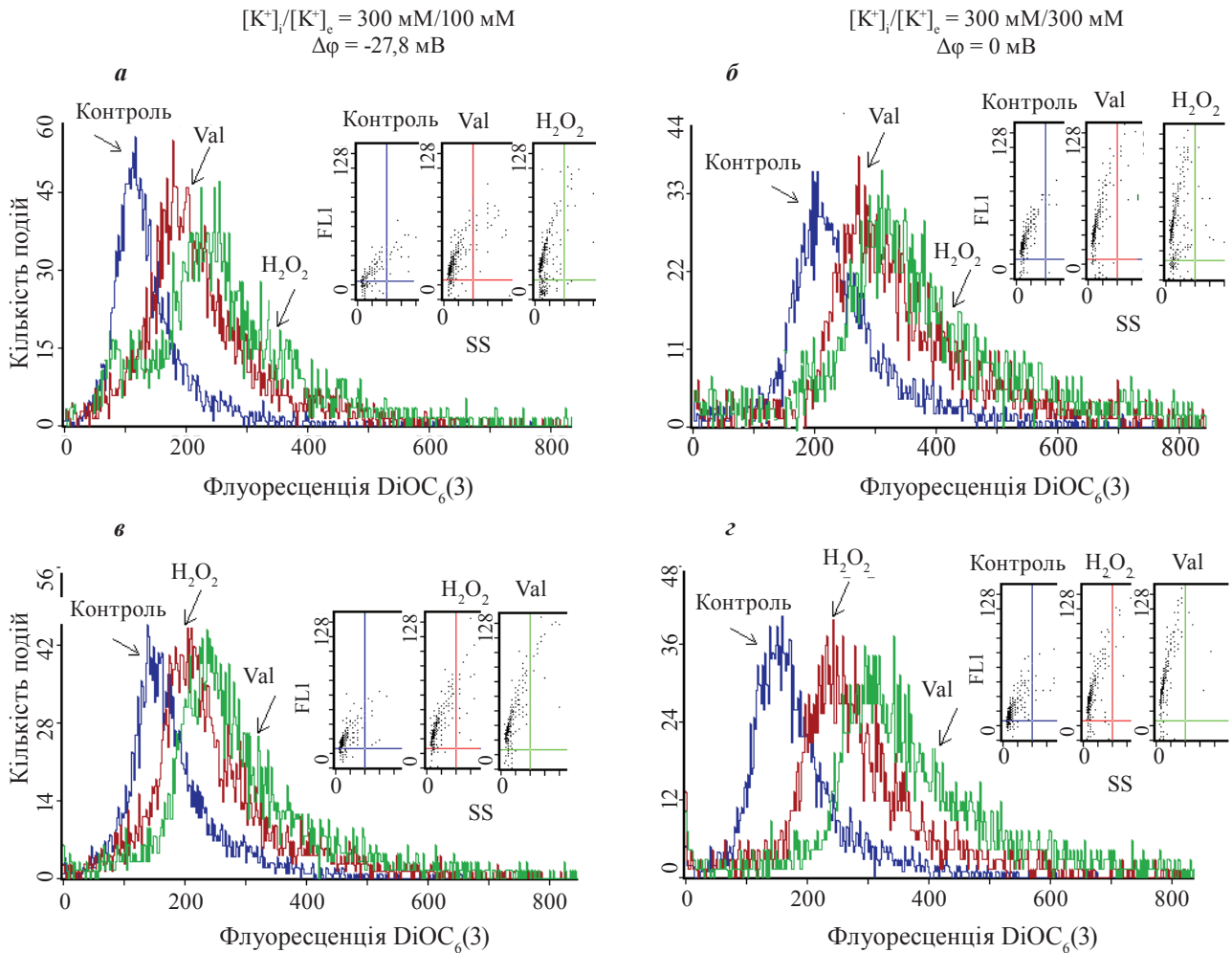


Рис. 6. Вплив H₂O₂ на інтенсивність флуоресценції DiOC₆(3): а, в – зміни інтенсивності флуоресценції DiOC₆(3) у присутності градієнта K⁺ на мембрані (300 мМ [K⁺]_i/100 мМ [K⁺]_e + 200 мМ [Ch⁺]_e, Δφ = -27,8 мВ); б, г – зміни інтенсивності флуоресценції DiOC₆(3) за відсутності градієнта K⁺ на мембрані ([K⁺]_i = [K⁺]_e = 300 мМ, Δφ = 0 мВ). Дані типового експерименту

кові. Окисли азоту практично не впливають на величину флуоресцентної відповіді порівняно з контролем в цьому варіанті експерименту. Відсутність ефекту нітрит-аніонів, як і в експериментах із NPS, потребують подальших досліджень. За наявності в середовищі нітропрусиду натрію суттєвим є наявність у середовищі, окрім окислів азоту, катіонів заліза та ціанід-аніонів.

Отже, дані різних варіантів експерименту свідчать про можливість підвищення проникності мембрани до іонів калію за дії H₂O₂ та NO₂⁻. Екстраполяція цих результатів на інтактні клітини уможливує припущення щодо посилення пасивного транспортування калію з міоцитів, яке супроводжується відповідною реполяризацією мембрани. *In vivo* це має спри-

чинити зниження рівня збудження сарколеми. В наших попередніх дослідженнях, здійснених на суспензії міоцитів та везикульованій фракції плазматичної мембрани, виявлено, що окиси азоту і пероксид водню підвищують рН міоплазми та транспортування протонів у сарколемі за градієнтом концентрації, а також пасивне транспортування Ca²⁺ в окремих експериментальних моделях. Локальне зростання рН та [Ca²⁺] зумовлює потужну активацію Ca⁺-залежних K⁺-каналів, що доповнює результати, наведені в цій роботі. Вірогідний напрям наших подальших досліджень – це використання інтактних міоцитів для вивчення змін мембранного потенціалу, що наблизить експерименти до фізіологічних умов.

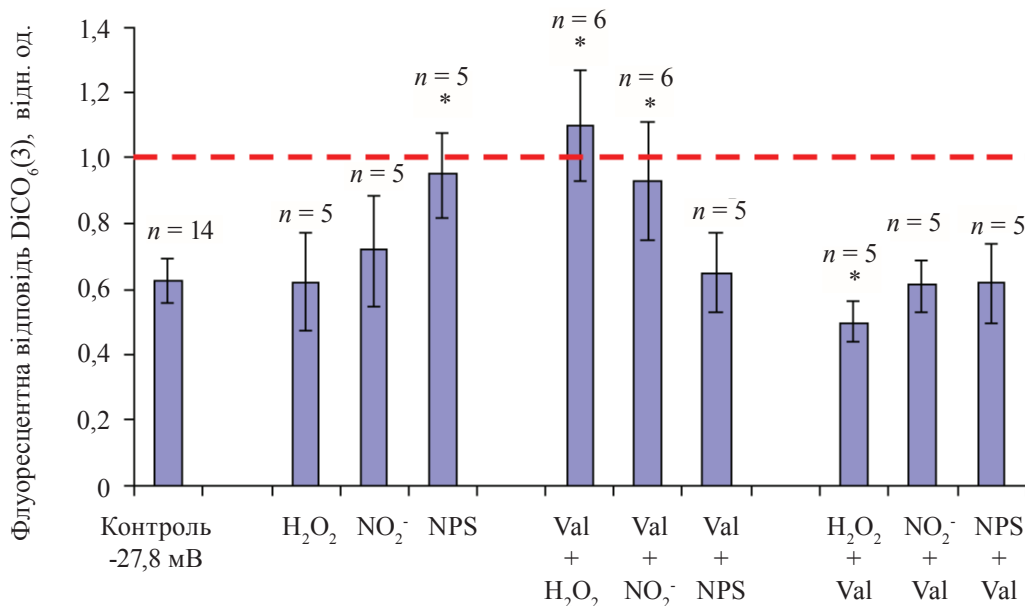


Рис. 7. Вплив H₂O₂, NO₂⁻, та NPS на величину K⁺-рівноважного трансмембранного потенціалу плазматичної мембрани. За відн. од. прийнято зміни флуоресценції в разі відсутності градієнта іонів калію ([K⁺]_i = [K⁺]_e = 300 мМ, Δφ = 0 мВ). * Дані відносно контролю (Δφ = -27,8 мВ, 300 мМ [K⁺]_i/100 мМ [K⁺]_e + 200 мМ [Ch⁺]_e) вірогідні, P ≤ 0,05

**РЕГИСТРАЦИЯ
K⁺-РАВНОВЕСНОГО ПОТЕНЦИАЛА
НА ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЕ
ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК
И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО МОДУЛЯЦИИ
NO_x ТА H₂O₂ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ
ЦИТОМЕТРИИ**

А. В. Данилович, Ю. В. Данилович,
В. Ф. Горчев

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев;
e-mail: danylovych@biochem.kiev.ua

Показана возможность использования метода проточной цитометрии для исследования формирования K⁺-равновесного мембранного потенциала на экспериментальной модели везикул плазматической мембраны миомерия в присутствии валиномицина с использованием потенциалчувствительного зонда 3,3'-дигексилосилокарбоцианина [DiOC₆(3)]. Величина трансмембранного потенциала соответствует рассчитанной по уравнению Нернста.

H₂O₂ и NO₂⁻, вероятно, увеличивают проницаемость мембраны для K⁺ и приводят к диссипации ранее наведенного потенциала. Данный эффект не характерен для нитропрусида натрия. Полученные результаты предполагают возможность усиления пассивного транспорта ионов калия сарколеммой

при действии вышеуказанных соединений с соответствующей реполяризацией мембраны и снижением уровня ее возбудимости.

Ключевые слова: K⁺-равновесный мембранный потенциал, сарколемма, пероксид водорода, оксиды азота, проточная цитометрия.

**REGISTRATION OF K⁺-EQUILIBRIUM
POTENTIAL IN MYOMETRIUM CELL
PLASMA MEMBRANE AND STUDY OF
ITS MODULATION OF NO_x AND H₂O₂
USING FLOW CYTOMETRY METHOD**

G. V. Danylovych, Yu. V. Danylovych,
V. F. Gorchev

Palladin Institute of Biochemistry, National
Academy of Science of Ukraine, Kyiv;
e-mail: danylovych@biochem.kiev.ua

S u m m a r y

Prospects of the use of flow cytometry analysis for investigation of forming K⁺- equilibrium membrane potential on the experimental model of myometrium plasma membrane vesicles in the presence of valinomycin using potential-sensitive probe of DiOC₆(3). Transmembrane potential magnitude corresponds to magnitude by Nernst's equation.

H_2O_2 and NO_2^- , probably, increase permeability of membrane for K^+ and result in potential dissipation. Given effect is not shown for sodium nitroprusside. The obtained results confirm an assumption as to enhancing the passive transport for K^+ through sarcolemma under the action of these substances, that can lead to membrane repolarisation and decline of the level of its excitability.

Key words: hydrogen peroxide, nitric oxide, flow cytometry, K^+ -equilibrium membrane potential, sarcolemma.

1. Sladek S. M., Magness R. R., Conrad K. P. // *Am. J. Physiol.* – 1997. – **272**, N 41. – P. R. 444–463.
2. Buxton I. L. // *Mol. Pharmacol.* – 2004. – **65**, N 5. – P. 1051–1059.
3. Warren A. Y., Matharoo-Ball B., Shaw R. W., Khan R. N. // *Reproduction.* – 2005. – **130**. – P. 539–544.
4. Chung D., Caruso R. L. // *Toxicol. Sci.* – 2006. – **93**, N 1. – P. 172–179.
5. Matoba T., Shimokawa H. // *J. Pharmacol. Sci.* – 2003. – **92**. – P. 1–6.
6. Шкрабак О., Данилович Г., Веклич Т. // *Вісн. КНУ. Біол.* – 2006. – **47–48**. – С. 55–57.
7. Данилович Ю. В., Тугай В. А. // *Укр. біохім. журн.* – 2001. – **73**, № 1. – С. 48–53.
8. Бабич Л. Г., Фомин В. П., Костерин С. А. // *Биохимия.* – 1990. – **55**, № 10. – С. 1890–1901.
9. Кондратюк Т. П., Быченко С. Ф., Прищепна Л. А. и др. // *Укр. біохім. журн.* – 1986. – **58**, № 4. – С. 50–56.
10. Bradford M. M. // *Anal. Biochem.* – 1976. – **72**, N 1. – P. 248–282.
11. Brewis I. A., Morton I. A., Mohammad S. N. et al. // *J. Andrology.* – 2000. – **21**, N 2. – P. 238–249.
12. Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. – М.: Наука. 1989. – 277 с.
13. Косников В. В. // *Укр. біохім. журн.* – 1990. – **62**, № 1. – С. 3–15.
14. Болдырев А. А., Юнева М. О. // *Сорос. образоват. журн.* – 2004. – **8**, № 2. – С. 7–14.
15. Бабич Л. Г., Шликов С. Г., Наумова Н. В., Костерин С. О. // *Укр. біохім. журн.* – 2007. – **79**, № 6. – С. 34–41.

Отримано 12.07.2009