

УДК 577.352.4

ВИВЧЕННЯ АКУМУЛЯЦІЇ Ca^{2+} В ІЗОЛЬОВАНИХ МІТОХОНДРІЯХ ГЛАДЕНЬКОГО М'ЯЗА ЗА ДОПОМОГОЮ ЗОНДА Fluo-4 AM

О. В. КОЛОМІЄЦЬ, Ю. В. ДАНИЛОВИЧ, Г. В. ДАНИЛОВИЧ, С. О. КОСТЕРІН

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

Доведено можливість застосування Ca^{2+} -чутливого флуоресцентного зонда Fluo-4 AM і методу спектрофлуориметрії для дослідження енергозалежної акумуляції Ca^{2+} мітохондріями гладенького м'яза матки. Встановлено, що у присутності препарату мітохондрій флуоресцентна відповідь барвника істотно зростає у часі і прямо залежить від концентрації Ca^{2+} в середовищі. Отже, за цих умов утворюється активна деестерифікована форма зонда, яка виявляє чутливість до Ca^{2+} . Показано, що акумуляція Ca^{2+} мітохондріями у присутності Mg-АТР та сукцинату залежить від концентрації екзогенного Ca^{2+} і характеризується насиченням за субстратом переносу. Уявна константа активації процесу накопичення Ca^{2+} складає $53,9 \pm 6,9$ мкМ, що відповідає фізіологічній концентрації катіона в клітині поблизу мітохондрій. Транзитне додавання до середовища інкубації Ca^{2+} -іонофору А23187 спричинює швидке вивільнення іонізованого катіона з мітохондрій. В умовах дисипації градієнта протонів на внутрішній мембрані мітохондрій протонофором СССР, а також у разі пригнічення генерації цього градієнта олігоміцином та у присутності інгібітора систем Ca^{2+} -акумуляції мітохондрій рутенієвого червоного, накопичення катіона істотно знижується. Одержані результати вказують на перспективність використання Fluo-4 AM для вивчення властивостей системи акумуляції Ca^{2+} в ізольованих мітохондріях міометрії.

Ключові слова: кальцій, мітохондрії, Fluo-4 AM, гладенький м'яз, міометрія.

На сьогодні сформовано надійне уявлення про можливе значення мітохондрій (МХ) як Ca^{2+} -депо в електрозбудливих клітинах. Зокрема, доведено, що після транзйентного підвищення концентрації Ca^{2+} в гладеньком'язових клітинах у разі їх збудження частина катіонів здатна акумулюватися МХ. Доведено також, що система Ca^{2+} -акумуляції МХ гладенького м'яза характеризується високою швидкістю та ємністю поряд із відносно низькою спорідненістю до Ca^{2+} [1–6]. В останні роки велика увага дослідників приділяється процесам взаємоузгодженого транспортування Ca^{2+} на рівні плазматичної мембрани, ендоплазматичного ретикула та МХ [7]. Функціонування Ca^{2+} -транспортувальних систем МХ у фізіологічних умовах здатне підтримувати таку концентрацію катіона в матриксі, яка необхідна для оптимального забезпечення енергетичного метаболізму [1]. У разі порушення функціонування Ca^{2+} -транспортувальних систем МХ може спостерігатися явище Ca^{2+} -перевантаження матрикса, наслідком чого є дисфункція зазначених субклітинних структур і загибель клітини [1, 8].

Під час вивчення трансмембранного обміну Ca^{2+} та його вмісту в МХ використо-

вують різні методичні підходи, а саме: двопробневу спектрофлуориметрію із застосуванням Ca^{2+} -чутливих металохромних барвників (арсеназо), електрометрію (Ca^{2+} -селективний електрод), ізотопну техніку ($^{45}\text{Ca}^{2+}$), біоломінесцентні виміри (Ca^{2+} -чутливі протеїни гідробіонтів), спектрофлуориметрію (Ca^{2+} -селективні флуоресцентні індикатори) тощо [9, 10]. Необхідним є подальше удосконалення методичних прийомів для надійного, швидкого і дешевого визначення змін концентрації Ca^{2+} в матриксі МХ. Донедавна добре апробованим підходом для реєстрації накопичення кальцію в МХ слугувала радіоізотопна техніка ($^{45}\text{Ca}^{2+}$), яка дозволяє досліджувати зміни загального вмісту кальцію в МХ, тобто сумарно як іонізованого, так і преципітованого у складі Ca^{2+} -фосфатного комплексу або зв'язаного з мембранними структурами [3, 11–13]. Оскільки функціональне значення у контролі процесу скорочення міоцитів належить передусім іонізованому Ca, важливим є дослідження його змін із використанням саме Ca^{2+} -чутливих флуоресцентних зондів.

Для здійснення високоякісних, доступних і швидких вимірів змін концентрації Ca^{2+} в МХ наразі використовують різні типи синтезованих для оптичних досліджень зондів, на

кшталт біоломінесцентних акваринів, флуоресцентних протеїнів та низькомолекулярних Ca^{2+} -флуоресцентних індикаторів, зокрема Rhod-2 AM, Indo-1 AM, Fura-2 AM, Fura-2FF AM, Fluo-3 AM тощо [1, 10]. Серед останніх сполук значне поширення в біохімічних дослідженнях знайшов Fluo-4 AM, який, порівняно зі своїм попередником Fluo-3 AM, має більший квантовий вихід, легше проникає крізь біологічні мембрани, а, отже, швидко накопичується у клітинах та їхніх органелах. Перевагою Fluo-4 AM є також інтенсивне збудження зонда при 488 нм, що дозволяє його використовувати на стандартних приладах, обладнаних аргоновим лазером, як це має місце у разі з протоковими цитофлуориметрами [14–16]. У доступній нам літературі відсутні відомості щодо використання Fluo-4 AM для дослідження змін концентрації Ca^{2+} в ізольованих МХ.

Більшість флуоресцентних індикаторів використовують у вигляді їхніх ацетоксиметильних або ацетатних ефірів, які є незарядженими сполуками і відносно легко проникають крізь клітинні мембрани [10, 15]. Неспецифічні внутрішньоклітинні естерази розщеплюють складнофірні зв'язки, наслідком чого є утворення зарядженої форми зонда (кислотної), яка слабо проникає крізь плазматичні мембрани, а, отже, накопичується або в цитозолі, або в окремих органелах залежно від фізико-хімічної природи зонда. Наводяться дані, що гідроліз ефірних форм таких індикаторів, як Rhod-2 AM, Indo-1 AM, Fura-2 AM, Fluo-3 AM може відбуватися як у цитозолі, так і в мітохондріальному матриксі, що супроводжується генерацією активних кислотних форм у цих компартментах [17, 18].

Акумуляція Ca^{2+} в МХ передусім пов'язана із функціонуванням електрофоретичного Ca^{2+} -уніпортеру, який транспортує катіон за наявності трансмембранної різниці потенціалів (може досягати -180 мВ) на внутрішній мембрані, а також системою «швидкого кальцієвого входу» та ріанодиновими рецепторами [1, 2, 19, 20]. До систем вивільнення Ca^{2+} з МХ належать $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -, $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінники та так звана пора перехідної проникності, роль якої зростає в умовах Ca^{2+} -перевантаження МХ. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник функціонує в електрозбудливих тканинах, тоді як Na^+ -незалежний $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник — у незбудливих, а також у міоцитах деяких гладеньких м'язів. Функціонування обмінників забезпечує підтримання оптимальної для

функціонування МХ концентрації Ca^{2+} в матриксі [1, 3, 7, 20].

В експериментах, проведених на фракції ізольованих МХ міометрія жінок, шурів і корів із застосуванням радіоізотопної техніки, доведено здатність цих субклітинних структур до енергозалежної акумуляції Ca^{2+} із середовища інкубації, яке містить субстрати дихання (сукцинат), АТФ та Mg^{2+} [2, 4, 11]. МХ міометрія нездатні накопичувати Ca^{2+} за відсутності АТФ та Mg^{2+} , і, на відміну від МХ гепатоцитів та кардіоміоцитів, характеризуються низькою спорідненістю до катіона (відповідна константа K_{Ca} дорівнює 25 мкМ) з одночасною високою акумуляюючою здатністю (накопичують до 1 мкмоль Ca^{2+} /мг протеїну) і значною максимальною швидкістю транспортування (до 600 нмоль Ca^{2+} /хв-мг протеїну). Як і в інших об'єктах, ефективними інгібіторами акумуляції Ca^{2+} в МХ міометрія є агенти, які запобігають формуванню або руйнують градієнт H^+ на їхній внутрішній мембрані, а саме інгібітори електронтранспортного ланцюга, протонофори, а також рутенієвий червоний (останній, можливо, здатний інгібувати всі вищезазначені шляхи акумуляції Ca^{2+} МХ). Енергозалежне включення Ca^{2+} в МХ стимулюється залуженням середовища [2, 4, 11–13]. Відомий блокатор АТФ-синтази МХ антибіотик олігоміцин [1] також є ефективним інгібітором транспортування Ca^{2+} , оскільки пригнічує формування електрохімічного градієнта протонів на внутрішній мітохондріальній мембрані внаслідок зворотного функціонування ензиму в режимі АТРази за умови додавання АТФ до середовища інкубації.

У дослідях, виконаних на пермеабілізованих дигітоніном міоцитах матки із використанням ізотопної техніки, продемонстровано, що рутенієвий червоний приблизно на 80% пригнічував енергозалежну акумуляцію Ca^{2+} внутрішньоклітинними структурами, тоді як нечутлива до рутенієвого червоного компонента може бути зумовлена функціонуванням саркоплазматичного ретикулула [3]. Це доводить відносну потужність системи МХ транспортування Ca^{2+} в міометрії. Оскільки закислення середовища призводить до гальмування рутенієзалежного включення Ca^{2+} в МХ, а іони Na не впливають на цей процес, автори цитованої роботи припускають, що у внутрішній мембрані МХ може функціонувати $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник, а не $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник, як у деяких нем'язових тканин (печінка, селезінка, нирки [13]).

За допомогою флуоресцентного зонда Fluo-3 АМ було продемонстровано залежне від концентрації катіона зростання вмісту саме іонізованого Са в МХ міометрія, до того ж процес накопичення катіона спостерігався і в деенергізованих МХ [6, 21].

Існує точка зору, що МХ здатні забезпечити зниження концентрації Са²⁺ в міоплазмі, яке необхідне для розслаблення, за фізіологічно значущий час, а також захищають клітини від цитотоксичних ефектів катіона за його надлишкового надходження із позаклітинного середовища [1, 2, 21]. Отже, дослідження біохімічних особливостей процесу накопичення Са²⁺ зазначеними внутрішньоклітинними структурами із використанням флуоресцентних зондів нового покоління є перспективним для з'ясування можливої ролі МХ в механізмах підтримання Са²⁺-гомеостазу гладеньких м'язів.

Метою представленої роботи було вивчення акумуляції іонізованого Са в ізолюваних МХ матки щурів із використанням одного із представників флуоресцентних зондів нового покоління – Fluo-4 АМ.

Матеріали і методи

Одержання фракції МХ міометрія. Препарат ізолюваних МХ одержували з міометрія невагітних щурів за допомогою методу диференційного центрифугування як описано раніше [22]. Дотримувались усіх вимог щодо роботи з лабораторними тваринами (Міжнародна конвенція, Страсбург, 1986). Тварин декапітували після інгаляційного наркозу діетиловим ефіром. Після виділення матки і очищення її від жирової та сполучної тканини препарат тримали у 0,9%-му розчині NaCl. Міометрій подрібнювали ножицями на шматочки розміром приблизно 2×2 мм, які переносили в робочий розчин із температурою 4 °С такого складу: 10 мМ НЕРЕС (рН = 7,4), 250 мМ сахароза, 1 мМ ЕГТА. Тканину гомогенізували за допомогою гомогенізатора типу «Політрон» 3 рази по 20 с із охолодженням на льоду протягом 1 хв, співвідношення тканина : робочий розчин складало 1 : 9. Гомогенат центрифугували протягом 15 хв при 1 тис. г і температурі 4 °С. Супернатант центрифугували протягом 15 хв при 12 тис. г і температурі 4 °С. Осад ресуспендували в робочому розчині і знову центрифугували протягом 15 хв при 10 тис. г за температури 4 °С. Одержану фракцію ізолюваних МХ впродовж експерименту зберігали на льоду.

Вміст протеїну у фракції МХ визначали за стандартним методом М. М. Bradford [23]. Середнє значення його складало 2 мг/мл, а в пробі – 50 мкг/мл.

Характеристика фракції ізолюваних МХ із використанням фотонної кореляційної спектроскопії. Функцію розподілу гідродинамічного діаметра (характеристичного розміру) МХ визначали методом фотонної кореляційної спектроскопії [24–26] в середовищі такого складу (в мМ): 20 НЕРЕС (рН 7,4), 250 сахароза, 2 P_i (у вигляді К⁺-фосфатного буфера, рН 7,4), 3 MgCl₂, 3 АТР, 5 сукцинат натрію. Виміри проводили при температурі 22 °С. Використовували прилад ZetaSizer-3 (Malvern Instruments, Велика Британія) з корелятором (Multi8 computing correlator type 7032 ce), обладтаним гелій-неоновим лазером ЛГ-111 із довжиною хвилі 633 нм і потужністю 25 мВт. Реєстрацію розсіюваного від суспензії МХ лазерного опромінення проводили протягом 1 хв при температурі 22 °С під кутом розсіювання 90°. Автокореляційну функцію обробляли за допомогою стандартної комп'ютерної програми PCS-Size mode v 1.61.

Процедура навантаження МХ флуоресцентним зондом Fluo-4 АМ. Навантаження МХ зондом Fluo-4 АМ (Invitrogen, США) в концентрації 2 мкМ проводили в середовищі, яке містило 10 мМ НЕРЕС (рН 7,4; 37 °С), 250 мМ сахарози, 0,1%-й бичачий сироватковий альбумін протягом 30 хв при температурі 37 °С. Для покращення процесу навантаження змішували барвник із Pluronic F-127 (0,02%). Подібну процедуру описано за навантаження МХ клітин міометрія щурів близьким за властивостями флуоресцентним зондом Fluo-3 АМ [21].

Дослідження вмісту іонізованого Са в МХ із використанням методу спектрофлуориметрії. Реєстрацію відносних значень рівня Са²⁺ в матриці МХ міометрія, навантажених Fluo-4АМ (λ_{зб.} = 495 нм, λ_{фл.} = 520 нм) досліджували із використанням флуориметричного методу на спектрофлуориметрії Quanta Master 40 РТІ (Канада) із програмним забезпеченням FelixGX 4.1.0.3096. Робоче середовище, з якого здійснювалась енергозалежна акумуляція Са²⁺ МХ, мало склад (в мМ) [21]: 20 НЕРЕС (рН 7,4; 37 °С), 250 сахароза, 2 калій-фосфатний буфер (рН 7,4; 37 °С), 3 MgCl₂, 3 АТР, 5 сукцинат натрія, концентрація Са²⁺ становила 20–80 мкМ.

Величину флуоресцентної відповіді наводили у відносних одиницях як описано нижче.

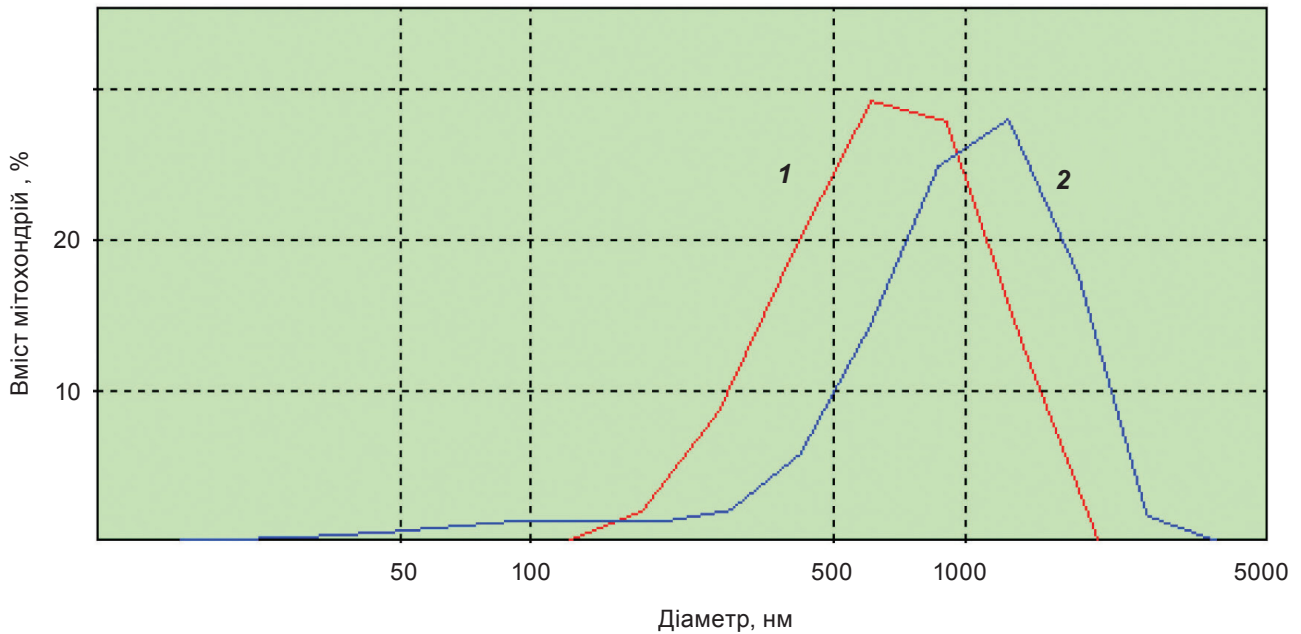


Рис. 1. Розподіл величини гідродинамічного діаметра ізолюваних МХ міометрія в контролі (крива 1) та за дії аламецитину (крива 2) згідно з даними фотонної кореляційної спектроскопії ($M \pm m$; $n = 5$). Наведені результати типового експерименту

Дослідження вмісту іонізованого Са в МХ із використанням методу протокової цитофлуориметрії. Вивчення змін іонізованого Са в матриксі МХ проводили також із використанням методу протокової цитофлуориметрії на протоковому цитометрі COULTER EPICS XLTM (Beckman Coulter, США) із програмним забезпеченням SYSTEM IITM Software (Beckman Coulter, США). Реєстрацію умовних значень рівня Са²⁺ в матриксі МХ здійснювали із залученням Са²⁺-чутливого флуоресцентного зонда Fluo-4 АМ у концентрації 2 мкМ ($\lambda_{\text{зб.}} = 488$ нм, $\lambda_{\text{фл.}} = 520$ нм) у середовищі описаного вище складу. Використовували робочий протокол аналізу зразків, який був створений нами для характеристики фракції ізолюваних МХ міометрія. Події для аналізу обирались шляхом введення логічного обмеження за параметрами бічного та прямого світлорозсіювання (SS та FS) в протокол протокової цитофлуориметрії. Аналіз проб припиняли за умови реєстрації 10 000 подій в межах виділеної області.

Статистичний аналіз одержаних даних проводили із використанням пакета стандартних програм IBM PC, застосовуючи загальновідомі методи [27] і *t*-критерій Стьюдента.

Результати та обговорення

Для характеристики МХ у суспензії ми використали метод фотонної кореляційної спектроскопії. Найвірогідніший середній гідродинамічний діаметр свіжовиділених МХ становить 549 ± 20 нм, що відповідає їхнім ефективним розмірам, описаним у літературі [24, 25]. За додавання антибіотика аламецитину (7,5 мкг/мл), який потенціалзалежно вбудовується у внутрішню мембрану МХ, формуючи мегаканали і спричинюючи набухання органел шляхом порушення осмотичної рівноваги [25, 28], гідродинамічний діаметр досліджуваного об'єкта значно зростає, в середньому до 804 ± 35 нм (рис. 1).

Між середовищами, в яких проводяться дослідження спектральних характеристик флуоресцентних зондів, результати яких наведено в оригінальних публікаціях та довідкових матеріалах, і використаним у наших експериментах робочим розчином існують істотні відмінності, передусім через наявність в останньому АТР, сукцинату та різних іонів. Отже, необхідно було проаналізувати спектри поглинання та емісії естерифікованої і кислотної форм Fluo-4 АМ в умовах, які будуть використовуватися в подальших експериментах. Була проведена попередня робота

щодо вивчення впливу препарату МХ на величину флуоресцентної відповіді барвника та її залежності від концентрації Ca^{2+} .

Згідно з даними літератури, довжина хвилі збудження зв'язаної з Ca^{2+} кислотної форми Fluo-4 АМ знаходиться в межах 488–494 нм, тоді як діапазон реєстрації емісії – 516–520 нм [14–16]. Інформація щодо спектральних характеристик естерифікованої форми барвника в доступній нам літературі відсутня.

Як можна бачити з рис. 2, спектри збудження та емісії естерифікованої форми зонда в номінально безкальцієвому робочому середовищі при рН 7,4 не мають гострих максимумів, а інтенсивність флуоресценції відносно низька. Ефективне поглинання видимого світла Fluo-4 АМ знаходиться в діапазоні від 490 до 520 нм з максимумом близько 503 нм. У разі роботи на приладах з аргонним лазером дозволяється збуджувати флуоресценцію при 488 нм, оскільки за цих умов інтенсивність абсорбції вважається також достатньою [15, 16]. Згідно з одержаними нами результатами інтенсивна емісія Fluo-4 АМ за вищезазначених умов ($\lambda_{\text{зб.}}$ = 495 нм) реєструється в діапазоні від 515 до 545 нм. За додавання до середовища, яке містить кислотну форму зонда, суспензії МХ інтенсивність флуоресценції з часом значно зростає (рис. 2), причому максимальні значення інтенсивності

випромінювання зміщуються в короткохвильовий діапазон приблизно на 5–6 нм. Відомо, що МХ виявляють естеразну активність різної специфічності (див., наприклад, [29]), з чим пов'язане застосування ацетоксиметильних похідних Ca^{2+} -зондів для вивчення змін концентрації Ca^{2+} в матриці МХ, оскільки за дії естераз утворюються активні кислотні форми зондів [17, 18]. Хоча суспензія МХ містить певну кількість ендogenous Ca^{2+} , високий рівень власної флуоресценції кислотної форми зонда за відсутності катіона в середовищі є характерною рисою застосованого нами барвника [14]. Таким чином, з часом зростає вміст кислотної (активної) форми зонда як наслідок розщеплення естерифікованої форми у присутності МХ.

За додавання до активної форми барвника Ca^{2+} у зростаючій кількості (рис. 3) флуоресцентний сигнал очікувано збільшується. При цьому максимум емісії характеризується лише невеликим зсувом у короткохвильову область із зростанням концентрації Ca^{2+} , що підтверджує інформацію щодо відсутності або слабкої залежності положення піка флуоресценції від наявності катіона, яка є характерною рисою подібних Fluo-4 АМ зондів [14].

З метою дослідження акумуляції Ca^{2+} ізольованими МХ, враховуючи одержані нами результати та дані літератури, а також вимогу

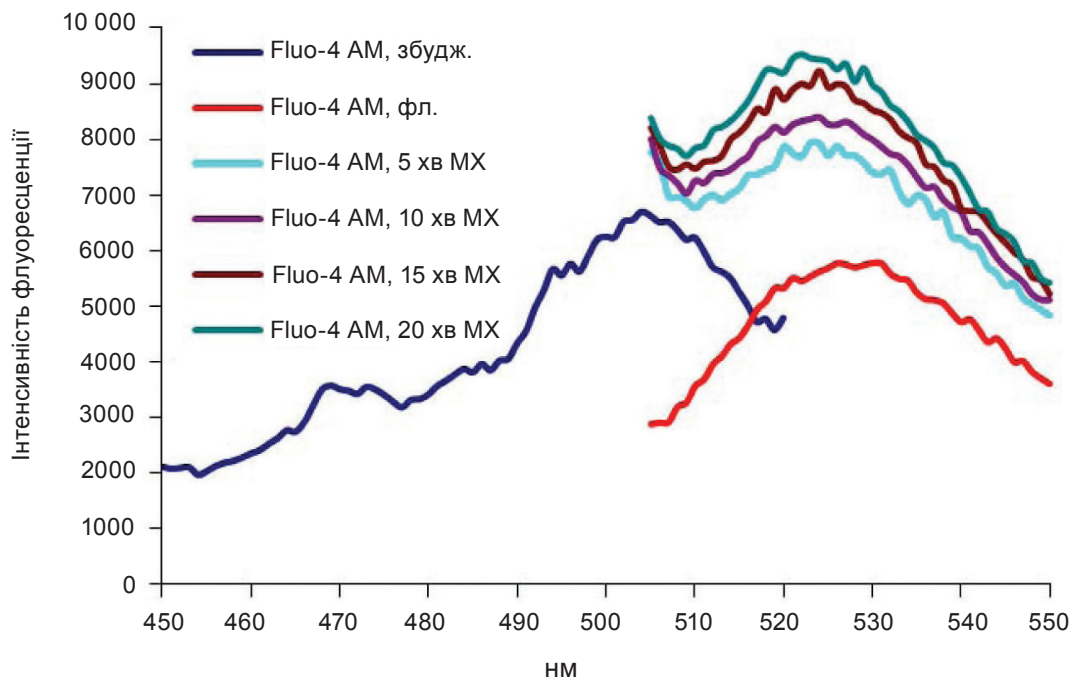


Рис. 2. Спектри збудження та флуоресценції Ca^{2+} -чутливого флуоресцентного зонда Fluo-4 АМ у контролі та в умовах його взаємодії із МХ міометрія в часі

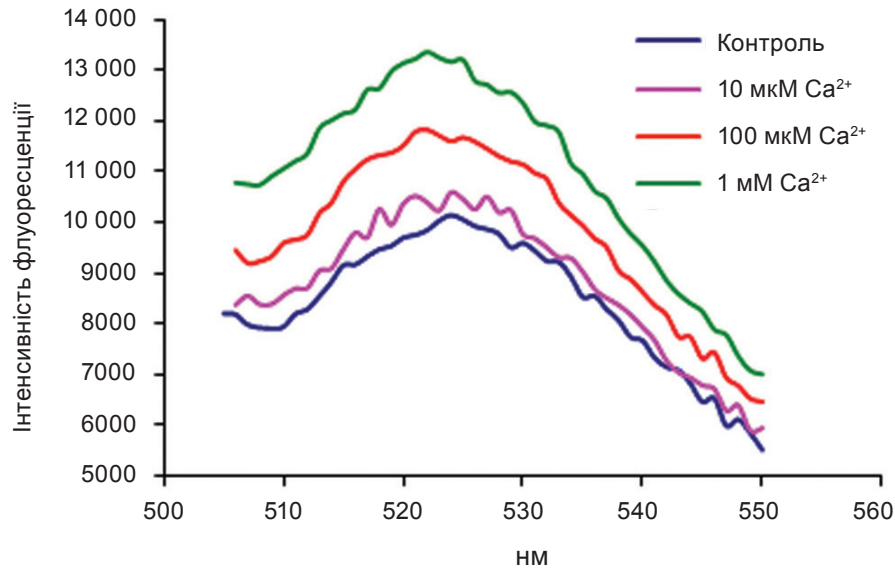


Рис. 3. Спектри флуоресценції Ca^{2+} -чутливого зонда Fluo-4 AM у присутності Ca^{2+} в різних концентраціях

для спектрофлуориметричних досліджень стосовно достатньої різниці між довжиною хвилі збудження та емісії, ми обрали наступний режим вимірювання: $\lambda_{\text{зб.}} = 495 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{фл.}} = 520 \text{ нм}$.

У МХ міометрія міститься більше 20% міцно зв'язаного Ca^{2+} відносно його загального пулу. Внутрішня мембрана ізольованих МХ має дуже низьку проникність для Ca^{2+} і може бути бар'єром для його внутрішньомітохондріального іонізованого пулу. Цією властивістю МХ як кальцієвих депо пояснюється наявність напрочуд повільної компоненти вивільнення катіона з міометрія, характеристичний час обміну якої складає 180 хв [11]. Важливими факторами, що сприяють утриманню Ca^{2+} в матриксі, може бути величезна різниця потенціалів на внутрішній мембрані (від'ємний заряд з боку матрикса), а також преципітація катіона неорганічним фосфатом та зв'язування із мембранами та біополімерами. Зазначеними чинниками можна пояснити і експериментально встановлену дуже значну Ca^{2+} -ємність МХ [2, 3, 11].

Тому за відсутності в середовищі Ca^{2+} суспензія МХ характеризується певним рівнем ендогенної флуоресценції кислотної форми Fluo-4 AM, пов'язаної з наявністю в матриксі іонізованого Ca. З метою коректної подачі експериментального матеріалу цю величину ми позначаємо як базальний рівень флуоресценції (F_0) і віднімаємо її від величини флуоресцентної відповіді, зумовленої акумуляцією Ca^{2+} МХ (F). Тоді співвідношення $F - F_0 / F_0$ буде відповідати загально прийнятим

відносним одиницям флуоресценції (Q), які зазначено на вісі ординат на наведених рисунках. Слід зазначити, що кількісні виміри концентрації Ca^{2+} в матриксі ускладнюються можливістю істотних Ca^{2+} -незалежних флукутацій інтенсивності флуоресценції, зумовлених змінами концентрації зонда в матриксі [14], передусім через значну сорбційну здатність компонентів внутрішнього вмісту МХ.

Квантоване додавання до попередньо завантажених Fluo-4 AM енергізованих МХ, які знаходились у середовищі із АТР та сукцинатом, Ca^{2+} , таким чином, що його кінцева концентрація становить 20-40-60-80 мкМ, супроводжується зростанням флуоресцентної відповіді (рис. 4). Як бачимо, внесення кожної аліквоти Ca^{2+} призводить до поступового зростання сигналу із виходом на платовий рівень у часі. Збільшення флуоресценції Fluo-4 AM пояснюється поступовою акумуляцією зростаючої кількості Ca^{2+} МХ. Органели мають здатність достатньо довго утримувати накопичений Ca^{2+} , про що свідчить факт стабільності флуоресцентної відповіді протягом не менше ніж 10 хв (рис. 4). За цих умов встановлюється динамічна рівновага між транспортними процесами, які забезпечують накопичення (Ca^{2+} -уніпортер) та вивільнення ($\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обмінник) катіона МХ.

Надійна бар'єрна функція внутрішньої мембрани ізольованих МХ міометрія щодо Ca^{2+} ілюструється дослідями, в яких додавання Ca^{2+} -іонофору А-23187 (10 мкМ) разом із Ca^{2+} -

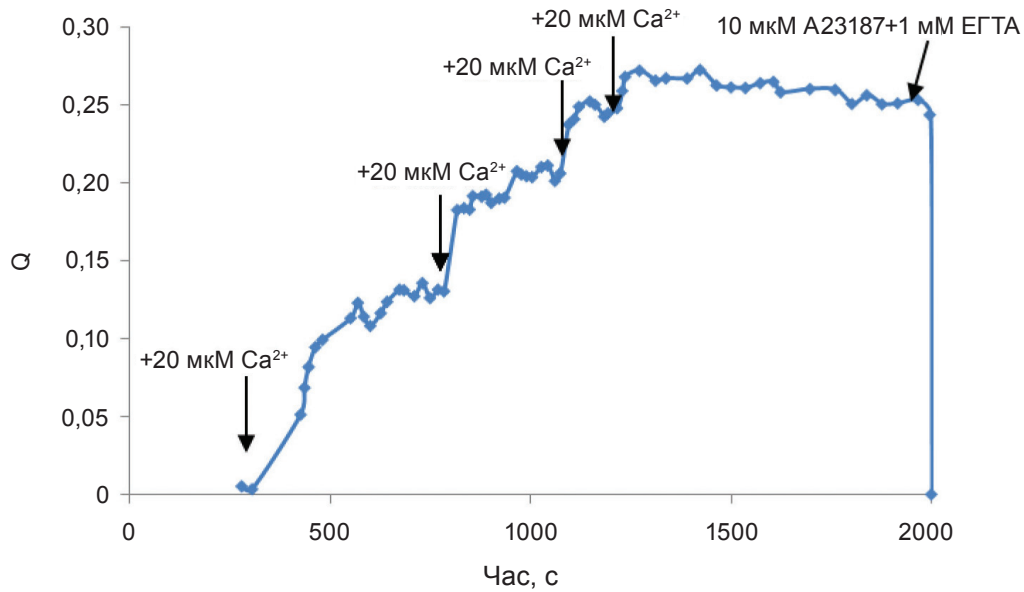


Рис. 4. Зміни інтенсивності флуоресцентної відповіді Флюо-4 АМ відображають здатність енергізованих МХ міометрія накопичувати та ефективно утримувати Ca^{2+} , а також швидко звільняти його за присутності іонофора А23187. Результати типових експериментів. Q – відносні одиниці флуоресценції (див. пояснення в тексті)

хелатором ЕГТА (1 мМ) в умовах досягнення транспортним процесом стаціонарного рівня (80 мкМ Ca^{2+} в середовищі) супроводжується різким падінням флуоресценції зонда, що свідчить про зниження концентрації катіона в МХ принаймні до базального рівня (рис. 4).

Акумуляція Ca^{2+} МХ характеризується насиченням за субстратом переносу, в цих умовах уявна константа активації процесу K_{Ca} сягає $53,9 \pm 6,9$ мкМ Ca^{2+} , що відповідає концентрації Ca^{2+} біля МХ у клітині (рис. 5). Отже, розрахована величина K_{Ca} знаходиться в межах фізіологічного діапазону, а її відносно високе значення підтверджує уявлення про

те, що енергозалежний транспорт Ca^{2+} в МХ характеризується низькою спорідненістю до катіона. Одержана нами константа активації дещо вища, ніж у роботах інших авторів. Так, константа активації процесу до Ca^{2+} , розрахована для міометрія, складає від 1 до 25 мкМ, для гладенького м'яза судин – 17 мкМ, а для таенія coli – 7 мкМ [2, 11]. Наведені величини одержано на основі даних радіоізотопних досліджень. Істотна різниця в величинах цих констант може бути обумовлена тканиноспецифічністю, а також різницею в методичних підходах.

Згідно з домінуючими на сьогодні уявленнями ми розглядаємо накопичення Ca^{2+} МХ у

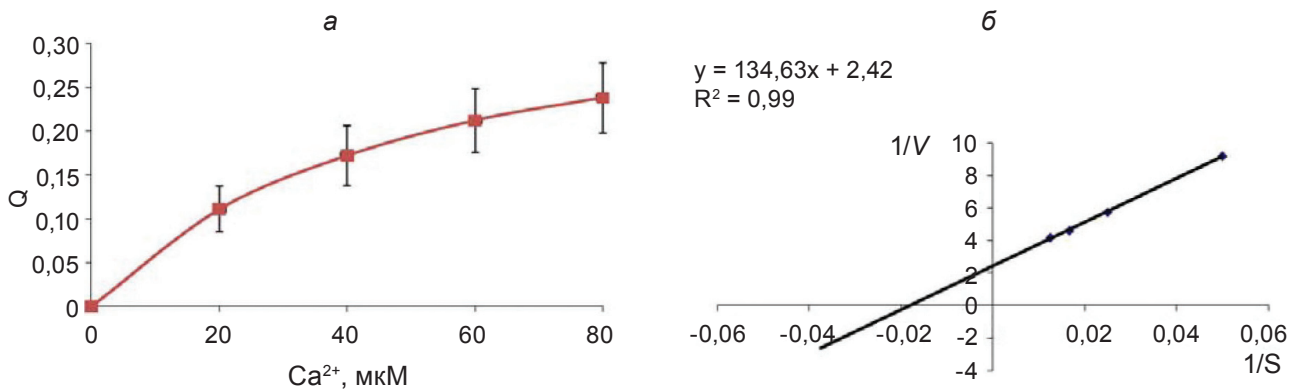


Рис. 5. Акумуляція Ca^{2+} енергізованими МХ міометрія в залежності від концентрації Ca^{2+} в робочому середовищі, $M \pm t$; $n = 5$ (а). Приклад типового розрахунку (б) константи активації акумуляції Ca^{2+} в МХ міометрія (координати Лайнуївера–Берка), де $1/V = F_0/F - F_0$ за 1 хв^{-1}

присутності АТР та сукцинату як транспортний процес, що здійснюється Ca^{2+} -уніпортером внутрішньої мембрани МХ за електрофоретичним механізмом. Альтернативним шляхом надходження катіона до матрикса може бути чутливий до рутенієвого червоного «швидкий кальцієвий вхід», який також може забезпечуватись уніпортером, що перебуває в окремому стані субпровідності. Можливість транспортування Ca^{2+} крізь канали р'анодинового рецептора МХ в міометрії ставиться під сумнів. Водночас, пропонується шлях накопичення катіона матриксом за рахунок оберненого функціонування $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника, який може працювати в реверсному режимі в умовах закислення матрикса [1, 2, 20, 24].

У наступній серії експериментів досліджували можливість накопичення Ca^{2+} в умовах деенергізації МХ, спричиненої або дисипацією градієнта протонів на внутрішній мембрані протонофором СССР, або блокуванням олігоміцином генерації ΔpH в умовах оберненого функціонування АТР-синтази за додавання АТР. У разі внесення до суспензії СССР (10 мкМ) або олігоміцину (1 мкг/мл) накопичення Ca^{2+} органелами знижується порівняно із контрольними експериментами на енергізованих МХ (рис. 6). В цих умовах акумуляції катіона електрофоретичний механізм його транспортування незадіяний, оскільки відсутність спрямованого в матрикс електрохімічного градієнта протонів на внутрішній мембрані веде до її деполаризації, тому слід розробити гіпотезу, яка б описувала в цьому разі надходження катіона в матрикс. Одним із можливих пояснень зазначеного явища є реверсне функціонування $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника.

В умовах деполаризації внутрішньої мембрани МХ рН матрикса знижується, що, в свою чергу, може активувати ΔpH -залежну акумуляцію Ca^{2+} [21].

У присутності блокатора Ca^{2+} -акумулюючих систем МХ – рутенієвого червоного (10 мкМ) – накопичення катіона також істотно зменшується порівняно з контрольними значеннями за відсутності блокатора (рис. 6). Наявність нечутливої до рутенієвого червоного компоненти транспортування Ca^{2+} в МХ можна пояснити функціонуванням численних каналних структур (аніонні-, Вах/Вак-канали) та транслоказ, які, за певних умов (скажімо, за блокування «традиційних» Ca^{2+} -транспортувальних структур), можливо, забезпечують його акумуляцію.

Результати, одержані з використанням традиційної спектрофлуориметрії (рис. 6, а), якісно підтверджуються нами із застосуванням протокового цитофлуориметра (рис. 6, б), який реєструє флуоресценцію кожної окремої МХ у суспензії. Подібність результатів, які спостерігаються за використання різних ефекторів (СССР, олігоміцин, RuR) у дослідах на суспензії МХ (спектрофлуориметрія) та окремих МХ (протокова цитофлуориметрія), свідчить на користь специфічного впливу цих ефекторів на флуоресцентну відповідь, пов'язану саме із транспортуванням Ca^{2+} в МХ, а не з фізико-хімічними процесами взаємодії зонда з діючими речовинами.

Отже, під час вивчення окремих властивостей енергозалежного накопичення Ca^{2+} в МХ міометрія із застосуванням флуоресцентної спектроскопії та зонда Fluo-4 АМ показано, що транспортний процес має окремі харак-

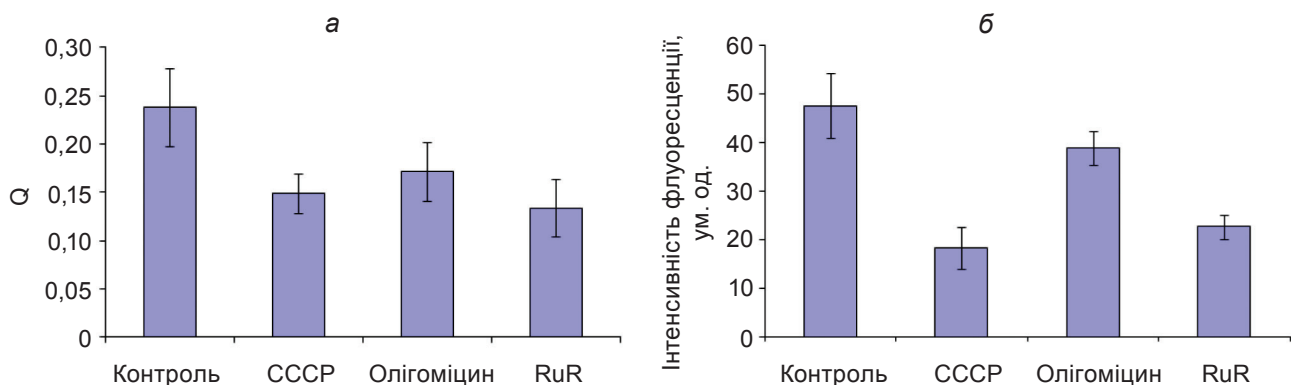


Рис. 6. Вплив СССР (10 мкМ), олігоміцину (1 мкг/мл) та рутенієвого червоного (10 мкМ) на акумуляцію Ca^{2+} МХ міометрія, концентрація Ca^{2+} в робочому середовищі становила 80 мкМ. Наведено результати досліджень, проведених із застосуванням спектрофлуориметра (а) та протокового цитофлуориметра (б), $M \pm m$, $n = 3-8$, зміни вірогідні відносно контролю, $P \leq 0,05$. За дії олігоміцину $P < 0,2$

теристики, подібні тим, які було визначено іншими методичними підходами і на інших об'єктах, а саме:

- транспорт Ca^{2+} МХ у присутності АТР та сукцинату залежить від концентрації Ca^{2+} в середовищі інкубації;
- транспортний процес досягає з часом стану рівноваги;
- внутрішня мембрана МХ є ефективним бар'єром для матричного іонізованого Ca^{2+} ;
- транспортування Ca^{2+} характеризується насиченням за субстратом переносу, а розрахована константа активації відповідає концентрації Ca^{2+} поблизу МХ;
- акумуляція Ca^{2+} МХ ефективно пригнічується рутенієвим червоним, СССР та олігоміцином, тобто в умовах блокування електрофоретичного накопичення катіона МХ або деполаризації її внутрішньої мембрани;
- існує феномен накопичення Ca^{2+} деенергізованими МХ.

Одержані нами за допомогою спектрофлуориметрії результати якісно підтверджуються із застосуванням протокової цитофлуориметрії.

Таким чином, продемонстровано, що Ca^{2+} -чутливий флуоресцентний зонд Fluo-4 AM можна використовувати для вивчення закономірностей акумуляції Ca^{2+} в ізольованих мітохондріях гладенького м'яза.

ИЗУЧЕНИЕ АККУМУЛЯЦИИ Ca^{2+} В ИЗОЛИРОВАННЫХ МИТОХОНДРИЯХ ГЛАДКИХ МЫШЦ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЗОНДА Fluo-4 AM

*О. В. Коломиец, Ю. В. Данилович,
А. В. Данилович, С. А. Костерин*

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

Доказана возможность применения Ca^{2+} -чувствительного флуоресцентного зонда Fluo-4 AM и метода спектрофлуориметрии для исследования закономерностей энергозависимой аккумуляции Ca^{2+} митохондриями гладкой мышцы матки. Установлено, что в присутствии препарата митохондрий флуоресцентный ответ красителя существенно возрастает во времени и прямо зависит от концентрации Ca^{2+} в среде. И так, в этих условиях образуется активная деэстерифицированная форма зонда, которая проявляет чувствительность к Ca^{2+} .

Показано, что аккумуляция Ca^{2+} митохондриями в присутствии Mg-АТР и сукцината зависит от концентрации экзогенного Ca^{2+} и характеризуется насыщением по субстрату переноса. Кажущаяся константа активации процесса накопления Ca^{2+} составляет $53,9 \pm 6,9$ мкМ, что соответствует физиологической концентрации катиона в клетке вблизи митохондрий. Транзитное добавление к среде инкубации Ca^{2+} -ионофора А23187 вызывает быстрое высвобождение ионизированного катиона из митохондрий. При диссипации градиента протонов на внутренней мембране митохондрий протонофором СССР, а также в случае подавления генерации этого градиента олигомицином и в присутствии ингибитора систем Ca^{2+} -аккумуляции митохондрий рутенієвого красного накопление катиона существенно снижается.

Полученные результаты указывают на перспективность использования Fluo-4 AM для изучения свойств системы аккумуляции Ca^{2+} в изолированных митохондриях миометрия.

Ключевые слова: кальций, митохондрии, Fluo-4 AM, гладкая мышца, миометрий.

Ca^{2+} ACCUMULATION STUDY IN ISOLATED SMOOTH MUSCLE MITOCHONDRIA USING Fluo-4 AM

*O. V. Kolomiets, Yu. V. Danylovysh,
G. V. Danylovysh, S. O. Kosterin*

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

The opportunity of Ca^{2+} -sensitive fluorescent dye Fluo-4 AM and spectrofluorimetry method application for the study of energy-dependent Ca^{2+} accumulation in mitochondria from uterus smooth muscle is proved. It has been found that the presence of mitochondrial preparation increases time-dependent fluorescent response considerably and this effect depends on Ca^{2+} concentration in the medium. Thus, in these conditions, deesterification active probe is formed which is sensitive to Ca^{2+} .

It is shown that the accumulation of calcium ions in mitochondria in the presence of Mg-АТР and succinate depends on exogenous Ca^{2+} concentration and is characterized by substrate saturating. The apparent activation constant of Ca^{2+} accumulation is 53.9 ± 6.9 mM, which corresponds to the physiological concentration of the cation in the cell next to mitochondria. Transit addition of Ca^{2+} -ionophore А23187 to the incubation me-

dium caused a rapid release of ionized cation from mitochondria. When proton gradient on the inner mitochondrial membrane is dissipated by protonophore CCCP, in the case of suppressing the generation of the gradient by oligomycin and in the presence of ruthenium red that inhibits Ca^{2+} mitochondrial accumulation systems, Ca^{2+} entry is significantly reduced.

The results indicate the prospects of using Fluo-4 AM to study the properties of the Ca^{2+} accumulation system in isolated mitochondria of the myometrium.

Key words: calcium, mitochondria, Fluo-4 AM, smooth muscle, myometrium.

1. Костюк П. Г., Костюк О. П., Лук'янець О. О. Внутрішньоклітинна кальцієва сигналізація: структура і функції. – К.: Наукова думка, 2010. – 175 с.
2. Костерин С. А., Бурдыга Ф. В. // Усп. совр. биол. – 1993. – **113**, вып. 4. – С. 485–505.
3. Шинлова О. П., Костерин С. А., Веклич Т. А. // Биохимия. – 1996. – **61**, вып. 8. – С. 1440–1447.
4. Костерин С. А. // Укр. биохим. журн. – 1998. – **70**, № 6. С. 152–160.
5. Бабіч Л. Г., Шликов С. Г., Наумова Н. В., Костерин С. О. // Укр. біохім. журн. – 2007. – **79**, № 6. – С. 34–41.
6. Бабіч Л. Г., Шликов С. Г., Наумова Н. В., Костерин С. О. // Укр. біохім. журн. – 2008. – **80**, № 4. – С. 51–58.
7. Wei A.-C., Liu T., Cortassa S. et al. // Biochim. Biophys. Acta. – 2011. – **1813**. – Р. 1373–1381.
8. Бурлака А. П., Сидорик Є. П. Радикальні форми кисню та оксиду азоту при пухлинному процесі. – К.: Наукова думка, 2006. – 227 с.
9. Авдонин П. В., Ткачук В. А. Рецепторы и внутриклеточный кальций. – М.: Наука, 1994. – 288 с.
10. Gerasimenko O., Terpikin A. // Cell Calcium. – 2005. – **38**. – Р. 201–211.
11. Костерин С. А. Транспорт кальция в гладких мышцах. – К.: Наукова думка, 1990. – 216 с.
12. Курский М. Д., Костерин С. А., Бурчинская Н. Ф., Шлыков С. Г. // Укр. биохим. журн. – 1987. – **59**, № 3. – С. 35–38.
13. Вовканич Л. С., Дубицький Л. О. // Экспер. клін. фізіол. біохім. – 2001. – **3**, № 15. – С. 34–37.
14. Fluo calcium indicators. Molecular probes. Invitrogen detection technologies. Product information. – Revised: 02-Feb-2011.
15. Бережнов А. В., Зинченко В. П., Федотова Е. И., Яшин В. А. Применение флуоресцентной микроскопии в исследованиях динамики Ca^{2+} в клетках. Пушино, Учебно-методический центр Пушинского научного центра, Учебный центр Института биофизики клетки РАН, 2007. – 65 с.
16. Gee K. R., Brown K. A., Chen W.-N. H et. al. // Cell Calcium. – 2005. – **27**, N 2. – Р. 97–106.
17. Scaduto R. C. Jr., Grotjohann L. W. // Am. J. Physiol. Heat Circ. Physiol. – 2003. – **285**. – Р. Н. 2118–2124.
18. Wan B., LaNoue K. F., Cheung J. Y., Scaduto R. C. Jr. // J. Biol. Chem. – 1989. – **264**, N 23. – Р. 13430–13439.
19. Malli R., Graier W. F. // FEBS Lett. – 2010. – **584**. – Р. 1942–1947.
20. Santo-Domingo J., Demarex N. // Biochim. Biophys. Acta. – 2010. – **1797**. – Р. 907–912.
21. Кандаурова Н. В. Ca^{2+} -індуковані зміни мембранного потенціалу мітохондрій міометрія шурів // Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – 2011. – 20 с.
22. Костерин С. А., Браткова Н. Ф., Курский М. Д. // Биохимия. – 1985. – **50**, вып. 8. – С. 1350–1361.
23. Bradford M. M. // Anal. Biochem. – 1976. – **72**. – Р. 248–254.
24. Кандаурова Н. В., Чуніхін О. Ю., Бабіч Л. Г. та ін. // Укр. біохім. журн. – 2010. – **82**, № 6. – С. 52–57.
25. Пономаренко О. В., Бабіч Л. Г., Горчев В. Ф., Костерин С. О. // Укр. біохім. журн. – 2006. – **78**, № 6. – С. 38–45.
26. Клюева А. В., Левчук Ю. Н., Набока Ю. Н. // Укр. біохім. журн. – 2002. – **74**, № 5. – С. 12–26.
27. Кучеренко М. Є., Бабенюк Ю. Д., Войціцький В. М. Сучасні методи біохімічних досліджень: Учебний посібник. – К.: Фітосоціоцентр, 2001. – 424 с.
28. Геннис Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функции: Пер. с англ. – М.: Мир, 1997. – 624 с.
29. Bisogno T., Sepe N., Meic D. et al. // Biochem. J. – 1997. – **322**. – Р. 671–677.

Отримано 27.02.2013