

МОДУЛЯЦІЯ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦІАЛУ МІТОХОНДРІЙ МІОМЕТРІЯ АНТАГОНІСТАМИ КАЛЬМОДУЛІНУ

С. Г. ШЛИКОВ, Л. Г. БАБІЧ, М. Є. ЄВТУШЕНКО, С. О. КАРАХІМ, С. О. КОСТЕРІН

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

Вплив антагоністів кальмодуліну – кальмідазоліуму та трифлуоперазину – на мембранний потенціал мітохондрій досліджували із використанням методів проточної цитометрії, конфокальної мікроскопії та залученням потенціалчутливих флуоресцентних зондів MTG та TMRM. Вивчення впливу різних концентрацій антагоністів кальмодуліну на мембранний потенціал мітохондрій виконували на проточному цитометрі з використанням фракції ізольованих мітохондрій міометрія невагітних щурів. Встановлено, що кальмідазоліум у концентрації від 1 до 10 мкМ дозозалежно знижує мембранний потенціал мітохондрій. У той же час, трифлуоперазин у концентрації від 10 до 100 мкМ діє різним чином: 10 мкМ – збільшує поляризацію, тоді як 100 мкМ спричинює майже повну деполаризацію мітохондріальних мембран. Методом конфокальної мікроскопії на клітинах міометрія продемонстровано, що внесення в середовище інкубації MTG приводить до появи флуоресценції в «зеленому» діапазоні випромінювання. Додавання іншого зонда – TMRM – зумовлює флуоресценцію в «червоному» діапазоні випромінювання. Деполаризація мітохондрій протонофором CCCP та 10 мМ NaN_3 супроводжується зниженням інтенсивності «червоної» флуоресценції, при цьому «зелена» флуоресценція зберігається. Внесення в середовище інкубації 10 мкМ кальмідазоліуму або 100 мкМ трифлуоперазину супроводжується після 10–15 хв інкубації практично повним гасінням флуоресцентного сигналу зонда TMRM. Таким чином, із використанням потенціалчутливих флуоресцентних зондів TMRM та MTG продемонстровано, що антагоністи кальмодуліну модулюють мембранний потенціал мітохондрій клітин міометрія.

Ключові слова: проточна цитометрія, конфокальна мікроскопія, фракція мітохондрій, клітини міометрія, мембранний потенціал мітохондрій, кальмідазоліум, трифлуоперазин.

Мітохондрії мають фундаментальне значення у контролі внутрішньоклітинних процесів [1–3]. Рівень поляризації внутрішньої мембрани мітохондрій є ключовим параметром, який визначає як функціональну активність цих органел, так і клітини в цілому. Добре відомо, що Ca^{2+} -зв'язуючий протеїн кальмодулін (CaM) є посередником численних внутрішньоклітинних ефектів Ca^{2+} за рахунок оборотного утворення комплексу «CaM- Ca^{2+} », який, у свою чергу, здатен регулювати величезну кількість Ca^{2+} -залежних внутрішньоклітинних процесів [4]. Слід зауважити, що CaM є достатньо «консервативним» протеїном (148 амінокислот, молекулярна маса 16,7 кДа): він належить до суперсімейства Ca^{2+} -зв'язуючих протеїнів, які використовують один і той самий Ca^{2+} -зв'язуючий структурний домен.

Нещодавно на кардіоміоцитах було показано, що більша частина кальмодуліну знаходиться у зв'язаному стані, а концентрація його у вільному стані становить 50–75 нМ, що приблизно дорівнює 1% від загальної кількості зазначеного протеїну [4]. У відповідь на кальцієвий сигнал CaM може зв'язуватися з великою кількістю різних протеїнів-мішеней, таких як кіназа легких ланцюгів міозину, фосфодіестераза, аденілатциклаза, Ca^{2+} /CaM-залежна кіназа, протеїнфосфатаза, кальцінейрин, Ca^{2+} -активовані K^+ -канали, кальцієві канали L-типу, ріанодинові рецептори та інші [4–8]. У літературі є дані щодо регуляції активності Ca^{2+} -уніпортеру мітохондрій клітин RBL-1 (лейкозні базофіли щурів) іонами Ca за участю CaM [9]. Відповідна інформація стосовно мітохондрій гладеньких м'язів відсутня.

В останні роки доведено можливість залучення методу проточної цитометрії для дослідження властивостей ізольованих мітохондрій [10–12]. Цей метод з успіхом використовується, зокрема, для вивчення змін електричного потенціалу мітохондріальної мембрани, визначення рівня активних форм кисню тощо [11, 12].

У попередніх дослідженнях ми показали, що інкубація мітохондрій міометрія з антагоністами кальмодуліну – кальмідазоліумом (10 мкМ) або трифлуоперазином (100 мкМ) – призводить до деполяризації їхніх мембран [13].

З метою подальшого розвитку цих досліджень ми поставили перед собою завдання: вивчити з використанням методів проточної цитометрії та конфокальної мікроскопії кінетичні аспекти дії антагоністів кальмодуліну на поляризацію мембрани мітохондрій міометрія, з'ясувати закономірності локалізації потенціалчутливих флуоресцентних зондів TMRM та MTG у клітинах міометрія за присутності протонофору СССР – фактора деполяризації мітохондріальної мембрани та антагоністів кальмодуліну.

Матеріали і методи

Препарат ізольованих мітохондрій одержували з міометрія невагітних щурів за допомогою методу диференціального центрифугування [14]. Одержаний препарат суспендували в розчині такого складу: 10 мМ Hepes (pH 7,4), 250 мМ цукроза, 1 мМ EGTA, 0,1% БСА; температура – 4 °С.

Визначення концентрації протеїну у фракції мітохондрій проводили за методом Бредфорд [15]. Вміст мітохондріального протеїну в пробі становив 50 мкг/мл.

Проточний цитометр COULTER EPICS XL™ (Beckman Coulter, США) з аргонним лазером ($\lambda_{\text{збуд.}}$ – 488 нм) використовували для реєстрації мембранного потенціалу мітохондрій та для дослідження бокового та прямого світлорозсіювання мітохондрій. Результати цих експериментів аналізували за допомогою програми SYSTEM II™ Software (Beckman Coulter, США).

Тестування відносних значень мембранного потенціалу $\Delta\psi$ мітохондрій здійснювали із використанням потенціалчутливого флуоресцентного зонда TMRM (tetramethylrhodamine

methyl ester) у концентрації 100 нМ, інкубацію проводили в середовищі наступного складу: 20 мМ Hepes (pH 7,4), 250 мМ цукроза, 0,1 мМ P_i (у вигляді K^+ -фосфатного буфера, pH 7,4), 5 мМ сукцинат натрію, 0,5 мМ $MgCl_2$ як описано раніше [16].

Суспензію клітин міометрія невагітних щурів одержували за допомогою обробки тканини колагеназою [17]. Підрахунок кількості клітин проводили із застосуванням гемоцитометра. Тестування життєздатності одержаних клітин проводили з використанням барвника трипанового синього – понад 95% клітин мали зелене забарвлення, що свідчить про цілісність плазматичної мембрани.

Мембранний потенціал мітохондрій на моделі інтактних міоцитів матки досліджували з використанням конфокального лазерного скануючого мікроскопа LSM 510 META (Carl Zeiss, Німеччина) із сучасною системою документування і обробки зображень за принципом спектрального розділення на базі інвертованого моторизованого універсального люмінесцентного мікроскопа. Дослідження проводили в режимі MultiTrack за допомогою детектора META, що дозволяє встановлювати довільний діапазон флуоресценції, що реєструється. Для збудження флуоресценції барвників MTG (MitoTracker® Green $\lambda_{\text{збуд.}} = 488$ нм, $\lambda_{\text{фл.}} = 516$ нм) та TMRM використовували лазерну лінію з λ 488 нм аргонного лазера (30 мВт). Флуоресценцію MTG реєстрували в діапазоні від 518 до 561 нм, а TMRM – у діапазоні від 593 до 754 нм. Об'єктив Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC.

Для експериментів на конфокальному мікроскопі були відпрацьовані умови прикріплення міоцитів до проточних камер. Скляну поверхню проточної камери для конфокальної мікроскопії обробляли розчином полілізину, що сприяло кращому прикріпленню клітин. Час прикріплення клітин у камері становив 120 хв у розчині такого складу: 136,9 мМ NaCl, 5,36 мМ KCl, 0,03 мМ $CaCl_2$, 0,44 мМ KH_2PO_4 , 4,5 мМ $NaHCO_3$, 0,26 мМ Na_2HPO_4 , 5,5 мМ глюкоза, 10 мМ Hepes (pH 7,4). За цей час більшість клітин надійно прикріплюються до поверхні камери, що можна візуально спостерігати із використанням світлового мікроскопа. Деякі експерименти виконували на клітинах міометрія, які вирощували в CO_2 -інкубаторі протягом 24 год у розчині DMEM із 10%-ю сироваткою.

Прикріплені до поверхні камери міоцити навантажували потенціалчутливим флуоресцентним зондом MTG (MitoTracker® Green $\lambda_{\text{збуд.}} = 488 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{фл.}} = 516 \text{ нм}$) (0,5 мкМ) та TMRM (1 мкМ), $\lambda_{\text{збуд.}} = 543 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{фл.}} = 590 \text{ нм}$.

У роботі використовували такі реактиви: D-(+)-цукроза, MTG, TMRM, Hepes, EGTA (етиленгліколь тетраацетат), АТФ, сукцинат натрію, вільний від жирних кислот БСА (BSA fatty acid free), олігоміцин, протоніофор CCCP, кальмідазоліум, трифлуоперазин, полілізин (Sigma, США); DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium), сироватка, розчин пеніциліну/стрептоміцину, розчин трипсину (Gibco, США). Інші реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації чда та хч.

Результати та обговорення

Вивчення кінетики впливу різних концентрацій антагоністів кальмодуліну на мембранний потенціал мітохондрій міометрія. Раніше ми показали, що інкубація мітохондрій з антагоністами кальмодуліну – 10 мкМ кальмідазоліумом або 100 мкМ трифлуоперазином призводить до швидкої деполаризації їхніх мембран [13]. У представленій роботі з використанням фракції мітохондрій, одержаних із міометрія невагітних щурів, досліджувались часова та концентраційна залежність ефектів антагоністів кальмодуліну на мембранний потенціал мітохондрій. Зокрема, кальмідазоліум використовували в концентраціях 1, 5 та 10 мкМ (рис. 1). Показано, що у концентрації 1 мкМ кальмідазоліум практично не впливає на рівень поляризації мітохондріальних мембран порівняно з контролем. Кальмідазоліум (5 мкМ) приблизно на 50% знижує поляризацію цих мембран вже на 1-й хв. Використання 10 мкМ кальмідазоліуму призводить до майже повної деполаризації мітохондріальних мембран також вже на 1-й хв інкубації.

Трифлуоперазин також використовували в трьох концентраціях: 10, 50 та 100 мкМ. Цікаво, що 10 мкМ трифлуоперазин спричинює значну гіперполяризацію досліджуваних мембран (приблизно у 2 рази порівняно з контролем) вже на 1-й хв інкубації. Трифлуоперазин (50 мкМ) не впливає на рівень поляризації, а збільшення його концентрації до 100 мкМ вже на 1-й хв інкубації призводить до майже повної деполаризації мембран мітохондрій міометрія (рис. 2).

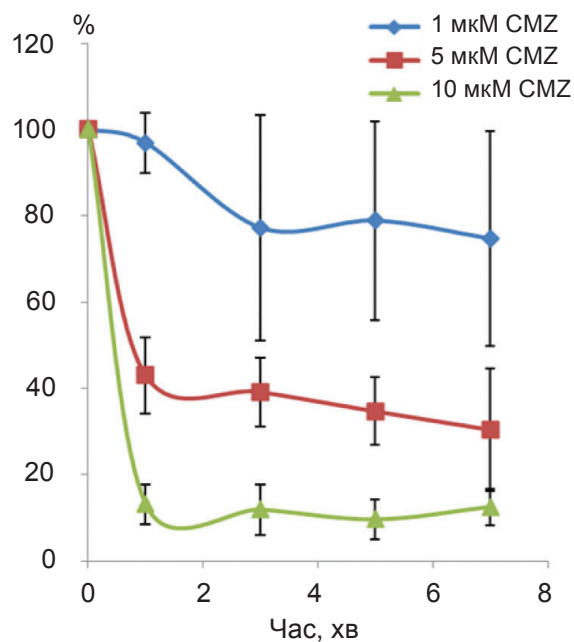


Рис. 1. Кінетична залежність впливу різних концентрацій кальмідазоліуму (CMZ) на мембранний потенціал мітохондрій міометрія ($M \pm m$, $n = 5$)

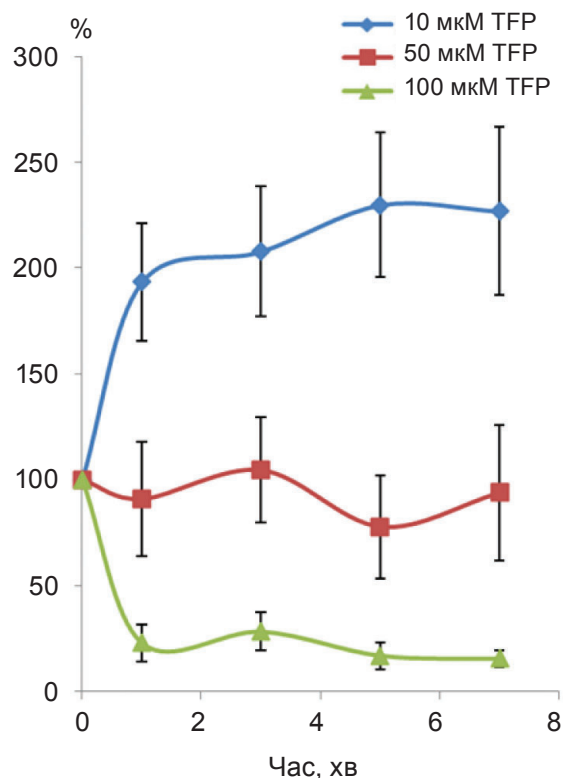


Рис. 2. Кінетична залежність впливу різних концентрацій трифлуоперазину (TFP) на мембранний потенціал мітохондрій міометрія ($M \pm m$, $n = 5$)

Таким чином, на фракції мітохондрій міометрія шурів за допомогою проточного цитометра та флуоресцентного зонда TMRM показано дозозалежне збільшення деполаризації мембран досліджуваних органел за використання кальмідазоліуму в концентрації від 1 до 10 мкМ. Проте ефекти іншого антагоніста кальмодуліну – трифлуоперазину – залежно від його концентрації у середовищі інкубації мають протилежну спрямованість: за 10 мкМ концентрації спостерігається збільшення поляризації, тоді як при 100 мкМ спостерігається майже повна деполаризація мітохондріальних мембран.

Візуалізація впливу антагоністів кальмодуліну на мембранний потенціал мітохондрій в клітинах міометрія. Подальша робота була спрямована на дослідження впливу антагоністів кальмодуліну на поляризацію мембран мітохондрій в інтактних клітинах міометрія. Експерименти проводили із залученням конфокальної мікроскопії та двох флуоресцентних зондів – TMRM та MTG. Більшість новітніх скануючих мікроскопів можуть працювати в мультиспектральному режимі, тобто можливо одержувати зображення одного об'єкту, обробленого кількома барвниками, в різних спектральних областях. Типовим режимом роботи мікроскопів є дослідження колокалізації в клітині (або у структурах клітини) двох протеїнів, мічених різними антитілами або флуоресцентними барвниками. Такі дослідження допомагають виявити причинно-наслідковий зв'язок між цими барвниками або протеїнами. Кількісним критерієм ступеня колокалізації двох зондів може слугувати так звана кольорова двовимірні гистограма, де по двом координатам відкладено відповідну інтенсивність каналів для кожної точки зображення. Таким чином, в умовах повної колокалізації та однакової інтенсивності флуоресценції обох зондів усі точки гистограми будуть лежати на прямій під кутом 45° [18]. Відомо, що використані нами флуоресцентні барвники TMRM та MTG є ліпофільними катіонами, які накопичуються в мембранних структурах залежно від рівня мембранного потенціалу цих структур. Оскільки внутрішня мембрана мітохондрій має високий негативний потенціал (близько -180 мВ), зонди дифундують до цитоплазми клітин міометрія та накопичуються переважно в мітохондріях, що видно з

рис. 3 та 4. Таке накопичення супроводжується підвищенням рівня флуоресценції барвників. Поведінка цих зондів при змінах мембранного потенціалу мітохондрій відрізняється. Зонд MTG накопичується в поляризованих мітохондріях та ковалентно зв'язується з мітохондріальними протеїнами. Таким чином, в умовах дисипації мембранного потенціалу зонд залишається в мітохондріях. Навпаки, зонд TMRM не взаємодіє з мембранними структурами або протеїнами мітохондрій, а тому дисипація мембранного потенціалу супроводжується виходом зонда з мітохондрій та, відповідно, зниженням рівня його флуоресценції. Саме ці ефекти ми використали для візуалізації дії антагоністів кальмодуліну на мембранний потенціал мітохондрій клітин міометрія. Необхідно також зазначити, що пік інтенсивності флуоресценції MTG реєструється в зеленій області спектра (панель A), тоді як TMRM – у червоній (панель B).

На рис. 3.1 (панелі A, B, C) продемонстровано навантаження зондом MTG клітин міометрія невагітних шурів. Реєструємо флуоресценцію в «зеленому» діапазоні (рис. 3.1, панель A). Суміщення двох зображень клітин у «зеленому» (панель A) та «червоному» (панель B) діапазонах флуоресценції представлено на панелі C. Аналіз інтенсивності флуоресценції на панелі C вздовж червоної лінії показав сигнал переважно у «зеленому» діапазоні (рис. 3.2, панель D).

Додавання до клітин міометрія навантажених зондом MTG ще одного зонда, TMRM, приводить до появи «червоної» флуоресценції (рис. 4.1). Суміщення двох зображень клітин у «зеленому» та «червоному» діапазонах флуоресценції супроводжується забарвленням клітини в жовтий колір (рис. 4, панель C), що свідчить про колокалізацію навантажених зондів. Відносна інтенсивність флуоресценції обох зондів вздовж червоної лінії на панелі C відображено на рис. 4.2 (панель D).

Деполаризація мітохондрій приводить до виходу TMRM із мітохондрій, тоді як MTG залишається в мітохондріях, оскільки він ковалентно зв'язується із протеїнами цих органел. Як контроль ми досліджували ефекти протонофору CCCP (1 мкМ) на флуоресцентний сигнал використаних зондів. Візуально деполаризація має супроводжуватися зниженням «червоної» флуоресценції і частковим збільшенням (або, як найменше, без змін) «зеленої» флуоресценції. Після дії на клітини протонофору CCCP (1 мкМ)

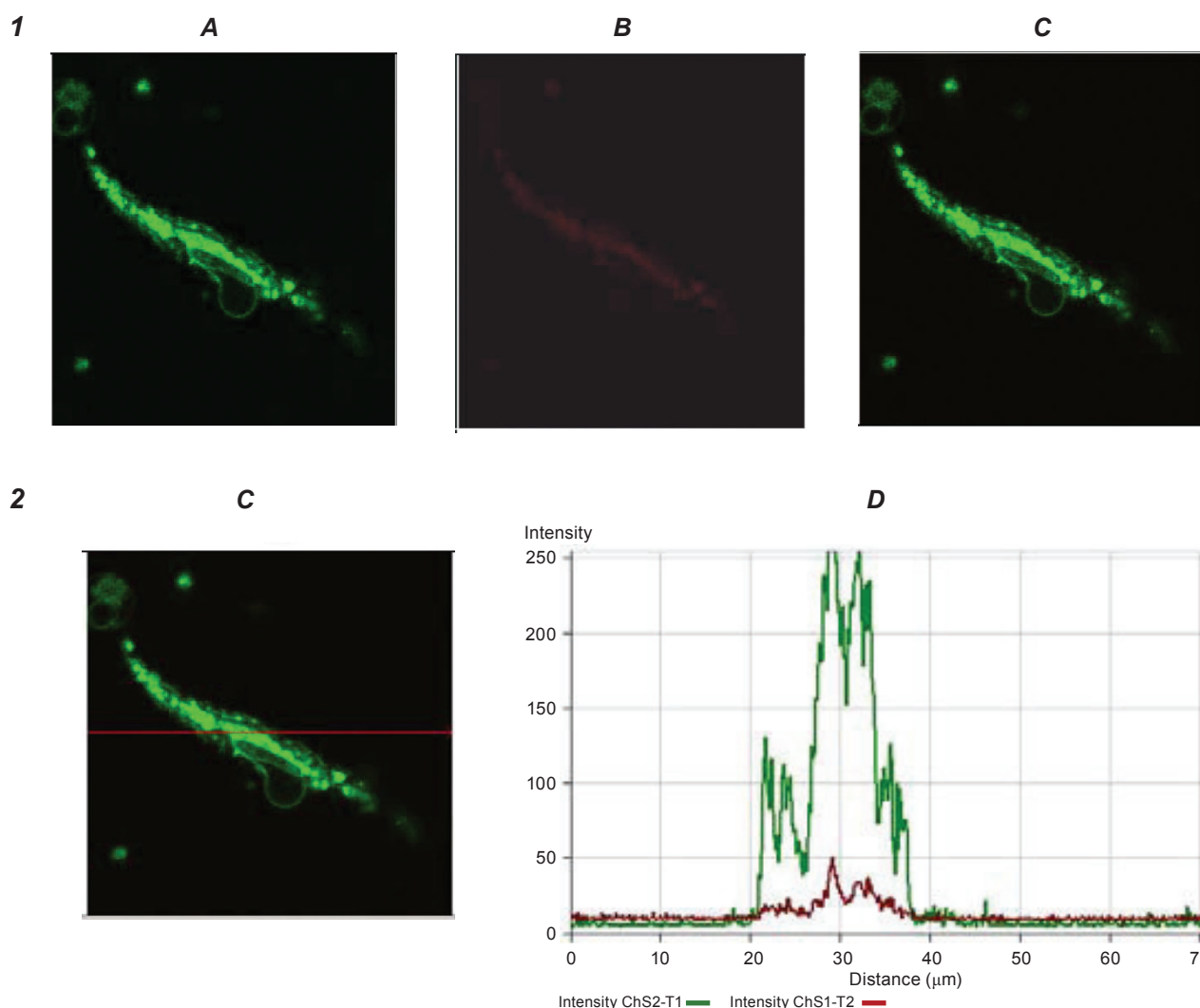


Рис. 3. Навантаження зонда MTG у клітини міометрія: 1 – навантаження зондом MTG клітин міометрія: панель 1A демонструє флуоресценцію зонда у «зеленому» діапазоні; панель 1B – флуоресценцію у «червоному» діапазоні (у цьому разі практично маємо її відсутність); панель 1C – демонстрація сукупної флуоресценції в «зеленому» та «червоному» діапазонах. 2 – Реєстрація відносного рівня інтенсивності флуоресценції зонда MTG у «зеленому» та «червоному» діапазонах вздовж червоної лінії на панелі C: – панель 2D – профіль відносної інтенсивності флуоресценції в обох діапазонах випромінювання вздовж червоної лінії

протягом 5 хв спостерігається поступове зниження флуоресценції в «червоному» діапазоні за рахунок виходу флуоресцентного зонда TMRM із мітохондрій (рис. 5.2, панелі A, B та C). Аналіз інтенсивності флуоресценції на панелі C вздовж червоної лінії також показав зниження інтенсивності флуоресценції в «червоному» діапазоні (рис. 5.3, панель D).

Аналогічні результати одержано за дії на клітини міометрія азиду натрію (NaN_3 , 10 мМ). На рис. 6 відображено вплив цього агента на

інтенсивність флуоресценції зонда TMRM у клітинах міометрія через 5 та 10 хв інкубації.

Вищезазначений підхід застосовано для візуалізації ефектів антагоністів кальмодуліну на рівень поляризації мітохондріальної мембрани клітин міометрія. Відомо, що Ca^{2+} -зв'язуючий протеїн CaM є посередником численних внутрішньоклітинних ефектів іонів Ca [4]. Раніше нами було показано, що комплекс «CaM- Ca^{2+} » бере участь у регуляції активності Ca^{2+} уніпортеру мітохондрій міометрія [13]. Ця

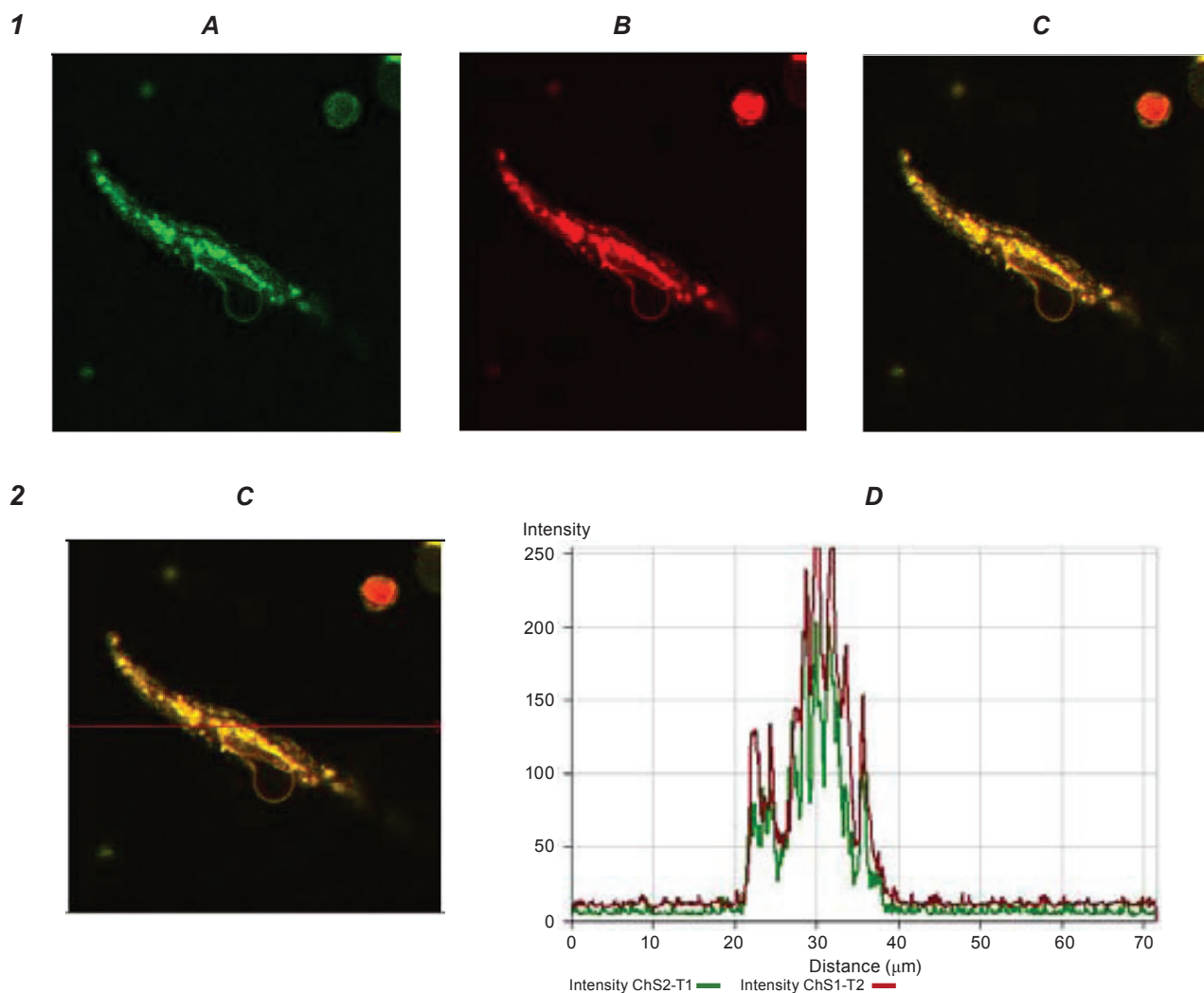


Рис. 4. Навантаження зондів MTG та TMRM у клітини міометрія: 1 – навантаження зондами MTG та TMRM клітин міометрія: панель 1А демонструє флуоресценцію зонда MTG у «зеленому» діапазоні; панель 1В – флуоресценцію TMRM у червоному діапазоні; панель 1С - демонстрація сукупної флуоресценції в «зеленому» та «червоному» діапазонах випромінювання. 2 – Реєстрація відносного рівня інтенсивності флуоресценції зондів MTG та TMRM у «зеленому» та «червоному» діапазонах вздовж червоної лінії на панелі С: – панель 2D – профіль відносної інтенсивності флуоресценції зондів в обох діапазонах випромінювання вздовж червоної лінії

точка зору відповідна до даних літератури [9]. З іншого боку доведено, що поляризація мембрани мітохондрій та активність кальцієвого уніпортеру – взаємопов'язані процеси [1, 19]. З'ясувалося, що антагоністи СаМ спричинюють істотну деполаризацію мембран мітохондрій: внесення 10 мкМ кальмідазоліуму (рис. 1) та 100 мкМ трифлуоперазину (рис. 2) у середовище інкубації приводить до повної дисипації відносно контролю мембранного потенціалу $\Delta\psi$. Проте, на відміну від кальмідазоліуму, ефекти іншого антагоніста кальмодуліну – трифлуо-

перазину, мають протилежну спрямованість залежно від його концентрації в середовищі інкубації: 10 мкМ – збільшує поляризацію, тоді як 100 мкМ – спричинює майже повну деполаризацію мітохондріальних мембран (рис. 2). Відомо, що кальмідазоліум є найбільш афінним серед антагоністів кальмодуліну [20].

Для дослідження ефектів антагоністів кальмодуліну на поляризацію мітохондріальних мембран клітини міометрія також навантажували двома зондами – MTG та TMRM. На рис. 7 видно розподіл застосованих нами флуоресцентних

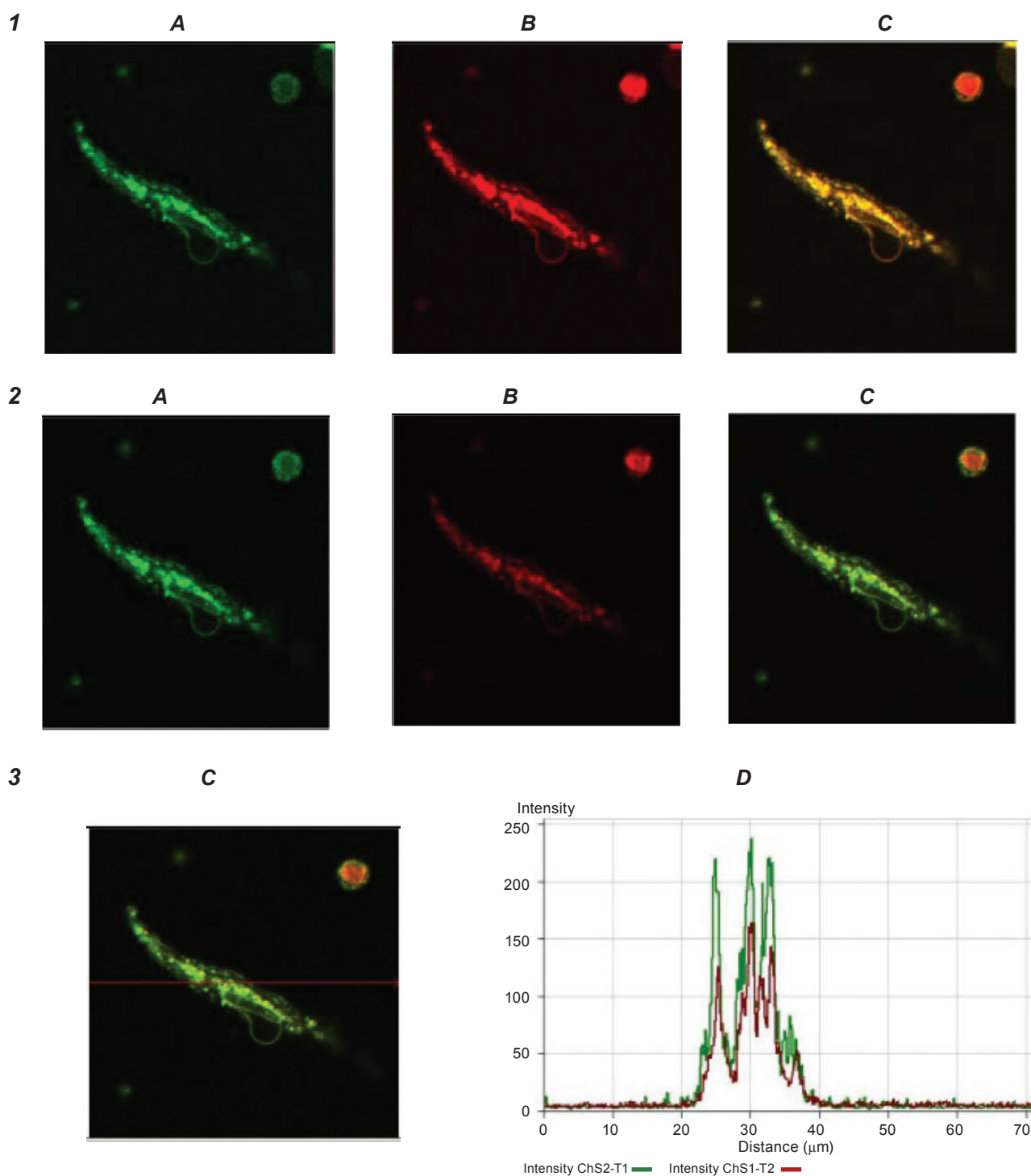


Рис. 5. Вплив протонофору CCCP (1 мкМ) на мембранний потенціал мітохондрій клітин міометрія, що були попередньо навантажені зондами MTG та TMRM: 1 – навантаження зондами MTG та TMRM клітин міометрія: панель 1A демонструє флуоресценцію зонда MTG у «зеленому» діапазоні; панель 1B – флуоресценцію зонда TMRM у «червоному» діапазоні; панель 1C – сукупна флуоресценція зондів у «зеленому» та «червоному» діапазонах випромінювання. 2 – Панелі 2A, 2B та 2C демонструють флуоресценцію зондів після дії протонофору CCCP. 3 – Реєстрація відносного рівня інтенсивності флуоресценції зондів MTG та TMRM у «зеленому» та «червоному» діапазонах вздовж червоної лінії на панелях C і 3D – профіль відносної інтенсивності флуоресценції зондів в обох діапазонах випромінювання вздовж червоної лінії після дії протонофору CCCP

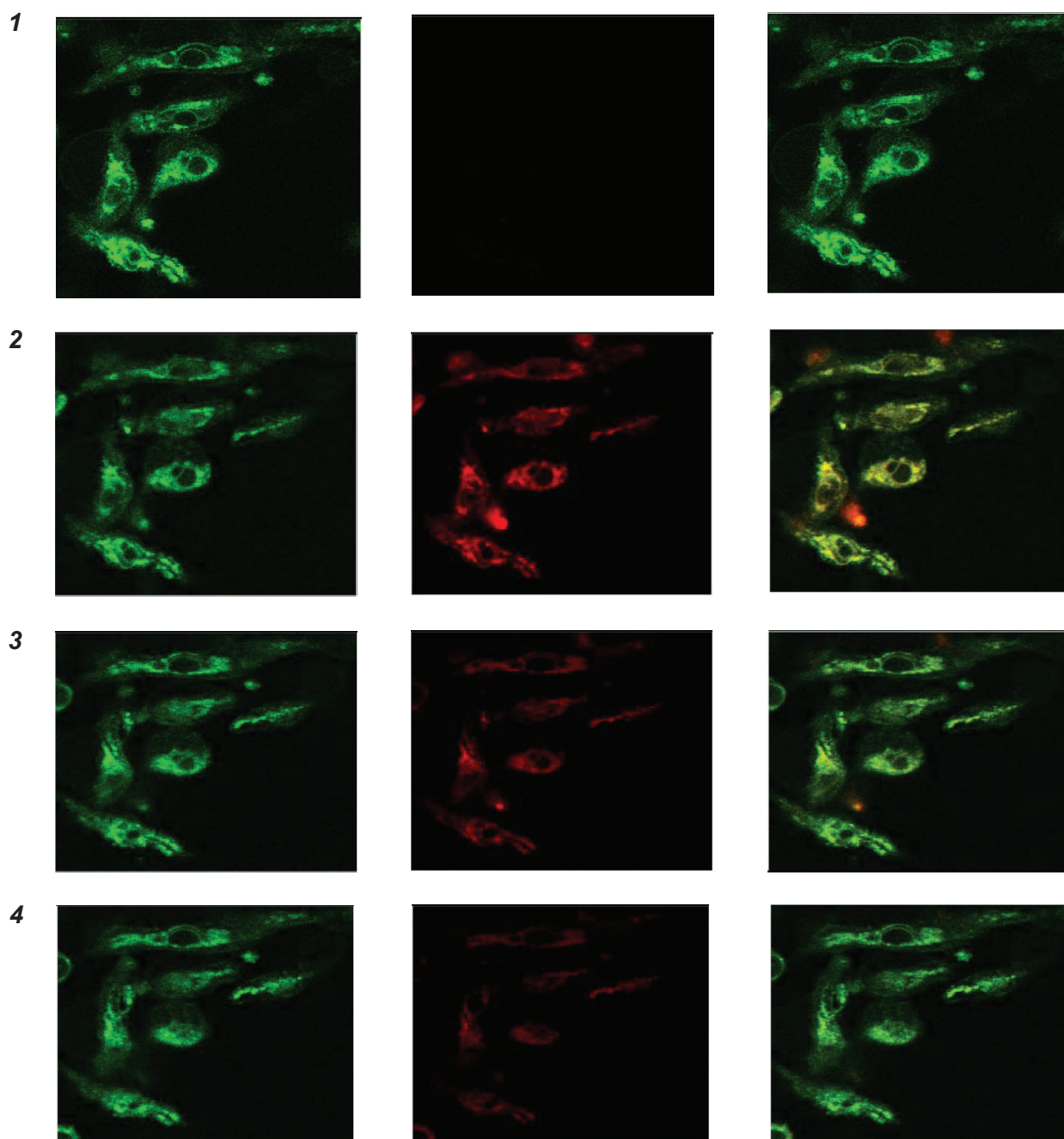
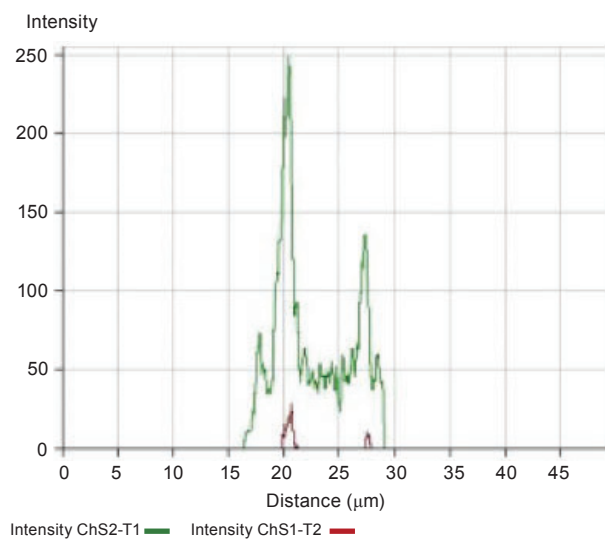
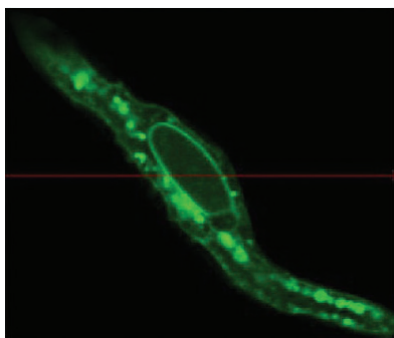


Рис. 6. Вплив азиду натрію (NaN_3 , 10 мМ) на мембранний потенціал мітохондрій клітин міометрія, що були попередньо навантажені зондами MTG та TMRM: 1 – флуоресценція зонда MTG; 2 – флуоресценція зондів MTG та TMRM; 3 і 4 – дія азиду натрію на мембранний потенціал мітохондрій клітин міометрія через 5 та 10 хв відповідно

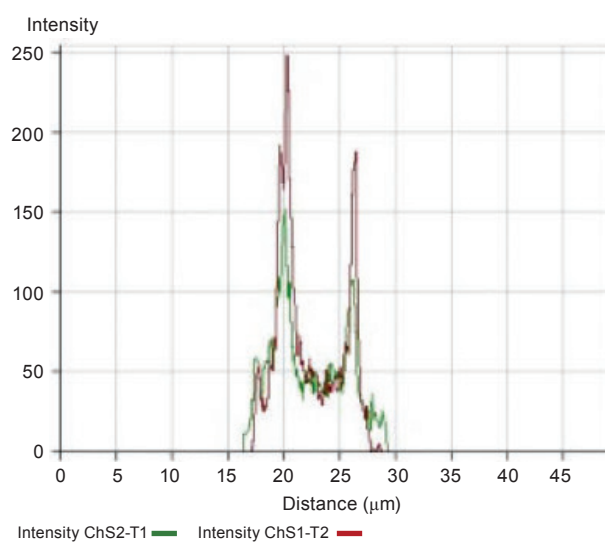
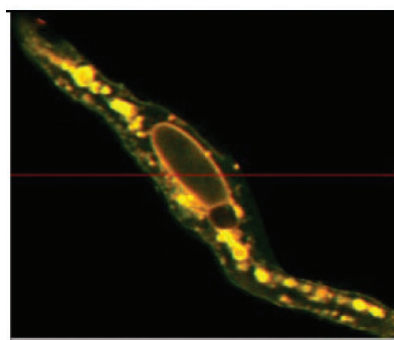
барвників у клітині, що збігається з розподілом мітохондріального матриксу в клітинах, тобто в навколоядерному та примембранному просторі клітин міометрія. Маємо також підтвердження стосовно колокалізації використаних нами барвників, оскільки в умовах рівної інтенсивності флуоресценції зондів усі точки гістограми лежать під кутом 45° (рис. 7.4). На рис. 7.3 пока-

зано вплив 10 мкМ кальмідазоліуму на мембранний потенціал мітохондрій міометрія. Інкубація клітин міометрія протягом 10 хв із 10 мкМ кальмідазоліумом веде до істотного зниження інтенсивності флуоресценції TMRM. На рис. 8 представлені результати щодо впливу 100 мкМ трифлуоперазину на поляризацію мембран мітохондрій міометрія. Інкубація клітин (10 хв)

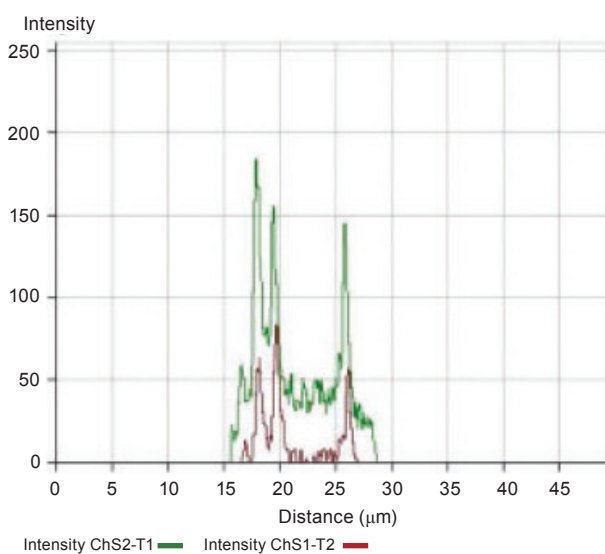
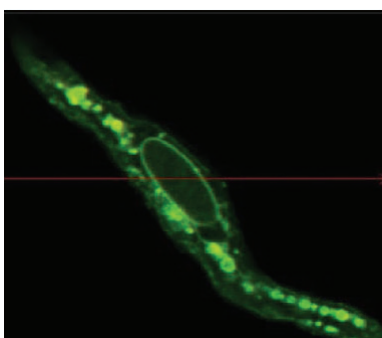
1



2



3



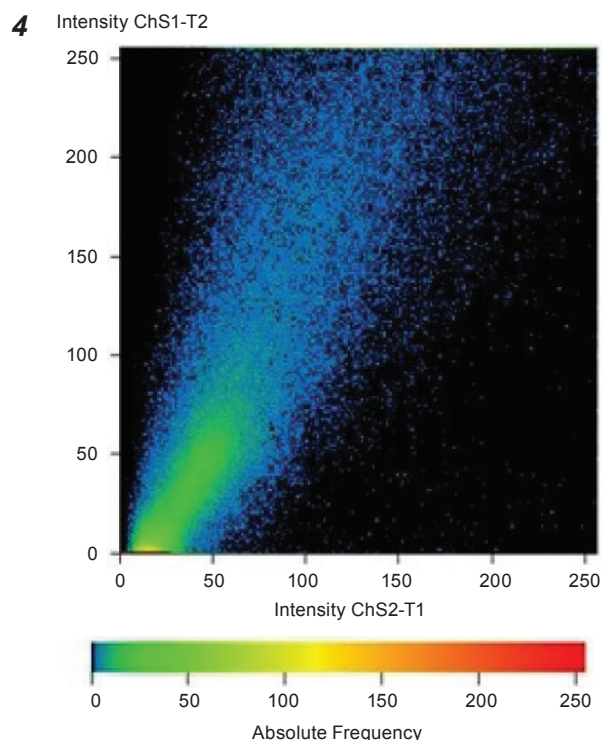


Рис. 7. Вплив кальмідазоліуму (10 мкМ) на мембранний потенціал мітохондрій клітин міометрія, що були попередньо навантажені зондами MTG та TMRM: 1 – флуоресценція зонда MTG (відносна інтенсивність флуоресценції зонда MTG вздовж червоної лінії); 2 – флуоресценція зондів MTG та TMRM (відносна інтенсивність флуоресценції зондів MTG та TMRM вздовж червоної лінії); 3 – вплив кальмідазоліуму на мембранний потенціал мітохондрій клітин міометрія через 10 хв (відносна інтенсивність флуоресценції зонда TMRM вздовж червоної лінії); 4 – колокалізація зондів MTG та TMRM у клітинах міометрія

з цим агентом веде до зниження інтенсивності флуоресценції зонда TMRM (рис. 8.3).

Відомо, що до складу внутрішньої мітохондріальної мембрани входять протеїни, які забезпечують перенесення метаболітів, нуклеотидів та кофакторів із цитозолу до матриксу та у зворотному напрямку. У літературі є дані щодо наявності ділянок гомологічних кальмодуліну у структурі Ca^{2+} -залежних мітохондріальних переносників, зокрема транспортерів АТР- Mg/P_i [21]. Отже, можна припустити, що зв'язування антагоністів CaM із цими ділянками призведе до гальмування активності зазначених транспортерів, що матиме опосередкований вплив на величину мембранного потенціалу мітохондрій.

Таким чином, із залученням двох експериментальних моделей – фракції мітохондрій та інтактних клітин міометрія, доведено, що, поперше, антагоністи кальмодуліну знижують з часом рівень поляризації мітохондріальної мембрани клітин міометрія, по-друге, використання методу проточної цитометрії, конфокальної мікроскопії, а також флуоресцентних зондів TMRM та MTG дає змогу надійно тестувати зміну поляризації мембрани мітохондрій гладенького м'яза матки.

Автори висловлюють подяку к.б.н. Кандауровій Н. В. за участь у проведенні окремих дослідів.

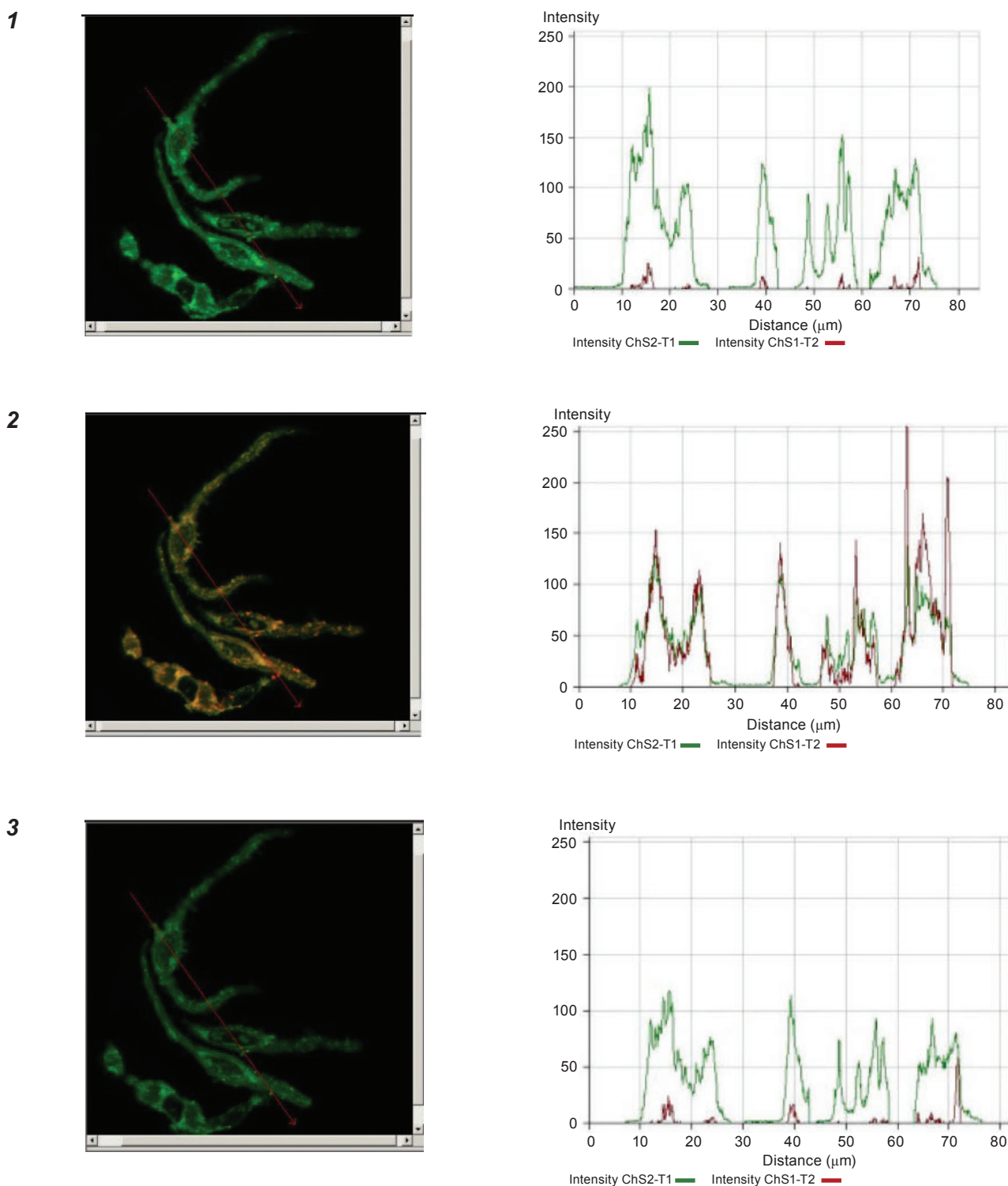


Рис. 8. Вплив трифлуоперазину (10 мкМ) на мембранний потенціал мітохондрій клітин міомерія, що були попередньо навантажені зондами MTG та TMRM: 1 – флуоресценція зонда MTG (відносна інтенсивність флуоресценції зонда MTG вздовж червоної лінії), 2 – флуоресценція зондів MTG та TMRM (відносна інтенсивність флуоресценції зондів MTG та TMRM вздовж червоної лінії), 3 – вплив трифлуоперазину на мембранний потенціал мітохондрій клітин міомерія через 10 хв (відносна інтенсивність флуоресценції зонда TMRM вздовж червоної лінії)

**МОДУЛЯЦІЯ МЕМБРАННОГО
ПОТЕНЦІАЛА МИТОХОНДРІЙ
МИОМЕТРИЯ АНТАГОНІСТАМИ
КАЛЬМОДУЛІНА**

*С. Г. Шлыков, Л. Г. Бабич,
М. Е. Евтушенко, С. А. Карахим,
С. А. Костерин*

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

Влияние антагонистов кальмодулина – кальмидазолиума и трифлуоперазина – на мембранный потенциал митохондрий исследовали с использованием метода проточной цитометрии, конфокальной микроскопии, применяя флуоресцентные зонды TMRM и MTG. Установлено, что антагонист кальмодулина кальмидазолиум в концентрациях от 1 до 10 мкМ дозозависимо снижает мембранный потенциал митохондрий. В то же время, трифлуоперазин в концентрации от 10 до 100 мкМ действует разнонаправленно – в концентрации 10 мкМ увеличивает поляризацию, тогда как в концентрации 100 мкМ вызывает практически полную деполяризацию митохондриальных мембран. Методом конфокальной микроскопии на клетках миометрия показано, что внесение в среду инкубации MTG приводит к появлению флуоресценции в «зеленом» диапазоне. Внесение второго зонда TMRM приводит к появлению флуоресценции в «красном» диапазоне. Деполяризация митохондрий протонофором CCCP и 10 мМ NaN₃ сопровождается снижением интенсивности «красной» флуоресценции, при этом «зеленая» флуоресценция сохраняется. Внесение в среду инкубации 10 мкМ кальмидазолиума или 100 мкМ трифлуоперазина через 10–15 мин инкубации приводит к практически полному гашению флуоресценции зонда TMRM. Таким образом, при использовании потенциалчувствительных флуоресцентных зондов TMRM и MTG продемонстрировано, что антагонисты кальмодулина модулируют мембранный потенциал митохондриальных клеток миометрия.

Ключевые слова: проточная цитометрия, конфокальная микроскопия, фракция митохондрий, клетки миометрия, мембранный потенциал митохондрий, кальмидазолиум, трифлуоперазин.

**MODULATION OF MYOMETRIUM
MITOCHONDRIAL MEMBRANE
POTENTIAL BY CALMODULIN
ANTAGONISTS**

*S. G. Shlykov, L. G. Babich,
M. E. Yevtushenko, S. O. Karakhim,
S. O. Kosterin*

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

Influence of calmodulin antagonists on mitochondrial membrane potential was investigated using a flow cytometry method, confocal microscopy and fluorescent potential-sensitive probes TMRM and MTG. Influence of different concentrations of calmodulin antagonists on mitochondrial membrane potential was studied using flow cytometry method and a fraction of myometrium mitochondria of un-pregnant rats. It was shown that 1-10 μM calmidazolium gradually reduced mitochondria membrane potential. At the same time 10-100 μM trifluoperazine influenced as follows: 10 μM – increased polarization, while 100 μM – caused almost complete depolarization of mitochondrial membranes. In experiments which were conducted with the use of confocal microscopy method and myometrium cells it was shown, that MTG addition to the incubation medium led to the appearance of fluorescence signal in a green range. Addition of the second probe (TMRM) resulted in the appearance of fluorescent signal in a red range. Mitochondrial membrane depolarization by 1 μM CCCP or 10 mM NaN₃ was accompanied by the decline of “red” fluorescence intensity, “green” fluorescence was kept. The 10-15 minute incubation of myometrium cells in the presence 10 μM calmidazolium or 100 μM trifluoperazine was accompanied by almost complete decrease of the TMRM fluorescent signal. Thus, with the use of potential-sensitive fluorescent probes TMRM and MTG it was shown, that calmodulin antagonists modulate mitochondrial membrane potential of myometrium cells.

Key words: flow cytometry, confocal fluorescence microscopy, isolated mitochondria, smooth muscles cells, mitochondrial membrane potential, calmidazolium, trifluoperazine.

1. *Duchen M. R.* // *Mol. Aspects Med.* – 2004. – **4**. – P. 365–451.
2. *Nicholls D. G.* // *Cell Calcium.* – 2005. – **38**, N 3–4. – P. 311–317.
3. *Костюк П. Г., Костюк О. П., Лук'янець О. О.* Іони кальцію у функції мозку – від фізіології до патології. – К.: Наук. думка, 2005. – 200 с.
4. *Wu X., Bers D. M.* // *Cell Calcium.* – 2007. – **41**, N 4. – P. 353–364.
5. *Means A. R., VanBerkum M. F., Bagchi I. et al.* // *Pharmacol. Ther.* – 1991. – **50**. – P. C.D. 5–270.
6. *Vogel H. J.* // *Biochem. Cell Biol.* – 1994. – **72**. – P. 357–376.
7. *James P., Vorherr T., Carafoli E.* // *Trends Biochem. Sci.* – 1995. – **20**. – P. 38–42.
8. *Maier L. S., Bers D. M.* // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 2002. – **34**. – P. 919–939.
9. *Moreau B., Nelson C., Parekh A. B.* // *Curr. Biol.* – 2006. – **16**, N 16. – P. 1672–1677.
10. *Medina J. M., Lopez-Mediavilla C., Orfao A.* // *FEBS Lett.* – 2002. – **510**, N 3. – P. 127–132.
11. *Mattiasson G.* // *Cytometry A.* – 2004. – **60**, N 2. – P. 145–154.
12. *Lecoeur H., Langonne A., Baux L. et al.* // *Exp. Cell. Res.* – 2004. – **294**, N 1. – P. 106–117.
13. *Бабіч Л. Г., Шликов С. Г., Наумова Н. В., Костерін С. О.* // *Укр. біохім. журн.* – 2008. – **80**, № 4. – С. 51–58.
14. *Костерін С. А., Браткова Н. Ф., Курский М. Д.* // *Биохимия.* – 1985. – **50**, № 8. – С. 1350–1361.
15. *Bradford M. M.* // *Anal. Biochem.* – 1976. – **72**. – P. 248–254.
16. *Бабіч Л. Г., Шликов С. Г., Наумова Н. В., Костерін С. О.* // *Укр. біохім. журн.* – 2007. – **79**, № 6. – С. 34–41
17. *Babich L. G., Shlykov S. G., Borisova L. A., Kosterin S. O.* // *Biokhimiia.* – 1994. – **59**. – P. 1218–1229.
18. *Штейн Г. И.* / СПб. : ИНИ РАН – 2007. – 77 с.
19. *Костерін С. А.* Транспорт кальция в гладких мышцах. – К.: Наук. думка, 1990. – 216 с.
20. *Gietzen K.* Pharmacological regulation of the activity of calmodulin. P. 405–423 /In: *Intracellular calcium regulation.* Ed. by H. Bader, K. Gietzen, J. Rosenthal, R. Rudel, H. U. Wolf/ Manchester University Press. – 1986. – 480 p.
21. *Satrústegui J., Pardo B., Del Arco A.* // *Physiol. Rev.* – 2007. – **87**, N 1. – P. 29–67.

Отримано 28.03.2013