УДК 577.352.5

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ НІТРОЗАКТИВНИХ СПОЛУК НА ПОЛЯРИЗАЦІЮ ВНУТРІШНЬОЇ МЕМБРАНИ МІТОХОНДРІЙ В МІОЦИТАХ МАТКИ ЩУРІВ ІЗ ВИКОРИСТАННЯМ ПОТЕНЦІАЛЧУТЛИВОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДА $DiOC_6(3)$

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

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

Досліджено вплив нітрозактивних сполук (нітропрусиду та нітриту натрію) на рівень поляризації внутрішньої мітохондріальної мембрани міоцитів матки із застосуванням методу лазерної конфокальної мікроскопії та потенціалчутливого флуоресцентного зонда $DiOC_6(3)$ (3,3'-дигексилоксакарбоціаніну). Продемонстрована колокалізація специфічних щодо мітохондрій флуоресцентних зондів (MitoTracker Orange CM-H_2TMRos, 10 – nonyl acridine orange та $DiOC_6(3)$). Показано, що нітропрусид натрію в концентрації 0,1 мМ спричинює помірне зниження трансмембранного потенціалу мітохондрій. Це спостереження підтверджується методом протокової цитофлуориметрії. Ефективність дії нітриту натрію в аналогічній концентрації істотно нижча за дії нітропрусиду натрію. Доведено, що нітропрусид натрію, але не нітрит, зумовлює незначне набухання мітохондрій. Обговорюється можлива протекторна роль оксиду азоту щодо мітохондрій.

Ключові слова: мітохондрії, оксид азоту, трансмембранний потенціал, міометрій, лазерна конфокальна мікроскопія.

Потенціал на внутрішній мітохондріальній мембрані є регулятором таких ключових мітохондріальних структур, як АТР-синтаза та пора перехідної провідності, а його величина – важливий показник ефективності функціонування електронно-транспортного ланцюга [1–7]. Рівень поляризації мембрани мітохондрій контролює функціонування локалізованих в них катіонтранспортувальних систем, зокрема тих, які впливають на концентрацію Ca^{2+} і K^+ в матриксі. Доведено першочергову роль мітохондріального потенціалу в процесах, пов'язаних з енергозалежним транспортом Ca^{2+} в мітохондрії, який здійснюється за електрофоретичним механізмом і вносить істотний вклад у підтримання гомеостазу Ca^{2+} в клітині [8–13]. У зв'язку із встановленням домінуючого значення оксиду азоту в механізмах релаксації гладеньких м'язів [14] вивчення закономірностей впливу нітрозактивних сполук (самого оксиду азоту або його редокс-форм) на рівень поляризації внутрішньої мембрани мітохондрій є важливим завданням біомембранології.

Окрім сигнальної та регуляторної функцій, оксид азоту або його похідні здатні захищати клітинні компартменти від оксидативного стресу. Відомо, що NO регулює експресію ензимів антипероксидного та антирадикального захисту, здатний безпосередньо обривати ланцюги вільнорадикального окислення ліпідів, взаємодіючи із ліпопероксидами [4, 15, 16]. Протекторна та цитотоксичні функції оксиду азоту безпосередньо залежать від його концентрації та мікрооточення, а також рівня прооксидантних процесів. Передбачають, що оксид азоту за низьких концентрацій спроможний захищати мітохондрії від оксидативного/нітрозативного стресів та відповідної дисфункції [1, 17, 18].

Можливими джерелами оксиду азоту в мітохондріях є ензиматичне утворення за рахунок активності мітохондріальної NO-синтази та пул NO, який продукується в цитозолі [17–19]. У разі з гладеньким м'язом матки біохімічні закономірності впливу NO на функціональну активність мітохондрій і, зокрема, потенціал їхньої внутрішньої мембрани, майже не вивчено.

У попередніх експериментах нами доведено можливість тестування поляризації плазматичної та внутрішньої мітохондріальної мембрани гладеньком'язових клітин матки щурів із використанням потенціалчутливого зонда 3,3′-дигексилоксакарбоціаніну ($DiOC_6(3)$) та методу протокової цитофлуориметрії [20]. Цю модель можна застосовувати для дослідження впливу біологічно активних низькомолекулярних сполук, що модулюють іонний транспорт у мембранах і можуть бути модифікаторами трансмембранного потенціалу мітохондрій. Для вивчення змін потенціалу внутрішньої мітохондріальної мембрани доцільно також використовувати метод лазерної конфокальної мікроскопії, який дозволяє візуалізувати розподіл потенціалчутливих флуоресцентних зондів у мітохондріях окремих інтактних міоцитів.

Отже, метою представленої роботи є вивчення можливого впливу нітрозактивних сполук, а саме їх донорів – нітропрусиду та нітриту натрію, на поляризацію мітохондріальної мембрани свіжовиділених міоцитів матки щурів із застосуванням вищезазначених методів.

Матеріали і методи

Міоцити виділяли з матки невагітних лабораторних щурів із застосуванням колагенази та соєвого інгібітору трипсину за методом Молларда [21]. Тварин наркотизували інгаляцією діетилового ефіру, після чого декапітували. Дотримувались усіх вимог щодо роботи з лабораторними тваринами (Міжнародна конвенція, Страсбург, 1986).

Процедуру іммобілізації клітин для конфокальних зйомок, відмивання неприкріплених міоцитів і всі експериментальні дослідження проводили в модифікованому фізіологічному середовищі Хенкса: 137 мМ NaCl, 5,36 мМ KCl, 0,44 мМ KH_2PO_4, 0,26 мМ $NaHCO_3$, 0,26 мМ Na_2HPO_4, 0,1% глюкоза, 10 мМ Hepes (pH 7,4), 0,03 мМ $CaCl_2$. Концентрації інших речовин зазначені в підписах до рисунків та в поясненнях у тексті.

Просторовий розподіл флуоресцентних барвників у клітині досліджували на лазерному скануючому конфокальному мікроскопі LSM 510 META (Carl Zeiss, Німеччина) із використанням іммобілізованих на полі-L-лізині міоцитів. Клітини (об'єм суспензії 100 мкл) іммобілізували 2 год на предметному склі, обробленому полі-L-лізином. Неприкріплені міоцити відмивали двічі, після чого іммобілізовані клітини обробляли відповідними барвниками і проводили подальші дослідження. Для візуалізації мітохондрій було залучено флуоресцентний барвник MitoTracker Orange CM-H_2TMRos у концентрації 200 нМ, 1 мкМ 10 – nonyl acridine orange (NAO) та 10 мкМ 9-аміноакридин (9-AA), а для візуалізації ядер клітин – 50 мкМ Hoechst 33342. Локалізацію $DiOC_6(3)$ в клітині спостерігали за раніше встановленої оптимальної концентрації 100 нМ (у разі вивчення зміни мембранного потенціалу) або 500 нМ (для дослідження колокалізації барвників) [20, 22]. Використовували уабаїн, азид натрію, нітропрусид та нітрит натрію в концентраціях та за процедурами, вказаними в підписах до рисунків та в поясненнях у тексті. Дослідження на конфокальному мікроскопі проводили в режимі Multi Track. Флуоресценцію Hoechst 33342 збуджували за допомогою лазера із $\lambda = 405$ нм, а для реєстрації сигналу використовували світлофільтр BP 420-480. Для збудження флуоресценції MitoTracker Orange CM-H_2TMRos використовували лазер із $\lambda = 543$ нм, а флуоресценцію реєстрували в діапазоні від 560 до 615 нм (світлофільтр BP 560-615); збудження флуоресценції $DiOC_6(3)$ та NAO здійснювали при $\lambda = 488$ нм, а її реєстрацію – в діапазоні від 505 до 530 нм (світлофільтр BP 505-530). Збудження флуоресценції 9-AA – 405 нм, а реєстрацію – від 420 до 480 нм. Вивчення кінетики розподілу флуоресцентних барвників у клітині проводили в режимі Time Series, а для кількісного аналізу застосовували функцію ROI (Region of Interest), яка дозволяє отримувати графік залежності інтенсивності флуоресценції від часу, усереднену для виділеної області.

Мембранний потенціал мітохондрій реєстрували також із використанням протокового цитофлуориметра Coulter Epics XL™ (Beckman Coulter, США) з аргоновим лазером, $\lambda_{зб} = 488$ нм, $\lambda_{фл} = 510$ нм (канал Fl1) за зміною інтенсивності флуоресценції $DiOC_6(3)$ в оптимальній концентрації 100 нМ [20, 22]. Під час дослідження впливу нітропрусиду і нітриту натрію на поляризацію мітохондріальної мембрани спочатку реєстрували інтенсивність флуоресценції $DiOC_6(3)$ на 3-й хв інкубації міоцитів із зондом (розподіл барвника в клітинах за цей час досягає стаціонарного рівня), далі

вносили 1 мМ уабаїн і інкубували клітини 5 хв для надійної деполяризації плазматичної мембрани, а потім вже додавали аліквоти розчинів нітрозактивних сполук.

Характеристичні розміри мітохондрій (гідродинамічний діаметр) оцінювали за допомогою лазерного кореляційного спектрометра ZetaSizer-3 (Malvern Instruments, Велика Британія) [23] з обчислювальним блоком-корелятором марки Computing correlator type 7032 та гелій-неоновим лазером ЛГ-111 із λ = 633 нм і потужністю 25 мВт. Реєстрацію автокореляційної функції розсіюваного від суспензії мітохондрій лазерного опромінення проводили протягом 1 хв, 10-разово, під кутом розсіювання 90°. Автокореляційну функцію обробляли за допомогою стандартної комп'ютерної програми PCS-Size mode v 1.61.

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

У роботі застосовували такі реактиви: Hepes, глюкоза, $CaCl_2$, колагеназа тип IA (Sigma, США), $DiOC_6(3)$, Hoechst 33342, соєвий інгібітор трипсину (Fluka, Швейцарія), MitoTracker Orange CM-H_2TMRos (Invitrogen, США). Інші реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації чда.

Результати та обговорення

Флуоресцентний зонд $DiOC_6(3)$ належить до класу карбоціанінових барвників і є ліпофільним катіоном, який потенціалзалежно накопичується всередині клітинних компартментів. Збільшення негативного потенціалу на мембранах призводить до посилення його акумуляції, що супроводжується зростанням інтенсивності флуоресценції. Згідно з даними літератури, переважне накопичення зонда відбувається в мітохондріях, потенціал внутрішньої мембрани яких сягає -180 мВ [20, 22, 24–28]. Іммобілізовані із застосуванням полі-L-лізину міоцити візуалізуються методом лазерної конфокальної мікроскопії у вигляді двох основних типів структур, заповнених гранулами $DiOC_6(3)$ (рис. 1).

Перший з них – це округлі або близькі до овальної форми об'єкти, які можна ідентифікувати як прикріплені, але не розпластані на поверхні субстрату міоцити. Згідно з термодинамічним принципом мінімуму енергії саме такий вигляд мають клітини в суспензії та ті, які прикріпилися до поверхні, але не розпласталися. Другий тип – це веретеноподібні об'єкти, морфологія яких подібна до розпластаних на субстраті міоцитів. Слід відмітити досить щільне заповнення міоцитів $DiOC_6(3)$, що відповідає уявленню про наявність у клітинах мітохондріального ретикулума, нерівномірне розташування гранул барвника, а також, у багатьох випадках, окреслення контурів клітини, що свідчить про взаємодію зонда із поляризованою плазматичною мембраною.

З метою доказу взаємодії $DiOC_6(3)$ саме із мітохондріями ми використали їх специфічний маркер – флуоресцентний зонд MitoTracker Orange CM-H_2TMRos, який потенціалзалежно накопичується мітохондріями і взаємодіє із протеїнами матриксу [29]. Як видно з рис. 2, розподіл флуоресцентних барвників MitoTracker

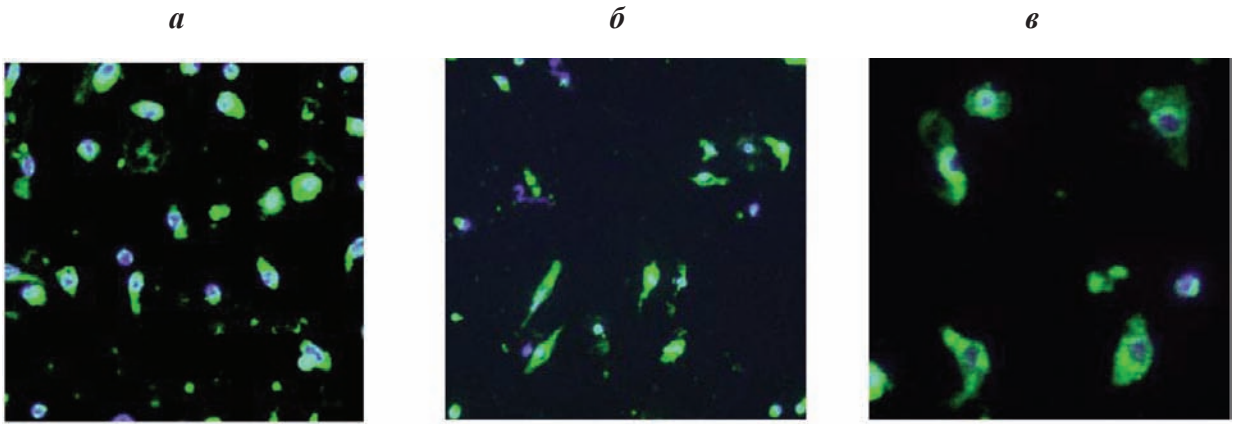

Рис. 1. Розподіл флуоресцентних барвників $DiOC_6(3)$ (зелений) та Hoechst 33342 (синій) в міоцитах матки. Представлено результати трьох незалежних зйомок (а–в)

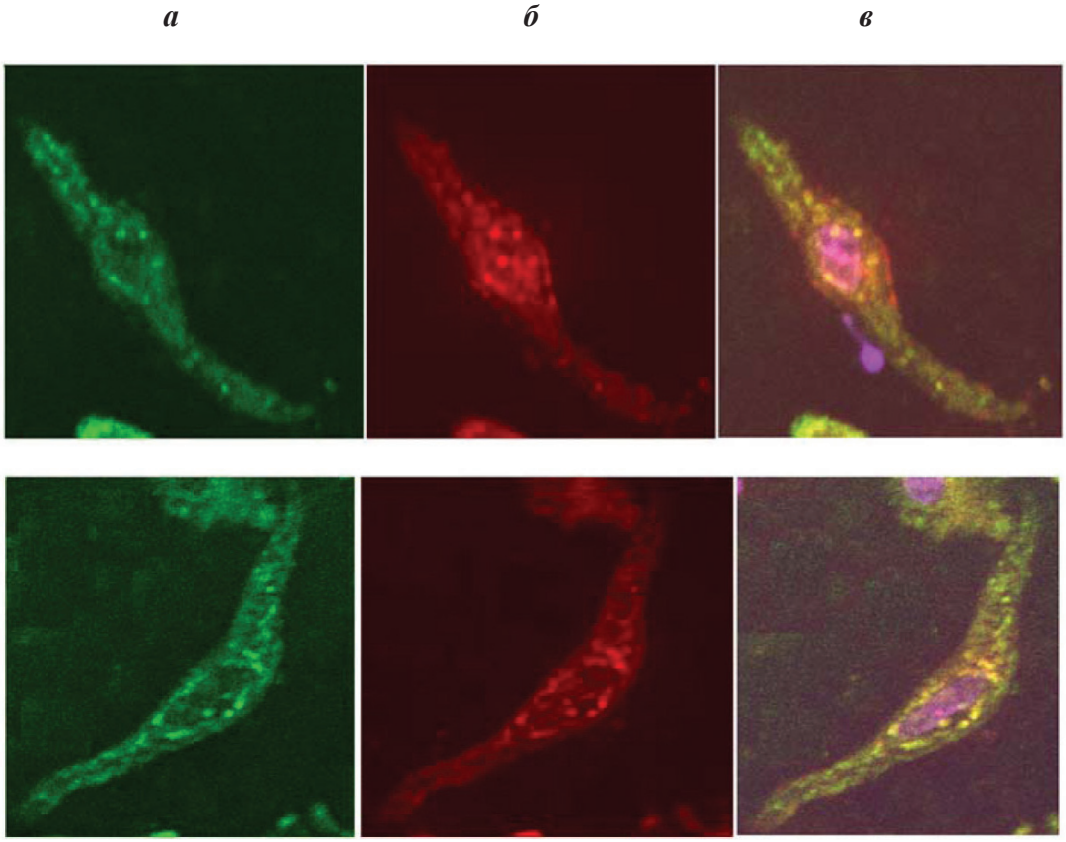

Рис. 2. Розподіл флуоресцентних зондів у міоциті матки: а – зелений – $DiOC_6(3)$, б – червоний – MitoTracker Orange CM-H_2TMRos, в – накладання обох зображень; фіолетовий – Hoechst 33342. Представлені результати двох окремих зйомок

Orange та $DiOC_6(3)$ має подібну присарколемну та навколоядерну локалізацію. У разі одночасного застосування двох барвників спостерігається їх колокалізація, що доводять результати по майже ідентичному профілю розподілу відповідних флуоресцентних зондів (рис. 3). Одержані дані дають підставу вважати, що накопичення $DiOC_6(3)$ в клітині, передусім, пов'язане із мітохондріями.

Подальшими дослідженнями доведено тотожну субклітинну локалізацію флуоресцентних зондів 9-АА та NAO і 9-АА із $DiOC_6(3)$ в міоцитах (рис. 4). Добре відомо, що NAO специфічно взаємодіє з кардіоліпіном, яким збагачена мітохондріальна мембрана [30], а 9-АА акумулюється в клітинних компартментах за наявності градієнта протонів на мембрані [31]. Отже, в досліджуваних міоцитах присутні енергізовані мітохондрії, які зв'язують $DiOC_6(3)$.

Задачею наступної серії досліджень було показати можливість використання лазерної конфокальної мікроскопії та зонда $DiOC_6(3)$ з метою вивчення можливого впливу низькомолекулярних водорозчинних ефекторів, зокрема нітрозактивних сполук (нітропрусиду та нітриту натрію), на поляризацію мітохондріальної мембрани в інтактних міоцитах матки. Для цього було використано речовини, які, як демонструється численними дослідженнями [1, 2, 8–10], зокрема із використанням зазначеного зонда за допомогою спектрофлуориметрії та протокової цитофлуориметрії на клітинах міометрія [20], здатні ефективно деполяризувати мітохондріальну та плазматичну мембрани. Серед них азид натрію – інгібітор IV комплексу електронтранспортного ланцюга мітохондрій та уабаїн – специфічний блокатор Na^+, K^+-АТРази сарколеми. За умови додавання до міоцита, попередньо навантаженого $DiOC_6(3)$, уабаїну (1 мМ) спостерігається лише незначне зниження інтенсивності флуоресценції $DiOC_6(3)$. Майже відсутні також зміни інтенсивності забарвлення ядра (рис. 5). На відміну від цього, дані щодо візуалізації обробленої 4 мМ азидом

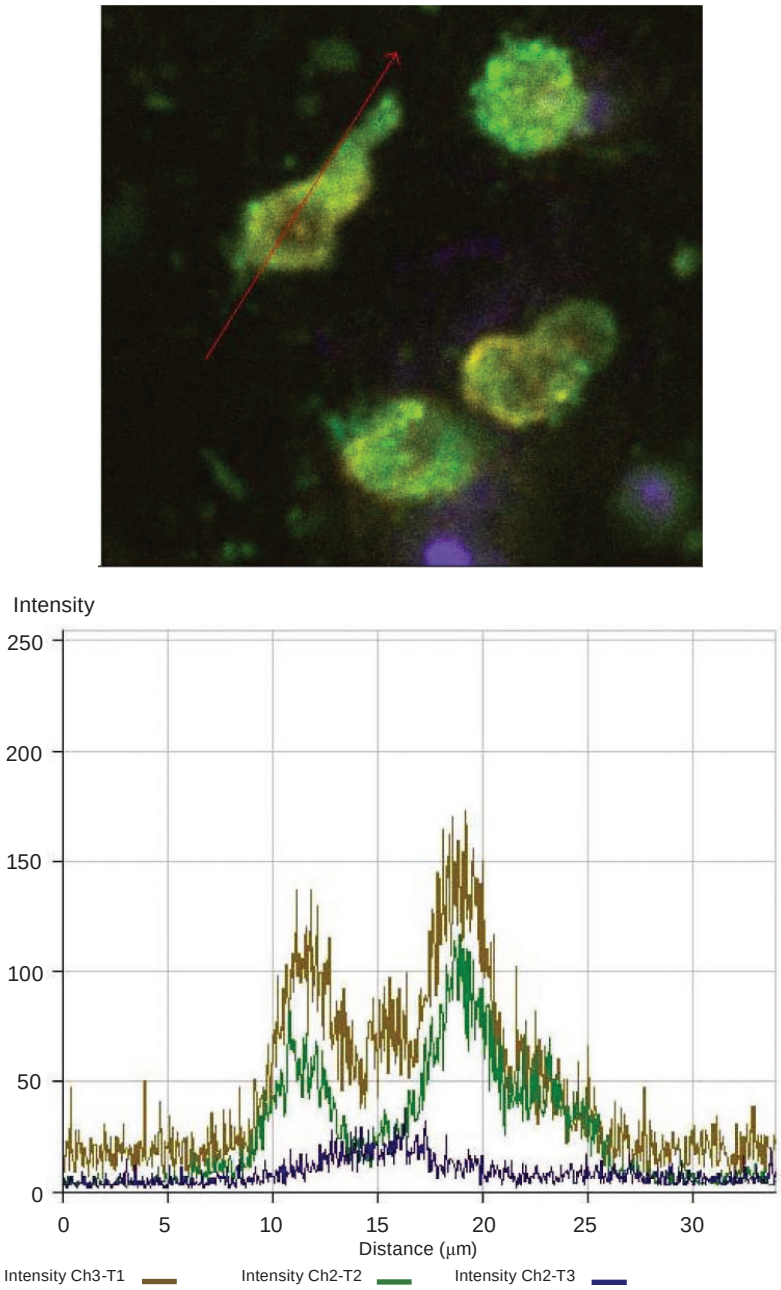

Рис. 3. Порівняння профілю розподілу флуоресцентних зондів, специфічних щодо мітохондрій (MitoTracker Orange CM-H_2TMRos, бура крива, канал 1), мембранного потенціалу (DiOC_6(3), зелена крива, канал 2) та ядра (Hoechst 33342, синя крива, канал 3) в іммобілізованому і розпластаному міоциті на модифікованій полі-L-лізином поверхні

натрію клітини (рис. 6) демонструють суттєве зниження інтенсивності флуоресценції барвника, яке можна пояснити деполяризуючим впливом на мітохондрії. В умовах експерименту інтенсивність забарвлення ядра майже не змінюється.

Застосований нами метод аналізу кінетики розподілу в клітині флуоресцентних барвників (рис. 7, дивись методичну частину) дозволив кількісно оцінити ступінь знебарвлення DiOC6(3) і провести відповідний статистичний аналіз. Зниження інтенсивності флуоресценції DiOC_6(3) за рахунок вигорання барвника за дії лазерного опромінення використаної довжини хвилі (10–20% максимальної потужності) в контролі сягає 17% протягом 5 хв (рис. 8). Ступінь

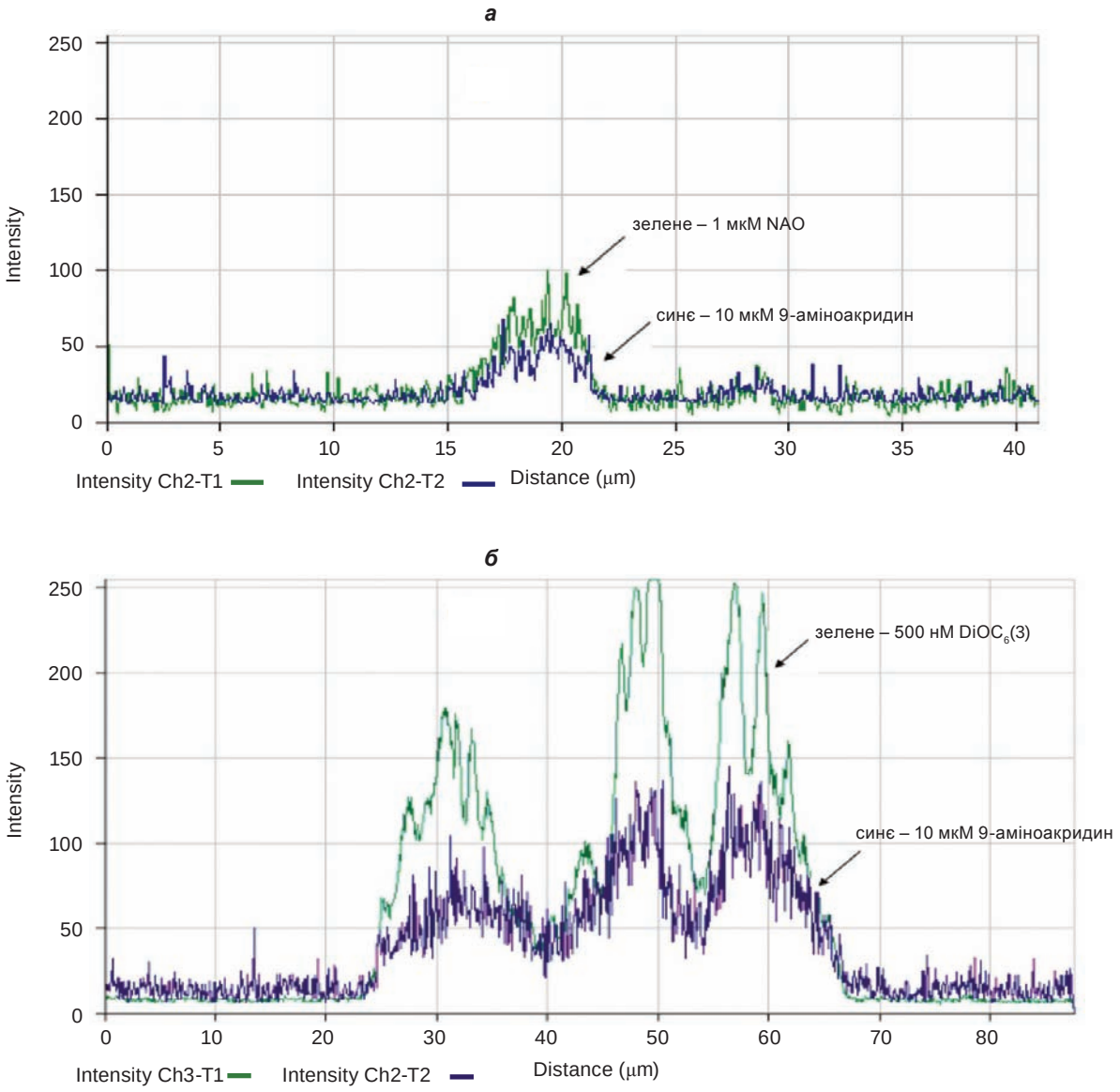

Рис. 4. Порівняння профілю розподілу флуоресцентних зондів, специфічних щодо мітохондріальної мембрани (NAO), мембранного потенціалу ($DiOC_6(3)$ та трансмембранного градієнта протонів (9-AA) у двох окремих міоцитах (а, б)

вигорання барвника є величиною змінною і залежить, передусім, від його концентрації, потужності і часу опромінення. За дії уабаїну ця величина не відрізняється від контрольних значень. Таким чином, використаний методичний підхід не дозволяє візуалізувати зміни поляризації сарколеми. Водночас азид натрію спричинює помітне зниження інтенсивності флуоресценції міоцитів, яке становить більше 40% (рис. 8). Очевидно, що залишковий рівень флуоресценції пов'язаний із неспецифічними процесами сорбції $DiOC_6(3)$ мембранними структурами. Отже, доведено можливість використання методу лазерної конфокальної мікроскопії для вивчення рівня поляризації внутрішньої мітохондріальної мембрани. Неможливість реєстрації змін трансмембранного потенціалу сарколеми, з нашої точки зору, пояснюється досить малою її поверхнею по відношенню до мембранної поверхні мітохондріального ретикулума, а також істотно меншим зарядом.

Подальшими дослідженнями встановлено, що 0,1 мМ нітропрусид натрію призводить до зниження флуоресценції $DiOC_6(3)$ за умови передінкубації міоцитів у фізіологічному середовищі з 1 мМ уабаїном із метою уне-

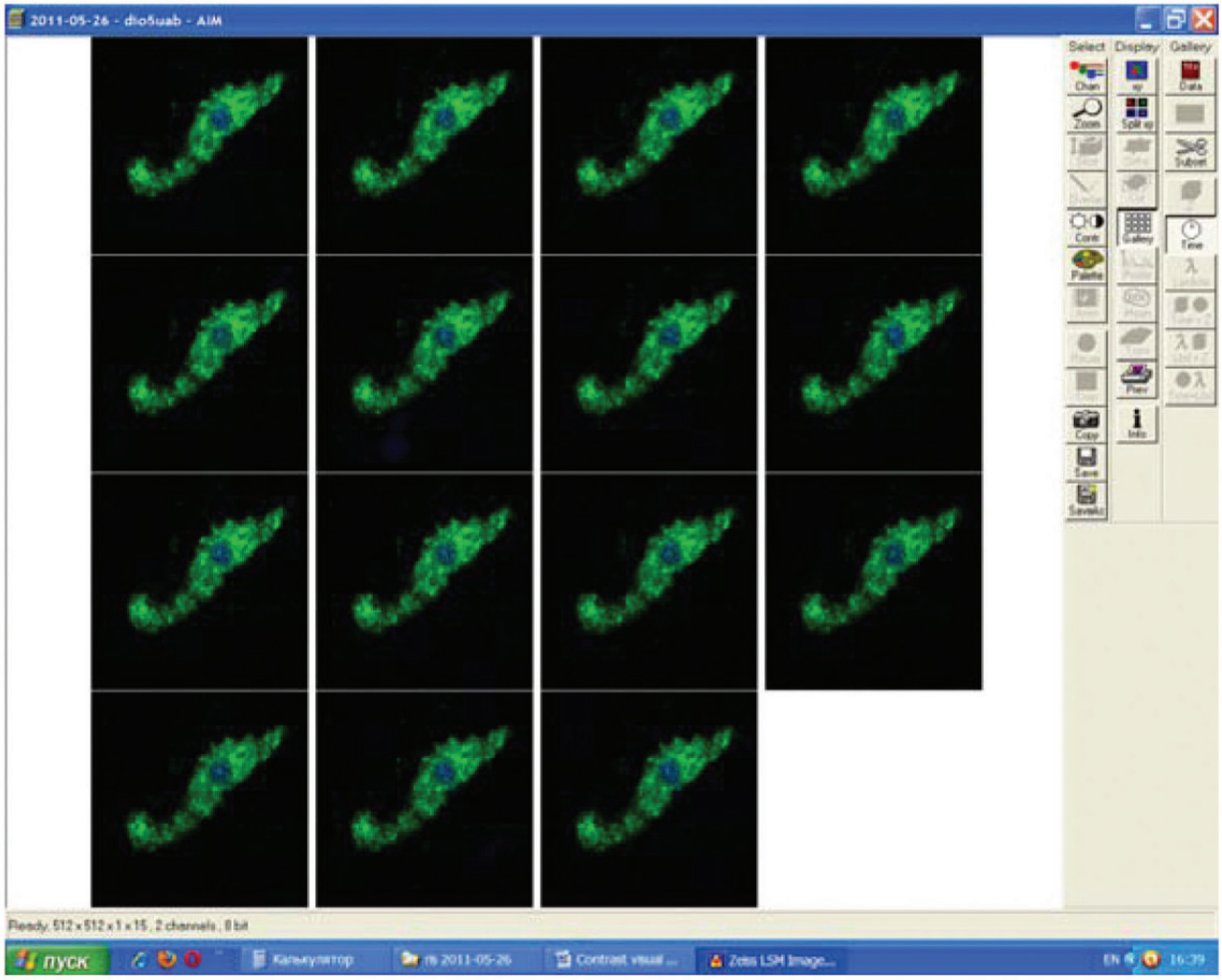

Рис. 5. Інтенсивність флуоресценції міоцита, попередньо навантаженого $DiOC_6(3)$, за внесення 1 мМ уабаїну. Результати типового досліду

можливлювання навіть незначного впливу потенціалу на плазматичній мембрані (рис. 9). У порівняльних дослідженнях нітрит натрію в аналогічній концентрації не чинив будь-якого ефекту на флуоресценцію (графічні дані не наведено). Отже, принаймні окремі похідні NO здатні знижувати поляризацію мітохондрій міометрія.

Одержаний результат підтверджено нами методом протокової цитофлуориметрії. Обидва застосовані підходи дають можливість аналізувати зміни флуоресценції поодиноких міоцитів. Водночас, у разі досліджень зі застосуванням конфокального мікроскопа для аналізу обирались клітини веретеноподібної форми, тобто розпластані по поверхні субстрату. Хоча це є запорукою того, що ми працювали із функціонально активними міоцитами, відповідь представників всієї клітинної популяції залишається невизначеною. З метою аналізу загального пулу досліджуваних об'єктів було застосовано метод протокової цитофлуориметрії. У порівнянні зі звичайною спектрофлуориметрією його перевагою є аналіз виключно міоцитів без урахування можливого внеску фізико-хімічних процесів у середовищі інкубації.

Встановлено, що як нітропрусид, так і нітрит натрію зменшують флуоресцентну відповідь забарвлених $DiOC_6(3)$ міоцитів (рис. 10). Ефект нітриту натрію є значно слабшим порівняно з нітропрусидом. Таким чином, застосування обох методів дало якісно схожі результати.

Внутрішня мітохондріальна мембрана, як і матриксні ензими, є ефективною мішенню

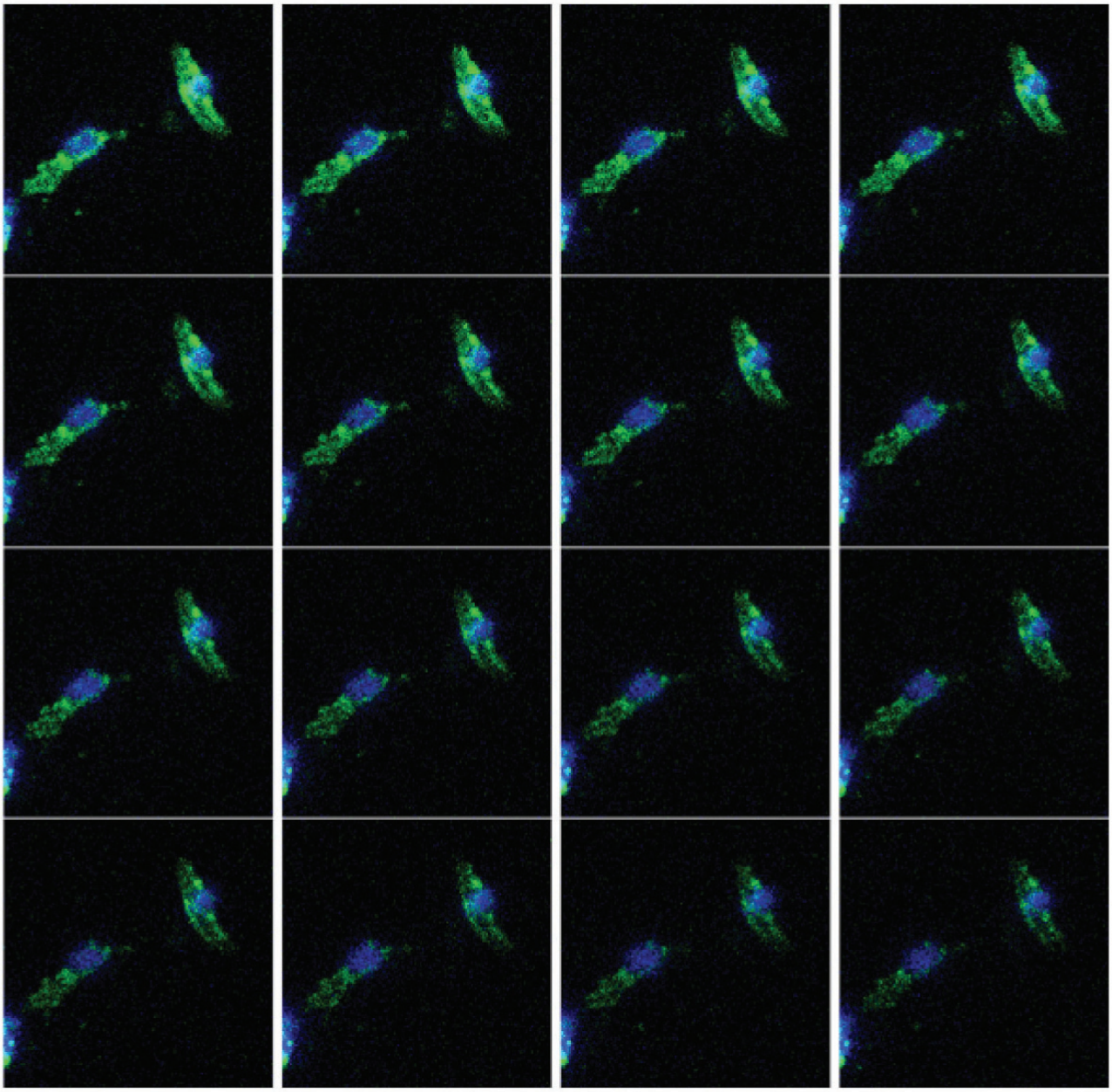

Рис. 6. Зменшення флуоресценції $DiOC_6(3)$ в двох міоцитах протягом 6 хв за додавання 4 мМ азиду натрію

дії нітрозактивних сполук через високий вміст у них залізо-сірчаних центрів та гемових груп. Зокрема, оксид азоту за фізіологічних концентрацій здатний зворотно пригнічувати активність цитохром *c*-оксидази, що призводить до зниження інтенсивності роботи електрон-транспортного ланцюга, окисного фосфорилування та споживання кисню мітохондріями. Оксид азоту або його похідні також взаємодіє і знижує ефективність роботи I комплексу дихального ланцюга [4, 5, 17–19]. Згідно із сучасними уявленнями зазначені процеси спроможні захищати мітохондрії від надлишкової продукції супероксид-аніона [1]. Таким чином, ми розглядаємо зареєстроване в наших експериментах помірне зниження потенціалу внутрішньої мембрани мітохондрій за дії нітрозактивних сполук як прояв протекторної дії оксиду азоту, який здатний захищати мітохондрії від дисфункції, спричиненої окисним стресом.

Останнє припущення підтверджується вивченням змін ефективних розмірів

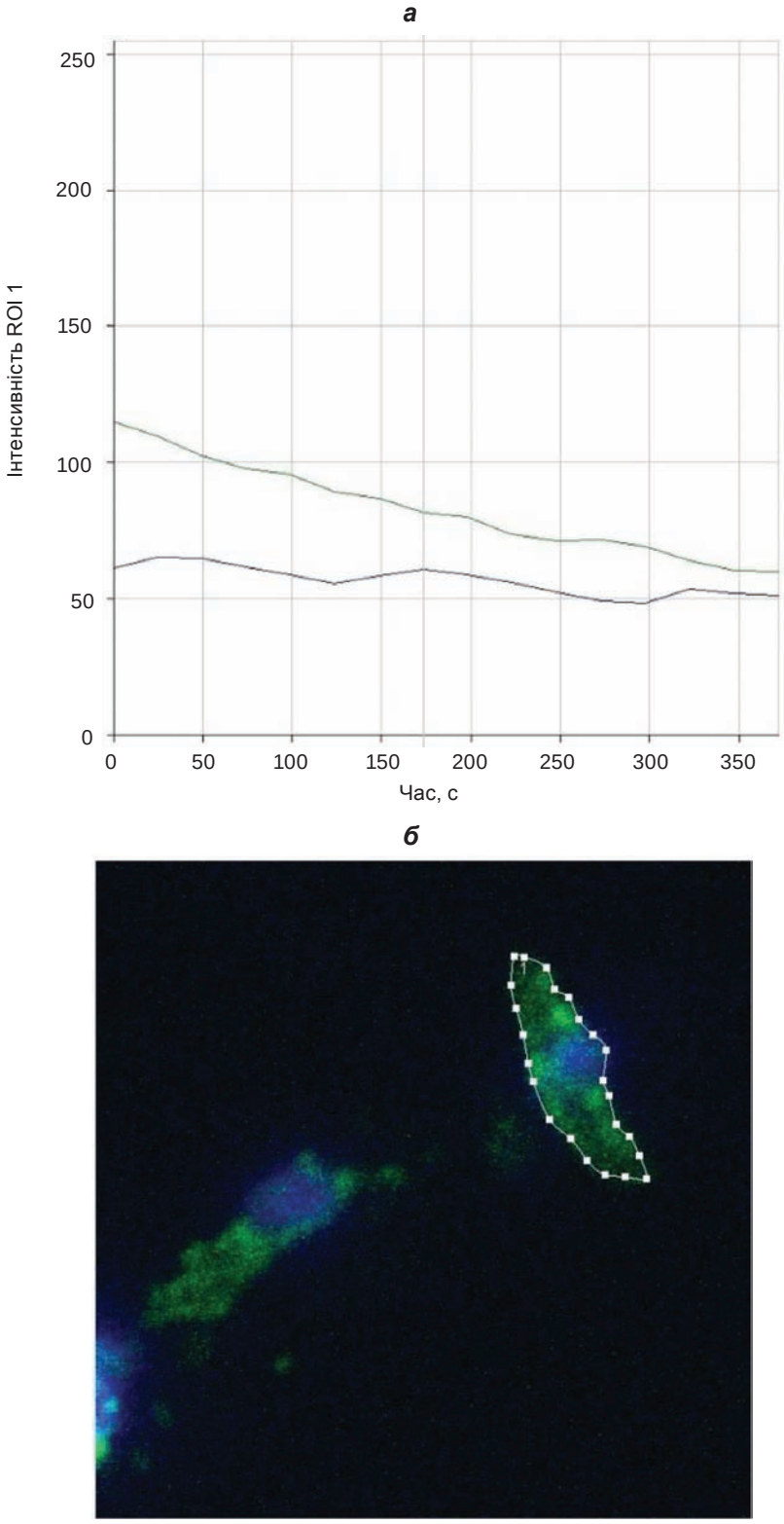

Рис. 7. Інтенсивність флуоресценції міоцита, попередньо навантаженого $DiOC_6(3)$, у разі внесення 4 мМ азиду натрію. Кількісна інтерпретація досліду, представленого на рис. 6: а – флуоресценція $DiOC_6(3)$ (зелена крива) після внесення азиду, синя крива – інтенсивність флуоресценції Hoechst 33342; б – результати одержані на основі оцінювання усередненої інтенсивності флуоресценції міоцита (ROI 1)

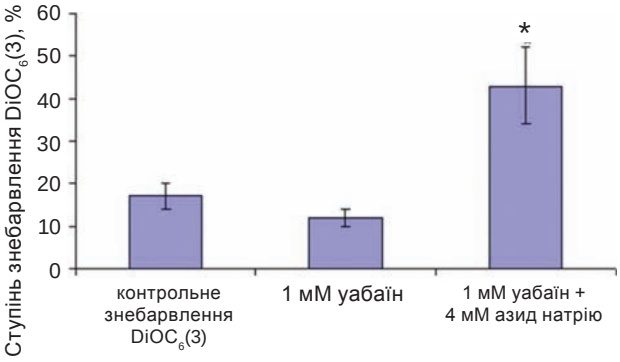

*Рис. 8. Зменшення інтенсивності флуоресценції $DiOC_6(3)$ за дії деполяризуючих мембранні структури агентів; M ± m, * P < 0,05*

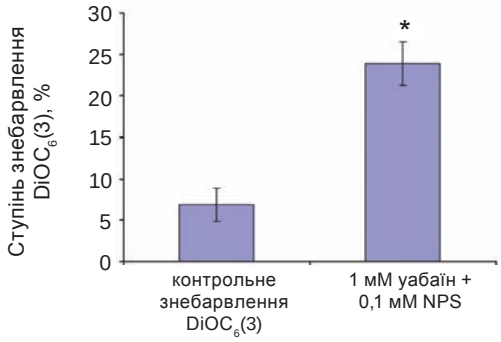

*Рис. 9. Зменшення інтенсивності флуоресценції $DiOC_6(3)$ за дії 0,1 мМ нітропрусиду натрію (NPS) у присутності уабаїну; M ± m, * P < 0,05*

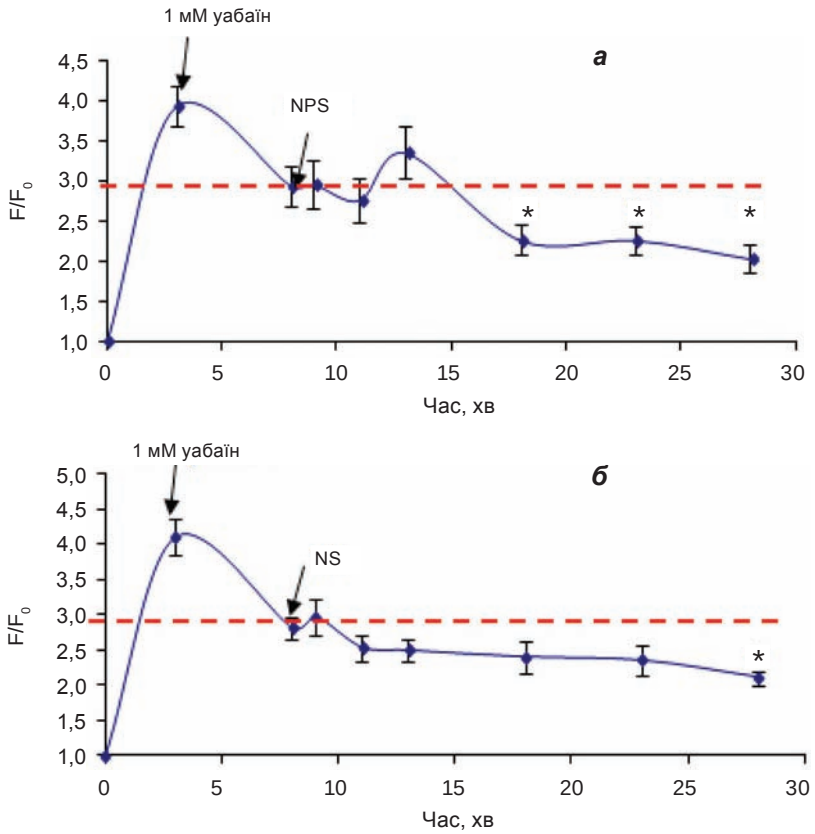

*Рис. 10. Вплив нітропрусиду натрію (NPS) – **а** та нітриту натрію (NS) – **б** в концентрації 0,1 мМ на поляризацію внутрішньої мембрани мітохондрій інтактних клітин міометрія (метод протокової цитофлуориметрії, зонд $DiOC_6(3)$, 100 нМ); M ± m, n = 5, * зміни вірогідні відносно контролю, P < 0,05*

мітохондрій під впливом досліджуваних сполук. Різке і незворотне падіння потенціалу на внутрішній мітохондріальній мембрані в умовах нітрозативного/оксидативного стресу (тривала деполяризація мітохондрій) є наслідком незворотного блокування активними формами азоту та кисню, передусім пероксинітритом та продуктами його розкладу, ключових компонентів електронно-транспортного ланцюга. Серед найважливіших подій, що супроводжують зазначений патологічний процес, є відкриття і зростання активності мітохондріальної пори перехідної провідності з подальшим вивільненням у цитозоль низки факторів запус-

ку апоптозу; драматичне зниження аеробного синтезу АТР поряд із незворотним інгібуванням гліколізу може призвести також і до некротичної загибелі клітини. Одним із наслідків посилення малоспецифічної проникності внутрішньої мембрани мітохондрій внаслідок описаних подій є порушення осмотичної рівноваги між матриксом та цитозолем, яке супроводжується транспортом води в мітохондрію й її набуханням. Останнє може призвести до пошкодження зовнішньої мембрани органел через розправлення крист і додатковим вивільненням у цитозоль проапоптичних факторів [1, 4, 5, 17–19, 32–33]. З огляду на вищезазначене досліджено вплив нітропрусиду та нітриту натрію на величину гідродинамічного діаметра мітохондрій у суспензії методом фотонної кореляційної спектроскопії. Найвірогідніший середній гідродинамічний діаметр мітохондрій становить 549 ± 20 нм, що відповідає їхнім ефективним розмірам [2, 33, 34]. За додавання антибіотика аламетицину (7,5 мкг/мл), який потенціалзалежно вбудовується у внутрішню мембрану органел, формуючи мегаканали, і спричинює їх набухання шляхом порушення осмотичної рівноваги [34, 35], гідродинамічний діаметр досліджуваного об'єкта істотно зростає (в середньому до 804 ± 35 нм, $n = 5$). Нітропрусид натрію в широкому діапазоні концентрацій (10^{-8}–10^{-4} М) спричинює лише незначне, хоча і статистично вірогідне, набухання мітохондрій, яке було нижчим, ніж у разі дії аламетицину

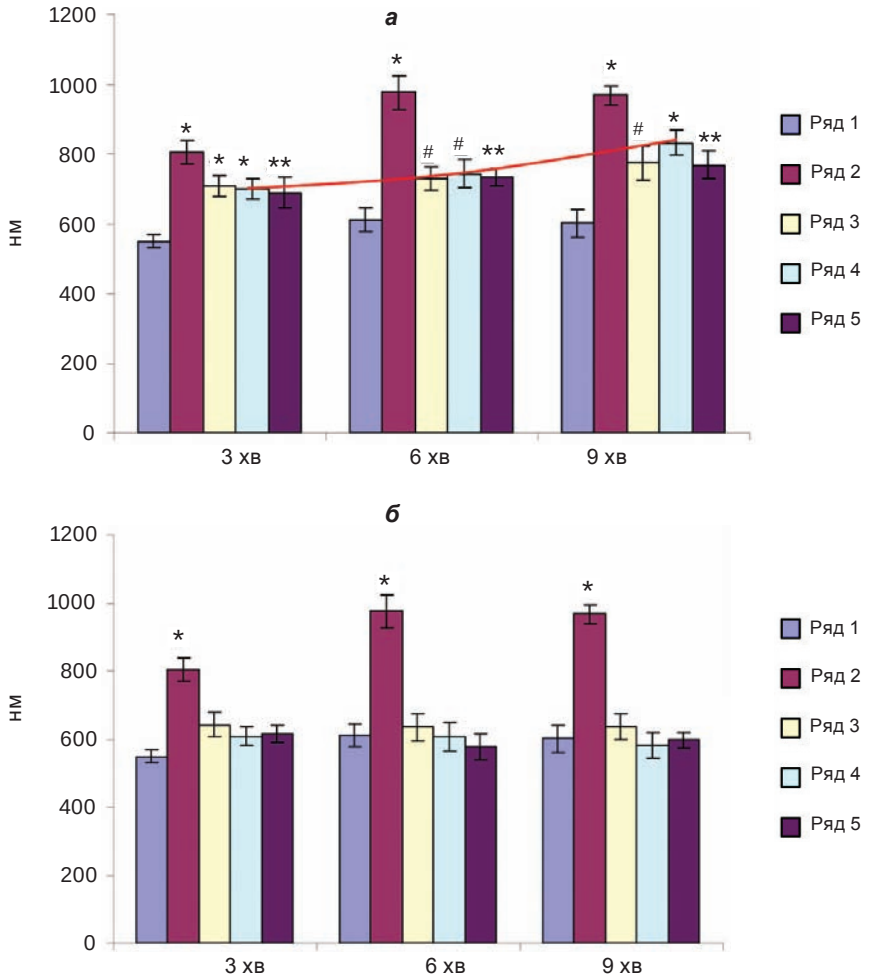

*Рис. 11. Вплив нітропрусиду (а) та нітриту натрію (б) на величину гідродинамічного діаметра мітохондрій. Аламетицин використовували як агент, який призводить до набухання інтактних мітохондрій: ряд 1 – контроль; ряд 2 – додавання до суспензії аламетицину; ряд 3, 4, 5 – експозиція мітохондрій до нітропрусиду або нітриту натрію в концентраціях 10^{-8}, 10^{-6}, 10^{-4} М відповідно; М ± m, зміни вірогідні відносно контролю, * $P < 0,01$, ** $P \leq 0,02$, # $P < 0,05$, $n = 5$*

(рис. 11, *а*). Концентраційна залежність ефекту не спостерігається, хоча виявлена тенденція до зростання гідродинамічного діаметра мітохондрій з часом. У разі дії нітриту натрію (рис. 11, *б*) змін характеристичних розмірів не зафіксовано.

Отже, інтенсивність впливу нітропрусиду та нітриту натрію на процес набухання мітохондрій корелює зі ступенем зменшення потенціалу внутрішньої мембрани за їх дії. Зареєстроване нами незначне зростання ефективних розмірів органел під впливом нітропрусиду натрію не є, з нашої точки зору, критичним для функціонування мітохондрій. Небезпечнішим є зворотний процес зменшення їхнього об'єму, який спостерігається в умовах ішемії і супроводжується порушенням функціонування ADP/ATP – антипортеру [36].

Таким чином, нами продемонстровано, що оксид азоту або його похідні помірно зменшують трансмембранний мітохондріальний потенціал, що підтверджується даними протокової цитофлуориметрії. Вперше доведена можливість застосування методу лазерної конфокальної мікроскопії та флуоресцентного потенціалчутливого зонда $DiOC_6(3)$ для візуалізації змін потенціалу внутрішньої мембрани мітохондрій міоцитів матки. Зменшення потенціалу внутрішньої мембрани мітохондрій за дії оксиду азоту може відображати процес зворотного пригнічення функціонування електронно-транспортного ланцюга, яке може захищати від надмірної генерації активних форм кисню. Отже, ми припускаємо, що оксид азоту здатний виконувати протекторну функцію щодо мітохондрій міометрія.

Робота виконувалась за підтримки програми наукових досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій» (№ держреєстрації 0110U005971).

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ НИТРОЗАКТИВНИХ СОЕДИНЕНИЙ НА ПОЛЯРИЗАЦИЮ ВНУТРЕННЕЙ МЕМБРАНЫ МИТОХОНДРИЙ В МИОЦИТАХ МАТКИ КРЫС С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОТЕНЦИАЛЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДА $DiOC_6(3)$

Ю. В. Данилович, А. В. Данилович, О. В. Коломиец, С. А. Костерин, С. А. Карахим, А. Ю. Чунихин

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

Исследовано влияние нитрозактивных соединений (нитропруссида и нитрита натрия) на уровень поляризации внутренней митохондриальной мембраны миоцитов матки с использованием метода лазерной конфокальной микроскопии и потенциалчувствительного флуоресцентного зонда $DiOC_6(3)$ (3,3′-дигексилоксакарбоцианина). Продемонстрирована колокализация специфических для мембран митохондрий флуоресцентных зондов (MitoTracker Orange CM-H_2TMRos, 10 – nonyl acridine orange и $DiOC_6(3)$). Показано, что нитропруссид натрия в концентрации 0,1 мМ вызывает умеренное снижение трансмембранного потенциала митохондрий. Это наблюдение подтверждается методом проточной цитофлуориметрии. Эффективность действия нитрита натрия в аналогичной концентрации существенно ниже, чем нитропруссида натрия. Показано, что нитропруссид натрия, но не нитрит, вызывает незначительное набухание митохондрий. Обсуждается возможная протекторная роль оксида азота по отношению к митохондриям.

Ключевые слова: митохондрии, оксид азота, трансмембранный потенциал, миометрий, лазерная конфокальная микроскопия.

INVESTIGATION OF NITROSACTIVE COMPOUNDS INFLUENCE ON POLARIZATION OF THE MITOCHONDRIAL INNER MEMBRANE IN THE RAT UTERUS MYOCYTES USING POTENTIAL SENSITIVE FLUORESCENT PROBE $DiOC_6(3)$

Yu. V. Danylovych, H. V. Danylovych, O. V. Kolomiets, S. O. Kosterin, S. A. Karakhim, A. Yu. Chunikhin

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

The effect of nitrosactive compounds (sodium nitroprusside and sodium nitrite) on the polarization level of the uterus myocytes inner mitochondrial membrane using the confocal laser microscopy and fluorescent probe potentialsensitive $DiOC_6(3)$ (3,3′-dihexyloxacarbocyanine) was ivestigated. Colocalisation of mitochondrial membranes specific fluorescent probes (MitoTracker Orange CM-H_2TMRos, 10 – nonyl acridine orange and $DiOC_6(3)$) was demonstrated. It was shown that sodium nitroprusside at 0.1 mM concentration caused a moderate decrease in mitochondrial transmembrane potential. That observation was confirmed by flow cytometry. Action efficiency of sodium nitrite in a similar concentration was significantly lower than that of sodium nitroprusside. It is shown that it was sodium nitroprusside which caused a slight swelling of the mitochondria. A possible protecting role of nitric oxide as to mitochondria was discussed.

Key words: mitochondria, nitric oxide, transmembrane potential, myometrium, laser confocal microscopy.

1. *Костюк П. Г., Костюк О. П., Лук'янець О. О.* Внутрішньоклітинна кальцієва сигналізація: структура і функції. – К.: Наук. думка, 2010. – 175 с.
2. *Кандаурова Н. В.* Ca^{2+}-індуковані зміни мембранного потенціалу мітохондрій міометрія щурів: автореф. дис. … канд. біол. наук. – 2011. – 20 с.
3. *Наумова Н. В., Бабіч Л. Г., Шликов С. Г.* // Укр. біохім. журн. – 2009. – **81**, № 4. – С. 28–31.
4. *Бурлака А. П., Сидорик Є. П.* Радикальні форми кисню та оксиду азоту при пухлинному процесі. – К.: Наук. думка, 2006. – 227 с.
5. *Duchen M. R.* // Diabetes. – 2004. – **53**, suppl. 1. – P. S96–S102.
6. *Feissner R. F., Skalska J., Gaum W. E. et al.* // Front Biosci. – 2009. – **14**. – P. 1197–1218.
7. *Graier W. G., Frieden M., Malli R.* // Pflugers. Arch. – Eur. J. Physiol. – 2007. – **455**. – P. 376–396.
8. *Костерин С. А., Бурдыга Ф. В.* // Усп. совр. биол. – 1993. – **113**, вып. 4. – С. 485–505.
9. *Шинлова О. П., Костерин С. А., Веклич Т. А.* // Биохимия. – 1996. – **61**, вып. 8. – С. 1440–1447.
10. *Бабіч Л. Г., Шликов С. Г., Наумова Н. В., Костерін С. О.* // Укр. біохім. журн. – 2008. – **80**, № 4. – С. 51–58.
11. *Feissner R. F., Skalska J., Gaum W. E. et al.* // Front Biosci. – 2009. – **14**. – P. 1197–1218.
12. *Malli R., Graier W. F.* // FEBS Lett. – 2010. – **584**. – P. 1942–1947.
13. *Santo-Domingo J., Demaurex N.* // Biochim. Biophys. Acta. – 2010. – **1797**. – P. 907–912.
14. *Bryan N. S., Bian K., Murad F.* // Front. Biosc. – 2009. – **14**. – P. 1–18.
15. *Серая И. П., Нарциссов Я. Р.* // Усп. совр. биол. – 2002. – **122**, № 3. – С. 249–258.
16. *Турпаев К. Т.* // Биохимия. – 2002. – **67**, вып. 3. – С. 339–352.
17. *Guilivi C., Kato K., Cooper C. E.* // Am. J. Physiol. Cell Physiol. – 2006. – **291**. – P. C. 1225–1231.
18. *Davidson S. M., Duchen R. M.* // Cardiovasc. Res. – 2006. – **71**. – P. 10–21.
19. *Ghafourifar P., Cadenas E.* // Trends Pharmac. Scie. – 2005. – **26**, N 4. – P. 190–195.
20. *Данилович Г. В., Данилович Ю. В., Горчев В. Ф.* // Укр. біохім. журн. – 2011. – **83**, № 3. – С. 99–105.
21. *Mollard P., Mironneau J., Amedee T. et al.* //Am. J. Physiol: Cell Physiology. –1986. – **250**, N 1. – P. C47–C54.
22. *Данилович Г. В., Данилович Ю. В., Коломієць О. В. та ін.* // Укр. біохім. журн. – 2012. – **84**, № 6. – С. 37–48.
23. *Данилович Ю. В., Чуніхін О. Ю., Данилович Г. В.* // Актуальные вопросы биологической физики и химии. Материалы VII Междунар. научно-технич. конф. Севастополь. – 2011. – С. 46–47.

24. *Rottenberg H., Wu S.* // Biochem. Biophys. Acta. – 1998. – **1404**. – P. 393–404.
25. *Salvioli S., Ardizzoni A., Franceschi C. et al.* // FEBS Letters. –1997. – **411**. – P. 77–82.
26. *Marchetti C., Jouy N., Leroy-Martin B. et al.* // Hum. Reprod. – 2004. – **12**, N 10. – P. 2267–2276.
27. *Kalbocova M., Vrbacky M., Drahota Z. et al.* // Cytometry. – 2003. – **52A**, Part A. – P. 110–116.
28. *Brewis I. A., Morton J. E., Mohammad S. N. et al.* // J. Andrology. – 2000. – **21**, N 2. – P. 238–249.
29. *Bukman J. F., Hernandes H., Kress G. J. et al.* // J. Neuros. Meth. – 2001. – **104**. – P. 165–176.
30. *Fernandez M. I. G., Ceccarelli D., Muscatello U.* // Anal. Biochem. – 2004. – **328**. – P. 174–180.
31. *Evron Y., McCarty R. E.* // Plant Physiol. – 2000. – **124**. – P. 407–414.
32. *Акопова О. В., Сагач В. Ф.* // Укр. біохім. журн. – 2005. – **77**, № 2. – С. 82–87.
33. *Кандаурова Н. В., Чуніхін О. Ю., Бабіч Л. Г. та ін.* // Укр. біохім. журн. – 2010. – **82**, № 6. – С. 52–57.
34. *Пономаренко О. В., Бабіч Л. Г., Горчев В. Ф., Костерін С. О.* // Укр. біохім. журн. – 2006. – **78**, № 6. – С. 38–45.
35. *Геннис Р.* Биомембраны: Молекулярная структура и функции: Пер. с англ. – М.: Мир, 1997. – 624 с.
36. *Kaasik A., Safiulina D., Zharkovsky A., Veksler V.* // Am. J. Physiol. Cell Physiol. – 2007. – **292**. – P. C. 157–163.

Отримано 19.04.2013