

МЕТОДИ

УДК 577.352.5

ПОРІВНЯЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ МЕТОДАМИ СПЕКТРОФЛУОРИМЕТРІЇ ТА ПРОТОВОЇ ЦИТОМЕТРІЇ ПОЛЯРИЗАЦІЇ ПЛАЗМАТИЧНОЇ І ВНУТРІШНЬОЇ МІТОХОНДРІАЛЬНОЇ МЕМБРАН ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВИХ КЛІТИН ІЗ ВИКОРИСТАННЯМ ПОТЕНЦІАЛЧУТЛИВОГО ЗОНДА DiOC₆(3)

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

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

Продемонстрована можливість застосування методів протокової цитометрії та спектрофлуориметрії для дослідження рівня поляризації як внутрішньої мітохондріальної, так і плазматичної мембран у суспензії міоцитів матки за допомогою потенціалчутливого зонда 3,3'-дигексилосакарбоціаніну [DiOC₆(3)]. Це дало підстави в подальшому використовувати його з метою вивчення впливу фізіологічно активних сполук на трансмембранні потенціали компартментів інтактних клітин.

Ключові слова: трансмембранний потенціал, потенціалчутливі зонди, протокова цитометрія, міоцити.

Потенціал на плазматичній та внутрішній мітохондріальній мембранах (ПМ) і (МХМ) відповідно впливає на катіон-транспортні системи відповідних компартментів клітини, зокрема регулюючи концентрацію Ca²⁺ в цитоплазмі [1]. Результати сучасних досліджень свідчать про важливу роль мітохондрій в механізмах клітинної сигналізації й шляхах, що ведуть до клітинної смерті. Потенціал на МХМ є чутливим індикатором енергетичного статусу мітохондрій і клітини в цілому, що може бути використано для оцінки стану електрон-транспортної системи МХМ, протонної помпи та пори перехідної провідності [2]. З огляду на це, дослідження змін потенціалу ПМ і МХМ під впливом фізіологічно активних речовин є важливим завданням біомембранології. Результати досліджень останніх років вказують на функціональний взаємозв'язок ПМ і мітохондрій [1].

Гладеньком'язові клітини є відносно малими за розмірами, що ускладнює використання мікроелектродної (мікрomanipуляційної) техніки з метою тестування трансмембранного потенціалу ПМ. Ця техніка майже непридатна для оцінки потенціалу на МХМ в інтактних міоцитах. Окрім того, використан-

ня мікроелектродів пошкоджує клітинні мембрани [3]. Тому вкрай необхідним є розробка відповідних методик із застосуванням флуоресцентних зондів. Вони дозволяють проводити дослідження на інтактних клітинах із збереженням цілісності клітинних компартментів. Зокрема, потенціалчутливі флуоресцентні барвники ціанінового ряду широко використовуються з метою досліджень трансмембранних потенціалів як на ПМ, так і на МХМ різних об'єктів. Водночас майже відсутня інформація щодо їхнього застосування щодо клітин гладеньких м'язів [4–9].

З урахуванням важливості гладенького м'яза матки у забезпеченні жіночої репродуктивної функції, а також актуальності пошуку сучасних і доступних прийомів реєстрації змін мембранного потенціалу в цих клітинах як об'єкт дослідження ми обрали суспензію інтактних міоцитів матки шурів.

Матеріали і методи

Суспензію клітин виділяли з матки лабораторних шурів із застосуванням колагенази та соєвого інгібітора трипсину за модифікованим методом Моларда [10].

Мембранний потенціал реєстрували за зміною інтенсивності флуоресценції потенціал-

чутливого зонда 3,3'-дигексилоксакарбоціаніну ($\text{DiOC}_6(3)$). Зміни флуоресценції $\text{DiOC}_6(3)$ вивчали за допомогою спектрофлуориметра Signe-4M (Латвія), $\lambda_{\text{зб}} = 485$ нм, $\lambda_{\text{фл}} = 505$ нм та протокового цитометра Coulter Epics XLTM (Beckman Coulter, США) з аргонним лазером, $\lambda_{\text{зб}} = 488$ нм, $\lambda_{\text{фл}} = 510$ нм (канал F11). У представленій серії експериментів виміри 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 . Дослідження щодо розподілу $\text{DiOC}_6(3)$ у клітині проводили із використанням лазерної конфокальної мікроскопії (Beckman Coulter, США). Концентрації флуоресцентних барвників (мкМ): 0,5 $\text{DiOC}_6(3)$, 20 Hoechst 33342. Концентрації інших речовин наведено в підписах до рисунків.

Зонд $\text{DiOC}_6(3)$ є ліпофільним катіоном, який потенціалзалежно накопичується всередині обмеженого мембранного простору (ліпосоми, мітохондрії, клітини) [4–9]. Існування потенціалу на клітинних мембранах приводить до його акумуляції, що супроводжується зростанням інтенсивності флуоресценції. При цьому зонд, в першу чергу, перерозподіляється між ПМ і МХМ в залежності від концентрації, співвідношення зонд/клітини, а також функціонального стану самих клітин. Згідно з даними літератури переважно накопичення відбувається в мітохондріях (потенціал ~ 180 мВ), що локалізовані поблизу ПМ. Зменшення інтенсивності флуоресценції зонда у клітинній суспензії може свідчити на користь зниження поляризації мембран, у той

час як її зростання – про збільшення величини (за модулем) трансмембранного потенціалу ПМ і/або МХМ [7–9].

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

У роботі застосовували наступні реактиви: HEPES (Sigma, США), трис-гідроксиметиламінометан (Reanal, Угорщина), EGTA, 3,3'-дигексилоксакарбоціанін, Hoechst 33342 (Fluka, Швейцарія). Інші реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації чда та хч.

Результати та обговорення

На початку досліджень ми підбрали умови реєстрації флуоресцентної відповіді зонда у клітинній суспензії із застосуванням речовин, які деполаризують МХМ (1 мМ азид натрію – інгібітор електрон-транспортного ланцюга мітохондрій, 10 мкМ протонатор СССР) та ПМ (1 мМ убаїн – специфічний інгібітор Na^+ , K^+ -АТФ-ази). Контрольні експерименти показали, що автофлуоресценція клітинної суспензії (F_0) не змінюється протягом часу проведення вимірювань, також не виявлено змін інтенсивності автофлуоресценції під дією досліджуваних речовин. Було досліджено широкий діапазон концентрації $\text{DiOC}_6(3)$ – 10 нМ – 5 мкМ. Кінетика спалаху флуоресценції за взаємодії зонда (10 – 500 нМ) із клітинами характеризується насиченням, яке досягається приблизно на 3-й хв інкубації згідно з результатами, одержаними з використанням спектрофлуориметра та протокового цитометра (рис. 1, а, рис. 2). Показано, що

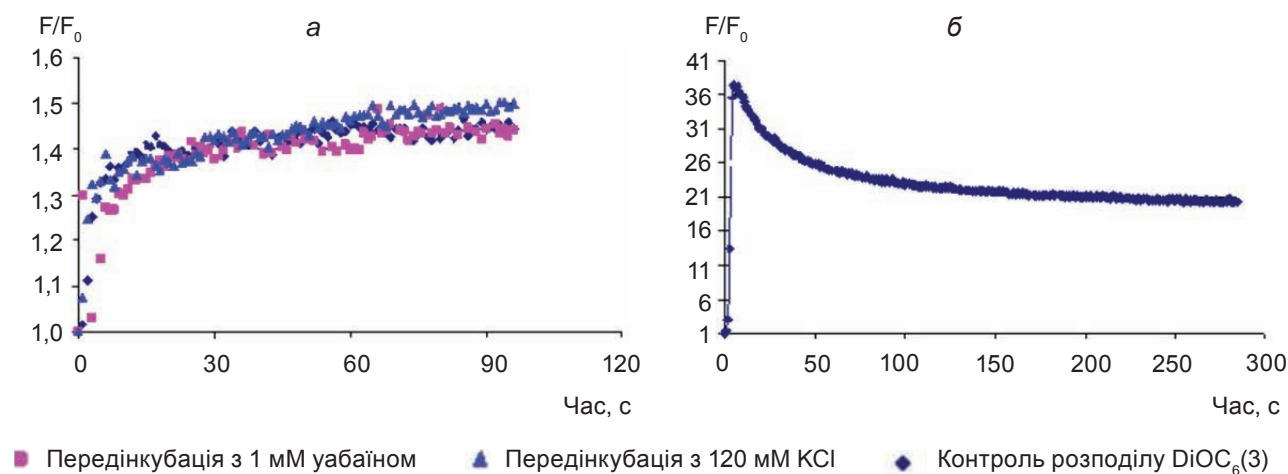


Рис. 1. Флуоресцентна відповідь 10 нМ (а) та 5 мкМ (б) $\text{DiOC}_6(3)$ в суспензії міоцитів матки. F – флуоресцентна відповідь $\text{DiOC}_6(3)$ за взаємодії із клітинами, F_0 – автофлуоресценція клітин. Передінкубація клітин із речовинами становила 5 хв. Дані типового експерименту

при концентрації зонда 10 нМ передінкубація міоцитів (5 хв) з агентами, які деполяризують ПМ (1 мМ убаїн та 120 мМ КСІ), не призводить до змін інтенсивності флуоресценції, отже відповідь зонда на потенціал ПМ відсутня (рис. 1, а). Водночас, за концентрації $\text{DiOC}_6(3)$ 1–5 мкМ спостерігається гасіння зонда (рис. 1, б). З літератури відомо, що димеризація ціанінових барвників, яка посилюється із зростанням їхньої концентрації, призводить до зниження флуоресценції [3], що може пояснити результати, представлені на рис. 1, б. Таким чином, відносно низькі та високі концентрації зонда виявляються неефективними для роботи на суспензії міоцитів.

В інтактних клітинах акумуляція ліпофільних катіонів із середовища в мітохондрії залежить не тільки від їхнього потенціалу, який визначає розподіл зонда між цитозолем і мітохондріальним матриксом, але також від величини потенціалу ПМ, який, у свою чергу, обумовлює його розподіл між цитозолем і позаклітинним середовищем. Отже, як потенціал ПМ, так і потенціал МХМ визначають величину флуоресценції за заданої концентрації зонда. Таким чином, створюючи в умовах експерименту оптимальне співвідношення зонд/клітини ми можемо вив-

чати внесок обох потенціалів (і ПМ, і МХМ) [4], а також уникнути гасіння флуоресценції зонда, пов'язаної з його агрегацією. У разі використання $\text{DiOC}_6(3)$ як індикатора потенціала на МХМ слід узяти до уваги той факт, що, подібно до інших ліпофільних карбоціанінів, він може виступати інгібітором NADH-дегідрогенази в ізольованих мітохондріях, тобто його ефект є ротеноноподібним [11]. У роботах інших авторів на різних клітинних об'єктах використовуються концентрації зонда від 10 до 50 нМ [5–8] з метою тестування потенціалу на ПМ і/або МХМ. Також $\text{DiOC}_6(3)$ використовується для фарбування мембран ендоплазматичного ретикулула в концентраціях 5–50 мкМ (1–10 мкг/мл) [12–14]. В даних роботах зазначено, що низькими концентраціями, які тестують саме МХМ, є 500 нМ (0,1 мкг/мл), а за високих концентрацій (5–50 мкМ) мітохондрії набрякають, втрачають потенціал і нормальну морфологію. З іншого боку, є дані, що ціанінові барвники можуть деполяризувати ПМ [3, 15]. Стосовно електрозбудливих клітин (і, зокрема, міомерія) відповідні відомості відсутні.

Було встановлено, що оптимальними умовами реєстрації флуоресцентної відповіді в суспензії міоцитів щурів є концентрація $\text{DiOC}_6(3)$ 50–100 нМ за кількості клітин 0,3–

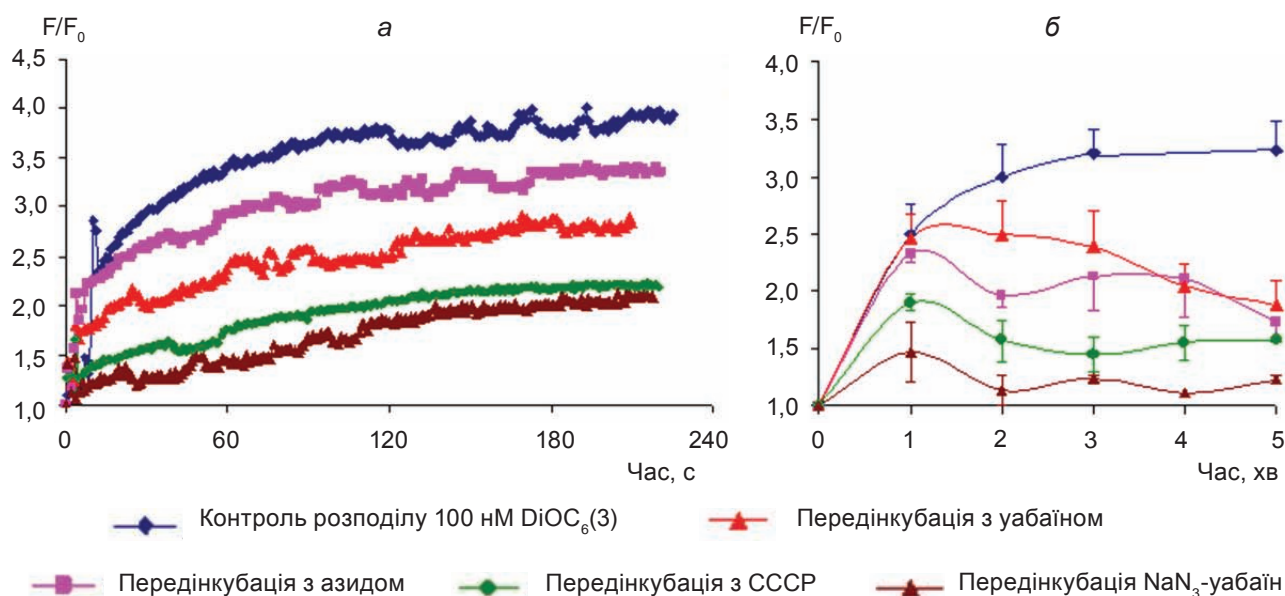


Рис. 2. Флуоресцентна відповідь 100 нМ $\text{DiOC}_6(3)$ в суспензії міоцитів матки у присутності агентів, що деполяризують плазматичну мембрану та мітохондрії. а – результати, одержані з використанням спектрофлуориметра (дані типового експерименту), б – результати одержані з використанням потокового цитометра ($M \pm m$, $n = 5$). F – флуоресцентна відповідь $\text{DiOC}_6(3)$ за взаємодії із клітинами, F_0 – автофлуоресценція клітин. Концентрації діючих речовин: 1 мМ убаїн, 10 мкМ СССР, 1 мМ NaN_3 . Передінкубація клітин із речовинами становила 5 хв

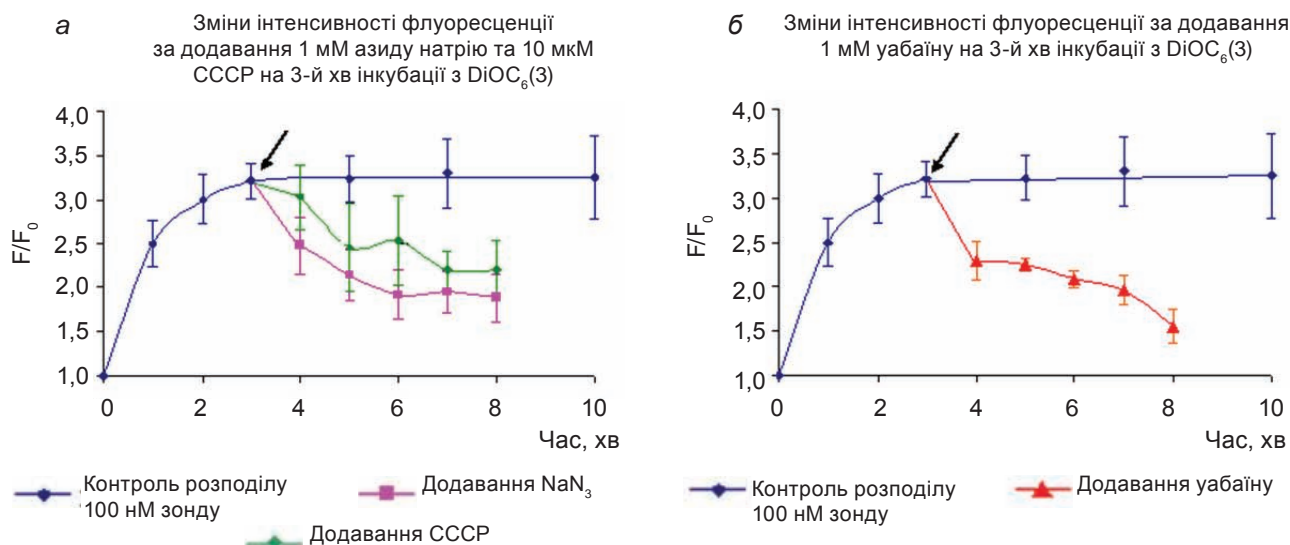


Рис. 3. Застосування методу протокової цитометрії з метою дослідження змін інтенсивності флуоресценції $DiOC_6(3)$ в суспензії міоцитів матки у разі транзитного додавання агентів, що деполаризують мембрану мітохондрій (а) та плазматичну мембрану (б). Стрілкою зазначено момент додавання аликвоти розчину досліджуваної речовини. F_0 – автофлуоресценція клітин. $M \pm t$, $n = 5$

0,5 млн у пробі. Насичення за величиною флуоресцентної відповіді спостерігається після 3-ї хв взаємодії зонда з клітинами (рис. 2).

Зниження рівня інтенсивності флуоресценції на 40% (рис. 2, а, 3-тя хв реєстрації флуоресцентної відповіді) у присутності 1 мМ убаїну свідчить на користь можливості тестування потенціалу на ПМ. Зниження рівня інтенсивності флуоресценції у присутності 10 мкМ CCCP (на 60%) та 1 мМ NaN_3 (на 20%) доводить можливість реєстрації потенціалу також на МХМ. Сумарний вплив 1 мМ убаїну і 1 мМ NaN_3 сягає 60%, що є сумою окремих ефектів вищезазначених речовин. Інтенсивність флуоресценції зонда за відсутності потенціалу на ПМ та МХМ (в умовах передінкубації з убаїном, CCCP або NaN_3) нижча, ніж у суспензії нативних клітин, причому змінюється також кінетика флуоресцентної відповіді зонда.

Одержані результати із використанням методу спектрофлуориметрії підтверджуються паралельно проведеними експериментами на протоковому цитометрі (рис. 2, б). Принципова різниця обох підходів полягає в тому, що в першому випадку реєструється інтегральна флуоресцентна відповідь клітинної суспензії, тоді як протоковий цитометр реєструє і аналізує флуоресцентний сигнал індивідуальних клітин. Результатом наших досліджень у випадку протокової цитометрії є одержання кривої «кількість подій–інтенсивність флуоресценції», положення максимуму якої

відповідає інтенсивності флуоресцентної відповіді більшості клітин їхньої загальної популяції. Цим методом продемонстровано зростання інтенсивності флуоресценції за взаємодії зонда із клітинами, причому, як і в попередніх дослідах, флуоресцентна відповідь досягає максимуму після 3 хв, у подальшому протягом принаймні 10 хв її інтенсивність майже не змінюється (іноді спостерігається тенденція до зниження в межах 10%). Відмічаються чітко виражені убаїн- та NaN_3 /CCCP-залежні компоненти сигналу. Причому сумарний ефект зниження флуоресценції у присутності азиду натрію та убаїну сягає 90%.

Протонофор CCCP та NaN_3 зменшують флуоресцентну відповідь клітин також і за додавання на 3-й хв акумуляції $DiOC_6(3)$ (рис. 3, а). Через 5 хв їхньої дії флуоресцентна відповідь зменшується у 2 рази. Аналогічний за напрямом ефект спостерігається і за додавання убаїну, причому через 5 хв інтенсивність флуоресценції знижується більше ніж у 2 рази (рис. 3, б). У разі використання спектрофлуориметра лише протонофор CCCP спричиняє гасіння флуоресцентного сигналу.

Є поодинокі дані, що $DiOC_6(3)$ непридатний для вимірювання потенціалу МХМ в умовах протокової цитометрії [5]. У наведеній роботі було показано, що цей флуоресцентний барвник виявляє неадекватну поведінку у зв'язку із його чутливістю до мембранного потенціалу (ПМ). Саме тому в наших дослідженнях було використано агенти, які

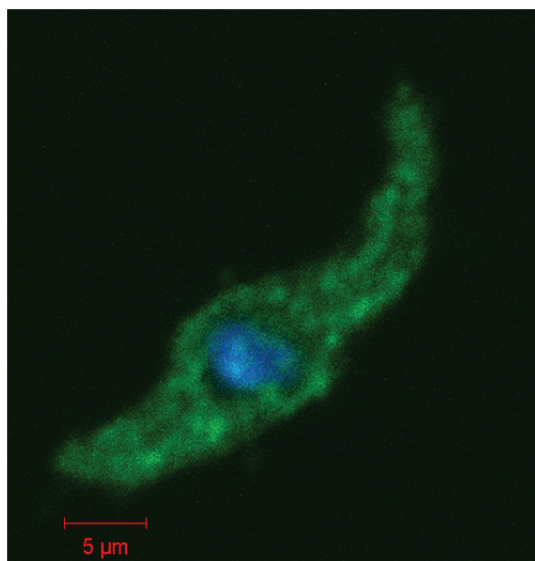


Рис. 4. Розподіл флуоресцентних барвників $DiOC_6(3)$ (зелене) та $Hoechst\ 33342$ (специфічного щодо ядра, синє) в міоциті матки. Об'єktiv із 63-разовим збільшенням

деполяризують ПМ (уабайн) з метою коректного тестування потенціалу на МХМ, а також сполуки, які деполаризують МХМ (азид натрію та СССР) з метою коректного тестування потенціалу на ПМ.

Було проведено також дослідження щодо розподілу $DiOC_6(3)$ в міоцитах матки з використанням лазерної конфокальної мікроскопії.

З рис. 4 видно, що $DiOC_6(3)$ достатньо рівномірно розподіляється у клітинному об'ємі, можливо, зв'язуючись із мітохондріальним ретикуломом та взаємодіючи із ПМ, окреслює контури клітини.

У подальшому досліджували вплив речовин, які модулюють іонний транспорт у мембранах і можуть виступати модифікаторами потенціалу як ПМ, так і МХМ. У серії експериментів із використанням спектрофлуориметрії додавання K^+ -іонофору валіноміцину на 3-й хв акумуляції зонда приводить до зростання інтенсивності флуоресценції (рис. 5, а), що, можливо, є наслідком різкого збільшення проникності ПМ або/і МХМ для іонів калію і відповідного збільшення (за модулем) трансмембранного потенціалу.

У випадку використання протокового цитометра була здійснена спроба віддиференціювати дію валіноміцину на поляризовані ПМ та МХМ (рис. 5, б). У разі деполаризації МХМ за умови передінкубації клітин протягом 5 хв з 1 мМ азидом натрію валіноміцин досить ефективно посилював флуоресцентну відповідь зонда, що може свідчити на користь додаткової поляризації ПМ. Водночас деполаризація ПМ, як наслідок передінкубації міоцитів з 1 мМ уабайном, робить клітини мало чутливими до дії валіноміцину. Отже, результати із використанням $DiOC_6(3)$ та клітин міометрії дозволяють

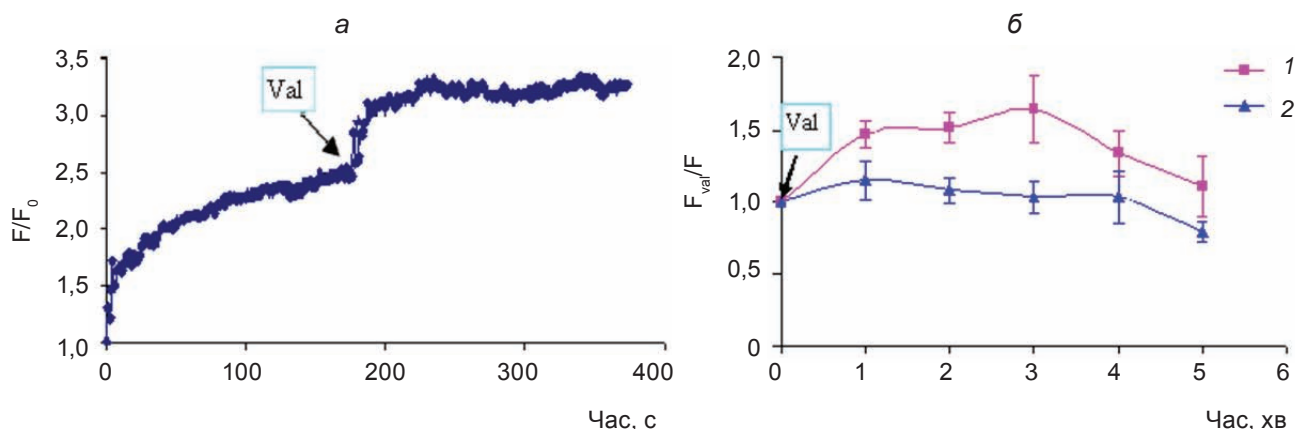


Рис. 5. Дія K^+ – іонофору валіноміцину на флуоресценцію $DiOC_6(3)$ в суспензії міоцитів матки. а – Вплив 0,5 мкМ валіноміцину (Val) на загальну флуоресценцію $DiOC_6(3)$ (метод спектрофлуориметрії). Дані типового досліду. F_0 – автофлуоресценція клітин. б – Вплив 0,5 мкМ валіноміцину на флуоресценцію $DiOC_6(3)$ за умов: 1 – передінкубація клітин з 1 мМ NaN_3 , 2 – передінкубація клітин з 1 мМ уабайном (метод протокової цитометрії). За 1 прийнято значення інтенсивності флуоресценції (F) на 3 хв інкубації клітин із зондом (0 хв на графіку), F_{val} – інтенсивність флуоресценції у присутності валіноміцину. Стрілкою вказано момент додавання аліквоти розчину досліджуваної речовини. $M \pm m$, $n = 5$

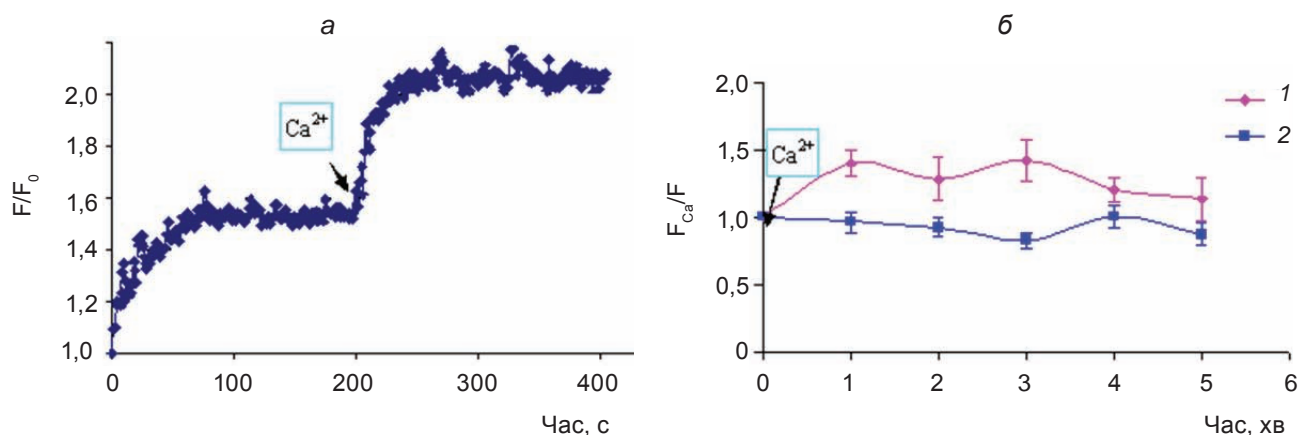


Рис. 6. Дія іонів кальцію на флуоресценцію $DiOC_6(3)$ в суспензії міоцитів матки: а – вплив 3 мМ Ca^{2+} на загальну флуоресценцію $DiOC_6(3)$ (метод спектрофлуориметрії). Дані типового дослід; б – вплив 3 мМ Ca^{2+} на флуоресценцію $DiOC_6(3)$ за умов: 1 – передінкубація клітин з 1 мМ NaN_3 , 2 – передінкубація клітин з 1 мМ убаїном (метод протокової цитометрії). За 1 прийнято значення інтенсивності флуоресценції (F) на 3-й хв інкубації клітин із зондом (0 хв на графіку), F_{Ca} – інтенсивність флуоресценції в присутності іонів Ca . Стрілкою вказаний момент додавання аліквоти розчину досліджуваної речовини. $M \pm m, n = 5$

зробити припущення, що ПМ більш ефективно поляризується в присутності валіноміцину.

Внесення екзогенного Ca^{2+} (кінцева концентрація 3,03 мМ) приводить до збільшення інтенсивності флуоресценції як у разі використання спектрофлуориметрії (рис. 6, а), так і протокової цитометрії (рис. 6, б). Причому в останньому разі збільшення інтенсивності флуоресценції $DiOC_6(3)$ спостерігається лише за умови існування потенціалу на ПМ (МХМ деполяризована передінкубацією з NaN_3). Можливо, даний ефект є наслідком активації типових для міомерія Ca^{2+} -залежних K^+ -каналів ПМ [16]. Також є дані, що позаклітинний кальцій знижує Na^+ -струми гладенького м'язу судин [17], наслідком чого є зниження збудливості мембрани.

Таким чином, флуоресцентний потенціалчутливий зонд $DiOC_6(3)$ можна використовувати для оцінки рівня поляризації як МХМ, так і ПМ в суспензії міоцитів матки. З цією метою можна застосовувати як метод спектрофлуориметрії, так і протокової цитометрії. Водночас слід зазначити, що перевагою другого підходу є високе співвідношення сигнал/шум у флуоресцентному каналі, можливість використання відносно низької кількості клітин у пробі (10^3 – 10^5), а також оцінка зміни інтенсивності флуоресценції $DiOC_6(3)$ лише тих об'єктів, які переважають у дослідженому зразку.

Автори висловлюють подяку О. В. Коломієць за участь у проведенні експериментів.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДАМИ СПЕКТРОФЛУОРИМЕТРИИ И ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ПОЛЯРИЗАЦИИ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ И ВНУТРЕННЕЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ МЕМБРАН ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОТЕНЦИАЛЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ЗОНДА $DiOC_6(3)$

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

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

Продемонструована можливість використання методів протокової цитометрії і спектрофлуориметрії для дослідження поляризації як внутрішньої мітохондриальної, так і плазматическої мембран в суспензії міоцитів матки з допомогою потенціалчутливого зонда 3,3'-дигексилосакарбонцианіна [$DiOC_6(3)$]. Отримані результати свідчать про можливість подальшого використання $DiOC_6(3)$ для вивчення впливу фізіологічно активних речовин на

трансмембранные потенциалы компартментов интактных клеток.

Ключевые слова: трансмембранный потенциал, потенциалчувствительные зонды, проточная цитометрия, миоциты.

COMPARATIVE INVESTIGATION BY SPECTROFLUORIMETRY AND FLOW CYTOMETRY OF PLASMA AND INNER MITOCHONDRIAL MEMBRANES POLARISATION IN SMOOTH MUSCLE CELL USING POTENTIAL-SENSITIVE PROBE DIOC₆(3)

G. V. Danylovysh, Yu. V. Danylovysh,
V. F. Gorchev

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

S u m m a r y

Possibility of the use of flow cytometry and spectrofluorimetry analysis for investigation mitochondria and plasma membrane polarization in myometrium cell suspension using potential-sensitive probe 3,3'-dihexyloxycarbocyanine [DiOC₆(3)] has been demonstrated. The obtained results confirm the use of DiOC₆(3) for studying the influence of effectors on transmembrane potentials of intact cell compartments.

Key words: transmembrane potential, potential-sensitive probe, flow cytometry, myometrium cell.

1. Graier W. F., Frieden M., Malli R. // Eur. J. Physiol. – 2007. – **455**. – P. 375–396.
2. Костюк П. Г., Костюк О. П., Лук'янець О. О. Внутрішньоклітинна кальцієва сигналізація: структури і функції. К.: Наук. думка, 2010. – 175 с.

3. Косников В. В. // Укр. биохим. журн. – 1990. – **62**, № 1. – С. 3–16.
4. Rottenberg H., Wu S. // Biochim. Biophys. Acta. – 1998. – **1404**. – P. 393–404.
5. Salvioli S., Ardizzoni A., Franceschi C., Cossarizza A. // FEBS Letters. – 1997. – **411**. – P. 77–82.
6. Marchetti C., Jouy N., Leroy-Martin B. et al. // Human Reproduction. – 2004. – **12**, N 10. – P. 2267–2276.
7. Kalbocova M., Vrbacky M., Drahota Z., Melkova Z. // Cytometry. – 2003. – **52A**, Part A. – P. 110–116.
8. Brewis I. A., Morton J. E., Mohammad S. N. et al. // J. Andrology. – 2000. – **21**, N 2. – P. 238–249.
9. Srivastava I. K., Rottenbergs H., Vaidya A. B. // J. Biol. Chem. – 1997. – **272**, N 7. – P. 3961–3966.
10. Mollard P., Mironneau J., Amedee T., Mironneau C. // Am. J. Physiol: Cell Physiology. – 1986. – **250**, N 1. – P. C47–C54.
11. Anderson W. M., Wood J. M., Anderson A. C. // Biochem. Pharmacol. – 1993. – **45**. – P. 2115–2122.
12. Sabnis R. W., Deligeorgiev T. G., Jachak M. N., Dalvi T. S. // Biotech. Histochem. – 1997. – **42**, N 5. – P. 253–258.
13. Terasaki M., Reese T. S. // J. Cell Sci. – 1992. – **101**. – P. 315–322.
14. Кроленко С. А., Адамян С. Я., Беляева Т. Н. и др. // Цитология. – 2007. – **49**, № 2. – С. 107–114.
15. Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. – М.: Наука, 1989. – 277 с.
16. Noble K., Floyd R., Shmygol A. et al. // Cell Calcium. – 2010. – **47**, N 1. – P. 47–54.
17. Voccaro G., Choby C., Frapier J. M. et al. // Circ. Res. – 1999. – October 1. – P. 606–613.

Отримано 31.01.2011