

## ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДУ ПРОТОКОВОЇ ЦИТОМЕТРІЇ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ $\text{Ca}^{2+}$ В МІТОХОНДРІЯХ ТА ВПЛИВУ НА НЬОГО АНТАГОНІСТІВ КАЛЬМОДУЛІНУ

Л. Г. БАБІЧ, С. Г. ШЛИКОВ, Н. В. НАУМОВА, С. О. КОСТЕРІН

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

*Для дослідження акумуляції іонів  $\text{Ca}$  в ізольованих мітохондріях міометрія використовували метод протокової цитометрії та флуоресцентні зонди. Внесення  $1 \text{ мМ } \text{Ca}^{2+}$  до середовища інкубації, яке містило навантажені зондом flio 3-AM мітохондрії, за присутності в ньому  $5 \text{ мкМ}$  кальцієвого іонофору А-23187 зміщувало геометричне положення піка інтенсивності флуоресценції зонда вправо. Збільшення інтенсивності його флуоресценції залежало від концентрації іонів  $\text{Ca}$  в середовищі: підвищення її від  $20 \text{ мкМ}$  до  $1 \text{ мМ}$  за наявності в суспензії кальцієвого іонофору А-23187 зумовлювало зростання інтенсивності випромінювання. В разі моделювання функціонування  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортеру мітохондрій спостерігалось  $\text{Ca}^{2+}$ -індуковане збільшення інтенсивності флуоресценції зонда flio 3-AM залежно від концентрації катіона: за введення до суспензії  $1 \text{ мкМ}$  протоніофору СССР та  $20 \text{ мкМ } \text{Ca}^{2+}$  інтенсивність флуоресценції зонда залишалась на рівні контролю. У подальших експериментах вивчали вплив антагоністів кальмодуліну — кальмідазоліуму та трифлуопіразину — на вміст в мітохондріях іонізованого  $\text{Ca}$ . Внесення  $10 \text{ мкМ}$  кальмідазоліуму або  $100 \text{ мкМ}$  трифлуопіразину до середовища інкубації повністю пригнічувало в органах акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$ . При цьому, використовуючи потенціалочутливий флуоресцентний зонд TMRM, було встановлено, що антагоністи кальмодуліну також спричинюють деполяризацію мітохондріальної мембрани. Припускається, що гальмування надходження іонів  $\text{Ca}$  до мітохондрій міометрія у присутності антагоністів кальмодуліну може відбуватися як через блокування утворення комплексу  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулін і, відповідно, інгібування функціонування  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортеру, так і/або дисипацію мембранного потенціалу  $\Delta\psi$  — рушійної сили акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріальному матриксі.*

*Ключові слова: протокова цитометрія, ізольовані мітохондрії,  $\text{Ca}^{2+}$ , мембранний потенціал мітохондрій, гладенькі м'язи.*

**М**ітохондрії відіграють фундаментальну роль у контролюванні внутрішньоклітинних кальцієвих транзєнтів і, відповідно, в забезпеченні кальцієвої сигналізації в цитозолі [1–3]. Водночас у дослідах із різними тканинами встановлено, що катіони  $\text{Ca}$  стимулюють активність мітохондріальних дегідрогеназ та функціонування  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника.  $\text{Ca}^{2+}$ -залежною є також «пора перехідної неспецифічної провідності» мітохондрій [4]. Акумуляція іонів  $\text{Ca}$  в мітохондріях забезпечується функціонуванням  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортеру, рушійною силою якого є мембранний потенціал  $\Delta\psi$ . Однак механізми регуляції активності цієї системи ще й досі не з'ясовані і залишаються актуальним питанням досліджень та наукових дискусій. Так, зокрема, в експериментах, проведених на ізольованих мітохондріях, було виявлено, що субстрат транспортування — іони  $\text{Ca}$  — алостерично регулюють активність уніпортеру [5]. З іншого боку, дані літератури

свідчать про здатність кальцієвого уніпортеру транспортувати іони  $\text{Na}$  у безкальцієвому середовищі [6].

В експериментах з вивчення трансмембранного обміну іонів кальцію в мітохондріях використовують різні методи — ізотопний ( $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ), електрометричний із застосуванням  $\text{Ca}^{2+}$ -селективного електрода, внутрішньоклітинну  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливу спектрофлуориметрію (застосовують  $\text{Ca}^{2+}$ -селективні флуоресцентні індикатори) тощо [3, 7–9]. Останнім часом доведено доцільність залучення до цих досліджень методу протокової цитометрії [10–12], яку нині успішно використовують, наприклад для виявлення змін мітохондріального потенціалу та рівня активних форм кисню тощо [11, 12]. Проте в доступній нам літературі ми не зустріли посилань на використання методу протокової цитометрії для вивчення обміну іонів  $\text{Ca}$  в ізольованих мітохондріях. Раніше в експериментах із застосуванням ізотопного

методу ( $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ) нами були всебічно досліджені властивості  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем гладенького м'яза матки [7, 8, 13–15]. Утім, цілком очевидно, що радіоіндикаторна техніка дає можливість тестувати кількість «загального» Са в мітохондріальному матриксі (тобто суму іонізованого та преципітованого катіона). Оскільки функціональна активність притаманна саме іонізованому кальцію, то важливо мати методи його селективного визначення.

Відомо, що  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язувальний білок кальмодулін відіграє роль посередника у багатьох внутрішньоклітинних ефектах іонів кальцію внаслідок оборотного утворення комплексу кальмодулін– $\text{Ca}^{2+}$ , який, у свою чергу, здатен регулювати різноманітні  $\text{Ca}^{2+}$ -залежні клітинні процеси [16]. Кальмодулін – це дуже консервативний білок, який належить до суперсімейства  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язувальних білків, для яких властивий однаковий  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язувальний структурний домен. У відповідь на кальцієвий сигнал останній може зв'язуватись із різноманітними білками-мішенями, зокрема з кіназою легких ланцюгів міозину, фосфодіестеразою, аденілатциклазою,  $\text{Ca}^{2+}$ -залежною кіназою, протеїнофосфатазою, кальціейрином,  $\text{Ca}^{2+}$ -активованими  $\text{K}^+$ -каналами, кальцієвими каналами L-типу, ріанодиноними рецепторами тощо [16–20]. В. Moreau et al. опублікували дані щодо регуляції активності  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортеру мітохондрій клітин RBL-1 іонами Са за участю кальмодуліну [21]. Однак аналогічна інформація стосовно мітохондрій гладеньких м'язів матки у літературі відсутня.

Метою роботи було дослідити методом протокової цитометрії вплив антагоністів кальмодуліну на рівень іонізованого Са та мембранний потенціал в мітохондріях гладенького м'яза матки.

### Матеріали і методи

Препарат ізольованих мітохондрій одержували з міометрія невагітних щурів методом диференціального центрифугування [13]. Мітохондрії суспендували в розчині, який містив: 10 мМ Hepes (рН 7,4), 250 мМ сахарози, 1 мМ ЕГТА, 0,1% бичачого сироваткового альбуміну (температура – 4 °С). Концентрація білка в мітохондріях, визначена методом М. М. Bradford [22], становила 50 мкг/мл.

Протоковий цитометр COULTER EPICS XL™ (Beckman Coulter, США) з аргоновим лазером ( $\lambda_{\text{збуд.}} = 488$  нм) використовували для визначення чистоти фракції ізольованих мітохондрій, рівня іонізованого Са та мембранного

потенціалу  $\Delta\psi$ . Результати цих експериментів аналізували за допомогою програми SYSTEM II™ Software (Beckman Coulter, США).

Тестування чистоти фракції ізольованих мітохондрій здійснювали з використанням флуоресцентного маркера NAO (10-nonyl acridine orange;  $\lambda_{\text{збуд.}} = 488$  нм,  $\lambda_{\text{фл.}} = 525$  нм) у концентрації 100 нМ як описано у статті [23]. У всіх зразках понад 95% «подій» були «NAO-позитивними», що підтверджує їхнє мітохондріальне походження.

Навантаження органел флуоресцентним зондом fluo 3-AM (концентрація 2 мкМ), проводили в середовищі для суспендування мітохондрій, яке наведене вище, протягом 30 хв при різних температурах. Визначення навантаження їх зондом здійснювали в середовищі інкубації, яке містило: 20 мМ Hepes (рН 7,4), 250 мМ сахарози, 2 мМ  $\text{P}_i$  ( $\text{K}^+$ -фосфатний буфер з рН 7,4), 3 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 3 мМ АТР, 5 мМ сукцинату натрію і за наявності іонофору А23187 (5 мкМ) та  $\text{CaCl}_2$  в різних концентраціях. Рівень накопиченого Са реєстрували в такому самому середовищі, але за відсутності в ньому іонофору А23187. Дані наведено у відносних одиницях інтенсивності флуоресценції (у присутності  $\text{Ca}^{2+}$  порівняно з базальним рівнем).

Тестування відносних значень мембранного потенціалу  $\Delta\psi$  мітохондрій здійснювали з використанням потенціалочутливого флуоресцентного зонда TMRM (tetramethylrhodamine methyl ester;  $\lambda_{\text{збуд.}} = 488$  нм,  $\lambda_{\text{фл.}} = 590$  нм) у концентрації 100 нМ як описано у статті [23].

У роботі застосовували такі реактиви: D-(+)-сахарозу, NAO, TMRM, Hepes, ЕГТА, АТР, сукцинат натрію, очищений від жирних кислот бичачий сироватковий альбумін (BSA fatty acid free), олігоміцин, протонофор СССР, А23187, кальмідазоліум, трифлуопіразин фірми Sigma (США); рутенієвий червоний та fluo 3-AM – фірми Fluka (Швейцарія). Інші використані нами реактиви були вітчизняного виробництва кваліфікації чда та хч.

### Результати та обговорення

Метод протокової цитометрії з успіхом використовується у клінічних і суто наукових дослідженнях, об'єктами яких є субклітинні структури і цілісні клітини [11, 24]. У попередніх роботах ми застосовували його для тестування індукованого іонами Са набухання мітохондрій міометрія [25] та реєстрації їхнього мембранного потенціалу [23].

### *I. Визначення оптимальних умов навантаження мітохондрій міометрія флуоресцентним зондом fluo 3-AM*

Флуоресцентний  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливий зонд – ацетоксиметильне похідне fluo 3 (fluo 3-AM) – був створений R. Y. Tsien та колегами для використання в дослідях, що проводилися на протоковому цитометрі та конфокальному мікроскопі [26]. Відомо, що він використовується як індикатор  $\text{Ca}^{2+}$  в багатьох типах клітин [27]. Дані літератури свідчать, що, зазвичай, клітини навантажують зондом fluo 3-AM у концентрації 2–10 мкМ протягом 30–45 хв при температурі 4, 22, 30 або 37 °C [27–30]. З огляду на це, ми розпочали власні дослідження з визначення оптимальних умов навантаження fluo 3-AM ізольованих мітохондрій міометрія, які інкубували з ним при 4, 22 та 37 °C. Тестування навантажених зондом мітохондрій проводили за відсутності та наявності в середовищі інкубації 1 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  та у присутності 5 мкМ A23187. Останній використовували як кальцієвий іонофор, що сприяє швидкому накопиченню  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях.

Як впливає з рис. 1, внесення до середовища інкубації мітохондрій 1 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  та 5 мкМ A23187 зумовлює зміщення геометричного положення піка інтенсивності флуоресценції зонда fluo 3-AM вправо (крива 3) порівняно з відсутністю екзогенного  $\text{Ca}^{2+}$  в розчині (крива 1 – контроль). Водночас у присутності лише A23187 (крива 2) ми практично не виявили зміни положення піка інтенсивності флуоресценції стосовно контролю. Отже, збільшення інтенсивності флуоресценції зонда у присутності кальцієвого іонофору є дійсно  $\text{Ca}^{2+}$ -залежним. Найінтенсивніша флуоресценція у присутності іонів Ca спостерігається в мітохондріях, які навантажували флуоресцентним маркером при 37 °C. Дані літератури свідчать, що fluo 3-AM та його кислотній формі fluo 3 спонтанна флуоресценція невластива, і лише після зв'язування кислотної форми із  $\text{Ca}^{2+}$  спостерігається поява флуоресцентного сигналу [31]. У подальших експериментах ізольовані мітохондрії міометрія ми навантажували fluo 3-AM у концентрації 2 мкМ при 37 °C протягом 30 хв.

Слід відзначити, що рівень інтенсивності флуоресценції зонда fluo 3-AM залежить від концентрації іонів Ca в середовищі інкубації (рис. 2): підвищення її від 20 мкМ до 1 мМ за наявності в розчині 5 мкМ кальцієвого іонофору A23187 істотно збільшує інтенсивність флуоресценції маркера (криві 2 та 3 відповідно) відносно контролю (крива 1).

### *II. Тестування СССР-чутливої акумуляції іонів Ca в мітохондріях у процесі моделювання функціонування $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортеру*

Надходження іонів Ca до мітохондрій забезпечується функціонуванням  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортеру, активність якого залежить від мембранного потенціалу [1–3, 7]. Як випливає з рис. 3 (крива 1), інтенсивність флуоресценції зонда fluo 3-AM збільшується у часі і досягає стаціонарного рівня, але знижується до нуля після додавання до середовища інкубації  $\text{Ca}^{2+}$ -іонофору A-23187 (5 мкМ) та хелатора іонів Ca – EGTA (1 мМ). Ці дані свідчать, що збільшення флуоресценції зонда fluo 3-AM дійсно віддзеркалює накопичення кальцію в мітохондріях міометрія. У присутності 1 мкМ протоніофору СССР – фактора дисипації мітохондріального потенціалу – інтенсивність флуоресценції зонда fluo 3 не підвищується (рис. 3, крива 2).

Слід відзначити, що інтенсивність флуоресценції зонда fluo 3-AM має тенденцію до виходу на плато у часі, величина якого залежить від концентрації екзогенного катіона: при 100 мкМ  $\text{Ca}^{2+}$  цей рівень більший, ніж при 20 (рис. 4, криві 2 та 1 відповідно). Аналогічні результати ми одержали також, досліджуючи накопичення загального Ca в мітохондріях міометрія ізотопним методом ( $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ) [7,13]. Відомо, що збільшення концентрації катіона в матриці активує системи його вивільнення з мітохондрій [1,2]. Отже, платові значення кількості іонізованого Ca в цих органелах є наслідком функціонування в них як систем його акумуляції, так і вивільнення. Безперечно, що зміни до цих платових значень вмісту кальцію в органелах вносять також процеси комплексоутворення  $\text{Ca}^{2+}$  із фосфатом та іншими  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язувальними аніонами, які відбуваються в матриці мітохондрій.

Одержані нами дані (рис. 3 та 4) свідчать, що, використовуючи метод протокової цитометрії та зонд fluo 3-AM, можна надійно тестувати потенціалозалежний процес накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях гладенького м'яза матки.

### *III. Вивчення впливу антагоністів кальмодуліну на СССР-чутливу акумуляцію іонів Ca в мітохондріях міометрія і їхній мембранний потенціал*

Відомо, що  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язувальний білок кальмодулін є первинним внутрішньоклітинним «сенсором» іонів Ca і посередником багатьох його внутрішньоклітинних ефектів [16]. В опублікованих роботах обговорюється питання щодо можливості регуляції активності  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортеру мітохондрій комплексом кальмодулін– $\text{Ca}^{2+}$  [21]. Таке припущення під-

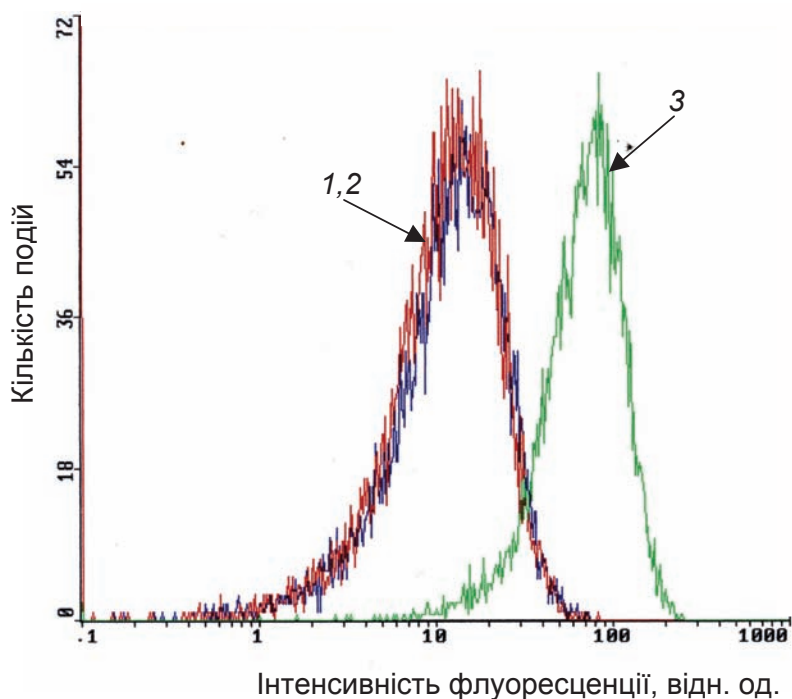


Рис. 1.  $Ca^{2+}$ -індуковане зміщення геометричного положення піка інтенсивності флуоресценції зонда fluo 3-AM у середовищі інкубації мітохондрій міометрія: 1 – за відсутності  $Ca^{2+}$  (контроль); 2 – за відсутності  $Ca^{2+}$ , але у присутності 5 мкМ кальцієвого іонофору A23187; 3 – у присутності 1 мМ  $Ca^{2+}$  та 5 мкМ A23187. Тривалість інкубації – 1 хв

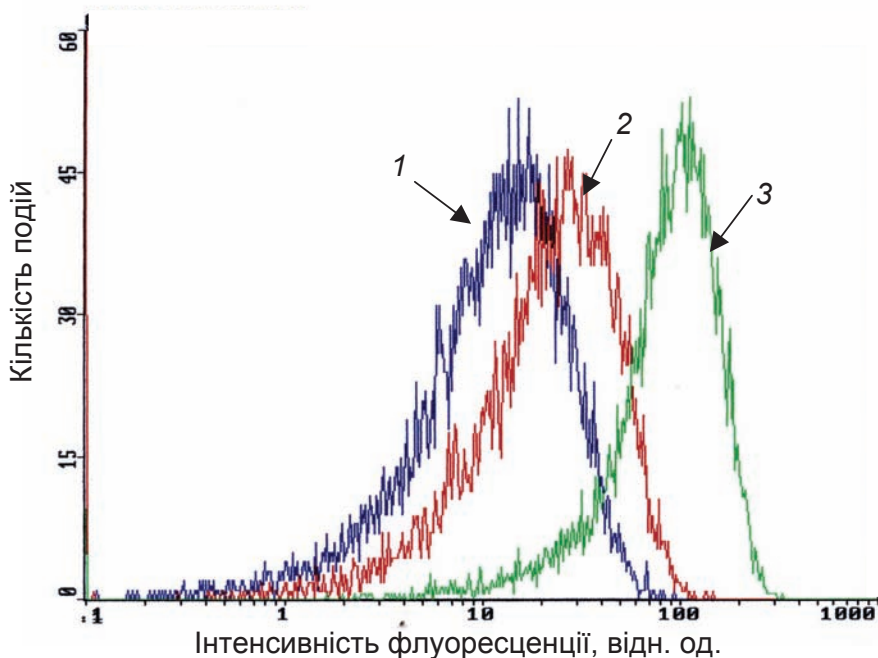


Рис. 2. Зміщення геометричного положення піка інтенсивності флуоресценції зонда fluo 3-AM у мітохондріях міометрія залежно від концентрації іонів Ca: 1 – за відсутності  $Ca^{2+}$ , але у присутності 5 мкМ кальцієвого іонофору A23187, 2 – у присутності 20 мкМ  $Ca^{2+}$  та 5 мкМ A23187, 3 – у присутності 1 мМ  $Ca^{2+}$  та 5 мкМ A23187. Тривалість інкубації – 1 хв

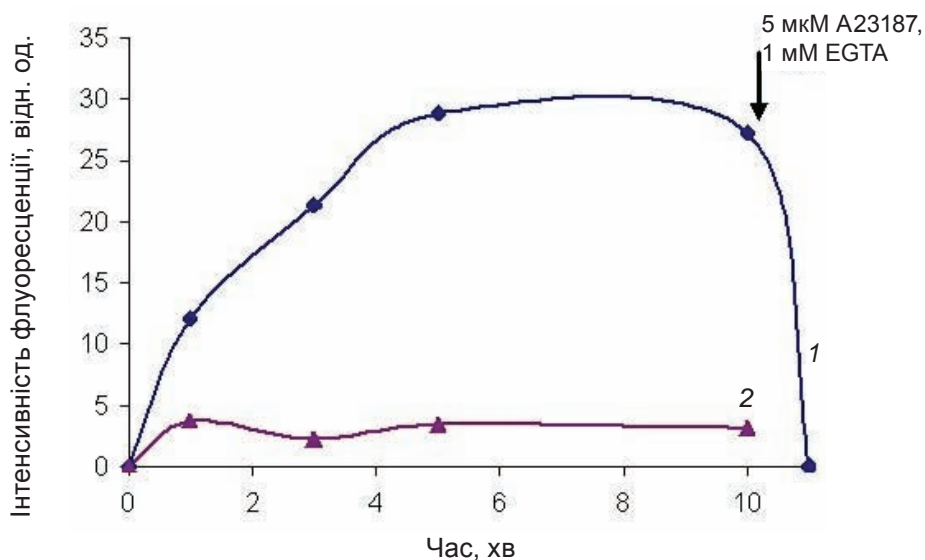


Рис. 3. Зміна інтенсивності флуоресценції  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливого зонда fluo 3 залежно від акумуляції іонів Ca в мітохондріях міометрії: 1 – 20 мкМ Ca, 2 – 1 мкМ СССР + 20 мкМ Ca. Момент часу, коли до середовища інкубації мітохондрій додавали іонофор A23187 (5 мкМ) та EGTA (1 мМ), позначено стрілочкою

тверджується, зокрема, пригніченням активності  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортеру мітохондрій рутенієвим червоним, оскільки доведено, що він інгібує зв'язування  $\text{Ca}^{2+}$  з кальмодуліном [32]. Тому слід було очікувати, що антагоністи кальмодуліну впливатимуть на систему акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях. Для підтвердження або спростування цього припущення ми вивчали

вплив антагоністів кальмодуліну – кальмідазоліуму та трифлуопіразину – на рівень іонізованого Ca в мітохондріях, за умов моделювання функціонування  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортеру. Порівняно з іншими антагоністами кальмодуліну кальмідазоліум належить до найафінніших [33]. Виявлено, що внесення 10 мкМ кальмідазоліуму (рис. 5, крива 2) або 100 мкМ трифлуопіразину

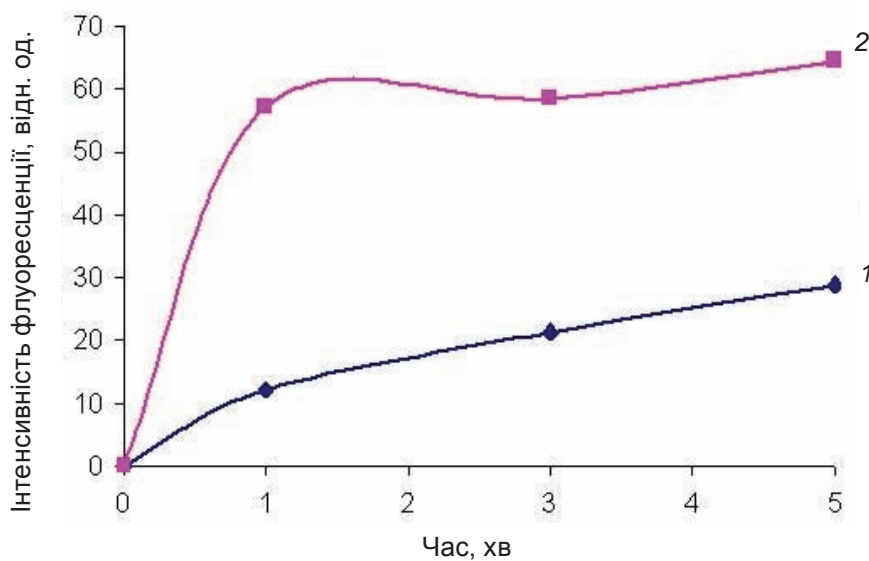


Рис. 4. Кінетика змін інтенсивності флуоресценції зонда fluo 3-AM при різних концентраціях  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі інкубації мітохондрій міометрії: 1 та 2 – концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  становила 20 і 100 мкМ відповідно

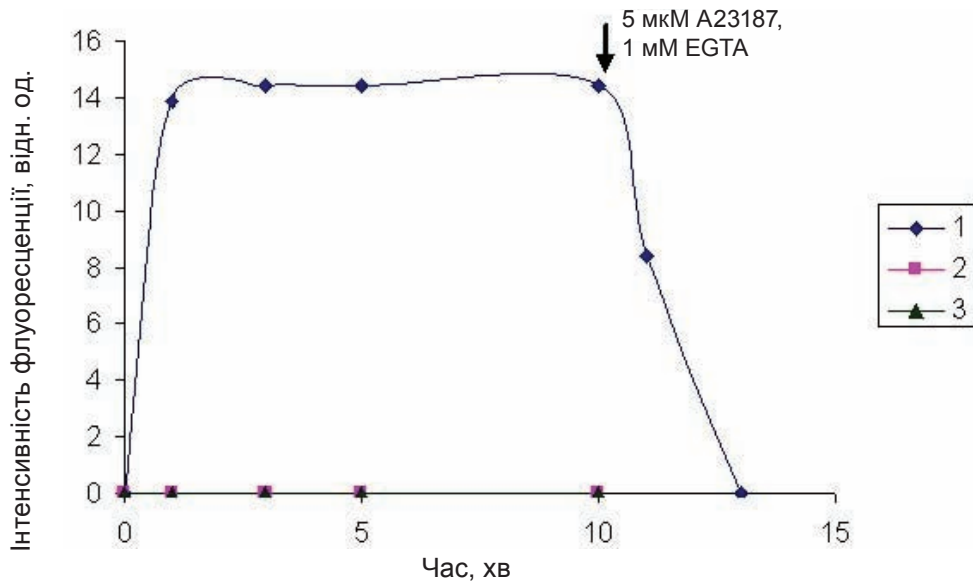


Рис. 5. Вплив антагоністів кальмодуліну на рівень іонізованого Ca в мітохондріях міомерія: момент часу, коли додавали 5 мкМ A23187 та 1 мМ EGTA позначено стрілочкою; 1 – контроль; 2 – 10 мкМ кальмідозоліум; 3 – 100 мкМ трифлуоперазин

(рис. 5, крива 3) до середовища інкубації мітохондрій зумовлює повне гальмування акумуляції в них Ca<sup>2+</sup>. Отже, ці дані підтверджують імовірність регуляції Ca<sup>2+</sup>-уніпортеру органел кальмодуліном. З іншого боку, активність Ca<sup>2+</sup>-уніпортеру мітохондрій залежить також від поляризації мітохондріальної мембрани [1,7]. Тому важливо було з'ясувати, чи спри-

чиняють антагоністи кальмодуліну дисипацію мембранного потенціалу мітохондрій?

Мембранний потенціал мітохондрій Δψ визначали з використанням флуоресцентного зонда TMRM (100 нМ). З'ясувалося, що антагоністи кальмодуліну істотно деполяризують мембрану органел: внесення 10 мкМ кальмідозоліуму (рис. 6, крива 2) та 100 мкМ три-

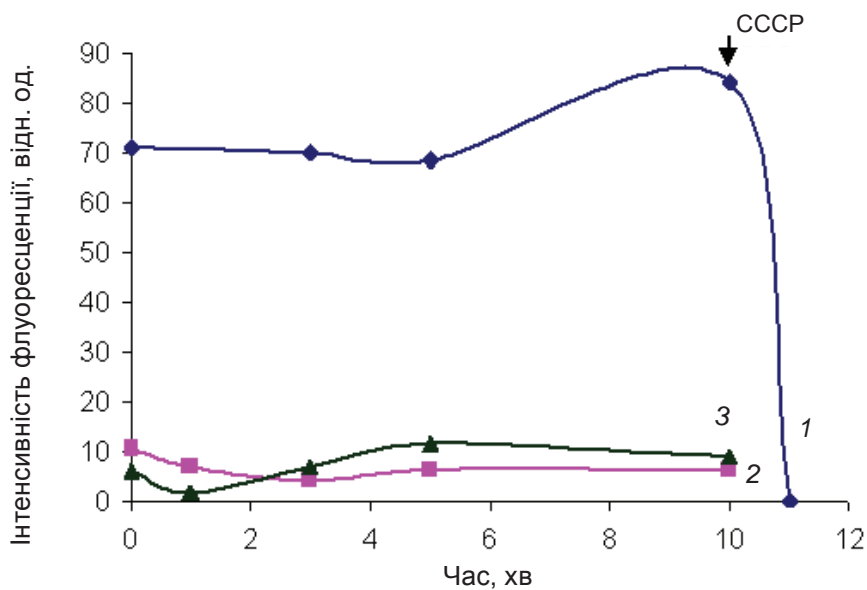


Рис. 6. Вплив антагоністів кальмодуліну на мембранний потенціал Δψ мітохондрій міомерія: 1 – контроль, 2 – 10 мкМ кальмідозоліум, 3 – 100 мкМ трифлуоперазин. Момент часу, коли до середовища інкубації додавали протоніфор CCCP (1 мМ), позначено стрілкою

флуопіразину (рис. 6, крива 3) до середовища інкубації мітохондрій зумовлює повну дисипацію мембранного потенціалу  $\Delta\psi$  відносно контролю (рис. 6, крива 1).

Опубліковані дані [4] свідчать, що у структурі  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних мітохондріальних переносників, зокрема транспортерів АТР– $\text{Mg}/\text{P}_i$ , є ділянки, які гомологічні кальмодуліну. Отже, зв'язування з ними антагоністів кальмодуліну гальмуватиме активність зазначених транспортерів. З огляду на це, можна припустити опосередкований вплив антагоністів кальмодуліну на значення мембранного потенціалу мітохондрій і, відповідно, на функціонування  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортеру.

Таким чином, одержані нами результати свідчать про можливість дослідження СССР-чутливої акумуляції іонів Са в ізольованих мітохондріях гладенького м'яза матки методом протокової цитометрії і з використанням в експериментах флуоресцентного зонда fluo 3-AM. При цьому накопичення кальцію в органелах унеможливується у присутності антагоністів кальмодуліну – кальмідазоліуму та трифлуопіразину. Ймовірно, що гальмування ними акумуляції іонів Са в мітохондріях міометрія відбувається як шляхом інгібування функціонування  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортеру, так/чи внаслідок дисипації мембранного потенціалу.

#### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ $\text{Ca}^{2+}$ В МИТОХОНДРИЯХ И ВЛИЯНИЕ НА НЕГО АНТАГОНИСТОВ КАЛЬМОДУЛИНА

*Л. Г. Бабич, С. Г. Шлыкков, Н. В. Наумова, С. А. Костерин*

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

Акумуляцію іонів Са в ізольованих мітохондріях міометрія дослідували з використанням метода протоочної цитометрії і флуоресцентного зонда fluo 3-AM. Внесення в середу інкубації 1 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  і 5 мкМ А23187 приводить до смещенню вправо геометричного положення піка інтенсивності флуоресценції зонда порівняльно з відсутністю в середі іонів Са. Інтенсивність флуоресценції зонда підвищується при збільшенні в розстворі концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ . В умовах моделювання функціонування  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортера інтенсивність флуоресценції зонда також зростає

з збільшенням в середі концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ , але не змінюється при попередньому введенні в неї 1 мкМ протонатора СССР. Внесення в середу інкубації антагоністів кальмодуліну – 10 мкМ кальмідазоліуму або 100 мкМ трифлуопіразину – приводить до повного інгібування накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях. Ці антагоністи кальмодуліну викликають також деполаризацію мітохондріальної мембрани, що було встановлено в експериментах з використанням потенціалчутливого флуоресцентного зонда TMRM. Висказується припущення про те, що інгібувальне діяння антагоністів кальмодуліну на акумуляцію іонів Са в мітохондріях міометрія може відбуватися як при інгібуванні безпосередньо  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортера, так/или внаслідок дисипації мембранного потенціалу.

**Ключевые слова:** проточная цитометрия, изолированные митохондрии, мембранный потенциал,  $\text{Ca}^{2+}$ , гладкие мышцы.

#### USE OF FLOW CYTOMETRY METHOD TO DETERMINE $\text{Ca}^{2+}$ CONTENT IN MITOCHONDRIA AND INFLUENCE OF CALMODULIN ANTAGONISTS ON IT

*L. G. Babich, S. G. Shlykov, N. V. Naumova, S. O. Kosterin*

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

#### Summary

Ca ions accumulation in isolated myometrium mitochondria was investigated using flow cytometry and fluorescent probe fluo 3-AM. The addition of 1 mM of  $\text{Ca}^{2+}$  and 5  $\mu\text{M}$  of А23187 to the incubation medium resulted in the shift to the right of geometrical peak position of fluorescence probe intensity compared with that registered in the absence of Ca ions. The increase of Ca concentration in the medium resulted in the increase of fluorescence intensity. In the conditions of  $\text{Ca}^{2+}$ -uniporter functioning modelling the probe fluorescence intensity also increased depending on an increase of Ca concentration and did not change at primary presence of the 1  $\mu\text{M}$  СССР.  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation in mitochondria was completely inhibited by 10  $\mu\text{M}$  calmidazolium or 100  $\mu\text{M}$  trifluoperazine, known as calmodulin antagonists. It was also shown that these calmodulin antagonists caused mitochondria membrane depolarization. The membrane potential was measured using fluorescent probe TMRM.

It is supposed that the inhibitory action of calmodulin antagonists on Ca ions accumulation in myometrium mitochondria can occur due to direct inhibition of Ca<sup>2+</sup>-uniporter and/or due to membrane potential dissipation.

Key words: flow cytometry, isolated mitochondria, membrane potential, Ca<sup>2+</sup>, smooth muscles.

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. *Satrústegui J., Pardo B., Del Arco A.* // *Physiol. Rev.* – 2007. – **87**, N 1. – P. 29–67.
5. *Gunter T. E., Pfeiffer D. R.* // *Am. J. Physiol.* – 1990. – **258**, N 5. Pt 1. – P. C755–C786.
6. *Kirichok Y., Kravivinsky G., Clapham D. E.* // *Nature.* – 2004. – **427**, N 6972. – P. 360–364.
7. *Костерин С. А.* Транспорт кальция в гладких мышцах. – К.: Наук. думка, 1990. – 216 с.
8. *Kosterin S. O., Burdyga Th.V., Fomin V. P., Grover A. K.* Control of Uterine Contractility. Chapt. 6 / Eds. R. E. Garfield, Thomas N. Tabb. CRC Press: Boca Raton–Ann Arbor–London–Tokyo. 1994.
9. *Gerasimenko O., Tepikin A.* // *Cell Calcium.* – 2005. – **38**, N 3–4. – P. 201–211.
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., Vaux L. et al.* // *Exp. Cell Res.* – 2004. – **294**, N 1. – P. 106–117.
13. *Костерин С. А., Браткова Н. Ф., Курский М. Д.* // *Биохимия.* – 1985. – **50**, № 8. – С. 1350–1361.
14. *Бабич Л. Г., Шлыков С. Г., Струтинская Н. А., Костерин С. А.* // *Укр. біохім. журн.* – 1999. – **71**, № 2. – С. 20–27.
15. *Борисова Л. А., Бабич Л. Г., Шлыков С. Г., Костерин С. А.* // Там само. – 2000. – **72**, № 3. – С. 44–55.
16. *Wu X., Bers D. M.* // *Cell Calcium.* – 2007. – **41**, N 4. – P. 353–364.
17. *Means A. R., VanBerkum M. F., Bagchi I. et al.* // *Pharmacol. Therap.* – 1991. – **50**. – P. C.D. 5–270.
18. *Vogel H. J.* // *Biochem. Cell Biol.* – 1994. – **72**. – P. 357–376.
19. *James P., Vorherr T., Carafoli E.* // *Trends Biochem. Sci.* – 1995. – **20**. – P. 38–42.
20. *Maier L. S., Bers D. M.* // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 2002. – **34**. – P. 919–939.
21. *Moreau B., Nelson C., Parekh A. B.* // *Curr. Biol.* – 2006. – **16**, N 16. – P. 1672–1677.
22. *Bradford M. M.* // *Anal. Biochem.* – 1976. – **72**. – P. 248–254.
23. *Бабич Л. Г., Шлыков С. Г., Наумова Н. В., Костерин С. О.* // *Укр. біохім. журн.* – 2007. – **79**, № 6. – С. 34–41
24. *Болдырев А. А., Юнева М. О.* // *СОЖ.* – 2004. – **8**, № 2. – С. 7–14.
25. *Пономаренко О. В., Бабич Л. Г., Горчев В. Ф., Костерин С. О.* // *Укр. біохім. журн.* – 2006. – **78**, № 6. – С. 38–45.
26. *Minta A., Kao J. P., Tsien R. Y.* // *J. Biol. Chem.* – 1989. – **264**, N 14. – P. 8171–8178.
27. *Szafrańska B., Tilton J. E.* // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2000. – **51**, N 3. – P. 541–554.
28. *Ripova D., Platilova V., Strunecka A. et al.* // *Physiol. Res.* 2004. – **53**, N 4. – P. 449–452.
29. *Bowser D. N., Minamikawa T., Nagley P., Williams D. A.* // *Biophys. J.* – 1998. – **75**, N 4. – P. 2004–2014.
30. *Ohata H., Chacon E., Tesfai S. A. et al.* // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 1998. – **30**, N 3. – P. 207–222.
31. *Scaduto R. C. Jr, Grotyohann L. W.* // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2003. – **285**, N 5. – P. H2118–H2124.
32. *Sasaki T., Naka M., Nakamura F., Tanaka T.* // *J. Biol. Chem.* – 1992. – **267**, N 30. – P. 21518–21523.
33. *Gietzen K.* Intracellular calcium regulation / Eds. H. Bader et al. – Manchester University Press. – 1986. – P. 405–423.

Отримано 20.05.2008