

## ЗМІНА МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦІАЛУ МІТОХОНДРІЙ ГЛАДЕНЬКОГО М'ЯЗА МАТКИ ПІД ВПЛИВОМ ІОНІВ Mg ТА Ca

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

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;  
e-mail: natalia\_naumova@ukr.net

Методом проточної цитометрії та потенціалчутливого флуоресцентного зонда TMRM досліджено вплив двовалентних катіонів Mg та Ca на мембранний потенціал ізольованих мітохондрій міометрії. Встановлено, що додавання до середовища інкубації  $Mg^{2+}$  у концентрації 7 мМ індукує гіперполяризацію мітохондріальної мембрани. За початкової присутності протоннофору СССР 1 мкМ, як фактора дисипації протонного градієнта, такого ефекту  $Mg^{2+}$  не спостерігається. Поряд з тим показано, що додавання 100 мкМ  $Ca^{2+}$  призводить до деполаризації мембрани мітохондрій. Індукована іонами Ca деполаризація мітохондрій сягає такого самого рівня, що і після додавання азиду натрію  $NaN_3$  (10 мМ) – інгібітора цитохромоксидази мітохондрій. Присутність у середовищі інкубації 7 мМ  $Mg^{2+}$  не запобігає деполаризувальному впливу іонів Ca.

*Ключові слова:* проточна цитометрія, ізольовані мітохондрії, мембранний потенціал мітохондрій.

**М**ітохондрії відіграють суттєву роль у забезпеченні кальцієвого гомеостазу у клітинах гладеньких м'язів [1, 2]. Динаміка обміну іонів Ca через мітохондріальну мембрану контролюється сукупним функціонуванням електрофоретичного кальцієвого уніпортеру, системами катіонного антипорту та пори неспецифічної провідності. Величина мембранного потенціалу є важливим фактором регуляції акумуляції іонів Ca у мітохондріях. Це пояснюється тим, що функціонування  $Ca^{2+}$ -уніпортеру залежить не тільки від наявності кальцієвого градієнта, а значною мірою саме від величини мембранного потенціалу мітохондрій [1–3]. Таким чином, важливим є дослідження мітохондріального мембранного потенціалу та впливу на нього різних ефекторів, зокрема фізіологічно важливих катіонів –  $Mg^{2+}$  та  $Ca^{2+}$  [3,4].

Метою цієї роботи було вивчити вплив іонів Mg та Ca на величину мембранного потенціалу мітохондрій міометрії.

### Матеріали і методи

Фракцію ізольованих мітохондрій одержували з міометрії невагітних щурів за допомогою методу диференційного центрифугування [5]. Одержаний препарат суспендували у буфері такого складу: 10 мМ HEPES (pH 7,4), 250 мМ цукроза, 1 мМ ЭГТА, 0,1%-й бичачий сироватковий альбумін.

Визначення концентрації протеїну у фракції мітохондрій проводили за методом

Бредфорда [6]. Вміст протеїну у пробі становив 50 мкг/мл.

Для реєстрації мембранного потенціалу  $\Delta\psi$  мітохондрій використовували проточний цитометр COULTER EPICS XL™ (Beckman Coulter). Тестування чистоти фракції ізольованих мітохондрій міометрії проводили з використанням флуоресцентного маркера NAO (10-ponyl acridine orange) в концентрації 100 нМ ( $\lambda_{збуд.}$  – 488 нм,  $\lambda_{фл.}$  – 525 нм) як описано нами раніше [7].

Реєстрацію відносних значень мітохондріального потенціалу із використанням флуоресцентного зонда TMRM (tetramethylrhodamine-methyl-ester,  $\lambda_{збуд.}$  = 488 нм,  $\lambda_{фл.}$  = 590 нм; 100 нМ) проводили у стандартному середовищі інкубації такого складу: 20 мМ HEPES (pH=7,4), 250 мМ цукроза, 100 мкМ  $P_i$  (у вигляді  $K^+$ -фосфатного буфера, pH =7,4), 0,5 мМ  $MgCl_2$ , 5 мМ сукцинат натрія.

Інтенсивність флуоресценції зонда TMRM у відносних одиницях розраховували за принципом: геометричне положення піка інтенсивності флуоресценції у пробі мінус геометричне положення піка інтенсивності флуоресценції у присутності протоннофора СССР.

Контролем вважали інтенсивність флуоресценції зонда TMRM в ізольованих мітохондріях за умов використання стандартного середовища інкубації.

У роботі використано такі реактиви: D-(+) – цукроза, акридиноранж-10-нонілбромід,

HEPES, ЭГТА, сукцинат натрію, вільний від жирних кислот бичачий сироватковий альбумін (BSA fatty acid free), протоніофор CCCP фірми Sigma (США); TMRM фірми Fluka (Швейцарія). Інші реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації чда та хч.

### Результати та обговорення

Іони Са відіграють центральну роль у забезпеченні скорочення м'язових клітин, зокрема міомерія. Відомо, що  $Mg^{2+}$  широко використовують як токолітичний агент для пригнічення скорочення міомерія під час вагітності.  $Mg^{2+}$  пригнічує спонтанні міомеріальні скорочення у концентрації 3 мМ, а також інгібує окситоциніндуковані скорочення міомерія на 30–40% у концентрації 8 мМ [8]. Концентрація  $Mg^{2+}$  5–10 мМ є фармакологічною [9]. Мітохондрії задіяні у забезпеченні обміну кальцію у клітинах гладеньких м'язів [1, 2]. Мембранний потенціал мітохондрій є фактором, який забезпечує перебіг багатьох процесів, зокрема транспортування іонів до матрикса. Таким чином, дослідження впливу іонів Mg та Са на мембранний потенціал мітохондрій є важливим для подальшого розуміння закономірностей обміну цих катіонів у клітинах гладеньких м'язів.

Для проведення експериментів на фракції ізольованих мітохондрій міомерія за допомогою проточного цитометра було використано створений нами робочий протокол, який опи-

сано в попередніх роботах по дослідженню мітохондріального мембранного потенціалу [7] та акумуляції іонів Са в мітохондріях [10].

З використанням флуоресцентного зонда TMRM було показано, що ізольовані мітохондрії міомерія мають заряд на своїй внутрішній мембрані. Цей заряд є досить стабільним у часі і швидко дисипує за умов внесення 1 мкМ CCCP (рис. 1, крива 1). Внесення 7 мМ  $MgCl_2$  в середовище інкубації ізольованих мітохондрій призводить до гіперполяризації мітохондріальної мембрани (рис.1, крива 2). Про це свідчить збільшення інтенсивності флуоресценції потенціалчутливого зонда TMRM порівняно з контролем.

За початкової присутності в середовищі інкубації протоніофору CCCP (1 мкМ), як фактора дисипації електрохімічного потенціалу внутрішньої мембрани мітохондрій, такого ефекту  $Mg^{2+}$  не спостерігається (рис. 1, крива 3). Додавання протоніофору CCCP (1 мкМ) на 10-й хвилині інкубації і в контролі і за присутності  $Mg^{2+}$  призводить до швидкого зниження інтенсивності флуоресцентного сигналу (рис. 1).

На відміну від  $Mg^{2+}$ , який у концентрації 7 мМ викликає гіперполяризацію мітохондріальної мембрани, внесення у середовище інкубації 100 мкМ  $Ca^{2+}$  ( $CaCl_2$ ) призводить до деполаризації внутрішньої мембрани мітохондрій (рис. 2, крива 3) порівняно з контролем (рис. 2, крива 1). Найявніш у середовищі інку-

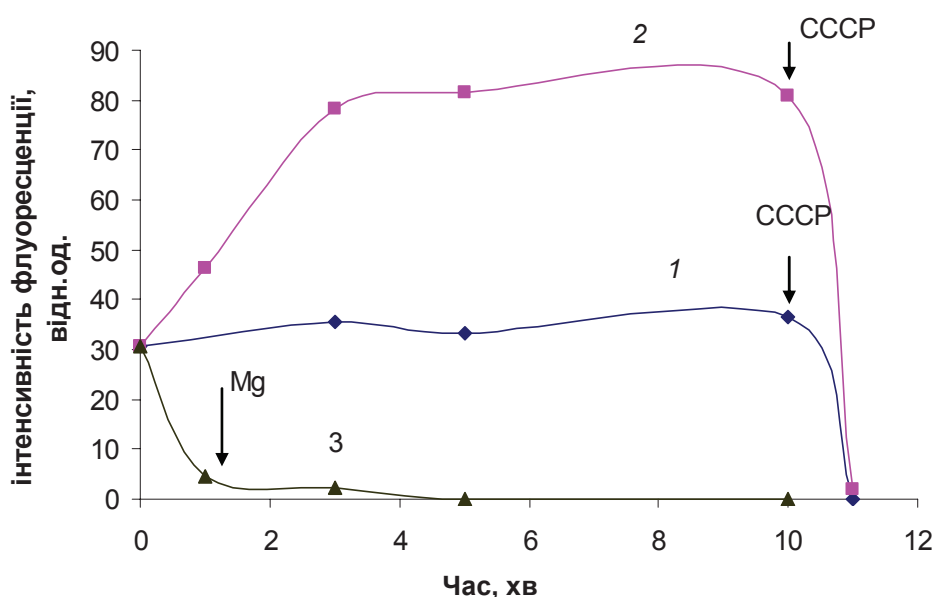


Рис. 1.  $Mg^{2+}$ -індукована гіперполяризація мембрани мітохондрій міомерія: 1 – контроль, 2 – 7 мМ  $Mg^{2+}$ , 3 – 1 мкМ CCCP, 7 мМ  $Mg^{2+}$ ; ↓ – момент додавання іонів Mg на 1-й хвилині та протоніофору CCCP на 10-й хвилині інкубації (кінцева концентрація 7 мМ та 1 мкМ відповідно)

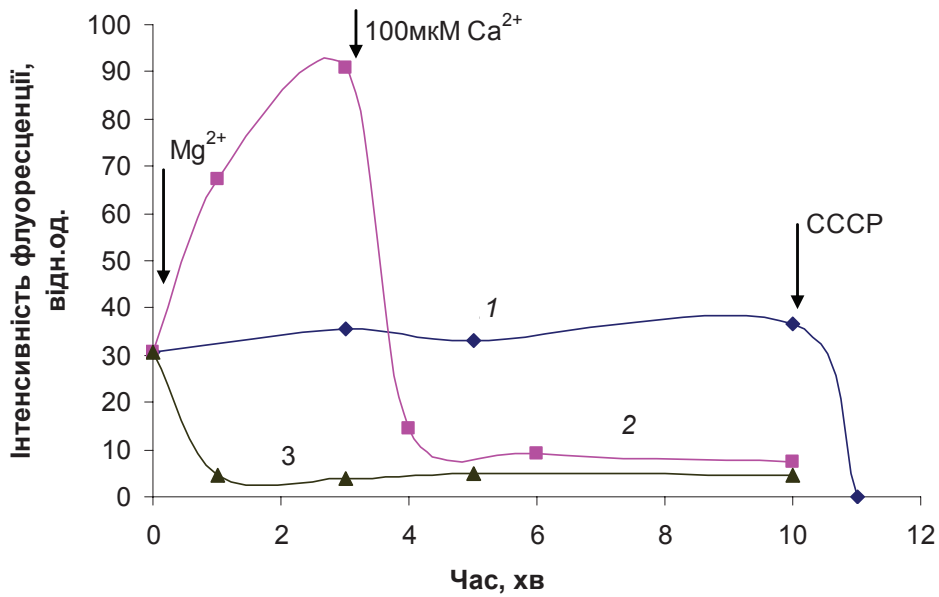


Рис. 2.  $\text{Ca}^{2+}$ -індукована деполаризація мембрани мітохондрій міомерія: 1 – контроль, 2 – 7мМ  $\text{Mg}^{2+}$ , 3 – 100 мкМ  $\text{Ca}^{2+}$ ; ↓ – момент додавання  $\text{Mg}^{2+}$  на 1-й хвилині (криві 2, 3),  $\text{Ca}^{2+}$  на 3-й хвилині (крива 2) та протонифору CCCP на 10-й хвилині інкубації (крива 1) (кінцева концентрація 7 мМ, 100 мкМ та 1 мкМ відповідно)

бації іонів Mg не запобігає деполаризувальному впливу іонів Ca (рис. 2, крива 2).

Як видно на рис. 3, деполаризація мітохондріальної мембрани за дії 100 мкМ  $\text{Ca}^{2+}$  (рис. 3, крива 2) сягає рівня, який тестується за умов дисипації мембранного потенціалу

мітохондрій азидом натрію  $\text{NaN}_3$  (10 мМ), відомим інгібітором цитохромоксидази мітохондрій (рис. 3, крива 3).

Таким чином, було встановлено, що іони Mg та Ca здатні змінювати рівень поляризації внутрішньої мембрани мітохондрій гладенько-

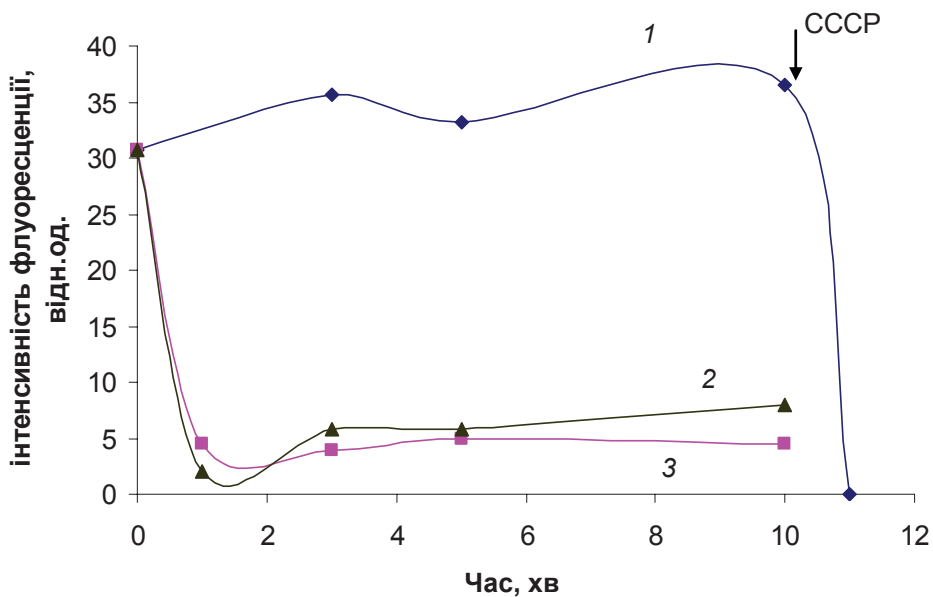


Рис. 3. Порівняльне дослідження впливу іонів Ca та азиду Na на поляризацію мембрани мітохондрій міомерія: 1 – контроль, 2 – 100 мкМ  $\text{Ca}^{2+}$ , 3 – 10 мМ  $\text{NaN}_3$ ; ↓ – момент додавання протонифору CCCP на 10-й хвилині інкубації (кінцева концентрація 1 мкМ)

го м'язу матки. Механізм впливу двовалентних катіонів на потенціал мітохондрій потребує подальших досліджень.

Автори вдячні член-кор. НАН України професору Костеріну С. О. за критичне обговорення результатів статті.

**ИЗМЕНЕНИЕ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА МИТОХОНДРИЙ ГЛАДКОЙ МЫШЦЫ МАТКИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ИОНОВ Mg И Ca**

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

Институт биохимии им. А. В. Палладина  
НАН Украины, Киев;  
e-mail: natalia\_naumova@ukr.net

С использованием метода проточной цитометрии и потенциалчувствительного флуоресцентного зонда TMRM исследовано влияние дивалентных катионов на мембранный потенциал изолированных митохондрий миометрия. Показано, что добавление в среду инкубации 7 мМ Mg<sup>2+</sup> индуцирует гиперполяризацию митохондриальной мембраны. При наличии в среде инкубации протонофора СССР (1 мкМ), как фактора диссипации мембранного потенциала митохондрий, такого эффекта Mg<sup>2+</sup> не наблюдается. Внесение 100 мкМ Ca<sup>2+</sup> приводит к деполяризации митохондриальной мембраны. Деполяризация митохондрий после добавления Ca<sup>2+</sup> достигает уровня, который наблюдается после добавления азидата натрия NaN<sub>3</sub> (10 мМ) – ингибитора цитохромоксидазы митохондрий. Также было показано, что присутствие в среде инкубации Mg<sup>2+</sup> (7 мМ) не препятствует деполяризации митохондрий под действием Ca<sup>2+</sup>.

Ключевые слова: проточная цитометрия, изолированные митохондрии, мембранный потенциал митохондрий.

**CHANGES OF MITOCHONDRIA MEMBRANE POTENTIAL OF THE UTERUS SMOOTH MUSCLE UNDER Mg<sup>2+</sup> AND Ca<sup>2+</sup> INFLUENCE**

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

Palladin Institute of Biochemistry, National  
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: natalia\_naumova@ukr.net

**S u m m a r y**

Using the method of flow cytometry and potential-sensitive fluorescent dye TMRM the effect

of divalent cations on the membrane potential of isolated myometrium mitochondria was studied. It was shown, that Mg<sup>2+</sup> (7 мМ) addition to the incubation medium induced mitochondrial membrane hyperpolarization. In the case of protonophore СССР (1 μМ) preliminary presence in the incubation medium, Mg<sup>2+</sup> addition did not lead to membrane potential hyperpolarization. Addition of Ca<sup>2+</sup> leads to membrane potential dissipation. Ca<sup>2+</sup>-induced mitochondrial depolarization is the same as NaN<sub>3</sub> (10 мМ) - induced depolarization. It also was shown that Mg<sup>2+</sup> (7 мМ) preliminary presence in the incubation medium did not protect mitochondria from Ca<sup>2+</sup>-induced depolarization.

Key words: flow cytometry, isolated mitochondria, mitochondrial membrane potential.

1. Костерин С. А. Транспорт кальция в гладких мышцах. – К.: Наук. думка, 1990. – 216 с.
2. Duchen M. R. // Mol. Aspects Med. – 2004. – 4. – P. 365–451.
3. Nicholls D. G. // Cell Calcium. – 2005. – 38, N 3–4. – P. 311–317.
4. Racay P. // Cell Biology International. – 2008. – 32. – P. 136–145.
5. Костерин С. А., Браткова Н. Ф., Курский М. Д. // Биохимия. – 1985. – 50, № 8. – С. 1350–1361.
6. Bradford M. M. // Anal Biochem. – 1976. – 72. – P. 248–254.
7. Бабіч Л. Г., Шлыкков С. Г., Наумова Н. В., Костерін С. О. // Укр. біохім. журн. – 2007. – 79, № 6. – С. 34–41.
8. Tica V. I., Tica A. A., Carling V., Banica O. S. // Gynecol Endocrinol. – 2007. – 23 (7). – P. 368–372.
9. Fomin V. P., Gibbs S. G., Vanam R. et al. // Am. J. Obstet Gynecol. – 2006. – 194 (5). – P. 1384–1390.
10. Бабіч Л. Г., Шлыкков С. Г., Наумова Н. В., Костерін С. О. // Укр. біохім. журн. – 2008. – 80, № 4. – С. 51–58.

Отримано 13.04.2009