

УДК 577.352.5

## РЕЄСТРАЦІЯ $K^+$ -РІВНОВАЖНОГО ПОТЕНЦІАЛУ НА ПЛАЗМАТИЧНІЙ МЕМБРАНІ КЛІТИН МІОМЕТРІЯ І ВИВЧЕННЯ ЙОГО МОДУЛЯЦІЇ $NO_x$ ТА $H_2O_2$ МЕТОДОМ ПРОТОВОЇ ЦИТОМЕТРІЇ

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

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

Доведено перспективність застосування протокової цитометрії із використанням потенціалчутливого зонда 3,3'-дигексилоксикарбоцианіну [ $DiOC_6(3)$ ] для дослідження формування  $K^+$ -рівноважного мембранного потенціалу на експериментальній моделі везикул плазматичної мембрани міометрія у присутності валіноміцину. Визначена цим методом величина трансмембранного потенціалу сумірна з розрахованою за рівнянням Нернста. Пероксид водню та  $NO_2^-$ , ймовірно, підвищують проникність мембрани для  $K^+$  і призводять до дисипації раніше наведеного потенціалу. Цей ефект відсутній за наявності в середовищі нітропрусида натрію.

Одержані нами результати підтверджують припущення щодо посилення пасивного транспортування іонів калію крізь сарколему за дії вищезазначених сполук і, відповідно, до реполяризації мембрани та зниження рівня збудливості сарколеми.

**Ключові слова:**  $K^+$ -рівноважний мембранний потенціал, сарколема, пероксид водню, оксиди азоту, протокова цитометрія.

Дослідження останніх років свідчать про можливу участь оксидів азоту і пероксиду водню у процесах тривалої релаксації міометрія на тлі зменшеної чутливості до утероконстрикторних агентів, що спостерігається під час вагітності за підвищеного рівня прогестерону у тканинах матки (прогестеронова блокада).  $NO_x$  та  $H_2O_2$  іноді виявляють односпрямовану функціональну активність, зокрема зумовлюють релаксацію клітин міометрія [1–5]. Одним із механізмів міорелаксаційного ефекту вважають активацію  $Ca^{2+}$ -залежних  $K^+$ -каналів сарколеми оксидом азоту шляхом окислення функціонально важливих сульфгідрильних груп або протеїнкіназа G-залежними шляхами. Активація  $K^+$ -каналів, імовірно, пов'язана з дією  $H_2O_2$  — фактора, що гіперполяризує гладенькі м'язи. Зважаючи на незначну роль cGMP у механізмах релаксації міометрія за дії оксиду азоту та пероксиду водню [2, 3], актуальності набуває вивчення їхнього безпосереднього впливу на мембрану, передусім на пасивне транспортування крізь неї  $K^+$  та на трансмембранний потенціал.

Досить зручною моделлю для вивчення впливу потенціалу на обмін катіонів є везикули плазматичної мембрани. Раніше в наших експериментах було встановлено, що фракція плазматичних мембран клітин міометрія свині

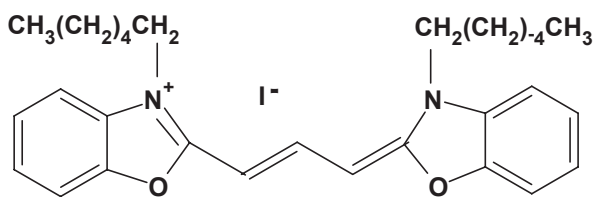
містить близько 80% везикульованих фрагментів [6, 7]. Цю модель апробовано в багатьох дослідженнях з вивчення дії хімічних речовин на сарколему [8].

Отже, метою роботи було довести, застосовуючи потенціалчутливий флуоресцентний зонд 3,3'-дигексилоксикарбоцианін [ $DiOC_6(3)$ ] і методи спектрофлуориметрії та протокової цитометрії, можливість формування трансмембранного потенціалу  $\Delta\phi$ , який за значенням відповідав би розрахованому за рівнянням Нернста, та дослідити можливий вплив нітрит-аніонів, нітропрусида натрію та пероксиду водню на його величину.

### Матеріали і методи

Фракцію сарколеми виділяли з міометрія свині методом диференційного центрифугування у градієнті густини сахарози як описано у статті [9]. Раніше нами було виявлено, що одержана фракція плазматичних мембран має, переважно, везикульовану структуру [6, 7].

Вміст протеїну визначали методом М. Bradford [10]. Середнє значення його в мембранній фракції становило 1,5–3,6 мг/мл. Мембранний потенціал реєстрували за зміною інтенсивності флуоресценції потенціалчутливого зонда 3,3'-дигексилоксикарбоцианіну [ $DiOC_6(3)$ ].



Препарат везикул сарколеми попередньо врівноважували упродовж 15–18 год при 4 °С в середовищі, що містило 300 мМ КСІ і 20 мМ НЕРЕС-Tris (рН 7,4).

Зміни флуоресценції DiOC<sub>6</sub>(3) методом спектрофлуориметрії ( $\lambda_{36} = 450$  нм,  $\lambda_{\text{фл}} = 506$  нм) вивчали за допомогою спектрофлуориметра Signe-4M (Латвія) в середовищі (об'єм 2 мл), що містило: 5 мкМ DiOC<sub>6</sub>(3), 20 мМ НЕРЕС-Tris (рН 7,4; температура – 37 °С), 150 мкг/мл протеїну і 0,5 мкМ валіноміцину. Потенціал певного значення створювали внесенням до розчину КСІ в різних концентраціях (температура – 37 °С), розрахованих за рівнянням Нернста, а іонну силу доводили до 300 мМ додаванням холінхлориду (ChCl) – варіанти експерименту 1–7:

1. 300 мМ  $[K^+]_i$ /300 мМ  $[K^+]_e$  ( $\Delta\phi = 0$  мВ),
2. 300 мМ  $[K^+]_i$ /250 мМ  $[K^+]_e$  + 50 мМ  $[Ch^+]_e$  ( $\Delta\phi = -4,9$  мВ),
3. 300 мМ  $[K^+]_i$ /200 мМ  $[K^+]_e$  + 100 мМ  $[Ch^+]_e$  ( $\Delta\phi = -10,8$  мВ),
4. 300 мМ  $[K^+]_i$ /150 мМ  $[K^+]_e$  + 150 мМ  $[Ch^+]_e$  ( $\Delta\phi = -18,5$  мВ),
5. 300 мМ  $[K^+]_i$ /100 мМ  $[K^+]_e$  + 200 мМ  $[Ch^+]_e$  ( $\Delta\phi = -29,3$  мВ),
6. 300 мМ  $[K^+]_i$ /50 мМ  $[K^+]_e$  + 250 мМ  $[Ch^+]_e$  ( $\Delta\phi = -47,8$  мВ),
7. 300 мМ  $[K^+]_i$ /30 мМ  $[K^+]_e$  + 270 мМ  $[Ch^+]_e$  ( $\Delta\phi = -61,5$  мВ).

$K^+$ -рівноважний потенціал у везикулярній мембранній системі визначали у присутності 0,5 мкМ валіноміцину (Val). Значення  $K^+$ -рівноважного потенціалу обчислювали за рівнянням Нернста:

$$\Delta\phi = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K^+]_e}{[K^+]_i}, \quad (1)$$

де  $[K^+]_e$  та  $[K^+]_i$  – концентрація іонів калію поза везикулами та всередині них відповідно.

У разі застосування протокового цитометра COULTER EPICS XLTM (Beckman Coulter, США) з аргонним лазером ( $\lambda_{36} = 488$  нм,  $\lambda_{\text{фл}} = 510$  нм) значення  $K^+$ -рівноважного потенціалу  $\Delta\phi$  обчислювали при 23 °С (варіанти досліду 1–7):

1. 300 мМ  $[K^+]_i$ /300 мМ  $[K^+]_e$  ( $\Delta\phi = 0$  мВ),
2. 300 мМ  $[K^+]_i$ /250 мМ  $[K^+]_e$  + 50 мМ  $[Ch^+]_e$  ( $\Delta\phi = -4,6$  мВ),
3. 300 мМ  $[K^+]_i$ /200 мМ  $[K^+]_e$  + 100 мМ  $[Ch^+]_e$  ( $\Delta\phi = -10,3$  мВ),
4. 300 мМ  $[K^+]_i$ /150 мМ  $[K^+]_e$  + 150 мМ  $[Ch^+]_e$  ( $\Delta\phi = -17,5$  мВ),
5. 300 мМ  $[K^+]_i$ /100 мМ  $[K^+]_e$  + 200 мМ  $[Ch^+]_e$  ( $\Delta\phi = -27,8$  мВ),
6. 300 мМ  $[K^+]_i$ /50 мМ  $[K^+]_e$  + 250 мМ  $[Ch^+]_e$  ( $\Delta\phi = -45,3$  мВ),
7. 300 мМ  $[K^+]_i$ /30 мМ  $[K^+]_e$  + 270 мМ  $[Ch^+]_e$  ( $\Delta\phi = -58,3$  мВ).

Концентрація пероксиду водню, нітрит-аніонів та нітропрусиду натрію (NPS) становила 50 мкМ. Для визначення впливу оксидів азоту та пероксиду водню на  $K^+$ -рівноважний потенціал використовували емпіричні формули. Інтенсивність флуоресценції DiOC<sub>6</sub>(3) розраховували у відносних одиницях (відн. од.), що відповідали б залежності флуоресценційної відповіді зонда від значення  $\Delta\phi$ , обчисленого за рівнянням Нернста.

Варіанти експериментів:

- Контроль:

$$\text{Ефект (відн. од.)} = \frac{\Delta PkPosX_{100}}{\Delta PkPosX_{300}}, \quad (2)$$

де  $\Delta PkPosX_{300}$  – різниця між положеннями піків до та після внесення до середовища валіноміцину при  $\Delta\phi = 0$  мВ ( $[K^+]_i = [K^+]_e = 300$  мМ);  $\Delta PkPosX_{100}$  – різниця між положеннями піків до та після внесення валіноміцину при  $\Delta\phi = -27,8$  мВ (300 мМ  $[K^+]_i$ /100 мМ  $[K^+]_e$  + 200 мМ  $[Ch^+]_e$ ).

-Вплив  $H_2O_2$ ,  $NO_2^-$  та NPS на флуоресценцію зонда за наявності градієнта  $K^+$  на мембрані:

$$\text{Ефект (відн. од.)} = \frac{\Delta PkPosX_{100(\text{ефектор})}}{\Delta PkPosX_{300(\text{ефектор})}}, \quad (3)$$

де  $\Delta PkPosX_{300(\text{ефектор})}$  – різниця між положеннями піків до та після внесення ефекторів ( $H_2O_2$ ,  $NO_2^-$ , NPS) за відсутності градієнта іонів калію ( $[K^+]_i = [K^+]_e = 300$  мМ);  $\Delta PkPosX_{100(\text{ефектор})}$  – різниця між положеннями піків до та після внесення  $H_2O_2$ ,  $NO_2^-$ , NPS за наявності градієнта  $K^+$ , спрямованого із внутрішньовезикулярного середовища назовні (300 мМ  $[K^+]_i$ /100 мМ  $[K^+]_e$  + 200 мМ  $[Ch^+]_e$ ).

- Дія  $H_2O_2$ ,  $NO_2^-$ , NPS на флуоресценцію зонда за наявності наведеного трансмембранного потенціалу (-27,8 мВ):

$$\text{Ефект (відн. од.)} = \frac{\Delta PkPosX_{100(Val+ефектор)}}{\Delta PkPosX_{300(Val+ефектор)}}, \quad (4)$$

де  $\Delta PkPosX_{300(Val+ефектор)}$  – різниця між положеннями піків до та після внесення валіноміцину,  $H_2O_2$ ,  $NO_2^-$  і NPS – за відсутності градієнта іонів калію ( $[K^+]_i = [K^+]_e = 300$  мМ);  $\Delta PkPosX_{100(Val+ефектор)}$  – різниця між положеннями піків до та після внесення валіноміцину,  $H_2O_2$ ,  $NO_2^-$  і NPS – за наявності градієнта  $K^+$  (300 мМ  $[K^+]_i/100$  мМ  $[K^+]_e + 200$  мМ  $[Ch^+]_e$ ).

- Вплив валіноміцину на флуоресцентну відповідь зонда після попереднього оброблення везикул  $H_2O_2$ ,  $NO_2^-$  та NPS:

$$\text{Ефект (відн. од.)} = \frac{\Delta PkPosX_{100(ефектор+Val)}}{\Delta PkPosX_{300(ефектор+Val)}}, \quad (5)$$

де  $\Delta PkPosX_{300(ефектор+Val)}$  – різниця між положеннями піків до та після внесення валіноміцину у присутності в середовищі  $H_2O_2$ ,  $NO_2^-$ , NPS та за відсутності градієнта іонів калію ( $[K^+]_i = [K^+]_e = 300$  мМ);  $\Delta PkPosX_{100(ефектор+Val)}$  – різниця між положеннями піків до та після внесення валіноміцину у присутності  $H_2O_2$ ,  $NO_2^-$ , NPS і наявності градієнта  $K^+$  (300 мМ  $[K^+]_i/100$  мМ  $[K^+]_e + 200$  мМ  $[Ch^+]_e$ ).

Для статистичного аналізу одержаних даних використовували пакет стандартних програм IBM PC.

У роботі застосовували такі реактиви: NERES (Sigma, США), трис-гідроксиметил-амінометан (Reanal, Угорщина), тритон X-100 (Merk, Німеччина), ЕГТА, 3,3'-дигексильоксикарбоціанін (Fluka, Швейцарія). Інші реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації чда та хч.

### Результати та обговорення

*Реєстрація  $K^+$ -рівноважного потенціалу на мембрані везикул сарколеми.* Реєстрацію трансмембранного потенціалу здійснювали за допомогою ліпофільного і позитивно зарядженого потенціалчутливого зонда DiOC<sub>6</sub>(3), що належить до ціанінових барвників [11]. Максимум його флуоресценції в буферному розчині (20 мМ NERES-Tris, 300 мМ KCl) становить 500 нм, а спектр збудження флуоресценції – має два максимуми (450 та 488 нм). Інтенсивність флуоресценції зонда лінійно зростає в межах 0–26 мкМ з подальшим насиченням зі збільшенням його концентрації. Внесення суспензії везикул до реакційного середовища підвищує інтенсивність флуоресценції та зміщує її максимум до довгохвильової області (506 нм), що, ймовірно, пояснюється

зв'язуванням DiOC<sub>6</sub>(3) з мембранами. Для вибору оптимального співвідношення концентрації зонда та суспензії мембран досліджували залежність інтенсивності флуоресценції зонда від концентрації та кількості протеїну у пробі (50, 100 та 150 мкг/мл). Максимальну інтенсивність флуоресценції зареєстровано при 5 мкМ концентрації зонда та вмісті протеїну 150 мкг/мл суспензії плазматичних мембран. Для створення трансмембранного потенціалу суспензію везикул із 300 мМ іонів калію у внутрішньовезикулярному середовищі вносили до буферного розчину, концентрація  $K^+$  у якому становила від 30 до 300 мМ.

Одержані нами дані свідчать (рис. 1, а), що внесення суспензії везикул до реакційного середовища спричинює помірне зростання інтенсивності флуоресценції DiOC<sub>6</sub>(3). Відповідно до даних літератури [12, 13] швидкий вихід  $K^+$  із везикул за градієнтом концентрації після внесення до середовища валіноміцину зумовлює створення на внутрішній поверхні везикулярної мембрани від'ємного заряду, внаслідок чого позитивно заряджені молекули зонда акумулюються у внутрішньовезикулярному середовищі. Це може спричинити короткотривалий спалах світіння зонда. Як впливає з результатів типового експерименту (рис. 1, а), валіноміцин дійсно індукує істотний спалах флуоресценції, який ми умовно позначили  $\Delta F$ . На другій стадії процесу зонд димеризується через високу концентрацію всередині везикул, що, у свою чергу, зумовлює стрімке гасіння флуоресценції ( $\Delta I$ ) [12, 13], причому ступінь її залежить від величини градієнта  $K^+$ , спрямованого із внутрішнього середовища везикул до позавезикулярного. Пізніше спостерігається повільне зростання інтенсивності флуоресценції, яке, ймовірно, пов'язано з дисипацією потенціалу на мембрані.

Нами встановлено, що базальна флуоресценція DiOC<sub>6</sub>(3) та її інтенсивність після внесення до середовища суспензії везикул майже не залежить від концентрації іонів калію в буферному розчині (графічні дані не наведено). Водночас, на величину спалаху флуоресценції зонда у присутності валіноміцину впливає концентрація в ньому  $K^+$ . Але криві залежності відносної зміни флуоресценції зонда ( $\Delta F/F_0$ ) та величини потенціалу, обчисленого за рівнянням Нернста ( $-\Delta\phi$ ), від зміни концентрації  $K^+$  ззовні везикул повністю не збігаються (рис. 1, б). Отже, відносне зростання флуоресценції на першому етапі акумуляції зонда безпосередньо не пов'язане з величиною обчисленого трансмембранного потенціалу. Однак дані літератури свідчать [11], що існує

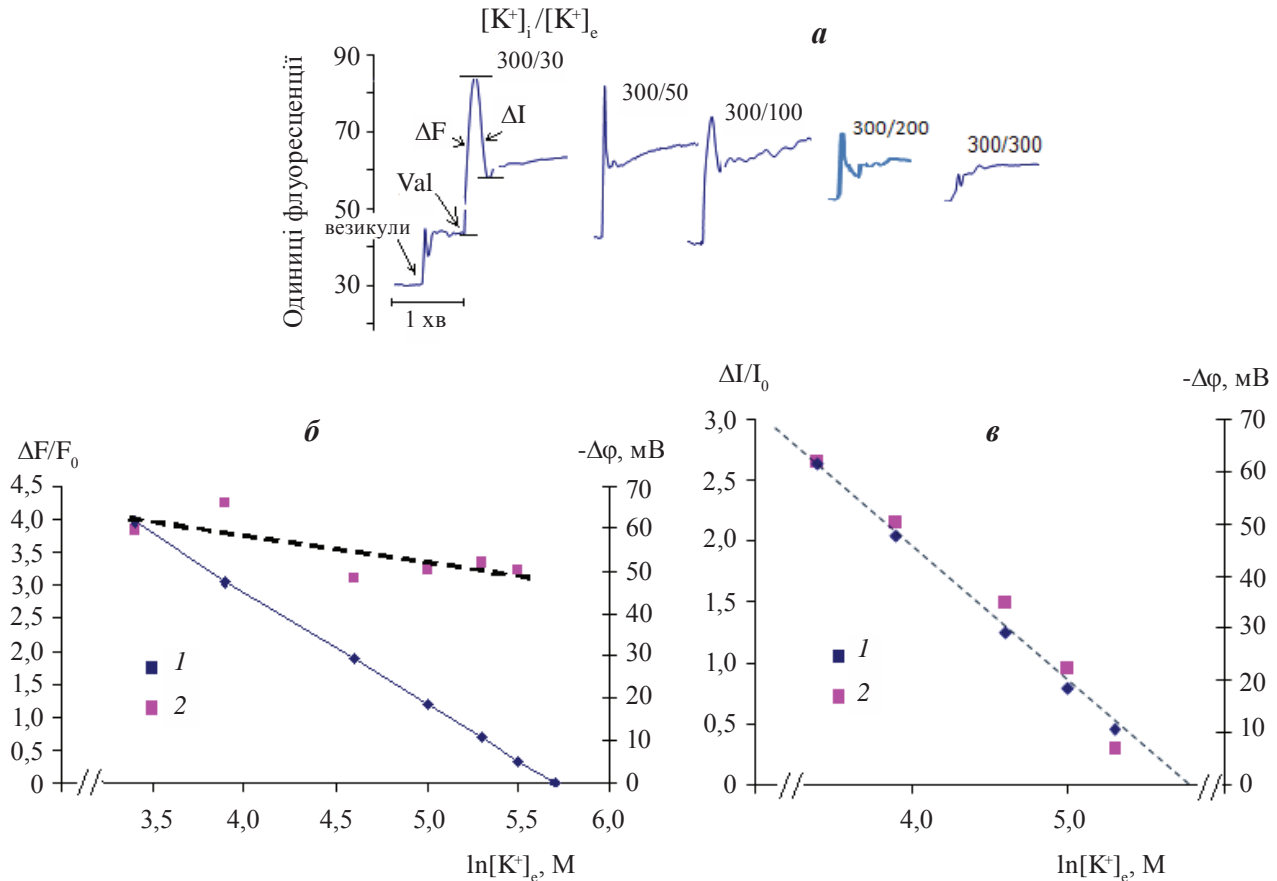


Рис. 1. Реєстрація  $K^+$ -рівноважного мембранного потенціалу на мембрані везикул сарколеми із використанням потенціалчутливого флуоресцентного зонда  $DiOC_6(3)$  ( $Val - 0,5 \mu M$  валіноміцину): а – флуоресцентна відповідь зонда, яка залежить від величини калієвого градієнта, спрямованого у позавезикулярне середовище; б – вплив  $[K^+]_e$  на відносну інтенсивність ( $\Delta F/F_0$ ) спалаху флуоресценції  $DiOC_6(3)$  при внесенні валіноміцину до середовища інкубації; в – вплив  $[K^+]_e$  на відносну інтенсивність ( $\Delta I/I_0$ ) гасіння флуоресценції  $DiOC_6(3)$  після внесення валіноміцину до середовища інкубації. 1 – Значення  $\Delta\phi$ , розраховане за рівнянням Нернста при  $37^\circ C$ ; 2 – везикули типу  $[K^+]_i/[K^+]_e + [Ch^+]_e$ ;  $F_0$  та  $I_0$  – зміни інтенсивності флуоресценції при  $\Delta\phi = 0$  мВ ( $[K^+]_i = [K^+]_e = 300$  мМ),  $\Delta F$  та  $\Delta I$  – зміни інтенсивності флуоресценції залежно від концентрації позавезикулярного калію ( $[K^+]_i/[K^+]_e + [Ch^+]_e$ )

пряма залежність між димеризацією зонда, гасінням флуоресценції та величиною  $\Delta\phi$  на мембрані. Інтенсивність гасіння флуоресценції збільшується зі зменшенням концентрації  $K^+$  в зовнішньому середовищі (зі збільшенням  $\Delta\phi$ ). У цьому разі крива залежності відносного гасіння флуоресценції зонда ( $\Delta I/I_0$ ) майже збігається із кривою відповідної залежності  $\Delta\phi$ , обчисленого за рівнянням Нернста, від зміни концентрації  $K^+$  у позавезикулярному просторі (рис. 1, в). Отже, на мембрані везикул формується  $K^+$ -рівноважний потенціал (всередині них від'ємний), значення якого визначається величиною калієвого градієнта.

У присутності детергенту – 0,1%-го дигітоніну – флуоресцентна відповідь зонда аналогічна такій, як у везикулах типу 300 мМ

$[K^+]_i/300$  мМ  $[K^+]_e$ , так і 300 мМ  $[K^+]_i/30$  мМ  $[K^+]_e + 270$  мМ  $[Ch^+]_e$ . Це свідчить, що в разі порушення цілісності везикул сарколеми потенціал не формується.

Отже, флуоресцентний потенціалчутливий зонд  $DiOC_6(3)$  можна використовувати для реєстрації  $K^+$ -рівноважного трансмембранного потенціалу  $\Delta\phi$ , який за величиною є сумірним із потенціалом, розрахованим за рівнянням Нернста.

Використання методу протокової цитометрії уможливорює якісний та кількісний аналіз біологічних та фізичних властивостей клітин і субклітинних структур за кількома параметрами одночасно: розміром (величиною прямого світлорозсіювання FS), гранулярністю (бічним світлорозсіюванням SS) і інтенсивністю флуо-



ресцентного сигналу при різних довжинах хвиль у видимому діапазоні спектра (FL1-FL4) [14–15]. У цих дослідженнях використовували канал флуоресценції FL1. На рис. 2 репрезентовано типові результати дослідів. Положення піка PkPosX відповідає інтенсивності флуоресценції більшості везикул у загальній популяції. Зміщення PkPosX залежить від значення калієвого градієнта, який спрямовується із внутрішньовезикулярного середовища: відстань між положеннями контрольного піка (PkPosX<sub>0</sub> – везикули + зонд) та піка після додавання валіноміцину (PkPosX<sub>val</sub> – везикули + зонд + Val) зменшується зі збільшенням градієнта калію. Через 2–3 хв відбувається поступова дисипація наведеного потенціалу Δφ, що визначається зміщенням PkPosX у напрямку збільшення інтенсивності флуоресценції

(вправо). Відповідні криві залежності інтенсивності флуоресценції від часу за різних значень початкового потенціалу наведено на рис. 3. Чим менше значення наведеного потенціалу (градієнт K<sup>+</sup>), тим більше зростання інтенсивності, оскільки дисипація градієнта також прискорюється. Внесення до середовища інкубації з наведеним потенціалом Δφ = -45,3 мВ (300 мМ [K<sup>+</sup>]<sub>i</sub>/50 мМ [K<sup>+</sup>]<sub>e</sub> + 250 мМ [Ch<sup>+</sup>]<sub>e</sub>) 0,05%-го тритону X-100 призводить до зміни положення піка в бік підвищення інтенсивності флуоресценції. Водночас, за відсутності потенціалу на мембрані зміщення піка не спостерігається (графічні дані не наведено). У подальших дослідженнях ми обчислювали різницю між інтенсивністю флуоресценції до (PkPosX<sub>0</sub>) та після додавання валіноміцину (PkPosX<sub>val</sub>), що характеризує флуоресцентну

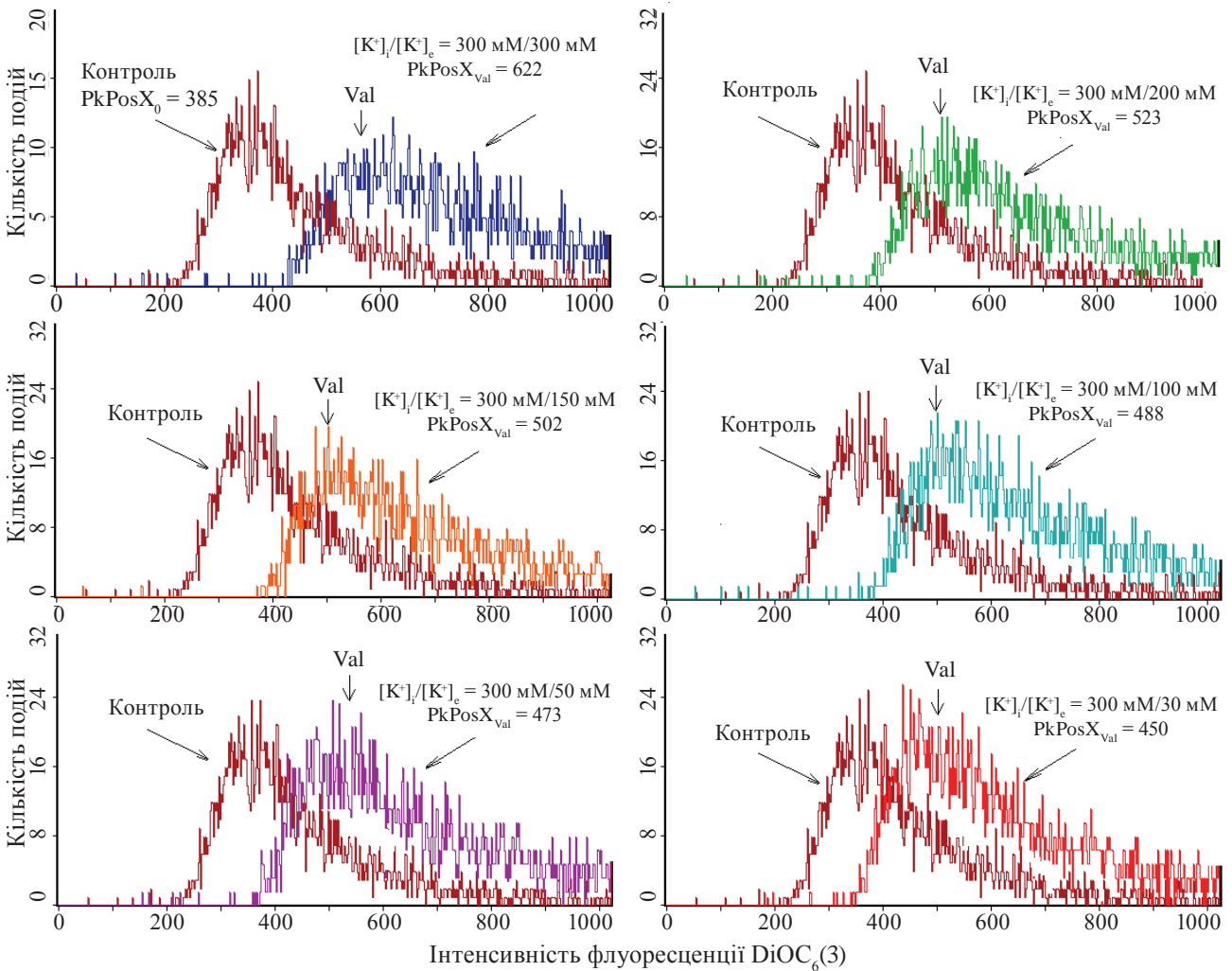


Рис. 2. Вплив 0,5 мкМ валіноміцину (Val) на флуоресценцію DiOC<sub>6</sub>(3). PkPosX<sub>0</sub> – інтенсивність флуоресценції DiOC<sub>6</sub>(3) перед внесенням до середовища інкубації валіноміцину, PkPosX<sub>val</sub> – інтенсивність флуоресценції DiOC<sub>6</sub>(3) після його внесення. Дані типового дослідів

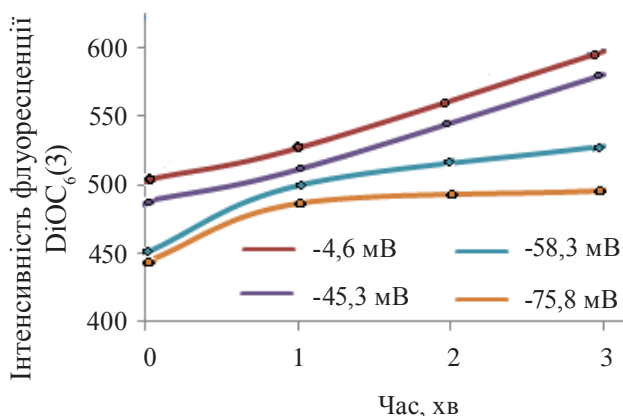


Рис. 3. Динаміка зміни інтенсивності флуоресценції  $\text{DiOC}_6(3)$  після внесення валіноміцину до суспензії везикул. Дані типового експерименту

відповідь  $\text{DiOC}_6(3) - \Delta \text{PkPosX}_n$  – при неоднаковій концентрації іонів калію в середовищі. Таким чином:

$$\Delta \text{PkPosX}_n = \text{PkPosX}_{\text{val}} - \text{PkPosX}_0,$$

де  $n$  – концентрація  $\text{K}^+$  в мМ в середовищі інкубації.

Відповідно до одержаних даних було побудовано калібрувальну криву, яка віддзеркалює взаємозв'язок між флуоресцентною відповіддю зонда при різних концентраціях  $\text{K}^+$  в середовищі та величиною потенціалу, обчисленого за рівнянням Нернста (рис. 4). Як випливає з рис. 4, пряма залежність між флуоресцентною відповіддю зонда та розрахованим  $\Delta \phi$  спостерігається лише при зміні наведеного потенціалу – від  $-58,3$  мВ до  $-10,3$  мВ. У разі зменшення потенціалу (тобто зниженні градієнта  $\text{K}^+$ ) спостерігається відхилення від

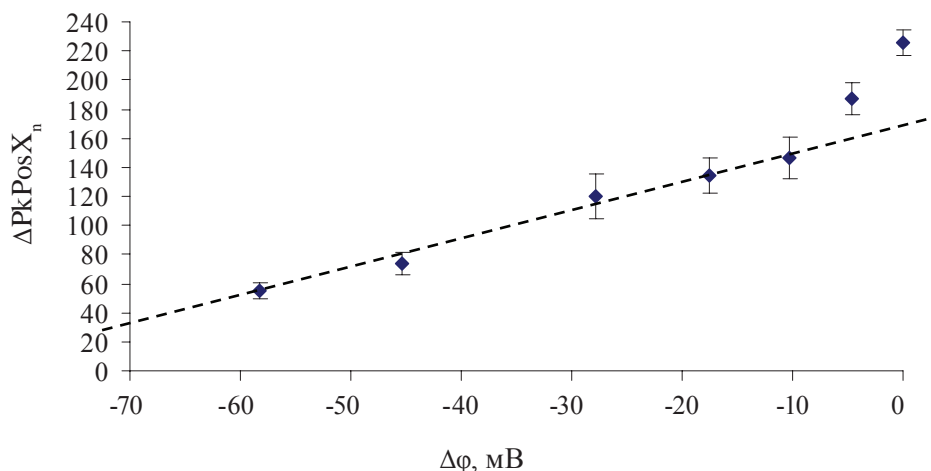


Рис. 4. Залежність флуоресцентної відповіді зонда ( $\Delta \text{PkPosX}_n$ ) від значення  $\Delta \phi$ , обчисленого за рівнянням Нернста ( $M \pm m$ ,  $n = 5$ ); коефіцієнт кореляції  $r = 0,97 \pm 0,02$

лінійної залежності, що потребує подальшого з'ясування. Величина відносної флуоресцентної відповіді зонда (виражена у відн. од.) при зміні концентрації  $\text{K}^+$  від 30 до 200 мМ у позавезикулярному середовищі наближається до значень  $\Delta \phi$ , розрахованих за рівнянням Нернста (рис. 5).

Отже, проведені експерименти з використанням потенціалчутливого зонда  $\text{DiOC}_6(3)$  свідчать про можливість тестування штучного  $\text{K}^+$ -рівноважного потенціалу  $\Delta \phi$  на мембрані везикул сарколеми міоцитів методом протокової цитометрії, який за значенням відповідає потенціалу, обчисленого за рівнянням Нернста.

Вивчення впливу нітрит-аніонів,  $\text{NPS}$  і  $\text{H}_2\text{O}_2$  на флуоресценцію зонда  $\text{DiOC}_6(3)$  в разі формування  $\text{K}^+$ -рівноважного трансмембранного потенціалу у везикульованій фракції сарколеми. Проведеними дослідженнями встановлено, що за відсутності градієнта  $\text{K}^+$  і, відповідно, трансмембранного потенціалу валіноміцин,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NPS}$  істотно впливають на інтенсивність флуоресценції  $\text{DiOC}_6(3)$ , унаслідок чого спостерігається зміщення піків кривих у координатах – кількість подій, інтенсивність флуоресценції  $\text{DiOC}_6(3)$  – в бік інтенсивності, тобто в напрямі підвищення квантового виходу (типові результати дії  $\text{H}_2\text{O}_2$  наведено на рис. 6; для інших речовин напрям зміщення піків аналогічний). Імовірно, це явище можна пояснити впливом досліджуваних сполук на взаємодію зонда з мембраною, оскільки, згідно з даними літератури та результатами наших експериментів, наведених вище, квантовий вихід  $\text{DiOC}_6(3)$  в разі взаємодії із протеїн-ліпідними комплексами зростає. Зазначені вище попередні дослідження обумовили доцільність ви-

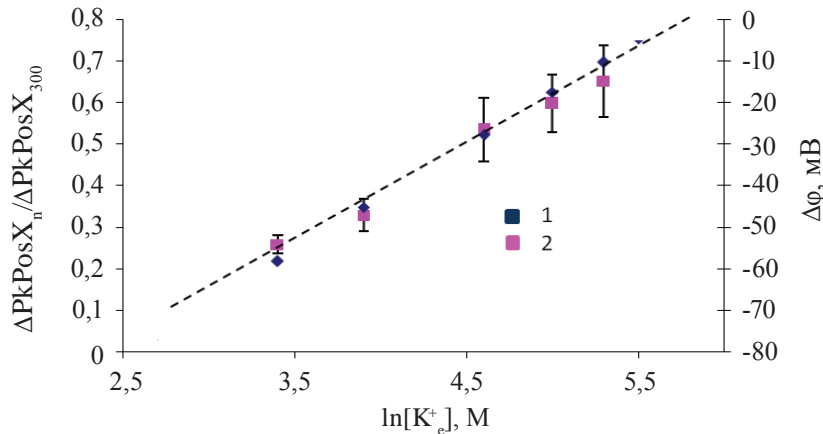


Рис. 5. Вплив  $[K^+]_e$  на флуоресцентну відповідь  $DiOC_6(3)$ :  $\Delta PkPosX_{300}$  – різниця між положеннями піків при  $\Delta\phi = 0$  мВ ( $[K^+]_i = [K^+]_e = 300$  мМ),  $\Delta PkPosX_n$  – різниця між положеннями піків при неоднакових значеннях  $\Delta\phi$  ( $[K^+]_i/[K^+]_e + [Ch^+]_e$ ). 1 – величина  $\Delta\phi$ , розрахована за рівнянням Нернста (температура 23 °С), 2 – везикули типу  $[K^+]_i/[K^+]_e + [Ch^+]_e$  ( $M \pm m, n = 5$ ). Коефіцієнт кореляції  $r = 0,98 \pm 0,03$

раження наших подальших результатів у відн. од. флуоресценції. Цей спосіб обчислення враховує неспецифічні зміни флуоресцентної відповіді (емпіричні формули наведено в розділі «Матеріали і методи»). Розподіл інтенсивності флуоресценції в координатах FL1/SS (інтенсивність флуоресценції, бічне світлорозсіювання, рис. б) свідчить, що під час експериментів структура везикул залишається стабільною, а змінюється лише інтенсивність флуоресценції зонда.

Для з'ясування впливу оксидів азоту і пероксиду водню на інтенсивність флуоресценції зонда та  $\Delta\phi$  було вибрано такі варіанти постановки експериментів (відповідні результати наведено на рис. 7):

1. Контроль. Відношення флуоресцентної відповіді  $DiOC_6(3)$  у присутності на мембрані градієнта  $K^+$  (300 мМ  $[K^+]_i$  / 100 мМ  $[K^+]_e + 200$  мМ  $[Ch^+]_e$ ,  $\Delta\phi = -27,8$  мВ) до флуоресцентної відповіді зонда за відсутності градієнта ( $[K^+]_i = [K^+]_e = 300$  мМ,  $\Delta\phi = 0$  мВ). Емпіричну формулу (2) наведено в «Матеріалах і методах».

2. Дія  $H_2O_2$ ,  $NO_2^-$ , NPS на флуоресценцію зонда (відн. од.) у присутності градієнта  $K^+$ , але за відсутності валіноміцину, тобто попередньої відсутності потенціалу на мембрані). Емпірична формула (3).

3. Вплив  $H_2O_2$ ,  $NO_2^-$ , NPS у разі внесення їх до середовища інкубації та формування  $\Delta\phi = -27,8$  мВ на мембрані (тобто після внесення валіноміцину до середовища). Емпірична формула (4).

4. Флуоресцентна відповідь  $DiOC_6(3)$  у присутності градієнта  $K^+$  на мембрані і послі-

довному додаванні до середовища  $H_2O_2$ ,  $NO_2^-$ , NPS та валіноміцину. Емпірична формула (5).

Значення флуоресцентної відповіді  $DiOC_6(3)$  у відн. од. за наявності градієнта  $K^+$  (300 мМ  $[K^+]_i$  / 100 мМ  $[K^+]_e + 200$  мМ  $[Ch^+]_e$ ) становило  $0,63 \pm 0,07$  ( $n = 14$ ) і відповідало  $\Delta\phi = -27,8$  мВ, обчисленого за рівнянням Нернста (контроль, варіант експерименту 1). Одиницею вважали флуоресцентну відповідь зонда за відсутності градієнта іонів калію ( $[K^+]_i = [K^+]_e = 300$  мМ,  $\Delta\phi = 0$  мВ). Виявлено, що  $H_2O_2$  та  $NO_2^-$ , найімовірніше, підвищують проникність мембрани до іонів калію, що приводить до можливої поляризації мембрани та відповідної зміни величини флуоресцентної відповіді зонда, яка досягає розрахованої для  $\Delta\phi = -27,8$  мВ (варіант експерименту 2). Цього ефекту не виявлено в дослідах із NPS.

Внесення  $H_2O_2$  та  $NO_2^-$  до середовища інкубації після утворення потенціалу на плазматичній мембрані (варіант експерименту 3), вірогідно, спричинює дисипацію штучно наведеного потенціалу, оскільки величина флуоресцентної відповіді наближається до 1 (відсутність потенціалу). Внесення NPS на флуоресцентну відповідь ( $\Delta\phi$ ) не впливає. У варіанті досліду 4 після попереднього внесення до середовища інкубації пероксиду водню (перед додаванням валіноміцину) флуоресцентна відповідь зонда, а отже  $\Delta\phi$  і  $K^+$ -проникність, вірогідно підвищується ( $0,50 \pm 0,06$ ,  $n = 5$ ) порівняно з потенціалом, сформованим за дії лише валіноміцину. Це дає підставу припустити, що мембранні механізми формування потенціалу за участю валіноміцину та  $H_2O_2$  за штучного градієнта  $K^+$  на мембрані неодна-

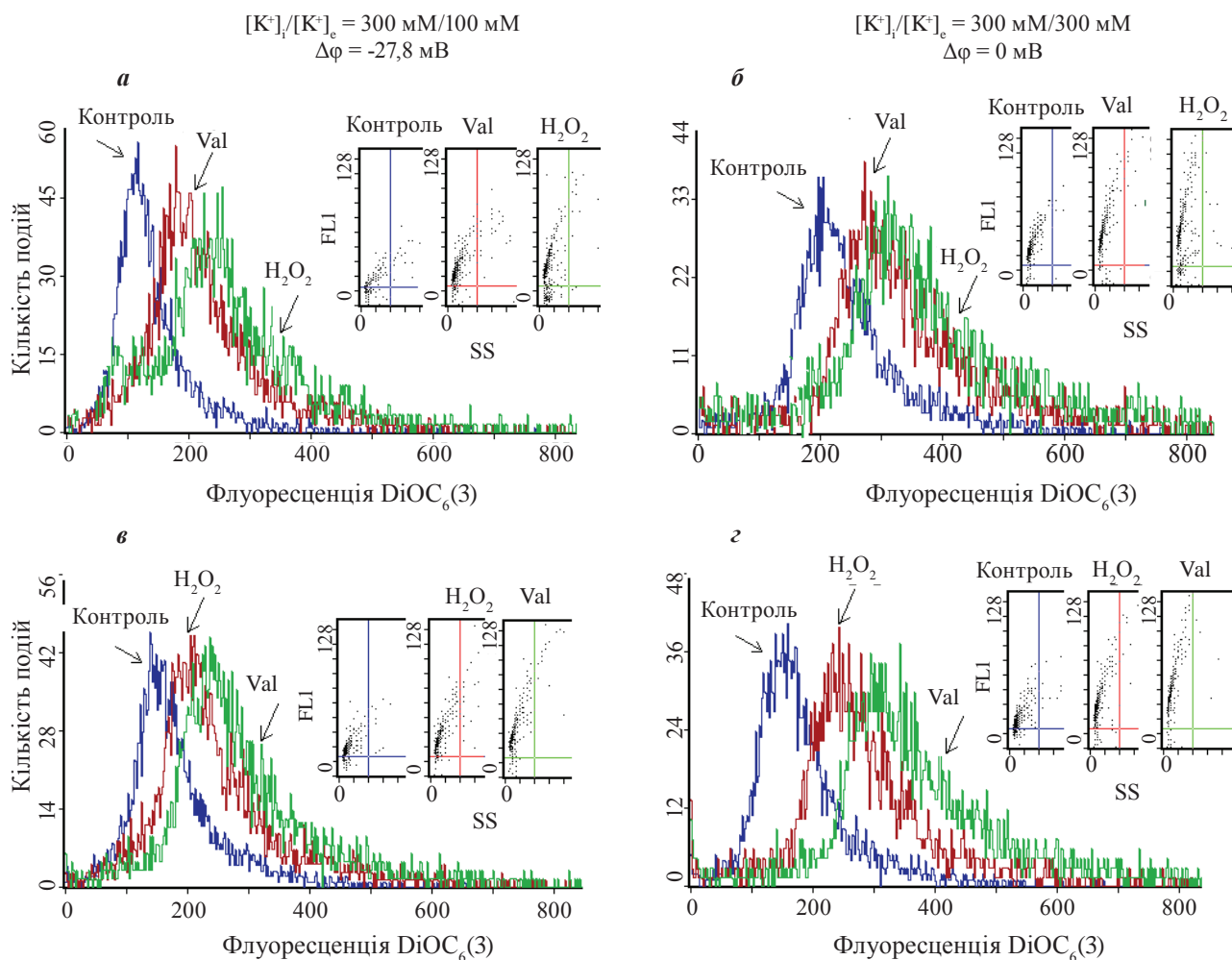


Рис. 6. Вплив H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на інтенсивність флуоресценції DiOC<sub>6</sub>(3): а, в – зміни інтенсивності флуоресценції DiOC<sub>6</sub>(3) у присутності градієнта K<sup>+</sup> на мембрані (300 мМ [K<sup>+</sup>]<sub>i</sub>/100 мМ [K<sup>+</sup>]<sub>e</sub> + 200 мМ [Ch<sup>+</sup>]<sub>e</sub>, Δφ = -27,8 мВ); б, г – зміни інтенсивності флуоресценції DiOC<sub>6</sub>(3) за відсутності градієнта K<sup>+</sup> на мембрані ([K<sup>+</sup>]<sub>i</sub> = [K<sup>+</sup>]<sub>e</sub> = 300 мМ, Δφ = 0 мВ). Дані типового експерименту

кові. Окисли азоту практично не впливають на величину флуоресцентної відповіді порівняно з контролем в цьому варіанті експерименту. Відсутність ефекту нітрит-аніонів, як і в експериментах із NPS, потребують подальших досліджень. За наявності в середовищі нітропрусиду натрію суттєвим є наявність у середовищі, окрім окислів азоту, катіонів заліза та ціанід-аніонів.

Отже, дані різних варіантів експерименту свідчать про можливість підвищення проникності мембрани до іонів калію за дії H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> та NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Екстраполяція цих результатів на інтактні клітини уможливує припущення щодо посилення пасивного транспортування калію з міоцитів, яке супроводжується відповідною реполяризацією мембрани. *In vivo* це має спри-

чинити зниження рівня збудження сарколеми. В наших попередніх дослідженнях, здійснених на суспензії міоцитів та везикульованій фракції плазматичної мембрани, виявлено, що окиси азоту і пероксид водню підвищують рН міоплазми та транспортування протонів у сарколемі за градієнтом концентрації, а також пасивне транспортування Ca<sup>2+</sup> в окремих експериментальних моделях. Локальне зростання рН та [Ca<sup>2+</sup>] зумовлює потужну активацію Ca<sup>+</sup>-залежних K<sup>+</sup>-каналів, що доповнює результати, наведені в цій роботі. Вірогідний напрям наших подальших досліджень – це використання інтактних міоцитів для вивчення змін мембранного потенціалу, що наблизить експерименти до фізіологічних умов.



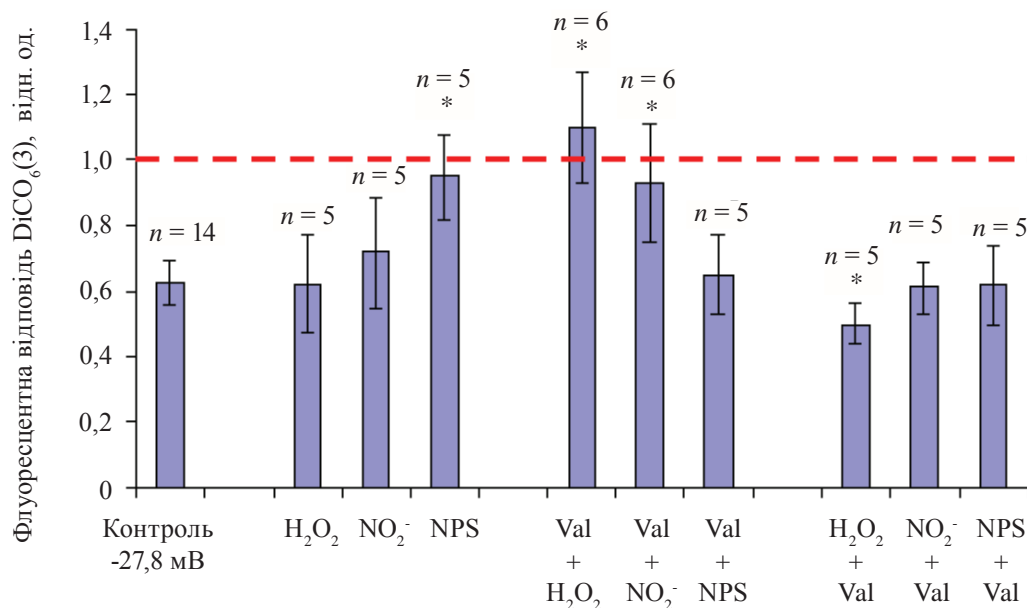


Рис. 7. Вплив H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, та NPS на величину K<sup>+</sup>-рівноважного трансмембранного потенціалу плазматичної мембрани. За відн. од. прийнято зміни флуоресценції в разі відсутності градієнта іонів калію ([K<sup>+</sup>]<sub>i</sub> = [K<sup>+</sup>]<sub>e</sub> = 300 мМ, Δφ = 0 мВ). \* Дані відносно контролю (Δφ = -27,8 мВ, 300 мМ [K<sup>+</sup>]<sub>i</sub>/100 мМ [K<sup>+</sup>]<sub>e</sub> + 200 мМ [Ch<sup>+</sup>]<sub>e</sub>) вірогідні, P ≤ 0,05

**РЕГИСТРАЦИЯ  
K<sup>+</sup>-РАВНОВЕСНОГО ПОТЕНЦИАЛА  
НА ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЕ  
ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК  
И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО МОДУЛЯЦИИ  
NO<sub>x</sub> ТА H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ  
ЦИТОМЕТРИИ**

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

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

Показана возможность использования метода проточной цитометрии для исследования формирования K<sup>+</sup>-равновесного мембранного потенциала на экспериментальной модели везикул плазматической мембраны миомеритрия в присутствии валиномицина с использованием потенциалчувствительного зонда 3,3'-дигексилосилокарбоцианина [DiOC<sub>6</sub>(3)]. Величина трансмембранного потенциала соответствует рассчитанной по уравнению Нернста.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, вероятно, увеличивают проницаемость мембраны для K<sup>+</sup> и приводят к диссипации ранее наведенного потенциала. Данный эффект не характерен для нитропрусида натрия. Полученные результаты предполагают возможность усиления пассивного транспорта ионов калия сарколеммой

при действии вышеуказанных соединений с соответствующей реполяризацией мембраны и снижением уровня ее возбудимости.

Ключевые слова: K<sup>+</sup>-равновесный мембранный потенциал, сарколемма, пероксид водорода, оксиды азота, проточная цитометрия.

**REGISTRATION OF K<sup>+</sup>-EQUILIBRIUM  
POTENTIAL IN MYOMETRIUM CELL  
PLASMA MEMBRANE AND STUDY OF  
ITS MODULATION OF NO<sub>x</sub> AND H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
USING FLOW CYTOMETRY METHOD**

G. V. Danylovych, Yu. V. Danylovych,  
V. F. Gorchev

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

**S u m m a r y**

Prospects of the use of flow cytometry analysis for investigation of forming K<sup>+</sup>- equilibrium membrane potential on the experimental model of myometrium plasma membrane vesicles in the presence of valinomycin using potential-sensitive probe of DiOC<sub>6</sub>(3). Transmembrane potential magnitude corresponds to magnitude by Nernst's equation.

$H_2O_2$  and  $NO_2^-$ , probably, increase permeability of membrane for  $K^+$  and result in potential dissipation. Given effect is not shown for sodium nitroprusside. The obtained results confirm an assumption as to enhancing the passive transport for  $K^+$  through sarcolemma under the action of these substances, that can lead to membrane repolarisation and decline of the level of its excitability.

**Key words:** hydrogen peroxide, nitric oxide, flow cytometry,  $K^+$ -equilibrium membrane potential, sarcolemma.

1. *Sladek S. M., Magness R. R., Conrad K. P.* // *Am. J. Physiol.* – 1997. – **272**, N 41. – P. R. 444–463.
2. *Buxton I. L.* // *Mol. Pharmacol.* – 2004. – **65**, N 5. – P. 1051–1059.
3. *Warren A. Y., Matharoo-Ball B., Shaw R. W., Khan R. N.* // *Reproduction.* – 2005. – **130**. – P. 539–544.
4. *Chung D., Caruso R. L.* // *Toxicol. Sci.* – 2006. – **93**, N 1. – P. 172–179.
5. *Matoba T., Shimokawa H.* // *J. Pharmacol. Sci.* – 2003. – **92**. – P. 1–6.
6. *Шкрабак О., Данилович Г., Веклич Т.* // *Вісн. КНУ. Біол.* – 2006. – **47–48**. – С. 55–57.
7. *Данилович Ю. В., Тугай В. А.* // *Укр. біохім. журн.* – 2001. – **73**, № 1. – С. 48–53.
8. *Бабич Л. Г., Фомин В. П., Костерин С. А.* // *Биохимия.* – 1990. – **55**, № 10. – С. 1890–1901.
9. *Кондратюк Т. П., Быченко С. Ф., Прищепна Л. А. и др.* // *Укр. біохім. журн.* – 1986. – **58**, № 4. – С. 50–56.
10. *Bradford M. M.* // *Anal. Biochem.* – 1976. – **72**, N 1. – P. 248–282.
11. *Brewis I. A., Morton I. A., Mohammad S. N. et al.* // *J. Andrology.* – 2000. – **21**, N 2. – P. 238–249.
12. *Добрецов Г. Е.* Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. – М.: Наука. 1989. – 277 с.
13. *Косников В. В.* // *Укр. біохім. журн.* – 1990. – **62**, № 1. – С. 3–15.
14. *Болдырев А. А., Юнева М. О.* // *Сорос. образоват. журн.* – 2004. – **8**, № 2. – С. 7–14.
15. *Бабич Л. Г., Шликов С. Г., Наумова Н. В., Костерин С. О.* // *Укр. біохім. журн.* – 2007. – **79**, № 6. – С. 34–41.

Отримано 12.07.2009