

Ю.В. Данилович, О.В. Коломієць, Г.В. Данилович, С.О.Костерін

Оксид азоту як один із регуляторів енергозалежного транспорту Ca^{2+} в мітохондріях міомеріа

Досліджено вплив донора та попередника NO, а саме 100 мкмоль/л нітропрусиду натрію та нітриту натрію на енергозалежний транспорт Ca^{2+} в ізольовані мітохондрії міомеріа щурів. Зміни концентрації Ca^{2+} в матриксі мітохондрій оцінювали за допомогою методу спектрофлуориметрії та кальційчутливого зонда Fluo-4 AM. Mg^{2+} -АТФ-залежна акумуляція Ca^{2+} мітохондріями за наявності сукцинату суттєво стимулюється оксидом азоту, зокрема, нітропрусид натрію посилював транспорт в 1,6 раза відносно його контрольних значень. Ефект NO ставав значущим лише за умови попередньої інкубації мітохондрій з досліджуваними сполуками. Оскільки акумуляція Ca^{2+} за наявності нітропрусиду натрію ефективно пригнічувалася протонофором СССР і рутенієвим червоним (10 мкмоль/л), зроблено висновок про стимуляцію кальцієвого уніпортеру внутрішньої мітохондріальної мембрани оксидом азоту. Акумуляція Ca^{2+} мітохондріями за наявності нітропрусиду натрію виявилася не чутливою до дії специфічного інгібітора пори перехідної провідності циклоспорину (5 мкмоль/л). Це вказує на те, що роль пори перехідної провідності є менш суттєвою, ніж кальцієвого уніпортеру у процесах транспорту Ca^{2+} в мітохондріях за умови дії на них оксиду азоту. Отже, оксид азоту стимулює енергозалежну акумуляцію Ca^{2+} мітохондріями міомеріа, опосередковану функціонуванням кальцієвого уніпортеру їхньої внутрішньої мембрани.

Ключові слова: мітохондрії, оксид азоту, кальцій, кальцієвий уніпортер, міомеріа.

ВСТУП

Оксид азоту характеризується широким спектром функціональної активності, яка включає регуляцію серцево-судинної, нервової, ендокринної, імунної, репродуктивної систем організму [1–4]. Фізіологічні ефекти NO часто опосередковуються взаємодією із численними внутрішньо- та позаклітинними ефекторними молекулами і супрамолекулярними комплексами, включаючи хромопротеїни, тіоли, супероксид-аніон [5–7]. Оскільки мітохондрії (МХ) мають багато хромопротеїнів, зокрема, цитохромоксидазу, глутатіон, цистеїнівмісні білки і залізосірчані комплекси, а також виступають джерелом супероксид-аніона, вони є потенційною мішенню дії оксиду азоту або його редокс-форм [8–12]. Відкриття протягом останніх років можливості власного синтезу NO в МХ, зумовленого роботою мітохондріальної

© Ю.В. Данилович, О.В. Коломієць, Г.В. Данилович, С.О.Костерін

NO-синтази і нітрит/нітрат – редуктазною здатністю компонентів електронно-транспортного ланцюга [9, 12, 13], переконливо доводить важливість оксиду азоту у регуляції функціонування МХ.

Біологічна активність МХ істотно залежить від змін концентрації Ca^{2+} в цитозолі та матриксі. Іони кальцію відіграють роль активаторів мітохондріальних дегідрогеназ і регулюють функціонування електронно-транспортного ланцюга. Ca^{2+} забезпечує нормальне функціонування відповідних підтипів калієвих каналів у МХ, які є важливими для передачі сигналів та осморегуляції органел [14–16].

Доведена роль МХ як депо іонів кальцію в клітинах. Наводяться переконливі докази ключового їх значення в термінації кальцієвого сигналу, зокрема клітин гладеньких м'язів [14–17].

Надмірне підвищення концентрації Ca^{2+} в матриксі, яке є однією з причин і супроводжує мітохондріальну дисфункцію, викликає незворотну та тривалу деполяризацію внутрішньої мембрани МХ, що призводить до апоптотичної загибелі клітини [14, 15, 17].

Наразі достатньо з біохімічної та біофізичної точок зору охарактеризована система енергозалежного транспорту Ca^{2+} в МХ (кальцієвий уніпортер їхньої внутрішньої мембрани), рушійною силою якого є наявність високого негативного потенціалу (близько – 180 мВ), що генерується в процесі функціонування електронно-транспортного ланцюга і транспорту протонів з матриксу у міжмембранний простір МХ [14–16, 18]. Хоча відомості про молекулярні структури, які забезпечують електрофоретичний, чутливий до рутенієвого червоного, транспорт іонів кальцію в МХ нині суперечливі [15, 19], не викликає сумнівів його суттєва роль у механізмах підтримки кальцієвого гомеостазу гладеньких м'язів, зокрема міометрія [18, 20].

Здатність оксиду азоту викликати розслаблення гладенького м'яза матки є встановленим експериментальним фактом, водночас біохімічні механізми цієї утерорелаксуючої дії мало досліджені [2, 4]. Недостатньо вивчені іонні, мембранні та молекулярні закономірності кальційзалежного розслаблення міометрія під впливом NO, парціальний внесок у цей процес субклітинних енергозалежних транспортних систем, зокрема локалізованих у МХ.

Спроможність оксиду азоту модулювати процес енергозалежного транспорту Ca^{2+} МХ міометрія не з'ясована, проте в досліджах *in vivo* наводяться переконливі докази такої можливості для кардіоміоцитів, гладенького м'яза судин і тканини печінки [21–23].

Аналіз літературних даних і власних результатів [20, 24] дає підставу використати суспензію ізольованих МХ міометрія та флуоресцентний зонд Fluo-4 AM для вивчення дії оксиду азоту на енергозалежну акумуляцію Ca^{2+} органелами.

Метою нашої роботи було з'ясувати мож-

ливість впливу донора і попередника NO (нітропрусиду та нітриту натрію) на АТФ-залежну акумуляцію Ca^{2+} ізольованими МХ міометрія матки шурів і дослідити його особливості.

МЕТОДИКА

Одержання фракції МХ міометрія. Препарат ізольованих МХ одержували із міометрія невагітних шурів за допомогою методу диференційного центрифугування [20, 24]. Наркотизували тварин за допомогою інгаляції діетилового ефіру, після чого їх декапітували. Дотримувались усіх вимог щодо роботи з лабораторними тваринами (Міжнародна конвенція, Страсбург, 1986). Після виділення матки й очищення її від жирової та сполучної тканини препарат зберігали у 0,9%-му розчині NaCl. Міометрій подрібнювали ножицями на шматочки розміром приблизно 2x2 мм, які переносили у робочий розчин при 4°C такого складу (ммоль/л): HEPES – 10 (рН 7,4), сахароза – 250, EGTA – 1. Тканину гомогенізували за допомогою гомогенізатора типу «Політрон» 3 рази по 20 с із охолодженням на льоду протягом 1 хв, співвідношення тканина : робочий розчин становила 1 : 9. Гомогенат і супернатант центрифугували при 4 °C протягом 15 хв при 1000 і 12000 г відповідно. Осад ресуспендували у робочому розчині і знову центрифугували протягом 15 хв при 12000 г при 4 °C. Впродовж експерименту одержану фракцію ізольованих МХ зберігали на льоду.

Визначали вміст білка у фракції МХ за стандартним методом Bradford [25].

Процедура навантаження МХ флуоресцентним зондом Fluo-4 AM. Навантаження МХ зондом Fluo-4 AM у концентрації 2 мкмоль/л проводили у середовищі, яке містило (ммоль/л): HEPES – 10 (рН 7,4; 37 °C), сахароза – 250, бичачий сироватковий альбумін – 0,1% протягом 30 хв при 37 °C. Для покращення процесу навантаження змішували барвник із Pluronic F-127 (0,02 %) [24].

Дослідження вмісту іонізованого кальцію в МХ із використанням методу спек-

трофлуориметрії. Відносні значення вмісту Ca^{2+} в матриці МХ міомерія, навантажених Fluo-4 AM ($\lambda_{\text{зб}} = 495 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{фл}} = 520 \text{ нм}$) досліджували із використанням флуориметричного методу на спектрофлуориметрі Quanta Master 40 РТІ (Канада) із програмним забезпеченням FelixGX 4.1.0.3096 [24]. Середовище, з якого здійснювалась енергозалежна акумуляція Ca^{2+} МХ, мало склад (ммоль/л) [20, 24]: НЕРЕС – 20 (рН 7,4; 37°C), сахароза – 250, калій-фосфатний буфер – 2 (рН 7,4; 37 °C), MgCl_2 – 3, АТР – 3, сукцинат натрію – 5, концентрація Ca^{2+} становила 80 мкмоль/л. Флуоресцентну відповідь наводили у відносних одиницях: значення базального рівня флуоресценції (F_0), зумовленого наявністю в МХ ендогенного Ca^{2+} , віднімали від значення флуоресцентної відповіді, зумовленої акумуляцією Ca^{2+} МХ (F). Співвідношення $(F - F_0)/F_0$ відповідає загальноприйнятим відносним одиницям флуоресценції, які зазначені на вісі ординат рисунків.

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили із використанням пакету стандартних програм IBM PC, застосовуючи загальновідомі методи [26] і критерій t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На початку досліджень нами показано, що використані в роботі ефектори, а саме нітропрусид натрію, нітрит натрію, циклоспорин та СССР (від англ. carbonil cyanide m-chlorphenil hydrasone) не впливають на флуоресценцію Fluo-4 AM; лише RuR (рутенієвий червоний) викликає її незначне зниження.

Встановлено, що транзитне додавання до МХ, транспорт Ca^{2+} в яких за наявності в середовищі Mg-ATP^{2-} та сукцинату досяг стану рівноваги, 100 мкмоль/л нітропрусиду або нітриту натрію не супроводжувалося суттєвими змінами рівня акумуляції катіона (рис. 1). Протягом кількох хвилин після внесення досліджуваних сполук спостерігалось лише незначне посилення транспорту іонів Ca у МХ. Одержаний результат вказує на неефективність впливу

оксида азоту на МХ за відносно короткотривалої експозиції. Вочевидь, хімічна модифікація функціонально-важливих тіольних груп кальційтранспортних структур або гемо-вмісних протеїнів МХ потребує певного часу.

Для перевірки цього припущення нами були проведені експерименти із передінкубацією суспензії МХ з нітропрусидом або нітритом натрію. В усіх дослідах концентрація Ca^{2+} в середовищі його акумуляції МХ становила 80 мкмоль/л. Це пов'язано із тим, що уявна константа активації процесу накопичення Ca^{2+} становить $53,9 \pm 6,9$ мкмоль/л [24]. Таке відповідає фізіологічній концентрації катіона в клітині поблизу МХ. Водночас використання надто високих концентрацій Ca^{2+} здатне викликати порушення функціональної активності МХ [14].

Встановлено, що попередня інкубація МХ із нітропрусидом і нітритом натрію протягом

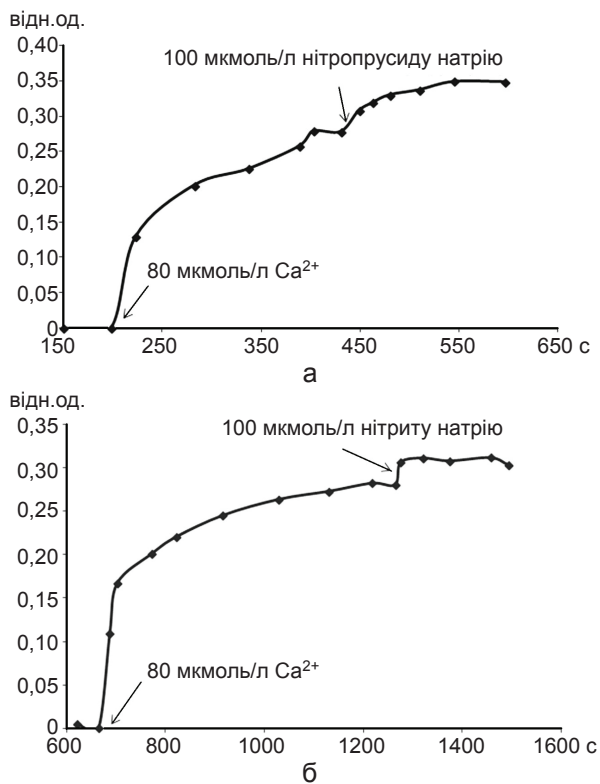


Рис. 1. Акумуляція іонів Ca мітохондріями (тут і далі вміст білка становив 50 мкг/мл) за наявності Mg-ATP^{2-} в умовах транзитного додавання нітропрусиду натрію (а) або нітриту натрію (б)

15 хв призводила до суттєвого зростання акумуляції Ca^{2+} органелами (рис. 2). Зокрема, нітропрусид натрію посилював транспорт Ca^{2+} приблизно в 1,6 раза. Ефект нітриту натрію виявився дещо меншим, але статистично значущим. Подібні дані були одержані іншими авторами при дослідженні короткотривалого впливу нітрогліцерину *in vivo* в аорті, міокарді та печінці щурів. Одночасно зареєстровано зниження мембранного потенціалу органел на 28-30 % [21]. В наших попередніх дослідженнях *in vitro* на ізольованих МХ міомерія щурів демонструвалося помірне зменшення поляризації їхньої внутрішньої мембрани на 24–27 % під впливом нітропрусиду натрію (за результатами конфокальної мікроскопії та протокової цитофлуориметрії), водночас ефект нітриту натрію майже не спостерігався [27]. Ми припускаємо, що зростання ємності МХ щодо Ca^{2+} під впливом оксиду азоту як *in vivo*, так і *in vitro* в різних тканинах може бути пов'язане із активацією кальцієвого уніпортеру і не залежить від змін мембранного потенціалу у фізіологічних межах.

У попередніх дослідженнях із використанням флуоресцентних зондів Fluo-3 АМ, Fluo-4 АМ та радіоізотопної техніки ($^{45}\text{Ca}^{2+}$) був ідентифікований кальцієвий уніпортер МХ міомерія і вивчено його окремі властивості [18, 20, 24]. За такими характеристиками, як чутливість до інгібіторної дії RuR та азиду натрію, катіонною і субстратною спе-

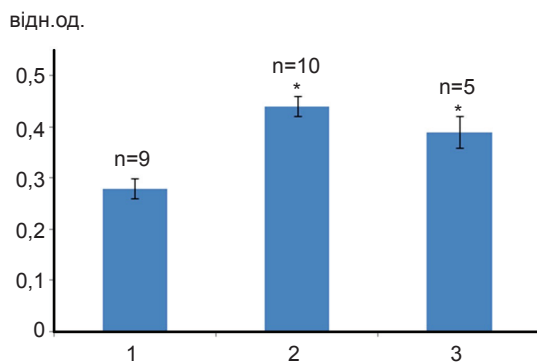


Рис. 2. Вплив донора та попередника NO на енергозалежний транспорт Ca^{2+} в ізольованих мітохондріях міомерія: 1 – контроль, 2 – нітропрусид натрію, 3 – нітрит натрію * зміни достовірні відносно контролю, $P < 0,05$

цифічністю, кінетичними та каталітичними характеристиками, блокувальним ефектом катіонів двовалентних металів, активуючою дією поліамінів, АТФ-залежне накопичення Ca^{2+} МХ міомерія подібне до того, яке притаманне тканинам інших типів.

Для підтвердження припущення про роль уніпортеру у стимуляції NO енергозалежної акумуляції Ca^{2+} МХ нами були використані протонатор CCCP та класичний інгібітор електрофоретичного шляху накопичення іонів Ca органелами RuR. Встановлено, що 10 мкмоль/л CCCP і RuR ефективно пригнічували акумуляцію Ca^{2+} МХ за наявності нітропрусиду натрію (рис. 3). Інгібування транспортного процесу сягло значень нижчих від контрольні без додавання нітропрусиду натрію, оскільки RuR блокує кальцієвий уніпортер, а CCCP усуває рушійну силу транспорту катіона через дисипацію градієнта протонів на внутрішній мітохондріальній мембрані.

Специфічний інгібітор мітохондріальної пори (МП) перехідної провідності циклоспорин (5 мкмоль/л) майже не впливав на активоване нітропрусидом натрію енергозалежне накопичення Ca^{2+} МХ (див. рис. 3), хоча і спостерігалася тенденція до зростання акумуляції катіона за цих умов. У паралельно проведених дослідженнях з'ясувалося, що за наявності циклоспорину акумуляція іонів Ca МХ дещо зростала. Це вказує на певне значення МП в процесі обміну катіона в ізольованих МХ, водночас роль пори не є визначальною, можливо, через наявність в середовищі акумуляції Mg-АТФ²⁻ та сукцинату, які стабілізують роботу електронно-транспортного ланцюга протягом експерименту і забезпечують достатню енергізацію МХ.

Разом з тим в експериментах, проведених на аорті та міокарді щурів в умовах введення тваринам нітрогліцерину, показано, що підвищення кальцієвої ємності МХ зумовлене саме інгібуванням МП оксидом азоту [22, 23]. Тими самими авторами в дослідках на ізольованих МХ, на відміну від експериментів *in vivo*, показано зниження кальцієвої

ємності органел за дії нітрогліцерину, яке пояснюється активацією вивільнення катіона через уніпортер, спричинене деполяризацією МХ. Різниця між результатами, одержаними в наших дослідженнях і даними інших авторів, може полягати у тканинспецифічності впливу та різниці хімічної структури використаних донорів NO. Слід зазначити, що біохімічні механізми дії NO на міометрій можуть суттєво відрізнятись від тих, які притаманні іншим м'язовим тканинам [2, 4].

Отже, нами показано, що під впливом донора і попередника NO (нітропрусиду та нітриту натрію) спостерігається посилення енергозалежної

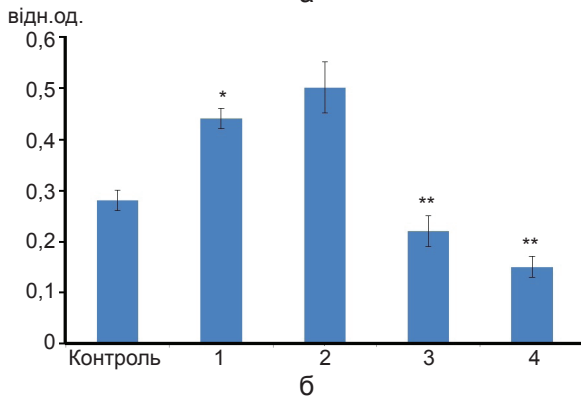
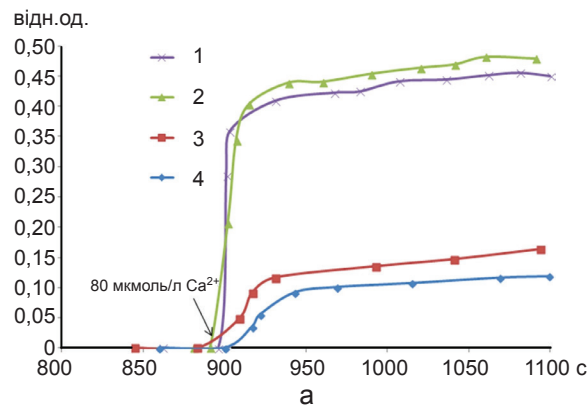


Рис. 3. Вплив модифікаторів трансмембранного обміну Ca^{2+} в мітохондріях міометрії на енергозалежний транспорт катіона в умовах активуючого впливу нітропрусиду натрію: (а) – результати типового експерименту, (б) – статистичний аналіз одержаних результатів. 1 – 100 мкмоль/л нітропрусиду натрію, 2, 3 і 4 – 100 мкмоль/л нітропрусиду натрію і 5 мкмоль/л циклоспорину, 10 мкмоль/л RuR, 10 мкмоль/л СССР. * зміни достовірні відносно контролю ($n=9-10$, $P \leq 0,05$), ** відносно дії 100 мкмоль/л нітропрусиду натрію ($n=5-10$, $P \leq 0,05$)

акумуляції Ca^{2+} в ізольованих МХ міометрії, не пов'язане зі зміною їхнього мембранного потенціалу. Стимулювальний ефект може більшою мірою опосередковуватися активацією кальцієвого уніпортеру, ніж залежати від функціонування пори перехідної провідності.

**Ю.В. Данилович, О.В. Коломиєц,
Г.В. Данилович, С.А. Костерин**

ОКСИД АЗОТА КАК ОДИН ИЗ РЕГУЛЯТОРОВ ЭНЕРГОЗАВИСИМОГО ТРАНСПОРТА Ca^{2+} В МИТОХОНДРИЯХ МИОМЕТРИИ

Исследовано влияние донора и предшественника NO, а именно 100 мкмоль/л нитропруссид натрия и нитрита натрия на энергозависимый транспорт Ca^{2+} в изолированные митохондрии миометрия крыс. Изменения концентрации Ca^{2+} в матриксе митохондрий оценивали с помощью метода спектрофлуориметрии и кальцийчувствительного зонда Fluo-4 AM. Mg^{2+} -АТФ-зависимая аккумуляция Ca^{2+} митохондриями в присутствии сукцината существенно стимулируется оксидом азота, в частности, нитропруссид натрия усиливал транспорт в 1,6 раза относительно его контрольных значений. Эффект NO становился значимым лишь при условии инкубации митохондрий с исследуемыми соединениями. Поскольку аккумуляция Ca^{2+} в присутствии нитропруссид натрия эффективно подавлялась протонофором СССР и рутениевом красным (10 мкмоль/л), сделан вывод о стимуляции кальциевого уніпортера внутренней митохондриальной мембраны оксидом азота. Аккумуляция Ca^{2+} митохондриями в присутствии нитропруссид натрия оказалось не чувствительной к действию специфического ингибитора поры переходной проводимости циклоспорина (5 мкмоль/л). Это указывает на то, что роль поры переходной проводимости менее существенна, чем кальциевого уніпортера, в процессах транспорта Ca^{2+} митохондриями в условиях действия на них оксида азота. Итак, оксид азота стимулирует энергозависимую аккумуляцию Ca^{2+} митохондриями миометрия, опосредованную функционированием кальциевого уніпортера их внутренней мембраны. Ключевые слова: митохондрии, оксид азота, кальций, кальциевый уніпортер, миометрий.

**Danylovych Yu.V., Kolomiets O.V.,
Danylovych G.V., Kosterin S.O.**

NITRIC OXIDE AS A POSSIBLE REGULATOR OF ENERGO-DEPENDENT Ca^{2+} TRANSPORT IN MITOCHONDRIA OF UTERINE SMOOTH MUSCLE

The influence of the donor and the precursor of NO, namely 100 mM sodium nitroprusside and sodium nitrite on the energo-dependent Ca^{2+} -transport in isolated mitochondria from rat

myometrium was investigated. Changes in the mitochondrial matrix Ca^{2+} -concentration was evaluated by spectrofluorimetry using Ca^{2+} sensitive probe Fluo-4 AM. Mg^{2+} -ATP-dependent Ca^{2+} -accumulation on mitochondria in the presence of succinate significantly stimulated by nitric oxide, in particular, 100 μM sodium nitroprusside amplified the transport by 1.6 times relative to its control values. NO effect becomes significant only when the incubation of mitochondria with the compounds was performed. Ca^{2+} -accumulation in the presence of sodium nitroprusside effectively suppressed by protonophore (CCCP) and ruthenium red (10 μM). It was concluded that inner mitochondrial membrane Ca^{2+} -uniporter stimulated by nitrogen oxide. Ca^{2+} -accumulation in mitochondria in the presence of sodium nitroprusside was not sensitive to the action of a specific permeability transition pore inhibitor cyclosporine (5 μM). This data indicates that the role of permeability transition pore is less significant than Ca^{2+} -uniporter in the processes of Ca^{2+} -transport in mitochondria under the nitric oxide action. Thus, nitric oxide stimulates the ergo-dependent Ca^{2+} -accumulation by myometrium mitochondria mediated their inner membrane Ca^{2+} -uniporter functioning.

Keywords: mitochondria, nitric oxide, calcium, calcium uniporter, myometrium.

O.V. Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev.

REFERENCES

- Bryan NS, Bian K, Murad F. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2009 Jan 1;14:1-18.
- Bernal AL. The regulation of uterine relaxation. *Semin Cell Dev Biol* 2007 Jun;18(3):340-7.
- Levine AB, Punihaole D, Levine TB. Characterization of the role of nitric oxide and its clinical application. *Cardiology* 2012;122(1):55-68.
- Sladek MS, Magness RR, Conrad KP. Nitric oxide and pregnancy. *Am J Physiol* 1997;272(2):441-63.
- Pucovsky DV, Gordienko TB, Bolton V. Effect of nitric oxide donors and noradrenaline on Ca^{2+} release sites and global intracellular Ca^{2+} in myocytes from guinea-pig small mesenteric arteries. *J Physiol* 2002;539(1):25-39.
- Trebak M, Ginnan R, Singer HA, Jourdeuil D. Interplay between calcium and reactive oxygen/nitrogen species: an essential paradigm for vascular smooth muscle signaling. *Antioxid Redox Signal* 2010 Mar 1;12(5):657-74.
- Zima AV, Blatter LA. Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. *Cardiovasc Res* 2006 Jul 15;71(2):310-21.
- Davidson SM, Duchon MR. Effects of NO on mitochondrial function in cardiomyocytes: pathophysiological relevance. *Cardiovasc Res*. 2006 Jul 1;71(1):10-21.
- Guilivi C, Kato K, Cooper CE. Nitric oxide regulation of mitochondrial oxygen consumption I: cellular physiology. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006 Dec;291(6):C1225-31.
- Shiva S. Mitochondria as metabolizers and targets of nitrite. *Nitric Oxide* 2010 Feb 15;22(2):64-74.
- Shiva S. Nitrite: A physiological store of nitric oxide and modulator of mitochondrial function. *Redox Biol* 2013;1(1):40-44.
- Tota B, Quintieri AM, Angelone T. The emerging role of nitrite as an endogenous modulator and therapeutic agent of cardiovascular function. *Curr Med Chem* 2010;17(18):1915-25.
- Ghafourifar P, Cadenas E. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci* 2005 Apr;26(4):190-5.
- Kostyuk PG, Kostyuk OP, Lukyanets EA. Intracellular calcium signaling: structures and functions. Kyiv: Nauk. Dumka; 2010. (In Ukrainian)
- Pan S, Ryu S-Y, Sheu S-S. Distinctive characteristics and functions of multiple mitochondrial Ca^{2+} influx mechanisms. *Sci China Life Sci* 2011 Aug;54(8):763-9.
- Santo-Domingo J, Demarex N. Calcium uptake mechanisms of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 2010 Jun-Jul;1797(6-7):907-12.
- Duchen MR. Roles of mitochondria in health and disease. *Diabetes* 2004 Feb;53 Suppl 1:S96-102.
- Kosterin SA, Burdyga ThV, Fomin VP, Grover AK. Mechanism of Ca^{2+} -transport in myometrium. From: Control of Uterine Contractility. Eds. Garfield RE, Tabb TN. London, Tokyo: CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, 1994.
- Crosdas G, Varnai P, Golenar T. Calcium transport across the inner mitochondrial membrane: molecular mechanisms and pharmacology. *Mol Cell Endocrinol* 2012 Apr 28;353(1-2):109-13.
- Kandaurova NV. Ca^{2+} -induced changes of membrane potential of myometrium mitochondria: Dissertation for a scientific degree of the PhD of biological sciences. Kyiv: O. V. Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine; 2011.
- Akopova OV, Sahach VF. The influence of nitric oxide donors on Ca^{2+} -uptake in rat heart and liver mitochondria. *Ukr Biokhim Zh* 2005 Mar-Apr;77(2):82-7. (In Russian)
- Akopova OV, Kotsiuruba AV, Kharlamova OM, Sahach VF. The role of mitochondria in NO-dependent regulation of Na^+ , K^+ -ATPase activity in the rat aorta. *Fiziol Zh* 2010;56(4):76-85. (In Ukrainian)
- Akopova OV, Korkach IuP, Kotsiuruba AV, Kolchyn'ska AV, Sahach VF. Reactive nitrogen and oxygen species metabolism in rat heart mitochondria upon administration of NO donor in vivo. *Fiziol Zh*. 2012;58(2):3-15. (In Ukrainian)
- Kolomiets OV, Danylovykh YuV, Danylovykh GV, Kosterin SO. Ca^{2+} accumulation study in isolated smooth muscle mitochondria using Fluo-4 AM. *Ukr Biokhim Zh* 2013 Jul-Aug;85(4):30-9. (In Ukrainian)
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976 May 7;72:248-54.
- Bailay NTJ. Statistical methods in biology. *Great Britain*: Cambridge University Press; 1995.
- Danylovykh YuV, Danylovykh GV, Kolomiets OV, Kosterin SO, Karakhim SO, Chunikhin OJu. Investigation of nitrosative compounds influence on polarization of the mitochondrial inner membrane in the rat uterus myocytes using potential sensitive fluorescent probe DiOC₆(3). *Ukr Biokhim Zh* 2014 Jul-Aug;86(1):42-55. (In Ukrainian).

*Ін-т біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ
E-mail: danylovykh@biochem.kiev.ua*

*Матеріал надійшов
до редакції 05.11.2013*