

Ca²⁺/H⁺-ОБМІН У МІТОХОНДРІЯХ МІОМЕТРІЯ

О. В. КОЛОМІЄЦЬ, Ю. В. ДАНИЛОВИЧ, Г. В. ДАНИЛОВИЧ, С. О. КОСТЕРІН

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

З використанням флуоресцентного зонда Fluo-4 AM ідентифіковано Na⁺-незалежний Ca²⁺/H⁺-обмін в ізольованих мітохондріях міометрії щурів та вивчено його окремі властивості. Штучне створення спрямованого в матрикс мітохондрій градієнта протонів спричинює антипортне вивільнення Ca²⁺, попередньо акумульованого в енергозалежному процесі (у присутності Mg-АТФ та сукцинату). Функціонування Ca²⁺/H⁺-обміну залежить від величини градієнта протонів та характеризується зворотністю, а саме в умовах залуження позамітохондріального середовища реєструється додаткова акумуляція Ca²⁺ органелами. Градієнти моновалентних катіонів (Na⁺, K⁺, Li⁺) не зумовлюють вивільнення Ca²⁺ з мітохондрій. Швидкість Ca²⁺/H⁺-обміну зростає в умовах збільшення ΔpH на мембрані мітохондрій, а кінетика ΔpH-індукованого вивільнення Ca²⁺ з матриксу відповідає закономірностям реакції першого порядку.

Дослідження окремих властивостей Ca²⁺/H⁺-обміну в мітохондріях міометрії показало, що значений транспортний процес має електрогенну природу, можливо здійснюється в стехіометрії 1 : 1 (коефіцієнт Хілла щодо H⁺ наближається до 1) і спроможний регулювати внутрішньомітохондріальну концентрацію Ca²⁺ за фізіологічних умов (активації за рН ≈ 6,9).

Отже, у внутрішній мембрані мітохондрій міометрії наявна система вторинно-активного транспортування Ca²⁺ з матриксу цих органел у міоплазму, причому основою цього процесу, можливо, є функціонування Ca²⁺/H⁺-обмінника.

Ключові слова: мітохондрії, Ca²⁺/H⁺-обмін, гладенькі м'язи, міометрії, Letm 1.

Наразі доведено, що мітохондрії (МХ) відіграють важливу роль у процесах внутрішньоклітинної Ca²⁺-сигналізації внаслідок їх спроможності акумулювати та вивільнювати значну кількість Ca²⁺ [1–8]. Після транзйентного підвищення концентрації Ca²⁺ в гладеньком'язових клітинах за їх збудження МХ здатні акумулювати катіон в енергозалежному процесі. Існує аргументована точка зору, що МХ забезпечують зниження концентрації Ca²⁺ в міоплазмі, яке необхідне для розслаблення за фізіологічно значущий час, а також захищають клітини від цитотоксичних ефектів катіона у разі його надлишкового надходження із позаклітинного середовища [1, 2, 8].

Основним механізмом, який забезпечує надходження Ca²⁺ до матрикса МХ, є функціонування так званого Ca²⁺-уніпортеру, що забезпечує потенціалзалежний (електрофоретичний), високоємнісний, чутливий до рутенієвого червоного шлях акумуляції катіона, активність якого оптимальна за мікромольних

концентрацій позамітохондріального Ca²⁺. Хоча ця транспортна система досить добре охарактеризована з біохімічної, електрофізіологічної та біофізичної точок зору [1, 2, 7], молекулярні структури, що обумовлюють електрофоретичну акумуляцію Ca²⁺, достеменно не ідентифіковані, незважаючи на багаторічні пошуки. Дослідження останніх років із використанням геноміки, протеоміки та методів РНК-інтерференції, разом із залученням Ca²⁺-чутливих флуоресцентних протеїнів, дозволили ідентифікувати деякі з них, які здатні забезпечувати Ca²⁺-акумуляцію МХ і локалізовані на її внутрішній мембрані. Серед них UCP (uncoupling protein) або термогенін, MCU (mitochondrial Ca²⁺ uniporter), який може працювати в комплексі із Ca²⁺-зв'язувальним протеїном MICU1 (mitochondrial calcium uptake 1), а також канали ріанодинового рецептора (mRyR) і, можливо, окрема структура, яка забезпечує «швидкий кальцієвий вхід» (RaM, rapid mode uptake). Перелічені протеїни ідентифіковані в різних типах клітин,

але залишається дискусійною можливість їх одночасної експресії в одній і тій самій клітині та спроможність забезпечувати транспортний процес в МХ за різної концентрації Ca^{2+} [3, 6, 7, 9, 10].

Серед протеїнів, які забезпечують транспортування Ca^{2+} в МХ, особливе значення, згідно з останніми повідомленнями, належить структурі Mdm38/Letm1 (leucine-zipper-EF hand-containing transmembrane region). Цей протеїн, спочатку ідентифікований як K^+/H^+ -транспортер (КНЕ), наразі розглядається, передусім, як $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обмінник [11–13]. Унікальність зазначеної транспортної системи полягає в тому, що в певних умовах, вона здатна забезпечити як ΔpH -залежне вивільнення Ca^{2+} з МХ, так і акумуляцію Ca^{2+} в матрикс. Першочергове значення для функціонування обмінника в аверсному (акумуляція Ca^{2+} МХ) чи реверсному режимі має співвідношення концентрацій Ca^{2+} і H^+ в цитозолі та матриксі/міжмембранному просторі МХ [12]. Існує точка зору, що, на відміну від низькоафінного Ca^{2+} -уніпортеру, $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обмінник ефективно працює за відносно низьких субмікромольних концентрацій Ca^{2+} [13]. У протилежність іншим електрозбудливим тканинам в гладеньких м'язах система Na^+ -залежного транспортування Ca^{2+} з МХ є менш значущою порівняно із $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обмінником, оскільки збудження міоцитів, а, отже, розвиток потенціалу дії, зумовлений вхідним струмом переважно не натрієвої, а кальцієвої природи [14].

Таким чином, ідентифікація і дослідження біохімічних особливостей $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обміну в МХ гладеньких м'язів є актуальним у зв'язку із першочерговим значенням цього транспортувального процесу в механізмах підтримання Ca^{2+} -гомеостазу в МХ.

Метою роботи було із використанням методу спектрофлуориметрії та Ca^{2+} -чутливого флуоресцентного зонда Fluo-4 АМ вивчити властивості $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обміну (ΔpH -індукованого транспортування Ca^{2+}) в ізольованих МХ гладенького м'яза матки.

Матеріали і методи

Одержання фракції МХ міометрія. Препарат ізольованих МХ одержували із міометрія невагітних щурів за допомогою методу диференційного центрифугування як описано раніше [15]. Тварин наркотизували інгаляцією

діетилового ефіру, після чого декапітували. Дотримувались усіх вимог щодо роботи з лабораторними тваринами (Міжнародна конвенція, Страсбург, 1986). Після виділення матки і очищення її від сполучної тканини, препарат тримали у 0,9%-му розчині NaCl . Міометрій подрібнювали ножицями на шматочки розміром приблизно 2×2 мм, які переносили в робочий розчин із температурою 4°C такого складу: 10 мМ HEPES ($\text{pH} = 7,4$), 250 мМ цукроза, 1 мМ EGTA. Тканину гомогенізували за допомогою гомогенізатора типу «Політрон» 3 рази по 20 с із охолодженням на льоду протягом 1 хв, співвідношення тканина : робочий розчин дорівнювало 1 : 9. Гомогенат центрифугували протягом 15 хв при 1000 г за температури 4°C . Супернатант центрифугували протягом 15 хв при 12 000 г за температури 4°C . Осад ресуспендували в робочому розчині і знову центрифугували протягом 15 хв при 12 000 г за температури 4°C . Впродовж експерименту одержану фракцію ізольованих МХ зберігали на льоду.

Визначали вміст протеїну у фракції МХ за стандартним методом Bradford M. M. [16]; середнє значення складало 2 мг/мл, а в пробі – 50 мкг/мл.

Характеристика фракції ізольованих МХ міометрія із використанням електронної мікроскопії. Для отримання електронних знімків осад фракції МХ фіксували 2,5%-им глутаральдегідом в 0,1 М какодилатному буфері при $\text{pH} 7,4$ протягом 2 год і постфіксували 1%-им OsO_4 в цьому самому буфері також протягом 2 год. Всі маніпуляції проводили при 20°C . Після зневоднення в серії ацетонів препарати вносили в епоксидну смолу «Епон-Аралдіт». Ультратонкі зрізи зафарбовували уранілацетатом і цитратом свинцю [17]. Зрізи переглядали та фотографували за допомогою електронного мікроскопа JEOL EM-1230 (Токіо Воекі, Японія).

Характеристика фракції ізольованих МХ із використанням фотонної кореляційної спектроскопії. Функцію розподілу гідродинамічного діаметра (розміру) МХ визначали методом фотонної кореляційної спектроскопії [18–20] в середовищі такого складу: 20 мМ HEPES ($\text{pH} 7,4$), 250 мМ цукроза, 2 мМ P_i (у вигляді K^+ -фосфатного буфера, $\text{pH} 7,4$), 3 мМ MgCl_2 , 3 мМ АТР, 5 мМ сукцинат натрію. Виміри проводили при температурі 22°C . Використовували прилад ZetaSizer-3 (Malvern

Instruments, Велика Британія) з корелятором Multi8 computing correlator type 7032 се, який облаштований гелій-неоновим лазером ЛГ-111 із довжиною хвилі 633 нм і потужністю 25 мВт. Реєстрацію розсіяного від суспензії МХ лазерного опромінення проводили протягом 1 хв при температурі 22 °С під кутом розсіювання 90°. Автокореляційну функцію обробляли за допомогою стандартної комп'ютерної програми PCS-Size mode v 1.61.

Процедура навантаження МХ флуоресцентним зондом Fluo-4 АМ. Навантаження МХ зондом Fluo-4 АМ у концентрації 2 мкМ проводили в середовищі, яке містило 10 мМ НЕРЕС (рН 7,4, 37 °С), 250 мМ цукрозу, 0,1%-й БСА протягом 30 хв при температурі 37 °С. Для покращення процесу навантаження барвник змішували із Pluronic F-127 (0,02%-й) [20]. Подібна процедура описується у разі навантаження МХ клітин міометрія щурів близьким за властивостями флуоресцентним зондом Fluo-3 АМ [8].

Дослідження вмісту іонізованого Са в МХ із використанням методу спектрофлуориметрії. Реєстрацію відносних значень рівня Са²⁺ в матриці МХ міометрія, навантажених Fluo-4 АМ ($\lambda_{\text{зб.}} = 490$ нм, $\lambda_{\text{фл.}} = 520$ нм) досліджували із використанням флуориметричного методу на спектрофлуориметрі Quanta Master 40 РТІ (Канада) із програмним забезпеченням FelixGX 4.1.0.3096 [21–23]. Середовище, з якого здійснювалась енергозалежна акумуляція Са²⁺ МХ, мало склад [8, 20]: 20 мМ НЕРЕС (рН 7,4, 37 °С), 250 мМ цукрозу, 2 мМ калій-фосфатний буфер (рН 7,4, 37 °С), 3 мМ MgCl₂, 3 мМ АТР, 5 мМ сукцинат натрію, концентрація Са²⁺ дорівнювала 80 мкМ. Енергозалежну акумуляцію Са²⁺ проводили протягом 5 хв, після чого аліквоту суспензії (100 мкл) розводили в середовищі вивільнення Са²⁺ (2 мл) такого складу: 20 мМ НЕРЕС (рН 5,0–8,0, 37 °С), 250 мМ цукрозу, 2 мМ калій-фосфатний буфер (рН 5,0–8,0, 37 °С), 5 мМ сукцинат натрію, 5 мкМ циклоспорин А. Концентрація Са²⁺ в середовищі вивільнення катіона становила 4 мкМ.

Величину флуоресцентної відповіді наводили у відносних одиницях як описано нижче.

Статистичний аналіз одержаних даних проводили із використанням пакета стандартних програм IBM PC, застосовуючи загальновідомі методи [24] і *t*-критерій Стьюдента.

Результати та обговорення

Аналіз знімків, одержаних із використанням електронного мікроскопа, дозволив охарактеризувати форму і розміри МХ міометрія (рис. 1), ізольованих шляхом препаративного центрифугування. Вони мають всі морфологічні ознаки інтактних органел. Зокрема, на рис. 1 можна бачити МХ овальної або округлої форми із неушкодженими внутрішньою і зовнішньою мембранами, а також наявність крист. Значення середнього діаметра ізольованих МХ – 500–700 нм, що добре узгоджується із літературними та нашими даними, одержаними із використанням фотонної кореляційної спектроскопії [18–20]. У представлених нижче дослідженнях найвірогідніший середній гідродинамічний діаметр свіжовиділених МХ становить 549 ± 20 нм (наведено середній результат та помилка середнього арифметичного 5 незалежних вимірювань).

У серії попередніх досліджень нами було доведено можливість застосування Са²⁺-чутливого флуоресцентного зонда Fluo-4 АМ і методу спектрофлуориметрії для дослідження закономірностей обміну Са²⁺ в МХ гладенького м'яза матки. Зокрема, встановлено, що флуоресцентна відповідь барвника у присутності препарату МХ істотно зростає в часі і прямо залежить від концентрації Са²⁺ в середовищі. Отже, за цих умов утворюється активна деестерифікована форма зонда, яка виявляє чутливість до Са²⁺ [20].



Рис. 1. Електронна мікрофотографія ізольованих мітохондрій міометрія, $\times 20\,000$

Необхідним є також проведення контрольних досліджень, які б довели, що ізольовані МХ міометрія здатні до енергозалежної акумуляції Ca^{2+} із середовища інкубації, а використаний флуоресцентний зонд адекватно відповідає на збільшення концентрації катіона в матриксі.

Нами показано, що у присутності Mg-АТР та сукцинату, які є абсолютно необхідними для транспортування Ca^{2+} в МХ міометрія, останні ефективно накопичують катіон зі стандартного інкубаційного середовища, що супроводжується істотним зростанням рівня флуоресценції Fluo-4 (рис. 2). За відсутності енергетичних субстратів і, відповідно, різкого зменшення електричного потенціалу на внутрішній мембрані МХ електрофоретичне накопичення Ca^{2+} практично відсутнє (рис. 2), про що свідчить рівень флуоресцентної відповіді, близький до контрольних значень в умовах номінальної відсутності Ca^{2+} в стандартному середовищі інкубації.

Результати цього дослідження переконливо свідчать, що використання Ca^{2+} -чутливого флуоресцентного зонда Fluo-4 АМ є перспективним для реєстрації енергозалежного накопичення Ca^{2+} в ізольованих МХ міометрія.

Наступну серію досліджень було спрямовано на ідентифікацію $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ обміну в МХ міометрія. У разі позамітохондріального рН 7,5 і нижче спостерігається процес вивільнення Ca^{2+} із МХ, попередньо акумуляованого в енергозалежному процесі (у присутності Mg-АТР та сукцинату); це залежить від величини позамітохондріального рН (рис. 3).

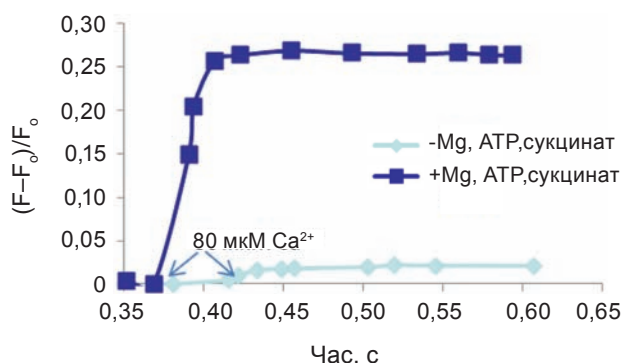


Рис. 2. Акумуляція мітохондріями Ca^{2+} не спостерігається за відсутності у складі середовища інкубації комплексу Mg-АТР та сукцинату. F_0 – флуоресценція за відсутності Ca^{2+} («базальна»), F – флуоресцентний сигнал у разі додавання Ca^{2+} до ізольованих мітохондрій

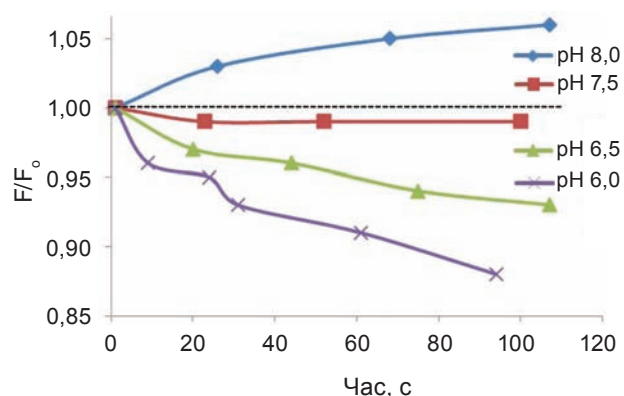


Рис. 3. Транспортування Ca^{2+} з мітохондрій за зміни рН позамітохондріального середовища. Ефективність процесу залежить від величини ΔpH . F_0 – початковий флуоресцентний сигнал у разі внесення суспензії ізольованих мітохондрій, навантажених Ca^{2+} , в середовище їх ізотонічного розведення. F – флуоресцентний сигнал за відповідні проміжки часу реєстрації вивільнення Ca^{2+} з мітохондрій

Отже, у разі закислення середовища істотно посилюється вихід Ca^{2+} з МХ, що свідчить на користь існування ΔpH -залежної компоненти транспортування Ca^{2+} з МХ і відповідає уявленням про існування $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обміну у внутрішній мітохондріальній мембрані в гладеньких м'язах. За залуження позамітохондріального середовища спостерігається додаткове зростання акумуляції катіона, що свідчить на користь можливості функціонування $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обміну в реверсному режимі. Градієнти фізіологічно значущих моновалентних Na^+ та K^+ , а також Li^+ (за ізотонічних умов) не стимулюють транспортування Ca^{2+} (рис. 4), що відповідає уявленням про відсутність або незначну роль $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника у функціонуванні МХ гладеньких м'язів, зокрема і міометрія [2, 14].

Одержані нами результати узгоджуються з попередніми дослідженнями, проведеними на ізольованих МХ міометрія корів із застосуванням радіоізотопної техніки ($^{45}\text{Ca}^{2+}$). Зокрема, було показано, що закислення середовища інкубації від рН 7,5 до 6,5 стимулювало вивільнення Ca^{2+} із МХ міометрія, водночас зниження рН пригнічує зворотний процес енергозалежної акумуляції катіона. Na^+ та K^+ також не впливають на досліджуваний процес [14]. У досліджах, виконаних на пермеабілізованих дигітоніном міоцитах матки щурів із використанням ізотопної техніки

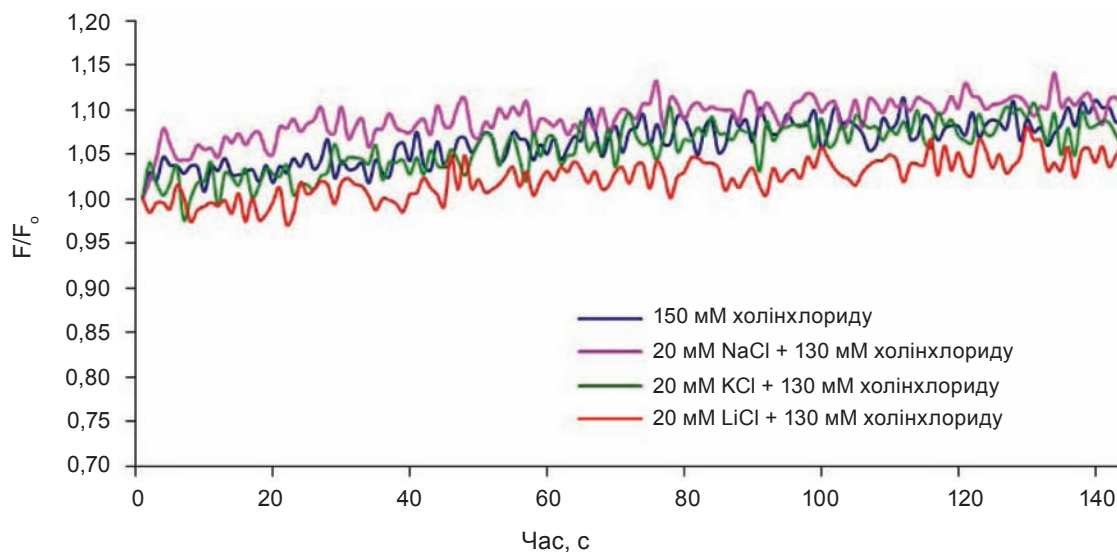


Рис. 4. Одновалентні катіони не впливають на вміст Ca^{2+} в ізолюваних МХ міометрія

продемонстровано, що закислення середовища призводить до гальмування рутенійзалежного включення Ca^{2+} в МХ, а ізотонічна заміна K^+ на Na^+ виявилась неефективною [25]. Принципова різниця між дослідженням процесів транспортування Ca^{2+} із використанням $^{45}Ca^{2+}$ та флуоресцентних зондів полягає в тому, що в останньому випадку тестуються зміни саме концентрації іонізованого Ca, тобто того пулу катіона, який виявляє функціональну активність. Отже, створення градієнта протонів на мембрані МХ міометрія спричинює антипортне вивільнення Ca^{2+} . Функціонування Ca^{2+}/H^+ -обміну залежить від величини градієнта протонів та характеризується оборотністю. Водночас градієнти моновалентних катіонів (Na^+ , K^+ , Li^+) не спричинюють вивільнення Ca^{2+} .

Наступним завданням було вивчення окремих закономірностей Ca^{2+}/H^+ -обміну в МХ міометрія. Аналіз динаміки ΔpH -індукованого вивільнення Ca^{2+} з МХ свідчить про те, що залежність змін флуоресценції Fluo-4 AM, який тестує концентрацію Ca^{2+} в матриці, задовольняє реакції першого порядку [14] (рис. 5).

Із формальної точки зору [26] факт відповідності досліджуваного транспортного процесу кінетичним закономірностям реакції першого порядку свідчить, що ΔpH -індукований вихід Ca^{2+} з МХ прямо залежить від концентрації катіона в матриці. Це може відобразити здатність Ca^{2+}/H^+ -обмінника МХ ефективно реагувати на збільшення в них концентрації Ca^{2+} .

В умовах зростання градієнта протонів як рушійної сили виходу Ca^{2+} з МХ (рис. 6), час

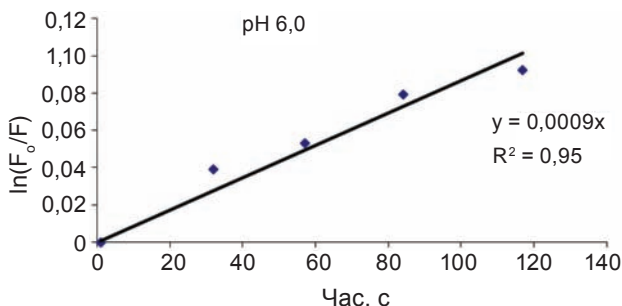


Рис. 5. Лінеаризація кінетичної кривої ΔpH -індукованого виходу Ca^{2+} з мітохондрій під час перебування її в координатах незворотної реакції першого порядку

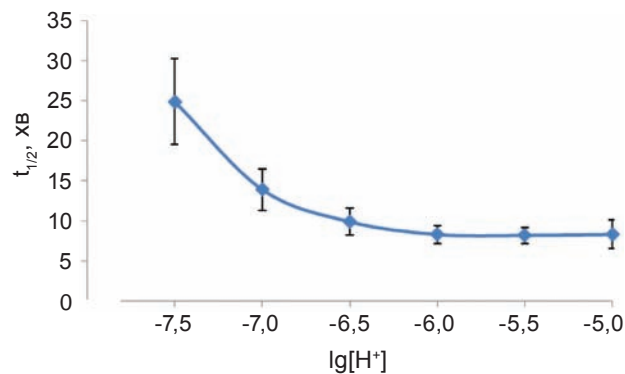


Рис. 6. Залежність періоду напіввиходу Ca^{2+} з мітохондрій від величини градієнта протонів, спрямованого в матрикс, $M \pm m$, $n = 6-9$

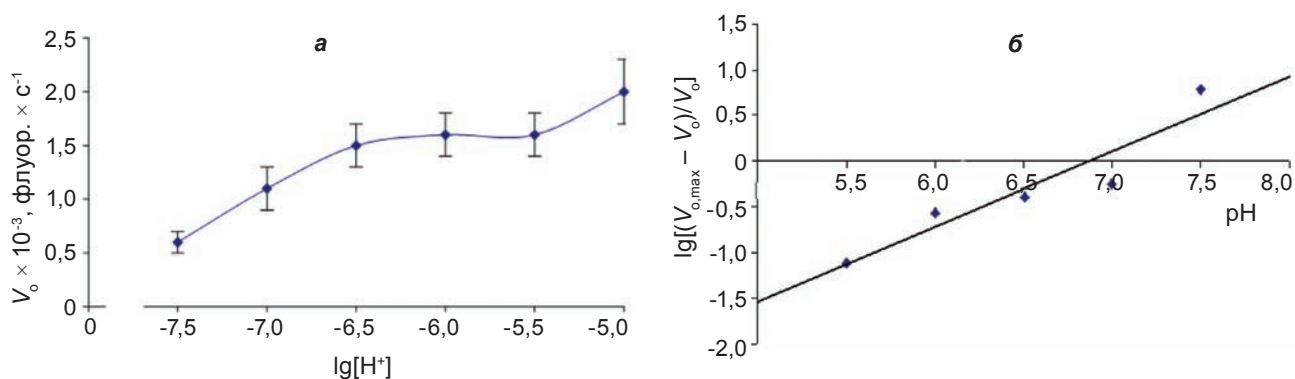


Рис. 7. Залежність початкової швидкості вивільнення Ca^{2+} з мітохондрій міомеріа від концентрації протонів (а). Приклад лінеаризації результатів дослідження (а) в координатах Хілла: суцільна лінія – (б) графічний вигляд прямо пропорційної (лінійної) залежності між зростанням рН та величиною $\lg[(V_{0,\text{max}} - V_0)/V_0]$, де V_0 – початкова швидкість, $V_{0,\text{max}}$ – максимальна початкова швидкість транспортування Ca^{2+} з мітохондрій

напіввивільнення катіона ($t_{1/2}$) зменшується. Отже, швидкість $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обміну зростає в умовах збільшення ΔpH на мембрані МХ, а кінетика ΔpH -індукованого вивільнення Ca^{2+} з МХ міомеріа відповідає закономірностям реакції першого порядку.

Крива залежності швидкості вивільнення Ca^{2+} з ізольованих МХ міомеріа від концентрації протонів у середовищі їх розведення має тенденцію до насичення (рис. 7, а), а розрахована нами константа активації за протонами ($-\lg K_a$ або pH_a) складає $6,9 \pm 0,1$, що свідчить про можливість функціонування системи Na^+ -незалежного виходу Ca^{2+} з МХ за близького до фізіологічного значення рН. Величина коефіцієнта Хілла (n_H), розрахована із застосуванням відповідних координат (рис. 7, б), вказує на стехіометрію $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обміну 1 : 1 і електрогенність транспортної системи. Але, за даними літератури, є докази функціонування у внутрішній мембрані МХ печінки електронейтрального переносника, який здійснює антипорт одного Ca^{2+} із двома іонами Н [27].

На відміну від печінки, нирок, гладеньких м'язів, у мітохондріях серця, мозку, скелетних м'язів працює $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ -обмінник, що зумовлено значним вхідним Na^+ -струмом в умовах деполяризації плазматичної мембрани [14, 28].

Отже, дослідження властивостей $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обміну в мітохондріях міомеріа показало, що зазначений транспортний процес має елек-

трогенну природу і спроможний регулювати внутрішньомітохондріальну концентрацію Ca^{2+} за фізіологічних умов.

Таким чином, із використанням флуоресцентного зонда Fluo-4 АМ ідентифіковано $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обмін у мітохондріях міомеріа і вивчено його окремі властивості, а саме: кінетика ΔpH -індукованого виходу Ca^{2+} з ізольованих мітохондрій задовольняє реакції першого порядку; $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обмін є оборотним; він не залежить від градієнта інших одновалентних катіонів; активується за фізіологічних значень рН; в мітохондріях міомеріа здійснюється в стехіометрії 1 : 1 і, скоріш за все, є електрогенним; катіони Na, L, Li не впливають на транспорт Ca з МХ.

Отже, крім енергозалежної акумуляції Ca^{2+} в мітохондріях міомеріа наявна система вторинно-активного транспортування Ca^{2+} з матриксу цих органел у міоплазму, причому в основі цього процесу, можливо, є функціонування $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обмінника внутрішньої мембрани мітохондрій. Досліджуваний транспортний процес спрямований, передусім, на підтримку фізіологічно-значущої концентрації Ca^{2+} в матриксі мітохондрій і захисті органел від небезпечного для них Ca^{2+} -перевантаження. Водночас, здатність $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обміну працювати в реверсному режимі передбачає його можливу участь у зниженні рівня Ca^{2+} міоплазми після транзйенту.

Ca²⁺/H⁺-ОБМЕН В МИТОХОНДРИЯХ МИОМЕТРИЯ

О. В. Коломиец, Ю. В. Данилович,
А. В. Данилович, С. А. Костерин

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

С использованием флуоресцентного зонда Fluo-4 AM идентифицирован Na⁺-независимый Ca²⁺/H⁺-обмен в изолированных митохондриях миомерия крыс и изучены его отдельные свойства.

Искусственное создание направленного в матрикс митохондрий градиента протонов вызывает антипортное высвобождение Ca²⁺, предварительно аккумулированного в энергонезависимом процессе (в присутствии Mg-АТФ и сукцината). Функционирование Ca²⁺/H⁺-обмена зависит от величины градиента протонов и характеризуется обратимостью, а именно: в условиях защелачивания внемитохондриальной среды регистрируется дополнительная аккумуляция Ca²⁺ органеллами. Градиенты моновалентных катионов (Na⁺, K⁺, Li⁺) не вызывают высвобождение Ca²⁺ из митохондрий. Скорость Ca²⁺/H⁺-обмена возрастает в условиях увеличения ΔрН на мембране митохондрий, а кинетика ΔрН-индуцированного высвобождения Ca²⁺ из матрикса удовлетворяет закономерностям реакции первого порядка.

Исследование свойств Ca²⁺/H⁺-обмена в митохондриях миомерия показало, что этот транспортный процесс имеет электрогенную природу, осуществляется, возможно, в стехиометрии 1 : 1 (коэффициент Хилла по H⁺ близок к 1), а также способен регулировать концентрацию Ca²⁺ в матриксе при физиологических условиях (активация при рН ≈ 6,9).

Таким образом, во внутренней мембране митохондрий миомерия существует система вторично-активного транспорта Ca²⁺ из матрикса этих органелл в миоплазму, причем в основе этого процесса, возможно, лежит функционирование Ca²⁺/H⁺-обменника.

Ключевые слова: митохондрии, Ca²⁺/H⁺-обмен, гладкие мышцы, миомерий, Letm1.

Ca²⁺/H⁺-EXCHANGE IN MYOMETRIUM MITOCHONDRIA

O. V. Kolomiets, Yu. V. Danylovych,
H. V. Danylovych, S. O. Kosterin

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

Using the fluorescent probe Fluo-4 AM the authors have identified Na⁺-independent Ca²⁺/H⁺-exchange in isolated mitochondria of rat myometrium and studied its individual properties.

Formation of directional protons gradient in the matrix of mitochondria causes antyporte release of Ca²⁺, which has been previously accumulated in energetic processes (in the presence of Mg-ATP and succinate). The functioning of Ca²⁺/H⁺-exchange depends on the proton gradient and is characterized by reversibility, in case of extramitochondria environment alkalization the additional accumulation of Ca²⁺ by organelles is recorded. Monovalent cations gradients (Na⁺, K⁺, Li⁺) do not cause the release of Ca²⁺ from mitochondria. Rate of Ca²⁺/H⁺-exchange is growing in terms of increasing ΔрН on the mitochondria membrane and kinetics of ΔрН-induced Ca²⁺ release from the matrix corresponds to the laws of first order reaction.

Research of Ca²⁺/H⁺-exchange some properties in the myometrium mitochondria showed that the above transport process is of electrogenic nature, perhaps it is done in a 1 : 1 stochiometry (Hill coefficient on H⁺ close to 1) and is able to adjust matrix Ca²⁺ concentration under physiological conditions (рН activation of about 6.9).

Thus, in the inner membrane of the myometrium mitochondria the available system of the secondary active Ca²⁺-transport from the matrix of these organelles to myoplasm and the functioning of Ca²⁺/H⁺-exchanger may underlie this process.

Key words: mitochondria, Ca²⁺/H⁺-exchange, smooth muscle, myometrium, Letm1.

1. Костюк П. Г., Костюк О. П., Лук'янець О. О. Внутрішньоклітинна кальцієва сигналізація: структура і функції. – Київ: Наукова думка, 2010. – 175 с.
2. Костерин С. А., Бурдыга Ф. В. // Усп. совр. биол. – 1993. – **113**, вып. 4. – С. 485–505.

3. *Perocchi F., Gohil H. S., Girgis H. S. et al.* // Nature. – 2010. – **467**, N 7313. – P. 291–296.
4. *Santo-Domingo J., Demaurex N.* // Biochim. Biophys. Acta. – 2010. – **1797**. – P. 907–912.
5. *Malli R., Graier W. F.* // FEBS Lett. – 2010. – **584**. – P. 1942–1947.
6. *Pan S., Ryu S.-Y., Sheu S.-S.* // Life Scien. – 2011. – **54**, N 8. – P. 763–769.
7. *Crosdas G., Varnai P., Golenar T.* // Mol. Cel. Endocrin. – 2012. – **353**. – P. 109–113.
8. *Кандаурова Н. В.* Ca²⁺-індуковані зміни мембранного потенціалу мітохондрій міометрія щурів : автореф. дис. ... канд. біол. наук. – 2011. – 20 с.
9. *Baughman J. M., Perocchi F., Girgis H. S. et al.* // Nature. – 2011. – **476**, N 7360. – P. 341–345.
10. *Alam M. R., Groschner L. N., Parichatikanond W.* // J. Biol. Chem. – 2012. – **287**, N 41. – P. 34445–34454.
11. *Jiang D., Zhao L., Clapham D. E.* // Science. – 2009. – **326**. – P. 144–147.
12. *Nowikovsky K., Pozzan T., Rizzuto R. et al.* // J. Gen. Physiol. – 2012. – **139**, N 6. – P. 445–454.
13. *Waldeck-Weirmair M., Jean-Quartier C., Rost R.* // J. Biol. Chem. – 2012. – **286**, N 32. – P. 28444–28455.
14. *Костерин С. А.* Транспорт кальция в гладких мышцах. – Киев: Наукова думка, 1990. – 216 с.
15. *Костерин С. А., Браткова Н. Ф., Курский М. Д.* // Биохимия. – 1985. – **50**, вып. 8. – С. 1350–1361.
16. *Bradford M. M.* // Anal. Biochem. – 1976. – **72**. – P. 248–254.
17. *Гайер Г.* Электронная гистохимия. – Москва: Мир, 1974. – 488 с.
18. *Кандаурова Н. В., Чуніхін О. Ю., Бабіч Л. Г. та ін.* // Укр. біохім. журн. – 2010. – **82**, № 6. – С. 52–57.
19. *Пономаренко О. В., Бабіч Л. Г., Горчев В. Ф., Костерин С. О.* // Укр. біохім. журн. – 2006. – **78**, № 6. – С. 38–45.
20. *Коломієць О. В., Данилович Ю. В., Данилович Г. В., Костерин С. О.* // Укр. біохім. журн. – 2013. – **85**, № 4. – С. 30–39.
21. *Fluo calcium indicators. Molecular probes. Invitrogen detection technologies. Product information.* – Revised: 02-Feb-2011.
22. *Бережнов А. В., Зинченко В. П., Федотова Е. И., Яшин В. А.* Применение флуоресцентной микроскопии в исследованиях динамики Ca²⁺ в клетках. Пушино, Учебно-методический центр Пушинского научного центра, Учебный центр Института биофизики клетки РАН, 2007. – 65 с.
23. *Gee K. R., Brown K. A., Chen W-N. H et. al.* // Cell Calcium. – 2005. – **27**, N 2. – P. 97–106.
24. *Кучеренко М. Є., Бабенюк Ю. Д., Войціцький В. М.* Сучасні методи біохімічних досліджень: Учбовий посібник. – Київ: Фітосоціоцентр, 2001. – 424 с.
25. *Шинлова О. П., Костерин С. А., Веклич Т. А.* // Биохимия. – 1996. – **61**, вып. 8. – С. 1440–1447.
26. *Келети Т.* Основы ферментативной кинетики. – Москва: Мир, 1990. – 350 с.
27. *Вовканич Л. С., Дубицький Л. О.* // Експер. кліні. фізіол. біохім. – 2001. – **3**, № 15. – С. 34–37.
28. *Gunter T. E., Pfeiffer D. R.* // Am. J. Physiol. – 1990. – **258**, N 5. – P. C755–C786.

Отримано 28.05.2013