

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

## $H^+$ – $Ca^{2+}$ -обмінник у мітохондріях міомерія: модуляція екзо- та ендogenousними сполуками

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

*Досліджені властивості  $\Delta pH$ -індукованого транспорту  $Ca^{2+}$  з ізольованих мітохондрій міомерія щурів. Акумуляція  $Ca^{2+}$  здійснювалася за наявності  $Mg$ -АТФ $^{2-}$  та сукцинату. Транспорт іонів  $Ca$  реєстрували із використанням кальційчутливого флуоресцентного зонда Fluo-4 АМ. Показано, що закиснення позамітохондріального середовища стимулює вивільнення  $Ca^{2+}$  із мітохондрій. Цей процес нечутливий до відносно специфічного інгібітора  $Na^+$ – $Ca^{2+}$ -обмінника внутрішньої мембрани мітохондрій тетрафенілфосфонію, але гальмується за наявності моноклональних антитіл проти протеїну LETM1 (анти-LETM1). Протеїн LETM1 в деяких тканинах є молекулярною основою функціонування  $H^+$ – $Ca^{2+}$ -обмінника мітохондрій. Встановлено, що  $H^+$ – $Ca^{2+}$ -обмінник стимулювався діуретиком амілоридом (100 мкмоль/л) та пригнічувався іонами  $Mg$  у мілімолярних концентраціях. Досліджувана транспортна система також стимулювалася макроциклічними сполуками каліксаренами (С-97 та С-99) у субмікромолярних концентраціях, але була абсолютно резистентна до дії оксиду азоту (нітропрусиду та нітриту натрію). Отже, мітохондрії міомерія щурів, вірогідно, не мають системи  $Na^+$ – $Ca^{2+}$ -обміну, а забезпечують підтримання кальцієвого гомеостазу матриксу за допомогою  $H^+$ – $Ca^{2+}$ -обмінника. Останній високоафінно стимулюється каліксаренами, що робить перспективними подальші дослідження щодо закономірностей впливу цих сполук на транспортний процес.*

*Ключові слова:  $H^+$ – $Ca^{2+}$ -обмінник, протеїн LETM1, мітохондрії, каліксарени, міомерії.*

### ВСТУП

Мітохондріям належить провідне значення в фізіології еукаріотних клітин. Вони забезпечують енергією метаболічні процеси, зумовлюють і контролюють їхнє протікання та відіграють головну роль у механізмах клітинної загибелі. Мітохондріальна дисфункція лежить в основі виникнення численних патологічних процесів – від порушень серцево-судинної системи до виникнення новоутворень; в останні роки навіть використовують таку дефініцію, як «мітохондріальні хвороби» [1–4].

Іони  $Ca$  відіграють важливу роль у функціонуванні мітохондрій. З одного боку, зміни концентрації  $Ca^{2+}$  в матриксі регулюють власну метаболічну активність органел. З іншого – кальційтранспортні системи мітохондрій

значною мірою зумовлюють термінацію кальцієвого транзєнта в клітинах. Збільшення концентрації  $Ca^{2+}$  у матриксі мітохондрій активує синтез аденозинтрифосфату (АТФ) та ензимами циклу трикарбонових кислот, водночас перевантаження органел катіоном індукує клітинну загибель. В основі регуляції концентрації  $Ca^{2+}$  у мітохондріях лежить узгоджене функціонування систем, які забезпечують енергозалежну акумуляцію катіона та його вивільнення з матриксу в цитозоль [1, 5–9].

Основною системою акумуляції  $Ca^{2+}$  енергізованими мітохондріями є кальцієвий уніпортер їхньої внутрішньої мембрани, який забезпечує накопичення катіона за електрофоретичним механізмом (від англ. MCU, mitochondrial  $Ca^{2+}$  uniporter). Ця транспортна система модулюється протеїном MICU1 (від

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

англ. mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake 1) і відносно специфічно інгібується рутенієвим червоним. У внутрішній мембрані мітохондрій функціонують також обмінники Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> і H<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>, які забезпечують вивільнення Ca<sup>2+</sup> із матриксу і нечутливі (або малочутливі) до рутенієвого червоного. В залежності від значення рН та співвідношення концентрації Ca<sup>2+</sup> в матриксі та цитозолі H<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-обмінник може функціонувати як в аверсному, так і реверсному режимах. В останньому він забезпечує акумуляцію Ca<sup>2+</sup> з цитозолу за відносно низьких концентрацій катіона (субмікромолярних), на відміну від низькоафінного MCU. Перевантаження іонами Ca та деенергізація мітохондрій супроводжуються відкриттям пори перехідної провідності, через яку також може здійснюватись транспорт катіонів [7–12].

Скорочення гладеньких (тонічних) м'язів значною мірою підтримуються процесами окисного метаболізму та супроводжуються окисненням жирних кислот та ацетоацетату. При цьому важливе значення, на відміну від скелетного м'яза, в забезпеченні енергією для контрактильної активності відіграє цикл трикарбонових кислот. Це вказує на неабияку роль мітохондрій у функціонуванні гладенького м'яза і важливість систем регуляції кальцієвого гомеостазу органел [13, 14]. Передбачається суттєве значення мітохондрій у забезпеченні «правого плеча» кальцієвого транзєнта в міоцитах [15, 16]. В гладенькому м'язі матки (міометрії) дослідження із використанням лазерної конфокальної мікроскопії продемонстрували досить щільне розташування мітохондрій в матриксі, які можуть утворювати структури на кшталт мітохондріального ретикулума [17].

У клітинах гладенького м'яза матки потенціал дії забезпечується значною мірою вхідним Ca<sup>2+</sup>, а не натрієвим струмом [15]. У сарколемі міоцитів матки зареєстрована висока активність незалежної від Ca<sup>2+</sup> Mg<sup>2+</sup>-АТФази, функція якої може полягати в продукуванні H<sup>+</sup> у міоплазму [18]. Ці дані свідчать

про першочергову роль саме H<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-обмінника в мітохондріях клітин гладенького м'яза, зокрема міометрія. Аналогічна транспортна система функціонує також у клітинах печінки та нирок [19]. У наших попередніх дослідженнях, проведених на ізольованих мітохондріях міометрія шурів, продемонстрована наявність системи зворотного H<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-обміну (ΔрН-залежного транспорту іонів Ca), який не залежав від градієнтів іонів Na та K, активувався за фізіологічних значень рН (рН<sub>а</sub> ≈ 7,0) і здійснювався в стехіометрії 1:1 [20]. Але питання ідентифікації білка-транспортера, який забезпечує H<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-обмін у мітохондріях міоцитів матки та пошуку ефективних модуляторів цього процесу, не з'ясоване.

Метою нашої роботи було встановити природу H<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-обміну в ізольованих мітохондріях міометрія шурів і дослідити вплив на цей обмін вибраних органічних та неорганічних ендогенних/екзогенних модуляторів транспортних процесів у гладенькому м'язі.

## МЕТОДИКА

*Одержання фракції мітохондрій міометрія.* Препарат ізольованих мітохондрій отримували із міометрія невагітних шурів за допомогою методу диференційного центрифугування, як описано раніше [6]. Тварин наркотизували інгаляцією діетилового ефіру, після чого їх декапітували. Дотримувались усіх вимог щодо роботи з лабораторними тваринами (Міжнародна конвенція, Страсбург, 1986). Після видалення матки і очищення її від жирової та сполучної тканини, препарат тримали 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): НЕРЕС – 10 (рН 7,4), цукроза – 250, EGTA – 1. Тканину подрібнювали 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 супер-

натант центрифугували протягом 15 хв при (1000 g і 12000 g, 4 °С). Осад ресуспендували у робочому розчині (склад описаний вище) і знову центрифугували (15 хв, 12000 g, 4 °С). Упродовж експерименту одержану фракцію ізольованих мітохондрій зберігали на льоду. Визначали вміст білка у фракції мітохондрій за стандартним методом Bradford [21]. Середнє значення його вмісту становило 2 мг/мл, а в пробі – 50 мкг/мл.

*Процедура навантаження мітохондрій.* Навантаження мітохондрій зондом Fluo-4 AM у концентрації 2 мкмоль/л проводили у середовищі, яке містило (ммоль/л): НЕРЕС – 10 (рН 7,4, 37 °С), цукроза – 250, 0,1%-й бичачий сироватковий альбумін протягом 30 хв при 37 °С. Для покращення процесу змішували барвник із Pluronic F-127 (0,02 %) [22].

*Дослідження вмісту іонізованого Ca в мітохондріях.* Відносні значення вмісту  $Ca^{2+}$  у матриці мітохондрій міометрія, навантажених Fluo-4 AM ( $\lambda_{\text{зб.}} = 490$  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 [22]. Середовище, з якого здійснювалась енергозалежна акумуляція  $Ca^{2+}$  мітохондріями, мало склад (ммоль/л) [4, 6]: НЕРЕС – 20 (рН 7,4, 37 °С), цукроза – 250, калій-фосфатний буфер – 2 (рН 7,4, 37 °С),  $MgCl_2$  – 3, АТФ – 3, сукцинат натрію – 5, концентрація  $Ca^{2+}$  – 80 мкмоль/л. Енергозалежну акумуляцію  $Ca^{2+}$  проводили протягом 5 хв, після чого аліквоту суспензії (100 мкл) розводили в середовищі вивільнення  $Ca^{2+}$  (2 мл) такого складу (ммоль/л): НЕРЕС – 20 (рН 6,5, 37 °С), цукроза – 250, калій-фосфатний буфер – 2 (рН 6,5, 37 °С), сукцинат натрію – 5, концентрація циклоспорину А – 5 мкмоль/л.

Значення флуоресцентної відповіді наводили у відносних одиницях як  $F/F_0$ , де  $F_0$  – початковий рівень флуоресценції,  $F$  – флуоресцентний сигнал упродовж спостереження за транспортом  $Ca^{2+}$ .

Статистичний аналіз отриманих резуль-

татів проводили із використанням пакета стандартних програм IBM PC, застосовуючи загальновідомі методи [23] і критерій t Стьюдента.

В роботі були використані реактиви: НЕРЕС, диметилсульфоксид, циклоспорин А, сукцинат натрію, цукроза, АТФ. Мишачі комерційні моноклональні антитіла проти LETM1 людини анти-LETM1 (від англ. leucine-zipper-EF hand-containing transmembrane region; «Sigma», США), Fluo-4 AM, Pluronic F-127 («Invitrogen», США), бичачий сироватковий альбумін, мінеральні солі вітчизняного виробництва. Розчини готували на бідистильованій воді, яка мала питому електропровідність не більше ніж 1,5 мкСм/см. Електропровідність води реєстрували за допомогою кондуктометра ОК-102/1 (Угорщина).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Згідно з сучасними уявленнями, молекулярною структурою, яка забезпечує функціонування  $H^+$ - $Ca^{2+}$ -обмінника у внутрішній мембрані мітохондрій, виступає протеїн LETM1. Ця ізоформа розповсюджена в мітохондріях еукаріотів, тоді як LETM2 знайдений лише в тестикулах і сперматозоїдах. У дріжджах ідентифікований структурно і функціонально подібний протеїн Mdm38. Делеція відповідного гена, який локалізований у короткому плечі 4-ї хромосоми, призводить до виникнення синдрому Вольфа–Хиршхорна, що супроводжується затримкою росту та розвитку, епілептичними нападами тощо. Надекспресія LETM1 пов'язана із пригніченням туморогенезу [10–12, 24].

LETM1 асоційований із величезним білковим комплексом масою 300–500 кДа внутрішньої мітохондріальної мембрани. Відсутність цього протеїну спричинює деполяризацію та набухання мітохондрій, втрату крист. Тому LETM1 розглядається також як елемент молекулярної структури, яка бере участь у підтриманні калієвого гомеостазу органел [11].

У структурі протеїнів родини Mdm38/

LETM1 виділяють N-термінальний кінець, розташований у міжмембранному просторі мітохондрій, трансмембранний домен, який регулює димеризацію, і С-кінцевий домен, знаходиться у матриксі, що включає в себе, зокрема, типову кальційзв'язувальну структуру типу «EF-hand» [11]. Остання може забезпечувати функціонування LETM1 як H<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-обмінника або виступати сенсором змін концентрації Ca<sup>2+</sup> у матриксі.

Оскільки мітохондрії в клітинах гладеньких м'язів морфологічно пов'язані із сарколемою та саркоплазматичним ретикуломом [15, 25], їхня зовнішня мембрана після препаративного виділення набуває значної неспецифічної проникності. Водночас численні електронно-мікроскопічні дослідження, функціональні тести (вивчення кальційтранспортних процесів) та дані фотонної кореляційної спектроскопії однозначно вказують на наявність інтактної внутрішньої мембрани в ізольованих мітохондріях міомерія [5, 6, 15, 20, 22]. Раніше було показано, що використання флуоресцентного зонда Fluo-4 AM дає змогу надійно тестувати зміни концентрації Ca<sup>2+</sup> у матриксі ізольованих мітохондрій, а їхня внутрішня мембрана має бар'єрну щодо іонів Ca функцію [22].

Виявлено, що закиснення позамітохондріального середовища (рН 6,5) стимулює

вивільнення Ca<sup>2+</sup> з ізольованих мітохондрій, який був попередньо акумульований організмами в енергозалежному процесі (рис. 1, 1). При значенні рН середовища 7,5 вихід катіона не є суттєвим, що повністю відповідає нашим попереднім результатам [20]. Встановлено, що інгібітор Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-обмінника мітохондрій тетрафенілфосфоній [26] не впливає на ΔрН-індукований транспорт Ca<sup>2+</sup> (див. рис. 1). Цей результат ставить під сумнів наявність Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-обмінника в мітохондріях міомерія.

Анти-LETM1 суттєво пригнічували ΔрН-індуковане вивільнення Ca<sup>2+</sup> з мітохондріального матриксу. У разі 5-хвилинної інкубації з антитілами ефект був більше виражений (рис. 2). Отже, є підстави припустити, що мітохондрії міомерія щурів мають транспортну систему H<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-обмінника, яка репрезентована білком LETM1.

Водночас використання антитіл повністю не інгібує транспортну систему навіть за умови їхньої високої концентрації: до 100 мкг протеїну мітохондрій додавали 2,5 мкг анти-LETM1. Цей результат можна пояснити видоспецифічністю білка-транспортера. Існують відомості щодо взаємодії LETM1 із системами, які забезпечують транспорт речовин у мітохондрії [11], що, можливо, перед-

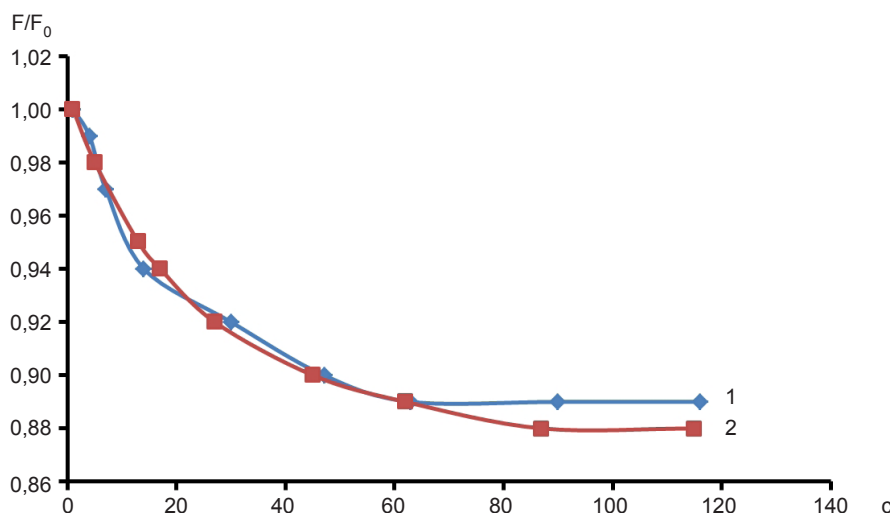


Рис. 1. Вплив інгібітора Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-обмінника тетрафенілфосфонію (ТФФ) на ΔрН-індуковане вивільнення іонів Ca з мітохондрій міомерія. 1 – контроль, 2 – 100 мкмоль/л ТФФ

бачає зв'язок протеїну також із зовнішньою мембраною органел.

Важливою проблемою подальшого вивчення властивостей та регуляції  $H^+-Ca^{2+}$ -обмінника є пошук як природних, так і штучних інгібіторів транспортної системи. В доступній нам літературі відповідних відомостей дуже мало. Показано, що транспорт  $Ca^{2+}$  у внутрішній мембрані мітохондрій модулюється іонами Mg та діуретиками (амілорид) [26]. В наших дослідженнях (рис. 3)  $Mg^{2+}$  пригнічував, а амілорид стимулював  $H^+-Ca^{2+}$ -обмінник.

При вивченні властивостей кальцієвого уніпортера мітохондрій дія іонів Mg виявилася біфазною: за фізіологічних мілімолярних концентрацій спостерігалася стимуляція транспортної системи, а за високих – інгібування [5]. Останній ефект пов'язується або ж прямим впливом на каналну структуру, або із екрануванням негативного заряду, який забезпечує рушійну силу уніпортера [26]. Для  $H^+-Ca^{2+}$ -обмінника ми припускаємо безпосередній вплив  $Mg^{2+}$  на транспорту систему. Проникнення блокувального катіона до матриксу і відповідна конкуренція із  $Ca^{2+}$  за місця зв'язування є маловірогідною через бар'єрну функцію внутрішньої мембрани.

Якщо дослідження із застосуванням амілориду та його аналогів продемонстрували інгібувальний вплив діуретиків на кальцієвий уніпортер [18], то відповідний ефект на  $H^+-Ca^{2+}$ -обмінник виявився протилежним (див. рис. 3).

У наших експериментах попередня акумуляція  $Ca^{2+}$  в енергозалежному процесі може призвести до деполаризації внутрішньої мембрани мітохондрій, що відкриває можливість вивільнення катіона із матриксу за концентраційним градієнтом через структуру MCU. Оскільки ефекти відомих модифікаторів транспорту  $Ca^{2+}$  на рівні уніпортера і  $H^+-Ca^{2+}$ -обмінника протилежні, останнє припущення мало вірогідне. З іншого боку, згідно з нашими попередніми результатами [27], пора перехідної провідності не відіграє суттєвої ролі у транспорті  $Ca^{2+}$  в ізольованих мітохондріях за цих умов.

Дослідження останніх років вказують на важливу роль оксиду азоту (NO) у функціонуванні мітохондрій. Знайдена мітохондріальна ізоформа NO-синтази, яка, можливо, є сплайс-варіантом нейрональної. Зовнішня мембрана мітохондрій у нейронах і ендотеліоцитах зв'язує також ендотеліальну форму NO-синтази. Електронно-транс-

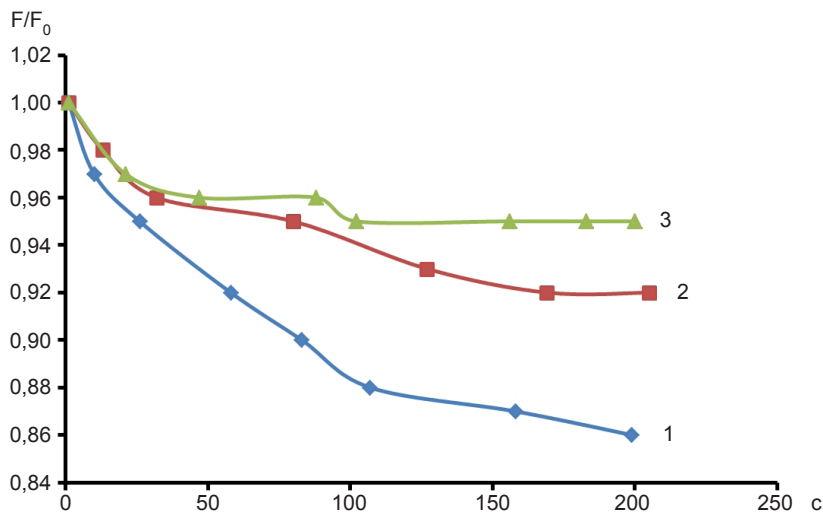


Рис. 2. Вплив комерційного моноклонального антитіла проти  $H^+-Ca^{2+}$ -обмінника мітохондрій (анти-LETM1) на  $\Delta pH$ -залежний транспорт  $Ca^{2+}$  з матриксу ізольованих мітохондрій міометрія щурів (на 100 мкг білка мітохондрій – 2,5 мкг антитіла). 1 – контроль, 2 – додавання анти-LETM1, 3 – передінкубація 5 хв з анти-LETM1

портний ланцюг мітохондрій та матриксні ензими – ефективні мішені для оксиду азоту або його похідних через наявність гемових груп та залізо-сірчаних кластерів. Оксид азоту регулює споживання кисню мітохондріями, процеси окисного фосфорилування та біогенез органел. Баланс між різними формами та концентраціями активних метаболітів азоту та кисню в мітохондріях визначає життя або загибель клітини [3]. Проте інформація щодо впливу донорів NO на кальційтранспортні системи мітохондрій доволі обмежена. Раніше нами демонструвалася стимуляція за дії

нітрозактивних сполук (нітропрусиду та нітриту натрію) кальцієвого уніпортера [27]. Водночас H<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-обмінник виявився резистентним до їхньої дії (рис. 4). Отже, ефект оксиду азоту на кальційтранспортні системи мітохондрій є специфічним.

Стимуляція енергозалежної акумуляції іонів Ca органелами оксидом азоту на тлі відсутності будь-якого ефекту на вихід катіона може забезпечити зниження концентрації Ca<sup>2+</sup> в міоплазмі поблизу мітохондрій.

Відсутність високоафінних модуляторів H<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-обмінника мітохондрій спонукало нас до пошуку синтетичних речовин,

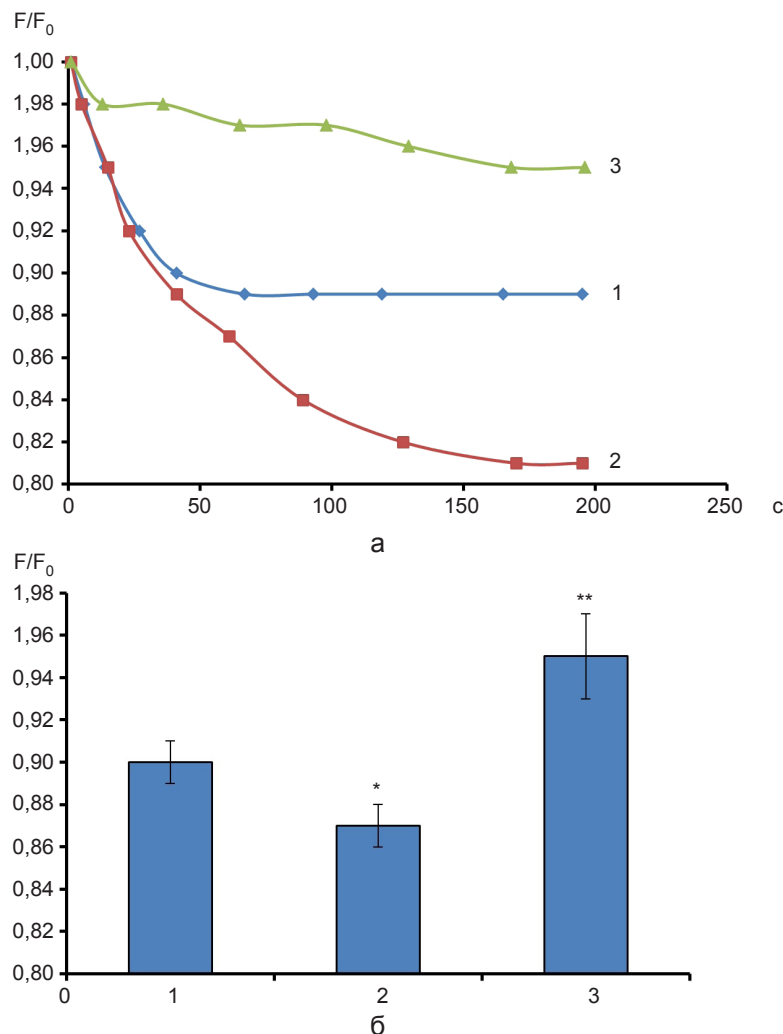


Рис. 3. Дія модифікаторів трансмембранного обміну катіонів на  $\Delta pH$ -індукований транспорт Ca<sup>2+</sup> з мітохондрій. 1 – контроль, 2 – 100 мкмоль/л амілорид, 3 – 4,5 ммоль/л Mg<sup>2+</sup>: а – результати типового експерименту, б – статистичний аналіз результатів, n=5; \*P≤0,02, \*\*P≤0,05 відносно контролю

здатних ефективно впливати на зазначену структуру. Нині інтенсивно досліджуються супрамолекулярні макроциклічні сполуки – каліксарени, – високоафінні модифікатори АТФ-гідролазу у гладенькому м'язі, зокрема матки, що привертає увагу до їхнього значення як можливих регуляторів кальцієвого гомеостазу міоцитів. Показана інгібіторна дія окремих каліксаренів на  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазу сарколеми та саркоплазматичного ретикулула, а також АТФ-гідролазну активність препаратів міозину з міомерія [28]. Демонструється ефективний подібний до убаїну вплив сполук С-97 та С-99 на  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазу активність сарколеми міомерія, яка проявляється у концентраціях 50-100 нмоль/л. Зазначені макроцикли викликають деполаризацію плазматичної мембрани та транзйентне зростання мембранного потенціалу мітохондрій [17]. Останній факт робить актуальним дослідження їхнього впливу на  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник мітохондрій.

Нами встановлено, що каліксарени С-97 та С-99 високоафінно (у субмікромольній концентрації) стимулюють досліджувану транспортну систему (рис. 5). Водночас макроцикл С-107, який має подібну біохімічну активність [17], та С-150 – суто каліксаренова

чаша без замісників, яка була використана для порівняння, не мали ефекту у зазначеній концентрації. Вплив диметилсульфоксиду, в якому були розчинені каліксарени, у робочій концентрації був несуттєвим.

Як було вказано вище, стехіометрія  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника мітохондрій міомерія близька до 1:1, що вказує на електрогенність транспортної системи та можливість поляризації внутрішньої мембрани мітохондрій при її функціонуванні. Отже, стимуляція обмінника дослідженими каліксаренами повинна підвищити мітохондріальний потенціал, що дійсно спостерігається в наших експериментах [17].

Отже, ми показали, що закиснення поза-мітохондріального середовища супроводжується вивільненням іонів  $\text{Ca}^{2+}$  із мітохондрій. Цей процес не є чутливим до специфічного інгібітора  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника внутрішньої мітохондріальної мембрани тетрафенілфосфонію і гальмується за наявності моноклональних антитіл проти протеїну LETM1. Таким чином, можна вважати, що в мітохондріях міомерія шурів нами ідентифікований  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник, молекулярною основою функціонування якого, можливо, є протеїн LETM1. Досліджуваний

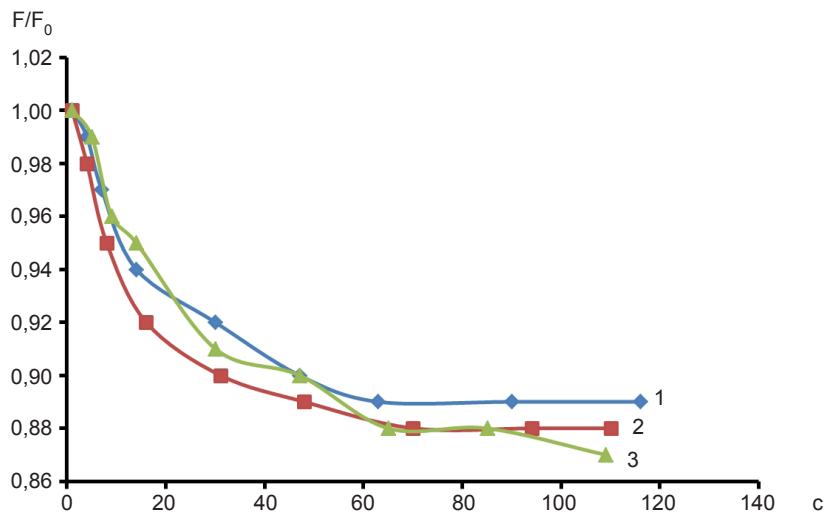


Рис. 4. Вплив нітрозактивних сполук на  $\Delta\text{pH}$ -індукований транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  з мітохондрій. 1 – контроль, 2 – 100 мкмоль/л NPS, 3 – 100 мкмоль/л NS

H<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-обмінник виявився резистентним до дії нітрозактивних сполук – нітропрусиду та нітриту натрію (100 мкмоль/л), пригнічувався іонами Mg у мілімолярних концентраціях, але стимулювався діуретиком амілоридом (100 мкмоль/л) та каліксаренами С-97, С-99 (100 нмоль/л). Високоафінна дія вищезазначених каліксаренів (субмікромолярні концентрації) спонукає до подальших досліджень цього класу органічних сполук для пошуку ефективних модуляторів кальційтранспортних систем мітохондрій.

Автори висловлюють подяку члену-кореспонденту НАН України, професору

С.О. Костеріну за цінні рекомендації під час обговорення експериментальних результатів та в процесі написання рукопису.

Синтез каліксаренфосфонових кислот С-97 (5-Біс(дигідроксифосфорил)метил-25,27-дипропоксикалікс[4]арен), С-99 (5,17-Біс(дигідроксифосфонілметил)-25,27-дипропоксикалікс[4]арен), С-107 (5,17-ди(фосфоно-2-піридилметил)аміно-11,23-ди-трет-бутил-26,28-дигідрокси-25,27-дипропоксикалікс[4]арен) та С-150 (25, 27-дипропоксикаліксарен) був здійснений у відділі хімії фосфоранів Інституту органічної хімії НАН України.

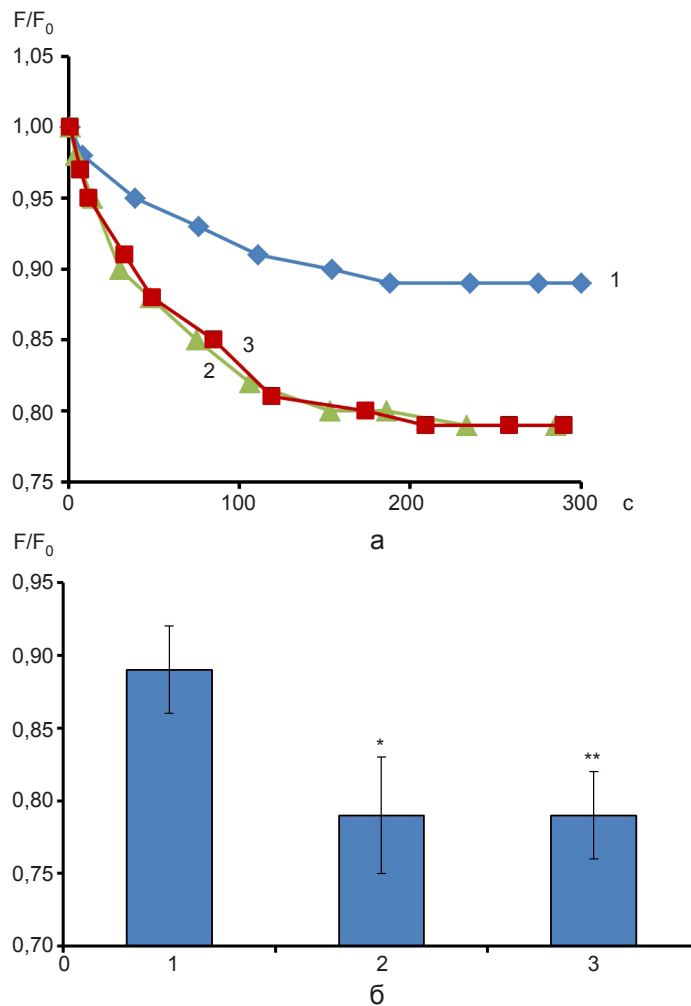


Рис. 5. Дія каліксаренів на  $\Delta pH$ -індукований транспорт  $Ca^{2+}$  з мітохондрій. 1 – контроль, 2 – 100 нмоль/л каліксарену С-97, 3 – 100 нмоль/л каліксарену С-99: а – результати типового експерименту, б – статистичний аналіз результатів,  $n=6-7$ ; \* $P<0,1$ , \*\* $P<0,05$  відносно контролю



**О.В. Коломієць, Ю.В. Данилович,  
А.В. Данилович**

### **H<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-ОБМЕННИК В МИТОХОНДРИЯХ МИОМЕТРИЯ: МОДУЛЯЦИЯ ЭКЗО- И ЭН- ДОГЕННЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ**

Исследованы свойства ΔpH-индуцированного транспорта Ca<sup>2+</sup> из изолированных митохондрий миометрия крыс. Аккумуляция Ca<sup>2+</sup> осуществлялась в присутствии Mg-ATP<sup>2-</sup> и сукцината. Транспорт ионов Ca регистрировали с использованием Ca<sup>2+</sup>-чувствительного флуоресцентного зонда Fluo-4 AM. Показано, что закисление внемитохондриальной среды сопровождается стимуляцией высвобождения Ca<sup>2+</sup> из митохондрий. Этот процесс нечувствителен к относительно специфическому ингибитору Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-обменника внутренней мембраны митохондрий тетрафенлфосфонию, однако угнетается в присутствии моноклональных антител против протеина LETM1 (Anti-LETM1). Протеин LETM1 в некоторых тканях является молекулярной основой функционирования H<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-обменника митохондрий. Установлено, что H<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-обменник стимулировался диуретиком амилоридом (100 мкмоль/л) и подавлялся ионами Mg в миллимолярных концентрациях. Исследуемая транспортная система была абсолютно резистентна к действию оксида азота (нитропрусида и нитрита натрия), но стимулировалась макроциклическими соединениями каликсаренами (C-97 и C-99) в субмикромольных концентрациях. Итак, митохондрии миометрия крыс, вероятно, не обладают системой Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-обменника, а обеспечивают поддержание кальциевого гомеостаза матрикса с помощью H<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-обменника. Последний высокоаффинно активируется каликсаренами, что делает перспективными дальнейшие исследования закономерностей влияния этих соединений на транспортный процесс. Ключевые слова: H<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-обменник, LETM1, митохондрии, каликсарены, миометрий.

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

### **H<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-EXCHANGER IN THE MYOMETRIUM MITOCHONDRIA: MODULATION OF EXOGENOUS AND ENDOGENOUS COMPOUNDS**

The properties of ΔpH-induced Ca<sup>2+</sup>-transport from isolated rat myometrium mitochondria was investigated. Ca<sup>2+</sup>-accumulation was carried out in the presence of Mg-ATP<sup>2-</sup> and succinate. Transport of Ca<sup>2+</sup> recorded using Ca<sup>2+</sup>-sensitive fluorescent probe Fluo-4 AM. It is shown that acidification of extramitochondrial medium is accompanied by stimulation of Ca<sup>2+</sup> release from mitochondria. This process is insensitive to the tetraphenylphosphonium which is relatively specific Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-exchanger inhibitor of mitochondrial inner membrane, but inhibited in the presence of monoclonal antibodies directed against the protein LETM1 (Anti-LETM1). LETM1

protein in some tissues is the molecular basis of the H<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-exchanger functioning on mitochondria. It was found that the H<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-exchanger is stimulated by 100 μM amiloride (diuretic) and inhibited by Mg ions in millimolar concentrations. The transport system was completely resistant to the action of nitric oxide (sodium nitroprusside and sodium nitrite), but was stimulated by macrocyclic compounds of Calixarenes (C-97 and C-99) in submicromolar concentrations. Thus, the mitochondria of rat myometrium probably not have a system of Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-exchanger, and provide the maintenance of the matrix Ca<sup>2+</sup>-homeostasis with H<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-exchanger. Since the transport system high affinity activated by Calixarenes, further investigation of the influence of these compounds on the transport process makes promising.

Key words: H<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-exchanger, LETM1, mitochondria, Calixarenes, myometrium.

*In-t біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ*

### **REFERENCES**

1. Kostyuk PG, Kostyuk OP, Lukyanets EA. Intracellular calcium signaling: structures and functions. Kyiv: Nauk. Dumka; 2010 [Ukrainian].
2. Duchon MR. Roles of mitochondria in health and disease. Diabetes. 2004 Feb;53 Suppl 1:S96-102.
3. Mitochondrial signaling in health and disease. Eds. S. Orrenius, L. Packer, E. Cadenas. N.Y.: CRC Press; 2012.
4. Piao L., Li Y., Kim S.J., Byun H.S., Huang S.M. Association of LETM1 and MRPL36 contributes to the regulation of mitochondrial ATP production and necrotic cell death. Cancer Res. 2009 Apr 15;69(8):3397-404.
5. Veklich TO. Transport of Ca<sup>2+</sup> in the smooth muscle cells mitochondria: Manuscript. Kiev: Palladin Institute of Biochemistry of the NASU; 2003 [Ukrainian].
6. Kandaurova NV. Ca<sup>2+</sup>-induced changes of membrane potential of myometrium mitochondria: Manuscript. Kiev: Palladin Institute of Biochemistry of the NASU; 2011 [Ukrainian].
7. 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.
8. Pan S., Ryu S.-Y., Sheu S.-S. Distinctive characteristics and functions of multiple mitochondrial Ca<sup>2+</sup> influx mechanisms. Sci China Life Sci. 2011 Aug;54(8):763-9.
9. Santo-Domingo J., Demareux N. Calcium uptake mechanisms of mitochondria. Biochim Biophys Acta. 2010 Jun-Jul;1797(6-7):907-12.
10. Jiang D, Zhao L, Clapham DE. Genome-wide RNAi screen identifies Letm1 as a mitochondrial Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. Science. 2009 Oct 2;326(5949):144-7.
11. Nowikovsky K., Pozzan T., Rizzuto R., Scorrano L., Bernardi P. The pathophysiology of LETM1. J Gen Physiol. 2012 Jun;139(6):445-54.
12. Waldeck-Weirmair M, Jean-Quartier C, Rost R, Khan MJ. Leucine zipper EF hand-containing transmembrane protein

- 1 (Letm1) and uncoupling proteins 2 and 3 (UCP2/3) contribute two distinct mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake pathways. *J Biol Chem.* 2011 Aug 12;286(32):28444-55.
13. Mc Comas AJ. Skeletal muscle (structure and function). - Kiev: Olympic. Lit-ra; 2001 [Ukrainian].
14. Barany EdM. Biochemistry of smooth muscle contraction. San Diego, California: Acad. Press; 1996.
15. Kosterin SO. Transport of calcium in the smooth muscles. Kiev: Naukova dumka; 1990 [Ukrainian].
16. Kosterin SA, Burdyga ThV, Fomin VP, Grover AK. Mechanism of Ca<sup>2+</sup>-transport in myometrium. Control of Uterine Contractility. Eds. R. E. Garfield, T. N. Tabb. London, Tokyo: CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor; 1994.
17. Danylovykh GV, Danylovykh YuV, Kolomiets OV, Chunikhin AJu, Gorchev VF, Karakhim SA, Kosterin SO, Rodik RV, Cherenok SO, Kalchenko VI. Changes in polarization of myometrial cells plasma and internal mitochondrial membranes under calixarenes action as inhibitors of plasma membrane Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP-ase. *Ukr Biokhim Zh* 2012 Nov-Dec;84(6):37-48 [Ukrainian].
18. Kosterin SO. The possible H<sup>+</sup>-dependent functional connection between plasma membrane and mitochondria in the smooth muscle cell. *Ukr Biokhim Zh.* 1998 Nov-Dec;70(6):152-60 [Ukrainian].
19. Vovkanych LS, Dubytsky LO. Kinetic properties of the H<sup>+</sup>-stimulated rat liver mitochondria Ca<sup>2+</sup> efflux. *Exp Clin Physiol Biochem* 2001; 15(3):34-37 [Ukrainian].
20. Kolomiets OV, Danylovykh YuV, Danylovykh GV, Kosterin SO. Regularities of Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>-exchange in mitochondria myometrium. *Ukr Biokhim Zh* 2014 Jul-Aug;86(3):41-8 [Ukrainian].
21. 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.
22. Kolomiets OV, Danylovykh YuV, Danylovykh GV, Kosterin SO. Ca<sup>2+</sup> accumulation study in isolated smooth muscle mitochondria using Fluo-4 AM. *Ukr Biokhim Zh* 2013 Jul-Aug;85(4):30-9 [Ukrainian].
23. Bailay NTJ. Statistical methods in biology. Great Britain: Cambridge University Press; 1995.
24. Shin JY, Chung YS, Kang B, Jiang HL. Co-delivery of LETM1 and CTMP synergistically inhibits tumor growth in H-ras 12V liver cancer model mice. *Cancer Gene Ther.* 2013 Mar;20(3):186-94.
25. Rizzuto R, Marchi S, Bonora M, Aguiary P, Bononi A. Ca<sup>2+</sup> transfer from the ER to mitochondria: When, how and why. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Nov;1787(11):1342-51.
26. Gunter TE, Pfeiffer DR. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol.* 1990 May;258(5 Pt 1):C755-86.
27. Kolomiets OV, Danylovykh YuV, Danylovykh GV. Influence of nitric oxide on transmembrane calcium exchange and mitochondrial inner membrane polarization of smooth muscle. III Conference of young scientists "Physiology: from Molecules to Organism" Kiev: Bogomoletz Institute of Physiology NASU; 2013 Oct: 15-16 [Ukrainian].
28. Labyntseva RD, Slinchenko NM, Veklich TO, Rodik RV, Cherenok SO, Boiko VI, Kal'chenko VI, Kosterin SO. Comparative study of calixarene effect on Mg<sup>2+</sup>-dependent ATP-hydrolase enzymatic systems from smooth muscle cells of the uterus *Ukr Biokhim Zh.* 2007 May-Jun;79(3):44-54 [Ukrainian].

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

*Матеріал надійшов до*  
*редакції 17.03.2014*