

**ТРАНСМЕМБРАННИЙ ОБМЕН  $\text{Ca}^{2+}$   
В ДЕПОЛЯРИЗОВАННЫХ МИТОХОНДРИЯХ  
МИОМЕТРИЯ КРЫС**

*Л. Г. БАБИЧ, С. Г. ШЛЫКОВ, Н. В. КАНДАУРОВА, С. А. КОСТЕРИН*

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

*Поляризация внутренней мембраны является ключевым фактором в обеспечении аккумуляции физиологически значимых катионов, в частности  $\text{Ca}^{2+}$ , в матриксе митохондрий. Так, достоверно показано, что вход ионов Ca в митохондрии обеспечивается главным образом  $\text{Ca}^{2+}$ -унипортером, активность которого зависит от мембранного потенциала. Тем не менее, есть отдельные сообщения о том, что и деполяризованные митохондрии способны аккумулировать  $\text{Ca}^{2+}$ . Цель данной работы – исследовать трансмембранный обмен ионов Ca в митохондриях миомерия в условиях диссипации мембранного потенциала. Ранее нами было показано, что внесение  $\text{Ca}^{2+}$  в инкубационную среду, не содержащую  $\text{K}^+$ -фосфат, АТФ и  $\text{Mg}^{2+}$ , приводило к деполяризации митохондриальной мембраны. Однако при этом регистрируется дозозависимое повышение уровня ионизированного Ca в матриксе митохондрий при внесении их в  $\text{Ca}^{2+}$ -содержащую среду. Введение в инкубационную среду 10 мкМ рутениевого красного или 3–7 мМ  $\text{Mg}^{2+}$ , классических ингибиторов  $\text{Ca}^{2+}$ -унипортера, сопровождалось ростом уровня ионизированного Ca в деполяризованных митохондриях. Предварительная инкубация митохондрий с 5 мкМ циклоспорином А, ингибитором митохондриальной поры, не снижала уровень  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксе. Высказывается предположение, что в условиях блокады потенциал-зависимых механизмов входа  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондрии, увеличение его уровня в матриксе, возможно, обеспечивается функционированием  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обменника. Рост уровня ионизированного Ca в митохондриях, по сравнению с контролем, в ответ на введение рутениевого красного или  $\text{Mg}^{2+}$ , вероятно, обусловлен ингибированием  $\text{Ca}^{2+}$ -унипортера, который в условиях деполяризации функционирует как система, обеспечивающая выход катиона.*

*Ключевые слова:* изолированные митохондрии миомерия,  $\text{Ca}^{2+}$ , мембранный потенциал, проточная цитометрия.

**Х**орошо известно, что митохондрии способны к аккумуляции ионов кальция [1–3]. Описаны как минимум три механизма, обеспечивающие поглощение  $\text{Ca}^{2+}$  митохондриями: (1) – электрогенный унипортер; (2) – быстрое поглощение  $\text{Ca}^{2+}$  (RaM); (3) – риаинодиновый рецептор (RuR) [4–6]. Выброс  $\text{Ca}^{2+}$  из митохондрий осуществляется путем  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  или  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  обмена [7, 8]. В гладких мышцах выход  $\text{Ca}^{2+}$  из митохондрий обеспечивает  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник [8]. Митохондриальная пора транзиентной проницаемости также рассматривается как механизм выхода  $\text{Ca}^{2+}$  [5, 9]. Montero и соавт. показали, что коллапс мембранного потенциала ( $\Delta\psi$ ) предотвращает поглощение  $\text{Ca}^{2+}$  митохондриями [10]. Было установлено, что деполяризация митохондриальной мембраны при использовании протоно-

форов FCCP или CCCP, а также в комбинации их с олигомицином – ингибитором  $\text{F}_1\text{F}_0$  АТФ-синтетазы, приводит к ингибированию входа  $\text{Ca}^{2+}$  через унипортер за счет снятия электрической составляющей электрохимического потенциала, контролирующего поглощение  $\text{Ca}^{2+}$  [5]. Следовательно, деполяризация внутренней мембраны митохондрий должна приводить к предотвращению входа  $\text{Ca}^{2+}$  в матрикс. Тем не менее, было показано, что деполяризованные митохондрии MDCK клеток (Madin-Darby canine kidney cell line) способны к аккумуляции  $\text{Ca}^{2+}$ , что обеспечивается функционированием  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника в обратном направлении [11]. Результаты, описанные в данной работе, свидетельствуют о том, что в деполяризованных митохондриях миомерия имеет место трансмембранный обмен  $\text{Ca}^{2+}$ .

Принятые сокращения: RuR – рутениевый красный, CCCP – карбонилцианид m-хлорофенилгидразон, Ru – риаинодин, RuR – риаинодиновый рецептор,  $\Delta\psi$  – мембранный потенциал.

## Материалы и методы

В работе использовали реактивы: АТР, БСА (свободный от жирных кислот),  $\text{CaCl}_2$ , карбонилцианид *m*-хлорофенилгидразон (СССР), циклоспорин А (CsA), 10-нонил акридин оранж (NAO), рианодин (Ru), олигомицин, DMSO, EGTA, сукцинат натрия, Neres (Sigma, США). Тетраметилродамин метиловый эфир (TMRM), fluo3AM и рутениевый красный RuR (Fluka, Швейцария). NAO, TMRM, CsA, Ru и fluo3AM растворяли в DMSO и хранили аликвотами при 4 °С (NAO, CsA, Ru) или -20 °С (TMRM и fluo3AM).

**Выделение митохондрий.** Митохондрии миоциты крыс получали методом дифференциального центрифугирования, как описано ранее [8]. Все манипуляции с тканью проводили на льду в охлажденной среде выделения такого состава: 250 мМ сахара, 1 мМ EGTA, 10 мМ Neres (pH 7,4). Глубокую анестезию крыс вызывали ингаляцией диэтилового эфира, после чего животных умерщвляли при помощи цервикальной дислокации. Эксперименты проводили сразу же после получения препарата.

Концентрацию протеина во фракции митохондрий определяли по методу Bradford [12], используя БСА в качестве стандарта.

БСА (свободный от жирных кислот, 0,1% вес/об.) добавляли в конечную суспензию митохондрий.

**Проточная цитометрия.** Проточный цитометр COULTER EPICS XL™ (Beckman Coulter,

США), оснащенный аргоновым лазером ( $\lambda_{\text{буд.}} = 488 \text{ нм}$ ) и программным обеспечением SYSTEM II™, использовали для регистрации флуоресцентных сигналов NAO, fluo3AM и TMRM в изолированных митохондриях. Соотношение «объем пробы»/«содержание митохондриального протеина» сохранялось постоянным во всех экспериментах. Флуоресцентный сигнал NAO и TMRM достигал плато значения после 3 мин инкубации.

**Чистота препарата.** С помощью проточного цитометра митохондрии тестировали, основываясь на их светопреломляющих свойствах. Примеси мембранных фрагментов в анализе исключали, помещая дискриминатор по параметру прямого светорассеивания в положение 10. События для анализа выбирали путем введения логического ограничения в протокол эксперимента — гейт А (рис. 1, а). Для определения чистоты препараты митохондрий окрашивали 100 нМ NAO, который селективно связывается с кардиолипином на внутренней мембране митохондрий (Em 525 нм) [13]. Во всех проанализированных препаратах более чем 95% событий в пределах гейта А были NAO-положительными (рис. 1, б). Гейт А в дальнейшем использовали для анализа TMRM- и fluo3AM-флуоресценции (соответственно потенциал- и  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительный флуоресцентные зонды).

**Тестирование мембранного потенциала митохондрий.** Митохондриальный мембранный потенциал тестировали с использованием

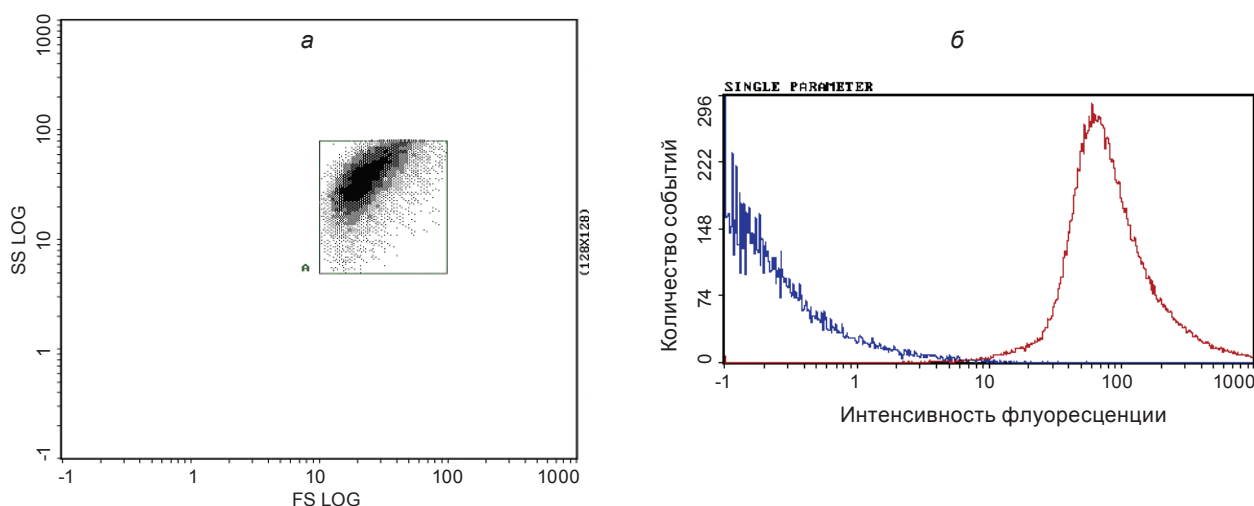


Рис. 1. Характеристика суспензии митохондрий миоциты крыс по светопреломлению (а) и селективному окрашиванию (б) с использованием метода проточной цитометрии. Во всех экспериментах тестировали 10 тыс. событий в пределах гейта А (а). Препараты окрашивали 100 нМ NAO (б) для определения чистоты фракции. Флуоресцентный сигнал при 525 нм для NAO-окрашенных объектов в пределах гейта А (красная линия) сравнивается с неокрашенными контрольными образцами (синяя линия)

флуоресцентного зонда TMRM, как сообщалось ранее [14]. Свежеизолированные митохондрии миомерия (50 мкл, 1 мг протеина/мл) нагружали (в темноте) 100 нМ TMRM в 1 мл среды (буфер выделения без EGTA, в который был внесен 5 мМ сукцинат) в течении 3 мин при комнатной температуре и затем сразу же анализировали на проточном цитометре при  $\lambda = 590$  нм (FL-2 канал). Каждое определение представляло собой среднее значение интенсивности флуоресценции 10 тыс. событий, которое выражалось в условных единицах: «среднее значение интенсивности флуоресценции пробы» минус «среднее значение интенсивности флуоресценции пробы после внесение 1 мкМ CCCP».

*Тестирование уровня кальция в митохондриях.* Уровень  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксе определяли с использованием  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительного флуоресцентного зонда fluo3AM, как было описано ранее [15]. Изолированные митохондрии инкубировали (в темноте) с 2 мкМ fluo3AM при 36 °С в течение 30 мин. Нагруженные флуоресцентным зондом митохондрии помещали в лед и сразу же использовали для проведения экспериментов. Митохондрии (50 мкл, 1 мг протеина/мл), нагруженные fluo3AM, вносили в среду инкубации следующего состава: 250 мМ сахароза, 10 мМ Hepes (pH 7,4), 5 мМ сукцинат и 20 или 100 мкМ  $\text{CaCl}_2$ , объем среды инкубации – 1 мл. Флуоресцентный сигнал регистрировали при  $\lambda = 520$  нм (FL-1 канал). Каждое определение представляло собой среднее значение интенсивности флуоресценции 10 тыс. событий, которое выражалось в условных единицах: «среднее значение интенсивности флуоресценции пробы при добавлении  $\text{CaCl}_2$ » минус «среднее значение интенсивности флуоресценции пробы в отсутствии этого катиона».

*Статистический анализ.* Данные представлены как  $M \pm m$ ,  $n$  – количество экспериментов. Разницу между значениями оценивали при помощи  $t$ -теста, величины  $P < 0,05$  считали статистически достоверными.

### Результаты и обсуждение

Показано, что инкубация TMRM-нагруженных митохондрий с 1 мкМ CCCP, 10 мМ  $\text{NaN}_3$  или 100 мкМ  $\text{Ca}^{2+}$  (среда инкубации без АТФ и  $\text{Mg}^{2+}$ ) приводит к быстрой деполяризации митохондриальных мембран (рис. 2). Тем не менее, инкубация fluo3AM-нагруженных митохондрий миомерия в среде, содержащей 100 мкМ  $\text{CaCl}_2$ , 5 мМ сукцинат, 250 мМ сахарозу и 20 мМ Hepes (pH 7,4), при-

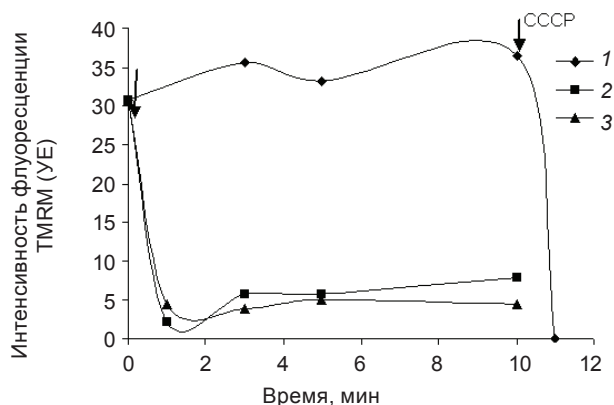


Рис. 2. Тестирование мембранного потенциала изолированных митохондрий миомерия с использованием 100 нМ TMRM: 1 – стабильность митохондриального потенциала во времени и деполяризация после добавления CCCP; 2 – эффект 10 мМ  $\text{NaN}_3$ ; 3 – эффект 100 мкМ  $\text{CaCl}_2$  на мембранный потенциал митохондрий. Стрелкой указано время добавления соответствующих эффекторов. Здесь и далее представлены типичные эксперименты

водит к возрастанию интенсивности флуоресценции зонда, то есть к росту содержания  $\text{Ca}^{2+}$  в них (рис. 3, а, кривая 1). Уровень  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях достигает плато через 1–2 мин инкубации и не меняется на протяжении времени эксперимента. Увеличение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в среде инкубации (20 и 100 мкМ) приводит к увеличению интенсивности флуоресценции зонда (рис. 3, а, кривые 1 и 2). Добавление  $\text{Ca}^{2+}$ -ионофора A23187 (5 мкМ) в присутствии 1 мМ EGTA на 10-й мин инкубации вызывает выход кальция из митохондрий (рис. 3, а). Аналогичные результаты были получены в присутствии 10 мМ  $\text{NaN}_3$  (рис. 3, б).

Существует предположение, что RyR могут представлять собой один из путей входа  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондрии сердечной мышцы [5, 9]. Для того, чтобы протестировать возможность функционирования RyR как системы кальциевого входа в митохондриях миомерия, исследовали эффекты Ru на аккумуляцию  $\text{Ca}^{2+}$  в этих органеллах. Были изучены эффекты 1 и 100 мкМ Ru при 10 и 100 мкМ  $\text{Ca}^{2+}$  в среде инкубации. Как было установлено, Ru не влиял на уровень кальция в митохондриях (данные не приведены).

Широко используемым ингибитором RyR каналов является RuR [16]. В наших экспериментах внесение 10 мкМ RuR не уменьшало, а, наоборот, приводило к росту уровня кальция в

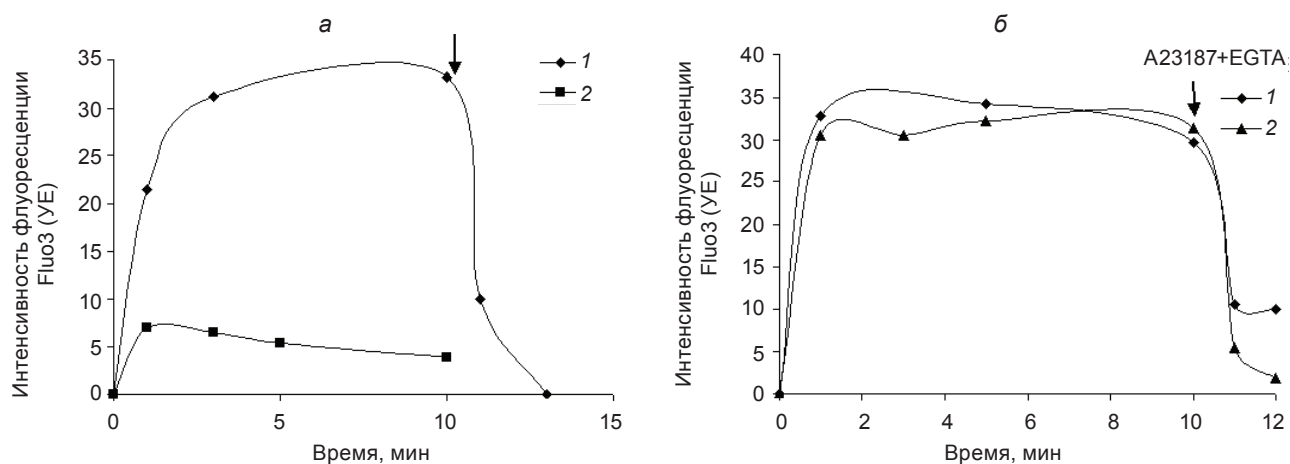


Рис. 3. Тестирование уровня свободного  $\text{Ca}$  в митохондриях с использованием fluo3AM. а: 1 – fluo3AM-нагруженные митохондрии инкубируют в среде, содержащей 250 мМ сахарозу, 20 мМ *Hepes*, pH 7,4, 5 мМ сукцинат и 100 мкМ  $\text{CaCl}_2$ ; 2 – аналогично кривой 1, но в присутствии 20 мкМ  $\text{CaCl}_2$ . б: 1 – контроль; 2 – аналогично кривой 1 плюс 10 мМ  $\text{NaN}_3$ . Стрелкой указано время добавления 5 мкМ A23187 + 1 мМ EGTA

суспензии деполяризованных митохондрий из миометрия крысы (рис. 4).

Блокатором  $\text{RuR}$ , как известно, являются также ионы  $\text{Mg}^{2+}$  [17]. Однако введение 3 или 7 мМ  $\text{MgCl}_2$  в инкубационную среду приводило не к уменьшению, а к увеличению уровня кальция в деполяризованных митохондриях (рис. 5). При исследовании концентрационной зависимости эффекта  $\text{Mg}^{2+}$ , было показано, что  $K_a$  по  $\text{Mg}^{2+}$  составляет  $2,96 \pm 0,21$  мМ ( $n = 5$ ).

Высказывается предположение, что ионы  $\text{Ca}$  могут входить в митохондрию при открытии поры транзитной проницаемости

[18]. Циклоспорин А является классическим ингибитором митохондриальной поры. Как показано на рис. 6, предварительная инкубация митохондрий с 5 мкМ циклоспорином А не препятствовала увеличению уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в матрице, после введения данного катиона в среду инкубации.

Результаты, описанные в этой работе, показывают, что деполяризация внутренней мембраны митохондрий миометрия не препятствует аккумуляции  $\text{Ca}^{2+}$  в матрице. При этом уровень  $\text{Ca}^{2+}$  в матрице зависит от концентрации катиона в среде инкубации. Возникает за-

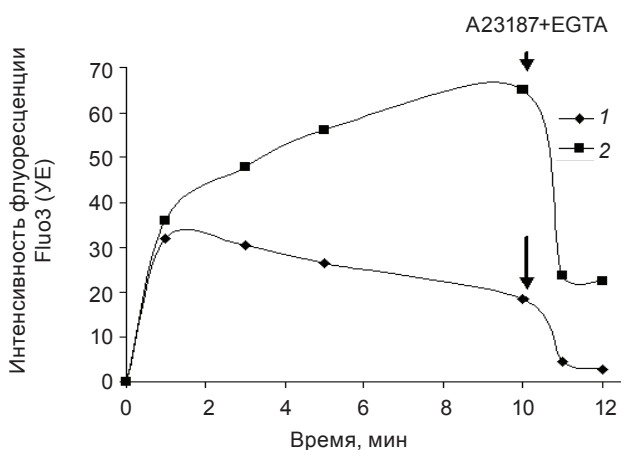


Рис. 4. Эффект  $\text{RuR}$  на уровень свободного  $\text{Ca}$  в митохондриях: 1 – контроль; 2 – аналогично кривой 1 + 10 мкМ  $\text{RuR}$ . Стрелкой указано время добавления 5 мкМ A23187 + 1 мМ EGTA

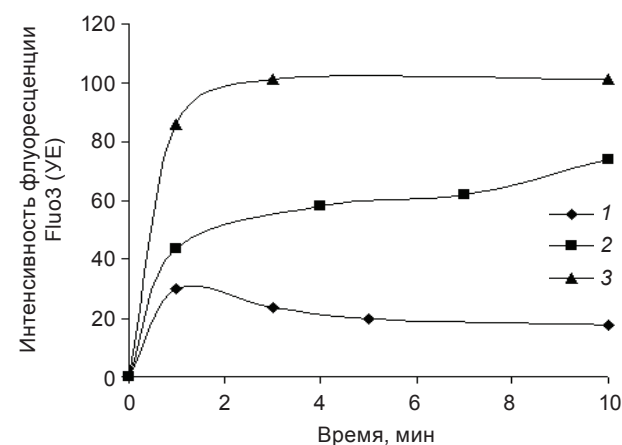


Рис. 5. Эффект  $\text{MgCl}_2$  на уровень свободного  $\text{Ca}$  в митохондриях: 1 – контроль; 2 – аналогично кривой 1 + 3 мМ  $\text{MgCl}_2$ ; 3 – аналогично кривой 1 + 7 мМ  $\text{MgCl}_2$

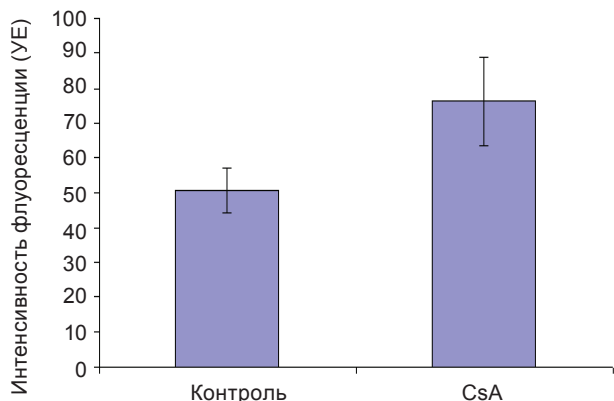


Рис. 6. Эффект циклоспорина А на уровень свободного Са в митохондриях. Митохондрии предварительно инкубировались без и в присутствии 5 мкМ циклоспорина А ( $M \pm m, n = 3$ )

кономерный вопрос – как катион попадает в митохондрии?

Существует точка зрения, что RyR могут представлять собой одну из систем, обеспечивающих накопление  $Ca^{2+}$  в митохондриях сердечной мышцы [5, 9]. В миометрии женщин обнаружены три типа mRNA RyR, при этом RyR3 имеет наибольший уровень экспрессии, меняющийся на протяжении беременности [19, 20]. Мы предположили, что эти каналы могли бы принимать участие в поступлении  $Ca^{2+}$  в деполяризованные митохондрии. Для проверки такой возможности были исследованы эффекты Ru на поглощение  $Ca^{2+}$  в суспензии деполяризованных митохондрий. Как известно [21], Ru проявляет комплексные эффекты на проводимость одиночных RyR в зависимости от его концентрации. При субмикромольных концентрациях Ru частично открывает канал [22]. Ru, используемый в микро/миллимолярных концентрациях, индуцирует перманентно закрытое состояние каналов [23]. В проведенных опытах использовали 1 и 100 мкМ Ru как при 10, так и 100 мкМ  $Ca^{2+}$  в среде инкубации и при этом не было отмечено какого-либо влияния Ru на уровень кальция в митохондриях.

RyR, как известно, блокируются RuR [16]. Если эти каналы вовлечены в механизм входа  $Ca^{2+}$  в деполяризованные митохондрии, то в эксперименте должно регистрироваться снижение уровня катиона в матриксе. Полученные результаты показали, что добавление 10 мкМ RuR в инкубационную среду не снижает, а наоборот, увеличивает уровень кальция в суспензии деполяризованных митохондрий. Здесь следует вспомнить, что RuR

также является блокатором  $Ca^{2+}$ -унипортера митохондрий. Высказывалось предположение, что в деполяризованных митохондриях  $Ca^{2+}$ -унипортер может функционировать как система выхода катиона из митохондрий [10]. Таким образом, увеличение уровня  $Ca^{2+}$  в деполяризованных митохондриях при введении 10 мкМ RuR, возможно, обусловлено ингибированием выхода катиона из митохондрий.

RyR блокируются также ионами Mg [24]. Наши результаты показали, что внесение  $Mg^{2+}$  (3 или 7 мМ) в инкубационную среду приводило не к снижению, а к росту уровня  $Ca^{2+}$  в деполяризованных митохондриях по сравнению с контролем. Это увеличение не было обусловлено связыванием  $Mg^{2+}$  с зондом fluo3. Действительно, относительная величина  $Ca^{2+}$ -зависимого роста флуоресценции fluo3 более чем в 8 раз превышает таковую  $Mg^{2+}$ -зависимого при 100 мкМ  $Ca^{2+}$  и 10 мМ  $Mg^{2+}$  соответственно (информация предоставлена Molecular Probes). Поэтому мы считаем, что  $Mg^{2+}$  не оказывал сколько-нибудь существенного влияния на флуоресценцию fluo3 в данных опытах. Ионы Mg, наряду с RuR, также являются блокаторами  $Ca^{2+}$ -унипортера митохондрий. Таким образом, можно предположить, что внесение в среду инкубации  $Mg^{2+}$  или RuR приводит к увеличению уровня  $Ca^{2+}$  в матриксе митохондрий миометрия за счет снижения выхода катиона через  $Ca^{2+}$ -унипортер в условиях деполяризации внутренней мембраны. Участие RyR в аккумуляции  $Ca^{2+}$  в деполяризованных митохондриях миометрия нам не удалось зарегистрировать.

В последнее время пора транзистентной проницаемости митохондриальной мембраны рассматривается не только как система выхода  $Ca^{2+}$  из митохондрий [5], но и как структура, обеспечивающая вход катиона в матрикс [18]. Деполяризация внутренней мембраны митохондрий может сопровождаться открыванием этой поры [5]. Мы предположили, что при помещении митохондрий в  $Ca^{2+}$ -содержащую среду ионы Са могли входить в матрикс через пору. Если это так, то предварительная инкубация митохондрий с циклоспорином А – ингибитором неспецифической поры, должна была бы предотвратить рост уровня  $Ca^{2+}$  в матриксе, после введения данного катиона в среду инкубации. Оказалось, что предварительная инкубация митохондрий с 5 мкМ циклоспорином А не препятствовала росту уровня  $Ca^{2+}$  в них по сравнению с контролем.

Таким образом, деполяризованные митохондрии миометрия способны к аккумуляции

ионов Са. При этом увеличение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в деполяризованных митохондриях не обеспечивается функционированием рианодиновых каналов. Предварительная инкубация митохондрий с циклоспорином А не приводила к снижению уровня  $\text{Ca}^{2+}$  по сравнению с контролем, что исключает возможность входа  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондрии через пору неспецифической проводимости. Увеличение уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях после внесения в среду инкубации  $\text{Mg}^{2+}$  или RuR может быть обусловлено ингибированием выхода  $\text{Ca}^{2+}$  через  $\text{Ca}^{2+}$ -унипортер в условиях деполяризации. Мы полагаем, что  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -обменник, локализованный в мембране митохондрий миометрия [8], может выполнять роль системы, обеспечивающей поступление катиона в митохондрии в условиях деполяризации внутренней мембраны.

*Эта работа поддерживалась Национальной академией наук Украины, гранты № 0110U005970 и 0110U005971.*

### ТРАНСМЕМБРАННИЙ ОБМІН $\text{Ca}^{2+}$ В ДЕПОЛЯРИЗОВАНИХ МІТОХОНДРІЯХ МІОМЕТРІЯ ЩУРІВ

*Л. Г. Бабіч, С. Г. Шликов,  
Н. В. Кандаурова, С. О. Костерін*

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

Поляризація внутрішньої мембрани є головним фактором у забезпеченні акумуляції фізіологічно важливих катіонів, зокрема  $\text{Ca}^{2+}$ , у матриці митохондрій. Так, надійно доведено, що надходження іонів Са у митохондрії забезпечується функціонуванням  $\text{Ca}^{2+}$ -унипортеру, активність якого залежить від мембранного потенціалу. Проте є окремі повідомлення про можливість накопичення іонів Са у деполяризованих митохондриях. Мета цієї роботи – дослідити трансмембранний обмін іонів Са у митохондриях міометрія в умовах дисипації мембранного потенціалу. Раніше ми показали, що внесення  $\text{Ca}^{2+}$  в інкубаційне середовище, яке не містило  $\text{K}^{+}$ -фосфат, АТФ та  $\text{Mg}^{2+}$ , призводило до деполяризації митохондриальної мембрани. Але при цьому реєструється дозозалежне збільшення рівня іонізованого Са у матриці митохондрій у процесі їхньої інкубації в  $\text{Ca}^{2+}$ -вмісному середовищі. Введення до інкубаційного середовища 10 мкМ RuR або 3–7 мМ  $\text{Mg}^{2+}$ , класичних інгібіторів  $\text{Ca}^{2+}$ -унипортеру, супроводжується

збільшенням рівня іонізованого Са у деполяризованих митохондриях. Попередня інкубація митохондрій з 5 мкМ циклоспорином А, інгібітором митохондриальної пори, не зменшувала рівень  $\text{Ca}^{2+}$  у матриці. Зроблено припущення, що в умовах блокади потенціал-залежних шляхів надходження іонів Са до митохондрій, збільшення його рівня у матриці забезпечується функціонуванням  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -обмінника. Збільшення рівня іонізованого Са у митохондриях у відповідь на введення RuR або  $\text{Mg}^{2+}$ , з причинене інгібуванням  $\text{Ca}^{2+}$ -унипортеру, який в умовах деполяризації функціонує як система, що забезпечує вихід катіона.

**Ключові слова:** ізолювані митохондрії міометрія,  $\text{Ca}^{2+}$ , мембранний потенціал, точна цитометрія.

### TRANSMEMBRANE $\text{Ca}^{2+}$ EXCHANGE IN DEPOLARIZED RAT MYOMETRIUM MITOCHONDRIA

*L. G. Babich, S. G. Shlykov,  
N. V. Kandaurova, S. A. Kosterin*

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

#### Summary

Polarization of the inner membrane is the key factor in maintenance of the physiologically significant cations accumulation, in particular  $\text{Ca}^{2+}$ , in the mitochondria. It has been well established that mitochondria accumulate calcium through the uniporter, driven by the mitochondrial membrane potential. Nevertheless, it has been shown that depolarized mitochondria also accumulate  $\text{Ca}^{2+}$ . The aim of this paper is to investigate free Ca level in depolarized myometrium mitochondria. As we have shown previously  $\text{Ca}^{2+}$  addition to the incubation medium, that did not contain K-phosphate, ATP and  $\text{Mg}^{2+}$ , led to inner mitochondrial membrane depolarization. Nevertheless  $\text{Ca}^{2+}$  addition to such medium led to the concentration-dependent accumulation of this cation in the matrix. RuR or Mg addition to the incubation medium led to the higher elevation of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  level in depolarized mitochondria. Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  level was not affected by 5  $\mu\text{M}$  cyclosporine A. It was suggested that  $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{2+}$  exchanger could provide calcium accumulation in depolarized mitochondria. The elevation of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  level after addition of  $\text{Mg}^{2+}$  and RuR may be due to inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  efflux through  $\text{Ca}^{2+}$  uniporter.

Key words: isolated myometrium mitochondria;  $Ca^{2+}$ ; membrane potential; flow cytometry.

1. *Bianchi K., Rimessi A., Prandini A. et al.* // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2004. – **1742**. – P. 119–131.
2. *Nicholls D. G.* // *Cell Calcium.* – 2005. – **38**. – P. 311–317.
3. *Duchen M. R., Verkhatsky A., Muallem S.* // *Cell Calcium.* – 2008. – **44**. – P. 1–5.
4. *Duchen M. R.* // *Mol. Aspects Med.* – 2004. – **25**. – P. 365–451.
5. *Dedkova E.N., Blatter L. A.* // *Cell Calcium.* – 2008. – **44**. – P. 77–91.
6. *Santo-Domingo J., Demaurex N.* // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2010. – **1797**. – P. 907–912
7. *Graier W.F., Frieden M., Malli R.* // *Pflugers Arch.* – 2007. – **455**. – P. 375–396.
8. *Курский М. Д., Костерин С. А., Бурчинская Н. Ф., Шлыков С. Г.* // *Укр. биохим. журн.* – 1987. – **59**, № 3. – С. 35–39.
9. *Hoppe U. C.* // *FEBS Letters.* – 2010. – **584**. – P. 1975–1981
10. *Montero M., Alonso M. T., Albillos A. et al.* // *Mol. Biol. Cell.* – 2001. – **12**. – P. 63–71.
11. *Smets I., Caplanusi A., Despa S. et al.* // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* – 2004. – **286**. – P. F784–794.
12. *Bradford M. M.* // *Anal. Biochem.* – 1976. – **72**. – P. 248–254.
13. *Mattiasson, G.* // *Cytometry A.* – 2004. – **60**. – P. 145–154.
14. *Бабич Л. Г., Шлыков С. Г., Наумова Н. В., Костерин С. А.* // *Укр. біохім. журн.* – 2007. – **79**, № 6. – С. 34–41.
15. *Бабич Л. Г., Шлыков С. Г., Наумова Н. В., Костерин С. А.* // *Там само.* – 2008. – **80**, № 4. – С. 51–58.
16. *Sanders K. M.* // *J. Appl. Physiol.* – 2001. – **91**. – P. 1438–1449.
17. *Schmitz C., Deason F., Perraud A. L.* // *Magnesium Research.* – 2007. – **20**. – P. 6–18.
18. *Saotome M., Katoh H., Satoh H. et al.* // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2005. – **288**. – P. H1820–H1828.
19. *Wray S., Shmygol A.* // *Semin. Cell Dev. Biol.* – 2007. – **18**. – P. 315–320.
20. *Sanborn B. M.* // *Ibid.* – P. 305–314.
21. *Sutko J. L., Airey J. A., Welch W., Ruest L.* // *Pharmacol. Rev.* – 1997. – **49**. – P. 53–98.
22. *Rousseau E., Smith J. S., Meissner G.* // *Am. J. Physiol.* – 1987. – **253**. – P. C364–C368.
23. *Herrmann-Frank A., Darling E., Meissner G.* // *Pflugers Arch.* – 1991. – **418**. – P. 353–359.
24. *Lenzen S., Hickethier R., Panten U.* // *J. Biol. Chem.* – 1986. – **261**. – P. 16478–16483.

Получено 06.09.2011