

## ТРАНСПОРТУВАННЯ ІОНІВ Ca В МІТОХОНДРІЯХ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ

Л. Г. БАБІЧ, С. Г. ШЛИКОВ, С. О. КОСТЕРІН

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

*Мета огляду – аналіз даних літератури та власних результатів стосовно властивостей  $Ca^{2+}$ -транспортних систем мітохондрій та шляхів їх регуляції. До основних систем, що забезпечують накопичення  $Ca^{2+}$  в матриксі, відносять мітохондріальний уніпортер, систему швидкого захоплення катіона (RaM) та ріанодинчутливі  $Ca^{2+}$ -канали (RuR). Вихід  $Ca^{2+}$  з мітохондрій забезпечується  $Na^+$ -залежними та  $Na^+$ -незалежними  $Ca^{2+}$ -обмінниками. Порушення транзієнтної проникності також може функціонувати як система виходу  $Ca^{2+}$ . Накопичення іонів Ca в матриксі мітохондрій супроводжується збільшенням поляризації внутрішньої мембрани, зростанням швидкості синтезу АТР та транспортування метаболітів. Дисипація мембранного потенціалу мітохондрій має гальмувати надходження  $Ca^{2+}$  до матриксу. Встановлені нами деполаризувальний ефект антагоністів кальмодуліну та гіперполяризувальний ефект калікс[4]аренів C-136 і C-137 на мітохондрії міомеріа можуть мати застосування за необхідності корекції величини мембранного потенціалу мітохондрій.*

*Ключові слова: мітохондрії, гладенькі м'язи,  $Ca^{2+}$ -транспортні системи.*

**М**ітохондрії – мобільні внутрішньоклітинні високоенергетичні інтегратори метаболічних та іонних сигналів, які здатні акумулювати  $Ca^{2+}$  в значній кількості. Надходження  $Ca^{2+}$  всередину мітохондрій в основному забезпечується чутливим до рутенієвого червоного електрофоретичним уніпортером, активність якого залежить від електрохімічного протонного градієнта на внутрішній мітохондріальній мембрані [1]. До систем, що забезпечують накопичення  $Ca^{2+}$  в матриксі належить також система швидкого захоплення катіона (RaM) та ріанодинчутливі  $Ca^{2+}$ -канали (RuR) [2–4]. Вихід  $Ca^{2+}$  з мітохондрій до цитоплазми забезпечується, головним чином, двома типами механізмів:  $Na^+$ -залежними та  $Na^+$ -незалежними обмінниками  $Ca^{2+}$  [2, 3, 5, 6]. Вихід  $Ca^{2+}$  з мітохондрій також спостерігається за умов активації пори транзієнтної проникності [2]. Зміна концентрації іонів Ca в матриксі мітохондрій впливає на швидкість синтезу АТР, кальцієву сигналізацію в цитоплазмі клітини та є одним із чинників апоптозу [7–9]. Отже, перейдемо до розгляду систем транспорту  $Ca^{2+}$  в мітохондріях.

### Системи, що забезпечують надходження $Ca^{2+}$ до мітохондрій

**Вхід  $Ca^{2+}$  крізь зовнішню мембрану мітохондрій.** Перш ніж потрапити до матриксу, іони Ca мають пройти крізь зовнішню мембрану мітохондрій. Традиційно вважалось, що іони Ca вільно проходять крізь зовнішню мембрану мітохондрій [10]. Проте з часом було доведено, що потенціалзалежний аніонний канал (VDAC), вбудований в ліпідні бішари, проводить  $Ca^{2+}$  та моновалентні іони до міжмембранного простору [11]. VDAC може функціонувати як  $Ca^{2+}$ -активованій  $Ca^{2+}$ -канал [12]. Сама назва каналу – потенціалзалежний аніонний канал – викликає низку питань.

По-перше, ця структура знаходиться в зовнішній мембрані. Вважається, що потенціал утворюється тільки на внутрішній мембрані. То чим зумовлена залежність від потенціалу? Проте було показано, що за низьких значень потенціалу (10 мВ) канал знаходиться в стабільно відкритому стані. За значень потенціалу як (-), так і (+), більших за 40 мВ, канал має різну провідність та селективність [13]. Феномен потенціалзалежності каналу реєструється

і сьогодні тільки в експериментах *in vitro*. Невідомо, чи існує потенціал на зовнішній мітохондріальній мембрані. Однак розрахунки показують, що потенціал внутрішньої мембрани може впливати на зовнішню залежно від відстані між ними або в місцях контактів [13].

По-друге, назва каналу підкреслює його селективність до аніонів, хоч сьогодні доведено, що канал проводить і катіони. Ця назва склалась історично. Аніонна селективність каналу, що відображена в його назві, базується на роботах 70-их років минулого століття, коли було розраховано відношення селективності каналу: більш ніж 7 Cl<sup>-</sup> на 1 K<sup>+</sup> [13].

Стосовно іонів Са панувала думка, що вони вільно проходять крізь VDAC у міжмембранний простір [14, 15]. Проте пізніші дані дають підстави висунути припущення, що VDAC може слугувати бар'єром для вільної дифузії катіона і може тонко контролювати надходження Ca<sup>2+</sup> до мітохондрій. Так, недавно було показано, що в закритому стані VDAC має високу провідність для Ca<sup>2+</sup> [3, 14].

Структури, що забезпечують обмін Ca<sup>2+</sup> в мітохондріях, розташовані, головним чином, у внутрішній мембрані [2–4, 16]. Для зручності проведемо умовний поділ всіх систем за напрямком переміщення катіона: 1) системи, що забезпечують накопичення кальцію в матриксі мітохондрій і 2) системи, що забезпечують його вихід до цитоплазми.

**Вхід Ca<sup>2+</sup> крізь внутрішню мембрану мітохондрій.** До основних систем, що забезпечують накопичення Ca<sup>2+</sup> в матриксі мітохондрій, належить уніпортер, система швидкого захоплення катіона (RaM) та ріанодинчутливі Ca<sup>2+</sup>-канали (RyR) [2–4]. Крім того, є припущення, що мітохондріальна пара перехідної провідності може функціонувати як система, що забезпечує надходження катіона до мітохондрій за дисипації потенціалу на внутрішній мембрані [17]. За умов деполяризації внутрішніх мембран накопичення іонів Са в матриксі мітохондрій може відбуватись також за участю Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-антипортера [8, 18, 19]. Отже, розглянемо системи транспортування іонів Са до матриксу мітохондрій.

**Ca<sup>2+</sup> уніпортер.** Надходження Ca<sup>2+</sup> всередину мітохондрій, головним чином, забезпечується чутливим до рутенієвого червоного електрофоретичним уніпортером, рушійною силою якого є електрохімічний про-

тонний градієнт на внутрішній мембрані [6, 8, 10]. Цей електрохімічний градієнт створюється протонною помпою, котра спряжена або через електронтранспортувальну систему із субстратним окисленням, або медіюється F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-АТРазою, яка використовує енергію гідролізу АТР. Якщо поглинання Ca<sup>2+</sup> пов'язане із процесом субстратного окислення, воно ефективно блокується різноманітними інгібіторами метаболізму, але не олігоміцином – інгібітором АТРази. Коли ж для транспортного процесу потрібна енергія гідролізу АТР, у такому разі транспортування катіона блокується олігоміцином [20]. Gunter та Pfeiffer [21] у своєму огляді наводять кінетичні параметри транспортування Ca<sup>2+</sup> в мітохондріях. Автори констатують велику розбіжність у значеннях такого параметра, як V<sub>max</sub> транспортного процесу. Зумовлене це, перш за все, тим, що висока швидкість акумуляції катіона в мітохондріях призводить до зниження мембранного потенціалу, котрий і є рушійною силою для поглинання Ca<sup>2+</sup>. Різними авторами показано, що ці структури акумулюють 0,1–1 мкмоль Ca<sup>2+</sup> на 1 мг протеїну, значення максимальної швидкості накопичення V<sub>max</sub> дорівнює 30–600 нмоль Ca<sup>2+</sup> на 1 мг протеїну за 1 хв. Транспортувальна система характеризується низькою спорідненістю до Ca<sup>2+</sup>; K<sub>0,5</sub> дорівнює 1–25 мкМ. Значення K<sub>m</sub> за АТР дорівнює 0,5 мМ [22]. Активність уніпортеру має біфазну залежність від концентрації цитоплазматичного Ca<sup>2+</sup>: збільшення концентрації Ca<sup>2+</sup> в цитоплазмі може активувати або інгібувати накопичення катіона в мітохондріях залежно від тривалості існування підвищених концентрацій [14].

Нами було показано, що гладеньком'язові клітини матки, оброблені розчином дигітоніну, накопичували 1900 ± 450 пмоль Ca<sup>2+</sup> на 10<sup>6</sup> міоцитів за 5 хв при 37 °С із середовища інкубації (рН 7,4), що містило (в мМ): 50 трис-НCl, 125 KCl, 25 NaCl, 3 АТР, 3 сукцинат натрію, 3 MgCl<sub>2</sub>, 2 фосфат калію, 10 мкМ CaCl<sub>2</sub> (контроль). За відсутності в середовищі інкубації сукцинату натрію накопичення Ca<sup>2+</sup> зменшувалось на 30–40%, а за відсутності як сукцинату натрію, так і АТР – 89–93% відносно контролю. За тих самих умов фракція мітохондрій, яку було виділено з міоцитів матки, із середовища інкубації вищенаведеного складу акумулювала 149 ± 18 нмоль Ca<sup>2+</sup> на 1 мг протеїну за 5 хв (контроль), у цьому разі за відсутності в середовищі інкубації сук-

цинату натрію накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  зменшувалось на 9–23%, а за відсутності в ньому як субстрату окислення, так і АТР – 97–98% відносно контролю. Інгібітори енергозалежного транспортування  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях – азид натрію (5 мМ) та рутенієвий червоний (10 мкМ) – пригнічували накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  в пермеабілізованих гладеньком'язових клітинах на 64–72 та 80–88% відносно контролю. Аналогічно азид натрію та рутенієвий червоний, які було використано в тих самих концентраціях, пригнічували акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  у фракції мітохондрій, виділених із гладеньком'язових клітин матки, на 52–68 та 96–98% відносно контролю. Інгібуючий вплив рутенієвого червоного на енергозалежну акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  в гладеньком'язових клітинах, оброблених розчином дигітоніну, був значно ефективнішим, ніж азиду натрію: значення константи інгібування становило  $0,7 \pm 0,3$  мкМ та  $1,1 \pm 0,4$  мМ відповідно ( $n = 3$ ). Кальцієвий іонофор А23187 (1 мкМ), котрий вносили до середовища інкубації після зупинки процесу енергозалежного включення  $\text{Ca}^{2+}$  в міоцити рутенієвим червоним (10 мкМ), спричинював звільнення акумульованого катіона до зовнішнього розчину [23]. Наведені результати вказують на наявність у клітинах міомерія системи енергозалежної акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$ , локалізованої в мітохондріях. В основі цієї акумуляції лежить накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  саме всередині мітохондрій, а не адсорбція іонів на їхній поверхні. Дійсно, порушення бар'єрної (відносно  $\text{Ca}^{2+}$ ) функції мембрани цих внутрішньоклітинних структур у присутності іонофору А23187 стимулювало викид попередньо накопиченого  $\text{Ca}^{2+}$  до середовища інкубації. Останнє також вказує на те, що  $\text{Ca}^{2+}$ , котрий накопичився в мітохондріях гладенького м'яза матки протягом енергозалежного процесу, не є міцно зв'язаним, отже, він акумулюється в цих субклітинних структурах зворотно. Зауважимо, що одержані дані підтверджують раніше висловлену в літературі точку зору про домінуючу, порівняно із субстратами дихання, роль АТР у забезпеченні акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях міомерія [24, 25].

Слід окремо підкреслити, що, згідно з даними літератури, катіонтранспортна система мітохондрій має нижчу спорідненість до  $\text{Ca}^{2+}$ , ніж кальцієві помпи сарко(ендо)плазматичного ретикулума [26].

Деякі іони є конкурентними інгібіторами транспортування  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях; до них

належать  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ , а також лантаніди [2, 20]. Рутенієвий червоний, гексавалентний полікатіонний барвник, неконкурентно інгібує уніпортер,  $K_i$  становить 30 нМ. Для блокування акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях дослідники використовують рутенієвий червоний в концентрації 1–10 мкМ. Але на фоні досить високої афінності рутенієвого червоного до досліджуваної транспортувальної системи, ця сполука має певні недоліки – низьку селективність. Показано, що рутенієвий червоний інгібує канали  $\text{Ca}^{2+}$ -залежного викиду  $\text{Ca}^{2+}$ , котрі розташовані в мембрані саркоплазматичного ретикулума,  $\text{Na}^+$ -залежний викид  $\text{Ca}^{2+}$  з мітохондрій і зв'язується з поліфосфоінозидами [8, 12, 27, 28]. Мітохондріальний уніпортер також інгібується мілімолярними концентраціями  $\text{Mg}^{2+}$  та високими концентраціями сперміну і спермідину [29].  $\text{Mg}^{2+}$  та поліаміни можуть спричинити інгібування за рахунок зв'язування біля транспортувальної ділянки або за рахунок екранування заряду.

Іонам Mg належить істотна роль у забезпеченні скорочення гладеньких м'язів, зокрема міомерія [30]. У наших експериментах на моделі пермеабілізованих міоцитів матки за умов підвищення концентрації іонів Mg до 5 мМ ефективно стимулюється активність  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем мітохондрій (значення уявної константи активації за  $\text{Mg}^{2+}$  становить 2,8 мМ) [31, 32].

Поліаміни, це природні полікатіони, які задіяні, передусім, у регуляції процесів росту та диференціації клітин [33, 34]. Це найдослідженіша, але не єдина роль поліамінів у клітині. Зокрема, показано, що поліаміни сприяють релаксації гладеньких м'язів, у тому числі й матки [35]. Механізм релаксуючого впливу поліамінів залишається невизначеним. В наших експериментах за дії сперміну на накопичення іонів Ca в мітохондріях виявлено складну концентраційну залежність, яка описується куполоподібною кривою, що має максимум за концентрації поліаміну 1 мМ, і характеризується фазами активації (концентрація поліаміну – до 1 мМ) та інгібування (концентрація поліаміну  $> 1$  мМ) [31, 32].

Для досягнення повного блокування транспортування  $\text{Ca}^{2+}$  до матриксу мітохондрій в експерименті використовуються такі фармакологічні сполуки, котрі безпосередньо не

впливають на уніпортер, а впливають на процеси, пов'язані з генерацією протонного градієнта і, як результат, відбувається інгібування акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях. До таких сполук належать азид натрію (10 мМ), олігоміцин (10 мкМ), антимицин (10 мкМ) та FCCP (10 мкМ) [20]. Деполяризація мітохондріальної мембрани протонфорами СССР або FCCP веде до інгібування  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортеру [2]. Взагалі всі фактори, які впливають на рівень поляризації внутрішньої мітохондріальної мембрани, будуть впливати на обмін  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях, оскільки основні системи, що забезпечують транспортування цього катіона до матриксу є потенціалзалежними [36].

**Система швидкого захоплення  $\text{Ca}^{2+}$  (RaM).** На ізольованих мітохондріях серця описана система швидкого поглинання  $\text{Ca}^{2+}$ , яка функціонує транзійтно протягом початкової фази збільшення позамітохондріальної концентрації цього катіона [2, 10, 37, 38]. Надходження іонів Ca крізь RaM відбувається щонайменше у 300 разів швидше, ніж крізь уніпортер [14, 37]. Інактивується ця система за рахунок зв'язування  $\text{Ca}^{2+}$  із зовнішніми місцями зв'язування. Система швидкого захоплення  $\text{Ca}^{2+}$  блокується роз'єднувачами окисного фосфорилювання, рутенієвим червоним і активується фізіологічними концентраціями сперміну та мілімолярними концентраціями АТР [10]. Проте маємо зазначити, що молекулярну природу цієї системи не визначено, а сам факт існування такої системи є досить ілюзорним [14]. Сьогодні фізіологічна функція RaM невідома, більш того, не можна із впевненістю стверджувати, що ця система є альтернативною конформацією уніпортеру, або, дійсно, є інший транспортвальний механізм [10].

**Ріанодинчутливі  $\text{Ca}^{2+}$  канали (RuR).** Показано, що ріанодинчутливі  $\text{Ca}^{2+}$  канали розташовані у внутрішній мембрані мітохондрій серця щурів, та зроблено припущення, що ці структури є одним із шляхів надходження  $\text{Ca}^{2+}$  до матриксу [39–41]. Мітохондріальні RuR мають біохімічні, фармакологічні та функціональні властивості, подібні до таких I типу RuR саркоплазматичного ретикулула скелетних м'язів [39–41]. Для мітохондріальних RuR властива куполоподібна залежність від концентрації іонів Ca. Максимальна активність їх спостерігається за 10 мкМ, а повне інгібування за 0,1–1 мМ [39]. Зв'язування  $\text{Ca}^{2+}$  із цими каналами інгібується

іонами Mg та рутенієвим червоним, але не регулюється кофеїном [40]. Маємо зауважити, що RuR було знайдено тільки в мітохондріях серця, стосовно інших тканин це питання залишається відкритим [4]. Саме ця обставина дає змогу припустити, що ресстрація ріанодинчутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів у мітохондріях є наслідком часткового забруднення препаратів мітохондрій уламками мембран саркоплазматичного ретикулула [7]. Одержані на сьогодні дані не дозволяють повністю виключити таку можливість. Також остаточно не вирішене питання чи RaM та мітохондріальні RuR є самостійними системами транспортування  $\text{Ca}^{2+}$  до мітохондрій, чи вони є проявом різних конформаційних станів уніпортеру [2].

**$\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ - та  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -антипортери.** Мітохондріальні  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ - та  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -антипортери забезпечують вивільнення іонів Ca з мітохондрій. Проте, подібно до сарколемального, мітохондріальний  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -антипортер може функціонувати у зворотному напрямку, тобто забезпечувати накопичення іонів Ca в матриксі мітохондрій за умов деполяризації внутрішніх мембран [8, 18, 19]. Цей транспортвальний процес інгібувався у відсутності іонів Na в середовищі інкубації [18]. На інтактних кардіоміоцитах щурів та клітинах MCDCK, яких вирощували в умовах гіпоксії, що призводило до повної або часткової деполяризації мітохондріальних мембран, було показано значно менше накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  в клітинах зі зниженим вмістом  $\text{Na}^+$  [19]. Автори вважають, що це зумовлене функціонуванням  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -антипортера в зворотному напрямку. Одержані результати мають практичне значення, оскільки, як відомо, перенавантаження мітохондрій іонами Ca є ключовим фактором, ушкоджуючим клітини за гіпоксії [4].

У наших експериментах показано, що інкубація мітохондрій міометрія з 1 мкМ СССР, 10 мМ  $\text{NaN}_3$  або 100 мкМ  $\text{Ca}^{2+}$  (середовище інкубації без АТР та Mg) призводить до швидкої деполяризації мітохондріальних мембран (рівень поляризації мітохондріальних мембран визначали за допомогою потенціалчутливого флуоресцентного зонда TMRM). Проте за таких умов внесення іонів Ca до інкубаційного середовища супроводжується збільшенням інтенсивності флуоресценції  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливого зонда fluo3AM, навантаженого в ізольовані



мітохондрії міомерія. При цьому рівень іонізованого Са в матриксі залежить від концентрації катіона у середовищі інкубації. Деполяризація мітохондріальних мембран, як відомо, веде до гальмування функціонування Са<sup>2+</sup>-уніпортеру [2]. Ми припускаємо, що в деполяризованих мітохондріях міомерія обмінник Са<sup>2+</sup>Н<sup>+</sup> може виконувати роль системи, що забезпечує надходження іонів Са до матриксу за наявності градієнта Са<sup>2+</sup>, спрямованого всередину органел [42].

### Системи, що забезпечують вивільнення Са<sup>2+</sup> з мітохондрій

Концентрація вільного Са<sup>2+</sup> в мітохондріях залежить від концентрації фосфату та аденінових нуклеотидів: контроль відбувається через утворення оборотних Са<sup>2+</sup>-фосфатних комплексів [10]. Баланс поміж вільним та зв'язаним Са залежить також від значення рН матриксу: його закислення, індуковане дією протоніфорів, перешкоджає утворенню Са<sup>2+</sup>-фосфатних комплексів, що значно зменшує Са<sup>2+</sup>-буферну ємність мітохондрій і збільшує вихід катіона з органел [43]. Протягом тривалого часу панувала думка, що вихід Са<sup>2+</sup> з мітохондрій до цитоплазми забезпечується двома типами механізмів: Na<sup>+</sup>-залежними та Na<sup>+</sup>-незалежними обмінниками Са<sup>2+</sup> [2, 3, 5, 6]. Проте зараз доведено можливість вивільнення Са<sup>2+</sup> з мітохондрій за участю Са<sup>2+</sup>-уніпортеру (у деполяризованих мітохондріях) та мітохондріальної пори перехідної провідності.

**Na<sup>+</sup>-Са<sup>2+</sup>-антипортер.** Na<sup>+</sup>-Са<sup>2+</sup>-антипортер властивий для збудливих тканин (серце, скелетні м'язи, мозок). Na<sup>+</sup>-залежний механізм виведення Са<sup>2+</sup> з мітохондрій серцевого м'яза забезпечується наявністю Na<sup>+</sup> градієнта на внутрішній мембрані органел [2, 3, 44]. Доведено також існування системи обміну Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> на внутрішній мембрані мітохондрій, яка забезпечує виведення іонів Na з мітохондрій до цитоплазми. Саме через систему обміну Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> виведення іонів Са з мітохондрій спряжене з рухом протонів під час дихання [2]. Проте дослідникам не вдалось зареєструвати більш-менш істотних змін у цитоплазматичній концентрації Na<sup>+</sup> протягом нормального перебігу циклу скорочення серцевого м'яза [45]. Припускається, що Na<sup>+</sup>-Са<sup>2+</sup>-обмінник буде виносити іони Са з матриксу до того часу, поки іони Na, що потрапили до матриксу, матимуть можливість, у свою чергу,

повертатись до цитозолу через Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> обмін [36]. Залишається невирішеним також питання про наявність або відсутність електрогенності Na<sup>+</sup>-Са<sup>2+</sup>-антипортеру [2]. В науковій літературі висловлювалася думка, що цей механізм функціонує в електронейтральному режимі. Проте нещодавні роботи показали, що Na<sup>+</sup>-Са<sup>2+</sup>-антипортер переносить 1Са<sup>2+</sup> в обмін на 3Na<sup>+</sup>, тобто є електрогенним [3].

**H<sup>+</sup>-Са<sup>2+</sup>-антипортер.** H<sup>+</sup>-Са<sup>2+</sup>-антипортер властивий, переважно, для електронезбудливих тканин: печінки, нирок та інших вісцеральних органів [10, 14, 46]. Проте він також присутній у мітохондріях міомерія [24, 22]. H<sup>+</sup>-Са<sup>2+</sup>-антипортер функціонує в електронейтральному режимі – вихід 1Са<sup>2+</sup> супроводжується входом 2H<sup>+</sup> [3].

**Оборотність уніпортеру.** Вивільнення Са<sup>2+</sup> з мітохондрій є досить складним процесом, котрий може забезпечуватись й іншими механізмами, зокрема, оборотністю уніпортеру [36, 47]. В умовах *in vitro* оборотність уніпортеру може бути спричинена або сполуками, котрі здатні призводити до порушень окисного фосфорилування, або інгібіторами передачі електронів. Ці сполуки за рахунок колапсу мембранного потенціалу мітохондрій зумовлюють пасивну дифузію Са<sup>2+</sup> за його електрохімічним градієнтом із матриксу до цитозолу. Можливість того, що цей процес відбувається в мітохондріях за фізіологічних умов, здається малоюмовірною, хоча щось подібне може мати місце *in vivo* під час отруєння мітохондріальними отрутами або за ішемії.

**Мітохондріальна пора транз'єнтної проникності (РТР).** Активацію драматичних подій в проникності внутрішньої мітохондріальної мембрани, котра спричинюється різноманітними речовинами та експериментальними умовами, вперше було описано ще у 1970-их роках. Значно пізніше було доведено, що це явище зумовлене активацією неспецифічного іонного каналу, провідність якого > 1 nS [48]. За умов активації цього каналу спостерігається колапс мітохондріального потенціалу і вихід Са<sup>2+</sup>. Показано, що відкривання мітохондріальної пори транз'єнтної проникності (РТР) веде до виходу речовин із молекулярною масою до 1,5 кДа [2]. РТР є каналом із високою провідністю, якому властива значна кількість субпровідних станів. Концентрація

$\text{Ca}^{2+}$  у матриксі, значення рН, аденінові нуклеотиди, вільні радикали, а також величина мембранного потенціалу можуть впливати на стан пори [14].

Молекулярна природа РТР ще не з'ясована [14]. Проте вважається, що цей канал є багатопротеїновим комплексом, до складу якого входять аденіннуклеотид трансфераза (ANT), потенціалзалежний аніонний канал зовнішньої мембрани (VDAC),  $\text{F}_0\text{F}_1$  АТР-синтетаза та циклофілін D [49]. Деякі автори вважають, що і мітохондріальний транспортер фосфату також задіяний у формуванні пори [50]. РТР активується високими концентраціями іонів Са у матриксі, окислювальним стресом та деполяризацією, інгібується – циклоспорином А [2]. Показано, що фактори, які впливають на формування преципітатів  $\text{Ca}^{2+}$  та фосфату в матриксі, регулюють рівень  $\text{Ca}^{2+}$  порога для активації РТР [51]. Було зроблено припущення, що активація РТР веде до колапсу мембранного потенціалу та виходу іонів Са крізь пору та/або крізь уніпортер, що функціонує у зворотному напрямку [7, 36]. Проте питання стосовно функціонування РТР як каналу, що забезпечує вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з мітохондрій за фізіологічних умов, залишається дискусійним.

### Роль мітохондрій в $\text{Ca}^{2+}$ гомеостазі

Мітохондріальний метаболізм і внутрішньоклітинна  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналізація тісно між собою пов'язані. Можна виділити щонайменше два аспекти:

1) Вплив  $\text{Ca}^{2+}$  на продукування енергії.

2) Вплив мітохондріального  $\text{Ca}^{2+}$  на  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналізацію у клітині.

#### *Ефекти $\text{Ca}^{2+}$ на продукування енергії.*

Мітохондрії типової тваринної клітини продукують приблизно 92% АТР [38]. Концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксі мітохондрій є важливим компонентом системи, що контролює синтез АТР. Три ключових ензими метаболізму (піруват,  $\alpha$ -кетоглутарат та ізоцитрат дегідрогенази) в різний спосіб активуються іонами Са: перший – за рахунок  $\text{Ca}^{2+}$ -залежного дефосфорилювання, інші – за рахунок безпосереднього зв'язування катіона з регуляторною субодиницею [3, 14, 52]. Активність  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливих дегідрогеназ та інших метаболічних процесів, котрі відбуваються в матриксі мітохондрій, спряжені з утворенням АТР, яка необхідна для забезпечення енергетич-

них потреб клітини [6, 53]. За фізіологічних умов підвищення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазмі приводить до збільшення поглинання цього катіона мітохондріями, що, в свою чергу, веде до збільшення активності цих ензимів у кілька разів. Отже, передача цитоплазматичного кальцієвого сигналу до мітохондрій дозволяє модулювати мітохондріальний метаболізм відповідно до енергетичних потреб клітини [6, 54]. Припускається, що іони Са можуть активувати синтез АТР за рахунок безпосереднього зв'язування з  $\text{F}_0\text{F}_1$  АТР-синтетазою [10, 55]. За деяких патологічних станів, що зумовлені порушеннями енергетичного метаболізму на генетичному рівні,  $\text{Ca}^{2+}$ -акумуляуюча спроможність мітохондрій значно менша, якщо порівняти з нормою. Ці стани також характеризуються збільшеним рівнем цитоплазматичного кальцію та зменшеним мембранним потенціалом мітохондрій.

За фізіологічних умов  $\text{F}_0\text{F}_1$  АТР-синтетаза є системою, яка забезпечує синтез АТР. Проте за патологічних станів, наприклад, ішемії, цей ензим може функціонувати як  $\text{H}^+$ -АТР-аза, виводячи надлишок протонів із матриксу з метою збереження поляризації внутрішньої мембрани [1].

Показано, що іони Са можуть безпосередньо активувати транспортування метаболітів до матриксу мітохондрій. Деякі транспортери метаболітів, які розташовані у внутрішній мембрані мітохондрій, містять у своїй структурі  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язувальні ділянки, так звані, EF-руки, які мають високий ступінь гомологічності з відповідними ділянками кальмодуліну [55]. Мова йде про аспартат-глутамат та АТР-Mg/ $\text{P}_i$ -переносники. Наслідком активації цих структур є збільшення поляризації мітохондріальної мембрани, що, у свою чергу, сприятиме збільшенню надходження іонів Са до матриксу [55].

#### *Ефекти мітохондріального $\text{Ca}^{2+}$ на $\text{Ca}^{2+}$ сигналізацію у клітині.*

Протягом досить тривалого часу (1960–1980 рр.) в науковій літературі панувала думка, що мітохондрії є важливим, якщо не головним, внутрішньоклітинним пулом  $\text{Ca}^{2+}$ , котрий забезпечує низький рівень цього катіона в цитоплазмі [16]. Проте з часом дослідники почали стверджувати, що мітохондрії не відіграють істотної ролі в підтримці кальцієвого гомеостазу клітини. Так, на скінованих гладеньком'язових клітинах було показано, що за «фізіологічних» концентрацій

вільного  $\text{Ca}^{2+}$  ( $10^{-7}$ – $10^{-5}$  M) мітохондрії поглинають не більше 15%  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  [56]. Отже, низька афінність  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортеру мітохондрій стала основним аргументом у запереченні акумуляції іонів Ca мітохондріями за фізіологічних умов [4, 7, 10]. Вважалось, що мітохондрії задіяні у  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостазі тільки в умовах патологічних станів, коли клітини перевантажені катіоном [57]. З причини існування багатьох подібних даних інтерес дослідників до вивчення мітохондрій як кальцієвого пулу різко зменшився і протягом десятиріччя був сконцентрований виключно на дослідженні  $\text{Ca}^{2+}$ -залежності декількох дегідрогеназ [58]. Проте в науковій літературі продовжували публікуватися окремі повідомлення, які вказували на те, що зміни концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях мають фізіологічне значення і можуть виникати протягом або внаслідок фізіологічних змін концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазмі клітини [4, 16]. Так хто ж правий? Вирішення цього питання розпочалося у 1992 р., коли Rizzuto з колегами [59, 60] довели ймовірність існування, так званих, « $\text{Ca}^{2+}$ -мікропулів». Вони показали, що відкриття  $\text{IP}_3$ -залежних  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів саркоплазматичного ретикулула веде до різкого збільшення концентрації катіона безпосередньо біля каналу. Мітохондрії розташовані поблизу цих каналів, отже концентрація кальцію біля мітохондрії може бути значно більшою, ніж у цитоплазмі, що і забезпечує активацію низькоафінного  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортеру. У подальшому цей факт було підтверджено для багатьох типів клітин [7, 12, 14, 16]. Зокрема, в секреторних клітинах слинних залоз личинки дзвінця беззастережно підтверджено існування ендоплазматично-мітохондріальної  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональної одиниці [61]. Доведено, що одним із механізмів, за рахунок якого встановлюється комунікація між ендоплазматичним ретикуломом та мітохондріями, полягає в тісному контакті між цими органелами, який утворюється за рахунок асоційованих з мітохондріями мембран (mitochondria-associated membranes, MAM) [62]. Формування цих контактних ділянок між MAM та мітохондріями необхідне для перебігу ключових клітинних подій, зокрема, транспортування іонів Ca з ендоплазматичного ретикулула до мітохондрій [62, 63]. Отже, мітохондрії є важливими учасниками  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналізації в клітині.

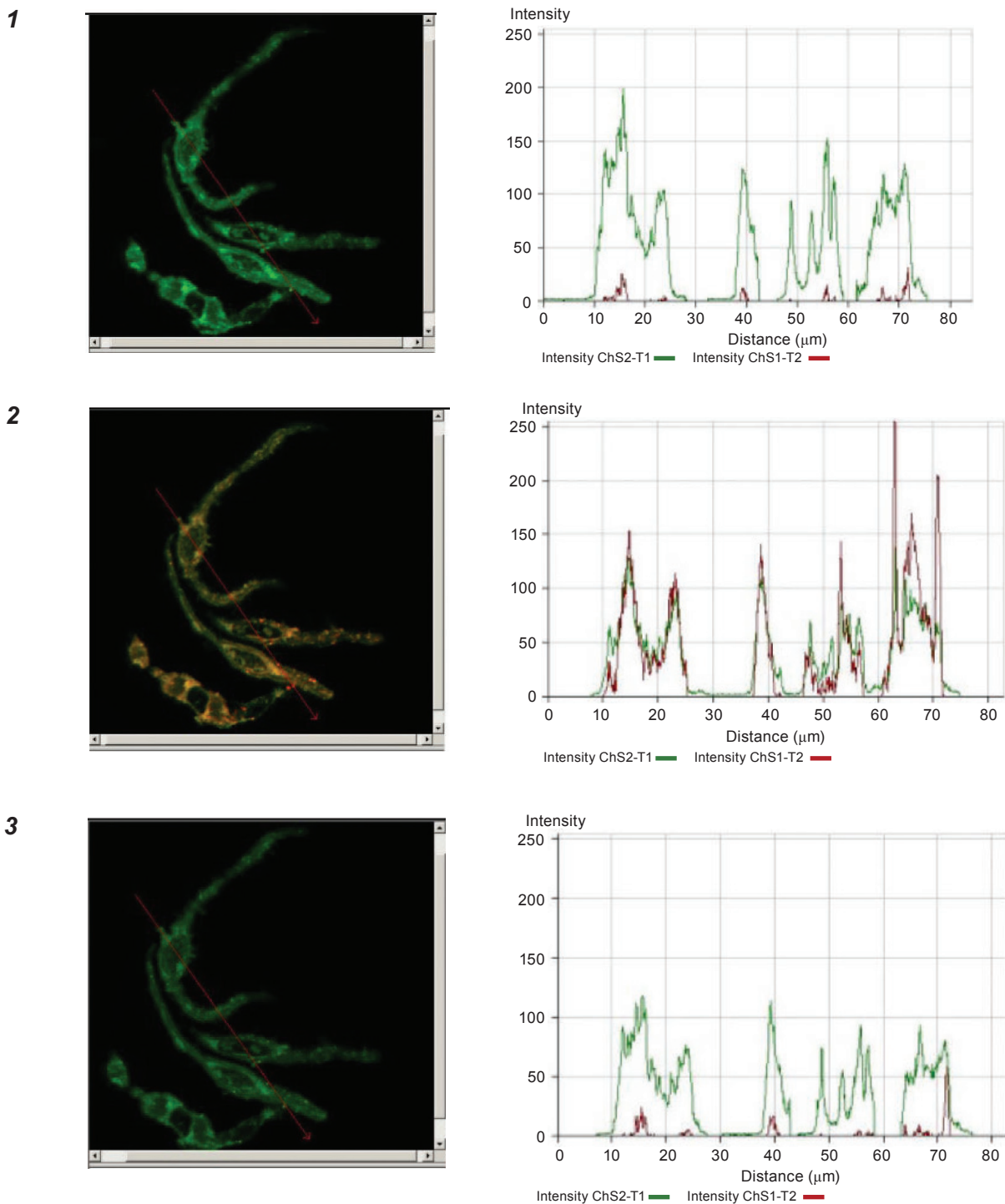
Активність мітохондрій як Ca-буфера зазнає значних змін протягом різних етапів

життя клітини. Кількість, розмір і розподіл мітохондрій, а також їхня чутливість до Ca, контролюються різноманітними сигнальними системами. Мітохондрії знаходяться поблизу місць вивільнення Ca, отже вони захоплюють значну частину катіона, який потрапляє в цитоплазму за умов відкриття відповідних каналів, розташованих на плазматичній мембрані та саркоплазматичному ретикулумі [64]. Крім того, знаходячись поруч із каналами, мітохондрії подовжують існування відкритого стану каналів за рахунок зв'язування Ca, який інактивує канали [52]. Висловлювалась також думка, що зв'язок між саркоплазматичним ретикуломом та мітохондріями відіграє ключову роль у різноманітних механізмах, що забезпечують виживання або загибель клітини [15].

Таким чином, мітохондрії, виконуючи роль  $\text{Ca}^{2+}$ -буфера, впливають на розповсюдження  $\text{Ca}^{2+}$ -хвиль, модулюють активність  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів та транспортерів плазматичної мембрани і прискорюють повернення  $\text{Ca}^{2+}$  до внутрішньоклітинних пулів [65].

### Регуляція обміну $\text{Ca}^{2+}$ та поляризації мембран мітохондрій міометрія

Добре відомо, що  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язувальний протеїн кальмодулін (CaM) є посередником численних внутрішньоклітинних ефектів іонів Ca за рахунок оборотного утворення комплексу «CaM– $\text{Ca}^{2+}$ », який, у свою чергу, здатен регулювати величезну кількість  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних внутрішньоклітинних процесів [66]. CaM – достатньо «консервативний» протеїн (148 амінокислот, молекулярна маса 16,7 кДа) – належить до суперсімейства  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язувальних протеїнів, які використовують один і той самий  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язувальний структурний домен. У відповідь на кальцієвий сигнал CaM може зв'язуватися з великою кількістю різних протеїнів-мішеней, таких як кіназа легких ланцюгів міозину, фосфодіестераза, аденілатциклаза,  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-залежна кіназа, протеїнфосфатаза, кальцинейрин,  $\text{Ca}^{2+}$ -активовані  $\text{K}^+$ -канали, кальцієві канали L-типу, ріанодинові рецептори та інші [66–70]. У літературі є дані щодо регуляції активності  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортеру мітохондрій клітин RBL-1 іонами Ca за участю CaM [71]. На моделі ізольованих мітохондрій міометрія, з використанням  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливого флуоресцентного зонда, ми показали, що комплекс «CaM– $\text{Ca}^{2+}$ » бере



*Вплив трифлуоперазину (100 мкМ) на мембранний потенціал мітохондрій клітин міометрія, які були попередньо навантажені зондами MTG та TMRM. 1 – флуоресценція зонда MTG (графік демонструє рівень відносної інтенсивності флуоресценції зонда MTG вздовж червоної лінії), 2 – флуоресценція зондів MTG та TMRM (графік демонструє відносну інтенсивність флуоресценції зондів MTG та TMRM вздовж червоної лінії), 3 – вплив трифлуоперазину на мембранний потенціал мітохондрій клітин міометрія через 10 хв (графік демонструє падіння відносної інтенсивності флуоресценції зонда TMRM вздовж червоної лінії)*



участь у регуляції активності  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортеру мітохондрій міометрія [72]. Ця точка зору знаходиться у відповідності з даними літератури [71]. З іншого боку, доведено, що поляризація мембрани мітохондрій та активність кальцієвого уніпортеру – взаємопов'язані процеси [1, 24]. Зокрема, нами також було показано, що антагоністи кальмодуліну модулюють рівень поляризації мітохондріальних мембран. Для візуалізації дії антагоністів кальмодуліну на мембранний потенціал мітохондрій клітин міометрія ми використали конфокальний мікроскоп та потенціалчутливі флуоресцентні зонди – MTG та TMRM. Показано, що інкубація клітин міометрія протягом 10 хв з 10 мкМ кальмідазоліумом або зі 100 мкМ трифлуоперазином (рисунок) веде до істотного зниження інтенсивності флуоресценції TMRM, що свідчить про деполяризуючий ефект цих сполук [73].

Рівень поляризації мембран мітохондрій та обмін іонів  $\text{Ca}^{2+}$  в них – ключові параметри, які відображають функціональний стан цих субклітинних структур у нормі та за патології [74, 75]. Значна кількість патологічних станів – від нейродегенеративних процесів до раку – мають у своїй основі дефекти апоптозу [76]. В науковій літературі висловлювалась думка, що гіперполяризація мембран мітохондрій сприяє збільшенню утворення активних форм кисню і може бути основою першого етапу на шляху до апоптозу, отже, до загибелі клітини [77–79]. Таким чином, пошук (або створення) оборотних ефекторів нової генерації, здатних модулювати рівень поляризації мітохондріальних мембран, має важливе як теоретичне, так і практичне значення. Останнім часом все більше уваги дослідники приділяють каліксаренам – макроциклічним сполукам, які одержують прецизійною циклоконденсацією паразаміщених фенолів та формальдегіду [80, 81]. Каліксарени, завдяки здатності утворювати супрамолекулярні комплекси з біологічно важливими молекулами та іонами, можуть впливати на перебіг різноманітних біохімічних процесів [82, 83]. Ми показали, що попередня інкубація пермеабілізованих клітин міометрія з 10 мкМ калікс[4]ареном C-136 або C-137 веде до збільшення поляризації мітохондріальних мембран [84].

Показані нами деполяризуючий ефект антагоністів кальмодуліну та гіперполяризуючий ефект калікс[4]аренів C-136 та C-137 на мітохондрій міометрія можуть мати застосування за необхідності корекції величини мембранного потенціалу мітохондрій.

Наведена в огляді інформація свідчить про те, що однією з головних функцій мітохондрій в клітині є їх участь в обміні іонів  $\text{Ca}^{2+}$ , яка забезпечується потенціалзалежними системами акумуляції цього катіона в матриксі та системами виходу катіона в цитоплазму. Доведено, що активність  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем мітохондрій модулюється різноманітними сполуками, як то, іонами  $\text{Mg}^{2+}$ , сперміном, антагоністами кальмодуліну та калікс[4]аренами. Подальше поглиблення суто теоретичних знань стосовно цієї субклітинної структури сприяє пошуку специфічних молекул, здатних модулювати транспортування іонів  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях, що є важливим етапом на шляху створення фармакологічних препаратів спрямованої дії.

#### **ТРАНСПОРТ ИОНОВ $\text{Ca}^{2+}$ В МИТОХОНДРИЯХ ГЛАДКИХ МЫШЦ**

*Л. Г. Бабич, С. Г. Шлык, С. А. Костерин*

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

Цель обзора – анализ данных литературы и собственных результатов относительно свойств  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортирующих систем митохондрий и путей их регуляции. К основным системам, которые обеспечивают аккумуляцию  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксе относят митохондриальный унипортер, систему быстрого поглощения катиона (RaM) и рианодинчувствительные  $\text{Ca}^{2+}$  каналы (RyR). Выход  $\text{Ca}^{2+}$  из митохондрий обеспечивается  $\text{Na}^{+}$ -зависимыми и  $\text{Na}^{+}$ -независимыми  $\text{Ca}^{2+}$ -обменниками. Пира переходной проницаемости также может функционировать как система выхода  $\text{Ca}^{2+}$ . Накопление  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксе митохондрий сопровождается увеличением поляризации внутренней мембраны, увеличением скорости синтеза АТФ и транспорта метаболитов. Диссипация мембранного потенциала митохондрий должна приводить к ингибированию поступления  $\text{Ca}^{2+}$  в матрикс. Показанные нами деполяри-

зирующий эффект антагонистов кальмодулина и гиперполяризующий эффект каликс[4]аренов C-136 и C-137 на митохондриях миомерия могут быть использованы при необходимости коррекции величины мембранного потенциала митохондрий.

**Ключевые слова:** митохондрии, гладкие мышцы, Ca<sup>2+</sup>-транспортирующие системы.

### Ca ION TRANSPORT IN SMOOTH MUSCLE MITOCHONDRIA

L. G. Babich, S. G. Shlykov, S. O. Kosterin

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

Review focuses on the analysis of literature data and own results concerning properties of mitochondria Ca<sup>2+</sup> transporting systems and their regulation. Three mechanisms for mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake are described: the electrogenic mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uniporter, a rapid mode of Ca<sup>2+</sup> uptake (RaM) and ryanodine-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels (RyR). Two mechanisms of Ca<sup>2+</sup> efflux from the mitochondrial matrix have been proposed: Na<sup>+</sup>-dependent and Na<sup>+</sup>-independent Ca<sup>2+</sup> exchange. The mitochondrial permeability transition pore can also function as a Ca<sup>2+</sup> efflux mechanism. Ca<sup>2+</sup> accumulation in mitochondria resulted in an increase of mitochondrial membrane potential, ATP synthesis and activation of metabolites transport. The dissipation of mitochondrial membrane potential should prevent mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake. Our data concerning depolarizing effect of calmodulin antagonists and hyperpolarizing effect of calix[4]arenes C-136 and C-137 on the myometrium mitochondria can be applied on the demand of mitochondria membrane potential correction.

**Key words:** mitochondria, smooth muscles, Ca<sup>2+</sup> transporting systems.

### References

- Duchen M. R. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol. Aspects Med.* 2004;4:365-451.
- Dedkova E. N., Blatter L. A. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> and the heart. *Cell Calcium.* 2008;44(1):77-91.
- Hoppe U. C. Mitochondrial calcium channels. *FEBS Lett.* 2010;584(10):1975-1981.
- Santo-Domingo J., Demareux N. Calcium uptake mechanisms of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 2010;1797:907-912.
- Gunter K. K., Gunter T. E. Transport of calcium by mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* 1994;26:471-485.
- Padua R. A., Baron K. T., Thyagarajan C. C., Thayer S. A. Reduced Ca<sup>2+</sup> uptake by mitochondria in pyruvate dehydrogenase-deficient human diploid fibroblasts. *Am. J. Physiol.* 1998;274(3):C615-C622.
- Contreras L., Drago I., Zampese E., Pozzan T. Mitochondria: The calcium connection. *Biochim. Biophys. Acta.* 2010;1797:607-618.
- Griffiths E.J. Mitochondrial calcium transport in the heart: physiological and pathological roles. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2009;46(6):789-803.
- Griffiths E. J., Balaska D., Cheng W. H. Y. The ups and downs of mitochondrial calcium signalling in the heart. E. J. Griffiths. *Biochim. Biophys. Acta.* 2010;1797:856-864.
- Cali T., Ottolini D., Brini M. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> as a key regulator of mitochondrial activities. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012;942:53-73.
- Gincel D., Zaid H., Shoshan-Barmatz V. Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. *Biochem. J.* 2001;358:147-155.
- Szabadkai G., Duchon M. R. Mitochondria: the hub of cellular Ca<sup>2+</sup> signaling. *Physiology (Bethesda).* 2008;23:84-94.
- Shoshan-Barmatz V., De Pinto V., Zweckstetter M., Raviv Z., Keinan N., Arbel N. VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Mol. Aspects Med.* 2010;31(3):227-285.
- Rizzuto R., Marchi S., Bonora M., Aguiari P., Bononi A., De Stefani D., Giorgi C., Leo S., Rimessi A., Siviero R., Zecchini E., Pinton P. Ca<sup>2+</sup> transfer from the ER to mitochondria: When, how and why. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009;1787(11):1342-1351.
- Spät A., Szanda G., Csordás G., Hajnóczky G. High- and low-calcium-dependent mechanisms of mitochondrial calcium signalling. *Cell Calcium.* 2008;44(1):51-63.
- Carafoli E. The fateful encounter of mitochondria with calcium: How did it happen? *Biochim. Biophys. Acta.* 2010;1797:595-606.

17. Saotome M., Katoh H., Satoh H., Nagasaka S., Yoshihara S., Terada H., Hayashi H. Mitochondrial membrane potential modulates regulation of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  in rat ventricular myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2005;288(4):H1820-H1828.
18. Kim B., Matsuoka S. Cytoplasmic  $\text{Na}^+$ -dependent modulation of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  via electrogenic mitochondrial  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$  exchange. *J. Physiol.* 2008;586:1683-1697.
19. Smets I., Caplanusi A., Despa S., Molnar Z., Radu M., Vande Ven M., Ameloot M., Steels P.  $\text{Ca}^{2+}$  uptake in mitochondria occurs via the reverse action of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger in metabolically inhibited MDCK cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2004;286:F784-794.
20. Missiaen L., Wuytack F., Raeymaekers L., De Smedt H., Droogmans G., Declerck I., Casteels R.  $\text{Ca}^{2+}$  extrusion across plasma membrane and  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by intracellular stores. *Pharmac. Ther.* 1991;50(2):191-232.
21. Gunter T. E., Pfeiffer D. R. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am. J. Physiol.* 1990;28:C755-C786.
22. Kosterin S. A., Burdyga F. V.  $\text{Ca}^{2+}$  transport and intracellular homeostasis in myometrium. *Uspekhi Sovrem. Biologii.* 1993;113(4):485-506.
23. Babich L. G., Shlykov S. G., Borisova L. A., Kosterin S. A. Energy-dependent  $\text{Ca}^{2+}$ -transport in intracellular smooth muscle structures. *Biokhimiia.* 1994;59(8):1218-1229. (In Russian).
24. Kosterin S. A. Calcium transport in smooth muscle. Kiev: Naukova dumka. 1990. 216 p. (In Russian).
25. Batra S. Uptake and energy-dependent extrusion of calcium in the rat uterus. *Acta Physiol. Scand.* 1982;114(3):447-452.
26. Carafoli E. Intracellular calcium regulation, with special attention to the role of the plasma membrane calcium pump. *J. Cardiovasc. Pharmac.* 1988;12:S77-S84.
27. Palade P., Dettbarn C., Brunder D., Stein P., Hals G. Pharmacology of calcium release from sarcoplasmic reticulum. *J. Bioenerg. Biomembr.* 1989;21(2):295-320.
28. Wingrove D. E., Gunter T. E. Kinetics of mitochondrial calcium transport. II. A kinetic description of the sodium-dependent calcium efflux mechanism of liver mitochondria and inhibition by ruthenium red and tetraphenylphosphonium. *J. Biol. Chem.* 1986;261:15166-15171.
29. Akerman K. E. O. Effect of  $\text{Mg}^{2+}$  and spermine on the kinetics of  $\text{Ca}^{2+}$  transport in rat-liver mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* 1977;9:65-72.
30. Tassani V., Campagnolo M., Toninello A., Siliprandi D. The contribution of endogenous polyamines to the permeability transition of rat liver mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996;226(3):850-854.
31. Babich L. G., Borisova L. A., Shlykov S. G., Titus O. V., Kosterin S. A. Effect of Mg ions and spermine on ATP-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  transport in myometrial intracellular structures. I. Comparative study of  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation in mitochondria and sarcoplasmic reticulum. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2004;76(5):52-60. (In Russian).
32. Babich L. G., Borisova L. A., Shlykov S. G., Titus O. V., Kosterin S. A. Effect of Mg ions and spermine on ATP-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  transport in myometrial intracellular structures. II. Comparative study of spermine, Mg ions and cyclosporine A effects on  $\text{Ca}^{2+}$  transport in mitochondria. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2004;76(6):55-62. (In Russian).
33. Aziz S. M., Olson J. W., Gillespie M. N. Multiple polyamine transport pathways in cultured pulmonary artery smooth muscle cells: regulation by hypoxia. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1994;10(2):160-166.
34. Loser C. Polyamines in human and animal milk. *Br. J. Nutr.* 2000;84(1):S55-S58.
35. Fernandez A. I., Cantabrana B., Sanchez M., Hidalgo A. Extracellular and intracellular effects of polyamines on smooth muscle contractions. *Life Sci.* 1995;57(9):855-861.
36. Lukyanenko V., Chikando A., Lederer W. J. Mitochondria in cardiomyocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signaling. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2009;41(10):1957-1971.
37. Buntinas L., Gunter K. K., Sparagna G. C., Gunter T. E. The rapid mode of calcium uptake into heart mitochondria (RaM): comparison to RaM in liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 2001;1504(2-3):248-261.
38. Gunter T. E., Sheu S. S. Characteristics and possible functions of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  transport mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009;1787(11):1291-1308.
39. Altschafli B. A., Beutner G., Sharma V. K., Sheu S. S., Valdivia H. H. The mitochondrial ryanodine receptor in rat heart: a pharmacokinetic profile. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007;1768(7):1784-1795.



40. Beutner G., Sharma V. K., Giovannucci D. R., Yule D. I., Sheu S. S. Identification of a ryanodine receptor in rat heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* 2001;276(24):21482-21488.
41. Beutner G., Sharma V. K., Lin L., Ryu S. Y., Dirksen R. T., Sheu S. S. Type 1 ryanodine receptor in cardiac mitochondria: transducer of excitation-metabolism coupling. *Biochim. Biophys. Acta.* 2005;1717(1):1-10.
42. Babich L. H., Shlykov S. H., Kandaurova N. V., Kosterin S. A. Transmembrane Ca<sup>2+</sup> exchange in depolarized rat myometrium mitochondria. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2011;83(6):56-62. (In Russian).
43. Nicholls D. G. Mitochondria and calcium signaling. *Cell Calcium.* 2005;38(3-4):311-317.
44. Murphy E., Eisner D. A. Regulation of intracellular and mitochondrial sodium in health and disease. *Circ. Res.* 2009;104, N3):292-303.
45. Despa S., Islam M. A., Pogwizd S. M., Bers D. M. Intracellular [Na<sup>+</sup>] and Na<sup>+</sup> pump rate in rat and rabbit ventricular myocytes. *J. Physiol.* 2002;539:133-143.
46. Nicholls D. G., Akerman K. Mitochondrial calcium transport. *Biochim. Biophys. Acta.* 1982;683:57-88.
47. Pozzan T., Rizzuto R., Volpe P., Meldolesi J. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol. Rev.* 1994;74(3):595-636.
48. Bernardi P., Vassanelli S., Veronese P., Colonna R., Szabó I., Zoratti M. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations. *J. Biol. Chem.* 1992;267(5):2934-2939.
49. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.* 1999;341(Pt 2):233-249.
50. Leung A. W., Halestrap A. P. Recent progress in elucidating the molecular mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochim. Biophys. Acta.* 2008;1777:946-952.
51. Starkov A. A. The molecular identity of the mitochondrial Ca<sup>2+</sup> sequestration system. *FEBS J.* 2010;277(18):3652-3563.
52. Rizzuto R., Pozzan T. Microdomains of intracellular Ca<sup>2+</sup>: molecular determinants and functional consequences. *Physiol. Rev.* 2006;86:369-408.
53. Gunter T. E., Gunter K. K., Sheu S. S., Gavin C. E. Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. *Am. J. Physiol.* 1994;267(2):C313-C339.
54. Hansford R. G. Physiological role of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transport. *J. Bioenerg. Biomembr.* 1994;26:495-508.
55. Satrustegui J., Pardo B., Del Arco A. Mitochondrial transporters as novel targets for intracellular calcium signaling. *Physiol. Rev.* 2007;87(1):29-67.
56. Yamamoto H., Van Breemen C. Ca<sup>2+</sup> compartments in saponin-skinned cultured vascular smooth muscle cells. *J. Gen. Physiol.* 1986;87:369-389.
57. Griffiths E. J., Rutter G. A. Mitochondrial calcium as a key regulator of mitochondrial ATP production in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009;1787(11):1324-1333.
58. McCormack J. G., Halestrap A. P., Denton R. M. Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol. Rev.* 1990;70:391-495.
59. Rizzuto R., Simpson A. W. M., Brini M., Pozzan T. Rapid changes of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature.* 1992;358:325-327.
60. Rizzuto R., Brini M., Murgia M., Pozzan T. Microdomains of high Ca<sup>2+</sup> close to IP<sub>3</sub>-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels that are sensed by neighbouring mitochondria. *Science.* 1993;262:744-747.
61. Velykopols'ka O. Iu., Man'ko B. O., Man'ko V. V. Endoplasmic-mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-functional unit: dependence of respiration of secretory cells on activity of ryanodine- and IP<sub>3</sub>-sensitive Ca<sup>2+</sup>-channels. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2012;84(5):76-88. (In Ukrainian).
62. Vance J. E. MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: Lipids and beyond. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. Dec 6. pii: S1388-1981(13)00265-5. doi: 10.1016/j.bbali.2013.11.014
63. Marchi S., Patergnani S., Pinton P. The endoplasmic reticulum-mitochondria connection: One touch, multiple functions. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014;1837(4):461-469.
64. Walsh C., Barrow S., Voronina S., Chvanov M., Petersen O.H., Tepikin A. Modulation of calcium signalling by mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009;1787(11):1374-1382.
65. Poburko D., Santo-Domingo J., Demarex N. Dynamic regulation of the mitochondrial proton gradient during cytosolic calcium elevations. *J. Biol. Chem.* 2011;286(13):11672-11684.



66. Wu X., Bers D. M. Free and bound intracellular calmodulin measurements in cardiac myocytes. X. Wu. *Cell Calcium*. 2007;41(4):353-364.
67. Means A. R., VanBerkum M. F., Bagchi I., Lu K. P., Rasmussen C. D. Regulatory functions of calmodulin. *Pharmacol. Ther.* 1991;50(2):255-270.
68. Vogel H. J. The Merck Frosst Award Lecture 1994. Calmodulin: a versatile calcium mediator protein. *Biochem. Cell Biol.* 1994;72(9-10):357-376.
69. James P., Vorherr T., Carafoli E. Calmodulin-binding domains: just two faced or multifaceted? *Trends Biochem. Sci.* 1995;20(1):38-42.
70. Maier L. S., Bers D. M. Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *J. Mol. Cell Cardiol.* 2002;34(8):919-939.
71. Moreau B., Nelson C., Parekh A. B. Biphasic regulation of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. *Curr. Biol.* 2006;16(16):1672-1677.
72. Babich L. H., Shlykov S. H., Naumova N. V., Kosterin S. O. Use of flow cytometry to determine  $\text{Ca}^{2+}$  content in mitochondria and influence of calmodulin antagonists on it. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2008;80(4):51-58. (In Ukrainian).
73. Shlykov S. G., Babich L. G., Yevtuchenko M. E., Karachim S. O., Kosterin S. O. Modulation of myometrium mitochondria membrane potential by calmodulin antagonists. *Ukr. Biochem. J.* 2014;86(1):29-41. (In Ukrainian).
74. Divakaruni A. S., Brand M. D. The regulation and physiology of mitochondrial proton leak. *Physiology* (Bethesda). 2011;26(3):192-205.
75. Scatena R. Mitochondria and drugs. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012;942:329-346.
76. Thompson C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995;267:1456-1462.
77. Skulachev V. P. Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. *Apoptosis*. 2006;11(4):473-485.
78. Giovannini C., Matarrese P., Scazzocchio B., Sanchez M., Masella R., Malorni W. Mitochondria hyperpolarization is an early event in oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis in Caco-2 intestinal cells. *FEBS Lett.* 2002; 523(1-3):200-206.
79. Sommer S. P., Sommer S., Sinha B., Wiedemann J., Otto C., Aleksic I., Schimmer C., Leyh R. G. Ischemia-reperfusion injury-induced pulmonary mitochondrial damage. *J. Heart. Lung Transplant.* 2011;30(7):811-818.
80. Gutsche C. D. Calixarenes Revisited. The Royal Society of Chemistry: Cambridge. 1998.
81. Gutsche C. D., Iqbal M. p-tert-Butyl calix[4]arene. *Org. Synth.* 1990;68:234-236.
82. Rodic R. V., Boyko V. I., Kalchenko V. I. Calixarenes in bio-medical researches. *Curr. Med. Chem.* 2009;16(13):1630-1655.
83. Klyachina M. A., Boyko V. I., Yakovenko A. V., Babich L. G., Shlykov S. G., Kosterin S. O., Khilya V. P., Kalchenko V. I. Calix[4]arene N-Chalconeamides: synthesis and influence on  $\text{Mg}^{2+}$ , ATP-Dependent  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation in the smooth muscle subcellular structures. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* 2008;60:131-137.
84. Babich L. G., Shlykov S. G., Boyko V. I., Klyachina M. A., Kosterin S. A. Calix[4]arenes C-136 and C-137 hyperpolarize myometrium mitochondria membranes. *Russian J. Bioorg. Chem.* 2013;39(6):649-655.

Отримано 01.04.2014