

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ДАНИЛОВИЧ ГАННА ВІКТОРІВНА

УДК 577.352.4

ДИСЕРТАЦІЯ

**БІОСИНТЕЗ ТА РЕГУЛЯТОРНА РОЛЬ ОКСИДУ АЗОТУ
В МІТОХОНДРІЯХ ГЛАДЕНЬКОГО М'ЯЗА**

Спеціальність 03.00.04 – Біохімія
Галузь знань 091 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

_____ Данилович Г.В.

Науковий консультант: КОСТЕРІН СЕРГІЙ ОЛЕКСІЙОВИЧ,
академік НАН України, доктор біологічних наук, професор

Київ – 2021

АНОТАЦІЯ

Данилович Г.В. Біосинтез та регуляторна роль оксиду азоту в мітохондріях гладенького м'яза. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, 2021.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню біохімічних закономірностей біосинтезу NO у мітохондріях гладеньком'язових клітин матки, вивченню молекулярних механізмів дії оксиду азоту як можливого ендогенного специфічного регулятора концентрації Ca^{2+} у міоцитах й функціонування Ca^{2+} -транспортувальних систем мітохондрій, біоенергетичних процесів (активності електрон-транспортного ланцюгу та поляризації їхньої внутрішньої мембрани) та впливу калікс[4]аренів – екзогенних нетоксичних модуляторів функціональної активності мітохондрій – на NO-синтазну здатність, біоенергетику та Ca^{2+} -гомеостаз органел.

Із застосуванням NO-чутливого флуоресцентного зонду DAF-FM, методів лазерної конфокальної мікроскопії та протокової цитометрії нами вперше продемонстровано утворення NO в гладеньком'язових клітинах матки. Доведено, що потужним джерелом NO у гладеньком'язових клітинах матки є мітохондрії. Синтез NO у мітохондріях є чутливим до інгібіторів конститутивних NO-синтаз (N^G -нітро-L-аргініна та 2-амінопіридина) та Ca^{2+} -уніпортера, пригнічується антагоністами кальмодуліну (кальмідазоліумом і трифлюоперазином), іонами Mg, суттєво залежить від рівня енергізації внутрішньої мітохондрійної мембрани. Значення уявної константи Міхаеліса за L-аргініном та константи активації за Ca^{2+} реакції біосинтезу NO знаходяться в межах фізіологічних значень їх концентрацій у матриксі мітохондрії. Також продемонстровано, що джерелами оксиду азоту в міоцитах можуть виступати NO-синтази, асоційовані з плазматичною мембраною та, можливо, саркоплазматичним ретикуломом.

У мітохондріях гладенького м'язу матки NO стимулює акумуляцію Ca^{2+} , шляхом активації саме Ca^{2+} -уніпортера. Система вивільнення Ca^{2+} з мітохондрій – H^+ - Ca^{2+} -обмінник, який презентований протеїном LETM 1, є резистентною

до впливу оксиду азоту. NO викликає помірне зниження електричного потенціалу на внутрішній мембрані органел, обумовлене пригніченням роботи комплексів дихального ланцюга, а саме гальмуванням окислення $FADH_2$, і протидіє процесам набухання органел, спричиненим висококальцієвим розчином.

Продемонстровано, що оксид азоту пригнічує шляхи підвищення концентрації іонів Ca в міоплазмі у разі дії на міоцити карбахолу та окситоцину, а також викликає збільшення характеристичних розмірів міоцитів. Поляризуючий ефект оксиду азоту обумовлений зростанням K^+ -проникності плазмалеми і залежить від іонів Ca, а також cGMP-залежним стимулюванням активності Na^+, K^+ -АТРази. Запропоновано схему біохімічних механізмів регуляторної дії NO на рівні мітохондрій та плазматичної мембрани у міоцитах матки.

Створено імітаційну модель у термінах функціональних гібридних мереж Петрі, яка відтворює функціональну активність мітохондрій, а саме одночасне протікання процесів окислення $NADH/FADH_2$, утворення активних форм кисню та зміни їхнього гідродинамічного діаметру. Отримані рівняння формалізують та описують концентраційно-часові залежності перебігу перелічених процесів у середовищі за дії азиду натрія, який в літературі розглядають як непрямий донор NO, з можливістю передбачення інтенсивності їхнього протікання. Зокрема, було спрогнозовано відповідь мітохондрій у часі на дію NaN_3 у концентрації, яка не використовувалася в експерименті.

Продемонстровано можливість проникнення калікс[4]арена C-956 у міоплазму клітин та його взаємодію з мітохондріями. Калікс[4]арен C-956 ефективно інгібує H^+ - Ca^{2+} -обмінник мітохондрій, не впливаючи на енергозалежну акумуляцію Ca^{2+} , стимулює мітохондрійну NO-синтазу, гальмує окислення $NADH$ та $FADH_2$ в електрон-транспортному ланцюзі. Сполуки C-97, C-99 та C-107 викликають деполаризацію плазматичної мембрани міоцитів матки. Взаємодіючи з мітохондріями, вони викликають інгібування Ca^{2+} -уніпортера і одночасну стимуляцію її H^+ - Ca^{2+} -обмінника (C-97, C-99), помірне пригнічення активності мітохондрійної NO-синтази. Поряд з цим має місце транзйентна гіперполяризація мітохондрійної мембрани, яка пов'язана з початковим посиленням окислення $NADH$ та, можливо, стимулюванням електрогенного H^+ - Ca^{2+} -

обмінника. Відсутність впливу всіх досліджуваних калікс[4]аренів на утворення активних форм кисню у мітохондріях може вказувати на користь того, що процеси, які активуються/гальмуються за їх присутності, не призводять до шкідливих для органел наслідків (тобто розвитку мітохондрійної дисфункції).

Таким чином, калікс[4]арени, шляхом посилення/пригнічення біосинтезу NO, змінюючи активність систем транспорту Ca^{2+} , можуть мати модулюючий вплив на функціонування комплексів дихального ланцюга і біоенергетику мітохондрій і використані в біохімічних дослідженнях як регулятори скорочення/розслаблення міометрія.

Ключові слова: оксид азоту, NO-синтаза, мітохондрії, міометрій, Ca^{2+} -гомеостаз, потенціал плазмалеми, електрон-транспортний ланцюг, потенціал внутрішньої мітохондрійної мембрани, калікс[4]арени.

SUMMARY

Danylovyh H.V. Biosynthesis and regulatory role of nitric oxide in smooth muscle mitochondria. – Qualifying scientific research with the manuscript rights.

Thesis for Doctor of Science degree on specialty 03.00.04 – biochemistry. O.V. Palladin Institute of Biochemistry of NAS of Ukraine, Kyiv, 2021.

The dissertation is devoted to the investigation of biochemical properties of NO biosynthesis in uterine smooth muscle mitochondria, as well as to the study of molecular mechanisms of nitric oxide action as a possible specific endogenous regulator of Ca^{2+} concentration in myocytes, mitochondrial Ca^{2+} -transport systems functioning, and bioenergetic processes (electron transport chain activity and inner mitochondrial membrane polarization) and to the study of the effect of calix[4]arenes – exogenous non-toxic modulators of mitochondrial functional activity – on NO-synthase capacity, bioenergetics and Ca^{2+} -homeostasis of the organelles.

With the use of NO-sensitive fluorescent probe DAF-FM, laser confocal microscopy and flow cytometry, we demonstrated for the first time the formation of NO in uterine smooth muscle cells. Mitochondria have been shown to be a potent source of NO in uterine smooth muscle cells. The NO synthesis in mitochondria is sensitive to inhibitors of constitutive NO synthases (N^{G} -nitro-L-arginine and 2-aminopyridine) and Ca^{2+} -uniporter. In addition, it is inhibited by calmodulin antagonists (calmidazolium and trifluoperazine), Mg ions, and is largely dependent on the level of inner mitochondrial membrane energization. The values of the apparent Michaelis constant by L-arginine and the activation constant by the Ca^{2+} for reaction of NO biosynthesis are within the physiological values of their concentrations in the mitochondrial matrix. It has also been shown that NO synthases associated with the plasma membrane and, possibly, the sarcoplasmic reticulum may be nitric oxide sources in myocytes.

In uterine smooth muscle mitochondria NO stimulates Ca^{2+} accumulation through the Ca^{2+} -uniporter activation. The system of Ca^{2+} release from mitochondria – the H^+ - Ca^{2+} -exchanger, which is presented by the protein LETM 1, is resistant to

nitric oxide influence. NO causes a moderate decrease in the electric potential on the inner membrane of the organelles due to the inhibition of the respiratory chain complexes, namely the inhibition of FADH₂ oxidation, and counteracts the swelling of the organelles caused by calcium-rich solution.

A simulation model in terms of functional hybrid Petri nets was created. The latter reproduces the functional activity of mitochondria, namely the simultaneous oxidation of NADH/FADH₂, the formation of reactive oxygen species and changes in their hydrodynamic diameter. The obtained equations formalize and describe the concentration-time dependencies of the course of the listed processes in the medium under the action of sodium azide, which is considered as an indirect donor of NO in the literature, with the possibility of predicting their course intensity. In particular, the response of mitochondria over time to the action of NaN₃ at a concentration that has not been used in the experiment was predicted.

It has been shown that nitric oxide inhibits the pathways that increase Ca ions concentration in the myoplasm under the effect of carbachol and oxytocin on myocytes, and also causes an increase in the characteristic size of myocytes. The polarizing effect of nitric oxide is due to the increase in K⁺-permeability of the plasmalemma and depends on Ca ions, as well as due to the cGMP-dependent stimulation of Na⁺,K⁺-ATPase activity. The scheme representing biochemical mechanisms of NO regulatory effects at the level of mitochondria and plasma membrane in uterine myocytes is proposed.

The possibility of calix[4]arene C-956 penetration into cell myoplasm and its interaction with mitochondria has been demonstrated. Calix[4]arene C-956 effectively inhibits mitochondrial H⁺-Ca²⁺-exchanger, without affecting the energy-dependent Ca²⁺ accumulation, stimulates mitochondrial NO-synthase, and inhibits the NADH and FADH₂ oxidation in the electron transport chain. Compounds C-97, C-99 and C-107 cause depolarization of the uterine myocytes plasma membrane. Upon interaction with mitochondria, they cause Ca²⁺-uniporter inhibition and simultaneous stimulation of its H⁺-Ca²⁺-exchanger (C-97, C-99), and moderate inhibition of mitochondrial NO-synthase activity. In addition, there is a transient hyperpolarization of the mitochondrial membrane, which is associated with an initial increase in NADH

oxidation and, possibly, stimulation of the electrogenic H^+ - Ca^{2+} -exchanger. The absent influence of all studied calix[4]arenes on the formation of reactive oxygen species in mitochondria may indicate that the activated/inhibited in their presence processes do not lead to harmful effects in these organelles (i.e. to the development of mitochondrial dysfunction).

Thus, through NO biosynthesis enhancement/inhibition by altering the activity of Ca^{2+} transport systems, calix[4]arenes can have a modulatory effect on the respiratory chain complexes functioning and mitochondrial bioenergetics and can be used in biochemical studies as myometrial contraction/relaxation regulators.

Key words: nitric oxide, NO-synthase, mitochondria, myometrium, Ca^{2+} -homeostasis, plasmalemma potential, electron transport chain, inner mitochondrial membrane potential, calix[4]arenes.

Список публікацій здобувача за темою дисертації

СТАТТІ

1. **Danylovych H.V.**, Danylovych Yu.V., Gulina M.O., Bohach T.V., Kosterin S.O. NO-synthase activity in the mitochondria of the uterus smooth muscle: identification and biochemical properties. *Gen. Physiol. Biohys.* 2019; 38(1): 39-50.
2. **Danylovych H.V.**, Danylovych Yu.V., Bohach T.V., Hurska V.T., Kosterin S.O. Sources and regularity of nitric oxide synthesis in uterus smooth muscle cells. *Ukr. Biochem. J.* 2019; 91(4): 33-40.
3. Данилович Ю.В., **Данилович Г.В.**, Костерін С.О. Роль іонів калію у біосинтезі оксиду азоту в мітохондріях гладенького м'яза. *Фізіол. журн.* 2021; 67 (1): 16-23.
4. **Danylovych H.V.**, Danylovych Yu.V., Rodik R.V., Hurska V.T., Kalchenko V.I., Kosterin S.O. Calix[4]arenes modulate Ca^{2+} -dependent processes smooth muscle cell mitochondria. *Chemistry Research Journal.* 2019; 4(6):109-122.
5. **Danylovych H.V.**, Danylovych Yu.V., Kosterin S.O. Nitric oxide induced polarization of myometrium cells plasmalemma revealed by application of fluorescent dye 3,3'-dihexyloxycarbocyanine. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics.* 2019; 55: 34-45.
6. **Danylovych H.V.**, Chunikhin A.Yu., Danylovych Yu.V., Kosterin S.O. Application of petri nets methodology for the examination of the bio(physico)chemical parameters of mitochondria functioning. *bioRxiv preprint* first posted online Jan. 23, 2020; doi: <http://dx.doi.org/10.1101/2020.01.22.915074>.// *Ukr. Biochem. J.* 2021; 93(3): 101-110.
7. Kolomiets O.V., Danylovych Yu.V., **Danylovych H.V.**, Kosterin S.O. Ways and Mechanisms of Transmembrane Exchange of Ca^{2+} in Mitochondria. *Int. J. Phys. Pathophys.* 2018; 9(3): 265-286.
8. **Danylovych G.V.**, Bohach T.V., Danylovych Yu.V. The biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. Nitric oxide formation features and its functional role in mitochondria. *Ukr. Biochem. J.* 2018; 90(1): 3-24.

9. **Danylovych G.V.**, Kolomiets O.V., Danylovych Yu.V., Rodik R.V., Kalchenko V.I., Kosterin S.O. Calix[4]arene C-956 is effective inhibitor of H^+ - Ca^{2+} -exchanger in smooth muscle mitochondria. *Ukr. Biochem. J.* 2018; 90(1): 25-31.
10. **Danylovych H.**, Chunikhin A., Danylovych Yu., Kosterin S. Methodology of Petri networks for simultaneous evaluation of the impact of different modifiers on the fluorescence of nucleotides from electron transport chain in isolated mitochondria and on the process of swelling. *BioTechnologia (J. Biotech. Comput. Biol. Bionanotech.)*. 2018; 99(1): 37-48.
11. Данилович Ю.В., **Данилович Г.В.**, Коломієць О.В., Родік Р.В., Кальченко В.І., Костерін С.О. Дія калікс[4]аренів на транспорт Ca^{2+} , електричний потенціал та активність електрон-транспортного ланцюга в мітохондріях гладенького м'язу. Збірник наукових праць «Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології». 2017; 15(2): 365-371.
12. **Danylovych H.V.**, Danylovych Yu.V., Rodik R.V., Kalchenko V.I., Chunikhin A.Ju. Calix[4]arenes as Modulators of Energy-Dependent Ca^{2+} -Accumulation and Functioning of the Electron Transport Chain in Smooth Muscle Mitochondria. *Int. J. Phys. Pathophys.* 2017; 8(3): 241-251.
13. **Danylovych H.V.** Evaluation of functioning of mitochondrial electron transport chain with NADH and FAD autofluorescence. *Ukr. Biochem. J.* 2016; 88(1): 31-43.
14. Danylovych Yu.V., Chunikhin A.Y., **Danylovych G.V.**, Kolomiets O.V. The use of the Petri net method in the simulation modeling of mitochondrial swelling. *Ukr. Biochem. J.* 2016; 88(4): 66-74.
15. Danylovych Yu.V., Kolomiets O.V., **Danylovych G.V.**, Kosterin S.O. Nitric Oxide as Possible Regulator of Energy-Dependent Ca^{2+} Transport in Mitochondria of Uterine Smooth Muscle. *Int. J. Phys. Pathophys.* 2015; 6(2): 91-98.
16. Kolomiets O.V., Danylovych Yu.V., **Danylovych G.V.** H^+ - Ca^{2+} exchanger in the Myometrium Mitochondria: Modulation by Exogenous and Endogenous Compounds. *Int. J. Phys. Pathophys.* 2015; 6(4): 287-297.

17. Danylovych Yu.V., Karakhim S.A., Kolomiets O.V., **Danylovych G.V.**, Kosterin S.O. Identification of nitric oxide in mitochondria of myometrium cell. *Biopolymers and Cell*. 2015; 31(3): 174-178.
18. Danylovych Yu.V., Karakhim S.A., **Danylovych G.V.**, Kolomiets O.V., Kosterin S.O. Electrochemical potential of the inner mitochondrial membrane and Ca^{2+} homeostasis of myometrium cells. *Ukr. Biochem. J.* 2015; 87(5): 56-65.
19. Данилович Ю.В., **Данилович Г.В.**, Коломієць О.В., Костерін С.О., Карахім С.О., Чуніхін О.Ю. Дослідження впливу нітрозактивних сполук на поляризацію внутрішньої мембрани мітохондрій в міоцитах матки щурів із використанням потенціалчутливого флуоресцентного зонда $\text{DiOC}_6(3)$. *Ukr. Biochem. J.* 2014; 86(1): 42-55.
20. Коломієць О.В., Данилович Ю.В., **Данилович Г.В.**, Костерін С.О. $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обмін у мітохондріях міометрія. *Ukr. Biochem. J.* 2014; 86(3): 41-48.
21. Данилович Ю.В., Чуніхін О.Ю., **Данилович Г.В.** Тестування змін розмірів міоцитів матки за дії модуляторів її скоротливої активності. *Фізіол. журн.* 2013; 59 (1): 32-39.
22. Коломієць О.В., Данилович Ю.В., **Данилович Г.В.**, Костерін С.О. Вивчення акумуляції Ca^{2+} в ізольованих мітохондріях гладенького м'яза за допомогою зонда Fluo-4 AM. *Укр. біохім. журн.* 2013; 85(4): 30-39.
23. **Данилович Г.В.**, Данилович Ю.В., Коломієць О.В., Костерін С.О., Родік Р.В., Черенок С.О., Кальченко В.І., Чуніхін О.Ю., Горчев В.Ф., Карахім С.О. Зміни поляризації плазматичної та внутрішньої мітохондріальної мембран клітин міометрія за дії каліксаренів – інгібіторів Na^+ , K^+ -АТФ-ази плазматичної мембрани. *Укр. біохім. журн.* 2012; 84(6): 37-48.
24. **Данилович Г.В.**, Данилович Ю.В., Горчев В.Ф. Реєстрація K^+ -рівноважного потенціалу на плазматичній мембрані клітин міометрія і вивчення його модуляції NO_x та H_2O_2 методом протокової цитометрії. *Укр. біохім. журн.* 2010; 82(1): 52-61.
25. Данилович Ю.В., **Данилович Г.В.**, Коломієць О.В. Ефекти нітропрусиду та нітриту натрію на уабіччутливу Na^+ , K^+ -АТФ-азну активність гладенького м'яза матки. *Укр. біохім. журн.* 2010; 82(6): 33-41.

26. **Данилович Г.В.**, Данилович Ю.В. Вплив окислів азоту і пероксиду водня на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-азну та Mg^{2+} -АТР-азну активності у фракції сарколеми міометрія. Укр. біохім. журн. 2007; 79(2): 31-38.

МОНОГРАФІЯ

27. Данилович Ю.В., **Данилович Г.В.** Активні форми азоту та кисню в біохімічних процесах транспорту іонів Са і поляризації субклітинних структур гладенького м'яза. НВП Видавництво «Наукова думка» НАН України. –Київ. – 2019.

ТЕЗИ

28. **Г. Данилович**, Ю. Данилович, С. Костерін. Характеристика H^{+} - Ca^{2+} -обмінника у внутрішній мембрані мітохондрій. П'ята міжнародна наукова конференція“Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології”. Матеріали конференції. Дніпро, Україна. – 2020. – С. 154-156.

29. **Данилович Г.В.**, Данилович Ю.В. Калікс[4]арени – модулятори транспортних і метаболічних процесів у мітохондріях гладенького м'яза. Матеріали XII Українського біохімічного конгресу. Тернопіль. – Медична та клінічна хімія. –2019. - Т. 21, № 3(додаток). - С. 84-85.

30. Bohach T.V., **Danylovych H.V.**, Danylovych Yu.V. Biochemical properties of NO-synthase activity in uterus smooth muscle mitochondria. FEBS3+ Meeting – XIth Parnas Conference – Young Scientists Forum “Biochemistry and molecular biology for innovation medicine”. Kyiv, Ukraine. – Ukr. Biochem. J. –2018. - Vol. 90, Special Issue. - P. 120.

31. **Данилович Г.В.**, Данилович Ю.В. Біосинтез та регуляторна роль оксиду азоту в мітохондріях гладенького м'яза матки. Матеріали Тематичного VII з'їзду Українського біофізичного товариства. Київ, Україна. – 2018. – С. 11.

32. **G. Danylovych**, T. Bohach, O. Kolomiets, Yu. Danylovych. Biosynthesis of nitric oxide in the uterine smooth muscle mitochondria. Third Kyiv Symposium “Smooth Muscle Physiology, Biophysics & Pharmacology: from genes and molecules to function, disorders and their novel treatment opportunities. Kyiv-Lutsk, Ukraine. – 2017. – P. 67.

33. **Г. Данилович**, Т. Богач, О. Коломієць, Ю. Данилович. Біосинтез і можлива фізіологічна роль оксиду азота в мітохондріях гладенького м'язу. Четверта міжнародна наукова конференція актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології. Матеріали конференції. Дніпро, Україна. – 2017. – С. 87-88.

34. Данилович Ю.В., **Данилович Г.В.**, Коломієць О.В., Родік Р.В., Кальченко В.І., Костерін С.О. Дія калікс[4]аренів на транспорт Ca^{2+} , електричний потенціал та активність електрон-транспортного ланцюга в мітохондріях гладенького м'язу. НАНСИС-2016. Тези V Наукової конференції “Нанорозмірні системи: будова, властивості, технології. Київ, Україна. – 2016. - С. 145.

35. Коломієць О.В., Данилович Ю.В., **Данилович Г.В.** Оксид азоту як можливий регулятор функціональної активності мітохондрій. Матеріали XI Українського біохімічного конгресу. Київ. - Ukr. Biochem. J. –2014. - Vol. 86, № 5(Supplement 1). - С. 163-164.

36. Данилович Ю.В., **Данилович Г.В.**, Коломієць О.В. Оксид азоту – потенційний регулятор Ca^{2+} -гомеостазу гладенького м'язу матки та рівня поляризації його субклітинних структур. Матеріали XI Українського біохімічного конгресу. Київ. - Ukr. Biochem. J. –2014. - Vol. 86, № 5(Supplement 1). - С. 100-101.

37. Коломієць О.В., Данилович Ю.В., **Данилович Г.В.** Окремі закономірності акумуляції іонів Са в ізольованих мітохондріях міометрія, досліджені із використанням Ca^{2+} -чутливого флуоресцентного зонду Fluo-4 АМ. Актуальні питання біологічної фізики та хімії. Матеріали ІХ Міжнародної науково-технічної конференції. Севастополь. – 2013. - С. 147-148.

38. Данилович Ю.В., **Данилович А.В.**, Коломієць О.В., Чунихин А.Ю., Карахим С.А. Использование метода лазерной конфокальной микроскопии и потенциалчувствительного флуоресцентного зонда DiOC₆(3) для исследования влияния нитрозактивных соединений на поляризацию внутренней митохондриальной мембраны гладкомышечных клеток. Научно-практическая конференция “Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения. Новый свет, Крым. – 2013. – С.103-104.

39. **Данилович А.В.**, Данилович Ю.В., Коломиец О.В. Влияние калкс[4]аренов – ингибиторов Na^+, K^+ -АТФ-азы на поляризацию плазматической и митохондриальной мембран гладкомышечных клеток матки. Актуальні питання біологічної фізики та хімії. Матеріали VIII Міжнародної науково-технічної конференції. Севастополь. – 2012. - С. 168-169.

40. Danylovych Yu.V, **Danylovych G.V.** The sarcolemma of myometrium is possible target of nitric oxide activity in utera. International symposium “Biological motility: fundamental and applied science”. Pushchino. – 2012. – P.47-48.

41. Данилович Ю.В., Чуніхін О.Ю., **Данилович Г.В.** Реєстрація змін розмірів клітин гладенького м'язу із використанням лазерної фотон-кореляційної спектроскопії. Актуальные вопросы биологической физики и химии. Материалы VII Международной научно-технической конференции. Севастополь. – 2011. - С. 217-220.

42. Данилович Ю.В., **Данилович Г.В.**, Коломиец О.В. Влияние доноров NO на убаинчувствительную Na^+, K^+ -АТФазную активность миометрия. Научно-практическая конференция “Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения. Новый свет, Крым. – 2011. – С.657-658.

43. Данилович Ю.В., **Данилович Г.В.** Вплив оксиду азоту на мембранний потенціал гладенького м'язу матки. Актуальные вопросы теоретической и прикладной биофизики, физики и химии. Материалы VI Международной научно-технической конференции. Севастополь. – 2010. - С. 217-220.

44. **Данилович Г.В.**, Данилович Ю.В. Використання потенціалчутливого зонда $\text{DiOC}_6(3)$ для тестування потенціалу плазматичної мембрани та митохондрій гладеньком'язових клітин матки. Матеріали X Українського біохімічного з'їзду. Одеса. - Укр. біохім. журн. –2010. - Т. 82, № 4(додаток 1). - С. 125-126.

45. Данилович Ю.В., **Данилович Г.В.** cGMP-незалежні ефекти оксиду азоту в міометрії, які можуть лежати в основі регуляції контрактильної активності. Матеріали X Українського біохімічного з'їзду. Одеса. - Укр. біохім. журн. –2010. - Т. 82, № 4(додаток 1). - С. 126-127.

46. Данилович Ю.В., **Данилович Г.В.** Закономірності утворення та біохімічні основи функціональної активності окислів азоту та пероксиду водню в матці. Актуальные вопросы теоретической и прикладной биофизики, физики и химии. Материалы V Международной научно-технической конференции. Севастополь. – 2009. - С. 106-109.

47. Danylovych Yu., **Danylovych H.** The targets of nitric oxides and hydrogen peroxide action in myometrium. Vth International symposium “Supramolecular systems in chemistry and biology”. Kyiv. – 2009. – P.93

48. Данилович Ю.В., Данилович Г.В. Некоторые биохимические механизмы функциональной активности окислов азота и пероксида водорода в матке. Научно-практическая конференция “Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения. Новый свет, Крым. – 2009. – С.249-250.

49. Векліч Т.О., Шкрабак О.А., **Данилович Г.В.** Дослідження мембранотропних ефектів інгібіторів Na^+ , K^+ -АТРази – каліксаренів С-99 та С-107. Научно-практическая конференция “Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения. Новый свет, Крым. – 2009. – С.439-440.

50. Danylovych Yu., **Danylovych H.** The possible role of nitric oxides and hydrogen peroxide in uterus. VII Parnas Conference on biochemistry and molecular biology. Yalta, Crimea. – Укр. біохім. журн. – 2009. - Т. 81, № 4 (спец. випуск). - P. 70.

51. Danylovych Yu.V., **Danylovych H.V.** The action of nitric and oxygen species on Ca^{2+} , Mg^{2+} - ATP-ase та Mg^{2+} - ATP-ase activity in myometrium sarcolemma fraction. Abstracts of the 6th Parnas Conference Molecular Mechanism of Cellular Signalling. – Krakov, Poland. – 2007. – Vol.54. – P.12-13.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	19
ВСТУП	22
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	
1.1. БІОХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ТА ЗАКОНОМІРНОСТІ БІОСИНТЕЗУ ОКСИДУ АЗОТУ	
1.1.1. Метаболізм оксиду азоту	35
1.1.2. Структура, каталітична активність та локалізація NOS	42
1.1.3. Біохімічні механізми, які лежать в основі функціональної активності NO	48
1.1.4. Джерела, регуляція утворення та фізіологічне значення оксиду азоту в матці	51
1.2. Ca^{2+} -ГОМЕОСТАЗ В КЛІТИНАХ ГЛАДЕНЬКОГО М'ЯЗА І ЙОГО РЕГУЛЯЦІЯ АКТИВНИМИ ФОРМАМИ АЗОТУ	
1.2.1. Електро(фармако)механічне спряження і шляхи активації скорочення гладеньком'язових клітин	56
1.2.2. Системи пасивного та енергозалежного транспорту Ca^{2+} в міоцитах	58
1.2.3. Просторово-часові характеристики Ca^{2+} -сигналу	61
1.2.4. Ca^{2+} -транспортувальні системи мітохондрій клітин гладенького м'яза	62
1.2.5. Молекулярна фізіологія іонів Ca в мітохондріях	67
1.2.6. Окремі приклади впливу NO на катіон-транспортувальні системи клітини	69
1.2.7. Ефекти NO в мітохондріях	71
1.2.8. Синтез оксиду азоту в мітохондріях за присутності кисню	73
1.3. БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ КАЛІКС[4]АРЕНІВ В ГЛАДЕНЬКОМУ М'ЯЗІ	
1.3.1. Структура та можливість застосування каліксаренів в хімії, біології та медицині	75
1.3.2. Біохімічна активність калікс[4]аренів у клітинах міометрія та їх вплив на функціонування мітохондрій	76
Узагальнення до розділу 1	80
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	
2.1. МЕТОДИ ПРЕПАРАТИВНОЇ БІОХІМІЇ	82
2.1.1. Виділення суспензії міоцитів з міометрія щурів	82
2.1.2. Виділення фракції плазматичних мембран міометрія свині	83
2.1.3. Одержання фракції мітохондрій міометрія	83
2.2. ФЛУОРЕСЦЕНТНІ МЕТОДИ	84

2.2.1.	Процедура іммобілізації міоцитів із використанням полі-L-лізину	86
2.2.2.	Навантаження флуоресцентними барвниками клітин та проведення конфокально-мікроскопічних досліджень	87
2.2.3.	Вивчення біохімічних властивостей біосинтезу NO ізольованими мітохондріями міометрія щурів методом протокової цитометрії	88
2.2.4.	Процедура навантаження мітохондрій флуоресцентним зондом Fluo-4 AM	89
2.2.5.	Дослідження змін вмісту іонізованого Ca в ізольованих мітохондріях із використанням методу спектрофлуориметрії	89
2.2.6.	Вивчення динаміки вмісту іонізованого Ca ²⁺ в ізольованих мітохондріях із використанням методу протокової цитометрії	90
2.2.7.	Навантаження мітохондрій рН-чутливим зондом BCECF-AM	91
2.2.8.	Дослідження змін рН матриксу в ізольованих мітохондріях із використанням методу спектрофлуориметрії	91
2.2.9.	Процедура навантаження мітохондрій флуоресцентним зондом DCF-DA	91
2.2.10.	Вивчення утворення активних форм кисню за допомогою флуоресцентного зонду DCF-DA та метода протокової цитометрії	91
2.2.11.	Вивчення змін мембранного потенціалу мітохондрій інтактних міоцитів із використанням методу лазерної конфокальної мікроскопії	92
2.2.12.	Реєстрація змін мембранного потенціалу мітохондрій інтактних міоцитів із використанням флуориметричного методу	92
2.2.13.	Реєстрація змін мембранного потенціалу в ізольованих мітохондріях	93
2.2.14.	Реєстрація K ⁺ -рівноважного потенціалу на плазматичній мембрані клітин міометрія і вивчення його модуляції методом спектрофлуориметрії та протокової цитометрії	93
2.2.15.	Реєстрація флуоресценції NADH та FAD в мітохондріях із використанням методу спектрофлуориметрії	96
2.2.16.	Вивчення ефектів калікс[4]аренів на транспортні та енергетичні процеси в міоцитах та ізольованих мітохондріях	97
2.2.17.	Визначення інтенсивності флуоресценції калікс[4]арена C-956 при взаємодії з гладеньком'язовими клітинами матки щурів	97
2.3.	МЕТОДИ ЕНЗИМОЛОГІЇ	
2.3.1.	Визначення Ca ²⁺ , Mg ²⁺ -АТРазної активності	98
2.3.2.	Визначення уабіччутливої Na ⁺ , K ⁺ -АТРазної активності	99
2.4.	ІНШІ МЕТОДИ	
2.4.1.	Визначення характеристичних розмірів і змін гідродинамічного діаметру мітохондрій та міоцитів із використанням методу лазерної кореляційної спектроскопії	100

2.4.2.	Імітаційне моделювання	101
2.4.3.	Характеристика клітинної суспензії	101
2.4.4.	Кінетичні розрахунки	102
2.4.5.	Статистична обробка результатів та обчислення	103
2.5.	РЕАКТИВИ	104

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1.	ІДЕНТИФІКАЦІЯ СИНТЕЗУ ОКСИДУ АЗОТУ В МІТОХОНДРІЯХ МІОМЕТРІЯ ТА БІОХІМІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЦЬОГО ПРОЦЕСУ	106
3.1.1.	Докази наявності оксиду азоту в мітохондріях міоцитів матки та можливості утворення NO в цих органелах	107
3.1.2.	З'ясування парціального внеску мітохондрій як ендогенного джерела NO у процес біосинтезу оксиду азоту в міоцитах	109
3.1.3.	Визначення оксиду азоту в ізольованих мітохондріях міометрія щурів із використанням флуоресцентного зонда DAF-FM та методу протокової цитометрії	114
3.1.4.	Кінетичні і каталітичні особливості NO-синтазної реакції в мітохондріях Узагальнення та обговорення результатів підрозділу 3.1.	119 128
3.2.	МІТОХОНДРІЇ ЯК СИСТЕМА ПІДТРИМАННЯ Ca^{2+} -ГОМЕОСТАЗУ В КЛІТИНАХ ГЛАДЕНЬКОГО М'ЯЗА МАТКИ. ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАНСПОРТУ ІОНІВ Ca ЇХНЬОЇ ВНУТРІШНЬОЇ МЕМБРАНИ	
3.2.1.	Електрохімічний потенціал внутрішньої мембрани мітохондрій та Ca^{2+} -гомеостаз у клітинах міометрія	131
3.2.2.	Стимуляція нітросполуками енергозалежної акумуляції іонів Ca в мітохондріях міометрія	140
3.2.3.	Ідентифікація та характеристика H^+ - Ca^{2+} -обмінника у внутрішній мембрані мітохондрій, вплив нітросполук на цю транспортувальну систему Узагальнення та обговорення результатів підрозділу 3.2.	148 155
3.3.	БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ ДІЇ ОКСИДУ АЗОТУ НА Ca^{2+} -ГОМЕОСТАЗ, ПОЛЯРИЗАЦІЮ СУБКЛІТИННИХ СТРУКТУР ТА АКТИВНІСТЬ ЕЛЕКТРОН-ТРАНСПОРТУВАЛЬНОГО ЛАНЦЮГА МІТОХОНДРІЙ МІОМЕТРІЯ	157
3.3.1.	Гальмування NO розвитку Ca^{2+} -транзієнту в ізольованих гладеньком'язових клітинах матки, спричиненого карбахолом та окситоцином	158
3.3.2.	Протокова цитометрія як інструмент вивчення трансмембранного потенціалу субклітинних структур гладеньком'язових клітин	161
3.3.3.	Вплив нітросполук на поляризацію плазматичної мембрани	

	клітин міометрія	167
3.3.4.	Зміни K^+ -рівноважного потенціалу на плазматичній мембрані за дії нітросполук	175
3.3.5.	Електрон-транспортувальний ланцюг мітохондрій як мішень дії оксиду азоту	180
3.3.6.	Протекторна дія NO щодо висококальцієвого набухання ізольованих мітохондрій	190
3.3.7.	Зміни гідродинамічного діаметру міоцитів за дії нітросполук	195
	Узагальнення та обговорення результатів підрозділу 3.3.	199
3.4.	ІМІТАЦІЙНЕ МОДЕЛЮВАННЯ БІОЕНЕРГЕТИЧНИХ ПРОЦЕСІВ У МІТОХОНДРІЯХ ЗА ДІЇ АЗИДУ НАТРІЯ ЯК НЕПРЯМОГО ДОНОРА NO	
3.4.1.	Використання методології мереж Петрі для імітаційного моделювання функціональної активності електрон-транспортувального ланцюга та об'єму мітохондрій	203
3.4.2.	Гібридні мережі Петрі як інструмент одночасної оцінки змін флуоресценції аденінових нуклеотидів, генерації активних форм кисню та набухання ізольованих мітохондрій за дії нітросполук	209
	Узагальнення та обговорення результатів підрозділу 3.4.	214
3.5.	БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ NO, Ca^{2+} -ЗАЛЕЖНОЇ ДІЇ КАЛІКС[4]АРЕНІВ НА ФУНКЦІОНУВАННЯ МІТОХОНДРІЙ	217
3.5.1.	Взаємодія калікс[4]арена C-956 з міоцитами	218
3.5.2.	Вплив калікс[4]арена C-956 на H^+ - Ca^{2+} -обмінник у мітохондріях міометрія, синтез NO та активність електрон-транспортувального ланцюга	224
3.5.3.	Вплив калікс[4]аренів C-97, C-99, C-107 на поляризацію плазматичної та внутрішньої мітохондрійної мембран, H^+ - Ca^{2+} -обмін, синтез NO та активність електрон-транспортувального ланцюга	230
	Узагальнення та обговорення результатів підрозділу 3.5.	238
	РОЗДІЛ 4. ЗАКЛЮЧНИЙ РОЗДІЛ	240
	ВИСНОВКИ	252
	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	254
	ДОДАТОК А	299
	ДОДАТОК Б	309

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- ГМК – гладеньком'язові клітини
- ПМ – плазматична мембрана
- EP/CP – ендоплазматичний/саркоплазматичний ретикулум
- МХ – мітохондрії
- ЗММ – зовнішня мітохондрійна мембрана
- ВММ – внутрішня мітохондрійна мембрана
- ЕТЛ – електрон-транспортний ланцюг
- NOS – NO-синтаза
- mtNOS – мітохондрійна NO-синтаза
- PMCA – Ca^{2+} -помпа плазматичної мембрани, Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза
- SERCA – Ca^{2+} -помпа сарко(ендо)плазматичного ретикулуму
- NCX – Na^+ - Ca^{2+} -обмінник плазматичної мембрани
- VDAC – потенціал залежний аніонний канал
- VDCC – потенціал-керовані Ca^{2+} -канали
- ROCC – рецептор-керовані Ca^{2+} -канали
- SMOCC – Ca^{2+} -канали, керовані вторинними месенджерами
- SOCC – пул-керований канал входу Ca^{2+} в цитоплазму
- SOCE – пул-керований вхід Ca^{2+} в цитоплазму
- RyR – канал ріанодинового рецептора саркоплазматичного ретикулума
- IP_3R – IP_3 -чутливі рецептори саркоплазматичного ретикулума
- CICR – Ca^{2+} -індуковане вивільнення Ca^{2+} через RyR
- STOCs – спонтанні транзйентні вихідні токи
- K_{Ca} – Ca^{2+} -залежні K^+ -канали
- E(Ф)МС – електро(фармако)механічне спряження
- MLCK – кіназа легких ланцюгів міозина
- MLCP – фосфатаза легких ланцюгів міозина
- рГЦ – розчинна гуанілатциклаза
- LETM 1 – протеїн, що репрезентує H^+ - Ca^{2+} -обмінник в мітохондріях (leucine zipper, EF-hand containing transmembrane protein 1)

PK B (Akt) – протеїнкіназа B
PK A – протеїнкіназа A (сАМР-залежна)
PK G – протеїнкіназа G (сGMP-залежна)
АМРК -5'-АМР-протеїнкіназа
МАРК – мітоген активована протеїнкіназа
РІЗ-кіназа – фосфатидилінозитол-3-кіназа
СаМК II –СаМ-залежна протеїнкіназа II
СаМ – кальмодулін
Са²⁺-СаМ – комплекс Са²⁺ з кальмодуліном
АФК – активні форми кисню
АФА – активні форми азоту
NO – оксид азоту
NO₂⁻ – нітрит-аніон
NO₃⁻ – нітрат-аніон
O₂^{•-} – супероксид аніон (радикал)
H₂O₂ – пероксид водню
ONOO⁻ – пероксинітрит
[Ca²⁺]_i – внутрішньоклітинна (цитозольна) концентрація Са²⁺
сАМР – циклічний аденозин-3',5'-монофосфат
сGMP – циклічний гуанозин-3',5'-монофосфат, p8-Br-сGMP – його мем-
бранопроникний аналог
IP₃ – інозитол-1,4,5,-трисфосфат
DAG – діацилгліцерол
NADH (NADPH) – нікотинаміддинуклеотид (фосфат)
FADH₂ – флавінаденіндинуклеотид
FMN – флавінаденінмононуклеотид
BH₄ – 6(^)-5,6,7,8-тетрагідробіоптерін
RuR – рутенієвий червоний
SNP – нітропрусид натрія, донор NO
SN – нітрит натрія, попередник NO
SNAP – S-нітрозо-N-ацетилпеніциламін, донор NO

L-NAME – N^G-нітро-L-аргінін метиловий ефір

L-NMME – N^G-монометил-L-аргінін

NA – N^G-нітро-L-аргінін

Csp – циклоспорин А

СССР – карбоніл ціанід 3-хлорофенілгідрозон

ВСТУП

Актуальність теми

Оксид азоту (NO) є універсальною сигнальною і регуляторною молекулою в клітинах. Важливим проявом його біологічної активності є контроль скоротливої функції гладеньких м'язів, що, значною мірою, зумовлює нормальну роботу внутрішніх органів, зокрема сечостатевої системи [133, 232, 361, 365, 442].

Результати експериментальних робіт різних років дозволяють висловити припущення стосовно значення оксиду азоту в процесах, які попереджають контрактильну відповідь на розтягнення стінок матки внаслідок росту ембріону та зменшують чутливість міометрія до утероконстрикторних агентів, що має особливе значення за нормального перебігу виношування плоду. Як продукція NO, так і чутливість до нього знижуються наприкінці вагітності і передують початку пологової активності [98, 144-145, 434, 413]. Донори оксиду азоту викликають релаксацію міометрія як невагітних жінок, так і тих, що мають різні строки вагітності. Відповідне зниження контрактильної здатності гладеньком'язових клітин (ГМК) матки показано також і у випадку окремих видів тварин, у тому числі для щурів та приматів, у різні періоди функціональної активності органу [144-145, 215, 343, 410, 413]. Водночас фізико-хімічні механізми, за якими оксид азоту контролює скоротливу функцію міометрія, на сьогодні не з'ясовані. Отже, вивчення закономірностей утворення та біохімічних властивостей оксиду азоту в ГМК матки є вкрай необхідним.

Зміни цитозольної концентрації Ca^{2+} лежать в основі контролю скоротливої активності гладеньких м'язів, а Ca^{2+} -транспортувальні системи субклітинних структур, зокрема мітохондрій (МХ), є мішенню дії речовин, які модулюють контрактильну функцію міоцитів [327, 469-470]. Здатність NO розслабляти міометрій зумовлює інтерес до вивчення біохімічних закономірностей впливу оксиду азоту на Ca^{2+} -гомеостаз клітин міометрія.

Джерелами NO в матці можуть слугувати її ендометріальна тканина та ендотелій судин. Ідентифіковані також нервові закінчення, які забезпечують нитрергічну інервацію матки і містять нейрональну NO-синтазу [33-34, 143, 147,

271, 448, 477, 483]. Потужним джерелом NO в міометрії, виходячи з аналізу інформації стосовно інших тканин, можуть слугувати МХ [212, 230, 236, 450, 482]. У літературі відсутні відомості щодо утворення NO, каталітичних і кінетичних властивостей NO-синтазної системи МХ гладеньких м'язів, зокрема і клітин міометрія.

Серед вельми широкого спектру функцій МХ (біоенергетика, місце перебігу універсальних метаболічних процесів, джерело активних форм кисню, регуляція апоптозу/некрозу, цілий ряд спеціалізованих), які обумовлюють ключову роль цих органел для нормальної життєдіяльності клітин, чільне місце посідає їх значення в підтриманні внутрішньоклітинного Ca^{2+} -гомеостаза. Доведено, що МХ є високоємнісним Ca^{2+} -депо, здатні термінувати Ca^{2+} -сигнал, а також підтримувати низьку фізіологічно-значущу концентрацію цього катіона в цитозолі, захищаючи клітини від Ca^{2+} -перевантаження [107, 151, 240, 379, 389, 424]. В основі порушення Ca^{2+} -гомеостазу і спричиненої цим клітинної патології може лежати дезорганізація роботи Ca^{2+} -транспортувальних систем, локалізованих в мембранах МХ. Особливо важливі зазначені процеси для роботи м'язової тканини, оскільки її основна функція – скоротлива активність – є Ca^{2+} -залежним процесом. Біологічна активність МХ має, значною мірою, Ca^{2+} -залежний характер. Зростання концентрації Ca^{2+} в матриксі МХ активує ензими циклу трикарбонових кислот та синтез АТР [229], водночас перевантаження органел катіоном індукує клітинну загибель [68, 108, 205]. МХ відіграють важливу роль у процесах Ca^{2+} -сигналізації та Ca^{2+} -залежного скорочення гладеньких м'язів. У цій тканині вони виконують функцію високоефективного Ca^{2+} -депо внаслідок спроможності акумулювати та вивільнювати значні кількості катіону [89, 240, 244, 420].

Руйнація узгодженого функціонування Ca^{2+} -транспортувальних систем, які локалізовані у внутрішній мембрані мітохондрій (ВММ), може призвести до явища Ca^{2+} -перевантаження матриксу, гіперполяризації, порушення Ca^{2+} -залежного метаболізму активних форм азоту/кисню та їхньої гіперпродукції. Спричинений цими процесами нітрозативний/оксидативний стрес має наслідком, за умови недостатнього функціонування захисних систем, дисфункцію МХ [283]. Остання проявляється у порушенні функціонування електрон-транспортувального ланцюга (ЕТЛ), гіпер/деполяризації (незворотній) внутрі-

шньої мембрани, руйнації осмотичного балансу між матриксом МХ та міоплазмою тощо [130, 149, 191, 230, 237, 247, 290, 391]. Можливо, зазначені явища супроводжують контрактильну дисфункцію гладенького м'язу за патологічних станів різного генезу. Порушення скоротливої активності гладеньких м'язів окремі автори відносять до категорії “мітохондрійних хвороб” [169, 191, 205, 283, 290, 294, 362, 371, 425, 428, 482].

За останні двадцять років було з'ясовано, що NO регулює енергетичні, метаболічні і транспортні процеси в МХ. ВММ, як і матриксні ензими, є ефективною мішенню дії нітросполук через високий вміст у них тіольних залишків, залізо-сірчаних центрів, гемових груп, а також наявність супероксид-аніону. Зокрема, оксид азоту за фізіологічних концентрацій здатний зворотно пригнічувати активність цитохром с-оксидази, що призводить до зниження інтенсивності роботи ЕТЛ, окисного фосфорилування та споживання кисню МХ. Оксид азоту або його похідні також взаємодіють з *I* та *III* комплексами дихального ланцюга й гальмують їхнє функціонування [290, 362, 371, 482]. Ряд дослідників розглядають оксид азоту у фізіологічних концентраціях (наномолярних) як протекторну молекулу, яка здатна захищати органели від дисфункції, спричиненої гіперполяризацією внутрішньої мембрани, надлишковою продукцією активних форм кисню (АФК) і окисним стресом [192, 290, 362, 386, 401, 431]. Результатами сучасних досліджень підтверджується, що з NO пов'язана важлива ланка підтримання оптимальної концентрації іонів Са як у міоплазмі, так і мітохондрійному матриксі [229, 236, 290, 386, 391, 440].

Результатом багаторічних досліджень співробітників відділу біохімії м'язів ІБХ НАНУ стали переконливі докази існування в МХ міометрія принаймні двох систем транспорту Са²⁺, локалізованих у внутрішній мембрані: Са²⁺-уніпортеру – електрофоретичної низькоафінної і високоємнісної системи енергозалежної акумуляції іонів Са та Н⁺-Са²⁺-обмінника [18, 49, 76]. Перша має особливе значення для ретикулярно-мітохондрійної Са²⁺-функціональної одиниці, забезпечуючи акумуляцію катіона за локальних високих концентрацій, які створюються біля ендо(сарко)плазматичного ретикулума [125]. Зворотним транспортером, більш афінним до Са²⁺, виступає Н⁺-Са²⁺-обмінник, молекулярною

структурою якого у ссавців згідно окремих результатів, є протеїн LETM 1 [201, 340, 394]. H^+ - Ca^{2+} -обмінник спроможний забезпечувати як вивільнення, так і акумуляцію катіона, залежно від діючих концентрацій Ca^{2+} та H^+ .

З огляду на вищезазначене, важливим є дослідження біохімічних властивостей оксиду азоту як можливого ендogenousного специфічного регулятора Ca^{2+} -транспортувальних систем МХ, а також їхньої біоенергетики, зокрема роботи ЕТЛ та поляризації внутрішньої мембрани органел – інтегральних показників функціональної активності цих субклітинних структур. У випадку гладенького м'язу матки проблема можливої біологічної активності NO в МХ не вирішена.

З точки зору системної біології клітини є перспективним комплексне дослідження функціонування МХ із залученням методів математичного моделювання, зокрема із використанням методології аналізу динамічних дискретних систем (наприклад, “функціональних гібридних мереж Петрі”) [202, 308, 465].

У зв'язку із першочерговим значенням іонів Ca для функціонування МХ, зокрема їхньої біоенергетики і біосинтезу NO, актуальним стає пошук екзогенних нетоксичних сполук, які б мали змогу ефективно діяти на Ca^{2+} -транспортувальні системи цих субклітинних структур. Останні роки значна увага світової біологічної науки приділяється циклічним олігомерам фенолів – каліксаренам. В Україні існує всесвітньо відома школа у галузі хімії макроциклічних сполук, зокрема калікс[4]аренів, яка працює під керівництвом академіка НАН України, професора В.І. Кальченка (Інститут органічної хімії НАН України). Калікс[4]арени – макроциклічні олігомери, побудовані з фенольних фрагментів, що поєднані метиленовими містками [5, 15, 53, 358]. Калікс[4]арени володіють противірусною, антитромботичною, антибактеріальною дією [15, 350, 358]. Багато калікс[4]аренів здатні виступати інгібіторами ензимів [71, 358]. Роботами відділу біохімії м'язів ІБХ НАНУ під керівництвом академіка НАН України Костеріна С.О. було доведено, що вибрані калікс[4]арени, які були синтезовані та охарактеризовані методами ядерно-магнітного резонансу та інфрачервоної спектроскопії у відділі хімії фосфоранів Інститута органічної хімії НАН України, специфічно впливають на катіон-транспортувальні системи субклітинних структур гладенького м'язу

матки. Зокрема, калікс[4]арен С-90 високоафінно інгібує активність транспортувальної Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази [22], а калікс[4]арени С-97, С-99 та С-107 - Na^+ , K^+ -АТРази плазмалеми [19-20]. Макроцикл С-91 викликає посилення енергозалежної акумуляції іонів Са в МХ у пермеабілізованих міоцитах. Проте С-91 не впливає на пасивне вивільнення іонів Са з цих органел [79]. Показано, що халконовмісні калікс[4]арени С-136 та С-137 спричинюють гіперполяризацію ВММ в міоцитах матки [6, 9]. Доведено також, що калікс[4]арени модулюють контрактильну активність міометрія [73-75]. Аналізуючи наведені результати можна припустити, що за невисоких (мікромольних) концентрацій окремі групи калікс[4]аренів здатні діяти на функціональну активність ЕТЛ, поляризацію мітохондрійної мембрани, транспорт іонів Са та біосинтез NO в МХ гладенького м'язу. Перевагою калікс[4]аренів як можливих інструментів біохімічних досліджень є їхня нетоксичність і дешевизна синтезу.

Отже, постає ряд актуальних питань, які стосуються загально-біологічної проблеми регуляції контрактильної активності гладенького м'язу. До них відноситься біосинтез оксиду азоту в МХ міоцитів, біохімічні механізми регуляції NO біоенергетичних процесів та транспорту іонів Са в цих субклітинних структурах. Наразі актуальним є завдання пошуку екзогенних нетоксичних модуляторів Ca^{2+} -гомеостазу та загалом функціональної активності МХ, зокрема їхньої NO-синтазної здатності, який доречно проводити, зокрема, серед представників калікс[4]аренів. До нагальних питань слід віднести з'ясування впливу оксиду азоту на концентрацію Ca^{2+} у міоплазмі клітин міометрія і дослідження можливих мембранних та іонних механізмів цього впливу. Вирішення зазначених задач є необхідним для розуміння ролі МХ та оксиду азоту в регуляції Ca^{2+} -гомеостазу ГМК і, відповідно, їх скоротливої здатності. Воно є основою пошуку селективних екзогенних модуляторів транспорту Ca^{2+} , біоенергетики та біосинтезу NO в МХ. Розв'язання цих питань є важливою умовою створення фармпрепаратів, які б мали змогу ефективно регулювати активність внутрішніх органів, зокрема контрактильну здатність матки.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами

Експериментальна робота виконувалась у 2007-2020 рр.

Робота виконана в рамках науково-дослідних тем відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (зав. – академік НАН України, професор Костерін С.О.).

Проблема “Біохімія тварин та людини”: – тема № 5, № 0104И003281 “Вивчення властивостей та регуляції АТФ-залежних кальцієвих помп мембранних структур гладеньких м'язів” (2004 - 2008); – тема № 5, № 0109U001589 “Вивчення біохімічних механізмів регуляції концентрації іонів Са в гладеньком'язових клітинах” (2009 - 2013); – тема № 5, № 0114U003213 “Вивчення біохімічних механізмів спряження збудження та скорочення в гладеньком'язових клітинах” (2014 - 2018); – тема № 5, № 0119U002508 “Вивчення біохімічних механізмів функціонування гладеньком'язової клітини як Са²⁺-залежної тензоелектрохімічної рецепторної системи” (2019 - 2023).

Проблема “Вивчення геному, протеому та метаболому живих організмів та шляхів їх регуляції: – тема № 15, №0117U004344 “Біохімічні механізми контролю системних міжклітинних взаємодій і регулювання сигнальних мереж та клітинних функцій за норми та патологічних станів” (2017 - 2021).

Робота виконувалась за підтримки:

– проектів ДФФД України за темами: – тема №18, №0107U007194 “Вивчення впливу та механізмів дії каліксаренів на системи іонного транспорту в субклітинних мембранних структурах гладеньких м'язів” (2007-2009 рр.); – №0110U000988 “Супрамолекулярні системи в хімії та біології. Каліксарени як модулятори активності ензиматичних та транспортних білків гладеньких м'язів” (2010-2012 рр.);

– програм наукових досліджень НАН України “Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій”: – №0110U005971 “З'ясування закономірностей та біофізикохімічних механізмів дії каліксаренів на функціонування каталітичних і транспортних білків біологічних мембран” (2010-2014 рр.); – №0112U002624 “Вивчення біохімічних механізмів Са²⁺-залежного контролю

скоротливої активності гладеньком'язової клітини як складної кооперативної тензоелектрохімічної рецепторної системи. Розробка молекулярно-динамічної моделі регуляції концентрації іонізованого Ca в міоцитах” (2012-2016 рр.); – №0115U003638 “Фізико-хімічні та біологічні властивості каліксаренів. Розділ 2. Розробка нових нанорозмірних каліксаренових ефекторів АТР-залежних ензиматичних та катіон-транспортуючих систем” (2015-2019 рр.);

– цільовою комплексною міждисциплінарною програмою наукових досліджень НАН України “Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства”, №0115U003639 (2015-2019 рр.).

Мета і завдання дослідження

Мета роботи:

Дослідити біохімічні властивості процесу синтезу оксиду азоту в мітохондріях гладенького м'язу матки та регуляцію нітросполуками й калікс[4]аренами Ca²⁺-залежної функціональної активності цих субклітинних структур.

Відповідно до вказаної мети були поставлені наступні **завдання**:

1. Вивчити закономірності утворення оксиду азоту в мітохондріях, каталітичні і кінетичні характеристики мітохондрійної NO-синтазної реакції.
2. З'ясувати біохімічні закономірності дії NO на транспорт Ca²⁺ у внутрішній мітохондрійній мембрані.
3. Дослідити ефекти NO та біохімічні механізми його дії на концентрацію Ca²⁺ у міоцитах, вивчити особливості впливу цього метаболіту на функціональну активність електрон-транспортного ланцюга та з'ясувати можливість протекторної дії оксиду азоту щодо мітохондрій.
4. Із застосуванням методології мереж Петрі здійснити імітаційне моделювання, біоенергетичних процесів у мітохондріях, зокрема за дії нітросполук.
5. Встановити іонні та мембранні механізми, які лежать в основі дії вибраних калікс[4]аренів на біосинтез NO, трансмембранний обмін Ca²⁺ та біоенергетику мітохондрій.

Об'єкт дослідження – біосинтез та функціональна роль оксиду азоту в мітохондріях гладенького м'язу матки.

Предмет дослідження – властивості синтезу NO мітохондріями міометрія, вплив оксиду азоту на обмін Ca^{2+} та біоенергетичні процеси в мітохондріях, іонні та мембранні механізми дії оксиду азоту та вибраних калікс[4]аренів на ці процеси.

Методи дослідження – методи препаративної та аналітичної біохімії, біохімічної мембранології, ензимології, спектрофотометрії, спектрофлуориметрії, протокової цитофлуориметрії (цитометрії), лазерної кореляційної спектрометрії (динамічного розсіювання світла), лазерної конфокальної мікроскопії, імітаційного моделювання (мережі Петрі), хімічної та біохімічної кінетики, статистичного аналізу.

Наукова новизна одержаних результатів

У дисертаційній роботі проведено комплексні дослідження біохімічних механізмів біосинтезу оксиду азоту в МХ гладенького м'язу матки. Вивчено вплив NO на транспорт Ca^{2+} , електричний потенціал та функціональну активність ЕТЛ в МХ. Вивчено вплив калікс[4]аренів на біосинтез оксиду азоту, Ca^{2+} -гомеостаз та біоенергетику цих субклітинних структур. Встановлено вплив NO на концентрацію Ca^{2+} в міоцитах матки і вивчено можливі мембранні і іонні механізми, які лежать в основі цього впливу. Сформульовані відповіді на фундаментальні запитання щодо ролі оксиду азоту і МХ в регуляції функціональної активності гладенького м'язу.

Вперше продемонстровано утворення NO в МХ ГМК матки із застосуванням лазерної конфокальної мікроскопії та методології солокалізації специфічних флуоресцентних барвників. Підібрано умови визначення NO-синтазної активності в ізольованих МХ міометрія щурів із застосуванням флуоресцентного зонду DAF-FM та методу протокової цитометрії. Оптимальна робота мітохондрійної NO-синтази (mtNOS) в ізольованих МХ міометрія потребує наявності в інкубаційному середовищі Ca^{2+} , NADPH та L-аргініну. Розраховано головні кінетичні параметри відповідної ензиматичної реакції: уявна константа Міхае-

ліса за L-аргініном складає $28,9 \pm 9,1$ мкМ, а константа активації за Ca^{2+} - $44,4 \pm 14,5$ мкМ. Доведено, що біосинтез оксиду азоту МХ суттєво залежить від рівня їхньої енергізації та інтенсивності надходження до матриксу екзогенного Ca^{2+} і пригнічується антагоністами кальмодуліну. Інгібітори конститутивних ізоформ NO-синтази N^G -нітро-L-аргінін та 2-амінопіридин у концентраціях 25 мкМ та 100 мкМ відповідно майже на 50 % пригнічували продукцію NO в МХ.

З використанням методів лазерної конфокальної мікроскопії, протокової цитометрії та Ca^{2+} -чутливого флуоресцентного зонду Fluo-4 AM продемонстровано значення електрохімічного градієнту протонів на ВММ у підтриманні концентрації Ca^{2+} в міоплазмі міоцитів та матриці МХ, що доводить суттєву роль цих субклітинних структур в регуляції Ca^{2+} -гомеостазу в гладеньком'язових клітинах матки. Чутлива до рутенієвого червоного акумуляція Ca^{2+} , що здійснюється енергізованими МХ, стимулюється оксидом азоту; цей ефект опосередкований активацією Ca^{2+} -уніпортера та не залежить від функціонування пори перехідної провідності (РТР). Виявлено, що вивільнення Ca^{2+} з МХ міометрія здійснюється за участі H^+ - Ca^{2+} -обмінника зі стехіометрією $1\text{H}^+ : 1\text{Ca}^{2+}$, який активується за фізіологічних значень рН та пригнічується моноклональними антитілами до протеїну LETM 1. Продемонстрована регуляція обмінника кальмодуліном. H^+ - Ca^{2+} -обмінник є резистентним до оксиду азоту.

Виявлено, що NO чинить протекторну дію на МХ шляхом помірною зниження (біля 17 %) електричного потенціалу на їхній внутрішній мембрані та запобігання процесам висококальцієвого набухання. Встановлено пригнічення роботи ЕТЛ за дії NO, яке відображається у гальмуванні окислення FADH_2 до флуоресціюючого FAD в суспензії ізольованих МХ.

Вперше показано, що обробка міоцитів матки нітросполуками запобігає зростанню концентрації Ca^{2+} в міоплазмі, спричиненого дією окситоцину або карбахолу. До можливих причин такого явища, як було продемонстровано в цій роботі, можна віднести інгібування Ca^{2+} -транспортувальної АТРази плазматичної мембрани (ПМ) з наступною активацією Ca^{2+} -залежної K^+ -проникності ПМ та cGMP-залежної стимуляції Na^+ , K^+ -АТРази, наслідком чого є гіперполяриза-

ція плазмалеми. Важливе значення може мати також посилення акумуляції Ca^{2+} у МХ за дії оксиду азоту.

З використанням методології гібридних мереж Петрі було проведено моделювання концентраційно-часових ефектів дії азиду натрію на окремі біохімічні та фізико-хімічні показники функціонування МХ.

На прикладі калікс[4]арена С-956 вперше продемонстровано, що він може проникати в цитоплазму та взаємодіяти з МХ. У МХ сполука С-956 ефективно інгібує H^+ - Ca^{2+} -обмінник, не впливаючи на енергозалежну акумуляцію Ca^{2+} , і стимулює NO-синтазну активність цих субклітинних структур. Досліджуваний калікс[4]арен викликає пригнічення окислення аденінових нуклеотидів: знижується активність комплексів дихального ланцюга, що має наслідком зменшення поляризації мітохондрійної мембрани.

Показано, що калікс[4]арени С-97, С-99 та С-107 викликають деполаризацію ПМ міоцитів матки. Взаємодіючи з МХ, сполуки С-97, С-99 та С-107 викликають гальмування Ca^{2+} -уніпортера внутрішньої мембрани і стимуляцію її H^+ - Ca^{2+} -обмінника (С-97, С-99), що призводить до відповідного зменшення концентрації Ca^{2+} в матриксі та пригнічення їхньої NO-синтазної активності. Поряд з цим спостерігається транзйентна гіперполяризація ВММ.

Продемонстрована відсутність впливу всіх досліджуваних калікс[4]аренів на утворення АФК в МХ. Отже процеси, які активуються/гальмуються за їхньої дії, не призводять до шкідливих для МХ наслідків, а саме – розвитку мітохондрійної дисфункції.

Практичне значення одержаних результатів

Одержані в дисертаційній роботі результати і сформована на їх основі концепція функціонування МХ гладенького м'язу як важливого джерела та мішені дії оксиду азоту є теоретичними основами подальших медико-біологічних досліджень з метою спрямованого скринінгу сполук, які б мали змогу селективно впливати на біосинтез NO в МХ. Перспективним є пошук таких речовин серед калікс[4]аренів, які здатні впливати на утворення NO за відносно низьких концентрацій і не володіють токсичністю.

Експериментально встановлений факт дії оксиду азоту в напрямку зниження концентрації Ca^{2+} в міоплазмі, а також виявлені мембранні та іонні механізми впливу NO на Ca^{2+} -гомеостаз в міоцитах, дозволяють здійснювати пошук донорів та попередників NO з метою створення токолітичних препаратів нового покоління.

Результати дослідження впливу калікс[4]аренів на транспорт Ca^{2+} , синтез оксиду азоту, функціональну активність ЕТЛ та електричний потенціал ВММ можуть слугувати основою скринінгу зазначених сполук з метою пошуку селективних, достатньо афінних та оборотних модифікаторів біоенергетики та Ca^{2+} -гомеостазу в цих субклітинних структурах.

Окремі експериментальні підходи, застосовані в роботі, розширюють арсенал сучасних біохімічних методів. Зокрема при вивченні закономірностей біосинтезу NO в міоцитах матки та парціального внеску в цей процес окремих клітинних компартментів комплексно застосована лазерна конфокальна мікроскопія і методологія солоколізації флуоресцентних зондів. Метод протокової цитометрії використовувався для дослідження біохімічних особливостей NO-синтазної активності в МХ із застосуванням специфічного зонду DAF-FM. Методи конфокальної мікроскопії, спектрофлуориметрії й протокової цитометрії сукупно було впроваджено для вивчення змін електричного потенціалу в субклітинних структурах, що суттєво верифікує одержані результати. Відпрацьовано методику оцінки функціональної активності ЕТЛ МХ за аутофлуоресценцією NADH/FAD. Було застосовано метод фотонної кореляційної спектроскопії для аналізу змін гідродинамічного діаметру (ГД) міоцитів. Запропоновано методику вивчення неінвазивного набухання МХ при високих (десятки мМ) концентраціях Ca^{2+} . Вперше в світі застосовані підходи імітаційного (симуляційного) моделювання, що ґрунтуються на методології функціональних гібридних мереж Петрі, для оцінки функціонування МХ.

Матеріали дисертаційної роботи можна використати при читанні відповідних курсів за напрямками «біохімія», «біофізика», «біофізична хімія», «фізіологія», «клітинна біологія», «молекулярна фізіологія» у вищих навчальних закладах.

Особистий внесок здобувача

Дисертаційна робота – завершене біохімічне дослідження, виконане авторкою відповідно до наукових планів відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.

Дисертанткою особисто сформульовано завдання досліджень, здійснено пошук, систематизація, аналіз та узагальнення наукової літератури за темою дисертації. Особисто був зроблений вибір об'єктів та методів дослідження, а також виконано експериментальну частину роботи, кінетичний та статистичний аналіз результатів досліджень. Симуляційне моделювання було зроблено у співпраці з к.т.н, с.н.с. Чуніхіним О.Ю. Аналіз власних експериментальних результатів, їхнє узагальнення, інтерпретацію, формування основних положень і висновків проведено разом із науковим консультантом – академіком НАН України Костеріним С.О.

Всі розділи роботи та її автореферат написані самостійно дисертанткою.

Апробація результатів дисертаційної роботи

Матеріали роботи були представлені на наукових семінарах Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (2007-2020); X Українському біохімічному з'їзді (Одеса, Україна, 2010); XI Українському біохімічному конгресі (Київ, Україна, 2014); XII Українському біохімічному конгресі (Тернопіль, Україна, 2019); 6й (Краків, Польща, 2007), 7й (Ялта, Україна, 2009), 11й (Київ, Україна, 2018) Парнасівській конференціях; International symposium “Biological motility: fundamental and applied science” (Пущіно, Росія, 2012); V, VI Международной научно-технической конференции “Актуальные вопросы теоретической и прикладной биофизики, физики и химии” (Севастополь, Україна, 2009, 2010); VII, VIII, IX Международной научно-технической конференции “Актуальные вопросы теоретической и прикладной биологической физики и химии” (Севастополь, Україна, 2011, 2012, 2013); International symposium “Supramolecular systems in chemistry and biology” (Київ, Україна, 2009); Науково-практичній конференції “Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения” (Новий світ, Крим, Україна, 2009, 2011,

2013); V Наукової конференції “Нанорозмірні системи: будова, властивості, технології ” НАНСИС-2016 (Київ, Україна, 2016); Third Kyiv Symposium “Smooth Muscle Physiology, Biophysics & Pharmacology: from genes and molecules to function, disorders and their novel treatment opportunities” (Київ-Луцьк, Україна, 2017); Четвертій міжнародній науковій конференції “Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології” (Дніпро, Україна, 2017); Тематичному VII з’їзді Українського біофізичного товариства (Київ, Україна 2018); П’ятій міжнародній науковій конференції “Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології” (Дніпро, Україна, 2020);

Публікації

За темою дисертації опубліковано 51 наукова робота, з яких 1 монографія, 26 статей у фахових вітчизняних та закордонних виданнях, 21 з яких включено до міжнародної наукометричної бази Scopus, а також 24 тези доповідей у матеріалах міжнародних та всеукраїнських наукових конференцій, конгресів і з’їздів.

Структура і обсяг дисертації

Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, результатів власних досліджень та їх обговорення, узагальнення отриманих результатів дослідження, висновків, списку використаних джерел літератури (492 посилань). Роботу викладено на 253 сторінках, проілюстровано 100 рисунками, 2 схемами, 5 таблицями.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. БІОХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ТА ЗАКОНОМІРНОСТІ БІОСИНТЕЗУ ОКСИДУ АЗОТУ

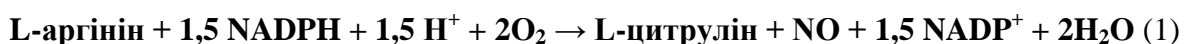
1.1.1. Метаболізм оксиду азоту

В останні десятиліття оксид азоту викликає все більший інтерес з огляду на його регуляторну роль у внутрішньоклітинних процесах та міжклітинних взаємодіях. З моменту його відкриття (початок 1980-тих років) Р. Фарчготом та Ж. Завадським “як ендотеліального фактору релаксації (EDRF)”, а також роботам Л. Ігнаро та Ф. Мурада (1986-1988 рр.), які ідентифікували EDRF саме як NO, оксид азоту став одною з найбільш досліджуваних молекул в області біомедичних наук. NO було названо “молекулою року” в 1992 р., а в 1998 р. Р. Фарчгот, Л. Ігнаро та Ф. Мурад отримали Нобелівську премію в галузі фізіології та медицини [133, 304]. З того часу коло функцій, які виконує оксид азоту, значно розширилось. Як внутрішньоклітинний та міжклітинний месенджер NO бере участь у регуляції метаболічних реакцій, що сприяє нормалізації функціонування організму. Серед широкого спектра його властивостей можна відзначити наступні: регулює тонус і проникність кровоносних судин, знижує агрегацію тромбоцитів і їхню адгезію до судинної стінки, нейропередача, імуномодуляція та антимікробний захист, секреція гормонів тощо [133, 232, 280, 361, 365, 442].

Оксид азоту - структурно проста низькомолекулярна амфіфільна вільнорадикальна молекула. NO в біосистемах має відносно короткий час існування (до 5 с залежно від мікрооточення) та може мігрувати на невеликі відстані від місць генерації, що визначається швидкістю його окиснення [86, 290, 442, 433, 486]. Це обмеження дифузії передбачає локальну дію NO в окремих клітинних компартментах завдяки солокалізації протеїнів-мішеней з джерелами NO в мультипротеїновий комплекс сигналом [290, 442].

Відповідно до концепції циклу оксиду азоту у клітинах тварин наявні два шляхи утворення оксиду азоту – NO-синтазний (ензиматичний) та нітрит/нітратредуктазний [65, 133].

Синтез NO в клітині за нормоксії забезпечує родина ізоформ NO-синтази (NOS, E.C. 1.14.13.39), які за участю NADPH як джерела електронів та наявності O₂ здійснюють п'ятиелектронне двостадійне окиснення гуанідинової групи L-аргініну з утворенням NO та L-цитруліна [86, 133, 217, 442]. Сумарне рівняння реакції, що каталізує NOS, має наступний вигляд:



За певних умов NO-синтаза виявляє оксидазну активність, продуктом реакції якої є супероксиданіон (O₂^{•-}). В подальшому утворюються редокс-форми оксиду азоту із різними ступенями окиснення атому азоту, а також пероксид водню (H₂O₂). Перетворення NO у водних аерованих розчинах за фізіологічних умов призводить до появи нітрит-аніону (NO₂⁻) та нітрат-аніону (NO₃⁻) [65, 133].

Існує 3 ізоформи NOS, які відрізняються за структурою та функціями. Ендотеліальна NOS (eNOS/NOS III, маса субодиниці 134 кДа) та нейрональна NOS (nNOS/NOS I, маса канонічної субодиниці 160 кДа) є конститутивно експресованими Ca²⁺-залежними ензимами; існують відомості, що eNOS може активуватися і за низьких концентрацій Ca²⁺ в середовищі. Індуцибельна NOS (iNOS/NOS II, маса субодиниці 130 кДа) експресується в більшості клітин лише після індукції прозапальними цитокінами, бактеріальними ліпополісахаридами, γ-опроміненням, а її активність не залежить від внутрішньоклітинного Ca²⁺ (активується за нефізіологічно низької концентрації катіону біля 40 нМ), оскільки кальмодулін (CaM) міцно зв'язаний у відповідному сайті завдяки специфічній амінокислотній послідовності останнього [91, 224]. Хоча всі три основні різновиди NOS характеризуються високою гомологією, в окремих випадках кожна ізоформа демонструє дещо відмінні структурні особливості, які відповідають її специфічній функції *in vivo* (Рис. 1.1.1) [91, 173, 224].

nNOS експресується в центральних та периферичних нейронах, а також в епітеліальних клітинах легень, скелетному м'язі, тканинах матки, шлунку, нирок, підшлункової залози [224, 338]. Ензим є висококонсервативним, 93 % амінокислотного складу у тканинах людини і щурів ідентичні [223].

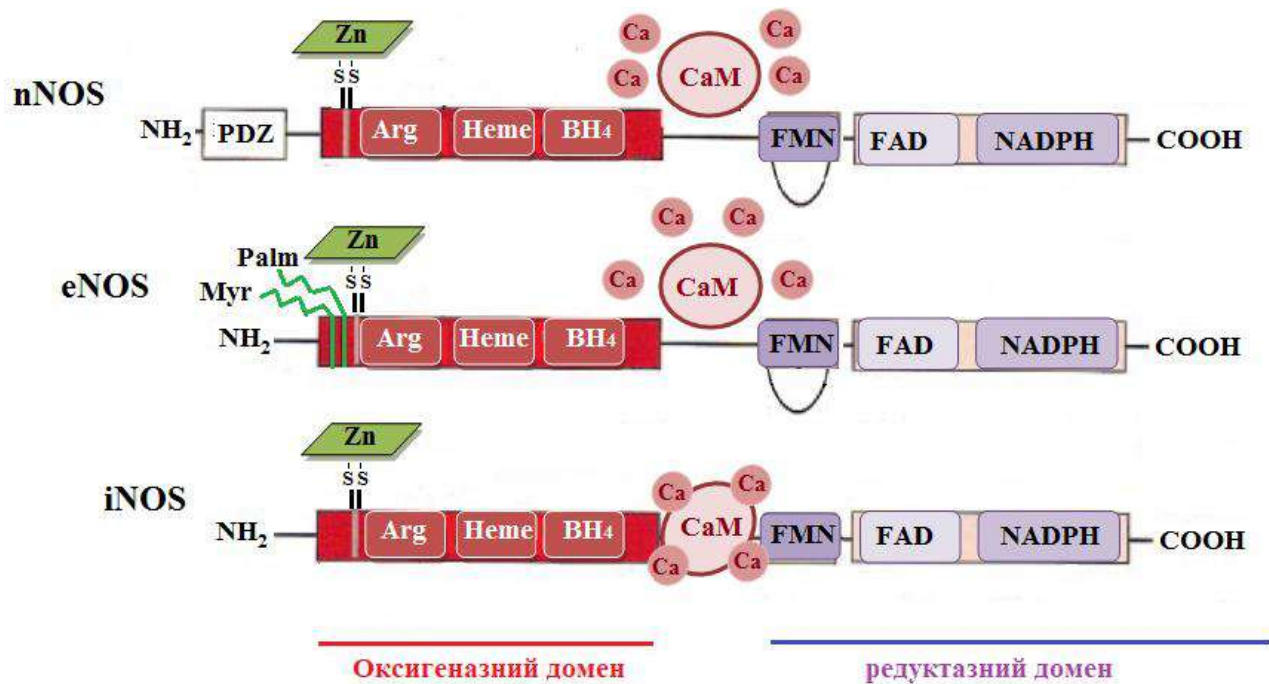


Рис. 1.1.1. Структура доменів nNOS, eNOS та iNOS. Також показано аутоінгібувальну петлю у FMN-ділянці nNOS та eNOS. Сайти зв'язування: Arg – L-аргінін, Heme – гем, BH₄ – тетрагідробіоптерин, FMN – флавінаденінмононуклеотид, FAD – флавінаденіндинуклеотид, NADPH – нікотинаміддинуклеотид-фосфат, Myr – міристинова кислота, Palm – пальмітинова кислота

Існує декілька сплайс-варіантів nNOS: nNOS α , nNOS β , nNOS γ , nNOS μ , nNOS-2 [86, 431]. Найрозповсюдженіші в тканинах nNOS α та nNOS μ на N-кінці містять PDZ-домен (акронім від *post drozofila zonula*, послідовність з 220 амінокислотних залишків, унікальне саме для цієї ізоформи), який може прямо взаємодіяти з PDZ-мотивами інших протеїнів, що визначає субклітинну локалізацію та активність ензима [126, 276, 408]. В м'язах експресується сплайс-варіант nNOS μ . Ця форма ензима включає унікальну (34 амінокислоти) вставку між CaM- та FMN-зв'язувальними сайтами [86, 172, 408, 431, 442]. Ca²⁺-транспортувальна АТРаза ПМ (ізоформа 4b, яка міститься в ГМК) в С-кінцевій ділянці зв'язується з PDZ-доменом nNOS μ і виступає негативним регулятором синтезу NO [204]. Показана також взаємодія nNOS з цитозольною частиною адренергічних та глутаматергічних (NMDA-R) рецепторів [86, 276, 442], α -синтрофін-дистроглікановим комплексом сарколеми скелетного м'язу, фосфофруктокіназою тощо [126, 276, 442]. В кардіоміоцитах nNOS може зв'язуватись

з ріанодиноним рецептором та ксантинооксидазою на поверхні саркоплазматичного ретикулума (СР) [442].

В N-кінцевій ділянці nNOS виявлено сайт зв'язування для 89-амінокислотного протеїна PIN (протеїновий інгібітор NOS), який ідентифікований як легкий ланцюг міозина та динеїну, що може вказувати на його альтернативну роль аксонального транспортного протеїну для nNOS. PIN інгібує NOS, спричинюючи її мономеризацію. Він також пригнічує NADPH-оксидазну активність всіх трьох ізоформ [86, 276].

До найголовніших функцій nNOS належить модуляція пластичності синапсів в центральній нервовій системі, центральна регуляція кров'яного тиску, тонуусу гладеньких м'язів внутрішніх органів, зокрема шляхом генерації NO в нітратергічних нервових закінченнях, контроль за кровопостачанням волокон скелетного м'язу [223-224, 276, 431].

eNOS вперше ідентифікована в ендотеліоцитах, контролює кров'яний тиск та має вазопротекторні, гемостатичні та антиатеросклеротичні ефекти. Ця ізоформа знайдена в тканинах легень та трахеї, кардіоміоцитах, тромбоцитах, нейронах мозку, синцитіо-трофобластах та епітеліальних клітинах нирки [91, 225, 338]. Ендотеліальна ізоформа, мембранозв'язана, локалізована в кавеолах, але знайдена також в апараті Гольджі та зовнішній мітохондрійній мембрані (ЗММ) [208, 232, 288]. Кавеоларна асоціація eNOS забезпечується специфічними ковалентними модифікаціями: приєднання котрансляційно і незворотно міристинової кислоти до N-кінцевого залишку гліцину, далі eNOS спрямовується в апарат Гольджі, де відбувається пальмітилювання N-кінцевого цистеїнового залишку (рис. 1.1.1). Ацилювання забезпечує асоціацію із кавеолами ПМ [91, 225, 338]. Взаємодія з протеїном кавеоліном, структурно-організуючим компонентом кавеол, інгібує активність eNOS, стерично блокуючи взаємодію з CaM. Активація відбувається внаслідок утворення комплексу Ca²⁺-CaM, взаємодії з Hsp 90, попередньо фосфорильованим за тирозином, фосфорильовання залишку Ser-1177 та дефосфорильовання Thr-495 [86, 224-225, 232, 276, 338]. З роками розширюється і уточнюється список залишків серину/треоніну/тирозинову різних доменів, а також протеїнкіназ/протеїнофосфатаз, які чинять регуляторний вплив

на eNOS (рис. 1.1.2) [232, 276]. Зокрема, активаторне фосфорилування забезпечується родинми кіназ залежно від характеру регуляторного впливу: Akt/PK B, PK A, PK G, AMPK, Ca²⁺-CaMK II тощо [86, 224, 232, 322, 486]. Цей процес запускається інсуліном, фактором росту судинного ендотелію (VEGF), ацетилхоліном, брадікініном, естрогенами, надмірним тиском на ендотелій за гіпертензії тощо [133, 208, 224-225, 232, 276, 290, 442]. Агоністами eNOS виступають нейротрансмітери - АТР, ацетилхолін та гістамін, ростові фактори (VEGF), гормони (інсулін, 17β-естрадіол [486]), регуляторні ліпіди, кініни [208, 224, 232, 290, 442, 486]. У разі тканинного ураження в позаклітинному просторі з'являється тромбоспондин 1 (TSP1, модулятор eNOS), який зв'язується з рецептором плазмалеми CD47, що спричиняє гальмування передачі сигналу від рецепторів ацетилхоліну, VEGF, інгібування eNOS та розчинної гуанілатциклази (pГЦ) [232, 325].

Солокалізація eNOS, катіонного транспортера L-аргініну (CAT1) та кавеоліну-1 в ендотеліоцитах сприяє доступу субстрату до eNOS та оптимізує біосинтез NO [224, 276, 442].

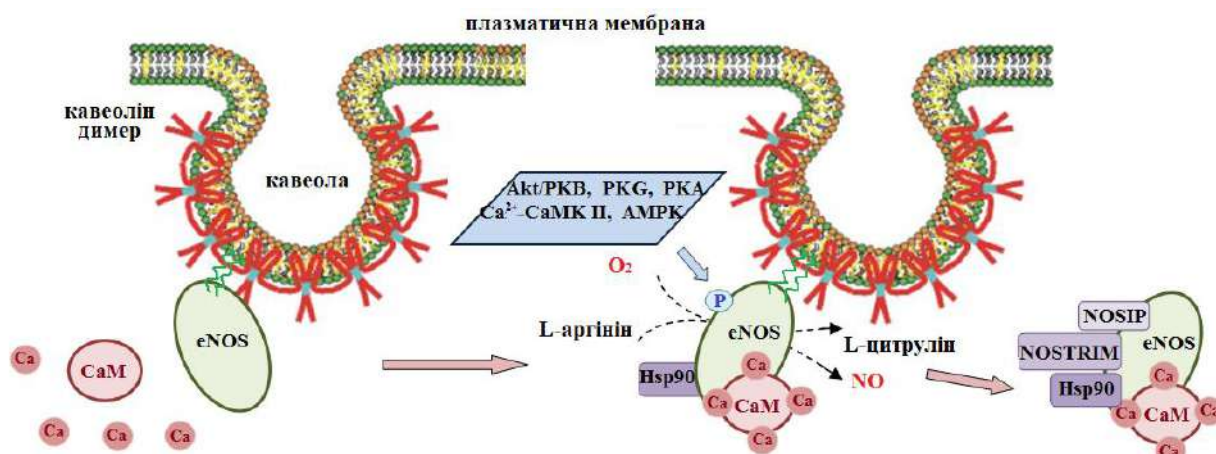


Рис. 1.1.2. Регуляція активності eNOS в кавеолі. Міристилювання та пальмітилювання (показані двома зеленими кривими) прикріплюють eNOS до плазматичної мембрани. Взаємодія з кавеоліном інгібує активність eNOS. Hsp90 (heat shock protein 90) та комплекс Ca²⁺-CaM активують її. Akt/PK B, PK G, PK A та інші кінази, через фосфорилування, також активують eNOS. Взаємодія eNOS з протеїнами NOSIP (NOS interacting protein) та NOSTRIN (NOS traffic inducer) призводить до транслокації її від кавеола до внутрішньоклітинних мішеней, в результаті чого активність eNOS зменшується [276, 325]

iNOS вперше виявлена в макрофагах, ідентифікована також в лімфоцитах, нейтрофілах, еозинофілах, є розчинним цитозольним протеїном та генерує NO в великих кількостях (концентрації мкмоль/л), що чинить цитотоксичну дію на мікроорганізми та пухлинні клітини [224, 338]. Завдяки високому афінітету NO до протеїн-зв'язаного заліза, він ефективно взаємодіє із залізо-сірчаними кластерами комплексів ЕТЛ МХ, цис-аконітазою та рибонуклеотид-редуктазою, інгібуючи ці ключові ензими біоенергетики та проліферації в клітинах-мішенях [223, 276]. Продукований макрофагами в надвисоких концентраціях оксид азоту спричиняє також одноланцюгові розриви та фрагментацію ДНК [223-224, 293]. Експресія *iNOS* ініціюється такими прозапальними цитокінами як TNF- α , INF- γ , IL-1 β , бактеріальними ліпополісахаридами та короткохвильовим опроміненням. Контролюється цей процес сигнальними шляхами, пов'язаними з NF- κ B та JAK/STATs [224, 232, 290, 322, 338, 410, 444, 446].

Експресія конститутивних ізоформ NOS чітко регулюється залежно від фізіологічної ситуації. Для них характерна базальна продукція NO, а час активації цих ензимів вимірюється секундами, в той час як для експресії й послідувальної активації *iNOS* потрібні години [133, 224].

Інші шляхи генерації оксиду азоту. Утворення окислів азоту з аміаку показано в нервовій, печінковій тканинах та лімфоцитах. В них демонструється окислення NH_4^+ за участі активних форм кисню з утворенням нітритів/нітратів, проміжним продуктом при цьому може бути гідроксиламін. Радикали для цих процесів можуть генеруватись в ферментній системі ксантин/ксантинооксидази. В печінковій і інших тканинах АФК здатні утворюватись за рахунок мікросомального окислення. В мутантних клітинах із відсутністю систем генерації радикалів окислення NH_4^+ до $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ не відбувається [207, 330].

Нітрит-аніон (NO_2^-) та нітрат-аніон (NO_3^-) розглядаються як стабільні метаболіти NO [133, 242, 439, 486]. Основне ендогенне джерело нітритів та нітратів у ссавців – це ензиматичний шлях L-аргінін-NO, який є стабільно активним в багатьох типах клітин. NO швидко окиснюється в крові та тканинах з утворенням NO_2^- та NO_3^- . Рівень нітрату в плазмі знаходиться в межах 20-40 мкМ, в той час як рівень нітриту значно нижчий (50-300 нМ). При певних станах запа-

лення (сепсис, важкий гастроентерит) рівень NO_2^- та NO_3^- значно зростає завдяки масованій індукції iNOS [133, 299, 407].

Оксид азоту, що синтезується eNOS, окислюється до нітрита в присутності металоензима церулоплазмiна, а до нітрату – в присутності оксигемоглобіна. В багатьох тканинах показана можливість перетворення NO_2^- в NO. Цей процес запускається в умовах ацидоза (неензиматичний шлях) та за наявності відновлених форм гем-вмісних протеїнів, що характерно для ішемічних станів [191, 345]. Важливу роль у відновленні NO_2^- в крові грає гемоглобін (Hb) в дезоксіформі, оскільки зв'язаний кисень перешкоджає взаємодії з NO_2^- і перетворенню останнього в NO. В серцевому і скелетному м'язах нітритредуктазну активність має дезоксиміоглобін [67, 299, 401, 486]. Відновлення NO_2^- може відбуватися також в МХ і мікросомах. В МХ нітритредуктазну активність виявляє цитохромоксидаза, а в мікросомах — цитохром P-450 [439, 486]. Тобто перелічені гем-вмісні протеїни мають здатність за відсутності кисню (гіпоксія) відновлювати NO_2^- до NO. Слід додати, що редуктазною активністю за цих умов володіють також NOS та ксантиоксидаза [242, 299, 402, 439]. Існування такого механізму синтезу оксиду азоту дозволило сформулювати концепцію "циклу оксиду азоту" (рис. 1.1.3) [65]. При цьому NO-синтазна компонента та неензиматичне окислення NH_4^+ забезпечують ендогенний синтез NO, NO_2^- та NO_3^- за присутності кисню. В умовах гіпоксії, спричиненої функціональним навантаженням або порушенням кровопостачання тканини (її ішемізація), парціальний тиск O_2 падає і зазначені механізми пригнічуються. Водночас дефіцит кисню активує редуктазну компоненту циклу [133, 299, 407].

Зважаючи на метаболічну спорідненість NO та NO_2^- завдяки існуванню циклу оксиду азоту, вивчення функціональної активності нітрит-аніонів в організмі є фундаментальною дослідницькою проблемою. Доведено, що ендогенний нітрит регулює численні фізіологічні і патологічні процеси [407, 439]. Він є відносно стабільним депо біоактивного NO. При гіпоксичних станах, коли зменшується функція NOS, відновлення нітриту може сприяти збереженню пулу NO для підтримання сигналіngu протягом гіпоксичного стану і спричиненому ним метаболічному стресу [402]. За умов зниження локального рівня кисню в тка-

нинах відбувається відновлення нітрит-аніонів до оксиду азоту, внаслідок чого модулюється передача клітинного сигналу, змінюється просвіт судин та ефективність мітохондрійного дихання, що в свою чергу не допускає розвитку ішемічних станів [299].

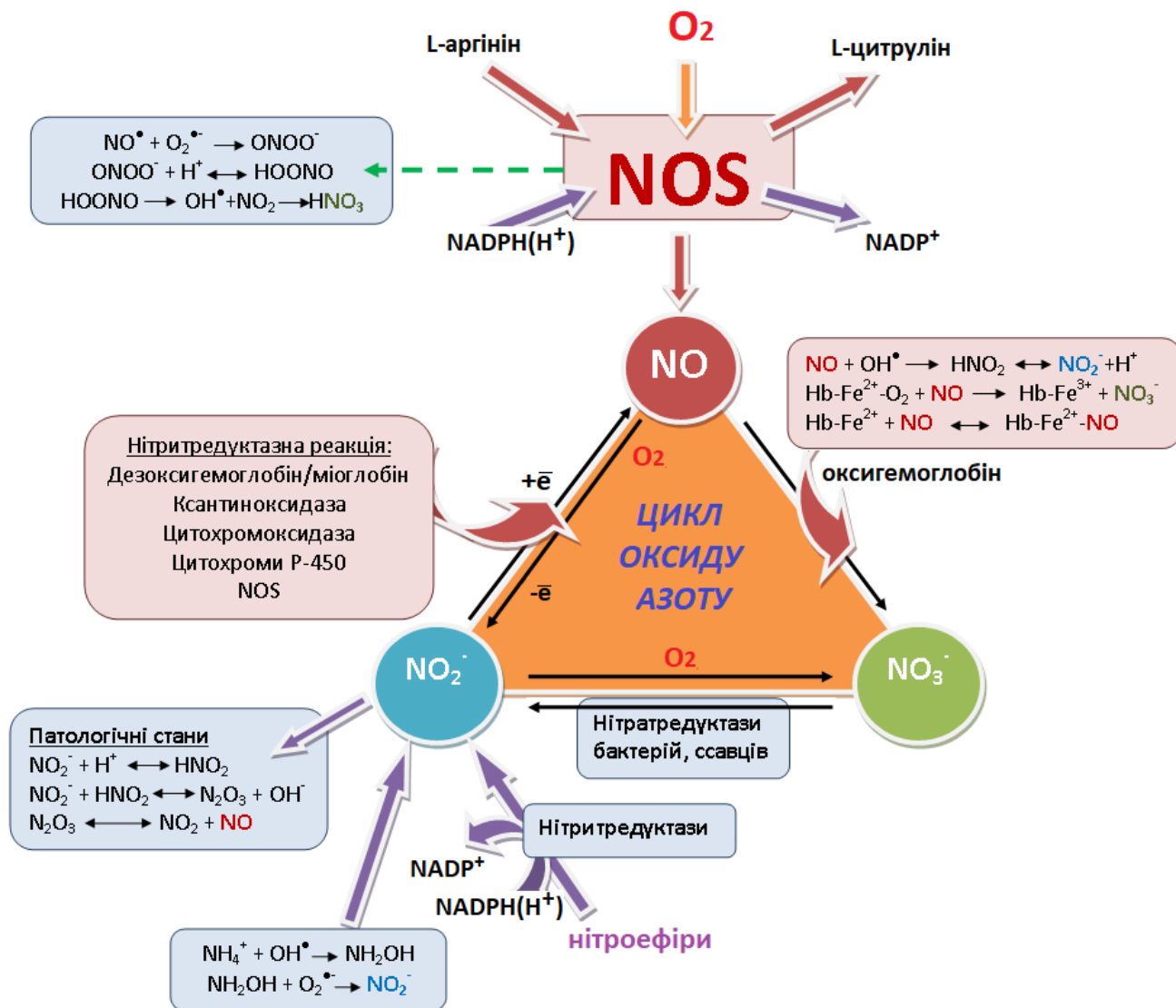


Рис. 1.1.3. Цикл оксиду азоту

1.1.2. Структура, каталітична активність та локалізація NOS

Структура та каталітична активність NOS. Умовою ефективного функціонування NOS є доступність субстрату L-аргініну, Ca^{2+} та кофакторів. Ензим NOS активний у формі димера, побудованого з двох ідентичних субодниць, які структурно та функціонально поділяються на два основних домени: С-термінальний редуказний та N-термінальний оксигеназний. Редуказний до-

мен має високу гомологію із цитохром Р450-редуктазою і містить сайти зв'язування NADPH, FAD та FMN (по одній молекулі); оксигеназний домен взаємодіє з простетичною гемовою групою, кофактором 6(^)-5,6,7,8-тетрагідробіоптеріном (BH₄) та субстратом L-аргініном. Між цими двома структурами знаходиться CaM-зв'язувальний домен (Рис. 1.1.1 та 1.1.4) [86, 91, 172-173, 276].

Біосинтез NO складається з двох послідовних монооксигеназних реакцій окиснення L-аргініну, витрачається 1,5 моля NADPH та 2 моля O₂ для утворення 1 моль L-цитруліну. Цей процес включає початкове гідроксилювання L-аргініну з утворенням N^G-гідрокси-L-аргініну, який також виступає субстратом NOS, наступне його окиснення супроводжується утворенням L-цитруліну та NO [86, 133, 173, 217, 224].

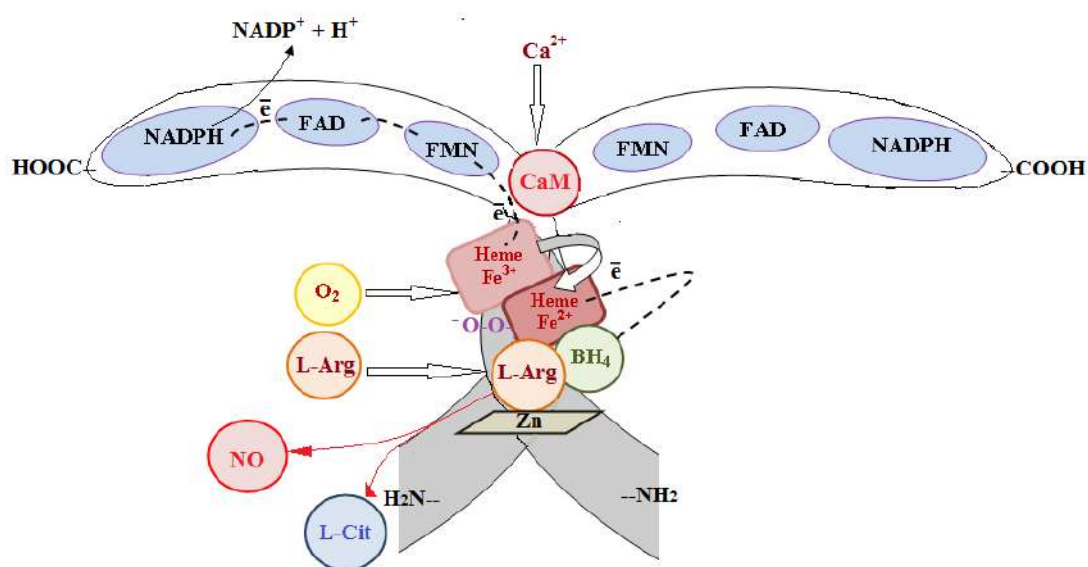


Рис. 1.1.4. Функціонально активний гомодимер NOS. Схематично зображено взаємне розташування коферментів, відмічені сайти зв'язування O₂ та L-аргініну. Можна побачити напрямок транспорту електронів (двох електронів) від NADPH, пунктирна лінія, та процес активації O₂. Умовні позначення: L-Arg - L-аргінін, L-Cit - L-цитрулін, Heme – гем

Перенос електронів здійснюється від редуктазного домена однієї субодиниці на оксигеназний домен іншої (рис. 1.1.4). Мономери всіх ізоформ не здатні зв'язувати BH₄ та L-аргінін і не каталізують утворення L-цитруліну/NO. Ізольований редуктазний домен спроможний переносити електрони від NADPH через

флавінові кільця на штучні субстрати цитохром *c* та фериціанід. Ця здатність зберігається і в мономері nNOS, вказуючи на те, що транспорт електронів не залежить від димерної структури. Водночас димеризований оксигеназний домен окислює N^G -гідрокси-L-аргінін. Таким чином, два домени виконують каталітично різні функції [86, 133, 173]. Одна з головних каталітичних відмінностей між ізоформами NOS – швидкість окислення NADPH. За нестачі субстрату nNOS продовжує переносити електрони на гем, який має значно більший відновний потенціал, і окислювати NADPH з високою швидкістю, в той час як eNOS та iNOS роблять це значно повільніше [91].

Принциповою відмінністю конститутивних ізоформ від індукцибельної є залежність ензиматичної активності від Ca^{2+} , що обумовлено комплексоутворенням Ca^{2+} з CaM (Ca^{2+} -CaM). Зв'язування CaM контролює транспорт електронів від редуказного на оксигеназний домен, а також в редуказному домені [86, 91]. nNOS та eNOS не активні за концентрації Ca^{2+} близько 100 нМ; стимулюються за підвищення рівня внутрішньоклітинного Ca^{2+} в межах 100-400 нМ [223-224, 242]. Зазначена особливість конститутивних ізоформ може бути також пов'язана із наявністю аутоінгібувальної послідовності (40-50 амінокислот у FMN- зв'язувальній ділянці (рис. 1.1.1)), яка блокує взаємодію з CaM за низьких концентрацій Ca^{2+} та інгібує перенос електронів від FMN на гем за відсутності Ca^{2+} -CaM [86, 172, 217, 276].

Ключовим етапом процесу димеризації всіх трьох ізоформ NOS є зв'язування гему через проксимальний цистеїн-тіолатний ліганд [86, 91, 160, 173]. Стабілізацію димера забезпечує Zn-цистеїновий кластер ($Zn-Cys_4$) (рис. 1.1.1. та 1.1.4), а його звільнення перетворює активний ензим в мономер з втраченою каталітичною активністю [160, 224, 425]. Залишки цистеїну є важливими для функціонування NOS. Зворотне S-нітросилування продуктом реакції супроводжується зниженням ензиматичної активності. Два висококонсервативних залишки цистеїну редуказного домена можуть бути також об'єктом S-глютаміонування, що за умов оксидативного стресу зворотно знижує активність ензима і збільшує генерацію $O_2^{\cdot-}$ в редуказному домені [224, 325, 431, 442].

Асоціація NOS в активний димер включає взаємодію з BH_4 , що допомагає утворенню своєрідної “кішені”, яка містить сайти зв’язування для гему та L-аргініну [91, 160, 168, 173]. BH_4 транспортує електрони в оксигеназному домені, забезпечуючи оптимальний для окиснення L-аргініну редокс-стан заліза гемової простетичної групи. Коли доступність BH_4 стає обмеженою, перенос електрона від флавінів стає не спряженим з окисненням L-аргініну, комплекс $-\text{Fe}^{2+}-\text{O}-\text{O}^-$ гема дисоціює, і в оксигеназному домені продукується $\text{O}_2^{\cdot-}$. BH_4 може виступати також пасткою для $\text{O}_2^{\cdot-}$ [86, 168, 225, 232, 396]. Інтенсивність утворення NO тісно корелює з внутрішньоклітинною концентрацією BH_4 , тому що лише за високого вмісту BH_4 (вище 10^{-6} М) NOS функціонує винятково як NO-синтаза, від 10^{-9} до 10^{-6} М утворюється пероксинітрит (ONOO^-), а за концентрацій менших 10^{-9} М продукується $\text{O}_2^{\cdot-}$ або H_2O_2 [91, 225, 396]. Внутрішньоклітинний рівень BH_4 регулюється активністю його біосинтезу *de novo* і контролюється GTP-циклогідролазою [161, 168, 224, 391, 396].

Субстрат NOS, *L-аргінін* – катіонна амінокислота, яка включена в ряд фізіологічних процесів і є необхідним попередником синтезу L-орнітину, L-проліну, поліамінів, агматину, креатину, протеїнів [209]. L-аргінін метаболізується декількома ензимами: аргінін/гліцин амінотрансферазою, аргініндекарбоксилазою, NOS, аргіназою I та II. L-аргінін, синтезується в циклі сечовини, а також надходить в клітини з плазми крові [72, 213, 321, 442]. Концентрація L-аргініну в плазмі ссавців та людини 100-200 мкМ, навіть за патологічних станів вона не знижується нижче 60 мкМ [224], а в цитозолі в нормі його концентрація знаходиться в межах 0,1-1 мМ [213, 471]. В плазмалемі ідентифіковані транспортери для катіонних амінокислот CAT1, CAT2a (ГМК судин) та CAT2b (кардіоміоцити), які переносять L-аргінін в цитозоль [162, 256, 369, 409, 442]. Значення K_m за L-аргініном для транспортерів сягає 100-150 мкМ, що відповідає його концентрації в плазмі [162, 321, 471]. З іншого боку, значення константи Міхаеліса K_m за L-аргініном eNOS складає біля 3 мкМ [224]. Отже, доступність субстрату ніколи не є лімітуючою для функціонування NOS за нормальних умов. Втім, надлишок позаклітинного L-аргініну активує NOS або стимулює синтез NO. Це явище отримало назву “аргініновий парадокс” [93, 213, 223, 321,

471, 486]. Причину зазначеному феномену вбачають у факті конкуренції за субстрат аргінази, а також суттєвому зростанні вмісту ендогенних інгібіторів NOS (передусім асиметричного диметиларгініну) [191, 209, 213, 224, 442, 471].

Аргіназа гідролізує L-аргінін до орнітину та сечовини. В клітинах ссавців ідентифіковано два типи аргіназ: аргіназа I локалізована в цитоплазмі, аргіназа II є мітохондрійним ензимом [72, 369, 442]. Проміжний продукт синтезу NO N^G -гідрокси-L-аргінін є конкурентним оборотним інгібітором аргінази [72, 93, 117, 209, 213]. Спорідненість аргінази до L-аргініну на три порядки нижча ($K_M = 1-5$ мМ), ніж для NOS ($K_M = 2-20$ мкМ), але максимальна початкова швидкість реакції (V_{max}) в 1000 разів вища для аргінази, ніж для NOS [93, 209, 213, 471]. Ендотеліальні клітини експресують аргіназу, яка може конкурувати з eNOS за L-аргінін, і у разі її високої активності змусити eNOS до субстратного “голодування” [117, 321, 471]. Показано підвищення експресії аргінази з наступним послабленням синтезу NO при кардіоваскулярних хворобах, водночас фармакологічне інгібування аргінази поліпшує продукцію NO. Крім того, аргіназа може гальмувати генерацію NO iNOS шляхом утворення сечовини [209, 213].

Іншою причиною «аргінінового парадоксу» може бути зростання вмісту ендогенного інгібітора NOS асиметричного диметиларгініна - продукту ензиматичної деградації протеїнів, що містять метильовані залишки аргініну. Його концентрація в плазмі зростає при ендотеліальних дисфункціях та серцево-судинних захворюваннях [72, 224, 290, 409, 442, 486] і може бути наслідком підвищеного вмісту ангіотензину II у таких пацієнтів [356].

Компартменталізація в клітині різних ізоформ NO-синтаз та біохімічні особливості дії оксиду азоту в різних компартментах яскраво ілюструються у випадку кардіоміоцитів [130]. Молекулярною основою для протилежно спрямованої дії NO є селективна взаємодія eNOS та nNOS з кавеолами та CP. В кардіоміоцитах eNOS локалізована в кавеолах сарколеми та T-трубочках, де асоційована зі специфічним для міоцитів структурним протеїном кавеоліном-3 [86, 191, 232]. Солокалізація eNOS з β -адренергічними рецепторами та Ca^{2+} -каналами призводить до Ca^{2+} -залежної eNOS-генерованої продукції NO, який залишається в межах відстані дифузії від його молекулярних мішеней. Пригні-

чуючи, ймовірно шляхом прямого нітрозилування, активність Ca^{2+} -каналів L-типу в кавеолах [276], оксид азоту обмежує надходження Ca^{2+} до міоплазми, захищаючи кардіоміоцити від кальцієвого перенавантаження. Таке розташування eNOS дозволяє NO інгібувати β -адренергічну стимуляцію та інотропні ефекти катехоламінів. nNOS імунопреципітується з ріанодиновими рецепторами (RyR) – Ca^{2+} -каналами CP [191, 232, 276, 386, 442]. Генерований цією ізоформою NO активує, можливо теж шляхом безпосереднього нітрозилування, канали вивільнення Ca^{2+} з ретикулуму, що стимулює взаємодію актину та міозину і регулює циклічну скорочувальну діяльність міокарда (CP узгоджено акумулює і вивільнює Ca^{2+} в безпосередній близькості від міофіламентів). Локалізована в міоплазмі iNOS експресується в міокарді транзійтно протягом імунної відповіді на стрес або за патофізіологічних умов, як от ішемія-реперфузія, сепсис, серцева недостатність. Продукований цією ізоформою NO також стимулює вивільнення Ca^{2+} з CP через ріанодин-чутливі канали [191, 232, 442, 482].

Макрофаги мають як індукцибельну, так і конститутивну NOS [453]. Ендотеліальні клітини, маючи конститутивну eNOS, активно експресують iNOS за дії прозапальних цитокінів [232, 486].

Крім специфічної просторової локалізації в клітинах різних ізоформ NOS з визначеними функціями описаний *феномен спрямованого і регульованого транспорту NO* в судинній стінці – так звані “міоендотеліальні щілинні контакти (myoendothelial gap junction)”. Синтезований в ендотелії оксид азоту дифундує до гладеньком’язового синцитію, активуючи розчинну гуанілатциклазу (pГЦ) в міоцитах та S-нітрозилуюючи протеїни-мішені. Виявилось, що цей процес паракринної регуляції є контрольованим, а між двома тканинами розташовується міоендотеліальний сполучний «коридор». Він полегшує взаємодію між ендотелієм і гладеньким м’язом в дрібних судинах [130, 232, 325, 442]. В «коридорі» солокалізовані eNOS, pГЦ та інші протеїни, що лімітує дифузію NO і знижує інтенсивність дії АФК як його скавенжерів. Міоендотеліальне сполучення містить значну кількість гемоглобіну, який високоафінно взаємодіє з оксидом азоту. Оксигемоглобін в реакції з NO утворює метгемоглобін та нітрат-аніон. Метгемоглобін відновлюється цитохромом b₅-редуктазою. Цей механізм

здатний обмежувати біодоступність NO в судинній стінці [232, 325, 442]. Важливою структурою, локалізованою в міоендотеліальному сполученні, є хеміканали конексинової природи: Cx37, Cx40 та Cx43 [325]. За дії катехоламінів на клітини гладенького м'язу судин в них зростає концентрація інозитол-1,4,5-трисфосфата (IP₃), який за градієнтом концентрації дифундує через ці канали до ендотеліоциту. S-нітрозилювання оксидом азоту активує зазначені канали. IP₃ спричиняє зростання концентрації Ca²⁺ в ендотеліальних клітинах, викликаючи активацію Ca²⁺-залежної S-нітрозоглутатіонредуктази, наслідком чого є денітрозилювання та закриття конексинових хеміканалів. Поряд з цим зазначені механізми забезпечують Ca²⁺-залежний синтез NO в ендотелії у відповідь на стимуляцію α1-адренорецепторів в ГМК [325].

1.1.3. Біохімічні механізми, які лежать в основі функціональної активності NO

Оксид азоту є майже універсальною месенджерною і регуляторною молекулою. В залежності від концентрації NO виявляє анти- або прооксидантну дію. За низьких концентрацій оксид азоту напряду взаємодіє з біологічними мішенями, що може привести до антиоксидантних ефектів [325]. Навпаки, високі концентрації NO, опосередковано через утворення активних форм азоту (АФА) при реакції NO з молекулярним киснем або АФК, виявляють прооксидантні ефекти. Дослідження показують, що порогова концентрація NO, яка визначає його прямий або опосередкований вплив знаходиться біля 1 мкМ [219, 325]. Локальні концентрації NO регулюються просторово та компартменталізацією джерел його утворення.

Основними механізмами, за якими NO здійснює сигнальні та регуляторні функції, вважаються [238, 242, 295, 322]:

(1) - *активація розчинної гуанілатциклази (рГц) шляхом зв'язування з її гемовою групою (при цьому формується Fe²⁺-нітрозильний комплекс), що веде до утворення cGMP, який, в свою чергу, стимулює РК G; необхідна концентра-*

ція NO для активації рГЦ знаходиться в межах 80-250 нМ [208, 225, 290, 442]. Термінація сигналу в ключовому для реалізації функціональної активності оксиду азоту напрямку NO/рГЦ/cGMP/РК G забезпечується родиною фосфодіестераз (PDE 5, 6, 9) [133, 232].

(2) - *S*-нітрозилювання: активні форми азоту – NO⁺, NO⁻, N₂O₃, NO₂ – оборотно нітрозилюють тільні групи цистеїнів протеїнів-мішеней; існує точка зору, що в серцево-судинній системі більшість ефектів NO опосередковується саме через *S*-нітрозилювання і є cGMP-незалежними [133, 144, 191, 208, 289-290, 442, 486];

(3) *нітрування пероксинітридом (ONOO⁻)*, який утворюється внаслідок дифузійно-контрольованої реакції між NO та O₂⁻, залишків тирозину і триптофану у протеїнах, що веде до залучення у процес передачі сигналу мітоген-активованих протеїнових (MAP) кіназ, ізоформ РК С, транскрипційного фактора NF-κB тощо [100, 133, 191, 289-290, 442, 444].

Оксид азоту впливає на перебіг численних клітинних процесів. Залежно від концентрації він регулює транскрипцію генів та трансляцію мРНК (зокрема, змінюючи активність факторів транскрипції), зумовлює та модулює посттрансляційні модифікації протеїнів (на кшталт нітрозилювання, ADP-рибозилування), має цитостатичні та цитотоксичні властивості [219, 325]. Шляхом *S*-нітрозилювання функціонально-важливих цистеїнових залишків транспортних протеїнів він забезпечує зниження концентрації Ca²⁺ в цитоплазмі в гладеньком'язових тканинах внутрішніх органів та судин, модулюючи активність потенціал-залежних Ca²⁺-каналів, Ca²⁺-залежних K⁺-каналів ПМ, Ca²⁺,Mg²⁺-АТРаз плазмалемі та ЕР/СР [325, 442, 486]. На органному рівні NO виступає ключовим гравцем в багатьох фізіологічних процесах: регулює тонус і проникність кровоносних судин, знижує агрегацію та адгезію до судинної стінки формених елементів крові, бере участь у функціонуванні нервової, ендокринної та імунної систем [133, 226, 232, 238, 290, 293, 338, 442].

На сьогодні з'ясовано, що NO модулює енергетичні, метаболічні і транспортні процеси в МХ. Внутрішня мембрана мітохондрій (ВММ) є ефективною мішенню дії нітросполук, оскільки у складі локалізованих в ній ензимів висо-

ким є вміст тіольних залишків, залізо-сірчаних центрів, гемових груп, а сама мембрана є місцем утворення $O_2^{\cdot-}$ [219, 237]. Оксид азоту здатний концентраційно-залежно регулювати активність комплексів ЕТЛ МХ. За низьких наномольних концентрацій NO зворотно пригнічує цитохром с-оксидазу, що обмежує інтенсивність дихання й окисне фосфорилування та розглядається як адаптивна фізіологічна відповідь [130, 290, 482]. Описано NO/cGMP-залежне зниження електричного потенціалу на ВММ, що впливає на інтенсивність електрофоретичного поглинання Ca^{2+} [290]. Оксид азоту, модулюючи гомеостаз Ca^{2+} в МХ, регулює активність Ca^{2+} -залежних NADH-дегідрогеназ [219, 440]; NO контролює експресію та активність кількох ензимів циклу Кребса (наприклад, аконітазу) [192, 295] та стимулює біогенез МХ в тканинах різних типів [290, 362, 431].

Надлишкова продукція NO на фоні посилення утворення $O_2^{\cdot-}$ в МХ супроводжується генерацією значних кількостей $ONOO^-$, пошкодженням компонентів ЕТЛ, незворотною деполяризацією органел і розвитком мітохондрійної дисфункції, яка може бути причиною апоптозу. А сама реакція NO з $O_2^{\cdot-}$ з утворенням $ONOO^-$ розглядається як важливий фактор зниження біодоступності і фізіологічної активності оксиду азоту в МХ [100, 191, 290, 293, 362].

Наведені приклади свідчать, що як нормальне функціонування, так і загибель клітини значною мірою залежать від рівня продукції NO та інтенсивності генерації АФК саме в МХ.

Гіперпродукція NO клітиною, особливо за підвищеної концентрації АФК, призвела б до утворення цілого спектра токсичних форм азоту і кисню, тому повинні існувати ефективні механізми, які знижують вміст NO. До них відносяться процеси інгібування активності NOS продуктами реакції, нітрозилування мембранних і цитозольних тіольних груп, зв'язування NO із залізо-сірчаними центрами і гем-вмісними протеїнами, його окислення у NO_2^-/NO_3^- тощо [213, 290, 295, 409, 439, 442]. Збільшення рівня cGMP в клітині за дії NO призводить до припинення передачі сигналу по Ca^{2+} -фосфатидилінозитидному шляху. Зниження синтезу NO досягається також фосфорилуванням NOS, пере-

дусім ізоформами РК С та MAPK (ERK – extracelullar responsive kinase) [223, 290, 322].

1.1.4. Джерела, регуляція утворення та фізіологічне значення оксиду азоту в матці

У зв'язку з інтенсивним дослідженням значення оксиду азоту або його похідних (активні форми азоту, АФА) в механізмах розслаблення гладеньких м'язів [133], розпочалось також вивчення ролі NO в регуляції скоротливої активності міометрія. Відповідний інтерес до міометрія пов'язаний з його функцією в жіночому організмі, а саме з виношуванням плоду під час вагітності та своєчасних пологів. За статистичними даними в розвинутих країнах (США) передчасними пологами закінчуються 1 з 8 вагітностей і в 50 % випадків це призводить до смерті 20000 плодів. В більше половини цих випадків передчасні пологи є спонтанним, а їх причини незрозумілими [447].

Вже з 1990х років з'явилися дослідження щодо посилення продукції NO в тканинах матки, статевих шляхах, плаценті (децидуальній оболонці) за вагітності. Кількість NO та чутливість тканин до нього знижується перед пологами, причому NO виявляє релаксуючий (токолітичний) ефект на міометрій [98, 144-145, 211, 337, 413, 434].

NO забезпечує відносну незбудливість міометрія за вагітності: попереджає контрактильну відповідь на розтягнення стінок матки в процесі росту ембріону та зменшує чутливість міометрія до утероконстрикторних агентів, що має місце за вагітності в умовах підвищеного рівня прогестерону в тканинах матки (прогестеронова блокада) [144-145, 228, 413], а також контролює процес ініціації скоротливої активності міометрія під час пологів, може регулювати кровоток через фетоплацентарний бар'єр [242, 368, 492]. З цієї точки зору, введення донорів оксиду азоту може бути корисним для інгібування скорочення міометрія з метою запобігання передчасних пологів.

Наводяться докази того, що NO здатний продукуватися ендометрієм, ендотелієм артерій, плацентарними синцитіотрофобластами або макрофагами в різні функціональні періоди [31, 33-34, 143, 147, 271, 448, 472, 477]. Припуска-

ють, що саме ендометрій є важливим регулятором скоротливості міометрія, аналогічно до взаємодії між ендотелієм та ГМК судин [92]. Крім того, NO синтезують нервові закінчення, які забезпечують нітргічну інервацію матки, завдяки наявності nNOS [337, 353]. На моделях вагітних щурів було показано, що матка під час вагітності генерує велику кількість нітритів та нітратів та може перетворювати L-аргінін в L-цитрулін, що передбачає важливу роль оксиду азоту як регулятора скоротливої активності матки [437, 475]. Наявність NOS в матці людини відіграє важливу роль в фізіології органа. У невагітних жінок активність NOS (не виключено, що eNOS) виявлено в кровоносних судинах, залозистому епітелії та стромальних клітинах ендометрія (але не ГМК матки) [101, 337], що сприяє місцевому розширенню судин в матці та відіграє важливу роль на початку імплантації та плацентування [337, 437, 492]. iNOS виявлено в залозистому епітелії та децидуальних стромальних клітинах ендометрія [147]. В цьому випадку синтезований NO, інгібуючи агрегацію тромбоцитів, бере участь в ініціації та контролі менструальної кровотечі, а також може пригнічувати скоротливу активність міометрія невагітних жінок. Протягом вагітності джерелом NO може бути плацента (в васкулярному ендотелії та синцитіотрофобластах плаценти ідентифіковано 2 ізоформи - iNOS та eNOS). Таким чином, плацентарний NO може виступати паракринним регулятором скорочення міометрія [142, 326].

В матці тварин (зокрема свиней), а саме в залозистому епітелії ендометрія та міометрії ідентифіковано iNOS та eNOS, активності яких зростають у другій половині вагітності і знижуються після пологів. В той же час зростає експресія субодиниць рГЦ в залозистому епітелії ендометрія, його стромальних клітинах та міометрії. Даний результат говорить про залучення NO/cGMP сигнального шляху протягом вагітності у свиней [292].

Синтез NO в матці вагітних щурів забезпечується eNOS та iNOS на різних строках вагітності та після пологів [215]. Експресія та регуляція NOS знаходяться під впливом прогестерона [228]. iNOS є основною ізоформою, її експресія у вагітній матці, зменшується безпосередньо перед пологами й корелює із зростанням експресії окситоцину та його рецепторів [92]. Припускають, що

iNOS відповідає за великі кількості NO, які генерується в матці та плаценті за вагітності, водночас як eNOS бере участь в вазодилатції в цей період [137, 228, 492].

В клітинах різних типів гладеньких м'язів релаксуючий ефект NO пов'язаний із зростанням вмісту cGMP в міоплазмі [133]. Регуляторний шлях L-аргінін/NO/cGMP ідентифікований в міометрії людини, щурів, мурчаків, кролів. Ефекти NO (синтез та активація рГЦ) знаходиться під контролем прогестерона, зокрема у випадку вагітних щурів [135, 138]. В усіх цих видах тварин він активується саме в період вагітності [199, 211, 249, 260, 419, 430, 436, 454, 475]. Виявлено, що рівень cGMP, нітратів та нітритів в плазмі та сечі зростає протягом вагітності у щурів та овець [199, 314]. Продемонстровано, що донори оксиду азоту викликають релаксацію міометрія як невагітних жінок, так і тих, які мають різні строки вагітності [122, 143]. Зниження контрактильної здатності ГМК матки показано для окремих видів тварин (щурів та приматів) в різні періоди функціональної активності органу [136, 249, 260, 282, 343, 419, 454]. Рівень cGMP в міоцитах невагітних жінок, щурів та мурчаків зростає *in vitro* у відповідь на обробку донором NO – нітропрусидом натрія (SNP). Інший донор NO нітрогліцерин знижував частоту скорочень смужок міометрія жінок (невагітного та у стані вагітності) разом із підвищенням вмісту внутрішньоклітинного cGMP [138, 260, 463].

На ізольованих смужках міометрія вагітних щурів було продемонстровано, що NO, SNP, 8-бромо-cGMP (проникний крізь ПМ аналог cGMP) та L-аргінін інгібували як спонтанне скорочення міометрія, так і скорочення, стимульоване агоністом ацетилхолінових рецепторів карбахолом, але не за висококалієвої деполяризації ПМ [463, 475]. Поряд з цим продемонстровано інгібування спонтанних скорочень невагітної матки жінок в присутності L-аргініна та SNP cGMP-неопосередкованим шляхом [251]. Жіночий міометрій не є чутливим до дії L-аргініна, але має набагато більшу поряд з іншими досліджуваними ссавцями і залежну від періоду вагітності чутливість до донорів NO. Автори роботи припускають, що жіночий міометрій можливо є мішенню дії NO, який синтезується поза цієї тканиною, в той час як міометрій щурів є і джерелом і мішенню NO [137].

Існує певна видоспецифічність щодо чутливості матки до оксиду азоту. Також існує фізіологічна залежність на різних моделях від джерел походження NO [342]. На смужках тканин матки жінок та щурів продемонстровано, що NO, субстрати та донори NO інгібують спонтанні скорочення, в той же час інгібітор NOS L-NAME – стимулює. Водночас *in vivo* L-NAME у щурів не викликав скорочення міометрію, а у мурчаків – викликав [135]. Міометрій щурів мало чутливий до впливу нітрогліцерина [343]. Інгібування активності NOS L-NAME або аміногуанідином та введення нітрогліцерина, як донора NO, *in vivo* не викликало змін скоротливої активності міометрія у невагітних та вагітних овець [314]. Різна чутливість міометрія до окремих сполук, що змінюють метаболізм та концентрацію оксиду азоту може залежати від їх хімічної природи та молекулярних механізмів дії. Водночас різниця в ефектах цих сполук на міометрій різних видів тварин вказує на певні відмінності у механізмах регуляції контрактильної функції матки.

Втім, посилення синтезу NO та зростання вмісту cGMP в міоплазмі [136] не є необхідною і достатньою умовою для фізіологічної відповіді у ГМК матки невагітних і вагітних жінок, приматів, щурів та мурчаків [122, 136, 143, 249, 281-282, 343]. cGMP-незалежним механізмом дії NO в гладеньких м'язах, зокрема і в міометрії, може бути безпосередня хімічна модифікація (S-нітрозилювання) іонних каналів та pomp, яка веде до зміни їхньої активності і може здійснюватись такими високореакційними нітрозилюючими похідними оксиду азоту як катіон нітрозонію (NO^+), діоксид азоту (NO_2), нітроксил-аніон (NO^-) тощо [144, 370, 441-442]. Зазначені редокс-форми NO утворюються в розчинах при застосуванні таких, широковживаних нітросполук, як SNP та нітрит натрію (SN), відповідно донора та попередника оксиду азоту [370]. Для жіночого міометрія доведений факт регуляторного впливу NO через S-нітрозилювання протеїнів, які підтримують стан вагітності [99, 242, 447]. Показано, що при передчасних пологах спостерігається підвищення S-нітрозилювання декількох ключових регуляторних протеїнів: кальпоніну-1, профіліну-1, регуляторного легкого поліпептиду міозину 9 та легкого поліпептиду міозину 6, тіоредоксину та трансгеліну. Поряд з цим спостерігається зниження S-нітрозилювання сироватко-

вого альбуміна, субодиниць Hb, глутатіон-S-трансферази P, яка бере участь у зберіганні та транспортуванні NO в клітину [447]. Спостерігається зростання рівня експресії S-нітрозоглутатіонредуктази і, відповідно, зниження вмісту S-нітрозоглутатіона – основної NO-транспортувальної та депонуючої молекули – в міометрії жінок у випадку передчасних пологів. За цих умов знижується ефективність NO-залежного розслаблення міометрія. Водночас активність рГЦ не мала прямого відношення до зазначених процесів [99].

Таким чином, під час вагітності в літературі окреслено такі функції NO: обмеження агрегації тромбоцитів в фетоплацентарному бар'єрі, регулювання власне плацентарного кровотоку, пригнічення скорочення міометрія тощо [413, 437, 492]. Водночас, біохімічні механізми, за якими оксид азоту контролює скоротливу функцію міометрія, на сьогодні остаточно не з'ясовані. Здатність оксиду азоту розслабляти міометрій зумовлює інтерес до використання донорів і попередників NO в акушерсько-гінекологічній практиці [492]. Але недостатня інформація стосовно Ca²⁺-залежних біохімічних механізмів його дії на гладенький м'яз матки гальмує процес створення і використання ефективних фармпрепаратів.

1.2. Ca^{2+} -ГОМЕОСТАЗ В КЛІТИНАХ ГЛАДЕНЬКОГО М'ЯЗА І ЙОГО РЕГУЛЯЦІЯ АКТИВНИМИ ФОРМАМИ АЗОТУ

1.2.1. Електро(фармако)механічне спряження і шляхи активації скорочення гладеньком'язових клітин

Іони кальцію забезпечують протікання багатьох фізіологічних процесів: скорочення-розслаблення м'язів, нейропередача та пластичність синапсів, секреція гормонів, згортання крові, проліферація, диференціювання клітин тощо. В позаклітинному середовищі концентрація вільного іонізованого кальцію підтримується на рівні 1-3мМ. В цитозолі клітин цей показник ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) на декілька порядків нижчий. В скелетному м'язі в стані спокою $[\text{Ca}^{2+}]_i$ знаходиться на рівні 130 нМ, при скороченні може зростати до 1-10 мкМ, в ГМК судин та клітинах ендотелія $[\text{Ca}^{2+}]_i$ сягає менше 100 нМ в спокої та зростає до 1 мкМ протягом активації. В міометрії $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в спокої сягає величини 150 нМ. Внутрішньоклітинні компартменти, зокрема ЕР/СР та МХ, є внутрішньоклітинними Ca^{2+} -депо і містять різну концентрацію катіона в активному стані та стані спокою. Наприклад, концентрація іонізованого Ca^{2+} в ЕР знаходиться в межах 250-600 мкМ, що в десятки разів перевищує його концентрацію в цитозолі. МХ діють як локальні буферні системи завдяки здатності поглинати Ca^{2+} в ділянках цитозолу, де локалізовані Ca^{2+} -канали ПМ та ЕР, а рівень вільного Ca^{2+} може сягати 10-20 мкМ. Поглинаючи Ca^{2+} , МХ запобігають Ca^{2+} -залежній інактивації каналів, а зростання концентрації Ca^{2+} в матриці стимулює енергетичні процеси. Надлишкове зростання рівня Ca^{2+} в цитозолі через порушення механізмів підтримання внутрішньоклітинного гомеостазу Ca^{2+} призводить до стресу ЕР, дисфункції МХ, порушення бар'єрної функції ПМ та загибелі клітин [84, 125, 268, 284, 373, 485]

Потенціал спокою ПМ міоцитів матки знаходиться в межах -35 - -80 мВ в залежності від функціонального стану і забезпечується перерозподілом Na^+ , K^+ , Cl^- і Ca^{2+} в міоплазмі та позаклітинному середовищі. У підтриманні потенціалу спокою на ПМ провідна роль належить Ca^{2+} -активованим K^+ -каналам високої провідності (BK_{Ca} або K_{Ca}), які лімітують збудження шляхом посилення виходу

іонів К (мають провідність близько 200 пСм) з клітини за підвищення локальної концентрації Ca^{2+} (мкМ) в субсарколемних ділянках цитозолу, спричиненого деполяризацією чи дією агоністів. Інгібування K^+ -каналів призводить до деполяризації та активації потенціал-керованих Ca^{2+} -каналів [298, 469].

За електро-механічного спряження (ЕМС) деполяризація ПМ в клітинах ГМ призводить до активації потенціал-керованих Ca^{2+} -каналів (VDCC), зокрема в міометрії найбільш репрезентований їхній L-тип (чутливий до дигідропіридинів). При фармако-механічному спряженні (ФМС) швидко активуються рецептор-керовані Ca^{2+} -канали (ROCC) при зв'язуванні відповідних лігандів (нейромедіаторів, гормонів, цитокінів). В міометрії, як в інших типах ГМ, до ФМС залучаються Ca^{2+} -канали, керовані вторинними месенджерами (SMOCC), зокрема cAMP та cGMP, IP_3 , DAG та арахідонової кислоти. За певних умов на зростання Ca^{2+} в міоплазмі може зумовлюватись реверсним режимом функціонування Na^+ - Ca^{2+} -обмінника ПМ [125, 301, 373, 441].

Зростання концентрації вільного Ca^{2+} призводить до взаємодії катіона з кальмодуліном (Ca^{2+} -CaM). Комплекс Ca^{2+} -CaM зв'язується з відповідним сайтом кінази легких ланцюгів міозину (MLCK) з наступним фосфорилуванням останніх та активацією скорочення. Зворотня реакція здійснюється фосфатазою легких регуляторних ланцюгів міозину (MLCP) та призводить до розслаблення м'язу [125, 315, 441, 469]. В умовах низької концентрації Ca^{2+} фаза підтримання сили скорочення зумовлюється стимулюванням Rho-кінази, яка активується в процесі зв'язування цитокінів або деполяризації [384, 452]. Це призводить до інгібування фосфатази легких ланцюгів міозину шляхом фосфорилування Rho-кіназою по залишкам тирозину. Rho-кіназа активується також комплексом Ca^{2+} -CaM. Таким чином, роль іонів Ca полягає у активації кінази легких ланцюгів міозину та Rho-опосередкованому інгібуванню фосфатази легких ланцюгів міозину. За дії відповідних лігандів в процесі передачі сигналу залучається фактор обміну гуанідинових нуклеотидів (GEF, guanine nucleotide exchange factor), який стимулює заміну в активному центрі малого G-білку RhoGDP на GTP, що має наслідком його активацію з подальшою стимуляцією Rho-кінази [85, 296, 422, 462].

Зниження концентрації Ca^{2+} в міоплазмі ГМК, і міометрія зокрема, забезпечують системи активного транспорту: $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ та СР, Na^+ - Ca^{2+} -обмінник ПМ, а також Ca^{2+} -уніпортер внутрішньої мембрани МХ, який транспортує Ca^{2+} в матрикс за електрофоретичним механізмом [84, 152, 296, 309, 387, 451, 462, 468, 485].

Вплив оксиду азоту на мембранні транспортувальні системи, які контролюють гомеостаз Ca^{2+} , та модуляція активності протеїнів скоротливого апарату можуть бути основними шляхами регуляції контрактильної функції міометрія з боку NO [84, 441, 443, 462, 472].

1.2.2. Системи пасивного та енергозалежного транспорту Ca^{2+} в міоцитах

Потенціал-керовані Ca^{2+} канали L-типу та T-типу плазматичної мембрани (voltage-dependent Ca^{2+} channels, VDCC). В міометрії потенціалкеровані Ca^{2+} -канали представлені L- та T-типами (відповідно ті, які мають повільну кінетику інактивації, та транзйентні). В міометрії наявні три ізоформи (α_{1G} , α_{1H} , α_{1I}) та кілька сплайс-варіантів каналів T-типу. Припускають, що початкова деполяризація ПМ зумовлює активацію T-каналів, забезпечуючи зміну потенціалу достатню для активації каналів L-типу [84, 287, 373]. Показано зростання експресії цих каналів за вагітності [221].

Ca^{2+} -канали L-типу - це високопорогові канали з максимальною активацією при значеннях мембранного потенціалу від 0 до +20 mV, забезпечують тривале і масоване надходження Ca^{2+} (провідність 15-25 пСм), відносно повільно та потенціалзалежно інактивуються. Фармакологічна блокада Ca^{2+} -каналів L-типу призводить до розслаблення міометрія. Інгібуються 1,4-дигідропіридинами (ніфедипін, нітрендипін та інше) та фенілалкіламінами (верапаміл та D-600), бензодіазепінами, а також дво- і тривалентними катіонами (Co^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , La^{3+} , Mn^{2+}) [54, 387, 469].

Рецептор-керовані Ca^{2+} канали плазматичної мембрани (receptor-operated Ca^{2+} channels, ROCC). Іншим механізмом активації надходження Ca^{2+} в міоцити є зв'язування агоністів (окситоцин, ендотелін, простагландин $\text{F}_{2\alpha}$, ацетилхолін) з рецепторами на ПМ, які зв'язані з сигнальними шляхами, опосеред-

кованими гетеротримерними G-протеїнами (GTPазами). Надалі активується фосфоліпаза C_{β} , яка гідролізує мембранний фосфатидилінозитол-4,5-бісфосфати (PIP_2), з утворенням двох вторинних месенджерів – IP_3 та DAG. IP_3 стимулює вихід Ca^{2+} з СР, що призводить до зростання Ca^{2+} в цитозолі [110, 115, 125, 315, 469].

Пул-керовані Ca^{2+} канали (store-operated Ca^{2+} channels, SOCC). Після спустошення люмену СР SOCCs, забезпечують ємнісний або пул-керований вхід Ca^{2+} (store-operated Ca^{2+} entry, SOCE), що сприяє підвищенню його рівня в міоплазмі та перезаповненню СР. SOCE є чутливим до низьких концентрацій лантаноїдів [80, 115, 125, 294, 373, 485]. В міометрії SOCE відводиться роль регулятора Ca^{2+} -сигналювання під час вагітності, можливо через підтримання агоніст-індукованого скорочення, що супроводжується пролонгацією потенціалів дії, Ca^{2+} -спарками, які збільшують амплітуду та тривалість скорочень. Є дані, що наприкінці вагітності роль SOCCs в міометрії зростає [159, 175, 335, 443, 469].

Інозитол-1,4,5-трисфосфатчутливі рецептори (IP_3 -receptor, IP_3R). В ГМК матки IP_3R є головним Ca^{2+} -звільнюючим каналом СР [152]. Існують три ізоформи рецептора – IP_3R1-3 , всі вони знайдені і в міометрії, де переважаючою є IP_3R3 -ізоформа [313, 468]. Активується IP_3 , а також при підвищенні $[Ca^{2+}]_i$ до ~ 300 нМ, за вищої концентрації Ca^{2+} провідність каналу зменшується [54, 115, 125, 152, 387].

Іони Са, які увійшли у міоплазму за градієнтом концентрації, викликають Ca^{2+} -індуковане вивільнення Ca^{2+} (CICR) через ріанодин-чутливі канали СР [110, 115, 125, 309, 370, 441, 485].

Ріанодинові рецептори (ryanodine receptor, RyR) – це канали, які активуються рослинним алкалоїдом ріанодином в наномолярних концентраціях, а за фізіологічних умов мікромольними концентраціями іонів Са (~ 10 мкМ), що викликає CICR з СР. За високих концентрацій Ca^{2+} (> 100 мкМ) спостерігається Ca^{2+} -залежна термінація активності RyR [120, 125, 152]. Ідентифіковано три ізоформи RyR, які відрізняються різною чутливістю до модуляторів (АТР, АДФ, АМР, сАМР, аденін, АДФ-рибоза, кофеїн, сурамін тощо) [105, 470]. Всі три форми виявлено в міометрії. RyR3 є домінуючою ізоформою (принаймні в міометрії миші), рівень експресії RyR2 регулюється протягом вагітності [305, 307, 470].

На рівні ПМ енергозалежний транспорт Ca^{2+} з міоплазми в позаклітинне середовище забезпечується двома системами - Ca^{2+} -помпою та Na^+ - Ca^{2+} -обмінником.

Ca²⁺-помпа ПМ, або PMCA (plasma membrane calcium-transporting ATPase) (з молекулярна масою біля 140 кДа), яка застосовує енергію гідролізу АТР для відкачування Ca^{2+} із клітини проти значного градієнта концентрації, який існує на ПМ [49-50, 279]. В спокої Ca^{2+} -помпа компенсує пасивний потік кальція, який спрямований до міоцитів, видаляє з клітини Ca^{2+} після м'язового скорочення, підтримуючи фізіологічну концентрацію іонів Са в ГМК на рівні 10^{-8} - 10^{-7} М [49, 84, 278-279, 309, 364]. РМСА відноситься до АТРАЗ Р-типу, її активність регулюється СаМ, який підвищує спорідненість ензиму до іонів Са, швидкість гідролізу АТР та транспорту катіона. С-кінцевий домен також містить PDZ-зв'язуючий мотив, який полегшує димеризацію РМСА з подальшим підвищенням її активності, взаємодію з протеїнами цитоскелету, утворення сигнальних комплексів, зокрема з nNOS [132]. Відомо чотири ізоформи РМСА та кілька сплайс-варіантів. В міометрії ідентифіковані 1, 2b та 4 ізоформи ензиму [84, 221, 364, 469]. Експресія РМСА в міометрії зростає наприкінці вагітності, що вказує на її важливу роль в забезпеченні скорочення-розслаблення міоцитів при пологах [84, 443]. До інгібіторів РМСА відносяться пептиди калоксини, а також калікс[4]арен С-90 [21, 252, 351-352, 456].

Na⁺-Ca²⁺-обмінник ПМ, або NCX (Na^+ - Ca^{2+} -exchanger) є мембраноасоційованим антипортером, використовує енергію електрохімічного градієнта Na^+ , створеного Na^+ , K^+ -АТРАзою [469]. За різними даними для міометрія стехіометрія обміну визначена як $1\text{Ca}^{2+}/2\text{Na}^+$ (електронейтральний) [50] або $1\text{Ca}^{2+}/3\text{Na}^+$ (електрогенний) [469]. Для Na^+ - Ca^{2+} -обмінника ПМ міометрія характерна низька афінність до Ca^{2+} ($K_{0,5} = 5$ -12 мкМ для міометрія щура). Інгібіторами транспортної системи є моненсин, доксорубіцин, деякі двовалентні катіони (Cd^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+}) [278].

Ca²⁺-помпа СР, або SERCA (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase) (молекулярна маса 110-115 кДа) також належить до АТРАЗ Р-типу, як і РМСА, здійснює активний транспорт Ca^{2+} в люмен СР, використовуючи енергію гідро-

лізу АТФ [125]. SERCA в міомерії має високу спорідненість до Ca^{2+} (0,3-1,2 мкМ) [49]. Відомо три ізоформи та кілька сплайс-варіантів SERCA, в міомерії експресуються SERCA 2a, SERCA 2b та SERCA 3 ізоформи ензиму [254, 387]. Експресія помпи 2-го типу в міомерії жінок та щурів зростає за вагітності, причому вміст ензиму залежить від рівня естрогенів [84, 443, 467]. Специфічними інгібіторами SERCA є терпеновий лактон тапсигаргін ($K_i=2$ нМ) та мікотоксин циклопіазонієва кислота ($K_i=0,3$ мкМ) [51, 387].

Таким чином, PMCA та SERCA беруть участь як у підтримці низької концентрації Ca^{2+} в міоцитах у стані спокою, компенсуючи пасивний потік іонів Са в клітину, так і в процесах повернення у цей стан, забезпечуючи зниження $[\text{Ca}^{2+}]_i$ після транз'єнта і відповідну релаксацію гладеньких м'язів. Вважають, що Na^+ - Ca^{2+} -обмінник регулює концентрацію Ca^{2+} у локальному просторі між ПМ та СР, підтримуючи її в збудженому міоциті на рівні близькому 10^{-5} М [51, 54, 387].

1.2.3. Просторово-часові характеристики Ca^{2+} -сигналу

Використання Ca^{2+} -чутливих флуоресцентних зондів та прецизійних методів реєстрації змін концентрації катіону в окремих клітинних компартментах, зокрема флуоресцентної мікроскопії, дозволило візуалізувати так звані “ Ca^{2+} -хвилі” та осциляції внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} в окремих клітинах. Вони є наслідком узгодженого функціонування систем пасивного та енергозалежного транспорту субклітинних мембранних структур, наявності прямих та зворотних зв'язків між цими системами, а також високою буферною щодо Ca^{2+} ємністю цитозолу. У формуванні Ca^{2+} -хвилі беруть участь як RyR, так і IP₃R ER [115, 125, 140, 167, 203, 467]. Картина Ca^{2+} -осциляцій кожної окремої клітини унікальна, але спостерігаються також і в популяціях клітин, зв'язаних між собою міжклітинними контактами, при цьому осциляції окремих клітин координуються [106, 190]. Одним з можливих пояснень цього є існування кількох клітин-ритмоводіїв аналогічних пейсмейкерам кардіоміоцитів [114, 388]. Іншим поясненням, яке адекватне для кардіоміоцитів та ГМК, що поєднані у синцитій, завдяки щільним контактам, є дифузія Ca^{2+} між клітинами і Ca^{2+} -індукований ви-

хід Ca^{2+} . В незбудливих тканинах дифундувати між клітинами може також IP_3 [469].

Використання флуоресцентних зондів Fluo-3 і 4 та методів лазерної конфокальної мікроскопії дозволило візуалізувати “ Ca^{2+} -треки” в ГМК (місця локального зростання концентрації катіона в міоплазмі). На відміну від скелетних міоцитів Ca^{2+} не вивільнюється на регулярних відстанях в міоплазмі, а утворює біля СР так звані “frequent-discharge sites або FDS”, тобто місця спонтанного вивільнення катіону з ретикулулу [114, 140, 167]. Спричинене FDS зростання флуоресценції називається “спарками”. Активація міоцитів, в ряді випадків, може призвести до зростання спаркової активності (кількості спалахів зонду та їхньої інтенсивності). В більшості ГМК спарки є наслідком активації RyR. У випадку стимуляції IP_3R візуалізуються більшвидовжені “пуфи” [114, 125, 311, 467].

Ще одним феноменом Ca^{2+} -сигналіngu в ГМК є Ca^{2+} -транзієнт, а саме індуковане деполаризацією або агоністами генералізоване зростання Ca^{2+} в міоплазмі [115, 116, 125, 140].

На характеристики Ca^{2+} осциляцій та хвиль в різних типах клітин, в тому числі і в ГМК, можуть впливати МХ шляхом зміни продукції АТР та регуляції рівня цитозольного Ca^{2+} [54, 114-115, 125, 152, 311, 335, 469].

1.2.4. Ca^{2+} -транспортувальні системи мітохондрій клітин гладенького м'яза

В дослідженнях на міометрії описане явище так званого “градієнту афінності” у функціонуванні Ca^{2+} -транспортувальних систем. А саме, афінітет (K_m) до Ca^{2+} зростає в ряді: РМСА – 0,35 мкМ > МХ – 5,7 мкМ > Na^+ - Ca^{2+} -обмінник – 30-50 мкМ. Тобто спорідненість до вільного іонізованого кальція Ca^{2+} -акумулюючої системи МХ на порядок нижча за таку для РМСА, але на порядок вища ніж для іоного обмінника ПМ. Крім того, початкова швидкість акумуляції катіона в МХ в 20 разів вища ніж для системи Na^+ - Ca^{2+} -обміну та 13,5 рази – для включення Ca^{2+} в СР [49].

Наразі остаточно сформовано уявлення щодо провідної ролі МХ як Ca^{2+} -депо в електробудливих клітинах, внаслідок їхньої спроможності акумулювати та вивільнювати значні кількості іонів Са, що особливо важливе в місцях

контакту з ЕР/ПМ, де локальна концентрація Ca^{2+} може сягати 10-100 мкМ, та модулювати амплітуду та часові характеристики Ca^{2+} -сигналу [107, 115, 151, 240, 311, 389, 379, 424]. Розраховано, що МХ можуть забезпечити зниження концентрації Ca^{2+} у ГМК за фізіологічно значущий час (30 с) та підтримувати його низькі локальні концентрації навіть за умови глобального зростання вмісту катіону в цитоплазмі [49-50, 107, 151]. Хоча Ca^{2+} -акумуляуючі системи МХ мають низький афінітет до Ca^{2+} , ефективність його акумуляції визначається високою початковою максимальною швидкістю процесу, високою позамітохондрійною концентрацією катіона, а також значним електричним потенціалом на ВММ та відносно низьким вмістом іонізованого Са у матриксі [107, 240, 311, 349, 379]. Підтримання концентрації вільного Ca^{2+} в МХ на оптимальному рівні забезпечується взаємоузгодженим протіканням трьох процесів: накопичення (за умови наявності неорганічного фосфату та аденінових нуклеотидів у фізіологічних концентраціях), зв'язування з внутрішньомітохондрійними буферами та вивільнення Ca^{2+} органелами [420].

Транспорт Ca^{2+} через ЗММ відбувається завдяки потенціалзалежному аніонному каналу VDAC, voltage-dependent anion channel (рис. 1.2.5.1.1) [284, 300, 379, 420-421]. Транспорт Ca^{2+} через ВММ забезпечується функціонуванням ряду каналних структур, коротка характеристика яких наведена нижче.

Мітохондрійний Ca^{2+} -уніпортер, або MCU (mitochondrial calcium uniporter) забезпечує швидке і масоване надходження Ca^{2+} , функціонуючи за високих, мікромольних концентрацій катіона (рис. 1.2.5.1) і за електрофізіологічними характеристиками являє собою Ca^{2+} -селективний іонний канал вхідного випрямлення, що транспортує іон за електрофоретичним механізмом завдяки наявності трансмембранного потенціалу на ВММ: при потенціалі -200 мВ він на 99 % знаходиться у відкритому стані, при -80 мВ ймовірність відкритого стану знижується до 11%. Канал може транспортувати до $20000 \text{ Ca}^{2+} \cdot \text{с}^{-1}$ [268, 300, 381]. Канальну природу MCU підтверджують результати щодо інгібування RuR ($K_i \sim 30$ нМ) та його похідним Ru360, які також блокують інші типи Ca^{2+} -каналів, наприклад в СР [241, 311, 420].

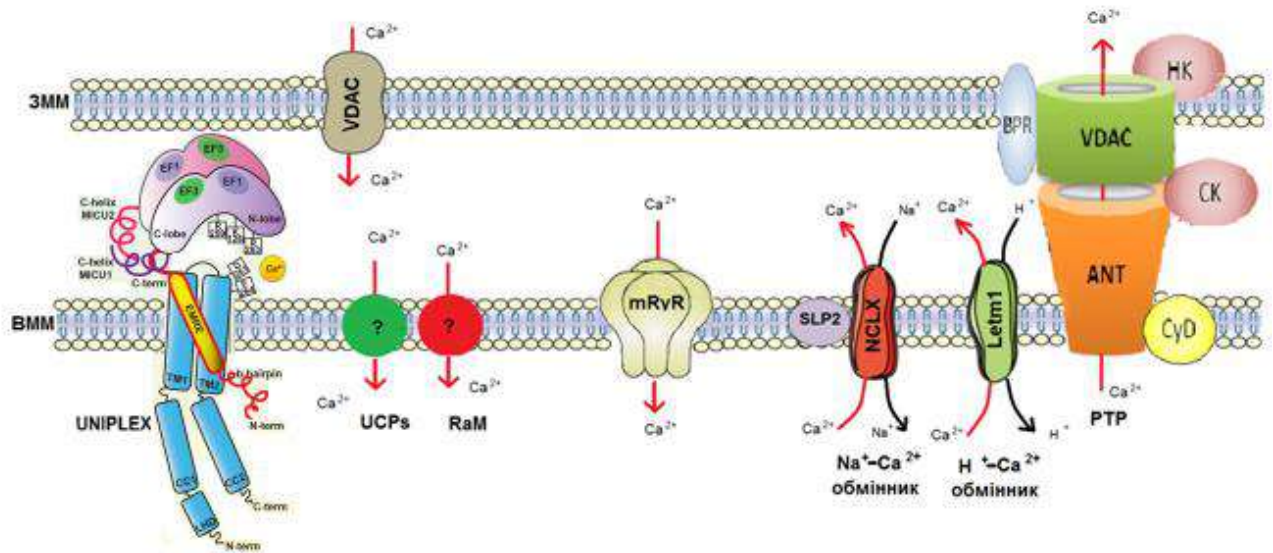


Рис. 1.2.5.1. Системи трансмембранного обміну Ca^{2+} в мітохондріях. ЗММ – зовнішня мітохондрійна мембрана; ВММ – внутрішня мітохондрійна мембрана; VDAC – потенціалзалежний аніонний канал (voltage-dependent anion channel); UNIPLEX – комплекс Ca^{2+} -уніпортера (calcium uniporter complex): MCU – мітохондрійний кальцієвий уніпортер (mitochondrial calcium uniporter), MICU1/2 – розчинні мембраноасоційовані регуляторні протеїни, що містять Ca^{2+} -зв'язуючі «EF-hand»-домени (mitochondrial calcium uptake 1/2), EMRE – Ca^{2+} -сенсорний регуляторний протеїн (essential MCU regulator), UCPs – роз'єднувальні протеїни (uncoupling proteins); mRyR – мітохондрійний ріанодиновий рецептор (mitochondrial ryanodine receptor); RaM – система швидкого кальцієвого входу (rapid mode uptake); NCLX – мітохондрійний Na^+ - Ca^{2+} - Li^+ -обмінник; SLP2 – стоматинподібний протеїн 2; LETM1 – протеїн, що забезпечує функціональну активність H^+ - Ca^{2+} -обміну. (leucine zipper and EF-hand containing transmembrane protein 1); PTP – мітохондрійна пора перехідної проникності; ANT – транслокатор аденінових нуклеотидів, CyD – циклофілін D, BPR – бензодіазепіновий рецептор, HK – гексокіназа, CK – креатинкіназа

Згідно з останніми даними, Ca^{2+} -уніпортер є частиною макромолекулярної структури, відомої як комплекс Ca^{2+} -уніпортеру (UNIPLEX, calcium uniporter complex), до складу якого входять протеїни MCU (mitochondrial calcium uniporter), MCUb (mitochondrial calcium uniporter b), MICU1 (mitochondrial calcium uptake 1), MICU2 (mitochondrial calcium uptake 2), MCUR1 (mitochondrial calcium uniporter regulator 1), EMRE (essential MCU regulator), MCUR1 (MCU-regulator 1), UCPs (uncoupling proteins) [148, 347, 390, 421, 428]. Показано, що при деполяризації MCU може працювати в реверсному режимі, забезпечуючи вихід Ca^{2+} [102]. В МХ міометрія уніпортер має низьку спорідненість до Ca^{2+} ($K_{0.5} = 1\text{-}54 \text{ мкМ}$), високе значенням максимальної швидкості акумуляції катіона (30-

600 нмоль Ca^{2+} /хв на мг протеїну) [18, 50, 76, 104]. Акумуляція Ca^{2+} МХ ефективно пригнічується за присутності інгібіторів дихального ланцюгу (ціаніди, азиди, ротенон, антимицин), протоніофорів (FCCP, CCCP, 2,4-динітрофенол) [50, 170].

«Швидкий кальцієвий вхід», або *RaM* (rapid mode uptake) спостерігали на ізольованих МХ печінки, серця, мозку (рис. 1.2.5.1) [104, 139, 195, 244, 253, 349]. *RaM* забезпечує локальні транзйентні (в межах мілісекунд) зростання концентрації Ca^{2+} в МХ. У випадку функціонування *RaM* швидкість акумуляції Ca^{2+} щонайменше в 300-1000 разів вище за *MCU*. Вважають, що цього надходження Ca^{2+} достатньо для посилення синтезу АТФ. Втім, *RaM* швидко інактивується Ca^{2+} при його концентрації в цитозолі до 200 нМ. Існує припущення, що *RaM* являє собою певний стан *MCU*, адже інгібується *RuR*, а також рушійною силою акумуляції Ca^{2+} є електрохімічний градієнт [107, 244, 253, 349, 381].

Мітохондрійний ріанодиновий рецептор, або *mRyR* (mitochondrial ryanodine receptor) – канал, який забезпечує швидке захоплення Ca^{2+} з високою провідністю та відносно низькою селективністю (рис. 1.2.5.1) [381, 421]. *mRyR* ідентифікований як скелетно-м'язова ізоформа *RyR*, відрізняється від *RyR* *CP/EP* чутливістю до кофеїну, Mg^{2+} та *RuR*, зв'язування *mRyR* з ріанодином є кофеїн-нечутливим [111, 253, 349].

До систем транспорту Ca^{2+} з МХ належать Na^+ - Ca^{2+} - і H^+ - Ca^{2+} -обмінники *VM* та *PTP*, яка функціонує за умов перевантаження матрикса Ca^{2+} . Na^+ -залежний обмінник існує в багатьох електрозбудливих тканинах, тоді як Na^+ -незалежний H^+ - Ca^{2+} -обмінник ідентифіковано в тканинах печінки, нирок, легенів, а також гладеньких м'язах; в деяких тканинах знайдено обидва типи обмінників [54, 56, 244].

Na⁺-Ca²⁺-обмінник МХ, або *mNCX* використовує енергію градієнту Na^+ для обміну 3Na^+ на 1Ca^{2+} (є електрогенним) або 2Na^+ на 1Ca^{2+} (електронейтральний обмін). Виведення іонів Na^+ з матриксу здійснюється H^+ - Na^+ -обмінником, молекулярна структура якого залишається невідомою [107, 244, 323,420]. Це поліпептид масою 100-110 кДа, в МХ серця та мозку він функціонує у формі димера [148]. В МХ підтверджена наявність 1-3 ізоформ, що свідчить на ко-

ристь ідентичності NCX MX та ПМ, хоча катіонна селективність та чутливість до інгібіторів mNCX відрізняються від таких у NCX плазмалеми [253, 348, 390].

H⁺-Ca²⁺-обмінник MX. На відміну від інших електробудливих тканин в міометрії було ідентифіковано H⁺-Ca²⁺-обмін, який не залежав від градієнта Na⁺ [50, 56]. Було виявлено протеїн LETM 1, який був описаний як K⁺-H⁺-обмінник, а згодом ідентифікований і як H⁺-Ca²⁺-обмінник [399]. У ліпосомах з вбудованим LETM 1 закислення середовища інкубації викликало вивільнення Ca²⁺, тоді як його залуження супроводжувалось накопиченням катіону. Таким чином, H⁺-Ca²⁺-обмінник може працювати в реверсному режимі, забезпечуючи накопичення Ca²⁺ в MX за його низьких цитозольних концентрацій (< 1 мкМ) (рис. 1.2.5.1) [89, 264, 300, 311, 340, 349, 389]. В різних тканинах демонструється як електрогенний обмін зі стехіометрією 1Ca²⁺ : 1H⁺ або 1Ca²⁺ : 3H⁺, так і електронейтральний обмін 1Ca²⁺ : 2H⁺ [50, 244, 340, 389-390, 424]. LETM 1 (leucine zipper and EF-hand containing transmembrane protein 1) – висококонсервативний протеїн еукаріот (має 31-83 % гомології в різних організмах), експресується переважно в MX [399]. Родина протеїнів LETM 1 має гідрофобний N-кінцевий домен, що знаходиться в міжмембранному просторі, трансмембранний домен, що може регулювати процес олігомеризації, та велику гідрофільну частину, в тому числі C-кінцевий домен, що розташований в матриксі і містить субстратзв'язуючий сайт, суперспіралізовані ділянки та два Ca²⁺-зв'язуючі «EF-hand»-мотиви. Специфічних інгібіторів даного обмінника не виявлено, але блокувальний вплив мають роз'єднувачі окисного фосфорилування в низьких концентраціях, ціаніди, RuR та Ru 360, іони Sr²⁺, Mn²⁺ та лантанноїди [170, 244, 349]. H⁺-Ca²⁺-обмін MX міометрія стимулювався естрогенами та простагландинами [50, 56].

Мітохондрійна пора перехідної проникності, або PTP являє собою неселективний високопровідний мегаканал з кількома станами провідності, через який вільно проходять молекули менші за 1,5 кДа. Цей канал включає компоненти ЗММ та ВММ, а саме VDAC, аденіннуклеотидний транслокатор (ANT), циклофілін D, припускають також асоціацію з ним димерів АТР-синтази (рис.2.1.5.1). Проте, показано функціонування PTP і за відсутності аденіннуклеотидного транслокатора та циклофіліну D [108, 390, 421].

Відкриттю пори передуює перевантаження матриксу іонами Ca, гіперпродукція АФК, зростання вмісту окисленої форми пуринових нуклеотидів та дітіолів, деполяризація ВММ, збільшення рівня неорганічного фосфату в матриксі. Незворотнє відкриття РТР призводить до колапсу мембранного потенціалу та вирівнюванню іонних градієнтів, набухання МХ, розриву ЗММ, звільнення цитохрому c та наступної індукції апоптозу чи некрозу. Інгібується РТР імунодепресантом циклоспорином А (Csp A) в нМ концентраціях, який зв'язується з циклофіліном D, іонами Mg, Mn, відновленими пуриновими нуклеотидами та тіолами [54, 108, 216, 374, 421].

В умовах підвищення концентрації Ca^{2+} в МХ до межі, що перевищує транспортувальну здатність Na^+-Ca^{2+} - та H^+-Ca^{2+} -обмінників, відбувається транзійне відкриття РТР. Вважають, що транзійні відкриття РТР, частота яких залежить від концентрації вільного Ca^{2+} в матриксі, є фізіологічним процесом і можуть забезпечувати швидкий вихід Ca^{2+} з МХ за умови існування градієнту катіону та запобігати їх Ca^{2+} -перевантаженню [1, 107-108, 216, 311, 374].

1.2.5. Молекулярна фізіологія іонів Ca в мітохондріях

Фізіологічна роль іонів Ca в МХ обумовлена їхнім значенням в регуляції фундаментальних біологічних процесів, що протікають в органелах і забезпечують життєдіяльність клітини: синтез АТФ, енергетичний метаболізм, частина реакцій циклу сечовини, синтез стероїдних гормонів, підтримка Ca^{2+} -гомеостазу клітини тощо [89, 107, 146, 241, 347]. Крім того, МХ є провідною ланкою у запуску процесу запрограмованої загибелі клітини за дії несприятливих внутрішніх або зовнішніх чинників та регуляції шляхів переключення між апоптозом та некрозом, де роль іонів Ca також важлива [68, 108, 205, 379, 421].

Збільшення концентрації Ca^{2+} в клітині за її активації зовнішніми стимулами супроводжується зростанням інтенсивності протікання АТФ-залежних реакцій та відповідно збільшенням споживання АТФ. В МХ Ca^{2+} стимулює окисне фосфорилування та продукцію АТФ шляхом активації піруватдегідрогеназного комплексу (через Ca^{2+} -залежне дефосфорилування) та ензимів циклу Кребса – ізоцитратдегідрогенази, α -кетоглутаратдегідрогенази, а також мембра-

нозв'язаної гліцерол-3-фосфатдегідрогенази [229, 284, 347]. Це забезпечує надходження відновлених еквівалентів NADH до ЕТЛ. Описано процес “мітохондрійної пам'яті” - довготривалої активації продукції АТР аж до 60 хв після Ca^{2+} сигналу. В той же час надмірне надходження Ca^{2+} в МХ та стимулювання функціонування дихального ланцюга є основним механізмом надмірної продукції АФК [54, 216, 240-241, 284]. Продемонстровано чутливість до Ca^{2+} АТР-синтази, транслокази аденінових нуклеотидів, самих комплексів дихального ланцюга та «EF-hand»-вмісних переносників метаболітів, нуклеотидів, кофакторів через ВММ (наприклад, Ca^{2+} -залежні транслокатори “aralar” та “citrin”) [148, 240, 379].

Іони Са впливають на процеси фосфорилування/дефосфорилування протеїнів МХ. Прикладами таких ефектів є Ca^{2+} -залежне дефосфорилування Mn^{2+} -залежної супероксиддисмутази та фосфорилування компонентів дихального ланцюга й ензимів циклу Кребса [240].

Показано вплив іонів Са на рух та морфологію МХ. Максимальна рухливість МХ спостерігається за низьких (близько 100 нМ) концентрацій вільного Ca^{2+} в цитозолі у стані спокою та повністю припиняється за зростання його концентрації до 1-2 мкМ, що полегшує поглинання Ca^{2+} МХ та стимулювання продукції АТР. Зростання внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} також ініціює транслокацію динамінспорідненої ГТРази до МХ, результатом чого є поділ та фрагментація МХ [89, 236, 240].

В клітині транспорт Ca^{2+} на рівні ПМ, ЕР/СР та МХ є взаємоузгодженим процесом [115, 424, 476, 485]. У збудливих клітинах МХ локалізовані поблизу потенціал-керованих Ca^{2+} -каналів ПМ і відіграють роль буфера для іонів Са, що надходять у клітину за деполяризації (в 20 нм від каналу концентрація Ca^{2+} може сягати 100 мкМ), зменшуючи його локальну концентрацію [166, 311, 476]. Крім того, солокалізація МХ з ЕР (~10-25 нм) та ПМ може забезпечувати перепакування ЕР, транспортуючи Ca^{2+} від ПМ до ЕР, оминаючи цитозоль [166, 300]. Розташування МХ біля пул-керованих каналів ПМ забезпечує підтримку каналів в активному стані за рахунок усунення інгібувальної дії іонів Са [170, 216, 240, 379, 389]. Продемонстрована наявність білкових містків між МХ

(VDAC) та EP (IP_3R), що дозволяє здійснювати позитивну регуляцію поглинання Ca^{2+} МХ, де концентрація катіона може сягати 20-100 мкМ [125, 148, 166, 170, 284, 379, 458]. З іншого боку, контакти МХ із Ca^{2+} -акумулюючими ділянками EP забезпечують перезавантаження ретикулярного пулу катіону під час та після стимуляції клітини, що необхідно для активації Ca^{2+} -залежних шаперонів EP, які відповідають за фолдинг протеїнів [125, 166, 216, 240, 300, 420].

Таким чином, розташування МХ поблизу Ca^{2+} -мікродоменів (локальних областей високої концентрації Ca^{2+} біля EP та ПМ) забезпечує швидку буферизацію катіону органелами, термінування Ca^{2+} -сигналу, зменшуючи його амплітуду та поширення, а також надходження до інших органел (EP/CP). Крім того, взаємоузгоджене функціонування систем поглинання та вивільнення Ca^{2+} в МХ регулює активність транспортерів субстратів [89, 125, 240, 244, 420, 476].

1.2.6. Окремі приклади впливу NO на катіон-транспортвальні системи клітини

Сигнальна роль NO тісно пов'язана із регуляторним впливом на системи, які задіяні у контролі іонного гомеостазу клітини [60, 113, 156, 370, 395, 432, 489]. Доведено, що функціональна активність NO реалізується опосередковано через зростання вмісту cGMP шляхом активації рГЦ. Цитоплазматична рГЦ є гем-вмісним гетеродимерним “рецептором” NO. Взаємодія NO з гемом рГЦ активує ензим в 200 разів [133, 442]. Надалі cGMP стимулює cGMP-залежну РК, відповідні фосфатази, а також безпосередньо впливає на роботу cGMP-керованих K^+ -, Na^+ - та Ca^{2+} каналів ПМ, що відіграє роль в вазодилатції, фототрансдукції та нейропередачі. Можлива також опосередкована активація РК А та PI_3 -кінази. На кардіоміоцитах та ГМК артерій продемонстровано, що потенціалзалежні $ВК_{Ca}$ регулюються NO шляхом активації РК G та РК A, а не S-нітрозилюванням. Зростання поляризації ПМ через відкриття $ВК_{Ca}$ та, як наслідок, зниження збудливості лімітує вхід Ca^{2+} через потенціал-керовані Ca^{2+} -канали, що в кінцевому рахунку призводить до релаксації [96, 123, 144, 344, 442, 486]. Для ГМК та кардіоміоцитів показаний інгібувальний ефект NO на Ca^{2+} -канали L-типу [276] та активацію TRPC1,4,5 через S-нітрозилювання за-

лишків Cys [441]. PK G фосфорилує фосфоламбан, що посилює депонування Ca^{2+} шляхом активації SERCA [372]. Для ГМК артерій показаний стимулювальний ефект NO на SERCA через активацію NO/cGMP/PK G шляху [442] або cGMP-незалежним шляхом за рахунок S-глутатіонування. В результаті окислення глутатіону пероксинітридом утворюється S-глутатіон (-SSG), який зворотно зв'язується з Cys674 SERCA, що активує ензим та сприяє зменшенню концентрації Ca в цитозолі з подальшим зниженням активності SOCC та розслабленням ГМК [163, 486]. Втім, NO концентраційно-залежно інгібував SERCA в скелетному м'язі, але його ефект не був пов'язаний з активацією рГЦ та PK G або окисленням тіольних залишків [258]. Демонструється NO/cGMP-залежне інгібування фосфоліпази C, а також зумовлене активацією PK G фосфорилування IP_3R EP/CP, що призводить до їхньої десенсибілізації [123, 144]. NO прямо або опосередковано активацією sGC/cGMP/PK G шляху стимулює АТР-чутливі K^+ -канали MX , що розглядають як кардіопротекторну властивість оксиду азоту [324, 459].

Поряд з цим, показаний стимулювальний вплив NO через cGMP-залежні механізми на cADP-рибозилтрансферазу, продуктом якої є cADP-рибоза – природний агоніст RyR [481]. Оксид азоту може cGMP-залежним шляхом регулювати зміни концентрації вільного Ca^{2+} у цитозолі [227, 480].

Утворення комплексу між PMCA4b та nNOS (через PDZ-домен останньої) в кавеолах регулює скорочення кардіоміоцитів та ГМК судин шляхом модуляції продукції NO, cGMP та cAMP (в останніх двох випадках через зниження активності фосфодіестерази (PDE)) [204, 442]. Вестерн-блот аналізом було продемонстровано, що за відсутності протеїну PMCA4b nNOS переміщується з ПМ в цитоплазму. Наслідком активації (або надекспресії) PMCA є зниження активності nNOS, зменшення утворення cGMP та ріст cAMP. Таким чином, комплекс PMCA4b-nNOS може регулювати локальні субсарколемні підвищення Ca^{2+} , необхідні для регуляції активності nNOS [150, 204, 316, 441]. Також показано оборотне інгібування PMCA пероксинітридом [163].

Оксид азоту легко вступає в окисно-відновні реакції з утворенням високоактивних похідних NO^+ , NO^- , NO_2 , N_2O_3 , N_2O_4 , які можуть виступати потуж-

ними нітрозилуючими агентами [133, 370, 489]. Зокрема, розклад у водних розчинах класичного донора NO SNP призводить до формування катіону нітрозонію (NO^+) [370]. S-нітрозилування є посттрансляційною ковалентною модифікацією, яка бере участь в регуляції протеїнів, які займають ключову роль в сигнальних та метаболічних шляхах. Зокрема, функціональна активність RyR SR посилюється шляхом S-нітрозилуванням [232]. Прикладом транснайтрозилування є передача NO-групи від Hb-SNO на аніонний обмінник AE-1. Також каспаза-3-SNO може нітрозилувати інгібітор апоптоза XIAP, пригнічуючи його лігазну активність [441].

Оскільки MX багаті на ензими з високим вмістом тіольних залишків, залізо-сірчаних центрів, гемових груп, а також є джерелом утворення супероксид-аніону, вони виступають потенційною мішенню дії оксиду азоту або його редокс-форм [237]. Оксид азоту, впливаючи на ефективність роботи ЕТЛ, ензимів матриксу та Ca^{2+} -транспортувальних систем ВММ, спроможний контролювати основні процеси, які забезпечують нормальне функціонування організму на клітинному рівні [191, 230, 236]. Показано пряму взаємодію eNOS з VDAC, який є компонентою РТР. NO може впливати на РТР нітруванням каналу, через активацію РК G, або непрямо – високими концентраціями Ca^{2+} в матриксі та оксидативним стресом, які також модулюються NO [191, 421].

1.2.7. Ефекти NO в мітохондріях

Відкриття протягом останніх років можливості ендогенного синтезу NO в MX, зумовленого роботою власної мітохондрійної NO-синтази (mtNOS), і нітрит/нітрат–редуктазною здатністю компонентів ЕТЛ [65, 230, 236], переконливо свідчить про важливість оксиду азоту у регуляції функціональної активності MX. Стаціонарна концентрація NO в матриксі MX за допомогою мікросенсорної техніки вимірюється в наномолярному діапазоні, водночас інтактні органели здатні продукувати NO в значно вищих мікромольних концентраціях. Це вказує на те, що значна частина утвореного оксиду азота реагує з мітохондрійними мішенями: $\text{O}_2^{\cdot-}$, гемовими та тіольними групами протеїнів тощо [235, 482].

NO за низьких фізіологічних концентрацій (наномолярних) регулює ефективність окисного фосфорилування та впливає на рН матриксу [232, 237, 362, 482]. За нормального парціального тиску кисню NO знижує поглинання O_2 в МХ і гальмує мітохондрійне дихання та окисне фосфорилування в різних тканинах, що розглядається як адаптивна фізіологічна відповідь [130, 236, 290, 431]. Оксид азоту оборотно зв'язується та пригнічує активність комплексів ЕТЛ, найбільш чутливою мішенню вважається комплекс IV [191-192, 245, 401]. Ендогенно синтезований NO, знижуючи активність цитохром с-оксидази, зменшує споживання кисню, що дозволяє оптимально функціонувати клітинним ферментам з низькою спорідненістю до O_2 [236, 431, 450]. Оксид азоту обмежує споживання O_2 добре окисгенованими клітинами, змушуючи O_2 дифундувати до більш віддалених від кровотоку ділянок [247, 329, 401]. Комплекси I і III дихального ланцюга також гальмуються оксидом азоту. Результатом NO-індукованого гальмування ЕТЛ є часткова деполяризація ВММ, що може мати протекторний ефект, знижуючи інтенсивність генерації АФК [149, 226, 367, 431].

NO регулює гомеостаз Ca^{2+} в МХ і, відповідно, Ca^{2+} -залежні процеси в них [229, 236, 440]. Зниження електричного потенціалу на ВММ знижує інтенсивність електрофоретичного поглинання Ca^{2+} [290]. Іони Ca можуть регулювати функціонування МХ, активуючи ключові метаболічні ферменти [229, 241], і, зокрема, mtNOS [196, 236-237]. Посилення роботи Ca^{2+} -залежних дегідрогеназ призводить до збільшення поглинання кисню, в той час як стимулювання активності mtNOS веде до протилежного ефекту [196, 229, 236, 386, 440]. Отже, за дії NO мають місце реципрокні взаємодії між процесами поглинання іонів Ca, споживання кисню та інтенсивністю окисного фосфорилування в МХ [230, 290, 440].

Показано, що NO може як запобігати, так і сприяти відкриттю РТР [290]. Це залежить одночасно від концентрації NO та інтенсивності генерації $O_2^{\cdot -}$ в МХ. За низького фізіологічного рівня NO відкриття пори гальмується (через S-нітрозилювання тіолів протеїнів) з константою напівінгібування біля 10 нМ [191, 421]. Високі концентрації NO сенсibiliзують РТР, роблячи її більш чутливою до таких факторів відкриття як підвищена концентрація Ca^{2+} в матриксі,

низький рівень АТР та посилення продукції $O_2^{\cdot-}$. Зокрема продемонстрована пряма взаємодія eNOS з VDAC, а також як пряме нітрування каналу або через активацію PKG [191]. Відкриття пори спричиняє різку деполаризацію, виснаження пулу АТР, апоптичну, а в окремих випадках і некротичну, загибель клітини. З огляду на це, mtNOS відіграє важливу роль в регуляції активності РТР [131, 191, 193, 482].

Реакція NO з $O_2^{\cdot-}$ розглядається як важливий фактор зниження біодоступності і фізіологічної активності оксиду азоту в МХ. Пероксинітрит є причиною окисного пошкодження, нітрування та S-нітрозилювання біомолекул – протеїнів [191, 421, 440], ліпідів, ДНК [293, 383], незворотної інактивації Mn^{2+} -вмісної супероксиддисмутази [198], матриксної аконітази [295, 438] та зниження вмісту відновленого глутатіона [289]. Нітрозативний стрес, спричинений ONOO⁻, викликає нерепаровані розриви та інші пошкодження ДНК з наступною активацією транскрипційного фактора p53 та полі-ADP-рибозополімерази (PARP-1) [131, 293, 383, 391].

Порушення балансу між анти- та прооксидантним статусом МХ, що супроводжується надмірним утворенням активних форм азоту та кисню, зокрема пероксинітриту та гідроксил-радикалу, призводить до виникнення їхньої дисфункції і лежить в основі біохімічних механізмів патогенезу артеріальної гіпертензії, серцевої недостатності та ішемічної хвороби серця, атеросклерозу, а також комплексних системних захворювань, таких як діабет II типу. Зазначені патологічні процеси навіть називають «мітохондрійними хворобами» [191, 205, 283, 293, 486].

1.2.8. Синтез оксиду азоту в мітохондріях за присутності кисню

В доступній нам науковій літературі відсутні відомості щодо утворення NO, каталітичних і кінетичних властивостей NO-синтазної системи мітохондрій гладеньких м'язів, зокрема, і клітин міомерія. Втім, така інформація наявна щодо деяких інших об'єктів. В ряді тканин мітохондрії розглядаються як важливе джерело оксиду азоту [212, 230, 236, 450, 482].

В інтактних енергізованих сукцинатом мітохондріях печінки щурів продемонстрували існування мітохондрійної NOS (mtNOS): за присутності L-

аргініну ензим утворював NO і L-цитрулін та був Ca^{2+} -залежним конститутивно активним. Функціонування mtNOS було асоційовано з внутрішньою мітохондрійною мембраною, залежало від інтенсивності мітохондрійного дихання та контролювалось мембранним потенціалом; аналоги L-аргініну інгібували ензим [231]. Синтез NO в мітохондріях був виявлений також на моделі пермеабілізованих дигітоніном міоцитів шлуночка серця E. Dedkova та L. Blatter [193].

Детальний аналіз амінокислотного складу mtNOS виявив, що будова протеїна нагадує первинну послідовність nNOS [429]. Припускають, що мітохондрійна NO-синтаза є сплайс-варіантом повноланцюгової nNOS α , відмінним від вже ідентифікованих, з молекулярною масою 144 кДа. Імуноколокалізація mtNOS з мітохондрійними маркерами (сукцинатдегідрогеназа, цитохром c-оксидаза) додатково доводить її розміщення саме у внутрішній мітохондрійній мембрані [212, 230, 431, 482].

Активність mtNOS максимальна за оптимальної роботи електронно-транспортного ланцюга, зокрема комплексу I, який, як припускають, може бути джерелом електронів для функціонування ензиму; блокування комплексу I пригнічує активність mtNOS [245, 290, 354]. Синтез NO експоненційно зростає з величиною електричного потенціала внутрішньої мембрани, а залежність продукції NO від внутрішньомітохондрійного pH (в діапазоні 5,5-8,5) має дзвоноподібний характер з максимумом при pH 7,4 [450, 482].

Отже, результати окремих досліджень свідчать, що синтез оксиду азоту мітохондріями суттєво залежить від рівня їхньої енергізації, величини електричного потенціалу та інтенсивності надходження до матриксу екзогенного Ca^{2+} . Експериментальні дані вказують на те, що mtNOS постійно експресується в мітохондріях, є мембранозв'язаним ензимом і за властивостями нагадує конститутивні NOS, зокрема нейрональну ізоформу. Наразі мітохондрійна локалізація NOS надійно показана в окремих органах та тканинах ссавців (печінка, нирки, тимус, кардіоміоцити, діафрагма) [88, 119, 141, 191, 193, 235]. Втім, наявність її в ГМК, і зокрема міометрія, в доступній нам літературі не обговорювалась. Біохімічні властивості mtNOS в ГМК матки не вивчалися.

1.3. БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ КАЛІКС[4]АРЕНІВ В ГЛАДЕНЬКОМУ М'ЯЗІ

1.3.1. Структура та можливість застосування каліксаренів в хімії, біології та медицині.

У біохімічних і фізіологічних дослідженнях останніх років значна увага приділяється макроциклічним сполукам чашоподібної будови – каліксаренам, що є продуктами циклічної конденсації *para*-заміщених фенолів (або резорцинів) з формальдегідом під дією кислот або лугів як каталізаторів, завдяки їхньому широкому спектру біологічної дії. Дані сполуки широко використовуються для дизайну специфічних рецепторів або біо(хемо)сенсорів завдяки чутливості та селективності відповідно до розмірів та властивостей субстратів [5, 15, 112, 234, 358].

Унікальні властивості та широкий спектр застосування калікс[4]аренів обумовлені своєрідною будовою молекули як показано на рисунку 1.3.1, утвореної центральними ареновими залишками (калікс[4]аренова чаша) та замісниками, які формують верхній та нижній вінці. В поєднанні ці структурні фрагменти утворюють гідрофобну порожнину, здатну зв'язувати іони або нейтральні молекули. При зміні розмірів та хімічної природи замісників на верхньому та нижньому вінцях чаші, можна синтезувати сполуки з новими властивостями [5, 15, 53, 71, 112, 332, 358].

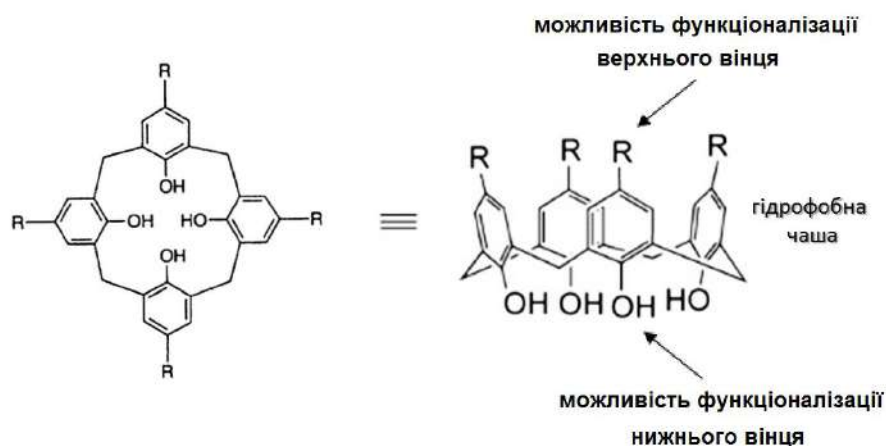


Рис. 1.3.1. Структура молекули калікс[4]арену.

Каліксаренам присвячена значна кількість досліджень, результати яких свідчать про перспективність їхнього застосування в біології та медицині. Селективність та чутливість каліксаренів забезпечує їх використання як біосенсорів (наприклад в діагностиці пріонів), в біотехнології (дизайн специфічних рецепторів біомолекул, хемосенсиори, платформи для ДНК-чипів, імітатори ензимів) та нанотехнології (мається на увазі їхня нанорозмірність) [5, 66, 332, 350, 474]. Можливість їх візуалізації (bioimaging) обумовлює можливість їх використання для таргетної доставки ліків та трансфекції генів тощо [66, 234, 350]. Біодоступність та специфічність забезпечує їхнє застосування як терапевтичних агентів: антивірусних, антибактеріальних, антигрибкових, антиракових, антитромботичних, антиоксидантних препаратів [15, 62, 171, 350, 358]. Також важливою сферою використання калікс[4]аренів є застосування як інгібіторів ензимів (наприклад, протеїнтирозинфосфатази) та іонних каналів [71, 358]. Показано, що калікс[4]арени можуть впливати на процеси імунної відповіді, скорочення м'язів, зсідання крові, активність катіон-транспортуючих систем субклітинних структур [5, 62]. Серед переваг калікс[4]аренів, можна зазначити їх легкий синтез і можливість модифікацій різноманітними функціональними групами, а також низьку токсичність (при концентрації 200 мМ виживаність клітин ~ 70 % [53, 66, 164, 350]) та імуногенність [5].

1.3.2. Біохімічна активність калікс[4]аренів у клітинах міометрія та їх вплив на функціонування мітохондрій

Можливість модифікації калікс[4]аренів по нижньому та верхньому вінцю замісниками різної хімічної будови забезпечує їх використання в якості модифікаторів активності ензимів. Для ГМ матки показано, зокрема, що вони з високою спорідненістю модулюють активність низки АТР-гідролаз, що привертає увагу щодо їх важливості як потенційних регуляторів гомеостазу Ca^{2+} в міоцитах [53].

На прикладі калікс[4]аренів С-97, С-99, С-107 (рис. 1.3.2) показано їх комплексний вплив на АТР-гідролазні реакції у ГМК. Зазначені калікс[4]арени є високо афінними інгібіторами Na^+ , K^+ -АТР-азної активності ПМ міометрія, та

практично не впливають на активність «базальної» Mg^{2+} -АТРази. Значення коефіцієнту інгібування IC_{50} для С-107 складає 50 нМ, для С-97 – 30 нМ, для С-99 – 100 нМ [19-20]. Слід зазначити, що дані калікс[4]арени мають у своїй структурі один або дві фосфонові групи в поєднанні з фенольними фрагментами. Наявність цих структур забезпечує ефективне інгібування натрієвої помпи. За кінетичними розрахунками (на прикладі С-97 та С-107) зазначені калісарени є неконкурентними інгібіторами, тобто не впливають на спорідненість Na^+ , K^+ -АТРази до іонів Mg , АТР, а також K^+ , але зменшують спорідненість до Na^+ [14]. В той же час вони значно підвищують (майже в 4 рази) спорідненість ензиму до убаїну. В тензометричних експериментах калікс[4]арени С-99 та С-107, аналогічно убаїну, знижували скоротливу активність смужок міометрія [73-74]. Отже, калісарени С-97, С-99 та С-107 є високоефективними ($I_{0,5}$ =30-100 нМ) порівняно з убаїном ($I_{0,5}$ =22 мкМ) інгібіторами Na^+ , K^+ -АТРази ПМ [19, 23-24].

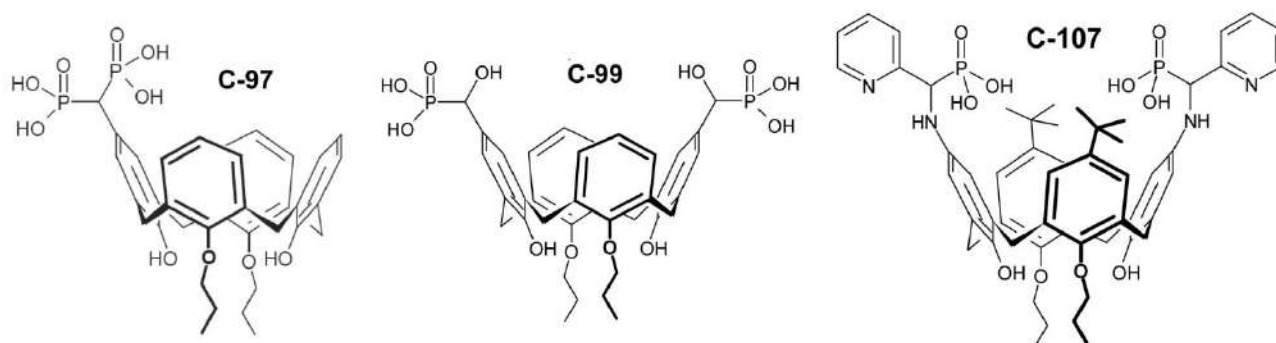


Рис. 1.3.2. Структурні формули калікс[4]аренів С-97, С-99 та С-107

Продемонстровано, що калікс[4]арени С-97 та С-99 виявляють гальмівний вплив також на АТР-гідролазну активність актоміозину та АТРази субфрагмента-1 (голівки) міозина (С-99) міометрія, але навіть за концентрації ефекторів 100 мкМ максимальний ефект інгібування сягав 50 % для С-97 та 70 % для С-99 [13]. Кінетичні розрахунки вказують на неконкурентне інгібування калікс[4]аренами (на прикладі С-99) АТРази голівки міозина щодо Mg^{2+} та АТР, але зменшення числа обертів АТРази [12, 57]. В той же час калікс[4]арен С-107 концентарційно-залежно (10-100 мкМ) активував вдвічі як АТРазну активність актоміозину, так і субфрагмента-1 міозина міометрія [13].

Таким чином, калікс[4]арени C-97, C-99 та C-107 не тільки здатні ефективно інгібувати активність Na^+ , K^+ -АТРази ПМ, а й впливати на активність АТРази скоротливих білків – актоміозинового комплексу міоцитів матки.

Ключова роль Ca^{2+} -помп ПМ та СР у регулюванні Ca^{2+} -гомеостаза у спокої та їх залучення в процеси фармакомеханічного скорочення/розслаблення ГМК матки зумовлює пошук ефекторів їхньої активності. І якщо для SERCA високоафінними інгібіторами були знайдені тапсигаргін та циклопіазонієва кислота, то для РМСА дане питання залишається відкритим.

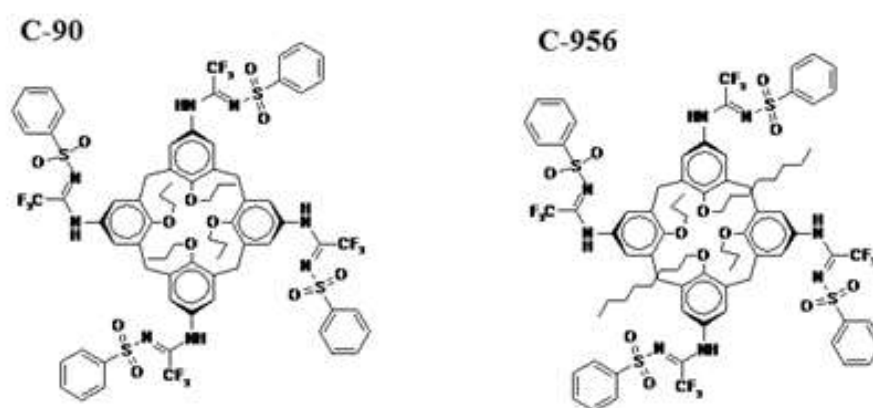


Рис. 1.3.3. Структурні формули калікс[4]аренів C-90 та C-956

Було показано, що калікс[4]арен C-90, який модифікований по верхньому вінцю сульфониламідinovими групами (рис. 1.3.3), на рівні ПМ специфічно інгібує Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаду як у фракції ПМ ($I_{0,5}=20$ мкМ), так і солюбілізований високо очищений ензим ($I_{0,5}=60$ мкМ) [455]. Він виступає неконкурентним інгібітором по відношенню до Ca^{2+} , АТР та Mg^{2+} , але зменшує максимальну швидкість гідролізу АТР [21-22]. На суспензії міоцитів було продемонстровано, що C-90 та його аналог C-956 ефективно пригнічують як Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаду ПМ ($I_{0,5}= 20$ мкМ та 15 мкМ відповідно), але й Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаду СР ($I_{0,5}= 57$ мкМ для C-90) [456-457]. Характер інгібувальної дії обох калікс[4]аренів має неконкурентний характер. Зазначені калікс[4]арени (20 мкМ) викликають зростання іонізованого Са в цитоплазмі міоцитів та зменшують їхній гідродинамічний діаметр на 30 % (C-90) та 50 % (C-956), аналогічно до дії утеротоніка окситоцину (100 нМ), який зменшує гідродинамічний діаметр міоцитів на 20-30 % [21, 456-457]. Також виявлено активуючий вплив C-90 на АТРаду активність актоміозина [58].

В роботі [75] продемонстровано зниження сили скорочень гладеньких м'язів міометрія під дією каліксарену С-90, яке відбувається NO-залежним шляхом, та уповільнення розслаблення (зменшення нормованої максимальної швидкості розслаблення V_{nr}), скоріше за все пов'язане як з пригніченням Ca^{2+} -транспортувальної функції кальцієвої помпи ПМ, так і активуючим впливом на АТРаду скоротливих білків.

На клітинній суспензії міоцитів матки, зокрема показано, що макроцикл С-91 (рис. 1.3.4) в концентрації 10-100 мкМ стимулює (на 173%) енергозалежну акумуляцію Ca^{2+} в МХ, не впливає на пасивний вихід катіону з органел та накопичення Ca^{2+} в СР [79].

Калікс [4]арени, що містять на нижньому вінці макроциклу халкони – ароматичні кетони, представники класу флавоноїдів

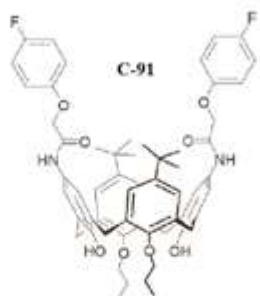


Рис. 1.3.4. Структурна формула калікс[4]арену С-91

(рис. 1.3.5) – викликають зростання поляризації ВММ міометрія (С-136 та С-137, які містять по 2 халконових замісники), за їх присутності зростає концентрація іонізованого Са в матриксі та стимулюється його енергозалежна акумуляція (більш ефективним виявився С-138 з 1 халконовим замісником) [6, 9].

Отже, супрамолекулярні макроцикли калікс[4]арени, які є малотоксичними та володіють широким спектром біологічної активності, є перспективними для використання їх як модуляторів Ca^{2+} -залежних процесів, в тому числі синтезі NO, в ГМ клітинах, зокрема міометрія.

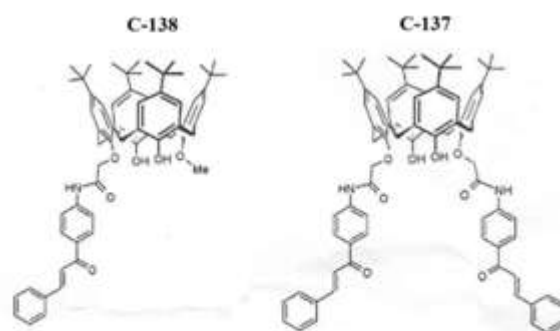


Рис. 1.3.5. Структурні формули халконовмісних калікс[4]аренів

Узагальнення до розділу 1

Регуляція функціональної активності гладенького м'язу матки є комплексною проблемою і потребує систематичних біохімічних досліджень з огляду на високу частоту спонтанних передчасних пологів або викиднів, причини 50 % з них є на сьогодні незрозумілими.

Доведено, що оксид азоту та його метаболіти (нітрити та нітрати) продукуються в матці та плаценті під час вагітності. Оксид азоту відіграє важливу фізіологічну роль в підтриманні вагітності – діє як релаксуючий фактор –, а кількість та чутливість до нього знижується перед пологами. За даними літератури джерелами NO в матці можуть слугувати ендометрій, ендотелій судин, нервові закінчення, які забезпечують нітратергічну іннервацію органу, плацента і трофобласти в період ранньої вагітності. Інформація щодо власного синтезу NO саме в міометрії, зокрема джерела його біосинтезу та компартменталізація в міоцитах, доволі обмежена. В клітинах різних типів гладеньких м'язів релаксуючий ефект NO пов'язаний із зростанням вмісту cGMP в міоплазмі, регуляторний шлях L-аргінін/NO/cGMP активується під час вагітності, а його функціональна значущість продемонстрована в жіночому міометрії, а також в дослідях на щурах, мурчаках та кролях. Альтернативним механізмом дії NO в гладеньких м'язах, зокрема і в жіночому міометрії, може бути безпосередня хімічна модифікація через S-нітрозилування іонних каналів та pomp, яка веде до зміни їхньої активності і може здійснюватись високореакційними нітрозилуючими похідними оксиду азоту.

Таким чином, комплексні біохімічні дослідження, спрямовані на з'ясування джерел та властивостей біосинтезу NO, ефектів нітросполук на мембранні фізико-хімічні процеси, транспортувальні системи субклітинних структур, зокрема МХ, є важливими для розуміння механізмів, які лежать в основі регуляції функції міометрія оксидом азоту і послуговують вирішенням актуальної наукової проблеми.

Зростання концентрації іонів Ca є центральним етапом послідовності біохімічних і біофізичних подій між збудженням плазмалеми та розвитком скоро-

чення міометрія (Е(Ф)МС). Збільшення/зменшення концентрації Ca^{2+} забезпечують функціонування каналів, pomp, обмінників ПМ, СР та МХ, між якими існують численні прямі і зворотні, негативні та позитивні регуляторні зв'язки. Внаслідок цього виникає феномен чітко організованого Ca^{2+} -сигналіngu у часі та просторі. З'ясування впливу оксиду азоту на концентрацію Ca^{2+} в міоплазмі клітин міометрія і дослідження можливих мембранних та іонних механізмів цього впливу, розуміння ролі МХ в регуляції Ca^{2+} -гомеостазу, зокрема їхньої NO-синтазної здатності, в гладеньком'язових клітинах є напрочуд важливим.

Аналіз літератури дає можливість припустити, що потужним джерелом синтезу NO в міоцитах матки можуть виступати МХ, який здатний регулювати енергетичні, метаболічні, транспортувальні процеси в органелах та підтримувати оптимальну концентрацію Ca^{2+} як в міоплазмі, так і мітохондрійному матриксі. Крім того, NO, синтезований в МХ, може впливати на катіон-транспортувальні структури ПМ, наслідком чого може бути зміни поляризації (в напрямку зростання) ПМ. Зокрема існують припущення щодо стимулювального впливу NO на K^+ -провідність ПМ, що може мати наслідком зниження збудливості ГМК матки.

Розуміння ролі оксиду азоту в регуляції Ca^{2+} -гомеостазу та загалом функціональної активності МХ в ГМК може бути основою для пошуку селективних екзогенних нетоксичних модуляторів транспорту Ca^{2+} , біоенергетики та біосинтезу NO в МХ, який доречно проводити серед представників калікс[4]аренів, та умовою для створення фармпрепаратів, які б мали змогу ефективно регулювати активність внутрішніх органів, зокрема й контрактильну здатність матки.

Вирішенню цих питань присвячена експериментальна частина дисертації.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. МЕТОДИ ПРЕПАРАТИВНОЇ БІОХІМІЇ

В дослідах використовувались статевозрілі невагітні нелінійні щури віком 2 місяці, середня маса тіла 200 г, маса матки 350-600 мг. Тварин вводили в стан наркозу шляхом витримування у камері, збагаченій парами хлороформу, після чого декапітували. Усі маніпуляції з тваринами були проведенні відповідно до Закону України № 3447 IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» та Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та наукових цілей (Страсбург, 1986).

2.1.1. Виділення суспензії міоцитів з міометрія щурів

Суспензію ГМК матки невагітних щурів одержували із використанням колагенази і соєвого інгібітору трипсину за допомогою методу Молларда [318], який використовували в деякій модифікації [7]. Після видалення матки її звільняли від жиру і сполучної тканини та переносили в розчин Хенкса (розчин А) наступного складу, (мМ): 136,9 NaCl, 5,36 KCl, 0,44 KH_2PO_4 , 0,26 NaHCO₃, 0,26 Na₂HPO₄, 1,26 CaCl₂, 0,4 MgCl₂, 0,4 MgSO₄, 5,5 глюкоза, 10 HEPES (pH, 7,4; 37 °C). Потім тканину подрібнювали ножицями на невеликі шматочки (середній розмір – 2 на 2 мм) і відмивали від крові та високих концентрацій іонів Ca (3 рази по 5 хв) в 5 мл розчину Б (розчин Хенкса вищепризведеного складу, який не містить MgCl₂ і MgSO₄ та містить CaCl₂ в концентрації 0,03 мМ). Після цього шматочки тканини інкубували протягом 20 хв (37 °C, режим постійного перемішування) у 2 мл середовища дисоціації тканини, яке являє собою розчин колагенази тип IA (0,1 %), бичачого сироваткового альбуміна (0,1 %) і соєвого інгібітора трипсину (0,01 %), що був приготований на розчині Б. Через 20 хв середовище дисоціації тканини відбирали, а тканину переносили в вільний від ензиматичного препарату розчин Б. Для прискорення дисоціації клітин тканинний препарат 15-20 разів обережно піпетували за допомогою скляної піпетки 1-2 хв. Розчин Б, який містить дисоційовані клітини, відбирали, а тканинний препарат знову переносили в нову порцію середовища дисоціації клітин, що міс-

тять колагеназу, бичачий сироватковий альбумін та соєвий інгібітор трипсину. Цю процедуру повторювали 5-6 разів. Дві перші порції розчину Б, що використовувався для піпетування (не містив колагенази та соєвого інгібітору трипсину і містив дисоційовані клітини), відкидали, в зв'язку з тим, що вони містили фрагменти тканини і пошкоджені клітини. Остані 3-4 порції збирали, об'єднували і центрифугували 10 хв при 80 g. Отриманий осад клітин промивали розчином Б і знову центрифугували у вказаному вище режимі. Потім клітини зберігали в розчині Б при низькій температурі (ставили на лід) та проводили запланований дослід.

2.1.2. Виділення фракції плазматичних мембран міометрія свині

Фракцію ПМ ГМК виділяли з міометрія свині за методикою, що описана в роботі [48]. Для цього 15 г тканини подрібнювали ножицями і гомогенізували у середовищі гомогенізації за допомогою ножового гомогенізатора 3 рази по 20 сек. Співвідношення тканина : середовище гомогенізації дорівнювало 1:4. Середовище гомогенізації мало наступний склад, мМ: 20 Трис-НСІ (рН 7,4, 8 °С), 250 цукроза, 2 ЕДТО, 0,6 КСІ. Отриманий гомогенат центрифугували протягом 18 хв при 6000 g. Надосадову рідину нашаровували на ступінчатий градієнт сахарози у наступному порядку і співвідношенні — 30 % цукроза : 15 % цукроза : надосадова рідина = 6 мл : 5 мл : 20 мл. Три пробірки із системою ступінчатого градієнта центрифугували 90 хв при 105000 g на бакет-роторі при +8 °С. Фракцію ПМ збирали в зоні 15 % цукрози. Отриману суспензію мембран розводили охолодженим бідистилятом до 2,5 % цукрози і осаджували протягом 1 години при 105000 g на кутовому роторі. Отриманий осад суспендували в 3 мл середовища наступного складу: 20 мМ Трис-НСІ (рН 7,4, 8 °С), 150 мМ КСІ. Суспензію препарату ПМ зберігали в скрапленому азоті.

2.1.3. Одержання фракції мітохондрій міометрія

Препарат ізольованих МХ одержували із міометрія невагітних щурів за допомогою методу диференційного центрифугування як описано раніше [52]. Після виділення матки і очищення її від жирової та сполучної тканини м'язевий

препарат знаходився у 0,9 % розчин NaCl. Препарат подрібнювали ножицями на шматочки розміром приблизно 2x2 мм, які переносили у робочий розчин з температурою 4°C наступного складу: 10 mM HEPES (pH = 7,4), 250 mM цукроза, 1 mM EGTA. Тканину гомогенізували за допомогою гомогенізатору Heidolph Silent Crusher M (Германія) 3 рази по 20 с із охолодженням на льоду протягом 1 хв, співвідношення тканина : робочий розчин складало 1 : 9. Гомогенат центрифугували протягом 15 хв при 1 тис. g за температури 4°C. Супернатант збирали та центрифугували протягом 15 хв при 12 тис. g за температури 4°C. Осад ресуспендували у робочому розчині наступного складу: 10 mM HEPES (pH = 7,4), 250 mM цукроза, і знову центрифугували протягом 15 хв при 12 тис. g за температури 4°C. Одержану фракцію ізольованих MX ресуспендували в буфері 10 mM HEPES (pH = 7,4), 250 mM цукроза, 1 мг/мл бичачого сироваткового альбуміну у співвідношенні 100 мг тканини:100 мл буфера. Фракцію ізольованих MX впродовж експерименту зберігали на льоду.

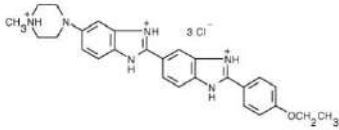


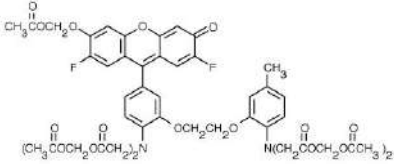
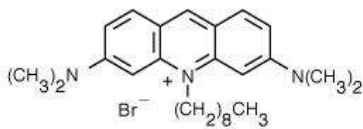
Вміст протеїну у фракції ПМ та MX визначали стандартним методом Bradford за його реакцією з реактивом Кумасі G250 [121]. Середнє значення вмісту протеїну у MX фракції складало 2 мг/мл.

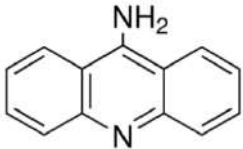
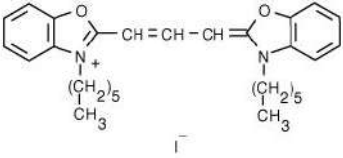
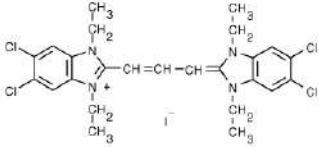
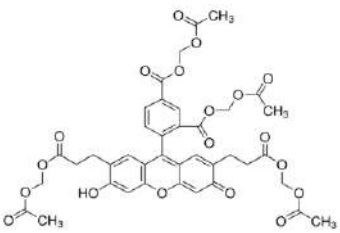
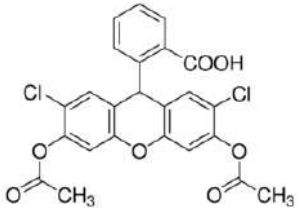
2.2. ФЛУОРЕСЦЕНТНІ МЕТОДИ

Флуоресцентні дослідження проводили із використанням спектрофлуориметра Quanta Master 40 PТІ (Канада) із програмним забезпеченням FelixGX 4.1.0.3096, протокового цитофлуориметра COULTER EPICS XL™ (Beckman-Coulter, США), що обладнаний аргоновим лазером ($\lambda_{36} = 488$ нм) із програмним забезпеченням SYSTEMII™ Software (BeckmanCoulter, США). Просторовий розподіл флуоресцентних барвників у клітині досліджували на лазерному скануючому конфокальному мікроскопі LSM 510 META (“Carl Zeiss”, Німеччина).

В експериментальній роботі були використані флуоресцентні барвники, описані в таблиці 2.2.1.

Таблиця 2.2.1. Флуоресцентні барвники, використані в дослідженнях

Структурна формула	Назва	Хімічна формула	специфічність
	Ноеchst 33342	$C_{27}H_{37}Cl_3N_6O_4$; 2,5'-Bi-1H-benzimidazole, 2'-(4-ethoxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-23491-52-3	барвник, специфічний до ядер
	MitoTracker Orange CM-H2TMRos	$C_{24}H_{25}ClN_2O$	барвник, специфічний до мітохондрій
	DAF-FM	$C_{21}H_{14}F_2N_2O_5$; 4-Amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein, Diaminofluorescein-FM	NO-специфічний
	Fluo-4 AM	$C_{51}H_{50}F_2N_2O_{23}$; Glycine, N-[4-[6-[(acetyloxy)methoxy]-2,7-difluoro-3-oxo-3H-xanthen-9-yl]-2-[2-[2-[bis [2-[(acetyloxy)methoxy]-2-oxoethyl] amino]-5-methylphenoxy] ethoxy] phenyl]-N-[2-[(acetyloxy)methoxy]-2-oxoethyl]- (acetyloxy)methyl ester	Ca^{2+} -чутливий
	NAO (Acridine Orange 10-Nonyl Bromide)	$C_{26}H_{38}BrN_3$; Acridinium, 3,6-bis(dimethylamino)-10-nonyl-, bromide	барвник, специфічний до кардіоліпіна мітохондрій

	9-AA	C ₁₃ H ₁₀ N ₂ ; 9-Aminoacridine	ΔpH-чутливий
	DiOC ₆ (3) (3,3'- Dihexyloxacar bocyanine Iodide)	C ₂₉ H ₃₇ N ₂ O ₂ ; Benzoxazolium, 3- hexyl-2-(3-(3-hexyl- 2(3H)- benzoxazolylidene)-1- propenyl)-, iodide	Потенціалчу- тливий
	JC-1	C ₂₅ H ₂₇ Cl ₄ N ₄ ; 5,5',6,6'-tetrachloro- 1,1',3,3'- tetraethylbenzimidazol ylcarbocyanine iodide	Потенціалчу- тливий
	BCECF-AM	2',7'-Bis(2- carboxyethyl)-5(6)- carboxyfluorescein tetrakis(acetoxymethyl) ester	pH-чутливий
	DCF-DA	C ₂₄ H ₁₆ Cl ₂ O ₇ ; 2',7'- dichlorofluorescein diacetate	барвник, специфічний до активних форм кисню

2.2.1. Процедура іммобілізації міоцитів із використанням полі-L-лізину

Клітини для проведення конфокально-мікроскопічних досліджень (об'єм суспензії 100 мкл) іммобілізували 2 год на предметному склі, обробленому полі-L-лізином (200 мкл), при температурі 24⁰С. Неприкріплені міоцити відмивали розчином Хенкса Б (див. вище), після чого до іммобілізованих клітин додавали 100 мкл розчину Б, клітини обробляли відповідними барвниками і проводили подальші дослідження.

2.2.2. Навантаження флуоресцентними барвниками клітин та проведення конфокально-мікроскопічних досліджень

Просторовий розподіл флуоресцентних барвників у клітині досліджували на лазерному скануючому конфокальному мікроскопі LSM 510 META (“Carl Zeiss”, Німеччина) із використанням іммобілізованих на полі-L-лізині міоцитів.

Експерименти проводили при температурі 24 °C. Дослідження на конфокальному мікроскопі проводили у режимі Multi Track. Вивчення кінетики розподілу флуоресцентних барвників у клітині проводили у режимі Time Series, а для кількісного аналізу застосовували функцію ROI (Region Of Interest), яка дозволяє отримувати графік залежності інтенсивності флуоресценції від часу, усереднену по виділеній області.

Для візуалізації ядер клітини навантажували 50 нМ Hoechst 33342, молекула якого є гідрофобною та несе позитивний заряд, що забезпечує його проходження через ліпідний бішар ПМ та ядерну оболонку, а також зв'язування з ДНК (АТ-багаті ділянки). Флуоресценцію Hoechst 33342 збуджували за допомогою лазера на довжині хвилі 405 нм, а для реєстрації сигналу використовували світлофільтр BP 420-480.

Для візуалізації МХ був залучений флуоресцентний барвник MitoTracker Orange CM-H₂TMRos у концентрації 200 нМ. MitoTracker Orange CM-H₂TMRos проникає в активно дихаючі клітини, окислюється до MitoTracker Orange CM-TMRos і набуває позитивно зарядженої форми, яка акумулюється переважно в МХ, завдяки більш негативному заряду на внутрішній мембрані. Там барвник зв'язується з тільними групами протеїнів та пептидів, формуючи альдегід-стабільні кон'югати. Для збудження флуоресценції MitoTracker Orange CM-H₂TMRos використовували лазер з довжиною хвилі 543 нм, а для реєстрації сигналу використовували світлофільтр BP 560-615.

NO-чутливий флуоресцентний зонд DAF-FM безпосередньо взаємодіє з NO за присутності O₂, в результаті чого утворюється триазоло-флуоресцеїнове похідне (DAF-FM-T), яке має більший квантовий вихід флуоресценції [331]. Навантаження іммобілізованих міоцитів DAF-FM в концентрації 10 мкМ про-

водили протягом 15 хв при температурі 24°C в розчині Хенкса Б, після чого клітини відмивали від барвника, знову розчиняли в середовищі Хенкса Б та проводили дослідження. Збудження флуоресценції DAF-FM здійснювали довжиною хвилі 488 нм, а її реєстрацію світлофільтром BP 505-530.

Навантаження іммобілізованих міоцитів Ca^{2+} -чутливим флуоресцентним зондом Fluo-4 AM в концентрації 10 мкМ відбувалося протягом 20 хв при температурі 24°C в розчині Хенкса Б, після чого проводились дослідження. Збудження флуоресценції Fluo-4 AM здійснювали на довжині хвилі 488 нм, реєстрували в діапазоні 505-530 нм (світлофільтр BP 505-530).

Флуоресценцію ΔpH -чутливого 9-аміноакридину (10 мкМ 9-AA) досліджували за збудження 405 нм та реєстрації сигналу світлофільтром BP 420-480.

Навантаження кардіоліпін-специфічним 1 мкМ 10-ноніл акридиноранжем (NAO) та потенціал чутливим $\text{DiOC}_6(3)$ в концентрації 100 нМ (при вивченні зміни мембранного потенціалу) або 500 нМ (для дослідження солокалізації барвників) проводили протягом 15 хв. Збудження їхньої флуоресценції здійснювали довжиною хвилі 488 нм, реєстрували в діапазоні 505-530 нм (світлофільтр BP 505-530).

2.2.3. Вивчення біохімічних властивостей біосинтезу NO ізольованими мітохондріями міометрія щурів методом протокової цитометрії

Утворення оксиду азоту в ізольованих МХ вивчали методом протокової цитометрії. Використовували робочий протокол аналізу зразків, який був створений нами для характеристики фракції ізольованих МХ міометрія за флуоресценцією DAF-FM ($\lambda_{\text{зб}} = 488$ нм, $\lambda_{\text{фл}} = 515$ нм (канал F11)). Події для аналізу обирались шляхом введення логічного обмеження за параметрами бічного та прямого світлорозсіювання (SS та FS) в протокол протокового цитометра. Аналіз проб припинявся за умови реєстрації 10000 подій в межах виділеної області.

NO-чутливий флуоресцентний барвник DAF-FM вносили безпосередньо в середовище інкубації в експериментально підібраній концентрації 0,5 мкМ. При визначенні оптимальної концентрації зонда для визначення NO досліджували його концентрацію в діапазоні 0,1-10 мкМ.

Активність mtNOS досліджували в присутності субстратів дихання (5 мМ піруват та сукцинат), L-аргініна (1-100 мкМ), Ca^{2+} (10-500 мкМ, в деяких випадках 1 мМ), кофакторів (10 мкМ тетрагідробіоптерин (BH_4) та FAD), NADPH (10 мкМ), а також 10 мкМ рутенієвого червоного (RuR), 7,5 мкг/мл аламетицину та N^G -нітро-L-аргініна, 0,5 мМ ADP. Для дослідження залежності продукції NO MX від їхнього енергетичного статусу використовували інгібітори ЕТЛ (5 мкМ ротенон, 1 мкг/мл антимицин А, 2,5 мкМ олігоміцин) та 10 мкМ протонофор карбоніл-ціанід 3-хлорофенілгідрозон (СССР).

Склад середовища інкубації (за виключенням дослідження концентраційних залежностей від L-аргініна та Ca^{2+}), мМ: 20 HEPES (pH 7,4, 24 °C), 2 K^+ -фосфатний буфер (pH 7,4, 24 °C), 120 KCl, 5 піруват, 5 сукцинат, 0,05 L-аргінін, 0,1 Ca^{2+} , 0,01 NADPH, 0,01 BH_4 , аліквота мітохондрійної фракції містила 15-20 мкг протеїна.

За “нульову точку” приймали одиниці флуоресценції DAF-FM+MX. Реакцію ініціювали внесенням аліквоти 20 мкл L-аргінін+ Ca^{2+} . Тривалість проведення ферментативної реакції 30 хв. Контролем слугувало утворення NO в мітохондріях за відсутності екзогенно доданих L-аргініна та Ca^{2+} .

2.2.4. Процедура навантаження мітохондрій флуоресцентним зондом Fluo-4 AM

Навантаження MX Ca^{2+} -чутливим флуоресцентним зондом Fluo-4 AM у концентрації 2 мкМ проводили у середовищі, яке містило 10 мМ HEPES (pH 7,4; 37°C), 250 мМ цукрозу, 0,1 % бичачий сироватковий альбумін протягом 30 хв при температурі 37°C. Для покращення процесу навантаження змішували барвник із Pluronic F-127 (0,02 %).

2.2.5. Дослідження змін вмісту іонізованого Ca в ізольованих мітохондріях із використанням методу спектрофлуориметрії

Реєстрацію відносних значень рівня Ca^{2+} в матриці MX 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.

Середовище, із якого здійснювалась енергозалежна акумуляція Ca^{2+} МХ, мало склад (мМ): 20 НЕРЕС (рН 7,4, 37 °С), 2 K^+ -фосфатний буфер (рН 7,4, 37 °С), 250 цукроза, 3 MgCl_2 , 3 АТР, 5 сукцинат натрію, концентрація Ca^{2+} становила 20-80 мкМ. Енергозалежну акумуляцію Ca^{2+} проводили протягом 5 хв.

У випадку дослідження ΔpH -індукованого вивільнення іонів Ca^{2+} з МХ попередню енергозалежну акумуляцію Ca^{2+} проводили протягом 5 хв, після чого аліквоту суспензії (100 мкл) розводили в середовищі вивільнення Ca^{2+} (2 мл) наступного складу, мМ: 20 НЕРЕС (рН 6,0-8,0; 37 °С), 2 K^+ -фосфатний буфер (рН 6,0-8,0; 37 °С), 250 цукроза, 5 сукцинат натрію, 5 мкМ циклоспорин А (Csp). Концентрація Ca^{2+} в середовищі вивільнення катіону становила 4 мкМ. Така концентрація є наслідком розведення аліквоти середовища, із якого здійснювалась енергозалежна акумуляція Ca^{2+} МХ (80 мкМ Ca^{2+}), в середовищі вивільнення катіону у 20 разів.

При дослідженні впливу градієнту одновалентних катіонів на ΔpH -індукований вихід Ca^{2+} з МХ 250 мМ цукрозу ізотонічно замінювали на 150 мМ холінхлорид або 20 мМ NaCl (KCl , LiCl) + 130 мМ холінхлорид.

2.2.6. Вивчення динаміки вмісту іонізованого Ca^{2+} в ізольованих мітохондріях із використанням методу протокової цитометрії

Вивчення змін іонізованого Ca^{2+} в матриці МХ проводили також із використанням методу протокової цитофлуориметрії на протоковому цитометрі COULTER EPICS XLTM. Використовували робочий протокол аналізу зразків, який був створений для характеристики фракції ізольованих МХ міомерією за флуоресценцією Fluo-4 ($\lambda_{\text{зб}} = 488$ нм, $\lambda_{\text{фл}} = 520$ нм (канал F11)). Події для аналізу обирались шляхом введення логічного обмеження за параметрами бічного та прямого світлорозсіювання (SS та FS) в протокол протокового цитофлуориметру. Аналіз проб припинявся за умови реєстрації 10000 подій в межах виділеної області.

Дослідження проводились при температурі 24°C. Реєстрацію умовних значень рівня Ca^{2+} в матриці МХ у середовищі наступного складу, мМ: 20

HEPES (pH 7,4), 2 K⁺-фосфатний буфер (pH 7,4), 250 цукроза, 3 MgCl₂, 3 АТР, 5 сукцинат натрія, концентрація Ca²⁺ становила 80 мкМ.

2.2.7. Навантаження мітохондрій рН-чутливим зондом BCECF-AM

Навантаження МХ зондом BCECF-AM у концентрації 5 мкМ проводили у середовищі, яке містило 10 мМ HEPES (pH 7,4, 37°C), 250 мМ цукрозу, 0,1% бичачий сироватковий альбумін та 0,02 % PluronicF-127 протягом 20 хв при температурі 25 °С. Зонд, який не акумулювався в матриксі, відокремлювали від МХ шляхом переосадження при 12 тис. g протягом 15 хв. Ресуспендували і зберігали МХ у вищеописаному середовищі.

2.2.8. Дослідження змін рН матриксу в ізольованих мітохондріях із використанням методу спектрофлуориметрії

Реєстрацію флуоресценції BCECF-AM в МХ ($\lambda_{\text{зб}} = 510$ нм, $\lambda_{\text{фл}} = 535$ нм) здійснювали на спектрофлуориметрі QuantaMaster 40 РТІ.

Середовище інкубації мало наступний склад, мМ: 20 HEPES (pH 6,0-8,0, 37°C), 2 K⁺-фосфатний буфер (pH 6,0-8,0, 37°C), 250 цукроза, 5 сукцинат натрія, 5 мкМ Csр.

2.2.9. Процедура навантаження мітохондрій флуоресцентним зондом DCF-DA

Навантаження МХ АФК-чутливим флуоресцентним зондом DCF-DA у концентрації 25 мкМ проводили у середовищі, яке містило 10 мМ HEPES (pH 7,4; 25°C), 250 мМ цукрозу, 0,1 % бичачий сироватковий альбумін протягом 30 хв при температурі 25°C. Для покращення процесу навантаження змішували барвник із Pluronic F-127 (0,02 %).

2.2.10. Вивчення утворення активних форм кисню за допомогою флуоресцентного зонду DCF-DA та метода протокової цитометрії

Утворення АФК в ізольованих МХ вивчали із використанням методу протокової цитофлуориметрії на протоковому цитометрі COULTER EPICS XLTM. Створено робочий протокол аналізу зразків для характеристики фракції ізольо-

ваних МХ міометрія за флуоресценцією DCF-DA ($\lambda_{36} = 488$ нм, $\lambda_{фл} = 515$ нм (канал F11)). Події для аналізу обирались шляхом введення логічного обмеження за параметрами бічного та прямого світлорозсіювання (SS та FS) в протокол протокового цитофлуориметру. Аналіз проб припинявся за умови реєстрації 10000 подій в межах виділеної області.

Середовище інкубації мало склад, мМ: 20 Нерес (рН 7,4, 25 °С), 2 К⁺-фосфатний буфер (рН 7,4, 25°С), 25 КСl, 25 NaCl. Вміст протеїну в мітохондрійній фракції складав 15-20 мкг. Реакцію ініціювали внесенням аліквоти 20 мкл 5 мМ піруват+5 мМ сукцинат.

2.2.11. Вивчення змін мембранного потенціалу мітохондрій інтактних міоцитів із використанням методу лазерної конфокальної мікроскопії

Для візуалізації МХ були залучені флуоресцентні барвники 200 нМ MitoTracker Orange CM-H₂TMRos, 10 мкМ 9-аміноакридин (АА) та 1 мкМ 10-ноніл-акридиноранж (NAO), а для візуалізації ядер клітин – 50 мкМ Hoechst 33342. Розподіл DiOC₆(3) в клітині спостерігали за концентрації 200 нМ. В даних експериментах створювали умови штучного колапсу потенціалу на ПМ попередньою інкубацією міоцитів із 1 мМ убаїном.

2.2.12. Реєстрація змін мембранного потенціалу мітохондрій інтактних міоцитів із використанням флуориметричного методу

Зміни трансмембранного потенціалу ПМ і внутрішньої МХ мембран інтактних міоцитів реєстрували за інтенсивністю флуоресценції потенціалчутливого зонда DiOC₆(3). Зміни флуоресценції DiOC₆(3) вивчали за допомогою спектрофлуориметра Signe-4М ($\lambda_{36} = 485$ нм, $\lambda_{фл} = 505$ нм) та протокового цитометра Coulter EpicsXLTM ($\lambda_{36} = 488$ нм, $\lambda_{фл} = 505$ нм (канал F11)). Виміри проводились в фізіологічному середовищі Хенкса наступного складу: 137 мМ NaCl, 5,36 мМ КСl, 0,44 мМ КН₂РО₄, 0,26 мМ NaHCO₃, 0,26 мМ Na₂НРО₄, 0,1 % глюкоза, 10 мМ НЕРЕС (рН 7,4), 0,03 або 1,26 мМ СаСl₂.

При дослідженні впливу вибраних ефекторів на потенціал ПМ клітини попередньо інкубували з 5 мМ NaN₃ протягом 5 хв для надійного інгібування

відповіді МХ, інтенсивність флуоресценції DiOC₆(3) реєстрували протягом 3-5 хв інкубації міоцитів з барвником та додавали аліквоти розчинів досліджуваних сполук. В цих дослідженнях концентрація DiOC₆(3) складала 100 нМ.

З метою вивчення впливу вибраних ефекторів на поляризацію МХ мембрани спочатку реєстрували інтенсивність флуоресценції DiOC₆(3) на 3 хв інкубації міоцитів з зондом, далі вносили 1 мМ убаїн і інкубували клітини 5 хв для надійної деполяризації ПМ, і вже потім додавали аліквоти розчинів досліджуваних сполук.

2.2.13. Реєстрація змін мембранного потенціалу в ізольованих мітохондріях

Зміни потенціалу ВММ досліджували з використання потенціалчутливого зонду JC-1 (1 мкМ) з залученням методу спектрофлуориметрії: $\lambda_{\text{зб}} = 488$ нм, $\lambda_{\text{фл}} = 535$ (мономер) та 595 (J-агрегат) нм на спектрофлуориметрі QuantaMaster 40 РТІ. Відносне значення одиниць флуоресценції 595/535 відображає зміни мембранного потенціалу МХ.

Середовище інкубації мало склад: 20 мМ Нерес (рН 7,4, 37°C), 2 мМ К⁺-фосфатний буфер (рН 7,4, 37 °C), 125 мМ КСl, 25 мМ NaCl. Вміст протеїну в мітохондрійній фракції складав 50 мкг.

2.2.14. Реєстрація К⁺-рівноважного потенціалу на плазматичній мембрані клітин міометрія і вивчення його модуляції методом протокової цитометрії

Препарат везикул сарколеми попередньо врівноважували в середовищі, що містило 300 мМ КСl, 20 мМ НЕРЕС-Трис (рН 7,4) протягом 15-18 год при 4⁰С.

Встановлення К⁺-рівноважного потенціалу в системі забезпечувалось в присутності 0,5 мкМ валіноміцина. Значення К⁺-рівноважного потенціалу розраховували за рівнянням Нернста:

$$\Delta\varphi = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K^+]_e}{[K^+]_i}, \quad (1)$$

де $[K^+]_e$ та $[K^+]_i$ – концентрація калію поза та в середині везикул відповідно.

Зміни флуоресценції DiOC₆(3) із застосуванням метода протокової цитометрії ($\lambda_{\text{зб}} = 488$ нм, $\lambda_{\text{фл}} = 505$ нм (канал F11)) досліджували в середовищі, що

містило 5 мкМ DiOC₆(3), 20 мМ HEPES-Трис (рН 7,4, 23⁰С), 150 мкг/мл білку, 0,5 мкМ валіноміцину. Потенціал задавали внесенням різних концентрацій КСІ відповідно до розрахунку за рівнянням Нернста (23⁰С), а іонну силу компенсували (до 300 мМ) додаванням холін-хлориду (Ch⁺). Значення K⁺-рівноважного потенціалу відповідно становили:

1. 300 мМ [K⁺]_i/300 мМ [K⁺]_e (Δφ= 0 мВ),
2. 300 мМ [K⁺]_i/250 мМ [K⁺]_e + 50 мМ [Ch⁺]_e (Δφ= -4,6 мВ),
3. 300 мМ [K⁺]_i/200 мМ [K⁺]_e + 100 мМ [Ch⁺]_e (Δφ= -10,3 мВ),
4. 300 мМ [K⁺]_i/150 мМ [K⁺]_e + 150 мМ [Ch⁺]_e (Δφ= -17,5 мВ),
5. 300 мМ [K⁺]_i/100 мМ [K⁺]_e + 200 мМ [Ch⁺]_e (Δφ= -27,8 мВ),
6. 300 мМ [K⁺]_i/50 мМ [K⁺]_e + 250 мМ [Ch⁺]_e (Δφ= -45,3 мВ),
7. 300 мМ [K⁺]_i/30 мМ [K⁺]_e + 270 мМ [Ch⁺]_e (Δφ= -58,3 мВ).

На рис. 2.2.1 репрезентовано типовий результат експерименту. Положення піку (PkPosX) відповідає інтенсивності флуоресцентної відповіді більшості везикул в їхній загальній популяції. Зміщення PkPosX залежить від величини калієвого градієнта, який спрямований з внутрішньовезикулярного середовища: відстань між положеннями контрольного піку (PkPosX₀ – везикули + зонд) та піку після додавання K⁺-іонофору валіноміцину (PkPosX_{Val} – везикули + зонд + Val) зменшується зі збільшенням градієнту калію. Після 2-3 хв відбувалась поступова дисипація наведеного потенціалу Δφ, що відображається у зміщенні PkPosX в напрямку збільшення інтенсивності флуоресценції (праворуч).

Для подальших розрахунків ми обрали різницю між інтенсивністю флуоресценції до (PkPosX₀) та після додавання валіноміцину (PkPosX_{Val}), що характеризує *флуоресцентну відповідь DiOC₆(3)* (ΔPkPosX_n) за умови різних концентрацій іонів калію в середовищі. Таким чином: $\Delta PkPosX_n = PkPosX_{Val} - PkPosX_0$, де n – це концентрація K⁺ (мМ) в середовищі інкубації. За одержаними даними було побудовано калібрувальну криву, яка відображає взаємозв'язок між флуоресцентною відповіддю зонду при різних концентраціях K⁺ в середовищі та величиною потенціалу, розрахованого за рівнянням Нернста. Пряма залежність між флуоресцентною відповіддю зонду та розрахованим Δφ спостерігалась при зміні наведеного потенціалу від -58,3 мВ до -10,3 мВ. При зменшенні потенціалу

(тобто при зменшенні градієнту K^+) спостерігалось відхилення від лінійної залежності. Значення відносної флуоресцентної відповіді зонду (виражена у відносних одиницях) при зміні концентрації K^+ від 30 до 200 мМ ззовні везикул наближались до значень величини $\Delta\phi$, розрахованого за рівнянням Нернста.

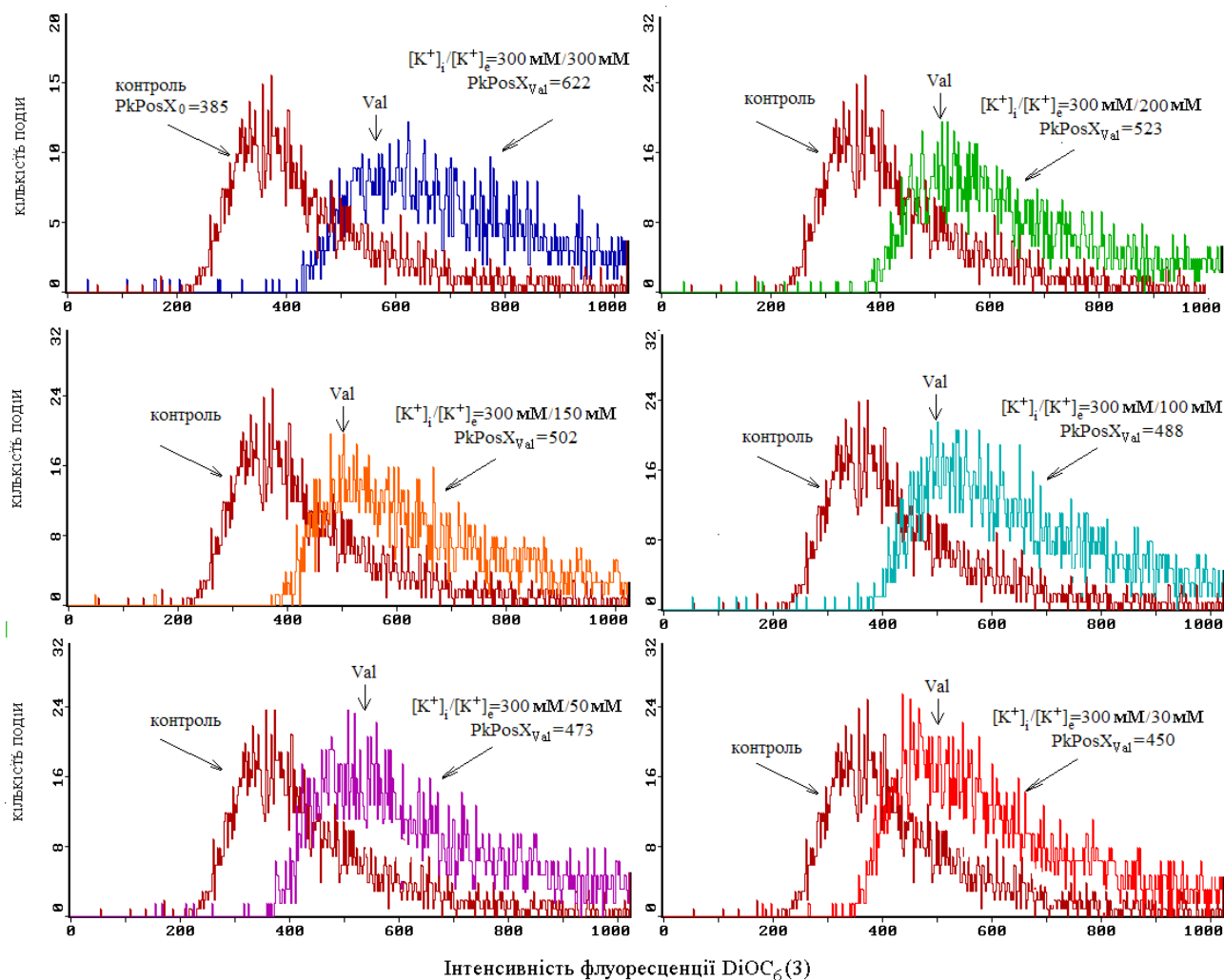


Рис. 2.2.1. Вплив валіноміцину на флуоресценцію $DiOC_6(3)$. (Val – валіноміцин (0,5 мкМ), $PkPosX_0$ – інтенсивність флуоресценції $DiOC_6(3)$ до внесення в середовище інкубації валіноміцину, $PkPosX_{Val}$ – інтенсивність флуоресценції $DiOC_6(3)$ (після внесення валіноміцину). Дані типового дослідження)

Для оцінки впливу 50 мкМ SNP та SN на K^+ -рівноважний потенціал ПМ нами було використано емпіричні формули розрахунку відносних одиниць флуоресценції $DiOC_6(3)$, які відповідали б залежності флуоресцентної відповіді зонду від значення $\Delta\phi$, розрахованого за рівнянням Нернста, тобто мали фізичний зміст.

$$\text{Контроль: ефект(в.о.)} = \frac{\Delta PkPosX_{100}}{\Delta PkPosX_{300}}, \quad (2)$$

де $\Delta PkPosX_{300}$ – різниця між положеннями піків до та після внесення валіноміцину при $\Delta\phi = 0$ мВ ($[K^+]_i=[K^+]_e=300$ мМ), $\Delta PkPosX_{100}$ – різниця між положеннями піків до та після внесення валіноміцину при $\Delta\phi = -27,8$ мВ (300 мМ $[K^+]_i/100$ мМ $[K^+]_e+200$ мМ $[Ch^+]_e$).

Характеристика впливу ефекторів на флуоресценцію зонда за наявності градієнту K^+ на мембрані:

$$\text{ефект(в.о.)} = \frac{\Delta PkPosX_{100(\text{ефектор})}}{\Delta PkPosX_{300(\text{ефектор})}}, \quad (3)$$

де $\Delta PkPosX_{300(\text{ефектор})}$ – різниця між положеннями піків до та після внесення ефекторів за відсутності градієнту іонів калію ($[K^+]_i=[K^+]_e=300$ мМ), $\Delta PkPosX_{100(\text{ефектор})}$ – різниця між положеннями піків до та після внесення діючих речовин за умов наявності градієнту K^+ спрямованого з внутрішньо везикулярного середовища (300 мМ $[K^+]_i/100$ мМ $[K^+]_e+200$ мМ $[Ch^+]_e$).

Дія ефекторів на флуоресценцію зонда за умови наведеного трансмембранного потенціалу $-27,8$ мВ:

$$\text{ефект(в.о.)} = \frac{\Delta PkPosX_{100(\text{Val}+\text{ефектор})}}{\Delta PkPosX_{300(\text{Val}+\text{ефектор})}}, \quad (4)$$

де $\Delta PkPosX_{300(\text{Val}+\text{ефектор})}$ – різниця між положеннями піків до та після внесення валіноміцину і діючих речовин за відсутності градієнту іонів калію ($[K^+]_i=[K^+]_e=300$ мМ), $\Delta PkPosX_{100(\text{Val}+\text{ефектор})}$ – різниця між положеннями піків до та після внесення валіноміцину і діючих речовин за умов наявності градієнту K^+ (300 мМ $[K^+]_i/100$ мМ $[K^+]_e+200$ мМ $[Ch^+]_e$).

2.2.15. Реєстрація флуоресценції NADH та FAD в мітохондріях із використанням методу спектрофлуориметрії

Реєстрацію відносних значень рівня власної флуоресценції NADH та FAD в матриці МХ досліджували із використанням флуориметричного методу на спектрофлуориметрі Quanta Master 40 РТІ.

Флуоресцентний сигнал від NADH реєстрували при $\lambda_{зб} = 350$ нм, $\lambda_{фл} = 450$ нм, від FAD – $\lambda_{зб} = 450$ нм, $\lambda_{фл} = 533$ нм.

Дослідження проводили в середовищі наступного складу, мМ: 20 HEPES (рН 7,4, 37⁰С), 2 К⁺-фосфатний буфер (рН 7,4, 37⁰С), 120 КСl, 5 піруват натрія, 5 сукцинат натрія, аліквота (100 мкл) мітохондрійної фракції містила 100 мкг білку.

Відносні одиниці флуоресценції від NADH та FAD розраховували як відношення $(F-F_0)/F_0$, де F_0 – початковий флуоресцентний сигнал, F – флуоресцентний сигнал за відповідні проміжки часу.

В експериментах щодо впливу ротенону, антимицину враховували власну флуоресценцію цих речовин.

2.2.16. Вивчення ефектів калікс[4]аренів на транспортні та енергетичні процеси в міоцитах та ізольованих мітохондріях

Каліксаренфосфонові кислоти С-97 (5-біс(дигідроксифосфорил)метил-25,27-дипропоксикалікс[4]арен, С-99 (5,17-біс(дигідроксифосфонілметилол)-25,27-дипропоксикалікс[4]арен, С-107 (5,17-ди(фосфоно-2-піридилметил)аміно-11,23-ди-трет-бутил-26,28-дигідрокси-5,27-дипропоксикалікс[4]арен), С-90 (5,11,17,23-тетра(трифтор)метил(феніл-сульфоніліміно)метиламіно-25,26,27,28-тетрапрокси-калікс[4]арен) та С-956 (5,11,17,23-тетра(трифтор)метил(феніл-сульфоніліміно)метиламіно-25,27-діоктилокси-26,28-дипропокси-калікс[4]арен) були синтезовані та охарактеризовані із використанням методів ЯМР та інфрачервоної спектроскопії у відділі хімії фосфоранів Інституту органічної хімії НАН України під керівництвом академіка НАН України Кальченка В.І.

Калікс[4]арени розчиняли в ДМСО та вносили безпосередньо в середовище інкубації. Концентрація розчинника в пробі не перевищувала 0,5 %. При проведенні експериментів контролем слугувало внесення аліквоти розчинника до середовища інкубації.

2.2.17. Визначення інтенсивності флуоресценції калікс[4]арена С-956 при взаємодії з гладеньком'язовими клітинами матки щурів

Флуоресценцію калікс[4]арена С-956 ($\lambda_{36} = 283$ нм, $\lambda_{фл} = 365$ нм) та її зміни при взаємодії з міоцитами матки досліджували на спектрофлуориметрії

Quanta Master 40 РТІ. Дослідження проводили в середовищі Хенкса: 137 мМ NaCl, 5,36 мМ KCl, 0,44 мМ KH_2PO_4 , 0,26 мМ NaHCO_3 , 0,26 мМ Na_2HPO_4 , 0,1 % глюкоза, 10 мМ HEPES (рН 7,4), 0,03 мМ CaCl_2 .

Візуалізацію міоцитів методом лазерної конфокальної мікроскопії проводили, збуджуючи зразки ультрафіолетовою лампою 360 нм та реєструючи флуоресценцію з використанням світлофільтру FSet 01 wf. В іншій постановці експерименту флуоресценцію клітин та барвника ядер Hoechst 33342 збуджували лазером на довжині хвилі 405 нм, а для реєстрації сигналу використовували світлофільтр BP 420-480. Збудження флуоресценції з використанням потенціалчутливого зонду MitoTrackerOrange CM-H₂TMROS здійснювали лазером на довжині хвилі 543 нм, а флуоресценцію реєстрували в діапазоні 560-615 нм (світлофільтр BP 560-615).

2.3. МЕТОДИ ЕНЗИМОЛОГІЇ

2.3.1. Визначення Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазної активності

Загальну Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежну АТР-гідролазну активність у фракції ПМ ГМК матки визначали при 37°C у середовищі інкубації (об'єм – 0,4 мл), яке мало наступний склад: 3 мМ АТР, 3 мМ MgCl_2 , 0,95 мМ CaCl_2 , 50 мМ NaCl, 100 мМ KCl, 1 мМ ЕГТО, 20 мМ HEPES-Трис (рН 7,4), 1 мМ оуабаїн, 0,1 мкМ тапсигаргін, 1 мМ NaN_3 , 0,1 % дигітонін, кількість білка у суспензії мембранної фракції в пробі – 20 мкг, час інкубації – 3 хв.

Активність транспортувальної Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ розраховували як різницю між загальною Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежною та “базальною” Mg^{2+} -залежною АТРазними активностями (за відсутності іонів Ca). Концентрацію вільних іонів Ca обчислювали із використанням програми “MAXCHEL” і за вищезазначених умов вона складала 1 мкМ.

Ферментативну реакцію ініціювали введенням до середовища інкубації аліквоти (20 мкл) суспензії ПМ (8 °C), а зупиняли шляхом додаванням до інкубаційної суміші 1 мл “стоп”-розчину: 1,5 М натрій оцтовокислий, 3,7 %-ий формальдегід, 14 %-ий етанол, 5 %-а ТХО, рН 4,3, 8 °C, як описано в роботі [375].

Кількість продукту реакції P_i визначали за методом W. Rathbun, V. Betlach. До проби додавали 0,05 мл 2 %-ого молібдату амонія і після інтенсивного перемішування вносили 0,1 мл 6,75 мМ хлористого олова. Через 15 хв заміряли оптичну густину розчину за допомогою спектрофотометра SPECORD UV VIS при довжині хвилі 660 нм [375].

2.3.2. Визначення уабіінчутливої Na^+, K^+ -АТРазної активності

Дослідження проводили з пост'ядерною фракцією. Тканину міометрія свині гомогенізували за стандартною процедурою у середовищі складу: 20 мМ Трис-НСІ (рН 7,4, 8 °С), 250 мМ цукроза, 2 мМ ЕДТО, 0,6 М КСІ. Гомогенат центрифугували при 6 тис. г протягом 20 хв. Одержану надосадову, яка являє собою пост'ядерну фракцію, розводили 5-разово 20 мМ НЕРЕС-Трис (рН 7,4) і використовували в подальших дослідах. До середовища інкубації (400 мкл) вносили аліквоту 30 мкл пост'ядерної фракції, що містила 30 мкг білку. При роботі з пост'ядерною фракцією застосовували процедури та підходи аналогічні дослідженням із фракцією ПМ. Попередньо було показано, що оптимальна для проведення дослідів кількість білку складає 25-30 мкг в пробі, а протягом 10 хв спостерігається лінійне зростання рівня неорганічного фосфату в пробах із пост'ядерною фракцією. Також було продемонстровано, що 0,1 % дигітонін не впливає на визначення питомої ферментативної активності Na^+, K^+ -АТРази у пост'ядерній фракції, тому в даних експериментах детергент до середовища інкубації не вносили.

Загальну ферментативну Na^+, K^+, Mg^{2+} -залежну АТРазну активність визначали в середовищі інкубації (об'єм 0,4 мл) наступного складу: 1 мМ АТР, 3 мМ $MgCl_2$, 125 мМ $NaCl$, 25 мМ KCl , 1 мМ ЕГТО, 20 мМ НЕРЕС-Трис (рН 7,4), 1 мМ NaN_3 , 0,1 мкМ тапсигаргін, 25-30 мкг білку фракції ПМ. Тривалість інкубації – 5 хв при 37 °С. Ферментативну активність Na^+, K^+ -АТР-ази розраховували як різницю між загальною Na^+, K^+, Mg^{2+} -залежною АТР-азною активністю та тією, яка тестується за присутності 1 мМ уабіаіна.

Кількість продукту реакції P_i визначали за методом W. Rathbun, V. Betlach.

2.4. ІНШІ МЕТОДИ

2.4.1. Визначення характеристикних розмірів і змін гідродинамічного діаметру мітохондрій та міоцитів із використанням методу лазерної кореляційної спектроскопії

Функцію розподілу гідродинамічного діаметру (характеристичного розміру) МХ визначали методом лазерної (фотонної) кореляційної спектроскопії [44]. Використовували прилад ZetaSizer-3 (MalvernInstruments, Велика Британія) з корелятором Multi8 computing correlator type 7032 се, який облаштований гелій-неоновим лазером ЛГН-111 з довжиною хвилі 633 нм і потужністю 25 мВт.

Діапазон вимірювання приладу становить від 1 нм до 20 мкм. Робота даного спектрометра основана на аналізі кореляційних характеристик флуктуації інтенсивності динамічно розсіяного світла при проходженні лазерного променя через середовище. Вимірювання кореляційної функції флуктуацій інтенсивності розсіяного світла і інтегральної інтенсивності розсіювання дозволяє визначити коефіцієнт трансляційної дифузії дисперсних часток в рідинах і за рівнянням Стокса-Ейнштейна визначити розподілення частинок в рідинах за розміром. Коефіцієнт трансляційної дифузії D частинок пов'язаний з тривалістю кореляції τ_c співвідношенням:

$$Dq^2 = 1/\tau_c$$

Хвильової вектор флуктуацій концентрації q описується виразом:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right),$$

де n – показник заломлення середовища (рідини), λ_0 – довжина хвилі випромінювання, θ - кут розсіювання.

Використовуючи формулу Стокса-Ейнштейна, яка пов'язує розмір частинок з їх коефіцієнтом трансляційної дифузії і в'язкістю рідини, можна розрахувати розмір сферичних частинок:

$$d(H) = \frac{k_B \cdot T}{3\pi\eta D},$$

де k_B – стала Больцмана, T – абсолютна температура, η – зсув на в'язкість середовища, в якому суспендовані частинки, D – коефіцієнт трансляційної дифузії.

Реєстрацію розсіюваного від суспензії МХ лазерного опромінення проводили протягом 10 хв по 1 хв при температурі 24°C під кутом розсіювання 90°. Автокореляційну функцію обробляли за допомогою стандартної комп'ютерної програми PCS-Sizemodev 1.61.

Середовище інкубації (1 мл) мало наступного складу: 20 мМ HEPES (pH 7,4, 24°C), 2 мМ K^+ -фосфатний буфер (pH 7,4, 24 °C), 250 мМ цукроза (або 130 KCl), 5 мМ сукцинат натрію. Кількість білка в мітохондрійній фракції дорівнювала 50 мкг.

2.4.2. Імітаційне моделювання

Для динамічного моделювання досліджуваних процесів у МХ використовували методологію гібридних функціональних мереж Петрі у середовищі Cell Illustrator 3.0. Розробник “Human Genome Center” Токійського Університету, Японія.

2.4.3. Характеристика клітинної суспензії

В 1 мл отриманої клітинної суспензії містилось в середньому $6,58 \cdot 10^6$ міоцитів; кількість життєздатних клітин - 90-95 % від загальної кількості клітин (цю характеристику визначали при фарбуванні клітинного препарату вітальним барвником трипановим синім). Підрахунок загальної кількості клітин і кількості життєздатних клітин проводили з використанням гемоцитометра (камери Горяєва). Для цього до клітинної суспензії додавали рівний об'єм фарбувального розчину (тобто до 5 частин суспензії клітин додавали 4 частини 0,2% розчину трипанового синього та 1 частину 4,25% розчину NaCl). Потім аліквоту забарвленої суспензії клітин вносили у лічильну камеру Горяєва з покривним склом, використовуючи ефект капілярного присмоктування. Кількість клітин підраховували за допомогою світлового мікроскопу, з використанням малого збільшення. Кількість життєздатних клітин, які виштовхують трипановий синій, оцінювали, підраховуючи середню кількість незабарвлених міоцитів у квадраті

площею 1 мм². Кількість клітин у 1 мл вихідної суспензії (С) визначали за формулою:

$$C = k \cdot n \cdot p \text{ клітин/мл,}$$

де n - кількість підрахованих клітин/1 мм²,

k - коефіцієнт розведення,

p - перерахунковий коефіцієнт, який дорівнює 10⁴/мм.

2.4.4. Кінетичні розрахунки

Константи активації для Ca²⁺ (K_{Ca}) та спорідненості для L-аргініна (K_{арг}) реакції біосинтезу NO в ізольованих МХ міомерія було розраховано методом Хейнса [43] з використанням відповідних координат {[S]/V : [S]}, де [S] – концентрації L-аргініна або Ca²⁺, V – активність mtNOS (n=5). Коефіцієнт кореляції складав R²>0,9.

Кінетичний аналіз процесів транспорту Ca²⁺ в ізольованих МХ проводили наступними методами.

Константу активації акумуляції іонів Ca в МХ розраховували в координатах Лаїнуївера-Берка {1/V; 1/S}, де 1/V = F₀/(F-F₀). F₀ – базальний рівень ендogenous Ca²⁺ в МХ, F – флуоресценція Fluo4 за різних концентрацій екзогенного Ca²⁺ (20-40-60-80 мкМ), S – відповідна концентрація іонів Ca. Було розраховано концентрації вільного Ca за допомогою програми MAXCHELATOR [255], які за умов експеримента склали 11-22-33-45 мкМ.

Методика розрахунку початкової швидкості (V₀) та величини характеристичного часу (τ_{1/2}) енергозалежної акумуляції та ΔpH-індукованого виходу Ca²⁺ в ізольованих мітохондріях. Даний метод ґрунтується на уявленні, що збільшення або зниження флуоресценції Ca²⁺-чутливого зонду Fluo-4, яким було навантажено МХ, адекватно відображає зростання/зменшення концентрації іонізованого Ca в матриці, згідно експериментальних даним.

Початкову швидкість енергозалежної акумуляції Ca²⁺ (V₀) та характеристичний час напівмаксимальної акумуляції катіона (τ_{1/2}) розраховували за формулами:

$$\tau_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (1)$$

$$V_0 = k \left(\frac{F_{\max} - F_0}{F_0} \right) \quad (2)$$

k (s^{-1}) – константа швидкості входу Ca^{2+} , яку знаходимо з лінійної залежності зміни флуоресценції Fluo-4 від часу в координатах $\{\ln((F_{\max} - F_0)/(F_{\max} - F)); t\}$, де F_0 – початкова флуоресценція, F – флуоресценція за відповідні проміжки часу, F_{\max} – стаціонарний рівень флуоресценції, який досягається з часом як наслідок входу певної кількості іонів Ca в матрикс.

Початкову швидкість ΔpH -залежного виходу Ca^{2+} (V_0) та характеристичний час напівмаксимального виходу катіона ($\tau_{1/2}$) розраховували за формулами:

$$\tau_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (3)$$

$$V_0 = k \left(\frac{F_0 - F'}{F_0} \right) \quad (4)$$

k (s^{-1}) – константа швидкості виходу Ca^{2+} з матриксу, яку знаходимо з лінійної залежності зміни флуоресценції Fluo-4 від часу в координатах $\{\ln((F_0 - F)/(F - F')); t\}$, де F_0 – початкова флуоресценція, F – флуоресценція за відповідні проміжки часу, F' – стаціонарний рівень флуоресценції, який досягається з часом як наслідок виходу певної кількості іонів Ca з матриксу.

Також початкову швидкість ΔpH -індукованого виходу іонів Ca із МХ розраховували в напівлогарифмічних координатах. Коефіцієнт Хілла та константу активації ΔpH -індукованого виходу іонів Ca із МХ за протонами (pH_a) розраховували в координатах Хілла $\{\lg[(V_{\max} - V_0)/V_0]; pH\}$, де V_{\max} – початкова флуоресценція, V_0 – стаціонарний рівень флуоресценції після закінчення транспортного процесу.

2.4.5. Статистична обробка результатів та обчислення

Статистичні параметри лінеаризованих графіків (величина достовірності апроксимації, тощо) розраховували методом найменших квадратів. Стандартне абсолютне значення величини достовірності апроксимації R становило 0,9-0,99.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили загально прийнятими методами [45]. Середнє арифметичне обчислювали за формулою:

$$M = \sum x_i / n,$$

де \sum - знак суми, x_i – варіанта, n – кількість варіант. Похибку середнього арифметичного визначали за формулою :

$$m = \sigma / n-1,$$

де σ – середнє квадратичне відхилення, n – кількість варіант. Вірогідність різниці середнього арифметичного за критерієм Стьюдента обчислювали за формулою:

$$td = (M_1 - M_2) / \sqrt{(m_1^2 - m_2^2)}$$

Розрахунки проводили за допомогою стандартного програмного забезпечення MS Office Excell на персональному комп'ютері типу IBM PC/AT.

2.5. РЕАКТИВИ

У роботі було використано реактиви та матеріали виробництва:

“Sigma”, США

Колагеназа тип IA, HEPES (N'-2-гідроксиетилпіперазин-N'-2-етансульфонова кислота), Трис (Trizma, трис-(оксиметил)-амінометан), глюкоза, цукроза, ЕГТО (етиленгліколь-біс-(β -аміноетиловий ефір) N,N,N',N'-тетраоцтової кислоти), бичачий сироватковий альбумін, CaCl₂, Pluronic F-127, полі-L-лізин, DAF-FM, NAO (10-ноніл акридин оранжевий), JC-1, BCECF-AM, BH₄ (тетрагідробіоптерін), сукцинат натрію, NADPH, FAD, N^G-нітро-L-аргінін, аламетицин, кальцієвий іонофор A23187, ротенон, антимицин А, азид натрію, олігоміцин, СССР (карбонілціанід-3-хлорфенілгідразон), холін хлорид, тапси-гаргін, дигітонін, карбахол, амілорид, тетраетиламоній, харібдотоксин, глібенк-ламід, кальмідазоліум, трифлюоперазін, anti-LETM 1, окситоцин, метиленовий синій, рутенієвий червоний, нітрендипін.

“Sigma-Aldrich”, США

DMCO (диметилсульфоксид), піруват натрія, L-аргінін, нітрит натрія, 2-амінопіридин, 4-амінопіридин.

“Invitrogen”, США

MitoTracker Orange CM-H₂TMRos, Fluo-4 AM.

“Fluka”, Швейцарія

АТФ, АДФ, Кумасі G250, 9-аміноакридин, DiOC₆(3), DCF-DA, Hoechst 33342, циклоспорин А, убаїн, валіноміцин, нітропрусид натрія, тетрафенілфосфоній.

Amersham LIFE SCIENCE

Циклічний гуанозин-3',5'-монофосфат (cGMP).

Інші мінеральні солі, кислоти та луги, двонатрієва сіль етилендіамінтетраоцтової кистоти (ЕДТО), трихлороцтова кислота (ТХО), формальдегід, етанол, трипановий синій— вітчизняного виробництва марки ч.д.а або х.ч.

Розчини сполук, що використовували у дослідах, готували на бідистильованій воді, яка мала електропровідність не більше 1,5 мкСм. Електропровідність води реєстрували за допомогою кондуктометра ОК-102/1 (Угорщина).

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. ІДЕНТИФІКАЦІЯ СИНТЕЗУ ОКСИДУ АЗОТУ В МІТОХОНДРІЯХ МІОМЕТРІЯ ТА БІОХІМІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЦЬОГО ПРОЦЕСУ

На разі доведено важливу роль оксид азоту в багатьох фізіологічних процесах, зокрема вазодилатції, нейротрансмісії, імунній відповіді тощо [133, 290]. Відповідно до аналізу даних літератури в матці ідентифіковане утворення NO, джерелами його синтезу виступають ендометрій та плацента (під час вагітності). Показано, що оксид азоту здатний розслабляти міометрій, також відбувається посилення його синтезу під час вагітності [145, 215, 447-448]. Домінантною ізоформою в матці є iNOS, експресія та посттрансляційна регуляція якої знаходиться під впливом прогестерона [92, 215, 228]. Ідентифіковано також ізоформу eNOS, але роль її відводиться у процесах вазодилатції за вагітності [492]. Таким чином, подальша ідентифікація джерел біосинтезу NO в міоцитах матки, враховуючи малу кількість публікацій і, подекуди, контрверсійних результатів, залишається актуальною. Суттєвими є також й проблеми методичного характеру, що пов'язано із коротким часом існування і високою реакційною здатністю оксиду азоту.

Джерелами синтезу NO в міоцитах можуть виступати NOS, асоційовані з субклітинними компартментами, серед яких важливу роль відіграють МХ. Присутність Ca^{2+} -залежної ізоформи NO-синтази в МХ (mtNOS) була доведена імуногістохімічними методами для окремих тканин: печінки [429], серця [191, 193, 293], мозку [378], нирок [119], скелетного м'язу (діафрагми) [88, 247] та тимусу [141].

Використання сучасного флуоресцентного зонда DAF (DAF-FM) дозволяє безпосередньо швидко і надійно зареєструвати продукцію NO за низьких його концентрацій (2-5 нМ) в клітинах, а метод лазерної конфокальної мікроскопії – візуалізувати його утворення та, із використанням специфічних щодо МХ зондів, довести зв'язок біосинтезу NO саме із цими органелами [291, 297, 331].

Отже, першим завданням дисертаційної роботи було продемонструвати можливість утворення оксиду азоту в МХ клітин гладенького м'язу матки та

вивчити каталітичні і кінетичні характеристики мітохондрійної NO-синтазної реакції.

3.1.1. Докази наявності оксиду азоту в мітохондріях міоцитів матки та можливості утворення NO в цих органелах

Нами була показана можливість синтезу NO в міоцитах матки із використанням NO-чутливого флуоресцентного барвника DAF-FM та методу лазерної скануючої конфокальної мікроскопії.

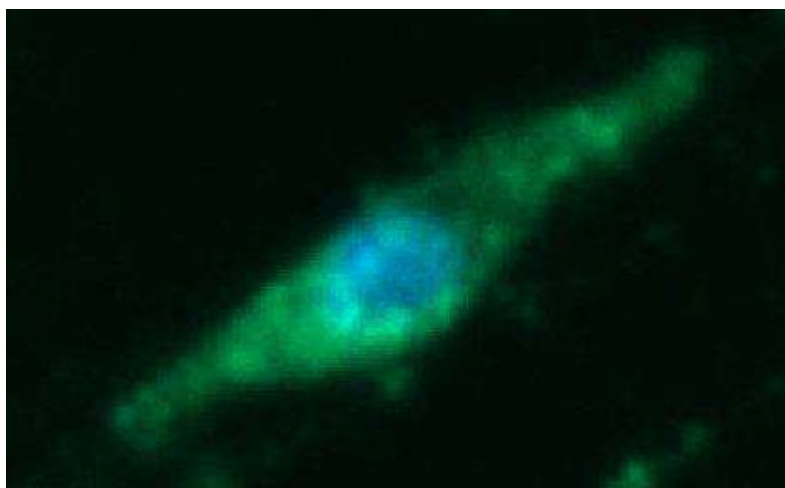


Рис. 3.1.1. Ідентифікація синтезу оксиду азоту в міоцитах матки щурів з використанням NO-чутливого зонду DAF-FM та методу лазерної скануючої конфокальної мікроскопії. Розподіл NO чутливого флуоресцентного зонду DAF-FM (зелений колір) та ядерного барвника Hoechst 33342 (блакитний колір) в міоциті

В експериментах використано активну кислотну форму DAF (DAF-FM), яка безпосередньо взаємодіє з NO за присутності O_2 , в результаті чого утворюється триазоло-флуоресцеїнове похідне (DAF-FM-T), яке має більший квантовий вихід флуоресценції [273, 331]. Використанням в цих дослідах флуоресцентного барвника DAF-FM є закономірним, бо цей зонд мало чутливий до дії лазерного променя і слабо вигоряє з часом [291, 297]. Хоча DAF-FM є частково мембранопроникним барвником, який може потрапляти до клітини шляхом дифузії, ефективність надходження його до міоплазми збільшували шляхом пермеабілізації ПМ 0,01 % дигітоніном [7, 81]. Проведеними дослідженнями встановлено (рис. 3.1.1), що в міоцитах матки спостерігається зелений флуоресцентний сигнал після передінкубації з DAF-FM, що свідчить про базальну продук-

цію NO. Аутофлуоресценція клітин в досліджуваній області за відсутності DAF-FM не спостерігалась. Висока чутливість використаного нами барвника дозволила зареєструвати базальний рівень NO в міоцитах, що формується внаслідок функціонування конститутивних форм NO-синтаз.

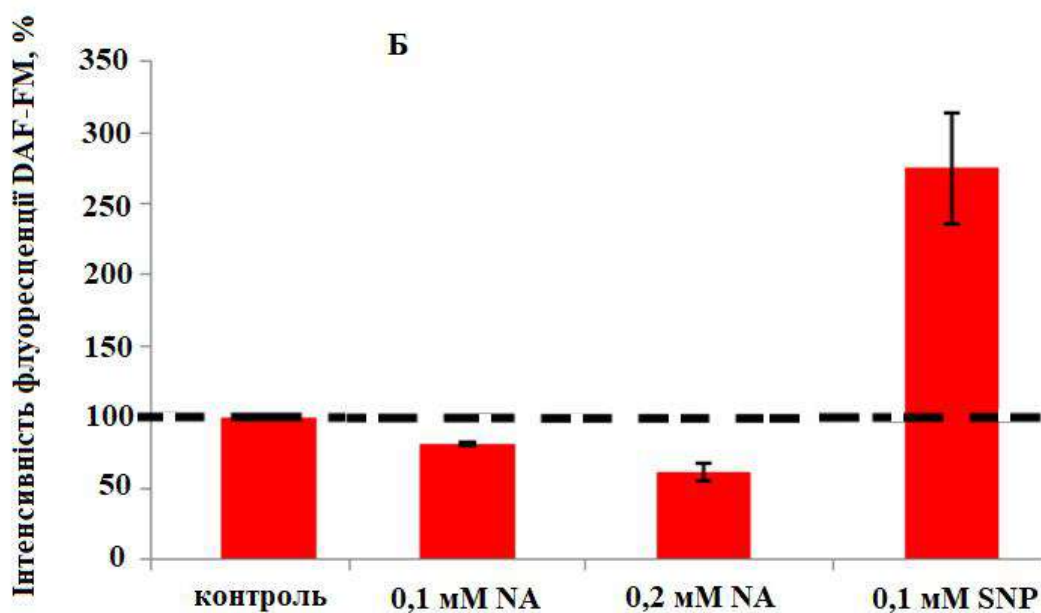
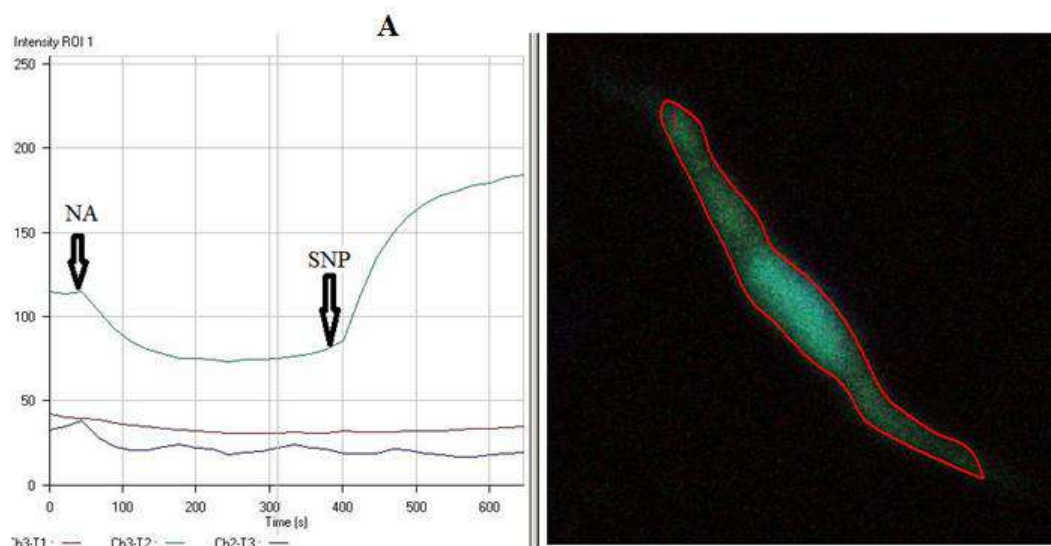


Рис. 3.1.2. Зміни інтенсивності флуоресценції DAF-FM в міоциті за додавання N^G -нітро-L-аргініна (NA, 0,2 мМ) та нітропрусида натрія (SNP, 0,1 мМ).

А – Дані лазерної конфокальної мікроскопії: MitoTracker Orange CM-H2TMRos, бура крива, канал 1; DAF-FM, зелена крива, канал 2; Hoechst 33342, синя крива, канал 3.

Б – Кількісний аналіз змін інтенсивності флуоресценції DAF-FM в міоцитах за додавання NA та SNP відносно контролю без діючих речовин (100%); $M \pm m$, $n=3-7$

Флуоресцентний зонд розподілявся в міоплазмі клітини, окреслюючи її контури та формуючи гетерогенні забарвлені ділянки та тяжі. Використання для реєстрації оксиду азоту DAF-системи забезпечує достатню роздільну здатність, яка дозволяє локалізувати джерела NO в міоплазмі, зокрема МХ [297]. Внаслідок дифузії, NO-позитивно забарвлені ділянки спостерігаються також частково в ядерній області і, іноді, поза клітинами.

Інкубація клітин із зростаючими концентраціями (0,1 та 0,2 мМ) N^G-нітро-L-аргініна (NA), неселективного інгібітора Ca²⁺-залежних ізоформ NO-синтаз [Vitecek 2012], супроводжувалась дозозалежним зниженням інтенсивності флуоресценції DAF в середньому на 20 % (0,1 мМ інгібітора) та 40 % (0,2 мМ інгібітора) (рис. 3.1.2, Б). Зростання флуоресцентної відповіді при додаванні донора NO 0,1 мМ SNP, не залежало від присутності інгібітора (рис. 3.1.2).

Ці результати свідчать про специфічність відповіді DAF-FM на NO. Оскільки флуоресцентний зонд взаємодіє саме з NO, він не тестує утворення широкого спектру активних метаболітів азоту та кисню, а саме NO₂⁻, NO₃⁻, ONOO⁻, [•]O₂⁻, H₂O₂ тощо [297]. Є вагомими підстави вважати, що DAF-FM є оптимальним NO-чутливим флуоресцентним барвником для детекції оксиду азоту в міоцитах.

3.1.2. З'ясування парціального внеску мітохондрій як ендogenous джерела NO у процес біосинтезу оксиду азоту в міоцитах

З використанням NO-чутливого флуоресцентного зонду DAF-FM продемонстровано, що міоцити матки щурів здатні до власного синтезу NO, який, зокрема, може забезпечуватись конститутивними ізоформами NOS. Тому наступним етапом досліджень була ідентифікація джерел біосинтезу NO в клітинах міомерія.

Обробка міоцитів дигітоніном у концентрації 0,01 %, за якої детергент не впливає на функціонування внутрішньоклітинних Ca²⁺-транспортувальних систем, але викликає зростання неспецифічної проникності саме ПМ [81], призводила до зростання флуоресценції DAF-FM і відповідного посилення продукції NO клітинами (рис. 3.1.3).

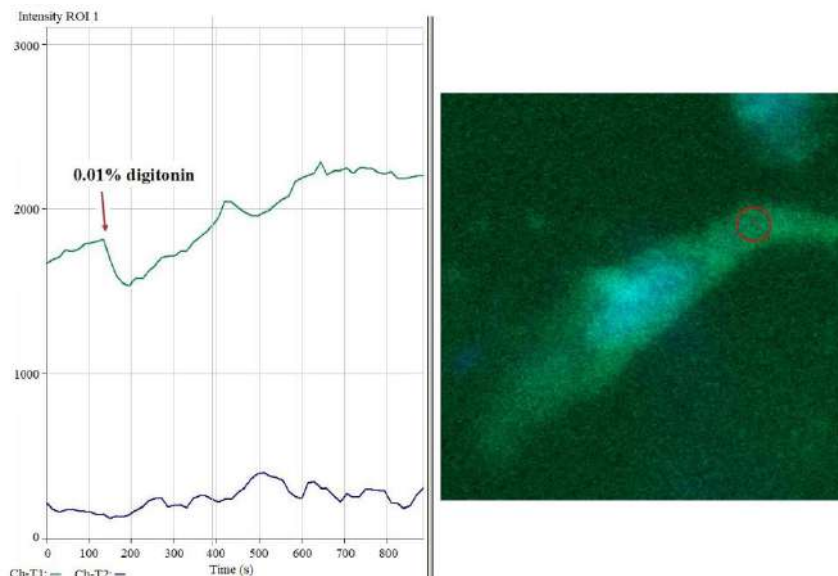


Рис. 3.1.3. Вплив 0,01 % дигітоніну на продукцію оксиду азоту в міоцитах матки. Дані лазерної конфокальної мікроскопії. Для кількісного аналізу результатів використана функція ROI (region of interests). 10 мкМ DAF-FM (NO), зелена крива, канал 1; 50 мкМ Hoechst 33342 (ядро), синя крива, канал 2

Дигітонін взаємодіє з холестеролом ПМ, утворюючи міцели та везикули, що порушує ліпідний бішар і мембрана стає більш проникною для неорганічних іонів та органічних субстратів [220]. При цьому відбувається руйнування кавеол і можливого відокремлення eNOS від кавеоліну – потужного інгібітора ензиму [208, 232]. Зазначені події є поясненням посилення синтезу NO міоцитами і свідченням того, що ПМ є джерелом оксиду азоту в клітинах міометрія.

Застосування метил- β -циклодекстрину (M β CD) – циклічного олігосахариду, який утворює комплекси з холестеролом і використовується як фармакологічний агент для видалення холестерола з мембран [423] та дигітоніну в надвисоких концентраціях (0,1%), за яких порушується інтактність субклітинних структур [81, 220], призводило до зниження флуоресцентного сигналу від DAF-FM в межах 50 % від контрольного рівня (рис. 3.1.4). Ці дані також свідчать на користь синтезу NO, асоційованого з ПМ та іншими субклітинними мембранами.

Відомо, що найбільш збагачена холестеролом ПМ, певна його кількість міститься також і у ВММ та мембрані ЕР. Можливо, «жорстка» дехолестеринізація субклітинних мембран має наслідком їхнє значне руйнування і відповідне пригнічення активності мембрано-асоційованих ензимів, зокрема і NOS.

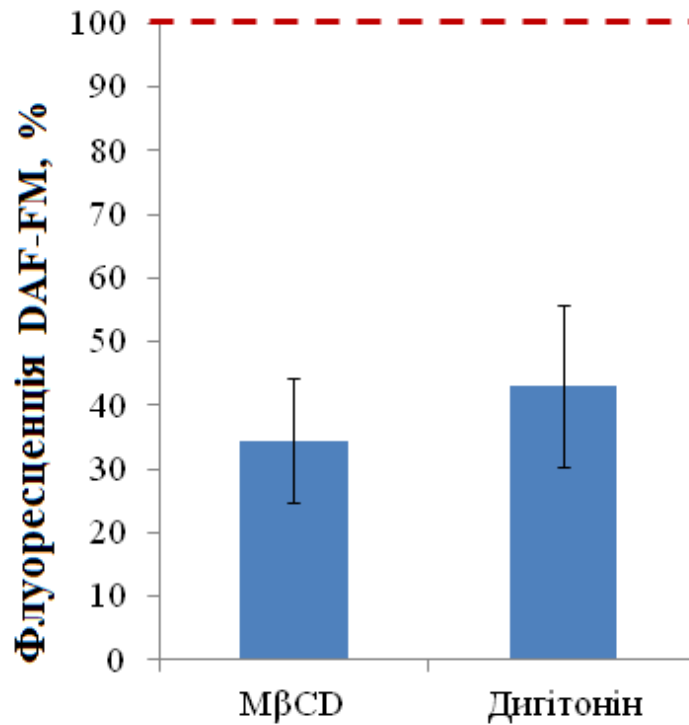


Рис. 3.1.4. Зміни біосинтезу оксиду азоту у клітинах міомерія за дії 1 мМ метил-β-циклодекстрину (МβCD) та 0,1 % дигітоніну; за 100 % прийнято синтез NO за відсутності речовин. Дані лазерної конфокальної мікроскопії. Для кількісного аналізу використано 5-6 клітин з різних незалежних дослідів, $M \pm m$.

Високоафінний інгібітор SERCA тапсигаргін в наномолярних концентраціях призводить до спустошення пулу іонів Ca в CP [120]. В наших дослідженнях 1 мкМ тапсигаргін не приводив до суттєвих змін у флуоресценції DAF-FM. Лише збільшення його концентрації до 3 мкМ мало наслідком зниження флуоресценції NO-чутливого DAF-FM (рис. 3.1.5). Таким чином, можна припустити, що в міоцитах матки активність NOS, асоційованої з CP, також має місце. Втім, досить високі концентрації тапсигаргіну, необхідні для появи інгібувального ефекту, можуть свідчити також й на користь його неспецифічної дії.

На фоні зростання рівня продукції NO в міоцитах внаслідок пермеабілізації ПМ 0,01% дигітоніном додавання інгібіторів I та III комплексів дихального ланцюга ротенона та антимицина відповідно, призводило до зниження флуоресценції DAF-FM, і відповідно синтезу оксиду азоту (рис. 3.1.6).

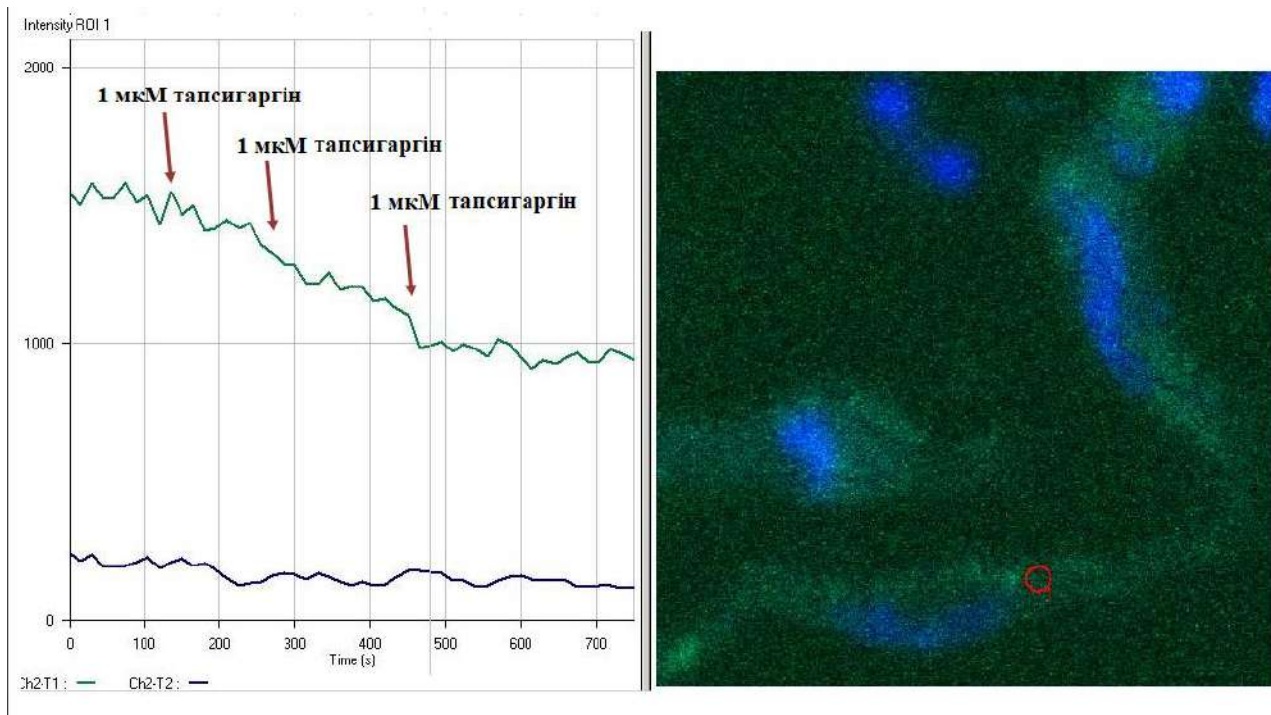


Рис. 3.1.5. Зміни інтенсивності флуоресценції DAF-FM в міоциті в умовах зростання концентрації тапсигаргину в середовищі.

Результат лазерної конфокальної мікроскопії. Для кількісного аналізу результатів використана функція ROI (region of interests). DAF-FM (NO), зелена крива, канал 1; Hoechst 33342 (ядро), синя крива, канал 2

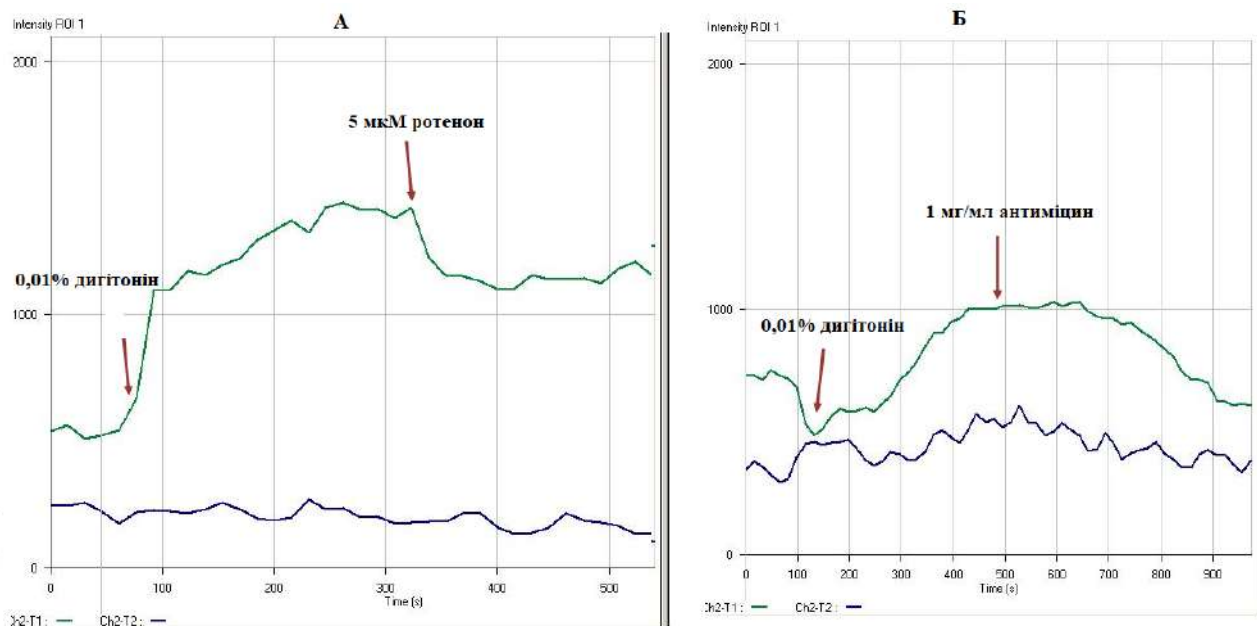


Рис. 3.1.6. Зміни інтенсивності флуоресценції DAF-FM в міоциті в умовах пермеабілізації плазматичної мембрани дигітоніном та дії інгібіторів I та III комплексів дихального ланцюга мітохондрій. Результат лазерної конфокальної мікроскопії. Для кількісного аналізу використана функція ROI (region of interests). DAF-FM (NO), зелена крива, канал 1; Hoechst 33342 (ядро), синя крива, канал 2

Цей результат демонструє взаємозв'язок синтезу NO з МХ, який безпосередньо залежить від функціональної активності комплексів ЕТЛ.

Подальшими дослідженнями продемонстровано солокалізацію специфічного щодо МХ зонда MitoTracker Orange CM-H₂TMRos, який накопичується в енергізованих органелах із значним негативним потенціалом на внутрішній мембрані, і ковалентно зв'язується із внутрішньомітохондрійними протеїнами [134], та NO-чутливого барвника DAF (рис. 3.1.7). Комп'ютерний аналіз довільно обраного поза ядром оптичного зрізу клітини показав тотожний розподіл обох флуоресцентних барвників.

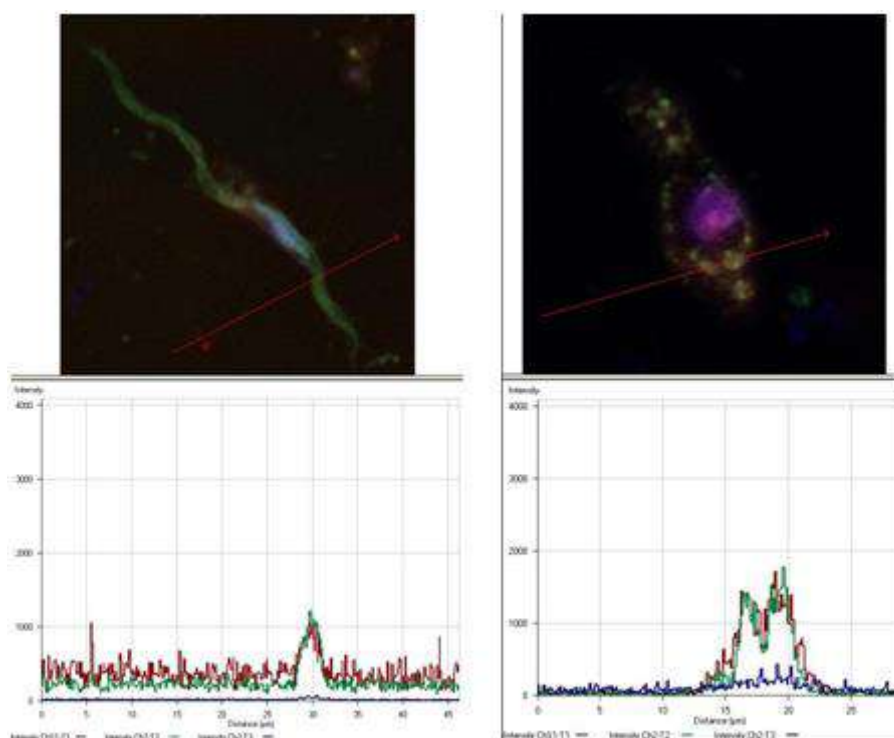


Рис. 3.1.7. Варіанти солокалізації флуоресцентних зондів DAF-FM та MitoTracker Orange CM-H₂TMRos в двох міоцитах. Представлено результати тотожного розподілу барвників довільного оптичного зрізу клітин: червоний колір – MitoTracker Orange CM-H₂TMRos (200 нМ), зелений – DAF-FM (10 мкМ), синій – специфічний щодо ядра барвник Hoechst 33342 (50 нМ)

Таким чином, джерелами оксиду азоту в клітинах гладенького м'язу матки можуть виступати конститутивні NOS, асоційовані з ПМ та, не виключено, СР, що узгоджується з результатами, одержаними на окремих електрозбудли-

вих клітинах [191, 482]. Потужним джерелом синтезу NO є МХ, ефективність якого залежить можливо від функціональної активності комплексів ЕТЛ.

Отже, використовуючи селективний щодо NO флуоресцентний зонд DAF-FM та специфічний маркер на функціонально-активні МХ MitoTracker Orange CM-H₂TMRos, нами доведено наявність NO в МХ міометрія із застосуванням лазерної конфокальної мікроскопії. Показано, що продукція NO в ГМК зменшується за присутності інгібітора конститутивних NO-синтаз, можливо є залежною від ефективності функціонування ЕТЛ МХ та інтактності субклітинних мембран.

Можливість утворення оксиду азоту в МХ клітин гладенького м'язу матки та регуляції ним функціональної активності органел зумовлює дослідження кінетичних та каталітичних властивостей реакції біосинтезу NO в МХ на моделі ізольованих органел.

3.1.3. Визначення оксиду азоту в ізольованих мітохондріях міометрія щурів із використанням флуоресцентного зонда DAF-FM та методу протокової цитометрії

Наразі з'ясовано, що NO модулює енергетичні, метаболічні і транспортні процеси в МХ. Відоме твердження, що МХ є первинними клітинними мішенями NO [237].

Біосинтез оксиду азоту МХ - достатньо потужний процес: органели серця та діафрагми (скелетний м'яз) здатні продукувати, відповідно, 67 та 24% загальноклітинного вмісту NO. mtNOS-генерований NO забезпечує реципрокну взаємодію між біосинтезом NO в цьому компартменті та концентрацією внутрішньомітохондрійного Ca²⁺, L-аргініна, рН, парціальним тиском O₂ та окисно-відновним станом МХ [193, 333, 391, 482].

Втім, біохімічні закономірності утворення оксиду азоту в МХ ГМ залишаються мало з'ясованими питаннями, а проблема біосинтезу NO в МХ міометрія в доступній нам літературі не розглядається. Вирішенню зазначених питань присвячені наступні етапи роботи.

Нами було здійснено добір оптимальних умов визначення NO-синтазної активності в ізольованих МХ міоетрія щурів із застосуванням DAF-FM та протокової цитометрії. Цей метод має вагомі переваги над звичайною спектрофлуориметрією. До них відносять високе співвідношення сигнал/шум у флуоресцентному каналі, оцінка зміни флуоресценції саме МХ, а не робочого середовища і немітохондрійних субклітинних фрагментів, а також можливість використання відносно малої кількості мембранного препарату у пробах.

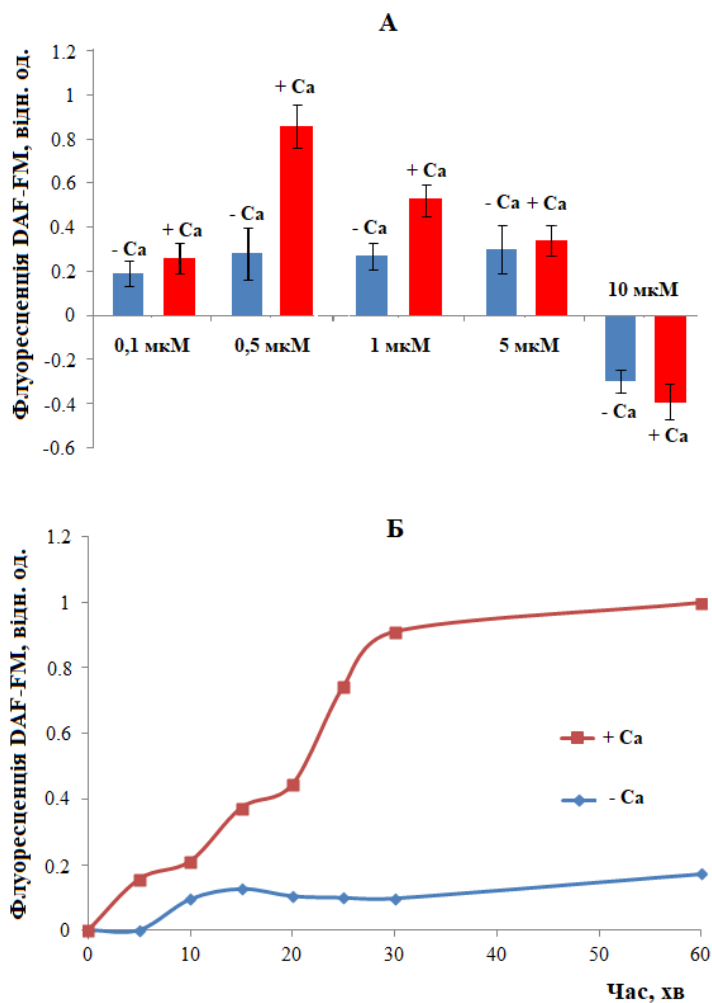


Рис. 3.1.8. Залежність флуоресценції DAF-FM в ізольованих мітохондріях від концентрації (А) та часу інкубації (Б)

Аналіз флуоресцентної відповіді зонда в широкому діапазоні концентрацій від 0,1 до 10 мкМ виявило, що за присутності у реакційному середовищі Ca^{2+} оптимальними концентраціями барвника для тестування утворення NO є 0,5 мкМ. Характер залежності флуоресценції від концентрації мав дзвоноподібний характер, а за 10 мкМ DAF-FM спостерігалось зниження сигналу нижче

контрольних значень (рис. 3.1.8, а). Залежність флуоресценції від часу мала вигляд кривої з виходом на платовий рівень (рис. 3.1.8, б), причому в усіх випадках за присутності позамітохондрійного Ca^{2+} (1 мМ) сигнал був суттєво вищим (рис. 3.1.8), окрім дослідів з 10 мкМ DAF-FM.

mtNOS, подібно іншим ізоформам NOS, потребує для синтезу оксиду азоту L-аргінін, O_2 , Ca^{2+} , а також NADPH і кофактори (CaM, BH_4 , FAD). Вважають, принаймні у випадку МХ серця, що mtNOS солокалізована разом із комплексом I дихального ланцюга [354, 482]. Така специфічна компартменталізація передбачає можливість регуляції активності NOS локальним мікрооточенням органел та компонентами матриксу, а також залежність продукції NO від активності ЕТЛ та електрохімічного градієнту іонів водню на ВММ. Ми намагалися з'ясувати необхідність тих чи інших компонентів реакційного середовища для коректного визначення активності mtNOS ізольованих МХ міометрія.

Дані по дослідженню залежності NO-синтазної активності ізольованих МХ від наявності екзогенних субстрату та кофакторів представлені на рис. 3.1.9.

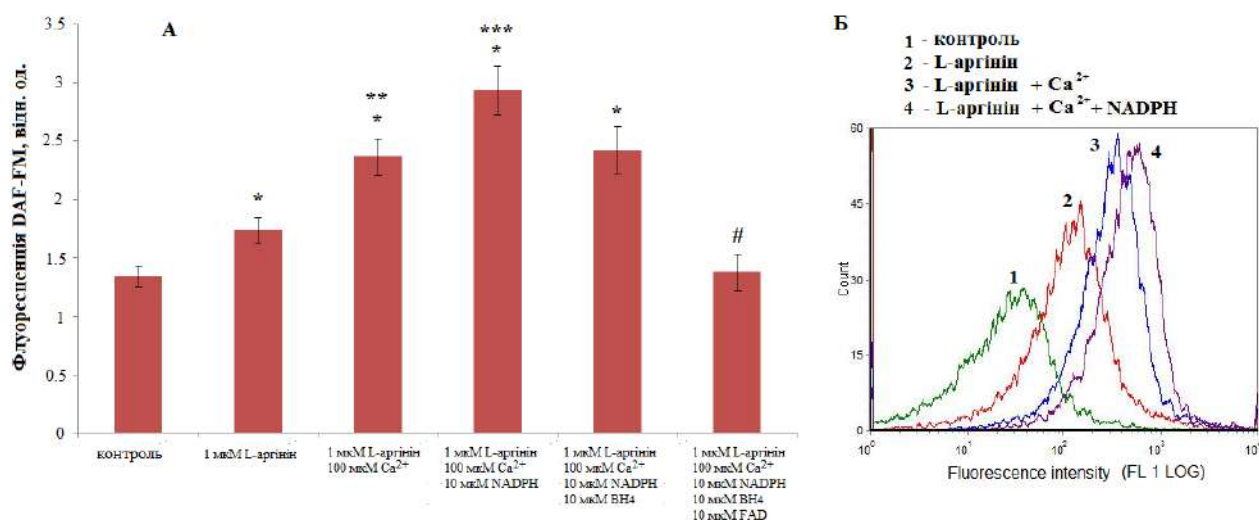


Рис. 3.1.9. Залежність синтезу NO мітохондріями від наявності субстрату та кофакторів в середовищі інкубації (А). Б – Зміщення піків інтенсивності флуоресценції в умовах різного складу середовища інкубації. Дані типового експерименту.

* $p < 0,05$ відносно контролю, ** $p < 0,05$ відносно наявності L-аргініна, *** $p = 0,05$ відносно наявності L-аргініна + Ca^{2+} , # $p < 0,05$ відносно повної реакційної суміші; $M \pm t$, $n = 7$ (А)

Мітохондрії в робочому середовищі, яке містило субстрати дихання, а саме 5 мМ піруват і сукцинат, та сбалансований іонний склад мали змогу до ендогенної продукції NO. За відсутності субстратів дихання біосинтез NO виявився нижчим на 40%. Послідовне внесення до інкубаційного середовища 1 мкМ L-аргініну та 100 мкМ Ca²⁺ приводило до достовірного (p<0,05) посилення біосинтезу оксиду азоту відносно контрольних значень. Додавання екзогенного Ca²⁺ мало наслідком суттєве зростання (p<0,05) утворення NO відносно дослідів за його відсутності (рис. 3.1.9). Додавання 10 мкМ NADPH також приводило подальшого зростання NO-синтазної активності. Водночас внесення до реакційного середовища NH₄ не стимулювало NO-синтазну активність MX (рис. 3.1.9). Наявність 10 мкМ FAD в інкубаційному середовищі, яке містило усі вище зазначені компоненти, мало наслідком суттєве зниження утворення оксиду азоту (p<0,05). Діючи концентрації речовин використовувалися з урахуванням результатів подібних експериментів на інших об'єктах [168, 231, 290, 425, 429].

Слід відзначити, що ізольовані MX володіють базальною NO-синтазною активністю за відсутності кофакторів та субстратів, що свідчить про наявність необхідних реакційних компонентів в матриксі у достатній кількості та енергізований стан MX у середовищі із піруватом та сукцинатом. Відомо, що енергізовані MX серця синтезують NO навіть за відсутності екзогенного Ca²⁺ через достатню для прояву ензиматичної активності концентрацію катіона в матриксі [212, 482]. Незалежний від позамітохондрійного Ca²⁺ біосинтез NO спостерігається і в наших експериментах. Втім, додавання до MX кардіоміоцитів мишей та щурів іонів Ca приводило до посилення продукції NO, а екстрамітохондрійні Mg²⁺ та RuR її пригнічували [482]. Отже, біосинтез оксиду азоту MX міометрія також залежить від концентрації екзогенного Ca²⁺.

Існують відомості, що енергізовані MX здатні продукувати NO за відсутності у середовищі інкубації NADPH та L-аргініну [212, 450, 482]. Внутрішньомітохондрійна концентрація NADPH складає 1,04-1,78 мМ, що значно перевищує відповідне значення K_{NADPH} для mtNOS (0,1-1 мкМ) [231]. Концентрація L-аргініну в матриксі MX відповідає 150-310 мкМ і суттєво вища за величину K_m

для L-аргініна (5 мкМ для МХ печінки [235], 35-37 мкМ – кардіоміоцитів та скелетного м'язу діафрагми [88]).

Хоча внесення до інкубаційного середовища основного джерела електронів в позамітохондрійних NOS NADPH мало наслідком подальше зростання продукції NO, додавання кофактору і дисоціюючого переносника електронів BH_4 не спричинювало вірогідної різниці у біосинтезі NO. Можливо, ці результати пояснюються достатньою енергізацією МХ в умовах наших дослідів (наявність в середовищі сукцинату та пірувату як субстратів дихання) на фоні функціонального sprzęження mtNOS із дихальним ланцюгом, а також можливістю зворотного транспорту електронів від II на I комплекс [83]. За нестачі L-аргініна або BH_4 , в умовах стимулювання акумуляції Ca^{2+} органелами утворення NO було значно меншим, але водночас спостерігався ріст продукції АФК в МХ кардіоміоцитів [193]. Отже, згідно цитованих даних, наявність BH_4 в інкубаційному середовищі є обов'язковою умовою коректного тестування NO-синтазної активності. Це враховувалося нами в подальших дослідях.

Ефект суттєвого гальмівного впливу FAD на продукцію оксиду МХ ми пояснюємо специфічним розташуванням і, відповідно, функціонуванням mtNOS як частини I (або IV) комплексу дихального ланцюга. Через присутність достатньої кількості CaM в МХ, цей кофактор був відсутній в середовищі інкубації.

Для полегшення переносу субстрату та кофакторів до матриксу ми використали каналоформер антибіотик аламетицин (7,5 мкг/мл), який перфорує ВММ [239]. Його присутність суттєво не впливала на NO-синтазну активність МХ за наявності в реакційному середовищі субстрату та кофакторів (графічні дані не наведено). Цей результат може свідчити на користь принаймні часткової експозиції mtNOS у міжмембранний простір МХ.

Отже, для надійного тестування біосинтезу NO в МХ міометрія в складі реакційного середовищі необхідним є наявність L-аргініна, Ca^{2+} , NADPH та BH_4 .

3.1.4. Кінетичні і каталітичні особливості NO-синтазної реакції в мітохондріях

В наступних експериментах досліджено основні кінетичні та каталітичні властивості реакції біосинтезу NO в МХ міомерія.

Важливими кінетичними характеристиками реакції синтезу NO є залежності NO-синтазної активності ізольованих МХ від концентрації Ca^{2+} та L-аргініна в інкубаційному середовищі.

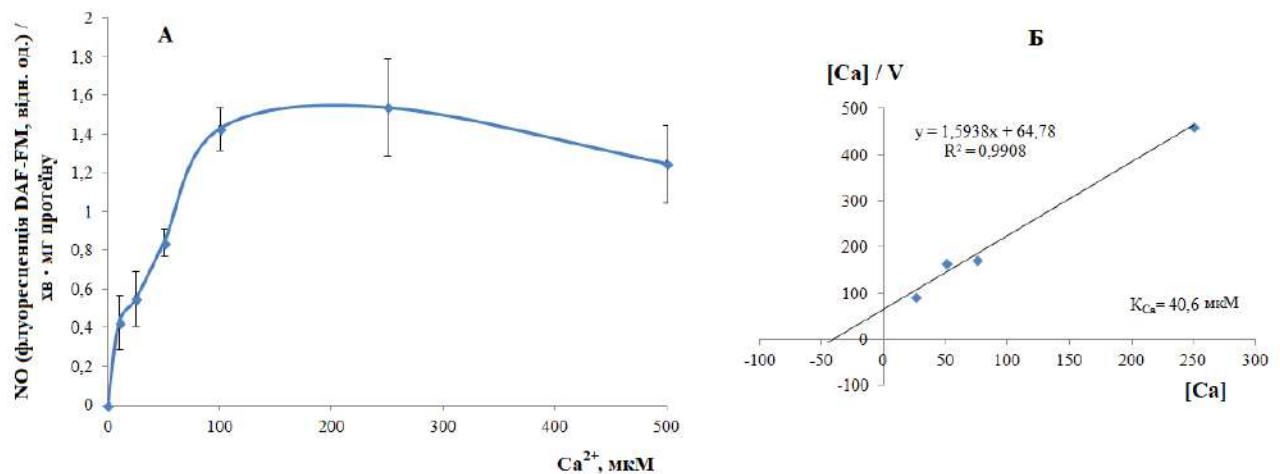


Рис. 3.1.10. Залежність активності mtNOS від концентрації екзогенного Ca^{2+} . $M \pm m$, $n=5$ (А). Б – приклад розрахунку методом Хейнса константи активації за Ca^{2+} : [Ca] – концентрація Ca^{2+} , V – активність mtNOS

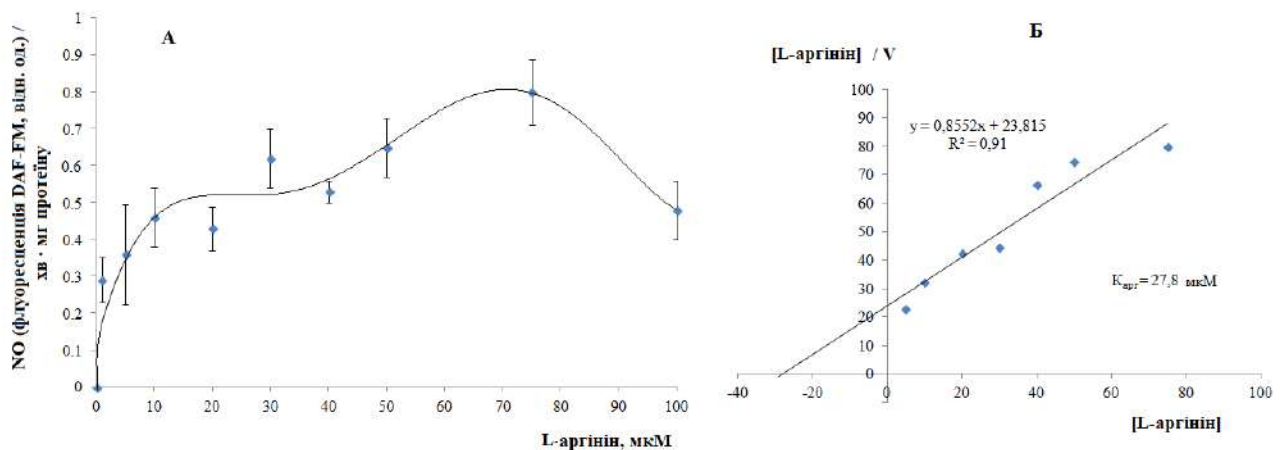


Рис. 3.1.11. Залежність активності mtNOS від концентрації екзогенного L-аргініна. $M \pm m$, $n=5$ (А). Б – приклад розрахунку методом Хейнса константи спорідненості до L-аргініна: [L-аргінін] – концентрація L-аргініна, V – активність mtNOS

Зі зростанням концентрації екзогенного Ca^{2+} збільшується продукція NO MX. Максимальна NO-синтазна активність спостерігається в діапазоні від 100 до 250 мкМ Ca^{2+} (рис. 3.1.10). Подальше зростання концентрації Ca^{2+} дещо знижувало продукцію NO. Характер кривої залежності на рис. 3.1.10 (А) дозволяє розрахувати константу активації за Ca^{2+} NO-синтазної реакції (рис. 3.1.10, Б), яка складає $44,4 \pm 14,5$ мкМ ($n=5$) за концентрації доданого до MX L-аргініну 1 мкМ.

Встановлено також, що зі зростанням концентрації L-аргініну від 1 до 75 мкМ спостерігається зростання біосинтезу оксиду азоту з тенденцією до виходу на плато (концентрація екзогенного Ca^{2+} складає 100 мкМ) (рис. 3.1.11, А), що дозволяє розрахувати уявна константу спорідненості за субстратом (рис. 3.1.11, Б). З подальшим зростанням концентрації амінокислоти (до 100 мкМ в цих дослідях) утворення NO суттєво знижується (рис. 3.1.11). Розрахована в координатах Хейнса константа спорідненості за L-аргініном становить $28,9 \pm 9,1$ мкМ ($n=5$). Одержане значення константи спорідненості за L-аргініном відповідає величинам констант для інших м'язових клітин [88].

Отже, оптимальними для функціональної активності mtNOS в міоцитах є концентрації L-аргініна в межах 50 мкМ та Ca^{2+} - 100 мкМ.

Широковживаний інгібітор конститутивних NO-синтаз N^G -нітро-L-аргінін (NA) та інгібітор nNOS 2-амінопіридин (2-AP) [267] ефективно гальмували синтез NO в MX міомерія (рис. 3.1.12). Напівмаксимальний гальмівний ефект мав місце за концентрацій ~ 25 мкМ NA та 100 мкМ 2-AP. Відомий блокатор транспорту Ca^{2+} у ВММ RuR (10 мкМ) суттєво пригнічував продукцію NO MX за наявності в інкубаційному середовищі 100 мкМ Ca^{2+} . В той же час інгібування mPTP Csp суттєво не впливало на активність mtNOS (рис. 3.1.12).

Ці результати свідчать про те, що в MX міомерія біосинтез NO забезпечується конститутивною ізоформою NOS, можливо nNOS.

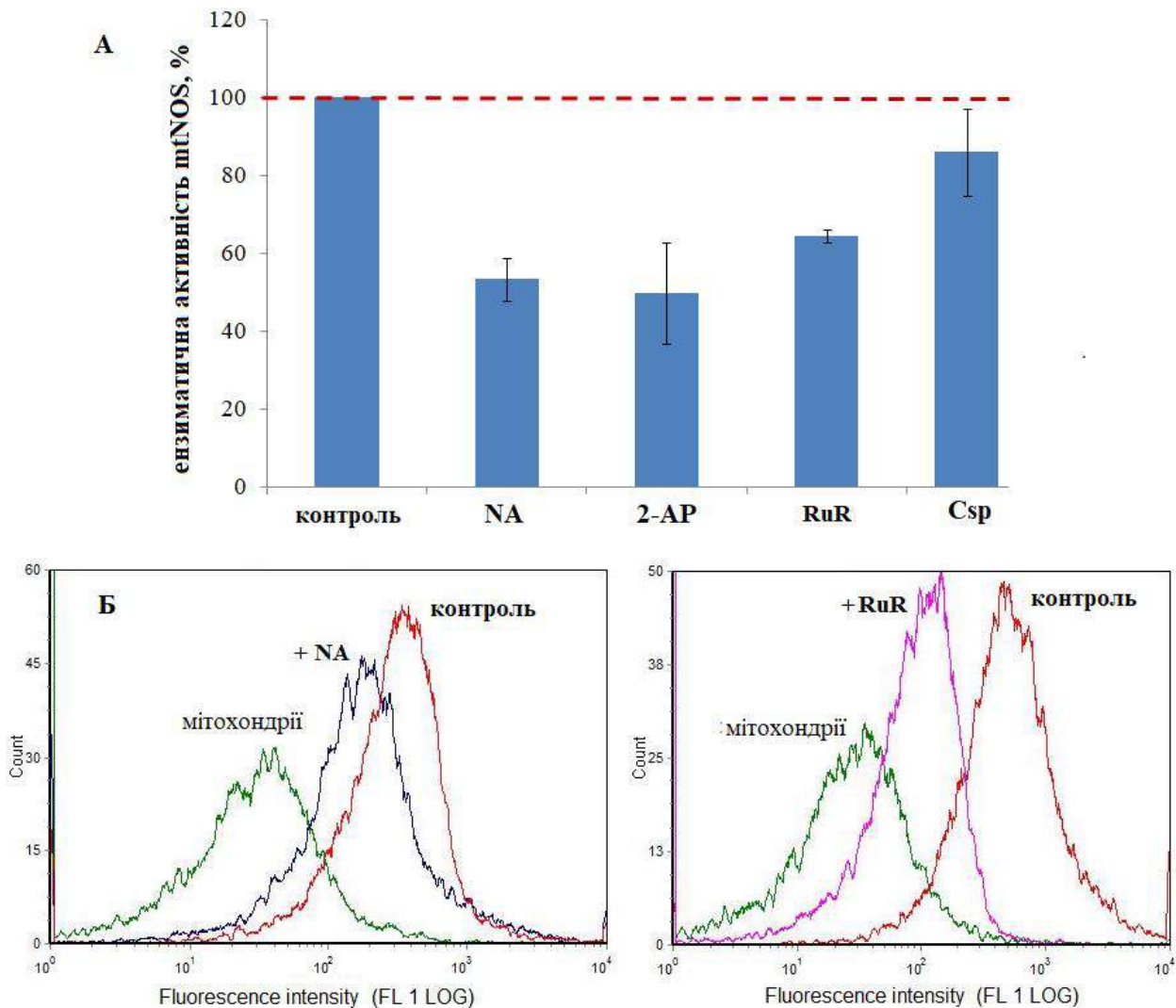


Рис. 3.1.12. Зміни інтенсивності флуоресценції DAF-FM в мітохондріях за присутності інгібіторів NO-синтаз 25 мкМ N^G -нітро-L-аргініна (NA) та 100 мкМ 2-амінопіридина (2-AP), а також модифікаторів обміну Ca^{2+} 10 мкМ рутенієвого червоного (RuR) та 5 мкМ циклоспорина А (Csp). $M \pm m$, $n=5$ (A). Б - Зміщення піків інтенсивності флуоресценції в умовах дії NA та RuR: “мітохондрії” – положення піку в “0” момент часу, “контроль” – положення піку через 30 хв. Дані типового експерименту

Відомо, що Mg^{2+} широко використовують як токолітик. Mg^{2+} гальмує спонтанні скорочення міометрія у концентрації 3 мМ, а також інгібує окситоцин-індуковані скорочення ГМК матки на 30–40% у концентрації 8 мМ [435]. Концентрація Mg^{2+} 5–10 мМ є фармакологічною [222]. Показано, що 7 мМ Mg^{2+} гіперполяризує мітохондрійну мембрану, але не перешкоджає її деполяризації за присутності 100 мкМ Ca^{2+} [61]. Наявність Mg^{2+} також є необхідною для накопичення Ca^{2+} МХ, константа активації за цим катіоном (K_{Mg}) сягає 1,7-4,27 мМ, значення оптимальної концентрації Mg^{2+} становить 5-10 мМ; за 10 мМ і

вище іони Mg блокують накопичення Ca^{2+} МХ [8, 50]. На відміну від МХ деяких інших типів клітин, в міомерії вони не здатні накопичувати Ca^{2+} за відсутності MgATP^{2-} , який потрібний для реверсної роботи АТР-синтази та забезпечення рушійної сили (формування електрохімічного градієнта протонів, Δp) для входу Ca^{2+} [18, 76].

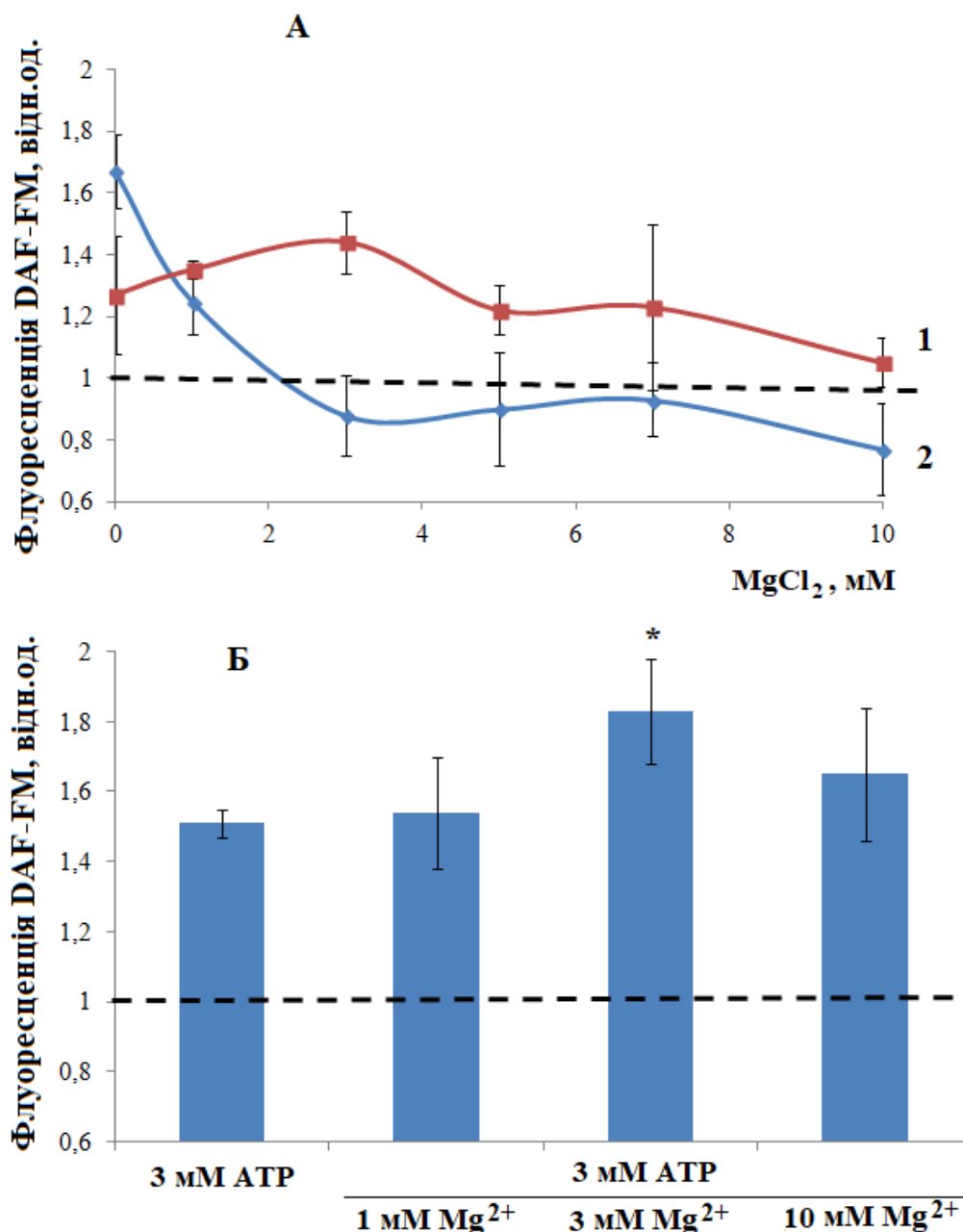


Рис. 3.1.13. Вплив іонів Mg на синтез оксиду азоту в ізолюваних мітохондріях міомерія. А - 1 – за наявності в середовищі 50 мкМ L-аргініну, 2 – за наявності 50 мкМ L-аргініну та 100 мкМ Ca^{2+} ; Б – в середовищі присутній 3 мМ АТР. $M \pm m$, $n=5$. ; * - зміни вірогідні ($p \leq 0,05$) відносно дії 3 мМ АТР. За “1” прийнято ендогенний (за відсутності L-аргініну та Ca^{2+} в середовищі) синтез NO в мітохондріях

Іони Mg в концентрації 1-10 мМ концентраційно-залежно гальмують біосинтез NO в МХ (рис. 3.1.13, А, крива 2). Водночас за відсутності іонів Ca інгібувальний ефект Mg^{2+} не спостерігали (рис. 3.1.13, А, крива 1). Тобто за цих експериментальних умов іони Mg виступають, можливо, інгібіторами надходження Ca^{2+} до МХ та Ca^{2+} -залежної генерації NO.

Подальші дослідження показали, що за присутності в середовищі 3 мМ АТР інгібувальний ефект Mg^{2+} знімається (рис. 3.1.13, Б). Даний результат можна пояснити утворенням комплексу $MgATP^{2-}$, який є субстратом для запуску H^+ -АТРази в режимі гідролізу АТР, що супроводжується активацією входу Ca^{2+} в МХ та стимулюванням активності mtNOS.

Біосинтез NO конститутивними NOS є Ca^{2+} , CaM-залежним процесом [86, 224]. Показано стимулювання Ca^{2+} -уніпортеру МХ комплексом Ca^{2+} -CaM, неопосередковане CaMKII [320]. Є дані, що в структурі переносників метаболітів, нуклеотидів та кофакторів через ВММ, зокрема транспортеру АТР-Mg/ P_i , присутні ділянки гомологічні CaM [392]. На інтактних міоцитах та фракції ізольованих МХ міометрія невагітних щурів показано, що антагоністи CaM – кальмідазоліум (10 мкМ) та трифлюоперазин (100 мкМ) деполаризують ВММ, але спричинюють зростання рівня іонізованого Ca як в цитоплазмі, так і в матриксі МХ [10, 78, 403]. Наведені дані дозволяють припустити, що порушення або інгібування взаємодії mtNOS з комплексом Ca^{2+} -CaM буде мати наслідком інгібування її Ca^{2+} -залежної активації або/і порушення регуляції.

Наші подальші дослідження показали, що антагоністи CaM кальмідазоліум (0,1-10 мкМ) та трифлюоперазин (10-100 мкМ) концентраційно-залежно інгібують синтез оксиду азоту в МХ міометрія (рис. 3.1.14).

Конститутивні NO-синтази, в тому числі й мітохондрійна, функціонально активні лише у формі димера, який стабілізується комплексом Ca^{2+} -CaM. Поряд з цим, зв'язування CaM контролює транспорт електронів від редуцтазного на оксигеназний домен, а також в редуцтазному домені NO-синтаз. Порушення транспорту електронів та спряження між субодинаціями в цих ензимах призводить до зростання генерації АФК [86, 224].

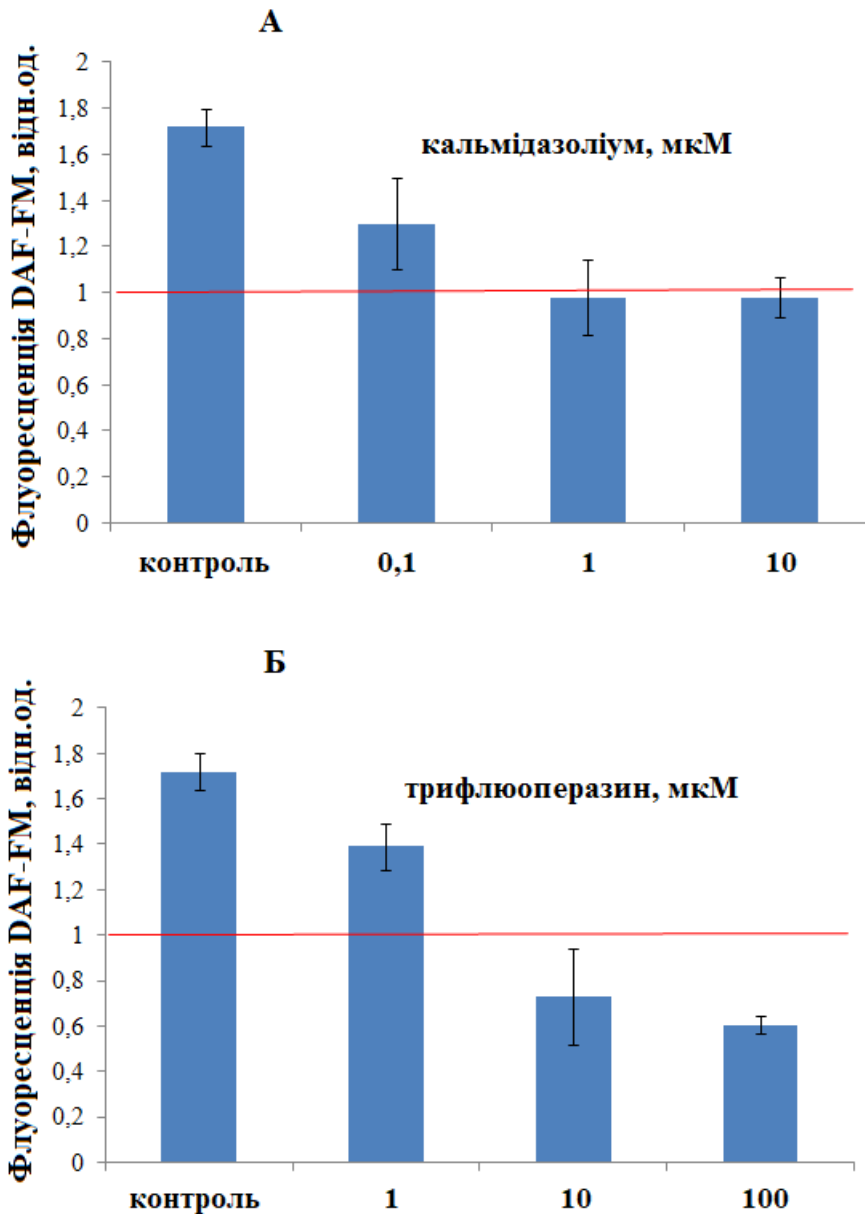


Рис. 3.1.14. Дія антагоністів кальмодуліна на продукцію оксиду азота в ізольованих мітохондріях міомерія. $M \pm m$, $n=5$. За "1" прийнято ендogenous (за відсутності L-аргініну та Ca^{2+} в середовищі) синтез NO в мітохондріях

Кальмідазоліум в концентрації 10 мкМ в 5 разів посилював генерацію АФК порівняно з контролем в досліджуваних субклітинних структурах. В той же час 100 мкМ трифлюоперазин майже не впливав на інтенсивність продукції АФК в МХ (рис. 3.1.15, А). А власне інгібування активності мітохондрійної NO-синтази (за дії інгібітора 50 мкМ N^G -нітро-L-аргініна) не приводило до посилення генерації АФК (рис. 3.1.15, Б). Одержані результати пояснюються істотними відмінностями в механізмах дії обох антагоністів.

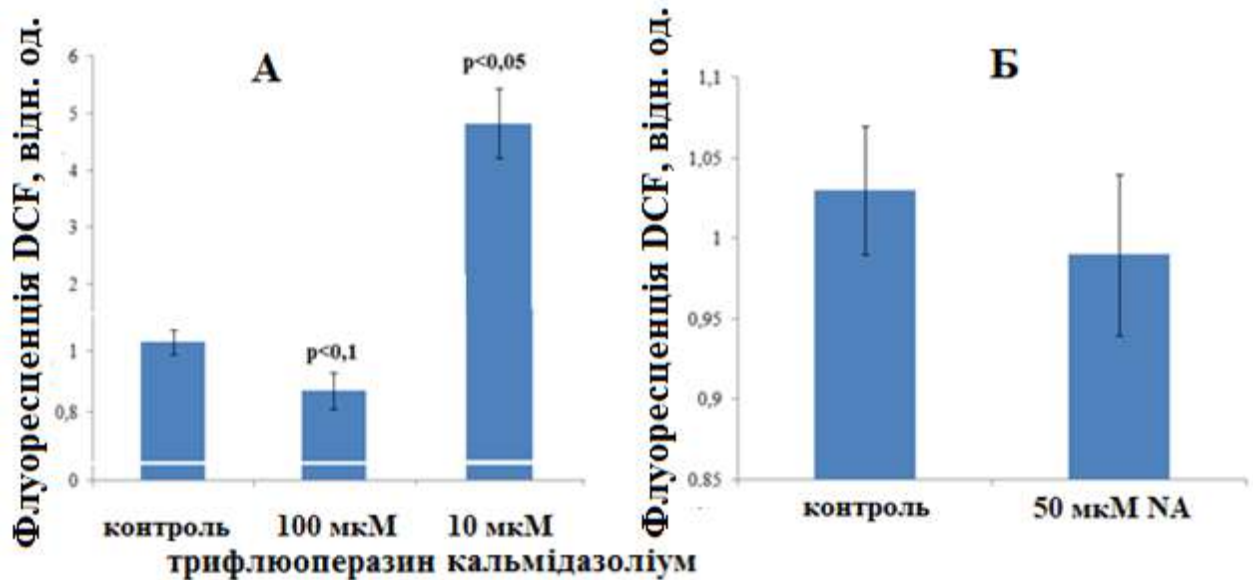


Рис. 3.1.15. Утворення активних форм кисню (за DCF-флуоресценцією) в присутності антагоністів кальмодуліна (А) та інгібітора NOS – N^G -нітро-L-аргініна (NA) (Б). За “1” прийнято значення флуоресценції перед внесенням діючих речовин. $M \pm m$, $n=4$

Кальмідазоліум має більшу спорідненість до CaM, ніж трифлюоперазин. Як було, наприклад, показано для кінази легких ланцюгів міозина (MLCK) кальмідазоліум діє на вже утворений CaM-ферментний комплекс як неконкурентний інгібітор. Даний комплекс не дисоціює, інгібування є незворотнім [262, 380, 415]. Не виключено, що кальмідазоліум, можливо, шляхом пригнічення CaM-залежного транспорту електронів в мітохондрійній NO-синтазі спричинює переключення її NO-синтазної активності на оксидазну і відповідне посилення генерації зазначеним ферментом АФК. В той же час трифлюоперазин взаємодіє з CaM в двох ділянках між Ca^{2+} -зв'язуючими доменами, запобігаючи утворенню активного комплексу CaM-ензим [415]. Таким чином, він зменшує пул вільного CaM, що знижує активність NOS, але не призводить до посилення генерації АФК. Хоча не можна виключати як пряму інгібувальну дію антагоністів кальмодуліну на фермент NOS, так і опосередковану, через блокування Ca^{2+} -уніпортера.

Водночас відсутність достовірного пригнічення генерації АФК МХ за дії NA свідчить на користь того, що в використаному нами реакційному середовищі mtNOS працює саме як NO-синтаза, а не оксидаза.

На свіжовиділених міоцитах матки нами продемонстровано, що синтез оксиду азоту в МХ залежить від функціональної активності ЕТЛ. Тому в наступній серії експериментів на фракції ізольованих МХ ми досліджували залежність NO-синтазної активності МХ від їхнього енергетичного стану.

Діюча концепція метаболічних станів МХ та дихального контролю базуються на співвідношенні швидкості поглинання O_2 та синтезу АТР ізольованими органелами. Відсутність екзогенних субстратів дихання та АDP відповідає метаболічному стану 1. Висока швидкість поглинання O_2 та продукції АТР спостерігається у випадку додавання субстратів дихання та АDP в метаболічному стані 3. Відсутність АDP обумовлює низьку швидкість поглинання O_2 , АТР не синтезується, а ВММ гіперполяризована (метаболічний стан 4) [154]. Із використанням панелі модифікаторів ЕТЛ нами було одержано наступні результати.

За відсутності екзогенно доданих субстратів дихання МХ синтезували NO (рис. 3.1.16), хоча і з незначною ефективністю. Додавання в середовище інкубації 5 мМ пірувату та сукцинату спричинює стимуляцію їх окиснення і функціонування ЕТЛ, енергізацію МХ та посилення синтезу оксиду азоту. Аналогічним впливом на NO-синтазну активність володіє відомий інгібітор H^+ -каналу H^+ -АТРази (комплексу V_o) олігоміцин (2,5 мкМ). Додавання до енергізованих МХ 0,5 мМ АDP (фосфат неорганічний та Mg^{2+} знаходяться в інкубаційному середовищі) приводило до створення умов для синтезу АТР та послаблювало NO-синтазну активність в МХ. Блокування I комплексу ЕТЛ ротеноном (5 мкМ) або III комплексу антимицином А (1 мкг/мл) мало наслідком суттєве зниження біосинтезу NO енергізованими МХ. Аналогічний за напрямком ефект спричинює введення до інкубаційного середовища протонофора карбонілціанід 3-хлорофенілгідрозона (СССР), який швидко руйнує електро-хімічний градієнт протонів на ВММ.

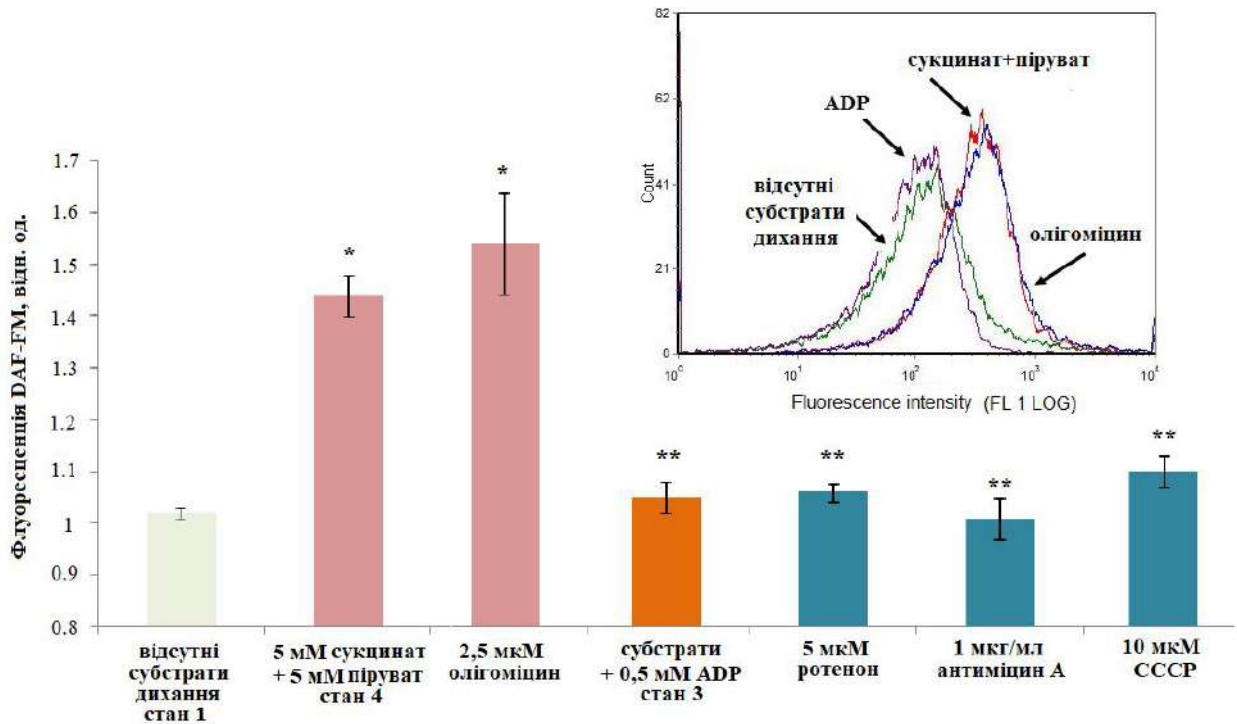


Рис. 3.1.16. Залежність активності mtNOS від присутності субстратів дихання та інгібіторів електрон-транспортного ланцюга в мітохондріях. Стани 1, 3, 4 – стани мітохондріального дихання за Чансом. * $p < 0,05$ відносно стану 1, ** $p < 0,05$ відносно стану 4. $M \pm m$, $n = 5$. Вставка: зміщення піків інтенсивності флуоресценції в умовах різного складу середовища інкубації. Дані типового експерименту

Отже, за відсутності екзогенно доданих субстратів дихання ізольовані МХ продукують NO за рахунок внутрішніх резервів, цей процес суттєво посилюється в умовах енергізації МХ та гіперполяризації їхньої внутрішньої мембрани за додавання субстратів дихання або олігоміцина. Натомість в стані ефективного окисного фосфорилування (стан 3) синтез NO знижується. До цього ж ефекту призводить інгібування окремих комплексів дихального ланцюга ротеноном та антимицином, а також дисипація електро-хімічного градієнта за внесення протонофора СССР. В дослідях на МХ кардіоміоцитів перехід від відносного спокою (стан 4) до активного дихання у випадку повністю спряжених МХ (наявні субстрати дихання, достатня концентрація кисню та присутнє АДР, стан 3) супроводжується зниженням на 60% продукції NO. Також було продемонстровано, що біосинтез NO експоненціально залежить від величини електричного потенціала внутрішньої мембрани [118, 130, 449]. За умови зворотного транс-

порту електронів (від II до I комплексу) у присутності в середовищі АТФ і сукцинату спостерігається утворення оксиду азоту навіть без екзогенного NADPH. Активність mtNOS максимальна за оптимальної роботи ЕТЛ, зокрема комплексу I, який є джерелом електронів для функціонування ензиму; інактивація комплексу I знижує активність mtNOS [290, 354, 450].

Наші результати узгоджуються із тими, які було одержано на пермеабілізованих кардіоміоцитах із застосуванням методу конфокальної мікроскопії. Зокрема, колапс мембранного потенціалу за присутності протонатора FCCP, блокування Ca^{2+} -уніпортера BMM сполукою Ru360, застосування інгібіторів ЕТЛ ротенону або антиміцину А в комбінації з олігоміцином призводило до гальмування синтезу NO в МХ [194].

Варто зазначити, що зниження продукції NO при переході зі стану 4 до стану 3 протилежне тому, що можна було б очікувати від незначного закиснення матриксу і рН-залежності активності mtNOS. Залежність продукції NO від внутрішньомітохондрійного рН (в діапазоні 5,5-8,5) має дзвоноподібний характер з максимумом при рН 7,4 [450]. Беручи до уваги значення рН матриксу біля 7,5 в стані 3 і біля 7,8 в стані 4 [109, 323], активність mtNOS повинна бути вища в першому випадку. Ці результати вказують на те, що більший синтез NO в стані 4 не пов'язаний зі змінами рН. Існує точка зору, що активність mtNOS регулюється саме електричною, а не протонною складовою мембранного потенціалу на BMM [129, 450].

Таким чином, наші результати переконливо свідчать і знаходяться у відповідності з уявленнями про те, що біосинтез оксиду азоту МХ суттєво залежить від рівня їхньої енергізації і величини електрохімічного градієнту іонів водню на внутрішній мембрані.

Узагальнення та обговорення результатів підрозділу 3.1.

Наразі доведено роль NO як фактора релаксації міометрія, який попереджає контрактильну відповідь на розтягнення стінок матки за вагітності. За даними літератури джерелами NO в матці можуть слугувати її ендометріальна тканина та ендотелій судин. Хоча й показана наявність iNOS та eNOS в міомет-

рії за вагітності, ідентифікація джерел біосинтезу NO саме в інтактних міоцитах матки залишається актуальною.

З використанням селективного щодо NO флуоресцентного зонду DAF-FM та методу лазерної конфокальної мікроскопії нами вперше продемонстровано продукцію оксиду азоту в свіжовиділених міоцитах міометрія щурів. З використанням детергентної техніки (пермеабілізація ПМ дигітоніном) та специфічного інгібітора SERCA тапсигаргіна показано, що джерелами оксиду азоту в ГМК матки можуть виступати конститутивні NOS (продукція NO зменшується за присутності інгібітора конститутивних NO-синтаз), асоційовані з ПМ та, можливо, CP, що узгоджується з результатами, одержаними на окремих електрозбудливих клітинах [191, 482]. З використанням методології солокалізації DAF-FM та специфічного щодо MX зонду MitoTracker Orange CM-H₂TMRos продемонстровано, що потужним джерелом синтезу NO є MX, ефективність якого залежить від функціональної активності комплексів ЕТЛ.

На фракції ізольованих MX щурів із застосуванням флуоресцентного зонду DAF-FM та методу протокової цитометрії нами вперше підібрано умови визначення NO-синтазної активності та охарактеризовані кінетичні та каталітичні властивості реакції біосинтезу NO. Оптимальна робота mtNOS в ізольованих MX міометрія потребує наявності в інкубаційному середовищі субстратів дихання (сукцинату та пірувату), Ca²⁺, NADPH та L-аргініну. Розраховано ключові кінетичні параметри цієї ензиматичної реакції: уявна константа Міхаеліса за L-аргініном дорівнює 28,9±9,1 мкМ, а константа активації за Ca²⁺ - 44,4±14,5 мкМ, які мають фізіологічне значення. Одержані нами результати переконливо свідчать про те, що синтез NO забезпечується Ca²⁺-залежною конститутивною NOS. Активність пригнічується інгібітором конститутивних NO-синтаз N^G-нітро-L-аргініном та nNOS – 2-амінопіридином, залежить від інтенсивності надходження до матриксу екзогенного Ca²⁺ і пригнічується антагоністами CaM та іонами Mg. Доведено, що біосинтез оксиду азоту MX суттєво залежить від рівня їхньої енергізації.

Можливість біосинтезу NO в MX та наявність значної кількості молекулярних мішеней дії нітросполук вказують на те, що оксид азоту є важливим ре-

гулятором функціональної активності цих органел. Особливо важливим може бути вплив нітросполук на системи ВММ, що контролюють Ca^{2+} -гомеостаз МХ, оскільки від концентрації Са в матриксі, як відомо, залежить ефективність біоенергетичних процесів. Ряд дослідників припускають, що МХ є важливим Ca^{2+} -депо, зокрема в ГМК. Вирішенню зазначених питань присвячений наступний розділ роботи.

Результати опубліковані [39-40, 179, 184-185, 187].

3.2. МІТОХОНДРІЇ ЯК СИСТЕМА ПІДТРИМАННЯ Ca^{2+} -ГОМЕОСТАЗУ В КЛІТИНАХ ГЛАДЕНЬКОГО М'ЯЗА МАТКИ. ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАНСПОРТУ ІОНІВ Ca^{2+} ЇХНЬОЇ ВНУТРІШНЬОЇ МЕМБРАНИ

3.2.1. Електрохімічний потенціал внутрішньої мембрани мітохондрій та Ca^{2+} -гомеостаз у клітинах міометрія

Результати сучасних досліджень свідчать про важливу роль МХ в механізмах клітинної сигналізації й шляхах, що ведуть до клітинної смерті. Електричний потенціал на ВММ є інтегральним показником активності ЕТЛ та основним регулятором метаболічних та транспортних процесів в МХ. Наразі існують експериментальні докази функціонального зв'язку ПМ та МХ, що забезпечує регуляцію концентрації Ca^{2+} в цитоплазмі [166].

Електрохімічний потенціал на ВММ ($\Delta\mu$) створюється за умови функціонування ЕТЛ і є безпосереднім наслідком формування та підтримання трансмембранного градієнту протонів в інтактних органелах. Він складається з двох компонент: хімічної ($\Delta\mu_{\text{H}}$) та електричної ($\Delta\phi$) [11, 491]. Робота Ca^{2+} -уніпортера залежить від ефективності транспорту протонів та електронів у ВММ і, відповідно, величини градієнту іонів водню. Суттєве зниження електрохімічного потенціалу мембрани органел (деполяризація) призведе до гальмування електрофоретичної акумуляції ними Ca^{2+} , водночас можна припустити, що домінуючим транспортним процесом у цьому випадку стане вивільнення катіона з матриксу в цитозоль за рахунок функціонування H^+ - Ca^{2+} -обмінника [278]. Слід очікувати, що речовини, які модулюють $\Delta\mu$, а саме інгібітори дихання та протонофори, будуть впливати як на концентрацію Ca^{2+} в матриксі МХ, так і в міоплазмі.

Для вивчення впливу стану енергізації МХ на концентрацію Ca^{2+} в міоплазмі міоцитів доцільно використати метод лазерної конфокальної мікроскопії, який дозволяє візуалізувати розподіл відповідних флуоресцентних зондів в окремих клітинах. Ми проаналізували вплив загально вживаного інгібітора IV комплексу ЕТЛ азиду натрію та протонофора СССР на електрохімічний потенціал ВММ та концентрацію Ca^{2+} в міоплазмі ГМК матки.

З використанням методології солокалізації флуоресцентних зондів NAO, який специфічно взаємодіє із кардіоліпіном, на який збагачена саме мітохондрійна мембрана [218], та 9-АА, котрий зв'язується із субклітинними мембранними структурами, на яких існує ΔpH [214], продемонстровано, що в досліджуваних міоцитах матки присутні енергізовані МХ із наявним градієнтом протонів на їхній внутрішній мембрані (рис. 3.2.1).

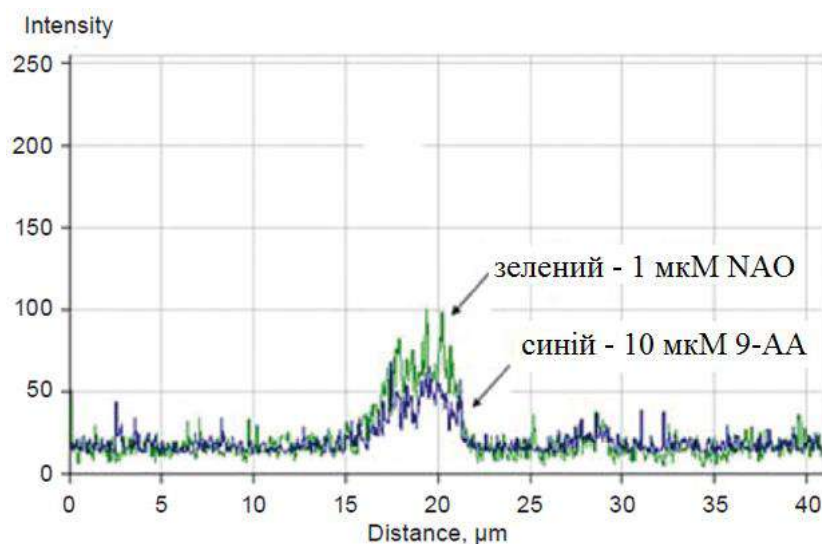


Рис. 3.2.1. Розподіл в міоциті флуоресцентних зондів, специфічних щодо мітохондрійної мембрани (1 мкМ NAO) та трансмембранного градієнту протонів (10 мкМ 9-АА). Дані лазерної конфокальної мікроскопії

Протонофор 10 мкМ CCCP (рис. 3.2.2, 3.2.3, А) та інгібітор дихального ланцюга мітохондрій 1 мМ NaN_3 (рис. 3.2.3, А) призводили до суттєвого зниження флуоресценції 9-АА протягом 5 хв у випадку додавання цих сполук до міоцитів. Використані концентрації діючих речовин широко застосовуються при роботі на МХ. Оскільки як Hoechst 33342 (зонд специфічний до ядра), так і 9-АА мають близькі величини довжини хвиль збудження та реєстрації флуоресценції, відбувається гасіння синьо-фіолетової флуоресценції міоплазми за дії протонофору, водночас аналогічне забарвлення ядра з часом не змінюється (рис. 3.2.2, верхня панель).

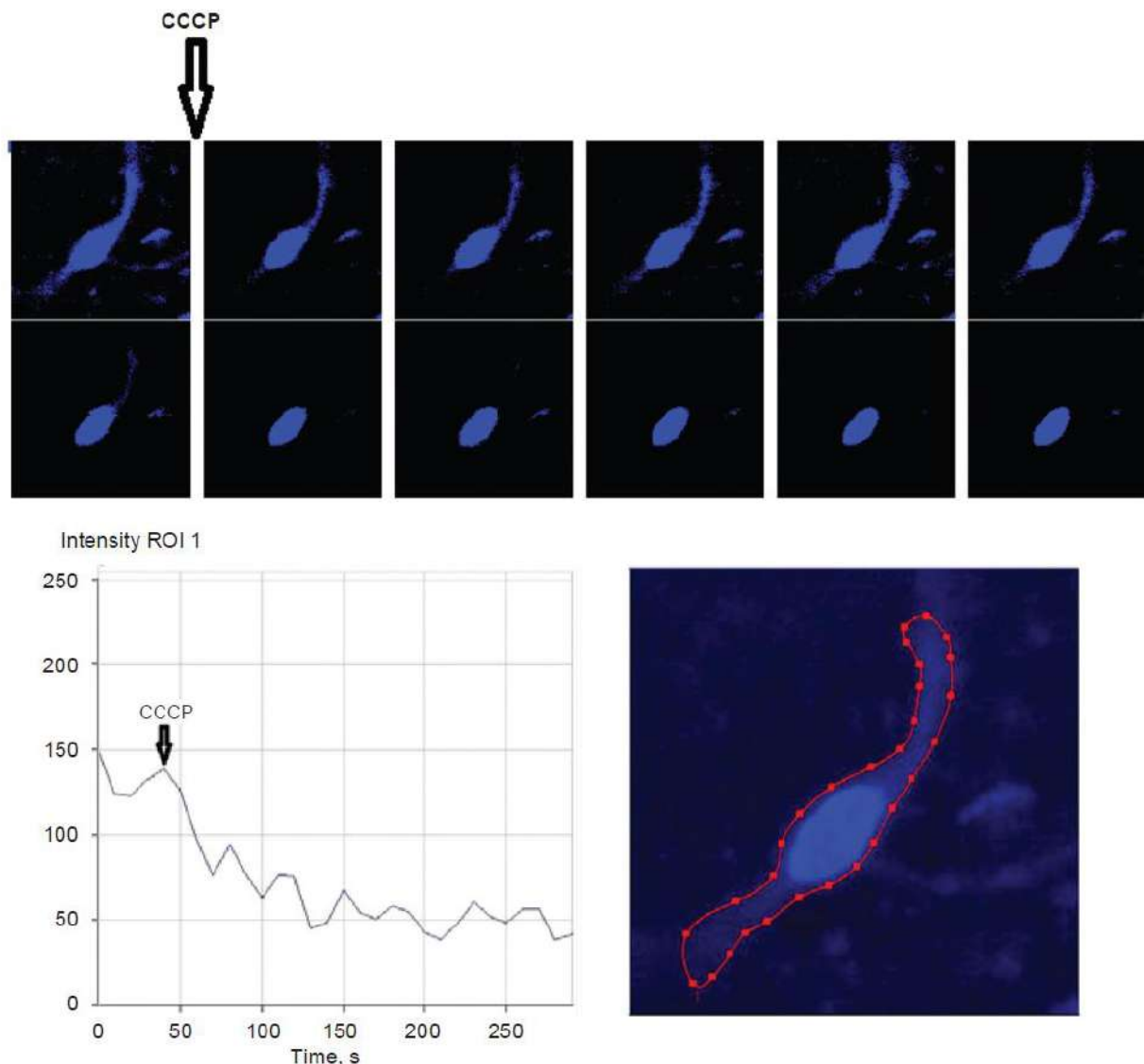


Рис. 3.2.2. Гасіння флуоресценції 9-АА за дії протонофору СССР (10 мкМ) (верхня панель) та числова інтерпретація цього процесу, функція ROI (нижня панель). Дані лазерної конфокальної мікроскопії

Електричну складову ($\Delta\phi$) електрохімічного потенціалу ВММ вивчали, використовуючи потенціалчутливий флуоресцентний зонд ціанінового ряду 3,3'-дігексилосакарбоціанін ($\text{DiOC}_6(3)$) (0,5 мкМ). Зонд $\text{DiOC}_6(3)$ є ліпофільним катіоном, який потенціал-залежно накопичується всередині обмеженого мембранного простору (ліпосоми, МХ тощо) [266, 302, 359]. Існування потенціалу на клітинних мембранах призводить до його акумуляції, що супроводжується зростанням інтенсивності флуоресценції. При цьому зонд, в першу чергу, перерозподіляється між ПМ і ВММ в залежності від концентрації, співвідношення зонд/клітини, а також функціонального стану самих клітин. Згідно даних

літератури переважне накопичення відбувається в МХ (потенціал близько -180 мВ). Зменшення інтенсивності флуоресценції зонда в клітинній суспензії може свідчити на користь зниження поляризації мембран, в той час як її зростання – про збільшення величини (за модулем) трансмембранного потенціалу ПМ і/або ВММ [127, 266].

Обробка міоцитів 1 мМ азидом натрію призводить до суттєвого зниження інтенсивності флуоресценції DiOC₆(3) (рис. 3.2.3, Б), яке проявляється у відповідному зростанні ступеня знебарвлення зонду, і пояснюється деполаризуючим впливом NaN₃ на МХ внаслідок інгібування IV комплексу дихального ланцюга. В наведеній серії досліджень застосовувалась методика пермеабілізації ПМ міоцитів неіонним детергентом дигітоніном для збільшення її неспецифічної проникності до діючих речовин. В окремих дослідах (рис. 3.2.3, Б (вставка)) спостерігається майже повне зникнення флуоресценції DiOC₆(3) за присутності азиду натрію.

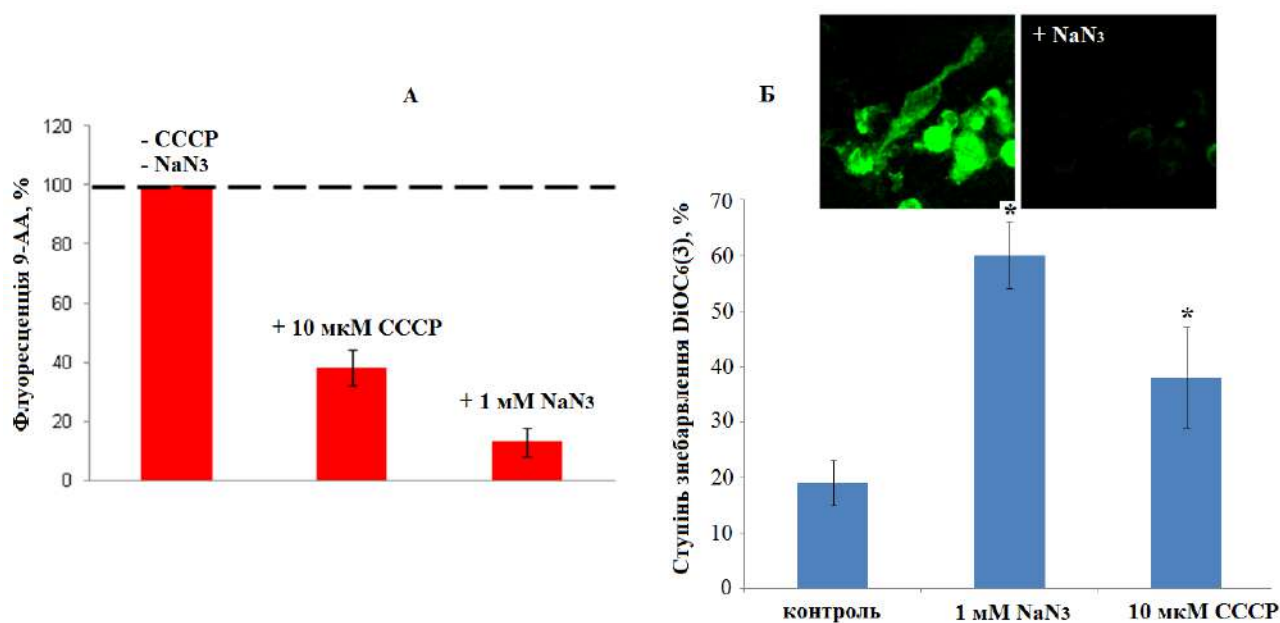


Рис. 3.2.3. Зміни інтенсивностей флуоресценції 9-АА (А) та DiOC₆(3) (Б) в міоцитах за дії протоннофора та інгібітора дихального ланцюга мітохондрій. Дані лазерної конфокальної мікроскопії. А - гасіння флуоресценції зонда 9-АА, $M \pm m$, $n = 3-4$. За 100 % (вісь ординат) прийнято величину флуоресценції зонду в клітинах за відсутності діючих речовин. Б - зниження інтенсивності флуоресценції (зростання ступеня знебарвлення) DiOC₆(3) в контролі (протягом 5 хв під впливом лазерного променю) та за дії деполаризуючих агентів; міоцити пермеабілізовані 0,01 % дигітоніном; $M \pm m$, * - $p \leq 0,05$, зміни вірогідні відносно контролю, для аналізу використано 5-14 клітин незалежних експериментів. Вставка

- зникнення флуоресценції $DiOC_6(3)$ в міоцитах протягом 2 хв при додаванні 1 мМ азиду натрію.

Кількісний аналіз (рис.3.2.2, нижня панель) дозволив оцінити ступінь знебарвлення 9-АА і провести відповідні розрахунки. Зокрема, СССР знижував флуоресценцію барвника в середньому на 62 %, а NaN_3 – на 87 % (рис. 3.2.3, А). Одержані результати пояснюються дисипацією градієнта протонів на ВММ за дії протонофора, а також унеможливленням генерації цього градієнту у випадку блокування дихального ланцюга азидом натрію. Отже, досліджувані речовини частково зменшують хімічну компоненту (ΔpH) електрохімічного градієнту МХ. Кількісні показники дисипації електрохімічного потенціалу на мітохондрійній мембрані (рис. 3.2.3, А) в середньому не набувають нульових значень протягом 5-хвилинного впливу СССР та азиду натрію, виключенням є лише окремі експерименти. Водночас, використані нами концентрації діючих речовин загальноживані на різних об'єктах для надійної дисипації Δp . Одержані результати можна пояснити існуванням компоненти неспецифічної сорбції флуоресцентних барвників мембранними структурами і макромолекулярними комплексами цитоплазми, якого практично неможливо уникнути.

Кількісний аналіз відповіді окремих міоцитів показав (рис. 3.2.3, Б), що зниження інтенсивності флуоресценції $DiOC_6(3)$ за рахунок знебарвлення зонду під дією лазерного опромінення використаної довжини хвилі (10-20 % максимальної потужності) в контролі сягає 20 % протягом 5 хв (для кількісної обробки результатів використано 14 клітин). Ступінь “вигорання” барвника є величиною змінною і залежить, передусім, від його концентрації, потужності лазера і часу опромінення. Азид натрію викликав суттєве зниження інтенсивності флуоресценції міоцитів, яке становило біля 60 % (оброблено 5 клітин). Як і у випадку 9-АА, залишковий рівень флуоресценції, очевидно, пов'язаний із неспецифічними потенціалнезалежними процесами сорбції $DiOC_6(3)$ мембранними структурами. Ефект азиду натрію був більш інтенсивним, ніж СССР (рис. 3.2.3, Б). Причиною цього, на нашу думку, є розклад NaN_3 з утворенням АФА [82] та інгібування каталази і цитохром с-оксидази МХ азидом, що супроводжується посиленою генерацією АФК [155, 263]. Існує точка зору, щодо дії

протонофору чутлива саме хімічна компонента електрохімічного градієнта протонів ВММ [11].

Отже, протонофор та інгібітор дихального ланцюга викликають істотне зниження електричного потенціалу в МХ міоцитів.

Дисипація електрохімічного потенціалу ВММ вплине на функціонування її Ca^{2+} -транспортувальних систем, наслідком чого можуть бути зміни концентрації Ca^{2+} в міоплазмі.

Із використанням Ca^{2+} -чутливого зонда Fluo-4 АМ встановлено значне зростання флуоресценції цього барвника за дії 10 мкМ СССР без додавання екзогенного Ca^{2+} , що свідчить про збільшення концентрації іонів Са в міоплазмі клітин міометрія за рахунок вивільнення з внутрішньоклітинних депо (рис. 3.2.4). За нашими підрахунками концентрація катіона зростає майже в два рази (рис. 3.2.5). Одержаний результат пояснюється унеможливленням функціонування Ca^{2+} -уніпортеру МХ внаслідок руйнування електрохімічного градієнта протонів на їхній внутрішній мембрані у присутності протонофору. Отже, МХ за цих умов неспроможні ефективно акумулювати іони Са з міоплазми. З іншого боку, в умовах експерименту можлива ефективна робота H^+ - Ca^{2+} -обмінника, який вивільнює Ca^{2+} з матриксу МХ у міоплазму.

Хоча деенергізуючий вплив азиду натрію на МХ є навіть більш інтенсивним, ніж СССР, його ефект на концентрацію іонів Са в міоплазмі не був вираженим. Цей факт можна пояснити з огляду на виникнення продуктів розкладу NaN_3 – АФА (NO та його похідних) [82], що здатні ефективно модулювати активність Ca^{2+} -транспортувальних систем міоцитів. Біохімічними мішенями дії АФА можуть бути енергозалежні системи транспорту катіону, локалізовані на рівні СР та ПМ (див. розділ 1.2).

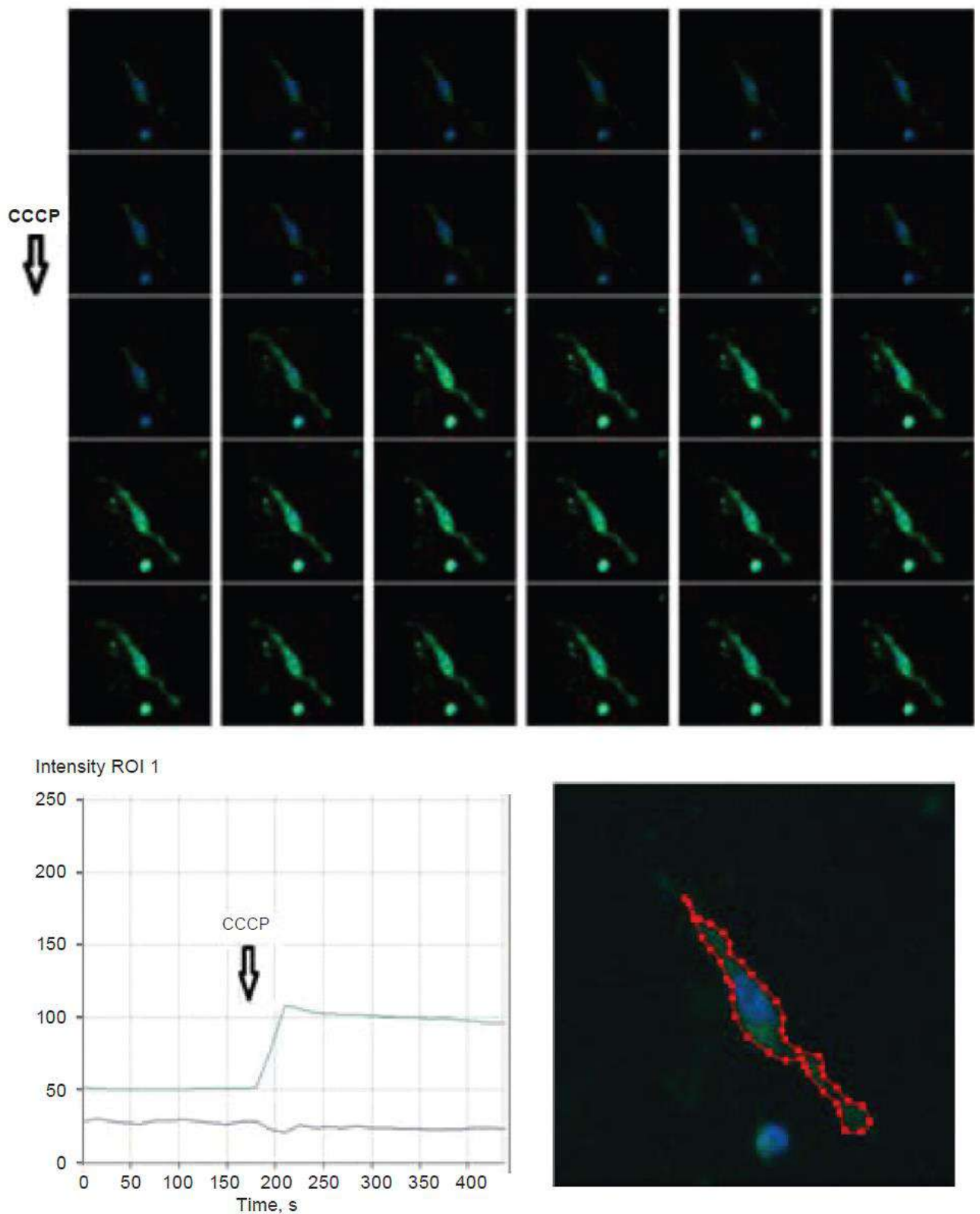


Рис. 3.2.4. Візуалізація з використанням Fluo-4 AM процесу зростання концентрації Ca^{2+} в мітоплазмі за дії 10 мкМ протоніфору (верхня панель) та числова інтерпретація цього процесу, функція ROI (нижня панель). Дані лазерної конфокальної мікроскопії

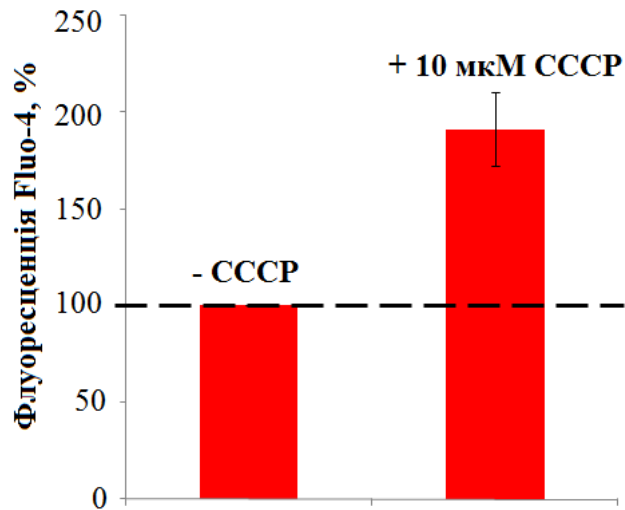


Рис. 3.2.5. Зростання в мітоплазмі концентрації Ca^{2+} в інтактних клітинах за дії протонифору СССР. $M \pm m$, для аналізу використано 8 клітин з незалежних експериментів. Значення інтенсивності флуоресценції Fluo-4 в клітинах за відсутності ефектора було прийнято за 100% (вісь ординат). Дані лазерної конфокальної мікроскопії

В паралельно проведених експериментах із застосуванням методу протокової цитофлуориметрії та Fluo-4 AM досліджувалась дія СССР та азиду натрію на вміст іонів Ca в матриксі ізольованих МХ.

5-хвилинна передінкубація МХ із протонифором за відсутності екзогенного Ca^{2+} призводила до зниження рівня катіону (початковий вміст Ca^{2+}) в матриксі в середньому на 20 % (рис. 3.2.6, А). Дія азиду натрію в цьому варіанті постановки експерименту не спостерігалась. Водночас передінкубація з обома діючими речовинами унеможлиблювала енергозалежну акумуляцію Ca^{2+} МХ (рис. 3.2.6, А).

Внесення до суспензії МХ екзогенного Ca^{2+} супроводжувалось збільшенням флуоресценції Fluo-4 AM, яким вони були попередньо навантажені (рис. 3.2.6, Б, стовпчик 1), що свідчить про зростання концентрації Ca^{2+} в матриксі. Акумуляція катіону здійснювалась за присутності Mg-АТР²⁻ та сукцината протягом 5 хв, після чого досягався стаціонарний рівень накопичення Ca^{2+} . Бар'єрну щодо іонів Ca функцію внутрішньої мембрани МХ можна довести, додаючи Ca^{2+} -іонофор А-23187 до суспензії, що супроводжується швидким вивільненням попередньо акумульованого катіону (рис. 3.2.6, Б, стовпчик 2). Слід зазначити, що принцип роботи протокового цитофлуориметра дозволяє аналі-

зувати зміни концентрації іонів Ca в окремих МХ, не беручи до уваги позамітохондрійне середовище. Протонофор та азид натрію викликали ефективний вихід попередньо накопиченого Ca²⁺ з МХ. Дія СССР була дещо інтенсивніша, ніж азиду (рис. 3.2.6, Б, стовпчики 3 та 4).

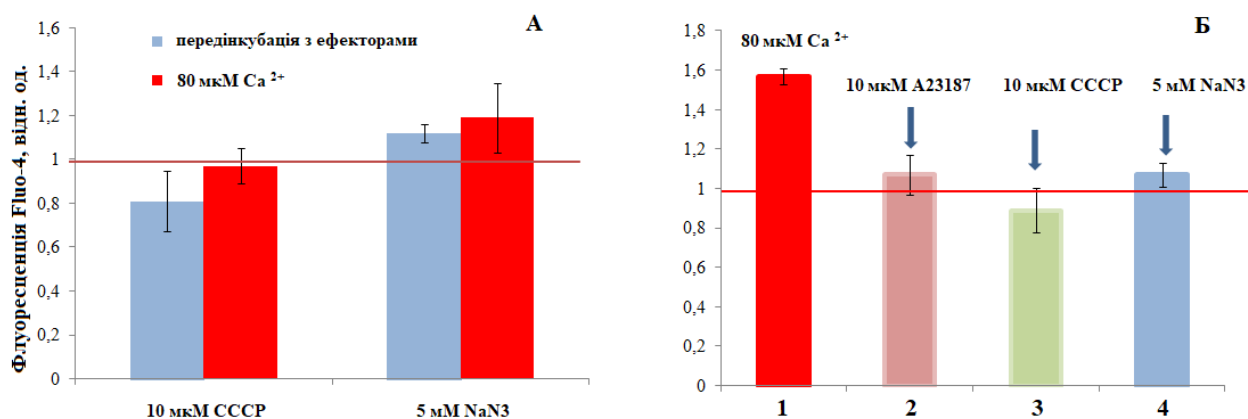


Рис. 3.2.6. Ефекти сполук, що деполаризують мітохондрійну мембрану, та Ca²⁺-іонофора на вміст Ca²⁺ в матриці ізольованих мітохондрій в умовах перед інкубації (А) та вразі коли катіон, акумульований в енергозалежному процесі. За “1” прийнято значення флуоресцентного сигналу F_{Fluo-4} без додавання екзогенного Ca²⁺ (ендогенний іонізований Ca, базальний рівень). М ± т, n=5. Дані протокової цитометрії

Наявність безпосереднього ефекту азиду натрію на концентрацію попередньо акумульованих іонів Ca в мітохондрійному матриксі при роботі на ізольованих органелах свідчить на користь нашого припущення стосовно впливу продуктів розкладу NaN₃ на позамітохондрійні Ca²⁺-транспортувальні системи у випадку дослідів із цілими міоцитами.

Отже, із залученням лазерної конфокальної мікроскопії, протокової цитофлуориметрії та методології солокалізації флуоресцентних зондів показано, що руйнування електрохімічного градієнту протонів на ВММ супроводжується зростанням концентрації іонів Ca в міоплазмі ГМК матки. Відсутність ефекту азиду натрію, як інгібітора ЕТЛ МХ, на концентрацію Ca²⁺ в міоплазмі може бути пояснено розкладом сполуки із продукуванням АФА – модуляторів субклітинних Ca²⁺-транспортувальних систем міоцитів, зокрема й МХ. Ця серія дослідів однозначно доводить ключову роль МХ в підтриманні Ca²⁺-гомеостазу ГМК. Локалізовані в субплазмалемному регіоні МХ, разом із ділянками периферичного СР, здатні акумулювати Ca²⁺ при його надходженні із позаклітинно-

го середовища і забезпечувати зв'язок між позаклітинним та внутрішньоретикулярним пулами катіону [97, 166, 349, 389].

Спроможність оксиду азоту модулювати процеси транспортування Ca^{2+} в МХ міометрія не з'ясована, хоча в досліджах *in vivo* наводяться переконливі докази такої можливості для кардіоміоцитів, ГМК судин та гепатоцитів [3]. Тому метою наступного етапу нашої роботи було оцінити вплив нітросполук (нітропрусида та нітриту натрію, SNP та SN відповідно) на АТР-залежну акумуляцію Ca^{2+} та H^+ - Ca^{2+} -обмін ізольованими МХ міометрія матки щурів – ключові Ca^{2+} -транспортувальні системи ВММ в цій тканині.

3.2.2. Стимуляція нітросполуками енергозалежної акумуляції іонів Са в мітохондріях міометрія

В дослідженнях із використанням радіоізотопної техніки ($^{45}\text{Ca}^{2+}$) на пермеабілізованих міоцитах матки щурів було продемонстровано, що акумуляція Ca^{2+} в МХ посилюється за присутності сукцината та MgATP^{2-} в мілімолярних концентраціях, не виключено що за рахунок реверсної роботи АТР-синтази. Іони Mg в концентраціях до 5 мМ ефективно стимулюють транспорт Ca^{2+} (константа активації за Mg сягає 1,7-4,3 мкМ), але за концентрацій, вищих 10 мМ, блокують накопичення Ca^{2+} МХ [18, 51, 76]. Вочевидь причиною посилення акумуляції катіона може бути зростання електричного потенціалу ВММ за цих умов. В представленій серії експериментів для дослідження змін мембранного потенціалу ВММ у випадку штучної енергізації МХ нами було використано потенціалчутливий флуоресцентний зонд JC-1 (1 мкМ) [411, 466]. В концентраціях нижчих 100 нМ JC-1 існує переважно як мономер та флуоресцює в зеленій області флуоресценції (525-535 нм). За вищих концентрацій JC-1 утворює агрегати (J-агрегати) зі зсувом інтенсивності флуоресценції в червону область (595 нм). Мембранний потенціал ВММ спричинює акумуляцію JC-1 в МХ завдяки більш негативному заряду з боку матрикса. Поляризовані МХ мають більшу інтенсивність флуоресценції в червоній області від J-агрегатів, ніж в зеленій від мономерної форми зонда. Саме співвідношення інтенсивностей червоної/зеленої флуоресценцій (595/535) використовується як індикатор мембран-

ного потенціалу, значення якого не залежить від концентрації зонда [359, 411, 466].

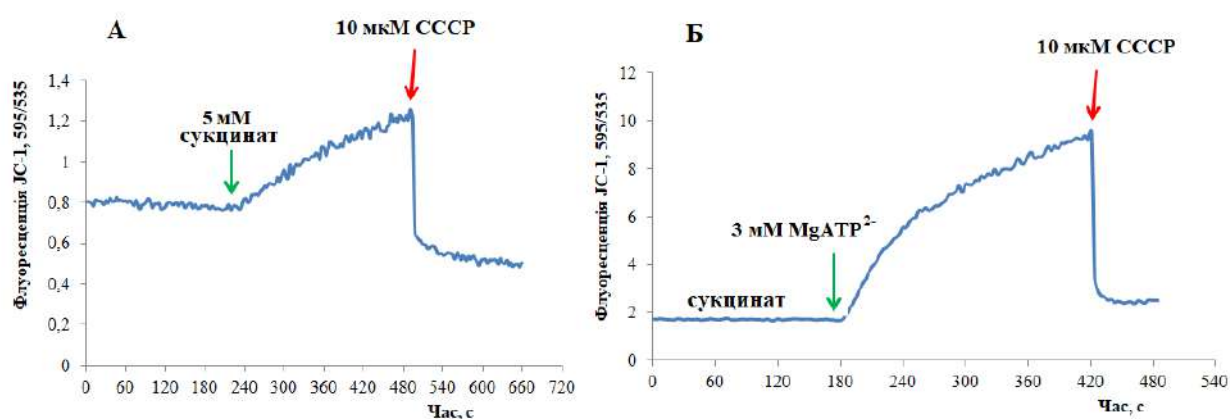


Рис. 3.2.7. Зміни поляризації внутрішньої мембрани мітохондрій при внесенні 5 мМ сукцината (А) та 3 мМ MgATP²⁻ (Б) в ізольованих мітохондріях міометрія. Результат типового експерименту

Дійсно, внесення в середовище інкубації 5 мМ сукцинату – субстрату сукцинатдегідрогенази, або II комплексу ЕТЛ – супроводжується зростанням мембранного потенціалу в середньому в 1,5 рази (рис. 3.2.7, А). Додавання в присутності сукцинату 3 мМ MgATP²⁻ призводить до значного (в середньому в 5 разів) зростання потенціалу на ВММ (рис. 3.2.7, Б), можливо за рахунок переключення роботи Н⁺-АТРази з синтезу на гідроліз АТР, що супроводжується потужним викидом протонів в міжмембранний простір та відповідним зростанням Δр. Внесення протонофору СССР призводить до різкого зниження електрохімічного потенціалу на ВММ. Отже, зростання енергізації МХ за додавання сукцинату та MgATP²⁻ очікувано підвищує ефективність акумуляції Ca²⁺. За присутності 3 мМ MgATP²⁻ та 5 мМ сукцинату ізольовані МХ, попередньо навантажені Fluo-4 АМ, ефективно накопичують Ca²⁺ із стандартного інкубаційного середовища, що супроводжується суттєвим зростанням рівня флуоресценції Fluo-4 (рис.3.2.8). За відсутності енергетичних субстратів і, відповідно, низького електричного потенціалу на ВММ електрофоретичне накопичення Ca²⁺ суттєво знижене (графічні дані не наведено).

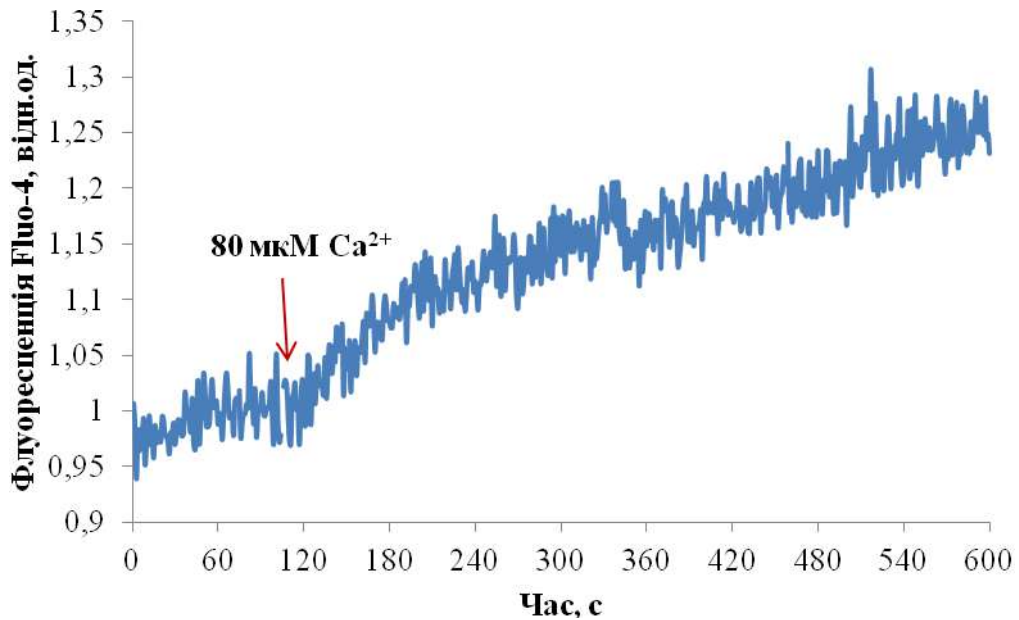


Рис. 3.2.8. Енергозалежна акумуляція Ca^{2+} присутності 3 мМ Mg-ATP^{2-} та 5 мМ сукцинату. Метод спектрофлуориметрії. Результат типового експерименту

Надійна бар'єрна функція внутрішньої мембрани ізольованих МХ міометрія щодо Ca^{2+} ілюструється дослідями, в яких додавання Ca^{2+} -іонофору А-23187 (10 мкМ) разом із Ca^{2+} -хелатором ЕГТО (1 мМ) в умовах досягнення транспортним процесом стаціонарного рівня (80 мкМ Ca^{2+} в середовищі, що відповідає 23,7 мкМ вільного катіону за присутності 3 мМ MgATP^{2-}) супроводжується різким падінням флуоресценції зонду, що свідчить про зниження концентрації катіону в МХ принаймні до початкового рівня. Концентрація Ca^{2+} в середовищі його акумуляції відповідає фізіологічній концентрації катіону в клітині поблизу МХ (в межах контактів МХ-СР або МХ-ПМ). Водночас, використання надто високих концентрацій катіону здатне викликати порушення функціональної активності органел [54, 451]. Було розраховано, що в МХ міститься близько 22 % всього зв'язаного в міометрії Ca^{2+} [49]. Загальний вміст Ca^{2+} у МХ може сягати 1 М [107, 216]. В той же час рівень саме іонізованого Ca^{2+} в матриксі знаходиться в межах 0,5-5 мкМ за наявності в середовищі неорганічного фосфату [54, 107, 151, 240, 300]. В матриксі МХ Ca^{2+} може знаходитись у складі Ca^{2+} -фосфатних комплексів, які подібні за хімічним складом та структурою до гідроксиапатиту та трикальційфосфату. При колапсі електрохімічного мембранно-

го потенціалу та закисленні матриксу вони можуть швидко дисоціювати [107, 151, 300].

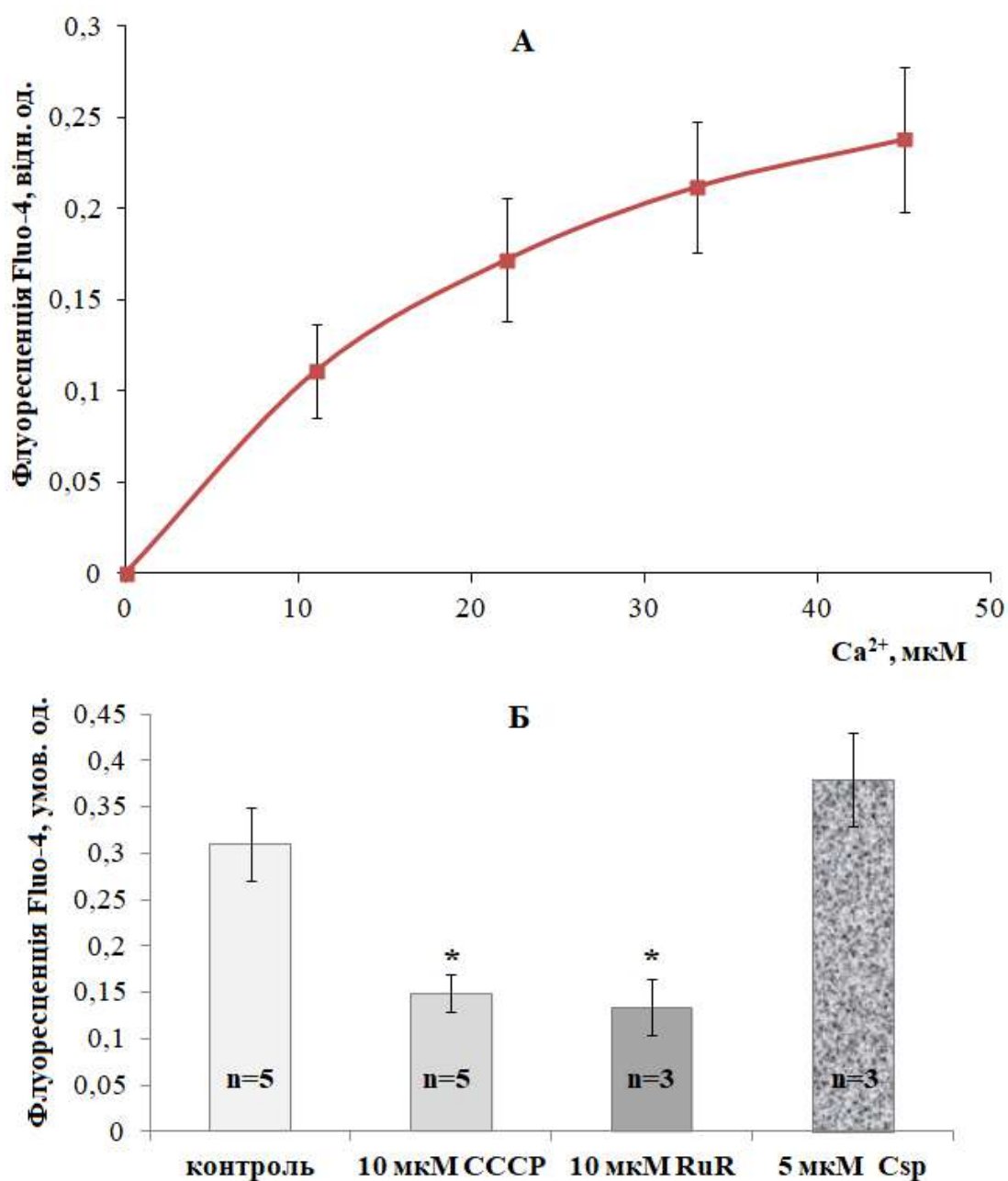


Рис. 3.2.9. Акумуляція Ca^{2+} енергізованими мітохондріями в залежності від концентрації вільного Ca^{2+} в робочому середовищі ($M \pm m$; $n=5$) (А), а також за присутності модифікаторів транспорту Ca^{2+} - CCCP, RuR та Csp (Б), * - $p < 0,05$, $M \pm m$; $n=3-5$

Збільшення концентрації Ca^{2+} в середовищі енергізованих МХ в межах 20-80 мкМ, які відповідали значенням концентрацій вільного катіона 11-45 мкМ відповідно, супроводжувалось зростанням флуоресцентної відповіді зонда, причому за цих умов досягається рівноважний стан акумуляції катіона (рис. 3.2.9, А), тобто характеризується насиченням за субстратом переносу. Наші ро-

зрахунки показали, що уявна константа активації за Ca^{2+} транспортного процесу (K_{Ca}) складає $29,1 \pm 3,7$ мкМ, що відповідає концентрації Ca^{2+} біля МХ у клітині, тобто знаходиться в межах фізіологічного діапазону. Початкова швидкість процесу акумуляції (за флуоресценцією Fluo-4) V_0 дорівнює $1,18 \pm 0,03$ ум.од.флуор./с, характеристичний час $\tau_{1/2}$ (або час напівмаксимальної акумуляції катіона) складає 140 ± 8 с.

Відносно високе значення K_{Ca} підтверджує уявлення про низьку спорідненість Ca^{2+} -уніпортера до катіона. Одержане значення константи відповідає значенням отриманим раніше радіоізотопними методами для ГМК матки (1-25 мкМ), судин (17 мкМ) та taeniacoli (7 мкМ) [49-50].

Органели мають здатність достатньо довго затримувати накопичений Ca^{2+} , про що свідчить факт стабільності флуоресцентного сигналу протягом не менше, ніж 10 хв. За цих умов встановлюється динамічна рівновага між транспортними процесами, які забезпечують накопичення (Ca^{2+} -уніпортер) та вивільнення (H^+ - Ca^{2+} -обмінник) катіону МХ.

В умовах дисипації протонного градієнта за присутності 10 мкМ протонофора СССР і відповідного зниження рушійної сили електрофоретичного накопичення Ca^{2+} (80 мкМ) акумуляція катіона органелами знижується порівняно з контролем, але не набуває нульового рівня (рис. 3.2.9, Б). Одним із можливих пояснень цього залишкового рівня акумуляції може бути реверсне функціонування H^+ - Ca^{2+} -обмінника, адже в умовах деполяризації ВММ рН матрикса знижується, що може активувати ΔpH -залежне накопичення Ca^{2+} . У присутності блокатора Ca^{2+} -акумулюючих систем RuR (10 мкМ) накопичення катіона також істотно зменшується порівняно з контролем (рис. 3.2.9, Б). Наявність нечутливої до RuR компоненти транспортування Ca^{2+} в МХ можна пояснити функціонуванням численних каналних структур (аніонні, Вах/Вак-канали) та транслоказ, які за певних умов (наприклад, блокування Ca^{2+} -транспортувальних структур), можливо забезпечують його акумуляцію [233, 487]. За присутності інгібітора РТР циклоспорина А (Csp) рівень акумуляції іонів Са суттєво не змінювався (рис. 3.2.9, Б). Отже, значення циклоспорин-чутливої пори в процесі обміну катіону в ізольованих МХ не є визначальним, можливо через наявність в сере-

довищі акумуляції $MgATP^{2-}$ та сукцинату, які стабілізують роботу ЕТЛ протягом експерименту і забезпечують достатню енергізацію МХ, а отже пригнічують РТР.

Одержані результати є методичною основою для вивчення впливу нітросполук на енергозалежну акумуляцію Ca^{2+} , яка здійснюється уніпортером за електрофоретичним механізмом.

Як нітросполуки нами було використано SNP та SN - донор та попередник NO, що широко використовуються в біологічних дослідженнях. SNP утворює в розчинах катіон нітрозонію, який виявляє властивості потужного нітрозилуючого агенту. SN продукує оксид азоту переважно в кислому середовищі, але здатен утворювати NO та його редокс-похідні також і за присутності гемових груп та залізо-сірчаних комплексів, якими багаті клітинні структури, особливо МХ [65, 370, 441]. Крім того, нітрит-аніони можуть володіти власною біохімічною активністю.

Транзитне додавання до МХ, транспорт Ca^{2+} в яких за присутності в середовищі $MgATP^{2-}$ та сукцинату досяг стану рівноваги, 100 мкМ SNP або SN не супроводжувалось значними змінами рівня акумуляції катіону (графічні дані не наведено). Це вказує на неефективність впливу оксиду азоту на МХ за відносно короткотривалої експозиції. Вочевидь, хімічна модифікація функціонально-важливих тіольних груп Ca^{2+} -транспортувальних структур або гем-вмісних протеїнів МХ потребує певного часу.

В умовах попередньої інкубації МХ із 100 мкМ SNP та SN протягом 15 хв приводила до суттєвого зростання акумуляції Ca^{2+} органелами в порівнянні з контролем (рис. 3.2.10). Так, SNP посилював транспорт Ca^{2+} приблизно в 1,6 рази. Ефект 100 мкМ SN виявився дещо менш інтенсивним, але статистично значущим. Подібні результати були одержані іншими авторами при дослідженні короткотривалого впливу нітрогліцерину *in vivo* в аорті, міокарді і печінці щурів [3]. Одночасно в цитованій роботі було зареєстроване зниження мембранного потенціалу органел на 28-30 %. Отже, зростання ємності МХ до Ca^{2+} як *in vivo*, так і *in vitro* в різних тканинах може бути пов'язане із активацією Ca^{2+} -уніпортеру і, можливо, мало залежить від змін мембранного потенціалу у відносно вузькому діапазоні.

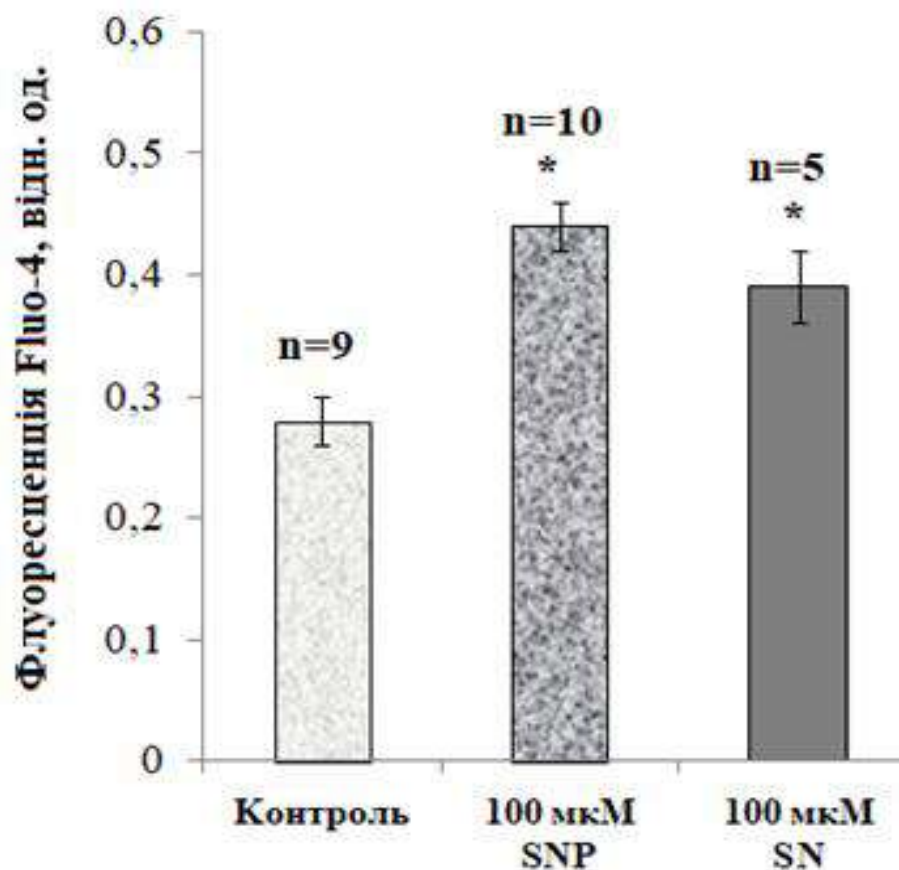


Рис. 3.2.10. Вплив нітросполук на енергозалежну акумуляцію Ca^{2+} (80 мкМ) в мітохондріях. $M \pm m$; * - зміни достовірні відносно контролю, $p \leq 0,05$,

В присутності протонифору CCCP та RuR стимулювальний ефект SNP на акумуляцію Ca^{2+} МХ не проявлявся (рис. 3.2.11), що доводить роль саме Ca^{2+} -уніпортеру у досліджуваному нами процесі. Рівень накопичення Ca^{2+} за дії CCCP та RuR сягав величин нижчих за контрольні значення без додавання SNP, оскільки рутенієвий червоний безпосередньо блокує Ca^{2+} -уніпортер, а CCCP усуває саму рушійну силу транспорту катіону. Інгібітор РТР Csp майже не впливав на активоване SNP енергозалежне накопичення Ca^{2+} МХ (рис. 3.2.11), хоча і спостерігалась тенденція до зростання акумуляції катіону за цих умов. Одержані результати вказують на несуттєву роль циклоспорин-чутливої пори в біохімічних механізмах стимуляції транспорту Ca^{2+} в МХ міомерія за впливу нітросполук в нашій моделі.

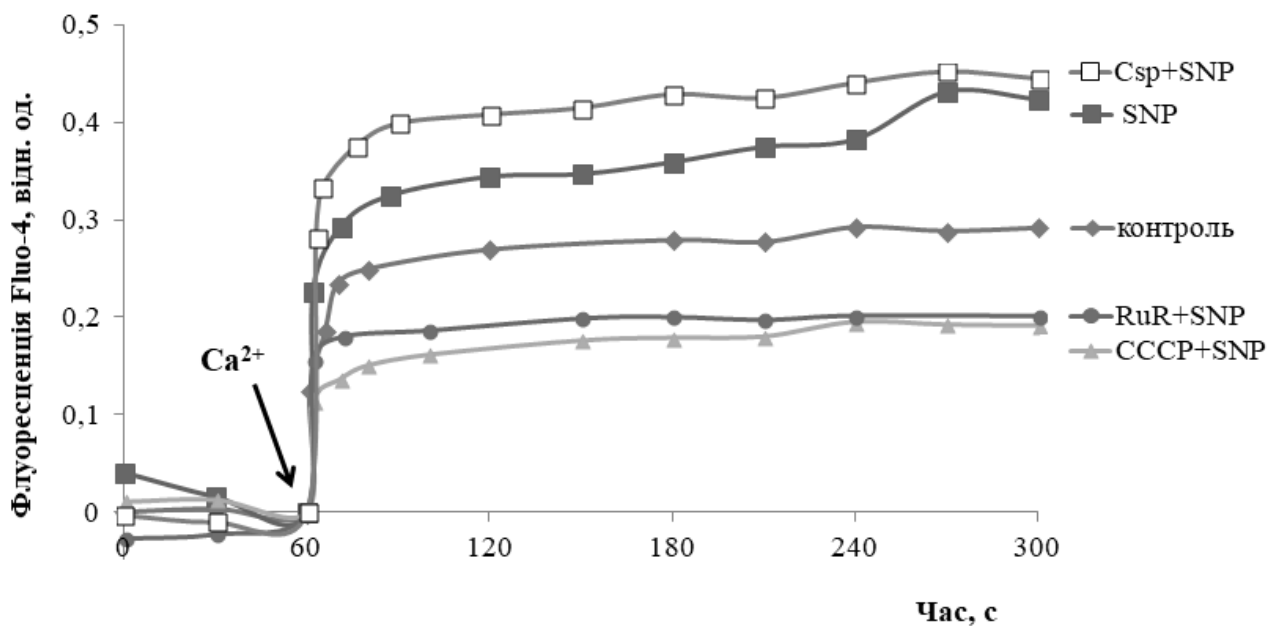


Рис. 3.2.11. Вплив 100 мкМ SNP на енергозалежну акумуляцію Ca^{2+} (80 мкМ) в мітохондріях в присутності модифікаторів трансмембранного обміну катіону: 10 мкМ CCCP, 10 мкМ RuR, 5 мкМ Csp. Результат типового експеримента

Водночас, в експериментах проведених на аорті та міокарді щурів в умовах введення тваринам нітрогліцерину показано, що підвищення Ca^{2+} -ємності МХ зумовлене саме інгібуванням РТР оксидом азоту [2-3]. Тими ж авторами в досліджах на ізольованих МХ, на відміну від експериментів *in vivo*, показано зниження Ca^{2+} -ємності органел за дії донора NO, яке пояснюється активацією вивільнення катіону через Ca^{2+} -уніпортер, спричинене деполяризацією МХ. Це ще раз доводить, що різниця між результатами, одержаними в наших дослідженнях і наведених в цитованих роботах, може полягати у тканиноспецифічності впливу та різниці хімічної структури використаних нітросполук. Також слід зазначити, що біохімічні механізми дії NO на міомерію можуть відрізнятися від тих, які притаманні іншим м'язовим тканинам [145, 413].

Отже, під впливом нітросполук спостерігається посилення електрофоретичної акумуляції Ca^{2+} в ізольованих МХ міомерію, обумовлене активацією саме Ca^{2+} -уніпортера внутрішньої мембрани цих органел, та не пов'язане з функціонуванням РТР.

Попередні результати (розділ 3.2.1.) підтверджують роль електрохімічного градієнта протонів (Δp) на внутрішній мітохондрійній мембрані у підтри-

манні Ca^{2+} -гомеостазу в клітинах міомерія. Тому важливим є дослідження ΔpH -залежної компоненти транспорту Ca^{2+} в мітохондріях, її можливої електрогенності тощо.

3.2.3. Ідентифікація та характеристика H^+ - Ca^{2+} -обмінника у внутрішній мембрані мітохондрій, вплив нітросполук на цю транспортувальну систему

Наступна серія досліджень була спрямована на вивчення біохімічних особливостей H^+ - Ca^{2+} -обміну в МХ міомерія. З використанням Ca^{2+} -чутливого зонда Fluo-4 AM та pH -чутливого зонда BCECF-AM [359] було продемонстровано процес одночасного вивільнення Ca^{2+} із МХ (рис. 3.2.12), акумульованого в енергозалежному процесі, та закислення матриксу. Інтенсивність вивільнення Ca^{2+} з матриксу залежала від величини позамітохондрійного pH . При закисненні позамітохондрійного середовища суттєво посилюється вихід Ca^{2+} з МХ. В умовах залуження позамітохондрійного середовища спостерігається додаткове зростання акумуляції катіону, що свідчить на користь можливості функціонування H^+ - Ca^{2+} -обміну в реверсному режимі (в середовищі розведення наявний Ca^{2+} , який вноситься разом із суспензією МХ).

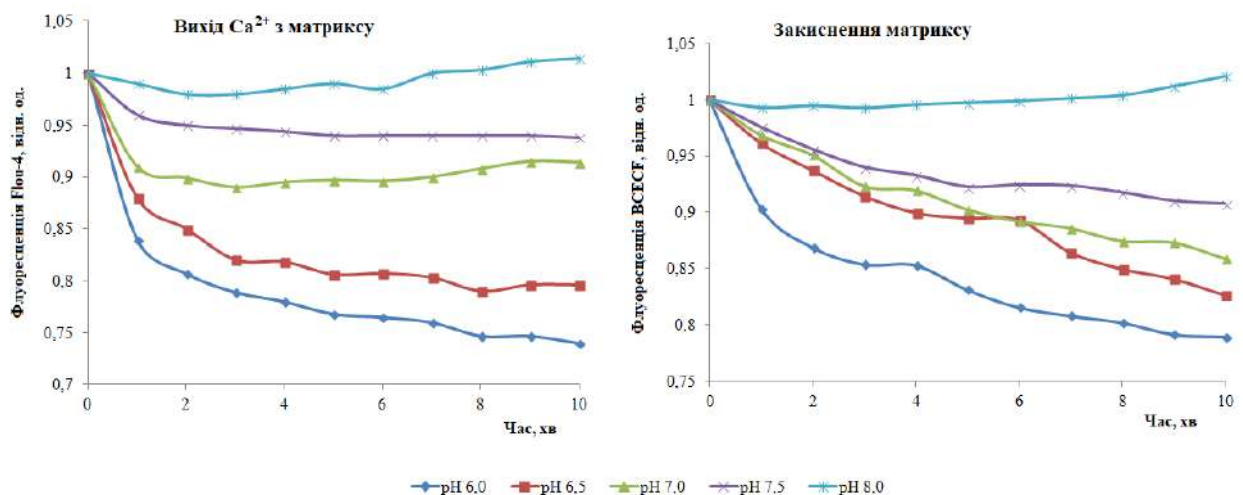


Рис. 3.2.12. Одночасні зміни концентрації Ca^{2+} та H^+ в матриксі мітохондрій за умови функціонування H^+ - Ca^{2+} -обміну. Дані типових експериментів

Одержані результати доводять існування ΔpH -залежної компоненти обміну Ca^{2+} і відповідає уявленням про функціонування H^+ - Ca^{2+} -обмінника у ВММ ГМК.

Згідно результатів подальших досліджень градієнти фізіологічно значущих моновалентних катіонів Na^+ , K^+ , а також Li^+ (за ізотонічних умов) не стимулювали транспортування Ca^{2+} з МХ. Іони Mg (4,5 мМ) пригнічували H^+ - Ca^{2+} -обмін. Інгібітор Na^+ - Ca^{2+} -обміну 100 мкМ тетрафенілфосфоній [244] не впливав на ΔpH -індукований транспорт Ca^{2+} з МХ. Наведені дані відповідають уявленням про відсутність або незначну роль Na^+ - Ca^{2+} -обмінника у функціонуванні МХ гладеньких м'язів, зокрема і міометрія [49-50].

Вище описані результати знаходяться у відповідності із попередніми дослідженнями, проведеними на ізольованих МХ міометрія корів із застосуванням радіоізотопної техніки ($^{45}\text{Ca}^{2+}$). Зокрема було показано, що закислення середовища інкубації від 7,5 до 6,5 стимулювало вивільнення Ca^{2+} із МХ, водночас зниження рН пригнічувало зворотній процес енергозалежної акумуляції Ca^{2+} . Катіони Na та K також не впливали на досліджуваний транспорт [49]. В експериментах, виконаних на пермеабілізованих дигітоніном міоцитах матки щурів, також із використанням ізотопної техніки, демонструється, що закислення середовища призводить до гальмування рутеній-залежного включення Ca^{2+} в МХ, а ізотонічна заміна іонів K на іони Na виявилась не ефективною [76]. Принципова різниця між дослідженням процесів транспорту Ca^{2+} із використанням $^{45}\text{Ca}^{2+}$ та флуоресцентних зондів полягає у тому, що в останньому випадку тестуються зміни саме концентрації іонізованого Ca , тобто того пулу катіону, який володіє функціональною активністю.

Згідно наших розрахунків динаміка ΔpH -індукованого виходу Ca^{2+} , проаналізована за зміною флуоресценції Fluo-4, який тестує вміст іонізованого Ca^{2+} в матриксі, задовольняє кінетичним закономірностям реакції першого порядку. Було розраховано кінетичні параметри ΔpH -індукованого вивільнення Ca^{2+} – початкову швидкість V_0 та характеристичний час $\tau_{1/2}$ (або час напіввиходу катіона) – за рН 6,5. V_0 дорівнює $1,37 \pm 0,23$ ум.од.флуор./с, а $\tau_{1/2}$ – 64 ± 9 с. Крива залежності вивільнення Ca^{2+} з ізольованих МХ міометрія від концентрації протонів у середовищі їх розведення має тенденцію до насичення за рН в діапазоні 6,5-5,5 (рис. 3.2.13). Розрахована нами в координатах Хілла $\{\lg[(V_{\max}-V_0)/V_0]\}$;

pH} константа активації за протонами pK_a складає $6,9 \pm 0,1$, що свідчить про можливість функціонування системи H^+ - Ca^{2+} -обміну за фізіологічних значень pH [323, 389, 482]. Величина коефіцієнта Хілла (n_H) наближається до одиниці, що вказує на стехіометрію обміну 1:1, тобто електрогенність данної транспортувальної системи.

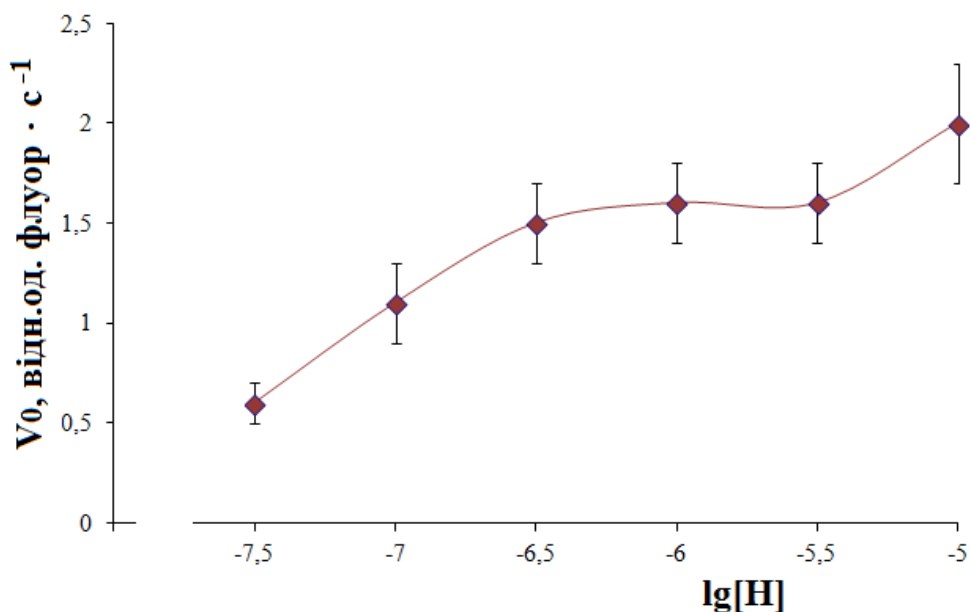


Рис. 3.2.13. Залежність початкової швидкості вивільнення іонів Ca (V_0) з мітохондрій від концентрації протонів. $M \pm m$, $n=6-8$

Згідно з сучасними уявленнями, молекулярною структурою, яка забезпечує функціонування H^+ - Ca^{2+} -обмінника у ВММ, виступає протеїн LETM 1, який асоційований із білковим комплексом масою 300-500 кДа ВММ. Відсутність цього протеїну спричинює деполяризацію, набухання МХ та втрату крист. Тому LETM 1 розглядається як частина молекулярної структури, яка бере участь у підтриманні осморегуляції органел [264, 340, 458]. Припускають, що LETM 1 також відіграє роль у регуляції активності генів, які контролюють функціонування МХ, взаємодіючи з рибосомами. Нокаут гена, що кодує LETM 1, призводить до зниження вмісту протеїнів дихального ланцюга, зокрема цитохромів родини b, зниження $\Delta\psi$, інтенсивності дихання (поряд зі зростання генерації АФК) та синтезу АТФ (тобто біоенергетичного колапсу) і зупинкою клітинної проліферації. Водночас надекспресія LETM 1 призводить до каспаз-незалежної, некротичної загибелі клітини. Крім того, LETM 1 може модулювати активність

ОРА1, впливаючи на морфологію МХ, а відсутність LETM 1 призводить до фрагментації МХ [201, 340, 363, 389].

Нами показано, що ΔpH -залежне вивільнення Ca^{2+} з МХ ефективно пригнічується моноклональними антитілами до протеїну LETM 1 (рис. 3.2.14). Водночас антитіла повністю не інгібують транспортувальну систему, що можна пояснити видоспецифічністю білка-транспортера.

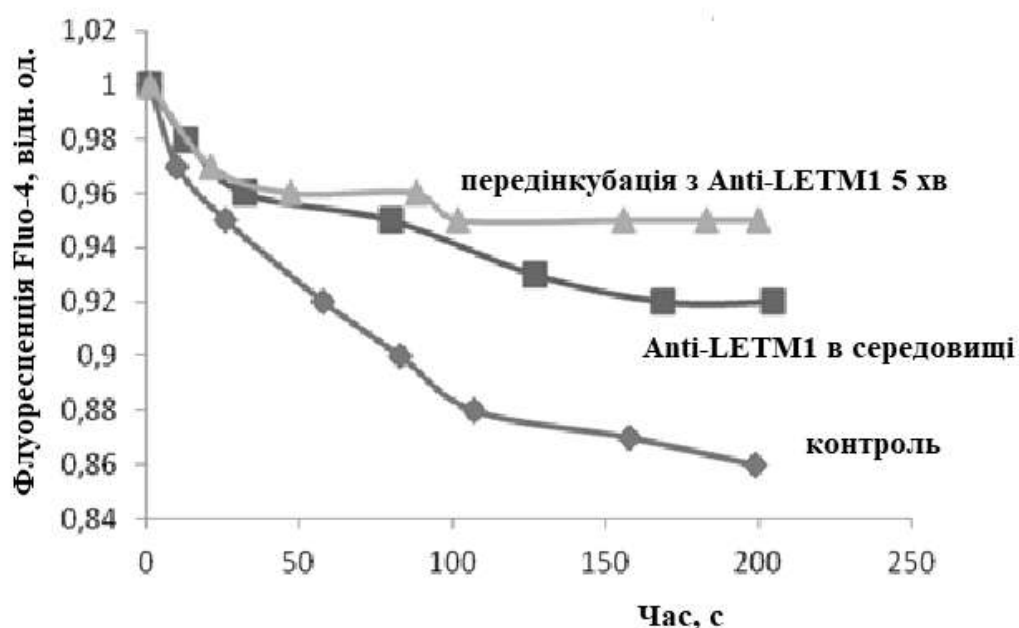


Рис. 3.2.14. Вплив комерційного моноклонального антитіла до H^+ - Ca^{2+} -обмінника мітохондрій (Anti-LETM 1) на ΔpH -залежний транспорт Ca^{2+} з матриксу ізольованих мітохондрій міометрія щурів (на 100 мкг протеїну мітохондрій – 2,5 мкг антитіла). Стандартне середовище інкубації (pH 6,5). Результати типового експерименту

Для функціонування МХ та підтримання їхньої цілісності важливе значення має регулювання об'єму матриксу, що впливає на інтенсивність дихання та рівень продукування АТР. Інтегральним показником об'єму МХ є величина їхнього гідродинамічного діаметру (ГД). Існує кореляція між змінами геометрії цих органел та такими явищами, як генерація АФК, поляризація ВММ, здатність до апоптозу [265, 339, 341].

Традиційним є оцінка процесу набухання за змінами оптичної густини/світлорозсіювання суспензії МХ. Досить інформативним та ефективним у випадку характеризування за розміром сферично-подібних частинок у розчинах

є метод фотонної кореляційної спектроскопії. Метод є високочутливим (реєструються зміни об'єму вже починаючи з 0,1 %, а діаметр частинок, які підлягають аналізу, – від 0,001 до 20 мкм), потребує незначної кількості експериментального матеріалу і унеможливорює артефакти, пов'язані з малими розмірами субклітинних частинок, які мають місце при застосуванні інших оптичних підходів. У випадку ізольованих МХ міометрія метод фотонної кореляційної спектроскопії дозволяє визначати їхній гідродинамічний діаметр (ефективні розміри) за безпосередніх умов експерименту [42, 312].

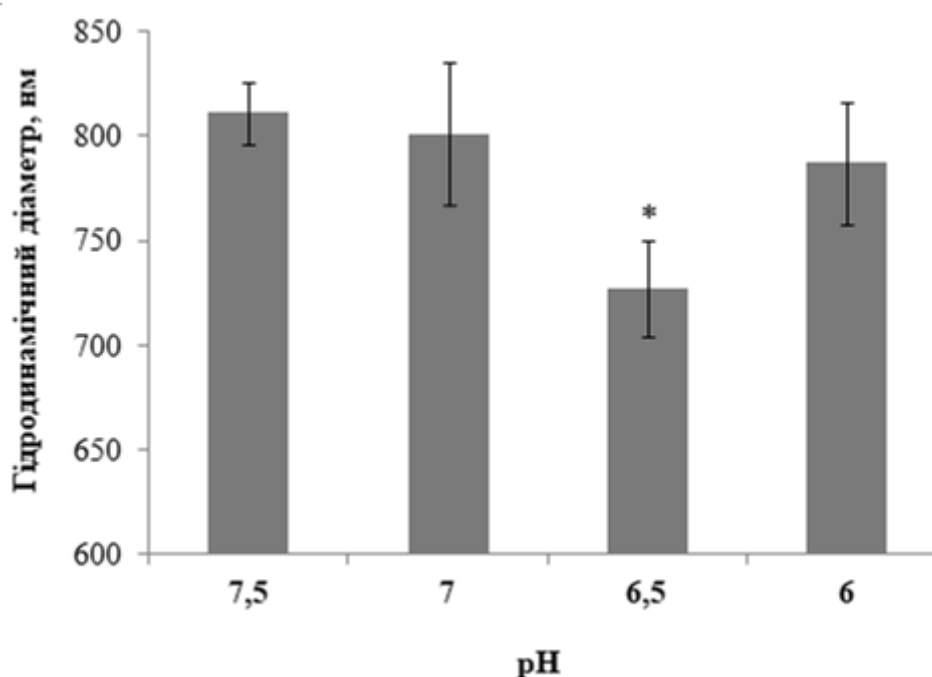


Рис. 3.2.15. Зміни характеристичних розмірів ізольованих мітохондрій за умов Δ pH-залежного вивільнення Ca^{2+} з матриксу. * - $p < 0,05$, $M \pm m$, $n = 6$. Метод фотонної кореляційної спектроскопії

За умови попередньої енергозалежної акумуляції Са до матриксу закислення середовища інкубації МХ від 7,5 до 6,5, тобто створення умов для ефективного функціонування H^+ - Ca^{2+} -обмінника, супроводжувалось суттєвим зниженням величини ГД (рис. 3.2.15). Подальше закислення середовища (до 6,0) не змінює досліджуваний параметр відносно його величини за рН 7,5. Ініціація Δ pH-залежного вивільнення Ca^{2+} супроводжується одночасним переміщенням асоційованих з іонами Са молекул води з матриксу, що може бути причиною

зменшення досліджуваного параметра. Втім, більш суттєве закислення позамітохондрійного середовища за рН 6,0 спроможне іонізувати зовнішню мембрану органел, що збільшить ГД, нівелюючи попередній ефект.

Таким чином, ВММ містить крім енергозалежної акумуляції Ca^{2+} в матрикс, також і механізм транспорту іонів Ca з матриксу у міоплазму, причому в основі останнього процесу лежить функціонування H^+ - Ca^{2+} -обмінника, який репрезентований протеїном LETM 1.

Існують відомості, що в структурі H^+ - Ca^{2+} -обмінника МХ наявний CaM-подібний Ca^{2+} -зв'язувальний мотив «EF-hand» [399, 458]. Не виключено також, що транспортувальні ензими ВММ підлягають регуляторному впливу комплексу Ca^{2+} -CaM, наявність якого передбачається в МХ. На сьогодні відсутні відомості щодо регуляції H^+ - Ca^{2+} -обмінника МХ міометрія цим комплексом. Тому було з'ясовано ефекти антагоністів CaM на ΔpH -залежний вихід Ca^{2+} з ізолюованих МХ міометрія.

Було виявлено, що антагоніст CaM – кальмідазоліум в концентрації 10 мкМ практично повністю блокує ΔpH -залежний вихід Ca^{2+} з ізолюованих МХ міометрія, за умови, коли катіон був попередньо акумульований в матрикс в енергозалежному процесі (рис. 3.2.16, А). Блокування H^+ - Ca^{2+} -обмінника кальмідазоліумом може призвести до зростання концентрації іонізованого Ca^{2+} в матриксі органел. Останній ефект за дії антагоністів CaM продемонстровано іншими авторами в незалежних дослідженнях раніше [78, 94, 403].

Інший антагоніст кальмодуліна 100 мкМ трифлюоперазин, який має відмінний від кальмідазоліуму механізм дії на Ca^{2+} -CaM-залежні ензими (див. обговорення в підрозділі 3.1.4), спричинював більш швидкий початковий вихід Ca^{2+} з матриксу, але не впливав на платовий рівень флуоресценції Fluo-4 (рис. 3.2.18, А). Аналіз основних кінетичних параметрів транспортного процесу - початкової швидкості (V_0) та величини характеристичного часу ($\tau_{1/2}$) ΔpH -індукованого виходу Ca^{2+} з ізолюованих МХ виявив, що за дії досліджуваного антагоніста час напіввиходу катіону зменшувався, а початкова швидкість транспорту зростала (рис. 3.2.16, Б). Тобто, трифлюоперазин суттєво впливає на кінетичні характеристики ΔpH -залежного обміну Ca^{2+} у ВММ гладенького м'яза.

Але його дія як більш м'якого антагоніста СаМ менш виражена ніж кальмідазоліуму. Перший лише знижує ефективність взаємодії СаМ з транспортувальною системою, тоді як другий діє на комплекс СаМ-транспортувальна система, гальмуючи розпад останньої (виступаючи неконкурентним інгібітором), а також має більший афінитет до СаМ [380, 415]. Ці дані непрямо свідчать, що СаМ виступає регулятором H^+ - Ca^{2+} -обмінника, інгібуючи обмін.

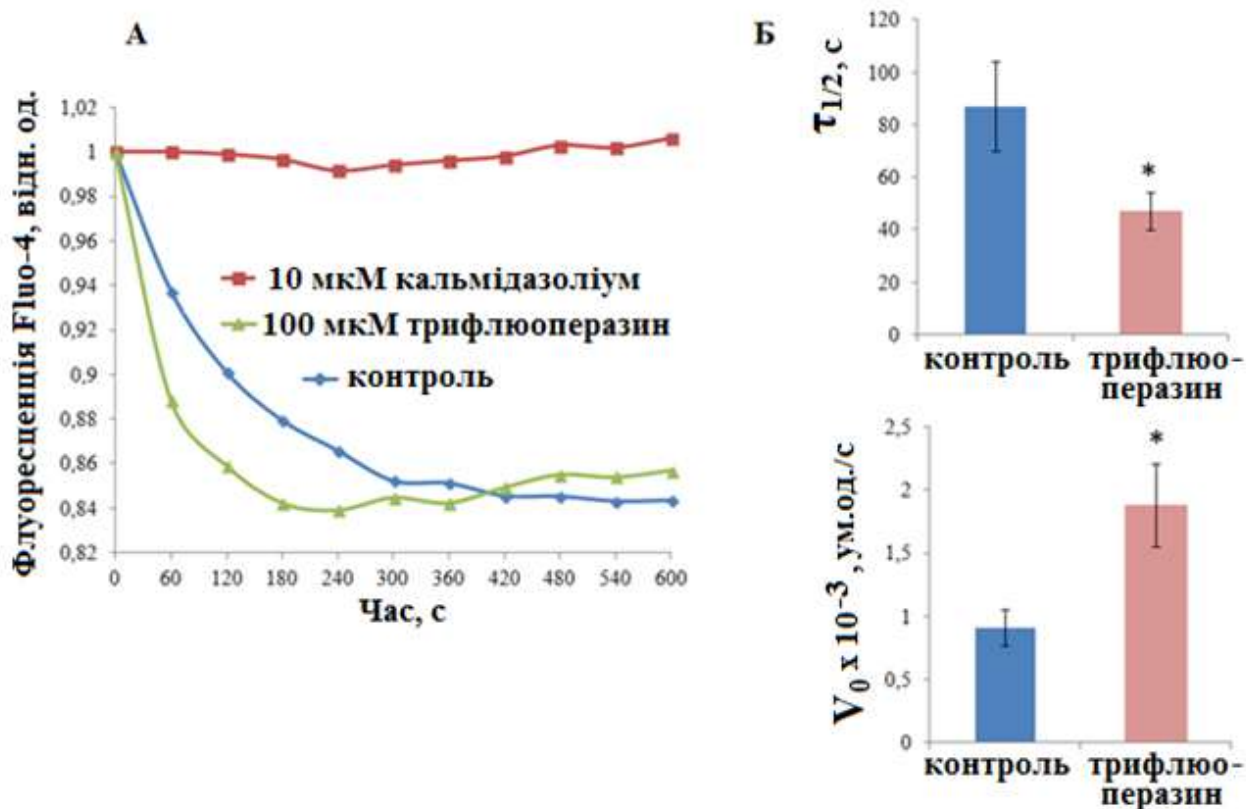


Рис. 3.2.16. Вплив антагоністів кальмодуліна на ΔpH -індукований транспорт Ca^{2+} з мітохондрій (рН 6,5). Дані типового експерименту (А) та розрахунок основних кінетичних параметрів вивільнення Ca^{2+} (Б). * - $p \leq 0,05$, зміни достовірні відносно контролю, $M \pm m$, $n=5$

В серії подальших досліджень нами демонструється (рис. 3.2.17), що H^+ - Ca^{2+} -обмінник є повністю резистентним до дії нітросполук (рис. 3.2.17, А). В іншому варіанті постановки експерименту стимулювання синтезу NO (в середовище попередньої акумуляції Ca^{2+} вносили 50 мкМ L-аргінін, 10 мкМ NADPH та VH_4) також не спричинювало модуляцію ΔpH -залежного виходу Ca^{2+} з МХ (рис. 3.2.17, Б).

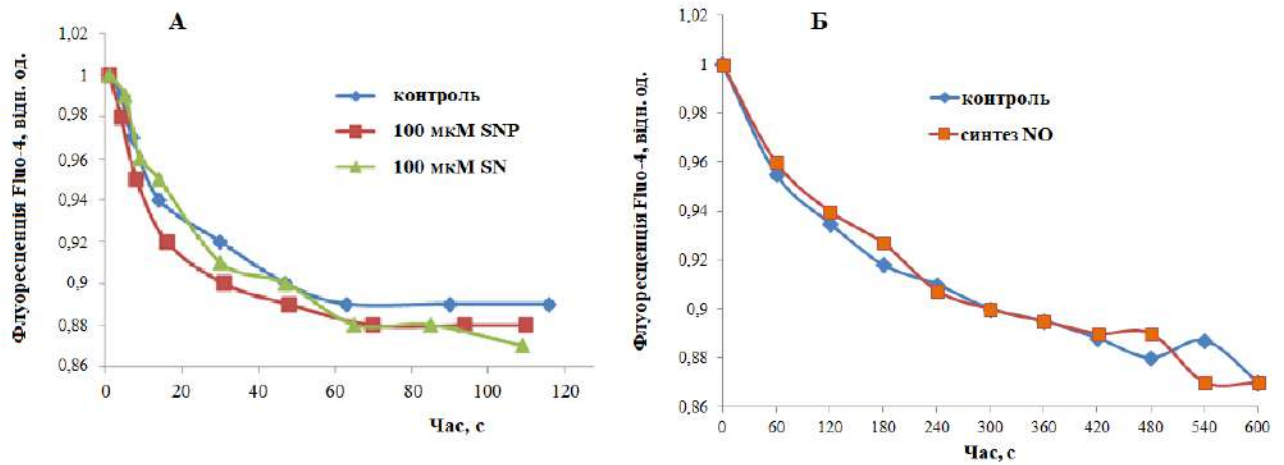


Рис. 3.2.17. Відсутність впливу нітросполук (А) та синтезу NO (в присутності 50 мкМ L-аргініна, 10 мкМ NADPH та BH_4) (Б) на ΔpH -індукований транспорт Ca^{2+} з мітохондрій. Наведені результати характерних дослідів. Стандартне середовище інкубації (рН 6,5)

Відсутність ефекту NO на H^+ - Ca^{2+} -обмінник дозволяє протікати ΔpH -залежному процесу вивільнення Ca^{2+} з матриксу МХ і подальшій його акумуляції СР. Оскільки оксид азоту стимулює енергозалежне включення Ca^{2+} в ретикулум [32], за умови підвищеної концентрації NO в міомерії існує можливість нормальної роботи мітохондрійно-ретикулярного компартменту (слід згадати, що афінітет SERCA-помпи до Ca^{2+} вищий, ніж уніпортера МХ) та подальшого виведення Ca^{2+} з клітини внаслідок взаємодії транспортувальних систем периферичного СР та ПМ. Отже, можна припустити наявність мембранних механізмів, які захищають МХ від небезпечного Ca^{2+} -перевантаження.

Узагальнення та обговорення результатів підрозділу 3.2.

Отже, із залученням методів лазерної конфокальної мікроскопії та протокової цитофлуориметрії, а також методології солокалізації флуоресцентних зондів показано, що руйнування електрохімічного градієнту протонів на ВММ супроводжується зростанням концентрації іонів Са в міоплазмі. Хоча азид натрію, як і СССР, спричинює вихід Ca^{2+} з матриксу ізольованих МХ, а також унеможлиблює його енергозалежну акумуляцію, в міоцитах не спостерігали змін концентрації Ca^{2+} в міоплазмі за його дії. Відсутність ефекту NaN_3 , як інгібітора ЕТЛ МХ, на концентрацію Ca^{2+} в міоплазмі може бути пояснено розкладом сполуки із продукуванням АФА.

Під впливом нітросполук спостерігається посилення енергозалежної акумуляції Ca^{2+} в ізольованих МХ, обумовлене активацією саме Ca^{2+} -уніпортера внутрішньої мембрани цих органел, та не пов'язане з функціонуванням РТР. Цей ефект може мати значення для швидкого зниження концентрації катіона в цитоплазмі після Ca^{2+} транз'єнта.

Детально вивчені біохімічні особливості функціонування H^+ - Ca^{2+} -обмінника в МХ міомерія. Встановлено, що H^+ - Ca^{2+} -обмінник являє собою протеїн LETM 1, його функціонування супроводжується зниженням концентрації Ca^{2+} в матриксі з одночасним закисленням останнього, здійснюється в стехіометрії 1:1; він активується за фізіологічних значень рН, є зворотнім, а також чутливим до СаМ. H^+ - Ca^{2+} -обмінник може брати участь в осморегуляції МХ ГМК матки. Ця транспортувальна система є резистентною до дії оксиду азоту.

Дія NO на Ca^{2+} -гомеостаз МХ ГМК передбачає можливість специфічних ефектів на Ca^{2+} -залежні біоенергетичні процеси. Вирішенню цих питань присвячений наступний розділ роботи.

Результати опубліковані [39, 46-47, 186, 188, 274-275].

3.3. БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ ДІЇ ОКСИДУ АЗОТУ НА Ca^{2+} -ГОМЕОСТАЗ, ПОЛЯРИЗАЦІЮ СУБКЛІТИННИХ СТРУКТУР ТА АКТИВНІСТЬ ЕЛЕКТРОН-ТРАНСПОРТУВАЛЬНОГО ЛАНЦЮГА МІТОХОНДРІЙ МІОМЕТРІЯ

Поряд із остаточним встановленням суттєвого значення оксиду азоту в механізмах розслаблення гладеньких м'язів судин, шлунково-кишкового тракту, дихальних і сечостатевого шляхів [133], проводяться також окремі дослідження спрямовані на вивчення його ролі в регуляції скоротливої активності гладенького м'язу матки (міометрія) [92, 145, 492]. Згідно наших попередніх результатів нітросполуки стимулюють енергозалежну акумуляцію Ca^{2+} , обумовлену активацією саме Ca^{2+} -уніпортера. Разом з цим H^+ - Ca^{2+} -обмінник є резистентним до дії SNP та SN, а також L-аргініну. Таким чином, оксид азоту, стимулюючи енергозалежне накопичення Ca^{2+} в МХ міометрія, може сприяти ефективному зниженню концентрації катіону в міоплазмі після Ca^{2+} транзєнта. Водночас біохімічні, фізико-хімічні та мембранні механізми, за якими оксид азоту контролює скоротливу функцію міометрія, на сьогодні остаточно не з'ясовані. Вхід іонів Ca стимулює mtNOS, активність якої, наприклад в кардіоміоцитах, забезпечує до 90% NO в цитозолі [449]. Таким чином, NO, синтезований МХ, може впливати на катіон-транспортуючі системи ПМ та СР.

В клітинах різних типів гладеньких м'язів релаксуючій ефект NO пов'язаний із зростанням вмісту cGMP в міоплазмі [133]. Втім, значення cGMP в релаксації механічної напруги поставлено під сумнів в роботах, проведених на міометрії невагітних і вагітних жінок, приматів, щурів, мурчаків [143, 281-282, 343]. Альтернативним напрямком дії NO в гладеньких м'язах, зокрема і в міометрії, може бути безпосередній вплив на катіон-транспортуючі системи плазмалемі, який здійснюється нітрозилуючими похідними оксиду азоту [370, 441].

Отже, актуальним є дослідження ефектів NO на окремі фундаментальні характеристики гладеньком'язових клітин матки, а саме Ca^{2+} -гомеостаз, поляризацію плазматичної та внутрішньої мітохондрійної мембран.

3.3.1. Гальмування NO розвитку Ca^{2+} -транзйенту в ізольованих гладеньком'язових клітинах матки, спричиненого карбахолом та окситоцином

Центральним етапом Е(Ф)МС є зростання концентрації іонів Са в міоплазмі шляхом його пасивного транспорту за концентраційним градієнтом із позата внутрішньоклітинних пулів внаслідок взаємоузгодженого функціонування каналних структур ПМ і СР, а зворотнє зниження концентрації Ca^{2+} обумовлене енергозалежними процесами, де задіяні катіон-транспортувальні системи ПМ, СР та МХ [49, 84, 152, 309, 387, 469].

Із застосуванням методу лазерної конфокальної мікроскопії та Ca^{2+} -чутливого зонду Fluo-4 АМ було продемонстровано зростання рівня іонізованого Са в міоплазмі міоцитів матки, спричиненого карбахолом (аналог ацетилхоліна, який не гідролізується холінестеразою) на 76 ± 10 % (рис. 3.3.1, А) та окситоцитом на 80 ± 11 % (рис. 3.3.2, А).

У випадку ФМС послідовність подій між зв'язуванням відповідного ліганду (біогенні аміни, пептидні гормони) і зростанням концентрації Ca^{2+} в цитозолі включає передачу сигналу через систему гетеротримерних G-білків на мембранозв'язану фосфоліпазу С (β -ізоформа). Активація фосфоліпази С призводить до утворення таких вторинних месенджерів як гідрофільний IP_3 та гідрофобний DAG [110, 335, 469]. IP_3 дифундує до СР і, зв'язуючись із відповідними каналами-рецепторами (IP_3R), викликає вивільнення Ca^{2+} із депо, причому сам процес вивільнення є високою мірою Ca^{2+} -залежним. DAG шляхом активації окремих ізоформ РК С здатний модулювати Ca^{2+} -сигнал. Вивільнення Ca^{2+} через канали RyR і IP_3R - взаємозалежні процеси, крім того вихід катіону з СР регулює його транспорт в ПМ [110, 152, 335]. Зростання рівня IP_3 в міоплазмі за дії таких агоністів, як ацетилхолін або окситоцин, знижує концентрацію Ca^{2+} в люмені СР, що ініціює SOCE [80, 294, 373, 485].

Передінкубація клітин з донором оксиду азоту SNP (0,1 мМ) перешкоджала стимуляції агоністами зростання концентрації Ca^{2+} в міоплазмі (рис. 3.3.1, Б, В; 3.3.2, Б, В). За цих умов в разі стимуляції карбахолом концентрація Ca^{2+} в міоплазмі зростала лише на 22 ± 3 %, окситоцином – на $17,8 \pm 7,0$ %.

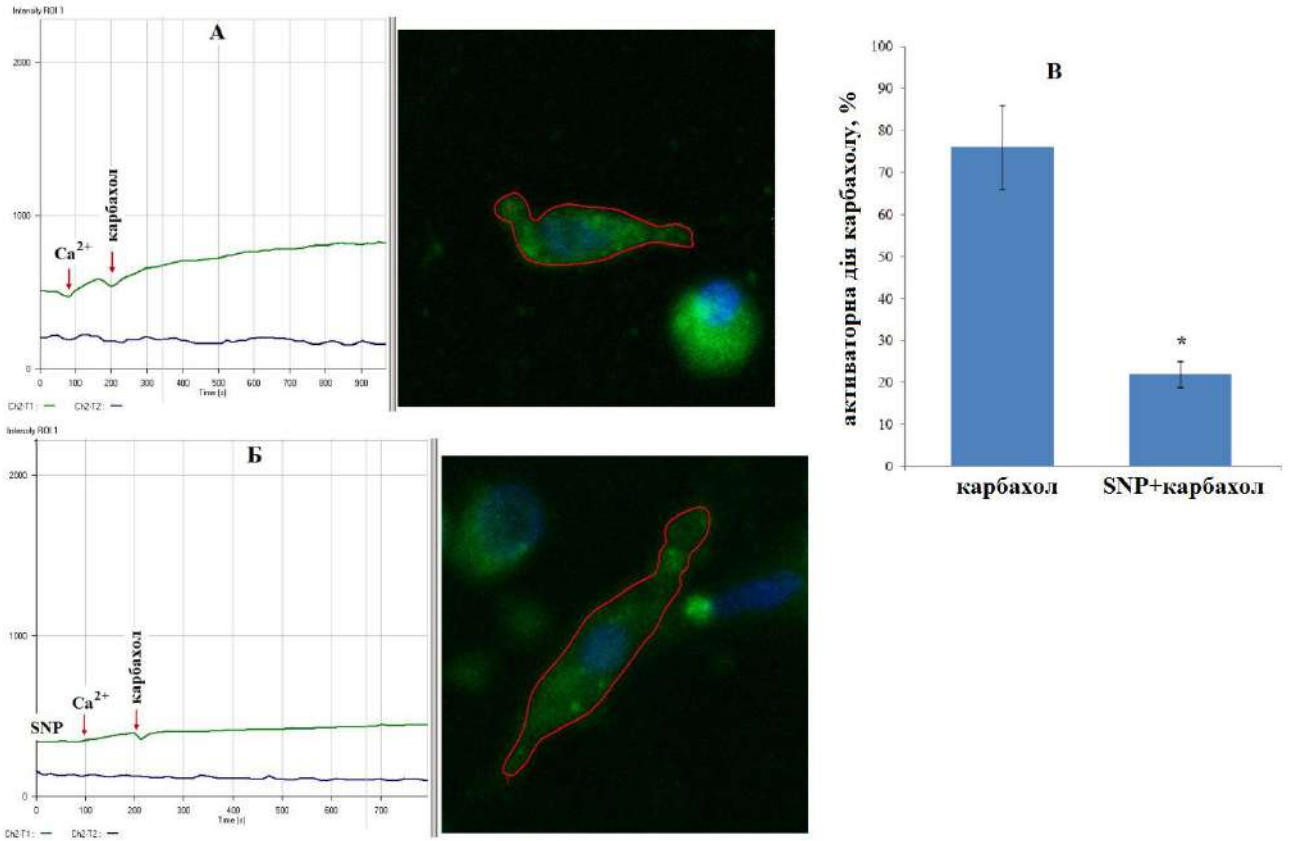


Рис. 3.3.1. Стимуляція карбахолом (0,1 мМ) зростання Ca^{2+} в міоплазмі у контролі (А) та за попередньої обробки (5 хв) клітин донором NO – 0,1 мМ SNP (Б) (0 % - не стимульовані клітини). Для кількісного аналізу використано 6-7 міоцитів з різних експериментів (В). * - $p < 0,01$

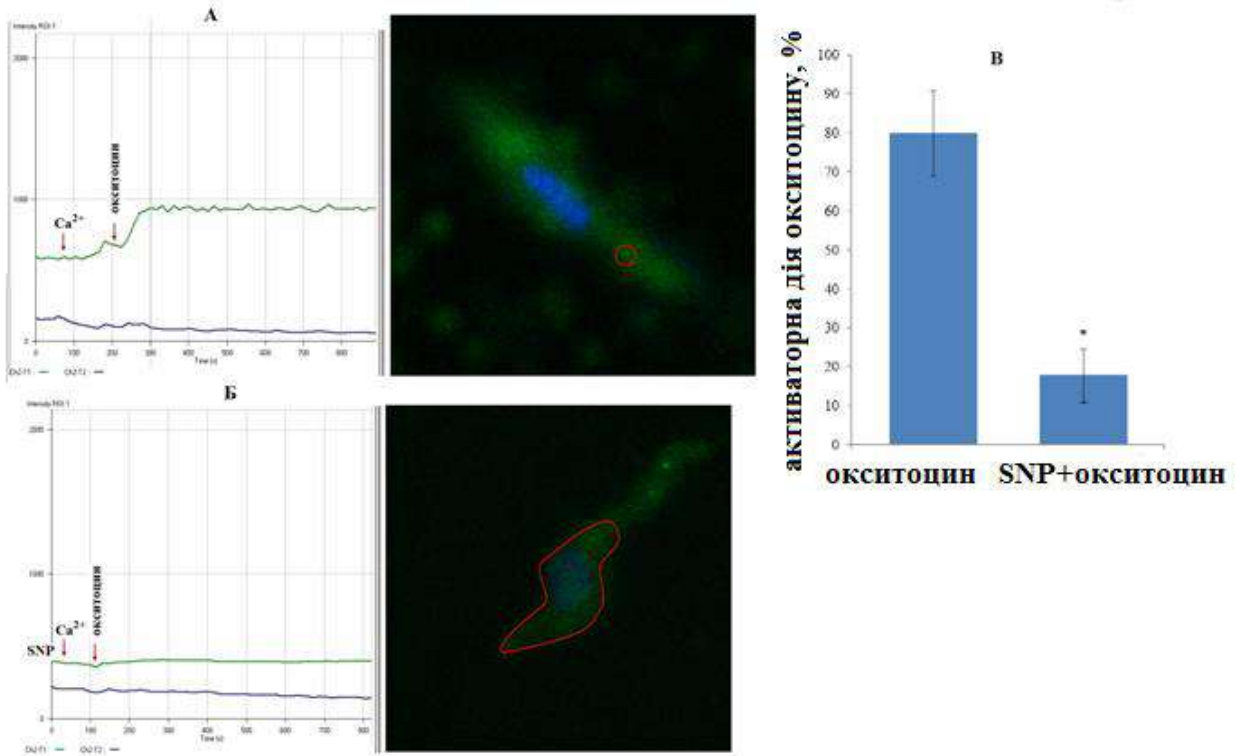


Рис. 3.3.2. Стимуляція окситоцином (0,5 мкМ) зростання Ca^{2+} в міоплазмі у контролі (А) та за попередньої обробки (5 хв) клітин донором NO – 0,1 мМ SNP

*(Б) (0 % - не стимульовані клітини). Для кількісного аналізу використано 5-6 міоцитів з різних експериментів (В). * - $p < 0,01$*

На малих мезентеріальних артеріях мурчаків було продемонстровано [370], що за аплікації норадреналіном (1-10 мкМ) зростає частота Ca^{2+} -спарків, спричинених FDS (frequent-discharge sites, місця спонтанного вивільнення Ca^{2+} з ретикулуму [114, 140]), та Ca^{2+} -хвиль. S-нітрозо-N-ацетилпеніциламін (SNAP; 50 мкМ) та SNP (100 мкМ), але не 8-Br-cGMP та інгібітор рГЦ, інгібували зазначені процеси. У стані спокою донори SNAP та SNP суттєво не впливали на активність FDS та $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Отже, в цитованій роботі донори оксиду азоту інгібували норадреналін-стимульоване зростання $[\text{Ca}^{2+}]_i$ cGMP-незалежним шляхом, частково ефект обумовлений пригніченням активності FDS. В дослідженнях щодо впливу NO на механокінетичні параметри спонтанних скорочень міометрія щурів продемонстровано, що за присутності SNP спостерігається вірогідне зниження амплітуди та частоти спонтанних скорочень, а також зростання нормованої максимальної швидкості фази розслаблення [75].

Одержані нами результати підтверджують факт впливу оксиду азоту на Ca^{2+} -гомеостаз та шляхи підвищення іонів Ca в міоплазмі у разі дії на міоцити фізіологічно значущих агоністів.

Одним з важливих біохімічних механізмів, за яким NO може викликати релаксацію гладенького м'язу матки, є cGMP-залежна або безпосередня активація K^+ -каналів ПМ [123, 344]. В міометрії людини та тварин ідентифіковано кілька підтипів K^+ -каналів, зокрема Ca^{2+} -залежні потенціал-чутливі високої та низької провідності, АТР-залежні тощо [123, 270, 334, 414, 469]. Речовини, які сприяють відкриттю K^+ -каналів, знижують збудливість клітин, викликаючи зміщення мембранного потенціалу від його порогових значень необхідних для активації іон-транспортувальних систем. В період вагітності людини і щурів спостерігається зсув потенціалу на плазмалемі клітин міометрія у бік більш негативних величин, що може бути зумовлено посиленням K^+ -канальних струмів [123, 414, 488]. Вірогідним наслідком активації різних підтипів K^+ -каналів оксидом азоту є гіперполяризація плазмалеми та зменшення концентрації Ca^{2+} в міоплазмі.

3.3.2. Протокова цитометрія як інструмент вивчення трансмембранного потенціалу субклітинних структур гладеньком'язових клітин

При дослідженні електричного потенціалу на субклітинних мембранних структурах важливо зберігати їхню інтактність, що вимагає роботи на неушкоджених клітинах. Це дозволяє підтримувати нативну морфологію плазмалеми і внутрішньоклітинних компартментів, а також значною мірою зберігає функціональні зв'язки між мембранними структурами. Субклітинні мембрани за нормальних умов володіють суттєвим електричним потенціалом як наслідок роботи іонних транспортерів та ЕТЛ. В більшості тваринних об'єктів мають значний заряд ВММ, плазмалема, передусім у випадку електробудливих клітин, а також мембрани ЕР внаслідок активності мікосомальної цитохромної системи [157, 310, 382, 385, 490]. Коректне дослідження змін електричного потенціалу у випадку цілісних клітин потребує урахування парціального вкладу цих мембранних компонентів, а також застосування сполук, які б мали змогу селективно впливати на їхню поляризацію.

Тривалий час з метою аналізу змін поляризації субклітинних структур використовуються потенціал-чутливі флуоресцентні зонди на кшталт похідних родамину, оксанолу або барвників ціанінового ряду [310, 317, 404, 490]. Останні широко впровадженні у експериментальну практику з метою досліджень трансмембранних потенціалів як на плазматичній, так і на мітохондрійній мембранах [157, 317, 355, 382, 490], водночас інформація щодо їхнього застосування в клітинах гладеньких м'язів доволі обмежена.

В роботах [28-29] було показано, що в міоцитах матки оксид азоту підвищує пасивну проникність ПМ до Ca^{2+} , що може зумовити короткотривале зростання концентрації катіона в субсарколемному регіоні і активацію Ca^{2+} -залежних підтипів K^+ -каналів, із наступною гіперполяризацією мембрани та зниженням рівня збудливості міоцитів. Для міометрія людини продемонстровано, що за вагітності на ПМ спостерігається зсув потенціала активації на 39 мВ в бік більш негативних значень, але не пов'язане з посиленням експресії Ca^{2+} -залежних K^+ -каналів високої провідності (BK_{Ca}) [488].

З метою підтвердження цієї гіпотези подальші дослідження ми спрямували на з'ясування можливості застосування DiOC₆(3) для реєстрації змін електричного потенціалу на ПМ і вивчення дії нітросполук на поляризацію плазмалеми за функціонального спокою міоцитів та у випадку розвитку штучної деполяризації із залученням методу протокової цитометрії.

В інтактних клітинах акумуляція ліпофільних катіонів із середовища в цитоплазму залежить від величини потенціалу ПМ, що обумовлює його розподіл між цитозолем і позаклітинним середовищем, а також електричного потенціалу ВММ, який визначає розподіл зонда між цитозолем і мітохондрійним матриксом в залежності від концентрації, співвідношення зонд/клітини та функціонального стану самих клітин (розділ 3.2.1). Електричний потенціал на СР слабо впливає на флуоресценцію DiOC₆(3) через відносно малу величину [157, 302, 310, 355, 404]. Отже, як електричний заряд плазмалеми, так МХ визначають величину флуоресценції при заданій концентрації зонда. Створюючи в умовах експерименту оптимальне співвідношення зонд/клітини ми можемо вивчати внесок обох потенціалів (і плазмалеми, і МХ) [310], а також уникнути гасіння флуоресценції зонда, пов'язаної з його агрегацією. На різних клітинних об'єктах використовуються концентрації DiOC₆(3) від 10 до 500 нМ [302, 355, 385] з метою тестування електричного потенціалу на субклітинних мембранних структурах. Для оцінювання змін потенціалу саме в МХ використовували 500 нМ (0,1 мкг/мл) зонду, водночас за його високих концентрацій (5 - 50 мкМ) органели набрякають, втрачають електричний заряд і нормальну морфологію. При застосуванні DiOC₆(3) як індикатора потенціалу на МХ слід взяти до уваги той факт, що, подібно до інших ліпофільних карбоціанінів, він може виступати інгібітором NADH-дегідрогенази, тобто його ефект є ротеноноподібним [90], а також деполяризувати ПМ [317]. Стосовно клітин гладенького м'яза відповідні відомості щодо поведінки і можливого застосування DiOC₆(3) для аналізу змін поляризації субклітинних мембранних структур в доступній нам літературі відсутні.

В результаті окиснення субстратів дихання і функціональної активності I, III та IV комплексів ЕТЛ відбувається транспорт H⁺ з матриксу у міжмембран-

ний простір МХ, що зумовлює створення і підтримання електро-хімічного градієнта протонів на їхній внутрішній мембрані, електрична компонента якого може сягати величини -160 – -180 мВ [11, 461]. Водночас зумовлений переважно K^+ -дифузійною природою електричний потенціал (потенціал спокою) ПМ в клітинах міомерія складає біля -35 мВ у невагітних тварин [387], де ключову роль у його забезпеченні відіграють Ca^{2+} -залежні K^+ -канали [123, 270, 334]. Важливо було продемонструвати із застосуванням DiOC₆(3), що плазмалема і МХ свіжовиділених міоцитів матки щурів в наших експериментальних умовах володіють стабільним у часі електричним потенціалом.

Ми підібрали умови реєстрації флуоресцентної відповіді DiOC₆(3) в міоцитах матки із застосуванням методу протокової цитометрії [127, 157, 266, 302, 310, 404]. Перевагою цього методу є можливість реєстрації флуоресцентного сигналу окремих міоцитів. Паралельні дослідження проведено із застосуванням звичайної спектрофлуориметрії, що, з нашої точки зору, сприяє їхній верифікації. В останньому варіанті аналізується флуоресцентний сигнал суспензії міоцитів в робочому середовищі, а не окремих клітин. Нами використано загальноживані в біохімічних дослідженнях речовини, які деполаризують мітохондрії (1 мМ азид натрію – інгібітор ЕТЛ, 10 мкМ протонофор СССР [461]) та ПМ (1 мМ убаїн –блокатор Na^+, K^+ -АТФ-ази [416]). Контрольні експерименти показали, що аутофлуоресценція клітинної суспензії не змінюється протягом часу проведення вимірювань, також не виявлено змін інтенсивності аутофлуоресценції під впливом сполук, що були використані.

Нами досліджено широкий діапазон концентрацій DiOC₆(3) – від 10 нМ до 5 мкМ. Кінетика спалаху флуоресценції при взаємодії зонда (10 - 500 нМ) з клітинами характеризується насиченням, яке досягається приблизно на 3 хв інкубації, в подальшому протягом принаймні 10 хв її інтенсивність майже не змінюється (рис. 3.3.3, А, наведено типовий результат для концентрацій зонда 100 нМ). Показано, що за 10 нМ DiOC₆(3) передінкубація міоцитів (5 хв) з агентами, які деполаризують ПМ (1 мМ оубаїн та 120 мМ КСl), не призводить до змін в інтенсивності флуоресценції, отже відповідь зонду на електричний потенціал плазмалеми відсутня (рис. 3.3.3, Б). Водночас за використання 1-5 мкМ

DiOC₆(3) спостерігається гасіння флуоресценції зонда (рис. 3.3.3, В). З літератури відомо, що димеризація ціанінових барвників, яка посилюється із зростанням їхньої концентрації, призводить до зниження флуоресценції [317], що пояснює наведені результати. Оптимальними умовами реєстрації флуоресцентної відповіді у випадку міоцитів матки є концентрації DiOC₆(3) в діапазоні 50-100 нМ. Відносно низькі (10 нМ) та високі (1-5 мкМ) концентрації зонда виявляються неефективними при роботі із цим об'єктом. За оптимальних концентрацій DiOC₆(3) протягом 3 хвилин акумуляції і розподілу зонду в клітинах досягається рівноважний стан (рис. 3.3.3), а флуоресцентна відповідь барвника надалі майже не змінюється з часом.

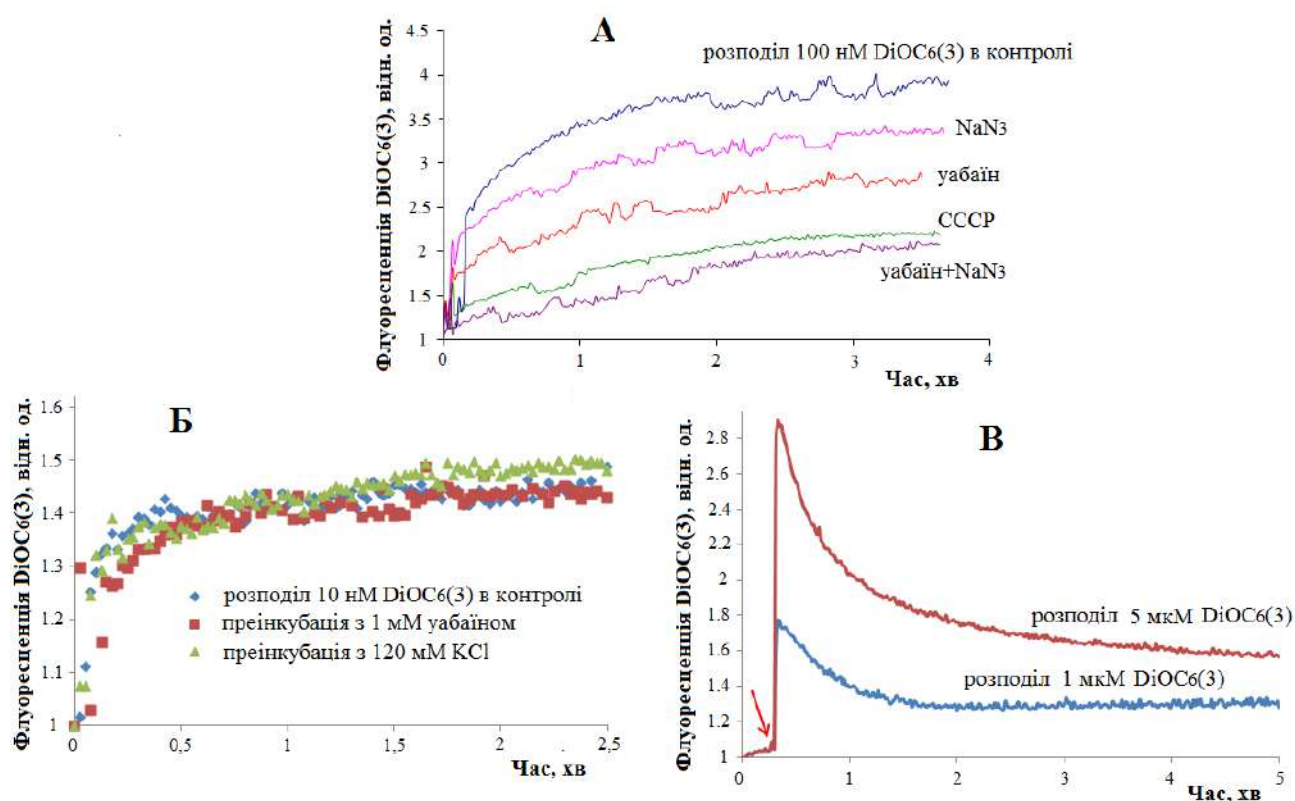


Рис. 3.3.3. Флуоресцентна відповідь 100 нМ (А), 10 нМ (Б), 1 та 5 мкМ (В) DiOC₆(3) в міоцитах матки. Результат характерного дослідження. Метод спектрофлуориметрії. Концентрації речовин: 1 мМ уабаїн, 10 мкМ СССР, 5 мМ NaN₃. Час преінкубації з сполуками 5 хв (А, Б)

Зменшення флуоресценції міоцитів за попередньої інкубації з уабаїном, азидом та СССР (рис. 3.3.3, А, 3.3.4, А) свідчить на користь можливості тестування потенціалу як на ПМ, так і в МХ клітин. Сумарний ефект гасіння флуоресцентного сигналу за присутності азиду натрію та уабаїну у застосованих нами

концентраціях сягає в окремих випадках 90 % (рис. 3.3.4, А). Протонофор CCCP та NaN_3 пригнічують флуоресцентну відповідь клітин також і при додаванні на 3-тій хв акумуляції $\text{DiOC}_6(3)$, тобто на платовому рівні (рис. 3.3.4, Б). Через 5 хв їхньої дії флуоресцентна відповідь зменшується майже в 2 рази. Аналогічний за напрямом ефект спостерігається і при додаванні убаїну, причому через 5 хв інтенсивність флуоресценції знижується більше, ніж в 2 рази (рис. 3.3.4, Б). Дані одержані як із застосуванням спектрофлуориметрії, так і протокової цитометрії мали якісно подібний характер (рис. 3.3.3, 3.3.4).

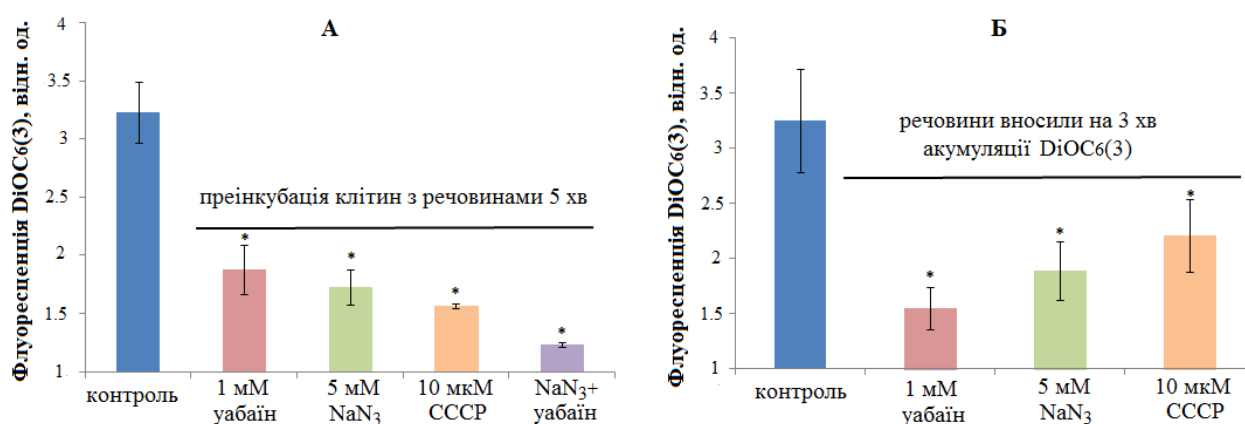


Рис. 3.3.4. Флуоресцентна відповідь $100 \text{ нМ DiOC}_6(3)$ в міоцитах матки в присутності речовин, що деполяризують плазмалему та мітохондрії: А – преінкубація клітин з речовинами 5 хв (відносні одиниці флуоресценції приведені на 5 хв розподілу $\text{DiOC}_6(3)$); Б – Транзитне внесення речовин, що деполяризують плазмалему та мітохондрійну мембрану (відносні одиниці флуоресценції приведені після 5 хв дії сполук). * $p < 0,05$, достовірні відносно контролю, $n=5$. Дані протокової цитометрії. За “1” прийнято власну флуоресценцію клітин

Таким чином, флуоресцентна відповідь $\text{DiOC}_6(3)$ в міоцитах матки включає в себе парціальні компоненти, пов'язані як з електричним потенціалом плазмалеми, так і МХ. До того ж, згідно даних, що підтверджуються спектрофлуориметрією та протоковою цитометрією, спостерігається адитивність у відповіді $\text{DiOC}_6(3)$ на преінкубацію міоцитів з азидом та убаїном (рис. 3.3.3, А, 3.3.4, А). Слід відмітити також доволі швидко відповідь $\text{DiOC}_6(3)$ на додавання досліджуваних агентів (рис. 3.3.4, Б).

Для підтвердження факту парціального внеску електричного потенціалу на ВММ та ПМ у флуоресцентний сигнал від $\text{DiOC}_6(3)$ в міоцитах нами був за-

стосований K^+ -іонофор валіноміцин. Його аплікація зумовлює зростання флуоресценції $DiOC_6(3)$ в міоцитах. У разі деполяризації ВММ за умови передінкубації клітин протягом 5 хв з 1 мМ азидом натрію валіноміцин посилював флуоресцентну відповідь зонда, що є наслідком збільшення проникності ПМ до іонів K і відповідного збільшення (за модулем) трансмембранного потенціалу. Водночас деполяризація плазмалеми внаслідок передінкубації міоцитів з 1 мМ уабаїном, робить ПМ не чутливою до K^+ -іонофору (графічні дані не наведено).

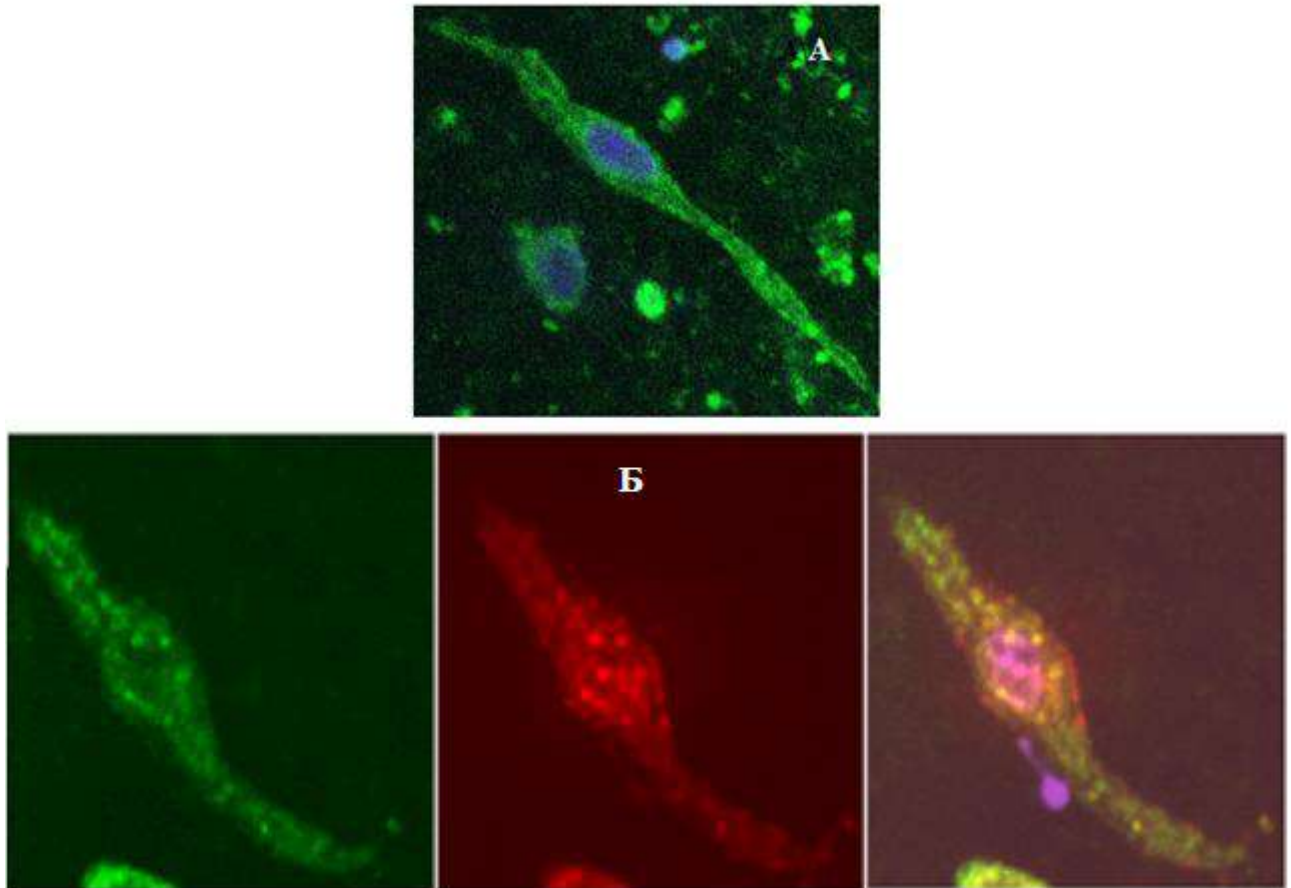


Рис. 3.3.5. Розподіл флуоресцентних зондів в міоцитах матки. А – розподіл потенціалчутливого барвника $DiOC_6(3)$ (зелений), 63-разове збільшення; Б - зелений - $DiOC_6(3)$, червоний - MitoTracker Orange CM- H_2 TMRos (специфічний щодо мітохондрій), накладання обох барвників; синій (А) або рожевий (Б) - Hoechst 33342 (специфічний щодо ядра)

З використанням лазерної конфокальної мікроскопії нами показано, що $DiOC_6(3)$ акумулюється у клітинному об'ємі, можливо, зв'язуючись із МХ та, взаємодіючи із зарядженою ПМ, окреслює контури клітини (рис. 3.3.5, А). Порівняльний розподіл потенціалчутливого $DiOC_6(3)$ та специфічного щодо МХ зонду MitoTracker Orange CM- H_2 TMRos в міоцитах матки вказує на їхню соло-

калізацію (рис. 3.3.5, Б). Отже, $\text{DiOC}_6(3)$ взаємодіє з ПМ, а також акумулюється в МХ міоцитів матки.

Таким чином, проведені дослідження свідчать про те, що флуоресцентний потенціалчутливий зонд $\text{DiOC}_6(3)$ та метод протокової цитометрії можна використовувати для аналізу змін електричного потенціалу як ПМ міоцитів в умовах деполяризації ВММ (передінкубація клітин з NaN_3 або СССР), так і МХ (у разі передінкубації клітин з уабаїном).

Рис. 3.3.5. демонструє присарколемальне та навколоядерне розташування МХ в міоцитах. З огляду на ідентифікацію синтезу NO в МХ, можливість його дифундування за межі органел та регуляторного впливу в місцях контактів ПМ з МХ подальші дослідження ми спрямували на вивчення впливу нітросполук на системи обміну катіонів у плазмалемі міомерія.

3.3.3. Вплив нітросполук на поляризацію плазматичної мембрани клітин міомерія

З огляду на принципове значення змін електричного потенціалу ПМ в процесах регуляції транспорту Ca^{2+} , скоротливої активності і виникнення тимчасової незбудливості на фоні підвищеного вмісту оксиду азоту в міомерії, надалі ми приділили увагу саме дослідженню рівня поляризації плазмалеми за дії нітросполук.

За дії досліджуваних нітросполук, а саме SNP та SN в концентрації 0,1 мМ на міоцити матки шурів у стані спокою нами демонструється зростання поляризації плазмалеми, причому цей ефект суттєво залежить від присутності іонів Ca в середовищі інкубації клітин (рис. 3.3.6). За низьких (не фізіологічних) концентрацій іонів Ca або наявності Ca^{2+} -хелатору ЕГТО поляризуючий вплив нітросполук майже не спостерігається. Тобто ефект поляризації плазмалеми має виражений Ca^{2+} -залежний характер.

Пасивний транспорт Ca^{2+} в ПМ міоцитів матки значною мірою обумовлений функціонуванням потенціал-керованих Ca^{2+} -каналів L-типу, які є дигідропіридин-чутливими [309]. Зміни мембранного потенціалу (наприклад, деполяризація за ЕМС) приводять до їхньої активації, а іони Ca, які увійшли в міопла-

зму за градієнтом концентрації, викликають CICR, обумовлене функціонуванням каналів RyR [110, 309, 370, 441, 485].

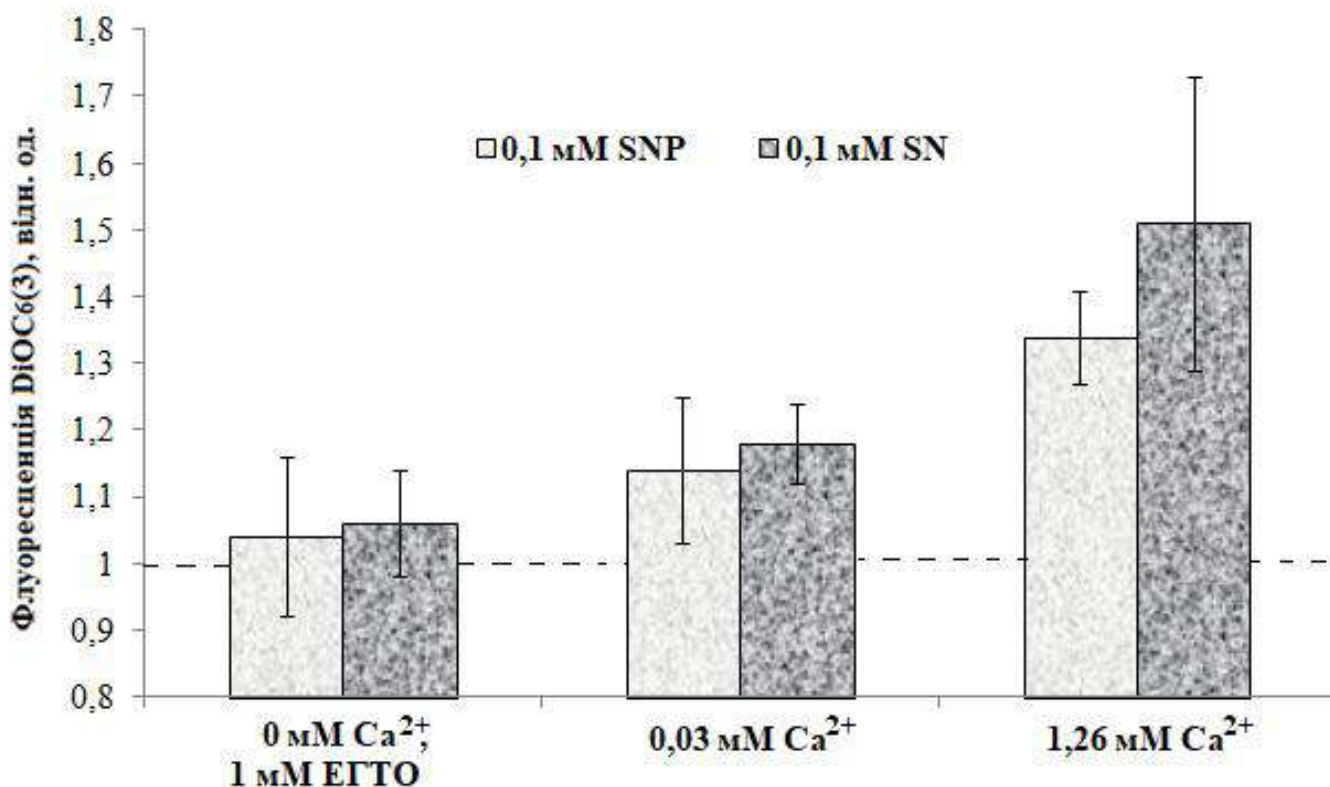


Рис. 3.3.6. Поляризація плазмалеми клітин міометрія за дії 0,1 mM SNP та SN за присутності 1 mM EGTA, 0,03 mM Ca²⁺ та 1,26 mM Ca²⁺. Для виключення ефекту мітохондрій клітини преінкубували 5 хв з 5 mM азидом натрія. Наведено значення відн. од. флуоресценції на 5 хв дії нітросполук. За "1" прийнято власну флуоресценцію клітин. $M \pm t$, $n=6$

Інгібітор дигідропіридинчутливих Ca²⁺-каналів нітрендипін суттєво не впливав на потенціал ПМ в нашому варіанті проведення експерименту (середовище містило 1,26 mM Ca²⁺) (рис. 3.3.7, А). Передобробка міоцитів нітрендипіном майже повністю гальмувала гіперполяризацію плазмалеми за дії нітросполук (рис. 3.3.7, Б). Відсутність поляризуючої дії нітросполук (рис. 3.3.7, Б) за присутності нітрендипіну вказує на можливість залучення цих структур у зростання проникності мембрани до іонів Ca.

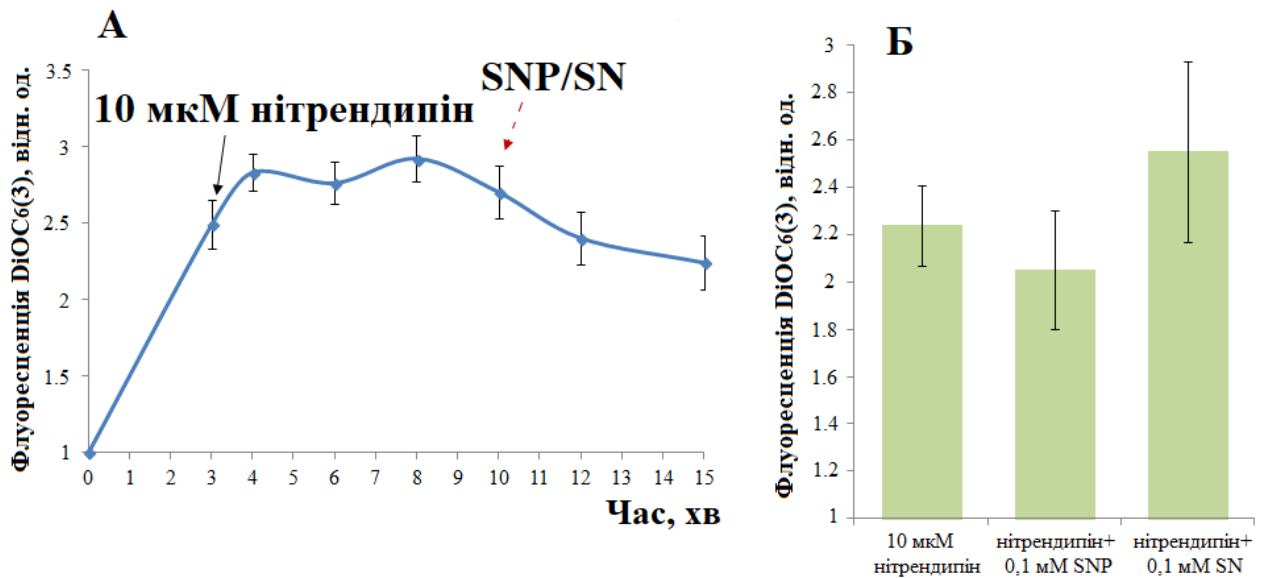


Рис. 3.3.7. Зміни поляризації плазмалеми міоцитів матки за дії специфічного інгібітора дигідропіридин-чутливих Ca^{2+} -каналів нітрендипіна (за наявності $1,26 \text{ мМ } Ca^{2+}$). SNP та SN транз'єнтно внесені через 7 хв дії інгібітора. А – зміни поляризації в контролі; Б – одиниці флуоресцентної відповіді через 15 хв (через 5 хв після внесення донорів оксиду азоту). Чорною стрілочкою показано момент внесення нітрендипіна в контролі; штрихованою стрілочкою вказано момент внесення SNP або SN в експериментальних умовах. $M \pm m$, $n=5$. Для виключення ефекту мітохондрій клітини преінкубували 5 хв з 5 мМ азидом натрія. За “1” прийнято власну флуоресценцію клітин.

Ще одним шляхом зростання концентрації Ca в субсарколемному регіоні може бути тимчасове зворотнє пригнічення PMCA. Активність PMCA в гладенькому м'язі пов'язана з ковеолами. Один зі сплайс-варіантів нейрональної ізоформи NO-синтази (nNOS μ) солокалізован з цим транспортним ферментом. Гальмування активності PMCA супроводжується посиленням біосинтезу NO і навпаки [204]. З огляду на це ми дослідили вплив нітросполук на активність PMCA у фракції сарколеми міомерія.

Встановлено, що питома ферментативна активність PMCA у фракції плазматичних мембран міомерія свині складає 35 ± 3 нмоль P_i /мг протеїну за 1 хв ($n = 22$). За доволі низької концентрації SN $0,01 \text{ мкМ}$ спостерігався виражений інгібувальний ефект (до 70 %) нітросполуки на активність PMCA. SNP у концентрації 100 мкМ в середньому на 50 % пригнічував активність Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази (рис. 3.3.8).

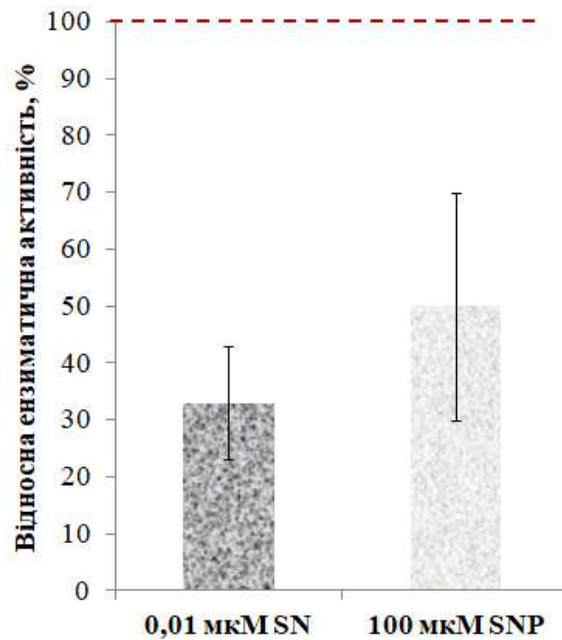


Рис. 3.3.8. Інhibувальний ефект нітросполук на активність РМСА міометрія. $M \pm m$, $n=5-6$. За 100 % прийнято значення ензиматичної активності за відсутності діючих речовин у середовищі

Пригнічення активності РМСА оксидом азоту разом зі зростанням проникності ПМ до Ca^{2+} в ГМК матки [28-29] за фізіологічних умов здатні викликати збільшення концентрація Ca^{2+} в субплазмалемному регіоні міоплазми, що може в подальшому активувати Ca^{2+} -залежні процеси, зокрема транспорт моновалентних катіонів. Можна також припустити, що Ca^{2+} -залежне зростання синтезу оксиду азоту в субсарколемній зоні призведе до зміни у функціонуванні розташованих тут катіон-транспортувальних систем і, зокрема, відповідних підтипів K^+ -каналів. Останнє буде мати наслідком збільшення електричного потенціалу на ПМ. Клінічні дослідження показали, що донор NO нітрогліцерин зменшує частоту передчасних пологів [165, 206, 281]. Нітрогліцерин гіперполяризує мембрану міоцитів вагітних щурів, але розслаблює міометрій невагітних щурів без підвищення рівня cGMP. Розслаблення невагітного міометрія мавп, індукованого S-нітро-L-цистеїном, інhibувалось тетраетиламонієм (інhibітором K^+ -каналів). Є дані, що донори NO та аргінін сприяють відкриттю VCa , а інhibітори РК G/NOS блокують провідність цих каналів в клітинах міометрія вагітних жінок. Було зроблено припущення, що NO (або його донори) може розслабляти міометрій, прямо активуючи рГЦ та/або KCa канали [336, 344, 400, 413, 488].

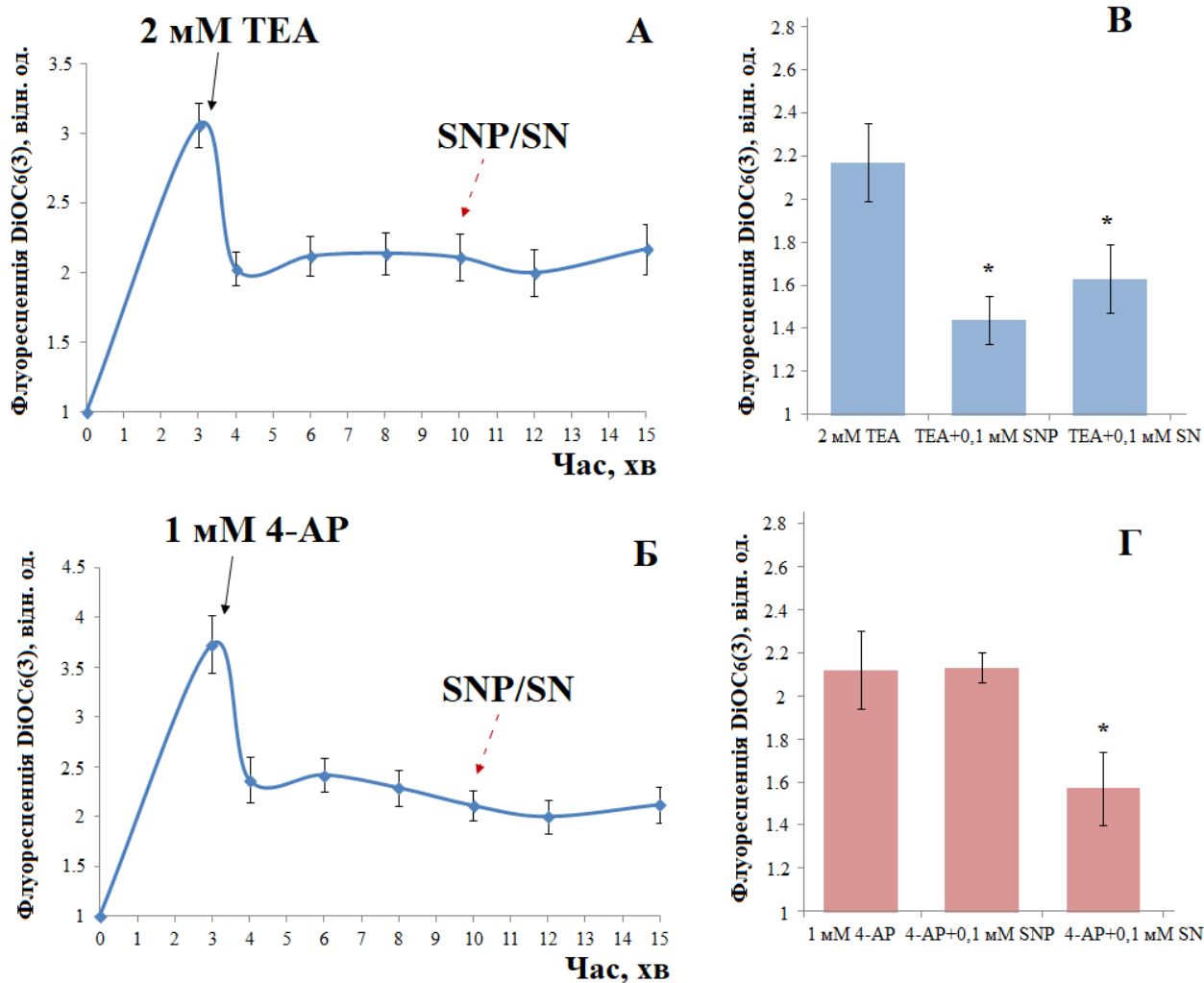


Рис. 3.3.9. Зміни поляризації плазмалеми міоцитів матки за дії блокувальників K^+ -каналів TEA (А) та 4-AP (Б) (за наявності в середовищі $1,26 \text{ mM Ca}^{2+}$), $0,1 \text{ mM SNP}$ та SN (В, Г). SNP та SN транзйєнтно внесені через 7 хв дії інгібіторів. А, Б – зміни поляризації в контролі; В, Г, – одиниці флуоресцентної відповіді через 15 хв (через 5 хв після внесення донорів оксиду азоту). Чорною стрілочкою показано момент внесення TEA, 4-AP в контролі; штрихованою стрілочкою вказано момент внесення SNP або SN в експериментальних умовах. $*p < 0,05$, достовірно відносно контролю за відсутності нітросполук, $M \pm t$, $n = 5$. Для виключення ефекту мітохондрій клітини преінкубували 5 хв з 5 mM азидом натрія. За “1” прийнято власну флуоресценцію клітин

В наших дослідженнях інгібування K^+ -проникності плазмалеми неспецифічними інгібіторами K^+ -каналів тетраетиламонієм (TEA) та 4-амінопіридином (4-AP) (середовище містило $1,26 \text{ mM Ca}^{2+}$) призводило до її вираженої деполяризації (3.3.9, А, Б), на фоні якої гіперполяризуючий ефект нітросполук не проявлявся (рис. 3.3.9, В, Г). Ці дані свідчать на користь залучення Ca^{2+} -залежних K^+ -каналів, що активуються NO, в реалізацію ефектів нітросполук, спрямованих

на зростання електричного потенціалу ПМ.

Важливим фактором, який зумовлює існування електричного потенціалу на ПМ є функціонування Na^+, K^+ -АТРази. Транспортувальний ензим підтримує градієнти потенціал-утворюючих катіонів на ПМ (транспортують проти концентраційного градієнту 2 K^+ в цитозоль на 3 Na^+ в позаклітинне середовище за рахунок енергії гідролізу АТР) і вносить парціальний внесок в величину потенціалу спокої на плазма лемі, а також регуляції проліферації, диференціювання та об'єму клітин [346, 416, 484]. Показаний тісний зв'язок між Na^+, K^+ -АТРазою (а саме специфічного мотиву на NH_2 -кінці) та IP_3 -рецепторами (IP_3R) СР, взаємодія між якими посилюється за присутності убаїну та індукує осциляції Ca^{2+} в цитозолі. Крім того, ізоформа $\alpha 1$ (а саме її центральна петля) взаємодіє з фосфоліпазою $\text{C}\gamma 1$, викликаючи генерацію IP_3 та діацилгліцеролу (DAG), формуючи разом з IP_3R СР Ca^{2+} -регуляторний комплекс [484].

Встановлено, що активність убаїнчутливої Na^+, K^+ -АТРази в пост'ядерній фракції м'язової тканини матки дорівнює $4,4 \pm 0,4$ нмоль P_i /хв на 1 мг протеїна. cGMP (0,8 мкМ) 3-разово стимулює ензим порівняно з контролем. За присутності метиленового синього (10 мкМ), відомого неспецифічного інгібітора рГЦ, зникав не тільки стимулювальний ефект cGMP , а й вдвічі пригнічувалась активність Na^+, K^+ -АТРази (рис. 3.3.10, А).

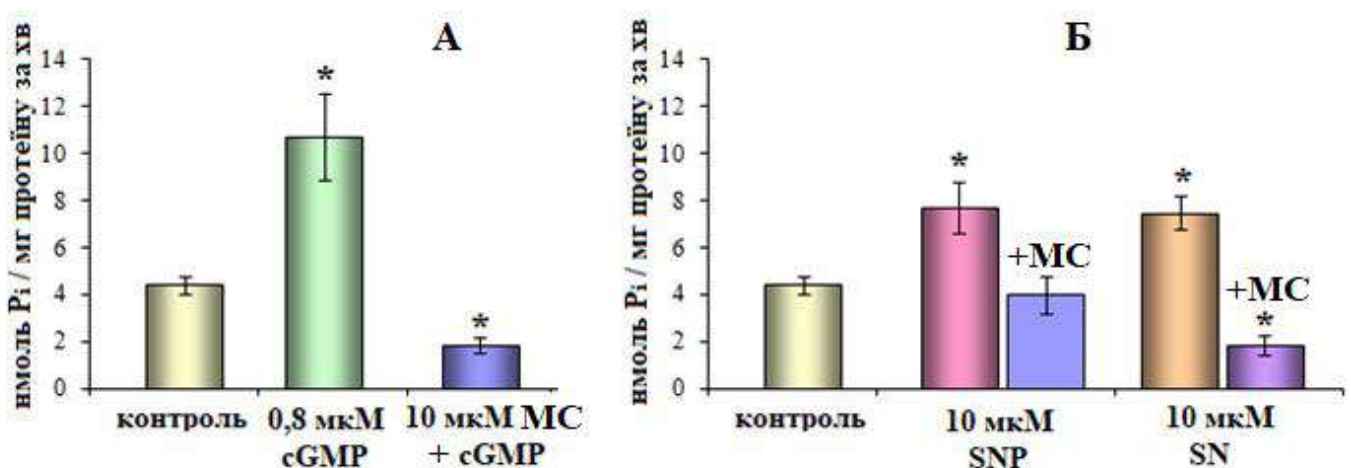


Рис. 3.3.10. Вплив cGMP , нітросполук та метиленового синього (МС, інгібітор розчинної гуанілатциклази) на Na^+, K^+ -АТРази активність у пост'ядерній фракції м'язової тканини матки. ($M \pm m$, $n=5$). * - зміни достовірні відносно контролю, $p \leq 0,05$

Даний результат доводить, що активність електрогенної Na^+, K^+ -АТРази регулюється cGMP та залежить від активності рГЦ. Раніше було показано, що нітросполуки підвищують вміст cGMP в міоцитах матки [30]. З огляду на це, ми дослідили вплив нітросполук на убаїнчутливу Na^+, K^+ -АТразу у пост'ядерній фракції міометрія (рис. 3.3.10, Б).

Виявлено, що 10 мкМ SNP та SN майже у 2 рази підвищують активність Na^+, K^+ -АТРази. За присутності в середовищі інкубації метиленового синього активуючого впливу нітросполук на активність Na^+, K^+ -АТРази не спостерігали (рис. 3.3.10, Б).

На препаратах судин продемонстровано, що cGMP-залежний шлях реалізації ефектів NO призводить до активації Na^+, K^+ -АТРази, водночас інгібування ензиму є процесом cGMP-незалежним і обумовлене посиленням вільнорадикальних реакцій [4]. В умовах стимуляції ендогенного синтезу NO після введення бактеріального ліпополісахариду і фармакологічних донорів NO (нітрогліцерину) було показано, що вплив оксиду азоту на Na^+, K^+ -АТразу ГМК аорти залежить від його концентрації. Введення щурам ліпополісахаридів і помірні дози нітрогліцерину призводили до активації Na^+, K^+ -АТРази [4]. Автори цитованої роботи висунули припущення, що вплив на ензим залежав від співвідношення між рівнем АФК та NO, вмісту депонуючих NO молекул, а також від інтенсивності вільно-радикальних реакцій.

Оскільки в пост'ядерній фракції присутні в нативному стані всі компоненти сигнального шляху NO/рГЦ/cGMP/ПК G й існує можливість активуючого фосфорилування Na^+, K^+ -АТРази, ми вважаємо, що в цьому варіанті постановки експерименту має місце cGMP-залежний механізм дії нітросполук. Саме він, згідно вище наведених літературних даних, може мати функціональне значення в контролі Ca^{2+} -залежної скоротливої активності ГМК оксидом азоту. cGMP-залежна стимуляція ензиму має наслідком зростання поляризації ПМ.

Можливе значення *in vivo* оксиду азоту як агента, що гальмує процеси збудження клітин гладенького м'яза матки, доводять експерименти з вивчення впливу SNP та SN на розвиток у часі висококалієвої деполаризації ПМ міоцитів (рис. 3.3.11). В цих дослідженнях додавання до клітин високої концентрації K^+

за умови ізотонічної заміни Na^+ на K^+ в середовищі інкубації призводило до доволі різкого зниження флуоресценції $\text{DiOC}_6(3)$, яке тривало у часі принаймні до 15 хв експерименту. Їхня попередня обробка нітросполуками не впливає на початковий розвиток деполаризації, але подальше падіння електричного потенціалу на плазмалемі зазнає суттєвого гальмування. У випадку дії SNP поляризація мембрани на 15 хв, згідно змін флуоресценції $\text{DiOC}_6(3)$, набуває близьких до контрольних значень показників (до моменту висококалієвої деполаризації) (рис. 3.3.11).

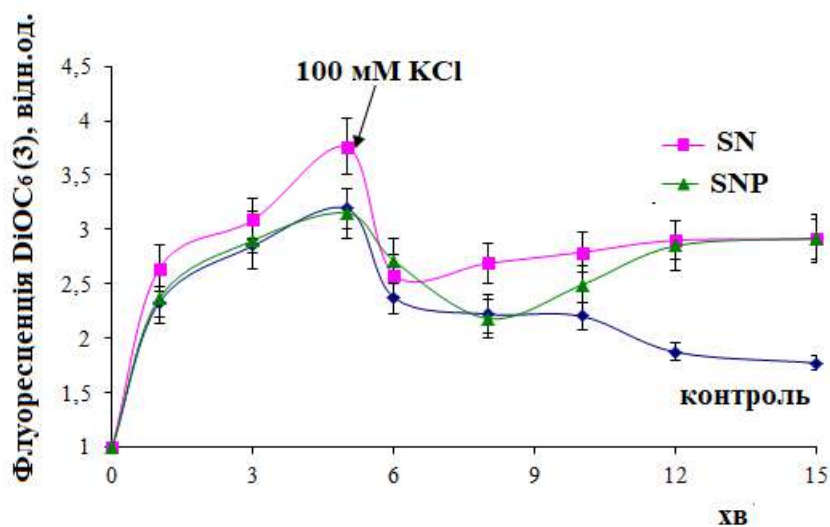


Рис. 3.3.11. Вплив 0,1 мМ SNP та SN на розвиток висококалієвої деполаризації у часі (передінкубація міоцитів з нітросполуками 15 хв). Для виключення ефекту мітохондрій клітини преінкубували 5 хв з 5 мМ азидом натрія. $n = 5$. За "1" прийнято власну флуоресценцію клітин

Отже, поляризуючий ефект оксиду азоту обумовлений активацією K^+ -проникності плазмалеми, що дозволяє припустити, що він пов'язаний саме із стимулюванням K_{Ca} -каналів. Зростання K^+ -проникності ПМ за умови спокою розглядається як важливий фактор підтримання відносної незбудливості міометрія в період вагітності [123].

Для подальшого з'ясування біохімічних механізмів, що лежать в основі гіперполяризуючої дії нітросполук на ПМ міоцитів матки ми дослідили їхній безпосередній вплив на транспортування крізь плазмалему іонів K , що лежить в основі створення мембранного потенціалу.

3.3.4. Зміни K^+ -рівноважного потенціалу на плазматичній мембрані за дії нітросполук

Зручною моделлю для вивчення впливу електричного потенціалу на обмін катіонів є везикули ПМ. Оскільки вона дозволяє позбутися впливу цитозольних метаболітів та регуляторних компонентів, контролювати вплив яких є доволі складною задачею. Раніше в наших експериментах встановлено, що фракція ПМ клітин міометрія свині містить близько 80 % везикульованих фрагментів [77]. Трансмембранний електричний потенціал створювали в апробованій модельній системі “ K^+ -валіноміцин”. Антибіотик і каналоформер валіноміцин підвищує проникність ПМ до K^+ , що дає можливість виходу катіона, попередньо навантаженого в везикули, за градієнтом його концентрації. При цьому виникає електричний потенціал на мембрані везикул зі знаком “-” на внутрішньому боці ПМ – квазістаціонарний K^+ -дифузійний потенціал, який є відносно стійким у часі (час напівдисипації його $\tau_{1/2}$ 3-5 хв) [49]. При цьому іонну силу компенсували до 150 мМ додаванням холін-хлориду (Ch^+) у відповідних концентраціях як детально описано в підрозділі 2.2.14 “Матеріали та методи досліджень”. Як було зазначено в цьому підрозділі тестування штучного K^+ -рівноважного потенціалу $\Delta\phi$ на везикулах ПМ міоцитів, який за своєю величиною відповідає розрахованому за рівнянням Нернста, можливе із використанням потенціалчутливого зонда $DiOC_6(3)$ та методу протокової цитометрії. Ці результати дають підставу використати зазначену експериментальну модель з метою дослідження Ca^{2+} -незалежного впливу нітросполук на поляризацію ПМ клітин міометрія.

Для з’ясування впливу нітросполук на інтенсивність флуоресценції $DiOC_6(3)$ та трансмембранний потенціал було обрано наступні варіанти постановки експерименту (відповідні результати представлено на рис. 3.3.12):

1. Контроль. Відношення флуоресцентної відповіді $DiOC_6(3)$ за умови наявності градієнту K^+ на мембрані (300 мМ $[K^+]_i$ / 100 мМ $[K^+]_e$ + 200 мМ $[Ch^+]_e$, $\Delta\phi = -27,8$ мВ) до флуоресцентної відповіді зонду за відсутності градієнту ($[K^+]_i = [K^+]_e = 300$ мМ, $\Delta\phi = 0$ мВ).

2. Дія 50 мкМ SN, SNP на флуоресценцію зонду за наявності градієнту K^+ , але відсутності валіноміцину (попередня відсутність потенціалу на мембрані).

3. Вплив 50 мкМ SN, SNP у разі внесення їх в середовище інкубації після формування $\Delta\phi = -27,8$ мВ на мембрані (тобто після внесення валіноміцину в середовище).

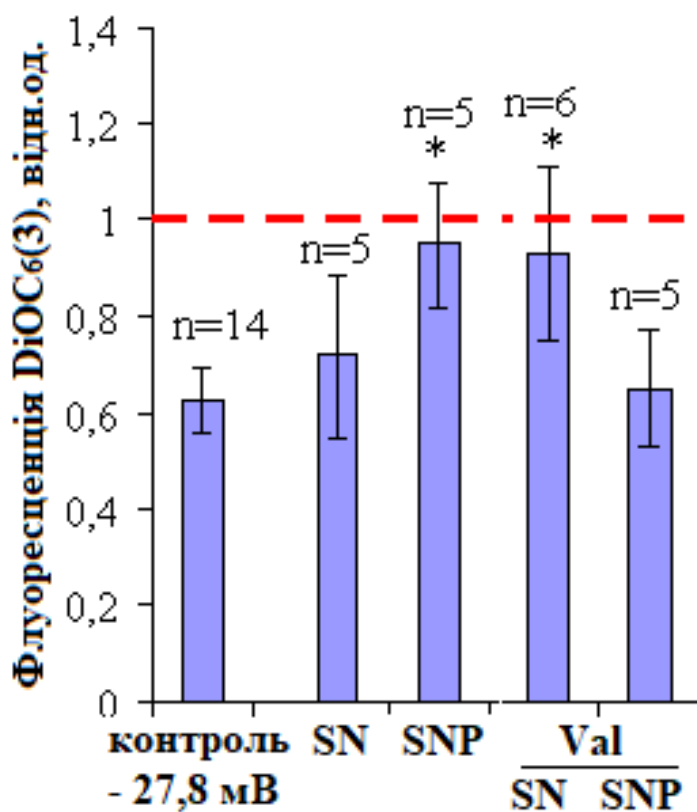


Рис. 3.3.12. Вплив SN та SNP (50 мкМ) на величину K^+ -рівноважного трансмембранного потенціалу на плазматичній мембрані. За відносну одиницю прийнято зміни флуоресценції при відсутності градієнту іонів калію ($[K^+]_i = [K^+]_e = 300$ мМ, $\Delta\phi = 0$ мВ). * - дані відносно контролю ($\Delta\phi = -27,8$ мВ, 300 мМ $[K^+]_i / 100$ мМ $[K^+]_e + 200$ мМ $[Ch^+]_e$) достовірні, $p \leq 0,05$

Значення флуоресцентної відповіді DiOC₆(3) (відносні одиниці) за наявності градієнту K^+ (300 мМ $[K^+]_i / 100$ мМ $[K^+]_e + 200$ мМ $[Ch^+]_e$) дорівнювало $0,63 \pm 0,07$ ($n=14$) і відповідало $\Delta\phi = -27,8$ мВ, розрахованому за рівнянням Нернста (контроль, перший варіант постановки експерименту). За одиницю прийнято флуоресцентну відповідь зонду при відсутності градієнту іонів калію ($[K^+]_i = [K^+]_e = 300$ мМ, $\Delta\phi = 0$ мВ). Виявлено, що SN, вірогідно, підвищуючи проникність мембрани до іонів K, призводить до поляризації мембрани та відповідної

зміни величини флуоресцентної відповіді зонду, яка досягає розрахованої для $\Delta\phi = -27,8$ мВ (другий варіант постановки експерименту). Цього ефекту не виявлено у випадку дослідів із SNP.

Внесення SN до середовища інкубації після створення потенціалу на ПМ (третій варіант постановки експерименту), призводить до дисипації штучно наведеного потенціалу, оскільки величина флуоресцентної відповіді наближається до 1 (відсутність потенціалу). Внесення SNP на величину флуоресцентної відповіді ($\Delta\phi$) не впливає.

Різні варіанти постановки експерименту вказують на можливість підвищення проникності ПМ до іонів K за безпосередньої дії попередника NO SN на мембрану. Цей ефект має місце за номінальної відсутності іонів Ca в середовищі і може бути обумовлений активацією Ca^{2+} -нечутливої K^+ -проникності ПМ. Відсутність ефекту SNP в цій модельній системі може бути пояснена хімічним складом цієї комплексної сполуки.

Таким чином, в міометрії NO підвищує проникність ПМ до Ca^{2+} шляхом стимуляції його дигідропіридин-чутливого пасивного транспорту у міоцити та гальмування РМСА. Подібні результати спостерігались також в окремих дослідженнях, проведених на кардіоміоцитах та клітинах нервової тканини [60, 156, 204, 316, 441]. Зазначені мембранні та іонні ефекти можуть зумовлювати короткотривале зростання концентрації катіона в субсарколемному регіоні, що призведе до активації Ca^{2+} -залежних ензимів та процесів, зокрема відповідних підтипів K^+ -каналів та NO-синтази, із послідуєчим зростанням поляризації ПМ та зниженням рівня збудливості ГМК. Цьому процесу сприяє також cGMP-залежна активація Na^+, K^+ -АТРази.

Поряд із електричним потенціалом на ПМ ключову роль підтримання Ca^{2+} -гомеостазу ГМК відіграє рівень поляризації ВММ, від якого залежать функціонування Ca^{2+} -транспортувальних систем МХ та відкриття РТР. Гіперполяризація ВММ має негативні наслідки, що проявляються в змінах морфології МХ, супроводжуються Ca^{2+} -перевантаженням та гіперпродукцією АФК. Існує точка зору, що NO в низьких концентраціях володіє протекторними щодо МХ

ефектами. Тому в наступній серії досліджень ми вивчали вплив нітросполук на поляризацію ВММ – інтегральний показник функціональної активності МХ.

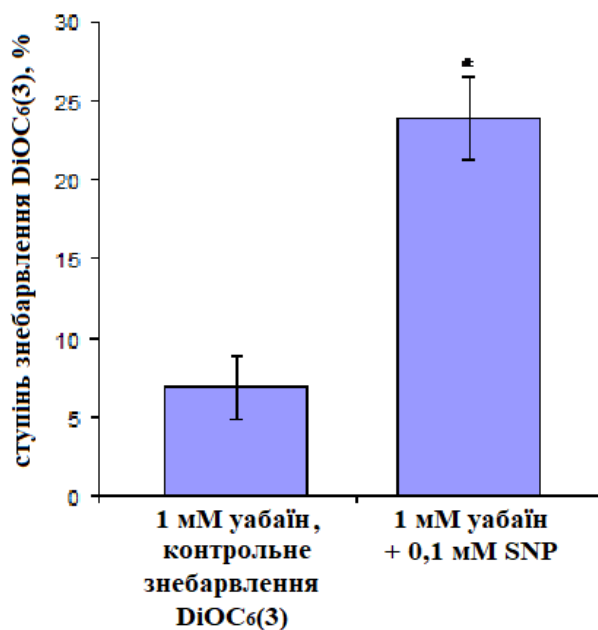


Рис. 3.3.13. Зменшення інтенсивності флуоресценції $DiOC_6(3)$ за дії 0,1 мМ SNP в присутності уабаїну; $M \pm t$, * - $p < 0,05$, для аналізу використано 10 клітин, реєстрація процесу здійснювалась протягом 5 хв. Метод лазерної конфокальної мікроскопії

Зростання потенціалу на ВММ супроводжується посиленою генерацією супероксиданіона в дихальному ланцюзі. Причинами цього явища можуть бути зворотний транспорт електронів за участі комплексу I, а також гальмування переносу електронів в цитохромній системі, що призводить до накопичення убісеміхінону. Саме тому явище «м'якого роз'єднання» дихання і фосфорилювання внаслідок дисипації електрохімічного градієнту протонів за участі роз'єднувальних протеїнів МХ та жирних кислот розглядається як захисна реакція, спрямована на попередження гіперпродукції АФК [83, 158, 397]. З огляду на це, цікавим є наші результати щодо помірною зниження мембранного потенціалу МХ (в середньому на 17 %) за дії SNP (рис. 3.3.13). В порівняльних дослідженнях SN у зазначеній концентрації не чинив ефекту на флуоресценцію. Аналогічні якісні і кількісні результати були отримані нами при роботі на пермеабілізованих дигітоніном міоцитах. Отже, принаймні окремі нітросполуки здатні знижувати поляризацію МХ міометрія, причому ефект може бути

пов'язаний із їхнім безпосереднім впливом на органели. Одержаний результат був якісно підтверджений нами із використанням методу протокової цитофлуориметрії (графічні дані не наведено).

Внутрішня мембрана МХ, як і матриксні ензими, є ефективною мішенню дії нітросполук через високий вміст в цих структурах залізо-сірчаних центрів та гемових груп. Оксид азоту (або його похідні) в наномолярних концентраціях здатний зворотньо пригнічувати активність цитохром с-оксидази, що призводить до зниження інтенсивності функціонування ЕТЛ, окисного фосфорилування та споживання кисню МХ [191, 205, 236]. Зазначені біохімічні властивості NO можуть лежати в основі захисту МХ від надмірної генерації АФК [191, 236]. Крім того, ймовірно, існують функціонально-значущі зворотні зв'язки між транспортом Ca^{2+} в матрикс, активністю Ca^{2+} -залежних дегідрогеназ, функціонуванням ЕТЛ та генерацією АФА та АФК в МХ. Як було продемонстровано раніше (розділ 3.2.2) SNP та SN стимулювали енергозалежну акумуляцію Ca^{2+} в МХ. Стимулювання трансмембранного переносу позитивних іонів Ca за дії NO також може лежати в основі помірною зниження потенціалу на мембрані МХ.

Окрім сигнальної та регуляторної функцій, оксид азоту або його похідні здатні володіти цитопротекторними властивостями. Відомо, що NO регулює експресію ензимів антипероксидного та антирадикального захисту, здатний безпосередньо обривати ланцюги вільнорадикального окиснення ліпідів, взаємодіючи із ліпопероксидами [64, 70]. Протекторна та цитотоксичні функції оксиду азоту безпосередньо залежать від його концентрації та мікрооточення, а також рівня прооксидантних процесів. Передбачають, що оксид азоту за низьких концентрацій спроможний захищати МХ від оксидативного/нітрозативного стресів та відповідної дисфункції [191, 236, 366].

Як вже зазначалося, причиною помірною зниження електричного потенціалу на ВММ за дії оксиду азоту може бути його вплив на окремі компоненти ЕТЛ. З метою вивчення цього явища була проведена експериментальна робота, основні результати якої представлені нижче.

3.3.5. Електрон-транспортувальний ланцюг мітохондрій як мішень дії оксиду азоту

Генерація електричного потенціалу на мітохондрійній мембрані забезпечується комплексами *I – IV* дихального ланцюга, а первинними переносниками електронів при окислювальному фосфорилуванні є коензими NADH (нікотинамідаденіндинуклеотид) та FADH₂ (флавінаденіндинуклеотид). Окислення NADH та FADH₂ в мітохондрійному ЕТЛ призводить до транслокації протонів через комплекси *I, III* та *IV* внутрішньої мембрани з матриксу у міжмембранний простір, а протонний градієнт разом з АДР контролюють швидкість синтезу АТФ. Зміни інтенсивності дихання МХ віддзеркалюються у редокс-стані піридинового та флавінового нуклеотидів (рис.3.3.14). Співвідношення окисненої та відновленої форм NADH та FADH₂ виступає показником біоенергетики МХ.

NADH є необхідним коензимом для каталітичних реакцій основних метаболічних шляхів та виступає домінантною компонентою клітинної аутофлуоресценції. Після віддачі електронів, передусім в ЕТЛ МХ, окислена молекула NAD⁺ не флуоресцює. На відміну від NADH, FADH₂ не має власної флуоресценції, проте FAD володіє зазначеною властивістю. Це дозволяє “візуалізувати” редокс-стан нуклеотидів з використанням оптичних методів без застосування флуоресцентних зондів. Таким чином, зміни у флуоресценції NADH та FAD можуть бути використані для оцінки ефективності роботи МХ та виступати маркером їхньої функціональної активності [248, 277, 412].

Вивчення редокс-стану переважно піридинових нуклеотидів застосовували в окремих біохімічних дослідженнях, зокрема з метою вивчення наслідків окисдативного стресу [174, 393], детекції клітинної смерті [460], оцінки ступеня постсинаптичної нейрональної активації [405]. Відповідні дослідження проводили на клітинах карциноми [398], легень [417], в тканині серця [377, 418]. Зміни редокс-стану піридинових нуклеотидів, як головної причини порушень дихання МХ за дії токсичного фторацетату, вивчали на клітинах асцидної карциноми Ерліха та МХ печінки щурів [41]. Щодо відповідних досліджень на кліти-

нах (та/або МХ) гладеньких м'язів інформація в доступній нам літературі відсутня.

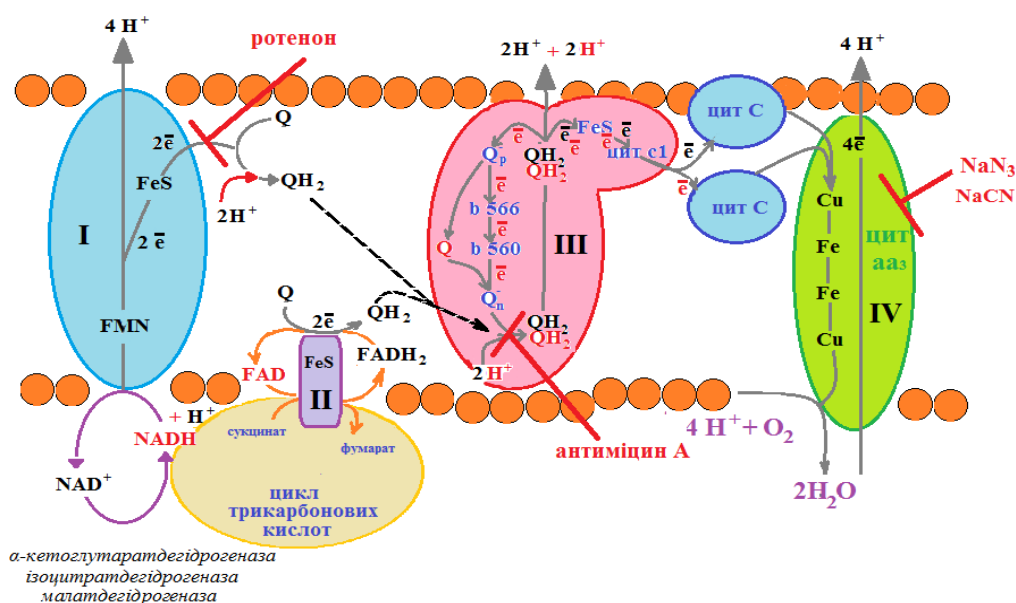


Рис. 3.3.14. Авторська схема переносу електронів та місця дії інгібіторів дихальних комплексів в електрон-транспортувальному ланцюзі мітохондрій. Комплекси I – NADH-убіхінон оксидоредуктаза, II – сукцинат-дегідрогеназа, III – убіхінон-цитохром с оксидоредуктаза, IV – цитохром с-оксидаза. Q – убіхінон, QH₂ – убіхінол

Оцінка функціонування електрон-транспортувального ланцюга мітохондрій міометрія за аутофлуоресценцією NADH та FAD. У фракції МХ міоцитів матки максимуми спектрів збудження та флуоресценції від NADH складають 350 та 450 нм відповідно (рис. 3.3.15, б, в). Максимуми спектрів збудження та флуоресценції FAD відповідали 450 та 533 нм (рис. 3.3.16, б, в), що узгоджується з даними літератури [277, 259, 405, 417, 460]. Крім того, спектри флуоресценції та збудження досліджуваних аденінових нуклеотидів збігаються із спектральними характеристиками відповідних хімічно чистих нуклеотидів в робочому середовищі (рис. 3.3.15, а; 3.3.16, а). Слід зазначити, що взаємодія NADH з протеїнами запобігає контакту (стекінг-взаємодії) між аденіном та відновленою нікотинамідною групою, в результаті чого зростає квантовий вихід флуоресценції, хоча для FAD такого ефекта не виявлено [285].

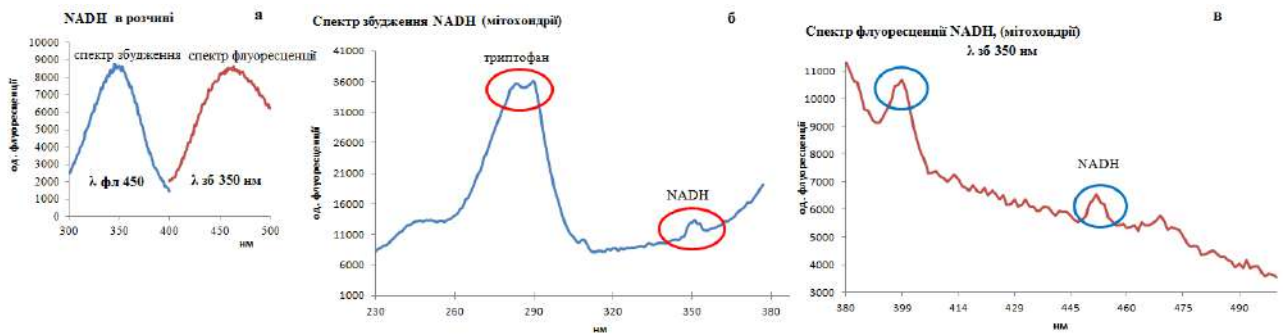


Рис.3.3.15. Спектри збудження та флуоресценції NADH в хімічно чистому вигляді (а, робочий розчин) та у складі ізольованих мітохондрій міоцитів матки (б, в)

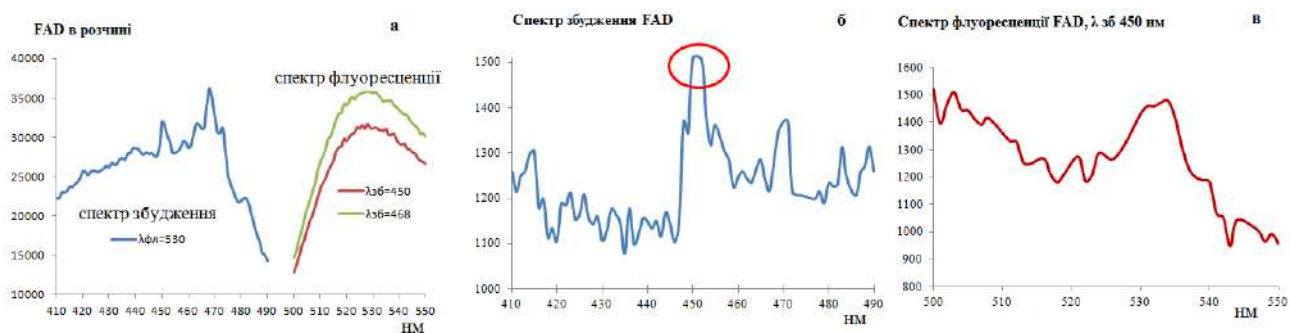


Рис.3.3.16. Спектри збудження та флуоресценції FAD в хімічно чистому вигляді (а, робочий розчин) та у складі ізольованих мітохондрій (б, в)

Для досягнення стану енергізації МХ в середовище інкубації вносили 5 мМ піруват (субстрат піруват-дегідрогеназного комплексу, який постачає NADH в дихальний ланцюг) та 5 мМ сукцинат (субстрат FAD-залежної сукцинат-дегідрогенази).

Флуоресценція NADH з часом знижується за присутності субстратів дихання, що свідчить на користь зростання вмісту окисленої форми NAD^+ за функціонування NADH-убіхінон оксидоредуктази або комплексу I (рис. 3.3.17). Поряд з цим, вміст FADH_2 знижується, і, відповідно, збільшується флуоресценція від FAD, що відображає роботу сукцинат-дегідрогеназного комплексу або комплексу II ЕТЛ (рис. 3.3.17). Таким чином, спостерігається реципрокність змін флуоресценції піридинового та флавінового аденіндинуклеотидів за нормального функціонування ЕТЛ МХ, що відповідає даним літератури [277, 398, 405, 417-418, 460, 479].

Комплекс II є ключовою ензиматичною компонентою циклу Кребса, що каталізує окислення сукцината до fumarата в матриксі МХ. Окислення сукци-

ната поєднано з відновленням убіхінона у ВММ. Комплекс II складається з двох частин. Перша являє собою розчинну сукцинат-дегідрогеназу, яка містить суб'єдиницю масою 70 кДа і ковалентно зв'язує FAD та суб'єдиницю масою 30 кДа, що включає FeS-кластери. Друга частина цього комплексу представлена мембранозв'язаним протеїном, який складається з двох суб'єдиниць (12 та 9 кДа), а також гема b. Внаслідок окислення сукцината до fumarата суб'єдиницею 70 кДа відбувається відновлення FAD до FADH₂. Послідує відновлення убіхінона (Q), який зв'язується з суб'єдиницею 12 кДа, до убіхінола (QH₂), супроводжується окисленням FADH₂.

Зниження флуоресценції FAD (рис. 3.3.17), спричинене додаванням субстратів дихання, можна пояснити стимулюванням активності ензимів циклу Кребса, і сукцинат-дегідрогенази зокрема, а наступне тривале подальше зростання сигналу може бути наслідком інтенсивного окислення FADH₂ внаслідок активації ланцюга переносу електронів.

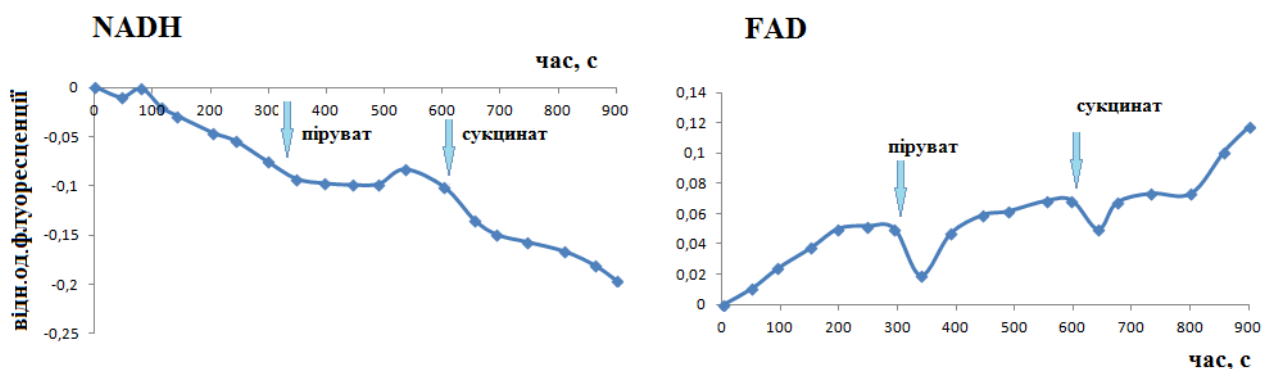


Рис. 3.3.17. Зміни флуоресценції NADH та FAD в ізолюваних мітохондріях за додавання субстратів дихання – 5 мМ пірувату та 5 мМ сукцинату, $n=5$. Дані типового експерименту

Внесення в середовище інкубації ротенону (5 мкМ), який блокує зв'язування убіхінону з комплексом I, призводить до збільшення вмісту NADH внаслідок блокування каталітичної активності NADH-дегідрогенази комплексу I, і відображається у зростанні флуоресценції піридинового нуклеотиду (рис. 3.3.18). Цей результат узгоджується з даними, одержаними на клітинах легень, карциноми, нейронах мозку, ізолюваних мітохондріях мозку та міокарду [41,

83, 259, 405, 417]. В той же час ротенон не впливав на динаміку змін флуоресценції від FAD.

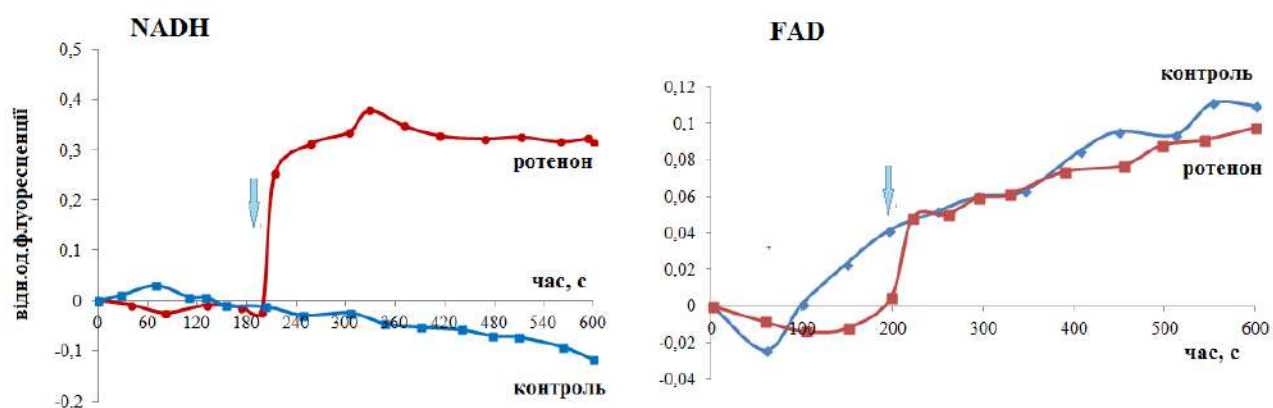


Рис. 3.3.18. Зміни флуоресценції $NADH$ та FAD в ізольованих мітохондріях за додавання 5 мкМ ротенону, $n=5$. Дані типового експерименту

Інгібітором III^{20} комплексу дихального ланцюгу (убіхінон-цитохром с оксидоредуктази) є антибіотик антимицин А, який блокує перенос електронів від убіхінону на цитохром с [257, 445, 479].

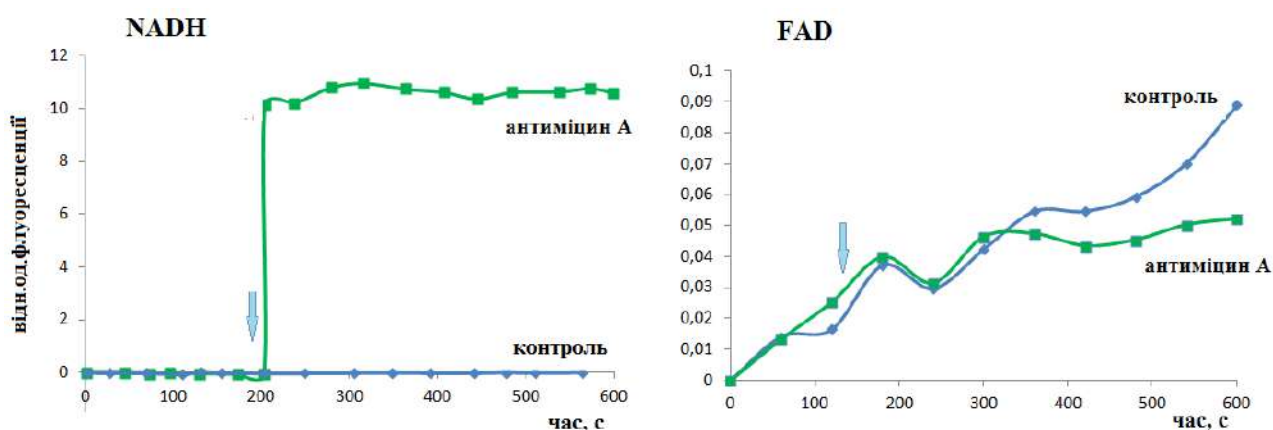


Рис. 3.3.19. Вплив антимицину А (1 мкг/мл) на флуоресценцію $NADH$ та FAD в ізольованих мітохондріях, $n=5$. Дані типового експерименту

Додавання антимицину (1 мкг/мл) викликало значне зростання інтенсивності флуоресценції від $NADH$ та помірне збільшення FAD порівняно з контролем (рис. 3.3.19). Даний результат свідчить про блокування I комплексу ЕТЛ та зниження функціональної активності II комплексу. За присутності сукцинату в середовищі інкубації сукцинат-дегідрогеназний комплекс продовжує окислювати сукцинат до фумарата з подальшим відновленням убіхінона до убіхінола, але з меншою інтенсивністю. За цих умов також можливий зворотний транс-

порт електронів від сукцинату через убіхінон до комплексу *I*, що супроводжується зростанням пулу NADH, внаслідок роботи NADH-дегідрогенази в реверсному режимі [83].

Специфічне інгібування *IV* комплексу ціанідом натрія (1 мМ), який блокує перенос електронів на кисень цитохромоксидазою, призводило до зростання флуоресценції NADH, тобто інгібування комплексу *I*, та зниження флуоресценції від FAD, що свідчить про блокування *II* комплексу дихального ланцюга (рис. 3.3.20). Цей експериментальний факт узгоджується з даними літератури. На клітинах легень та карциноми Ерліха також було показано зниження флуоресценції FAD за умови передінкубації з KCN та одночасне зростання сигналу від NADH [248, 412].

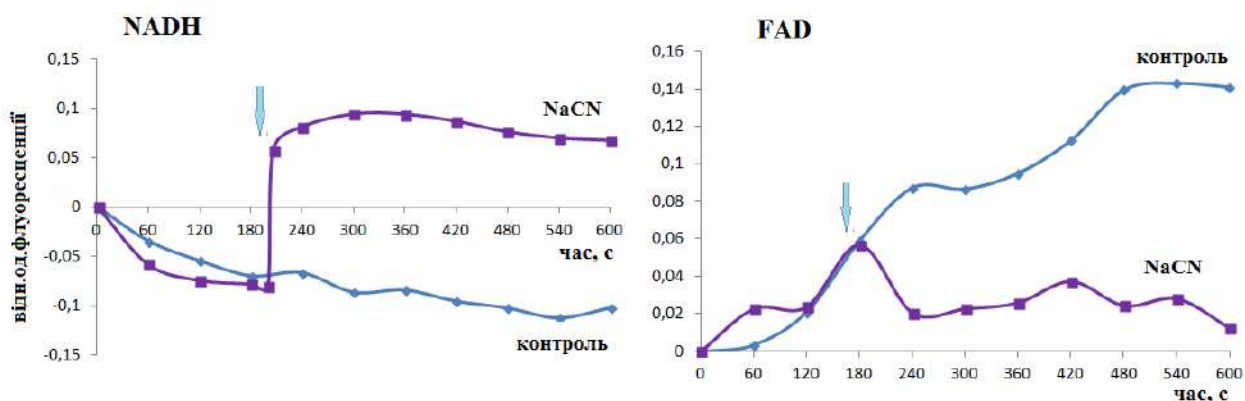


Рис. 3.3.20. Вплив NaCN (1 мМ) на флуоресценцію NADH та FAD в ізольованих мітохондріях, $n=5$. Дані типового експерименту

Дисипація електрохімічного градієнта протонів при внесенні в середовище інкубації протонофору CCCP (10 мкМ) мала наслідком різке зниження флуоресценції від NADH та FAD (рис. 3.3.21). Протонофори роз'єднують дихання та окисне фосфорилування за рахунок руйнування градієнту H^+ , внаслідок чого відбувається компенсаторне посилення функціональної активності окремих елементів дихального ланцюга *MX* [461]. Отримані результати вказують на стимулювання роботи *I* комплексу (рівень флуоресценції від NADH швидко знижується, надалі це падіння уповільнюється). Зменшення флуоресценції від FAD свідчить на користь блокування переносу електронів від сукцинату на убіхінон. Втім, продовження окиснення сукцинату сукцинат-дегідрогеназою супроводжується зростанням рівня $FADH_2$.

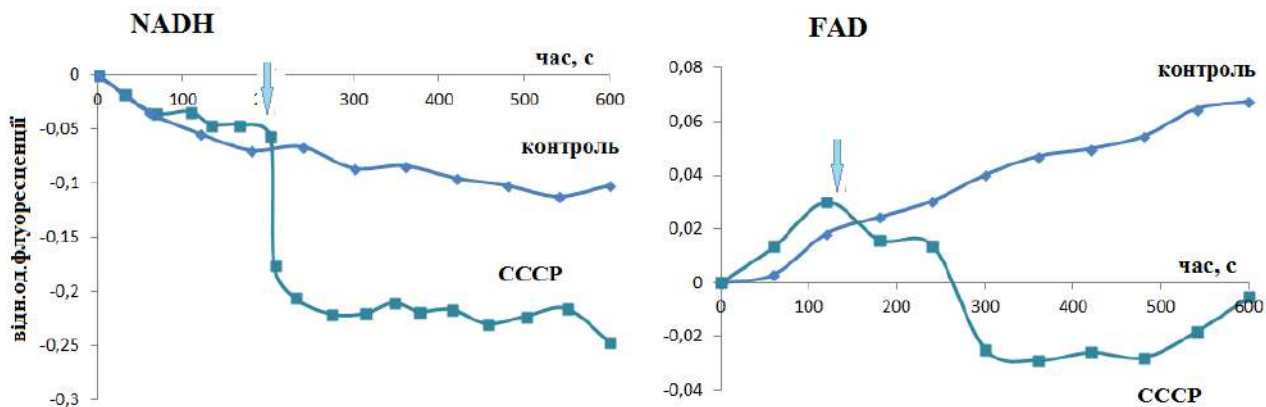


Рис. 3.3.21. Вплив протонифору СССР (10 мкМ) на флуоресценцію NADH та FAD в ізольованих мітохондріях, n=5. Дані типового експерименту

Передінкубація ізольованих МХ з протонифором СССР призводить до зниження рівня іонізованого Ca^{2+} в матриці органел, а також спричинює вихід попередньо акумульованого в енергозалежному процесі Ca^{2+} з МХ (розділ 3.2.1., рис. 3.2.8). Відомо, що піруватдегідрогеназний комплекс та NAD-вмісні дегідрогенази циклу Кребса (α -кетоглутаратдегідрогеназа та ізоцитратдегідрогеназа) є Ca^{2+} -залежними ензимами [229]. Протонифор СССР спричинює зниження іонів Са в матриці МХ, що веде до зниження активності Ca^{2+} -залежних ензимів циклу Кребса та сукцинат-дегідрогенази. Таким чином, компенсаторне відновлення градієнту протонів скоріше за все відбувається за рахунок переважно активності I комплексу ЕТЛ, адже такий шлях є енергетично більш вигідним для МХ.

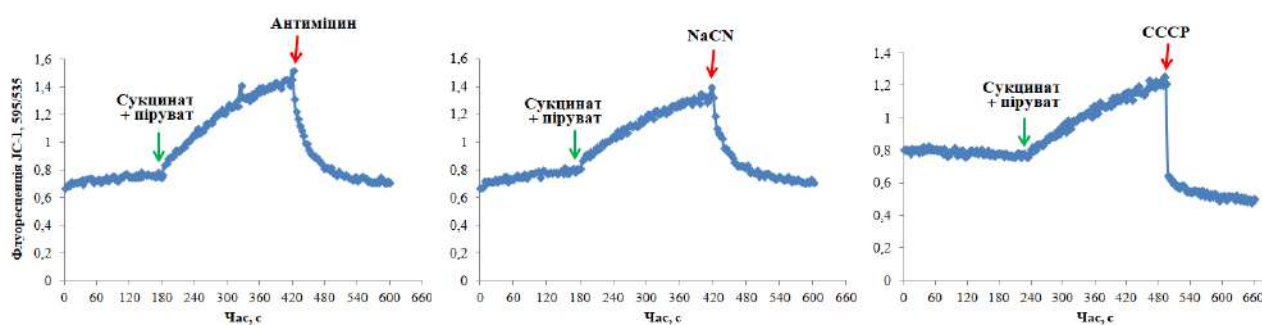


Рис. 3.3.22. Зміни потенціалу внутрішньої мембрани мітохондрій при внесенні субстратів I та II комплексів (5 мМ сукцината та пірувата), а також дії інгібіторів дихального ланцюга (1 мкг/мл антиміцину, 1 мМ NaCN) та 10 мкМ протонифора СССР

З використанням потенціал чутливого зонду JC-1 продемонстровано зростання потенціалу мітохондрійної мембрани при внесенні в середовище інкубації сукцинату та пірувату (5 мМ). Інгібітори дихального ланцюга спричинюють швидке зниження потенціалу МХ (рис. 3.3.22). Ці дані підтверджують результати щодо змін флуоресценції аденинових нуклеотидів.

Результати виконаних на фракції ізольованих МХ гладенького м'язу матки цієї серії експериментів вказують на можливість аналізу функціональної активності ЕТЛ, використовуючи власну флуоресценцію коензимів NADH та FAD. За постійної концентрації досліджуваних нуклеотидів в МХ зміни їхньої флуоресценції відображають саме окисно-відновний стан цих сполук – результат активності відповідних комплексів ЕТЛ. Аналіз флуоресцентної відповіді NADH та FAD в ізольованих МХ на специфічне блокування I, III, IV комплексів ЕТЛ та додавання протонифору виявив відповідність між змінами флуоресценції досліджуваних нуклеотидів (їхнім редокс-станом) і функціонуванням окремих комплексів ЕТЛ ВММ, а також поляризацією внутрішньої мембрани органел. Вивчення змін флуоресцентного сигналу від FAD та NADH можна використати для оцінки впливу ефекторів функціонування ЕТЛ, зокрема NO.

Вплив NO на аутофлуоресценцію мітохондрійних аденинових нуклеотидів. Основними наслідками дії NO є: 1 – високоафінне зворотнє інгібування IV комплексу ЕТЛ; 2 - нітрозилування протеїнів, що містять в активному центрі тільні залишки (до них відносяться піруват-дегідрогеназний комплекс та ензими циклу Кребса); 3 – нітрозилування комплексу I, що веде до його інгібування [482].

З огляду на вище сказане, ми дослідили зміни флуоресценції NADH та FAD за додавання 0,1 мМ SNP та SN. Нітросполуки викликали достовірне зниження флуоресценції NADH порівняно з контролем, що свідчить про накопичення в МХ окисленої форми піридинового нуклеотида за їхньої дії. Також нітросполуки викликали інгібування окиснення FADH₂, з тенденцією до відновлення цього процесу з часом. Отриманий результат свідчить про інгібування сукцинат-дегідрогеназного комплексу (рис. 3.3.23, А). Стимулювання синтезу

NO внесенням Ca^{2+} та L-аргініна (100 та 50 мкМ відповідно) також призводило до аналогічних змін флуоресценції аденінових нуклеотидів (рис. 3.3.23, Б).

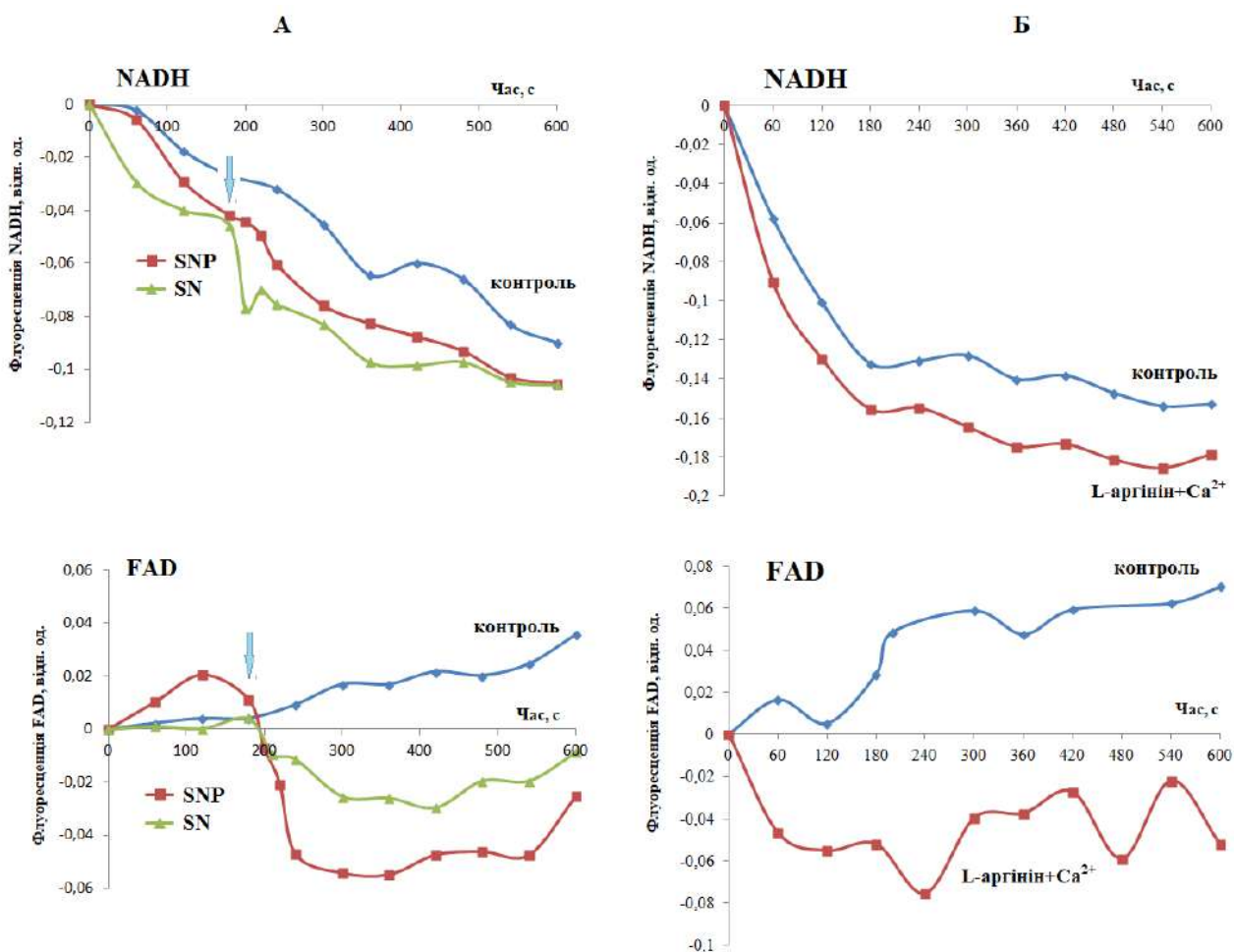


Рис. 3.3.23. Зміни флуоресценції NADH та FAD в ізольованих мітохондріях за впливу 0,1 мМ SNP та SN (А) та активації реакції синтезу NO в присутності 50 мкМ L-аргініна та 100 мкМ Ca^{2+} (Б). Дані типових експериментів

Таким чином, зниження рівня NADH та FAD за дії нітросполук або стимулювання реакції синтезу NO в присутності L-аргініна та Ca^{2+} скоріше за все пов'язане з гальмуванням II комплексу ланцюга переносу електронів в мітохондрійній мембрані, а також зі зменшенням активності ензимів циклу трикарбонових кислот. Втім, зміни у функціонуванні комплексів ЕТЛ не призводять до набухання МХ (рис. 3.3.24). Для порівняння використано набухання органел в присутності класичного каналотворюючого антибіотика аламетицина (7,5 мкг/мл) [63, 239]. Отже, оксид азоту, що синтезується МХ, та його донори не спричинюють дисфункцію органелл, яка може призвести до біохімічних механізмів загибелі міоцитів матки.

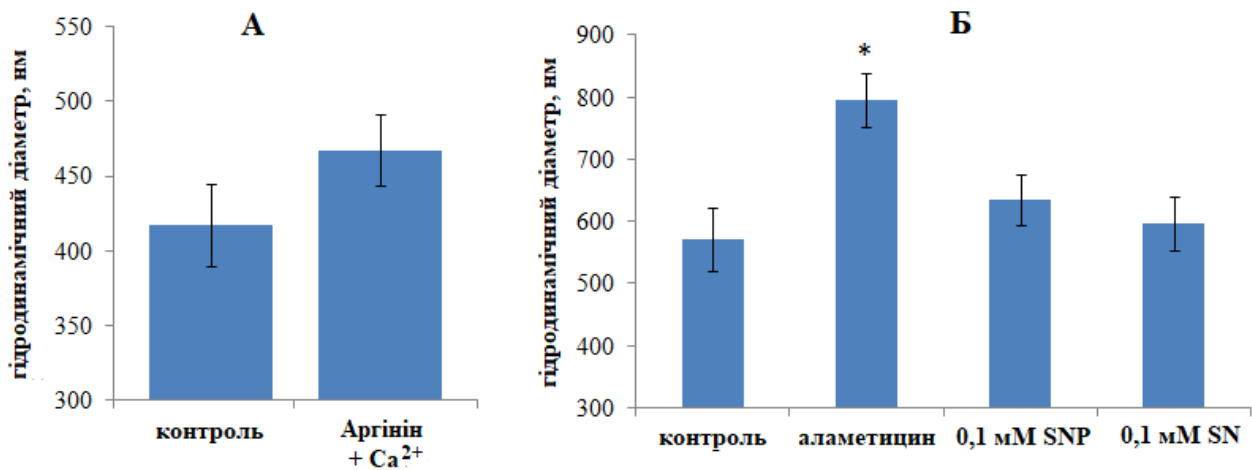


Рис. 3.3.24. Відсутність набухання мітохондрій за активації реакції синтезу NO в присутності 50 мкМ L-аргініна та 100 мкМ Ca²⁺ (А) та впливу 0,1 мМ SNP та SN (Б). M±m, n=5, * - p ≤ 0,05 відносно контролю. Аламетицин (каналоформер) – 7,5 мкг/мл.

В попередніх розділах цієї роботи мова йшла переважно про функціонально-значущі концентрації Ca²⁺, які регулюють біоенергетичні процеси в МХ та впливають на продукцію NO мітохондрійною NOS. Поряд з цим існує феномен Ca²⁺-перевантаження МХ, асоційований з такими негативними процесами як нітрозативний/оксидативний стрес, різке падіння електричного потенціалу на ВММ, відкриття РТР, біоенергетичний колапс тощо. Всі ці події мають наслідком розвиток апоптозу або некрозу. Одним із важливих процесів, пов'язаних з мітохондрійною дисфункцією, є порушення осмобалансу між матриксом та позамітохондрійним середовищем, набуханням МХ, розпрямленням крист, розриву ЗММ, що супроводжується вивільненням факторів апоптозу в цитозоль [128, 265, 339, 341]. Зокрема, для кардіоміоцитів було показано, що додавання донора NO SNAP викликало інгібування дихання, зниження потенціалу ВММ, зменшення акумуляції Ca²⁺, а також NO-залежне інгібування РТР, що розглядали як один з механізмів кардіопротекції [241]. Існує гіпотеза, що помірні концентрації NO здатні запобігати цим процесам, зокрема, гальмуючи РТР.

Для перевірки цього припущення нами була застосована модель набухання МХ в гіперкальцієвому середовищі і досліджена можлива протекторна роль оксиду азоту і інших сполук, зокрема АТР.

3.3.6. Протекторна дія NO щодо висококальцієвого набухання ізольованих мітохондрій

Важливе значення для функціонування МХ та підтримання їхньої цілісності є регулювання об'єму матриксу, що в свою чергу впливає на інтенсивність дихання та рівень продукування АТР. Зміни геометрії МХ відображають зміни генерації АФК, поляризації ВММ. Набухання МХ є не лише кінцевою стадією їхньої дисфункції, але й відіграє ключову роль в біохімічних механізмах ушкодження клітини.

В досліджах *in vitro* на суспензії ізольованих МХ використовують доволі різноманітні підходи для ініціації набухання органел: пермеабілізація ВММ антибіотиками, навантаження матриксу Ca^{2+} за присутності Ca^{2+} -іонофора А-23187, індукція неспецифічної проникності мембрани іонами Са та довголанцюговими насиченими жирними кислотами тощо [63, 239]. Нами запропоновано ще один модельний підхід для ініціації зростання неспецифічної проникності ВММ та збільшення об'єму матрикса – використання іонів Са у надвисоких (десятки мМ) концентраціях. З нашої точки зору, – це менш інвазійна і деструктивна модель набухання ізольованих МХ *in vitro*. Зокрема, в ній не застосовуються перфорація внутрішньої мембрани та значна хімічна модифікація ліпідного бішару.

Для оцінки змін характеристичних розмірів (об'єму) органел був використаний раніше нами вже апробований метод фотонної кореляційної спектроскопії. Встановлено, що ГД МХ знаходився в діапазоні від 500 до 700 нм із середнім значенням 550 ± 20 нм ($n=5$), що узгоджується з результатами електронної мікроскопії.

За відсутності в середовищі Ca^{2+} статистично значущого збільшення об'єму ізольованих органел не спостерігається протягом 10 хвилинних спостережень як в сахарозному робочому розчині (рис. 3.3.25), так і за присутності фізіологічних концентрацій K^+ . Протягом 10 хв процес набухання, ініційований 20 мМ Ca^{2+} , досягав стаціонарного стану (рис. 3.3.25). Суттєве збільшення об'єму МХ зафіксоване лише в середовищі, яке містило 15-25 мМ Ca^{2+} (табли-

ця 3.3.1) за відсутності $MgATP^{2-}$ (обов'язкова умова).

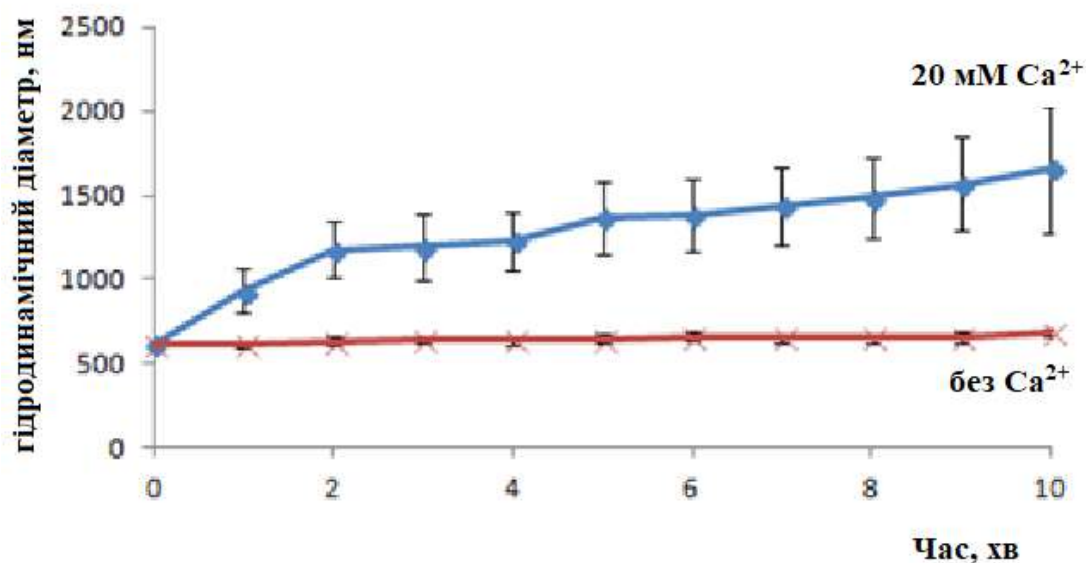


Рис. 3.3.25. Динаміка індукованого 20 мМ Ca^{2+} набухання мітохондрій в сахарозному середовищі; $M \pm t$, $n=5$

Збільшення ГД виявилось залежним від концентрації Ca^{2+} : зміни останньої від 0 до 25 мМ супроводжувались суттєвим зростанням характеристичних розмірів органел, також мало місце насичення за концентрацією катіону. Бар'єрна функція ВММ настільки потужна, що навіть 10 мМ Ca^{2+} майже не викликає збільшення ГД (таблиця 3.3.1). В концентраціях 15-25 мМ іони Са викликають зростання ГД навіть більше ніж в присутності класичного каналотворюючого антибіотика аламетицина [239] як за присутності, так і відсутності комплексу $MgATP^{2-}$.

Таблиця 3.3.1. Набухання мітохондрій, спричинене екзогенним Ca^{2+} у різних концентраціях, у сахарозному середовищі

Ca^{2+} , мМ	0	10	15	20	25	Аламетицин, без $MgATP^{2-}$	Аламетицин, з $MgATP^{2-}$
ГД, нм	646±27	780±32	968±194*	1231±167*	1240±217*	795±10*	974±9*
n=	7	6	5	4	6	5	5

$M \pm t$, * - зміни вірогідні відносно дослідів із 0 мМ Ca^{2+} ($p < 0,05$).

RuR (10 мкМ) – барвник, який взаємодіє з мукополісахаридами та сіаловими кислотами біомембран [153, 464] і розглядається як інгібітор Ca^{2+} -транспортувальних шляхів ВММ [381, 389], ефективно пригнічував процес набухання в середовищі як із сахарозою, так і хлоридом калію, за умови дії 20 мМ Ca^{2+} (рис. 3.3.26). В останньому випадку набухання було більш вираженим.

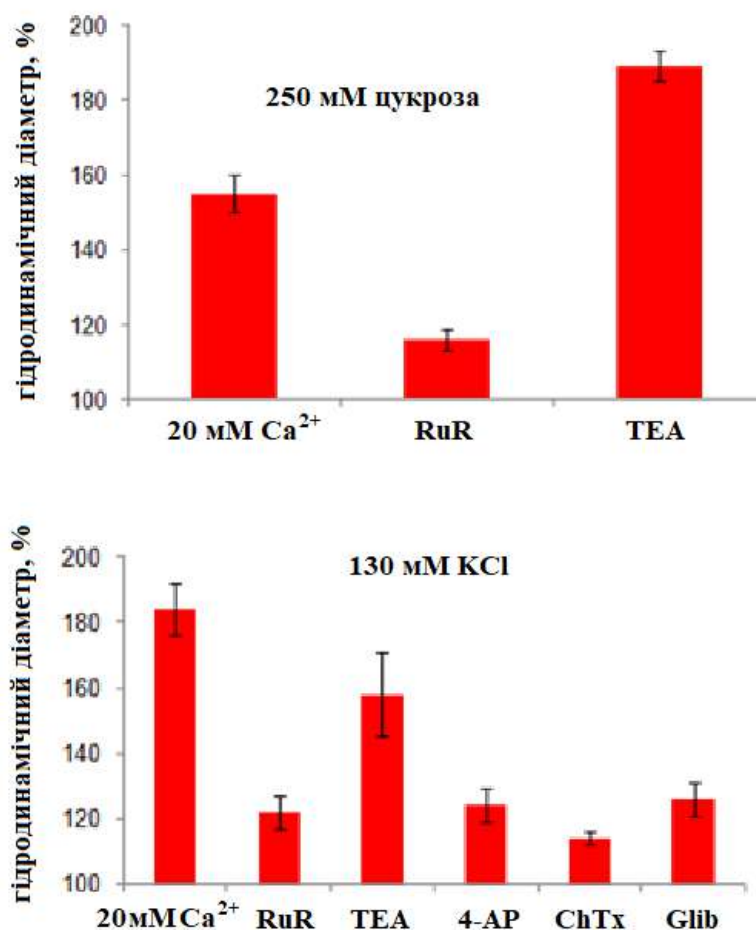


Рис. 3.3.26. Індуковані Ca^{2+} у надвисоких концентраціях (20 мМ) зміни гідродинамічного діаметру ізолюваних мітохондрій за присутності рутенієвого червоного та інгібіторів K^+ -каналів. Верхня панель – сахарозне середовище, нижня панель – середовище містить хлорид калію. За 100 % прийнято об'єм мітохондрій як середнє значення за 10 хв вимірювань до внесення Ca^{2+} . Контрольний стовпчик – набухання, індуковане іонами Ca . Концентрації діючих речовин: 10 мкМ RuR (рутенієвий червоний), 1 мМ TEA (тетраетиламоній), 1 мМ 4-AP (4-амінопіридин), 20 нМ ChTx (харібдотоксин), 20 мкМ Glib (глібенкламід); $M \pm m$, $n = 5$. Всі зміни вірогідні відносно контролю ($p \leq 0,05$)

Очевидно, що зростання ГД пов'язане не лише із надходженням Ca^{2+} до МХ крізь Ca^{2+} -уніпортер, оскільки не тільки не стимулюється, а й ефективно пригнічується за присутності комплексу MgATP^{2-} , який сприяє електрофорети-

чному накопиченню Ca^{2+} МХ (рис. 3.3.27, Б). Відомо, що RuR не є достатньо селективним інгібітором саме Ca^{2+} -уніпортеру, а впливає також на інші Ca^{2+} -транспортувальні системи МХ [381, 389] і навіть на Ca^{2+} -канали ER [250]. Ця особливість пов'язана, можливо, із неспецифічною модифікацією субклітинних мембранних структур. Отже, посилення набухання МХ за дії екзогенних надвисоких концентрацій іонів Са ми пояснюємо зростанням неспецифічної проникності внутрішньої мембрани органел до дії цього катіону із послідуочим зростанням його концентрації в матриксі.

Припущення щодо можливої ролі K^+ -проникності ВММ у механізмах зростання ГД органел у гіперкальцієвому середовищі спонукали нас до вивчення впливу відомих блокаторів K^+ -каналів на процес набухання. Через відсутність достатньої концентрації K^+ (варіант дослідів із сахарозним середовищем), відомий неселективний інгібітор K^+ -каналів 1 мМ тетраетиламоній не перешкоджає набухання органел (рис. 3.3.26, верхня панель). За наявності фізіологічної концентрації K^+ (130 мМ), що є передумовою функціональної активності K^+ -каналів МХ, зростання ГД під впливом 20 мМ Ca^{2+} є більш суттєвим, ніж в сахарозному середовищі (рис. 3.3.26, нижня панель).

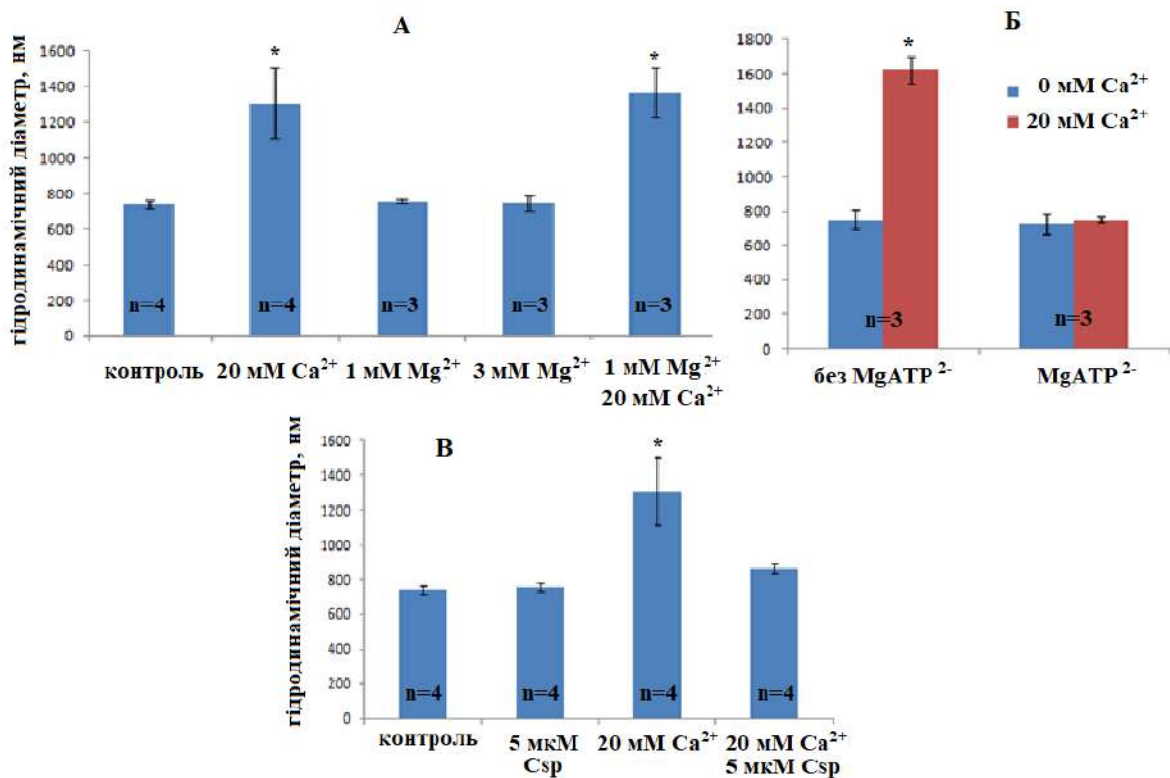


Рис. 3.3.27. Залежність індукованого 20 мМ Ca^{2+} набухання мітохондрій від наявності в середовищі Mg^{2+} (А), MgATP^{2-} (Б) та циклоспорину (Csp) (В). $M \pm m$,

$n=3-4$, * - $p<0,02$

Це може бути пояснено активацією транспорту K^+ крізь каналні структури в матрикс із наступним порушенням осмотичного балансу МХ за дії Ca^{2+} у надвисоких концентраціях, який, ймовірно, спроможний активувати окремі підтипи K^+ -каналів. Суттєве пригнічення набухання органел (рис. 3.3.26, нижня панель) спостерігається за умов використання неселективних інгібіторів K^+ -каналів тетраетиламонію та 4-амінопіридину (1 мМ), блокатора Ca^{2+} -залежних K^+ -каналів харібдотоксину (20 нМ) та АТР-чутливих K^+ -каналів глібенкламід (20 мкМ).

Створення високої концентрації іонізованого Са в матриксі поряд із низьким рівнем АТР призводять до відкриття РТР і порушення осмотичного балансу між матриксом та позамітохондрійним середовищем [265]. За присутності комплексу $MgATP^{2-}$ (3 мМ, в еквімолярних кількостях Mg^{2+} та ATP^{4-}) в наших умовах проведення експерименту набухання не спостерігається (рис. 3.3.27, Б). Цей результат вказує на те, що в процесі зростання об'єму матриксу задіяні мітохондрійні АТР-чутливі K^+ -канали [16], які, можливо, активуються Ca^{2+} . Нами також показано, що самі по собі іони Mg (1-3 мМ) не чинили впливу на ГД МХ і не захищали органели від набухання (рис. 3.3.27, А). Втім, Ca^{2+} -індуковане зростання об'єму матриксу усувається 5 мкМ Csp (рис. 3.3.27, В), що свідчить про суттєве значення циклоспорин-чутливої РТР в досліджуваному процесі. Ми припускаємо, що механізм Ca^{2+} -залежного набухання МХ включає в себе як активацію K^+ -каналів, так, і в більшому ступені, залучення в процес порушення осмотичної рівноваги РТР.

Одержані результати свідчать про можливість залучення в набухання МХ за дії екзогенного Ca^{2+} у надвисоких концентраціях різних підтипів K^+ -каналів. Можливо, Ca^{2+} -перевантаження, поряд із пригніченням генерації АТР, призведуть до активації Ca^{2+} - та АТР-чутливих K^+ -каналів МХ, а зростання концентрації іонів К в матриксі, у свою чергу, буде мати внесок у загальний процес порушення осмотичної рівноваги і набухання органел. Дуже важливе значення в досліджуваному процесі належить також циклоспорин-чутливій РТР.

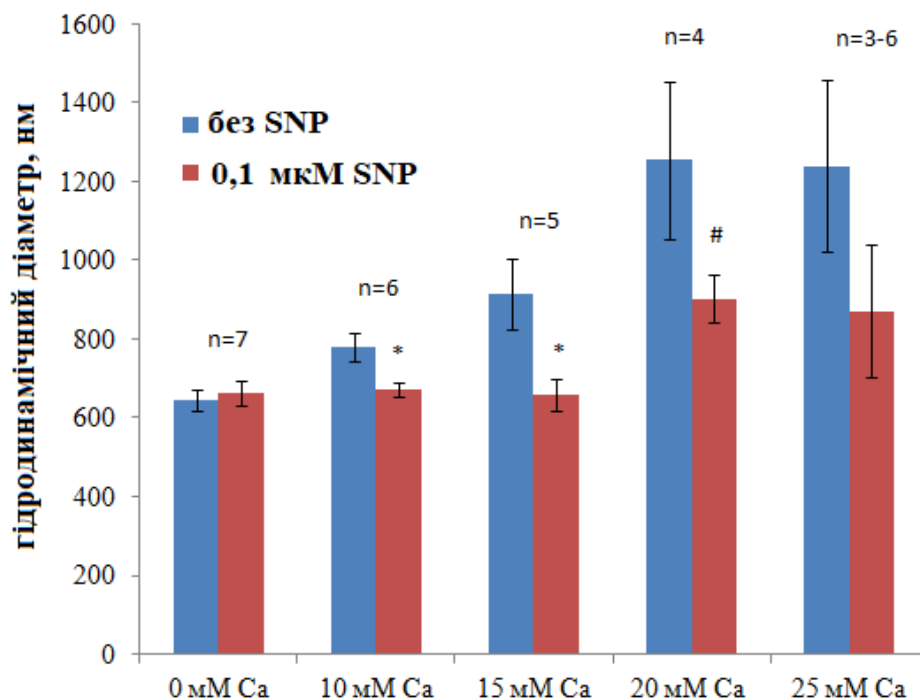


Рис. 3.3.28. Протекторна дія нітропрусиду натрія (SNP) проти висококальцієвого набухання мітохондрій. $M \pm m$, * - $p < 0,02$, # - $p < 0,1$ відносно дослідів із Ca^{2+}

Було виявлено, що SNP в доволі низькій концентрації (0,1 мкМ) ефективно пригнічував Ca^{2+} -залежне набухання МХ (рис. 3.3.28), що може бути пояснено гальмівною дією NO на РТР в міоцитах матки.

Отже, оксид азоту володіє протекторними щодо МХ властивостями: викликає помірне зниження електричного потенціалу на їхній внутрішній мембрані та протидіє процесам набухання, спричиненого гіперкальцієвим розчином.

Важливим явищем, яке тісно пов'язане з контрактильною активністю міоцитів є осморегуляція та осмосигналінг. Зміна об'єму міоцитів може бути інтегральною відповіддю на дію NO – сполуки, що, як було встановлено нами, має напрочуд широкий спектр впливу на ГМК, починаючи від Ca^{2+} -гомеостазу та поляризації субклітинних мембранних структур і закінчуючи клітинною біоенергетикою.

3.3.7. Зміни гідродинамічного діаметру міоцитів за дії нітросполук

Однією з інтегральних характеристик відповіді клітини на вплив значущих для її життєдіяльності факторів є зміна морфології. При цьому можуть за-

знавати модуляції як форма, так і об'єм. Отже, закономірно припустити, що нітросполуки SNP та SN, суттєво змінюючи біохімічні характеристики міометрії, зокрема, перебіг процесів, які регулюють Ca^{2+} -гомеостаз міоплазми та функціонування скоротливих протеїнів, здатні вплинути на морфологію клітин.

Скоротлива активність м'язового волокна супроводжується значними змінами ряду його фізико-хімічних характеристик, передусім електропровідності, осмомолярності міоплазми, її іонної сили та рН, температури, локального тиску, а також лінійних розмірів самого волокна [55, 69]. Водночас, інформація щодо модуляції об'єму міоцитів в процесі контрактильної активності доволі обмежена. З огляду на те, що скорочення м'язу багато в чому визначається структурно-функціональними особливостями окремих м'язових волокон, дослідження змін об'єму міоцитів здатне розширити наші уявлення стосовно клітинних механізмів узгодженої роботи м'язів.

Функціональна активність електрозбудливих клітин, зокрема м'язових, супроводжується суттєвими змінами інтенсивності трансмембранних іонних струмів, які достатні для зміщення осмотичної рівноваги між цитозолем і позаклітинним середовищем, а отже впливають на клітинний об'єм. Наводяться окремі докази кореляції між скоротливою активністю гладенького м'язу та змінами об'єму міоцитів [200]. Можливе існування функціонального зв'язку між об'ємом ГМК та структурами сарколеми, цитоскелетними білками, а також протеїнами контрактильного апарату [243, 306, 319] дозволяє припустити значення осмосигналіngu в регуляції скоротливої активності м'язів. Втім, інформація стосовно впливу речовин, які здатні змінювати контрактильну активність міоцитів на їхній об'єм майже відсутня у доступній нам науковій літературі.

Для вивчення скоротливої функції міоцитів ефективними виявились різноманітні оптичні методи дослідження [103, 197, 319]. Подальша розробка таких підходів дозволить розширити уявлення про механізми функціонування м'язу на клітинному рівні. Контрактильна активність м'язової клітини супроводжується змінами її геометрії [200, 306], що буде впливати на оптичні характеристики клітин у суспензії, зокрема, параметри світлорозсіювання [44, 59], які зручно досліджувати із використанням фотонної кореляційної спектроскопії. В

науковій літературі відсутня інформація стосовно застосування цього методу для оцінки функціонального стану міоцитів. Тому подальші дослідження ми спрямували на вивчення змін ГД свіжовиділених ГМК матки, які знаходяться у суспензії, за дії речовин, що впливають на контрактильну активність, а саме нітросполук (SNP та SN), убаїну, неселективних інгібіторів K^+ -каналів.

Форма міоцитів в суспензії близька до сферичної, що дозволяє використовувати метод фотонної кореляційної спектроскопії для оцінювання зміни їхнього ГД, який в наших експериментах складав 7-10 мкм. Цей результат узгоджується із результатами з використанням суспензії неприкріплених міоцитів, одержаними нами з використанням лазерної конфокальної мікроскопії, в якій були присутні також більші за розмірами утворення та об'єкти нетривіальної геометрії. Переважання об'єктів видовженої форми або складної геометрії унеможливило б коректну реєстрацію автокореляційної функції. Необхідно зазначити, що у складі міометріальної тканини міоцити об'єднані в пучки, формують щільні контакти і, за рахунок рецепторів інтегринів, взаємодіють із білками позаклітинного матриксу [319, 406, 469]. Це вимагає проведення досліджень на міоцитах, одержаних за допомогою протеолітичних ферментів [319].

Таблиця 3.3.2. Вплив модуляторів скоротливої активності на гідродинамічний діаметр міоцитів матки щурів

	0,03 мМ Ca^{2+}	3 мМ Ca^{2+}	10 мкМ A23187	1 мМ 4-AP	1 мМ TEA	50 мкМ убаїн
ГД міоцитів, мкм	10,5±0,9	8,7±0,4*	7,3±0,5 [#]	7,5±0,5 [#]	6,8±0,1 [#]	11,3±1 [#]

* $p < 0,05$ по відношенню до гіпокальцієвого середовища (0,03 мМ Ca^{2+}),

[#] $p < 0,05$ по відношенню до середовища з 3 мМ Ca^{2+}

Вивчали вплив окремих модуляторів скоротливої активності міометрія, дія яких надійно тестована в тензометричних дослідженнях, на розміри міоцитів (таблиця 3.3.2). Встановили, що додавання іонів Ca^{2+} (~3 мМ) до суспензії міоцитів, які були передінкубовані в гіпокальцієвому фізіологічному розчині, приводило до зменшення об'єму клітин, що відповідає уявленням про „базаль-

ний” вхід катіону в ГМК [278] і підвищення контрактильної активності матки у разі заміни гіпокальцієвого на нормальне середовище. Наявність в середовищі Ca^{2+} -іонофору А-23187 викликала суттєве зменшення ГД, причиною якого може бути зміна геометрії міоцитів, індукована масованим входом Ca^{2+} з позаклітинного середовища і активацією скоротливого апарату. Інгібітори K^+ -каналів, зокрема в міометрії, ТЕА та 4-АР [123], знижували об'єм ГМК, що знаходиться у відповідності із стимуляцією цими речовинами транспорту Ca^{2+} в клітини внаслідок їхньої деполяризуючої дії на ПМ із подальшою активацією актоміозинового комплексу. Специфічний інгібітор Na^+, K^+ -АТРази убаїн спричинював зростання ГД міоцитів, що корелює із результатами тензометричних досліджень, де убаїн знижував скоротливу активність смужок гладенького м'язу [73]. Аналіз конкретного випадку розподілу ГД свідчить, що зростання концентрації Ca^{2+} в середовищі до 3 мМ призводить як до зниження кількості крупних об'єктів в суспензії, так і до появи більш дрібних, що може бути наслідком зменшення об'єму міоцитів.

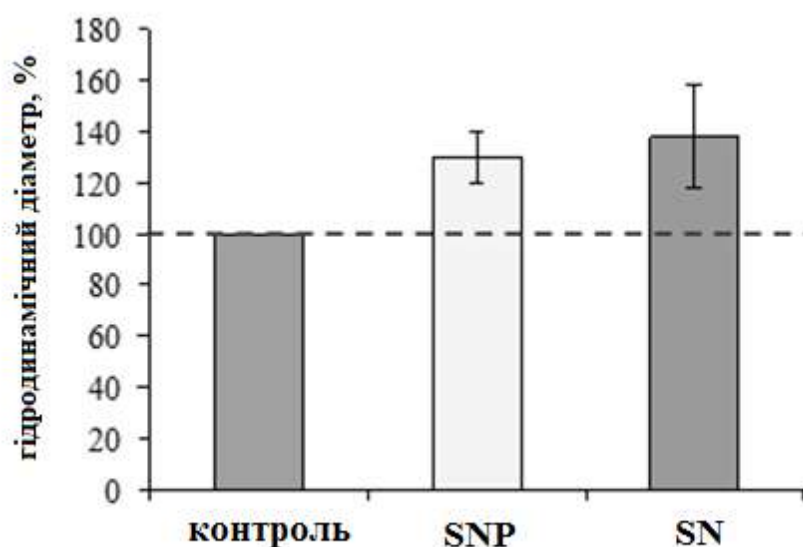


Рис. 3.3.29. Зміни характеристичних розмірів міоцитів за дії нітросполук (0,1 мМ). $M \pm m$, $n=5$

Описані результати є підставою використати фотонну кореляційну спектроскопію для оцінки впливу нітросполук на розміри міоцитів. Було встановлено, що за використання NPS, NS у концентраціях 0,1 мМ найбільш вірогідні

значення ГД міоцитів зростали по відношенню до контролю в середньому на 30 % та 38 % відповідно (рис. 3.3.29). Одержані нами результати стосовно зростання ГД позитивно корелюють зі здатністю нітросполук викликати релаксацію ГМК. Отже, дослідження фізіологічної відповіді міоцитів в суспензії, виконані із використанням фотонної кореляційної спектроскопії, можуть доповнити результати, одержані іншими методами.

Згідно результатів конфокальної зйомки, вплив досліджуваних речовин на об'єм міоцитів важко інтерпретувати як процеси вкорочення-подовження клітин. Зміни ГД, які ми спостерігали, можуть бути пояснені перебудовою цитоскелету за дії речовин-модуляторів скоротливої активності, дія яких супроводжується виникненням як евагінацій, так і інвагінацій поверхні міоцитів [306, 319]. Не викликає сумніву, що впливи, які змінюють активність контрактильного апарату клітин міометрія, можуть привести до відповідних змін в їхній морфології. Тому при інтерпретації одержаних нами результатів слід також враховувати факт взаємодії актинових філаментів із ПМ в ГМК [243]. Наприклад, показано, що скорочення ГМК матки вагітних жінок супроводжується зменшенням об'єму міоцитів. Відомо існування зв'язку між СГ-каналами ПМ, які регулюються змінами клітинного об'єму, та скоротливою активністю [200].

Таким чином, нітросполуки, релаксуючий вплив яких на ГМК надійно зареєстрований в фізіологічних експериментах, викликали зростання об'єму міоцитів.

Узагальнення та обговорення результатів підрозділу 3.3.

Принципове значення змін електричного потенціалу ПМ в процесах регуляції транспорту Ca^{2+} , скоротливої активності і виникнення тимчасової незбудливості на фоні підвищеного вмісту оксиду азоту в міометрії, який тестують за вагітності, вимагає розробки методичного підходу для дослідження рівня поляризації плазмалеми міоцитів. Використання флуоресцентного потенціал чутливого зонду $\text{DiOC}_6(3)$ та методу протокової цитометрії дає змогу вивчати та аналізувати зміни електричного потенціалу ПМ цілісних міоцитів в умовах деполаризації ВММ (передінкубація клітин з NaN_3 або СССР).

Зростання електричного потенціалу на ПМ за дії оксиду азоту в ГМК судин та матки може бути обумовлено активацією VK_{Ca} -каналів, яке пов'язує з нітрозилуванням тільних залишків протеїнів, що утворюють канал, або РК А/РК G-опосередкованими шляхами [95, 123-124, 261, 286]. Наші дослідження показали, що в ГМК матки поляризує ефект оксиду азоту обумовлений зростанням K^+ -проникності плазмалеми і залежить від іонів Ca. Це дозволяє припустити, що він пов'язаний саме із активацією K_{Ca} -каналів. Локальне субсарколемне зростання концентрації Ca^{2+} може бути обумовлене тимчасовим пригніченням оксидом азоту РМСА. Збільшення K^+ -проникності ПМ за умови спокою міоцитів може виступати важливим Ca^{2+} , NO-залежним фактором підтримання відносної незбудливості міометрія в період вагітності. Зростання електричного потенціалу на ПМ за дії нітросполук пояснюється також зареєстрованим нами cGMP-залежним стимулюванням активності Na^+, K^+ -АТРази.

З використанням потенціалчутливого зонду $DiOC_3(6)$ та методу лазерної конфокальної мікроскопії продемонстровано помірне зниження електричного потенціалу мітохондрійної мембрани за дії оксиду азоту в умовах деполаризуючої дії убаїну. Зниження потенціалу на ВММ може мати значення для потенціалзалежних процесів транспорту іонів через мембрану, змінюючи активність Ca^{2+} -уніпортеру, обмінників, транслокаторів тощо. Оскільки рушійною силою електрофоретичного транспорту Ca^{2+} в МХ є рівень електричного потенціалу на ВММ, необхідно пояснити зареєстроване нами за дії SNP та SN посилення акумуляції катіону органелами на фоні помірного зниження трансмембранного потенціалу під впливом оксиду азоту. Вірогідно, мішенню дії нітросполук виступають функціонально важливі тільні групи Ca^{2+} -уніпортеру, нітрозилування яких супроводжується зростанням енергозалежного транспорту Ca^{2+} . Водночас, за цих умов рушійна сила електрофоретичної акумуляції лишається цілком достатньою для ефективного накопичення катіону. Відсутність чіткої кореляції між впливом SNP та SN на поляризацію ВММ й рівнем стимуляції зазначеними сполуками накопичення Ca^{2+} органелами є підтвердженням висунутої гіпотези. З іншого боку, помірний деполаризуючий ефект нітросполук може бути наслідком початкового посилення транспорту Ca^{2+} (позитивно заряджених іонів) крізь

ВММ. Спричинене цим зростання концентрації Ca^{2+} в матриксі буде супроводжуватись інтенсифікацією роботи ЕТЛ і відновленням рівня поляризації мембрани. До аналогічного наслідку призведе і активація електрогенного H^+ - Ca^{2+} -обмінника МХ, який, згідно наших результатів, здійснюється у стехіометрії 1:1. Поряд з цим, зростання концентрації іонів Са в МХ супроводжується стимуляцією Ca^{2+} -залежного синтезу ними NO. Отже, транспорт Ca^{2+} в МХ, зміни мембранного потенціалу їхньої внутрішньої мембрани та біосинтез NO є взаємокоркованими процесами. Зниження електричного потенціалу на ВММ за дії NO може захищати МХ від гіперполяризації і відповідного посилення транспорту Са в матрикс та гіперпродукції АФК.

Функціональна активність *I-IV* комплексів ЕТЛ забезпечує підтримання електрохімічного потенціалу на внутрішній мембрані МХ (біля -180 мВ). Для вивчення механізмів, які задіяні у зменшенні поляризації мембрани МХ при дії оксиду азоту, нами була відпрацьована методика тестування активності комплексів ЕТЛ за змінами аутофлуоресценції аденінових нуклеотидів NADH та FAD. За нормального функціонування ЕТЛ МХ показано реципрокність змін флуоресценції піридинового та флавінового нуклеотидів у присутності субстратів *I* та *II* комплексів: флуоресцентний сигнал від NADH знижується, а від FAD – зростає, що може бути тестом ефективності функціонування ЕТЛ. Нами виявлена відповідність між змінами флуоресценції NADH та FAD (їхнім редокс-станом) і функціонуванням окремих комплексів ЕТЛ ВММ. За отриманими результатами оксид азоту знижує інтенсивність окиснення FADH_2 в ЕТЛ, що може бути причиною помірною зменшення потенціалу на ВММ, а також протидією Ca^{2+} -перенавантаженню органел. Оксид азоту, що синтезується МХ, та його донори не викликають змін об'єму органел.

Нами запропоновано модель неінвазивного набухання МХ надвисокими нефізіологічними концентраціями Ca^{2+} , яке супроводжується активацією АТР-чутливих та/або Ca^{2+} -залежних K^+ -каналів і РТР та призводить до порушення осмотичної рівноваги між матриксом та позамітохондрійним середовищем. Показано, що SNP в субмікромолярних концентраціях протектує МХ від набухан-

ня спричиненого надвисокими концентраціями Ca^{2+} , скоріше за все через пригнічення відкриття РТР.

Одержані результати підтверджують факт впливу оксиду азоту на Ca^{2+} -гомеостаз та шляхи підвищення іонів Са в міоплазмі у разі дії на міоцити фізіологічно значущих агоністів – карбахолу та окситоцину. Поряд з цим донори оксиду азоту SNP та SN викликали збільшення характеристичних розмірів міоцитів, що корелює з даними літератури про здатність NO викликати релаксацію ГМК.

Електричний потенціал на ВММ є інтегральним показником активності ЕТЛ, основним регулятором метаболічних та транспортних процесів в МХ. Слід очікувати, що сполуки, які модулюють електричний потенціал цих органел, зокрема оксид азоту або інгібітори дихального ланцюга, будуть впливати на фундаментальні показники функціонування МХ: концентрацію Ca^{2+} в матриксі, ефективність окислення аденінових нуклеотидів, інтенсивність генерації АФК та об'єм (ГД) органел. Можливість одночасного моделювання цих процесів важливе для розуміння функціонування МХ як цілісної системи і дасть змогу передбачити наслідки порушення окремих компонентів ЕТЛ для біоенергетики, Ca^{2+} -гомеостазу та запрограмованої клітинної смерті.

Формалізація і узагальнення експериментальних результатів та пошук відповідності між теоретичними передбаченнями та реальними експериментальними даними вимагають застосування імітаційного моделювання. Сучасним варіантом такого підходу є використання математичного апарату моделювання станів динамічних систем з можливістю їх структурного відображення, кількісного аналізу, спроможністю враховувати активуючі/інгібуючі ефекти, а саме функціональних гібридних мереж Петрі.

Результати опубліковані [25-26, 35-37, 39, 176, 178, 182, 189].

РОЗДІЛ 3.4. ІМІТАЦІЙНЕ МОДЕЛЮВАННЯ БІОЕНЕРГЕТИЧНИХ ПРОЦЕСІВ У МІТОХОНДРІЯХ ЗА ДІЇ АЗИДУ НАТРІЯ ЯК НЕПРЯМОГО ДОНОРА NO

3.4.1. Використання методології мереж Петрі для імітаційного моделювання функціональної активності електрон-транспортного ланцюга та об'єму мітохондрій

Карл Адам Петрі вперше запропонував використати систему мереж Петрі як засіб моделювання дискретних процесів [360]. Протягом наступних 30 років мережі Петрі використовувалися переважно для моделювання дискретних систем, автоматичного контролю та технологічних процесів. Перші спроби моделювання біологічних процесів апаратом мереж Петрі були зроблені лише на початку 90-х років ХХ століття [376]. Складність біологічних систем привела до появи більш гнучких мереж Петрі - гібридних мереж Петрі. Найважливішим удосконаленням була здатність працювати з безперервними позиціями та переходами в складних системах [87]. Гібридні мережі Петрі використовувалися для моделювання взаємодій між регуляторами та шляхами передачі сигналу в нейронах [357], перебігу метаболічних реакцій тощо [246]. Пізніше більш ефективна модифікація цього методу отримала назву гібридні функціональні мережі Петрі [202, 308], в якій було визначено зміст, положення, швидкості переходів між компонентами системи, інші незалежні параметри мережі. Цей уніфікований пристрій імітації (або симулювання) дозволив його використання для моделювання не тільки традиційних метаболічних шляхів, регуляції генів [272], але також і для вивчення динаміки функціонування іонних каналів [426]. За допомогою даного методу продемонстровано поведінку нейронної системи, де враховуються біохімічні та електрофізіологічні процеси [427].






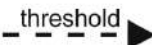



Перевагами гібридних функціональних мереж Петрі, як засобу моделювання, є [465]:

1. Можливість структурного відображення станів системи, яка моделюється, та процесів, що відбуваються в системі.

2. Кількісне моделювання станів та процесів трьох видів одночасно: дискретного (discrete), безперервного (continuous) та асоціативного (утворюючого) (generic).

3. Спроможність врахувати активуючі, інгібувальні та каталітичні ефекти за допомогою зв'язків спеціального типу.

Табл. 3.4.1. Головні структурні елементи гібридної функціональної мережі Петрі (пояснення в тексті).

Type	Places	Transitions	Label	Arcs
Discrete	 integer Discrete place	 delay Discrete transition	Normal	 threshold Normal arc
Continuous	 real number Continuous place	 rate Continuous transition	Test	 threshold Test arc
Generic	 any types Generic place	 any operation Generic transition	Inhibitory	 threshold Inhibitory arc

Як засіб моделювання нами було обрано програмне середовище Cell Illustrator v.3 (Human Genome Center, University of Tokyo, Japan), в якому базовим апаратом є гібридні функціональні мережі Петрі [328]. Мережа Петрі представляє собою орієнтований дводольний граф з двома типами вершин (Табл. 3.4.1): позиціями (places) і переходами (transitions), які з'єднані стрілками (arcs), що відображують структуру мережі. Позиції, як правило, характеризують об'єкти, елементи, ресурси системи, що моделюється, переходи – процеси, які відбуваються у системі, логічні умови їх здійснення.

В наших дослідженнях на ізольованих МХ міометрія щурів (див. розділ 3.3.5) продемонстровано, що зміни редокс-стану аденінових нуклеотидів NADH/FADH₂ можуть виступати біомаркером функціональної активності комплексів дихального ланцюга. В той же час регулювання об'єму матриксу має важливе значення для функціонування МХ та підтримання їхньої цілісності, адже зміни об'єму органел впливають на інтенсивність дихання та рівень продукування АТФ, генерацію АФК, поляризацію ВММ тощо. Тому метою цього етапу досліджень було створити імітаційну модель із застосуванням методології

гібридних функціональних мереж Петрі одночасних змін флуоресценції NADH/FAD та набухання ізольованих МХ міометрія, зокрема за дії нітросполук.

Інгібітор IV комплексу ЕТЛ азид натрію широко застосовується як інструмент для інгібування окисного фосфорилування і транспорту Ca^{2+} в МХ. З літератури відомо, що азид натрію може виступати “непрямим донором” NO [82]. В водних розчинах він розкладається з утворенням азотисто-водневої кислоти, гідроксиламіну та, можливо, продукує окисли азоту, які є активними, з біологічної точки зору, формами азоту.

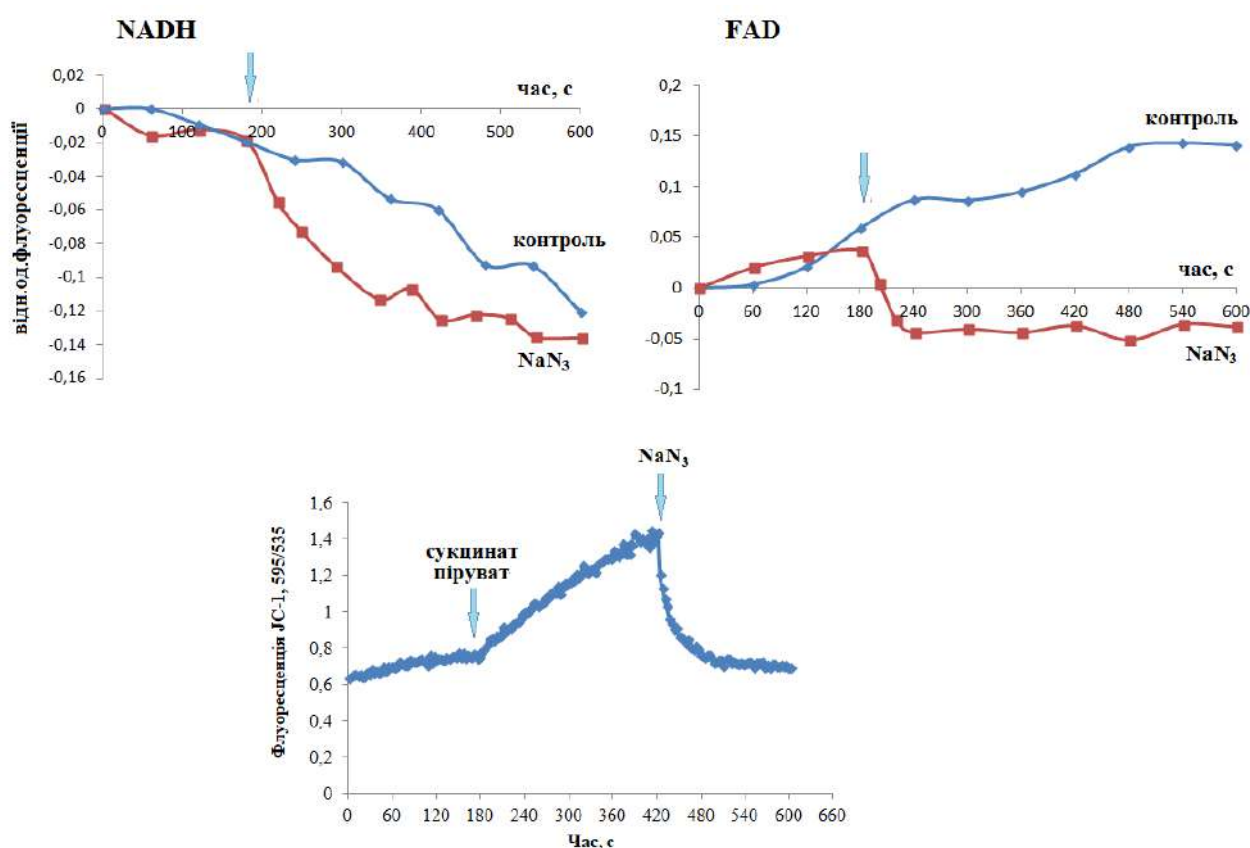


Рис. 3.4.1. Вплив азиду натрію (5 мМ) на флуоресценцію NADH та FAD, а також електричний потенціал (потенціал чутливий зонд JC-1) в ізольованих мітохондріях, $n=5$. Дані типових експериментів

Нами показано, що азид натрію (5 мМ), на відміну від ціаніду (рис. 3.3.20), викликав більш інтенсивне зниження флуоресценції від NADH порівняно з контролем, а також зростання вмісту FADH_2 (рис. 3.4.1, верхня панель), що свідчить про блокування переносу електронів від сукцината на убіхінон, а також зниження електричного потенціалу на ВММ (рис. 3.4.1, нижня панель). В даному випадку дія азиду натрію була аналогічною до ефектів SNP та SN, а та-

кож безпосередньо NO за умови стимуляції його синтезу Ca^{2+} та L-аргініном (див. розділ 3.3.5, рис. 3.3.23).

Крім того, азид натрія викликає зростання ГД МХ в часі (рис. 3.4.2).

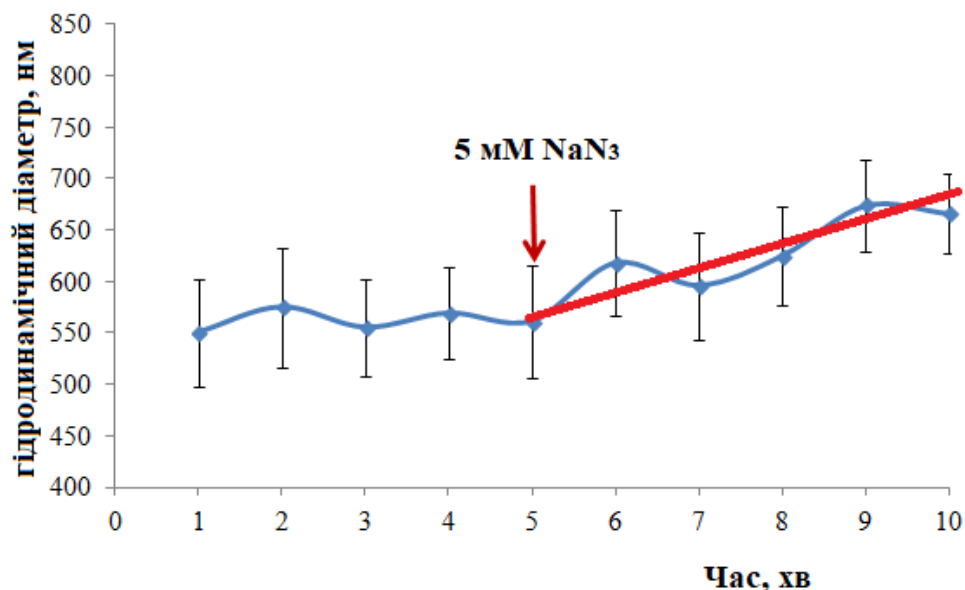


Рис. 3.4.2. Збільшення гідродинамічного діаметра мітохондрій за дії азиду натрія. 0-5 хвилини – стабілізація препарату мітохондрій. $M \pm m$, $n=5$

На рисунку 3.4.3 представлено модель МХ в термінах мереж Петрі. На основі аналізу літературних та власних експериментальних даних в модель закладено структури (комплекси), що відображають ЕТЛ. Процес окиснення NADH та FADH_2 , який ми реєструємо на спектрофлуориметрі за зміною їхньої флуоресценції, відображає створення та підтримання потенціалу на мітохондрійній мембрані. В модель включено компоненти інкубаційного середовища (H_2O , KCl, сукцинат, піруват) та активатори мітохондрійного набухання (аламетицин, протоніофор CCCP, нітросполуки, в даному випадку азид натрія). Модель враховує наступні характеристики функціонування МХ: 1) сукцинат та піруват в інкубаційному середовищі забезпечують енергізований стан МХ, 2) азид натрія (NO_x) знижує флуоресценцію NADH та FAD, що реєструється методом спектрофлуориметрії, 3) інгібування дихального ланцюга азидом призводить до зростання ГД органел внаслідок порушення осмотичного балансу між матриксом та позамітохондрійним середовищем (шляхом активації калієвих каналів та РТР), транспортом молекул H_2O в матрикс та зростанням харак-

теристичних розмірів органел (реєструємо методом фотонної кореляційної спектроскопії).

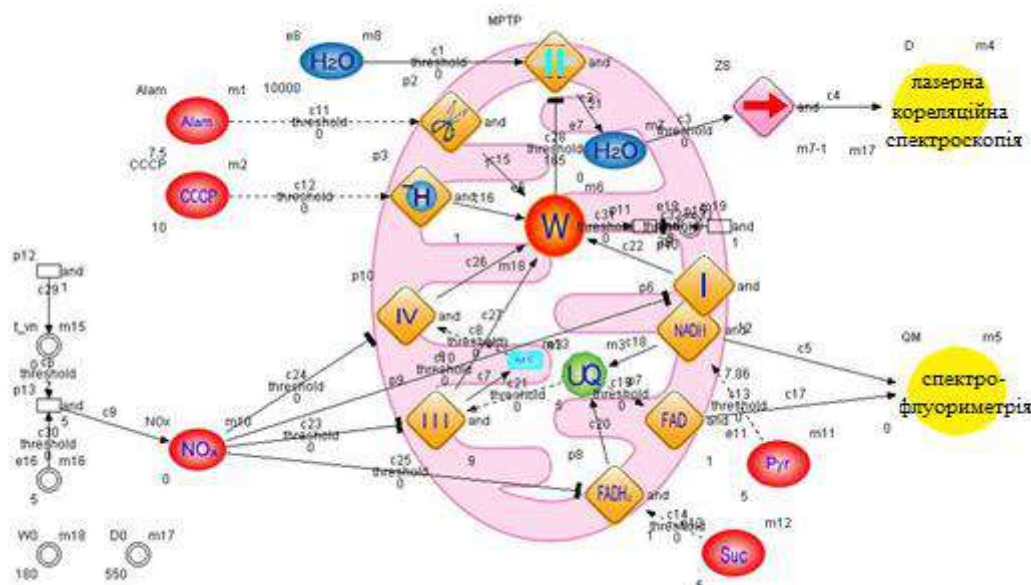


Рис. 3.4.3. Структура гібридних функціональних мереж Петрі, які симулюють ефекти азиду натрія на одночасні зміни гідродинамічного діаметру та флуоресценції в ізолюваних мітохондріях міометрія.

Символи на схемі: NO_x – нітросполуки, в даному випадку азид натрія; Suc – сукцинат натрія; Pyr – піруват натрія; W – електричний потенціал внутрішньої мембрани; I, II, III, IV так само як $FADH_2, FAD, NADH$ (вписані в ромби мітохондрійної мембрани) – комплекси ЕТЛ з відповідними кофакторами; $Alam$ – аламетицин; $CCCP$ – карбоніл ціанід 3-хлорофенілгідразон; UQ - убіхінон; $cytC$ – цитохром C; символ $-|/|$ в середині ромба – циклоспорін-чутлива пора перехідної провідності, PTR ; стрілки: \rightarrow - процес активації, \vdash - процес інгібування

В процесі моделювання нами отримані математичні рівняння, що формалізують одночасні процес набухання МХ та зміни флуоресценції $NADH/FAD$ в середовищі з додаванням азиду натрія. Ці рівняння адекватно описують часові залежності зниження флуоресценції нуклеотидів (рис.3.4.1) та набухання МХ (рис. 3.4.2).

В представленій вище моделі часові залежності усереднених змін ГД та флуоресцентної відповіді від $NADH$ та FAD були апроксимовані поліномами із ступенем n , де $n \leq 4$:

$$X = a_n t^n + \dots + a_2 t^2 + a_1 t + a_0 \quad (1)$$

Значення модельних коефіцієнтів a_i , отриманих як результат змін ГД та флуоресценції від NADH та FAD, що апроксимуються відповідно до рис. 3.4.1 та рис. 3.4.2, надані в таблиці 3.4.2.

Таблиця 3.4.2. Значення модельних коефіцієнтів a_i , одержаних як результат змін гідродинамічного діаметру та флуоресцентної відповіді від аденінових нуклеотидів

Коефіцієнт		a_4	a_3	a_2	a_1	a_0	
ГД	ГД	-	2,48	44,84	303,60	650	
	ГД'	-	-	7,43	89,68	303,60	
N A D H	контроль	δ NADH	-	-	-7,2E-04	-3,6E-03	0,001
		δ' NADH	-	-	-	-14,4E-04	-10,8E-03
	NaN ₃	δ NADH	1,17E-04	-4,32E-03	3,6E-02	-0,24	0,41
		δ' NADH	-	4,72E-04	-1,3E-02	7,2E-02	-0,24
F A D	контроль	δ FAD	-	-	-7,2E-04	-	-0,01
		δ' FAD	-	-	-	-1,44E-03	-
	NaN ₃	δ FAD	-	-	-	-0,06	0,284
		3-4 хв/4-10 хв	-	-	-	6E-04	-0,045
NaN ₃	δ' FAD	-	-	-	-	-0,06	
	3-4 хв/4-10 хв	-	-	-	-	0	

Проникність РТР та інтенсивність флуоресцентної відповіді NADH (FAD) є похідними часу від відповідних залежностей. Рядки позначені символом (') складаються з модельних коефіцієнтів, які дозволяють імітувати швидкість процесів у переходах РТР, NADH і FAD у розглянутій мережі Петрі (рис. 3.4.3).

Наведена модель передбачає одночасні зміни в MX NADH/FAD флуоресценції та їхнього ГД в часі, що дозволяє значно оптимізувати час експериментальних процедур, реагентів та лабораторних тварин. Крім того, вона дозволяє проаналізувати динаміку процесів, порівнювати наслідки моделювання (теоретичні передбачення) з фактичними спостереженнями.

Отже, запропонована модель дозволяє формалізувати та узагальнити експериментальні дані з метою здійснення прогностичної функції, а також пошуку відповідності теоретичними передбаченнями та реальними результатами. Рів-

няння спроможні адекватно описати часові та концентраційні характеристики зазначених процесів та передбачити інтенсивність їхнього протікання (наприклад в умовах змін середовища інкубації).

Тому наступним етапом нашої роботи було здійснити симуляційне моделювання більш складної експериментальної ситуації, а саме одночасних процесів зміни: власної флуоресценції аденінових нуклеотидів МХ, їхнього ГД та інтенсивності генерації ними АФК за умови змін концентрації нітросполук (азиду натрія), які гальмують функціонування ЕТЛ.

3.4.2. Гібридні функціональні мережі Петрі як інструмент одночасної оцінки змін флуоресценції аденінових нуклеотидів, генерації активних форм кисню та набухання ізольованих мітохондрій за дії нітросполук

Відповідно до одержаних результатів ми зробили спробу застосувати методологію гібридних мереж Петрі для оцінки біофізикохімічних параметрів функціональної активності МХ, узагальнити дані та здійснити прогностичні дії щодо відповідності теоретичних передбачень та реальних експериментальних результатів.

Для цього нами досліджено за присутності зростаючих кількостей NaN_3 (1-7 мМ) концентраційно-часові залежності одночасних змін флуоресценції ендогенного NADH, генерації АФК та характеристичних розмірів МХ за реальних експериментальних умов, які поєднують функціональні зміни із структурною репрезентацією цих процесів.

Попередні дослідження показали, що азид натрія в концентрації 5 мМ призводить до зниження окиснення NADH і FADH_2 в ЕТЛ з часом. Але в діапазоні 1-7 мМ NaN_3 не виявив концентраційно-залежних ефектів на флуоресценцію аденінових нуклеотидів (графічні дані не наведено).

Наші експериментальні результати свідчать, що NaN_3 залежно від концентрації (1-3-5-7 мМ) та часу (0-15 хв) посилював DCF-флуоресценцію в МХ, тобто стимулював утворення в них АФК (рис. 3.4.4), а також збільшував їхній ГД (викликав набухання) (рис. 3.4.5).

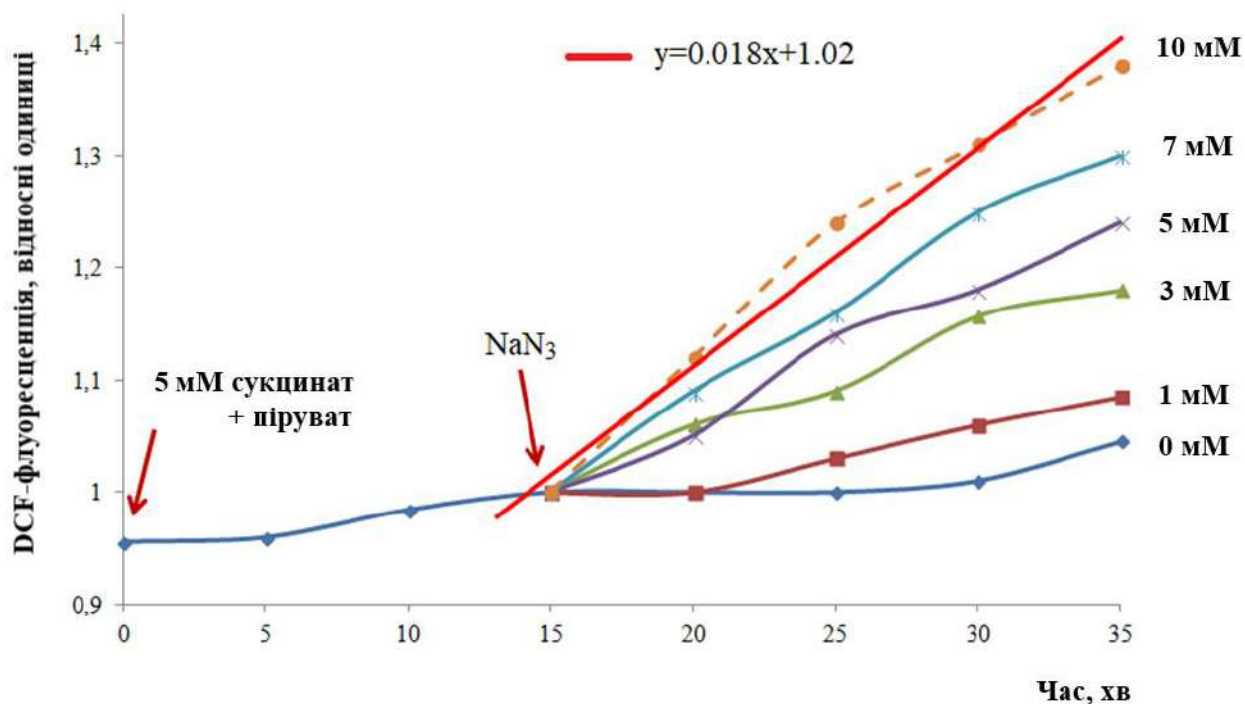


Рис. 3.4.4. Концентраційно-часові залежності змін DCF-флуоресценції за дії NaN_3 в ізольованих мітохондріях. Пряма лінія – теоретично розрахована крива змін DCF-флуоресценції відповідно до рівняння (5) для концентрації азида натрія 10 мМ; -●- та пунктирна крива – експериментально одержана залежність для 10 мМ азида натрія. Результат типового досліду

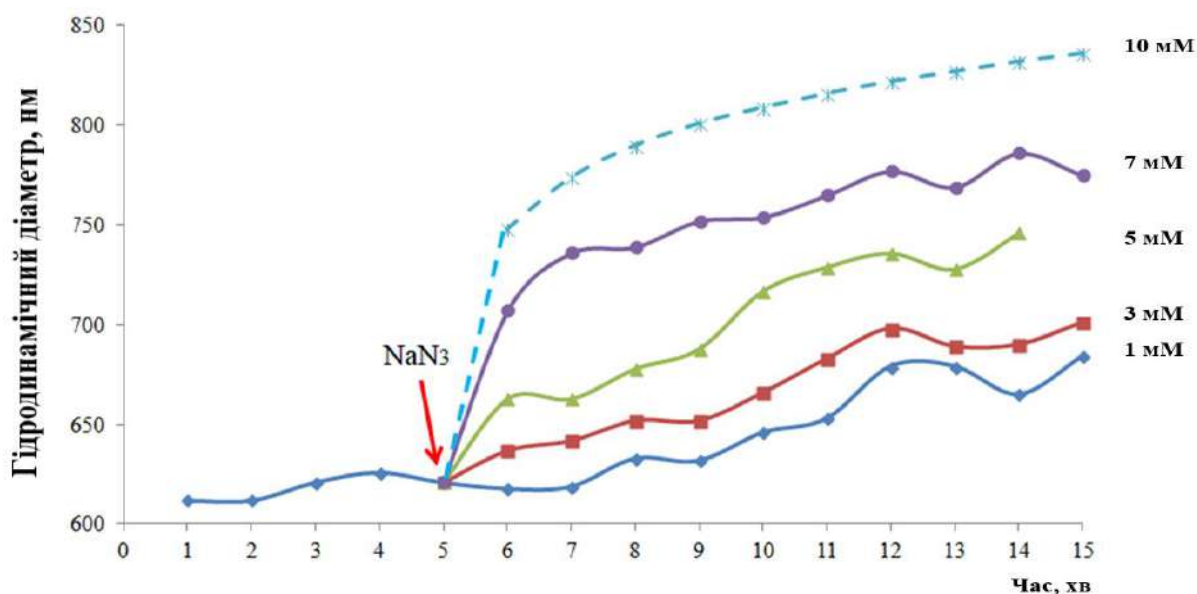


Рис. 3.4.5. Зміни гідродинамічного діаметру мітохондрій за впливу різних концентрацій азиду натрія. -Ж- – крива, яка віддзеркалює вплив 10 мМ азиду натрія теоретично розрахована відповідно до рівняння (6). Результат типового досліду

Інгібування IV комплексу дихального ланцюга призводить до уповільнення функціонування МХ, зменшення електричного ($\Delta\psi$) та хімічного (ΔpH)

потенціалу на внутрішній мембрані, відкриття РТР і набухання МХ. Накопичення в ЕТЛ напіввідновлених компонентів, особливо в Q-циклі, веде до збільшення процесу одноелектронного відновлення кисню з відповідним посиленням генерації супероксид-аніона та інших АФК. Розкладання азиду натрія з утворенням окислів азоту буде супроводжуватись також і посиленням утворенням пероксинітриду. Ці процеси призводять до посилення DCF-флуоресценції та ГД, які спостерігаються в експерименті. Використовуючи функціональні гібридні мережі Петрі, нами змодельовані ефекти азиду натрія на флуоресценцію NADH від часу та часово-концентраційні ефекти NaN_3 на DCF-флуоресценцію і ГД МХ (рис.3.4.6).

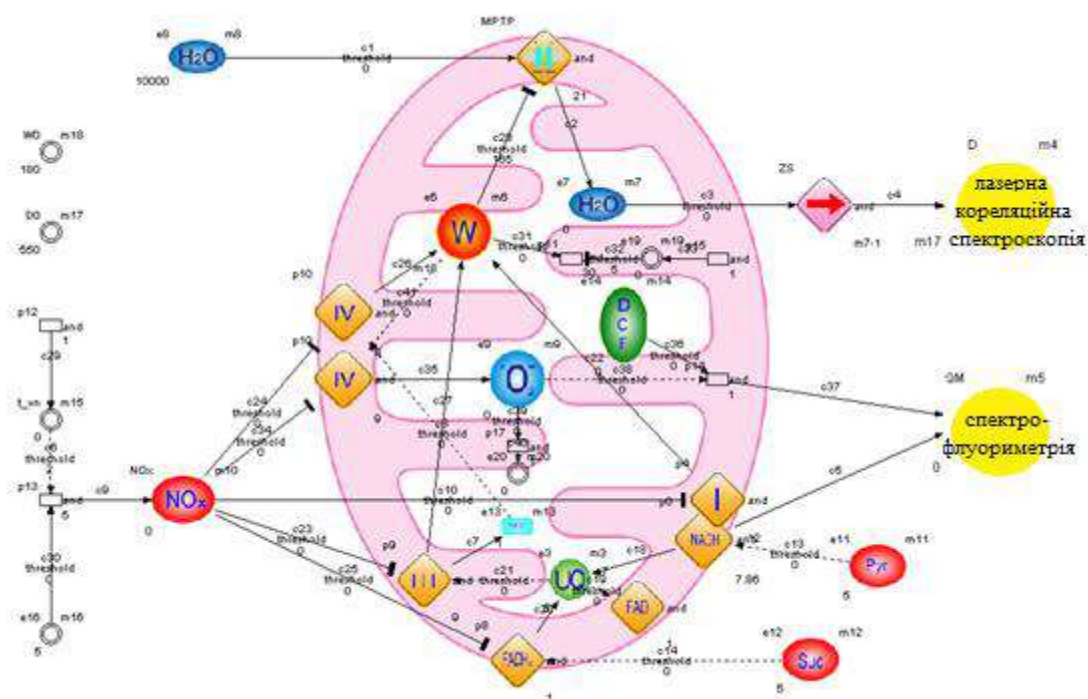


Рис.3.4.6. Структура гібридних функціональних мереж Петрі, які симулюють ефекти азиду натрія на зміни флуоресценції NADH, DCF та гідродинамічного діаметру в мітохондріях.

Символи на схемі: NO_x – нітросполуки, в даному випадку азид натрія; Suc – сукцинат натрія; Prg – піруват натрія; W – електричний потенціал внутрішньої мембрани; I, II, III, IV так само як FADH_2 , FAD, NADH (вписані в ромби мітохондрійної мембрани) – комплекси ЕТЛ з відповідними кофакторами; O_2^- - супероксиданіон; DCF – флуоресценція зонда DCF-DA; UQ - убіхінон; сут С – цитохром С; символ \neg в середині ромба – циклоспорін-чутлива РТР; стрілки: \rightarrow - процес активації, \top - процес інгібування

Модель враховує компоненти інкубаційного середовища та наступні експериментальні факти: 1 – сукцинат та піруват додаються в середовище для енергізації МХ; 2 – азид натрія, як "непрямий донор NO", має інгібувальний вплив на дихальний ланцюг в цілому, але найбільший ефект на морфо-функціональні параметри органел має інгібування I, III та IV комплексів; 3 – інгібування активності ЕТЛ призводить до надпродукції АФК (зокрема, супероксиданіону) в МХ і, як наслідок, до посилення DCF-флуоресценції (пряме інгібування IV комплексу в рамках імітаційної моделі); 4 – інгібування азидом натрія ЕТЛ призводить до зростання ГД МХ внаслідок порушення осмотичного балансу, деполяризації мітохондрійної мембрани, відкриттям РТР, транспортуванням молекул води та набухання органел.

У зв'язку з відсутністю концентраційно-залежних ефектів азиду натрія на флуоресценцію NADH для моделювання ми використали типовий графік часової залежності окиснення нуклеотида (рис.3.4.7).

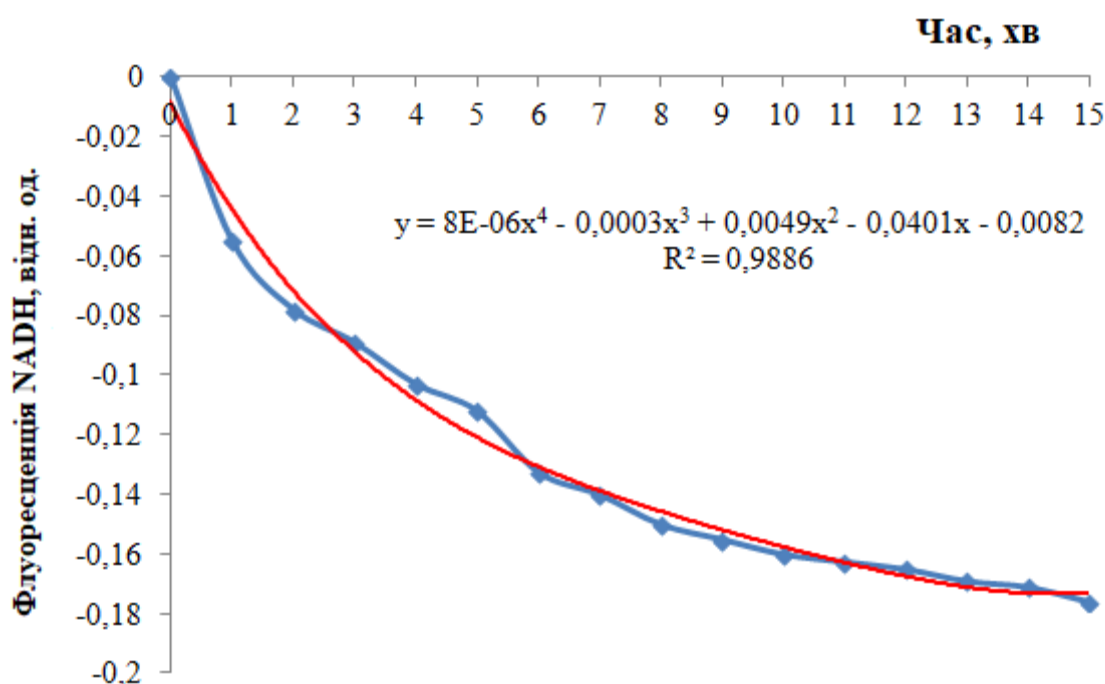


Рис. 3.4.7. Зміни флуоресценції NADH в ізолюваних мітохондріях. Дані типового експеримента та відповідне рівняння апроксимації поліномом

В процесі моделювання нами отримані математичні рівняння, які формалізують процес набухання МХ та зміни флуоресценції NADH/DCF в середовищі з азидом натрію. А саме, ці рівняння адекватно описують часові характеристики

тики набухання МХ (рис.3.4.5) та зміни флуоресценції DCF/NADH (рис. 3.4.4, 3.4.7) одночасно. Проникність РТР та інтенсивність флуоресцентної відповіді від NADH/DCF є похідними від часу відповідних залежностей. Флуоресценція NADH знижується з часом в присутності субстратів дихання, що вказує на зростання окисленої форми NAD^+ і свідчить про активацію NADH-убіхінон оксидоредуктази в ЕТЛ (рис.3.4.7). Ці експериментальні результати було використано нами для моделювання. Часові залежності усереднених змін флуоресцентної відповіді від NADH було апроксимовано поліномами (рівнянні 1 та 2):

$$F_n(\text{NADH}) = -0,08 t^3 + 2 t^2 - 30 t + 1087 \quad (1);$$

Інтенсивність флуоресцентної відповіді від NADH:

$$dF_n / dt = -0,24 t^2 + 4 t - 30 \quad (2).$$

Концентраційно-часові залежності DCF-флуоресценції було апроксимовано поліномами відповідно до рівнянь 3 та 4:

$$F_n(\text{DCF}) = (-0,099c^2 + 2,57c + 1,854)t + 2,506c + 990,7 \quad (3),$$

де c – концентрація азида натрія, мМ, t – час, хв.

Інтенсивність DCF-флуоресценції:

$$dF_n / dt = -0,099c^2 + 2,57c + 1,854 \quad (4).$$

Одержані рівняння можуть бути використані для передбачення змін DCF-флуоресценції від часу для невідомої концентрації азида натрія, наприклад 10 мМ (рис. 3.4.4). Відповідне рівняння 5:

$$F_n(\text{DCF}) = 17,65t + 1015,8 \quad (5).$$

Одержані результати змін середнього значення ГД МХ (набухання органел) в присутності 1-7 мМ NaN_3 (рис. 3.4.5) були апроксимовані відповідно до рівняння 6:

$$\Delta D = (0,7c + 31) \ln(t) + 16,6c - 39 \quad (6),$$

де c – концентрація азида натрія, мМ, t – час, хв.

Теоретично можна передбачити хід відповідних кривих для невідомих концентрацій азиду натрію на основі рівняння 6. На рис. 3.4.5 показаний приклад такої кривої для 10 мМ азиду натрію.

Проникність РТР описується рівнянням 7:

$$d(\Delta D)/dt = (0,7c + 31)/t \quad (7).$$

Отже, при моделюванні отримано математичні рівняння, які формалізують одночасні процеси мітохондрійного набухання, змін NADH та DCF-флуоресценції в середовищі, де присутній NaN_3 . Ці рівняння спроможні адекватно описати часові та концентраційні характеристики зазначених процесів, а також передбачити інтенсивність їхнього протікання. Зокрема було спрогнозовано відповідь МХ у часі на дію 10 мМ NaN_3 – концентрацію, яка в експерименті не використовувалася. Розраховані величини досліджуваних біофізикохімічних параметрів узгоджувались з експериментально одержаними даними.

Створення адекватної моделі оптимізує експериментальні процедури (час, витрати реагентів та лабораторних тварин), дозволяє аналізувати динаміку процесів та порівнювати експериментальні результати із теоретичними розрахунками за умови змін складу інкубаційного середовища.

Узагальнення та обговорення результатів підрозділу 3.4.

Формалізація і узагальнення експериментальних результатів та пошук відповідності між теоретичними передбаченнями та реальними експериментальними даними потребують застосування імітаційного моделювання. Сучасним варіантом такого підходу є використання математичного апарату моделювання станів динамічних систем з можливістю їх структурного відображення, кількісного аналізу, спроможністю враховувати активуючі/інгібуючі ефекти, а саме функціональних гібридних мереж Петрі.

Фундаментальними показниками функціонування МХ є концентрація Ca^{2+} в матриксі та функціонування Ca^{2+} -транспортувальних систем, ефективність окиснення аденінових нуклеотидів (NADH/FAD), інтенсивність генерації АФК та об'єм органел. Перелічені біофізикохімічні параметри впливають або залежать від потенціалу ВММ, а сполуки, що його змінюють, зокрема оксид азоту або інгібітори дихального ланцюга, будуть модулювати функціональну активність органел.

Для здійснення симуляційного моделювання біоенергетичних процесів в МХ (зміни власної флуоресценції аденінових нуклеотидів МХ, їхнього ГД та інтенсивності генерації ними АФК) в якості ефектора ЕТЛ нами було обрано інгібітор *IV* комплексу азид натрію, який широко застосовується як інструмент для інгібування окисного фосфорилування і транспорту Ca^{2+} в МХ, а також є “непрямим донором” NO.

Було показано, що азид натрію викликав більш інтенсивне зниження флуоресценції від NADH порівняно з контролем та зростання вмісту FADH_2 , що було аналогічним до ефектів SNP й SN, а також стимульованого Ca^{2+} та L-аргініном синтезу NO. Азид натрію також призводив до збільшення ГД МХ з часом.

В процесі моделювання отримані математичні рівняння, що формалізують процес набухання МХ та зміни флуоресценції NADH/FAD в середовищі в контролі та після додавання азиду натрію. Ці рівняння адекватно описують часові залежності зниження флуоресценції нуклеотидів та набухання МХ одночасно.

Для іншої серії експериментів було здійснено симуляційне моделювання одночасних процесів зміни власної флуоресценції аденінових нуклеотидів (NADH) МХ, їхнього ГД та інтенсивності генерації ними АФК (за DCF-флуоресценцією) за умови змін концентрації азиду натрію.

При моделюванні отримано математичні рівняння, які формалізують одночасні процеси мітохондрійного набухання, змін NADH та DCF-флуоресценції в середовищі, де присутній NaN_3 . Ці рівняння адекватно описують часові та концентраційні характеристики зазначених процесів з можливістю передбачення інтенсивності їхнього протікання. Зокрема було спрогнозовано відповідь МХ у часі на дію NaN_3 у концентрації, яка в експерименті не використовувалася. Розраховані величини досліджуваних біофізикохімічних параметрів узгоджувались з експериментально одержаними даними.

Важливим регулятором біохімічних процесів в матриксі та функціонуванні ЕТЛ є зміни в концентрації Ca^{2+} у МХ. Зростання вмісту катіону в мітохондрійному матриксі активує синтез АТФ, ензими циклу трикарбонових кислот та mtNOS; перевантаження органел катіоном спричинює клітинну загибель.

Тому важливим завданням сучасної біомембранології є пошук екзогенних нетоксичних сполук, які б могли ефективно і вибірково регулювати транспорт Ca^{2+} у ВММ та впливати на Ca^{2+} -залежні процеси, зокрема синтез АФА, АФК та мітохондрійну біоенергетику.

Наразі значна увага світової біологічної науки приділяється супрамолекулярним сполукам калікс[4]аренам, що є продуктами циклічної полімеризації фенолу (або резорцинів) з формальдегідом під дією кислот або лугів як каталізаторів, завдяки широкому спектру їхньої біологічної дії [5, 53]. Перевагою калікс[4]аренів як можливих інструментів біохімічних досліджень і, в перспективі, фармпрепаратів, є їхня нетоксичність і дешевизна синтезу.

Результати опубліковані [178, 181].

3.5. БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ NO, Ca²⁺-ЗАЛЕЖНОЇ ДІЇ КАЛІКС[4]АРЕНІВ НА ФУНКЦІОНУВАННЯ МІТОХОНДРІЙ

Важливість нормального перебігу біохімічних процесів у МХ для функціонування клітини, а також безпосередній зв'язок між мітохондрійною дисфункцією та розвитком патологій гладенького м'язу, зумовлюють інтерес до пошуку нетоксичних та селективних модифікаторів Ca²⁺-транспортувальних систем цих органел. Здатність окремих супрамолекулярних макроциклічних сполук калікс[4]аренів пригнічувати активність Ca²⁺-помп ПМ та СР в гладеньких м'язах привертає увагу до цих сполук як можливих регуляторів Ca²⁺-гомеостазу міоцитів [456-457].

Окремі калікс[4]арени з високою спорідненістю модулюють активність катіон-транспортувальних АТР-гідролаз в гладеньких м'язах, включаючи матку, що привертає увагу щодо їх важливості як потенційних регуляторів гомеостазу Ca²⁺ в міоцитах і Ca²⁺-залежних процесів, зокрема синтезу і функціонування ЕТЛ. Виявлено інгібувальну дію окремих калікс[4]аренів (С-90) на РМСА та SERCA, а також на АТР-гідролазну активність міозину міометрія [58]. На моделі пермеабілізованих міоцитів матки показано, що макроцикл С-91 спричинює збільшення акумуляції Ca²⁺ в МХ, але не впливає на пасивний вихід катіону з органел [79]. Окрім того, халкон-вмісні калікс[4]арени С-136 та С-137 спричинюють зростання поляризації ВММ в міоцитах матки [6].

Здатність калікс[4]аренів впливати на катіон-транспортувальну активність ізольованих МХ та МХ пермеабілізованих міоцитів ставить питання щодо можливості їхнього проникнення крізь ПМ міоцитів та взаємодію з органелами. Відповідь на нього є передумовою пошуку калікс[4]аренів, які могли б перешкоджати розвитку мітохондрійної дисфункції.

Результати нижче описаних експериментів стосуються вивчення взаємодії калікс[4]аренів (на прикладі макроцикла С-956) з міоцитами матки та їх проникнення до МХ. А також встановленню іонних та мембранних механізмів, які лежать в основі дії вибраних калікс[4]аренів на Ca²⁺-гомеостаз та біоенергетику

МХ міометрія, а також здатність калікс[4]аренів модулювати біосинтез NO в органелах.

3.5.1. Взаємодія калікс[4]арена С-956 з міоцитами

Калікс[4]арени є гідрофобними сполуками, які можуть ефективно проникати крізь ліпідний бішар субклітинних мембранних структур. Калікс[4]арен С-956 (5,11,17,23-тетра(трифтор)метил(феніл-сульфоніліміно)метиламіно-25,27-діоктилокси-26,28-дипропокси-калікс[4]арен) (рис. 3.5.1) містить чотири фенілсульфоніламідинові групи на верхньому вінці чаші і два октанольних залишка на нижньому вінці. Це, ймовірно, може сприяти більш ефективному вбудовуванню молекули калікс[4]арена в ПМ клітин. Показано, що гідрофобність безпосередньо корелює з біохімічною ефективністю калікс[4]аренів [53].

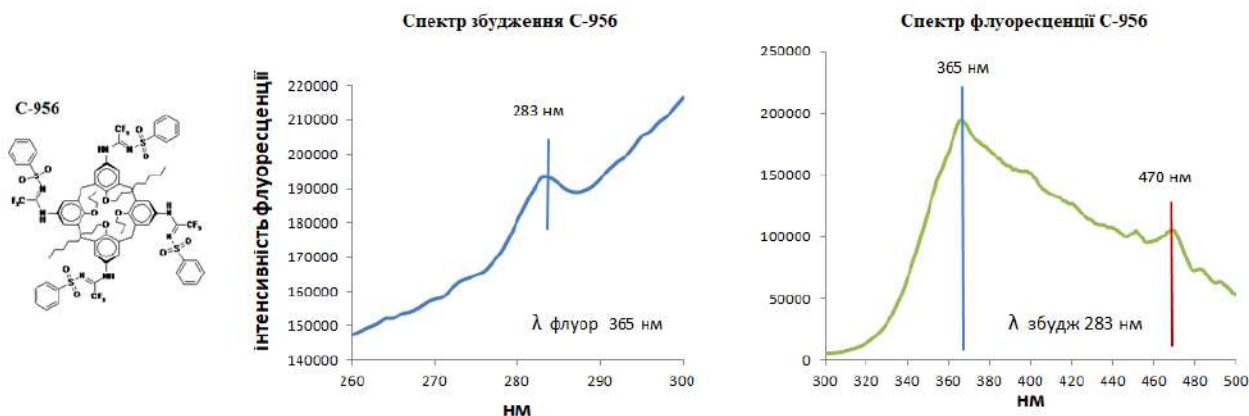


Рис. 3.5.1. Структурна формула, спектри збудження та флуоресценції калікс[4]арена С-956 (100 мкМ)

Аналог калікс[4]арена С-956 сполука С-90 (див. роз. 1.3.2, рис 1.3.3), як показано в роботах [21, 456], є специфічним інгібітором Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ ($I_{0,5} = 20$ мкМ) та СР ($I_{0,5} = 57$ мкМ). Значення коефіцієнту інгібування ($I_{0,5}$) для калікс[4]арену С-956 Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ дорівнює 15 мкМ, що вказує на його більшу афінність до зазначеної транспортувальної АТРази та становить перспективу для майбутніх пошуків високоспецифічних щодо РМСА його аналогів [457]. В цитованих дослідженнях продемонстровано, що обидві сполуки спричинюють зростання концентрації Ca^{2+} в цитоплазмі та зменшення об'єму міоцитів. Але проблемою дослідження біологічної активності С-956 є наведення надійних експериментальних доказів його проникнення в клітину.

З використанням методу спектрофлуориметрії нами виявлено, що калікс[4]арен С-956 має власну флуоресценцію в синьо-фіолетовій ділянці спектру: довжини хвилі максимумів збудження ($\lambda_{зб}$) та флуоресценції ($\lambda_{фл}$) С-956 становлять 283 нм та 365 нм відповідно (рис. 3.5.1). Інтенсивність флуоресценції калікс[4]арена С-956 лінійно зростала в залежності від його концентрації (10-100 мкМ) в робочому розчині без клітин (рис. 3.5.2). Детергент дигітонін (0,01%), який надалі використовується з метою підвищення неспецифічної проникності ПМ [7, 81], не впливав на флуоресценцію С-956 в робочому безклітинному середовищі (рис. 3.5.2). Грунтуючись на отриманих результатах, далі було проведено дослідження змін флуоресценції С-956 при взаємодії з ГМК матки із використанням методу спектрофлуориметрії (рис. 3.5.3).

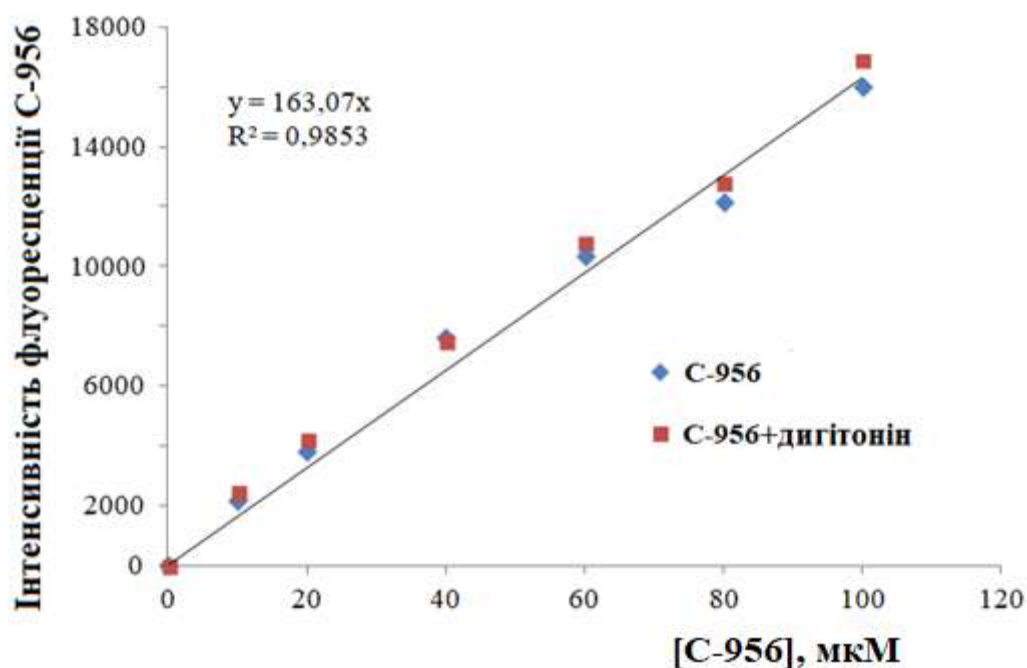


Рис. 3.5.2. Залежність інтенсивності флуоресценції С-956 в робочому середовищі (клітини відсутні) та в присутності 0,01 % дигітоніна

При внесенні у середовище з калікс[4]ареном С-956 за різних його концентрацій аліквоти суспензії міоцитів спостерігали різкий спалах інтенсивності флуоресценції калікс[4]арена, з подальшим поступовим її зниженням (рис 3.5.3, А). Початкове зростання та наступне гасіння флуоресценції С-956 залежить від його концентрації: із збільшенням концентрації ступінь спалаху зменшується, а гасіння зростає (рис. 3.5.3, А, 3.5.4, А). Зростання флуоресценції С-956 (етап І),

цілком ймовірно, обумовлене взаємодією калікс[4]арена з ПМ міоцитів, тобто його адсорбцією на поверхні клітини. Зменшення інтенсивності спалаху із збільшенням концентрації калікс[4]арена в середовищі можна пояснити взаємодією молекул С-956 між собою на поверхні клітини, що і спричинює ефект самогасіння. Детергент дигітонін (0,01 %) не впливав на величину початкового спалаху флуоресценції калікс[4]арена за різних його концентрацій (рис. 3.5.3, Б, 3.5.4, А), що підтверджує наше припущення стосовно зв'язку ефекту зростання флуоресценції С-956 пов'язаного саме з його адсорбцією на поверхні клітини.

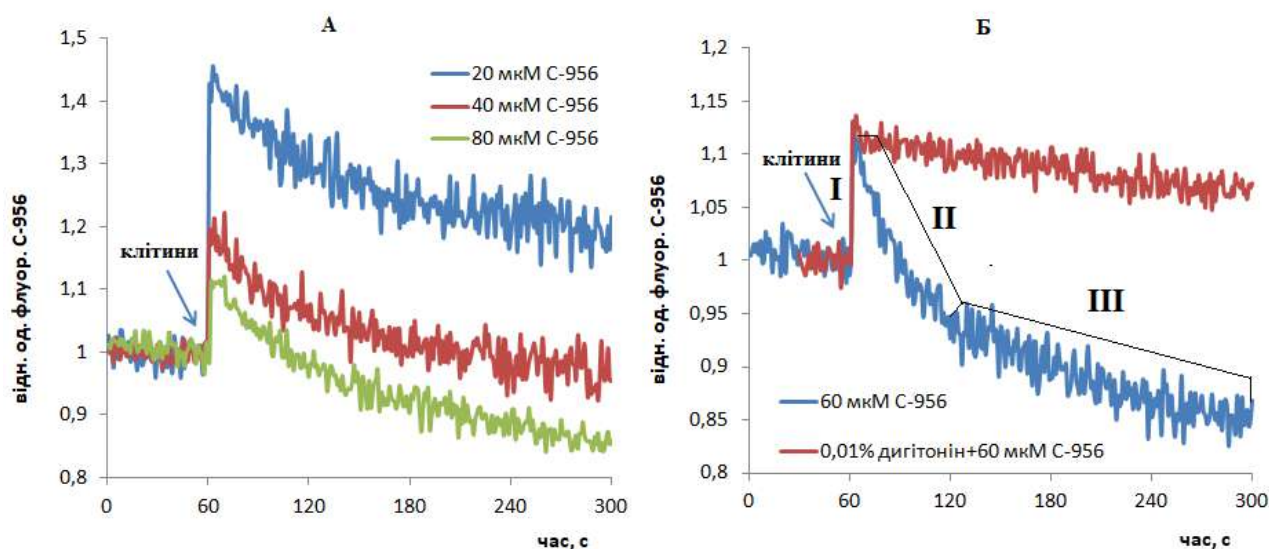


Рис. 3.5.3. Кінетика взаємодії С-956 з клітинами за різних його концентрацій (А) та вплив дигітоніну на цей процес (Б). За 1 прийнято флуоресценцію С-956 в середовищі інкубації (розчин Хенкса)

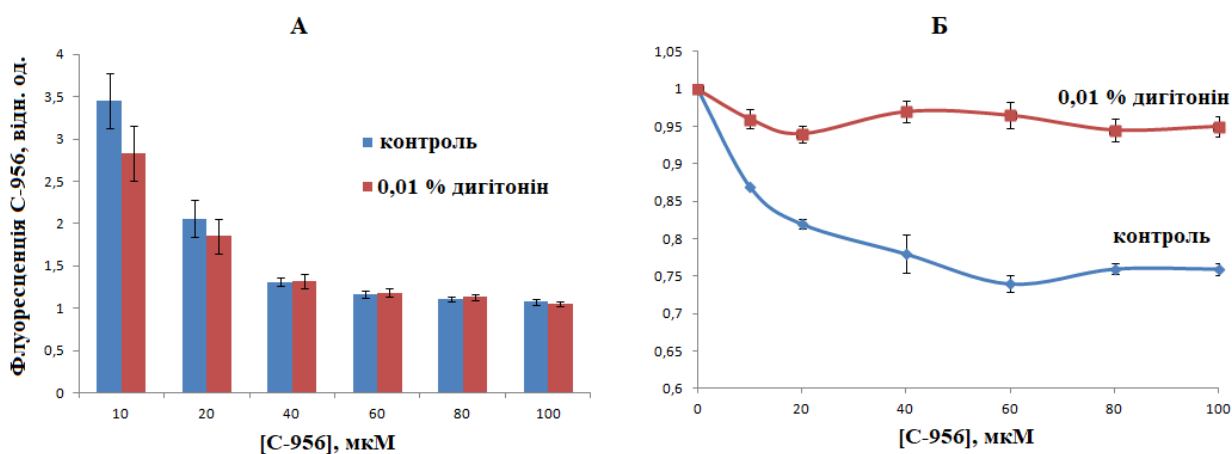


Рис. 3.5.4. Концентраційна залежність змін флуоресценції С-956 в контролі (синій колір) та за присутності дигітоніну (червоній колір). А - концентраційна залежність спалаху флуоресценції при взаємодії з міоцитами, Б - концентраційна залежність гасіння флуоресценції після взаємодії з міоцитами $M \pm t, n=5$

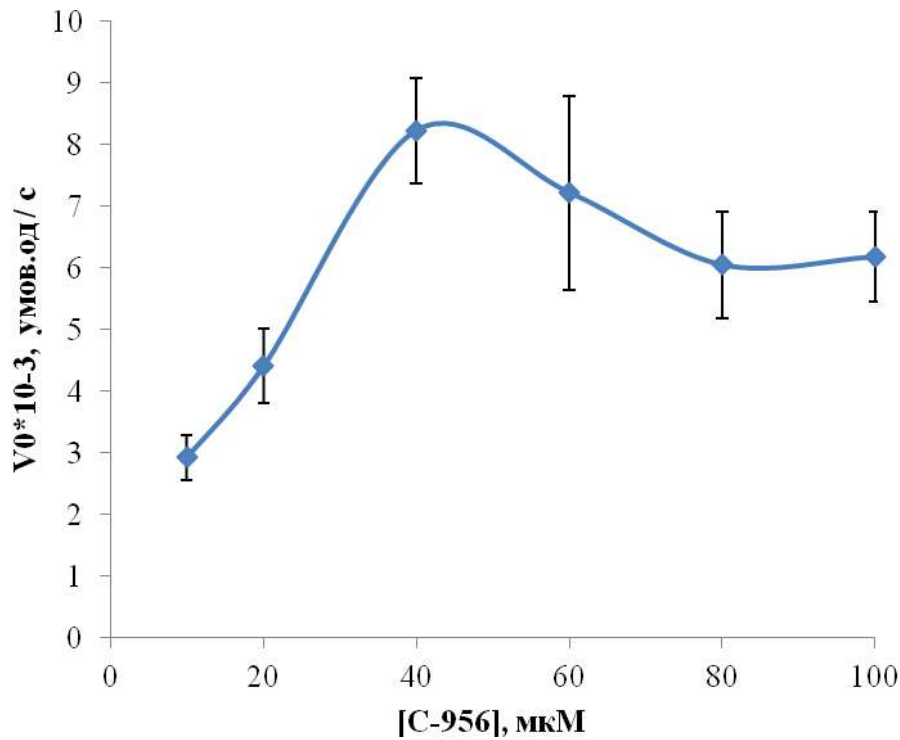


Рис. 3.5.5. Крива залежності початкової швидкості гасіння флуоресценції С-956 від його концентрації. $M \pm m$, $n=5$

Наступний процес швидкого зниження інтенсивності сигналу від С-956 (етап II) (рис. 3.5.3, А, 3.5.4, Б) вірогідно пов'язаний з проникненням калікс[4]арена через ліпідний бішар ПМ до цитоплазми; за присутності дигітоніна, тобто при збільшенні неспецифічної проникності мембрани, він відсутній. Швидкість гасіння флуоресценції зростає в межах концентрацій С-956 10-40 мкМ та виходить практично на платовий рівень при збільшенні концентрації калікс[4]арена до 100 мкМ (рис. 3.5.5). На етапі III відбувається перерозподіл С-956 в цитозолі, взаємодія з субклітинними структурами, можлива димеризація. В умовах порушення інтактності ПМ за присутності дигітоніна зростає ефективність взаємодії С-956 з цитоплазмою клітин і ступінь гасіння його флуоресценції зменшується (рис. 3.5.3, Б, 3.5.4, Б). Більш інтенсивний розподіл у внутрішньоклітинному об'ємі перешкоджає агрегації молекул С-956 на зовнішній поверхні клітини. Відсутність ефекту дигітоніну на початковий спалах флуоресценції С-956 та його гасіння може свідчити на користь проникнення С-956 саме в цитоплазму.

Таким чином, за взаємодії калікс[4]арена з міоцитами, мабуть, має місце як адсорбція С-956 на поверхні клітини, так і, згідно одержаних нами результатів, проникнення його в цитоплазму (абсорбція клітиною).

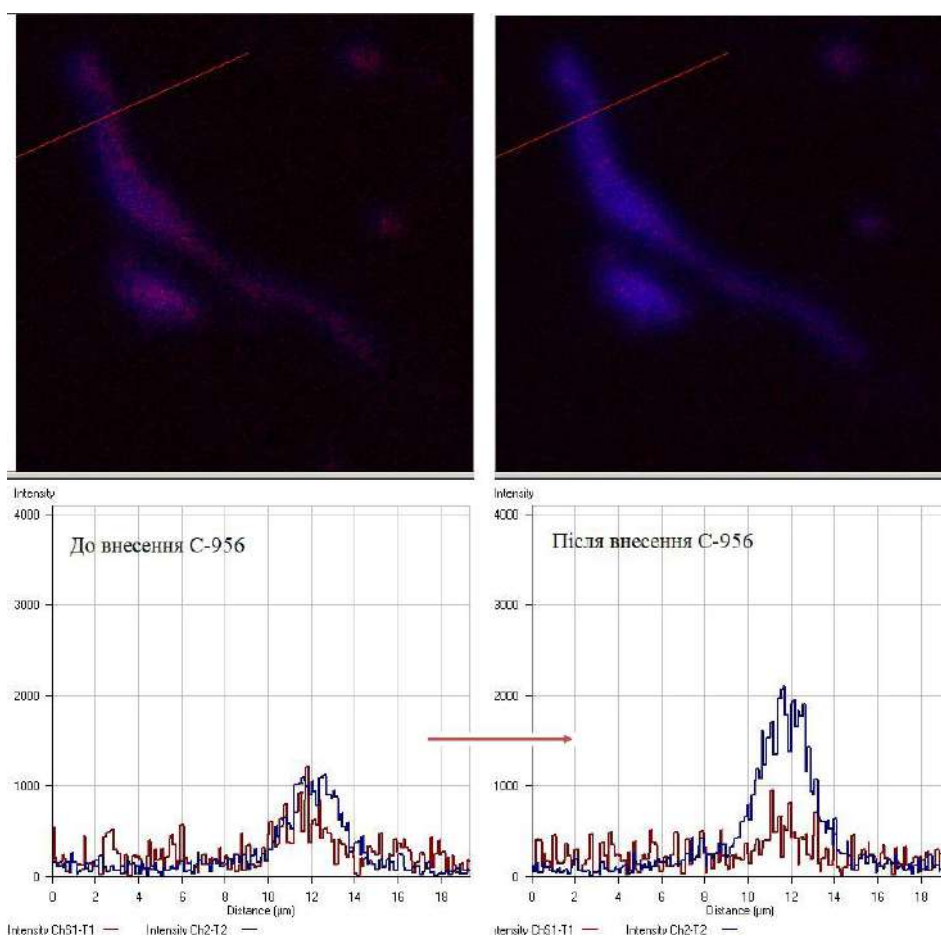


Рис. 3.5.6. Порівняння профілю розподілу в міоциті флуорофора калікс[4]арена С-956 (синій колір) та специфічного щодо мітохондрій MitoTracker Orange CM-H₂TMROS (червоний колір) (нижня панель). Для аналізу вибрана ділянка поза ядерною областю клітини

Для візуалізації цих процесів надалі ми використали метод конфокальної мікроскопії. Цим методом показано, що клітини флуоресціюють в синьо-фіолетовій ділянці спектра при збудженні 360 нм ультрафіолетовою лампою або лазером при довжині хвилі 405 нм (рис. 3.5.6, 3.5.7). При аналізі оптичного зрізу клітини, а саме ділянки цитоплазми поза ядром, спостерігається подібний розподіл синьої аутофлуоресценції клітини та флуоресценції потенціалчутливого мітохондрійного зонду (червоний сигнал) MitoTracker Orange CM-H₂TMROS (рис. 3.5.6, ліва частина). Синя флуоресценція міоцитів обумовлена, скоріше за все, сигналом від триптофан-вмісних білків (наприклад, актину, міозину, тропоніну) в цитоплазмі та аденінових нуклеотидів, вміст яких особливо високий у

МХ. Після внесення калікс[4]арену С-956 (рис. 3.5.6) інтенсивність сигналу в синій області зростає вдвічі. При цьому не змінюється солоколізація синього та червоного сигналів в цитоплазмі. Ці результати свідчать про можливість проникнення С-956 в клітину та взаємодію калікс[4]арена з МХ.

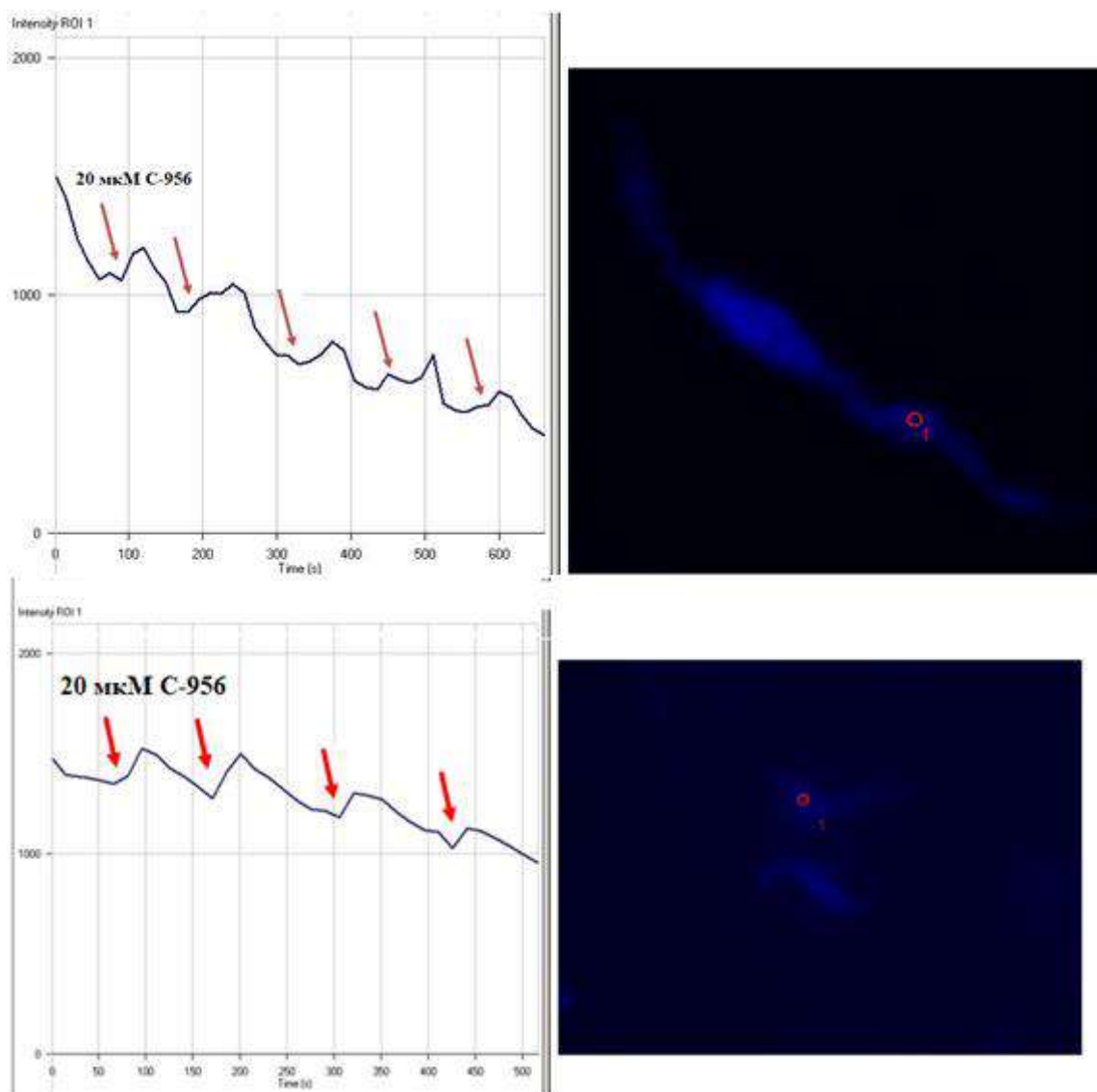


Рис. 3.5.7. Числова інтерпретація (функція ROI 1) процесу акумуляції в міоциті калікс[4]арена С-956 – сполуки, яка володіє власною флуоресценцією. Збудження зразка лазером 405 нм – верхня панель; нижня панель – ультрафіолетова лампа, збудження 360 нм

Вивчали також кінетику взаємодії С-956 за концентрації 20 мкМ з ГМК методом конфокальної мікроскопії. Додавання аліквоти калікс[4]арена С-956 в концентрації 20 мкМ спричинювало початковий спалах флуоресценції з подальшим її гасінням (рис. 3.5.7). Поступове збільшення концентрації С-956 в середовищі знижувало початкову інтенсивність флуоресценції вдвічі. Одержані

результати якісно відповідають раніше одержаним даним спектрофлуориметричного аналізу.

Отже, сукупне застосування методів спектрофлуориметрії та лазерної конфокальної мікроскопії вказує на те, що каліксарен С-956 сорбується поверхнею міоцитів та проникає до міоплазми, взаємодіючи із МХ.

3.5.2. Вплив калікс[4]арена С-956 на H^+ - Ca^{2+} -обмінник у мітохондріях міомерія, синтез NO та активність електрон-транспортного ланцюга

З урахуванням даних літератури щодо впливу калікс[4]арена С-956 на зміни вмісту іонізованого Са в міоцитах та можливої участі МХ у зниженні концентрації Ca^{2+} після його транзієнта [457], наступним завданням було з'ясувати вплив калікс[4]арену С-956 та його попередника С-90 (в порівняльному аспекті) на системи транспорту Ca^{2+} в ізольованих МХ гладенького м'язу матки щурів з метою пошуку можливих ефективних регуляторів обміну іонів Са та Ca^{2+} -залежних процесів, зокрема синтезу NO, в цих субклітинних структурах.

Нами було показано, що калікс[4]арен 100 мкМ С-90 має лише тенденцію до зниження енергозалежної акумуляції іонів Са в МХ (рис. 3.5.8, А), водночас С-956 (100 мкМ) не чинить ніякого впливу на даний процес (рис. 3.5.8, А, Б). Поряд з цим, калікса[4]арен 100 мкМ С-956 майже повністю блокує ΔpH -залежний вихід Ca^{2+} з ізольованих МХ (рис. 3.5.8, А, Б). Його структурний аналог – С-90 за такої ж концентрації майже не впливає на H^+ - Ca^{2+} -обмінник ВММ (рис. 3.5.8, А, Б). Таким чином, С-90 практично не діє на обидві системи обміну Ca^{2+} у ВММ. В той же час С-956 ефективно пригнічує лише ΔpH -залежний вихід Ca^{2+} з ізольованих МХ міомерія щурів. Цей факт свідчить на користь того, що калікса[4]арен С-956, пригнічуючи H^+ - Ca^{2+} -обмінник МХ, може привести до зміщення рівноваги у роботі Ca^{2+} -транспортних систем ВММ у бік акумуляції катіона, зростання його вмісту в матриксі і відповідного зниження концентрації Ca^{2+} в міоплазмі.

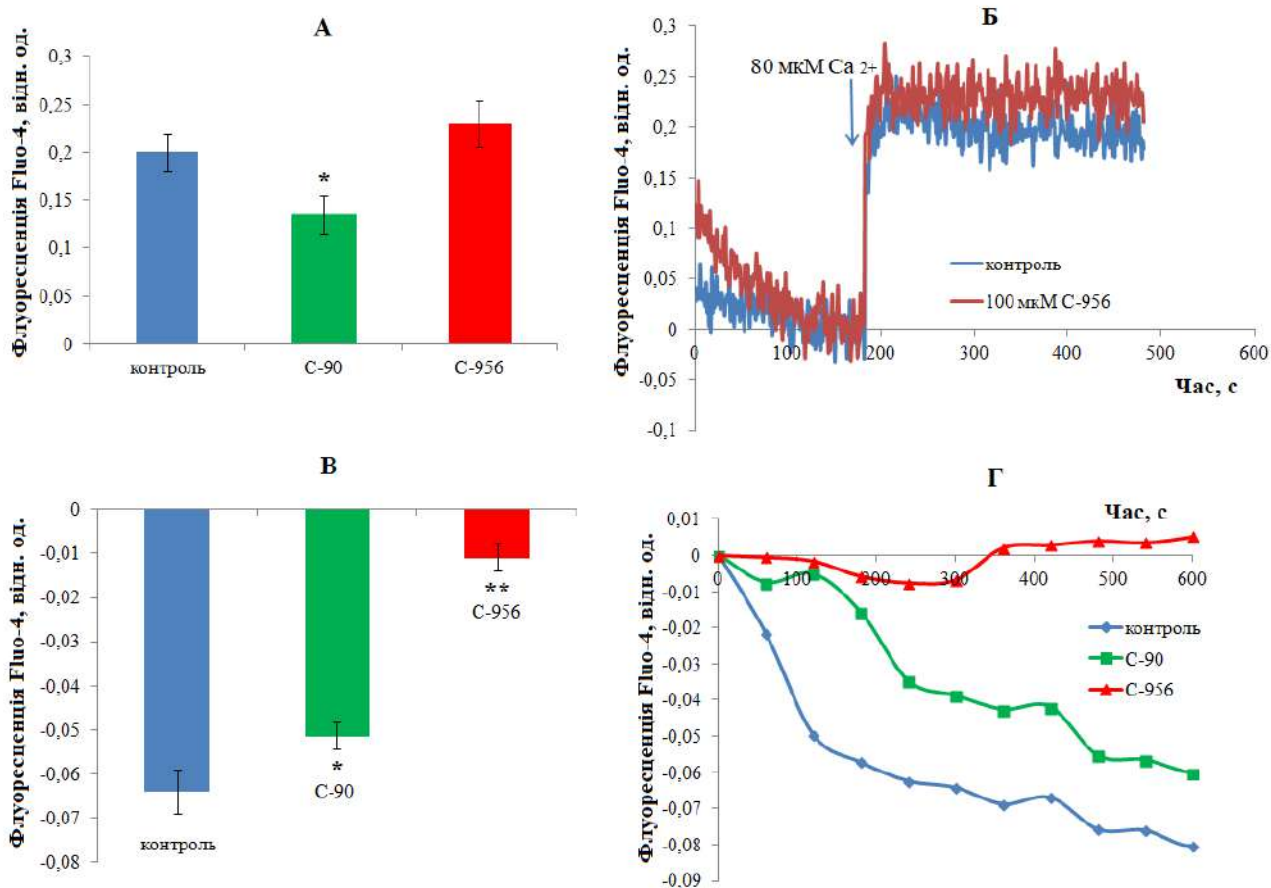


Рис. 3.5.8. Енергозалежна акумуляція Ca^{2+} ізольованими мітохондріями (А, Б) та ΔpH -залежний вихід Ca^{2+} з них (В, Г) за присутності в середовищі інкубації калікс[4]аренів С-90 та С-956 (100 мкМ). Статистична обробка результатів: А – на 5^й хв акумуляції Ca^{2+} , В - на 10^й хв вивільнення Ca^{2+} , * - $p < 0,1$, ** - $p < 0,05$ відносно контролю. $M \pm t$, $n = 4-6$; Б, Г – результати типового експерименту

Унікальність калікс[4]аренів полягає у вираженій специфіці впливу їхніх окремих представників на катіон-транспортувальні системи субклітинних структур залежно від хімічної будови [58]. Одержані результати щодо специфічного інгібування H^+ - Ca^{2+} -обмінника МХ спрямовує наступні дослідження в напрямку з'ясування кінетичних закономірностей впливу калікс[4]арену С-956 на ΔpH -залежний вихід Ca^{2+} з ізольованих МХ. Ми дослідили концентраційну та часову залежності гальмівного впливу калікс[4]арену С-956 на ΔpH -індукований вихід Ca^{2+} з ізольованих МХ в діапазоні його концентрацій 10-100 мкМ (рис. 3.5.9, для 3.5.9, А - наведено дані лише для трьох концентрацій). Часова залежність процесу вивільнення катіону як в контролі, так і за дії калікс[4]арену має експоненціальний характер, а рівень катіону у матриці, згідно

змін флуоресценції Fluo-4, виходить на стаціонарний рівень і, відповідно, не досягає нульових значень (рис. 3.5.9, А).

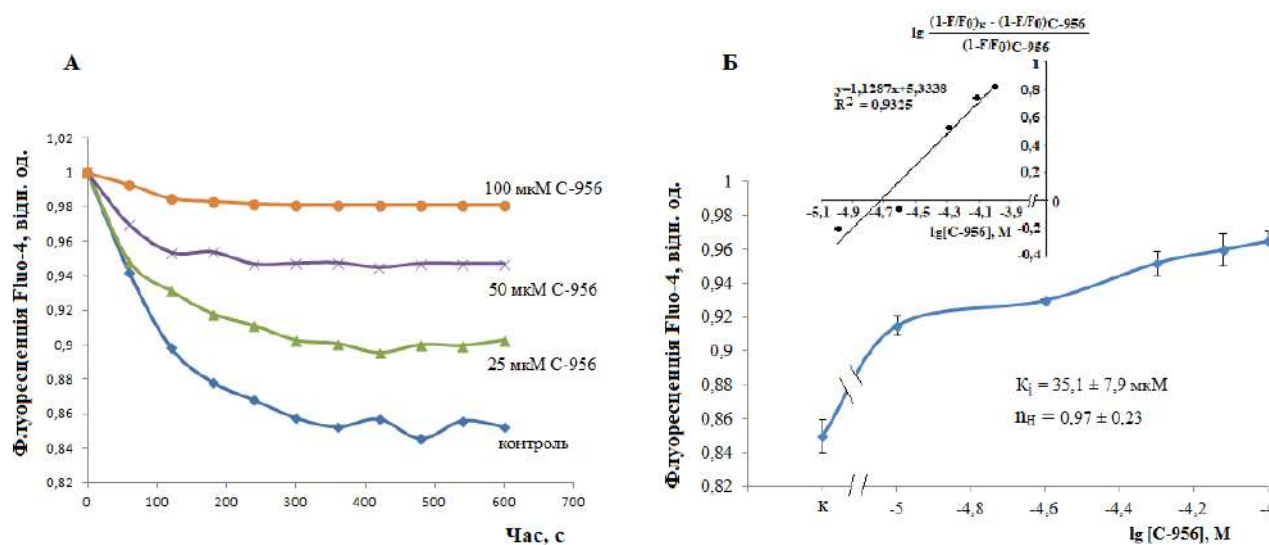


Рис. 3.5.9. Концентраційна та часова залежності впливу калікс[4]арену С-956 на ΔрН-індукований вихід Ca^{2+} з ізольованих мітохондрій. А – часова залежність вивільнення Ca^{2+} за різних концентрацій калікс[4]арену С-956, результат характерного дослідження. Б - концентраційна залежність інгібувального впливу калікс[4]арену С-956, к – контроль за відсутності калікс[4]арену, $M \pm m$, $n=5$. Вставка: приклад розрахунку константи інгібування (K_i) в координатах Хілла; F_0 – початкова флуоресценція, F – флуоресценція за відповідні проміжки часу. Результат типового дослідження ($n=5$)

На основі одержаних результатів (рис. 3.5.9, А) розраховували константу інгібування K_i калікс[4]ареном С-956 H^+ - Ca^{2+} -обмінника МХ (рис. 3.5.9, Б), яка становила $35,1 \pm 7,9$ мкМ. Відповідний коефіцієнт Хілла (n_H) складає $0,97 \pm 0,23$ (рис. 3.5.9, Б). Величина n_H може вказувати на механізм зв'язування калікс[4]арену з ензимом. Оскільки його величина близька до одиниці це свідчить про зв'язування однієї молекули калікс[4]арена з білковою структурою LETM 1, який за нашими даними репрезентує H^+ - Ca^{2+} -обмінник.

За дії калікс[4]арену С-956 (10-100 мкМ) показано також зменшення початкової швидкості V_0 (число обертів H^+ - Ca^{2+} -обмінника) та збільшення величини характеристичного часу $\tau_{1/2}$ ΔрН-індукованого виходу Ca^{2+} з ізольованих МХ залежно від його концентрації (рис. 3.5.10). Зміни цих параметрів відображають гальмівний вплив калікс[4]арену С-956 у мікромольярних концентраціях на H^+ - Ca^{2+} -обмінник.

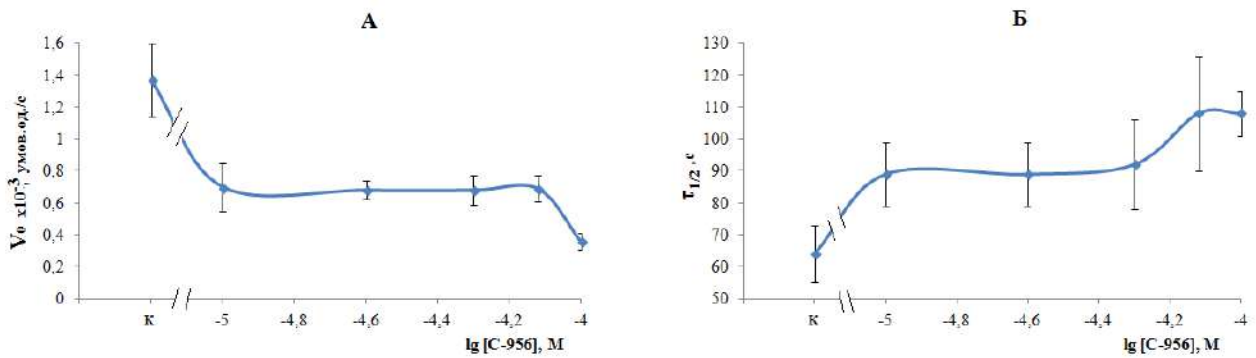


Рис. 3.5.10. Залежність початкової швидкості V_0 (А) та величини характеристичного часу $\tau_{1/2}$ (Б) ΔpH -індукованого виходу Ca^{2+} з ізольованих мітохондрій від концентрації калікс[4]арену С-956. К – контроль за відсутності калікс[4]арену, $M \pm m$, $n=5$

Попередні дослідження показали (див. розділ 2), що H^+ - Ca^{2+} -обмінник ВММ в клітинах міометрія є електрогенною системою, яка транспортує катіони у стехіометрії $1H^+:1Ca^{2+}$. Інша субклітинна транспортувальна система гладенького м'яза матки РМСА також функціонує в електрогенному режимі і може здійснювати транспорт одного іона Ca^{2+} з клітини в обмін на H^+ [49]. В кожному випадку протиіоном при перенесенні Ca^{2+} через мембрану може бути H^+ . З огляду на те, що обидві системи високочутливі до інгібуючої дії С-956 і мають аналогічні за порядком константи інгібування (десятки мкМ) [457], можна висунути припущення, що мішенню дії калікс[4]арену є саме їхня H^+ -транспортувальна компонента (структура). Більш детальні дослідження будови транспортерів поряд із подальшим з'ясуванням механізмів інгібувальної дії С-956 можуть підтвердити або спростувати наше припущення.

Отже, одержані результати вказують на наступне: калікс[4]арен С-956 у мікромольних концентраціях виявив виражений гальмівний вплив на H^+ - Ca^{2+} -обмінник, який обумовлений зниженням початкової швидкості V_0 та, як наслідок, збільшенням величини характеристичного часу $\tau_{1/2}$ ΔpH -індукованого виходу Ca^{2+} з МХ. Поряд з цим С-956 не впливає на енергозалежну акумуляцію катіону цими субклітинними структурами. Ці дані є підставою для подальшого дослідження ефектів С-956 на Ca^{2+} -чутливі процеси в МХ: біосинтез АФА та АФК, функціональну активність ЕТЛ.

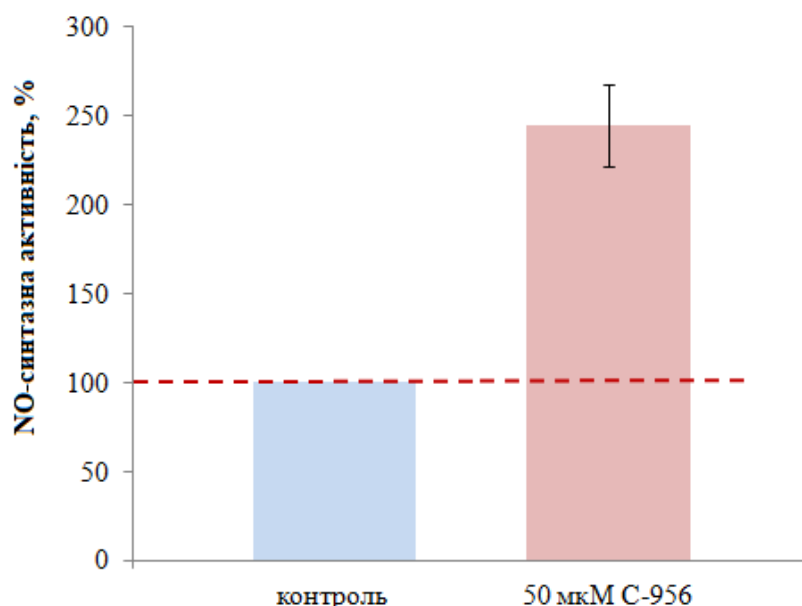


Рис. 3.5.11. Вплив калікс[4]арену С-956 на NO-синтазну активність в ізольованих мітохондріях. $M \pm m$, $n=5$

За наявності екзогенних 50 мкМ L-аргініну та 100 мкМ Ca^{2+} , а також за умови присутності в інкубаційному середовищі 10 мкМ NADPH, 10 мкМ BH_4 та субстратів дихання (5 мМ піруват та сукцинат) активність mtNOS складала $0,28 \pm 0,04$ відн.од.флуор. DAF-FM/мг протеїну за хв ($n=5$). Калікс[4]арен С-956 в концентрації 50 мкМ стимулює синтез NO мітохондрійною NO-синтазою в 2,5 рази (рис. 3.5.11).

Гальмування ΔpH -залежного вивільнення Ca^{2+} з МХ призводить до зростання концентрації катіону в матриці, що може стимулювати активність mtNOS. Втім, не виключений також і безпосередній вплив С-956 на досліджуваний ензим або ЕТЛ.

Як було зазначено раніше, оксид азоту в МХ є регулятором низки процесів, в тому числі функціональної активності комплексів дихального ланцюга, зворотно/незворотно пригнічуючи ЕТЛ залежно від концентрації та наявності АФК [362]. Отже, посилення синтезу NO МХ за впливу С-956 може привести до змін у функціонуванні відповідних комплексів.

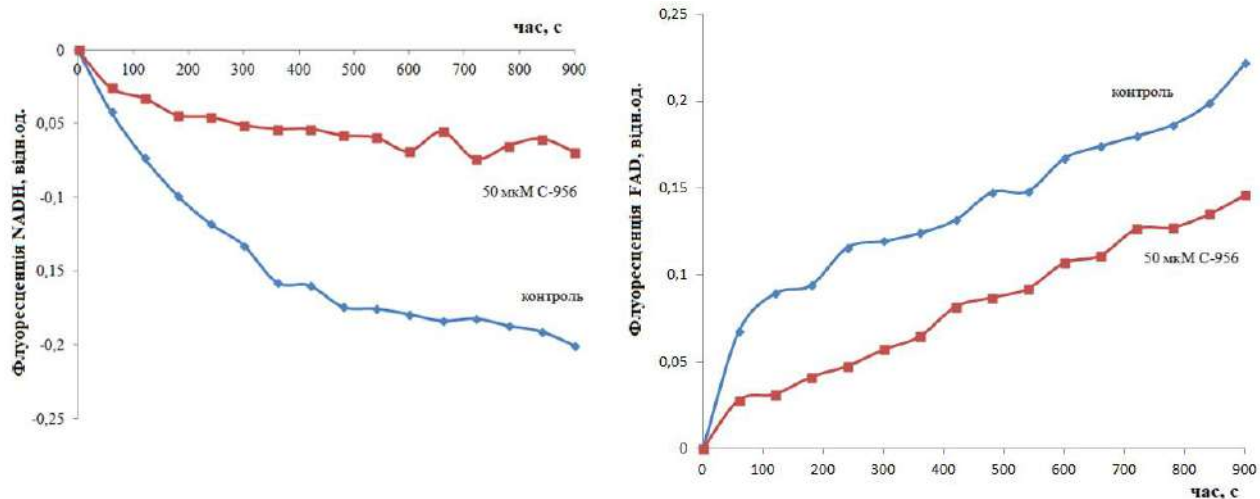


Рис. 3.5.12. Зміни флуоресценції NADH та FAD в ізольованих мітохондріях міометрія за присутності калікс[4]арену С-956. Результат типового досліджу

В підрозділі 3.3.5 нами доведено, що біомаркерами функціональної активності комплексів дихального ланцюга є зміни редокс-стану аденінових нуклеотидів, що мають власну флуоресценцію. За присутності субстратів дихання пірувату та сукцинату (5 мМ) в інкубаційному середовищі флуоресценція NADH зменшується, а FAD зростає внаслідок функціонування комплексу I і II дихального ланцюга (рис. 3.5.12). За додавання 50 мкМ С-956 спостерігається гальмування окислення NADH та FADH₂ в ЕТЛ (рис. 3.5.12). Цей ефект пояснюється стимулюванням за дії калікс[4]арена біосинтезу NO у МХ, останній призведе до гальмування комплексів I та II. Не виключений також і прямий ефект С-956 на відповідні комплекси ЕТЛ.

Відомо, що більш ефективно поглинання Ca²⁺, посилення продукції NO та гальмування активності комплексів дихального ланцюга в МХ можуть бути чинниками утворення в них АФК. Одним з механізмів їх продукції є стимуляція дихального ланцюга іонами кальцію [216]. Але NO-залежне інгібування ланцюга транспорту електронів може бути захисним фактором проти утворення АФК. В наших дослідженнях калікс[4]арен С-956 практично не змінює DCF-флуоресценцію в МХ (рис. 3.5.13). Відсутність впливу досліджуваного калікс[4]арена на утворення АФК в МХ може вказувати на користь того, що процеси, які активуються/гальмуються за присутності С-956 не призводять до шкідливих для МХ наслідків (тобто розвитку мітохондрійної дисфункції). Водно-

час шляхом посилення біосинтезу NO він може мати модулюючий вплив на функціонування ЕТЛ і біоенергетику МХ.

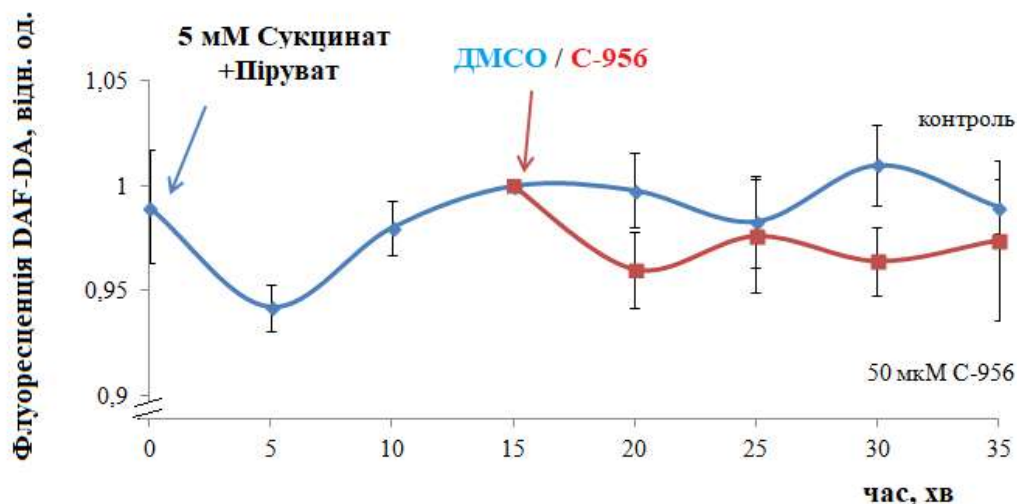


Рис. 3.5.13. Зміни флуоресценції DCF в ізольованих мітохондріях за присутності калікс[4]арену C-956. $M \pm m$, $n=5$

Таким чином, в представленому циклі досліджень показано, що калікс[4]арен C-956 взаємодіє з ПМ, проникає в цитоплазму та солокалізується з МХ. Встановлено, що калікс[4]арен C-956 інгібує Δp -залежний вихід Ca^{2+} з МХ, активує мітохондрійну NO-синтазу і гальмує окислення NADH та $FADH_2$ в ЕТЛ, але не впливає на синтез АФК в МХ. Отже, досліджувана сполука шляхом Ca^{2+} -залежного впливу на біосинтез NO може мати корегувальний ефект на МХ, знижуючи інтенсивність окисного фосфорилування і захищаючи клітини від енергетичного перевантаження.

3.5.3. Вплив калікс[4]аренів C-97, C-99, C-107 на поляризацію плазматичної та внутрішньої мітохондрійної мембран, H^+ - Ca^{2+} -обмін, синтез NO та активність електрон-транспортного ланцюга

Оскільки електричний потенціал на ПМ та ВММ регулює функціонування локалізованих в них катіон-транспортних систем, зумовлюючи зміни концентрації Ca^{2+} в цитоплазмі необхідні для регуляції скоротливої здатності ГМК [473], актуальним є пошук сполук, які могли б спрямовано впливати на поляризацію цих субклітинних структур. З огляду на це, нашу увагу приверну-

ли калікс[4]арени С-97, С-99, С-107 (рис. 1.3.2, розділ 1.3.2), які здатні змінювати електричний потенціал ПМ у зв'язку з їх убаїноподібним інгібуванням Na^+ , K^+ -АТРазної активності в міометрії. Відповідні значення коефіцієнту напівмаксимального інгібування IC_{50} складають: для С-107 – 50 нМ (при концентрації 10 мкМ спостерігається повне інгібування ферментативної активності); для С-97 – 40 нМ (при 100 мкМ – повне інгібування активності фермента); для С-99 – 100 нМ (при концентрації 100 мкМ спостерігається біля 14% залишкової активності) [20].

При дослідженні впливу калікс[4]аренів на електричний потенціал ПМ клітини попередньо інкубували з 5 мМ азидом натрію протягом 5 хв з метою деполаризації ВММ. Встановлено, що каліксарени С-97 (50 нМ), С-99 (100 нМ) та С-107 (50 нМ) в концентраціях, які відповідають значенням IC_{50} , знижують флуоресцентну відповідь зонда, що свідчить на користь зменшення електричного потенціалу ПМ і зумовлено їхнім інгібувальним впливом на Na^+ , K^+ -АТразу (рис. 3.5.14). Концентраційно-залежних змін в інтенсивності флуоресценції $\text{DiOC}_6(3)$ за використання С-97 та С-107 не спостерігали. Останнє може бути пояснене значним негативним зарядом досліджуваних калікс[4]аренів через наявність фосфонових залишків, що, за умови зростання їх концентрації, може вплинути на потенціал-залежну акумуляцію зонду.

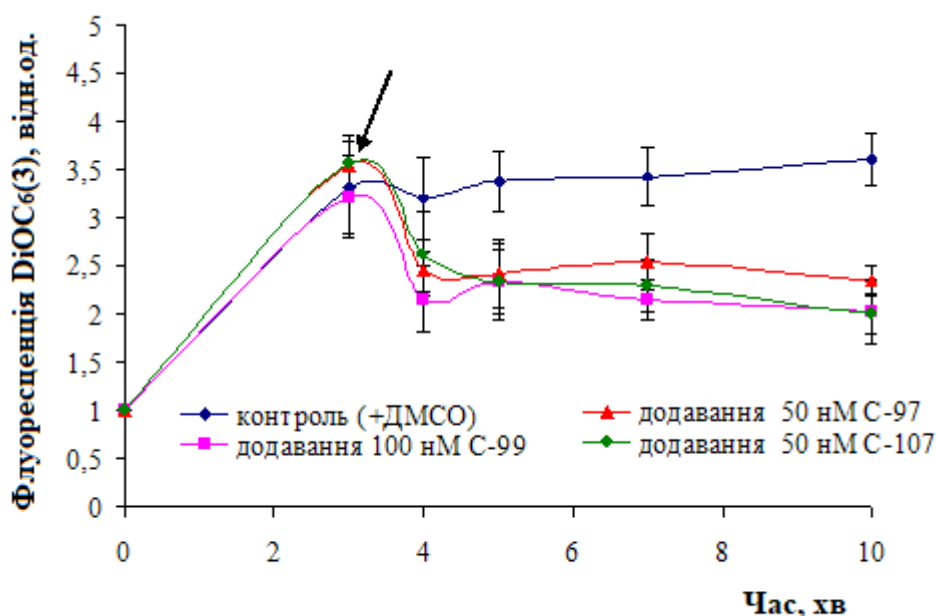


Рис. 3.5.14. Вплив калікс[4]аренів С-99, С-97 та С-107 на поляризацію плазматичної мембрани міоцитів матки. Стрілочкою вказано час додавання калікса-

ренів або ДМСО в контролі. $M \pm m$, $n=5$. Флуоресцентний зонд – 100 нМ DiOC₆(3). Дані протокової цитометрії

Водночас каліксарен С-150 ((25, 27-дипропоксикаликсарен) – суто каліксаренова “чаша”, до якої натрієва помпа є резистентною [19]), навіть за концентрації 500 нМ, не викликає істотних змін в поляризації ПМ в перші 4 хв інкубації з клітинами, і лише на 7-й хв спостерігається зниження її рівня (графічні дані не наведено). Оскільки С-150 не впливає на активність Na⁺, K⁺-АТРази, його відносно слабо виражений деполаризуючий ефект можна пояснити, зокрема, безпосередньою дією на системи пасивного транспорту потенціал-утворюючих іонів в ПМ.

Подальші дослідження були спрямовані на з’ясування ефектів вибраних калікс[4]аренів на поляризацію МХ міометрія, системи обміну іонів Са у ВММ, синтез NO та функціонування ЕТЛ.

Для виявлення ефектів калікс[4]аренів на поляризацію ВММ, міоцити попередньо інкубували 5 хв з 1 мМ убаїном з метою надійної деполаризації ПМ. Встановлено, що сполуки С-97, С-99 та С-107 викликали транзйентну поляризацію мітохондрійної мембрани, тривалість якої становила біля 5 хв після внесення досліджуваних речовин (рис. 3.5.15, А, крива 1). Максимальний рівень поляризації за впливу каліксаренів досягав 40 % (за 100 % прийнято значення інтенсивності флуоресценції зонду після інкубації міоцитів з убаїном). За цих же умов каліксаренова “чаша” С-150 практично не впливала на потенціал мітохондрійної мембрани. За умов деполаризації і ПМ і мітохондрійної мембрани, спричиненою попередньою інкубацією клітин з 1 мМ убаїном та 5 мМ азидом натрія, внесення зазначених каліксаренів не викликало змін в інтенсивності флуоресценції зонду (рис. 3.5.15, А, крива 2).

Одержані результати якісно підтверджуються дослідями із використанням методу лазерної конфокальної мікроскопії. Встановлено, що каліксарени С-99 (рис. 3.5.15, Б) та С-107 викликали ефективно зростання флуоресценції окремих міоцитів, попередньо навантажених DiOC₆(3) в присутності 1 мМ убаїну. Таким чином, вибрані калікс[4]арени викликають короткотривале зростання мембранного потенціалу МХ.

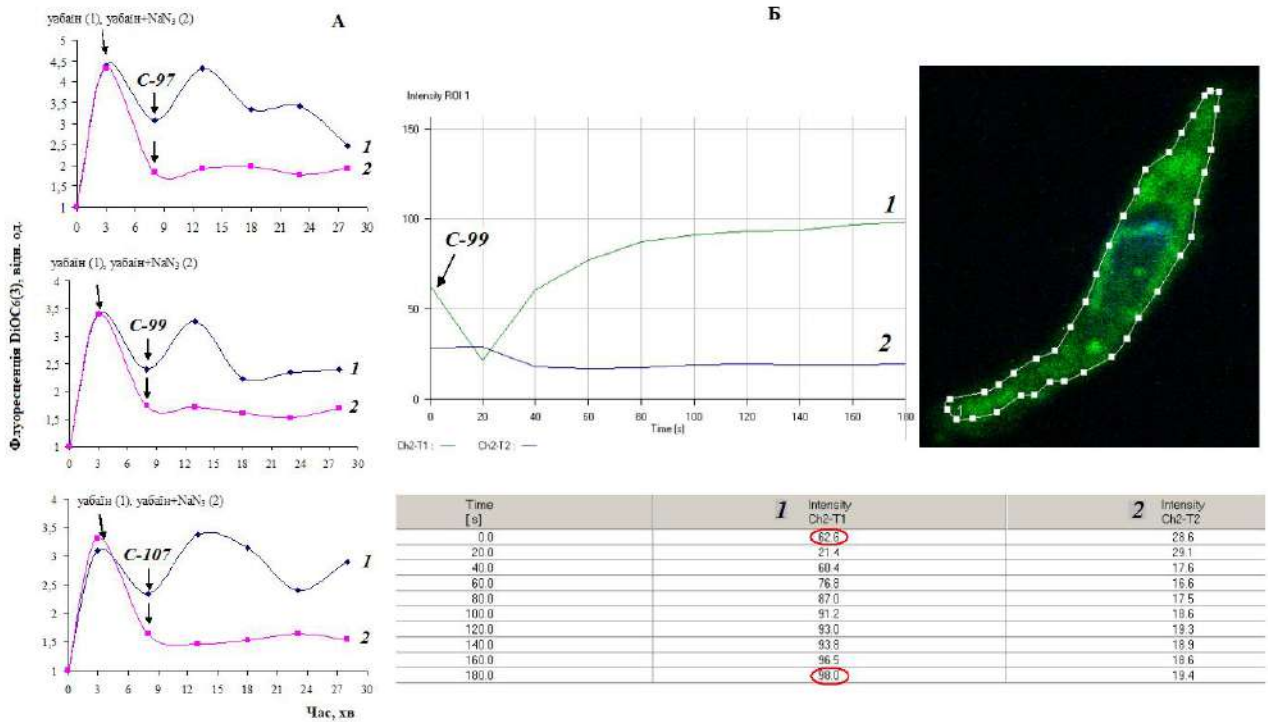


Рис. 3.5.15. Кінетичні закономірності дії калікс[4]аренів C-97, C-99, C-107 на поляризацію внутрішньої мітохондрійної мембрани. А - стрілочкою вказано момент додавання (на 3 хв інкубації клітин з зондом) 1 мМ убаїну (1) або 1 мМ убаїну+5 мМNaN₃ (2) та (на 8 хв) каліксаренів (100 нМ). Результати характерного дослідження, метод протокової цитометрії.

Б - збільшення інтенсивності флуоресценції міоциту при внесенні 100 нМ C-99, попередньо навантаженого DiOC₆(3) в присутності 1 мМ убаїну. Результати характерного дослідження, метод конфокальної мікроскопії.

Верхня панель – кінетика спалаху флуоресценції DiOC₆(3) (крива 1) після внесення C-99, крива 2 –інтенсивність флуоресценції ядерного барвника Hoechst 33342; нижня панель – цифрова презентація графічних результатів (1 – DiOC₆(3), 2 – Hoechst 33342); результати одержані на основі оцінювання інтенсивності флуоресценції, усередненої по площині оптичного зрізу міоциту (верхня панель), параметр ROI 1.

Електричний потенціал ВММ є регулятором Ca²⁺-обміну в МХ. Проведені дослідження виявили, що сполуки C-97, C-99 та C-107 у концентрації 100 нМ мають тенденцію до зниження вмісту ендogenous іонізованого Ca²⁺ в МХ за умови 5-хвилинної передінкубації з ними фракції органел (рис. 3.5.16, А). Втім зазначені зміни не є статистично значущими. Також калікс[4]арени перешкоджають наступній енергозалежній акумуляції катіона, а у разі C-99 спостерігається тенденція до ще більшого зниження вмісту іонізованого Са в матриці МХ. Внесення калікс[4]аренів у середовище інкубації після енергозалежної

аккумуляції Ca^{2+} МХ призводить до статистично значущого зниження його вмісту, навіть нижче від базального (рис. 3.5.16, Б). Ці ефекти не залежали від хімічної структури та взаєморозташування замісників у макроциклі. Також було продемонстровано, що калікс[4]арени С-97 та С-99, але не С-107, здатні стимулювати ΔpH -залежний вихід іонів Ca^{2+} з МХ гладенького м'яза матки, який за результатами наших досліджень є електрогенним (графічні дані не наведено).

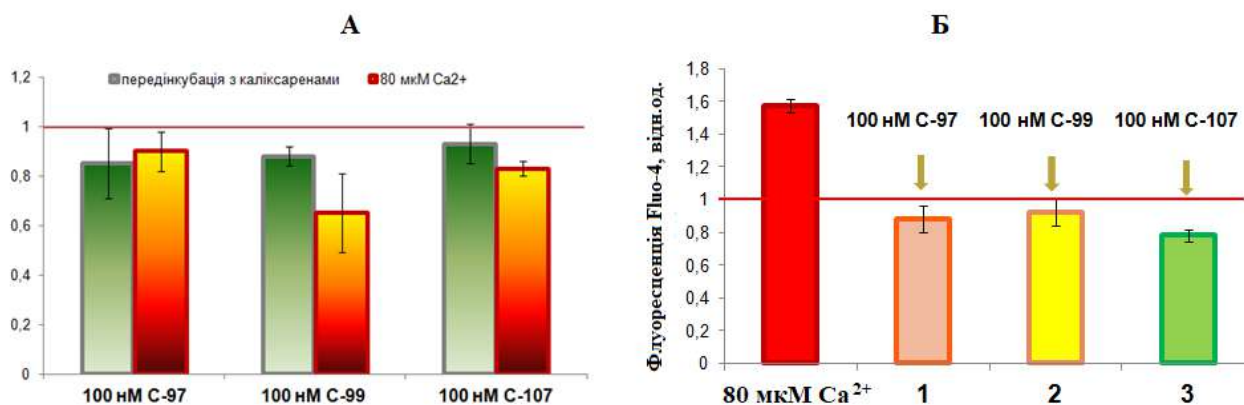


Рис. 3.5.16. Вплив калікс[4]аренів на концентрацію Ca^{2+} в матриці ізолюваних мітохондрій та енергозалежну акумуляцію Ca^{2+} органелами. $M \pm m$, $n=5$. А – передінкубація з каліксаренами протягом 5 хв (лівий стовпчик) та послідоюче додавання $80 \mu\text{M Ca}^{2+}$ (правий стовпчик). Б – додавання речовин після енергозалежної акумуляції Ca^{2+} мітохондріями.

Отже, вибрані калікс[4]арени працюють на зниження концентрації катіона в матриці. Така спрямованість впливу досліджуваних сполук може мати наслідком зниження активності Ca^{2+} -залежних мітохондрійних дегідрогеназ і відповідного гальмування роботи ЕТЛ з часом не залежно від початкового короткотривалого зростання потенціалу на ВММ. Щоб перевірити це припущення ми вивчили вплив досліджуваних калікс[4]аренів на функціональну активність ЕТЛ.

Внесення калікс[4]аренів в перші хвилини експерименту спричинювало більш інтенсивне зниження флуоресценції від NADH ізолюваних МХ (рис. 3.5.17), що може бути зумовлено стимулюванням I комплексу ЕТЛ і пояснює транзйентне зростання електричного потенціалу на ВММ. З часом флуоресценція NADH повертається до контрольних значень, що може бути наслідком зниження концентрації Ca^{2+} в матриці і відповідним гальмуванням ЕТЛ. Разом з цим має місце відсутність змін флуоресценції від FAD відносно контролю (рис.

3.5.17). Не виключено, що початковий гіперполяризуючий ефект калікс[4]аренів пов'язаний із безпосереднім впливом на ЕТЛ.

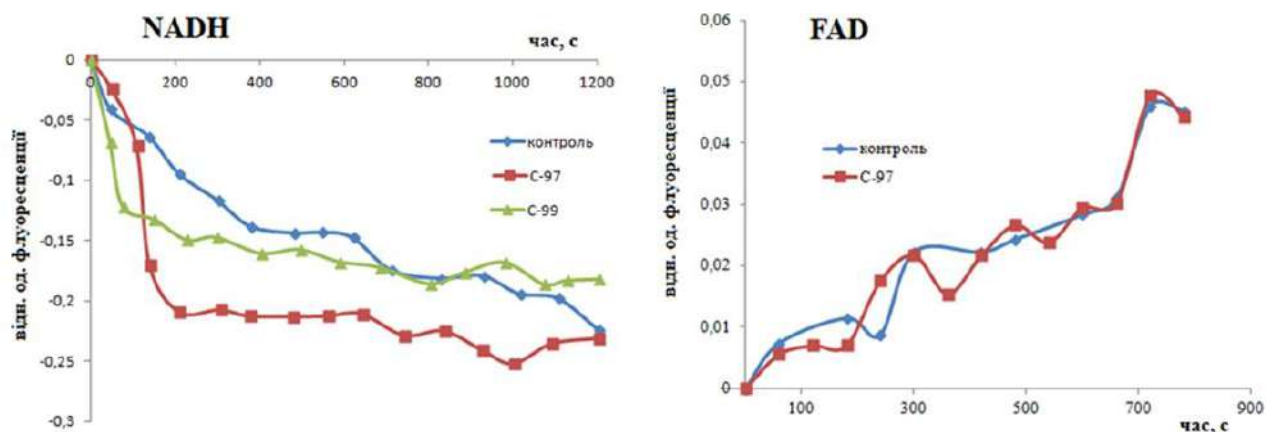


Рис. 3.5.17. Динаміка змін флуоресценції NADH та FAD в ізолюваних мітохондріях за впливу сполук C-97 та C-99 (100 нМ). Контроль – зміни флуоресценції нуклеотидів в присутності ДМСО. Дані типового експерименту

Виявлено, що вибрані калікс[4]арени (100 нМ) помірно, в межах 30 %, знижують активність мітохондрійної NO-синтази (рис. 3.5.18). Цей ефект може бути наслідком зменшення концентрації Ca^{2+} в матриксі МХ.

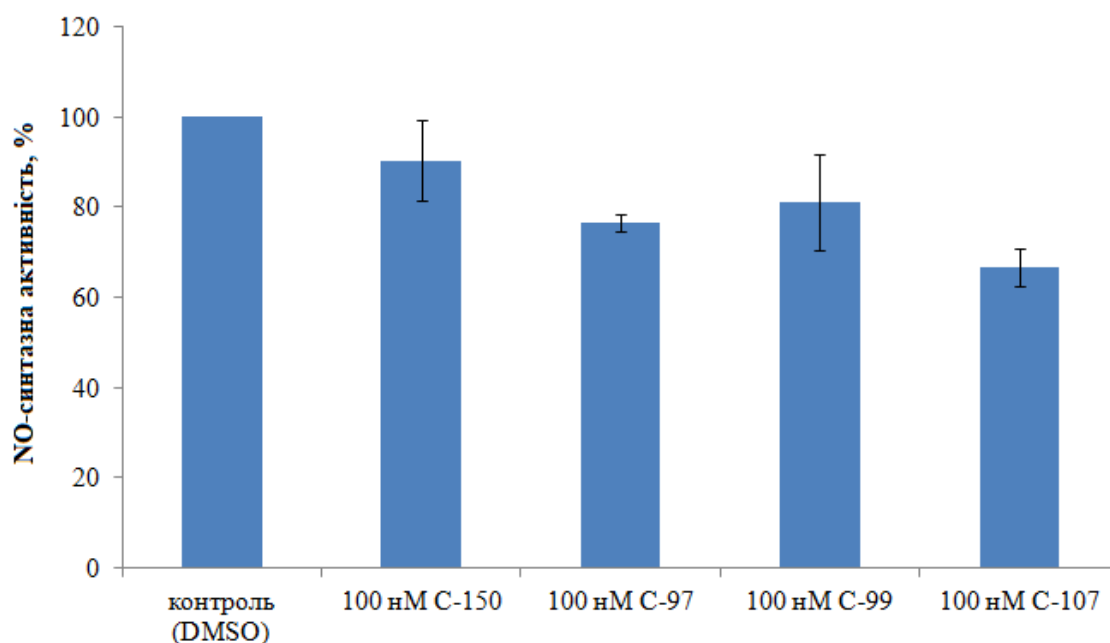


Рис. 3.5.18. Вплив вибраних калікс[4]аренів на NO-синтазну активність в ізолюваних мітохондріях. $M \pm m$, $n=5$

Також було продемонстровано, що досліджувані калікс[4]арени в концентраціях 0,1 мкМ та 1 мкМ не спричинюють посилення генерації АФК (рис. 3.5.19). Тобто, їхня дія у використаних концентраціях на МХ не призводить до розвитку оксидативного/нітрозативного стресу і відповідної мітохондрійної дисфункції. Це дуже важливо оскільки створює перспективи для їх використання як сполук, що захищають МХ від Ca^{2+} -перевантаження і гіперпродукції АФА/АФК.

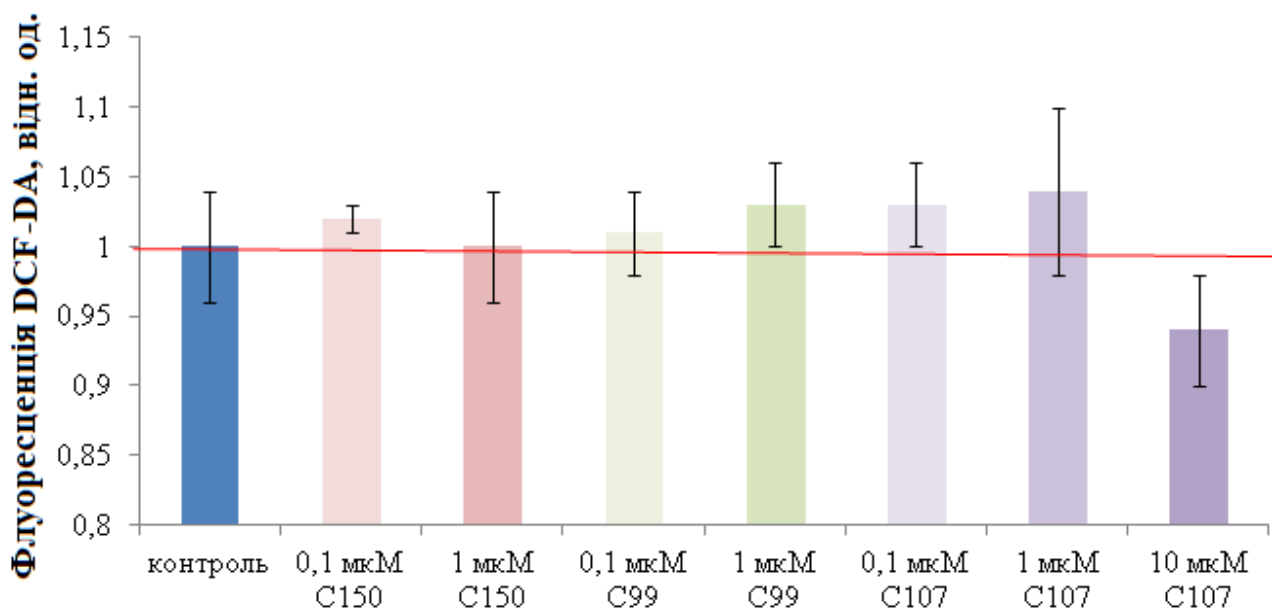


Рис. 3.5.19. Ефекти калікс[4]аренів C-99 та C-107, а також калікс[4]аренової “чаші” – C-150 на флуоресценцію DCF в ізолюваних мітохондріях. $M \pm m$, $n=5$. За “1” прийнято значення флуоресценції DCF до внесення речовин. Приведено відносні одиниці флуоресценції на 20 хв дії сполук

Беручи до уваги, що важливою морфо-функціональною ознакою МХ є їхній об’єм, нами було досліджено вплив речовин-модифікаторів функціонування дихального ланцюга та трансмембранного обміну катіонів у МХ на зміни характеристик розмірів (ГД) органел методом фотонної кореляційної спектроскопії. Середнє значення ГД МХ в контролі становить 547 ± 49 нм та відповідає їхнім ефективним розмірам (див. вище). За додавання антибіотику аламетицину ($7,5$ мкг/мл) ГД органел зростає до 800 ± 39 нм. Зміни ГД після внесення каналоформера аламетицина були прийняті в якості контролю (100 % набухання). Руйнування електро-хімічного потенціалу ВММ внаслідок впливу екзогенних ефекторів призводить до порушення осмотичного балансу між матриксом та

позамітохондрійним середовищем. На прикладі інгібіторів I, III та IV комплексів дихального ланцюга нами продемонстровано, що внесення інгібіторів ЕТЛ 5 мкМ ротенону, антимицину (1 мкг/мл), 5 мМ азиду натрію, а також протонофору СССР (10 мкМ) призводить до збільшення ГД МХ в середньому на 40 %, порівняно з контрольним набуханням (рис. 3.5.20, ліва панель). Блокування відповідних комплексів ЕТЛ призводить до зменшення електро-хімічного потенціалу ВММ, наслідком чого є порушення трансмембранного обміну катіонів, зокрема іонів К та Р_i, наслідком чого є набухання органел [16, 265]. Калікс[4]арени викликали збільшення ГД МХ на 22±6 % (С-97) та 34±8% (С-99) (рис. 3.5.20, права панель) порівняно з контрольним набуханням. Таке набухання не є критичним для функціонування МХ. Адже зростання об'єму матриксу активує дихальний ланцюг та посилення продукції АТФ [16, 265]. Більш небезпечним є, навпаки, зменшення об'єму матриксу, яке супроводжується гіперполяризацією ВММ, посиленням генерації АФК та пригніченням переносу електронів [210, 303, 491].

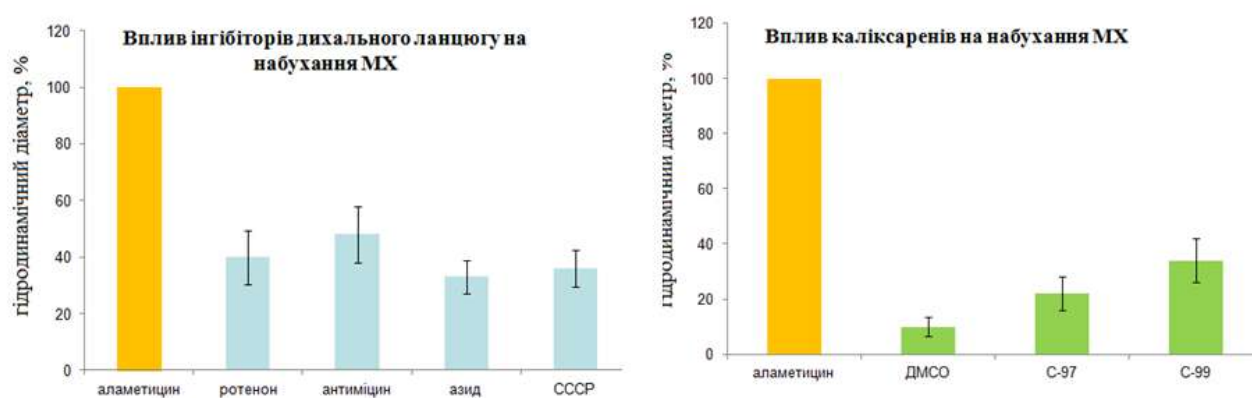


Рис. 3.5.20. Вплив інгібіторів електрон-транспортного ланцюга (5 мкМ ротенон, 1 мкг/мл антимицин, 5 мМ азид натрію, 10 мкМ СССР) та калікс[4]аренів С-97 й С-99 (100 нМ) на гідродинамічний діаметр ізолюваних мітохондрій, $M \pm m$, $n=5$

Отже, калікс[4]арени С-97, С-99 та С-107 знижують концентрацію Ca^{2+} в матриксі шляхом пригнічення енергозалежної акумуляції іонів Са МХ та стимулюванням H^+ - Ca^{2+} обмінника (С-97 та С-99), знижують Ca^{2+} -залежну НО-синтазну активність у МХ та викликають транзйентну поляризацію ВММ, з часом електричний потенціал ВММ набуває контрольних значень.

Узагальнення та обговорення результатів підрозділу 3.5.

Наразі використання супрамолекулярних макроциклів калікс[4]аренів є актуальним та перспективним з огляду на їх властивості (селективність та чутливість, біодоступність та специфічність, можливість їх візуалізації та низька токсичність). Для ГМ матки показано, зокрема, що калікс[4]арени з високою спорідненістю модулюють активність АТР-гідролаз, що привертає увагу щодо їх використання як потенційних регуляторів Ca^{2+} , NO-залежних процесів в міоцитах.

Здатність калікс[4]аренів змінювати функціональну активність субклітинних структур, зокрема МХ, ставить питання стосовно їхнього проникнення через ПМ міоцитів в міоплазму. Одержані нами результати методами спектрофлуориметрії та лазерної конфокальної мікроскопії результати із застосуванням специфічних флуоресцентних зондів та явища аутофлуоресценції калікс[4]арену С-956 вказують на те, що вибраний калікс[4]арен сорбується поверхнею ПМ та проникає в міоплазму, взаємодіючи з МХ.

Продемонстровано, що калікс[4]арен С-956 виявив виражений гальмівний вплив на H^+ - Ca^{2+} -обмінник, який обумовлений зниженням початкової швидкості V_0 та, як наслідок, збільшенням величини характеристичного часу $\tau_{1/2}$ транспортного процесу. В той же час С-956 не впливає на енергозалежну акумуляцію катіону цими субклітинними структурами, що зсуває рівновагу обміну Ca^{2+} в бік його акумуляції до матриксу.

Гальмування ΔpH -залежного вивільнення Ca^{2+} з МХ призводить до зростання концентрації катіону в матриксі, що стимулює активність Ca^{2+} -залежних ензимів, зокрема, синтази оксиду азоту. Посилення синтезу NO МХ за дії С-956 може призвести до змін у функціонуванні ЕТЛ. Нами показано, що калікс[4]арен С-956 виявляє гальмівний вплив на активність I та II комплексів дихального ланцюга: ефективність окиснення NADH та FADH_2 знижується.

NO-залежне інгібування ланцюга транспорту електронів може бути захисним фактором проти гіперпродукції АФК. Виявлено відсутність впливу сполуки С-956 на утворення АФК в МХ, що може вказувати на користь того, що процеси, які активуються/гальмуються в присутності С-956 не призводять до шкід-

ливих наслідків (тобто розвитку мітохондрійної дисфункції) для МХ гладенького м'язу матки.

Зміни у функціонуванні Na^+ , K^+ -АТРази, спричинені фізіологічно-активними сполуками, безпосередньо пов'язані із регуляцією внутрішньоклітинного Ca^{2+} -гомеостазу і, відповідно, скоротливої здатності м'язової тканини [473]. Потенціал на мітохондрійній мембрані є індикатором енергетичного та функціонального статусу МХ і клітини в цілому [303, 491]. З огляду на вищезазначене дослідження змін потенціалу ПМ і мітохондрійної мембрани під впливом фізіологічно-активних речовин є важливим завданням біомембранології.

За використання потенціалчутливого зонду $\text{DiOC}_6(3)$ та протокової цитометрії на свіжовиділених міоцитах було продемонстровано, що калікс[4]арени С-97 С-99 та С-107, які є ефективними інгібіторами Na^+ , K^+ -АТРази ПМ, знижують поляризацію плазмалеми, внаслідок їх убаїнподібної дії на ензим. Крім того, за умови деполаризації ПМ у присутності убаїна, досліджувані сполуки викликали транзйентне зростання мембранного потенціалу МХ. Вибрані калікс[4]арени С-97, С-99 та С-107 пригнічують енергозалежну акумуляцію Ca^{2+} МХ міометрія та знижують концентрацію катіона, попередньо накопиченого в енергозалежному процесі, стимулюючи H^+ - Ca^{2+} -обмінник їхньої внутрішньої мембрани (С-97 та С-99). Зниження концентрації Ca^{2+} в матриксі може призвести до зменшення активності Ca^{2+} -залежних мітохондрійних дегідрогеназ і відповідного гальмування роботи ЕТЛ, а також мітохондрійної NOS. Останній факт доведений нами експериментально. Внесення досліджуваних калікс[4]аренів спричинювало більш інтенсивне зниження флуоресценції від NADH ізольованих МХ, що може бути зумовлено стимулюванням I комплексу ЕТЛ. Попри початкове транзйентне зростання потенціалу ВММ, вихід іонів Са з матриксу, спричинений досліджуваними сполуками, з часом призводить до зниження активності ЕТЛ.

Отже, досліджені нами калікс[4]арени можуть бути в перспективі використані як регулятори Ca^{2+} -гомеостазу в МХ та ефективності функціонування ЕТЛ. Одним з механізмів цих ефектів є Ca^{2+} -опосередкована дія калікс[4]аренів на mtNOS та NO-залежний вплив на функціонування МХ. Важливим для їхнього майбутнього застосування у практиці є те, що калікс[4]арени не підвищують продукцію АФК в МХ.

Результати опубліковані [27, 38, 177, 180, 183, 274]

РОЗДІЛ 4. ЗАКЛЮЧНИЙ РОЗДІЛ

Оксид азоту визнано універсальною месенджерною і регуляторною молекулою. В залежності від концентрації та хімічного мікрооточення NO виявляє функціональну активність, впливаючи на перебіг фізіологічних процесів, або бере участь у розвитку різноманітних патологічних станів. За низьких концентрацій оксид азоту взаємодіє з біологічними мішенями, зумовлюючи антиоксидантні ефекти. Високі концентрації NO, опосередковано через утворення високореактивних форм азоту при реакції з молекулярним киснем або АФК (наприклад, пероксинітриту), виявляють прооксидантні ефекти й призводять до розвитку нітрозативного/оксидативного стресу [219]. Оксид азоту виступає ключовим гравцем у багатьох фізіологічних процесах: регулює тонус і проникність кровоносних судин, знижує агрегацію формених елементів крові та їхню адгезію до судинної стінки, бере участь у функціонуванні нервової, ендокринної, імунної систем [232, 293, 338, 442]. Наразі доведено значення оксиду азоту в процесах релаксації міометрія та зменшення його чутливості до утероконстрикторних агентів, що має місце за вагітності в умовах підвищеного рівня прогестерону в тканинах матки (прогестеронова блокада) [145, 413].

Ряд дослідників розглядають МХ як основну мішень дії NO. МХ відіграють ключову роль для нормальної життєдіяльності клітин, являючись біоенергетичною машиною клітини, місцем перебігу універсальних метаболічних процесів, джерелом активних форм азоту і кисню, регулятором запуску апоптозу/некрозу та ряду інших спеціалізованих функцій. Чільне місце посідає їхнє значення в підтриманні внутрішньоклітинного Ca^{2+} -гомеостаза, адже МХ є високоємнісним Ca^{2+} -депо, здатні термінувати Ca^{2+} -сигнал, а також підтримувати низьку фізіологічно-значущу концентрацію цього катіона в цитозолі, захищаючи клітини від Ca^{2+} -перевантаження [54, 107, 151, 240, 379, 389, 424]. Водночас біологічна активність МХ має Ca^{2+} -залежний характер: зростання концентрації Ca^{2+} в матриксі активує ензими циклу трикарбонових кислот та синтез АТФ, а перевантаження органел катіоном індукує клітинну загибель [68, 205, 229, 379]. Потужним регулятором енергетичних, метаболічних і транспортних процесів у

МХ, виступає оксид азоту. Результати сучасних досліджень підтверджують роль NO як важливої ланки підтримання оптимальної концентрації іонів Ca як у міоплазмі, так і мітохондрійному матриксі [236, 440].

Скоротлива активність гладеньких м'язів контролюються передусім іонами Ca, низька фізіологічно значуща концентрація яких у міоплазмі підтримується за рахунок функціонування системи NO [84, 469]. Роль оксиду азоту в репродуктивній жіночій системі як токолітичного агента набуває особливого значення за нормального перебігу виношування плоду з ростом терміну вагітності: продукція NO та чутливість до нього знижуються наприкінці вагітності, що передуює початку пологової активності [98, 145, 211, 337, 413]. В основі порушення Ca²⁺-гомеостазу й спричиненої цим клітинної патології може лежати дезорганізація роботи Ca²⁺-транспортувальних систем, локалізованих в мембранах МХ, які виконують функцію вискоєфективного Ca²⁺-депо внаслідок спроможності акумулювати та вивільнювати значні кількості катіону [89, 240, 244, 420]. Руйнація узгодженого функціонування Ca²⁺-транспортувальних систем, які локалізовані у ВММ, може призвести до явища Ca²⁺-перевантаження матриксу, гіперполяризації, порушення Ca²⁺-залежного метаболізму АФА та АФК та їхньої гіперпродукції. Спричинений цими процесами нітрозативний/оксидативний стрес має наслідком, за умови недостатнього функціонування захисних систем, дисфункцію МХ, проявом якої є порушення функціонування ЕТЛ, гіпер/деполяризація (незворотня) внутрішньої мембрани, руйнація осмотичного балансу між матриксом МХ та міоплазмою тощо [130, 149, 191, 212, 230, 237, 247, 290, 391]. Перелічені явища супроводжують контрактильну дисфункцію гладенького м'язу за патологічних станів різного генезу. У випадку міометрія вони можуть бути причинами передчасних пологів, зриву вагітності, які обумовлюють неонатальну смертність. Здатність NO розслабляти міометрій зумовлює інтерес до вивчення біохімічних закономірностей його синтезу в ГМК матки та впливу на Ca²⁺-гомеостаз клітин міометрія. Наразі показано, що джерелами NO в матці можуть слугувати її ендометріальна тканина, ендотелій судин та нервові закінчення, а також плацента за вагітності [33-34, 145, 147, 326, 448, 477]. Синтез NO, переважно досліджений в матці вагітних людини та тварин, забезпечу-

ється eNOS та iNOS, експресія та регуляція яких знаходяться під впливом прогестерона [215, 269, 327]. Припускають, що iNOS відповідає за великі кількості NO, які генерується в матці та плаценті за вагітності, водночас як eNOS бере участь в вазодилатції в цей період [137, 228, 492]. Наразі фактів щодо базального синтезу NO в міоцитах у стані відносного спокою в літературі не наведено. Але, виходячи з аналізу даних літератури стосовно інших тканин, потужним джерелом NO в міометрії можуть слугувати МХ [212, 230, 236, 450, 482]. Оксид азоту у фізіологічних концентраціях (наномолярних) розглядають як протекторну молекулу, яка здатна захищати органели від дисфункції, спричиненої гіперполяризацією внутрішньої мембрани, надлишковою продукцією АФК і окисним стресом [195, 230, 236, 290, 333, 362, 386, 431, 440, 478].

З огляду на важливість оксиду азоту як сигнальної і регуляторної молекули в контролі скоротливої функції гладеньких м'язів, що зумовлює нормальну роботу внутрішніх органів, зокрема й міометрія, нагальним є вирішення трьох фундаментальних наукових питань: 1 – дослідження біохімічних закономірностей біосинтезу NO в МХ міоцитів; 2 – вивчення молекулярних механізмів дії оксиду азоту як можливого ендогенного специфічного регулятора концентрації Ca^{2+} в міоцитах та функціонування Ca^{2+} -транспортувальних систем МХ, а також біоенергетичних процесів, зокрема роботи ЕТЛ та поляризації їхньої внутрішньої мембрани; 3 – пошук екзогенних нетоксичних модуляторів функціональної активності МХ, які б мали мішенню впливу їхню NO-синтазну здатність, біоенергетику та Ca^{2+} -гомеостаз.

В ході виконання експериментальної частини роботи нами вперше із застосуванням NO-чутливого флуоресцентного зонду DAF-FM, методів лазерної конфокальної мікроскопії та протокової цитометрії продемонстровано утворення NO в МХ ГМК матки. Значення кінетичних параметрів реакції біосинтезу NO (уявної константи Міхаеліса за L-аргініном та константи активації за Ca^{2+}) знаходяться в межах фізіологічних значень їхніх концентрацій у матриксі МХ. Синтез NO в МХ є чутливим до інгібіторів конститутивних NO-синтаз (N^G -нітро-L-аргініна та 2-амінопіридина) та Ca^{2+} -уніпортера, пригнічується антагоністами кальмодуліна (кальмідазоліумом і трифлюоперазином), а також іонами

Mg. Біосинтез оксиду азоту в МХ суттєво залежить від енергізації й величини електрохімічного градієнту іонів водню на ВММ. Одержані нами результати переконливо свідчать про те, що синтез NO забезпечується Ca^{2+} -залежною конститутивною NOS, не виключено що nNOS, та залежить від ефективності надходження іонів Ca та функціональної активності комплексів ЕТЛ.

З використанням детергентної техніки та специфічного інгібітора SERCA помпи тапсигаргіна показано, що джерелами оксиду азоту, які забезпечують його синтез в клітинах гладенького м'язу матки, можуть виступати також NOS, асоційовані з ПМ та, можливо, CP.

Можливість біосинтезу NO в МХ ГМК матки та наявність значної кількості його молекулярних мішеней у ВММ та матриксі (високий вміст тіольних залишків, залізо-сірчаних центрів та гемових груп) вказують на те, що оксид азоту є важливим регулятором функціональної активності цих органел [290, 362, 371, 482]. Особливо важливим може бути вплив нітросполук на системи ВММ, що контролюють Ca^{2+} -гомеостаз МХ, оскільки від концентрації Ca в матриксі залежить функціональна активність комплексів ЕТЛ, ефективність біоенергетичних процесів та рівень електричного потенціалу на мітохондрійній мембрані [89, 240, 244, 420].

Електричний потенціал на ВММ є інтегральним показником активності ЕТЛ та основним регулятором метаболічних та транспортних процесів у МХ. З використанням лазерної конфокальної мікроскопії та протокової цитометрії нами продемонстровано, що руйнування електрохімічного градієнта протонів на ВММ супроводжується зростанням концентрації іонів Ca в міоплазмі клітин гладенького м'язу матки, що доводить суттєву роль цих субклітинних структур у підтриманні Ca^{2+} -гомеостазу міоцитів. Є підстави очікувати, що нітросполуки будуть впливати на компоненти ЕТЛ, електричний потенціал органел та регулювати активність Ca^{2+} -транспортувальних структур МХ.

Як нітросполуки ми використали нітропрурид та нітрит натрія – донор та попередник NO відповідно. SNP утворює в розчинах катіон нітрозонію, який виявляє властивості потужного нітрозилуючого агенту. SN продукує NO (пере-

важно в кислому середовищі) та його редокс-похідні за присутності гемових груп та залізо-сірчаних комплексів, на які багаті МХ [65].

Встановлено, що енергозалежна акумуляція Ca^{2+} в МХ, чутлива до рутенієвого червоного, стимулюється SNP та SN; цей ефект опосередкований активацією Ca^{2+} -уніпортера та не залежить від функціонування циклоспоринчутливої РТР. Він може мати значення для швидкого зниження концентрації катіона в цитоплазмі після Ca^{2+} транз'єнта. З іншого боку, система вивільнення Ca^{2+} з МХ міометрія, яка здійснюється за участі H^+ - Ca^{2+} -обмінника і являє собою, як нами з'ясовано, протеїн LETM 1, є резистентною до впливу оксиду азоту. Відсутність ефекту NO на H^+ - Ca^{2+} -обмінник дозволяє протікати ΔpH -залежному процесу вивільнення Ca^{2+} з матриксу МХ за умови перевантаження матриксу катіоном і подальшій його акумуляції СР, що дозволяє припустити наявність мембранних механізмів, які захищають МХ від небезпечного Ca^{2+} -перевантаження.

Іони Са у функціонально значущих концентраціях регулюють біоенергетичні процеси в МХ та впливають на продукцію NO мітохондрійною NOS. Поряд з цим існує феномен Ca^{2+} -перевантаження МХ, асоційований з такими негативними процесами як нітрозативний/оксидативний стрес, різке падіння електричного потенціалу на ВММ, відкриття РТР, біоенергетичний колапс тощо. Всі ці події мають наслідком розвиток апоптозу або некрозу. Одним із важливих процесів, пов'язаних з мітохондрійною дисфункцією, є порушення осмобалансу між матриксом та позамітохондрійним середовищем, набухання МХ, розпрямлення крист, розрив ЗММ, що супроводжується вивільненням факторів апоптозу в цитозоль. Припускають, що помірні концентрації NO здатні запобігати цим процесам, зокрема, знижуючи проникність РТР [108, 289, 362].

Наші дослідження продемонстрували, що NO може чинити протекторну дію на МХ шляхом помірною зниження електричного потенціалу на їхній внутрішній мембрані через пригнічення роботи ЕТЛ, яке відображається у гальмуванні окиснення FADH_2 . Крім того, оксид азоту протидіє процесам набухання МХ, спричиненим висококальцієвим розчином.

Отже, нами зареєстроване посилення акумуляції Ca^{2+} в МХ на фоні помірного зниження трансмембранного потенціалу під впливом NO. Зміни потенціалу на ВММ може мати значення для потенціалзалежних процесів транспорту іонів через мембрану (обмінників, транслокаторів), зокрема змінюючи активність Ca^{2+} -уніпортеру. В даному випадку, ймовірно, мішенню дії нітросполук виступають функціонально важливі тіольні групи Ca^{2+} -уніпортеру, нітрозилування яких супроводжується стимулюванням енергозалежного транспорту Ca^{2+} , водночас рушійна сила електрофоретичної акумуляції лишається цілком достатньою для ефективного накопичення катіону. З іншого боку, помірний деполяризуючий ефект NO може бути наслідком початкового посилення транспорту Ca^{2+} (позитивно заряджених іонів) крізь ВММ, що надалі спричинює стимулювання активності комплексів ЕТЛ і відновлення рівня поляризації мембрани. Поряд з цим, зростання концентрації іонів Ca в МХ супроводжується стимуляцією Ca^{2+} -залежного синтезу ними NO. Отже, транспорт Ca^{2+} в МХ, зміни мембранного потенціалу їхньої внутрішньої мембрани та біосинтез NO є взаємокерованими процесами. Зниження електричного потенціалу на ВММ за дії NO може захищати МХ від гіперполяризації, посилення транспорту Ca^{2+} в матрикс та гіперпродукції АФК.

Концентрація Ca^{2+} в матриксі та функціонування Ca^{2+} -транспортувальних систем, ефективність окислення аденінових нуклеотидів ($\text{NADH}/\text{FADH}_2$), інтенсивність генерації АФК та об'єм органел є фундаментальними показниками функціонування МХ. Перелічені біофізикохімічні параметри впливають або залежать від потенціалу ВММ, а ефектори, що його змінюють, зокрема нітросполуки, будуть модулювати функціональну активність органел. Можливість одночасного моделювання цих процесів важливе для розуміння функціонування МХ як цілісної системи і дасть змогу передбачити наслідки порушення окремих компонентів ЕТЛ для біоенергетики, Ca^{2+} -гомеостазу та запрограмованої клітинної смерті. Формалізація і узагальнення експериментальних результатів та пошук відповідності між теоретичними передбаченнями та реальними експериментальними даними вимагають застосування імітаційного моделювання. Нами створено імітаційну модель у термінах функціональних гібридних мереж

Петрі, яка відтворює функціональну активність МХ, а саме одночасне протікання процесів окислення NADH/FADH₂, утворення АФК та зміни їхнього гідродинамічного діаметру. При моделюванні отримані математичні рівняння, що формалізують та описують концентраційно-часові залежності перебігу перелічених процесів у середовищі за дії азиду натрія, який в літературі розглядають як непрямий донор NO [82], з можливістю передбачення інтенсивності їхнього протікання. Зокрема було спрогнозовано відповідь МХ у часі на дію NaN₃ у концентрації, яка в експерименті не використовувалася.

Із застосуванням методології солокалізації флуоресцентних зондів, а саме потенціалчутливого DiOC₆(3) та специфічного щодо енергізованих МХ MitoTracker Orange CM-H₂TMRos, а також методу лазерної конфокальної мікроскопії, продемонстровано, що МХ мають навколядерне та присарколемне розташування в міоцитах матки. Плазмалема і МХ в наших експериментальних умовах володіють стабільним у часі електричним потенціалом. Оксид азоту, що синтезується в МХ, або позаклітинного походження (ендометрій, ендотелій судин, донори та попередники NO) може впливати на електричний потенціал ПМ та відповідні катіон-транспортувальні системи в ній. Центральним етапом E(Ф)МС є зростання концентрації іонів Са в міоплазмі шляхом його пасивного транспорту за концентраційним градієнтом із поза- та внутрішньоклітинних пулів внаслідок взаємоузгодженого функціонування каналних структур ПМ і СР [84, 152, 309, 373, 387, 441, 462, 469, 485]. Релаксуючий ефект NO в ГМК пов'язують із зростанням вмісту cGMP в міоплазмі [133], альтернативним напрямком дії NO в гладеньких м'язах, зокрема і в міометрії, може бути безпосередній вплив (шляхом S-нітрозилювання) на катіон-транспортувальні системи плазмалеми, який здійснюється нітрозилюючими похідними оксиду азоту [99-100, 232, 242, 447, 486].

Наші дослідження показали, що в ГМК матки поляризуючий ефект оксиду азоту обумовлений зростанням К⁺-проникності плазмалеми і залежить від іонів Са. Це дозволяє припустити, що він пов'язаний саме із активацією Са²⁺-залежних К⁺-каналів, можливо опосередкованою нітрозилюванням тіольних залишків протеїнів, що утворюють канал, або РК А/РК G-залежними шляхами

[95, 123-124, 261, 286]. Локальне субсарколемне зростання концентрації Ca^{2+} може відбутися, як свідчать результати наших експериментів, внаслідок тимчасового пригнічення оксидом азоту РМСА. Збільшення K^+ -проникності ПМ за умови спокою міоцитів здатне виступати важливим Ca^{2+} , NO-залежним фактором підтримання відносної незбудливості міомерія в період вагітності. Зростання електричного потенціалу на ПМ за дії нітросполук можна пояснити також зареєстрованим нами сGMP-залежним стимулюванням активності Na^+, K^+ -АТРази. Вірогідним наслідком активації різних підтипів K^+ -каналів оксидом азоту є гіперполяризація плазмалеми, що має наслідком зміщення мембранного потенціалу від його порогових значень необхідних для активації іон-транспортувальних систем [123, 414] та зменшення концентрації Ca^{2+} в міоплазмі.

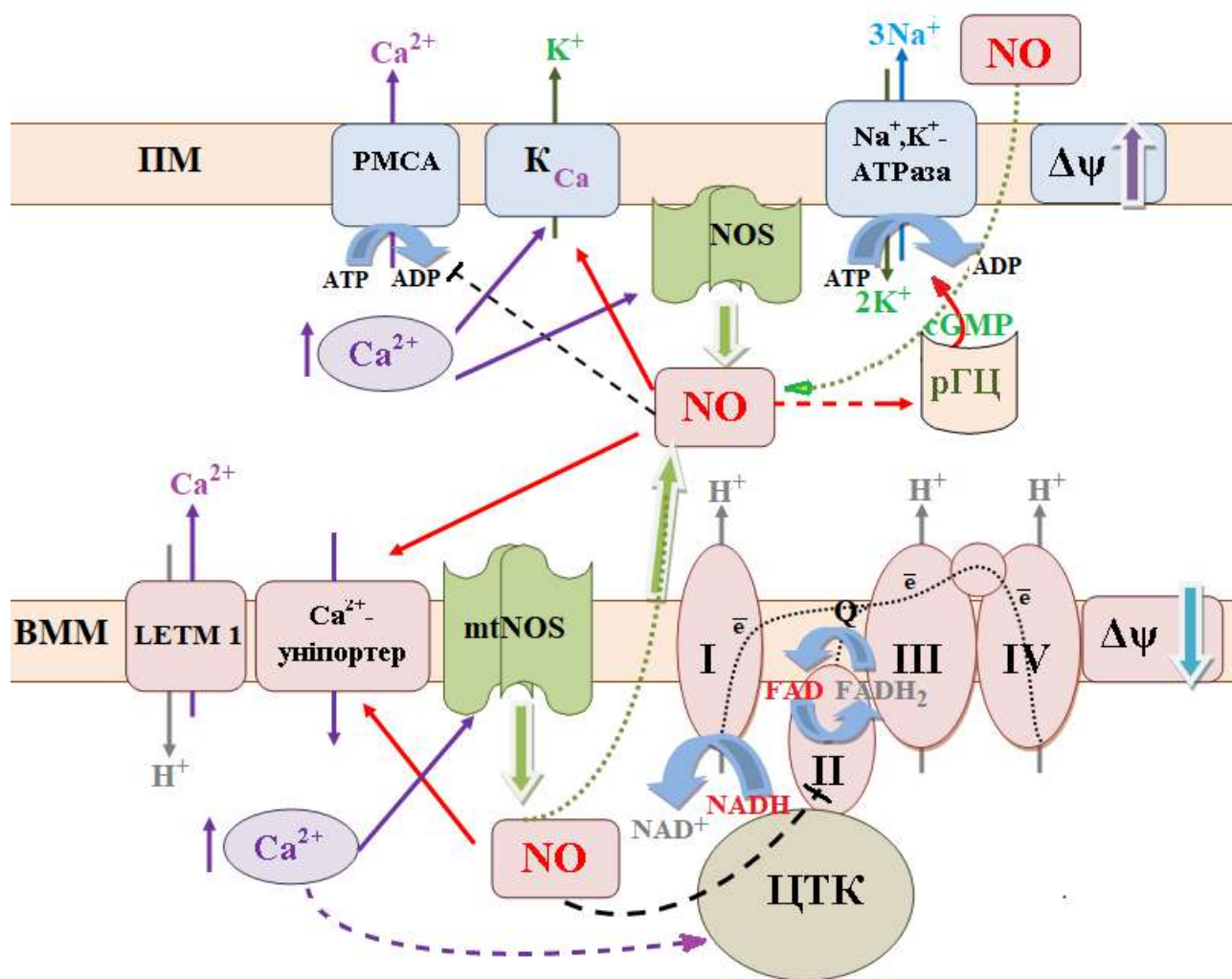


Схема 1. Біохімічні механізми, що лежать в основі регуляторної дії NO на рівні мітохондрій та плазматичної мембрани в міоцитах матки

Наші результати підтверджують факт впливу оксиду азоту на Ca^{2+} -гомеостаз, а саме пригнічення шляхів підвищення іонів Ca^{2+} в міоплазмі у разі дії на міоцити карбахолу та окситоцину. Поряд з цим донори оксиду азоту SNP та SN викликали збільшення характеристичних розмірів міоцитів, що корелює з даними літератури про здатність NO викликати релаксацію ГМК.

Результати наших пріоритетних досліджень щодо механізмів синтезу NO в МХ, його регуляторної ролі в біохімічних процесах обміну Ca^{2+} , поляризації субклітинних структур, редокс-стану аденінових нуклеотидів, Ca^{2+} -гомеостазу міоцитів матки представлено на схемі 1.

Наразі залучення методів математичного моделювання, зокрема із використанням методології аналізу динамічних дискретних систем, є перспективним для комплексного дослідження функціонування МХ [202, 308, 465]. З використанням функціональних гібридних мереж Петрі було створено імітаційну модель МХ, яка відтворює функціональну активність мітохондрій, а саме одночасне протікання процесів окислення $\text{NADH}/\text{FADH}_2$, утворення АФК та зміни їхнього гідродинамічного діаметру за дії азиду натрія. Одержані при моделюванні рівняння формалізують одночасні процеси мітохондрійного набухання, змін NADH та DCF-флуоресценції в середовищі, де присутній NaN_3 , і спроможні адекватно описати часові та концентраційні характеристики зазначених процесів, а також передбачити інтенсивність їхнього протікання. Зокрема було спрогнозовано відповідь МХ у часі на дію 10 мМ NaN_3 – концентрацію, яка в експерименті не використовувалася.

Важливість нормального перебігу біохімічних процесів у МХ для функціонування клітини, а також безпосередній зв'язок між мітохондрійною дисфункцією та розвитком патологій гладенького м'язу зумовлюють пошук екзогенних нетоксичних сполук, які б могли ефективно та вибірково регулювати транспорт Ca^{2+} у ВММ та впливати на Ca^{2+} -залежні процеси, зокрема синтез АФА, АФК та мітохондрійну біоенергетику. Для вирішення цієї задачі ми звернули увагу на супрамолекулярні макроцикли калікс[4]арени, які є малотоксичними, володіють широким спектром біологічної активності і, що особливо важливо, є

перспективними для використання їх як модуляторів Ca^{2+} -залежних процесів [5, 15, 62, 66, 350, 358].

Здатність окремих калікс[4]аренів пригнічувати активність Ca^{2+} -помп ПМ та СР в гладеньких м'язах привертає увагу до цих сполук як можливих регуляторів Ca^{2+} -гомеостазу міоцитів [456-457]. Зазначені транспортувальні АТРази підтримують низьку концентрацію іонів Са в міоплазмі, а також забезпечують зниження концентрації катіона після Ca^{2+} транз'єнта, забезпечуючи релаксацію гладеньком'язової клітини. В роботі [457] продемонстровано, що додавання до міоцитів калікс[4]арену С-956 призводить до зростання вмісту іонізованого Ca^{2+} в цитоплазмі, скоріше за все, внаслідок інгібування Ca^{2+} -помпи ПМ (та не виключено що й СР), з подальшим незначним зниженням його вмісту. Досліджувана сполука зменшувала об'єм міоцитів, аналогічно до дії утеротоніка окситоцина. Факт зниження рівня іонізованого Ca^{2+} в умовах інгібування РМСА та SERCA дозволяє припустити залучення інших транспортувальних механізмів зменшення концентрації Ca^{2+} в цитоплазмі, зокрема локалізованих у МХ.

Наші дослідження продемонстрували можливість проникнення калікс[4]арена С-956 в міоплазму клітин та його взаємодію з МХ. Калікс[4]арен С-956 ефективно інгібує H^+ - Ca^{2+} -обмінник у МХ, не впливаючи на енергозалежну акумуляцію Ca^{2+} . Це свідчить на користь можливого залучення МХ у процес зниження концентрації катіона в міоплазмі за дії вибраного калікс[4]арена. Сполука С-956 стимулює мітохондрійну NO-синтазу, можливо внаслідок зростання концентрації Ca^{2+} в матриксі МХ, і гальмує окислення NADH та FADH_2 в ЕТЛ, що має результатом зниження поляризації мітохондрійної мембрани. Поряд з цим, С-956 не спричинює утворення АФК в МХ. Отже, досліджувана сполука шляхом Ca^{2+} -залежного впливу на біосинтез NO може мати корегувальний ефект на МХ, знижуючи інтенсивність окисного фосфорилування і захищаючи клітини від енергетичного перевантаження.

Наразі актуальним є пошук сполук, які могли б спрямовано впливати на поляризацію ПМ та ВММ, оскільки електричний потенціал є регулятором функціонування локалізованих в них катіон-транспортувальних систем, зумовлюючи зміни концентрації Ca^{2+} в цитоплазмі, необхідні для регуляції скоротливої

здатності ГМК. Показаний інгібувальний вплив калікс[4]аренів С-97, С-99, С-107 на Na^+ , K^+ -АТРазну активність в міоциті, аналогічно до дії убаїну [20, 24]. Отже, зазначені сполуки здатні змінювати електричний потенціал ПМ.

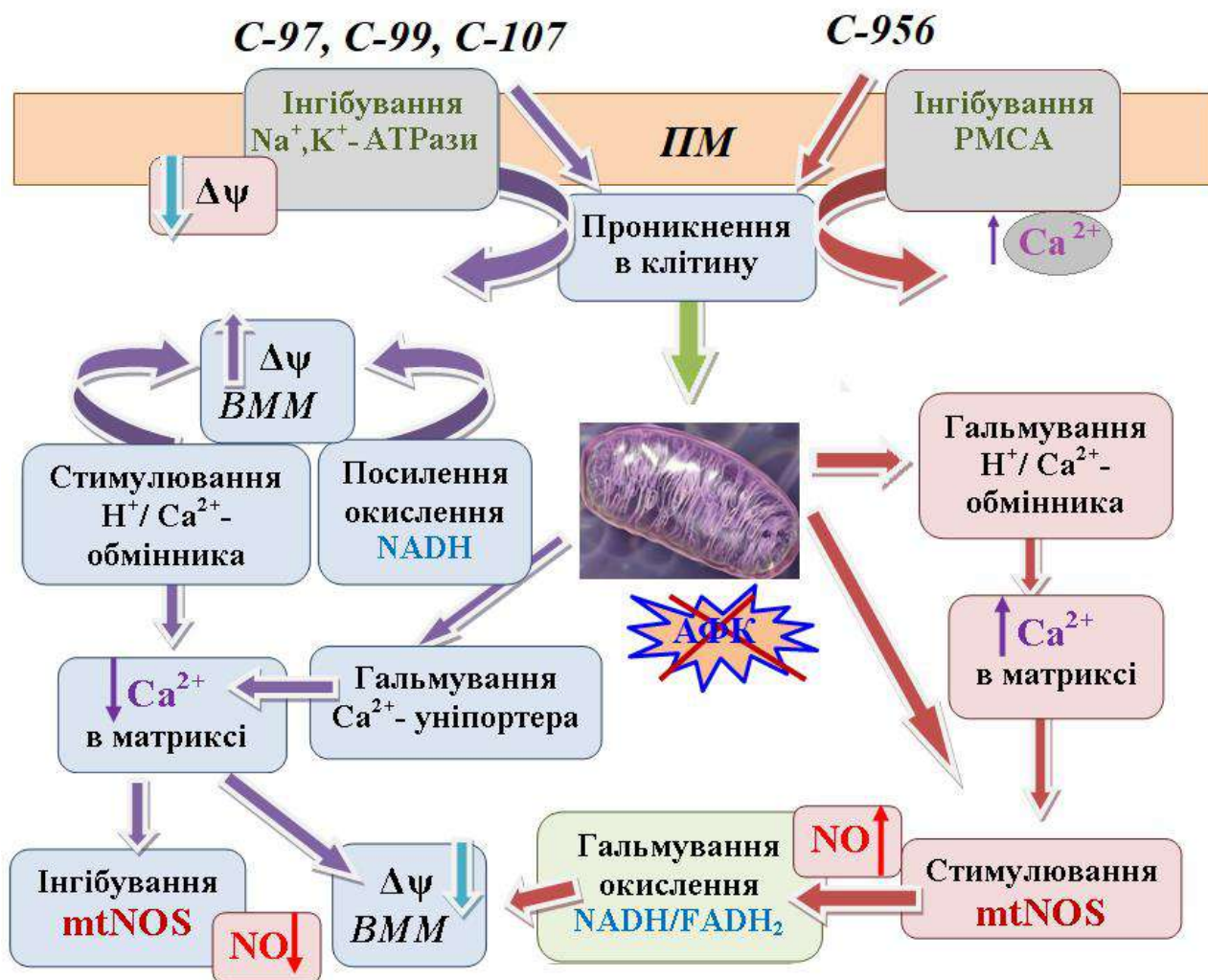


Схема 2. Шляхи та механізми впливу досліджуваних калікс[4]аренів на концентрацію Ca^{2+} в мітохондріях, синтез NO та функціонування електронотранспортного ланцюга

Нами показано, що калікс[4]арени С-97, С-99 та С-107 викликають деполаризацію ПМ міоцитів матки. Проникаючи в міоплазму та взаємодіючи з МХ, сполуки С-97, С-99 та С-107 викликають інгібування Ca^{2+} -уніпортера ВММ і одночасну стимуляцію її H^+ - Ca^{2+} -обмінника (С-97, С-99), що призводить до відповідного зменшення концентрації Ca^{2+} в матриксі та помірного пригнічення активності mtNOS. Поряд з цим має місце транзійтна гіперполяризація мітохондрійної мембрани, яка пов'язана з початковим посиленням окислення NADH та, можливо, стимулюванням електрогенного H^+ - Ca^{2+} -обмінника, водночас не спостерігається посилення генерації АФК за дії досліджуваних сполук. Зареєс-

троване за цих умов уповільнення інтенсивності функціонування ЕТЛ через зменшення концентрації Ca^{2+} в матриксі може мати наслідком відновлення рівня поляризації МХ.

Відсутність впливу всіх досліджуваних калікс[4]аренів на утворення АФК в МХ може вказувати на користь того, що процеси, які активуються/гальмуються за їх присутності не призводять до шкідливих для МХ наслідків (тобто розвитку мітохондрійної дисфункції). Водночас шляхом посилення/пригнічення біосинтезу NO вони можуть мати модулюючий вплив на функціонування ЕТЛ і біоенергетику МХ. Шляхи та механізми впливу калікс[4]аренів на концентрацію Ca^{2+} в МХ, синтез NO та функціонування ЕТЛ викладено в схемі 2.

Таким чином, вибрані калікс[4]арени є ефективними модуляторами синтезу оксиду азоту в МХ та Ca^{2+} -залежних біоенергетичних процесів і можуть бути використані в біохімічних дослідженнях як регулятори скорочення/розслаблення міометрія.

ВИСНОВКИ

На підставі одержаних даних сформовано уявлення про мітохондрії як джерело оксиду азоту в гладеньком'язових клітинах матки та можливого значення NO у функціонуванні цих субклітинних структур. Встановлено можливість утворення NO та вивчено біохімічні закономірності реакції його синтезу в мітохондріях міометрія. Доведено роль оксиду азоту як ендogenous регулятора концентрації Ca^{2+} в міоцитах, функціонування Ca^{2+} -транспортувальних систем мітохондрій, електрон-транспортувального ланцюга та поляризації їхньої внутрішньої мембрани. Продемонстровано, що вибрані представники калікс[4]аренів можуть виступати модуляторами функціональної активності мітохондрій, а саме – впливати на їхню NO-синтазну здатність, біоенергетику та Ca^{2+} -гомеостаз.

1. Доведена можливість утворення оксиду азоту в мітохондріях клітин гладенького м'язу матки. Інгібітори електрон-транспортувального ланцюга мітохондрій пригнічують біосинтез оксиду азоту в пермеабілізованих міоцитах.

2. Встановлено, що константа активації за Ca^{2+} NO-синтазної реакції в ізольованих мітохондріях міометрія відповідає діючій концентрації цього катіона в зазначених субклітинних структурах, а уявна константа спорідненості за L-аргініном – відповідним значенням для мітохондрійних NO-синтаз з інших тканин. Доведено, що ефективність синтезу оксиду азоту мітохондріями залежить від ступеня їхньої енергізації та концентрації Ca^{2+} , причому утворення NO пригнічується антагоністами кальмодуліну та інгібіторами конститутивних NO-синтаз N^G -нітро-L-аргініном і 2-амінопіридином.

3. Чутливе до протонатора СССР та рутенієвого червоного енергозалежне накопичення Ca^{2+} в мітохондріях стимулюється оксидом азоту. Цей ефект зумовлений активацією Ca^{2+} -уніпортера і не залежить від функціонування циклоспорин-чутливої пори перехідної провідності.

4. Встановлено, що H^+ - Ca^{2+} обмін (стехіометрія 1:1) здійснюється за участі протеїна LETM 1, супроводжується зниженням концентрації Ca^{2+} в матриксі з одночасним закисленням останнього, активується за фізіологічних значень рН,

регулюється кальмодуліном і є резистентним до дії оксиду азоту.

5. Показано, що оксид азоту гальмує зростання концентрації Ca^{2+} в міоцитах матки, спричинене дією карбахолу та окситоцину. NO викликає збільшення електричного потенціалу на плазматичній мембрані (її гіперполяризацію) шляхом активації Ca^{2+} -залежних K^+ -каналів та cGMP-залежної стимуляції Na^+ , K^+ -АТРази. Ці мембранні та іонні ефекти можуть бути одними з механізмів протидії збільшенню концентрації Ca^{2+} в міоплазмі під впливом утероконстрикторних агентів з боку оксиду азоту.

6. Виявлена відповідність між змінами флуоресценції NADH та FAD (їхнім редокс-станом) і функціонуванням окремих комплексів електрон-транспортного ланцюга внутрішньої мембрани мітохондрій. Оксид азоту знижує інтенсивність окислення FADH_2 у електрон-транспортному ланцюзі.

7. Оксид азоту володіє протекторними щодо мітохондрій властивостями: викликає помірне зниження електричного потенціалу на їхній внутрішній мембрані та протидіє процесам набухання, спричиненого гіперкальцієвим розчином.

8. Із застосуванням методології функціональних гібридних мереж Петрі змодульовані одночасні концентраційно-часові ефекти азиду натрію на флуоресценцію аденінових нуклеотидів, утворення активних форм кисню (за DCF-флуоресценцією) та гідродинамічний діаметр мітохондрій.

9. Доведено, що калікс[4]арен C-956 сорбується поверхнею міоцитів та проникає до міоплазми, взаємодіючи з мітохондріями. Сполука C-956 ефективно пригнічує H^+ - Ca^{2+} -обмінник внутрішньої мітохондрійної мембрани, посилює біосинтез NO мітохондріями та гальмує окислення NADH/ FADH_2 в електрон-транспортному ланцюзі.

10. Калікс[4]арени C-97, C-99 та C-107 пригнічують енергозалежну акумуляцію іонів Ca мітохондріями, стимулюють H^+ - Ca^{2+} обмінник (C-97 та C-99), знижують концентрацію Ca^{2+} в матриксі, пригнічують NO-синтазну активність у мітохондріях, посилюють окислення NADH та викликають транзієнтну поляризацію внутрішньої мітохондрійної мембрани.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Акопова ОВ. Роль мітохондріальної пори перехідної провідності у трансмембранному обміні Ca^{2+} в мітохондріях. Укр. біохім. журн. 2008; 80(3): 40-47.
2. Акопова ОВ, Коркач ЮП, Коцюруба АВ, Колчинська АВ, Сагач ВФ. Метаболізм активних форм азоту та кисню в мітохондріях міокарда щурів за умов введення донора оксиду азоту. Фізіологічний журнал. 2012; 58(2): 3-15.
3. Акопова ОВ, Сагач ВФ. Влияние доноров NO на аккумуляцию Ca^{2+} в митохондриях миокарда и печени крыс. Укр. біохім. журн. 2005; 77(2): 82-87.
4. Акопова ОВ, Харламова ОМ, Коцюруба АВ. Вплив оксиду азоту на Na^+, K^+ -АТФазу в тканині аорти щурів. Фізіологічний журнал. 2009; 55(1): 27-35.
5. Атамась ЛІ, Бойко ВІ, Драпайло АБ, Єсипенко ОА, Кальченко ОІ, Клячина МА, Матвеев ЮІ, Мірошніченко СІ, Родік РВ, Черенок СО, Кальченко ВІ. Супрамолекулярна хімія каліксаренів. Журн. орг. фарм. хімії. 2009; 7(вып. 2, №26): 28-36.
6. Бабич ЛГ, Шлыков СГ, Бойко ВИ, Клячина МА, Костерин СА. Калікс[4]аренхалконамиды С-136 и С-137 гиперполяризуют мембрану митохондриальной миометрии. Биоорг. химия. 2013; 39(6): 728–735.
7. Бабич ЛГ, Шлыков СГ, Борисова ЛА, Костерин СА. Энергозависимый транспорт Ca^{2+} во внутриклеточных структурах гладкой мышцы. Биохимия. 1994;9(8):1218 – 1229.
8. Бабич ЛГ, Борисова Л.А, Шлыков СГ, Титус ОВ, Костерин СА. Эффект ионов Mg и спермина на АТР-зависимый транспорт Ca^{2+} в внутриклеточных структурах миометрии. I. Сравнительное исследование аккумуляции Ca^{2+} в митохондриях и саркоплазматическом ретикулуме. Укр. біохім. журн. 2004;76(5): 52-60.
9. Бабіч ЛГ, Шлыков СГ, Кушнар'ова АМ, Єсипенко ОА, Костерін СО. Халконвмісні калікс[4]арени — нанорозмірні модулятори поляризації мембран мітохондрій та вмісту йонізованого Са в них. Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології. 2017;15(1): 193–202.

10. Бабіч ЛГ, Шликов СГ, Наумова НВ, Костерін С О. Використання методу протокової цитометрії для визначення вмісту Ca^{2+} в мітохондріях та впливу на нього антагоністів кальмодуліну. Укр. біохім. журн. 2008; 80(4): 51–58.
11. Бабський А, Іккерт О, Манько В. Основи біоенергетики: підручник: [для студ. вищ. навч. закл.]. Львів : ЛНУ імені Івана Франка, Серія “Біологічні Студії”. 2017. 312 с.
12. Бевза АА, Лабинцева РД, Бевза ОВ, Черенок СО, Кальченко ВІ, Костерін СО Кінетичні закономірності та механізм дії калікс[4]арену С-99 на АТР-азну активність субфрагмента-1 міозину міометрія. Укр. біохім. журн. 2010; 82(6): 22-32.
13. Бевза АА, Лабинцева РД, Родік РВ, Черенок СО, Костерін СО, Кальченко ВІ. Вплив калікс[4]аренів на активність АТР-ази актоміозинового комплексу та субфрагмента-1 міозину міометрія. Укр. біохім. журн. 2009; 81(6): 49-58.
14. Бевза ОВ, Векліч ТО, Шкрабак ОА, Родік РВ, Кальченко ВІ, Костерін СО. Калікс[4]арен С-107 як високоафінний супрамолекулярний інгібітор Na^+ , K^+ -АТР-ази плазматичної мембрани. Укр. біохім. журн. 2013; 85(2): 5-19.
15. Бухаров СВ, Нугуманова ГН, Тагашева РГ. Полифенольные антиоксиданты на основе каликсаренов. Казань. Изд-во КНИТУ. 2016.
16. Вадзюк О.Б. АТР-чутливі K^+ -канали м'язових клітин: властивості та фізіологічна роль. Ukr Biochem J. 2014; 86(3): 5-22.
17. Веклич ТА, Шкрабак АА, Слинченко НН, Мазур ЮЮ, Костерин СА, Родик РВ, Бойко ВИ, Кальченко ВИ. Калікс[4]арен С-90 селективно інгібує Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазу плазматической мембрани кліток міометрія. Биохимия. 2014; 79(5): 417-424.
18. Векліч ТО, Костерін С.О., Шинлова О.П. Катіонна специфічність системи акумуляції Ca^{2+} в мітохондріях клітин міометрія. Укр. біохім. журн. 2002; 74(1): 42-48.
19. Векліч ТО, Костерін СО, Родік РВ, Черенок СО, Бойко ВІ, Кальченко ВІ. Вплив каліксаренфосфонових кислот на Na^+ , K^+ -АТР-азну активність у плазматичній мембрані гладеньком'язових клітин. Укр. біохім. журн. 2006; 78(1): 70-78.
20. Векліч ТО, Кочешкова НС, Родік РВ, Бойко ВІ, Воробець ЗД, Костерін СО. Порівняльне дослідження впливу каліксаренів на Na^+ , K^+ -АТРазну актив-

- ність в плазматичній мембрані скоротливих та рухливих клітин. Укр. біохім. журн. 2007; 79(3): 19-28.
21. Векліч ТО, Шкрабак ОА, Мазур ЮЮ, Родік РВ, Бойко ВІ, Кальченко ВІ, Костерін СО. Кінетичні закономірності дії калікс[4]арену С-90 на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазну активність плазматичної мембрани та на концентрацію Ca^{2+} в незбуджених клітинах міометрія. Укр. біохім. журн. 2013; 85(4): 20-29.
 22. Векліч ТО, Шкрабак ОА, Мазур ЮЮ, Родік РВ, Кальченко ВІ, Костерін СО. Кінетика інгібіторної дії калікс[4]арену С-90 на активність транспортної Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин. Укр. Biochem. J. 2014; 86(5): 37-46.
 23. Векліч ТО, Шкрабак ОА, Родік РВ, Кальченко ВІ, Костерін СО Вплив каліксарену С-107 на кінетичні параметри Na^+ , K^+ -АТР-ази плазматичної мембрани міоцитів матки. Укр. біохім. журн. 2011; 83(2): 36-44.
 24. Векліч ТО, Шкрабак ОА, Родік РВ, Кальченко ВІ, Костерін СО. Каліксарен С-107 збільшує спорідненість Na^+ , K^+ -АТР-ази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин до убаїну. Укр. біохім. журн. 2011; 83(1): 38-44.
 25. Данилович ГВ, Данилович ЮВ. Вплив окислів азоту і пероксиду водня на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-азну та Mg^{2+} -АТР-азну активності у фракції сарколеми міометрія. Укр. біохім. журн. 2007; 79(2): 31-38.
 26. Данилович ГВ, Данилович ЮВ, Горчев ВФ. Реєстрація K^+ -рівноважного потенціалу на плазматичній мембрані клітин міометрія і вивчення його модуляції NO_x та H_2O_2 методом протокової цитометрії. Укр. біохім. журн. 2010; 82(1): 52-61.
 27. Данилович ГВ., Данилович ЮВ, Коломієць ОВ, Костерін СО, Родік РВ, Черенок СО, Кальченко ВІ, Чуніхін ОЮ, Горчев ВФ, Карахім СО. Зміни поляризації плазматичної та внутрішньої мітохондріальної мембран клітин міометрія за дії каліксаренів – інгібіторів Na^+ , K^+ -АТР-ази плазматичної мембрани. Укр. біохім. журн. 2012; 84(6): 37-48.
 28. Данилович ЮВ. Вплив активних сполук азоту та кисню на обмін Ca^{2+} та H^+ через плазматичну мембрану клітин міометрія. Укр. біохім. журн. 2001;73(4): 49-54.

29. Данилович ЮВ. Порівняльний аналіз впливу активних метаболітів азоту і кисню на K^+ - та тапсигаргін-індукований вхід Ca^{2+} в міоцити матки щурів. Буковинський медичний вісник. 2005; 9(2): 78-79.
30. Данилович ЮВ, Тугай ВА. Вплив активних метаболітів азоту і кисню на рівень cGMP в міоцитах матки. Укр. біохім. журн. 2006; 78(1): 102-106.
31. Данилович Ю.В. Вплив стероїдних гормонів і окситоцину на утворення NO і H_2O_2 в ендометрії. Укр. біохім. журн. 2004; 76(1): 88-96.
32. Данилович ЮВ. Характеристики пасивного транспорту Ca з саркоплазматичного ретикулуму клітин міометрія щурів. Фізіол. Журн. 2007; 53(1): 55-61.
33. Данилович ЮВ, Тугай ВА. Утворення NO та H_2O_2 у стромальних клітинах ендометрія за дії ацетилхоліну. Укр. біохім. журн. 2001; 73(2): 110-115.
34. Данилович ЮВ. Механізми ацетилхолінзалежної продукції NO_2^- та H_2O_2 стромальними клітинами ендометрія. Укр. біохім. журн. 2003; 75(5): 77-84.
35. Данилович ЮВ, Данилович ГВ, Коломієць ОВ. Ефекти нітропрусиду та нітриту натрію на убаїнчутливу Na^+ , K^+ -АТФ-азну активність гладенького м'яза матки. Укр. біохім. журн. 2010; 82(6): 33-41.
36. Данилович ЮВ, Чуніхін ОЮ, Данилович ГВ. Тестування змін розмірів міоцитів матки за дії модуляторів її скоротливої активності. Фізіол. журн. 2013; 59 (1): 32-39.
37. Данилович ЮВ, Данилович ГВ, Коломієць ОВ, Костерін СО, Карахім СО, Чуніхін ОЮ. Дослідження впливу нітрозактивних сполук на поляризацію внутрішньої мембрани мітохондрій в міоцитах матки щурів із використанням потенціалчутливого флуоресцентного зонда DiOC₆(3). Ukr. Biochem. J. 2014; 86(1): 42-55.
38. Данилович ЮВ, Данилович ГВ, Коломієць ОВ, Родік РВ, Кальченко ВІ, Костерін СО. Дія калікс[4]аренів на транспорт Ca^{2+} , електричний потенціал та активність електрон-транспортного ланцюга в мітохондріях гладенького м'язу. Збірник наукових праць «Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології». 2017; 15(2): 365-371.
39. Данилович ЮВ, Данилович ГВ. Активні форми азоту та кисню в біохімічних процесах транспорту іонів Ca і поляризації субклітинних структур гла-

- днького м'яза. НВП Видавництво «Наукова думка» НАН України. – Київ. – 2019.
40. Данилович ЮВ, Данилович ГВ, Костерін СО. Роль іонів калію у біосинтезі оксиду азоту в мітохондріях гладенького м'яза. Фізіол. журн. 2021; 67 (1): 16-23.
 41. Зинченко ВП, Гончаров НВ, Теплова ВВ, Касымов ВА, Петрова ОИ, Бережнов АВ, Сенченков ЕВ, Миндукшев ИВ, Дженкинс РО, Радиллов АС. Изучение взаимосвязи внутриклеточных сигнальных и метаболических путей при ингибировании митохондриальной аконитазы фторацетатом. Цитология. 2007;49(12):1023-31.
 42. Кандаурова НВ, Чуніхін АЮ, Бабіч ЛГ, Шликов СГ, Костерін СО. Модулятори трансмембранного кальцієвого обміну в мітохондріях міометрія змінюють їхній гідродинамічний діаметр. Ukr Biochem J. 2010; 82(6): 52-57.
 43. Келети Т. Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1990. 350 с.
 44. Ключева АВ, Левчук ЮН, Набока ЮН. Фотон-корреляционная спектроскопия белков. Укр. біохім. журн. 2002; 74(5): 12-26.
 45. Кокунин ВА. Статистическая обработка данных при малом числе опытов. Укр. биохим. журн. 1975; 45(6): 776-791.
 46. Коломієць ОВ, Данилович ЮВ, Данилович ГВ, Костерін СО. Вивчення акумуляції Ca^{2+} в ізольованих мітохондріях гладенького м'яза за допомогою зонда Fluo-4 АМ. Укр. біохім. журн. 2013; 85(4): 30-39.
 47. Коломієць ОВ, Данилович ЮВ, Данилович ГВ, Костерін СО. $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -обмін у мітохондріях міометрія. Ukr. Biochem. J. 2014; 86(3): 41-48.
 48. Кондратюк ТП, Быченко СФ, Прищепа ЛА, Бабич ЛГ, Курский МД, Осипенко АА. Выделение и характеристика фракции плазматических мембран миометрия свиньи. Укр. биохим. журн. 1986; 58(4): 50-56.
 49. Костерин С. А. Транспорт кальция в гладких мышцах. Киев: Наук. Думка, 1990. 216 с.
 50. Костерин СА, Бурдыга ФВ. Транспорт и внутриклеточный гомеостаз Ca^{2+} в миометрии. Успехи совр. биол. 1993;113(4):485-506.
 51. Костерин СА, Браткова НФ, Бабич ЛГ, Шинлова ОП, Слинченко НН, Шлыков СГ, Зими́на ВП, Ровенец НА, Веклич ТА. Влияние ингибиторов эне-

- ргозависимых Ca^{2+} -транспортирующих систем на кальциевые насосы гладкомышечной клетки. Укр. биохим. журн. 1996; 68(6): 50-61.
52. Костерин СА, Браткова НФ, Курский МД. Роль сарколеммы и митохондрий в обеспечении кальциевого контроля расслабления миомерия. Биохимия. 1985; 50(8): 1350-1361.
53. Костерин С.О., Кальченко В.І., Веклич Т.О., Бабич Л.Г., Шликов С.Г. Каліксарени як модулятори АТР-гідролазних систем гладеньком'язових клітин. Київ: Наукова думка, 2019. 256 с.
54. Костюк ПГ, Костюк ОП, Лук'янець ОО. Внутрішньоклітинна кальцієва сигналізація: структура і функції. Київ: Наукова думка, 2010. 175 с.
55. Костюк ПГ, Зима ВЛ, Мірошніченко МС та ін.. Біофізика. К: Обереги. 2001. 544 с.
56. Курский МД, Костерин СА, Бурчинская НФ, Шликов СГ. Пассивный транспорт Ca^{2+} во фракции митохондрий миомерия. Укр. биохим. журн. 1987; 59(3): 35-39.
57. Лабинцева РД, Бевза АА, Бевза ОВ, Черенок СО, Кальченко ВІ, Костерин СО. Структурно-функціональні основи міжмолекулярної взаємодії калікс[4]арену С-97 із субфрагментом-1 міозину міомерия. Укр. біохім. журн. 2012; 84(1): 34-44.
58. Лабинцева РД, Слінченко НМ, Веклич ТО, Родік РВ, Черенок СО, Бойко ВІ, Кальченко ВІ, Костерин СО. Порівняльне дослідження впливу каліксаренів на Mg^{2+} -залежні АТР-гідролазні ферментативні системи гладеньком'язових клітин матки. Укр. біохім. журн. 2007; 79(3): 44-54.
59. Лебедев АД, Левчук ЮН, Ломакин АВ, Носкин ВА. Лазерная корреляционная спектроскопия в биологии. Киев: Наукова думка, 1987. 256 с.
60. Мончин АА, Недвецкий ПИ, Федорович СВ. Деполяризация изолированных нервных окончаний мозга донорами окиси азота: мембранные механизмы. Биохимия. 1998; 63(6): 787-796.
61. Наумова НВ, Бабич ЛГ, Шликов СГ. Зміна мембранного потенціалу митохондрій гладенького м'яза матки під впливом іонів Mg та Ca. Укр. біохім. журн. 2009; 81(4): 28-31.
62. Позняк ТА.; винахідник. Антитромботичні каліксарени. Патент України № а 2010 04273, 26 грудня 2011.

63. Пономаренко ОВ, Бабіч ЛГ, Горчев ВФ, Костерін СО. Дослідження Ca^{2+} -залежного набухання мітохондрій гладенького м'яза за допомогою метода проточної цитометрії та вплив сперміна на цей процес. Укр. біохім. журн. 2006; 78(6): 38-45.
64. Проскуряков СЯ, Коноплянников АГ, Иванников АИ, Скворцов ВГ. Биология окиси азота. Успехи современной биологии. 1999; 119(4): 380-395.
65. Реутов ВП. Цикл оксида азота у млекопитающих и принцип цикличности. Биохимия. 2002; 67 (3): 293-311.
66. Родік РВ. Застосування каліксаренів для трансфекції ДНК у клітини. Укр. біохім. журн. 2012; 84(5):5-15.
67. Сибірна НО, Люта МЯ, Климишин НІ. Молекулярні механізми депонування оксиду азоту в еритроцитах. Біологічні студії. 2010; 4(1):143-160.
68. Судаков НП, Никифоров СБ, Константинов ЮМ, Лепехова СА. Роль мітохондрій в реалізації механізмів програмированої гибелі клітки. Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2007; 1 (53):103-107.
69. Тугай ВА. Регуляторная роль протона в мембранных процессах мышечной клетки. Киев: Наукова думка, 1993. 118 с.
70. Турпаев КТ. Роль окиси азота в передаче сигнала между клетками. Мол. биология. 1998; 32(4):581-591.
71. Фёгле Ф, Вебер Э. Каликсарены. Химия комплексов «гость-хозяин». Синтез, структуры и применения. Москва: Мир; 1988. 445-502 с.
72. Ференц ІВ, Броляк ІВ, Люта МЯ, Бурда ВА, Федорович АМ, Сибірна НО. Вплив агматину на метаболізм L-аргініну в еритроцитах крові за умов стрептозотозин-індукованого діабету у щурів. Укр. Biochem. J. 2012; 84(3): 55-62.
73. Цимбалюк ОВ, Онуфрийчук ОВ, Векліч ТО, Черенок СО, Кальченко ВІ, Мірошніченко МС, Костерін СО. Порівняльне дослідження впливу оуабаїну і каліксарен біс-гідроксиметилфосфонової кислоти на активність Na^+ , K^+ -АТРази та механокінетику процесу «скорочення-розслаблення» гладенького м'язу. Фізика живого. 2006; 14(1): 53-72.

74. Цимбалюк ОВ, Родік РВ, Кальченко ВІ, Костерін СО. Механокінетичні параметри скоротливої активності гладеньких м'язів саесит щура за умов хронічної дії каліксарену С107 in vivo. Фізика живого. 2010; 18(1): 47-51.
75. Цимбалюк ОВ., Костерін СО. Вплив каліксарену С-90 на скоротливу активність гладеньких м'язів міометрія щурів. Біол. студії. 2013; 7(3): 5-20.
76. Шинлова ОП, Костерин СА, Веклич ТА. Подавляемый рутениевым красным энергозависимый и пассивный транспорт Ca^{2+} в пермеабиллизированных гладкомышечных клетках. Биохимия. 1996;61(8): 1440-1447.
77. Шкрабак ОА, Данилович ГВ, Веклич ТО. Локалізація "базальної" Mg^{2+} -АТФази у плазматичній мембрані гладеньком'язових клітин матки свині. Вісник КНУ імені Тараса Шевченка. Біологія. 2006; 47-48: 55-57.
78. Шликов СГ, Бабіч ЛГ, Євтушенко М Є, Карахім СО, Костерін СО. Модуляція мембранного потенціалу мітохондрій міометрія антагоністами кальмодуліну. Ukr. Biochem. J. 2014; 86(1): 29-41.
79. Шликов СГ, Бабіч ЛГ, Слінченко НМ, Родік РВ, Бойко ВІ, Кальченко ВІ, Костерін СО. Каліксарен С-91 стимулює акумуляцію іонів Са в мітохондріях міометрія. Укр. біохім. журн. 2007; 79(4): 28-33.
80. Шликов СГ. Окситоцин та його роль у контролі внутрішньоклітинного рівня іонів кальцію в міометрії. Укр. біохім. журн. 2010; 82(2): 5-17.
81. Шликов СГ, Бабіч ЛГ, Костерин СА. Суспензия гладкомышечных клеток, обработанных раствором дигитонина, как модель для изучения кальциевого насоса эндоплазматического ретикула миометрия. Биохимия. 1997; 62(12): 1666-1671.
82. Яковенко ИН, Жирнов ВВ. Азид натрия как непрямой донор оксида азота: исследования на изолированных сегментах аорты крыс. Укр. біохім. журн. 2005; 77(4): 120-123.
83. Agarwal B, Dash RK, Stowe DF, Bosnjak ZJ, Camara AK. Isoflurane modulates cardiac mitochondrial bioenergetics by selectively attenuating respiratory complexes. Biochim Biophys Acta. 2014; 1837(3): 354–365.
84. Aguilar HN, Mitchell BF. Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility. Hum. Reprod. Update. 2010; 16(6): 725-744.

85. Aguilar HN, Tracey CN, Zielnik B, Mitchell BF. Rho-kinase mediates diphosphorylation of myosin regulatory light chain in cultured uterine but not vascular smooth muscle cells. *J. Cell. Mol. Med.* 2012; 16(12): 2978-2989.
86. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 2001; 357: 593-615.
87. Alla H, David R. Continuous and hybrid Petri nets. *J. Circuit. Sys. Comput.* 1998; 8: 159-188.
88. Alvarez S, Boveris A. Mitochondrial nitric oxide metabolism in rat muscle during endotoxemia. *Free Radic. Biol. Med.* 2004; 37(9): 1472-1478.
89. Anderson AJ, Jackson TD, Stroud DA, Stojanovski D. Mitochondria—hubs for regulating cellular biochemistry: emerging concepts and networks. *Open Biol.* 2019; 9: 190126.
90. Anderson WM, Wood JM, Anderson AC. Inhibition of mitochondrial and *Paracoccus denitrificans* NADH-ubiquinone reductase by oxacarboxyanine dyes. A structure-activity study. *Biochem Pharmacol.* 1993;45: 2115.
91. Andrew PJ, Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc. Res.* 1999; 43(3): 521-531.
92. Arthur P, Taggart MJ, Zielnik B, Wong S, Mitchell BF. Relationship between gene expression and function of uterotonic systems in rat gestation, uterine activation and both term and preterm labour. *J. Physiol.* 2008;586: 6063-6076.
93. Ash DE. Structure and Function of Arginases. *J. Nutr.* 2004; 134(10): 2760S-2767S.
94. Babich LG, Shlykov SG, Kushnarova AM, Kosterin SO. Ca^{2+} -dependent regulation of the Ca^{2+} concentration in the myometrium mitochondria. I. Trifluoperazine effects on mitochondria membranes polarization and $[\text{Ca}^{2+}]_m$. *Ukr. Biochem. J.* 2016; 88(4): 5-11.
95. Bae H, Choi J, Kim Y-W, Lee D, Kim J-H, Ko J-H, Bang H, Kim T, Lim I. Effects of Nitric Oxide on Voltage-Gated K^+ Currents in Human Cardiac Fibroblasts through the Protein Kinase G and Protein Kinase A Pathways but Not through S-Nitrosylation. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19: 814.

96. Bae H, Lim I. Effects of nitric oxide on large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} currents in human cardiac fibroblasts through PKA and PKG-related pathways. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2017; 44(11): 1116-1124.
97. Bakowski D, Nelson C, Parekh AB. Endoplasmic reticulum-mitochondria coupling: local Ca^{2+} signaling with functional consequences. *Pflügers Archiv.* 2012; 464(1): 27-32.
98. Bao S, Rai J, Schreiber J. Expression of nitric oxide synthase isoforms in human pregnant myometrium at term. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 2002; 9(6): 351-356.
99. Barnett SD, Smith CR, Ulrich CC, Baker JE, Buxton ILO. S-Nitrosoglutathione reductase underlies the dysfunctional relaxation to nitric oxide in preterm labor. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 5614.
100. Bartesaghi S, Radi R. Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Redox Biol.* 2018; 14: 618-625.
101. Bartlett SR, Bennett PR, Campa JS, Dennes WJB, Slater DM, Mann GE, Poston L, Poston R. Expression of nitric oxide synthase isoforms in pregnant human myometrium. *J. Physiology.* 1999; 521(3): 705-716.
102. Baughman JM, Perocchi F, Girgis HS, Plovanich M, Belcher-Timme CA, Sancak Y, Bao XR, Strittmatter L, Goldberger O, Bogorad RL, Koteliansky V, Mootha VK. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature.* 2011; 476(7360): 341-345.
103. Bazan C, Barda DT, Blomgren P. et al. Image processing techniques for assessing contractility in isolated neonatal cardiac myocytes. *Int. J. Biomed. Imaging.* 2011; Article ID 729732: 9
104. Bazil JN, Dash RK. A minimal model for the mitochondrial rapid mode of Ca^{2+} uptake mechanism. *PLoS One.* 2011; 6(6): e21324.
105. Beard NA, Wei L, Dulhunty AF. Control of muscle ryanodine receptor calcium release channels by proteins in the sarcoplasmic reticulum lumen. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2009; 36(3): 340-345.
106. Benninger RKP, Hutchens T, Head WS, McCaughey MJ, Zhang M, Le Marchand SJ, Satin LS, Piston DW. Intrinsic Islet Heterogeneity and Gap Junction Coupling Determine Spatiotemporal Ca^{2+} Wave Dynamics. *Biophys. J.* 2014; 107(11): 2723-2733.

107. Bernardi P, Rasola A. Calcium and cell death: the mitochondrial connection. *Subcell. Biochem.* 2007; 45: 481-506.
108. Bernardi P, von Stockum S. The permeability transition pore as a Ca^{2+} release channel: New answers to an old question. *Cell Calcium.* 2012; 52(1): 22-27.
109. Bernardi P. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 8834-8839.
110. Berridge MJ. The Inositol Trisphosphate/Calcium Signaling Pathway in Health and Disease. *Physiol. Rev.* 2016; 96(4): 1261-1296.
111. Beutner G, Sharma VK, Lin L, Ryu S-Y, Dirksen RT, Sheu S-S. Type 1 ryanodine receptor in cardiac mitochondria: transducer of excitation-metabolism coupling. *Biochim. Biophys. Acta.* 2005; 1717(1):1-10.
112. Bohmer V. Calixarenes, macrocycles with (almost) unlimited possibilities. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1995; 34: 713-745.
113. Bolotina VM, Najibis S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature.* 1994; 368(6474): 850-853.
114. Bolton TB, Gordienko DV, Povstyan OV, Harhun MI, Pucovsky V. Smooth Muscle Cells and Interstitial Cells of Blood Vessels. *Cell Calcium.* 2004; 35(6): 643-657.
115. Bootman MD, Bultynck G. Fundamental of Cellular Calcium Signaling: A Primer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2020; 12(1): a038802.
116. Borysova L, Dora KA, Garland CJ, Burdyga T. Smooth Muscle Gap-Junctions Allow Propagation of Intercellular Ca^{2+} Waves and Vasoconstriction Due to Ca^{2+} Based Action Potentials in Rat Mesenteric Resistance Arteries. *Cell Calcium.* 2018; 75:21-29.
117. Boucher JL, Moali C, Tenu JP. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cell Mol. Life Sci.* 1999; 55(8-9): 1015-28.
118. Boveris A, Valdez LB, Zaborny T, Bustamante J. Mitochondrial metabolic states regulate nitric oxide and hydrogen peroxide diffusion to the cytosol. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006; 1757(5-6): 535-542.

119. Boveris A, Valdez LB, Alvarez S, Zaborny T, Boveris AD, Navarro A. Kidney mitochondrial nitric oxide synthase. *Antioxid. Redox Signal.* 2003; 5(3): 265-271.
120. Bovo E, Mazurek SR, Blatter LA, Zima AV. Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak by cytosolic Ca^{2+} in rabbit ventricular myocytes. *J. Physiol.* 2011; 589(24): 6039-6050.
121. 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; 72: 248-254.
122. Bradley KK, Buxton IL, Barber JE, McGaw T, Bradley ME. Nitric oxide relaxes human myometrium by a cGMP-independent mechanism. *Am. J. Physiol.* 1998; 75(6): C1668-C1673.
123. Brainard AM, Korovkina VP, England SK. Potassium channels and uterine function. *Seminars in Cell and Development Biology.* 2007; 18(3): 332-339.
124. Brakemeier S, Eichler I, Knorr A, Fassheber T, Köhler R, Hoyer J. Modulation of Ca^{2+} -activated K^+ channel in renal artery endothelium in situ by nitric oxide and reactive oxygen species. *Kidney Int.* 2003; 64(1): 199-207.
125. Bravo-Sagua R, Parra V, Muñoz-Cordova F, Sanchez-Aguilera P, Garrido V, Contreras-Ferrat A, Chiong M, Lavandero S. Sarcoplasmic reticulum and calcium signaling in muscle cells: Homeostasis and disease. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2020; 350: 197-264.
126. Brenman JE, Chao DS, Gee SH, McGee AW, Craven SE, Santillano DR, Wu Z, Huang F, Xia H, Peters MF, Froehner SC, and Bredt DS. Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and α 1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell.* 1996; 84: 757-767.
127. Brewis IA, Morton IE, Mohammad SN, Browes CE, Moore HD. Measurement of intracellular calcium concentration and plasma membrane potential in human spermatozoa using flow cytometry. *J. Androl.* 2000; 21(2): 238-249.
128. Brocard JB, Rintoul GL, Reynolds IJ. New perspectives on mitochondrial morphology in cell function. *Biol. Cell.* 2003; 95: 239-242.

129. Brookes PS, Kraus DW, Shiva S, Doeller JE, Barone MC, Patel RP, Lancaster JR Jr, Darley-USmar V. Control of mitochondrial respiration by NO: effects of low oxygen and respiratory state. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 31603-31609.
130. Brown GC, Borutaite V. Nitric oxide and mitochondrial respiration in the heart. *Cardiovasc Res.* 2007; 75(2): 283-290.
131. Brown GC. Nitric oxide and neuronal death. *Nitric oxide.* 2010; 23(3): 153-165.
132. Bruce JIE. Metabolic regulation of the PMCA: Role in cell death and survival. *Cell Calcium.* 2018; 69: 28-36.
133. Bryan NS, Bian K, Murad F. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development. *Front Biosc.* 2009; 14: 1-18.
134. Buckman JF, Hernández H, Kress GJ, Votyakova TV, Pal S, Reynolds IJ. Mi-toTracker labeling in primary neuronal and astrocytic cultures: influence of mitochondrial membrane potential and oxidants. *J. Neurosci. Methods.* 2001; 104(2): 165-176.
135. Buhimschi I, Ali M, Jain V, Chwalisz K, Garfield RE. Differential regulation of nitric oxide in the rat uterus and cervix during pregnancy and labour. *Hum. Reprod.* 1996;11(8):1755-66.
136. Buhimschi I, Yallampalli C, Dong YL, [et al.] Involvement of a nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in control of human uterine contractility during pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1995; 172(5): 1577-1584.
137. Buhimschi IA, Saade GR, Chwalisz K, Garfield RE. The nitric oxide pathway in pre-eclampsia: pathophysiological implications. *Hum. Reprod. Update.* 1998; 4(1): 25-42.
138. Bulbul A, Yağci A, Altunbaş K, Sevimli A, Celik HA, Karadeniz A, Akdağ E. The role of nitric oxide in the effects of ovarian steroids on spontaneous myometrial contractility in rats. *Theriogenology.* 2007; 68(8): 1156-1168.
139. Buntinas L, Gunter KK, Sparagna GC, Gunter TE. The rapid mode of calcium uptake into heart of mitochondria (RaM): comparison to RaM in liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 2001; 1504(2-3): 248-261.
140. Burdyga T, Lang RJ. Excitation-Contraction Coupling in Ureteric Smooth Muscle: Mechanisms Driving Ureteric Peristalsis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019; 1124: 103-119.

141. Bustamante J, Bersier G, Badin RA, Cymeryng C, Parodi A, Boveris A. Sequential NO production by mitochondria and endoplasmic reticulum during induced apoptosis. *Nitric Oxide*. 2002; 6(3): 333-341.
142. Buttery LDK, McCarthy A, Springall DR, Sullivan MHF, Elder MG, Michel T, Polak J M. Endothelial nitric oxide synthase in the human placenta: regional distribution and proposed regulatory role at the feto-maternal interface. *Placenta*. 1994; 15(3): 257-265.
143. Buxton IL, Kaiser RA, Malmquist NA, Tichenor S. NO-induced relaxation of labouring and non-labouring human myometrium is not mediated by cyclic GMP. *Br. J. Pharmacol*. 2001; 134: 206-214.
144. Buxton ILO. Regulation of uterine function: a biochemical conundrum in the regulation of smooth muscle relaxation. *Mol. Pharmacol*. 2004; 65(6): 1051-1059.
145. Buxton ILO. The regulation of uterine relaxation. *Sem. Cell Dev. Biol*. 2007; 18(3): 340-347.
146. Cali T, Ottolini D, Brini M. Mitochondrial Ca^{2+} as a key regulator of mitochondrial activities. *Adv. Exp. Med. Biol*. 2012; 942: 53-73.
147. Cameron IT, Campbell S. Nitric oxide in the endometrium. *Hum. Reprod. Update*. 1998; 4(5): 565-569.
148. Cao JL, Adaniya SM, Cypress MW, Suzuki Y, Kusakari Y, Jhun BS, O-Uchi J. Role of mitochondrial Ca^{2+} homeostasis in cardiac muscles. *Arch. Biochem. Biophys*. 2019; 663: 276-287.
149. Carreras MC, Poderoso JJ. Mitochondrial nitric oxide in the signaling of cell integrated responses. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 2007; 292: C1569-C1580.
150. Cartwright EJ, Oceandy D, Neyses L. Physiological implications of the interaction between the plasma membrane calcium pump and nNOS. *Pflugers Arch*. 2009; 457(3): 665-671.
151. Chalmers S, Nicholls DG. The relationship between free and total calcium concentrations in the matrix of liver and brain mitochondria. *J. Biol. Chem*. 2003; 278(21): 19062-19070.

152. Chalmers S, Olson ML, MacMillan D, Rainbow RD, McCarron JG. Ion channels in smooth muscle: regulation by the sarcoplasmic reticulum and mitochondria. *Cell Calcium*. 2007; 42(4-5): 447-466.
153. Chan L, Wong YC. Cytochemical localisation and characterisation of proteoglycans (glycosaminoglycans) in the epithelial-stromal interface of the seminal vesicle of the guinea pig. *J Anat*. 1992; 180(Pt 1): 41-56.
154. Chance B, Williams GR. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state. *J. Biol. Chem*. 1955; 217: 409-427.
155. Chang S, Lamm SH. Human health effects of sodium azide exposure: a literature review and analysis. *Int. J. Toxicol*. 2003; 22(3): 175-186.
156. Chen C, Schofield GG. Nitric oxide donors enhanced Ca^{2+} currents and blocked noradrenalin-induced Ca^{2+} current inhibition in rat sympathetic neurons. *J. Physiol (Lond.)*. 1995; 482, Pt 3: 521-531.
157. Chen G, Yang Y, Xu C, Gao S. A flow cytometry-based assay for measuring mitochondrial membrane potential in cardiac myocytes after hypoxia/reoxygenation. *J. Vis. Exp*. 2018; 137: 57725.
158. Chen Y-R, Zweier JL. Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation. *Circ Res*. 2014; 114: 524-237.
159. Chin-Smith EC, Slater DM, Johnson MR, Tribe RM. STIM and Orai isoform expression in pregnant human myometrium: a potential role in calcium signaling during pregnancy. *Front Physiol*. 2014; 5: 169.
160. Chreifi G, Li H, McInnes CR, Gibson CL, Suckling CJ, Poulos TL. Communication between the zinc and tetrahydrobiopterin binding sites in nitric oxide synthase. *Biochemistry*. 2014; 53(25): 4216-4223.
161. Chuaiphichai S, McNeill E, Douglas G, Crabtree MJ, Bendall JK, Hale AB, Alp NJ, Channon KM. Cell-autonomous role of endothelial GTP cyclohydrolase 1 and tetrahydrobiopterin in blood pressure regulation. *Hypertension*. 2014; 64(3): 530-540.
162. Closs EI, Scheld JS, Sharafi M, Forstermann U. Substrate supply for nitric-oxide synthase in macrophages and endothelial cells: role of cationic amino acid transporters. *Mol. Pharmacol*. 2000; 57: 68-74.

163. Cohen RA, Adachi T. Nitric-oxide-induced vasodilatation: regulation by physiological S-glutathiolation and pathologic oxidation of the sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium ATPase. *Trends Cardiovasc. Med.* 2006; 16(4): 109-114.
164. Coleman AW, Jebors S, Cecillon S, Perret P, Garin D, Marti-Battle D, Moulin M. Toxicity and biodistribution of *para*-sulfonato-calix[4]arene in mice. *New J. Chem.* 2008; 32(5): 780-782.
165. Conde-Agudelo A, Romero R. Transdermal nitroglycerin for the treatment of preterm labor: a systematic review and metaanalysis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2013; 209(6): 551.e1–551.e18.
166. Contreras L, Drago I, Zampese E, Pozzan T. Mitochondria: the calcium connection. *Biochim. Biophys. Acta.* 2010; 1797: 607-618.
167. Corbett EF, Michalak M. Calcium, a signaling molecule in the endoplasmic reticulum? *Trends Biochem. Sci.* 2000; 25(7): 307-311.
168. Crabtree MJ, Tatham AL, Al-Wakeel Y, Warrick N, Hale AB, Cai S, Channon KM, Alp NJ. Quantitative Regulation of Intracellular Endothelial Nitric-oxide Synthase (eNOS) Coupling by Both Tetrahydrobiopterin-eNOS Stoichiometry and Biopterin Redox Status. *J. Biol. Chem.* 2009; 284(2): 1136-1144.
169. Crouser ED: Mitochondrial dysfunction in septic shock and multiple organ dysfunction syndrome. *Mitochondrion.* 2004; 4: 729-741.
170. Csordas G, Varnai P, Golenar T, Sheu SS, Hajnoczky G. Calcium transport across the inner mitochondrial membrane: molecular mechanisms and pharmacology. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2012; 353(1-2): 109-113.
171. Da Silva E, Lazar AN, Coleman AW. Biopharmaceutical applications of calixarenes. *J. Drug. Delivery Sci. Tech.* 2004;14(1):3-20.
172. Daff S, Sagami I, Shimizu T. The 42-amino acid insert in the FMN domain of neuronal nitric-oxide synthase exerts control over Ca^{2+} /calmodulin-dependent electron transfer. *J. Biol. Chem.* 1999; 274(43): 30589-30595.
173. Daff S. NO synthase: structures and mechanisms. *Nitric Oxide.* 2010; 23(1): 1-11.
174. Daiber A. Redox signaling (cross-talk) from and to mitochondria involves mitochondrial pores and reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta.* 2010; 1797(6-7): 897-906.

175. Dalrymple A , Mahn K, Poston L, Songu-Mize E, Tribe RM. Mechanical stretch regulates TRPC expression and calcium entry in human myometrial smooth muscle cells. *Mol. Hum. Reprod.* 2007; 13(3): 171-179.
176. Danylovyh HV. Evaluation of functioning of mitochondrial electron transport chain with NADH and FAD autofluorescence. *Ukr. Biochem. J.* 2016; 88(1): 31-43.
177. Danylovyh HV, Danylovyh YuV, Rodik RV, Kalchenko VI, Chunikhin AJu. Calix[4]arenes as Modulators of Energy-Dependent Ca^{2+} -Accumulation and Functioning of the Electron Transport Chain in Smooth Muscle Mitochondria. *Int. J. Phys. Pathophys.* 2017; 8(3): 241-251.
178. Danylovyh H, Chunikhin A, Danylovyh Yu, Kosterin S. Methodology of Petri networks for simultaneous evaluation of the impact of different modifiers on the fluorescence of nucleotides from electron transport chain in isolated mitochondria and on the process of swelling. *BioTechnologia (J. Biotech. Comput. Biol. Bionanotech.)*. 2018; 99(1): 37-48.
179. Danylovyh GV, Bohach TV, Danylovyh YuV. The biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. Nitric oxide formation features and its functional role in mitochondria. *Ukr. Biochem. J.* 2018; 90(1): 3-24.
180. Danylovyh GV, Kolomiets OV, Danylovyh YuV, Rodik RV, Kalchenko VI, Kosterin SO. Calix[4]arene C-956 is effective inhibitor of H^+ - Ca^{2+} -exchanger in smooth muscle mitochondria. *Ukr. Biochem. J.* 2018; 90(1): 25-31.
181. Danylovyh HV, Chunikhin AYu, Danylovyh YuV, Kosterin SO. Application of petri nets methodology for the examination of the bio(physico)chemical parameters of mitochondria functioning. *bioRxiv preprint first posted online Jan. 23, 2020; doi: <http://dx.doi.org/10.1101/2020.01.22.915074>. // *Ukr. Biochem. J.* 2021; 93(3): 101-110.*
182. Danylovyh HV, Danylovyh YuV, Kosterin SO. Nitric oxide induced polarization of myometrium cells plasmalemma revealed by application of fluorescent dye 3,3'-dihexyloxycarbocyanine. *Ind. J. Biochem. Biophys.* 2019; 55: 34-45.
183. Danylovyh HV, Danylovyh YuV, Rodik RV, Hurska VT, Kalchenko VI, Kosterin SO. Calix[4]arenes modulate Ca^{2+} -dependent processes smooth muscle cell mitochondria. *Chem. Res. J.* 2019; 4(6): 109-122.

184. Danylovykh HV, Danylovykh YuV, Bohach TV, Hurska VT, Kosterin SO. Sources and regularity of nitric oxide synthesis in uterus smooth muscle cells. *Ukr. Biochem. J.* 2019; 91(4): 33-40.
185. Danylovykh HV, Danylovykh YuV, Gulina MO, Bohach TV, Kosterin SO. NO-synthase activity in the mitochondria of the uterus smooth muscle: identification and biochemical properties. *Gen. Physiol. Biohys.* 2019; 38(1): 39-50.
186. Danylovykh YuV, Karakhim SA, Danylovykh GV, Kolomiets OV, Kosterin SO. Electrochemical potential of the inner mitochondrial membrane and Ca^{2+} homeostasis of myometrium cells. *Ukr. Biochem. J.* 2015; 87(5): 56-65.
187. Danylovykh YuV, Karakhim SA, Kolomiets OV, Danylovykh GV, Kosterin SO. Identification of nitric oxide in mitochondria of myometrium cell. *Biopolimers and Cell.* 2015; 31(3): 174-178.
188. Danylovykh YuV, Kolomiets OV, Danylovykh GV, Kosterin SO. Nitric oxide as possible regulator of energy-dependent Ca^{2+} transport in mitochondria of uterine smooth muscle. *Int. J. Phys. Pathophys.* 2015; 6(2): 91-98.
189. Danylovykh YuV, Chunikhin AY, Danylovykh GV, Kolomiets OV. The use of the Petri net method in the simulation modeling of mitochondrial swelling. *Ukr. Biochem. J.* 2016; 88(4): 66-74.
190. Das PN, Mehrotra P, Mishra A, Bairagi N, Chatterjee S. Calcium Dynamics in Cardiac Excitatory and Non-Excitatory Cells and the Role of Gap Junction. *Math. Biosci.* 2017; 289: 51-68.
191. Davidson SM, Duchon MR. Effects of NO on mitochondrial function in cardiomyocytes: pathophysiological relevance. *Cardiovasc. Res.* 2006; 71(1): 10-21.
192. De Palma C, Clementi E. Nitric oxide regulation of mitochondrial biogenesis. *Mitochondrial signaling in health and disease.* Ed. S. Orrenius, L. Packer, E. Cadenas. 2012: 157-167.
193. Dedkova EN, Blatter LA. Characteristics and function of cardiac mitochondrial nitric oxide synthase. *J. Physiol.* 2009; 587(Pt 4): 851-872.
194. Dedkova EN, Blatter LA. Measuring mitochondrial function in intact cardiac myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2012; 52(1): 48-61.

195. Dedkova EN, Blatter LA. Mitochondrial Ca^{2+} and the heart. *Cell Calcium*. 2008; 44(1): 77-91.
196. Dedkova EN, Ji X, Lipsius SL, Blatter LA. Mitochondrial calcium uptake stimulates nitric oxide production in mitochondria of bovine vascular endothelial cell. *Am. J. Physiol: Cell. Physiol.* 2004; 286: C406-C415.
197. Delbridge LM, Roos KP. Optical methods to evaluate the contractile function of unloaded isolated cardiac myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1997; 29(1): 11-25.
198. Demicheli V, Moreno DM, Jara GE, Lima A, Carballal S, Rios N, Batthyany C, Ferrer-Sueta G, Quijano C, Estrin DA, Marti MA, Radi R. Mechanism of the reaction of human manganese superoxide dismutase with peroxynitrite: nitration of critical tyrosine 34. *Biochemistry*. 2016; 55(24): 3403-3417.
199. Demirkoprulu N, Cetin M, Bagcivan I, Kaya T, Soydan AS, Karadas B, Cetin A. Comparative relaxant effects of YC-1 and DETA/NO on spontaneous contractions and the levels of cGMP of isolated pregnant rat myometrium. *Eur. J. Pharmacol.* 2005; 517(3): 240-245.
200. Dessouky DA. Ultrastructural observations of the human uterine smooth muscle cells during gestation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1976; 125(8): 1099-1107.
201. Dimmer KS, Navoni F, Casarin A, Trevisson E, Endeles S, Winterpacht A, Salviati L, Scorrano L. LETM1, deleted in Wolf-Hirschhorn syndrome is required for normal mitochondrial morphology and cellular viability. *Hum. Mol. Genet.* 2008; 17(2): 201-214.
202. Doi A, Fujita S, Matsuno H, Nagasaki M, Miyano S. Constructing biological pathway models with hybrid functional Petri nets. *In Silico Biol.* 2004; 4: 271-291.
203. Drumm BT, Rembetski BE, Cobine CA, Baker SA, Sergeant GP, Hollywood MA, Thornbury KD. Ca^{2+} signalling in mouse urethral smooth muscle in situ: role of Ca^{2+} stores and Ca^{2+} influx mechanisms. *J. Physiol.* 2018; 596(8): 1433-1466.
204. Duan W, Zhou J, Li W, Zhou T, Chen Q, Yang F, Wei T. Plasma membrane calcium ATPase 4b inhibits nitric oxide generation through calcium-induced dynamic interaction with neuronal nitric oxide synthase. *Protein Cell.* 2013; 4:286-298.
205. Duchen MR, Verkhatsky A, Muallem S. Mitochondria and calcium in health and disease. *Cell Calcium*. 2008; 44(1): 1-5.

206. Duckitt K, Thornton S. Nitric oxide donors for the treatment of preterm labour. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2002; (3): CD002860.
207. Dull BJ, Hotchkins JH. Activated oxygen and mammalian nitrate biosynthesis. *Carcinogenesis.* 1984; 5(9): 1161-1164.
208. Duran WN, Breslin JW, Sanchez FA. The NO cascade, eNOS location, and microvascular permeability. *Cardiovasc. Res.* 2010; 87: 254-261.
209. Durante W, Johnson FK, Johnson RA. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2007; 34(9): 906-911.
210. Dzeja PP, Holmuhamedov EL, Ozcan C, Pucar D, Jahangir A, Terzic A. Mitochondria: gateway for cytoprotection. *Circ. Res.* 2001; 89(9): 744-746.
211. Ekerhovd E, Weidegård B, Brännström M, Norström A. Nitric oxide-mediated effects on myometrial contractility at term during prelabor and labor. *Obstet. Gynecol.* 1999; 93(6): 987-994.
212. Elfering SL, Sarkela ThM, Giulivi C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 2002; 277(41): 38079-38086.
213. Elms S, Chen F, Wang Y, Qian J, Askari B, Yu Y, Pandey D, Iddings J, Caldwell RB, Fulton DJ. Insights into the arginine paradox: evidence against the importance of subcellular location of arginase and eNOS. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2013; 305(5): H651- H666.
214. Evron Y, McCarty RE. Simultaneous measurement of ΔpH and electron transport in chloroplast thylakoids by 9-aminoacridine fluorescence. *Plant Physiol. Biochem.* 2000; 124(1): 407-414.
215. Farina M, Ribeiro ML, Franchi A. Nitric oxide synthases in pregnant rat uterus. *Reproduction.* 2001; 121(3): 403-407.
216. Feissner RF, Skalska J, Gaum WE. Crosstalk signaling between mitochondrial Ca^{2+} and ROS. *Front. Biosci.* 2009; 14: 1197-1218.
217. Feng C, Chen L, Li W, Elmore BO, Fan W, Sun X. Dissecting regulation mechanism of the FMN to heme interdomain electron transfer in nitric oxide synthases. *J. Inorg. Biochem.* 2014; 130: 130-140.

218. Fernandez MIG, Ceccarelli D, Muscatello U. Use of the fluorescent dye 10-N-nonyl acridine orange in quantitative and location assays of cardiolipin: a study on different experimental models. *Anal. Biochem.* 2004; 328(2): 174-180.
219. Fernando V, Zheng X, Walia Y, Sharma V, Letson J, Furuta S. S-Nitrosylation: An Emerging Paradigm of Redox Signaling. *Antioxidants (Basel)*. 2019; 8(9): 404.
220. Fiskum G. Intracellular levels and distribution of Ca^{2+} in digitonin-permeabilised cell. *Cell Calcium*. 1985; 6(1-2): 25-27.
221. Floyd R, Wray S. Calcium transporters and signalling in smooth muscles. *Cell Calcium*. 2007; 42(4-5): 467-476.
222. Fomin VP, Gibbs SG, Vanam R, Morimiya A, Hurd WW. Effect of magnesium sulfate on contractile force and intracellular calcium concentration in pregnant human myometrium. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2006; 194(5): 1384–1390.
223. Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*. 1994; 23(6, Part 2): 1121-1131.
224. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart J.* 2012; 33: 829-837.
225. Forte M, Conti V, Damato A, Ambrosio M, Puca AA, Sciarretta S, Frati G, Vecchione C, Carrizzo A. Targeting nitric oxide with natural derived compounds as a therapeutic strategy in vascular diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016; 2016: 7364138.
226. Franco MC, Antico Arciuch VG, Peralta JG, Galli S, Levisman D, Lopez LM, Romorini L, Poderoso JJ, Carreras MC. Hypothyroid phenotype is contributed by mitochondrial complex I inactivation due to translocated neuronal nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 2006; 281(8): 4779-4786.
227. Galione A. Cyclic ADP-ribose, the ADP-ribosyl cyclase pathway and calcium signalling. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1994; 98(2): 125-131.
228. Garfield RE, Saade G, Buhimschi C, Buhimschi I, Shi L, Shi SQ, Chwalisz K. Control and assessment of the uterus and cervix during pregnancy and labour. *Hum. Reprod. Update*. 1998; 4(5): 673-695.

229. Gellerich FN, Gizatullina Z, Gainutdinov T, Muth K, Seppet E, Vielhaber S. The of brain mitochondrial energization by cytosolic calcium: the mitochondrial gas pedal. *IUBMB Life*. 2013; 65(3): 180-190.
230. Ghafourifar P, Cadenas E. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol. Sci*. 2005; 26(4): 190-195.
231. Ghafourifar P, Richter Ch. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Letters*. 1997; 418: 291-296.
232. Ghimire K, Altmann HM, Straub AC, Isenberg JS. Nitric oxide: what's new to NO? *Am. J. Physiol. Cell. Physiol*. 2017; 312: C254-C262.
233. 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(Pt 1): 147-155.
234. Giuliani M, Morbioli I, Sansone F, Casnati A. Moulding calixarenes for biomacromolecule targeting. *Chem. Commun*. 2015; 51(75):14140-14159.
235. Giulivi C. Functional implications of nitric oxide produced by mitochondria in mitochondrial metabolism. *Biochem. J*. 1998; 332: 673-679.
236. Giulivi C, Kato K, Cooper CE. Nitric oxide regulation of mitochondrial oxygen consumption I: cellular physiology. *Am. J. Physiol*. 2006; 291(6): C1225-C1231.
237. Giulivi C. Mitochondria as generators and targets of nitric oxide. *Novartis Found Symp*. 2007; 287: 92-104.
238. Godo S, Shimokawa H. Divergent roles of endothelial nitric oxide synthases system in maintaining cardiovascular homeostasis. *Free Radic. Biol. Med*. 2017; 109: 4-10.
239. Gostimskaya IS, Grivennikova VG, Zharova TV, Bakeeva LE, Vinogradov AD. In situ assay of the intramitochondrial enzymes: use of alamethicin for permeabilization of mitochondria. *Anal. Biochem*. 2003; 313(1):46-52.
240. Graier WF, Frieden M, Malli R. Mitochondria and Ca^{2+} signaling: old quests, new functions. *Eur. J. Physiol*. 2007; 455: 375-396.
241. Griffiths EJ, Balaska D, Cheng WH. The ups and downs of mitochondrial calcium signalling in the heart. *Biochim. Biophys. Acta*. 2010; 1797(6-7): 856-64.
242. Guerra DD, Hurt KJ. Gasotransmitter in pregnancy: from conception to uterine involution. *Biol. Reprod*. 2019; 101(1): 4-25.

243. Gunst SJ, Tang DD. The contractile apparatus and mechanical properties of airway smooth muscle. *Eur. Respir. J.* 2000; 15(3): 600-616.
244. Gunter TE, Sheu SS. Characteristics and possible function of mitochondrial Ca^{2+} transport mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009; 1787(11): 1291-1308.
245. Gutierrez J, Ballinger SW, Darley-Usmar VM, Landar A: Free radicals, mitochondria, and oxidized lipids: the emerging role in signal transduction in vascular cells. *Circ. Res.* 2006; 99: 924-932.
246. Hardy S, Robillard PN. Modeling and Simulation of Molecular Biology Systems Using Petri Nets. *J. Bioinfo. Comput. Biol.* 2004; 2: 619-637.
247. Haynes V, Elfering S, Traaseth N, Giulivi C. Mitochondrial nitric-oxide synthase: enzyme expression, characterization, and regulation. *J. Bioenerg Biomembr.* 2004; 36(4): 341-346.
248. Heikal AA. Intracellular coenzymes as natural biomarkers for metabolic activities and mitochondrial anomalies. *Biomark. Med.* 2010; 4(2): 241-263.
249. Hennan JK, Diamond J. Evidence that spontaneous contractile activity in the rat myometrium is not inhibited by NO-mediated increases in tissue levels of cyclic GMP. *Br. J. Pharmacol.* 1998; 123(5): 959-967.
250. Herrmann-Frank A, Darling E, Meissner G. Functional characterization of the Ca^{2+} -gated Ca^{2+} release channel of vascular smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Pflugers Arch.* 1991; 418(4): 353-359.
251. Hoffman P, Stanke-Labesque F, Fanchin R, Dilai N, Pons JC, Ayoubi JM. Effects of L-arginine and sodium nitroprusside on the spontaneous contractility of human nonpregnant uterus. *Hum. Reprod.* 2003; 18(1): 148-151.
252. Holmes ME, Chaudhary J, Grover AK. Mechanism of action of the novel plasma membrane Ca^{2+} -pump inhibitor caloxin. *Cell Calcium.* 2003; 33(4): 241-245.
253. Hoppe UC. Mitochondrial calcium channels. *FEBS Lett.* 2010; 584(10): 1975-1981.
254. Hovnanian A. SERCA pumps and human diseases. *Subcell. Biochem.* 2007; 45: 337-363.
255. <https://somapp.ucdmc.ucdavis.edu/pharmacology/bers/maxchelator/downloads.htm>

256. Hsu C-N, Tain Y-L. Impact of arginine nutrition and metabolism during pregnancy on offspring outcomes. *Nutrients*. 2019; 11: 1452.
257. Hunte C, Palsdottir H, Trumpower BL. Protonmotive pathways and mechanisms in the cytochrome bc1 complex. *FEBS Lett*. 2003; 545(1): 39-46.
258. Ishii T, Sunami O, Saitoh N, Nishio H, Takeuchi T, Hata F. Inhibition of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase by nitric oxide. *FEBS Lett*. 1998; 440(1-2): 218-222.
259. Islam MS, Honma M, Nakabayashi T, Kinjo M, Ohta N. pH Dependence of the Fluorescence Lifetime of FAD in Solution and in Cells. *Int. J. Mol. Sci*. 2013; 14(1): 1952-1963.
260. Izumi H, Garfield RE. Relaxant effects of nitric oxide and cyclic GMP on pregnant rat uterine longitudinal smooth muscle. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol*. 1995; 60(2): 171-180.
261. Jackson WF. Potassium channels in regulation of vascular smooth muscle contraction and growth. *Adv. Pharmacol*. 2017; 78: 89-144.
262. James LR, Griffiths CH, Garthwaite J, Bellamy TC. Inhibition of nitric oxide-activated guanylyl cyclase by calmodulin antagonists. *Br. J. Pharmacol*. 2009; 158(6): 1454-1464.
263. Ji D, Kamalden TA, del Olmo-Aguado S, Osborne NN. Light- and sodium azide-induced death of RGC-5 cells in culture occurs via different mechanisms Apoptosis. 2011; 16(4): 425-37.
264. Jiang D, Zhao L, Clapham DE. Genome-wide RNAi screen identifies *Letm1* as a mitochondrial Ca²⁺/H⁺ antiporter. *Science*. 2009; 326(5949): 144-147.
265. Kaasik A, Safiulina D, Zharkovsky A, Veksler V. Regulation of mitochondrial matrix volume. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 2007; 292: C157-C163.
266. Kalbocova M, Vrbacky M, Drahota Z, Melková Z. Comparison of the effect of mitochondrial inhibitors on mitochondrial membrane potential in two different cell lines using flow cytometry and spectrofluorometry. *Cytometry*. 2003; Part A, 52(2): 110-116.
267. Kang S, Li H, Tang W, Martásek P, Roman LJ, Poulos TL, Silverman RB. 2-Aminopyridines with a truncated side chain to improve human neuronal nitric ox-

- ide synthase inhibitory potency and selectivity. *J. Med. Chem.* 2015 23; 58(14): 5548-5560.
268. Kannurpatti SS. Mitochondrial calcium homeostasis: Implications for neurovascular and neurometabolic coupling. *JCBFM.* 2017; 37(2): 381-395.
269. Karasinski J, Galas J, Semik D, Fiertak A, Bilinska B, Kilarski WM. Changes of connexin43 expression in non-pregnant porcine myometrium correlate with progesterone concentration during oestrous cycle. *Reprod. Domest Anim.* 2010; 45(6): 959-966.
270. Khan RN, Smith SK, Morrison JJ, Ashford ML. Ca^{2+} dependence and pharmacology of large-conductance K^+ channels in nonlabor and labor human uterine myocytes. *Am. J. Physiol.* 1997; 273: C1721- C1731.
271. Khorram O, Gartwaite M, Magness RR. Endometrial and myometrial expression of nitric oxide synthase isoforms in pre- and postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999;84(66):2226-2232.
272. Koch I, Reisig W, Schreiber F. *Modeling Systems Biology. The Petri Net Approach.* Springer. 2011.
273. Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y, Nagano T. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal. Chem.* 1998; 70(13): 2446-2453.
274. Kolomiets OV, Danylovyh YuV, Danylovyh GV. H^+ - Ca^{2+} exchanger in the Myometrium Mitochondria: Modulation by Exogenous and Endogenous Compounds. *Int. J. Phys. Pathophys.* 2015; 6(4): 287-297.
275. Kolomiets OV, Danylovyh YuV, Danylovyh HV, Kosterin SO. Ways and mechanisms of transmembrane exchange of Ca^{2+} in mitochondria. *Int. J. Phys. Pathophys.* 2018; 9(3): 265-286.
276. Kone BC, Kuncewicz T, Zhang W, Yu Z-Y. Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2003; 285: F178-F190.
277. Kosterin P, Kim GH, Muschol M, Obaid AL, Salzberg BM. Changes in FAD and NADH fluorescence in neurosecretory terminals are triggered by calcium entry and by ADP production. *J. Membr. Biol.* 2005; 208(2): 113-24.

278. Kosterin SA, Burdyga ThV, Fomin VP, Grover AK. Mechanism of Ca^{2+} -transport in myometrium. Control of Uterine Contractility. Eds. RE. Garfield, TN. Tabb. – CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, 1994, P. 129-153.
279. Kosterin SO. Kinetics and energetics of Mg^{2+} , ATP-dependent Ca^{2+} transport in the plasma membrane of smooth muscle cells. *Нейрофизиология/Neurophysiology*. 2003; 35(3/4): 215-228.
280. Krauss G. Biochemistry of signal transduction and regulation. Fifth, Completely Revised Edition. Wiley-VCH, Verlag GmbH&Co.KGaA. 2014, 815 p.
281. Kuenzli KA, Bradley ME, Buxton IL. Cyclic GMP-independent effects of nitric oxide on guinea-pig uterine contractility. *Br. J. Pharmacol*. 1996; 119(4): 737-743.
282. Kuenzli KA, Buxton IL, Bradley ME. Nitric oxide regulation of monkey myometrial contractility. *Br. J. Pharmacol*. 1998; 124(1): 63-68.
283. Kuznetsov AV, Javadov S, Hagenbuchner J, Ausserlechner MJ. Mitochondrial involvement in the molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in the heart. *Recent Res. Adv. Biol*. 2021; 8(6): 64-87.
284. Kuznetsov AV, Javadov S, Ausserlechner MJ, Hagenbuchner J. The role of cytoskeletal proteins in the regulation of mitochondrial function. *Recent Res. Adv. Biol*. 2021; 8(6): 39-63
285. Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy. Second edition. Plenum Publisher, New York, 1999.
286. Lang RJ, Harvey JR, McPhee GJ, Klemm MF. Nitric oxide and thiol reagent modulation of Ca^{2+} -activated K^+ (BK_{Ca}) channels in myocytes of the guineapig taenia caeci. *J. Physiol*. 2000; 525(Pt 2): 363-376.
287. Lee SE, Ahn DS, Lee YH. Role of T-type Ca channels in the spontaneous phasic contraction of pregnant rat uterine smooth muscle. *Korean J. Physiol. Pharmacol*. 2009; 13(3):241-249.
288. Leea JE, Yuanb H, Liangc F-X, Sehgal PB. Nitric oxide scavenging causes remodeling of the endoplasmic reticulum, Golgi apparatus and mitochondria in pulmonary arterial endothelial cell. *Nitric Oxide*. 2013; 33: 64-73.
289. Leite ACR, Oliveira HCF, Utino FL, Garcia R, Alberici LC, Fernandes MP, Castilho RF, Verces AE. Mitochondria generated nitric oxide protects against per-

- meability transition via formation of membrane protein S-nitrosothiols. *Biochim. Biophys. Acta.* 2010; 797: 1210-1216.
290. Levine AB, Punihaole D, Levine TB. Characterization of the role of nitric oxide and its clinical applications. *Cardiology.* 2012; 122: 55-68.
291. Li H, Wan A. Fluorescent probes for real-time measurement of nitric oxide in living cells. *Analyst.* 2015; 140: 7129-7141.
292. Li Y, Zhou X, Wei QW, Huang RH, Shi FX. Cell-specific expression and immunolocalization of nitric oxide synthase isoforms and soluble guanylyl cyclase α and β subunits in postnatal porcine uteri. *Acta Histochem.* 2014; 116(3): 466-473.
293. Litvinova L, Atochin DN, Fattakhov N, Vasilenko M, Zatolokin P, Kirienkova E. Nitric oxide and mitochondria in metabolic syndrome. *Front. Physiol.* 2015; 6: 20.
294. Liu B, Shi R, Li X, Liu Y, Feng X, Chen X, Fan X, Zhang Y, Zhang W, Tang J, Zhou X, Li N, Lu X, Xu Z. Downregulation of L-type voltage-gated Ca^{2+} , voltage-gated K^+ , and large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels in vascular myocytes from salt-loading offspring rats exposed to prenatal hypoxia. *J. Am. Heart Assoc.* 2018; 7(6): e008148.
295. Liu C, Cheng LM, Wah ST. Nitric Oxide, Iron and Neurodegeneration. *Front. Neurosci.* 2019; 13: Article 114.
296. Liu Z, Khalil RA. Evolving mechanisms of vascular smooth muscle contraction highlight key targets in vascular disease. *Biochem. Pharmacol.* 2018; 153: 91-122.
297. Lopez-Figueroa MO, Caamano C, Morano MI, Ronn LC, Akil H, Watson SJ. Direct Evidence of Nitric Oxide Presence within mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000; 272(1): 129-133.
298. Lorca RA, Prabakaran M, England SK. Functional insights into modulation of BK_{Ca} channel activity to alter myometrial contractility. *Front. Physiol.* 2014; 5: 289.
299. Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2008; 7(2): 156-167.
300. Malli R, Graier WF. Mitochondrial Ca^{2+} channels: Great unknowns with important functions. *FEBS Lett.* 2010; 584(10): 1942-1947.

301. Manoury B, Idres S, Leblais V, Fischmeister R. Ion channels as effectors of cyclic nucleotide pathways: Functional relevance for arterial tone regulation. *Pharmacol. Ther.* 2020; 209: 107499.
302. Marchetti C, Jouy N, Leroy-Martin B, Defossez A, Formstecher P, Marchetti P. Comparison of four fluorochromes for the detection of the inner mitochondrial membrane potential in human spermatozoa and their correlation with sperm motility. *Hum. Reprod.* 2004; 12(10): 2267-2276.
303. Marchi S, Giorgi C, Suski JM, Agnoletto C, Bononi A, Bonora M, De Marchi E, Missiroli S, Patergnani S, Poletti F, Rimessi A, Duszynski J, Wieckowski MR, Pinton P. Mitochondria-ros crosstalk in the control of cell death and aging. *J. Signal. Transduct.* 2012; 2012: 329635.
304. Marsh N, Marsh A. A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2000; 27: 313-319.
305. Martin C, Chapman KE, Thornton S, Ashley RH. Changes in the expression of myometrial ryanodine receptor mRNAs during human pregnancy. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999; 451(2-3): 343-352.
306. Maruyama I, Kobayashi M, Yoshida C, Momose K. Ultrastructure of single smooth muscle cells contracted by carbachol and calcium ion. *J. Pharmacobiodyn.* 1987;10(8):396-403.
307. Matsuki K, Takemoto M, Suzuki Y, Yamamura H, Ohya S, Takeshima H, Imaizumi Y. Ryanodine receptor type 3 does not contribute to contractions in the mouse myometrium regardless of pregnancy. *Pflugers Arch.* 2017; 469(2): 313-326.
308. Matsuno H, Tanaka Y, Aoshima H, Doi A, Matsui M, Miyano S. Biopathways representation and simulation on hybrid functional Petri net. *In Silico Biol.* 2003; 3: 389-404.
309. Matthew A, Shmygol A., Wray S. Ca^{2+} entry, efflux and release in smooth muscle. *Biol. Res.* 2004; 37(4): 617-624.
310. Mattiasson G. Flow cytometric analysis of isolated liver mitochondria to detected changes relevant to cell death. *Cytometry A.* 2004; 60(2):145-154.

311. McCarron JG, Olson ML, Wilson C, Sandison ME, Chalmers S. Examining the role of mitochondria in Ca^{2+} signaling in native vascular smooth muscle. *Microcirculation*. 2013; 20(4): 317-329.
312. Merkus HG. Particle size measurements. Fundamentals, practice, quality. Springer, 2009. 533 p.
313. Mesonero JE, Tanfin Z, Hilly M, Colosetti P, Mauger JP, Harbon S. Differential expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor types 1, 2, and 3 in rat myometrium and endometrium during gestation. *Biol. Reprod.* 2000; 63(2): 532-537.
314. Mirabile CP Jr, Massmann GA, Figueroa JP. Physiologic role of nitric oxide in maintenance of uterine quiescence on nonpregnant and pregnant sheep. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2000; 183(1): 191-198.
315. Mitchell BF, Aguilar HN, Mosher A, Wood S, Slater DM. The uterine myocyte as a target for prevention of preterm birth. *Facts Views Vis. Obgyn.* 2013; 5(1): 72-81.
316. Mohamed TM, Oceandy D, Zi M, Prehar S, Alatwi N, Wang Y, Shaheen MA, Abou-Leisa R, Schelcher C, Hegab Z, Baudoin F, Emerson M, Mamas M, Di Benedetto G, Zaccolo M, Lei M, Cartwright EJ, Neyses L. Plasma membrane calcium pump (PMCA4)-neuronal nitric-oxide synthase complex regulates cardiac contractility through modulation of a compartmentalized cyclic nucleotide microdomain. *J. Biol. Chem.* 2011; 286 (48): 41520-41529.
317. *Molecular probes handbook. A guide to fluorescent probes and labeling technologies.* 11-th edition. 2010. Chapter 22. Probes for membrane potential.
318. Mollard P, Mironneau J, Amedee T. Electrophysiological characterization of single pregnant rat myometrial cells in short-term primary culture. *Am. J. Physiol: Cell Physiol.* 1986; 250(1): C47-C54.
319. Momose K. Isolation, configuration and contractile responses of single smooth muscle cells. *Nihon Yakurigaku Zasshi.* 1993; 101(3): 101-110.
320. Moreau B, Nelson C, Parekh AB. Biphasic regulation of mitochondrial Ca^{2+} uptake by cytosolic Ca^{2+} concentration. *Curr. Biol.* 2006; 16(16): 1672-1677.
321. Morris SM. Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases. *Br. J. Pharmacol.* 2009; 157: 922-930.

322. Mu K, Yu S, Kitts DD. The role of nitric oxide in regulating intestinal redox status and intestinal epithelial cell functionality. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20(7): 1755.
323. Murphy E, Eisner DA. Regulation of intracellular and mitochondrial Na in health and disease. *Circ. Res.* 2009; 104(3): 292-303.
324. Murphy ME, Brayden JE. Nitric oxide hyperpolarizes rabbit mesenteric arteries via ATP-sensitive potassium channels. *J. Physiol.* 1995; 486(Pt.1): 47-58.
325. Mutchler SM, Straub AC. Compartmentalized nitric oxide signaling in the resistance vasculature. *Nitric Oxide.* 2015; 49: 8-15.
326. Myatt L, Brockman DE, Eis ALW, Pollock JS. Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the human placenta. *Placenta.* 1993; 14: 487-495.
327. Nadeem L, Shynlova O, Mesiano S, Lye S. Progesterone via its Type-A receptor promotes myometrial gap junction coupling. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 13357.
328. Nagasaki M, Saito A, Doi A, Matsuno H, Miyano S. Foundations of systems biology. using cell illustrator and pathway databases. Springer. 2009, 166 p.
329. Nagendran J, Michelakis ED. Mitochondrial NOS is upregulated in the hypoxic heart: implications for the function of the hypertrophied right ventricle. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2009; 296: H1723-H1726.
330. Nagono T, Friedovich I. The co-oxidation of ammonia to nitrite during the aerobic xanthine oxidase reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* 1985; 241(2): 596-601.
331. Nakatsubo N, Kojima H, Kikuchi K, Nagoshi H, Hirata Y, Maeda D, Imai Y, Irimura T, Nagano T. Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diaminofluoresceins. *FEBS Letters.* 1998; 427: 263-266.
332. Nimse S. Biological applications of functionalized calixarenes. *Chem. Soc. Rev.* 2013; 42(1): 366-86.
333. Nisoli E, Carruba MO. Nitric oxide and mitochondrial biogenesis. *J. Cell Sci.* 2006; 119(14): 2856-2862.
334. Noble K, Floyd R, Shmygol A, Shmygol A, Mobasher A, Wray S. Distribution, expression and functional effects of small conductance Ca-activated potassium (SK) channels in rat myometrium. *Cell Calcium.* 2010; 47(1):47-54.

335. Noble K, Matthew A, Burdyga T, Wray S. A review of recent insights into the role of the sarcoplasmic reticulum and Ca entry in uterine smooth muscle. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2009; 144 (Suppl 1): S11- S19.
336. Norman JE, Ward LM, Martin W, Cameron AD, McGrath JC, Greer I A, Cameron IT. Effects of cGMP and the nitric oxide donors glyceryl trinitrate and sodium nitroprusside on contractions in vitro of isolated myometrial tissue from pregnant women. *J. Reprod. Fertil.* 1997; 110(2): 249-254.
337. Norman JE, Cameron IT. Nitric oxide in the human uterus. *Rev. Reprod.* 1996; 1(1): 61–68.
338. Nosarev AV, Smagliy LV, Anfinogenova Y, Popov SV, Kapilevich LV. Exercise and NO production: relevance and implications in the cardiopulmonary system. *Front. Cell. Dev. Biol.* 2015; 2: 73.
339. Nowikowski K, Schweyen RJ, Bernardi P. Pathophysiology of mitochondrial volume homeostasis: potassium transport and permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009; 1787(5): 345-350.
340. Nowikovsky K, Pozzan T, Rizzuto R, Scorrano L, Bernardi P. The Pathophysiology of LETM1. *J. Gen. Physiol.* 2012; 139(6): 445-454.
341. Okamoto K, Shaw JM. Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 2005; 39: 503-536.
342. Okawa T, Sato A, Syal AS, Vedernikov YP, Saade GR, Garfield RE. Effect of nitric oxide donors on non-pregnant and pregnant rat uterine and aortic smooth muscle. *Fukushima J. Med. Sci.* 2003; 49(1): 23-32.
343. Okawa T, Vedernikov YP, Saade GR, Garfield RE. Effect of nitric oxide on contractions of uterine and cervical tissues from pregnant rats. *Gynecol. Endocrinol.* 2004; 18(4): 186-193.
344. Okawa T, Vedernikov YP, Saade GR, Longo M, Olson GL, Chwalisz K, Garfield RE. Roles of potassium channels and nitric oxide in modulation of uterine contractions in rat pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1999; 181(3): 649-655.
345. Omar SA, Webb AJ, Lundberg JO, Weitzberg E. Therapeutic effects of inorganic nitrate and nitrite in cardiovascular and metabolic diseases. *J. Intern. Med.* 2016; 279(4): 315-336.

346. Orlov SN, Platonova AA., Hamet P, Grygorczyk R. Cell volume and monovalent ion transporters: their role in cell death machinery triggering and progression. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2013; 305: C361-C372.
347. Pallafacchina G, Zanin S, Rizzuto R. From the identification to the dissection of the physiological role of the mitochondrial Calcium Uniporter: an ongoing story. *Biomolecules* 2021; 11: 786.
348. Palty R, Hershinkel M, Sekler I. Molecular Identity and Functional Properties of the Mitochondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchanger. *J. Biol. Chem.* 2012; 287(38): 31650-31657.
349. Pan S, Ryu S-Y, Sheu S-S. Distinctive characteristics and functions of multiple mitochondrial Ca^{2+} influx mechanisms. *Life Sci.* 2011; 54(8): 763-769.
350. Pan Y-C, Hu X-Y, Guo D-S. Biomedical applications of calixarenes: state of the art and perspectives. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2021; 60(6):2768-2794.
351. Pande J, Mallhi KK, Grover AK. A novel plasma membrane Ca^{2+} -pump inhibitor: caloxin 1A1. *Eur. J. Pharmacol.* 2005; 508(1-3): 1-6.
352. Pande J, Mallhi KK, Grover AK. Role of third extracellular domain of plasma membrane Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase based on novel inhibitor caloxin 3A1. *Cell Calcium.* 2005; 37(3): 245-250.
353. Papka RE, McNeill DL, Thompson D, Schmidt HH. Nitric oxide nerves in the uterus are parasympathetic, sensory, and contain neuropeptides. *Cell Tissue Res.* 1995; 279: 339-349.
354. Parihar MS, Nazarewicz RR, Kincaid E, Bringold U, Ghafourifar P. Association of mitochondrial nitric oxide synthase activity with respiratory chain complex I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008; 366: 23-28.
355. Patrat C, Serres C, Jouannet P. Progesterone induces hyperpolarization after a transient depolarization phase in human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 2002; 66(6):1775-1780.
356. Peng H, Chen L, Huang X, Yang T, Yu Z, Cheng G, Zhang G, Shi R. Vascular peroxidase 1 up regulation by angiotensin II attenuates nitric oxide production through increasing asymmetrical dimethylarginine in HUVECs. *J. Am. Soc. Hypertens.* 2016; 10(9): 741-751.

357. Peng SC, Chang H-M, Hsu DF, Tang CY. Modeling signal transduction of neural system by hybrid Petri net representation. *Operation Res. Proc.* 2004; 34: 271-279.
358. Perret F, Lazar AN, Coleman AW. Biochemistry of the para-sulfonato-calix[n]arenes. *Chem. Commun.* 2006; 23: 2425-2438.
359. Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Gelbard HA. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Bio-techniques.* 2011; 50(2): 98-115.
360. Petri C.A. Kommunikation mit Automaten. Ph.D dissertation. University of Bonn. West Germany. 1962.
361. Philippu A. Nitric Oxide: a universal modulator of brain function. *Curr. Med. Chem.* 2016; 23(24): 2643-2652.
362. Piantadosi CA, Suliman HB. Redox regulation of mitochondrial biogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* 2012; 53(11): 2043-2053.
363. Piao I, Li Y, Kim SJ, Byun HS, Huang SM, et al. Association of LETM1 and MRPL36 contributes to the regulation of mitochondrial ATP production and necrotic cell death. *Cancer Res.* 2009; 69(8): 3397-3404.
364. Pierce SJ, Kupittayanant S, Shmygol T, Wray S. The effects of pH change on Ca(++) signaling and force in pregnant human myometrium. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2003; 188(4): 1031-1038.
365. Pitocco D, Zaccardi F, Di Stasio E, Romitelli F, Santini SA, Zuppi C, Ghirlanda G. Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. *Rev. Diabet Stud.* 2010; 7(1): 15-25.
366. Plotnikov EY, Kazachenko AV, Vyssokikh MY, Vasileva AK, Tcvirkun DV, Isaev NK, Kirpatovsky VI, Zorov DB. The role of mitochondria in oxidative and nitrosative stress during ischemia/reperfusion in the rat kidney. *Kidney Int.* 2007; 72(12): 1493-1502.
367. Poderoso JJ, Carreras MC, Schopfer F, Lisdero C, Riobo N, Giulivi C, Boveris A, Boveris AA, Cadenas E. The reaction of nitric oxide with ubiquinol: kinetic properties and biological significance. *Free Radic. Biol. Med.* 1999; 26: 925-935.
368. Poniedziatek-Czajkowska E, Marciniak B, Kimber-Trojnar Z, Leszczynska-Gorzela B, Oleszczuk J. Nitric oxide in normal and preeclamptic pregnancy. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2011; 12(5): 743-749.

369. Porcelli V, Fiermonte G, Longo A, Palmieri F. The Human gene *SLC25A29*, of solute carrier family 25, encodes a mitochondrial transporter of basic amino acids. *J. Biol. Chem.* 2014; 289(19): 13374-13384.
370. Pucovský V, Gordienko DV, Bolton TB. Effect of nitric oxide donors and noradrenaline on Ca^{2+} release sites and global intracellular Ca^{2+} in myocytes from guinea-pig small mesenteric arteries. *J. Physiol.* 2002; 539(Pt 1): 25-39.
371. Radi R, Cassina A, Hodara R. Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. *Biol. Chem.* 2002; 383(3-4): 401-409.
372. Raeymaekers L, Hofmann F, Casteels R. Cyclic GMP-dependent protein kinase phosphorylates phospholamban in isolated sarcoplasmic reticulum from cardiac and smooth muscle. *Biochem. J.* 1988; 252(1): 269-273.
373. Raiagopal S, Ponnusamy M. Calcium signaling: from physiology to diseases. Springer. 2017.
374. Rasola A, Bernardi P. Mitochondrial permeability transition in Ca^{2+} -dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium.* 2011; 50(3): 222-233.
375. Rathbun W, Betluch V. Estimation of enzymically produced orthophosphate in the presence of cystein and adenosine triphosphate. *Anal. Biochem.* 1969; 28(1-3): 436-445.
376. Reddy VN, Mavrovouniotis ML, Liebman MN. Petri net representations in metabolic pathways. *Proc.Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* 1993; 1: 328-336.
377. Riess ML, Camara AK, Kevin LG, An J, Stowe DF. Reduced reactive O_2 species formation and preserved mitochondrial NADH and $[\text{Ca}^{2+}]$ levels during short-term 17 degrees C ischemia in intact hearts. *Cardiovasc. Res.* 2004; 61(3): 580-590.
378. Riobo NA, Melani M, Sanjuan N, Fiszman ML, Gravielle MC, Carreras MC, Cadenas E, Poderoso JJ. The modulation of mitochondrial nitric-oxide synthase activity in rat brain development. *J. Biol. Chem.* 2002; 277(45): 42447-42455.
379. Rizzuto R, Marchi S, Bonora M, Aguiary P, Bononi A. Ca^{2+} transfer from the ER to mitochondria: When, how and why. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009; 1787(11): 1342-1351.
380. Roufogalis BD, Minocherhomejee A-E-V M, Al-Jobore A. Pharmacological antagonism of calmodulin. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 1983; 61: 927-933.

381. Ryu S-Y, Beutner G, Dirksen RT, Kinnally KW, Sheu S-S. Mitochondrial ryanodine receptors and other mitochondrial Ca^{2+} permeable. *FEBS Lett.* 2010; 584(10): 1948-1955.
382. Sabnis RW, Deligeorgiev TG, Jachak MN, Dalvi TS. DiOC6(3): a useful dye for staining the endoplasmic reticulum. *Biotech. Histochem.* 1997; 72(5): 253-258.
383. Salem MM, Shalhaf M, Gibbons NC, Chavan B, Thornton JM, Schallreuter KU. Enhanced DNA binding capacity on up-regulated epidermal wild-type p53 in vitiligo by H_2O_2 -mediated oxidation: a possible repair mechanism for DNA damage. *FASEB J.* 2009; 23(11): 3790-3807.
384. Sakurada S, Okamoto H, Takuwa N, Sugimoto N, Takuwa Y. Rho activation in excitatory agonist-stimulated vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2001; 281(2): C571- C578.
385. Salvioli S, Ardizzoni A, Franceschi C, Cossarizza A. JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess delta psi changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Letters.* 1997; 411(1): 77-82.
386. Sanchez-Padilla J, Guzman JN, Ilijic E, Kondapalli J, Galtieri DJ, Yang B, Schieber S, Oertel W, Wokosin D, Schumacker PT, Surmeier DJ. Mitochondrial oxidant stress in locus coeruleus is regulated by activity and nitric oxide synthase. *Nat. Neurosci.* 2014; 17(6): 832-840.
387. Sanders KM. Mechanisms of calcium handling in smooth muscles. *J. Appl. Physiol.* 2001. 91(3): 1438-1449.
388. Sanders KM. Spontaneous electrical activity and rhythmicity in gastrointestinal smooth muscles. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019; 1124: 3-46.
389. Santo-Domingo J, Demarex N. Calcium uptake mechanisms of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 2010; 1797(6-7): 907-912.
390. Santo-Domingo J, Wiederkehr A, De Marchi U. Modulation of the matrix redox signaling by mitochondrial Ca^{2+} . *World J. Biol. Chem.* 2015; 6(4): 310-323.
391. Santos CXC, Anilkumar N, Zhang M, Brewer AC, Shah AM. Redox signaling in cardiac myocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 2011; 50(7): 777-793.

392. Satrústegui J, Pardo B, Del Arco A. Mitochondrial transporters as novel targets for intracellular calcium signaling. *Physiol. Rev.* 2007; 87(1): 29-67.
393. Schae D, Ratikan JA, Iwamoto KS. Cellular autofluorescence following ionizing radiation. *PLOSone*. 2012; 7(2): e32062.
394. Schlickum S, Moghekar A, Simpson JC, Steglich C, O'Brien RJ, Winterpacht A, Ende SU. LETM1, a gene deleted in Wolf-Hirschhorn syndrome, encodes an evolutionarily conserved mitochondrial protein. *Genomics*. 2004; 83(2): 254-261.
395. Schmidt HHHW, Hofmann H, Ogilvie P. The role of nitric oxide in physiology and Pathophysiology. Springer. 1995; 75–86.
396. Schmidt TS, Alp NJ. Mechanisms for the role of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease. *Clin. Sci (Lond)*. 2007; 113(2): 47-63.
397. Schönfeld P, Wojtczak L. Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: the cellular perspective. *J. Lipid Res.* 2016; 57(6): 943-954.
398. Shah AT, Beckler MD, Walsh AJ, Jones WP, Pohlmann PR, Skala MC. Optical metabolic imaging of treatment response in human head and Neck squamous cell carcinoma. *PLOSone*. 2014; 9(3): e90746.
399. Shao J, Fu Z, Ji Y, Guan X, Guo S, Ding Z, Yang X, Cong Y, Shen Y. Leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1 (LETM1) forms a $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporter. *Sci. Rep.* 2016; 6: 341-374.
400. Shimano M, Nakaya Y, Fukui R, Kamada M, Hamada Y, Maeda K, Aono T. Activation of Ca^{2+} -activated K^{+} channels in human myometrium by nitric oxide. *Gynecol. Obstet. Invest.* 2000; 49(4): 249-254.
401. Shiva S. Mitochondria as metabolizers and targets of nitrite. *Nitric Oxide*. 2010; 22(2): 64-74.
402. Shiva S. Nitrite: A physiological store of nitric oxide and modulator of mitochondrial function. *Redox Biol.* 2013; 1(1): 40-44.
403. Shlykov SG, Babich LG, Yevtushenko ME, Karakhim SO, Kosterin SO. Calmodulin antagonists effect on Ca^{2+} level in the mitochondria and cytoplasm of myometrium cells. *Ukr. Biochem. J.* 2015; 87(5): 54-60.

404. Shoji KF, Debure L. Fluorometric methods for detection of mitochondrial membrane depolarization induced by CD95 activation. *Methods Mol. Biol.* 2017; 1557: 49-62.
405. Shuttleworth CW, Prennan AM, Connor JA. NAD(P)H fluorescence imaging of postsynaptic neuronal activation in murine hippocampal slices. *J. Neurosci.* 2003; 23(8): 3196-3208.
406. Shynlova O, Tsui P, Jaffer S, Lye SJ. Integration of endocrine and mechanical signals in the regulation of myometrial functions during pregnancy and labour. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2009; 144(1): S2-10.
407. Siervo M, Scialò F, Shannon OM, Stephan BCM, Ashor AW. Does dietary nitrate say NO to cardiovascular ageing? Current evidence and implications for research. *Proc. Nutr. Soc.* 2018; 77(2): 112-123.
408. Silvagno F, Xia H, Bredt D S. Neuronal nitric-oxide synthase- μ , an alternatively spliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 1996; 271(19): 11204-11208.
409. Simon A, Plies L, Habermeier A, Martiné U, Reining M, Closs EI. Role of neutral amino acid transport and protein breakdown for substrate supply of nitric oxide synthase in human endothelial cells. *Circ. Res.* 2003; 93(9): 813-20.
410. Siomek A. NF- κ B signaling pathway and free radical impact. *Acta Biochim. Pol.* 2012; 59(2): 323-331.
411. Sivandzade F, Bhalerao A, Cucullo L. Analysis of the mitochondrial membrane potential using the cationic JC-1 dye as a sensitive fluorescent probe. *Bio. Protoc.* 2019; 9(1): e3128.
412. Skala MC, Riching KM, Gendron-Fitzpatrick A, Eickhoff J, Eliceiri KW, White JG, Ramanujam N. In vivo multiphoton microscopy of NADH and FAD redox states, fluorescence lifetimes, and cellular morphology in precancerous epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2007; 104(49): 19494-19499.
413. Sladek MS, Magness RR, Conrad KP. Nitric oxide and pregnancy. *Am. J. Physiol.* 1997; 272(2): R441-R463.

414. Smith RC, McClure MC, Smith MA, Abel PW, Bradley ME. The role of voltage-gated potassium channels in the regulation of mouse uterine contractility. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2007; 5:41.
415. Sobieszek A. Calmodulin antagonist action in smooth-muscle myosin phosphorylation. Different mechanisms for trifluoperazine and calmidazolium inhibition. *Biochem. J.* 1989; 262(1): 215-223.
416. Sommer B, Flores-Soto E, Gonzalez-Avila G. Cellular Na⁺ handling mechanisms involved in airway smooth muscle contraction. *Int. J. Mol. Med.* 2017; 40(1): 3-9.
417. Staniszewski K, Audi SH, Sepehr R, Jacobs ER, Ranji M. Surface fluorescence studies of tissue mitochondrial redox state in isolated perfused rat lungs. *Ann. Biomed. Eng.* 2013; 41(4): 827-836.
418. Stowe DF, Gadicherla AK, Zhou Y, Aldakkak M, Cheng Q, Kwok W-M, Jiang MT, Heisner JS, Yang M, Camara AKS. Protection against cardiac injury by small Ca²⁺-sensitive K⁺-channels identified in guinea pig cardiac inner mitochondrial membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013; 1828(2): 427-442.
419. Syal AS, Vedernikov YP, Chwalisz K, Saade GR, Garfield RE. Both soluble guanylate cyclase and particulate guanylate cyclase regulate myometrial contractility. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1998; 179(1): 111-116.
420. Szabadkai G, Duchen MR. Mitochondria: The hub of cellular Ca²⁺ signaling. *Physiology.* 2008; 23: 84-94.
421. Szabo I, Zoratti M. Mitochondrial channels: ion fluxes and more. *Physiol. Rev.* 2014; 94: 519-608.
422. Szasz T, Webb RC. Rho-mancing to sensitize calcium signaling for contraction in the vasculature: role of Rho kinase. *Adv. Pharmacol.* 2017; 78: 303-322.
423. Szydlarska J, Weiss C, Marycz K. The Effect of methyl- β -cyclodextrin on apoptosis, proliferative activity, and oxidative stress in adipose-derived mesenchymal stromal cells of horses suffering from metabolic syndrome (EMS). *Molecules.* 2018; 23(2): 287.
424. Takeuchi A, Kim B, Matsuoka S. The destiny of Ca(2+) released by mitochondria. *J. Physiol. Sci.* 2015; 65(1): 11-24.

425. Talib J, Kwan J, Suryo Rahmanto A, Witting PK, Davies MJ. The smoking-associated oxidant hypothiocyanous acid induces endothelial nitric oxide synthase dysfunction. *Biochem. J.* 2014; 457: 89-97.
426. Tang Y, Wang F. Ion channel modeling and simulation using hybrid functional Petri net. *Lecture Notes Comp. Sci.* 2010; 6330: 404-412.
427. Tang Y, Wang F. Neural system modeling and simulation using hybrid functional Petri net. *J. Bioinform. Comput. Biol.* 2012; 10(1): 1240006.
428. Tarasova NV, Vishnyakova PA, Logashina YuA, Elchaninov AV. Mitochondrial Calcium Uniporter structure and function in different types of muscle tissues in health and disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20(19): 4823.
429. Tatoyan A, Giulivi C. Purification and characterization of a nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 1998; 273(18): 11044-11048.
430. Telfer JF, Itoh H, Thomson AJ, Norman JE, Nakao K, Campa JS, Poston L, Tribe RM, Magness RR. Activity and expression of soluble and particulate guanylate cyclases in myometrium from nonpregnant and pregnant women: down-regulation of soluble guanylate cyclase at term. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001; 86(12): 5934-43.
431. Tengan CH, Rodrigues GS, Godinho RO. Nitric oxide in skeletal muscle: role on mitochondrial biogenesis and function. *Int. J. Mol. Sci.* 2012; 13(12): 17160-84.
432. Tewari K, Simard IM. Effect of nitric oxide vasorelaxation in smooth muscle cells from cortical arterioles. *Biophys. J.* 1994; 66(2): 98-107.
433. Thomas DD, Liu X, Kantrow SP, Lancaster JR Jr. The biological lifetime of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2001; 98(1): 355-60.
434. Tiboni GM, Giampietro F, Lamonaca D. The soluble guanylate cyclase inhibitor methylene blue evokes preterm delivery and fetal growth restriction in a mouse model. *In Vivo.* 2001; 15: 333-337.
435. Tica VI, Tica AA, Carling V, Banica O S. Magnesium ion inhibits spontaneous and induced contractions of isolated uterine muscle. *Gynecol. Endocrinol.* 2007; 23(7): 368-372.

436. Tichenor SD, Malmquist NA, Buxton IL. Dissociation of cGMP accumulation and relaxation in myometrial smooth muscle: effects of S-nitroso-N-acetylpenicillamine and 3-morpholinopyrrolidine. *Cell. Signal.* 2003; 15(8): 763-772.
437. Toda N, Toda H, Okamura T. Regulation of myometrial circulation and uterine vascular tone by constitutive nitric oxide. *Eur. J. Pharmacol.* 2013; 714(1-3): 414-423.
438. Tortora V, Quijano C, Freeman B, Radi R, Castro L. Mitochondrial aconitase reaction with nitric oxide, S-nitrosoglutathione, and peroxynitrite: mechanisms and relative contributions to aconitase inactivation. *Free Radic Biol Med.* 2007; 42(7): 1075-1088.
439. Tota B, Quintieri AM, Angelone T. The emerging role of nitrite as an endogenous modulator and therapeutic agent of cardiovascular function. *Curr. Med. Chem.* 2010; 17(18): 1915-1925.
440. Traaseth N, Elfering S, Solien J, Haynes V, Giulivi C. Role of calcium signaling in activation of mitochondrial nitric oxide synthase and citric acid cycle. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004; 1658(1-2): 64-71.
441. Trebak M, Ginnan R, Singer HA, Jourdain D. Interplay between calcium and reactive oxygen/nitrogen species: an essential paradigm for vascular smooth muscle signaling. *Antioxid. Redox Signal.* 2010; 12(5): 657-673.
442. Treuer AV, Gonzalez DR. Nitric oxide synthases, S-nitrosylation and cardiovascular health: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities (Review). *Mol. Med. Rep.* 2015; 11(3):1555-1565.
443. Tribe RM, Moriarty P, Dalrymple A, Hassoni AA, Poston L. Interleukin-1 β induces calcium transients and enhances basal and store operated calcium entry in human myometrial smooth muscle. *Biol. Reprod.* 2003;68(5):1842-9.
444. Tripathi P. Nitric oxide and immune response. *Ind. J. Biochem. Biophys.* 2007; 44: 310-319.
445. Trumpower BL. The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc₁ complex. *J. Biol. Chem.* 1990; 265(20): 11409-11412.
446. Tsai KD, Chen W, Wang SH, Hsiao YW, Chi JY, Wu HY, Lee YJ, Wong HY, Tseng MJ, Lin TH. Downregulation of connective tissue growth factor by LPS/IFN- γ -induced nitric oxide is reversed by aristolochic acid treatment in glo-

- merular mesangial cells via STAT-1 α and NF- κ B signaling. *Chem. Biol. Interact.* 2014; 210: 86-95.
447. Ulrich C, Quilici DR, Schlauch KA, Buxton ILO. The human uterine smooth muscle S-nitrosoproteome fingerprint in pregnancy, labor, and preterm labor. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2013; 305: C803-C816.
448. Valdes G, Corthorn J. Review: the angiogenic and vasodilatory uteroplacental network. *Placenta.* 2011; 32 (Suppl 2): S170-175.
449. Valdez LB, Boveris A. Mitochondrial nitric oxide synthase, a voltage-dependent enzyme, is responsible for nitric oxide diffusion to cytosol. *Front. Biosci.* 2007; 12: 1210-1219.
450. Valdez LB, Zaobornyj T, Boveris A. Mitochondrial metabolic states and membrane potential modulate mtNOS activity. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006; 1757(3): 166-172.
451. Vallot O, Combettes L, Lompre A-M. Functional coupling between the caffeine/ryanodine-sensitive Ca²⁺ store and mitochondria in rat aortic smooth muscle cells. *Biochem. J.* 2001; 357(Pt 2): 363-371.
452. Van Bavel E, van der Meulen ET, Spaan JA. Role of Rho-associated protein kinase in tone and calcium sensitivity of cannulated rat mesenteric small arteries. *Exp. Physiol.* 2001; 86(5): 585-592.
453. Van Straaten JF, Postma DS, Coers W, Noordhoek JA, Kauffman HF, Timens W. Macrophages in lung tissue from patients with pulmonary emphysema express both inducible and endothelial nitric oxide synthase. *Mod. Pathol.* 1998; 11(7):648-55.
454. Vedernikov YP, Syal AS, Okawa T, Jain V, Saade GR, Garfield RE. The role of cyclic nucleotides in the spontaneous contractility and responsiveness to nitric oxide of the rat uterus at midgestation and term. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2000; 182(3): 612-619.
455. Veklich TO, Skrabak OA, Slinchenko NN, Mazur II, Rodik RV, Boyko VI, Kalchenko VI, Kosterin SO. Calix[4]arene C-90 selectively inhibits Ca²⁺,Mg²⁺-ATPase of myometrium cell plasma membrane. *Biochemistry.* 2014; 79(5): 417-424.

456. Veklich TO. The inhibitory influence of calix[4]arene of C-90 on the activity of Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPases in plasma membrane and sarcoplasmic reticulum in myometrium cells. *Ukr. Biochem. J.* 2016; 88(2): 5-15.
457. Veklich TO, Skrabak OA, Nikonishyna YuV, Rodik RV, Kalchenko VI, Kosterin SO. Calix[4]arene C-956 selectively inhibits plasma membrane Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase in myometrial cells. *Ukr. Biochem. J.* 2018; 90(5): 34-42.
458. Waldeck-Weirmair M, Jean-Quartier C, Rost R. Leucine zipper EF hand-containing transmembrane protein 1 (Letm1) and uncoupling proteins 2 and 3 (UCP2/3) contribute to two distinct mitochondrial Ca^{2+} uptake pathways. *J. Biol. Chem.* 2012; 286(32): 28444-28455.
459. Walewska A, Szewczyk A, Koprowski P. Gas signaling molecules and mitochondrial potassium channels. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19: 3227.
460. Wang HW, Wei YH, Guo HW. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) fluorescence for detection of cell death. *Anticancer Agents Med. Chem.* 2009; 9(9): 1012-1017.
461. Watzke N, Diekert K, Obrdlik P. Electrophysiology of respiratory chain complexes and the ADP-ATP exchanger in native mitochondrial membranes. *Biochemistry.* 2010; 49(48): 10308-10318.
462. Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv. Physiol. Educ.* 2003; 27(4): 201-206.
463. Wetzka B, Schafer WR, Stehmans A, Zahradnik HP. Effect of nitric oxide donors on the contractility and prostaglandin synthesis of myometrial strips from pregnant and non-pregnant women. *Gynecol. Endocrinol.* 2001; 15(1): 34-42.
464. Wieraszko A. Evidence that ruthenium red disturbs the synaptic transmission in the rat hippocampal slices through interacting with sialic acid residues. *Brain Res.* 1986; 378(1): 120-126.
465. Wingender E. (ed.) *Biological Petri Nets*. IOSPress. 2011, 314 p.
466. Wolken GG, Arriaga EA. Simultaneous measurement of individual mitochondrial membrane potential and electrophoretic mobility by capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* 2014; 86: 4217-4226.

467. Wray S, Burdyga T. Sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle. *Physiol. Rev.* 2010; 90(1): 113-178.
468. Wray S, Kupittayanant S, Shmygol A, Smith RD, Burdyga T. The physiological basis of uterine contractility: a short revive. *Exp. Physiol.* 2001; 86(2): 239-246.
469. Wray S, Prendergast C. The myometrium: from excitation to contractions and labour. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019; 1124: 233-263.
470. Wray S, Shmygol A. Role of the calcium store in uterine contractility. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 2007; 18(3): 315-320.
471. Wu G, Morris SM. Arginine metabolism : nitric oxide and beyond. *Biochem. J.* 1998; 336: 1-17.
472. Xiao D, Pearce WJ, Zhang L. Pregnancy enhances endothelium-dependent relaxation of ovine uterine artery: role of NO and intracellular Ca^{2+} . *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2001; 281: H183-H190.
473. Xie Z, Cai T. Na^+ - K^+ -ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function. *Mol. Interv.* 2003; 3(3): 157-168.
474. Xiong D. Colorimetric detection of pesticides based on calixarene modified silver nanoparticles in water. *Nanotechnology.* 2008; 19(46): 126-135.
475. Yallampalli C, Izumi H, Byam-Smith M and Garfield RE. An L-arginine–nitric oxide–cyclic guanosine monophosphate system exists in the uterus and inhibits contractility during pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1994; 170: 175-185.
476. Yamamura H, Kawasaki K, Inagaki S, Suzuki Y, Imaizumi Y. Local Ca^{2+} coupling between mitochondria and sarcoplasmic reticulum following depolarization in guinea pig urinary bladder smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2018; 314: C88-C98.
477. Yellon SM, Mackler AM, Kirby MA. The role of leukocyte traffic and activation in parturition. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 2003; 10(6): 323-338.
478. Yi-Dong Y, Li M-M, Xu G, Zhang E-L, Chen J, Sun B, Chen D-W, Gao Y-Q. Targeting mitochondria-associated membranes as a potential therapy against endothelial injury induced by hypoxia. *J. Cell. Biochem.* 2019; 120(11): 18967-18978.
479. Ying W. NAD^+ / $NADH$ and $NADP^+$ / $NADPH$ in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. *Antioxid. Redox Signal.* 2008; 10(2): 179-206.

480. Yu J-Z, Zhang DX, Zou A-P, Campbell WB, Li P-L. Nitric oxide inhibits Ca^{2+} mobilization through cADP-ribose signaling in coronary arterial smooth muscle cell. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2000; 279: H873-H881.
481. Yusufi AN, Cheng J, Thompson MA, Dousa TP, Warner GM, Walker HJ, Grande JP. cADP-ribose/ryanodine channel/ Ca^{2+} -release signal transduction pathway in mesangial cells. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2001;281(1):F91-F102.
482. Zaobornyj T, Ghafourifar P. Strategic localization of heart mitochondrial NOS: a review of the evidence. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2012; 303(11): H1283- H1293.
483. Zhang J, Massmann GA, Mirabile CP, Figueroa JP. Nonpregnant sheep uterine type 1 and type 2 nitric oxide synthase expression is differentially regulated by estrogen. *Biol. Reprod.* 1999; 60(5):1198-11203.
484. Zhang L, Staehra C, Zengb F, Bouzinovaa EV, Matchkov VV. The Na,K-ATPase in vascular smooth muscle cells. *Curr. Top. Membr.* 2019; 83: 152-175.
485. Zhao C., Wu AY-H, Yu X, Gu Y, Lu Y, Song X, An N, Zhang Y. Microdomain elements of airway smooth muscle in calcium regulation and cell proliferation. *J. Physiol. Pharmacol.* 2018; 69(2): 151-163.
486. Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SW. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J. Pharmacol. Sci.* 2015; 129(2): 83-94.
487. Zhou L, Chang DC. Dynamics and structure of the Bax-Bak complex responsible for releasing mitochondrial proteins during apoptosis. *J. Cell. Sci.* 2008; 121(Pt 13): 2186-2196.
488. Zhou X-B, Wang G-X, Ruth P, Huñeke B, Korth M. BKCa channel activation by membrane-associated cGMP kinase may contribute to uterine quiescence in pregnancy. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2000; 279(6): C1751-C1759.
489. Zima AV, Blatter LA. Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. *Cardiovasc. Res.* 2006; 71(2): 310-321.
490. Zorov DB, Kobrinsky E, Juhaszova M, Sollott SJ. Examining intracellular organelle function using fluorescent probes: from animalcules to quantum dots. *Circ. Res.* 2004; 95: 239-252.

491. Zorovaa LD, Popkova VA, Plotnikova EY, Silacheva DN, Pevznera IB, Jankauskasa SS, Babenko VA, Zorovc SD, Balakirevad AV, Juhaszovae M, Sollotte SJ, Zorov DB. Mitochondrial membrane potential. *Anal. Biochem.* 2018; 552: 50-59.
492. Zullino S, Buzzella F, Simoncini T. Nitric oxide and biology of pregnancy. *Vascul. Pharmacol.* 2018; 110: 71-74.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

- статті у наукових періодичних фахових виданнях України, у т.ч. які входять до міжнародних науко метричних баз:

1. **Danylovych H.V.**, Chunikhin A.Yu., Danylovych Yu.V., Kosterin S.O. Application of petri nets methodology for the examination of the bio(physico)chemical parameters of mitochondria functioning. [bioRxiv preprint](https://doi.org/10.1101/2020.01.22.915074) first posted online Jan. 23, 2020; doi: <http://dx.doi.org/10.1101/2020.01.22.915074>. // Ukr. Biochem. J. 2021; 93(3): 101-110. *(Особистий внесок: проведено біохімічні дослідження, здійснено узагальнення отриманих результатів, написано та оформлено публікацію)*

2. Данилович Ю.В., **Данилович Г.В.**, Костерін С.О. Роль іонів калію у біосинтезі оксиду азоту в мітохондріях гладенького м'яза. Фізіол. журн. 2021; 67 (1): 16-23. *(Особистий внесок: сформульовано ідею роботи, спільно з співавторами проведено дослідження, здійснено узагальнення отриманих результатів, статистичний аналіз, написано та оформлено публікацію).*

3. **Danylovych H.V.**, Danylovych Yu.V., Bohach T.V., Hurska V.T., Kosterin S.O. Sources and regularity of nitric oxide synthesis in uterus smooth muscle cells. Ukr. Biochem. J. 2019; 91(4): 33-40. *(Особистий внесок: сформульовано наукову задачу, спільно з співавторами проведено дослідження, здійснено узагальнення отриманих результатів, проведено статистичний аналіз, підготовлено рукопис).*

4. **Danylovych G.V.**, Bohach T.V., Danylovych Yu.V. The biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. Nitric oxide formation features and its functional role in mitochondria. Ukr. Biochem. J. 2018; 90(1): 3-24. *(Особистий внесок: сформульовано ідею публікації, здійснено пошук та аналіз літературних даних, оформлення публікації).*

5. **Danylovych G.V.**, Kolomiets O.V., Danylovych Yu.V., Rodik R.V., Kalchenko V.I., Kosterin S.O. Calix[4]arene C-956 is effective inhibitor of H^+ - Ca^{2+} -exchanger in smooth muscle mitochondria. Ukr. Biochem. J. 2018; 90(1): 25-31. *(Особистий внесок: сформульовано ідею роботи, спільно з співавторами про-*

ведено дослідження, здійснено узагальнення отриманих результатів, кінетичний та статистичний аналіз, підготовлено публікацію).

6. Данилович Ю.В., **Данилович Г.В.**, Коломієць О.В., Родік Р.В., Кальченко В.І., Костерін С.О. Дія калікс[4]аренів на транспорт Ca^{2+} , електричний потенціал та активність електрон-транспортувального ланцюга в мітохондріях гладенького м'язу. Збірник наукових праць «Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології». 2017; 15(2): 365-371. (Особистий внесок: спільно з співавторами сформульовано наукову задачу та проведено дослідження, узагальнення та аналіз результатів, написано та оформлено публікацію).

7. **Danylovych H.V.** Evaluation of functioning of mitochondrial electron transport chain with NADH and FAD autofluorescence. Ukr. Biochem. J. 2016; 88(1): 31-43.

8. Danylovych Yu.V., Chunikhin A.Y., **Danylovych G.V.**, Kolomiets O.V. The use of the Petri net method in the simulation modeling of mitochondrial swelling. Ukr. Biochem. J. 2016; 88(4): 66-74. (Особистий внесок: спільно з співавторами проведено дослідження, здійснено аналіз та узагальнення отриманих результатів, оформлено публікацію).

9. Danylovych Yu.V., Karakhim S.A., Kolomiets O.V., **Danylovych G.V.**, Kosterin S.O. Identification of nitric oxide in mitochondria of myometrium cell. Biopolymers and Cell. 2015; 31(3): 174-178. (Особистий внесок: спільно з співавторами проведено дослідження, здійснено аналіз та узагальнення отриманих результатів, оформлено публікацію).

10. Danylovych Yu.V., Karakhim S.A., **Danylovych G.V.**, Kolomiets O.V., Kosterin S.O. Electrochemical potential of the inner mitochondrial membrane and Ca^{2+} homeostasis of myometrium cells. Ukr. Biochem. J. 2015; 87(5): 56-65. (Особистий внесок: участь у виділенні інтактних міоцитів, проведення досліджень на лазерному конфокальному мікроскопі, відпрацювання протоколу досліджень на протоковому цитометрі для фракції мітохондрій та зонду Flio-4 AM, здійснено аналіз та узагальнення отриманих результатів, оформлено публікацію).

11. Данилович Ю.В., **Данилович Г.В.**, Коломієць О.В., Костерін С.О., Каракхім С.О., Чуніхін О.Ю. Дослідження впливу нітрозактивних сполук на поля-

ризацію внутрішньої мембрани мітохондрій в міоцитах матки щурів із використанням потенціалчутливого флуоресцентного зонда DiOC₆(3). Ukr. Biochem. J. 2014; 86(1): 42-55. *(Особистий внесок: участь у виділенні інтактних міоцитів, проведенні процедури іммобілізації клітин для конфокальних зйомок, відпрацювання методології солокалізації флуоресцентних зондів в клітинах з використанням лазерної конфокальної мікроскопії, здійснено аналіз та узагальнення отриманих результатів, оформлено публікацію).*

12. Коломієць О.В., Данилович Ю.В., **Данилович Г.В.**, Костерін С.О. Ca²⁺/H⁺-обмін у мітохондріях міомерія. Ukr. Biochem. J. 2014; 86(3): 41-48. *(Особистий внесок: відпрацювання методології ΔpH-залежного виходу Ca²⁺ з матриксу мітохондрій, розрахунок кінетичних параметрів процесу, здійснено аналіз та узагальнення отриманих результатів, підготовлено публікацію).*

13. Данилович Ю.В., Чуніхін О.Ю., **Данилович Г.В.** Тестування змін розмірів міоцитів матки за дії модуляторів її скоротливої активності. Фізіол. журн. 2013; 59 (1): 32-39. *(Особистий внесок: спільно з співавторами сформульовано ідею роботи, підготовка та проведення конфокальних зйомок неприкріплених міоцитів, проведено узагальнення та статистичний аналіз результатів щодо змін гідродинамічного діаметра міоцитів, оформлено публікацію).*

14. Коломієць О.В., Данилович Ю.В., **Данилович Г.В.**, Костерін С.О. Вивчення акумуляції Ca²⁺ в ізольованих мітохондріях гладенького м'яза за допомогою зонда Fluo-4 AM. Ukr. біохім. журн. 2013; 85(4): 30-39. *(Особистий внесок: спільно з співавторами сформульовано задачу, проведення досліджень методом фотонної кореляційної спектроскопії, відпрацювання методики навантаження суспензії мітохондрій зондом Fluo-4, здійснено аналіз та узагальнення отриманих результатів, розрахунок кінетичних параметрів процесу акумуляції Ca²⁺, оформлено публікацію).*

15. **Данилович Г.В.**, Данилович Ю.В., Коломієць О.В., Костерін С.О., Родік Р.В., Черенок С.О., Кальченко В.І., Чуніхін О.Ю., Горчєв В.Ф., Карахім С.О. Зміни поляризації плазматичної та внутрішньої мітохондріальної мембран клітин міомерія за дії каліксаренів – інгібіторів Na⁺, K⁺-АТР-ази плазматичної мембрани. Ukr. біохім. журн. 2012; 84(6): 37-48. *(Особистий внесок: сформу-*

льовано ідею роботи, підбір методів та протоколу досліджень, участь в експериментах, здійснено аналіз та узагальнення отриманих результатів, оформлено публікацію).

16. **Данилович Г.В.,** Данилович Ю.В., Горчев В.Ф. Реєстрація K^+ -рівноважного потенціалу на плазматичній мембрані клітин міометрія і вивчення його модуляції NO_x та H_2O_2 методом протокової цитометрії. Укр. біохім. журн. 2010; 82(1): 52-61. *(Особистий внесок: вибір моделі та методів дослідження, відпрацювання протоколу досліджень на протоковому цитометрі, проведені дослідження та математичні розрахунки, здійснено узагальнення та аналіз отриманих результатів, оформлено публікацію).*

17. Данилович Ю.В., **Данилович Г.В.,** Коломієць О.В. Ефекти нітропрусиду та нітриту натрію на убаїнчутливу Na^+ , K^+ -АТФ-азну активність гладенького м'яза матки. Укр. біохім. журн. 2010; 82(6): 33-41. *(Особистий внесок: відпрацьовано методику отримання пост'ядерної фракції міометрія свині, проведено дослідження щодо визначення активності Na^+ , K^+ -АТФазу в ній у присутності модифікаторів, здійснено кінетичний та статистичний аналіз отриманих результатів, оформлено публікацію).*

18. **Данилович Г.В.,** Данилович Ю.В. Вплив окислів азоту і пероксиду водня на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азну та Mg^{2+} -АТФ-азну активності у фракції сарколеми міометрія. Укр. біохім. журн. 2007; 79(2): 31-38. *(Особистий внесок: сформульовано мету роботи, розроблено схему експериментів та безпосередня участь в них, підібрано специфічні модифікатори поверхневих мембранних груп, здійснено кінетичний та статистичний аналіз отриманих результатів, оформлено публікацію).*

- статті у наукових періодичних фахових виданнях інших держав, у т.ч. які входять до міжнародних науко метричних баз:

19. **Danylovych H.V.,** Danylovych Yu.V., Gulina M.O., Bohach T.V., Kosterin S.O. NO-synthase activity in the mitochondria of the uterus smooth muscle: identification and biochemical properties. Gen. Physiol. Biohys. 2019; 38(1): 39-50. *(Особистий внесок: сформульовано ідею роботи, спільно з співавторами проведено*

дослідження, здійснено узагальнення отриманих результатів, кінетичний та статистичний аналіз, підготовлено публікацію).

20. **Danylovych H.V.**, Danylovych Yu.V., Rodik R.V., Hurska V.T., Kalchenko V.I., Kosterin S.O. Calix[4]arenes modulate Ca^{2+} -dependent processes smooth muscle cell mitochondria. Chem. Res. J. 2019; 4(6):109-122. (Особистий внесок: сформульовано ідею роботи, спільно з співавторами проведено дослідження, здійснено узагальнення отриманих результатів, кінетичний та статистичний аналіз, написано та оформлено публікацію).

21. **Danylovych H.V.**, Danylovych Yu.V., Kosterin S.O. Nitric oxide induced polarization of myometrium cells plasmalemma revealed by application of fluorescent dye 3,3'-dihexyloxycarbocyanine. Ind. J. Biochem. Biophys. 2019; 55: 34-45. (Особистий внесок: сформульовано ідею роботи, спільно з співавторами проведено дослідження, узагальнення та аналіз результатів, написано та оформлено публікацію).

22. Kolomiets O.V., Danylovych Yu.V., **Danylovych H.V.**, Kosterin S.O. Ways and Mechanisms of Transmembrane Exchange of Ca^{2+} in Mitochondria. Int. J. Phys. Pathophys. 2018; 9(3): 265-286. (Особистий внесок: підбір та узагальнення літературних даних, участь в оформленні публікації).

23. **Danylovych H.**, Chunikhin A., Danylovych Yu., Kosterin S. Methodology of Petri networks for simultaneous evaluation of the impact of different modifiers on the fluorescence of nucleotides from electron transport chain in isolated mitochondria and on the process of swelling. BioTechnologia (J. Biotech. Comput. Biol. Bionanotech.). 2018; 99(1): 37-48. (Особистий внесок: проведено біохімічні дослідження, здійснено узагальнення отриманих результатів, написано та оформлено публікацію). Стаття відмічена нагородою за кращу публікацію у 2018 р. в журналі BioTechnologia за сприяння фонду Waclaw Szybalski (Польща).

24. **Danylovych H.V.**, Danylovych Yu.V., Rodik R.V., Kalchenko V.I., Chunikhin A.Ju. Calix[4]arenes as Modulators of Energy-Dependent Ca^{2+} -Accumulation and Functioning of the Electron Transport Chain in Smooth Muscle Mitochondria. Int. J. Phys. Pathophys. 2017; 8(3): 241-251. (Особистий внесок: сформульовано наукову задачу, спільно з співавторами проведено дослідження, здійснено уза-

гальнення, кінетичний та статистичний аналіз результатів, написано та оформлено публікацію).

25. Danylovych Yu.V., Kolomiets O.V., **Danylovych G.V.**, Kosterin S.O. Nitric Oxide as Possible Regulator of Energy-Dependent Ca^{2+} Transport in Mitochondria of Uterine Smooth Muscle. Int. J. Phys. Pathophys. 2015; 6(2): 91-98. (Особистий внесок: спільно з співавторами проведено дослідження, здійснено аналіз та узагальнення отриманих результатів, оформлено публікацію).

26. Kolomiets O.V., Danylovych Yu.V., **Danylovych G.V.** H^+ - Ca^{2+} exchanger in the Myometrium Mitochondria: Modulation by Exogenous and Endogenous Compounds. Int. J. Phys. Pathophys. 2015; 6(4): 287-297. (Особистий внесок: спільно з співавторами проведено дослідження, здійснено аналіз та узагальнення отриманих результатів, оформлено публікацію).

Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації - монографії:

27. Данилович Ю.В., **Данилович Г.В.** Активні форми азоту та кисню в біохімічних процесах транспорту іонів Ca і поляризації субклітинних структур гладенького м'яза. НВП Видавництво «Наукова думка» НАН України. –Київ. – 2019. (Особистий внесок: спільно з співавтором сформульовано ідею та зміст монографії, здійснений пошук даних літератури, відібрано та систематизовано експериментальний фактаж, написано та оформлено рукопис).

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації - тези та матеріали конференцій:

28. **Г. Данилович**, Ю. Данилович, С. Костерін. Характеристика H^+ - Ca^{2+} -обмінника у внутрішній мембрані мітохондрій. П'ята міжнародна наукова конференція“Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології”. Матеріали конференції. Дніпро, Україна. – 2020. – С. 154-156.

29. **Данилович Г.В.**, Данилович Ю.В. Калікс[4]арени – модулятори транспортних і метаболічних процесів у мітохондріях гладенького м'яза. Матеріали XII Українського біохімічного конгресу. Тернопіль. – Медична та клінічна хімія. –2019. - Т. 21, № 3(додаток). - С. 84-85.

30. Bohach T.V., **Danylovych H.V.**, Danylovych Yu.V. Biochemical properties of NO-synthase activity in uterus smooth muscle mitochondria. FEBS3+ Meeting – XIth Parnas Conference – Young Scientists Forum “Biochemistry and molecular biology for innovation medicine”. Kyiv, Ukraine. – Ukr. Biochem. J. –2018. - Vol. 90, Special Issue. - P. 120.

31. **Данилович Г.В.**, Данилович Ю.В. Біосинтез та регуляторна роль оксиду азоту в мітохондріях гладенького м'яза матки. Матеріали Тематичного VII з'їзду Українського біофізичного товариства. Київ, Україна. – 2018. – С. 11.

32. **G. Danylovych**, T. Bohach, O. Kolomiets, Yu. Danylovych. Biosynthesis of nitric oxide in the uterine smooth muscle mitochondria. Third Kyiv Symposium “Smooth Muscle Physiology, Biophysics & Pharmacology: from genes and molecules to function, disorders and their novel treatment opportunities. Kyiv-Lutsk, Ukraine. – 2017. – P. 67.

33. **Г. Данилович**, Т. Богач, О. Коломієць, Ю. Данилович. Біосинтез і можлива фізіологічна роль оксиду азоту в мітохондріях гладенького м'язу. Четверта міжнародна наукова конференція актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології. Матеріали конференції. Дніпро, Україна. – 2017. – С. 87-88.

34. Данилович Ю.В., **Данилович Г.В.**, Коломієць О.В., Родік Р.В., Кальченко В.І., Костерін С.О. Дія калікс[4]аренів на транспорт Ca^{2+} , електричний потенціал та активність електрон-транспортного ланцюга в мітохондріях гладенького м'язу. НАНСИС-2016. Тези V Наукової конференції “Нанорозмірні системи: будова, властивості, технології. Київ, Україна. – 2016. - С. 145.

35. Коломієць О.В., Данилович Ю.В., **Данилович Г.В.** Оксид азоту як можливий регулятор функціональної активності мітохондрій. Матеріали XI Українського біохімічного конгресу. Київ. - Ukr. Biochem. J. –2014. - Vol. 86, № 5(Supplement 1). - С. 163-164.

36. Данилович Ю.В., **Данилович Г.В.**, Коломієць О.В. Оксид азоту – потенційний регулятор Ca^{2+} -гомеостазу гладенького м'язу матки та рівня поляризації його субклітинних структур. Матеріали XI Українського біохімічного конгресу. Київ. - Ukr. Biochem. J. –2014. - Vol. 86, № 5(Supplement 1). - С. 100-101.

37. Коломиец О.В., Данилович Ю.В., **Данилович Г.В.** Окремі закономірності акумуляції іонів Са в ізольованих мітохондріях міометрія, досліджені із використанням Ca^{2+} -чутливого флуоресцентного зонду Fluo-4 АМ. Актуальні питання біологічної фізики та хімії. Матеріали ІХ Міжнародної науково-технічної конференції. Севастополь. – 2013. - С. 147-148.

38. Данилович Ю.В., **Данилович А.В.**, Коломиец О.В., Чунихин А.Ю., Карахим С.А. Использование метода лазерной конфокальной микроскопии и потенциалчувствительного флуоресцентного зонда DiOC₆(3) для исследования влияния нитроактивных соединений на поляризацию внутренней митохондриальной мембраны гладкомышечных клеток. Научно-практическая конференция “Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения. Новый свет, Крым. – 2013. – С.103-104.

39. **Данилович А.В.**, Данилович Ю.В., Коломиец О.В. Влияние калликс[4]аренов – ингибиторов Na^+ , K^+ -АТФ-азы на поляризацию плазматической и митохондриальной мембран гладкомышечных клеток матки. Актуальні питання біологічної фізики та хімії. Матеріали VIII Міжнародної науково-технічної конференції. Севастополь. – 2012. - С. 168-169.

40. Danylovych Yu.V, **Danylovych G.V.** The sarcolemma of myometrium is possible target of nitric oxide activity in utera. International symposium “Biological motility: fundamental and applied science”. Pushchino. – 2012. – P.47-48.

41. Данилович Ю.В., Чунихин О.Ю., **Данилович Г.В.** Реєстрація змін розмірів клітин гладенького м'язу із використанням лазерної фотон-кореляційної спектроскопії. Актуальные вопросы биологической физики и химии. Материалы VII Международной научно-технической конференции. Севастополь. – 2011. - С. 217-220.

42. Данилович Ю.В., **Данилович Г.В.**, Коломиец О.В. Влияние доноров NO на убаинчувствительную Na^+ , K^+ -АТФазную активность миометрия. Научно-практическая конференция “Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения. Новый свет, Крым. – 2011. – С.657-658.

43. Данилович Ю.В., **Данилович Г.В.** Вплив оксиду азоту на мембранний потенціал гладенького м'язу матки. Актуальные вопросы теоретической и прикладной биофизики, физики и химии. Материалы VI Международной научно-технической конференции. Севастополь. – 2010. - С. 217-220.

44. **Данилович Г.В.**, Данилович Ю.В. Використання потенціалчутливого зонда $\text{DiOC}_6(3)$ для тестування потенціалу плазматичної мембрани та мітохондрій гладеньком'язових клітин матки. Матеріали X Українського біохімічного з'їзду. Одеса. - Укр. біохім. журн. –2010. - Т. 82, № 4(додаток 1). - С. 125-126.

45. Данилович Ю.В., **Данилович Г.В.** cGMP-незалежні ефекти оксиду азоту в міометрії, які можуть лежати в основі регуляції контрактильної активності. Матеріали X Українського біохімічного з'їзду. Одеса. - Укр. біохім. журн. – 2010. - Т. 82, № 4(додаток 1). - С. 126-127.

46. Данилович Ю.В., **Данилович Г.В.** Закономірності утворення та біохімічні основи функціональної активності окислів азоту та пероксиду водню в матці. Актуальные вопросы теоретической и прикладной биофизики, физики и химии. Материалы V Международной научно-технической конференции. Севастополь. – 2009. - С. 106-109.

47. Danylovych Yu., **Danylovych H.** The targets of nitric oxides and hydrogen peroxide action in myometrium. Vth International symposium “Supramolecular systems in chemistry and biology”. Kyiv. – 2009. – P.93

48. Данилович Ю.В., Данилович Г.В. Некоторые биохимические механизмы функциональной активности окислов азота и пероксида водорода в матке. Научно-практическая конференция “Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения. Новый свет, Крым. – 2009. – С.249-250.

49. Векліч Т.О., Шкрабак О.А., **Данилович Г.В.** Дослідження мембранотропних ефектів інгібіторів Na^+ , K^+ -АТРази – каліксаренів С-99 та С-107. Научно-практическая конференция “Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения. Новый свет, Крым. – 2009. – С.439-440.

50. Danylovych Yu., **Danylovych H.** The possible role of nitric oxides and hydrogen peroxide in uterus. VII Parnas Conference on biochemistry and molecular biology. Yalta, Crimea. – Укр. біохім. журн. – 2009. - Т. 81, № 4 (спец. випуск). - P. 70.

51. Danylovych Yu.V., **Danylovych H.V.** The action of nitric and oxygen species on Ca^{2+} , Mg^{2+} - ATP-ase та Mg^{2+} - ATP-ase activity in myometrium sarcolemma fraction. Abstracts of the 6th Parnas Conference Molecular Mechanism of Cellular Signalling. – Krakov, Poland. – 2007. – Vol.54. – P.12-13.

АПРОБАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

Основні положення дисертаційної роботи представлені та обговорені на міжнародних і вітчизняних конференціях та конгресах різного рівня:

1. Четвертій міжнародній науковій конференції “Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології” (Дніпро, Україна, 5-6 жовтень 2017, форма участі – усна доповідь).
2. Тематичному VII з’їзді Українського біофізичного товариства (Київ, Україна, 29-31 жовтня 2018, форма участі – усна доповідь).
3. FEBS3+ Meeting – XIth Parnas Conference – Young Scientists Forum “Biochemistry and molecular biology for innovation medicine”.. (3-5 September 2018, Kyiv, Ukraine, форма участі – постерна доповідь).
4. V Науковій конференції НАНСИС-2016 (Київ, Україна, 1-2 грудня 2016, форма участі – постерна доповідь).
5. XI Українському біохімічному конгресі (Київ, Україна, 6-10 жовтня 2014, форма участі – постерна доповідь).
6. VII Parnas Conference on biochemistry and molecular biology (Yalta, Crimea. 3-7 October 2009, форма участі – постерна доповідь).
7. VI Международной научно-технической конференции (Севастополь, Украина, 26-30 апреля 2010, форма участі – усна доповідь).
8. X Українському біохімічному з’їзді (Одеса, Україна, 13-17 вересня 2010, форма участі – усна доповідь).
9. XII Українському біохімічному конгресі (Тернопіль, Україна, 30 вересня-4 жовтня 2019, форма участі – усна доповідь).
10. V Науковій конференції “Нанорозмірні системи: будова, властивості, технології (Київ, Україна, 1-2 грудня 2016, форма участі – постерна доповідь).