

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О.В. ПАЛЛАДІНА**



ДАНИЛОВИЧ ГАННА ВІКТОРІВНА

УДК 577.352.4

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

03.00.04 – біохімія

Галузь знань 091 – Біологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Київ – 2021

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

Науковий консультант: академік НАН України,
доктор біологічних наук, професор
КОСТЕРІН Сергій Олексійович,
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,
заступник директора з наукової роботи,
завідувач відділу біохімії м'язів

Офіційні опоненти: член-кореспондент НАН України,
доктор біологічних наук, професор
СТОЙКА Ростислав Стефанович,
Інститут біології клітини НАН України,
завідувач відділу регуляції проліферації клітин і
апоптозу.
Заслужений діяч науки і техніки України

доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
АКОПОВА Ольга Валеріївна,
Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України,
провідний науковий співробітник відділу фізіології
кровообігу

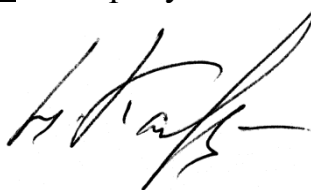
доктор біологічних наук, доцент
ЦИМБАЛЮК Ольга Володимирівна,
Навчально-науковий інститут високих технологій
Київського національного університету імені Тараса
Шевченка,
професор кафедри молекулярної біотехнології та
біоінформатики

Захист дисертації відбудеться “6” грудня 2021 р. о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.240.01 в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України за адресою: 01054, м. Київ, вул. Леонтовича, 9.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (Київ, вул. Леонтовича, 9).

Автореферат розіслано “4” листопада 2021 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук



Н.П. Карлова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

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 зумовлює нормальну роботу внутрішніх органів, зокрема сечостатевої системи [Bryan N., 2004; Pitocco D., 2010; Treuer A., 2015; Philippu A., 2016; Ghimire K., 2017].

Як продукція NO, так і чутливість до нього знижуються наприкінці вагітності і передують початку пологової активності [Sladek M., 1997; Tiboni G., 2001; Bao S., 2002; Buxton I.L., 2004, 2007]. Донори оксиду азоту викликають релаксацію міометрія як невагітних жінок, так і тих, хто має 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 [Sladek M., 1997; Farina M., 2001; Okawa T., 2004; Buxton I.L., 2004, 2007; Siomek A., 2012]. Водночас біохімічні та 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 (MX), є мішенню дії речовин, які модулюють контрактильну функцію міоцитів [Karasinski J., 2010; Костерін С., 2016, 2019; Nadeem L., 2017; Wray S., 2019]. 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 нітрегрічну інервацію матки і містять нейрональну NO-синтазу [Cameron I., 1998; Khorram O., 1999; Zhang J., 1999; Buxton I.L., 2001; Yellon S., 2003; Данилович Ю., 2004; Valdes G., 2011]. Потужним джерелом NO в міометрії, виходячи з аналізу інформації стосовно інших тканин, можуть слугувати MX [Elfering S., 2002; Ghafourifar P., 2005; Guilivi C., 2006; Valdez L., 2006; Tota B., 2010; Zaobornyj T., 2012]. У літературі відсутні відомості щодо утворення NO, каталітичних і кінетичних властивостей NO-синтазної системи MX гладеньких м'язів, зокрема і клітин міометрія.

Доведено, що MX 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 [Kosterin S., 1994; Chalmers S., 2003; Bernardi P., 2007; Graier W., 2007; Rizzuto R., 2009; Santo-Domingo J., 2010; Takeuchi A., 2015]. В основі порушення Ca^{2+} -гомеостазу і спричиненої цим клітинної патології може лежати дезорганізація роботи Ca^{2+} -транспортувальних систем, локалізованих в мембранах MX. Особливо важливі зазначені процеси для роботи м'язової тканини, оскільки її основна функція – скоротлива активність – є Ca^{2+} -контрольованим процесом. Біологічна актив-

ність МХ має, значною мірою, Ca^{2+} -залежний характер. Зростання концентрації Ca^{2+} в матриксі МХ активує ензими циклу трикарбонових кислот та синтез АТР [Gellerich F., 2010], водночас перевантаження органел катіоном індукуює клітинну загибель [Duchen M., 2004; Судаков Н., 2007; Graier W., 2007; Szabadkai G., 2009; Bernardi P., 2012; Campbell A., 2015; Anderson A., 2019].

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 [Ghafourifar P., 2005; Davidson S., 2006; Brown G., 2007; Carreras M., 2007; Santos C., 2011; Levine A., 2012; Kuznetsov A., 2021]. Саме тому дисфункцію скоротливої активності гладеньких м'язів окремі автори відносять до категорії “мітохондрійних хвороб” [Crouser E., 2004; Davidson S., 2006; Piantadosi C., 2012; Talib J., 2014; Liu B., 2018; Tarasova N., 2019].

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 приводить до зниження інтенсивності роботи електрон-транспортувального ланцюгу (ЕТЛ), окисного фосфорилювання та споживання кисню МХ. Оксид азоту або його похідні також взаємодіють з I та III комплексами дихального ланцюга й гальмують їхнє функціонування [Radi R., 2002; Levine A., 2012; Zaobornyj T., 2012; Piantadosi C., 2012]. Ряд дослідників розглядають оксид азоту у фізіологічних концентраціях (нано-молярних) як протекторну молекулу, яка здатна захищати органели від дисфункції, спричиненої гіперполяризацією внутрішньої мембрани, надлишковою продукцією активних форм кисню (АФК) й окисним стресом [Shiva S., 2010; Levine A., 2012; Piantadosi C., 2012; Tengan C., 2012; De Palma C., 2014; Sanchez-Padilla J., 2014]. Результатами сучасних досліджень підтверджується, що з NO пов'язана важлива ланка підтримання оптимальної концентрації іонів Са як в міоплазмі, так і мітохондрійному матриксі [Traaseth N., 2004; Giulivi C., 2006; Gellerich F., 2010; Santos C., 2011; Levine A., 2012; Sanchez-Padilla J., 2014].

Існують переконливі докази існування в МХ міометрія принаймні двох систем транспорту Ca^{2+} , локалізованих у внутрішній мембрані: Ca^{2+} -уніпортеру – електрофоретичної низькоафінної і високоємнісної системи енергозалежної акумуляції іонів Са та H^+ - Ca^{2+} -обмінника [Костерин С., 1990; Шинлова О., 1996; Векліч Т., 2002]. Важливим є дослідження біохімічних властивостей оксиду азоту як можливого ендогенного специфічного регулятора вищезазначених 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 ролі NO в МХ не вирішена.

З точки зору системної біології клітини є перспективним комплексне дослідження функціонування МХ із залученням методів математичного

модельовання, зокрема із використанням методології аналізу динамічних дискретних систем (наприклад, “функціональних гібридних мереж Петрі”) [Matsuno H., 2003; Doi A., 2004; Wingender E., 2011].

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 приділяється циклічним олігомерам фенолів – каліксаренам [Костерін С., Кальченко В., 2019]. Калікс[4]арени володіють протівірусною, антитромботичною, антибактеріальною дією [Perret F., 2006; Бухаров С., 2016; Pan Y-C., 2020]. Багато калікс[4]аренів здатні виступати інгібіторами ензимів [Vovk A., 2004; Perret F., 2006; Buldenko V., 2019]. Доведено, що окремі калікс[4]арени специфічно впливають на катіон-транспортувальні системи субклітинних структур, у тому числі й МХ, та ефективність гідролізу АТР актоміозинним комплексом у гладенькому м’язі матки [Лабинцева Р., 2007; Шликов С., 2007; Веклич Т., 2014; Бабич Л., 2017]. Встановлено, що калікс[4]арени модулюють контрактильну активність міометрія [Цимбалюк О., 2006, 2010, 2013]. Не виключено, що за невисоких (мікромольних) концентрацій окремі групи калікс[4]аренів здатні діяти на функціональну активність ЕТЛ, поляризацію мітохондрійної мембрани, обмін іонів Ca 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 Ca в цих субклітинних структурах. Наразі актуальним є завдання пошуку екзогенних нетоксичних модуляторів Ca^{2+} -гомеостазу та загалом функціональної активності МХ, у тому числі їхньої NO -синтазної здатності, який доречно проводити, зокрема, серед представників калікс[4]аренів. До нагальних питань слід віднести й 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 функціональну активність внутрішніх органів, зокрема контрактильну здатність матки.

Зв’язок роботи з науковими програмами, планами і темами

Експериментальна робота виконувалась у 2007-2021 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 власивостей та регуляції АТФ-залежних кальцієвих pomp

мембранних структур гладеньких м'язів" (2004 - 2008); – тема № 5, № 0109U001589 “Вивчення біохімічних механізмів регуляції концентрації іонів Ca 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 Ca^{2+} -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 Ca^{2+} -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.);

– цільової комплексної міждисциплінарної програми 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 Ca^{2+} -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 Ca^{2+} у внутрішній мітохондрійній мембрані.
3. Дослідити ефекти NO та біохімічні механізми його дії на концентрацію

Ca^{2+} в 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 Ca^{2+} 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. Досліджено 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 й вивчено можливі мембранні та іонні механізми, які лежать в основі цього впливу. Сформульовані відповіді на фундаментальні запитання щодо ролі оксиду азоту і МХ у 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. Для прояву оптимальної активності мітохондрійної NO-синтази (mtNOS) в ізольованих МХ міометрія необхідною є наявність в інкубаційному середовищі Ca^{2+} , NADPH та L-аргініну. Розраховано головні кінетичні параметри відповідної ензиматичної реакції: уявна константа Міхаеліса 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 АМ продемонстровано значення електрохімічного градієнту протонів на ВММ у підтриманні концентрації Ca^{2+} в міоплазмі міоцитів та матриксі МХ, що доводить суттєву роль цих субклітинних структур у 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). 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. Продemonстрована регуляція обмінника кальмодуліном. H^+ - Ca^{2+} -обмінник є резистентним до оксиду азоту.

Виявлено, що NO чинить протекторну дію на МХ шляхом помірного 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 можна віднести інгібування Ca^{2+} -транспортальної АТРази плазматичної мембрани (ПМ) з наступною активацією Ca^{2+} -залежної K^+ -проникності ПМ та cGMP-залежної стимуляції Na^+ , K^+ -АТРази, наслідком чого є гіперполяризація 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 приводить до відповідного зменшення концентрації Ca^{2+} в матриксі та пригнічення їхньої NO-синтазної активності. Поряд з цим спостерігається транзйентна гіперполяризація ВММ.

Продemonстрована 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 у 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, 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 було впроваджено для вивчення змін електричного потенціалу в субклітинних структурах, що суттєво верифікує одержані результати. Відпрацьовано методику визначення 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. Чуніхінім О.Ю. Аналіз власних експериментальних результатів, їхнє узагальнення, інтерпретацію, формування основних положень і висновків проведено разом із науковим консультантом – академіком НАН України Костерінім 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 to 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 посилання). Роботу викладено на 253 сторінках, проілюстровано 100 рисунками, 2 схемами та 5 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **Вступі** охарактеризовано наукову проблему, обґрунтовано актуальність теми, сформульовано мету і завдання досліджень, зазначено теоретичну новизну та практичне значення результатів роботи.

В **Огляді літератури** відображено сучасний стан розвитку досліджень щодо метаболізму оксиду азоту, біохімічних механізмів, що лежать в основі його функціональної активності, а також джерел, регуляції утворення та фізіологічного значення цієї сполуки в матці. Описано системи, які забезпечують електро(фармако)механічне спряження в ГМК; роль МХ у цих процесах, фізіологічну роль іонів Са та ефекти NO в зазначених органелах. Охарактеризовані дані щодо біохімічної активності калікс[4]аренів у клітинах гладенького м'язу матки.

Матеріали та методи досліджень

Методи препаративної біохімії

У дослідях 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 в камері, збагаченій парами хлороформу, після чого декапітували. Усі маніпуляції з тваринами були проведені 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).

Суспензію міоцитів з міометрія щурів одержували з використанням колагенази (тип IA) й соєвого інгібітору трипсину за допомогою методу Молларда [Mollard P., 1986], який використовували в деякій модифікації [Бабич, 1994]. Дослідження з інтактними міоцитами проводили у фізіологічному розчині Хенкса наступного складу (мМ): 136,9 NaCl, 5,36 KCl, 0,44 KH_2PO_4 , 0,26 NaHCO_3 , 0,26 Na_2HPO_4 , 0,03 або 1,26 CaCl_2 , 0,4 MgCl_2 , 0,4 MgSO_4 , 5,5 глюкоза, 10 HEPES (pH, 7,4; 37 °C).

Виділення фракції плазматичних мембран міометрія свині здійснювали із використанням диференційного центрифугування в градієнті густини цукрози [Кондратюк Т., 1986]. Суспензію препарату ПМ зберігали в середовищі: 20 мМ Трис-HCl (pH 7,4, 8 °C), 150 мМ KCl.

Фракцію мітохондрій міометрія щурів отримували за допомогою методу диференційного центрифугування, як описано в роботі [Костерин С., 1985]. Одержану фракцію ізольованих МХ зберігали в буфері 10 мМ HEPES (pH 7,4), 250 мМ цукроза, 1 мг/мл бичачого сироваткового альбуміну у співвідношенні 100 мг тканини: 100 мл буфера.

Вміст протеїну у фракціях ПМ та МХ визначали стандартним методом Bradford за його реакцією з реактивом Кумасі G250 [Bradford M., 1976]. Середнє значення вмісту протеїну в МХ фракції складало 2 мг/мл.

Флуоресцентні методи

Флуоресцентні дослідження проводили з використанням спектрофлуориметра Quanta Master 40 PTI (Канада) з програмним забезпеченням FelixGX 4.1.0.3096, протокового цитофлуориметра COULTER EPICS XL™

(BeckmanCoulter, США), що обладнаний аргоновим лазером ($\lambda_{36} = 488$ нм) з програмним забезпеченням SYSTEMII™ Software (BeckmanCoulter, США). Просторовий розподіл флуоресцентних барвників у клітині досліджували на лазерному скануючому конфокальному мікроскопі LSM 510 META (“Carl Zeiss”, Німеччина). Дослідження на конфокальному мікроскопі проводили в режимі Multi Track. Вивчення кінетики розподілу флуоресцентних барвників у клітині проводили в режимі TimeSeries, а для кількісного аналізу застосовували функцію ROI (Region Of Interest), яка дозволяє отримувати графік залежності інтенсивності флуоресценції від часу, усереднену по виділеній області. При роботі на протоковому цитометрі використовували робочий протокол аналізу зразків, який був створений нами для характеристики фракції ізольованих МХ міометрія або суспензії міоцитів за флуоресценцією відповідного зонду. Події для аналізу обиралися шляхом введення логічного обмеження за параметрами бічного та прямого світлорозсіювання (SS та FS) у протокол цитометра. Аналіз проб припинявся за умови реєстрації 10000 подій у межах виділеної області.

В експериментальній роботі були використані наступні флуоресцентні барвники: Hoechst 33342 – специфічний до ядер, MitoTracker Orange CM-H₂TMRos – специфічний до МХ, DAF-FM – NO-чутливий, Fluo-4 AM – Ca²⁺-чутливий, 10-ноніл-акридиноранж (NAO) – специфічний до кардіоліпіна, 9-аміноакридин (9-AA) – ΔpH-чутливий, BCECF-AM – pH-чутливий, DiOC₆(3), JC-1 – потенціал чутливі, DCF-DA – специфічний до АФК.

Процедуру іммобілізації міоцитів проводили із використанням полі-L-лізину. Клітини (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, іммобілізовані клітини в 100 мкл розчину Хенкса обробляли відповідними барвниками і проводили подальші дослідження.

Візуалізацію просторового розподілу флуоресцентних барвників у міоцитах і конфокально-мікроскопічні дослідження проводили наступним чином: флуоресценцію Hoechst 33342 (50 нМ) та 9-AA (10 мкМ) збуджували лазером при довжині хвилі 405 нм, сигнал реєстрували, використовуючи світлофільтр BP 420-480. MitoTracker Orange CM-H₂TMRos (200 нМ) збуджували при довжині хвилі 543 нм, реєстрацію сигналу здійснювали із використанням світлофільтру BP 560-615. DAF-FM (10 мкМ), Fluo-4 AM (10 мкМ), DiOC₆(3) (100 або 500 нМ), NAO (1 мкМ) – збуджували при довжині хвилі 488 нм, сигнал реєстрували із використанням світлофільтру BP 505-530.

Властивості біосинтезу NO ізольованими мітохондріями міометрія щурів методом протокової цитометрії вивчали з використанням NO-чутливого флуоресцентного барвника DAF-FM ($\lambda_{36} = 488$ нм, $\lambda_{фл} = 515$ нм (канал F11)), який вносили безпосередньо в середовище інкубації в експериментально підібраній концентрації 0,5 мкМ. Склад середовища інкубації (мМ): 20 HEPES (pH 7,4, 24⁰С), 2 K⁺-фосфатний буфер (pH 7,4, 24⁰С), 120 KCl, 5 піруват, 5 сукцинат, 0,05 L-аргінін, 0,1 Ca²⁺, 0,01 NADPH, 0,01 тетрагідробіоптерін (BH₄), аліквота мітохондрійної фракції містила 15-20 мкг протеїна. Реакцію ініціювали внесенням аліквоти 20 мкл розчину L-аргінін+Ca²⁺. Тривалість проведення фе-

рментативної реакції – 30 хв. Контролем слугувало утворення NO в MX за відсутності екзогенно доданих L-аргініна та Ca^{2+} .

Дослідження змін вмісту іонізованого Ca в ізольованих мітохондріях із використанням методу спектрофлуориметрії. Навантаження MX Ca^{2+} -чутливим флуоресцентним зондом Fluo-4 AM у концентрації 2 мкМ проводили в середовищі, яке містило 10 мМ HEPES (pH 7,4, 37°C), 250 мМ цукрозу, 0,1 % бичачий сироватковий альбумін, 0,02 % Pluronic F-127 протягом 30 хв при температурі 37°C. Реєстрацію відносних значень рівня Ca^{2+} в матриксі MX міометрія, навантажених Fluo-4 AM проводили за $\lambda_{\text{зб}} = 490$ нм та $\lambda_{\text{фл}} = 520$ нм.

Середовище для енергозалежної акумуляції Ca^{2+} в MX мало склад (мМ): 20 HEPES (pH 7,4, 37°C), 2 K^+ -фосфатний буфер (pH 7,4, 37°C), 250 цукроза, 3 MgCl_2 , 3 АТР, 5 сукцинат натрію, концентрація Ca^{2+} становила 80 мкМ. Акумуляцію катіона проводили протягом 5 хв.

У випадку дослідження ΔpH -індукованого вивільнення іонів Ca з MX 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 HEPES (pH 6,0-8,0, 37°C), 2 K^+ -фосфатний буфер (pH 6,0-8,0, 37°C), 250 цукроза, 5 сукцинат натрію, 5 мкМ циклоспорин А (Csp).

При вивченні динаміки вмісту іонізованого Ca^{2+} в ізольованих мітохондріях із використанням методу протокової цитометрії використовували робочий протокол аналізу зразків, який був створений для характеристики фракції ізольованих MX міометрія за флуоресценцією Fluo-4 ($\lambda_{\text{зб}} = 488$ нм, $\lambda_{\text{фл}} = 520$ нм (канал F11)). Дослідження проводились при температурі 24°C. Реєстрацію значень рівня Ca^{2+} в матриксі MX проводили в середовищі наступного складу (мМ): 20 HEPES (pH 7,4), 2 K^+ -фосфатний буфер (pH 7,4), 250 цукроза, 3 MgCl_2 , 3 АТР, 5 сукцинат натрію, концентрація Ca^{2+} становила 80 мкМ.

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

Реєстрацію змін флуоресценції BCECF-AM у MX проводили при $\lambda_{\text{зб}} = 510$ нм, $\lambda_{\text{фл}} = 535$ нм. 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 натрію, 5 мкМ Csp.

Вивчення утворення активних форм кисню за допомогою флуоресцентного зонду DCF-DA та метода протокової цитометрії. Навантаження MX АФК-чутливим флуоресцентним зондом DCF-DA у концентрації 25 мкМ проводили в середовищі, яке містило 10 мМ HEPES (pH 7,4; 25°C), 250 мМ цукрозу, 0,1 % бичачий сироватковий альбумін, 0,02 % Pluronic F-127 протягом 30 хв при температурі 25°C.

Для дослідження утворення АФК було створено робочий протокол аналізу зразків для характеристики фракції ізольованих MX міометрія за флуоресце-

нцією DCF-DA ($\lambda_{36} = 488$ нм, $\lambda_{фл} = 515$ нм (канал F11)). Середовище інкубації мало склад (мМ): 20 HEPES (pH 7,4, 25 °C), 2 K⁺-фосфатний буфер (pH 7,4, 25°C), 25 KCl, 25 NaCl. Вміст протеїну в мітохондрійній фракції складав 15-20 мкг. Реакцію ініціювали внесенням аліквоти 20 мкл розчину 5 мМ піруват+5 мМ сукцинат.

Візуалізацію змін мембранного потенціалу мітохондрій інтактних міоцитів із використанням методу лазерної конфокальної мікроскопії проводили із залученням флуоресцентних барвників 200 нМ MitoTracker Orange CM-H₂TMRos, 10 мкМ 9-AA та 1 мкМ NAO, а для візуалізації ядер клітин – 50 мкМ Hoechst 33342. Розподіл DiOC₆(3) в клітині спостерігали за концентрації 200 нМ. Умови штучного колапсу потенціалу на ПМ створювали попередньою інкубацією міоцитів із 1 мМ убаїном, на ВММ – передінкубацією з 5 мМ азидом натрія.

Реєстрацію змін мембранного потенціалу мітохондрій інтактних міоцитів із використанням флуориметричного методу проводили за інтенсивністю флуоресценції потенціалчутливого зонда DiOC₆(3). Зміни флуоресценції DiOC₆(3) (100 нМ) вивчали за допомогою спектрофлуориметра Signe-4М ($\lambda_{36} = 485$ нм, $\lambda_{фл} = 505$ нм) та протокового цитометра CoulterEpicsXLTM ($\lambda_{36} = 488$ нм, $\lambda_{фл} = 505$ нм (канал F11)). Виміри проводились у фізіологічному середовищі Хенкса.

Зміни мембранного потенціалу в ізольованих мітохондріях досліджували з використання потенціалчутливого зонду JC-1 (1 мкМ) та методу спектрофлуориметрії при $\lambda_{36} = 488$ нм, $\lambda_{фл} = 535$ нм (мономер) та 595 (J-агрегат) нм. Відносне значення одиниць флуоресценції при відношенні довжин хвиль 595/535 відображає зміни мембранного потенціалу МХ. Середовище інкубації мало склад: 20 мМ HEPES (pH 7,4, 37°C), 2 мМ K⁺-фосфатний буфер (pH 7,4, 37°C), 125 мМ KCl, 25 мМ NaCl. Вміст протеїну в мітохондрійній фракції складав 50 мкг.

Створення та реєстрацію K⁺-рівноважного потенціалу на плазматичній мембрані клітин міометрія проводили в системі “K⁺-валіноміцин-везикули” з використанням потенціал-чутливого зонда DiOC₆(3) та методу протокової цитометрії ($\lambda_{36} = 488$ нм, $\lambda_{фл} = 505$ нм (канал F11)). Величину дифузійного K⁺-рівноважного потенціалу розраховували за рівнянням Нернста. Дослідження проводили в середовищі складу: 5 мкМ DiOC₆(3), 20 мМ HEPES-Трис (pH 7,4, 23°C), 150 мкг/мл білку, 0,5 мкМ валіноміцину.

Реєстрацію відносних значень рівня власної флуоресценції NADH та FAD у матриксі МХ досліджували з використанням флуориметричного методу. Флуоресцентний сигнал від NADH реєстрували при $\lambda_{36} = 350$ нм, $\lambda_{фл} = 450$ нм, від FAD – $\lambda_{36} = 450$ нм, $\lambda_{фл} = 533$ нм. Дослідження проводили в середовищі наступного складу, мМ: 20 HEPES (pH 7,4, 37°C), 2 K⁺-фосфатний буфер (pH 7,4, 37°C), 120 KCl, 5 піруват натрія, 5 сукцинат натрія; аліквота (100 мкл) мітохондрійної фракції містила 100 мкг білку.

Вивчення ефектів калікс[4]аренів на транспортні та енергетичні процеси в міоцитах та ізольованих мітохондріях проводили з застосуванням каліксаренфосфонових кислот С-97 (5-біс(дигідроксифосфорил)метил-25,27-дипропосикалікс[4]арен, С-99 (5,17-біс(дигідроксифосфонілметил)-25,27-дипропосикалікс[4]арен, С-107 (5,17-ди(фосфоно-2-піридилметил)аміно-11,23-ди-трет-бутил-26,28-дигідрокси-5,27-дипропосикалікс[4]арен), С-90 (5,11,17,23-

тетра(трифтор)метил(феніл-сульфоніліміно)метиламіно-25,26,27,28-тетрапрокси-калікс[4]арен) та C-956 (5,11,17,23-тетра(трифтор)метил(феніл-сульфоніліміно)метиламіно-25,27-діоктилокси-26,28-дипрокси-калікс[4]арен). Сполуки 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.

Зміни інтенсивності власної флуоресценції калікс[4]арена C-956 при взаємодії з гладеньком'язовими клітинами матки щурів досліджували методом спектрофлуориметрії при $\lambda_{\text{зб}} = 283$ нм, $\lambda_{\text{фл}} = 365$ нм у середовищі Хенкса.

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 потенціал чутливого зонду MitoTrackerOrangeCM-H₂TMROS здійснювали лазером на довжині хвилі 543 нм, а флуоресценцію реєстрували в діапазоні 560-615 нм (світлофільтр BP 560-615).

Методи ензимології

Визначення Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазної активності у плазмалемі гладеньком'язових клітин матки. 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 (pH 7,4), 1 мМ оубаїн, 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. Концентрація вільного Ca^{2+} за вищезазначених умов складала 1 мкМ. 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) [Данилович Г., 2005].

Визначення убаїнчутливої Na^+ , K^+ -АТРазної активності у пост'ядерній фракції матки. Для одержання пост'ядерної фракції матку свині гомогенізували у середовищі: 20 мМ Трис-HCl (pH 7,4, 8 °C), 250 мМ цукроза, 2 мМ ЕДТО, 0,6 М KCl. Гомогенат центрифугували при 6 тис. g протягом 20 хв. Одержану надосадову, яка являє собою пост'ядерну фракцію, розводили 5-разово 20 мМ HEPES-Трис (pH 7,4) і використовували в подальших дослідках. Загальну ензиматичну 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 HEPES-Трис (pH 7,4, 37 °C), 1 мМ NaN_3 , 0,1 мкМ тапсигаргін, 25-30 мкг білку фракції ПМ. Тривалість інкубації – 5 хв при 37°C. Ензиматичну 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 убаїна [Векліч Т., 2008].

Кількість продукту реакції P_i визначали за методом Rathbun W., Betlach V. [Болдырев А., 1977].

Інші методи

Визначення характеристикних розмірів і змін гідродинамічного діаметру мітохондрій та міоцитів методом лазерної кореляційної спектроскопії проводили на приладі 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.

Імітаційне моделювання біоенергетичних процесів у МХ здійснювали з використанням методології гібридних функціональних мереж Петрі [Nagasaki, 2009] у середовищі Cell Illustrator 3.0. Розробник “Human Genome Center” Токійського Університету, Японія.

Характеристика клітинної суспензії. Підрахунок загальної кількості клітин і кількості життєздатних клітин проводили з використанням гемоцитометра (камери Горяєва); 100 мкл суспензії фарбували 0,2% трипановим синім та 4,25% NaCl.

Кінетичні розрахунки. Константи активації для Ca^{2+} (K_{Ca}) та спорідненості для L-аргініна (K_{arg}) реакції біосинтезу NO в ізольованих МХ міометрія було розраховано методом Хейнса [Келети Т., 1990] з використанням відповідних координат $\{[S]/V : [S]\}$, де $[S]$ – концентрації L-аргініна або Ca^{2+} , V – активність mtNOS ($n=5$). Коефіцієнт кореляції складав $R^2 > 0,9$.

Константу активації акумуляції іонів Ca в МХ розраховували в координатах Лаїнуївера-Берка $\{1/V; 1/S\}$, де $1/V = F_0/(F-F_0)$. F_0 – базальний рівень ендогенного Ca^{2+} в МХ, F – флуоресценція Fluo-4 за різних концентрацій Ca^{2+} (20-40-60-80 мкМ), S – відповідна концентрація іонів Ca [Келети Т., 1990].

Коефіцієнт Хілла та константу активації ΔpH -індукованого виходу іонів Ca із МХ за протонами (pH_a) розраховували в координатах Хілла $\{\lg[(V_{\text{max}}-V_0)/V_0]; \text{pH}\}$, де V_{max} – початкова флуоресценція, V_0 – стаціонарний рівень флуоресценції після закінчення транспортного процесу [Келети Т., 1990].

Початкову швидкість енергозалежної акумуляції Ca^{2+} (V_0) та характеристичний час напівмаксимальної акумуляції катіона ($\tau_{1/2}$) розраховували за формулами: $V_0 = k \left(\frac{F_{\text{max}} - F_0}{F_0} \right)$ та $\tau_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$, де k (с^{-1}) – константа швидкості входу Ca^{2+} , яку знаходили з лінійної залежності зміни флуоресценції Fluo-4 від часу в координатах $\{\ln ((F_{\text{max}} - F_0)/(F_{\text{max}} - F)); t\}$, 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.

Кінетичні параметри V_0 та $\tau_{1/2}$ ΔpH -залежного виходу Ca^{2+} розраховували за формулами: $V_0 = k \left(\frac{F_0 - F'}{F_0} \right)$ та $\tau_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$, де k (с^{-1}) – константа швидкості виходу Ca^{2+} з матриксу, яку знаходили 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

Статистичну обробку результатів проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики із використанням t -критерія Стьюдента [Прилу-

цький Ю. та інші, 2017]. Стандартне абсолютне значення величини достовірності апроксимації R становило 0,9-0,99. Розрахунки проводили за допомогою стандартного програмного забезпечення MS Office Excell. У випадку представлення результатів типового експерименту досліди повторювались не менше 5 разів.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

ЗАВДАННЯ 1. Вивчити закономірності утворення оксиду азоту в мітохондріях, каталітичні і кінетичні характеристики мітохондрійної NO-синтазної реакції.

Результати експериментальних досліджень 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 [Sladek M., 1997; Yellon S., 2003; Buxton I., 2007; Valdes G., 2011]. Синтез NO, переважно досліджений в матці вагітних людини та тварин, забезпечується eNOS та iNOS, експресія та регуляція яких знаходяться під впливом прогестерона [Farina M., 2001; Karasinski J., 2010; Nadeem L., 2017]. Припускають, що iNOS відповідає за великі кількості NO, які генерується в матці та плаценті за вагітності, eNOS бере участь у вазодилатції в цей період [Buhimschi I., 1998; Garfield R., 1998; Zullino S., 2018]. Наразі фактів щодо базального синтезу NO в міометрії в доступній нам науковій літературі не наведено, тому 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 матки щурів (рис.1, А).

Із використанням детергентної техніки (пермеабілізація ПМ дигітоніном, рис. 1, Б) та специфічного інгібітора SERCA тапсигаргіна показано, що джерелами оксиду азоту в клітинах гладенького м'язу матки можуть виступати конститутивні NOS (продукція NO зменшується за присутності інгібітора конститутивних NO-синтаз N^G -нітро-L-аргініна) (рис. 1, А), асоційовані з ПМ та, не виключено, саркоплазматичним ретикуломом (СР), що узгоджується з результатами, одержаними на окремих електрозбудливих клітинах [Davidson S., 2006; Zaobornyj T., 2012]. 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. 1, Б). З використанням методології солокалізації DAF-FM та специфічного щодо МХ зонду MitoTracker Orange CM-H₂TMRos продемонстровано, що МХ є потужним джерелом синтезу NO (рис 2). Ефективність цього процесу залежить від функціональної активності комплексів ЕТЛ.

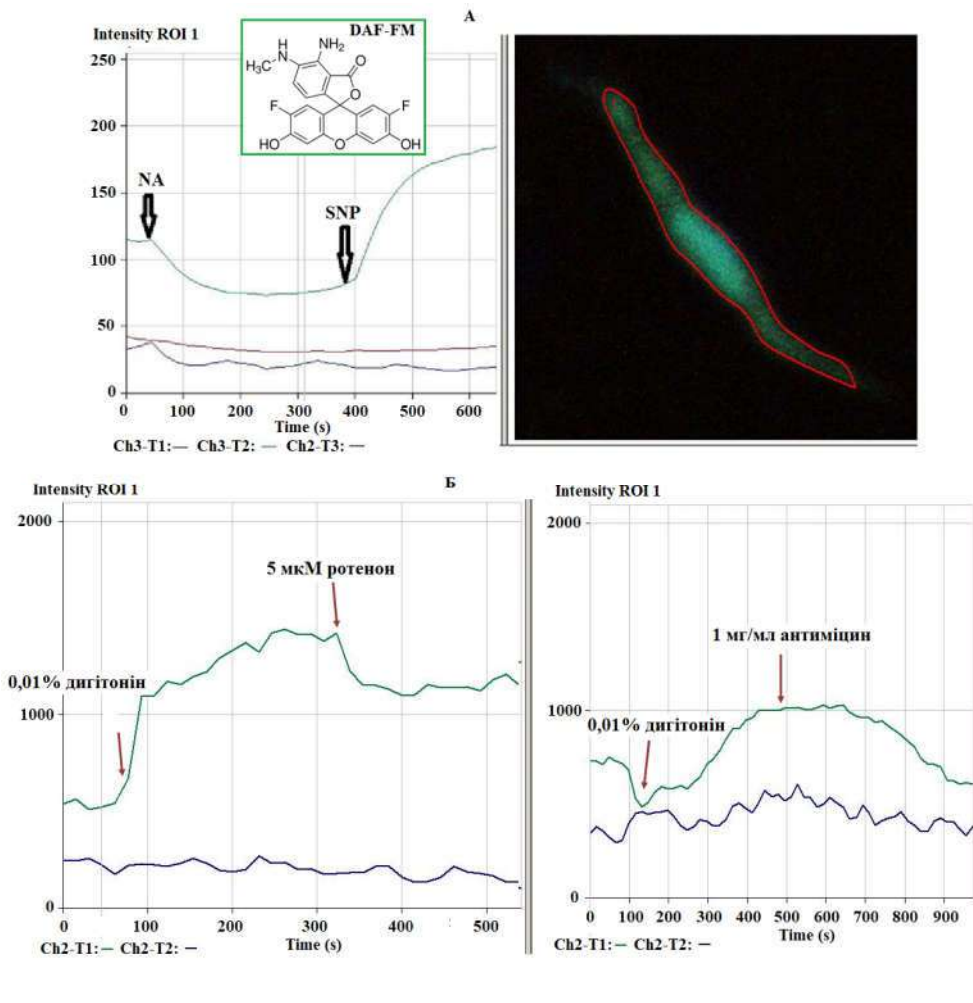


Рис. 1. Зміни інтенсивності флуоресценції DAF-FM у міоциті. А - за додавання N^G -нітро-L-аргініна (NA, 0,2 мМ) та донора NO нітропрусида натрія (SNP, 0,1 мМ), Б - в умовах пермеабілізації плазматичної мембрани дигітоніном та дії інгібіторів I та III комплексів дихального ланцюга мітохондрій.

DAF-FM (NO) – зелена крива, MitoTracker Orange CM-H₂TMRos (мітохондрії) – червона крива, Hoechst 33342 (ядро)- синя крива. Для кількісного аналізу використана функція ROI (region of interests). Метод лазерної конфокальної мікроскопії

На фракції ізольованих МХ щурів із застосуванням флуоресцентного зонду DAF-FM та методу протокової цитометрії нами підбрано умови визначення NO-синтазної активності та охарактеризовані кінетичні та каталітичні властивості реакції біосинтезу NO.

Для прояву оптимальної активності mtNOS в ізольованих МХ міометрія необхідною є наявність в інкубаційному середовищі субстратів дихання (сукцинату та пірувату), Ca^{2+} , NADPH та L-аргініну (рис. 3). Розраховано ключові кінетичні параметри цієї ензиматичної реакції: уявна константа Міхаеліса за L-аргініном дорівнює $28,9 \pm 9,1$ мкМ, а константа активації за Ca^{2+} - $44,4 \pm 14,5$ мкМ, які мають фізіологічне значення. Одержані нами результати переконливо свідчать про те, що синтез NO забезпечується Ca^{2+} -залежною конститутивною NOS. Її активність пригнічується інгібіторами конститутивних NO-синтаз N^G -нітро-L-аргініном та nNOS – 2-амінопіридином, залежить від інтенсивності надходження до матриксу екзогенного Ca^{2+} (рис. 4, А), інгібується антагоністами кальмодуліна кальмідазоліумом (рис. 4, Б) та трифлюоперазином, а також іонами Mg. Доведено, що біосинтез оксиду азоту МХ суттєво залежить від рівня їхньої енергізації (рис. 5).

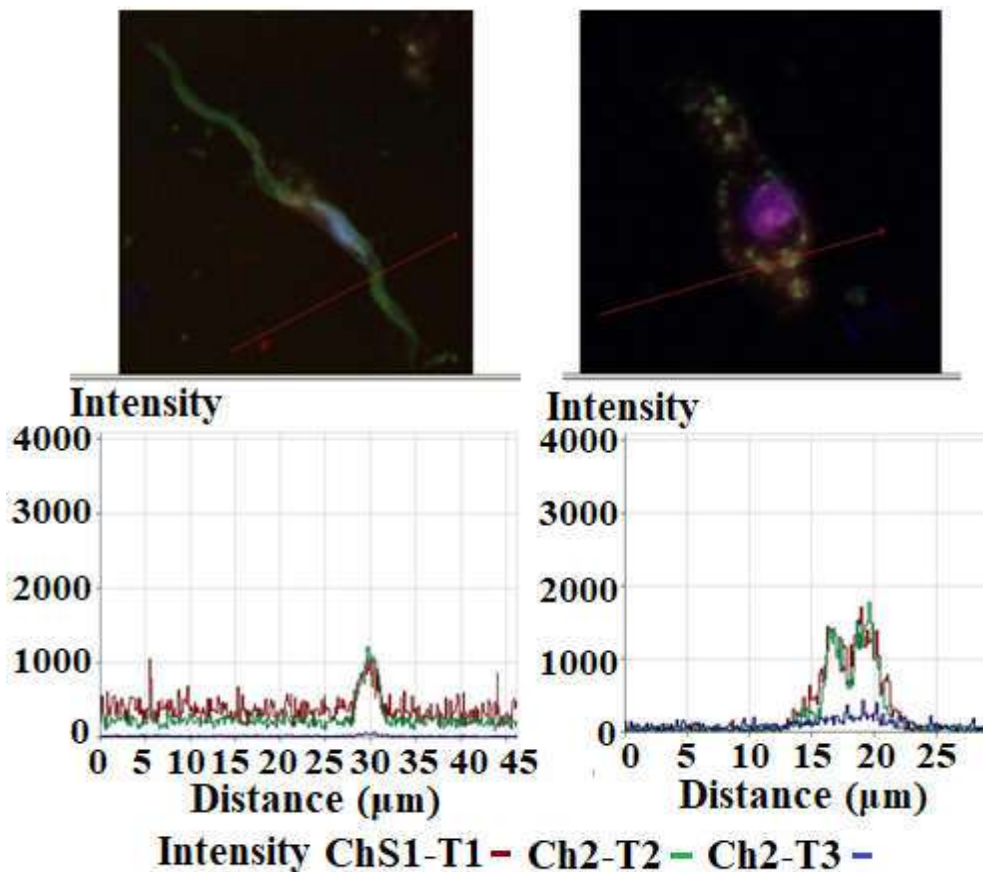


Рис. 2. Варіанти солокалізації флуоресцентних зондів DAF-FM та MitoTracker Orange CM-H₂TMRos у двох міоцитах. Представлено результати тотожного розподілу барвників довільного оптичного зрізу клітин: червоний колір – MitoTracker Orange CM-H₂TMRos (мітохондрії), зе-

лений – DAF-FM (NO), синій – Hoechst 33342 (ядро). Метод лазерної конфокальної мікроскопії

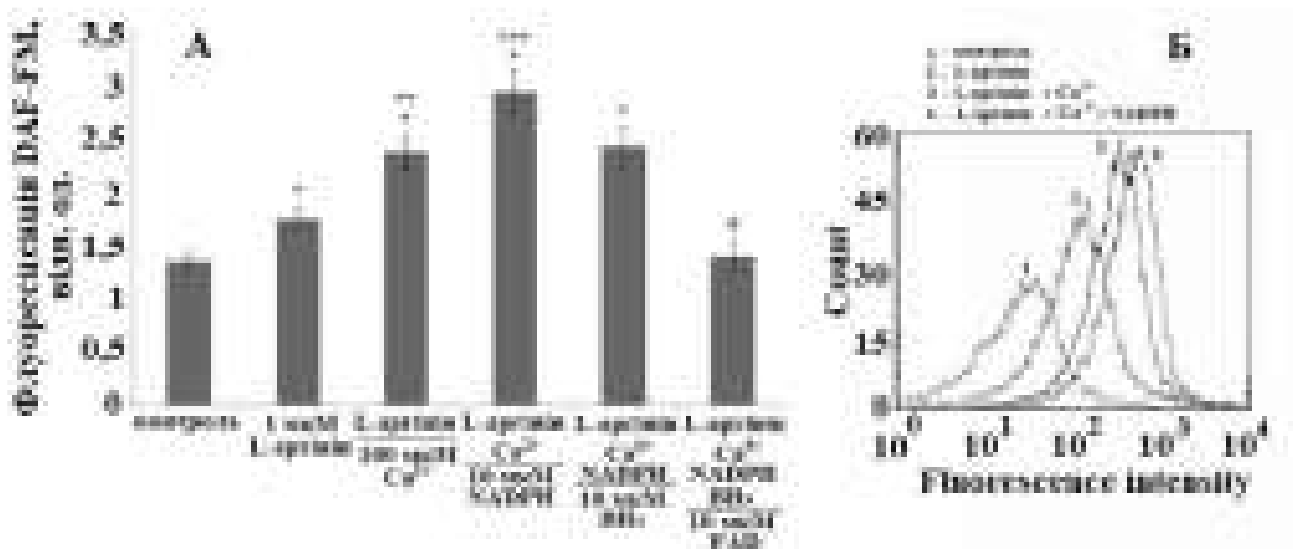


Рис. 3. Залежність активності mtNOS від наявності субстрату та кофакторів у середовищі інкубації (А). Б – Зміщення піків інтенсивності флуоресценції в умовах різного складу середовища інкубації. Метод протокової цитометрії.

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

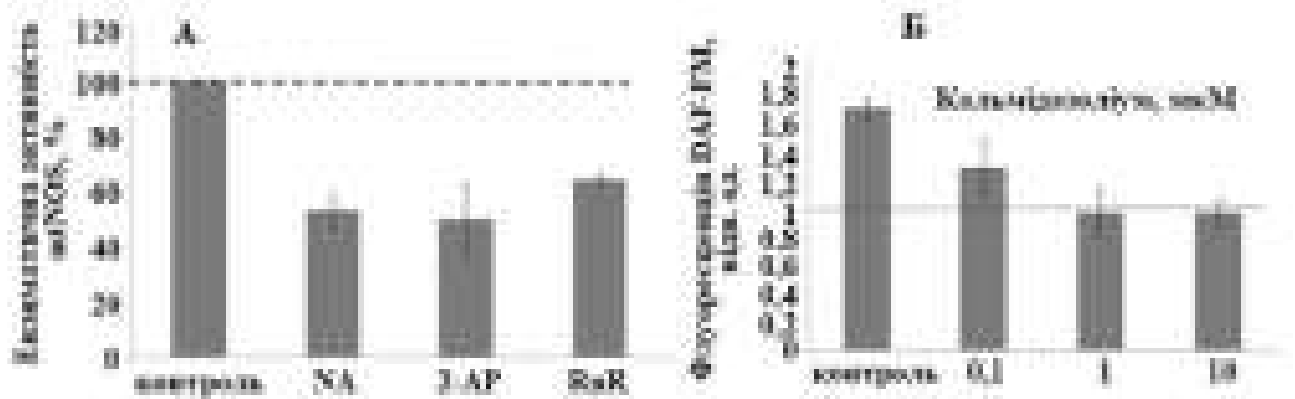


Рис. 4. Зміни NO-синтазної активності в мітохондріях за присутності 25 мкМ N^G -нітро-L-аргініна (NA), 100 мкМ 2-амінопіридина (2-AP), 10 мкМ рутенієвого червоного (RuR)(A), а також кальмідазоліума (Б). $M \pm m$, $n=5$. За "1" (Б) прийнято ендогенний (за відсутності L-аргініну та Ca^{2+} в середовищі) синтез NO в мітохондріях

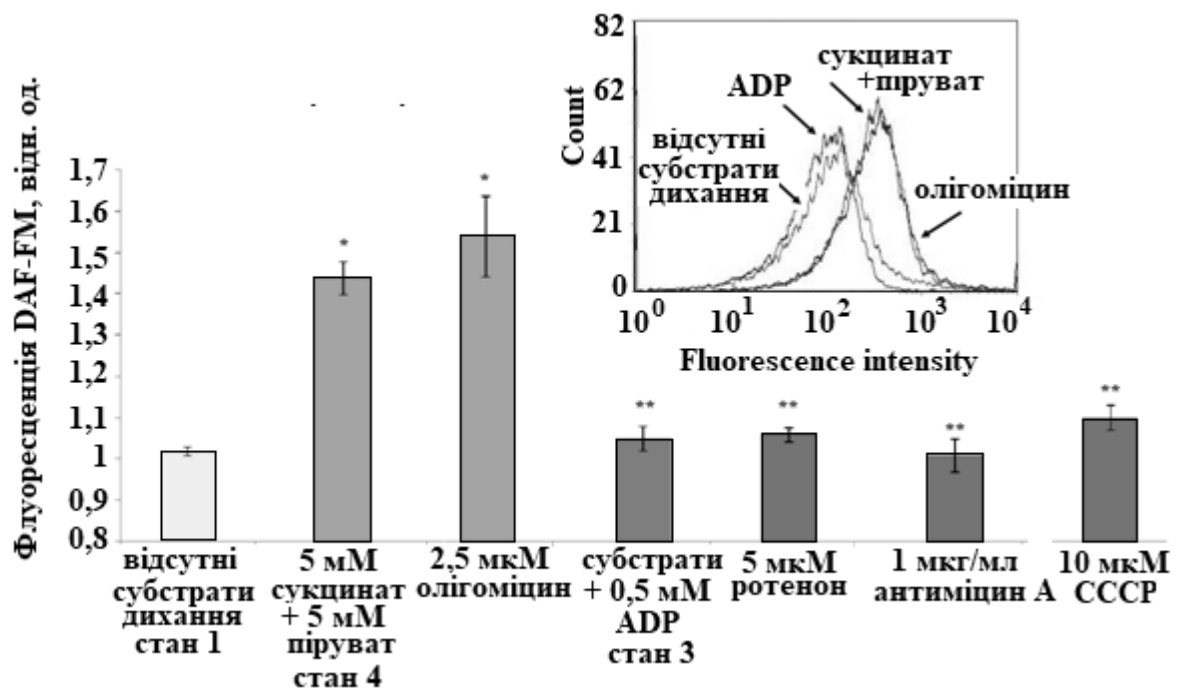


Рис. 5. Залежність активності mtNOS від присутності субстратів дихання та інгібіторів електрон-транспортного ланцюга в мітохондріях. Стани 1, 3, 4 – стани мітохондріального дихання за Чансом. * $p < 0,05$ відносно стану 1, ** $p < 0,05$ відносно стану 4. $M \pm m$, $n=5$. Вставка: зміщення піків інтенсивності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

Можливість біосинтезу NO в МХ та наявність значної кількості молекулярних мішеней дії нітросполук вказують на те, що оксид азоту є регулятором функціональної активності цих органел. Особливо важливим може бути вплив нітросполук на транспортні системи ВММ, що контролюють Ca^{2+} -гомеостаз МХ, оскільки від концентрації Ca в матриксі, як відомо, залежить ефективність біоенергетичних процесів. Припускають, що МХ є важливим Ca^{2+} -депо, зокрема в ГМК [Kosterin S., 1994; Gunter T., 2004; Graier W., 2007; Szabadkai G., 2009; Campbell A., 2015; Anderson A., 2019].

ЗАВДАННЯ 2. З'ясувати біохімічні закономірності дії NO на транспорт Ca^{2+} у внутрішній мітохондрійній мембрані.

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 регулятором метаболічних та транспортних процесів у МХ. Наразі існують експериментальні докази функціонального зв'язку ПМ та МХ, що забезпечує підтримання оптимальної концентрації Ca^{2+} в цитоплазмі [Haynes V., 2003; Brown G., 2007; Graier W., 2007; Santos C., 2011]. Із залученням методів лазерної конфокальної мікроскопії та протокової цитометрії нами показано, що руйнування електрохімічного градієнту протонів на ВММ супроводжується зростанням концентрації іонів Ca в міоплазмі та зменшенням у матриксі (рис. 6).

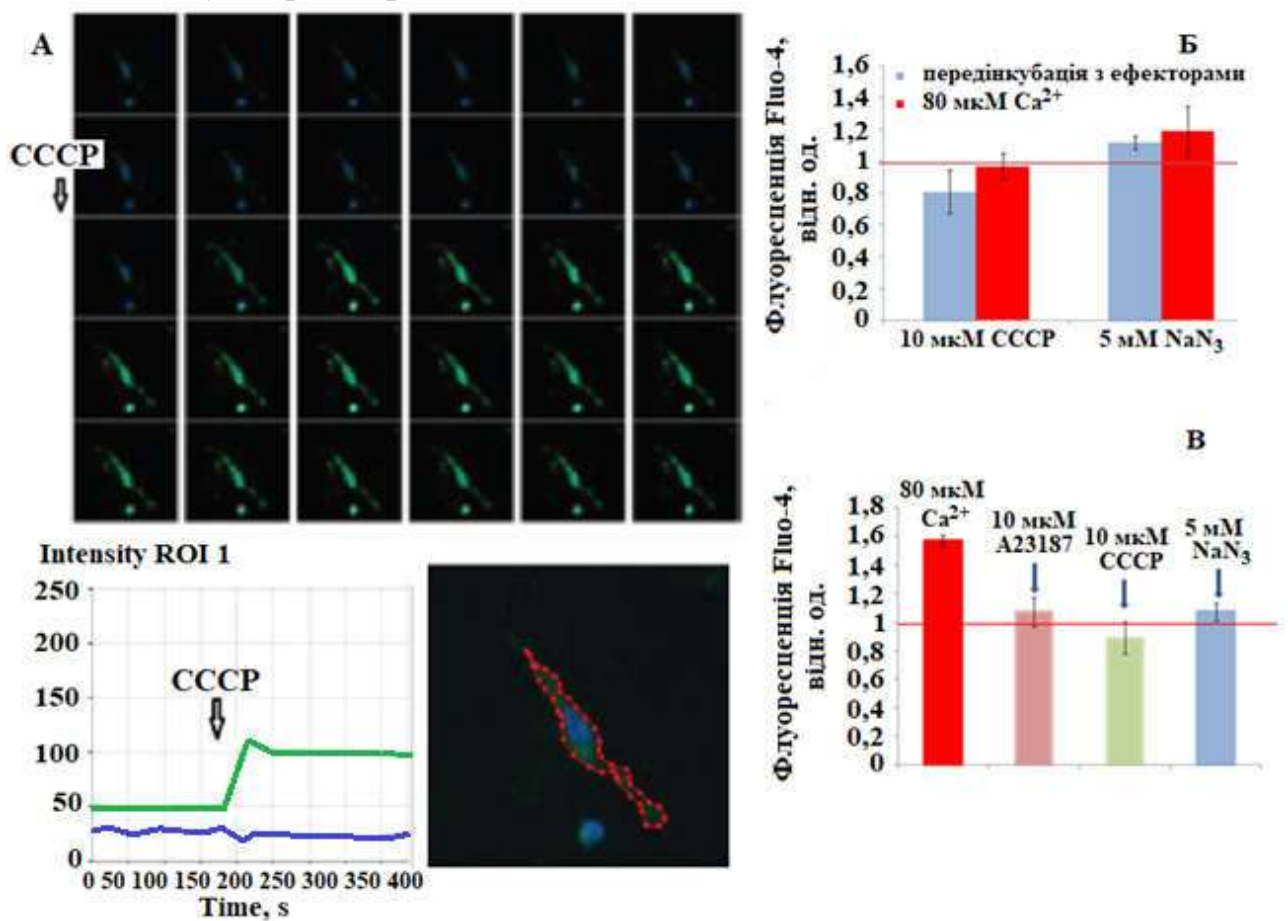
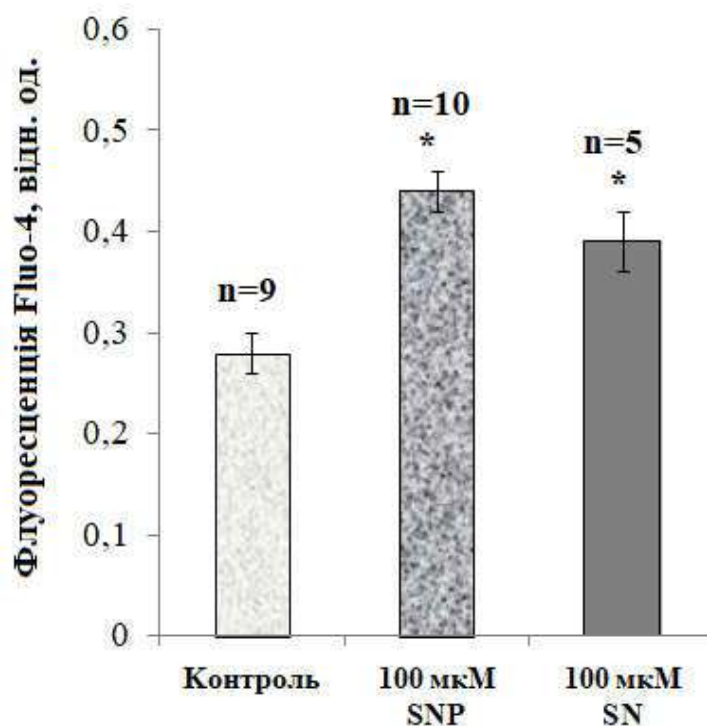


Рис. 6. Ефекти сполук, що деполяризують мітохондрійну мембрану, на вміст Ca^{2+} в міоплазмі (А), матриксі ізольованих мітохондрій в умовах передінкубації (Б) та після енергозалежної акумуляції катіона, а також за присутності Ca^{2+} -іонофора (В'). А – метод лазерної конфокальної мікроскопії, зонд Fluo-4 АМ: візуалізація процесу зростання концентрації Ca^{2+} в міоплазмі за дії 10 μM протонифору (верхня панель) та числова інтерпретація цього процесу, функція ROI (нижня панель). Б, В' – протокова цитометрія: за "1" прийнято значення флуоресцентного сигналу Fluo-4 без додавання екзогенного Ca^{2+} (ендогенний іонізований Ca, базальний рівень). $M \pm m$, $n = 5$

Ці результати підтверджують ключову роль МХ в підтриманні Ca^{2+} -гомеостазу ГМК матки. Локалізовані в субплазмалемному регіоні МХ, разом із

ділянками периферичного СР, здатні акумулювати Ca^{2+} при його надходженні з позаклітинного середовища і забезпечувати зв'язок між позаклітинним та внутрішньоретикулярним пулами катіону [Waldeck-Weiermair M., 2013; Santo-Domingo J., 2015; Takeuchi A., 2015; Spat A., 2017; Kuznetsov A., 2021; Alevriadou B., 2021]. 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 [Акопова J., 2005]. Тому наступний етап роботи присвячено дослідженню впливу 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.

Нітросполуки посилювали енергозалежну акумуляцію Ca^{2+} в ізольованих МХ (рис. 7). Стимулювальний ефект мав місце лише за умови передінкубації (15 хв), обумовлений активацією Ca^{2+} -уніпортера внутрішньої мембрани цих органел (в присутності 10 мкМ протонофора CCCP та 10 мкМ RuR не проявля-



вся), та не залежав від наявності 5 мкМ циклоспорина А – інгібітора пори перехідної провідності (РТР). Цей ефект може мати значення для швидкого зниження концентрації катіона в цитоплазмі після Ca^{2+} транзєнта.

*Рис. 7. Вплив нітросполук на енергозалежну акумуляцію Ca^{2+} в мітохондріях. Спектрофлуориметрія. $M \pm m$; * - зміни достовірні відносно контролю, $p \leq 0,05$*

Нами детально вивчені біохімічні особливості функціонування H^+ - Ca^{2+} -обмінника в МХ міометрія. Встановлено, що H^+ - Ca^{2+} -обмінник являє собою протеїн LETM 1, його функціонування супроводжується зниженням концентрації Ca^{2+} в матриксі з одночасним закисленням останнього та здійснюється за стехіометрії 1:1; він активується за фізіологічних значень рН, є зворотнім, а також регулюється кальмодуліном. H^+ - Ca^{2+} -обмінник є резистентним до дії оксиду азоту (рис. 8).

Отже, за умови перевантаження матриксу Ca^{2+} відсутність ефекту NO на H^+ - Ca^{2+} -обмінник дозволяє протікати рН-залежному процесу вивільнення катіону з матриксу МХ і подальшій його акумуляції СР. Це дає змогу припустити наявність мембранних механізмів, які захищають МХ від небезпечно високої концентрації Ca^{2+} . Дія NO на Ca^{2+} -гомеостаз МХ передбачає можливість специфічних ефектів на Ca^{2+} -залежні біоенергетичні процеси в ГМК.

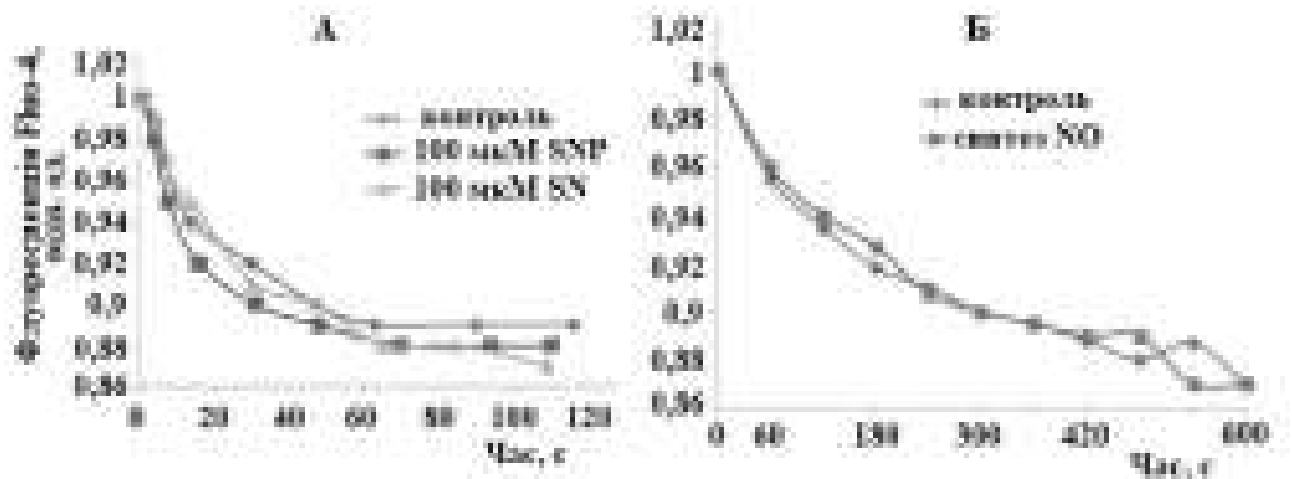


Рис. 8. Відсутність впливу нітросполук (А) та NO (Б, синтез за присутності 50 мкМ L-аргініна, 10 мкМ NADPH й BH₄) на рН-індукований транспорт Ca²⁺ з мітохондрій. Наведені результати характерного дослідю. Стандартне середовище інкубації (рН 6,5). Спектрофлуориметрія

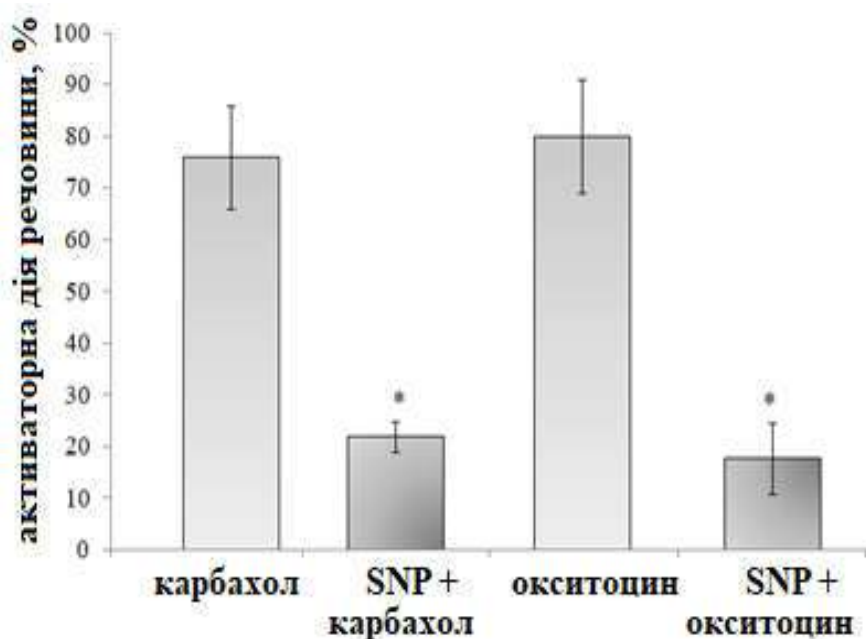
ЗАВДАННЯ 3. Дослідити ефекти NO та біохімічні механізми його дії на концентрацію Ca²⁺ в міоцитах, вивчити особливості впливу цього метаболіту на функціональну активність електрон-транспортного ланцюга та з'ясувати можливість протекторної дії оксиду азоту щодо мітохондрій.

Центральним етапом електро(фармако)механічного спряження у м'язах є зростання концентрації іонів Ca в міоплазмі шляхом його пасивного транспорту за концентраційним градієнтом із поза- та внутрішньоклітинних пулів внаслідок взаємоузгодженого функціонування каналних структур ПМ і СР [Костерин С., 1990; Garcia-Gardena G., 1996; Sanders K., 2001; Matthew A., 2004; Chalmers S., 2007, Wray S., 2019]. Оксид азоту, що синтезується в МХ міоцитів, або позаклітинного походження (ендометрій, ендотелій судин, донори та попередники NO) може впливати на електричний потенціал ПМ та катіон-транспортувальні системи в ній. Релаксуючий ефект NO в ГМК пов'язують із зростанням вмісту сGMP в міоплазмі [Bryan N., 2009], альтернативним напрямом 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 [Pucovsky V., 2002; Trebak M., 2010; Ulrich C., 2013; Barnet S., 2018; Guerra D., 2019].

Проведеними дослідженнями продемонстровано, що оксид азоту гальмує процес підвищення концентрації іонів Ca в міоплазмі в разі дії на міоцити карбахола та окситоцину (рис. 9).

Одним з важливих біохімічних механізмів, за яким NO може викликати релаксацію гладенького м'язу матки, є сGMP-залежна або безпосередня активація K⁺-каналів ПМ [Khan R., 1997; Brainard A., 2007; Smith R., 2007; Noble K., 2010; Wray S., 2019]. Речовини, які сприяють відкриттю K⁺-каналів, знижують збудливість клітин, викликаючи зміщення мембранного потенціалу від його порогових значень, необхідних для активації іон-транспортувальних систем.

З використанням потенціал чутливого зонду DiOC₆(3) та методу протокової цитометрії на свіжовиділених міоцитах було продемонстровано, що ефект поляризації ПМ в присутності SNP та SN в концентрації 0,1 мМ має виражений Ca²⁺-залежний характер. Пасивний транспорт Ca²⁺ в ПМ міоцитів матки значною мірою обумовлений функціонуванням потенціал-керованих дигідропіридинчутливих Ca²⁺-каналів L-типу [Matthew A., 2004]. Блокування Ca²⁺-каналів нітрендипіном суттєво не впливало на потенціал ПМ, також не відбувалось зростання поляризації ПМ за дії нітросполук. Таким чином, поляризуючий ефект нітросполук не залежить від активації Ca²⁺-каналів, але може вказувати на можливе залучення цих структур у зростання проникності мембрани до іонів Ca.

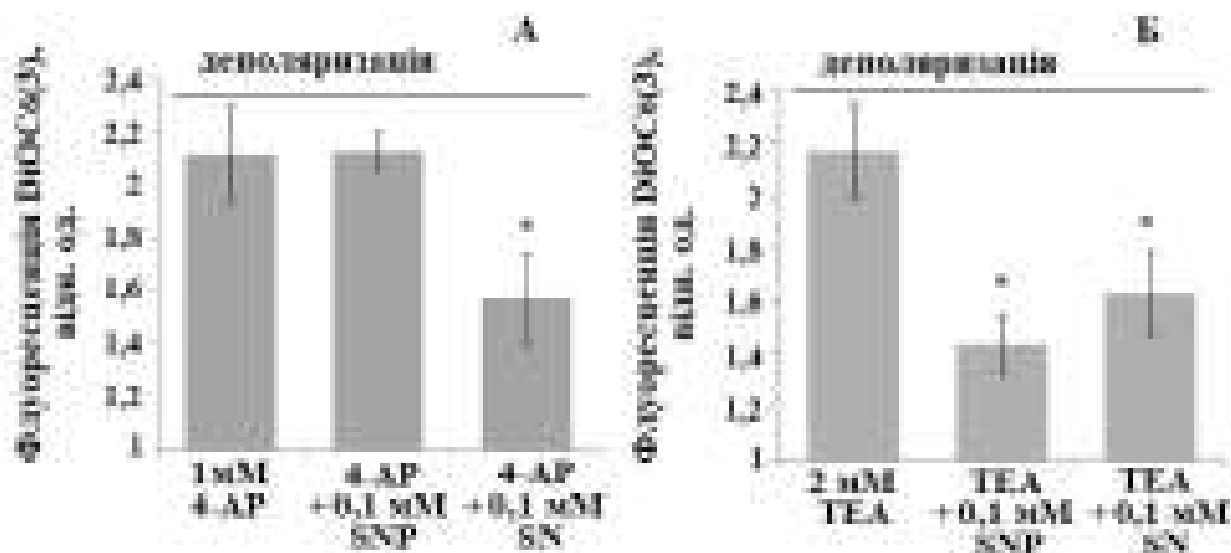


*Рис. 9. Стимуляція карбахолом (0,1 мМ) та окситоцином (0,5 мкМ) зростання Ca²⁺ в міоплазмі в контролі та за попередньої обробки (5 хв) клітин донором NO – 0,1 мМ SNP. M±m, n=14. * - зміни достовірні відносно стимульовального ефекту спотук, p < 0,01. За 0 % прийнято рівень флуоресценції Fluo-4 в не*

стимульованих клітинах. Лазерна конфокальна мікроскопія

Крім того, SN за доволі низької концентрації (0,01 мкМ) виявляв виражений інгібувальний ефект (до 70 %) на активність Ca²⁺-помпи ПМ (PMCA). SNP у концентрації 100 мкМ в середньому на 50 % пригнічував активність Ca²⁺,Mg²⁺-АТРази.

Пригнічення активності РМСА оксидом азоту разом зі зростанням проникності ПМ до Ca²⁺ в ГМК матки за фізіологічних умов здатні викликати збільшення концентрації Ca²⁺ в субплазмалемному регіоні міоплазми, що може в подальшому активувати Ca²⁺-залежні процеси і структури, зокрема відповідні підтипи K⁺-каналів. Останнє буде сприяти збільшенню електричного потенціалу на ПМ. У наших дослідженнях блокування K⁺-проникності плазмалеми інгібіторами K⁺-каналів тетраетиламонієм та 4-амінопіридином (середовище містило фізіологічні концентрації Ca²⁺) призводило до її вираженої деполяризації, на фоні якої гіперполяризуючий ефект нітросполук не проявлявся (рис. 10). Ці дані свідчать на користь залучення Ca²⁺-залежних K⁺-каналів, що активуються NO, у реалізацію ефектів нітросполук, спрямованих на зростання електричного потенціалу ПМ. Крім того в умовах передінкубації міоцитів з нітросполуками гальмується розвиток у часі висококалієвої деполяризації.



*Рис. 10. Відсутність поляризуючого ефекту 0,1 мМ SNP та SN в умовах блокування K^+ -каналів плазмалеми міоцитів матки 4-амінопіридином (4-AP) (А) та тетраетиламонієм (ТЕА) (Б). $M \pm m$, $n = 5$. *- зміни достовірні відносно контролю за відсутності нітросполук, $p < 0,05$. Для виключення ефекту мітохондрій клітини преінкубували 5 хв з 5 мМ азидом натрія. За "1" прийнято власну флуоресценцію клітин*

Було продемонстровано, що 10 мкМ SNP та SN підвищують активність Na^+, K^+ -АТРази у міометрії. За присутності метиленового синього (10 мкМ), відомого інгібітора розчинної гуанілатциклази, стимульовального ефекта нітросполук не спостерігали, що вказує на користь залучення компонентів сигнального шляху NO/розчинна гуанілатциклаза/сGMP/протеїнкіназа G у реалізацію ефектів нітросполук. Активація Na^+, K^+ -АТРази також може мати парціальний внесок у зростання поляризації ПМ.

Поряд із електричним потенціалом на ПМ ключову роль у підтриманні Ca^{2+} -гомеостазу ГМК, як було нами продемонстровано вище, відіграє рівень поляризації ВММ, від якого залежать функціонування Ca^{2+} -транспортувальних систем МХ та відкриття РТР. Гіперполяризація ВММ має негативні наслідки, що проявляється в змінах морфології МХ, Ca^{2+} -перевантаженні та гіперпродукції АФК. Існує точка зору, що NO у низьких концентраціях володіє протекторними щодо МХ ефектами. Методами лазерної конфокальної мікроскопії та потокової цитометрії із залученням потенціал чутливого зонду DiOC₆(3) нами було продемонстровано, що 0,1 мМ SNP (за умови деполаризації ПМ 1 мМ убаїном) приводить до помірного зниження електричного потенціалу ВММ (біля 17 %). Причиною цього ефекту може бути його вплив на окремі компоненти ЕТЛ. Нами продемонстровано відповідність між змінами флуоресценції мітохондрійних NADH та FAD (їхнім редокс-станом) і функціонуванням окремих комплексів ЕТЛ ВММ. Оксид азоту (у формі нітросполук або за стимулювання його синтезу внесенням Ca^{2+} та L-аргініна) знижує інтенсивність окислення FADH₂ в ЕТЛ, що може бути причиною помірного зменшення електричного потенціалу на ВММ (рис. 11).

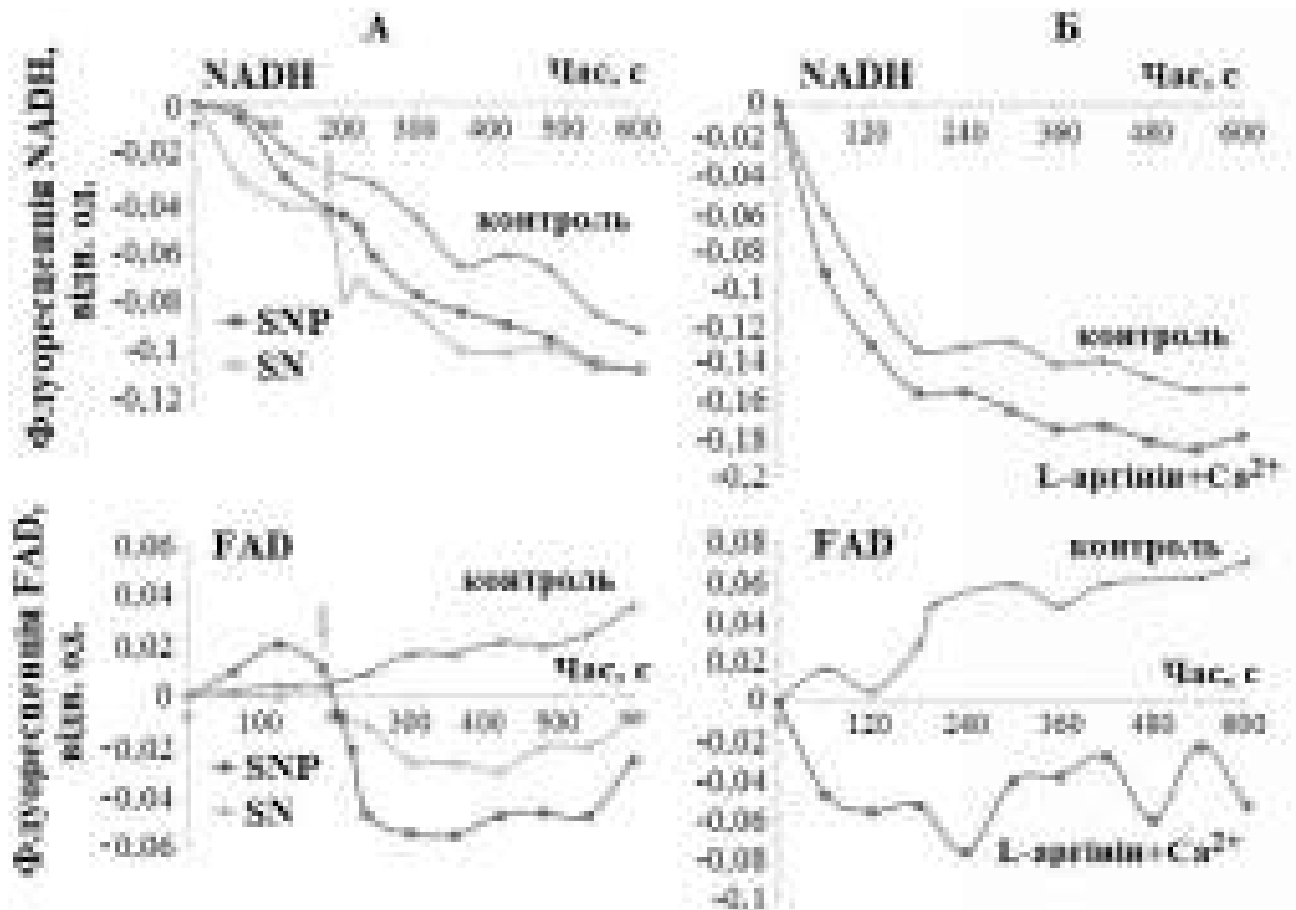


Рис. 11. Зміни флуоресценції NADH та FAD в ізольованих мітохондріях за дії 0,1 мМ SNP та SN (А) та активації реакції синтезу NO за присутності 50 мкМ L-аргініна та 100 мкМ Ca²⁺ (Б). Дані типових експериментів

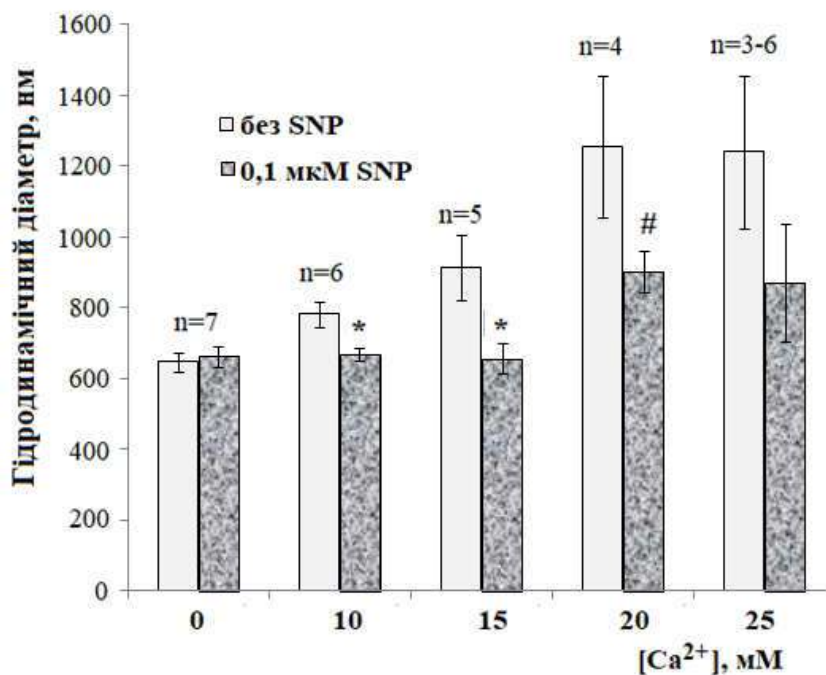


Рис. 12. Протекторна дія нітропрусида натрія (SNP) за умов висококальцієвого набухання мітохондрій. $M \pm t$, * - $p < 0,02$, # - $p < 0,1$ відносно дослідів із Ca²⁺. Фотонна кореляційна спектроскопія

Було також виявлено, що SNP в доволі низькій концентрації (0,1 мкМ) ефективно пригнічував набухання МХ у гіперкальцієвому середовищі (рис. 12), що може

бути пояснено гальмівною дією NO на РТР [Brooker P., 2000].

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

Проведеними експериментами було продемонстровано, що використані нітросполуки (0,1 мМ) викликають зростання (на 30-40 %) ефективного гідродинамічного діаметра міоцитів, що позитивно корелює із їхньою здатністю викликати релаксацію ГМК.

Узагальнення результатів наших досліджень щодо механізмів синтезу NO в МХ гладеньких м'язів, його регуляторної ролі в біохімічних процесах обміну Ca^{2+} , поляризації субклітинних структур, редокс-стану аденінових нуклеотидів, Ca^{2+} -гомеостазу міоцитів матки представлено на рис. 13 у вигляді схеми.

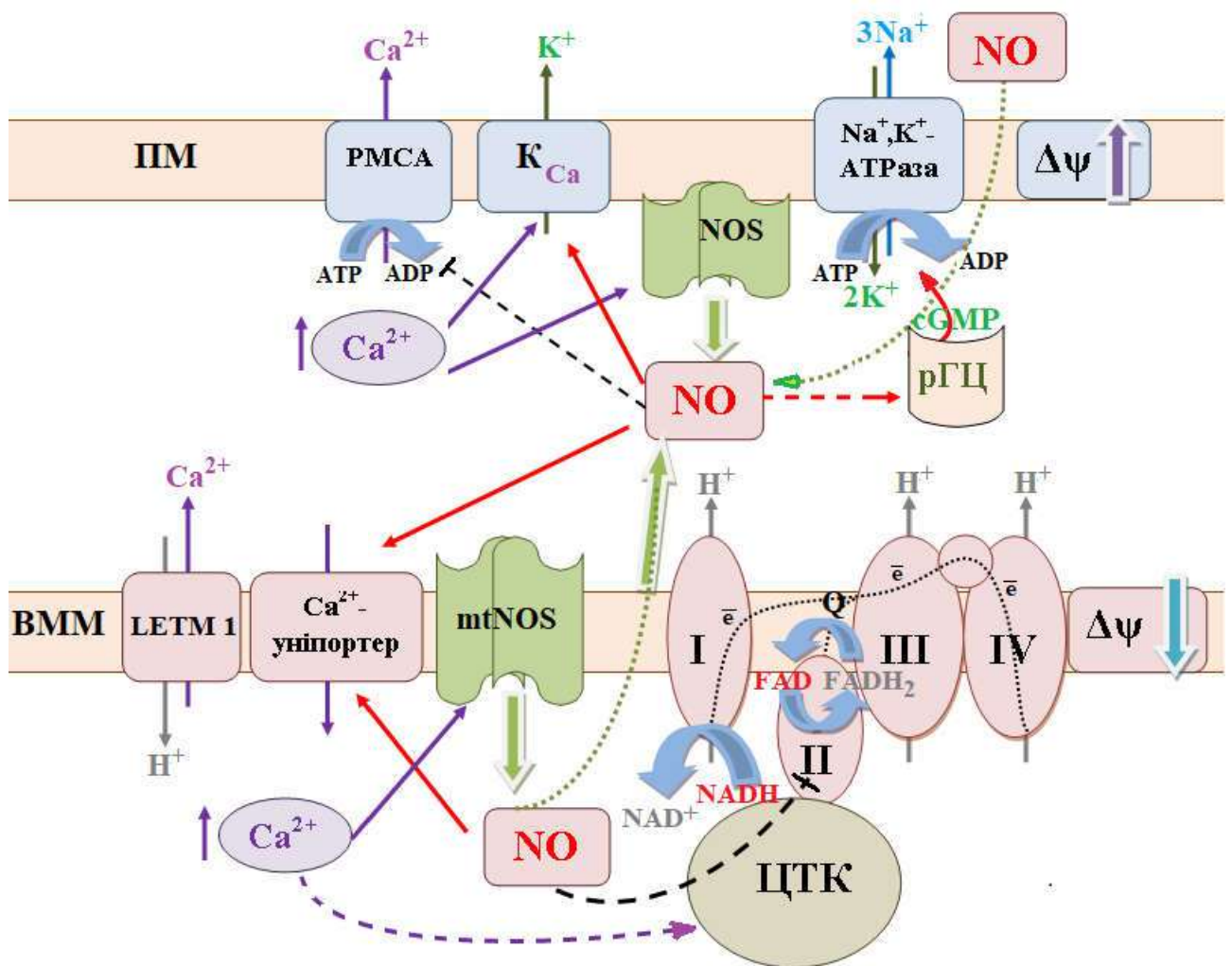


Рис. 13. Біохімічні механізми, що лежать в основі регуляторної дії NO на рівні мітохондрій та плазматичної мембрани в міоцитах матки : ПМ – плазматична мембрана, ВММ – внутрішня мітохондрійна мембрана, РМСА – Ca^{2+} -транспортувальна АТРаза, K_{Ca} – Ca^{2+} -залежні K^{+} -канали, рГЦ – розчина гуанілатциклаза, LETM 1 – H^{+} - Ca^{2+} -обмінник, I, II, III, IV – відповідні комплекси електрон-транспортувального ланцюга, ЦТК – цикл трикарбонових кислот, $\Delta\psi$ – зміни мембранного потенціала, $\rightarrow$ - активуючий вплив, $-|$ - інгібувальний вплив

ЗАВДАННЯ 4. Із застосуванням методології мереж Петрі здійснити імітаційне моделювання біоенергетичних процесів у мітохондріях, зокрема за дії нітросполук

Електричний потенціал на ВММ є інтегральним показником активності ЕТЛ, основним регулятором метаболічних та транспортних процесів у МХ. Слід очікувати, що сполуки, які його модулюють, 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 ефективний ГД органел. Можливість одночасного та комплексного моделювання цих процесів важливе для розуміння функціонування МХ як цілісної системи. Формалізація й узагальнення експериментальних результатів та пошук відповідності між теоретичними передбаченнями та реальними експериментальними даними вимагають застосування методології 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 [Matsuno H., 2003; Doi A., 2004; Wingender E., 2011].

Для здійснення симуляційного моделювання біофізикохімічних процесів у МХ (зміни власної флуоресценції аденінових нуклеотидів МХ, їхнього ГД та інтенсивності генерації ними АФК) у якості ефектора ЕТЛ нами було обрано інгібітор IV комплексу дихального ланцюга азид натрію, що широко застосовується як інструмент для інгібування окисного фосфорилювання і транспорту Ca^{2+} в МХ, а також є “непрямим донором” NO [Яковенко И., 2005].

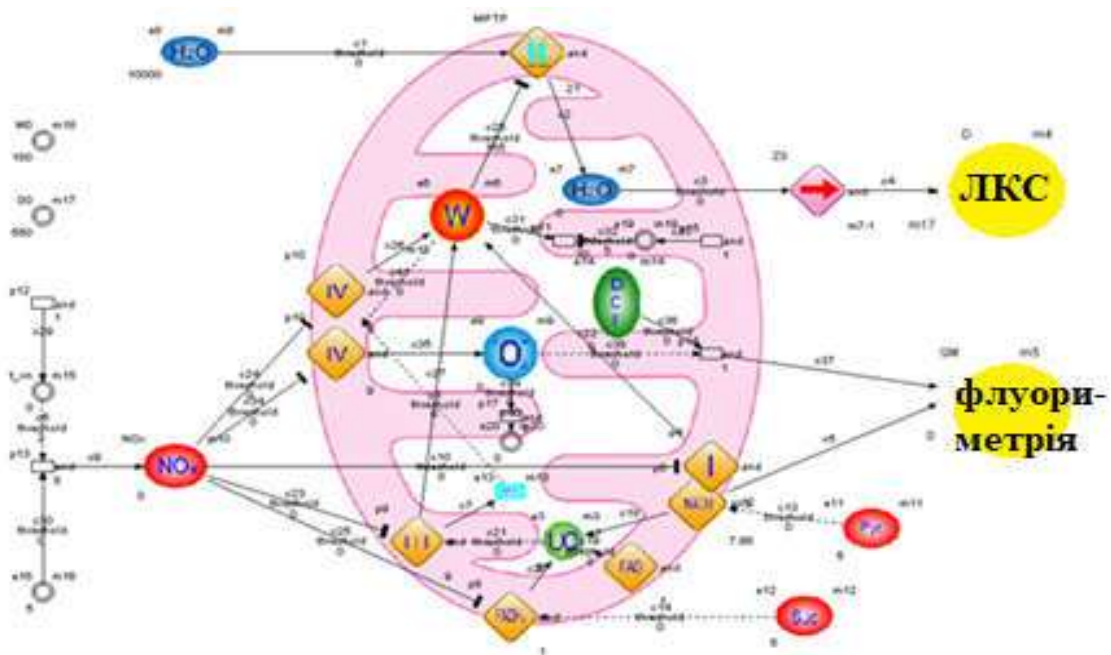


Рис. 14. Структура гібридних функціональних мереж Петрі, які симулюють ефекти азиду натрію на зміни флуоресценції NADH, DCF та гідродинамічного діаметру в мітохондріях. Символи на схемі: NO_x – нітросполуки, в дано-

му випадку азид натрія; *Suc* – сукцинат натрія; *Pyr* – піруват натрія; *W* – електричний потенціал внутрішньої мембрани; *I*, *II*, *III*, *IV* так само як *FADH₂*, *FAD*, *NADH* (вписані в ромби мітохондрійної мембрани) – комплекси ЕТЛ з відповідними кофакторами; *O₂⁻* – супероксиданіон; *DCF* – флуоресценція зонда *DCF-DA*; *UQ* – убіхінон; *cyt C* – цитохром *C*; символ $\square$ – в середині ромба – пора перехідної провідності (*MPTP*); стрілки: $\rightarrow$ – процес активації, $\top$ – процес інгібування. *ЛКС* – лазерна кореляційна спектроскопія

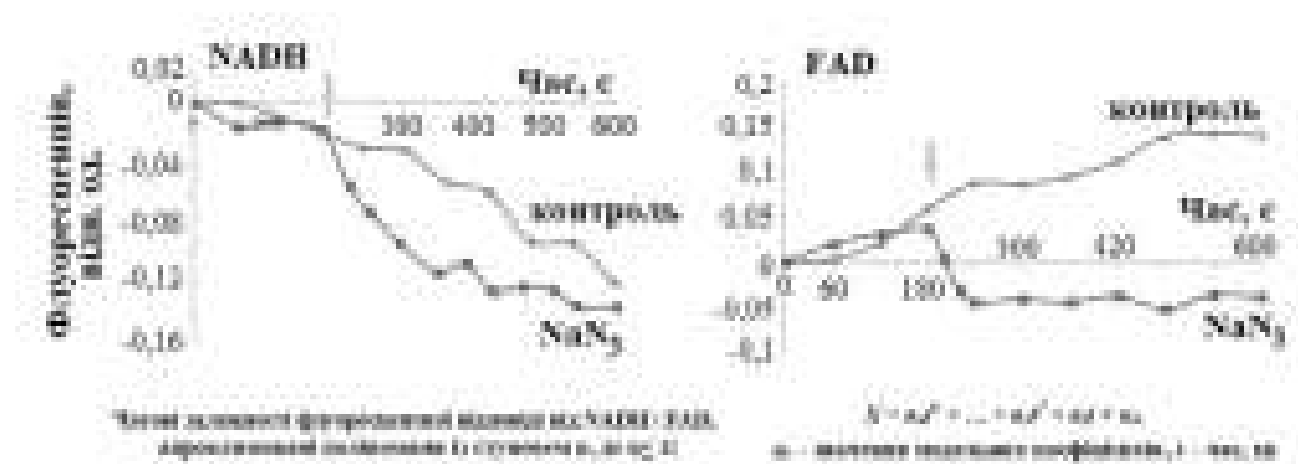


Рис. 15. Вплив азиду натрію (5 мМ) на флуоресценцію *NADH* та *FAD* в ізольованих мітохондріях. Дані типового експерименту. Спектрофлуориметрія

Нами створено модель МХ в термінах мереж Петрі (рис. 14) на основі аналізу літературних та власних експериментальних даних (рис. 15, 16), в яку закладено структури (комплекси), що відображають ЕТЛ. Модель враховує компоненти інкубаційного середовища та наступні експериментальні факти: **1** – сукцинат та піруват додаються в середовище для енергізації МХ; процес окислення *NADH* та *FADH₂*, який ми реєструємо на спектрофлуориметрі за зміною їхньої флуоресценції, відображає створення та підтримання потенціалу на мітохондрійній мембрані; **2** – азид натрія, як "непрямий донор NO", має інгібувальний вплив на дихальний ланцюг в цілому, але найбільший ефект на морфо-функціональні параметри органел має пригнічення *I*, *III* та *IV* комплексів; **3** – інгібування активності ЕТЛ призводить до надпродукції АФК (зокрема, супероксид-аніону) в МХ і, як наслідок, до посилення *DCF*-флуоресценції (пряме інгібування *IV* комплексу в рамках імітаційної моделі); **4** – інгібування азидом натрію ЕТЛ призводить до зростання ГД МХ внаслідок деполаризації мітохондрійної мембрани, відкриття РТР, порушення осмотичного балансу та набухання органел (реєструємо методом лазерної кореляційної спектроскопії).

Азид натрія впливає на флуоресценцію *NADH/FAD* аналогічно до дії донорів оксиду азоту (рис. 15, рис. 11), викликає збільшення ГД МХ та посилену генерацію АФК (рис. 16).

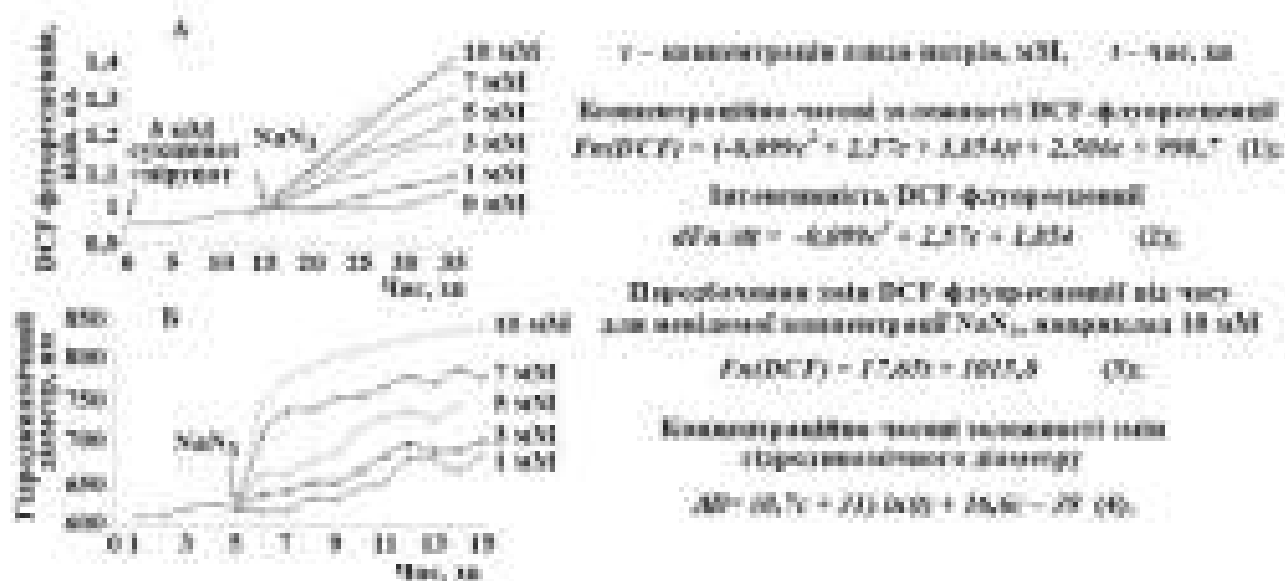


Рис. 16. Концентраційно-часові залежності змін DCF-флуоресценції (А) та ефективного гідродинамічного діаметру (Б) мітохондрій за впливу різних концентрацій азиду натрія. А - Прямая лінія теоретично розрахована крива змін DCF-флуоресценції відповідно до рівняння (3) для концентрації азида натрія 10 mM; точки та пунктирна крива – експериментально одержана залежність для 10 mM азида натрія. Протокова цитометрія. Б – Пунктирна крива віддзеркалює вплив 10 mM азиду натрія, теоретично розрахована відповідно до рівняння (4). Лазерна кореляційна спектроскопія

Одержані рівняння (рис.15, 16) 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 MX у часі на дію 10 mM NaN_3 – концентрацію, яка в експерименті не використовувалася (рис. 16).

ЗАВДАННЯ 5. Встановити іонні та мембранні механізми, які лежать в основі дії вибраних калікс[4]аренів на біосинтез NO, трансмембранний обмін Ca^{2+} та біоенергетику мітохондрій.

Важливим регулятором біохімічних процесів у матриксі та функціонуванні ЕТЛ є зміни в концентрації Ca^{2+} в MX. Зростання вмісту катіону в мітохондрійному матриксі активує синтез АТР, 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 й вибірково регулювати транспорт Ca^{2+} у ВММ та впливати на Ca^{2+} -залежні процеси, зокрема мітохондрійну біоенергетику. Окремі калікс[4]арени з високою спорідненістю модулюють активність катіон-транспортуючих АТР-гідролаз у гладеньких м'язах, включаючи матку, що привертає увагу щодо їх важливості як потенційних регуляторів гомеостазу Ca^{2+} в міоцитах [Лабинцева Р., 2007; Veklich T., 2016, 2018; Костерін С., 2019].

Здатність калікс[4]аренів змінювати функціональну активність субклітинних структур, зокрема МХ, ставить питання стосовно їхнього проникнення через ПМ міоцитів у міоплазму. Калікс[4]арен C-956 є високоафінним інгібітором Ca^{2+} -помпи ПМ, спричинює зростання з послідовним зниженням вмісту іонізованого Ca^{2+} в цитоплазмі та зменшення об'єму міоцитів [Veklich T., 2018].

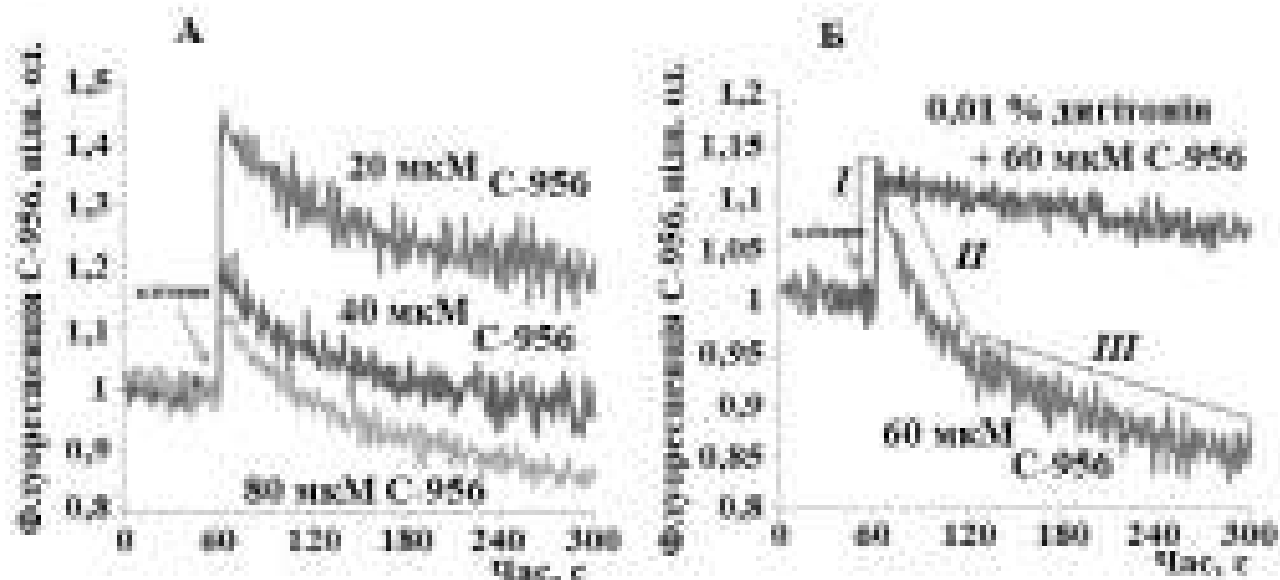


Рис. 17. Кінетика взаємодії калікс[4]арена C-956 з клітинами за його різних концентрацій (А) та вплив 0,01% дигітоніну на цей процес (Б). Результат типового експеримента. Метод спектрофлуориметрії

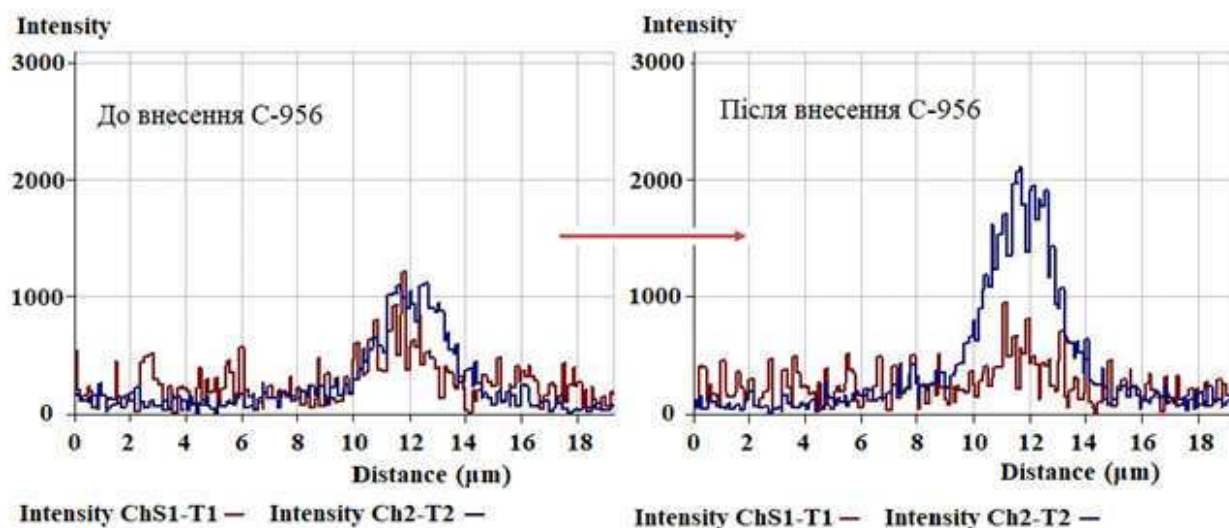


Рис. 18. Порівняння профілю розподілу в міоциті синьої флуоресценції до та після внесення флуорофора калікс[4]арена C-956 з флуоресценцією специфічного щодо мітохондрій MitoTracker Orange CM-H₂TMRos (червоний колір). Для аналізу вибрано ділянку цитоплазми поза ядром. Лазерна конфокальна мікроскопія

Одержані нами результати методом спектрофлуориметрії (рис. 17) виявили наступні закономірності взаємодії C-956 (за змінами його флуоресценції

$\lambda_{\text{аб}}=283$ нм, $\lambda_{\text{фл}} = 365$ нм) з міоцитами. Початковий спалах флуоресценції (етап I) залежить від концентрації калікс[4]арена, вказує на адсорбцію поверхнею клітини. Етап II (швидке гасіння флуоресценції) включає проникнення через ПМ; за присутності дигітоніна, тобто при збільшенні неспецифічної проникності мембрани, він відсутній. На етапі III відбувається перерозподіл C-956 у цитозолі, взаємодія з субклітинними структурами, можлива димеризація.

Дані лазерної конфокальної мікроскопії (рис. 18) із застосуванням специфічних флуоресцентних зондів (зокрема, MitoTracker Orange CM-H₂TMROS) та аутофлуоресценції калікс[4]арену C-956 підтверджують, що вибраний калікс[4]арен сорбується поверхнею ПМ та проникає в міоплазму, взаємодіючи із МХ.

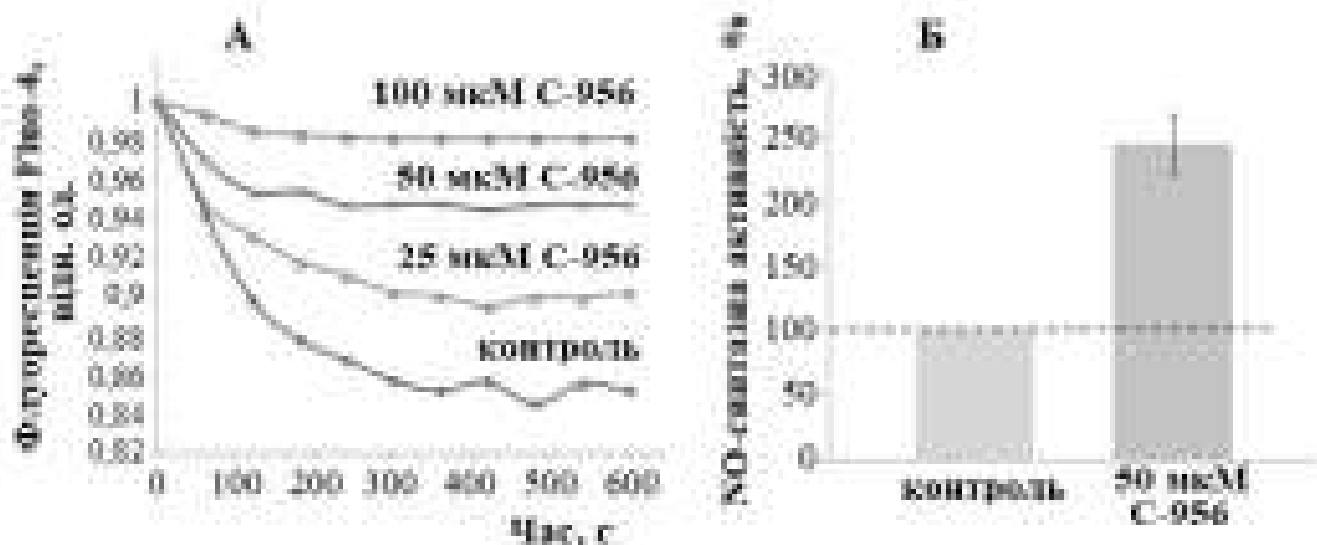


Рис. 19. Вплив калікс[4]арена C-956 на ΔpH -залежний вихід Ca^{2+} з матриксу (А) та NO-синтазу активність (Б) в ізольованих мітохондріях. А - метод спектрофлуориметрії, результат типового дослідження. Б - протокова цитометрія, $M \pm m$, $n=5$

Калікс[4]арен C-956 ефективно інгібує H^+ - Ca^{2+} -обмінник у МХ (рис. 19, А), 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 C-956 стимулює мітохондрійну NO-синтазу (рис. 19, Б), можливо внаслідок зростання концентрації Ca^{2+} в матриксі МХ, і гальмує окислення NADH та FADH_2 в ЕТЛ (рис. 20). Останній ефект може бути опосередкованим NO і має результатом зниження поляризації мітохондрійної мембрани. Поряд з цим, C-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 фосфорилювання і захищаючи клітини від енергетичного перевантаження.

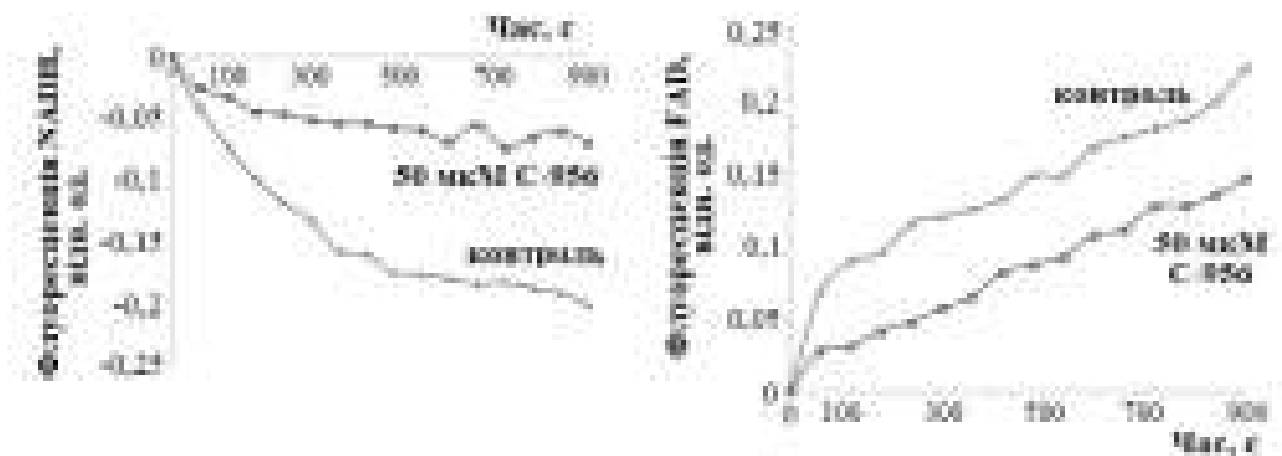


Рис. 20. Зміни флуоресценції NADH та FAD в ізольованих мітохондріях міометрія за присутності калікс[4]арену C-956. Результат типового дослідження. Спектрофлуориметрія

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 [Хіе З., 2003]. Потенціал на мітохондрійній мембрані є індикатором енергетичного та функціонального статусу МХ і клітини в цілому [Костюк П., 2010]. З огляду на вищезазначене дослідження змін потенціалу ПМ і мітохондрійної мембрани під впливом фізіологічно-активних речовин є важливим завданням біомембранології.

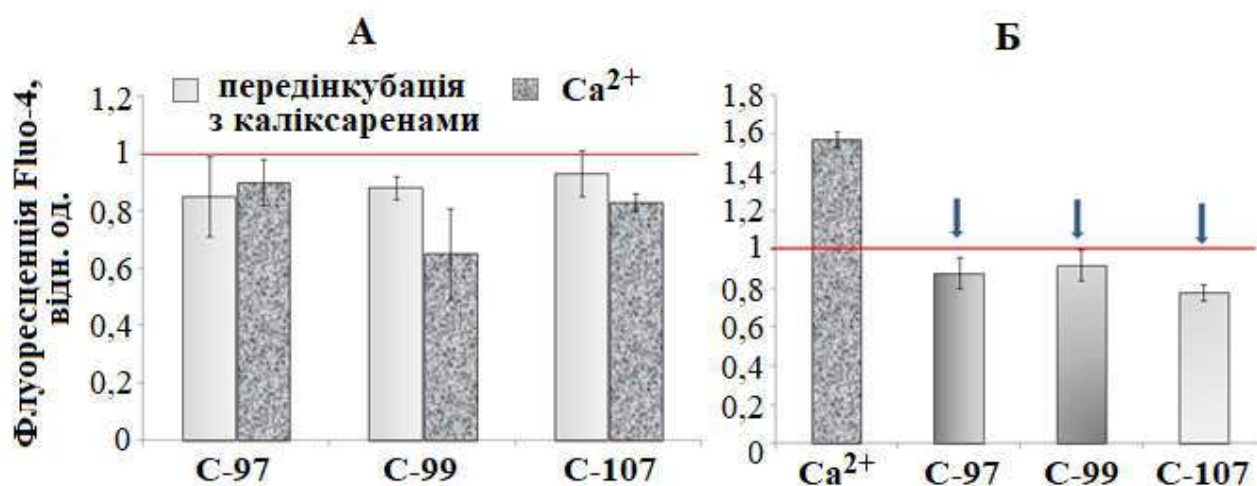


Рис. 21. Вплив калікс[4]аренів (100 нМ) на концентрацію Ca^{2+} в матриксі ізольованих мітохондрій та енергозалежну акумуляцію Ca^{2+} органелами. $M \pm m$, $n=5$. А – передінкубація з калікс[4]аренами протягом 5 хв (лівий стовпчик) та послідовне додавання 80 мкМ Ca^{2+} (правий стовпчик). Б – додавання речовин після енергозалежної акумуляції 80 мкМ Ca^{2+} мітохондріями. Протокова цитометрія

За використання потенціалчутливого зонду DiOC₆(3) та протокової цитометрії на свіжовиділених міоцитах було продемонстровано, що калікс[4]арени C-97, C-99 та C-107, які є ефективними інгібіторами Na^+, K^+ -АТРази ПМ, зни-

жують поляризацію плазмалемми, внаслідок їх убаїнподібної дії на ензим [Векліч Т., 2007]. 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+} в МХ міометрія та знижують концентрацію катіона, попередньо накопиченого в енергозалежному процесі (рис. 21), стимулюючи H^+ - Ca^{2+} -обмінник їхньої внутрішньої мембрани (С-97 та С-99). Зниження концентрації Ca^{2+} в матриксі приводить до зменшення активності Ca^{2+} -залежних мітохондрійних дегідрогеназ і відповідного гальмування роботи ЕТЛ, а також mtNOS (рис. 22).

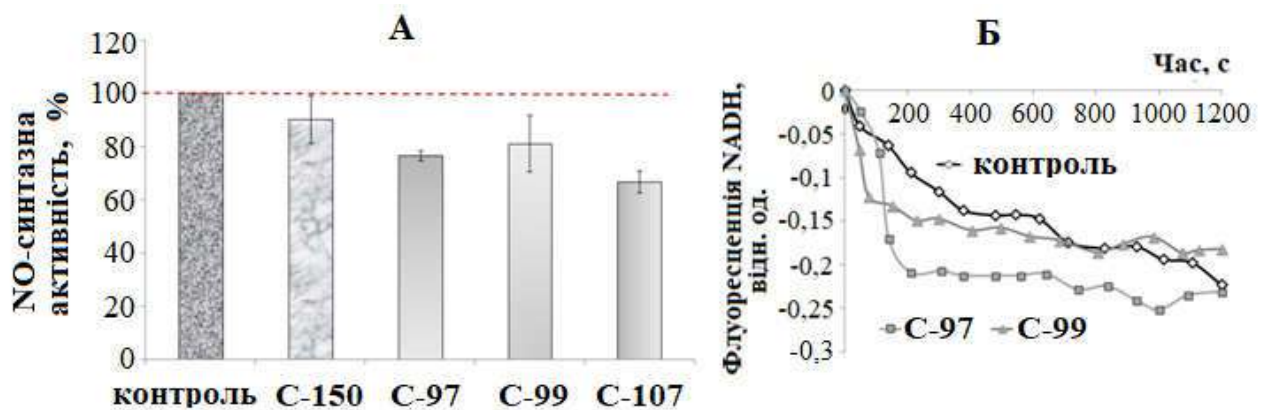


Рис. 22. Вплив вибраних калікс[4]аренів (100 нМ) на NO-синтазну активність (А) та динаміку змін флуоресценції NADH (Б) в ізолюованих мітохондріях. А - протокова цитометрія, $M \pm m$, $n=5$. Б – спектрофлуориметрія, дані типового експерименту.

Внесення досліджуваних калікс[4]аренів спричинювало більш інтенсивне зниження флуоресценції від NADH ізолюованих МХ, що може бути зумовлено стимулюванням I комплексу ЕТЛ. Попри початкове транзйентне зростання потенціалу ВММ, вихід іонів Ca з матриксу, спричинений досліджуваними сполуками, з часом приводить до гальмування активності ЕТЛ, що може бути поясненням зниженням потенціалу ВММ з часом.

Отже, досліджені нами калікс[4]арени можуть бути в перспективі використані як регулятори Ca^{2+} -гомеостазу в МХ та функціонування ЕТЛ. Одним з механізмів цих ефектів є Ca^{2+} -опосередкована дія калікс[4]аренів на біосинтез оксиду азоту 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.

Шляхи та механізми впливу калікс[4]аренів на концентрацію Ca^{2+} в МХ, синтез NO та функціонування ЕТЛ викладено у вигляді авторської узагальнюючої схеми на рис. 23.

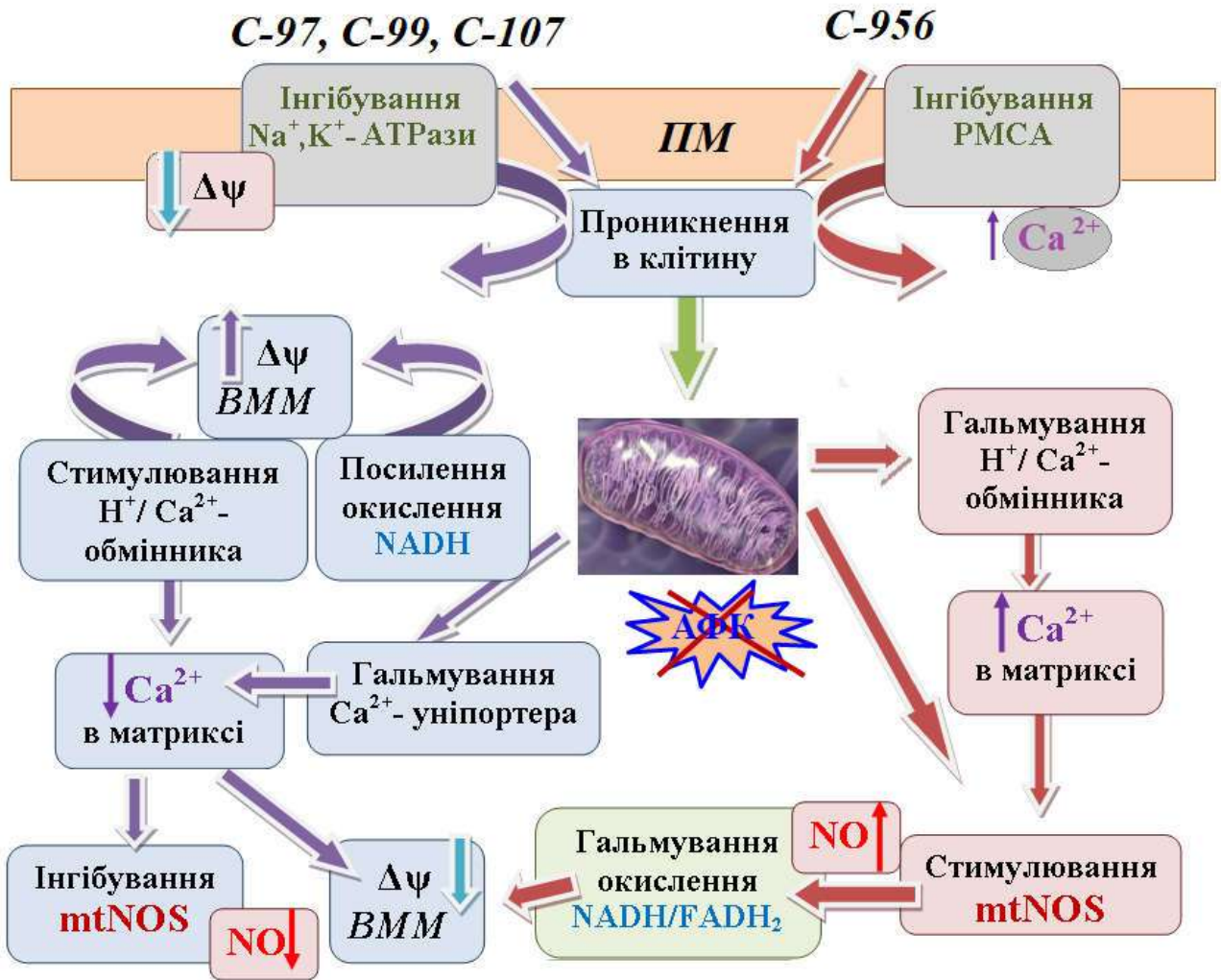


Рис. 23. Шляхи та механізми впливу досліджуваних калікс[4]аренів на концентрацію Ca^{2+} в мітохондріях, синтез NO та функціонування електрон-транспортного ланцюга: ПМ – плазматична мембрана, ВММ – внутрішня мітохондрійна мембрана, РМСА – Ca^{2+} -помпа плазматичної мембрани, $\Delta\psi$ – зміни мембранного потенціала

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+} -транспортних систем мітохондрій, електрон-транспортного 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-транспортного 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 протонофора 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 (stechiometriya 1:1) здійснюється за участі протеїна LETM 1, супроводжується зниженням концентрації Ca^{2+} в матриксі з одночасним закисненням останнього, активується за фізіологічних значень pH, 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 $\text{NADH}/\text{FADH}_2$ у 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 транзйентну поляризацію внутрішньої мітохондрійної мембрани.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

СТАТТІ

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* 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., 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)*.

4. **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)*.

5. **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)*.

6. **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'-dihexyloxacarbocyanine. *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)*.

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. *(Особистий внесок: підбір та узагальнення літературних даних, участь в оформленні публікації)*.

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. *(Особистий внесок: сформульо-*

вано ідею публікації, здійснено пошук та аналіз літературних даних, оформлення публікації).

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. *(Особистий внесок: сформульовано ідею роботи, спільно з співавторами проведено дослідження, здійснено узагальнення отриманих результатів, кінетичний та статистичний аналіз, підготовлено публікацію).*

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. *(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 Wacław Szybalski (Польща).*

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. *(Особистий внесок: спільно з співавторами сформульовано наукову задачу та проведено дослідження, узагальнення та аналіз результатів, написано та оформлено публікацію).*

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. *(Особистий внесок: сформульовано наукову задачу, спільно з співавторами проведено дослідження, здійснено узагальнення, кінетичний та статистичний аналіз результатів, написано та оформлено публікацію).*

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. *(Особистий внесок: спільно з співавторами проведено дослідження, здійснено аналіз та узагальнення отриманих результатів, оформлено публікацію).*

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. *(Особистий внесок: спільно з співавторами проведено дослідження, здійснено аналіз та узагальнення отриманих результатів, оформлено публікацію).*

16. Kolomiets O.V., Danylovych Yu.V., **Danylovych G.V.** H^+ - Ca^{2+} exchanger in the Myometrium Mitochondria: Modulation by Exogenous and Endogenous Com-

pounds. Int. J. Phys. Pathophys. 2015; 6(4): 287-297. *(Особистий внесок: спільно з співавторами проведено дослідження, здійснено аналіз та узагальнення отриманих результатів, оформлено публікацію).*

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. Biopolimers and Cell. 2015; 31(3): 174-178. *(Особистий внесок: спільно з співавторами проведено дослідження, здійснено аналіз та узагальнення отриманих результатів, оформлено публікацію).*

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. *(Особистий внесок: участь у виділенні інтактних міоцитів, проведення досліджень на лазерному конфокальному мікроскопі, відпрацювання протоколу досліджень на протоковому цитометрі для фракції мітохондрій та зонду Fluo-4 АМ, здійснено аналіз та узагальнення отриманих результатів, оформлено публікацію).*

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 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).*

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. *(Особистий внесок: відпрацювання методології ΔpH -залежного виходу Ca^{2+} з матриксу мітохондрій, розрахунок кінетичних параметрів процесу, здійснено аналіз та узагальнення отриманих результатів, підготовлено публікацію).*

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. *(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).*

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 АМ. Укр. 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 Ca^{2+} , оформлено публікацію).*

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^+ -АТР-ази плазматичної мембрани. Укр. біохім. журн. 2012; 84(6): 37-48. *(Особистий внесок: сформульовано ідею роботи, підбір методів та протоколу досліджень, участь в експериментах, здійснено аналіз та узагальнення отриманих результатів, оформлено публікацію).*

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. *(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).*

25. Данилович Ю.В., Данилович Г.В., Коломієць О.В. Ефекти нітропрусиду та нітриту натрію на убаїнчутливу Na^+ , K^+ -АТР-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^+ -АТР-ази в ній у присутності модифікаторів, здійснено кінетичний та статистичний аналіз отриманих результатів, оформлено публікацію).*

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. *(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).*

МОНОГРАФІЯ



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).*

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 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. 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 IX 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 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., Коломієць О.В. Влияние калікс[4]аренов – ингибиторов Na^+ , K^+ -АТФ-азы на поляризацию плазматической и митохондриальной мембран гладкомышечных клеток матки. Актуальні пи-

тання 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. Актуальні питання біологічної фізики та хімії. Матеріали VII Міжнародної науково-технічної конференції. 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. Актуальні питання теоретичної та прикладної біофізики, фізики та хімії. Матеріали VI Міжнародної науково-технічної конференції. 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. Актуальні питання теоретичної та прикладної біофізики, фізики та хімії. Матеріали V Міжнародної науково-технічної конференції. 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 C-99 та C-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). - Р. 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.

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 в мітохондріях гладеньком'язових клітин матки, вивченню молекулярних механізмів дії оксиду азоту як можливого ендогенного специфічного регулятора концентрації Ca^{2+} в 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 в 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 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.

Продemonстровано, що оксид азоту пригнічує шляхи підвищення концентрації іонів Ca в міоплазмі у разі дії на міоцити карбахолу та окситоцину, а та-

кож викликає збільшення характеристичних розмірів міоцитів. Поляризує оксид азоту обумовлений зростанням K^+ -проникності плазмалемми 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 в 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 у літературі розглядають як непрямий донор NO, з можливістю передбачення інтенсивності їхнього протікання. Зокрема, було спрогнозовано відповідь мітохондрій у часі на дію NaN_3 в 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 деполяризацію 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 стимулюванням електрогенного H^+-Ca^{2+} -обмінника. Відсутність впливу всіх досліджуваних калікс[4]аренів на утворення активних форм кисню в 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 та бути використаними в біохімічних дослідженнях як регулятори скорочення/розслаблення міометрія.

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

SUMMARY

Danylovych 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 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 FADH_2 oxidation, and counteracts the swelling of the organelles caused by calcium-rich solution.

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 $\text{Na}^{+}, \text{K}^{+}$ -ATPase activity. The scheme representing biochemical mechanisms of NO regulatory effects at the level of mitochondria and plasma membrane in uterine myocytes is proposed.

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 $\text{NADH}/\text{FADH}_2$, 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 NaN_3 at a concentration that has not been used in the experiment was predicted.

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^+ - Ca^{2+} -exchanger, without affecting the energy-dependent Ca^{2+} accumulation, stimulates mitochondrial NO-synthase, and inhibits the NADH and $FADH_2$ 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 Ca^{2+} -uniporter inhibition and simultaneous stimulation of its H^+ - Ca^{2+} -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.