



Г.В. ДАНИЛОВИЧ, Ю.В. ДАНИЛОВИЧ

**СИНТЕЗ  
ТА БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ  
ОКСИДУ АЗОТУ  
В МІТОХОНДРІЯХ  
ГЛАДЕНЬКОГО М'ЯЗА**



НАЦІОНАЛЬНА  
АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ  
ІМ. О.В. ПАЛЛАДІНА



NATIONAL ACADEMY  
OF SCIENCES OF UKRAINE  
O.V. PALLADIN INSTITUTE  
OF BIOCHEMISTRY

H.V. DANYLOVYCH, Yu.V. DANYLOVYCH

---

**SYNTHESIS  
AND BIOLOGICAL  
ACTIVITY  
OF NITRIC OXIDE  
IN SMOOTH MUSCLE  
MITOCHONDRIA**

---

*«SCIENTIFIC BOOK»  
PROJECT*

---

KYIV • NAUKOVA DUMKA • 2024

Г.В. ДАНИЛОВИЧ, Ю.В. ДАНИЛОВИЧ

---

**СИНТЕЗ  
ТА БІОЛОГІЧНА  
АКТИВНІСТЬ  
ОКСИДУ АЗОТУ  
В МІТОХОНДРІЯХ  
ГЛАДЕНЬКОГО М'ЯЗА**

---

*ПРОЄКТ  
«НАУКОВА КНИГА»*

---

КИЇВ • НАУКОВА ДУМКА • 2024

У монографії викладено дані сучасної наукової літератури та результати власних комплексних досліджень щодо біохімічних закономірностей синтезу NO у мітохондріях гладеньком'язових клітин матки. Особливу увагу приділено молекулярним механізмам дії оксиду азоту як можливого ендогенного специфічного регулятора концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у міоцитах, функціонування  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем мітохондрій та біоенергетичних процесів у них. Проаналізовано експериментальні дані щодо впливу калікс[4]аренів — екзогенних нетоксичних модуляторів функціональної активності мітохондрій — на NO-синтазну здатність, біоенергетику та  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаз органел. Наведено нові відповіді на фундаментальні питання стосовно шляхів розслаблення гладеньких м'язів. Ґрунтовно проаналізовано сучасні дані щодо метаболізму та фізіологічного значення оксиду азоту. Викладено переважно власний експериментальний матеріал стосовно таких питань як синтез оксиду азоту в мітохондріях гладенького м'яза матки, регуляція оксидом азоту  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостазу в міоцитах та транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  у внутрішній мітохондрійній мембрані, впливу оксиду азоту на електронтранспортувальний ланцюг. Значну увагу приділено калікс[4]аренам як селективному інструменту впливу на транспорт  $\text{Ca}^{2+}$ , синтез NO та енергетичні процеси в мітохондріях.

Для фахівців у галузі біохімії та біофізичної хімії, біохімічної мембранології та фармакології, а також для аспірантів відповідних спеціальностей.

The monograph presents data from the current scientific literature and the results of our own comprehensive studies on the biochemical pathways of NO synthesis in the mitochondria of uterine smooth muscle cells. Special attention is paid to the molecular mechanisms of nitric oxide action as a possible endogenous specific regulator of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in myocytes, functioning of  $\text{Ca}^{2+}$  transport systems of mitochondria and bioenergetic processes in them. Experimental data on the effect of calix[4]arenes, exogenous non-toxic modulators of mitochondrial functional activity, on NO synthase capacity, bioenergetics, and  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis of organelles were analyzed. New answers are given to fundamental questions about the ways of smooth muscle relaxation. Provides a thorough analysis of modern data on the metabolism and physiological significance of nitric oxide. Contain mainly the author's own experimental material on such issues as nitric oxide synthesis in uterine smooth muscle mitochondria, nitric oxide regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in myocytes and  $\text{Ca}^{2+}$  transport in the inner mitochondrial membrane, and the effect of nitric oxide on the electron transport chain. Considerable attention is paid to calix[4]arenes as a selective effectors on  $\text{Ca}^{2+}$  transport, NO synthesis, and energy processes in mitochondria.

For specialists in the field of biochemistry and biophysical chemistry, biochemical membranology and pharmacology, as well as for graduate students of the relevant specialties.

Науковий редактор академік НАН України, професор *С.О. Костерін*

**Р е ц е н з е н т и:**

член-кореспондент НАН України, професор *Р.С. Стойка*,  
доктор біологічних наук, професор *О.П. Матишевська*,  
доктор біологічних наук *А.О. Тихомиров*

*Рекомендовано до друку вченою радою Інституту біохімії  
ім. О.В. Палладіна НАН України (протокол №8 від 12.09.2023 р.)*

**Оригінал-макет виготовлено  
за кошти Цільової комплексної програми НАН України  
«Наукові основи функціонування та забезпечення умов розвитку  
науково-видавничого комплексу НАН України»**

Науково-видавничий відділ природничо-технічної літератури

Редактор *В.В. Вероцька*

© Г.В. Данилович, Ю.В. Данилович, 2024  
© НВП «Видавництво “Наукова думка”  
НАН України», дизайн, 2024

# ПЕРЕДМОВА

---

Шановні читачі!

У 2019 р. у видавництві “Наукова думка” вийшла в світ монографія співробітників відділу біохімії м’язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України Ю.В. Даниловича та Г.В. Данилович “Активні форми азоту і кисню в біохімічних процесах транспорту іонів кальцію та поляризації субклітинних структур гладенького м’яза”. І ось зараз переді мною рукопис нової монографії цих авторів, яка присвячена нагальній проблемі сучасної м’язової біохімії, а саме — вивченню ролі оксиду азоту у функціонуванні гладенького м’яза. Основна увага приділена гладенькому м’язу матки — традиційному об’єкту досліджень Юрія Володимировича та Ганни Вікторівни. Книга включає в себе як аналіз, систематизацію та узагальнення сучасних даних наукової літератури з відповідного питання, так і, значною мірою, опис результатів власних оригінальних досліджень, які невпинно проводяться у відділі вже майже чверть століття.

І тут треба підкреслити, що в останні десятиріччя оксид азоту NO викликає значний інтерес з огляду на регуляторну роль у внутрішньоклітинних процесах та міжклітинних взаємодіях. Нітрогліцерин — відомий донор NO — був запропонований як лікарський засіб при нападах стенокардії ще в далекому 1879 році англійським фізиком В. Мюрреєм. Але знадобилося багато часу, аж до початку 1980-тих років, для того щоб пов’язати його фізіологічну дію саме з утворенням оксиду азоту. У свій час у класичних роботах, виконаних на стінці судин з інтактним та порушеним ендотелієм, Р. Фарчготом та Ж. Завадським був описаний EDRF — “ендотелійний фактор релаксації”. Л. Ігнаро та Ф. Мурад у період між 1986—1988 роками ідентифікували EDRF як NO. З того часу оксид азоту став однією з найбільш досліджуваних молекул у біології. Варто нагадати, що в 1992 р. NO було названо “молекулою року”, а в 1998 р. Р. Фарчгот, Л. Ігнаро та Ф. Мурад отримали Нобелівську премію в галузі фізіології та медицини за відповідні дослідження. На сьогодні інтенсивно досліджується роль NO як внутрішньоклітинного і міжклітинного месенджера, ауто- та паракринного регулятора. Доведено, NO бере участь у функціонуванні серцево-судинної системи, процесах гемостазу, зумовлює нейропередачу, імуномодуляцію та антимікробний захист, впливає на секрецію гормонів тощо. Контроль за протіканням численних метаболічних реакцій та фізіологічних процесів робить його майже універсальною сигнальною та регуляторною молекулою.

Наразі дані наукової літератури дають змогу акцентувати увагу на важливій ролі оксиду азоту в процесах, які пригнічують контрактильну відповідь матки за вагітності в умовах підвищеного рівня прогестерону. Вже з 1990-х років з'явилися дослідження щодо посилення продукції NO в тканинах матки, статевих шляхах, плаценті за вагітності. Було зроблено припущення, що NO виконує токолітичну функцію. Вміст NO та чутливість тканин матки до нього знижується перед пологамі. Існують переконливі докази, що оксид азоту забезпечує відносну незбудливість гладенького м'яза матки при виношуванні плоду та контролює процес ініціації скоротливої активності під час пологів. Донори оксиду азоту викликають релаксацію міометрія жінок і тварин як у стані функціонального спокою, так і у вагітних. Уведення донорів оксиду азоту може бути корисним для інгібування скорочення матки з метою запобігання передчасних пологів. Утім, через відносно невеликий рівень дослідницької активності порівняно, скажімо, з відповідними роботами в галузі серцево-судинної системи, вивчення як шляхів утворення NO в тканинах матки, так і молекулярних механізмів його функціонування є актуальною науковою проблемою. Слабко дослідженими є джерела оксиду азоту в матці, закономірності утворення в судинах органу та ендометрії, значення NO в регуляції фетоплацентарного кровообігу. Наразі мало з'ясованими залишаються біохімічні механізми дії оксиду азоту на внутрішньоклітинний  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаз у міометрії і, відповідно, шляхи його дії як фактора розслаблення на гладенький м'яз матки. Недостатня інформація стосовно  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних субклітинних механізмів дії NO гальмує процеси створення і використання ефективних токолітиків.

Відповідно до цього, важливими є результати систематичних досліджень авторів монографії, спрямованих на вивчення закономірностей утворення NO в окремих компартментах міоцитів матки, які беруть участь в підтриманні  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостазу, а також самі виступають мішенню дії NO. Важливим координаційним центром клітини, який зумовлює узгоджені процеси біоенергетики, метаболізму і  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналізації, є мітохондрії. За нормоксії мітохондрії можуть забезпечувати окислення гуанідинової групи L-аргініну з утворенням оксиду азоту. Останній є важливим регулятором функціональної активності самих мітохондрій. До появи наведеного в цій монографії цикла праць у науковій літературі були відсутні відомості щодо утворення NO, каталітичних і кінетичних властивостей NO-синтазної системи мітохондрій гладеньких м'язів, зокрема клітин міометрія. Дослідницькі зусилля в цьому напрямку сприятимуть кращому розумінню регуляції скоротливої активності матки, в тому числі в різні періоди її функціонування, отже, дадуть змогу перейти до створення токолітичних препаратів нового покоління на основі донорів та попередників NO, а також до розбудови фармакологічних технологій для спрямованого впливу на синтез оксиду азоту в матці. Зрозуміло, що відповідна пошукова експериментальна робота, вочевидь, має суттєве медико-соціальне значення, оскільки безпосередньо стосується поліпшення репродуктивної ситуації в Україні.

Мітохондрії зумовлюють нормальну життєдіяльність клітин, володіючи широким спектром функціональної активності, який включає в себе забезпечення клітинної енергетики, перебіг універсальних метаболічних процесів

(цикл Кребса,  $\beta$ -окислення жирних кислот, окремі реакції орнітинового циклу), генерацію активних форм кисню як сигнальних молекул, процес апоптозу тощо. Ключова роль цих органел полягає і в контролі внутрішньоклітинного  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостазу. Мітохондрії підтримують низьку фізіологічно-значущу концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозолі, вони здатні термінувати  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал і захищати клітини від  $\text{Ca}^{2+}$ -перевантаження. Ці властивості зумовлені тим, що мітохондрії є високоємнісним  $\text{Ca}^{2+}$ -депо і мають високу початкову швидкість акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$ . В основі порушення  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостазу і спричиненої цим клітинної патології може лежати дезорганізація роботи  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем, локалізованих у внутрішній мітохондрійній мембрані. Ці субклітинні структури відіграють особливо важливу роль в процесах  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналізації та  $\text{Ca}^{2+}$ -залежного скорочення гладеньких м'язів.

Однак біологічна активність самих мітохондрій має  $\text{Ca}^{2+}$ -залежний характер. Зростання концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксі активує піруватдегідрогеназний комплекс, ензими циклу трикарбонових кислот та синтез АТФ, водночас перевантаження органел катіоном індукує клітинну загибель.

Існують переконливі експериментальні докази того, що NO регулює енергетичні, метаболічні і транспортні процеси в мітохондріях. Внутрішня мітохондрійна мембрана, як і матриксні ензими, є ефективною мішенню дії нітросполук через специфічний хімічний склад, а саме високий вміст залізо-сірчаних центрів, сульфгідрильних і гемових груп тощо. Оксид азоту за фізіологічних концентрацій здатний зворотно пригнічувати активність цитохром с-оксидази, I та III комплексів електронтранспортного ланцюга, що призводить до сповільнення його роботи, зменшення інтенсивності окисного фосфорилування та споживання кисню мітохондріями. Зазначені ефекти вважаються регуляторними. Деякі дослідники розглядають оксид азоту як протекторну молекулу, що здатна захищати клітини від мітохондрійної дисфункції, спричиненої кальцієвим перевантаженням і окисним стресом. У літературі описано NO/cGMP-залежне зниження електричного потенціалу на внутрішній мітохондрійній мембрані, що впливає на інтенсивність електрофоретичного поглинання  $\text{Ca}^{2+}$ . Оксид азоту, модулюючи гомеостаз  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях, регулює активність  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних NADH-дегідрогеназ. Існують науково обґрунтовані докази, які підтверджуються результатами досліджень авторів цієї книги, що NO — важливий фактор підтримання оптимальної концентрації іонів Ca як у міоплазмі, так і в мітохондрійному матриксі.

Представлена монографія присвячена висвітленню зазначених питань в сучасній науковій літературі поряд з паралельним аналізом результатів власних експериментів авторів. Проведені дослідження є комплексними і відображають сучасні тенденції розвитку системної біології. Особливу увагу слід звернути на пошук авторами екзогенних нетоксичних сполук, які б мали змогу ефективно діяти на  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальні системи та синтез оксиду азоту в мітохондріях. Останні роки значна увага світової біологічної науки приділяється макроциклічним сполукам калікс[4]аренам. Перевагою калікс[4]аренів як можливих інструментів біохімічних досліджень та майбутніх фармпрепаратів є їхня нетоксичність і дешевизна синтезу. Аналізуючи наведені в представленій книзі результати, можна стверджувати, що окремі групи калікс[4]аренів здатні ефективно і селективно діяти на функціональну актив-



## Передмова

---

ність електронтранспортувального ланцюга, поляризацію мітохондрійної мембрани, транспорт іонів Са та біосинтез NO в мітохондріях гладенького м'язу.

Особливо хочу підкреслити, що при проведенні експериментальних досліджень автори монографії залучали численні сучасні біохімічні та фізико-хімічні експериментальні підходи: спектрофлуориметрію, протокову цитометрію, лазерну конфокальну мікроскопію, фотонну кореляційну спектрокопію, методи біохімічної кінетики тощо.

Я впевнений, що ця книга зацікавить біохіміків, біофізиків, фізіологів, фармакологів, особливо тих, які працюють у напрямі біології гладеньких м'язів. Вона, безперечно, приверне увагу як досвідчених учених, так і аспірантів та пошукувачів.

Академік НАН України, професор, доктор біологічних наук,  
завідувач відділу біохімії м'язів та заступник директора  
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

С.О. КОСТЕРІН

\* \* \*

Автори монографії щиро вдячні всім співробітникам відділу біохімії м'язів та лабораторії оптичних методів дослідження Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України й особисто керівникові цього відділу академіку НАН України, професору С.О. Костеріну за плідну співпрацю, обговорення і допомогу в аналізі та систематизації експериментального матеріалу. Окрема подяка старшим науковим співробітникам кандидату технічних наук О.Ю. Чуніхіну та кандидату хімічних наук С.О. Карахіму за велику допомогу в проведенні та аналізі результатів досліджень.

## ВСТУП

---

Оксид азоту (NO) — універсальна сигнальна і регуляторна молекула в клітинах. Важливим проявом його біологічної активності є контроль скоротливої функції гладеньких м'язів, що значною мірою зумовлює нормальну роботу внутрішніх органів, зокрема сечостатевої системи [1—5].

Результати експериментальних робіт різних років дають змогу висловити припущення стосовно значення оксиду азоту в процесах, які попереджають контрактильну відповідь на розтягнення стінок матки внаслідок росту ембріону та зменшують чутливість міометрія до утероконострикторних агентів, що має особливе значення за нормального перебігу виношування плоду. Як продукція NO, так і чутливість до нього знижуються наприкінці вагітності і передують початку пологової активності [6—10]. Донори оксиду азоту викликають релаксацію міометрія як невагітних жінок, так і тих, що мають різні строки вагітності [11]. Відповідне зниження контрактильної здатності гладеньком'язових клітин (ГМК) матки показано також у випадку окремих видів тварин, у тому числі для шурів та приматів, у різні періоди функціональної активності органу [6, 7, 12, 13]. 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  $\text{Ca}^{2+}$  лежать в основі контролю скоротливої активності гладеньких м'язів, а  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальні системи субклітинних структур, зокрема мітохондрій (МХ), є мішенню дії речовин, які модулюють контрактильну функцію міоцитів [14—18]. Здатність NO розслабляти міометрій зумовлює інтерес до вивчення біохімічних закономірностей впливу оксиду азоту на  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаз ГМК матки.

Джерелами NO в матці можуть слугувати її ендометріальна тканина [19—22] та ендотелій судин [23—25]. Ідентифіковані також нервові закінчення, які містять нейрональну NO-синтазу і забезпечують нітратергічну інервацію матки [26]. Потужним джерелом NO в міометрії, виходячи з аналізу інформації стосовно інших тканин, можуть слугувати МХ [27—32]. У літературі відсутні відомості щодо утворення NO, каталітичних і кінетичних властивостей NO-синтазної системи МХ гладеньких м'язів, зокрема, й клітин міометрія.

Серед вельми широкого спектра функцій МХ (біоенергетика, місце перебігу універсальних метаболічних процесів, джерело активних форм кисню, життя та смерть, ціла низка спеціалізованих), які зумовлюють ключову роль цих органел для нормальної життєдіяльності клітин, чільне місце посідає їх значення в підтриманні внутрішньоклітинного  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостазу [33—38]. Доведено, що МХ є високоємнісним  $\text{Ca}^{2+}$ -депо, здатні термінувати  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал,

а також підтримувати низьку фізіологічно-значущу концентрацію цього катіона в цитозолі, захищаючи клітини від  $\text{Ca}^{2+}$ -перевантаження [33, 35, 36, 39]. В основі порушення  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостазу і спричиненої цим клітинної патології може лежати дезорганізація роботи  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем, локалізованих у мембранах МХ. Особливо важливі зазначені явища для роботи м'язової тканини, оскільки її основна функція — скоротлива здатність — є  $\text{Ca}^{2+}$ -залежним процесом. Біологічна активність МХ має, значною мірою,  $\text{Ca}^{2+}$ -керований характер. Зростання концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксі МХ активує ензими циклу трикарбонових кислот та синтез АТР [40—42], водночас перевантаження органел катіоном індукує клітинну загибель [36, 43, 44]. МХ відіграють важливу роль в процесах  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналізації та  $\text{Ca}^{2+}$ -залежного скорочення гладеньких м'язів. У цій тканині вони виконують функцію високоефективного  $\text{Ca}^{2+}$ -депо внаслідок спроможності акумулювати та вивільнювати значні кількості катіона [36, 39, 45, 46].

Руйнація узгодженого функціонування  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем, які локалізовані у внутрішній мембрані мітохондрій (ВММ), може призвести до явища  $\text{Ca}^{2+}$ -перевантаження матриксу, гіперполяризації, порушення  $\text{Ca}^{2+}$ -залежного метаболізму активних форм азоту/кисню та їхньої гіперпродукції. Спричинений цими процесами нітрозативний/оксидативний стрес має наслідком, за умови недостатнього функціонування захисних систем, дисфункцію МХ. Остання проявляється у порушенні функціонування електронтранспортувального ланцюга (ЕТЛ), гіпер/деполяризації (незворотній) внутрішньої мембрани, руйнації осмотичного балансу між матриксом МХ та цитоплазмою тощо [28, 38, 47—51]. Можливо, зазначені явища супроводжують контрактільну дисфункцію гладенького м'яза за патологічних станів різного генезу. Порушення скоротливої активності гладеньких м'язів окремі автори відносять до категорії “мітохондрійних хвороб” [47, 52—56].

Протягом останніх двадцяти 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 тільних залишків, залізо-сірчаних центрів, гемових груп, а також наявність супероксид-аніона. Зокрема, оксид азоту за фізіологічних концентрацій здатний зворотно пригнічувати активність цитохром с-оксидази, що призводить до зниження інтенсивності роботи ЕТЛ, окисного фосфорилування та споживання кисню МХ. Оксид азоту або його похідні також взаємодіють і гальмують роботу I та III комплексів дихального ланцюга [30, 51, 53, 57]. Деякі дослідники розглядають оксид азоту у фізіологічних концентраціях (наномольних) як протекторну молекулу, що здатна захищати органили від дисфункції, спричиненої гіперполяризацією внутрішньої мембрани, надлишковою продукцією активних форм кисню (АФК) і окисним стресом [51, 53, 58—61]. Результатами сучасних досліджень підтверджується, що з NO пов'язана важлива ланка підтримання оптимальної концентрації іонів Са як у міоплазмі, так і в мітохондрійному матриксі [29, 40, 50, 51, 59, 62].

Результатом багаторічних досліджень співробітників відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України стали переконливі докази існування в МХ міометрія принаймні двох систем транспорту  $\text{Ca}^{2+}$ , локалізованих у внутрішній мембрані:  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортеру — електрофоретичної низько-

афінної і високоємнісної системи енергозалежної акумуляції іонів Са та  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника [45, 63, 64]. Перша має особливе значення для ретикулярно-мітохондрійної  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональної одиниці, забезпечуючи акумуляцію катіона у локальних високих концентраціях, які створюються біля сарко(ендо)-плазматичного ретикулума.  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  обмінник, молекулярною структурою якого у ссавців, згідно з окремими результатами, є протеїн LETM [65–67], більш афінний до  $\text{Ca}^{2+}$  зворотним транспортером, що спроможний забезпечувати як вивільнення, так і акумуляцію катіона, залежно від діючих концентрацій  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{H}^+$ .

З огляду на зазначене вище, важливим є дослідження біохімічних властивостей оксиду азоту як можливого ендogenous специфічного регулятора  $\text{Ca}^{2+}$ -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'яза матки проблема можливої біологічної активності NO в МХ не вирішена.

У зв'язку із першочерговим значенням іонів Са для функціонування МХ, зокрема їхньої біоенергетики і синтезу NO, актуальним стає пошук екзогенних нетоксичних сполук, які б мали змогу ефективно діяти на  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальні системи цих субклітинних структур. Останні роки значна увага світової біологічної спільноти приділена супрамолекулярним сполукам каліксаренам. В Україні існує всесвітньо відома школа у галузі хімії макроциклічних сполук, зокрема калікс[4]аренів, яка працює під керівництвом академіка НАН України, професора В.І. Кальченка (Інститут органічної хімії НАН України). Калікс[4]арени — макроциклічні олігомери, побудовані з фенольних фрагментів, що поєднані метиленовими містками [68]. Калікс[4]арени володіють противірусною, антитромботичною, антибактеріальною дією [69–71]. Багато калікс[4]аренів здатні виступати інгібіторами ферментів [69, 72, 73]. Роботами відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України під керівництвом академіка НАН України С.О. Костеріна було доведено, що вибрані калікс[4]арени, які були синтезовані та охарактеризовані методами ядерно-магнітного резонансу та інфрачервоної спектроскопії у відділі хімії макроциклічних сполук Інституту органічної хімії НАН України, специфічно впливають на катіонотранспортувальні системи субклітинних структур гладенького м'яза матки. Зокрема, калікс[4]арен С-90 високоафінно інгібує активність транспортувальної  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРази [74], а калікс[4]арени С-97, С-99 та С-107 —  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРази [75, 76]. Макроцикл С-91 викликає посилення енергозалежної акумуляції іонів Са в МХ у пермеабілізованих міоцитах. Проте С-91 не впливає на пасивне вивільнення іонів Са з цих органел [77]. Показано, що халконовмісні калікс[4]арени С-136 та С-137 спричиняють гіперполяризацію ВММ у міоцитах матки [78, 79]. Доведено також, що калікс[4]арени модулюють контрактильну активність міометрія [80–82]. Аналізуючи літературні дані, можна припустити, що за невисоких (мікромолярних) концентрацій окремі групи калікс[4]аренів здатні впливати на функціональну активність ЕТЛ, поляризацію мітохондрійної мембрани, транспорт іонів Са та біосинтез NO в МХ гладенького м'яза. Перевагою ка-

лікс[4]аренів як можливих інструментів біохімічних досліджень є їхня нетоксичність і дешевизна синтезу.

Отже, постає низка актуальних питань, які стосуються загальнобіологічної проблеми регуляції контрактильної активності гладенького м'яза. До них належать синтез 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<sup>2+</sup>-гомеостазу та загалом функціональної активності МХ, зокрема їхньої NO-синтазної здатності, який доречно проводити серед представників калікс[4]аренів. До нагальних питань слід віднести з'ясування впливу оксиду азоту на концентрацію Ca<sup>2+</sup> в міоплазмі клітин міометрія і дослідження можливих мембранних та іонних механізмів цього впливу. Вирішення зазначених завдань є необхідним для розуміння ролі МХ та оксиду азоту в регуляції Ca<sup>2+</sup>-гомеостазу в ГМК і, відповідно, їхньої скоротливої здатності. Воно є основою пошуку селективних екзогенних модуляторів транспорту Ca<sup>2+</sup>, біоенергетики та біосинтезу NO в МХ. Вирішення цих питань є важливою умовою створення фармпрепаратів, які б мали змогу ефективно регулювати активність внутрішніх органів, зокрема контрактильну здатність матки.

## МЕТАБОЛІЗМ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНА АКТИВНІСТЬ ОКСИДУ АЗОТУ

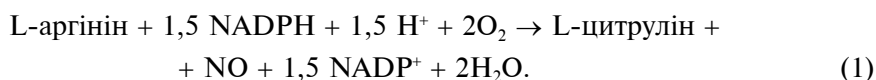
### 1.1. Біосинтез оксиду азоту

В останні десятиріччя оксид азоту викликає все більший інтерес з огляду на його регуляторну роль у внутрішньоклітинних процесах та міжклітинних взаємодіях. З моменту відкриття (початок 1980-х років) Р. Фарчготом та Ж. Завадським “як ендотеліального фактора релаксації (EDRF)”, а також публікації праць Л. Ігнаро та Ф. Мурада (1986—1988 рр.), які ідентифікували EDRF саме як NO, оксид азоту став однією з найбільш досліджуваних молекул у галузі біомедичних наук. NO було названо “молекулою року” в 1992 році, а в 1998 році Р. Фарчгот, Л. Ігнаро та Ф. Мурад одержали Нобелівську премію в галузі фізіології та медицини [1—4]. З того часу відомості стосовно кола функцій, які виконує оксид азоту, значно розширились. Як внутрішньо- та міжклітинний месенджер NO бере участь у клітинному сигналюванні, регуляції експресії генів та перебігу метаболічних реакцій, що сприяє підтриманню гомеостазу на різних рівнях функціонування організму. Серед широкого спектра його фізіологічних властивостей можна виокремити такі: регуляція тонуусу і проникності кровоносних судин, зниження агрегації тромбоцитів та їхньої адгезії до судинної стінки, нейропередача, імуномодуляція та антимікробний захист, модуляція секреції гормонів тощо [5—10].

Оксид азоту — структурно проста низькомолекулярна амфіфільна вільнорадикальна сполука. NO в біосистемах має відносно короткий час існування (до 5 с залежно від мікрооточення) та може мігрувати на невеликі відстані від місць генерації, що визначається швидкістю його окислення [5, 11—14]. Це обмеження дифузії передбачає локальну дію NO в окремих клітинних компартментах завдяки солокалізації джерел NO з протеїнами-мішенями в мультипротеїновий комплекс сигналосом [5, 13].

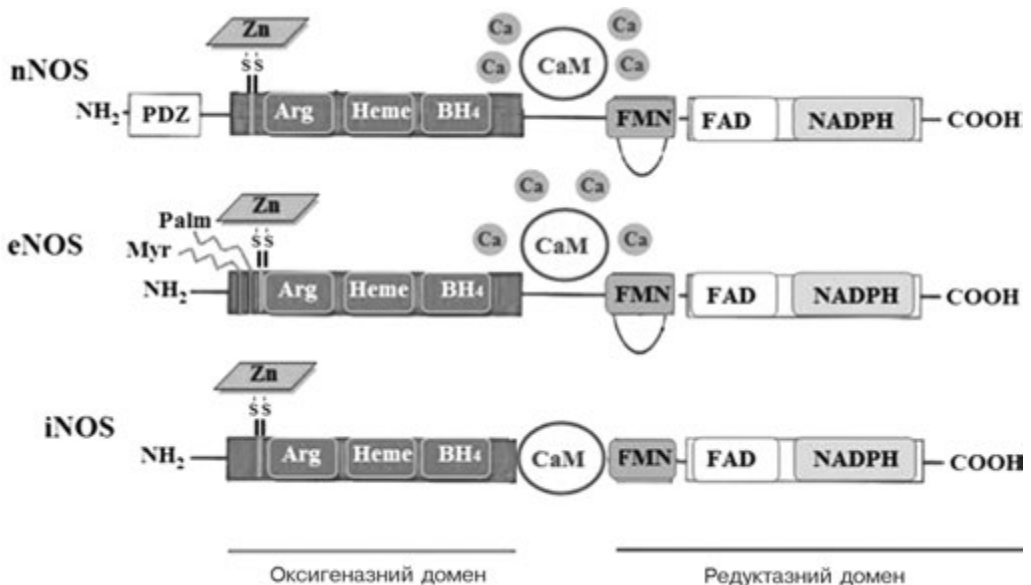
Відповідно до концепції “циклу оксиду азоту” у клітинах тварин наявні два шляхи утворення оксиду азоту — NO-синтазний та нітрит/нітрат-редуктазний [15].

Синтез NO в клітині за нормоксії забезпечує родина ізоформ NO-синтази (NOS, E.C. 1.14.13.39), які за участю NADPH як джерела електронів та наявності O<sub>2</sub> здійснюють п’ятиелектронне двостадійне окислення гуанідинової групи L-аргініну з утворенням NO та L-цитруліну [5, 11]. Сумарне рівняння реакції, що каталізує NOS, має такий вигляд:



За умови обмеження доступності кофакторів та/або субстрату NO-синтаза виявляє оксидазну активність, продуктом якої є супероксид-аніон ( $O_2^-$ ), що надалі перетворюється на пероксид водню ( $H_2O_2$ ). Окислення NO у водних аерованих розчинах за фізіологічних умов призводить до появи нітрит-аніона ( $NO_2^-$ ) та нітрат-аніона ( $NO_3^-$ ) [7, 16].

Існує три ізоформи NOS, які різняться структурою та функціями. Всі ізоформи функціональні у вигляді гомодимеру. Ендотеліальна NOS (eNOS/NOSIII, маса субодиниці 134 кДа) та нейрональна NOS (nNOS/NOSI, маса канонічної субодиниці 160 кДа) є конститутивно експресованими  $Ca^{2+}$ -залежними ензимами; існують відомості, що eNOS може активуватися і за низьких концентрацій  $Ca^{2+}$  в середовищі. Індуцибельна NOS (iNOS/NOSII, маса субодиниці 130 кДа) експресується в більшості клітин лише після індукції прозапальними цитокінами, бактеріальними ліпополісахаридами,  $\gamma$ -опроміненням, а її активність не залежить від внутрішньоклітинного  $Ca^{2+}$  (активується за нефізіологічно низької концентрації катіона близько 40 нМ), оскільки кальмодулін (CaM) міцно зв'язаний у відповідному сайті завдяки специфічній амінокислотній послідовності останнього [11, 14, 17–19]. Хоча три основні різновиди NOS характеризуються високою гомологією, кожна ізоформа демонструє дещо відмінні структурні особливості, які відповідають її специфічній функції *in vivo* (рис. 1.1) [17–19]. Назви ізоформ (ендотеліальна, нейрональна) пішли від першоджерела ідентифікації і значною мірою не відображають реального тканинного поширення.



**Рис. 1.1.** Структура доменів nNOS, eNOS та iNOS. Також показано аутоінгібувальну петлю у FMN-ділянці nNOS та eNOS. Сайти зв'язування: Arg — L-аргінін, Heme — гем, BH<sub>4</sub> — тетрагідробіоптерін, FMN — флавінаденінмононуклеотид, FAD — флавінаденіндинуклеотид, NADPH — нікотинаміддинуклеотидфосфат, Myr — міристинова кислота, Palm — пальмітинова кислота

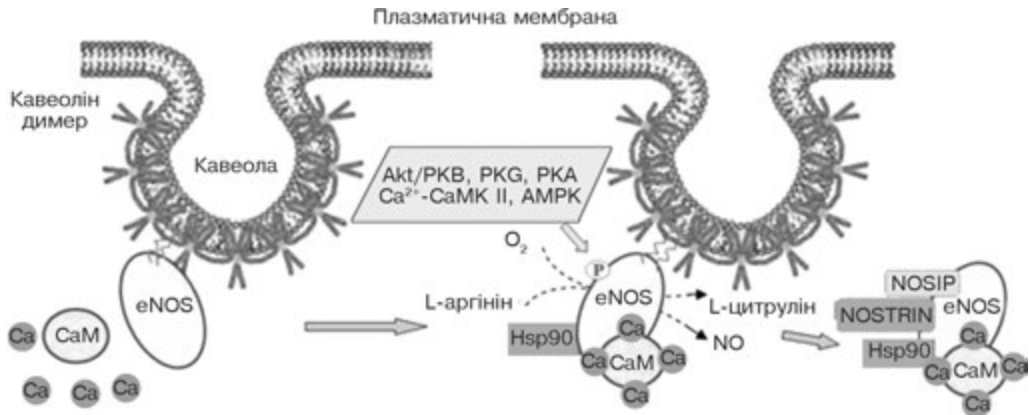
*nNOS* виявляють в центральних та периферійних нейронах, нітратергічних закінченнях, які іннервують гладенькі м'язи, зокрема матки (міометрія), а також в епітеліальних клітинах легень, скелетному м'язі, шлунку, нирках, підшлунковій залозі [17, 20]. Ензим є висококонсервативним, 93 % амінокислотного складу в тканинах людини і шурів ідентичні [21]. Існує декілька сплайс-варіантів *nNOS*: *nNOS $\alpha$* , *nNOS $\beta$* , *nNOS $\gamma$* , *nNOS $\mu$* , *nNOS-2* [11, 22]. Найрозповсюдженіші в тканинах *nNOS $\alpha$*  та *nNOS $\mu$*  на N-кінці містять PDZ-домен (акронім від *post drosophila zonula*, послідовність з 220 амінокислотних залишків), який може прямо взаємодіяти з PDZ-мотивами інших протеїнів, що визначає субклітинну локалізацію та активність ензиму [23–25]. Наявність PDZ-домену специфічна саме для ізоформи *nNOS* [26]. У м'язах експресується сплайс-варіант *nNOS $\mu$* . Ця форма ензиму включає унікальну (34 амінокислотних залишка) вставку між CaM- та FMN-зв'язувальними сайтами [5, 11, 22, 23, 27, 28]. Ca<sup>2+</sup>-транспортувальна АТРаза ПМ (ізоформа 4b, яка міститься в ГМК) у С-кінцевій ділянці зв'язується з PDZ-доменом *nNOS $\mu$*  і виступає негативним регулятором синтезу NO [29]. Показана також взаємодія *nNOS* з цитозольною частиною адренергічних та глутаматергічних (NMDA-підтип) рецепторів [5, 11, 26],  $\alpha$ -синтрофін-дистроглікановим комплексом сарколеми скелетного м'яза, фосфофруктокіназою тощо [5, 24, 26]. У кардіоміоцитах *nNOS* може асоціюватись з ріанодиновим рецептором та ксантинооксидазою на поверхні саркоплазматичного ретикулума (СР) [5].

У N-кінцевій ділянці *nNOS* виявлено сайт зв'язування для 89-амінокислотного протеїну PIN (протеїновий інгібітор NOS). PIN пригнічує NOS, блокуючи її димеризацію. Він також гальмує NADPH-оксидазну активність всіх трьох ізоформ. PIN ідентифікований як легкий ланцюг міозину та динеїну, що може вказувати на його альтернативну роль транспортного протеїну для *nNOS* в аксонах [11, 26, 30, 31].

До найголовніших функцій *nNOS* належать модуляція пластичності синапсів у центральній нервовій системі, центральна регуляція кров'яного тиску, тонуусу гладеньких м'язів внутрішніх органів, зокрема генерацією NO в нітратергічних нервових закінченнях, контроль за кровопостачанням волокон скелетного м'яза [17, 21, 22, 26, 32].

*eNOS* уперше ідентифікована в ендотеліоцитах, контролює кров'яний тиск та має вазопротекторні, гемостатичні та антиатерогенні ефекти. Ця ізоформа знайдена в тканинах матки, легень та трахеї, кардіоміоцитах, тромбоцитах, нейронах мозку, синцитіотрофобластах та епітеліальних клітинах нирки [20]. Експресія *eNOS* зростає за умов гіпоксії, що опосередковується транскрипційним фактором HIF, а також в експериментальних моделях загоєння ран, постішемічних станах та у випадку збільшення напруги зсуву на судинну стінку, де залучений транскрипційний фактор KLF2 (Kruppel-like factor, відомий також як фактор каліцтва). Збільшення судинного тиску може зумовлювати зростання експресії *eNOS* також за участю NF- $\kappa$ B [19, 33]. Ендотеліальна ізоформа мембранозв'язана, локалізована в caveолах, але знайдена також в апараті Гольджі та зовнішній мітохондрійній мембрані (ЗММ) [6, 34, 35]. Caveолярна асоціація *eNOS* забезпечується ацилюванням [36]. Спочатку до N-кінцевого залишку гліцину котрансляційно і незворотно приєднується міристинова кислота. Міристильована *eNOS* спрямовується в апарат Гольджі, де





**Рис. 1.2.** Регуляція активності eNOS у кавеолі. Міристилювання та пальмітилювання (показані двома кривими) забезпечують прикріплення eNOS до плазматичної мембрани. Взаємодія з кавеоліном інгібує активність eNOS. Hsp90 (heat shock protein 90) та комплекс Ca<sup>2+</sup>-CaM активують її. Akt/PKB, PKG, PKA та інші кінрази, через фосфорилування, також активують eNOS. Взаємодія eNOS з протеїнами NOSIP (NOS interacting protein) та NOSTRIN (NOS traffic inducer) призводить до її транслокації від кавеол до внутрішньоклітинних мембран, у результаті чого активність eNOS зменшується

відбувається пальмітилювання N-кінцевого цистеїнового залишку (див. рис. 1.1) [11, 19, 20, 22]. Взаємодія зі структурно-організуючим компонентом кавеол протеїном кавеоліном стерично блокує взаємодію з CaM і інгібує eNOS. Активація eNOS відбувається внаслідок утворення комплексу Ca<sup>2+</sup>-CaM і витіснення кавеоліну з відповідного сайту зв'язування, фосфорилування залишку Ser-1177 та дефосфорилування Thr-495 у складі ензиму, взаємодії з протеїном-шапероном Hsp90, попередньо фосфорильованим за тирозином тощо [6, 11, 17, 20, 26]. З роками розширюється і уточнюється список залишків серину/треоніну/тирозиону різних доменів, а також протеїнкіназ/протеїнфосфатаз, які чинять регуляторний вплив на eNOS (рис. 1.2) [6, 26]. Зокрема, активаторне фосфорилування забезпечується різними родинами кіназ залежно від характеру регуляторного впливу: Akt/PKB, PKA, PKG, AMPK, Ca<sup>2+</sup>-CaMK II тощо [6, 11, 14, 17, 37, 38]. Цей процес ініціюється інсуліном, фактором росту судинного ендотелію (VEGF), ацетилхоліном, брадікініном, естрогенами, надмірним тиском на ендотелій за гіпертензії тощо [5–7, 13, 17, 26, 35]. Агоністами eNOS виступають нейротрансмітери — АТФ, ацетилхолін та гістамін, регуляторні ліпіди, кініни [5, 6, 13, 14, 17, 35]. Нещодавно виявлено ще один модулятор eNOS та клітинної активності NO — тромбоспондин 1 (TSP1), який з'являється в позаклітинному середовищі за тканинного ураження і зв'язується з рецептором плазмалеми CD47, що спричиняє гальмування передачі сигналу від рецепторів ацетилхоліну, VEGF, інгібування eNOS та розчинної гуанілатциклази (pГЦ) [6, 39–41].

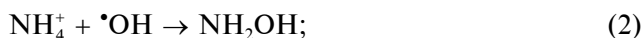
Солокалізація eNOS, катіонного транспортера L-аргініну (CAT1) та кавеоліну-1 в ендотеліоцитах сприяє доступу субстрату до eNOS та оптимізує біосинтез NO [5, 17, 26, 42, 43].

*iNOS* уперше виявлена в макрофагах, ідентифікована також у лімфоцитах, нейтрофілах, еозинофілах, тканинах матки тощо. Вона є розчинним цитозольним протеїном та генерує NO у великих кількостях (мкМ), що чинить цитотоксичну дію на мікроорганізми та пухлинні клітини [17, 20, 21]. Завдяки високому афінитету NO до протеїн-зв'язаного заліза він ефективно взаємодіє із залізо-сірчаними кластерами комплексів ЕТЛ МХ, цис-аконітазою та рибонуклеотидредуктазою, інгібуючи ці ключові ензими біоенергетики та проліферації в клітинах-мішенях [21, 26]. Продукований макрофагами в надвисоких концентраціях оксид азоту спричиняє також одноланцюгові розриви та фрагментацію ДНК [17, 21, 44]. Експресія *iNOS* ініціюється такими прозапальними цитокінами як TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , бактеріальними ліпополісахаридами та короткохвильовим опроміненням. Контролюється цей процес сигнальними шляхами, пов'язаними з NF- $\kappa$ B та JAK/STATs [6, 13, 17, 20, 21, 45–48].

Експресія конститутивних ізоформ NOS чітко регулюється залежно від фізіологічної ситуації. Для них характерна базальна продукція NO, а час активації цих ензимів вимірюється секундами, хоча для експресії й наступної активації *iNOS* потрібні години [7, 17].

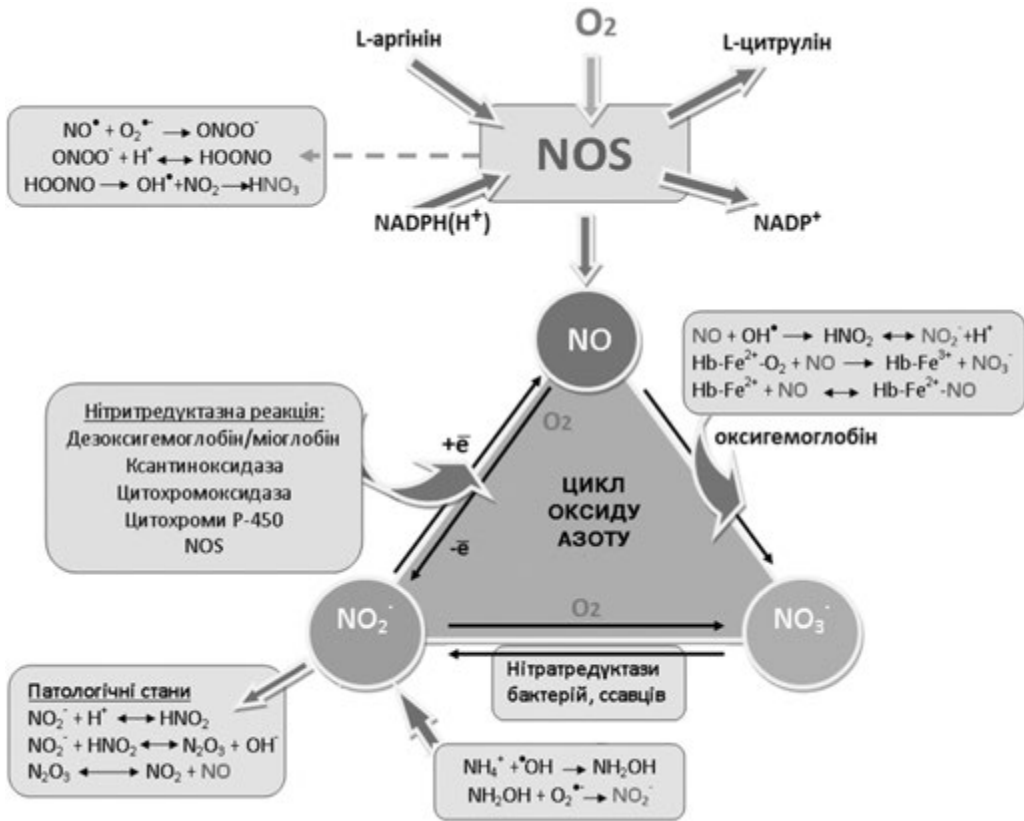
У макрофагах описані як індукцибельна, так і конститутивна NOS [49, 50]. Ендотеліальні клітини, маючи конститутивну eNOS, активно експресують *iNOS* за дії прозапальних цитокінів [6, 14].

Існування *неензиматичного механізму* утворення нітросполук показано в нервовій, печінковій тканинах та лімфоцитах. У них демонструється окислення NH $_4^+$  з утворенням нітритів/нітратів, проміжним продуктом при цьому може бути гідроксиламін. Зокрема, в стимульованих лімфоцитах за участю АФК протікають реакції:



Радикали для цих процесів можуть генеруватися в ензимній системі ксантин/ксантинооксидаза. В печінковій та інших тканинах значні кількості АФК здатні утворюватись за рахунок мікросомального окислення. В мутантних клітинах із відсутністю систем генерації кисневих радикалів окислення NH $_4^+$  до NO $_2^-$  / NO $_3^-$  не відбувається [51, 52].

Нітрит-аніон (NO $_2^-$ ) та нітрат-аніон (NO $_3^-$ ) розглядаються як стабільні метаболіти NO [7, 14, 53]. Як було зазначено вище, основне ендогенне джерело нітритів та нітратів у ссавців — це ензиматичний шлях окислення L-аргініну в водних аерованих розчинах з утворенням NO та інших активних форм азоту (АФА), який є конститутивно активним у багатьох типах клітин. NO швидко окислюється в крові та інших тканинах з утворенням NO $_2^-$  та NO $_3^-$ . Рівень нітрату в плазмі знаходиться в межах 20–40 мкМ, у той час як рівень нітриту значно нижчий (50–300 нМ). У різних тканинах концентрація NO $_2^-$  може сягати 1–20 мкМ. За запалення (сепсис, важкий гастроентерит) рівень NO $_2^-$  та NO $_3^-$  значно зростає завдяки масованій індукції *iNOS* [7, 54–56].



**Рис. 1.3.** Цикл оксиду азоту

Наявність металоензимів прискорює окислення NO. Оксид азоту, що синтезується eNOS, інтенсивно окислюється до нітриту за присутності церулоплазміна, а до нітрату — за присутності оксигемоглобіна. В багатьох тканинах демонструється можливість зворотного перетворення  $\text{NO}_2^-$  на NO. Цей процес ініціюється за умов ацидоза та за наявності відновлених форм гем-вмісних протеїнів, що характерно для ішемічних станів [16, 37]. Важливу роль у редукції  $\text{NO}_2^-$  в крові має гемоглобін (Hb) у дезоксиформі, оскільки зв'язаний кисень перешкоджає взаємодії з  $\text{NO}_2^-$  гемового заліза і відновленню нітрит-аніона в NO. В серцевому і скелетному м'язах нітритредуктазну активність має дезоксиміоглобін [14, 57—59]. Відновлення  $\text{NO}_2^-$  може відбуватися також у МХ і мікросомах. У МХ нітритредуктазну активність виявляє цитохромоксидаза, а в мікросомах — цитохром P-450 [14]. За гіпоксії перелічені гем-вмісні протеїни мають здатність відновлювати  $\text{NO}_2^-$  до NO. Слід додати, що редуктазною активністю за зниженого парціального тиску кисню володіють також NOS та ксантиноксидаза [53, 54, 60]. Існування такого механізму

## 1.2. Структура, каталітична активність та локалізація NOS

синтезу оксиду азоту дало змогу сформулювати концепцію “циклу оксиду азоту” (рис. 1.3). При цьому NO-синтазна компонента та неензиматичне окислення  $\text{NH}_4^+$  забезпечують ендogenous синтез NO,  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  за присутності кисню. В умовах гіпоксії, спричиненої функціональним навантаженням або порушенням кровопостачання тканини (її ішемізація), парціальний тиск  $\text{O}_2$  падає і зазначені механізми пригнічуються. Водночас дефіцит кисню активує редуктазну компоненту циклу [7, 15, 55, 56, 61].

Зважаючи на метаболічну спорідненість NO та  $\text{NO}_2^-$  завдяки існуванню “циклу оксиду азоту”, вивчення функціональної активності нітрит-аніонів в організмі є фундаментальною дослідницькою проблемою. Доведено, що ендogenous нітрит регулює численні фізіологічні процеси і відіграє роль у патогенезі [56, 61]. Він є відносно стабільним депо біоактивного NO. При гіпоксичних станах, коли знижується функція NOS, відновлення нітриту може сприяти збереженню пулу NO для підтримання процесів сигналювання і регуляції протягом гіпоксичного стану і спричиненого ним метаболічного стресу [60, 61]. За умови зменшення локального рівня кисню в тканинах спостерігається NO-залежна модуляція передачі клітинного сигналу, змінюється просвіт судин та ефективність мітохондрійного дихання, що знижує інтенсивність розвитку ішемічних пошкоджень [15, 62].

## 1.2. Структура, каталітична активність та локалізація NOS

*Структура та каталітична активність NOS.* Умовою ефективного функціонування NOS є доступність субстрату L-аргініну та кофакторів. Ензим NOS активний у формі димеру, побудованого з двох ідентичних субодиниць, які структурно та функціонально поділяються на два основних домені: С-термінальний редуктазний та N-термінальний оксигеназний. Редуктазний домен має високу гомологію із цитохром P450-редуктазою і містить сайти зв'язування NADPH, FAD та FMN (по одній молекулі); оксигеназний домен взаємодіє з простетичною гемовою групою, кофактором 6(α)-5,6,7,8-тетрагідробіоптеріном ( $\text{BH}_4$ ) та субстратом L-аргініном. Між цими двома структурами знаходиться CaM-зв'язувальний домен (див. рис. 1.1 та 1.4) [11, 18, 19, 26, 27].

Синтез NO складається з двох послідовних монооксигеназних реакцій окислення L-аргініну, витрачається 1,5 моля NADPH та 2 моля  $\text{O}_2$  для утворення 1 моля L-цитруліну. Цей процес включає початкове гідроксилювання L-аргініну з утворенням  $\text{N}^G$ -гідрокси-L-аргініну, який також виступає субстратом NOS, наступне його окислення супроводжується утворенням L-цитруліну та NO [11, 17, 18].

Транспорт електронів здійснюється від редуктазного домену однієї субодиниці на оксигеназний домен іншої (рис. 1.4). Мономери усіх ізоформ не здатні зв'язувати  $\text{BH}_4$  та L-аргінін і не каталізують утворення L-цитруліну/NO. Ізольований редуктазний домен спроможний переносити електрони від NADPH через флавінові кільця на штучні субстрати цитохром c та фериціанід. Ця здатність зберігається і в мономері pNOS, вказуючи на те, що тран-



та L-аргініну [18, 19, 65, 67].  $\text{BH}_4$  транспортує електрони в оксигеназному домені, забезпечуючи оптимальний для окислення L-аргініну редокс-стан заліза гемової простетичної групи. В цій реакції утворюється тригідробіоптерін-радикал, який потім відновлюється флавінами редуцтазного домену. Коли доступність  $\text{BH}_4$  стає обмеженою, перенесення електрона від флавінів стає не спряженим з окисленням L-аргініну, комплекс  $-\text{Fe}^{2+}-\text{O}-\text{O}^-$  гема дисоціює, і в оксигеназному домені продукується  $\text{O}_2^-$  [11, 67, 68, 69]. Інтенсивність утворення NO тісно корелює з внутрішньоклітинною концентрацією  $\text{BH}_4$ , тому що лише за високого вмісту  $\text{BH}_4$  NOS функціонує винятково як NO-синтаза. Запропоновано модель, відповідно до якої при концентраціях  $\text{BH}_4$  менших за  $10^{-9}$  М продукується  $\text{O}_2^-$ , від  $10^{-9}$  до  $10^{-6}$  М утворюється перокси-нітрил ( $\text{ONOO}^-$ ), а вище  $10^{-6}$  М синтезується NO [19, 70, 71]. Конститутивні NOS за насичувальних концентрацій L-аргініну та субнасичувальних  $\text{BH}_4$  одночасно продукують NO у  $\text{BH}_4$ -вмісній та  $\text{O}_2^-$  у  $\text{BH}_4$ -вільній субодиницях. Взаємодіючи, NO та  $\text{O}_2^-$  утворюють  $\text{ONOO}^-$ , вміст якого буде також визначатися рівнем відновленого глутатіону та активністю супероксидисмутази. Отже, в умовах нестачі  $\text{BH}_4$  NOS здатна продукувати  $\text{O}_2^-$  або  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Ця особливість має суттєво значення за ендотеліної дисфункції; зокрема атерогенез супроводжується зменшенням вмісту відновленого  $\text{BH}_4$  за дії окислених ліпопротеїдів, наслідком чого є зниження інтенсивності утворення NO та посилена продукція інших АФК [5, 14, 19, 44, 67, 72]. Крім того,  $\text{BH}_4$  може слугувати пасткою для  $\text{O}_2^-$ . Саме тому терапію  $\text{BH}_4$  розглядають як перспективний напрямок відновлення біодоступності NO в судинній стінці [14, 44, 67, 72–74]. Внутрішньоклітинний рівень  $\text{BH}_4$  регулюється активністю його біосинтезу *de novo* і контролюється GTP-циклогідролазою [17, 67, 68, 73, 75].

За низьких концентрацій або відсутності L-аргініну конститутивні NOS, насамперед nNOS, також каталізують одноелектронне відновлення кисню з утворенням  $\text{O}_2^-$  та  $\text{H}_2\text{O}_2$ , що може бути пояснено відсутністю спряження між транспортом електронів в ензимі та окисленням гуанідинової групи L-аргініну [11, 14, 19].

Однією з головних каталітичних відмінностей між ізоформами NOS є інтенсивність окислення NADPH. За нестачі субстрату nNOS продовжує окислювати NADPH з високою швидкістю і переносити електрони на гем, у той час як eNOS та iNOS роблять це значно повільніше. Річ у тім, що залізо гема nNOS має значно більший окисно-відновний потенціал, ніж, наприклад, у iNOS; остання повинна спершу зв'язати субстрат та  $\text{BH}_4$  для досягнення такого самого значення цього показника [19].

Залишки цистеїну є важливими для функціонування NOS. Зворотне S-нітрозилювання продуктом реакції супроводжується зниженням ензиматичної активності. Два висококонсервативних залишки цистеїну редуцтазного домену NOS можуть бути також об'єктом S-глутатіонування, що за умов оксидативного стресу зворотно знижує активність ензиму і збільшує генерацію  $\text{O}_2^-$  в редуцтазному домені [5, 17, 22, 39].

Субстрат *NOS*, *L*-аргінін, синтезується в циклі сечовини, а також надходить в клітини з плазми крові [5]. В плазмалемі ідентифіковані транспортери для катіонних амінокислот CAT1, CAT2a (ГМК судин) та CAT2b (кардіоміоцити), які переносять *L*-аргінін в цитозоль [5, 21, 76–78]. Значення  $K_m$  за *L*-аргініном для транспортерів сягає 100–150 мкМ, що відповідає його концентрації в плазмі [43, 79].

*L*-аргінін — катіонна амінокислота, яка бере участь у низці фізіологічних процесів і є необхідним попередником синтезу *L*-орнітину, проліну, поліамінів, агматину, креатину, протеїнів [80, 81]. *L*-аргінін метаболізується декількома ензимами: аргінін:гліцин амідинотрансферазою, аргініндекарбоксилазою, *NOS*, аргіназою I та II [5, 82, 83]. Концентрація *L*-аргініну в плазмі крові ссавців та людини становить 100–200 мкМ, навіть за патологічних станів вона не знижується нижче 60 мкМ [17], а в цитозолі в нормі його концентрація знаходиться в межах 0,1–1 мМ [43, 79, 82]. Проте значення константи Міхаеліса  $K_m$  за *L*-аргініном у випадку *eNOS* становить близько 3 мкМ [17, 84]. Ендотеліальні клітини взагалі не залежать від надходження *L*-аргініну з позаклітинного середовища, оскільки можуть ефективно перетворювати *L*-цитрулін на *L*-аргінін, а також отримувати *L*-аргінін шляхом протеолізу. Згідно з наведеними даними, доступність субстрату не є лімітуючим фактором для функціонування *NOS* за нормальних умов. Утім надлишок позаклітинного *L*-аргініну активує *NOS* або стимулює синтез *NO*, не зважаючи на присутність внутрішньоклітинного *L*-аргініну в концентраціях, які передбачають підтримання максимальної активності *NOS*, базуючись на значеннях  $K_m$ . Це явище отримало назву “аргініновий парадокс” [14, 21, 43, 82, 85], який, окрім вище викладеного, полягає у складності пояснення позитивного терапевтичного ефекту введення *L*-аргініну пацієнтам із серцево-судинними патологіями. Причину зазначеного феномена шукають у факті конкуренції за субстрат аргінази, а також у суттєвому зростанні вмісту ендогенних інгібіторів *NOS* (передусім асиметричного диметиларгініну) за згаданих захворювань [5, 17, 37, 43, 80–82].

Аргіназа гідролізує *L*-аргінін до орнітину та сечовини. В клітинах ссавців ідентифіковано два типи аргіназ, які кодуються різними генами. Аргіназа I локалізована в цитоплазмі, в той час як аргіназа II є мітохондрійним ензимом [5, 83, 86]. Проміжний продукт синтезу *NO*  $N^G$ -гідрокси-*L*-аргінін є конкурентним оборотним інгібітором аргінази [80, 82, 83, 85, 87, 88]. Спорідненість аргінази до *L*-аргініну на три порядки нижча ( $K_m = 1–5$  мМ), ніж для *NOS* ( $K_m = 2–20$  мкМ), але максимальна початкова швидкість реакції ( $V_{max}$ ) у 1000 разів вища для аргінази, ніж для *NOS* [43, 80–82, 85]. Ендотеліальні клітини експресують аргіназу, яка може конкурувати з *eNOS* за *L*-аргінін, у разі її високої активності можливе субстратне “голодування” *eNOS* [43, 81, 87].

Показано підвищення експресії аргінази з наступним послабленням синтезу *NO* при кардіоваскулярних хворобах, водночас фармакологічне інгібування аргінази поліпшує продукцію *NO*. Крім того, аргіназа може гальмувати генерацію *NO* *iNOS* шляхом утворення сечовини [80, 82].

Іншою причиною “аргінінового парадокса” може бути зростання вмісту ендогенного інгібітора *NOS* асиметричного диметиларгініну — продукту ензиматичної деградації протеїнів, що містять метильовані залишки аргініну.

Його концентрація в плазмі збільшується при ендотеліній дисфункції та серцево-судинних захворюваннях [5, 13, 14, 17, 76, 83] і може бути наслідком підвищеного вмісту ангіотензину II у таких пацієнтів [89].

*Компартменталізація* в клітині ізоформ NO-синтаз та біохімічні особливості дії оксиду азоту в різних компартментах яскраво ілюструються у випадку кардіоміоцитів [90]. Молекулярною основою реалізації функціональної активності NO в цих клітинах є специфічна взаємодія eNOS та nNOS відповідно з кавеолами та CP. У кардіоміоцитах eNOS локалізована в кавеолах сарколеми та Т-трубочках, де асоційована з характерним для міоцитів структурним протеїном кавеоліном-3 [6, 11, 37, 74, 91]. Солокалізація eNOS з  $\beta$ -адренергічними рецепторами та  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами L-типу призводить до  $\text{Ca}^{2+}$ -залежної eNOS-генерованої продукції NO, який залишається в межах відстані дифузії від його молекулярних мішеней. Пригнічуючи, ймовірно прямим нітрозилуванням, активність  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів L-типу в кавеолах [26], оксид азоту обмежує надходження  $\text{Ca}^{2+}$  до міоплазми, захищаючи кардіоміоцити від кальцієвого перенавантаження. Таке розташування eNOS дає змогу NO інгібувати  $\beta$ -адренергічну стимуляцію та інотропні ефекти катехоламінів. nNOS імуопреципітується з ріанодиновими рецепторами (RyR) —  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами CP [5, 6, 26, 37, 92]. Генерований цією ізоформою NO активує, можливо теж безпосереднім нітрозилуванням, канали вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з ретикулума, що стимулює взаємодію актину та міозину і регулює циклічну скорочувальну діяльність міокарда (CP узгоджено акумулює і вивільнює  $\text{Ca}^{2+}$  в безпосередній близькості від міофіламентів). Локалізована в міоплазмі iNOS експресується в міокарді транзійтно у відповідь на стрес або за таких патофізіологічних умов, як ішемія-реперфузія, сепсис, серцева недостатність. Продукований цією ізоформою NO також стимулює вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з CP через ріанодинчутливі канали [5, 6, 37, 93].

Крім специфічної просторової локалізації в клітинах різних ізоформ NOS з визначеними функціями описаний *феномен спрямованого і регульованого транспорту NO* в судинній стінці — так звані “міоендотелійні щільні контакти (myoendothelial gap junction)”. Синтезований в ендотелії оксид азоту дифундує до гладеньком’язового синцитію, активуючи розчинну гуанілатциклазу в міоцитах та S-нітрозилуючи протеїни-мішені. Виявилось, що цей процес паракринної регуляції є контрольованим, а між двома тканинами розташовується міоендотелійний сполучний “коридор”. Він полегшує взаємодію між ендотелієм і гладеньким м’язом у дрібних судинах [5, 6, 39, 90]. У “коридорі” солокалізовані eNOS, рГЦ та інші протеїни; існування такої структури лімітує дифузійну NO і знижує інтенсивність дії АФК як його скавенджерів. Міоендотелійне сполучення містить значну кількість гемоглобіну, який високоафінно взаємодіє з оксидом азоту. Оксигемоглобін у реакції з NO утворює метгемоглобін та нітрат-аніон. Метгемоглобін відновлюється цитохромом  $b_5$ -редуктазою. Цей механізм здатний обмежувати біодоступність NO в судинній стінці [5, 6, 39, 90, 94]. Важливою структурою, локалізованою в міоендотелійному сполученні, є хеміканали конексинової природи: Cx37, Cx40 та Cx43 [95, 96]. За дії катехоламінів на клітини гладенького м’яза судин у них зростає концентрація інозитол-1,4,5,-трисфосфата ( $\text{IP}_3$ ), який за градієнтом концентрації дифундує через ці структури до ендотеліоциту. S-нітрозилування



оксидом азоту активує зазначені канали.  $IP_3$  спричиняє зростання концентрації  $Ca^{2+}$  в ендотелійних клітинах, викликаючи активацію  $Ca^{2+}$ -залежної S-нітрозоглутатіонредуктази, наслідком чого є денітрозилювання та закриття конексिनних хеміканалів. Поряд з цим зазначені механізми забезпечують  $Ca^{2+}$ -залежний синтез NO в ендотелії у відповідь на стимуляцію  $\alpha 1$ -адренорецепторів у ГМК [39, 94].

### **1.3. Вибрані біохімічні механізми, які лежать в основі функціональної активності NO**

Напрямок дії оксиду азоту на біохімічні процеси є високою мірою концентраційно-залежним. Це наслідок як високої хімічної активності низки нітросполук, так і залежності ефектів від хімічного мікрооточення, насамперед одночасної генерації АФК. Наприклад, залежно від концентрації NO виявляє анти- або прооксидантну дію. За низьких концентрацій оксид азоту чинить антиоксидантні ефекти, напряду взаємодіючи з ліпопероксидними радикалами, тим самим обриваючи вільнорадикальний ланцюг окислення ліпідів. Навпаки, NO у високих концентраціях, опосередковано через утворення АФА (при реакції NO з молекулярним киснем) або АФК, виявляє прооксидантні властивості. Дослідження показують, що порогова концентрація NO, яка визначає його прямий або опосередкований вплив, знаходиться близько 1 мкМ [97]. Локальні концентрації NO суттєво змінні і визначаються компартменталізацією джерел його утворення.

Основними механізмами, за якими NO здійснює сигнальні та регуляторні функції, вважають такі [53, 98]:

1) *активація розчинної гуанілатциклази* шляхом зв'язування молекулярного NO з її простетичною гемовою групою (при цьому формується  $Fe^{2+}$ -нітрозильний комплекс), що веде до утворення cGMP, який у свою чергу стимулює PKG. Необхідна концентрація NO для активації рГЦ знаходиться в межах 80—250 нМ [5, 13, 35, 99]. Термінація сигналу в ключовому для реалізації функціональної активності оксиду азоту напрямку  $NO \rightarrow$  рГЦ  $\rightarrow$  cGMP  $\rightarrow$  PKG  $\rightarrow$  протеїни-мішені забезпечується родиною фосфодіестераз (PDE 5, 6, 9) [6, 7, 100];

2) *S-нітрозилювання*: активні форми азоту —  $NO^+$ ,  $NO^-$ ,  $N_2O_3$ ,  $NO_2$  — оборотно нітрозилюють тиольні групи цистеїнів протеїнів-мішеней; існує точка зору, що в серцево-судинній системі більшість ефектів NO опосередковується саме через S-нітрозилювання і є cGMP-незалежними [5, 7, 13, 14, 35, 37, 99, 101, 102];

3) *нітрування пероксинітрином*, який утворюється внаслідок дифузійно-контрольованої реакції між NO та  $O_2^-$ , залишків тирозину і триптофану у протеїнах, що веде до залучення у процес передачі сигналу мітоген-активованих протеїнових кіназ, ізоформ PKC, транскрипційного фактора NF- $\kappa$ B тощо [5, 7, 13, 37, 47, 102].

Оксид азоту забезпечує або впливає на перебіг численних регуляторних процесів у клітині та володіє захисними функціями. Залежно від концентрації він регулює транскрипцію генів та трансляцію мРНК (зокрема, змінюючи ак-

### 1.3. Вибрані біохімічні механізми, які лежать в основі функціональної активності NO

тивність факторів транскрипції), зумовлює та модулює посттрансляційні модифікації протеїнів (на кшталт нітрозилування, ADP-рибозилування), має цитостатичні та цитотоксичні властивості [39, 97]. Шляхом S-нітрозилування функціонально важливих цистеїнових залишків транспортних протеїнів він забезпечує зниження концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в міоплазмі ГМК внутрішніх органів та судин, модулюючи активність потенціалзалежних  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів,  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних  $\text{K}^{+}$ -каналів плазматичної мембрани (ПМ),  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФаз плазмалеми та СР [5, 14]. На органному рівні NO виступає ключовим гравцем у багатьох фізіологічних процесах: регулює тонус і проникність кровоносних судин, знижує агрегацію та адгезію до судинної стінки формених елементів крові, бере участь у функціонуванні нервової, ендокринної та імунної систем [5—7, 13, 20, 44, 103].

Наразі з'ясовано, що NO модулює енергетичні, метаболічні і транспортні процеси в МХ. ВММ є ефективною мішенню дії нітросполук, оскільки у складі локалізованих у ній ензимів високим є вміст тіольних залишків, залізо-сірчаних центрів, гемових груп, а сама мембрана є місцем утворення  $\text{O}_2^-$  [97, 104, 105]. Оксид азоту здатний концентраційно-залежно регулювати активність комплексів ЕТЛ МХ. За низьких наномолярних концентрацій NO зворотно пригнічує цитохром с-оксидазу, що обмежує інтенсивність дихання й окисне фосфорилування та розглядається як адаптивна фізіологічна відповідь [13, 90, 93]. Описано NO/cGMP-залежне зниження електричного потенціалу на ВММ, що впливає на інтенсивність електрофоретичного поглинання  $\text{Ca}^{2+}$  [13]. Оксид азоту, модулюючи гомеостаз  $\text{Ca}^{2+}$  в МХ, регулює активність  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних NADH-дегідрогеназ [97, 106]. Більше того, NO контролює експресію та активність кількох ензимів циклу Кребса (наприклад аконітази) [28, 98]. Оксид азоту стимулює біогенез МХ у тканинах різних типів [13, 22, 107].

Надлишкова продукція NO на фоні посилення утворення  $\text{O}_2^-$  в МХ супроводжується генерацією значних кількостей  $\text{ONOO}^-$ , пошкодженням компонентів ЕТЛ, незворотною деполяризацією органел і розвитком мітохондріальної дисфункції, яка може бути причиною апоптозу. А саму реакцію NO з  $\text{O}_2^-$  та утворення  $\text{ONOO}^-$  розглядають як важливий фактор зниження біодоступності і фізіологічної активності оксиду азоту в МХ [13, 37, 44].

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

Гіперпродукція NO клітиною, особливо за підвищеної концентрації АФК, призвела б до утворення цілого спектра токсичних форм азоту і кисню, тому повинні існувати ефективні механізми, які знижують вміст NO. До них відносяться процеси інгібування активності NOS продуктами реакції, нітрозилування мембранних і цитозольних тіольних груп, зв'язування NO із залізо-сірчаними центрами і гем-вмісними протеїнами, його окислення у  $\text{NO}_2^-$  /  $\text{NO}_3^-$  тощо [5, 13, 76, 82, 98]. Збільшення рівня cGMP у клітині за дії NO призводить до припинення передачі сигналу по  $\text{Ca}^{2+}$ -фосфатидилнозитидному шляху. Зниження синтезу NO досягається також фосфорилуванням NOS, передусім ізоформами РКС та MAPK (ERK — extracellular responsive kinase, зокрема) [13, 21].

## **1.4. Утворення та фізіологічне значення оксиду азоту в матці**

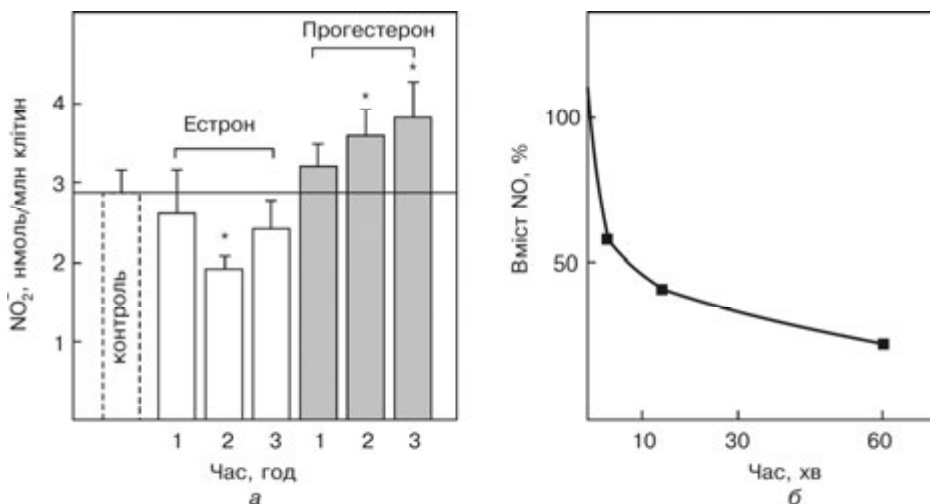
*Нейрогуморальна регуляція скоротливої активності матки.* З відкриттям оксиду азоту як фактора релаксації судинної стінки розпочалися дослідження його ефектів в інших типах гладеньких м'язів. Відповідний інтерес до міометрія пов'язаний з його унікальною функцією в жіночому організмі, а саме з виношуванням плоду під час вагітності та забезпеченням своєчасних пологів. За статистичними даними в США передчасними пологами закінчуються одна з 8 вагітностей. Диспропорційна висока смертність плодів (близько 20 000 щорічно) спостерігається серед афроамериканців. Більше ніж у половині цих випадків передчасні пологи є спонтанними, а їхні причини незрозумілими [108].

Регуляція функції міометрія протягом вагітності, пологів та в післяпологовий період знаходиться в центрі досліджень репродуктивних наук. Ця комплексна проблема передбачає з'ясування клітинних та молекулярних механізмів скоротливої активності гладенького м'яза матки. Функціонування міометрія знаходиться значною мірою під контролем гормонів. Серед них стероїдні гормони, прогестерон та естрогени відіграють провідну роль у процесах зростання розмірів матки при збільшенні ембріону, підтримання її відносно незбудливості за вагітності (прогестеронова блокада) та підготовки і в ході пологів [109, 110]. Окрім стероїдних гормонів, є ціла низка факторів, які регулюють контрактильну функцію міометрія. Сприяють скороченню гладенького м'яза матки окситоцин, окремі простагландини (особливо простагландин  $F_{2\alpha}$ ), ендотелін, фактор активації тромбоцитів, а його розслабленню — кортикотропін-релізінг фактор, простациклін (простагландин  $I_2$ ), оксид азоту тощо. Загально відомо, що саме окситоцин генерує скорочення міометрія під час пологової активності [111—115]. Матка — міогенний орган, який може підтримувати контрактильну здатність за відсутності безпосередніх нейрогуморальних впливів. Хоча пряма іннервація міоцитів матки не описана, нейромедіатори, а саме норадреналін від симпатичних та ацетилхолін від парасимпатичних волокон, виділяються в проміжки між м'язовими пучками.

Кровоносні судини матки іннервуються симпатичними, парасимпатичними і сенсорними нейронами. За парасимпатичної стимуляції активуються мускаринові холінергічні рецептори, наслідком чого є вазодилатація. За симпатичної іннервації активуються  $\alpha$ -адренергічні рецептори, стимуляція яких спричинює вазоконстрикцію [116, 117]. У стані вагітності в кровоносних судинах матки посилюється симпатична нейропередача, парасимпатична, навпаки, послаблюється [53].

Функціональна активність міометрія та його судин знаходиться під контролем сенсорних нейронів, які виділяють ряд нейромодуляторів: кальцитонін ген-споріднений пептид (CGRP), речовина P (SP), вазоактивний кишковий поліпептид (VIP), нейропептид Y (NPY) та нейрокініни. Зв'язуючись з відповідними рецепторами гладеньком'язових клітин, CGRP виявляє релаксувальну дію на судинну стінку; циркулюючий рівень CGRP та чутливість до нього зростає під час вагітності. Припускають, що SP стимулює скорочення міометрія та відіграє суттєву роль в дозріванні шийки матки. Судинорозширюваль-

#### 1.4. Утворення та фізіологічне значення оксиду азоту в матці



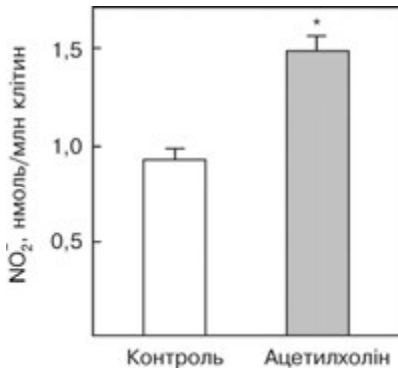
**Рис. 1.5.** Вплив 10 нМ естроу, прогестерону (а) та 10 нМ окситоцину (б) на продукування оксиду азоту стромальними клітинами ендометрія в позаклітинне середовище. \* — позначено статистично вірогідні зміни ( $p \leq 0,05$ ),  $M \pm m$ ,  $n = 5$ ; крива (б) — результат типового дослідження

ні властивості має VIP, який також здатний знижувати контрактильну активність міометрія. Втім, основна його роль полягає в протизапальній дії і регуляції імунної відповіді протягом всієї вагітності [116].

Джерела утворення та фізіологічне значення оксиду азоту в матці. На моделі вагітних щурів було показано, що матка в цей період генерує велику кількість нітритів та нітратів і може перетворювати L-аргінін на L-цитрулін, що передбачає роль оксиду азоту як регулятора функціонування органа за вагітності, зокрема його скоротливої активності [118, 119]. В жіночій матці наявна NOS, яка може також впливати на фундаментальні фізіологічні процеси релаксації судин та інгібування агрегації тромбоцитів, що є необхідним для нормального функціонування ендометрія [119–121]. Місцеве розширення судин у матці відіграє важливу роль на початку імплантації та плацентування.

Наведено докази того, що NO здатний продукуватися ендометрієм, ендотелієм артерій, плацентарними синцитіотрофобластами та макрофагами в різні функціональні періоди [122–125]. Припускають, що саме ендометрій є важливим регулятором скоротливості міометрія аналогічно взаємодії між ендотелієм та гладеньком'язовим синцитієм судин [126].

Нами підтверджена можливість продукування NO ендометрієм, продемонстровано, що прогестерон та ацетилхолін стимулюють цей процес, а функціональний антагоніст прогестерону утероконстрикторний пептид окситоцин пригнічує утворення оксиду азоту (рис. 1.5, 1.6) [127–129]. У цих дослідженнях використовували стромальні клітини ендометрія з матки невагітних свиней. Суспензію стромальних клітин після механічного відокремлення ендометріальної і міометріальної тканини одержували за методом, описаним раніше [130]. Досліди проводили в фізіологічному середовищі при 37 °С, концентра-



**Рис. 1.6.** Вплив 1 мкМ ацетилхоліну протягом 1 год на продукування оксиду азоту стромальними клітинами ендометрія в позаклітинне середовище.  $M \pm m$ ,  $n = 5$ , \* — зміни вірогідні відносно контролю,  $p \leq 0,05$

ція позаклітинного  $\text{Ca}^{2+}$  становила 1 мМ. Зміни інтенсивності утворення оксиду азоту оцінювали за вмістом  $\text{NO}_2^-$ , який визначали колориметрією за допомогою реактива Гріса методом Гріна [131] у модифікації (захищена патентом України) [132, 133].

У судинах та різних відділах ендометрія ідентифікували окремі ізоформи NO-синтази. У невагітних жінок у кровоносних судинах, залозистому епітелії та стромальних клітинах ендометрія було виявлено NOS-подібний протеїн. У тканинах матки різного терміну вагітності ідентифікована eNOS. Втім, ензим не знайдено в гладенькому м'язі матки [120, 134]. В ендометрії жінок iNOS локалізована в залозистому епітелії, а також у децидуальних стромальних клітинах. Останнє може свідчити на користь того, що NO бере участь в ініціації та контролі менструальної кровотечі, вірогідно інгібуючи агрегацію тромбоцитів в ендометрії. Оксид азоту, що продукується ендометрієм, може пригнічувати скоротливу активність міометрія невагітних жінок [135].

У матці тварин також ідентифіковано різні ізоформи NOS. Зокрема, дві ізоформи NOS виявлено в залозистому епітелії ендометрія та міометрії матки свиней. Активності iNOS та eNOS зростають у другій половині вагітності і знижуються після пологів. Водночас збільшується експресія субодиниць рГЦ у залозистому епітелії ендометрія, його стромальних клітинах та міометрії. Цей результат свідчить про залучення NO/cGMP сигнального шляху протягом вагітності у свиней [136].

Синтез NO, який досліджено в матці вагітних щурів на різних строках вагітності та після пологів, також забезпечується eNOS та iNOS. Найвищий вміст NOS був на 13 день вагітності з подальшим зниженням, а найнижча експресія спостерігалася одразу після пологів [137]. Дослідження показують, що iNOS є основною ізоформою, яка присутня в репродуктивних органах щурів, а її регуляція під час вагітності різниться між маткою, шийкою матки та плацентою. Синтез iNOS високий у вагітній матці і зменшується безпосередньо перед пологам, що корелює зі зростанням рівня окситоцину та експресії його рецепторів [126]. Протилежні зміни спостерігаються в шийці матки щурів. У плаценті вміст цієї ізоформи є високим під час вагітності, але зниження її експресії починається раніше, ніж у матці. Відповідно до результатів щодо змін експресії різних ізоформ NOS, висунуто припущення, що iNOS відповідає за великі кількості оксиду азоту, які генеруються в матці та плаценті за вагітності, водночас як eNOS бере участь у процесі вазодилатації в цей період [109]. Це підтверджується дослідженнями, в яких застосування  $\text{N}^G$ -нітро-L-аргінін метилового ефіру (L-NAME,  $\text{N}^G$ -nitro-L-arginine methyl ester), інгібітор конститутивних NOS, більш селективний відносно eNOS) у

вагітних щурів призводило до підвищення артеріального тиску та зменшення вмісту метаболітів NO в сечі (нітритів та нітратів), на відміну від уведення аміногуанідину (більш специфічного інгібітора iNOS), який знижує продукцію NO в сечі без впливу на артеріальний тиск [109, 121, 139]. Експресія та регуляція NOS знаходяться під впливом прогестерона [109].

Показано негативний вплив застосування інгібіторів NOS на перебіг вагітності. За пригнічення NOS інгібітором L-NAME спостерігається ініціювання передчасних пологів у мишей. З метою їхнього запобігання застосовували прогестерон, який сприяє експресії NOS і відповідному синтезу NO, що супроводжується зменшенням скоротливої активності матки [140].

За вагітності відбувається адаптація систем кровообігу матері та плода. Стан матково-плацентарного кровообігу прямо залежить від функціонування системи NO. Зниження рівня NO в крові вагітних може призводити до виникнення дисбалансу у фетоплацентарному колі кровообігу, що супроводжується розвитком плацентарної недостатності. Вона спричиняє хронічне кисневе голодування і гіпоксію плода, наслідком чого є виникнення синдрому затримки внутрішньоутробного розвитку та порушення стану новонародженого. Поряд з цим уведення L-аргініну призводить до позитивних змін у фетоплацентарному кровообігу у пацієток з передчасними пологами [141].

Доволі поширеною причиною переривання вагітності є антифосфоліпідний синдром — аутоімунне захворювання різної етіології, яке супроводжується продукуванням антитіл проти власних фосфоліпідів та асоційованих з ними протеїнів. Фосфоліпідний синдром протікає на фоні гіперпродукції прозапальних цитокінів. Показано [142] підвищення рівня прозапального цитокіну TNF- $\alpha$  у сироватці крові жінок, які страждають від викиднів. У вагітних жінок із нормальним перебігом вагітності рівень антизапального цитокіну IL-6 у сироватці крові був високим, тоді як прозапальних INF- $\gamma$  і TNF- $\alpha$  — низьким. Можливо така дія прозапальних цитокінів пов'язана із надлишковим зростанням експресії iNOS та гіперпродукцією активних форм азоту і кисню в тканинах матки. На моделі антифосфоліпідного синдрому продемонстровано неоднозначну дію NO на скоротливу функцію міометрія під час вагітності. NO спричинює релаксацію за помірної концентрації, але суттєве зниження його утворення призводить до спонтанних абортів та передчасних пологів. Гіперпродукція активних форм азоту і кисню, опосередкована iNOS, збільшує скоротливу активність міометрія, внаслідок чого ризик невиношування вагітності зростає [143, 144].

Застосування відомого донора NO S-нітросо-N-ацетил-Dl-пеніциламіну (SNAP) запобігає інгібувальному впливу антифосфоліпідних антитіл на eNOS [145]. Активатор eNOS гідроксихлорохін [146, 147] зменшує прокоагулянтний стан та покращує судинну функцію при антифосфоліпідному синдромі. Зниження частоти передчасних пологів за цієї патології відбувається під впливом морфіну, що пояснюють його здатністю стимулювати вивільнення NO [144]. Застосування L-NAME нівелює цей ефект, що підтверджує роль системи NO у розвитку антифосфоліпідного синдрому.

Джерелом NO може бути плацента: у васкулярному ендотелії та синцитіотрофобластах плаценти ідентифіковано дві ізоформи — iNOS та eNOS. Припускають, що плацентарний NO може виступати паракринним регулятором

скорочення міометрія [148, 149]. Ідентифіковані нервові закінчення, які містять nNOS і забезпечують нітратергічну іннервацію матки [135, 150—152].

Отже, встановлено факт утворення оксиду азоту в тканинах матки, її судинах та нервових закінченнях, у плаценті. Синтез NO здійснюється передусім iNOS та eNOS і суттєво залежить від типу тканини та функціонального стану органу, що вказує на його можливе фізіологічне значення.

Як було зазначено вище, конститутивні ізоформи NOS структурно-функціонально пов'язані передусім з ПМ та EP/EC, водночас індукційна NO-синтаза є переважно розчинним ферментом. Наразі мітохондрійна локалізація NOS (mtNOS) надійно показана в окремих органах та тканинах ссавців [37, 93, 104, 106]. Експериментальні дані вказують на те, що mtNOS постійно експресується в МХ, є мембранозв'язаним ферментом і за біохімічними властивостями нагадує конститутивні NOS, зокрема нейрональну ізоформу [44].

Синтез NO конститутивними ферментами є високою мірою  $\text{Ca}^{2+}$ -залежним процесом. Водночас МХ відіграють провідну роль в процесах внутрішньоклітинної  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналізації внаслідок їхньої спроможності накопичувати та вивільняти значні кількості іонів Са. Завдяки ефективній акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$ , зокрема в місцях контакту EP/ПМ та МХ, де локальна концентрація катіона може досягати десятків і навіть сотень мкМ, останні здатні модулювати  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал, зокрема його амплітуду та часові характеристики [153—157]. Проте здатність МХ накопичувати  $\text{Ca}^{2+}$  є визначальною для функціонування клітини в цілому, оскільки продукція ними АТФ залежить від концентрації іонів Са в матриксі, що зумовлено специфікою роботи відповідних дегідрогеназ; поряд з цим,  $\text{Ca}^{2+}$ -перевантаження МХ є тригером відкриття пори перехідної проникності (РТР, permeability transition pore) і розвитку апоптозу [158—160]. За низьких наномолярних концентрацій оксид азоту регулює гомеостаз  $\text{Ca}^{2+}$  в МХ і, відповідно,  $\text{Ca}^{2+}$ -залежні процеси в них. Відомо твердження, що МХ є первинними клітинними мішенями NO [104]. З нашої точки зору, сучасною проблемою біохімії МХ є розуміння взаємозв'язку:  $\text{Ca}^{2+}$ —оксид азоту—функціональна активність органел. Вирішення цієї проблеми реалізує принцип системного підходу до вивчення мітохондріону.

На момент підготовки рукопису монографії в доступній нам науковій літературі були відсутні відомості щодо утворення NO, каталітичних і кінетичних властивостей NO-синтази в МХ гладеньких м'язів, зокрема клітин міометрія.

## УТВОРЕННЯ ОКСИДУ АЗОТУ В МІТОХОНДРІЯХ

### 2.1. Особливості синтезу оксиду азоту в мітохондріях за присутності кисню

Біохімія і молекулярна фізіологія МХ, яка об'єднує процеси споживання кисню, окисного фосфорилування, катаболізму ліпідів, синтезу гему, підтримання гомеостазу  $\text{Ca}^{2+}$ , продукції АФК та апоптозу, значною мірою контролюється оксидом азоту [1–7].

Перші публікації результатів щодо власної продукції NO МХ почали з'являтися приблизно з 1995 року. У 1997 році P. Ghafourifar та C. Richter продемонстрували в інтактних енергізованих сукцинатом МХ печінки щурів існування функціонально-активної мітохондрійної NOS: за присутності L-аргініну ензим утворював NO і L-цитрулін та був  $\text{Ca}^{2+}$ -залежним та конститутивно активним. Функціонування mtNOS було асоційовано з ВММ, залежало від інтенсивності мітохондрійного дихання та контролювалось мембранним потенціалом; аналоги L-аргініну  $\text{N}^G$ -монометил-L-аргінін ( $\text{N}^G$ -monomethyl-L-arginine, L-NMMA) та  $\text{N}^G$ -нітро-L-аргінін ( $\text{N}^G$ -nitro-L-arginine, NA) інгібували ензим [8]. У 1998 році C. Giulivi та A. Voveris із співавторами [9] показали продукцію NO в МХ печінки щура за допомогою незалежних методів електронно-парамагнітного резонансу, використовуючи техніку спінових пасток (похідні дітіокарбаматів), та двохвильової спектروفотометрії окисленого Hb. Було визначено уявну  $K_m$  за L-аргініном, яка становила 5–7 мкМ, що близьке до такої для nNOS [9–11]. Автори зробили припущення, що ендегенно синтезований NO може впливати на енергетику органел, споживання  $\text{O}_2$  та утворення вільних радикалів кисню. Синтез NO МХ був продемонстрований на пермеабілізованих дигітоніном міоцитах шлуночка серця E. Dedkova та L. Blatter [12].

Солюбілізована і очищена методом афінної хроматографії mtNOS печінки синтезувала 250–350 нмоль NO/мг протеїну за хв,  $K_m$  за L-аргініном становила 3 мкМ, ензим інгібувався L-NMMA. Детальний аналіз амінокислотного складу mtNOS виявив, що будова протеїну відповідає первинній послідовності nNOS [13].

Подібність структури mtNOS та nNOS доводять також результати щодо інгібування ензиматичної активності: відносно специфічний блокатор nNOS (4*S*)-*N*-(4-аміно-5[аміноетил]амінопентил)-*N'*-нітрогуанідин, а також антагоніст CaM сполука W-7 гальмували утворення NO в МХ кардіоміоцитів, у той час як інгібітори eNOS-1-*N*5-(1-іміноетил)орнітин та iNOS-*N*-(3-амінометил)бензилацетамідин • 2HCl (сполука 1400W) були неефективними [12].



Припускають, що мітохондрійна NO-синтаза є сплайс-варіантом повноланцюгової nNOS $\alpha$ , відмінним від вже ідентифікованих, з молекулярною масою 144 кДа. Має дві посттрансляційні модифікації: міристилювання в N-кінцевому регіоні за Thr або Ser та фосфорилування C-кінця ензиму за залишком Ser-1412 [3, 10, 14—18]. Імунолокалізація mtNOS з мітохондрійними маркерами (сукцинатдегідрогеназа, цитохром с-оксидаза) додатково доводить її розміщення саме у ВММ. Міристилювання mtNOS є необхідним для спрямування ензиму в МХ та/або закорення його в мембрану. Фосфорилування C-кінцевого залишку Ser регулює активність mtNOS [16, 18—20].

Методами імуоелектронної мікроскопії та імуопреципітації показана взаємодія mtNOS через PDZ-домен з субодиницею V<sub>a</sub> цитохром с-оксидази, яка є залежною від Ca<sup>2+</sup>. Інші дослідження виявили, що і протеїни комплексу I ЕТЛ імуопреципітують з внутрішньомітохондрійною NOS [6, 17—19, 21, 22]. Активність mtNOS максимальна за оптимальної роботи ЕТЛ, зокрема комплексу I, який є можливим джерелом електронів для функціонування ензиму; інактивація комплексу I знижує активність mtNOS [23—25]. Вивільнення NO експоненційно зростає зі збільшенням електричного потенціалу внутрішньої мембрани, а залежність продукції NO від внутрішньомітохондрійного рН (у діапазоні 5,5—8,5) має дзвоноподібний характер з максимумом при рН 7,4 [11, 19, 26]. Водночас існує точка зору, що активність mtNOS регулюється саме електричною, а не протонною складовою мембранного потенціалу на ВММ [27—28].

Наведено дані, що енергізовані МХ здатні продукувати NO за відсутності у середовищі інкубації NADPH, L-аргініну та екзогенного Ca<sup>2+</sup> [11, 16, 19]. Внутрішньомітохондрійна концентрація NADPH становить 1,0—1,8 мМ, що значно перевищує відповідне значення константи активації  $K_{\text{NADPH}}$  для mtNOS (0,1—1 мкМ) [8]. Концентрація L-аргініну в матриксі МХ відповідає 150—310 мкМ і суттєво вища за значення  $K_m$  для L-аргініну (5 мкМ для МХ печінки [9], 35—37 мкМ — кардіоміоцитів та скелетного м'яза діафрагми [29]). Отже, концентрації L-аргініну, Ca<sup>2+</sup> та NADPH не є швидкість-лімітуючими факторами синтезу NO в МХ [19, 30, 31]. У ВММ був ідентифікований транспортер основних амінокислот (SLC25A29), який функціонує як уніпортер та забезпечує доступ L-аргініну до мітохондрійних аргінази II та NOS ( $K_m$  за L-аргініном становить 0,42 мМ) [30, 32]. Нестача L-аргініну в матриксі та відповідне зниження активності mtNOS може бути наслідком посилення роботи аргінази II в МХ, яка конкурує з ензимом за субстрат [33—35]. Ще одним поясненням цього може бути високий вміст ендогенних інгібіторів NOS на кшталт асиметричного диметиларгініну [36, 37].

Уявна  $K_m$  за O<sub>2</sub> для mtNOS кардіоміоцитів становить 40 мкМ. Таким чином, за фізіологічних умов, коли концентрація O<sub>2</sub> знаходиться в межах 5—20 мкМ, активність mtNOS не досягає максимальних значень [21]. В умовах стимулювання акумуляції Ca<sup>2+</sup> органелами, але нестачі L-аргініну або ВН<sub>4</sub>, спостерігали значно менше утворення NO з одночасним зростанням продукції АФК [12].

Отже, конститутивна mtNOS зумовлює можливість ендогенного біосинтезу оксиду азоту в енергізованих МХ за наявності O<sub>2</sub>. PDZ-домен забезпечує взаємодію цього ензиму з комплексом I та/або IV дихального ланцюга. Ендо-

генне утворення NO MX залежить від їхнього метаболічного стану, електричного потенціалу на ВММ і є  $\text{Ca}^{2+}$ -залежним процесом. Можливо, оксид азоту забезпечує тонкі регуляторні реципрокні взаємодії між активністю mtNOS та внутрішньомітохондрійним  $\text{Ca}^{2+}$ , рН, L-аргініном,  $\text{O}_2$  та редокс-станом MX [7, 12, 19, 38].

Присутність mtNOS була доведена імуногістохімічними методами для окремих тканин: печінки [13], серця [14, 15, 12], мозку [39, 40], нирок [41], скелетного м'яза (діафрагми) [29] та тимусу [42]. Наявність mtNOS у ГМК, зокрема міометрія, в доступній нам літературі не обговорювалась. Біохімічні властивості mtNOS у ГМК матки не вивчалися.

### **2.2. Синтез оксиду азоту в мітохондріях міометрія та біохімічні характеристики цього процесу**

Як функціональна активність, так і загибель MX та клітини в цілому значною мірою залежать від рівня продукції NO [43, 44]. Це вказує на важливість ідентифікації процесу синтезу NO в MX міоцитів. Суттєвими для верифікації джерел утворення NO в ГМК матки є проблеми методичного характеру, що пов'язано із коротким часом існування і високою реакційною здатністю оксиду азоту.

Використання сучасного флуоресцентного зонда DAF-FM (diaminofluorescein-FM) або його діацетильованого похідного DAF-FM-DA (diaminofluorescein-FM diacetate) дає змогу безпосередньо швидко і надійно зареєструвати продукцію NO за низьких його концентрацій (2–5 нМ) у клітинах, а метод лазерної сканувальної конфокальної мікроскопії — візуалізувати його утворення та довести зв'язок синтезу NO саме з MX, використовуючи специфічні щодо органел зонди [45–49].

Нашим завданням було продемонструвати можливість утворення оксиду азоту в MX клітин гладенького м'яза матки та вивчити каталітичні і кінетичні характеристики мітохондрійної NO-синтазної реакції.

### **Докази наявності оксиду азоту в мітохондріях міоцитів матки та можливості утворення NO в цих органелах**

У досліджах використовувались статевозрілі невагітні нелінійні щури віком біля 2 місяців, середня маса тіла 200 г, маса матки 350–600 мг. Тварин вводили в стан наркозу витримуванням у 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 із використанням колагенази (тип IA) і соєвого інгібітора трипсину за допомогою методу Молларда [50], який застосовували в деякій модифікації [51]. Дослідження з міоцитами проводили в фізіологічному розчині Хенкса такого складу (мМ): 136,9 NaCl, 5,36 KCl, 0,44  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,26  $\text{NaHCO}_3$ , 0,26  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,03 або 1,26  $\text{CaCl}_2$ , 0,4  $\text{MgCl}_2$ , 0,4  $\text{MgSO}_4$ , 5,5 глюкоза, 10 Hepes (рН 7,4; 37 °С).

Просторовий розподіл флуоресцентних барвників у клітині вивчали на лазерному сканувальному конфокальному мікроскопі LSM 510 META ("CarlZeiss", Німеччина). Дослідження виконували у режимі Multi Track. Вивчення кінетики розподілу флуоресцентних барвників у клітині проводили у режимі Time Series, а для кількісного аналізу застосовували функцію ROI (Region Of Interest), яка дає змогу отримувати графік залежності інтенсивності флуоресценції від часу, усереднену по виділеній області. 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 24 °C. Неприкріплені міоцити відмивали розчином Хенкса, іммобілізовані клітини в 100 мкл розчину Хенкса обробляли відповідними барвниками і виконували подальші дослідження. Флуоресценцію Hoechst 33342 (50 нМ) збуджували лазером за довжини хвилі 405 нм, сигнал реєстрували, використовуючи світлофільтр BP 420-480. Mito-Tracker Orange CM-H<sub>2</sub>TMRos (200 нМ) збуджували за довжини хвилі 543 нм, реєстрацію сигналу здійснювали із використанням світлофільтру BP 560-615. DAF-FM (10 мкМ) збуджували за довжини хвилі 488 нм, сигнал реєстрували із використанням світлофільтру BP 505-530.

Флуоресцентний барвник DAF-FM мало чутливий до дії лазерного променя і слабо вигоряє з часом [46, 48]. Хоча DAF-FM є частково мембранопроникним зондом, який може потрапляти до клітини внаслідок дифузії, ефективність надходження його до міоплазми штучно збільшували пермеабілізацією ПМ 0,01 % дигітоніном. Обробка міоцитів детергентом у такій концентрації не впливає на функціонування внутрішньоклітинних Ca<sup>2+</sup>-транспортних систем, але викликає зростання неспецифічної проникності саме ПМ [52]. За результатами досліджень встановлено (рис. 2.1, див. вклейку), що в міоцитах матки спостерігається зелений флуоресцентний сигнал після передінкубації з DAF-FM, який свідчить про наявність NO в цьому об'єкті. Аутофлуоресценцію клітин у досліджуваній області за відсутності DAF-FM не спостерігали. Висока чутливість використаного нами барвника дала змогу зареєструвати базальний рівень NO в міоцитах, що формується внаслідок функціонування конститутивних форм NO-синтаз.

Флуоресцентний зонд розподілявся в міоплазмі клітини, окреслюючи її контури та формуючи гетерогенні забарвлені ділянки та тяжі. Використання для реєстрації оксиду азоту DAF-системи забезпечує достатню роздільну здатність, яка дає змогу локалізувати джерела NO в міоплазмі, зокрема МХ [46]. Унаслідок дифузії, NO-позитивно забарвлені ділянки спостерігаються також частково в ядерній області та, іноді, поза клітинами.

Інкубація клітин із зростаючими концентраціями (0,1 та 0,2 мМ) N<sup>G</sup>-нітро-L-аргініну (NA), неселективного інгібітора Ca<sup>2+</sup>-залежних ізоформ NO-синтаз [53], супроводжувалась дозозалежним зниженням інтенсивності флуоресценції DAF-FM у середньому на 20 % (0,1 мМ інгібітора) та 40 % (0,2 мМ інгібітора) (рис. 2.1, б, див. вклейку). Зростання флуоресцентної відповіді при додаванні донора NO 0,1 мМ нітропрусида натрію (SNP) не залежало від присутності інгібітора (рис. 2.1, див. вклейку).

Ці результати свідчать про специфічність відповіді DAF-FM на NO в досліджуваних клітинах. Оскільки флуоресцентний зонд взаємодіє саме з NO,

він не тестує утворення широкого спектра активних метаболітів азоту та кисню, а саме  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{ONOO}^-$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  тощо [46]. Є вагомим підстави вважати, що DAF-FM є оптимальним NO-чутливим флуоресцентним барвником для детекції оксиду азоту в міоцитах.

### **З'ясування внеску мітохондрій як ендogenous джерела NO у процес синтезу оксиду азоту в міоцитах**

Обробка міоцитів дигітоніном призводила до посилення продукції NO клітинами і відповідного зростання флуоресценції DAF-FM (рис. 2.2, а, б, див. вклейку). Дигітонін взаємодіє з холестеролом ПМ, утворюючи міцели та везикули, що порушує ліпідний бішар і мембрана стає більш проникною для неорганічних іонів та органічних субстратів [54]. При цьому відбувається руйнування кавеол і можливе відокремлення eNOS від кавеоліну — потужного інгібітора ензиму [55—56]. Зазначені події є поясненням посилення синтезу NO міоцитами і свідченням того, що в клітинах міомеріа джерело оксиду азоту є асоційованим з ПМ.

Високоафінний інгібітор SERCA-помпи тапсигаргін у наномолярних концентраціях призводить до спустошення пулу іонів Ca в CP [1, 57]. У наших дослідженнях тапсигаргін навіть у концентрації 1 мкМ не викликав суттєвих змін у флуоресценції DAF-FM. Лише збільшення його вмісту до 3 мкМ мало наслідком зниження флуоресценції NO-чутливого барвника (рис. 2.2, в, див. вклейку). Можна припустити, що в міоцитах матки активність NOS, асоційованої з CP, також має місце. Втім, досить високі концентрації тапсигаргіну, необхідні для появи інгібувального ефекту, можуть свідчити також на користь його неспецифічної дії.

Застосування метил- $\beta$ -циклодекстрину (M $\beta$ CD) — циклічного олігосахариду, який утворює комплекси з холестеролом і використовується як фармакологічний агент для видалення холестеролу з мембран [58—59] та дигітоніну в надвисоких концентраціях (0,1 %), за яких порушується інтактність субклітинних структур [52, 54], призводило до зниження флуоресцентного сигналу від DAF-FM у межах 50 % від контрольного рівня (рис. 2.3). Ці дані також свідчать на користь синтезу NO, асоційованого з ПМ та іншими субклітинними мембранами. Відомо, що найбільш збагачена холестеролом ПМ. Однак певна його кількість міститься також у ВММ та мембрані EP. Можливо, “жорстка” дехолестеринізація субклітинних мембран має наслідком їхнє значне руйнування і відповідне пригнічення активності мембранно-асоційованих ензимів, зокрема NOS.

На фоні зростання флуоресценції DAF-FM у міоцитах унаслідок пермеабілізації ПМ 0,01% дигітоніном додавання інгібіторів I та III комплексів дихального ланцюга ротенону та антимицину А призводило до зниження синтезу оксиду азоту (рис. 2.2, а, б, див. вклейку). Цей результат надійно демонструє взаємозв'язок синтезу NO з МХ, який безпосередньо залежить від функціональної активності комплексів ЕТЛ.

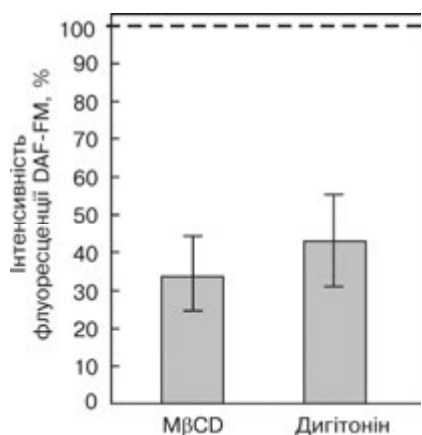


Рис. 2.3. Зміни біосинтезу оксиду азоту в клітинах міомерія за дії 1 мМ метил-β-циклодекстрину (МβCD) та 0,1 % дигітоніну; за 100 % прийнято синтез NO за відсутності речовин. Дані лазерної конфокальної мікроскопії. Для кількісного аналізу використано 5–6 клітин з різних незалежних дослідів,  $M \pm m$

Подальшими дослідженнями продемонстровано солокалізацію специфічного щодо МХ зонда MitoTracker Orange CMTMRos, який накопичується лише в енергізованих органелах [60], та NO-чутливого барвника DAF-FM (рис. 2.4, див. вклейку). Комп'ютерний аналіз довільно обраного поза ядром оптичного зрізу клітини показав тотож-

ний розподіл обох флуоресцентних барвників.

Таким чином, джерелами оксиду азоту в клітинах гладенького м'яза мати можуть виступати конститутивні NOS, асоційовані з ПМ та, не виключено, СР, що узгоджується з результатами, одержаними на окремих електрозбудливих клітинах [14, 19]. Потужним джерелом синтезу NO є МХ, ефективність якого залежить, можливо, від функціональної активності комплексів ЕТЛ. Продукція NO в МХ міоцитів може свідчити на користь участі оксиду азоту в таких процесах як мітохондрійне дихання, транспорт  $\text{Ca}^{2+}$ , апоптоз тощо.

Можливість утворення оксиду азоту в МХ клітин гладенького м'яза мати та регуляції ним функціональної активності цих субклітинних структур зумовлює проведення досліджень кінетичних та каталітичних властивостей реакції синтезу NO в МХ на моделі ізольованих органел.

### Визначення оксиду азоту в ізольованих мітохондріях міомерія щурів із використанням флуоресцентного зонда DAF-FM та методу протокової цитометрії

Синтез оксиду азоту МХ — достатньо потужний процес. За підрахунками, мітохондрії серця здатні продукувати від 56 до 90 % загальноклітинного вмісту NO в клітині [14, 28, 61]. Втім, біохімічні закономірності утворення оксиду азоту в МХ ГМ не з'ясовані.

Фракцію мітохондрій міомерія щурів отримували за допомогою методу диференційного центрифугування, як описано в праці [62]. Одержану фракцію ізольованих МХ зберігали в буфері 10 мМ Hepes (рН 7,4), 250 мМ цукрози, 1 мг/мл бичачого сироваткового альбуміну у співвідношенні 100 мг тканини: 100 мл буфера. Вміст протеїну у фракції МХ визначали стандартним методом Bradford за його реакцією з реактивом Кумасі G250.

В експериментах використано активну кислотну форму DAF-FM, яка безпосередньо взаємодіє з NO за присутності  $\text{O}_2$ , в результаті чого утворюється триазоло-флуоресцеїнове похідне (DAF-FM-T), яке має більший квантовий вихід флуоресценції [49, 63]. У дослідженнях було використано також

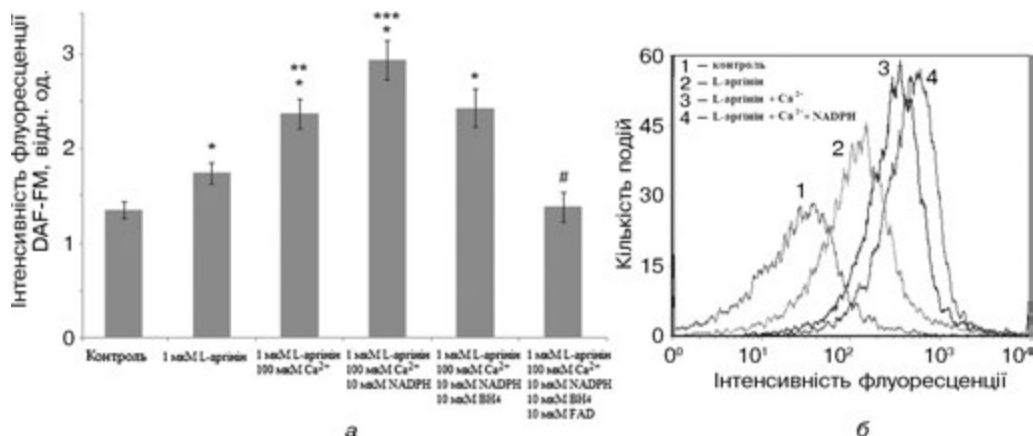
ацетильований DAF-FM-DA, який, проникаючи в матрикс, за дії естераз перетворюється на активну форму DAF-FM.

Синтез оксиду азоту в ізольованих МХ вивчали із залученням протокової цитометрії. Цей метод має вагомі переваги над звичайною спектрофлуориметрією. До них належить високе співвідношення сигнал/шум у флуоресцентному каналі, оцінка зміни флуоресценції саме МХ, а не робочого середовища і немітохондрійних субклітинних фрагментів, а також можливість використання відносно малої кількості мембранного препарату у пробах. Дослідження проводили із використанням протокового цитометра COULTER EPICS XL™ (Beckman Coulter, США), що обладнаний аргонним лазером ( $\lambda_{36} = 488$  нм) із програмним забезпеченням SYSTEM II™ Software (Beckman Coulter, США).

Зонд DAF-FM ( $\lambda_{36} = 488$  нм,  $\lambda_{\text{фл}} = 515$  нм (канал F11)) вносили безпосередньо до середовища інкубації в експериментально підібраній концентрації 0,5 мкМ. У разі використання DAF-FM-DA його навантаження в МХ у концентрації 5 мкМ виконували в середовищі, яке містило 10 мМ HEPES (pH 7,4, 25 °C), 250 мМ цукрози, 0,1 % бичачого сироваткового альбуміну, 0,02 % Pluronic F-127 (для покращення процесу навантаження) протягом 30 хв при 25 °C. Склад середовища інкубації (мМ): 20 HEPES (pH 7,4, 24 °C), 2 K<sup>+</sup>-фосфатний буфер (pH 7,4, 24 °C), 125 KCl, 25 NaCl, 5 піруват, 5 сукцинат, 0,01 NADPH, 0,01 ВН<sub>4</sub>, 0,001–0,1 L-аргінін, 0,01–0,5 Ca<sup>2+</sup>, аліквота мітохондрійної фракції містила 15–20 мкг протеїну. Окрім експериментів по з'ясуванню оптимальних умов проведення реакції і кінетичних досліджень, використовували концентрації L-аргініну — 50 мкМ, Ca<sup>2+</sup> — 100 мкМ. Реакцію ініціювали внесенням 20 мкл розчину L-аргінін+Ca<sup>2+</sup>. Залежність зростання флуоресценції DAF-FM від часу мала вигляд кривої з виходом на платовий рівень після 30 хвилини реакції. Тому тривалість проведення ензиматичної реакції становила 30 хв. Контролем слугувало утворення NO в МХ за відсутності екзогенно доданих L-аргініну та Ca<sup>2+</sup>.

mtNOS, подібно іншим ізоформам NOS, потребує для синтезу оксиду азоту L-аргінін, O<sub>2</sub>, Ca<sup>2+</sup>, CaM, NADPH, а також ВН<sub>4</sub> та FAD. Вважають, принаймні у випадку МХ серця, що mtNOS солокалізована разом із комплексом I дихального ланцюга [19, 24]. Така специфічна компартменталізація передбачає можливість регуляції активності NOS локальним мікрооточенням органел та компонентами матриксу, а також залежність продукції NO від активності ЕТЛ та електрохімічного градієнта іонів водню на ВММ. Ми намагалися з'ясувати необхідність тих чи інших компонентів реакційного середовища для коректного визначення активності mtNOS в ізольованих МХ міометрія.

Результати дослідження залежності NO-синтазної активності ізольованих МХ від наявності екзогенних субстрату та кофакторів представлені на рис. 2.5. Мітохондрії в робочому середовищі, яке містило субстрати дихання, а саме 5 мМ піруват і сукцинат, та сбалансований іонний склад мали змогу до ендогенної продукції NO. За відсутності субстратів дихання біосинтез NO виявився нижчим приблизно на 40 %. Послідовне внесення до інкубаційного середовища 1 мкМ L-аргініну та 100 мкМ Ca<sup>2+</sup> призводило до достовірного посилення біосинтезу оксиду азоту відносно контрольних значень. Додавання екзогенного Ca<sup>2+</sup> мало наслідком суттєве зростання утворення NO відносно дослідів за його відсутності (див. рис. 2.5.).



**Рис. 2.5.** Залежність синтезу NO мітохондріями від наявності субстрату та кофакторів у середовищі інкубації (а) та зміщення піків інтенсивності флуоресценції в умовах різного складу середовища інкубації (б). Дані типового експерименту. \*  $p < 0,05$  відносно контролю, \*\*  $p < 0,05$  відносно наявності L-аргініну, \*\*\*  $p = 0,05$  відносно наявності L-аргініну та Ca<sup>2+</sup>, #  $p < 0,05$  відносно повної реакційної суміші;  $M \pm m$ ,  $n = 7$  (а)

Додавання 10 мкМ NADPH також призводило до подальшого зростання NO-синтазної активності. Водночас внесення до реакційного середовища BH<sub>4</sub> не стимулювало NO-синтазну активність MX (див. рис. 2.5). Наявність 10 мкМ FAD в інкубаційному середовищі, яке містило усі вище зазначені компоненти, мало наслідком суттєве зниження утворення оксиду азоту. Діючі концентрації речовин використовувалися з урахуванням результатів подібних експериментів на інших об'єктах [8, 13, 23, 64, 65].

Зазначимо, що ізольовані MX володіють базальною NO-синтазною активністю за відсутності екзогенних субстрату та кофакторів, що свідчить про наявність необхідних реакційних компонентів у матриксі в достатній кількості та енергізований стан MX у середовищі з піруватом та сукцинатом. Відомо, що енергізовані MX серця синтезують NO навіть за відсутності екзогенного Ca<sup>2+</sup> через достатню для прояву ензиматичної активності концентрацію катіона в матриксі [16, 19]. Незалежний від позамітохондрійного Ca<sup>2+</sup> біосинтез NO спостерігаємо і в наших експериментах. Проте додавання до MX кардіоміоцитів мишей та шурів іонів Ca призводило до посилення продукції NO, а екстрамітохондрійні Mg<sup>2+</sup> та рутенієвий червоний (RuR) її пригнічували [19]. Як бачимо, біосинтез оксиду азоту MX міометрія також залежить від концентрації екзогенного Ca<sup>2+</sup>.

Внесення до інкубаційного середовища основного джерела електронів у позамітохондрійних NOS NADPH мало наслідком подальше зростання продукції NO, хоча й не дуже суттєве. Додавання кофактора і дисоціюючого переносника електронів BH<sub>4</sub> не спричинювало вірогідної різниці у біосинтезі оксиду азоту. Можливо, ці результати пояснюються достатньою енергізацією MX в умовах наших дослідів (наявність в середовищі сукцинату та пірувату як субстратів дихання) на фоні функціонального спряження mtNOS із дихальним ланцюгом, а також можливістю зворотного транспорту електронів

від II на I комплекс ЕТЛ [66]. У МХ кардіоміоцитів за нестачі L-аргініну або  $\text{NH}_4$  в умовах стимулювання акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  органелами утворення NO було значно меншим, але водночас спостерігалось збільшення продукції АФК [12]. Отже, згідно з цитованими даними, наявність  $\text{NH}_4$  в інкубаційному середовищі є обов'язковою умовою коректного тестування NO-синтазної активності. Це враховувалося нами в подальших дослідях.

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

Як зазначалося в розділі 1, конститутивні NO-синтази, зокрема nNOS, за певних умов володіють оксидазною активністю і генерують  $\text{O}_2^- / \text{H}_2\text{O}_2$ . Ця властивість особливо важлива у випадку МХ як джерела АФК у клітині, а також значення гіперпродукції АФК у механізмах розвитку мітохондрійної дисфункції. Слід також взяти до уваги можливу структурно-функціональну єдність mtNOS з комплексами дихального ланцюга — основними джерелами АФК у МХ.

Утворення активних форм кисню реєстрували за допомогою АФК-чутливого флуоресцентного зонда DCF-DA (2',7'-Dichlorofluorescein diacetate) та методу протокової цитометрії. Навантаження МХ зондом у концентрації 25 мкМ виконували 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 за температури 25 °C. Для дослідження утворення АФК було створено робочий протокол аналізу флуоресценції DCF-DA ( $\lambda_{\text{аб}} = 488$  нм,  $\lambda_{\text{фл}} = 515$  нм (канал F11)) в ізольованих МХ міометрія. Середовище інкубації мало склад (мМ): 20 Hepes (pH 7,4, 25 °C), 2  $\text{K}^+$ -фосфатний буфер (pH 7,4, 25 °C), 125 KCl, 25 NaCl. Вміст протеїну в мітохондрійній фракції становив 15—20 мкг. Реакцію ініціювали внесенням аліквоти 20 мкл розчину 5 мМ пірват + 5 мМ сукцинат.

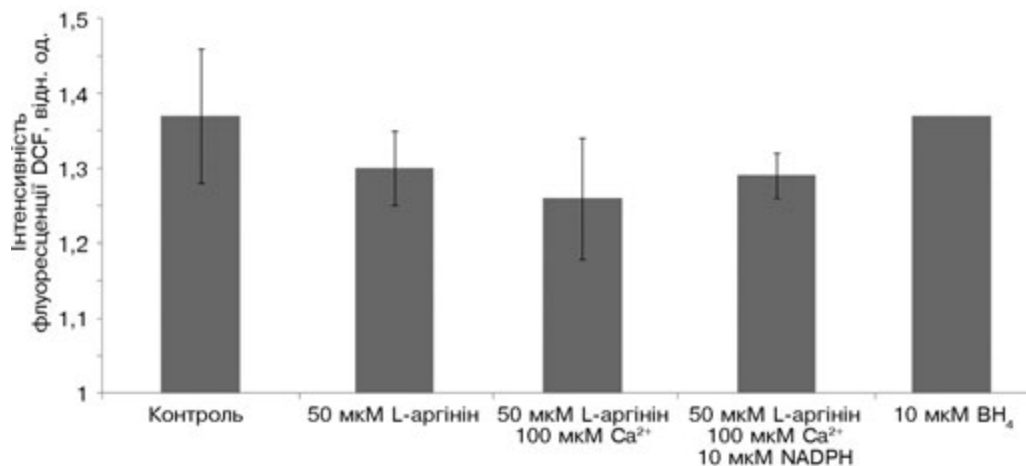
Продемонстровано, що внесення до середовища ізольованих МХ субстрату та кофакторів NO-синтази не призводило до достовірного посилення генерації АФК (рис. 2.6). Таким чином, можна зробити аргументоване припущення про те, що утворення АФК в ізольованих МХ не пов'язане з активністю mtNOS.

Отже, для надійного тестування біосинтезу NO в МХ міометрія в складі реакційного середовища необхідним є наявність L-аргініну,  $\text{Ca}^{2+}$ , NADPH та  $\text{NH}_4$ . За цих умов оксидазна активність mtNOS не проявляється.

### **Кінетичні і каталітичні особливості NO-синтазної реакції в мітохондріях**

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





**Рис. 2.6.** Синтез АФК мітохондріями за умови послідовного внесення L-аргінінату кофакторів NOS,  $n = 4$

Зі зростанням концентрації екзогенного  $\text{Ca}^{2+}$  збільшується продукція NO МХ. Максимальна NO-синтазна активність спостерігається в діапазоні від 100 до 250 мкМ  $\text{Ca}^{2+}$  (рис. 2.7). Подальше зростання концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  дещо знижувало продукцію NO. Характер кривої залежності на рис. 2.7, а дає змогу розрахувати константу активації за  $\text{Ca}^{2+}$  NO-синтазної реакції (рис. 2.7, б), яка становить  $44,4 \pm 14,5$  мкМ ( $n = 5$ ) за концентрації доданого до МХ L-аргініну 1 мкМ.

Встановлено також, що зі збільшенням концентрації L-аргініну від 1 до 75 мкМ відбувається зростання синтезу оксиду азоту з тенденцією до виходу на плато (концентрація екзогенного  $\text{Ca}^{2+}$  становить 100 мкМ) (рис. 2.8, а), що дає змогу розрахувати уявну константу спорідненості за субстратом (рис. 2.8, б). З подальшим зростанням концентрації амінокислоти (до 100 мкМ у цих дослідах) утворення NO суттєво знижується (див. рис. 2.8, а). Розрахована в координатах Хейнса (див. рис. 2.8, б) константа спорідненості за L-аргініном становить  $28,9 \pm 9,1$  мкМ ( $n = 5$ ).

Отже, оптимальними для прояву функціональної активності mtNOS в ізольованих МХ міомерія є концентрації L-аргініну в межах 50 мкМ та  $\text{Ca}^{2+}$  — 100 мкМ.

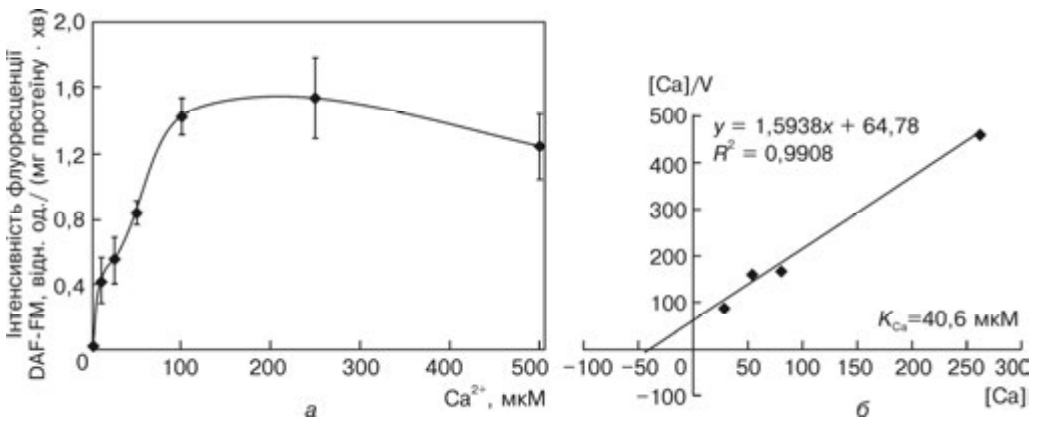
Широковживаний інгібітор конститутивних NO-синтаз N<sup>G</sup>-нітро-L-аргінін (NA) та інгібітор nNOS 2-амінопіридин (2-AP) [67, 68] ефективно гальмували синтез NO в МХ міомерія (рис. 2.9). Напівмаксимальний гальмівний ефект мав місце за концентрацій 25 мкМ NA та 100 мкМ 2-AP. Відомий блокатор транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  у ВММ рутенієвий червоний (10 мкМ) суттєво пригнічував продукцію оксиду азоту МХ за наявності в інкубаційному середовищі 100 мкМ  $\text{Ca}^{2+}$  (див. рис. 2.9). Ці результати свідчать про те, що в МХ міомерія синтез NO забезпечується конститутивною ізоформою NOS, можливо nNOS.

Інгібування активності мітохондрійної NO-синтази NA навіть у концентрації 50 мкМ не призводить до достовірного зниження генерації АФК міто-

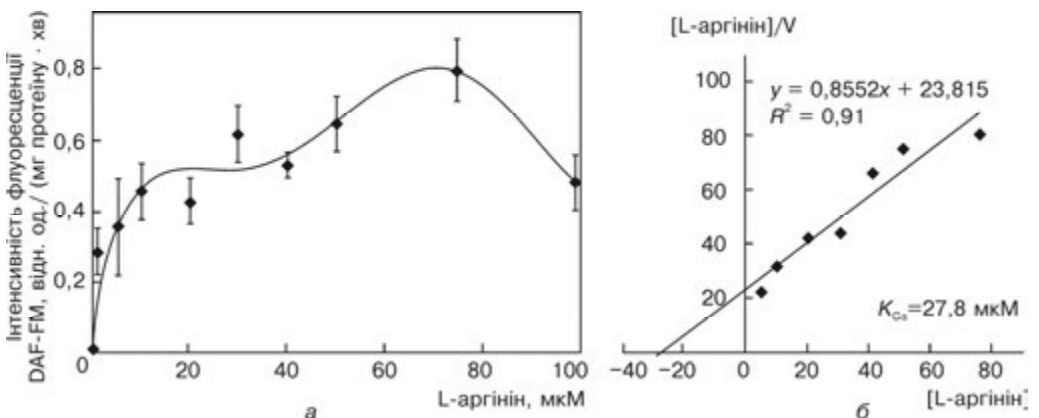
## 2.2. Синтез оксиду азоту в мітохондріях міометрія та біохімічні характеристики...

хондріями (рис. 2.10). Ці досліді підтверджують наші попередні результати про те, що утворення АФК в ізольованих МХ не пов'язане з активністю mtNOS.

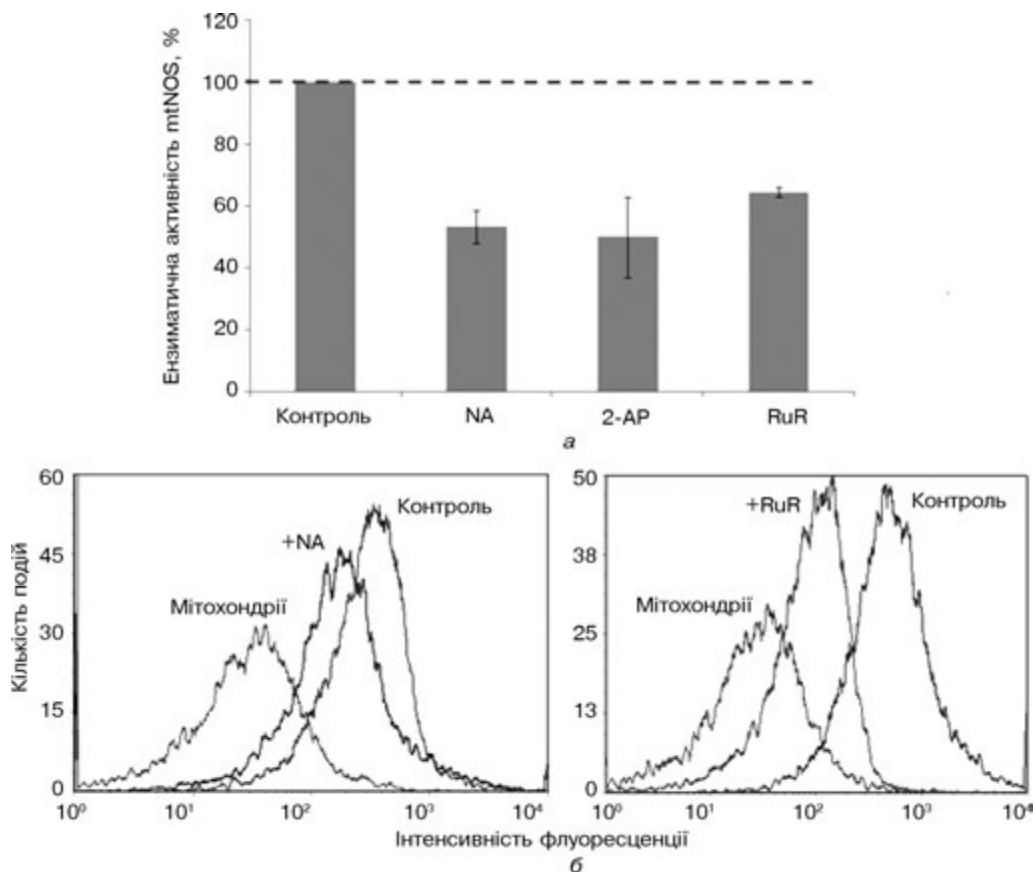
Відомо, що  $Mg^{2+}$  широко використовують як токолітик.  $Mg^{2+}$  гальмує спонтанні скорочення міометрія у концентрації 3 мМ, а також інгібує окситоцин-індуковану конструкцію ГМК матки на 30–40 % у концентрації 8 мМ [69]. Концентрація  $Mg^{2+}$  5–10 мМ є фармакологічною [70]. Наявність  $Mg^{2+}$  також є необхідною для накопичення  $Ca^{2+}$  МХ, константа активації за цим катіоном ( $K_{Mg}$ ) сягає 1,7–4,3 мМ, значення оптимальної концентрації  $Mg^{2+}$  становить 5–10 мМ; за 10 мМ і вище іони Mg блокують накопичення  $Ca^{2+}$  МХ [71, 72]. У міометрії МХ ефективно акумулюють  $Ca^{2+}$  за присутності  $MgATP^{2-}$ , який потрібний для реверсної роботи АТР-синтази та зростання



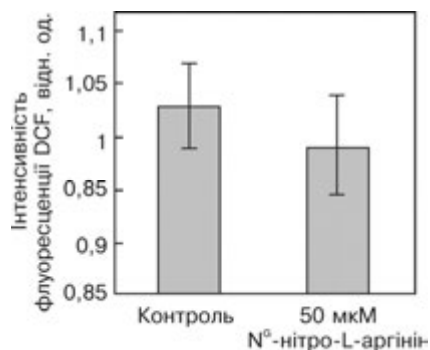
**Рис. 2.7.** Залежність активності mtNOS від концентрації екзогенного  $Ca^{2+}$ .  $M \pm m$ ,  $n = 5$  (a) та приклад розрахунку методом Хейнса константи активації за  $Ca^{2+}$  (б):  $[Ca]$  — концентрація  $Ca^{2+}$ ,  $V$  — активність mtNOS



**Рис. 2.8.** Залежність активності mtNOS від концентрації екзогенного L-аргініну.  $M \pm m$ ,  $n = 5$  (a) та приклад розрахунку методом Хейнса константи спорідненості до L-аргініну (б):  $[L-аргінін]$  — концентрація L-аргініну,  $V$  — активність mtNOS



**Рис. 2.9.** Зміни ензиматичної активності mtNOS в мітохондріях за присутності 25 мкМ N<sup>G</sup>-нітро-L-аргінину (NA) та 100 мкМ 2-амінопіридину (2-AP), а також 10 мкМ рутенієвого червоного (RuR).  $M \pm m$ ,  $n = 5$  (а) та зміщення піків інтенсивності флуоресценції в умовах дії NA та RuR (б): “мітохондрії” — положення піка в “0” момент часу, “контроль” — положення піка через 30 хв. Дані типового експерименту



**Рис. 2.10.** Синтез АФК мітохондріями за присутності N<sup>G</sup>-нітро-L-аргінину

рушійної сили (формування електрохімічного градієнта протонів,  $\Delta p$ ) для входу  $\text{Ca}^{2+}$  [73, 74].

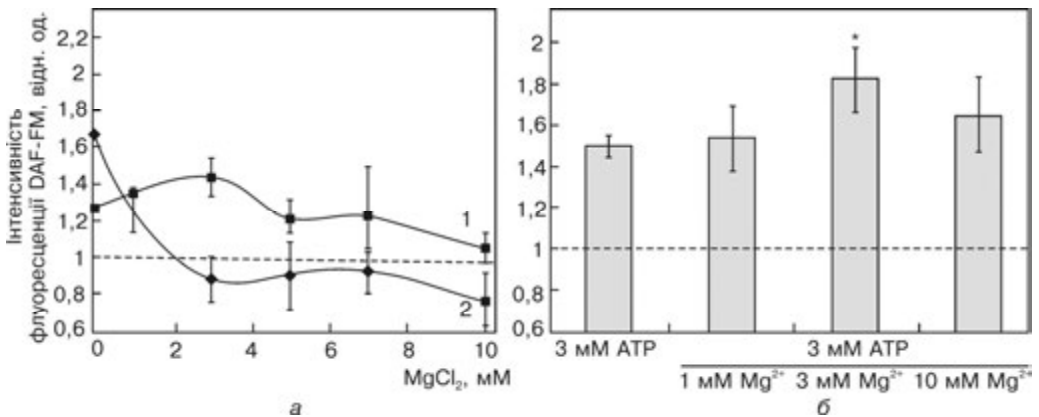
Іони  $\text{Mg}^{2+}$  в концентраціях 1–10 мМ гальмують синтез NO в МХ (рис. 2.11, а, крива 2). Водночас за відсутності іонів  $\text{Ca}^{2+}$  інгібувальний ефект  $\text{Mg}^{2+}$  не спостерігали (рис. 2.11, а, крива 1). Тобто за цих експериментальних умов іони  $\text{Mg}^{2+}$  виступають, можливо, інгібіторами надходження  $\text{Ca}^{2+}$  до МХ та

## 2.2. Синтез оксиду азоту в мітохондріях міомеріа та біохімічні характеристики...

Ca<sup>2+</sup>-залежної генерації NO. Подальші дослідження показали, що за присутності в середовищі 3 мМ АТФ інгібувальний ефект Mg<sup>2+</sup> знімається (рис. 2.11, б). Одержаний результат можна пояснити утворенням комплексу MgATP<sup>2-</sup>, що супроводжується активацією входу Ca<sup>2+</sup> в МХ та стимулюванням активності mtNOS.

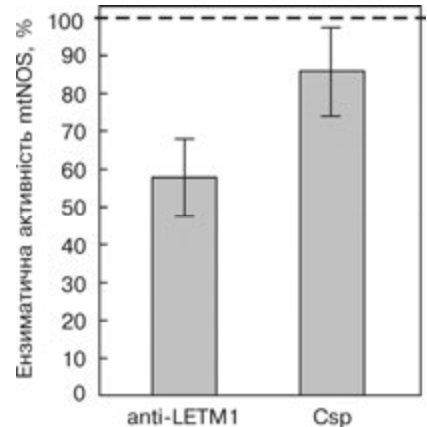
У МХ Ca<sup>2+</sup>-гомеостаз забезпечують електрофоретичний низькоафінний Ca<sup>2+</sup>-уніпортер (вхід Ca<sup>2+</sup>) [75, 76] та H<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-обмінник, який репрезентований протеїном LETM1 та здійснює ΔpH-залежний вихід Ca<sup>2+</sup> з матриксу [77—79]. Вище (див. рис. 2.9.) було показано, що блокування входу Ca<sup>2+</sup> RuR супроводжується зниженням на 40 % інтенсивності синтезу NO. За присутності антитілу до протеїну LETM1 (рис. 2.12) та пригнічення функціонування H<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-обмінника синтез оксиду азоту МХ також суттєво зменшується. Поряд з цим, активність mtNOS майже не змінювалась за наявності в середовищі циклоспорину А (див. рис. 2.12).

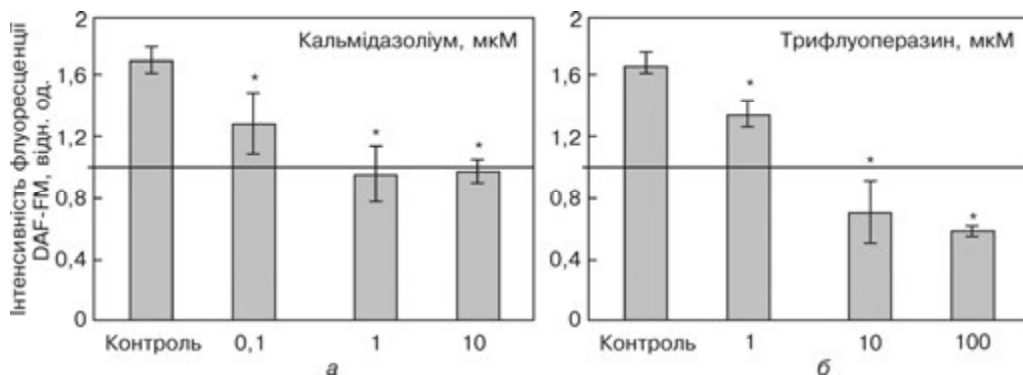
Таким чином, порушення функціонування систем обміну іонів Са в МХ суттєво позначається на активності mtNOS. Циклоспорин-чутлива РТР не відіграє значної ролі в Ca<sup>2+</sup>-залежному біосинтезі NO за умов нашого експерименту.



**Рис. 2.11.** Вплив іонів Mg на синтез оксиду азоту в ізольованих мітохондріях міомеріа. *a*: 1 — за наявності в середовищі 50 мкМ L-аргініну, 2 — за наявності 50 мкМ L-аргініну та 100 мкМ Ca<sup>2+</sup>; *б* — в середовищі присутній 3 мМ АТФ.  $M \pm m$ ,  $n = 5$ ; \* — зміни вірогідні ( $p \leq 0,05$ ) відносно дії 3 мМ АТФ. За “1” прийнято ендogenousний (за відсутності L-аргініну та Ca<sup>2+</sup> в середовищі) синтез NO в мітохондріях

**Рис. 2.12.** Вплив інгібіторів систем Ca<sup>2+</sup>-обміну в мітохондріях на ензиматичну активність mtNOS: антитілу проти LETM1 (1,25 мк ganti-LETM1/25 мкг протеїну) та циклоспорину А (Csp, 5 мкМ). За 100 % прийнята ензиматична активність за відсутності інгібіторів,  $M \pm m$ ,  $n = 7$





**Рис. 2.13.** Дія антагоністів кальмодуліну на продукцію оксиду азоту в ізольованих мітохондріях міомерія.  $M \pm m$ ,  $n = 5$ , \* — зміни вірогідні відносно контролю ( $p \leq 0,05$ ). За “1” прийнято ендogenousний (за відсутності L-аргініну та  $\text{Ca}^{2+}$  в середовищі) синтез NO в мітохондріях

Біосинтез NO конститутивними NOS є  $\text{Ca}^{2+}$ , CaM-залежним процесом [80, 81]. Показано стимулювання  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортера MX комплексом  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM, неопосередковане CaMKII [82]. Є дані, що в структурі протеїнів-переносників ВММ, зокрема транспортера АТФ-Mg/ $\text{P}_i$ , присутні ділянки гомологічні CaM [83]. На інтактних міоцитах та фракції ізольованих MX міомерія невагітних щурів показано, що антагоністи CaM — кальмідазоліум (10 мкМ) та трифлуоперазин (100 мкМ) деполаризують ВММ, але спричинюють зростання рівня іонізованого Ca як у цитоплазмі, так і в матриксі MX [84—86]. Наведені дані дають змогу припустити, що порушення взаємодії mtNOS з комплексом  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM буде мати наслідком інгібування її  $\text{Ca}^{2+}$ -залежної активації та/або порушення регуляції.

Наші дослідження показали, що антагоністи CaM кальмідазоліум (0,1—10 мкМ) та трифлуоперазин (10—100 мкМ) концентраційнозалежно пригнічують синтез оксиду азоту в MX міомерія (рис. 2.13).

Як було зазначено вище (див. розділ 1), конститутивні NO-синтази функціонально-активні лише у формі димеру, який стабілізується комплексом  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM. Поряд з цим, зв'язування CaM контролює транспорт електронів від редуктазного на оксигеназний домен, а також у редуктазному домені NO-синтаз. Порушення транспорту електронів та спряження між субодинамиціями в цих ензимах призводить до зростання генерації АФК [80, 81].

Кальмідазоліум у концентрації 10 мкМ у 5 разів посилював генерацію АФК порівняно з контролем у досліджуваних субклітинних структурах. Водночас 100 мкМ трифлуоперазин майже не впливав на інтенсивність продукції АФК у MX (рис. 2.14). Одержані результати пояснюються істотними відмінностями в механізмах дії обох антагоністів.

Кальмідазоліум має більшу спорідненість до CaM, ніж трифлуоперазин. Кальмідазоліум діє на вже утворений субстрат-ензимний комплекс (у нашому випадку CaM-NOS) як неконкурентний інгібітор. За цих умов комплекс не дисоціює, інгібування є незворотнім [87, 88]. Таким чином, кальмідазоліум, можливо, порушенням CaM-залежного транспорту електронів у мітохондрійній NO-синтазі спричинює переключення її NO-синтазної активності на ок-

## 2.2. Синтез оксиду азоту в мітохондріях міомеріа та біохімічні характеристики...

сидазну і відповідне посилення генерації зазначеним ферментом АФК. Водночас трифлуоперазин взаємодіє з СаМ у двох ділянках між Са<sup>2+</sup>-зв'язувальними доменами, запобігаючи утворенню активного комплексу СаМ-ензим (у нашому випадку NOS) [87]. Таким чином, він зменшує пул вільного СаМ, що знижує активність NOS, але не призводить до посилення генерації АФК. Хоча не можна виключати як пряму інгібувальну дію антагоністів кальмодуліну на фермент NOS, так і опосередковану, через блокування Са<sup>2+</sup>-уніпортера.

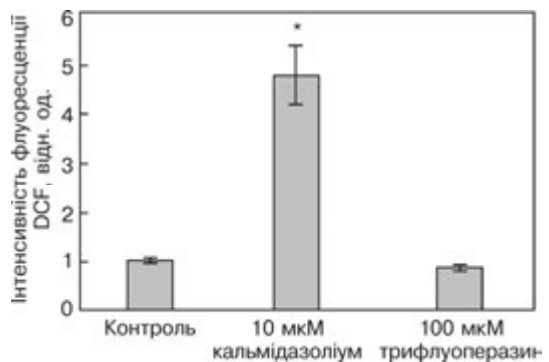
На свіжовиділених міоцитах матки нами продемонстровано (див. рис. 2.2, а, б), що синтез оксиду азоту в МХ залежить від функціональної активності ЕТЛ. У наступній серії експериментів на фракції ізольованих МХ ми дослідили залежність NO-синтазної активності МХ від їхнього енергетичного стану.

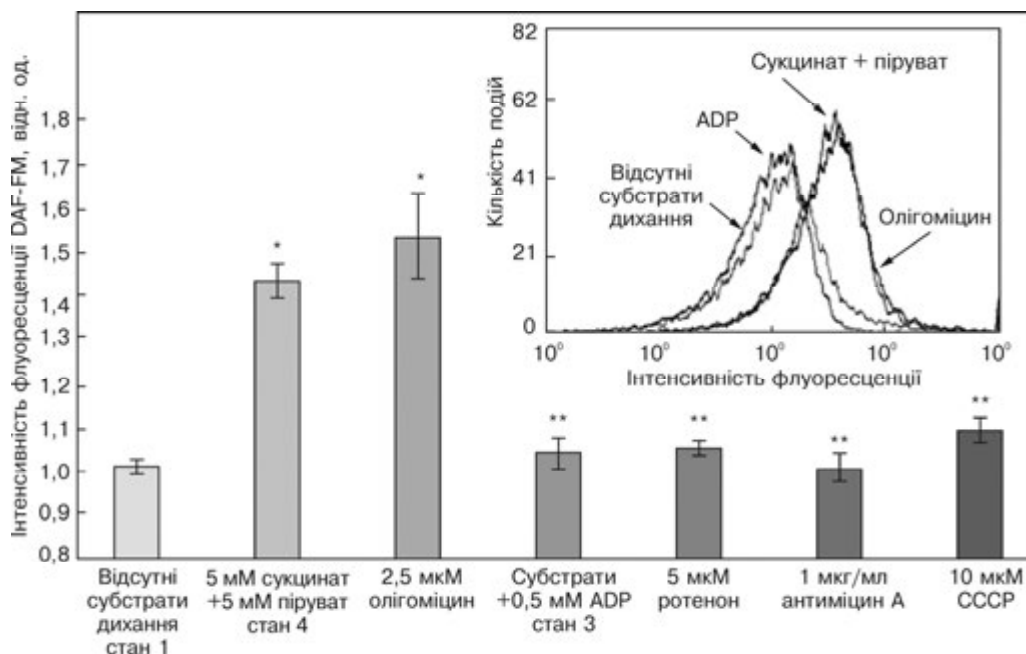
Діюча концепція метаболічних станів МХ та дихального контролю базуються на співвідношенні швидкості поглинання О<sub>2</sub> та синтезу АТР ізольованими органелами. Відсутність екзогенних субстратів дихання та АТР відповідає метаболічному стану 1. Висока швидкість поглинання О<sub>2</sub> та продукції АТР спостерігається у випадку додавання субстратів дихання та АТР у метаболічному стані 3. Відсутність АТР зумовлює низьку швидкість поглинання О<sub>2</sub>, АТР не синтезується, а ВММ гіперполяризована (метаболічний стан 4) [89].

Із використанням панелі модифікаторів ЕТЛ нами було одержано такі результати. За відсутності екзогенно доданих субстратів дихання МХ синтезували NO (рис. 2.15), хоча і з незначною ефективністю. Додавання в середовище інкубації 5 мМ пірувату та сукцинату спричинює стимуляцію їх окислення і функціонування ЕТЛ, енергізацію МХ та посилення синтезу оксиду азоту. Аналогічним впливом на NO-синтазну активність володіє відомий інгібітор Н<sup>+</sup>-каналу Н<sup>+</sup>-АТРази олігоміцин (2,5 мкМ). Додавання до енергізованих МХ 0,5 мМ АТР (фосфат неорганічний та Mg<sup>2+</sup> знаходяться в інкубаційному середовищі) створювало умови для синтезу АТР та послаблювало NO-синтазну активність в МХ. Блокування I комплексу ЕТЛ ротеноном (5 мкМ) або III комплексу антимицином А (1 мкг/мл) мало наслідком суттєве зниження синтезу NO енергізованими МХ. Аналогічний за напрямком ефект спричинює введення до інкубаційного середовища протонифору карбонілціанід m-хлорофенілгідрозону (СССР), який швидко руйнує електрохімічний градієнт протонів на ВММ.

Отже, за відсутності екзогенно доданих субстратів дихання ізольовані МХ продукують NO за рахунок внутрішніх резервів. Цей процес суттєво посилюється в умовах енергізації МХ та гіперполяризації їхньої внутрішньої мембрани за додавання субстратів дихання або

**Рис. 2.14.** Утворення активних форм кисню за присутності антагоністів кальмодуліну. \* — зміни вірогідні відносно контролю ( $p < 0,05$ ). За "1" прийнято значення флуоресценції перед внесенням діючих речовин.  $M \pm m, n = 4$





**Рис. 2.15.** Залежність синтезу оксиду азоту від присутності субстратів дихання та інгібіторів електронтранспортного ланцюга в мітохондріях. Стани 1, 3, 4 — стани мітохондрійного дихання за Чансом. \*  $p < 0,05$  відносно стану 1, \*\*  $p < 0,05$  відносно стану 4.  $M \pm m$ ,  $n = 5$ . Вставка: зміщення піків інтенсивності флуоресценції в умовах різного складу середовища інкубації. Дані типового експерименту

олігоміцина. Натомість в стані ефективного окисного фосфорилування (стан 3) синтез NO знижується. До цього ж ефекту призводить інгібування окремих комплексів дихального ланцюга ротеноном та антимицином, а також дисипація електрохімічного градієнта за внесення протонифору CCCP. У дослідях на МХ кардіоміоцитів перехід від відносного спокою (стан 4) до активного дихання у випадку повністю спряжених МХ (наявні субстрати дихання, достатня концентрація кисню та присутнє АДР, стан 3) супроводжується зниженням на 60 % продукції NO. Також було продемонстровано, що біосинтез NO експоненціально залежить від електричного потенціала внутрішньої мембрани [90, 91]. Активність mtNOS максимальна за оптимальної роботи ЕТЛ, зокрема комплексу I, який розглядається як можливе джерело електронів для функціонування ензиму; інактивація комплексу I знижує активність mtNOS [11, 23, 24].

Наші результати узгоджуються з тими, які було одержано на пермеабілізованих кардіоміоцитах із застосуванням методу конфокальної мікроскопії. Зокрема, колапс мембранного потенціалу за присутності протонифора FCCP, блокування  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортера ВММ сполукою Ru360, застосування інгібіторів ЕТЛ ротенону або антимицину А в комбінації з олігоміцином призводило до гальмування синтезу NO в МХ [92].

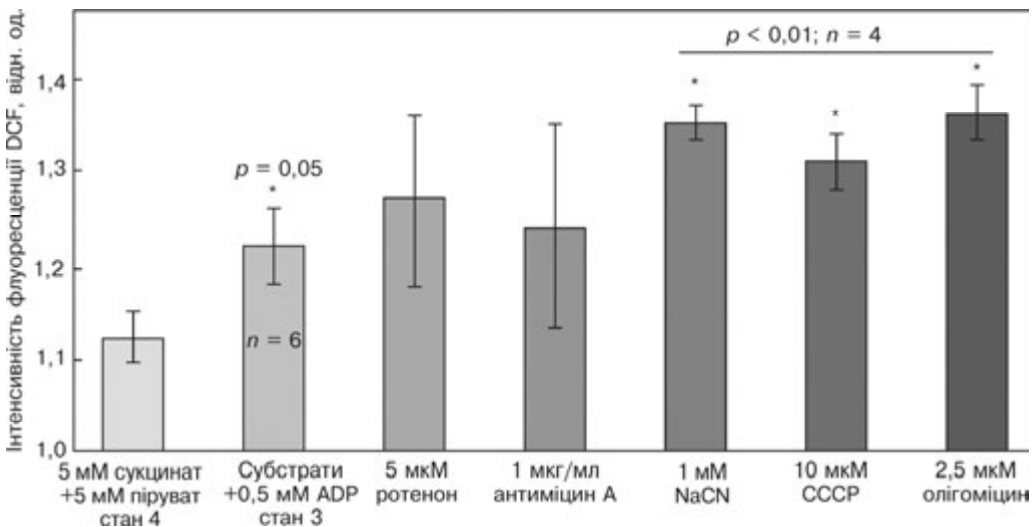
Варто зазначити, що зниження продукції NO при переході зі стану 4 до стану 3 протилежне тому, що можна було б очікувати від незначного закис-

## 2.2. Синтез оксиду азоту в мітохондріях міометрія та біохімічні характеристики...

лення матриксу і рН-залежності активності mtNOS. Залежність продукції NO від внутрішньомітохондрійного рН (у діапазоні 5,5—8,5) має дзвоноподібний характер з максимумом при рН 7,4 [11]. Беручи до уваги значення рН матриксу близько 7,5 у стані 3 і близько 7,8 у стані 4 [90, 93, 94], активність mtNOS повинна бути вища в першому випадку. Ці результати вказують на те, що більший синтез NO в стані 4 не пов'язаний зі змінами рН. Існує точка зору, що активність mtNOS регулюється саме електричною, а не протонною складовою мембранного потенціалу на ВММ [11, 29].

Цікаво порівняти зміни інтенсивності генерації NO та АФК за додавання модифікаторів ЕТЛ. За присутності субстратів дихання посилюється синтез як NO (див. рис. 2.15), так і АФК (рис. 2.16). За наявності ADP синтез NO пригнічується (див. рис. 2.15), втім достовірно зростає рівень АФК (див. рис. 2.16.). Цей результат виявився дещо несподіваним через те, що посилення сприяння дихання і фосфорилування у стані 3 мало б знизити генерацію АФК завдяки більш ефективній роботі комплексів ЕТЛ. Проте АФК у нормі продукується ЕТЛ, отже можлива стимуляція його активності в умовах експерименту виявила одночасне зростання і генерації АФК. Внесення інгібіторів дихального ланцюга та протоннофору СССР супроводжується пригніченням синтезу NO та, очікувано [95], посиленням генерації АФК. Гіперполяризація ВММ за присутності олігоміцину має наслідком зростанням продукції як NO, так і АФК, останнє також узгоджується з даними літератури [66, 96].

Таким чином, наші результати переконливо свідчать і знаходяться у відповідності з уявленнями про те, що біосинтез оксиду азоту МХ міометрія



**Рис. 2.16.** Залежність синтезу активних форм кисню від наявності в середовищі інкубації мітохондрій субстратів дихання, 0,5 мМ ADP, інгібіторів електронтранспортного ланцюга (5 мкМ ротенону, 1 мкг/мл антимицину А, 1 мМ NaCN), 10 мкМ протоннофору СССР, 2,5 мкМ олігоміцину. Умовна одиниця (1) — ендогенний синтез АФК ізольованими мітохондріями



суттєво залежить від рівня їхньої енергізації і величини електрохімічного градієнта іонів водню на внутрішній мембрані.

### Іони калію та синтез оксиду азоту мітохондріями

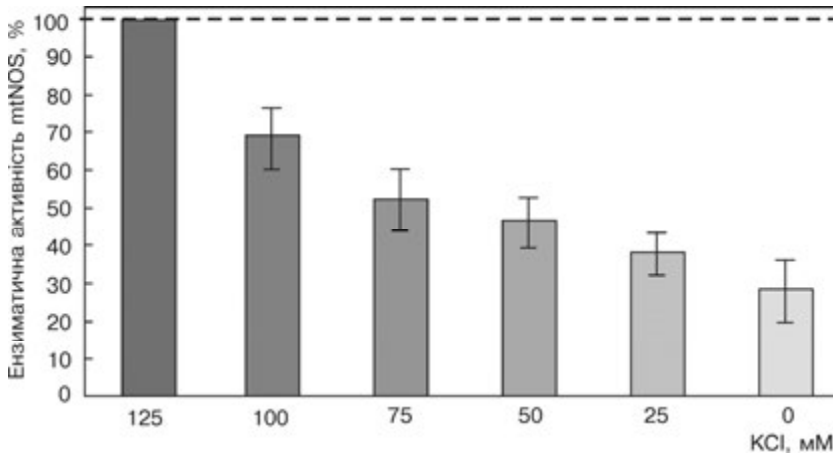
Іони калію відіграють провідну роль в молекулярній фізіології МХ. Зокрема, транспорт  $K^+$  у мітохондрійній мембрані регулює утворення АФК та забезпечує осморегуляцію. Наразі є відомості про функціонування різних підтипів  $K^+$ -каналів у ВММ органел: АТР-чутливих (міто $K_{\text{АТР}}$ ), потенціалкерованих (потенціалворотних),  $Ca^{2+}$ -активованих (високої, низької та проміжної провідностей), рН-чутливих, двопорових (TASK 3) тощо [97, 98]. За фізіологічних умов (нормоксії) стимуляція міто $K_{\text{АТР}}$  призводить до посилення генерації АФК як сигнальних молекул, що супроводжується зниженням електричного потенціалу на ВММ, помірним роз'єднанням окиснення та фосфорилування з наступним зменшенням генерації АФК. Часткова деполяризація МХ за умови посилення  $K^+$ -проникності захищає від  $Ca^{2+}$ -перевантаження та відкриття РТР. Цей механізм може мати важливе значення для протидії мітохондрійній дисфункції за умови ішемії-реперфузії та відповідного розвитку оксидативного стресу [97].

Активация  $K^+$ -каналів призводить до стимуляції транспорту іонів К у матрикс, посилення роботи аніонних каналів, накопичення іонів СІ у МХ. Ці іонні процеси зумовлюють рух води в органели, спричинений порушенням осмотичної рівноваги, і їхнє набухання. Протидіє зазначеним явищам є робота  $H^+$ - $K^+$ -обмінника. У випадку дисфункції деполяризація МХ унаслідок активації міто $K_{\text{АТР}}$  супроводжується відкриттям РТР і процес набухання стає неконтрольованим [97, 99, 100]. Існують докази того, що NO протидіє зазначеним процесам, володіючи протекторною щодо МХ функцією [101, 102]. У зв'язку з цим нами було досліджено утворення NO МХ міометрія залежно від концентрації іонів калію в позамітохондрійному середовищі та дії відомих інгібіторів  $K^+$ -каналів.

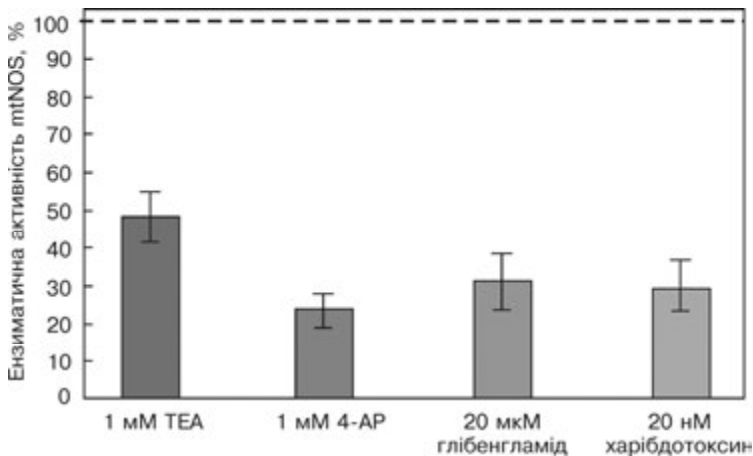
Максимальна активність mtNOS спостерігається за концентрацій екзогенного калію, що близькі до фізіологічних у цитозолі, а саме 125 мМ  $K^+$ . Послідовна ізотонічна заміна в реакційному середовищі хлориду калію на холін-хлорид і відповідне зниження екзогенної концентрації катіона до 100-75-50-25-0 мМ призводить до суттєвого зниження NO-синтазної здатності МХ. За відсутності  $K^+$  в інкубаційному середовищі ензиматична активність знижується на 70 % (рис. 2.17).

Ці результати переконливо свідчать про важливу роль іонів калію у функціонуванні mtNOS. У попередніх наших дослідженнях показано, що спричинене гіперкальцієвим розчином набухання МХ суттєво пригнічується блокаторами різних підтипів  $K^+$ -каналів внутрішньої мембрани [102], що свідчить про їхню можливу функціональну активність у випадку МХ міометрія [101]. У монографії ми використали інгібітори  $K^+$ -проникності: тетраетиламоній (ТЕА) та 4-амінопіридин (4-AP) (суттєво пригнічують активність потенціалкерованих  $K^+$ -каналів), глібенкладмід (селективний інгібітор міто $K_{\text{АТР}}$ ) та харібдотоксин (селективний інгібітор  $Ca^{2+}$ -залежних  $K^+$ -каналів). Усі зазначені сполуки призводили до ефективного гальмування NO-синтазної здатності МХ (рис. 2.18), що доводить суттєву роль  $K^+$ -проникності у функціонуванні mtNOS.

## 2.2. Синтез оксиду азоту в мітохондріях міомерія та біохімічні характеристики...



**Рис. 2.17.** Зміни активності mtNOS за умови зменшення концентрації іонів калію в реакційному середовищі. Хлорид калію ізотонічно замінювали на холінхлорид,  $M \pm m$ ,  $n = 7$



**Рис. 2.18.** Активність mtNOS в умовах інгібування  $K^+$ -каналів тетраетиламонієм (TEA), 4-амінопіридином (4-AP), глібенгламідом та харібдотоксином. За 100 % прийнята ензиматична активність за відсутності інгібіторів,  $M \pm m$ ,  $n = 7$

Ми припускаємо, що одним з механізмів дії іонів калію на біосинтез NO МХ може бути вплив на  $Ca^{2+}$ -гомеостаз матриксу. Річ у тім, що протеїн LETM1, який забезпечує активність  $H^+$ - $Ca^{2+}$ -обмінника, спочатку був описаний як структура, що забезпечує  $H^+$ - $K^+$ -обмін у ВММ [77, 103—105]. Це може свідчити на користь принаймні функціонального взаємозв'язку  $H^+$ - $Ca^{2+}$ - та  $H^+$ - $K^+$ -обміну, отже, і значення  $K^+$  в регуляції концентрації  $Ca^{2+}$  в мітохондрійному матриксі та  $Ca^{2+}$ -залежного біосинтезу NO. Крім того, регулювання об'єму матриксу має важливе значення для функціонування МХ. Зокрема, зміни об'єму впливають на інтенсивність дихання та продукування АТР. Існує кореляція між змінами геометрії органел та такими явищами, як генерація

АФК, поляризація ВММ, здатність до апоптозу тощо [19, 99, 100, 103]. У цьому сенсі можна припустити зв'язок між функціонуванням  $K^+$ -каналів ВММ та  $H^+$ - $K^+$ -обмінника, яке залежить від концентрації  $K^+$ , об'ємом МХ та продукуванням NO. Зміни в біосинтезі оксиду азоту, в свою чергу, будуть впливати як на активність  $K^+$ -каналів (це надійно показано у випадку ПМ), так і на осморегуляцію. Наразі стимуляція міто $K_{ATP}$  оксидом азоту або безпосередньо нітрозилуванням, або через систему NO/cGMP/PKG є встановленим і добре описаним фактом [106, 107]. Припускають, що за цим механізмом може реалізовуватись протекторна щодо МХ функція оксиду азоту, зокрема у випадку ішемії-реперфузії міокарда [108]. Важливість подальшого з'ясування молекулярно-фізіологічних механізмів захисту від мітохондрійної дисфункції робить дослідження взаємозв'язку між системою NO та  $K^+$ -проникністю в МХ вельми актуальною науковою задачею.

### **Роль аденілатциклазного сигнального шляху в синтезі оксиду азоту мітохондріями**

Однією з можливих модифікацій активності мітохондрійної NOS може бути фосфорилування за участю протеїнових кіназ, зокрема протеїнкінази А. Брауном зі співавторами в 1975 році була продемонстрована наявність розчинної аденілатциклази в клітинах репродуктивних тканин самців. Ця ізоформа виявилася відмінною від вже відомої зв'язаної з ПМ аденілатциклази і активувалася  $Mn^{2+}$  [109]. Було встановлено, що розчинна ізоформа безпосередньо стимулювалася бікарбонатом та іонами Ca [110]. Пізніше описали аденілатциклазну активність в різних клітинних компартментах, зокрема МХ, ядрі, центріолах тощо [111]. Наявність елементів аденілатциклазного сигнального каскаду, зокрема ізоформ розчинної аденілатциклази, у МХ надійно доведена для низки об'єктів. Показана генерація cAMP у матриці МХ, де цей циклічний нуклеотид, як передбачають, забезпечує спряження між утворенням  $CO_2$  в циклі трикарбонових кислот та активністю процесу окисного фосфорилування [112—115]. Розщеплення cAMP у МХ з утворенням неактивного 5'-AMP забезпечується фосфодіестеразою 2A [113, 115, 116].

Циклічний AMP, який продукується розчинною аденілатциклазою, стимулює протеїнкіназу А. Наявність протеїнкінази А (PKA) в МХ різних типів клітин у літературі ще дискутується, хоча і передбачається можливість фосфорилування протеїнів як ЕТЛ, так і матриксних метаболічних шляхів. Зокрема припускають, що PKA здійснює регуляторне фосфорилування комплексів дихального ланцюга, ключових ензимів циклу Кребса,  $\beta$ -окислення жирних кислот, катаболізму амінокислот, транспортерів ВММ, а також протеїнів, які забезпечують підтримання  $Ca^{2+}$ -гомеостазу в МХ. Процес апоптозу також керується PKA [113, 115, 117, 118]. Пригнічення фосфодіестерази 2A в МХ і відповідне зростання рівня cAMP у матриці мало наслідком посилення дихання та окисного фосфорилування [116].

Можливість регуляції синтезу NO в МХ міометрія з боку cAMP/PKA сигнальної системи не вивчалась. Для вирішення цього питання ми застосували панель загальноновживаних інгібіторів та активаторів аденілатциклази та протеїнкінази А. Зокрема, відомий активатор аденілатциклази форсколін,  $NaHCO_3$ , її селективний інгібітор KN7, а також специфічний інгібітор протеїнкінази А —

## 2.2. Синтез оксиду азоту в мітохондріях міометрія та біохімічні характеристики...

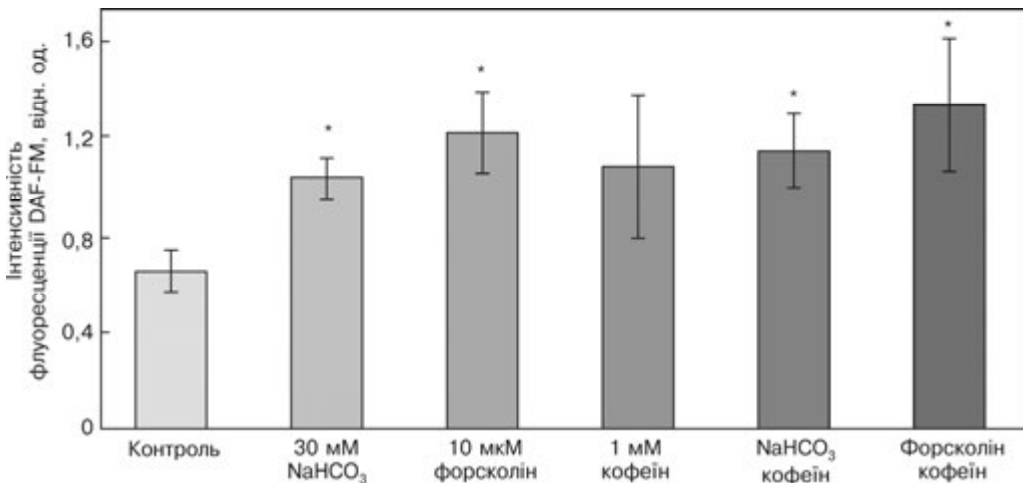
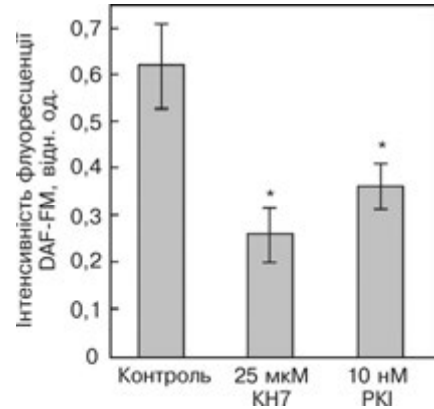
**Рис. 2.19.** Зміни інтенсивності синтезу NO за присутності КН7 та РКІ; \* — зміни вірогідні відносно контролю,  $p < 0,01$  (КН7),  $p < 0,05$  (РКІ),  $n = 7$

сполуку РКІ, яка є поліпептидом клітинного походження [113, 119—121].

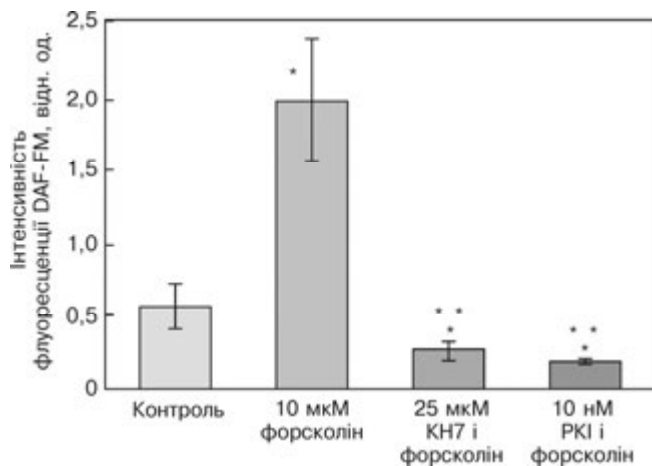
Залучення аденілатциклазного сигнального каскаду в регуляцію синтезу NO в МХ міометрія доводять такі результати. У разі пригнічення активності аденілатциклази специфічним інгібітором КН7 (25 мкМ) інтенсивність утворення NO в органелах зменшувалася приблизно вдвічі (рис. 2.19). За наявності інгібітора протеїнкінази А 10 нМ РКІ синтез NO в МХ також суттєво зменшувався.

Синтез NO в МХ підвищується за дії активаторів аденілатциклази в оптимальних концентраціях: природного  $\text{HCO}_3^-$  та рослинного лабданового терпеноїду форсколіну, а також неспецифічного інгібітора фосфодіестераз — кофеїну (рис. 2.20).

Цікавим є результат щодо стимулюючої дії форсколіну. Хоча форсколін і зв'язується з активним центром розчинної аденілатциклази, в окремих працях його стимулююча дія саме на цю ізоформу ензиму не демонструється [119, 122]. Втім, активний центр аденілатциклаз є досить консервативною структурою, що і пояснює наші результати. Цілком можлива і пряма дія форсколіну на mtNOS, оскільки терпеноїди (сапоніни, глікозиди) є активаторами NOS [123]. Однак за наявності інгібіторів аденілатциклази КН7 та протеїнкінази А РКІ у вищезазначених концентраціях активація терпеноїдом синтезу



**Рис. 2.20.** Зміни інтенсивності синтезу NO за присутності  $\text{NaHCO}_3$ , форсколіну та кофеїну;  $M \pm m$ ,  $n = 6$ , \* — зміни вірогідні відносно контролю,  $p < 0,01$  ( $\text{NaHCO}_3$ ),  $p < 0,05$  (форсколін,  $\text{NaHCO}_3$  + кофеїн, форсколін + кофеїн)



**Рис. 2.21.** Зміни інтенсивності синтезу NO за наявності модюляторів аденілатциклазного шляху. \* —  $p < 0,05$  відносно контролю, \*\* —  $p < 0,01$  відносно дії форсколіну ( $n = 4$ )

оксиду азоту не спостерігалася (рис. 2.21), що свідчить на користь залучення саме сигнального шляху сАМФ/протеїнкіназа А в активаторну дію форсколіну. Інший стимулятор  $\text{HCO}_3^-$  також зв'язується з активним центром і є специфічним саме для розчинної ізоформи аденілатциклази [119, 122].

Вивчали вплив АТР як субстрату аденілатциклази на синтез NO у МХ. У цій серії досліджень у реакційному середовищі були присутні іони Mg як кофактора аденілатциклазної реакції [122, 124]. За присутності АТР синтез оксиду азоту неістотно зростає. За наявності сполук, які підвищують рівень сАМР ( $\text{NaHCO}_3$  та кофеїн), ефект АТР посилюється (рис. 2.22). Цей результат можна пояснити як додатковою енергізацією МХ за рахунок зворотного функціонування АТР-синтази, так і зростанням продукції сАМР. Останній варіант здається більш імовірним, оскільки за відсутності активаторів утворення сАМР зростання синтезу NO при підвищенні концентрації АТР не було суттєвим.

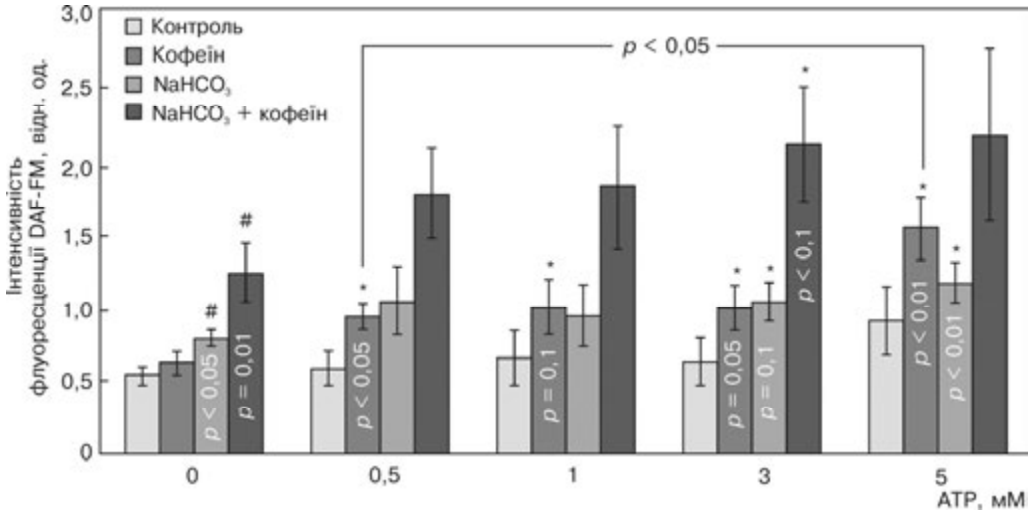
Із внесенням до середовища інкубації інгібітора конститутивних NO-синтаз L-NAME стимулюючого впливу досліджуваних сполук на синтез NO у МХ не спостерігається, що підтверджує зв'язок цих ефектів саме з активацією мітохондрійної NO-синтази (рис. 2.23).

Згідно з нашими результатами щодо дослідження синтезу оксиду азоту мітохондріями за дії модифікаторів  $\text{Ca}^{2+}$ - та DAG-залежних ізоформ протеїнкінази С цей сигнальний шлях не регулює синтез NO у МХ. Як активатор протеїнкінази С форболовий ефір (1 мкМ РМА), так і інгібітор 0,5 мкМ стауроспорин суттєво не впливали на утворення оксиду азоту МХ.

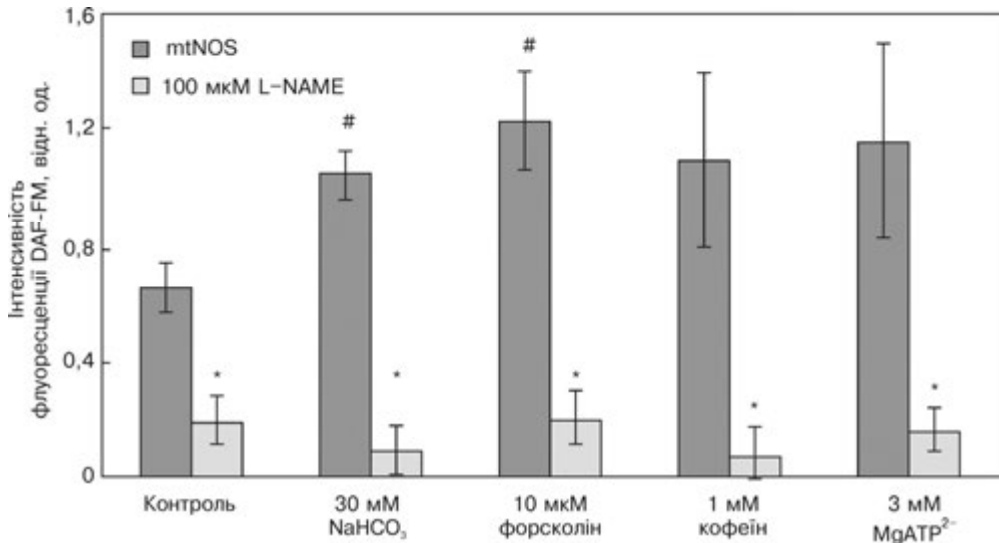
Одержані результати дають змогу передбачити залежність синтезу NO в МХ міометрія від функціональної активності розчинної аденілатциклази та можливість активаторного фосфорилування мітохондрійної NOS з боку протеїнкінази А. Припускають, що сАМР/РКА сигнальний шлях у МХ є своєрідним метаболічним сенсором, який визначає рівень окисного фосфорилування і продукцію АФК [114, 115, 125]. У цьому сенсі сАМР-залежна модуляція синтезу NO МХ може виступати важливим регулятором біоенергетики і метаболічних процесів у цих субклітинних структурах.

## 2.2. Синтез оксиду азоту в мітохондріях міомерія та біохімічні характеристики...

З урахуванням ключової ролі МХ у біоенергетиці клітини та визначенні її долі (життя чи смерть) важливими напрямками майбутніх досліджень можуть бути пошук специфічних модюляторів (активаторів/інгібіторів) активності mtNOS, регуляція її експресії та механізм трафіку до МХ, остаточне визначення субмітохондрійної локалізації ензиму, встановлення взаємозв'язку між



**Рис. 2.22.** Зміни інтенсивності синтезу NO за присутності ATP у зростаючій концентрації. Концентрація Mg<sup>2+</sup> — 3 мМ, кофеїну — 1 мМ, NaHCO<sub>3</sub> — 30 мМ.  $M \pm m$ ,  $n = 5$ . Зміни вірогідні: # — відносно контролю без діючих речовин; \* — відносно дослідів без ATP



**Рис. 2.23.** Зміни синтезу NO під впливом сполук, які підвищують рівень cAMP у мітохондріях, за присутності інгібітора конститутивних NO-синтаз L-NAME.  $M \pm m$ ,  $n = 7$ . Зміни вірогідні ( $p < 0,05$ ): # — відносно контролю без діючих речовин; \* — відносно дії модюляторів

ЕТЛ та роботою mtNOS тощо. Нез'ясованими залишаються питання впливу ендогенно синтезованого NO на інші клітинні компартменти, зокрема EP/CP навколомітохондрійної локалізації, та внесок таких клітинних джерел NO як плазмалема та ретикулум у регуляцію власне мітохондрійних процесів. У випадку гладеньком'язової тканини першочерговим завданням є з'ясування регуляторного впливу NO на  $\text{Ca}^{2+}$ -залежну скоротливу активність і роль MX у цьому процесі. Особлива увага має бути приділена значенню оксиду азоту в модуляції  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналу та  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостазу, а також біоенергетиці MX, яка забезпечує функціональну здатність ГМК.

Молекулярною основою дії оксиду азоту на контрактильну функцію гладеньких м'язів можуть бути зміни рівня іонізованого Ca в міоплазмі. Зростання концентрації іонів Ca є центральним етапом біохімічних і біофізичних подій між збудженням плазмалеми (зміною мембранного потенціалу та/або зв'язуванням лігандів) і розвитком скорочення м'язової тканини, зокрема міометрія. Зазначені процеси отримали в науковій літературі назву електро(фармако)механічне спряження. Внаслідок розповсюдження через щілинні контакти потенціалу дії в гладенькому м'язі [126, 127] відбувається деполяризація ПМ та відкриття потенціалзалежних  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів, експресія субодиниць яких у міометрії регулюється прогестероном. Іони Ca, які увійшли в міоплазму за градієнтом концентрації, викликають  $\text{Ca}^{2+}$ -індуковане вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з периферійних ділянок CP, зумовлене функціонуванням у цьому компартменті каналів чутливих до алколоїду ріанодину. У випадку фармако-механічного спряження послідовність подій між зв'язуванням відповідного ліганду (біогенні аміни, пептидні гормони) і зростанням концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в міоплазмі включає передачу сигналу через систему гетеротримерних G-протеїнів на ключовий ензим — фосфоліпазу C ( $\beta$ -ізоформу). Активація фосфоліпази C з наступним гідролізом фосфатидилінозитол-4,5-бісфосфату призводить до утворення таких вторинних месенджерів як інозитол-1,4,5-трисфосфат ( $\text{IP}_3$ ) та гідрофобний діацилгліцерол [128, 129]. Гідрофільний  $\text{IP}_3$  дифундує до периферичного ретикулума і, зв'язуючись із відповідними рецепторами-каналами ( $\text{IP}_3$ -рецептори), викликає вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  із депо, причому сам процес вивільнення є високою мірою  $\text{Ca}^{2+}$ -залежним. Діацилгліцерол шляхом активації окремих ізоформ протеїнкінази C здатний модулювати  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал. Зростання рівня  $\text{IP}_3$  в міоплазмі за дії таких агоністів як ацетилхолін або окситоцин знижує концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  в люмені CP, що ініціює так званий «пулкерований» або «ємнісний» вхід катіона у міоплазму [130—133].

Зростання концентрації іонів Ca в міоплазмі призводить до утворення його комплексу зі специфічним рецепторним білком кальмодуліном. Надалі комплекс  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулін активує кіназу легких ланцюгів міозину. Ця кіназа безпосередньо фосфорилує регуляторні легкі ланцюги (маса близько 20 кДа), наслідком чого є взаємодія важких ланцюгів із актином з подальшою активацією контрактильного апарату. Зворотній процес дефосфорилування здійснює фосфатаза легких ланцюгів міозину [128, 129, 134]. Процес дефосфорилування додатково регулюється Rho-кіназою, яка пригнічує фосфатазну активність шляхом фосфорилування ензиму за залишками тирозину [135—139].

Фундаментальною причиною розслаблення гладенького м'яза є зниження концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в міоплазмі, яке зумовлене процесами енергозалежного

## **2.2. Синтез оксиду азоту в мітохондріях міометрія та біохімічні характеристики...**

---

транспорту катіона, де задіяні іонні помпи та обмінники ПМ, СР і МХ [128, 130, 140, 141]. Плазмалема містить транспортну  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТразу (PMCA) та NCX —  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник, який працює за рахунок енергії градієнта  $\text{Na}^+$ , а отже, за фізіологічних умов абсолютно залежить від функціонування  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТрази. На рівні сарко(ендо)плазматичного ретикулула локалізована ще одна транспортна  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза (SERCA-помпа) [128, 130, 141]. У МХ розташований  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортер, який акумулює  $\text{Ca}^{2+}$  в матрикс за електрофоретичним механізмом через досить високу різницю потенціалів на внутрішній мембрані мітохондрій, яка може сягати  $-180$  мВ (зі знаком « $\rightarrow$ » з боку матриксу) [75, 76, 142].

Отже, зростання концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в міоплазмі є першою і основною умовою розвитку констрикції. У зв'язку з інтенсивним дослідженням значення оксиду азоту або його похідних (активні форми азоту) в механізмах розслаблення гладеньких м'язів окремі наукові колективи вивчають роль NO в  $\text{Ca}^{2+}$ -залежній регуляції скорочення-розслаблення міометрія.



## СА<sup>2+</sup>-ГОМЕОСТАЗ У КЛІТИНАХ ГЛАДЕНЬКОГО М'ЯЗА І ЙОГО РЕГУЛЯЦІЯ ОКСИДОМ АЗОТУ

### 3.1. Загальна характеристика процесів збудження і скорочення гладеньком'язових клітин

Іони кальцію забезпечують протікання багатьох фізіологічних процесів: скорочення-розслаблення м'язів, нейропередача та пластичність синапсів, секреція гормонів, згортання крові, проліферація, диференціювання клітин тощо. В позаклітинному середовищі концентрація вільного іонізованого кальцію підтримується на рівні 1–3 мМ. У цитозолі клітин цей показник ( $[Ca^{2+}]_i$ ) на декілька порядків нижчий. У скелетному м'язі у стані спокою  $[Ca^{2+}]_i$  знаходиться на рівні 130 нМ, при скороченні може зростати до 1–10 мкМ, у ГМК судин та клітинах ендотелія  $[Ca^{2+}]_i$  сягає менше 100 нМ у спокої та зростає до 1 мкМ протягом активації. В нейронах  $[Ca^{2+}]_i$  знаходиться близько 200 нМ, за електричної стимуляції зростає до 100 мкМ. У клітинах міометрія  $[Ca^{2+}]_i$  у спокої сягає 150 нМ. Субклітинні компартменти, зокрема ЕР/СР та МХ, є внутрішньоклітинними Са<sup>2+</sup>-депо і містять різну концентрацію катіона в активному стані та стані спокою. Наприклад, рівень іонізованого Са<sup>2+</sup> в ЕР знаходиться в межах 250–600 мкМ, що в десятки разів перевищує його концентрацію в цитозолі. МХ діють як буферні системи завдяки здатності поглинати Са<sup>2+</sup> в ділянках цитозолу, де розташовані Са<sup>2+</sup>-канали ПМ та ЕР, а локальний рівень вільного Са<sup>2+</sup> може сягати десятків і навіть сотень мкМ. Поглинаючи Са<sup>2+</sup>, МХ запобігають Са<sup>2+</sup>-залежній інактивації каналів, а збільшення концентрації Са<sup>2+</sup> в матриксі стимулює енергетичні процеси. Надлишкове зростання рівня Са<sup>2+</sup> в цитозолі внаслідок порушення механізмів підтримання його внутрішньоклітинного гомеостазу призводить до стресу ЕР, дисфункції МХ, порушення бар'єрної функції ПМ та загибелі клітин [1–3].

Потенціал спокою ПМ міоцитів матки знаходиться в межах –35÷–80 мВ залежно від функціонального стану і забезпечується перерозподілом Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> і Са<sup>2+</sup> в міоплазмі та позаклітинному середовищі. Na<sup>+</sup>-канали відкриваються, коли електричний потенціал на плазмалемі знижується до –30 мВ, проводять швидкі деполяризуючі струми, що посилює відповідь на дію агоністів, та забезпечують швидке розповсюдження потенціалу дії в міометрії. Na<sup>+</sup>-канал інактивується при наближенні значення електричного потенціалу до 0 мВ на ПМ. Ці структури ідентифіковано в міометрії вагітних мишей та людини [4–8].

У підтриманні потенціалу спокою на ПМ ГМК та поверненні в цей стан суттєва роль належить Са<sup>2+</sup>-активованим K<sup>+</sup>-каналам високої провідності (BK<sub>Ca</sub>), які лімітують збудження шляхом посилення виходу іонів K (мають провідність близько 200 пСм) з клітини за підвищення локальної концентра-

ції  $\text{Ca}^{2+}$  (мкМ) у субсарколемних ділянках міоплазми, спричиненого деполяризацією чи дією агоністів. Інгібування  $\text{K}^+$ -каналів призводить до деполяризації та активації потенціалкерованих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів [6, 7, 9].  $\text{VK}_{\text{Ca}}$  мають тетрамерну структуру, яка включає чотири пороутворювальні  $\alpha$ -субодиниці та допоміжні  $\beta$  та  $\gamma$ -субодиниці, що модулюють властивості каналу.  $\alpha$ -Субодиниця містить 7 трансмембранних сегментів (S0—S6) та великий (близько 800 амінокислотних залишків) С-кінцевий цитоплазматичний фрагмент. S1—S4 трансмембранні сегменти утворюють потенціалчутливий домен, сегменти S5—S6 складають пороутворювальний (або воротний) домен, який контролює проникнення іонів у відповідь на різні стимули. Позаклітинний N-кінець S0-сегмента та С-кінцевий цитоплазматичний домен визначають чутливість до лігандів [10, 11]. Хоча зв'язування з  $\text{Ca}^{2+}$  призводить до відкриття каналу, його активація зміною електричного потенціалу та  $\text{Ca}^{2+}$  існують як два паралельних механізми регуляції.

С-кінцевий цитоплазматичний домен становить 2/3 всієї довжини  $\alpha$ -субодиниці і має два сайти, які виступають регуляторами провідності каналу (RCK1 та 2). RCK2 включає дві  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язувальні ділянки, що містять “EF-hand” послідовності ( $\alpha$ -спіраль — петля —  $\alpha$ -спіраль), які при зв'язуванні з катіоном забезпечують відповідні конформаційні зміни і сприяють відкриттю каналу [12]. Ділянка RCK1 зазнає пре-мРНК-сплайсингу та посттрансляційних модифікацій, що розширює діапазон регуляторних впливів [11, 13, 14].

У зв'язку з низьким афінітетом RCK-сайтів до  $\text{Ca}^{2+}$  (близько 10 мкМ)  $\text{VK}_{\text{Ca}}$  часто асоційовані з  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами L-типу в ділянках кавеол; передбачають їх взаємодію з кавеоліном 1 та 2 в ГМК та кавеоліном 3 в скелетному м'язі, а також протеїнами цитоскелета [13, 15, 16]. Активність каналу регулюється низкою протеїнкіназ — тирозинових кіназ (Src-, JAK-родин) [17, 18], серин/треонінових (PKA, PKC, CaMKII та PKG) [13, 19—25]. Показана активація  $\text{VK}_{\text{Ca}}$  іонами Mg у мілімолярних концентраціях шляхом електростатичної взаємодії катіона з потенціалчутливим доменом каналу, який перебуває в активованому стані [11, 14].

У ГМК матки, окрім  $\text{VK}_{\text{Ca}}$ , представлені такі підтипи  $\text{K}^+$ -каналів:  $\text{Ca}^{2+}$ -залежні  $\text{K}^+$ -канали низької провідності ( $\text{SK}_{\text{Ca}}$ ), потенціал- ( $\text{K}_v$ ) та АТР-залежні ( $\text{K}_{\text{АТР}}$ )  $\text{K}^+$ -канали [7, 26—28]. У міометрії також ідентифіковано  $\text{Na}^+$ -активовані  $\text{K}^+$ -канали високої провідності (SLO2.1), які підтримують потенціал спокою мембрани міоцитів і є нечутливими до тетраетиламонію. Цей тип каналів інгібується при зв'язуванні окситоцина з рецепторами, що веде до деполяризації, активації потенціалкерованих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів та входу  $\text{Ca}^{2+}$  в міоцити. Припускають, що інгібування SLO2.1 може бути одним з механізмів регуляції скорочення матки наприкінці вагітності [29].

$\text{Ca}^{2+}$ -активовані  $\text{Cl}^-$ -канали відіграють роль у спонтанних та агоніст-стимульованих скороченнях міометрія [7, 30].

Нерівноважні концентрації  $\text{Na}^+$  та  $\text{K}^+$  на ПМ підтримуються завдяки функціонуванню  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРази, помпи Р-типу, яка транспортує проти концентраційного градієнта 2  $\text{K}^+$  (в цитозоль) на 3  $\text{Na}^+$  (в позаклітинне середовище) за рахунок енергії гідролізу АТР. Цей ензим бере безпосередню участь в підтриманні потенціалу спокою, регуляції проліферації, диференціювання та об'єму клітин [31—33]. Останні ефекти зумовлені об'єднанням у сигналоному (сиг-

нальний модуль) на ПМ  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази з елементами тирозинкіназних сигнальних систем.

$\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза являє собою комплекс з 3 субодиниць ( $\alpha$ ,  $\beta$  та  $\gamma$ ):  $\alpha$ -субодиниця представлена ізоформами 1-4,  $\beta$ -субодиниця — ізоформами 1-3. Субодиниця  $\alpha$  має молекулярну масу 100—113 кДа і утворює 10 трансмембранних доменів (M1—M10), N- та C-кінці поліпептидного ланцюга розташовані з боку цитозолу. Вона відповідає за транспорт  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  та зв'язування з АТР. Субодиниця  $\beta$  (масою близько 60 кДа) перетинає мембрану один раз, N-кінець знаходиться поза клітиною, взаємодіє з  $\alpha$ -субодиницею, стабілізує та забезпечує її транслокацію з CP у ПМ. Не виключають роль  $\beta$ -субодиниці в гідролізі АТР, транспорті іонів та зв'язуванні кардіоглікозиду убаїну. Субодиниця  $\gamma$  взаємодіє з C-кінцевим доменом  $\alpha$ -субодиниці та відповідає за зв'язування убаїну [34—36]. Існує багато доказів того, що убаїн є стероїдним гормоном, який синтезується у ссавців в адренальному кортексі (adrenal cortex) та гіпоталамусі і, взаємодіючи з  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРазою як рецептором, ініціює передачу клітинного сигналу [37].

У ГМК судин, кардіоміocyтах ізоформа  $\alpha 1$  розташована в ПМ відносно рівномірно і є конститутивним ензимом. Ізоформи  $\alpha 2/\alpha 3$  експресуються у відповідь на стимулювання агоністами і в ПМ солокалізуються з  $\text{Na}^+ \text{-Ca}^{2+}$ -обмінником та ділянками периферійного CP, беручи участь у формуванні мікродоменів для ефективного контролю локальної концентрації  $\text{Na}^+$  та  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозолі у субплазмалемному регіоні. Ізоформи  $\alpha 1$  та  $\alpha 2$  експресуються в ГМК судин приблизно у співвідношенні 7:3 [32, 37]. Вони мають різну чутливість до убаїну, наприклад, у гризунів  $\alpha 1$  ізоформа відносно не чутлива до дії убаїну. Ізоформа  $\alpha 2$  відіграє важливу роль в підтриманні судинного тону.

Зв'язування з убаїном ізоформи  $\alpha 1$  ініціює сигнальний шлях, пов'язаний з активацією мембраноасоційованих нерцепторних тирозинових кіназ (Src-кіназ), що запускає клітинну проліферацію, впливає на гомеостаз  $\text{Ca}^{2+}$  (зокрема активує  $\text{Ca}^{2+}$ -канали L-типу) та посилює скоротливу активність судин. У первинній послідовності ізоформи  $\alpha 1$  ідентифіковано 20 амінокислотних залишків, відповідальних за взаємодію із Src-кіназою. Крім того, доведено взаємозв'язок  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази з фосфатидилінозитол-3-кіназою (PI3-кіназою), що ініціює активацію Akt/PKB сигнального шляху [32, 37].

Показаний тісний зв'язок між  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРазою, а саме специфічного мотиву на N-кінці, та  $\text{IP}_3$ -рецепторами CP ( $\text{IP}_3\text{R}$ ), взаємодія між якими посилюється за присутності убаїну та індукує осциляції  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозолі. Крім того, центральна петля ізоформи  $\alpha 1$  взаємодіє з фосфоліпазою C  $\gamma 1$ , викликаючи генерацію  $\text{IP}_3$  та діацилгліцеролу, формуючи разом з  $\text{IP}_3\text{R}$   $\text{Ca}^{2+}$ -регуляторний комплекс [32].

Таким чином, електричний потенціал на ПМ міоцитів підтримується за рахунок функціонування низки каналів, переважно  $\text{K}^+$ -провідності, та  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази. Деполяризація передувє скороченню ГМК, що супроводжується змінами концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в міоплазмі.

В основі процесу зростання концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в міоплазмі клітин гладеньких м'язів лежить його пасивний транспорт за хімічним градієнтом із поза- та внутрішньоклітинних пулів. Водночас взаємоузгоджене функціонування помп та катіонних обмінників ПМ, CP і MX забезпечує підтримання трансмемб-

### 3.1. Загальна характеристика процесів збудження і скорочення...

ранного градієнта  $\text{Ca}^{2+}$ , що є необхідним для виконання ним сигнальних та регуляторних функцій [2—3, 38—44].

За електромеханічного спряження (ЕМС) деполяризація ПМ у клітинах ГМ призводить до активації потенціалкерованих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів (VOCC), зокрема в міометрії найбільш репрезентований їхній L-тип (чутливий до дигідропіридинів). За фармакомеханічного спряження (ФМС) активуються рецепторкеровані  $\text{Ca}^{2+}$ -канали (ROCC) при зв'язуванні відповідних лігандів (нейромедіаторів, гормонів, цитокінів). У міометрії, як в інших типах ГМ, до ФМС залучаються  $\text{Ca}^{2+}$ -канали, керовані вторинними месенджерами (SMOCC), зокрема cAMP і cGMP,  $\text{IP}_3$ , DAG. За певних умов зростання  $\text{Ca}^{2+}$  в міоплазмі може зумовлюватись реверсним режимом функціонування  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника ПМ [1, 6, 45—47].

Іони Ca, які увійшли у міоплазму за градієнтом концентрації, спричинюють  $\text{Ca}^{2+}$ -індуковане вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  (CICR) крізь р'янодин-чутливі канали CP (канали р'янодинового рецептора, RyR) [3, 39, 44, 47, 48]. За дії на міоцити ацетилхоліну, окситоцину, факторів росту пасивний транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  із CP індукується  $\text{IP}_3$ , який утворюється внаслідок гідролізу фосфатидилінозитол-4,5-бісфосфату фосфоліпазою C ( $\beta$ - або  $\gamma$ -ізоформами). Зростання рівня  $\text{IP}_3$  знижує концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  в люмені CP, що індукує пулкерований транспорт катіона (SOCE) у міоцити, чутливий до низьких концентрацій лантанодів [1, 3, 6, 16, 49—51].

Зростання концентрації вільного  $\text{Ca}^{2+}$  призводить до взаємодії катіона з кальмодуліном (формується комплекс  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM). Комплекс  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM зв'язується з відповідним сайтом кінази легких регуляторних ланцюгів міозину (MLCK) з наступним фосфорилуванням останніх та активацією скорочення. Зворотня реакція здійснюється фосфатазою легких ланцюгів міозину (MLCP) та призводить до розслаблення м'яза [6, 7, 47, 52]. В умовах низької концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  фаза підтримання сили скорочення зумовлюється стимулюванням Rho-кінази, яка активується в процесі зв'язування цитокінів або деполяризації [53, 54]. За дії відповідних лігандів у процес передачі сигналу залучається фактор обміну гуанінових нуклеотидів (GEF, guanine nucleotide exchange factor), який стимулює заміну в активному центрі малого G-білка Rho GDP на GTP, що має наслідком його активацію з подальшою стимуляцією Rho-кінази [16, 55—59]. Це призводить до інгібування фосфатази легких ланцюгів міозину шляхом її фосфорилування Rho-кіназою за залишками тирозину. Rho-кіназа активується також комплексом  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM. Таким чином, роль іонів Ca полягає в активації кінази легких ланцюгів міозину та Rho-опосередкованому інгібуванню фосфатази легких ланцюгів міозину.

Зниження концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в міоплазмі ГМК, і міометрія зокрема, забезпечують системи активного транспорту:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ та CP,  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник ПМ, а також  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортер внутрішньої мембрани МХ, який транспортує  $\text{Ca}^{2+}$  в матрикс за електрофоретичним механізмом [2, 3, 16, 38—42, 60, 61].

У клітинах гладеньких м'язів основними шляхами регуляції контрактильної функції з боку NO можуть бути його вплив на мембранні транспортні системи, які контролюють  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаз, та модуляція активності протеїнів, що забезпечують роботу скоротливого апарату [2, 38, 47].

### 3.2. Системи пасивного транспорту $\text{Ca}^{2+}$ в міоцитах

#### Потенціалкеровані $\text{Ca}^{2+}$ канали L- та T-типу плазматичної мембрани

У міометрії потенціалкеровані  $\text{Ca}^{2+}$ -канали (voltage-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels, VOCC) представлені L- та T-типами.  $\text{Ca}^{2+}$ -канали T-типу (транзйентні) низькопорогові, чутливі до малих змін електричного потенціалу, для них характерна швидка кінетика активації/інактивації [1, 62]. У міометрії наявні три ізоформи ( $\alpha_{1G}$ ,  $\alpha_{1H}$ ,  $\alpha_{1I}$ ) та кілька сплайс-варіантів каналів T-типу. Припускають, що початкова деполяризація ПМ зумовлює активацію T-каналів, що забезпечує зміну потенціалу, достатню для відкриття каналів L-типу [2]. Показано зростання експресії цих каналів за вагітності [63].

$\text{Ca}^{2+}$ -канали L-типу (long lasting), дигідропіридин-чутливі, дигідропіридинові рецептори — це високопорогові канали з максимальною активацією при значеннях мембранного потенціалу від 0 до +20 мВ, забезпечують тривале і масоване надходження  $\text{Ca}^{2+}$  (провідність 15—25 пСм), відносно повільно та потенціалзалежно інактивуються. Канали закриваються, коли мембрана гіперполяризована, або в результаті додаткової  $\text{Ca}^{2+}$ -залежної інактивації (характерно для ГМ), що перешкоджає перевантаженню міоцитів  $\text{Ca}^{2+}$ . Фармакологічна блокада  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів L-типу призводить до розслаблення міометрія. Інгібуються ці структури 1,4-дигідропіридинами (ніфедипін, нітредипін та інші) та фенілалкіламінами (верапаміл та D-600), бензодіазепінами, а також дво- і тривалентними катіонами ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ). Канали L-типу мають високу селективність до  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ , але за відсутності в середовищі двовалентних катіонів починають пропускати також  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Cs}^+$  [6, 7, 40, 64].

Канали L-типу складаються з п'яти субодиниць ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), з яких основною каналоформуальною є  $\alpha_1$ -субодиниця, що містить чотири повторювані домени, кожен з яких утворений шістьма трансмембранними сегментами ( $S_1$ — $S_6$ ). Сенсор потенціалу знаходиться в  $S_4$  сегменті. Субодиниці  $\alpha_2$  та  $\delta$  забезпечують експресію каналу на поверхні ПМ,  $\beta$ -субодиниця перешкоджає убіквітинуванню та протеосомній деградації протеїнів каналу. В ГМК  $\alpha_1$ -субодиниця представлена сплайс-варіантом  $\alpha_{1C-b}$  [7, 40, 65]. Зі збільшенням терміну вагітності спостерігається підвищення експресії  $\alpha_1$ -субодиниці в міометрії людини, шурів та мурчаків, зменшується рівень цього протеїну під час пологів з одночасним зростання експресії  $\beta$ -субодиниці [7].

#### Рецептор- та пулкеровані $\text{Ca}^{2+}$ канали плазматичної мембрани

Іншим механізмом активації надходження  $\text{Ca}^{2+}$  в міоцити є зв'язування агоністів (окситоцин, ендотелін, простагландин  $F_{2\alpha}$ , ацетилхолін) з рецепторами на ПМ, які зв'язані з сигнальними шляхами опосередковано гетеротримерними G-протеїнами. У деяких випадках G-протеїни здатні безпосередньо регулювати активність спряжених з ними  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів. Такі канали належать до рецепторкерованих (ROCC). Інші підтипи G-протеїнів активують фосфоліпазу C ( $\beta$ ), яка гідролізує мембранний фосфатидилінозитол-4,5-бісфосфат

( $\text{PIP}_2$ ), з утворенням двох вторинних месенджерів —  $\text{IP}_3$  та DAG.  $\text{IP}_3$  стимулює вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з СР і спустошення пулу цього катіона, що призводить до зростання  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозолі [6, 7, 52]. Пулкеровані  $\text{Ca}^{2+}$  канали (store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels, SOCCs) мають суттєве значення у фізіології гладеньких м'язів. Після спустошення люмену СР SOCCs забезпечують ємнісний або пулкерований вхід  $\text{Ca}^{2+}$  (store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry, SOCE), що сприяє підвищенню його рівня в міоплазмі та перезаповненню СР.

Спустошення СР спостерігається в умовах зростання рівня  $\text{IP}_3$  або штучного інгібування  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи СР, зокрема тапсигаргіном або циклопіазонієвою кислотою [2, 40, 52, 66, 67]. У СР ідентифікований трансмембранний протеїн STIM1 (stromal interaction molecule-1), який чутливий до концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в люмені СР: при зменшенні концентрації катіона в люмені  $\text{Ca}^{2+}$  дисоціює від STIM1, що змінює його конформацію. Надалі STIM1 взаємодіє з каналоформувальною субодиницею протеїну Orai 1 на ПМ, з утворенням та активацією SOCCs, які забезпечують стійке підвищення  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозолі. Ці канали не є потенціалкерованими, мають невисоку провідність (фентасіменси), але сприяють значному зростанню концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  та підтримують амплітуду коливань катіона в цитозолі. Вони інактивуються за умови заповнення внутрішньоклітинних компартментів кальцієм та зниження рівня  $\text{IP}_3$  [1, 3, 6, 7, 47, 68—70].

Згідно з іншою точкою зору, пулкерований вхід  $\text{Ca}^{2+}$  забезпечується каналами родини TRP (TRPCs, transient receptor potential channels). Це неспецифічні катіонні канали (з провідністю 2—3 пСм), проникні для  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  та інших катіонів у ПМ ГМК, які взаємодіють з STIM1. Більшість TRPCs складається з різних субодиниць, що об'єднані в гетеротетрамерні структури [2, 31, 47, 67, 71]. З використанням антитіл до TRPC1 було показано локалізацію цього протеїну в ПМ ГМК судин; зв'язування антитіла з протеїном блокувало пулкеровану  $\text{Ca}^{2+}$ -каналну активність [40, 64]. У ГМК матки експресуються різні ізоформи TRPCs (TRPC 1—7) [7].

У міометрії за вагітності SOCE, можливо, забезпечує збільшення амплітуди та тривалості агоніст-індукованих скорочень, пролонгацію потенціалів дії тощо. Існують відомості, що наприкінці вагітності роль SOCCs у міометрії зростає та посилюється експресія TRPCs [7, 70, 72—74].

#### **$\text{Ca}^{2+}$ -канали сарко(ендо)плазматичного ретикулума**

Саркоплазматичний ретикулум у ГМК матки завдяки відносно низькій синтетичній активності тканини займає лише близько 6 % загального клітинного об'єму. Втім його функціональне значення в регуляції  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостазу та скоротливої активності досить важливе. Фрагменти СР, розташовані в тісному контакті з сарколемою, забезпечують векторний транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  до ПМ, а ділянки, розміщені в глибині міоцита, спрямовують  $\text{Ca}^{2+}$  до контрактильного апарату. Об'єм СР під час вагітності зростає, що свідчить про його фізіологічну значущість [75—77]. У люмені СР  $\text{Ca}^{2+}$  переважно знаходиться в комплексі з протеїнами кальретикуліном, кальсеквестрином та іншими, які виконують буферну та сенсорну функцію відносно  $\text{Ca}^{2+}$  [6, 46, 72, 78, 79].

Інозитол-1,4,5-трисфосфат-чутливі рецептори ( $\text{IP}_3$ -receptors,  $\text{IP}_3\text{Rs}$ ) у ГМК матки є головними  $\text{Ca}^{2+}$ -звільнюючими каналами  $\text{CP}$  [41]. Існують три ізоформи рецептора —  $\text{IP}_3\text{R1}$ -3, усі вони знайдені і в міометрії, де переважаючою є  $\text{IP}_3\text{R3}$ -ізоформа [42, 80, 81].  $\text{IP}_3\text{R}$  являє собою гомотетрамер з молекулярною масою мономера  $\sim 300$  кДа, субодиниці якого формують  $\text{Ca}^{2+}$ -пору. Сайт, що зв'язує  $\text{IP}_3$  — щілина, збагачена на залишки аргініна та лізіна, які взаємодіють з трьома негативно зарядженими фосфатами  $\text{IP}_3$ . Канал асоційований з низкою протеїназ (РКВ, РКА) та зв'язує  $\text{MgATP}^{2-}$ , які регулюють його активність. Інгібіторами транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  через цю структуру є рутенієвий червоний (RuR), гепарин, декаванадат, ксестоспондін, аміноетоксидифенілборат тощо [6, 40, 46, 64, 81].

Для  $\text{IP}_3\text{R}$  характерна регуляція цитозольним  $\text{Ca}^{2+}$  з біфазною залежністю відкриття каналу від концентрації катіона: канал активується при підвищенні  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  до  $\sim 300$  нМ, за вищої концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  активність каналу зменшується [40, 41].

Значення DAG у міометрії наразі не є однозначно з'ясованим, але показана DAG-залежна активація відповідних ізоформ РКС, що має наслідком інгібування фосфоліпази С (негативний зворотний зв'язок) та активацію протеїнофосфатази  $\text{CP}\text{I}$ -17, факторів транскрипції та синтезу простагландинів [44, 82]. DAG відводиться також участь в інтерналізації та деградації рецепторів окситоцину [2].

Ріанодинові рецептори (ryanodine receptor, RyR) — це канали, які активуються рослинним алкалоїдом ріанодином у наномолярних концентраціях, а за фізіологічних умов — мікромолярними концентраціями іонів  $\text{Ca}$ , що викликає  $\text{CICR}$  з  $\text{CP}$  [66]. RyR — це гомотетрамери з молекулярною масою мономера  $\sim 500$  кДа. Ідентифіковано три ізоформи RyR: RyR1 (скелетні м'язи), RyR2 (серцевий м'яз), RyR3 (нервова тканина), які різняться різною чутливістю до модуляторів: АТФ, АДФ, АМФ, сАМФ, аденін, сАДФ-рибоза, кофеїн, сурамін тощо [6, 46, 78, 79]. Усі три форми виявлено в міометрії. RyR3 є домінуючою ізоформою (принаймні в міометрії миші), рівень експресії RyR2 регулюється протягом вагітності [79, 83, 84]. Кофеїн призводить до посилення транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  з  $\text{CP}$  через канали RyR. Втім, характерною особливістю міометрія є відсутність кофеїнової контрактури. В деяких дослідженнях демонструється, що кофеїн не стимулює вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з  $\text{CP}$  у міометрії людини та щурів, а розслаблення тканини міометрія за аплікації кофеїном пов'язане з інгібуванням фосфодіестерази та відповідним зростанням рівня сАМФ [7, 75]. Водночас на моделі пермеабілізованих дигітоніном міоцитах невагітної матки щурів показана стимуляція вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з  $\text{CP}$  за дії кофеїну [85]. Активність каналу регулюється цитоплазматичними РКА, РКГ, СаМКП [6]. RyRs специфічно блокуються ріанодином у мікромолярних концентраціях, інгібувальний ефект також проявляють RuR, неоміцин, двовалентні катіони ( $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) [6, 40, 46].

Для RyR характерна біфазна залежність від  $\text{Ca}^{2+}$ : стимулювання за відносно низьких концентрацій катіона ( $\sim 10$  мкМ) та інгібування за його високих концентрацій ( $> 100$  мкМ), що може призводити до  $\text{Ca}^{2+}$ -залежної термінації активності RyR. Така біфазність пояснюється існуванням стимулювального та інгібувального  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язувальних сайтів з різною спорідненістю до катіона [6, 41, 86].

Припускають, що на ранніх стадіях вагітності функціональна роль РКС, Rho-кінази та TRPC невисока і головну роль в підтриманні концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  відіграють  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальні системи CP, зокрема SERCA (2 ізоформа). З терміном вагітності зростає роль сигнального шляху рецептор/G-протеїни/фосфоліпаза C, що наприкінці вагітності сприяє окситоцин-індукованому скороченню міометрія за участю  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів L-типу,  $\text{IP}_3\text{Rs/RyRs}$ , SOCCs (TRPCs) [2, 75, 87, 88].

### 3.3. Системи енергозалежного транспорту $\text{Ca}^{2+}$ в клітинах гладеньких м'язів

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

#### $\text{Ca}^{2+}$ -помпа плазматичної мембрани

$\text{Ca}^{2+}$ -помпа ПМ або PMCA (plasma membrane calcium-transporting ATPase) має молекулярну масу близько 140 кДа і застосовує енергію гідролізу АТФ для транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  із клітини проти значного градієнта концентрації, який існує на ПМ [89, 90]. Наведено докази, що після транз'єнтного зростання  $\text{Ca}^{2+}$  в міоплазмі близько 70 % його виводиться з клітини саме PMCA, а інші 30 % — за рахунок функціонування помпи CP та  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника ПМ [7, 63, 91, 92].

У результаті  $\text{Mg}^{2+}$ -залежного гідролізу однієї молекули АТФ PMCA транспортує один іон  $\text{Ca}^{2+}$  з цитозолу в позаклітинне середовище з одночасним перенесенням у протилежному напрямку іона водню, тобто працює як електрогенна система [89, 93, 94].  $\text{Ca}^{2+}$ -помпа компенсує пасивний потік кальцію, який завжди спрямований до міоцитів у стані спокою, а також видаляє з клітини  $\text{Ca}^{2+}$  після м'язового скорочення, забезпечуючи фізіологічну концентрацію іонів  $\text{Ca}^{2+}$  в ГМК на рівні  $10^{-8}$ — $10^{-7}$  М [39, 89, 95—97]. Її електрогенність може слугувати фактором підтримання потенціалу спокою на ПМ, а котранспорт протона — створенню локальних присарколемних ділянок зі зниженим рН, що може змінювати спорідненість  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язувальних протеїнів до  $\text{Ca}^{2+}$  внаслідок конкуренції  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{H}^+$  [92]. Зокрема, закислення присарколемних ділянок міоплазми зменшує активність  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів L-типу [98, 99]. Доведено пряму кореляцію між силою скорочення міометрія та змінами рН міоплазми: чим сильніше скорочення, тим більше закислення міоплазми та ефективніше подальше розслаблення. Це може запобігати гіпоксичному ушкодженню матки та плоду під час пологів. Водночас підвищення позаклітинного рН супроводжується зростанням амплітуди коливань  $\text{Ca}^{2+}$  в міоплазмі та сили скорочень [2, 99]. Згідно з цими міркуваннями, PMCA відіграє суттєву роль в регуляції рН міоплазми та позаклітинного середовища і, через це, контрактильної активності.

PMCA належить до АТФаз Р-типу, для яких характерно утворення проміжного фосфорильованого інтермедіату в каталітичному циклі. Відомо чоти-



ри ізоформи РМСА та кілька сплайс-варіантів. У міометрії ідентифіковані 1, 2b та 4 ізоформи ензиму [2, 7,63,81]. Експресія РМСА в міометрії зростає наприкінці вагітності, що вказує на її важливу роль в забезпеченні скорочення-розслаблення міоцитів під час пологів [2, 100].

Молекула РМСА містить 10 трансмембранних сегментів, які з'єднані на зовнішній поверхні мембрани невеликими поліпептидними петлями. З цитоплазматичного боку знаходиться близько 80 % ензиму: поліпептидний ланцюг утворює дві великі гідрофільні петлі між другим та третім, четвертим та п'ятим трансмембранними фрагментами. Перша петля відповідає за спряження гідролізу АТР з транслокацією іона Са, друга — за утворення проміжного фосфорильованого продукту та містить АТР-зв'язувальний сайт. Ділянка фосфорилування наближується до сайту зв'язування АТР за допомогою шарнірної вставки [92]. У С-кінцевій частині ензиму зосереджений СаМ-зв'язувальний (або аутоінгібувальний) сайт та місця регуляторного фосфорилування ензиму РКА та РКС, яке підвищує її активність. Взаємодія  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРазі з  $\text{Ca}^{2+}$ -СаМ призводить до зростання спорідненості ензиму до іонів Са,  $\text{Ca}^{2+}$ -СаМ також підвищує швидкість гідролізу АТР та транспорту катіона [12, 101, 102]. Взаємодія СаМ-зв'язувальної послідовності (за відсутності СаМ) з відповідними ділянками ензиму призводить до аутоінгібування  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРазі [103, 104]. С-кінцевий фрагмент також містить PDZ-домен, який полегшує димеризацію РМСА з подальшим підвищенням її активності. Цей домен забезпечує взаємодію з nNOS, протеїнами цитоскелета та бере участь в утворенні сигнальних комплексів [105].

Питома активність  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРазі в препаратах сарколеми міометрія дуже низька (одиниці мкМоль  $\text{P}_i$ /мг протеїну за годину). Солюбілізована і очищена методом афінної хроматографії на СаМ-сефарозі  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРаза з ПМ клітин міометрія має питому активність до 100 мкМоль  $\text{P}_i$ /мг протеїну за годину, гідролізує тільки АТР і, реконструйована в азолектинові ліпосоми, забезпечує активний  $\text{Mg}^{2+}$ , АТР-залежний транспорт іонів Са [89, 106—108].

Значення константи спорідненості за  $\text{MgATP}^{2-}$  для очищеної солюбілізованої РМСА міометрія близько 0,56 мМ, максимальна активність ензиму спостерігається при концентрації іонів Са 5—29 мкМ, значення константи активації за  $\text{Ca}^{2+}$  становить 0,17 мкМ [107]. Оптимальне значення рН для солюбілізованого ензиму 7,5—8,0, для  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРазі в мембранному препараті — 6,4—7,0 [107, 109]. Оптимальна температура для солюбілізованої РМСА міометрія близько 40 °С. Енергія активації  $E_a$  АТР-гідролізної реакції, що каталізується цим ензимом, становить 56,4 кДж/моль [110].

Основними неспецифічними необоротними інгібіторами транспортної РМСА є п-хлормеркурібензоат та іони La, оборотними інгібіторами є ортованадат та еозин Y [111, 112]. Показано інгібуючий вплив утеротоніків окситоцину та простагландину  $\text{F}_{2\alpha}$  на активність РМСА міометрія [89, 113—115]. Єдиними відомими на сьогодні відносно специфічними інгібіторами РМСА є пептиди класу калоксинів, які зв'язуються з позаклітинними петлями ензиму [116—119]. Найбільший інтерес викликає калоксин 2A1, який селективно зв'язується з другою зовнішньоклітинною петлею, але високий коефіцієнт інгібування ставить під сумнів його практичне застосування [116, 117].

Згідно з останніми результатами, досить перспективним інгібітором РМСА може виступати калікс[4]арен С-90 та його похідні [94, 120]. Зокрема, він специфічний щодо РМСА принаймні на рівні катіонтранспортувальних систем ПМ та має низьку константу інгібування (у мікромольному діапазоні концентрацій).

#### **$\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник плазматичної мембрани**

$\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник ПМ або англійською NCX ( $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -exchanger) є мембраноасоційованим антипортером, включає 938 амінокислотних залишків та складається з дев'яти трансмембранних доменів (у ссавців відомо п'ять його ізоформ). Це приклад вторинно-активного транспорту, який використовує енергію електрохімічного градієнта  $\text{Na}^+$ , створеного  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТРазою [7]. За різними даними для міомерія стехіометрія обміну становить  $1\text{Ca}^{2+}/2\text{Na}^+$  (електронейтральний) [95] або  $1\text{Ca}^{2+}/3\text{Na}^+$  (електрогенний) [7]. Для  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника ПМ міомерія характерна відносно низька афінність до  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_{0,5} = 5\text{—}12$  мкМ для міомерія щурів). Інгібіторами транспортної системи є моненсин, доксорубіцин, деякі двовалентні катіони ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) [89, 91, 95].

Для гладеньких м'язів була показана солокалізація  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника та  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТРази в кавеолах поряд з ділянками периферійного СР [15, 32, 36, 40, 63]. Вважають, що розташування NCX поблизу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів СР дає змогу функціонувати цим  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальним системам узгоджено [7, 15, 63]. За певних умов  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник може працювати в реверсному режимі для входу  $\text{Ca}^{2+}$  в клітину [40, 63].

#### **$\text{Ca}^{2+}$ -помпа саркоплазматичного ретикулула**

$\text{Ca}^{2+}$ -помпа СР або SERCA (sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) з молекулярною масою 110—115 кДа, як і РМСА, належить до АТРаз Р-типу, здійснює активний транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  в люмен СР, використовуючи енергію гідролізу АТФ для транспорту 2 іонів Са в обмін на протони [121]. За кінетичними розрахунками обмін є електрогенним. Стехіометрія обміну залежить від рН [122]. SERCA складається з трьох глобулярних цитоплазматичних доменів та 10 трансмембранних сегментів. Два іони Са, що транспортуються, зв'язуються з трансмембранною областю сегментів М4 та М5, М6 та М8. Відомо три ізоформи та кілька сплайс-варіантів SERCA (SERCA 1a, в; SERCA 2a-с; SERCA 3a-f), у міомерії експресуються SERCA 2a, SERCA 2b та SERCA 3 ізоформи ензиму [40, 81, 123]. Експресія помпи 2-го типу в міомерії жінок та щурів зростає за вагітності, причому вміст ензиму залежить від рівня естрогенів [2, 88, 100].

SERCA не містить СаМ-зв'язувальної послідовності, а її активність регулюється низькомолекулярним протеїном фосфоламбаном (22—25 кДа): взаємодія з дефосфорильованим фосфоламбаном зменшує спорідненість за  $\text{Ca}^{2+}$  та максимальну швидкість помпи, що знижує її активність. Регуляторне фосфорильовання здійснюється РКА, РКС, PKG, СаМКII, що призводить до його відокремлення, олігомеризації та активації SERCA [121, 124—126].

SERCA в міометрії має відносно високу спорідненість до  $\text{Ca}^{2+}$  (0,3–1,2 мкМ) [89]. Константа активації за  $\text{Mg}^{2+}$  та константа Міхаеліса за АТФ становлять 0,6 та 1,0 мМ відповідно. При використанні  $\text{Zn}^{2+}$  та  $\text{Cu}^{2+}$  замість  $\text{Mg}^{2+}$  акумуляція  $\text{Ca}^{2+}$  не спостерігалась [89, 90].

Специфічними інгібіторами SERCA є терпеновий лактон тапсигаргін ( $K_i = 2$  нМ) та мікотоксин циклопіазонієва кислота ( $K_i = 0,3$  мкМ) [40, 111].

Таким чином, PMCA та SERCA беруть участь як у підтриманні низької концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в міоцитах у стані спокою, компенсуючи пасивний потік іонів Ca в клітину, так і в процесах повернення у цей стан, забезпечуючи зниження  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  після транзйенту і відповідну релаксацію гладеньких м'язів. Вважають, що  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник регулює концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  у локальному просторі між ПМ та СР, підтримуючи її в збудженому міоциті на рівні, близькому до  $10^{-5}$  М [40, 111].

### Транспорт $\text{Ca}^{2+}$ в мітохондріяx

На сьогодні сформовано уявлення про значення МХ як  $\text{Ca}^{2+}$ -депо в електробудливих клітинах. У 1961 році Н.Ф. DeLuca та G.W. Engstrom показали, що мітохондрії можуть акумулювати іони Ca [127], а в 1963 році A.L. Lehninger та ін. довели, що вони здатні накопичувати на кілька порядків більше  $\text{Ca}^{2+}$ , ніж його початковий вміст у матриксі; ними було висунуто також припущення, що МХ діють як  $\text{Ca}^{2+}$ -депо за умови перевантаження клітини іонами Ca [128]. У 1965 році E. Sarafoli та ін. показали, що акумуляція  $\text{Ca}^{2+}$  та неорганічного фосфата мітохондріями супроводжується накопиченням ними АТФ [129].

Після транзйентного підвищення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в клітинах у разі їх збудження, в тому числі в гладеньком'язових, частина іонів Ca здатна акумулюватись МХ. Після повернення  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  (концентрація іонізованого Ca в цитозолі) до базального рівня органели починають звільняти  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазму [95, 130–132]. Розраховано, що МХ можуть забезпечити зниження концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у гладеньком'язовій клітині за фізіологічно значущий час (30 с) [89]. Тобто МХ активно задіяні в підтриманні  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостазу.

Здатність МХ швидко запасати великі кількості іонів Ca протирічить тому факту, що їх  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортери мають низьку спорідненість до катіона. Це явище пояснюється високою початковою максимальною швидкістю акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  та локалізацією МХ поблизу  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів субклітинних структур (ЕПР, ПМ), де може спостерігатися тимчасове локальне значне підвищення концентрації катіона [71, 130, 133–135].

Ефективність акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями визначається позамітохондрійною концентрацією  $\text{Ca}^{2+}$ , електричним потенціалом на ВММ та вмістом іонізованого Ca в матриксі [134, 136]. Концентрація вільного  $\text{Ca}^{2+}$  в МХ підтримується на певному оптимальному гомеостатичному рівні і залежить від одночасного протікання трьох процесів: накопичення катіона, зв'язування з внутрішньомітохондрійними буферами та вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  органелами [137, 138].

Концентраційний градієнт  $\text{Ca}^{2+}$  на ВММ не задовольняє рівняння Нернста, оскільки при різниці потенціалів  $-180$  мВ (зі знаком “–” на внутрішньому

### 3.4. Просторово-часові характеристики $\text{Ca}^{2+}$ -сигналу

боці мембрани) співвідношення концентрацій вільного  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксі та міжмембранному просторі має дорівнювати близько  $10^6$ , а реально становить від 1 до 10. Це пояснюється тим, що співвідношення  $\text{Ca}^{2+}$  по обидва боки мембрани визначається стаціонарною рівновагою між процесами електрофоретичного входу катіона та його виходу з органел через  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінники [135, 138].

Згідно з так званою “уніфікованою моделлю” регуляції транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  у МХ та підтримання  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостазу матриксу, ці процеси можна умовно розділити на три фази. Під час першої рівень  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  (концентрація іонізованого Са в матриксі), що може змінюватись через коливання  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , досягає стаціонарного стану внаслідок одночасного протікання протилежних процесів акумуляції катіона та його вивільнення шляхом функціонування вищезазначених катіонних обмінників. На другій фазі  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  сягає більше 500 нМ, акумуляція катіона перевищує транспортну здатність обмінників і  $\text{Ca}^{2+}$  починає накопичуватись у МХ, що супроводжується утворенням  $\text{Ca}^{2+}$ -фосфатного комплексу для компенсації надходження катіона. На третій фазі транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  у МХ спостерігається перевищення буферної ємності матриксу, що призводить до різкого зростання  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  та активації мітохондрійної пори, через яку  $\text{Ca}^{2+}$  потрапляє до цитозолу [137, 139, 140].

Наразі в науковій літературі описано декілька типів  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем, які локалізовані у ВММ. До них належать мітохондрійний  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортер, системи “швидкого кальцієвого входу” та мітохондрійного ріанодинового рецептора,  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ - та  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник, мітохондрійна пара перехідної провідності тощо. В розділі 4 буде розглянуто їхню структуру та можливу функціональну роль як у мітохондріях, та і в підтриманні  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостазу клітини.

### 3.4. Просторово-часові характеристики $\text{Ca}^{2+}$ -сигналу

Використання  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливих флуоресцентних зондів та прецизійних методів реєстрації змін концентрації катіона в окремих клітинних компартментах, зокрема флуоресцентної мікроскопії, дало змогу візуалізувати так звані “ $\text{Ca}^{2+}$ -хвилі” та осциляції внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в окремих клітинах. Вони є наслідком узгодженого функціонування систем пасивного та енергозалежного транспорту субклітинних мембранних структур, наявності прямих та зворотних, позитивних та негативних зв'язків між цими системами, а також високою буферною щодо  $\text{Ca}^{2+}$  ємністю цитозолу. У формуванні  $\text{Ca}^{2+}$ -хвилі беруть участь як  $\text{RyR}$ , так і  $\text{IP}_3\text{R}$  ендоплазматичного ретикулула [88, 141, 142]. Згідно з моделлю Беріджа, спочатку  $\text{IP}_3$ , який генерується фосфоліпазою С, викликає локальне підвищення концентрації  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  поблизу мембрани  $\text{ER}$ , потім відбувається викид  $\text{Ca}^{2+}$  з  $\text{ER}$  через кофеїн-чутливі канали, що стимулює подальше  $\text{Ca}^{2+}$ -індуковане вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  і фронт  $\text{Ca}^{2+}$ -хвилі розповсюджується від початкового джерела збудження. Дифузія  $\text{Ca}^{2+}$  вздовж ретикулула підвищує чутливість  $\text{IP}_3\text{R}$  до  $\text{IP}_3$ . Розрахунки показали, що концентрація  $\text{IP}_3$  достатньо висока, щоб окупувати всі молекули відповідних рецепторів  $\text{ER}$ , але вихід  $\text{Ca}^{2+}$  спостерігається лише в так званих “гарячих ді-

лянках” або “гарячих плямах” (hot spots). Це ділянки змінної локалізації, що виникають як наслідок локального збільшення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{IP}_3$  або відповідних рецепторів і часто розташовані в субплазмалемному регіоні ЕР, де концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  набагато більша (досягає сотень мкМ), ніж в інших компартментах цитозолу [143—145]. Назва пішла від методики візуалізації  $\text{Ca}^{2+}$  із використанням флуоресцентної мікрокопії, коли відповідні комп'ютерні програми відображають інтенсивно забарвлені ділянки високої концентрації катіона в окремих клітинах. Зростання концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  інактивує канали. Локальному зниженню рівня  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозолі сприяють також енергозалежні процеси (гасіння “гарячих ділянок”). Поряд з цим, дифундуючи вздовж ретикулула,  $\text{Ca}^{2+}$  генерує нові ділянки викиду [142, 146, 147].

Гіпотеза про осциляції внутрішньоклітинного  $\text{Ca}^{2+}$  була висунута в 1979 році М. Беріджем і Р. Раппом, які знайшли, що серотонін, активуючи вхід  $\text{Ca}^{2+}$  в клітини слинної залози личинок м'ясної мухи, викликає постійну за величиною періодичну зміну трансмембранного потенціалу. Швидкість секреції слини корелює з частотою осциляцій мембранного потенціалу, залежить від концентрації серотоніна і пригнічується блокаторами  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів. У попередніх роботах на  $\beta$ -клітинах підшлункової залози та передньої долі гіпофіза було доведено, що коливання мембранного потенціалу є наслідком періодичної активації  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних калієвих і хлорних каналів, що дало можливість припустити, що спостерігаються періодичні зростання концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозолі [148].

Уперше осциляції  $\text{Ca}^{2+}$  були продемонстровані на гепатоцитах (1986 рік) за дії вазопресину та адреналіну: концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  збільшувалась до 600—800 нМ за 3 с, пік тривав 7—15 с, потім знижувався до базального рівня, інтервал між окремими осциляціями становив від 20 с до 4 хв залежно від концентрації гормонів [149]. Картина  $\text{Ca}^{2+}$ -осциляцій кожної окремої клітини унікальна і повторюється при повторному введенні гормона. Накладання відповідей окремих клітин в їхній суспензії унеможливує реєстрацію осциляцій більш старими методами. Осциляції відтворюються при введенні в цитоплазму клітин  $\text{IP}_3$  у спеціальних контейнерах, стінки яких потім руйнуються лазерним променем. Амплітуда і тривалість осциляцій збільшуються під дією кофеїну та невеликого зростання  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазмі [150, 151]. Осциляції спостерігаються також у популяціях клітин, зв'язаних між собою міжклітинними контактами, при цьому осциляції окремих клітин координуються [152, 153]. Одним з можливих пояснень цього є існування кількох клітин-ритмоводіїв, аналогічних пейсмейкерам кардіоміоцитів [154, 155]. Іншим поясненням, яке адекватне для кардіоміоцитів та ГМК, що поєднані у синцитій завдяки щільним контактам, є дифузія  $\text{Ca}^{2+}$  між клітинами і  $\text{Ca}^{2+}$ -індукований вихід  $\text{Ca}^{2+}$ . В незбудливих тканинах дифундувати між клітинами може також  $\text{IP}_3$  [7].

У цитоплазмі окремих клітин гормони і фактори росту за зростання концентрації практично не впливають на амплітуду підвищення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ , проте посилюють частоту його осциляцій. Зазвичай рівень  $\text{Ca}^{2+}$  змінюється від 100 до 500 нМ, а частота — від 1 коливання/хв до 1 коливання/с.  $\text{Ca}^{2+}$ -залежні ефекти агоністів прямо пропорційні частоті осциляцій цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$ . Ефективність насичення катіоном  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язувальних протеїнів

### 3.4. Просторово-часові характеристики $\text{Ca}^{2+}$ -сигналу

пропорційна частоті  $\text{Ca}^{2+}$ -осциляцій, тому  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язувальні протеїни сприймають частотну інформацію і трансформують її в повільні зміни метаболізму, функціонального стану та морфології [156].

Використання флуоресцентних зондів Fluo-3 і 4 та методів лазерної конфокальної мікроскопії дало змогу візуалізувати " $\text{Ca}^{2+}$ -треки" в ГМК — місця локального зростання концентрації катіона в міоплазмі. На відміну від скелетних міоцитів  $\text{Ca}^{2+}$  не вивільнюється на регулярних відстанях у міоплазмі, а утворює біля СР так звані "frequent-discharge sites" або FDS, тобто місця спонтанного вивільнення катіона з ретикулула [142, 154, 157]. Наприклад, у портальній вені кролів виявлено єдиний FDS у субсарколемній області, локалізований поблизу ядра. В малих мезентеріальних артеріях мурчаків спостерігають в різних частинах клітини 2—3 FDS за хвилину. Спричинене FDS зростання флуоресценції називають "спарками". Активація міоцитів у деяких випадках може призвести до зростання спаркової активності (кількості спалахів зонда та їхньої інтенсивності). У більшості ГМК спарки є наслідком активації  $\text{RyR}$ . У випадку стимуляції  $\text{IP}_3\text{R}$  візуалізуються більш видовжені "пуфи" [88, 154]. Спарки асоційовані з кластерами  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних  $\text{K}^+$ - та  $\text{Cl}^-$ -каналів ПМ, що спричинює так звані спонтанні транзйентні вихідні струми (STOCs, spontaneous transient outward currents). Назагал, кожне вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з СР асоційоване із активацією  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних каналів ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , неспецифічних катіонних) ПМ, тобто відбувається в периферичному СР з субплазмалемною локалізацією. Сам факт реєстрації спарків як локальних ділянок є наслідком буферної ємності цитозолу, що суттєво знижує дифузію катіона в міоплазмі [66, 75, 88, 154, 156—158].

На малих мезентеріальних артеріях мурчаків було продемонстровано [159], що у стані спокою донори  $\text{NO}$  S-нітрозо-N-ацетилпеніциламін (SNAP; 50 мкМ) та SNP (100 мкМ) суттєво не впливають на активність FDS та  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . За аплікації норадреналіном (1—10 мкМ) зростає частота виникнення  $\text{Ca}^{2+}$ -спарків, спричинених FDS, та  $\text{Ca}^{2+}$ -хвиль. SNAP та SNP, але не 8-Br-cGMP та інгібітор рГЦ, пригнічували зазначені процеси. Таким чином, донори оксиду азоту інгібують норадреналін-стимульоване зростання  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  cGMP-незалежним шляхом, частково ефект зумовлений пригніченням активності FDS.

Ще одним феноменом  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналіngu в ГМК є  $\text{Ca}^{2+}$ -транзйент, а саме індуковане деполяризацією або агоністами генералізоване зростання  $\text{Ca}^{2+}$  в міоплазмі. Це явище зумовлене масованим  $\text{Ca}^{2+}$ -індукованим вивільненням  $\text{Ca}^{2+}$  з СР та передбачає відносно гомогенне розташування  $\text{Ca}^{2+}$ -вивільняючих місць в міоплазмі. Ці місця займають близько 5—7 % міоплазми і візуалізуються поблизу СР із використанням флуоресцентних похідних ріанодину [75, 142, 160].

На характеристики  $\text{Ca}^{2+}$  осциляцій та хвиль в різних типах клітин, у тому числі в ГМК, можуть впливати МХ шляхом зміни продукції АТР та регуляції рівня цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  [7, 41, 72, 154, 156].

### 3.5. Окремі приклади впливу NO на катіонтранспортувальні системи клітини

Молекула NO містить некротну кількість електронів і являє собою амфільний радикал, який легко проникає крізь біологічні мембрани і може дифундувати на відстанях, що в декілька разів перевищують розміри клітин. Але окисники цитозолу лімітують прояв біохімічних ефектів NO в межах 100 нм від місця утворення, що зумовлює локальність дії оксиду азоту. Оксид азоту легко вступає в окисно-відновні реакції з утворенням високоактивних похідних  $\text{NO}^+$ ,  $\text{NO}^-$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}_3$ ,  $\text{N}_2\text{O}_4$ , які можуть виступати потужними нітрозильюючими агентами, хімічні властивості яких суттєво впливають на біологічну активність оксиду азоту [46, 159, 161–163]. Зокрема, розклад у водних розчинах відомого донора NO SNP призводить до формування катіона нітрозонію ( $\text{NO}^+$ ) [159]. Невеликий молекулярний радіус і високий коефіцієнт дифузії дають змогу NO виявляти свою біологічну активність як у клітині, де він синтезується, так і в позаклітинному середовищі, що і визначає його властивість як ауто/паракринного регулятора [164–167].

Наразі сформовано уявлення щодо майже універсальної ролі NO як сигнальної та регуляторної молекули в клітинах. Передача сигналу за участю оксиду азоту включає окисно-відновні реакції з подальшою ковалентною модифікацією протеїнів-мішеней. Поширені як пряма взаємодія з тіольними групами цистеїну, так і реакція транснаїтрозильовання, де ефекторний протеїн акцептує NO-групу від S-нітрозильованого донора, часто S-нітрозоглутатіона (GSNO). S-нітрозильовання забезпечує регуляцію функціональної активності протеїнів. Прикладом є утворення S-нітрозильованого гемоглобіну за залишком Cys93  $\beta$ -ланцюга (Hb-SNO), що впливає на його газотранспортні властивості [168]. Транснаїтрозильованням здійснюється передача NO-групи від Hb-SNO на аніонний обмінник AE-1 еритроцитів. Функціональна активність RyR саркоплазматичного ретикулума посилюється S-нітрозильованням [169]. Нітрозильована каспаза-3-SNO може транснаїтрозильовувати інгібітор апоптозу XIAP, пригнічуючи його лігазну активність [46, 47].

Оксид азоту бере участь у нітруванні залишків тирозину та триптофану у протеїнах-мішенях. За таким механізмом реалізується біологічна активність пероксинітриду, який може регулювати агрегацію тромбоцитів [161, 170–172].

Сигнальна роль NO тісно пов'язана із впливом на системи, які задіяні у контролі іонного гомеостазу клітини [159, 161, 162]. Доведено, що функціональна активність NO реалізується опосередковано через зростання вмісту cGMP шляхом активації рГЦ. Цитоплазматична рГЦ є гем-вмісним гетеродимерним “рецептором” NO. Взаємодія NO з простетичною гемовою групою рГЦ активує ензим у 200 разів [173, 174]. Надалі cGMP стимулює cGMP-залежну протеїнкіназу, відповідні фосфатази, а також безпосередньо впливає на роботу cGMP-керованих  $\text{K}^+$ -,  $\text{Na}^+$ - та  $\text{Ca}^{2+}$  каналів ПМ, що відіграє важливу роль у вазодилатції, фототрансдукції та нейропередачі. Можлива також опосередкована активація PKA та P13-кінази. На кардіоміоцитах та ГМК артерій продемонстровано, що потенціалзалежні  $\text{VK}_{\text{Ca}}$  регулюються NO шляхом активації PKG та PKA, а не S-нітрозильованням. Зростання поляризації ПМ

через відкриття  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  та, як наслідок, зниження збудливості лімітує вхід  $\text{Ca}^{2+}$  через потенціалкеровані  $\text{Ca}^{2+}$ -канали, що призводить до релаксації [25, 26, 46, 175, 179]. Для ГМК та кардіоміоцитів показаний інгібувальний ефект NO на  $\text{Ca}^{2+}$ -канали L-типу [180] та активацію TRPC1,4,5 через S-нітрозилювання залишків цистеїну [47]. Для ГМК артерій не показано стимулювального ефекту NO на SERCA через залучення NO/cGMP/PKG шляху [181]. cGMP-незалежним механізмом активації цієї помпи може бути S-глутатіонування. В його основі лежить окислення глутатіону пероксинітридом з подальшим зворотнім глутатіонуванням SERCA за залишком Cys674, що активує ензим, сприяє зменшенню концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозолі, зниженню активності SOCC та розслабленню ГМК [170, 182]. Втім, показано, що NO концентраційнозалежно інгібував SERCA в скелетному м'язі; цей ефект не був пов'язаний з активацією рГЦ та PKG або окисненням тиольних залишків [183].

Демонструється NO/cGMP-залежне інгібування фосфоліпази C, а також зумовлене активацією PKG фосфорилування  $\text{IP}_3\text{R}$ , що призводить до його десенсибілізації [26, 178]. Поряд з цим показаний стимулювальний вплив NO через cGMP-залежні механізми на cADP-рибозилтрансферазу, продуктом якої є cADP-рибоза — природний агоніст  $\text{RyR}$  [180, 184]. Таким чином, NO cGMP-залежним шляхом може як знижувати, так і підвищувати концентрацію вільного  $\text{Ca}^{2+}$  у цитозолі [184].

Утворення комплексу між  $\text{PMCA4b}$  та nNOS (через PDZ-домен останньої) в кавеолах регулює скорочення кардіоміоцитів та ГМК судин шляхом модуляції продукції NO, cGMP та cAMP, зокрема через зниження активності фосфодіестераз [181, 185]. Вестерн-блот аналізом було продемонстровано, що за відсутності протеїну  $\text{PMCA4b}$  nNOS переміщується з ПМ в цитоплазму. Наслідком активації або надекспресії  $\text{PMCA}$  є зменшення субсарколемної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ , зниження активності nNOS, зменшення утворення cGMP та зростання cAMP з подальшим фосфорилуванням фосфоламбуна та тропоніну C/І. Таким чином, комплекс  $\text{PMCA4b}$ -nNOS може контролювати локальні підвищення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ , необхідні для регуляції активності nNOS [47, 185—188]. Також показано оборотне інгібування  $\text{PMCA}$  пероксинітридом [182].

### **3.6. Біохімічні механізми дії оксиду азоту на $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаз та поляризацію субклітинних мембранних структур у гладенькому м'язі**

Як нітросполуки нами було використано нітропрусид натрію (SNP, sodium nitroprusside) та нітрит натрію (SN, sodium nitrite) — донор та попередник NO, що широко застосовуються в біологічних дослідженнях. SNP утворює в розчинах катіон нітрозонію, який виявляє властивості потужного нітрозилюючого агента. SN продукує оксид азоту переважно в кислому середовищі, але здатен утворювати NO та його редокс-похідні також за присутності гемових груп та залізо-сірчаних комплексів, якими багаті клітинні структури [47, 159, 164, 189]. Крім того, нітрит-аніони можуть володіти власною біохімічною активністю, про що зазначалося вище.

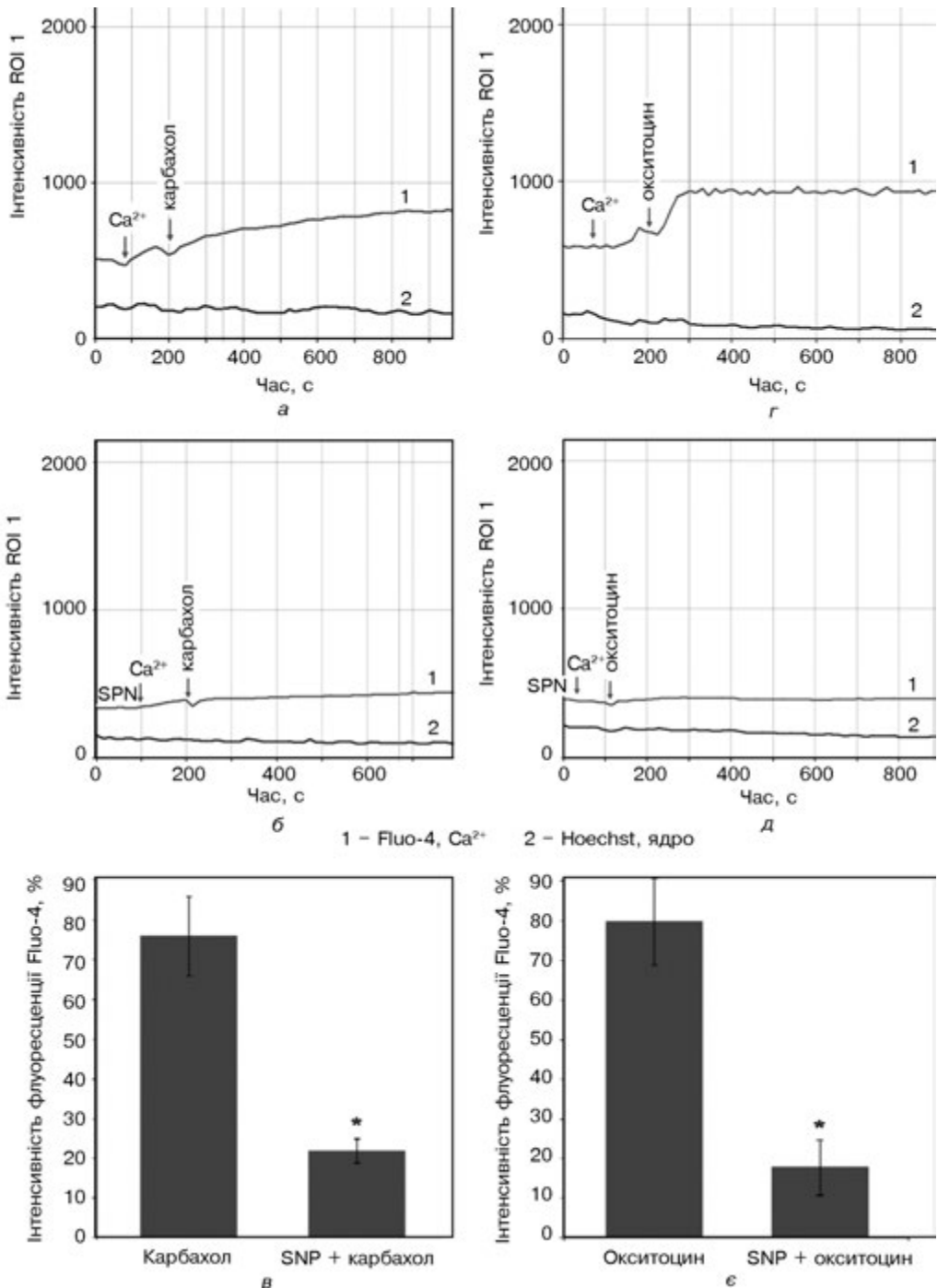


Із застосуванням методу лазерної конфокальної мікроскопії та  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливого флуоресцентного зонда Fluo-4 AM нами було продемонстровано зростання рівня іонізованого Са в міоплазмі міоцитів матки, спричиненого карбахолом (аналог ацетилхоліна, який не гідролізується холінестеразою) на  $76 \pm 10$  % (рис. 3.1, *a, в*) та окситоцитом на  $80 \pm 11$  % (рис. 3.1, *г, є*). Передінкубація клітин з SNP (0,1 мМ) перешкоджала стимуляції агоністами зростання концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в міоплазмі (рис. 3.1, *б, в, д, є*). За цих умов у разі стимуляції карбахолом концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  в міоплазмі зростала лише на  $22 \pm 3$  %, окситоцином — на  $17,8 \pm 7,0$  %.

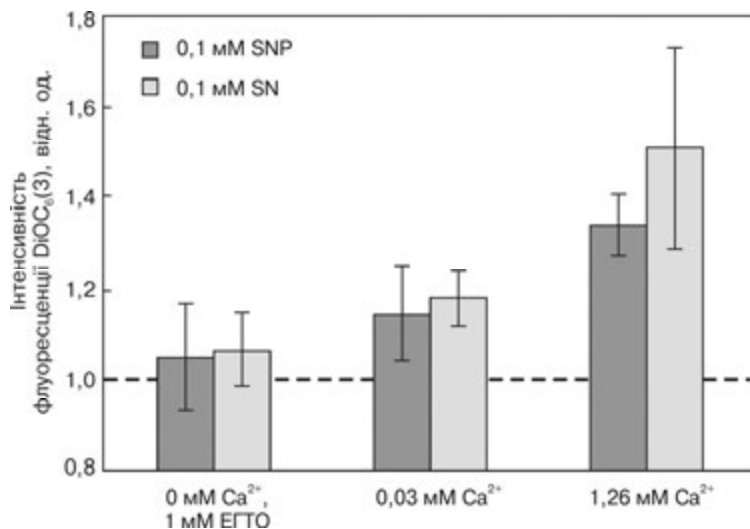
Одержані результати підтверджують факт впливу оксиду азоту на  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаз та шляхи підвищення концентрації іонів Са в міоплазмі у разі дії на міоцити фізіологічно значущих агоністів.

Одним із важливих біохімічних механізмів, за яким NO може викликати релаксацію гладенького м'яза матки, є cGMP-залежна або безпосередня активація  $\text{K}^+$ -каналів ПМ [26, 177]. У міометрії людини та тварин, як було описано вище, ідентифіковано кілька підтипів  $\text{K}^+$ -каналів. Речовини, які сприяють відкриттю  $\text{K}^+$ -каналів, знижують збудливість клітин, викликаючи зміщення мембранного потенціалу від його порогових значень, необхідних для активації іонтранспортувальних систем. У період вагітності у людини і шурів спостерігається зсув потенціалу на плазмалемі клітин міометрія у бік більш негативних величин, що може бути зумовлено посиленням  $\text{K}^+$ -канальних струмів [26, 27, 190]. Вірогідним наслідком активації різних підтипів  $\text{K}^+$ -каналів оксидом азоту є гіперполяризація плазмалеми та зменшення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в міоплазмі.

У працях [191, 192] було показано, що в міоцитах матки оксид азоту підвищує пасивну проникність ПМ до  $\text{Ca}^{2+}$ , що може зумовити короткотривале зростання концентрації катіона в субсарколемному регіоні та активацію  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних підтипів  $\text{K}^+$ -каналів, із наступною гіперполяризацією мембрани та зниженням рівня збудливості міоцитів. Ми застосували ціаніновий барвник 3,3'-дігексилосакарбоціанін ( $\text{DiOC}_6(3)$ ) для реєстрації змін електричного потенціалу на ПМ і вивчення дії нітросполук на поляризацію плазмалеми за функціонального спокою міоцитів та у випадку розвитку штучної деполяризації. Зонд  $\text{DiOC}_6(3)$  є ліпофільним катіоном, який потенціалзалежно накопичується всередині обмеженого мембранного простору [193—195]. В інтактних клітинах акумуляція ліпофільних катіонів із середовища в цитоплазму залежить від величини потенціалу ПМ, що зумовлює його розподіл між цитозолем і позаклітинним середовищем, а також електричного потенціалу ВММ, який визначає розподіл зонда між цитозолем і мітохондрійним матриксом залежно від концентрації, співвідношення зонд/клітини та функціонального стану самих клітин. Електричний потенціал на СР слабо впливає на флуоресценцію  $\text{DiOC}_6(3)$  через відносно малу величину [194, 196—200]. Зменшення інтенсивності флуоресценції зонда у міоцитах може свідчити на користь зниження поляризації субклітинних мембран, у той час як її зростання — про збільшення величини (за модулем) трансмембранного потенціалу плазматичної та/або внутрішньої мітохондрійної мембрани [195, 198, 201]. Результати виконаних раніше досліджень свідчать про те, що зонд  $\text{DiOC}_6(3)$  та метод протокової цитометрії можна використовувати для аналізу змін електричного



**Рис. 3.1.** Стимуляція карбахолом (0,1 мМ) та окситоцином (0,5 мкМ) зростання Ca<sup>2+</sup> в міоплазмі у контролі (а, с) та за попередньої обробки (5 хв) клітин донором NO – 0,1 мМ SNP (б, д) (0 % – не стимульовані клітини). Для кількісного аналізу використано 6–7 міоцитів з різних експериментів (е, ф). \* –  $p < 0,01$



**Рис. 3.2.** Поляризація плазмалеми клітин міомерія за дії 0,1 мМ SNP та SN за присутності 1 мМ ЕГТО, 0,03 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  та 1,26 мМ  $\text{Ca}^{2+}$ . Для виключення ефекту мітохондрій клітини преінкубували 5 хв з 5 мМ азидом натрію. За “1” прийнято власну флуоресценцію клітин.  $M \pm m$ ,  $n = 6$

потенціалу як ПМ міоцитів в умовах деполаризації ВММ (передінкубація клітин з  $\text{NaN}_3$  або СССР), так і МХ (у разі передінкубації клітин з убаїном). Зміни флуоресценції  $\text{DiOC}_6(3)$  (100 нМ) вивчали за допомогою протокового цитометра Coulter Epics XL™ ( $\lambda_{\text{вб}} = 488$  нм,  $\lambda_{\text{фл}} = 505$  нм (канал F11)). Вимірювання виконували у фізіологічному середовищі Хенкса та його модифікаціях, зазначених у тексті (розділ 2.2).

З огляду на принципове значення змін електричного потенціалу ПМ у процесах регуляції транспорту  $\text{Ca}^{2+}$ , скоротливої активності і виникнення тимчасової незбудливості на фоні підвищеного вмісту прогестерону та оксиду азоту в міомерії, надалі ми приділили увагу саме дослідженню впливу NO на рівень поляризації плазмалеми.

За дії досліджуваних нітросполук у концентрації 0,1 мМ на міоцити матки шурів у стані спокою нами демонструється зростання поляризації плазмалеми, причому цей ефект суттєво залежить від присутності іонів Ca в середовищі інкубації клітин (рис. 3.2). За низьких (не фізіологічних) концентрацій іонів Ca або наявності  $\text{Ca}^{2+}$ -хелатору ЕГТО поляризуючий вплив нітросполук майже не спостерігається. Тобто ефект поляризації плазмалеми має виражений  $\text{Ca}^{2+}$ -залежний характер.

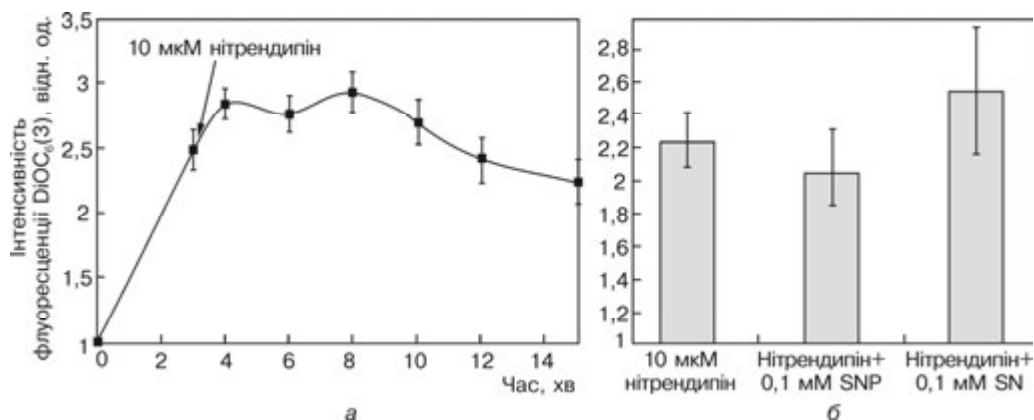
Як було зазначено раніше, пасивний транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  в ПМ міоцитів матки значною мірою зумовлений функціонуванням потенціалкерованих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів L-типу, які є дигідропіридин-чутливими. Інгібітор дигідропіридин-чутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів нітрєндипін суттєво не впливав на потенціал ПМ у нашому варіанті проведення експерименту на міоцитах у стані функціонального спокою (рис. 3.3, а). Водночас передобробка міоцитів нітрєндипіном майже повністю гальмувала зростання електричного потенціалу плазмалеми

### 3.6. Біохімічні механізми дії оксиду азоту на $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаз та поляризацію...

за дії SNP та SN (рис. 3.3, б). Відсутність  $\text{Ca}^{2+}$ -залежної поляризуючої дії нітросполук за присутності нітрендипіну вказує на можливе залучення дигідропіридин-чутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів, що показано нами раніше [191, 192], і зростання проникності ПМ до іонів Ca за дії оксиду азоту.

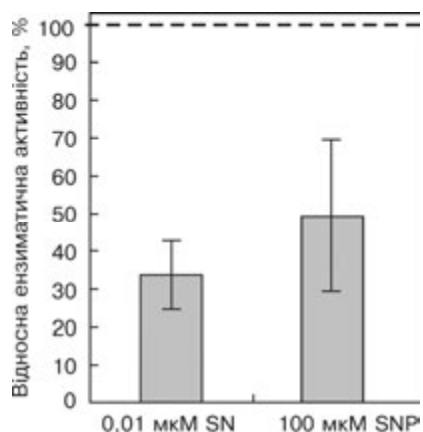
Ще одним шляхом зростання концентрації Ca в субсарколемному регіоні може бути тимчасове зворотне пригнічення PMCA. Активність PMCA в гладенькому м'язі пов'язана з ковеолами. Один зі сплайс-варіантів нейрональної ізоформи NO-синтази (nNOS $\mu$ ) солокалізован з цим транспортним ферментом. Гальмування активності PMCA супроводжується посиленням біосинтезу NO і навпаки [185]. З огляду на це, ми дослідили вплив нітросполук на активність PMCA у фракції сарколеми міометрія.

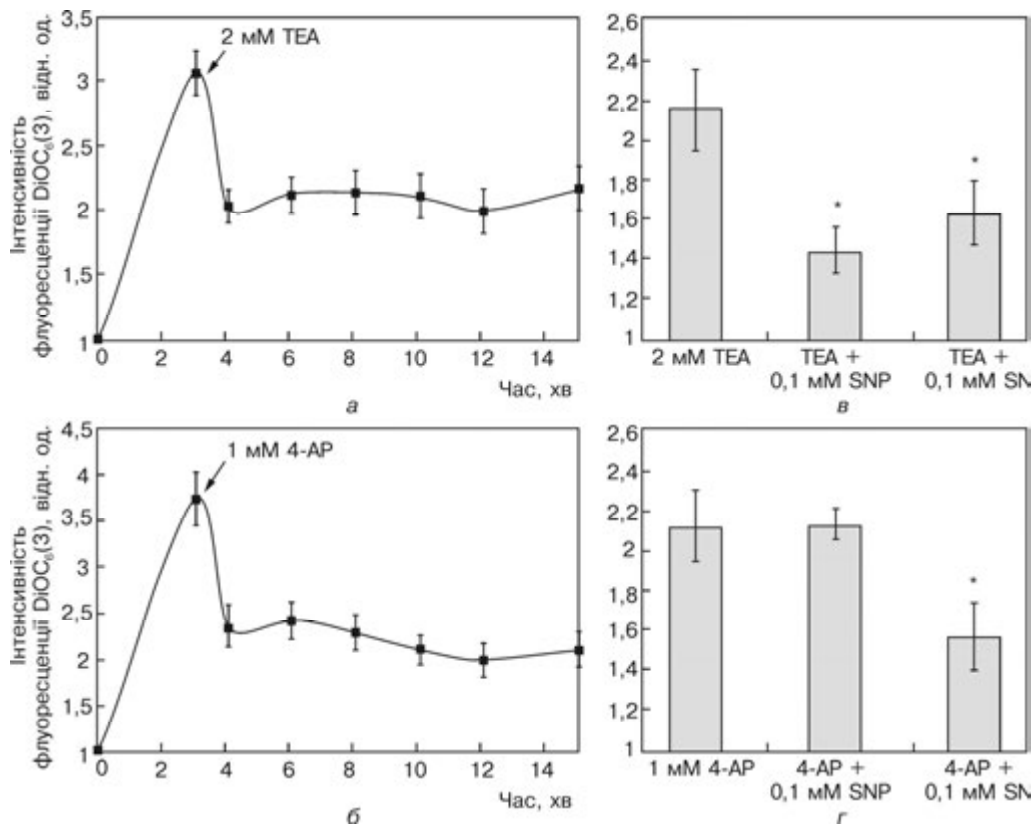
Встановлено, що питома ензиматична активність PMCA у фракції сарколеми міометрія свині становить  $35 \pm 3$  нмоль  $\text{P}_i$ /мг протеїну за 1 хв ( $n = 22$ ). За доволі низької концентрації SN 0,01 мкМ спостерігався виражений інгібувальний ефект (до 70 %) нітросполуки на активність PMCA. SNP у концентрації 100 мкМ у середньому на 50 % пригнічував активність  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРази (рис. 3.4). Ці ефективні концентрації нітросполук були підібрані нами експериментально.



**Рис. 3.3.** Зміни поляризації плазмалеми міоцитів матки: *а* — за дії специфічного інгібітора дигідропіридин-чутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів нітрендипіну (1,26 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  в середовищі інкубації); *б* — флуоресцентна відповідь на 5 хв після внесення донорів оксиду азоту (SNP та SN вносили на 7 хв дії інгібітора).  $M \pm m$ ,  $n = 5$ . Для виключення ефекту мітохондрій клітини преінкубували 5 хв з 5 мМ азидом натрію. За "1" прийнято власну флуоресценцію клітин

**Рис. 3.4.** Інгібувальний ефект нітросполук на активність PMCA міометрія.  $M \pm m$ ,  $n = 5-6$ . За 100 % прийнято значення ензиматичної активності за відсутності діючих речовин у середовищі





**Рис. 3.5.** Зміни поляризації плазмалеми міоцитів матки за дії блокаторів  $\text{K}^+$ -каналів TEA (а) та 4-AP (б), а також нітросполук 0,1 мМ SNP та SN (в, г); в, г — флуоресцентна відповідь на 15 хв проведення експерименту та на 5 хв дії донорів оксиду азоту (SNP та SN внесено через 7 хв передінкубації з блокаторами). \*  $p < 0,05$ , зміни достовірні відносно контролю за відсутності нітросполук,  $M \pm m$ ,  $n = 5$ . Для виключення ефекту мітохондрій клітини преінкубували 5 хв з 5 мМ азидом натрію. За “1” прийнято власну флуоресценцію клітин

Пригнічення активності РМСА оксидом азоту разом із зростанням проникності ПМ до  $\text{Ca}^{2+}$  в ГМК матки за фізіологічних умов здатні викликати збільшення концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  в субплазмалемному регіоні міоплазми, що може в подальшому активувати  $\text{Ca}^{2+}$ -залежні процеси, зокрема транспорт моновалентних катіонів. Можна також припустити, що  $\text{Ca}^{2+}$ -залежне зростання синтезу оксиду азоту в субсарколемній зоні призведе до зміни у функціонуванні розташованих тут катіонтранспортувальних систем і, зокрема, відповідних підтипів  $\text{K}^+$ -каналів. Останнє буде мати наслідком збільшення електричного потенціалу на ПМ.

У наших дослідженнях інгібування  $\text{K}^+$ -проникності плазмалеми інгібіторами  $\text{K}^+$ -каналів тетраетиламонієм (ТЕА) та 4-амінопіридином (4-АР) у середовищі інкубації з 1,26 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  призводило до її вираженої деполаризації (3.5, а, б), на фоні якої гіперполяризуючий ефект нітросполук не проявлявся (рис. 3.5, в, г). Посилення проникності ПМ до  $\text{Ca}^{2+}$  донорами NO на фоні блокування  $\text{K}^+$ -каналів мало наслідком зниження електричного потенціалу.

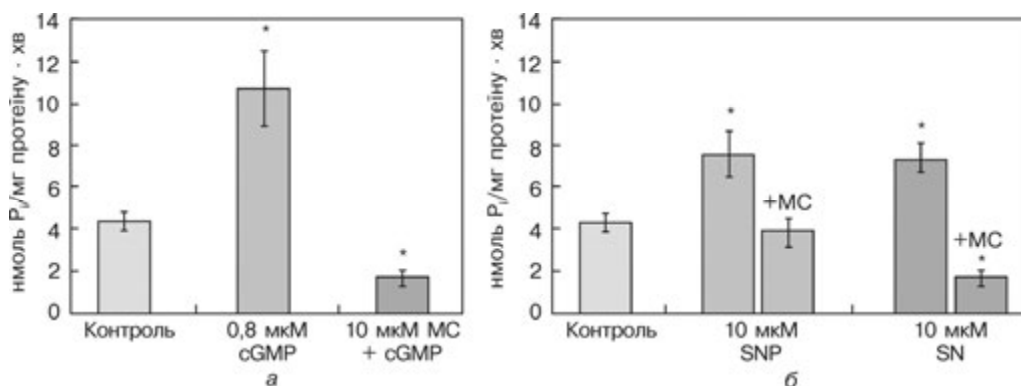
### 3.6. Біохімічні механізми дії оксиду азоту на $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаз та поляризацію...

Ці дані свідчать на користь залучення  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних  $\text{K}^+$ -каналів, що активуються NO, в реалізацію ефектів нітросполук, спрямованих на зростання потенціалу ПМ.

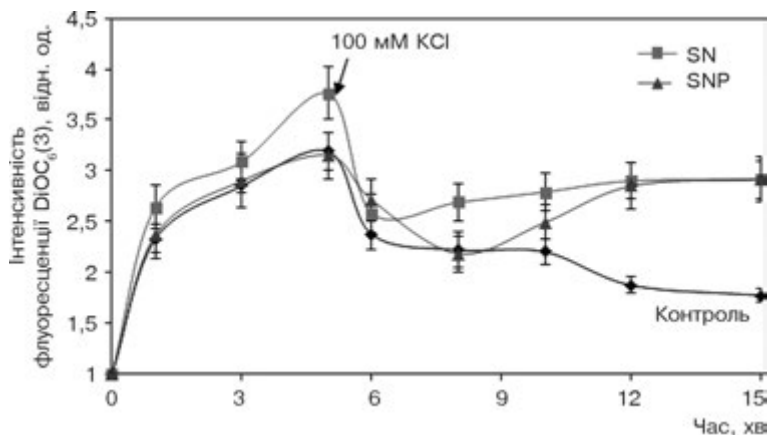
Важливим фактором, який зумовлює існування електричного потенціалу на ПМ, є функціонування  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази. Транспортувальний ензим підтримує градієнти потенціалутворювальних катіонів і робить парціальний внесок у величину потенціалу спокою на плазмалемі. З огляду на це, ми дослідили вплив нітросполук на убаїнчутливу  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТразу у пост'ядерній фракції міомерія.

Встановлено, що активність убаїнчутливої  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази в пост'ядерній фракції м'язової тканини матки становить  $4,4 \pm 0,4$  нмоль  $\text{P}_i/\text{мг}$  протеїну за 1 хв (рис. 3.6). cGMP (0,8 мкМ) майже 3-разово стимулює ензим порівняно з контролем. За присутності метиленового синього (10 мкМ), відомого неспецифічного інгібітора рГЦ, зникав не лише стимулювальний ефект cGMP, а й вдвічі пригнічувалась активність  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази (рис. 3.6, а). Виявлено, що 10 мкМ SNP та SN у 2 рази підвищують активність  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази. За присутності в середовищі інкубації метиленового синього активуючого впливу не спостерігали або він був суттєво нижчим (рис. 3.6, б).

Раніше нами було показано, що нітросполуки підвищують вміст cGMP у міоцитах матки [202]. На препаратах судин продемонстровано, що cGMP-залежний шлях реалізації ефектів NO призводить до активації  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази, водночас інгібування ензиму є процесом cGMP-незалежним і зумовлене посиленням вільнорадикальних реакцій [203]. В умовах стимуляції ендogenous синтезу NO після введення бактеріального ліпополісахариду і фармакологічних донорів NO (нітрогліцерину) було показано, що вплив оксиду азоту на  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТразу ГМК аорти залежить від його концентрації. Введення щуром ліпополісахаридів і помірні дози нітрогліцерину призводили до активації  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази [203]. Автори цитованої праці висунули припущення, що вплив на ензим залежав від співвідношення між рівнем АФК та NO, вмісту депонуючих NO молекул, а також від інтенсивності вільнорадикальних реакцій.



**Рис. 3.6.** Вплив cGMP, нітросполук та метиленового синього (МС, інгібітор розчинної гуанілатциклази) на  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРазну активність у пост'ядерній фракції м'язової тканини матки.  $M \pm m$ ,  $n = 5$ . \* — зміни віронідні відносно контролю,  $p \leq 0,05$



**Рис. 3.7.** Вплив 0,1 мМ SNP та SN на розвиток висококалієвої деполяризації в часі (взаємодія міоцитів з нітросполуками становила 15 хв). Для виключення ефекту мітохондрій клітини преінкубували 5 хв з 5 мМ азидомнатрію.  $M \pm m$ ,  $n = 5$ . За “1” прийнято власну флуоресценцію клітин

Оскільки в пост’ядерній фракції присутні у нативному стані всі компоненти сигнального шляху NO/pГЦ/cGMP/PKG і є можливість активаторного фосфорилування  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТРази, ми вважаємо, що в цьому варіанті постановки експерименту має місце cGMP-залежний механізм дії нітросполук. Саме він, згідно з вище наведеними літературними даними, може мати функціональне значення в контролі  $\text{Ca}^{2+}$ -залежної скоротливої активності ГМК оксидом азоту. cGMP-залежна стимуляція ензиму має наслідком зростання поляризації ПМ.

Можливе значення оксиду азоту як агента, що гальмує процеси збудження клітин гладенького м’яза матки, доводять експерименти з вивчення впливу SNP та SN на розвиток у часі висококалієвої деполяризації ПМ міоцитів (рис. 3.7). У цих дослідженнях додавання до клітин високої концентрації  $\text{K}^+$  за умови ізотонічної заміни  $\text{Na}^+$  на  $\text{K}^+$  в середовищі інкубації призводило до зниження флуоресценції  $\text{DiOC}_6(3)$ , яке тривало принаймні до 15 хв експерименту. Попередня обробка міоцитів нітросполуками не впливає на початковий розвиток деполяризації, але подальше падіння електричного потенціалу на плазмалемі зазнає суттєвого гальмування. У випадку дії SNP поляризація мембрани на 15 хв, згідно зі змінами флуоресценції  $\text{DiOC}_6(3)$ , набуває близьких до контрольних значень до моменту висококалієвої деполяризації (див. рис. 3.7). Наведені результати свідчать, що оксид азоту гальмує розвиток висококалієвої деполяризації з часом.

Таким чином, у міометрії NO підвищує проникність ПМ до  $\text{Ca}^{2+}$  шляхом стимуляції його пасивного транспорту у міоцити та гальмування РМСА. Подібні результати спостерігали також в окремих дослідженнях, проведених на кардіоміоцитах та клітинах нервової тканини [47, 185, 188, 204–206]. Зазначені мембранні та іонні ефекти можуть зумовлювати короткотривале зростання концентрації катіона в субсарколемному регіоні, що призведе до активації  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних ензимів та транспортних систем, зокрема відповідних під-

### 3.6. Біохімічні механізми дії оксиду азоту на $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаз та поляризацію...

---

типів  $\text{K}^+$ -каналів та NO-синтази, з наступним зростанням поляризації ПМ та зниженням рівня збудливості ГМК. Цьому сприяє також cGMP-залежна активація  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази. В науковій літературі збільшення  $\text{K}^+$ -проникності ПМ за умови спокою розглядають як важливий фактор підтримання відносної незбудливості міомерія в період вагітності [26]. Згідно з нашими результатами, це явище може бути зумовлене дією оксиду азоту.

Поряд з плазматичною мембраною, центральною мішенню дії оксиду азоту в гладеньком'язових клітинах можуть бути мітохондрії — одночасно потужне джерело цього газоподібного месенджера. Біонергетичні та метаболічні процеси, а також синтез оксиду азоту в мітохондріях суттєво залежать від концентрації іонів  $\text{Ca}$ , отже, і від оптимального функціонування  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем, які локалізовані в їхній внутрішній мембрані. Наразі остаточно сформовано уявлення щодо провідної ролі МХ як  $\text{Ca}^{2+}$ -депо в електрозбудливих клітинах унаслідок їхньої спроможності акумулювати та вивільнювати значні кількості іонів  $\text{Ca}$ , що особливо важливе в місцях контакту з ЕР/ПМ, де локальна концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  може сягати 10—100 мкМ, та модулювати амплітуду та часові характеристики  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналу [71, 130, 131, 133—135, 207]. Мітохондрії знижують концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  у ГМК та підтримують його низькі локальні концентрації навіть за умови глобального зростання вмісту катіона в цитоплазмі [89, 95, 130, 131, 139]. Аналізу систем транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  в МХ присвячено наступний розділ цієї книги.



## СА<sup>2+</sup>-ТРАНСПОРТУВАЛЬНІ СИСТЕМИ МІТОХОНДРІЙ КЛІТИН ГЛАДЕНЬКОГО М'ЯЗА

У дослідженнях на міометрії описане явище так званого “градієнта афінності” у функціонуванні Са<sup>2+</sup>-транспортувальних систем субклітинних структур. А саме, афінітет ( $K_m$ ) до Са<sup>2+</sup> зростає в ряді: РМСА (0,3 мкМ) > система енергозалежної акумуляції МХ (5,7 мкМ) > Na<sup>+</sup>-Са<sup>2+</sup>-обмінник ПМ (30—50 мкМ). Тобто спорідненість до кальцію Са<sup>2+</sup>-акумуляуючої системи МХ на порядок нижча за таку для РМСА, але суттєво більша, ніж для іонного обмінника ПМ. Крім того, початкова швидкість акумуляції катіона мітохондріями у 20 разів вища, ніж для системи Na<sup>+</sup>-Са<sup>2+</sup>-обміну ПМ та у 13,5 раза — для включення Са<sup>2+</sup> в СР [1]. Тобто, хоча Са<sup>2+</sup>-акумуляуючі системи МХ мають низький афінітет до Са<sup>2+</sup>, ефективність його акумуляції визначається суттєвою швидкістю процесу, високою позамітохондрійною концентрацією катіона, а також значним електричним потенціалом на ВММ та відносно низьким вмістом іонізованого Са у матриці [2—5].

Було розраховано, що в МХ міститься близько 22 % усього зв'язаного в міометрії Са<sup>2+</sup> [1]. Загальний вміст Са<sup>2+</sup> у МХ може сягати молярного діапазону [3, 6]. Водночас рівень саме іонізованого Са<sup>2+</sup> в матриці коливається в межах 0,5—5 мкМ за наявності в середовищі неорганічного фосфату [2, 3, 7—10]. У матриці МХ Са<sup>2+</sup> може знаходитись у складі Са<sup>2+</sup>-фосфатних комплексів, які подібні за хімічним складом та структурою до гідроксиапатиту та трикальційфосфату. При колапсі електрохімічного мембранного потенціалу та закисленні матриксу вони можуть швидко дисоціювати [3, 8—10]. Підтримання концентрації вільного Са<sup>2+</sup> в МХ на оптимальному рівні забезпечується взаємоузгодженим протіканням трьох процесів: накопичення (за умови наявності неорганічного фосфату та аденінових нуклеотидів у фізіологічних концентраціях), зв'язування з внутрішньомітохондрійними буферами та вивільнення Са<sup>2+</sup> органелами [11].

### 4.1. Шляхи надходження Са<sup>2+</sup> у мітохондрії

Біохімічні механізми транспорту Са<sup>2+</sup> через ЗММ є малодослідженим питанням. Розглядають можливість як відносно неспецифічного проникнення катіона (простої дифузії) у міжмембранний простір, так і участь в цьому процесі більш-менш специфічних протеїнів. Зазначимо, що при роботі на ізольованих препаратах мітохондрій інтактність зовнішньої мембрани може бути суттєво порушена. У ЗММ ідентифікований потенціалзалежний аніонний ка-

нал VDAC (voltage-dependent anion channel), який володіє більшою кальцієвою провідністю у “закритому” стані (рис. 4.1, див. вклейку) [4, 10, 11].

VDAC можуть існувати у станах високої та низької провідності, які розрізняються за здатністю пропускати метаболіти (АТФ, АДФ, піруват, малат) та іони ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ). Наявність і природа електричного потенціалу на ЗММ є питанням дискусійним. Втім припускають, що у випадку низьких електричних потенціалів на ЗММ ( $-10$  мВ) для VDAC характерний повністю відкритий стан, а зниження провідності та поява більшої селективності щодо іонів кальцію спостерігаються за вищих потенціалів ( $-40$  мВ). Провідність для  $\text{Ca}^{2+}$  становить  $0,4\text{--}4$  пСм [7, 12, 13]. Хоча за надекспресії VDAC рівень акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  в МХ зростає,  $\text{Ca}^{2+}$ -індуковане набухання МХ спостерігається і при нокдауні гена, який кодує VDAC, що може вказувати на участь в транспорті катіона й інших протеїнів ЗММ [11]. Транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  через ВММ забезпечується функціонуванням низки каналних структур, стисла характеристика яких наведена нижче.

#### Мітохондрійний $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортер

Мітохондрійний  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортер або MCU (mitochondrial calcium uniporter) забезпечує швидке і масоване надходження  $\text{Ca}^{2+}$ , функціонуючи за високих, мікромольних концентрацій катіона (рис. 4.1, див. вклейку) [14, 15]. За електрофізіологічними характеристиками являє собою  $\text{Ca}^{2+}$ -селективний іонний канал вхідного випрямлення, що транспортує іони за електрофоретичним механізмом завдяки наявності трансмембранного електричного потенціалу на ВММ: при його значенні  $-200$  мВ він на 99 % знаходиться у відкритому стані, при  $-80$  мВ імовірність відкритого стану знижується до 11 %. Канал може транспортувати до  $20000 \text{ Ca}^{2+} \cdot \text{c}^{-1}$  [10, 12, 16]. Канальну природу MCU підтверджують результати щодо інгібування рутенієвим червоним, RuR ( $K_i \sim 30$  нМ) та його похідним Ru360, які також блокують інші типи  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів, наприклад у СР [11, 17–21].

Згідно з останніми даними,  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортер є частиною макромолекулярної структури, відомої як комплекс  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортера (UNIPLEX, calcium uniporter complex), до складу якого входять протеїни MCU (mitochondrial calcium uniporter), MCUb (mitochondrial calcium uniporter b), MICU1 (mitochondrial calcium uptake 1), MICU2 (mitochondrial calcium uptake 2), MCUR1 (mitochondrial calcium uniporter regulator 1), EMRE (essential MCU regulator), можливо UCPs (uncoupling proteins) [20–26].

MCU — каналоформульальний протеїн (40 кДа), молекулярна структура якого ще дискутується. Він складається з двох спіральних доменів на N- та C-кінцях поліпептидного ланцюга, які виступають у матрикс, та двох трансмембранних спіралей, розділених коротким висококонсервативним амінокислотним мотивом, що звернений у міжмембранний простір і утворює пору. За останніми даними субодиниці MCU олігомеризуються з утворенням тетраметра або структури димер-димер. На різних моделях показано, що провідність каналу становить від  $6\text{--}7$  до  $14$  пСм [5, 12, 20, 23–25, 27–28]. MCUb — паралог MCU ( $\approx 50$  % ідентичних послідовностей), що може утворювати олігомерні комплекси з MCU, виконуючи роль домінантно-негативного регулято-

ра даного протеїна. MICU1 (54 кДа) розташований у міжмембранному просторі, є розчинним мембраноасоційованим протеїном, містить два  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючі "EF-hand"-домени, не входить до складу каналу і розглядається як регуляторний протеїн, що забезпечує позитивну кооперативність акумуляції катіона при підвищенні цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  до значень кількох мкМ. Цей протеїн закриває канал уніпортера за низьких концентрацій цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\approx 100$  нМ). MICU2/3 — ізоформи MICU1, які формують гетеродимери з MICU1. EMRE — протеїн масою 10 кДа, який являє собою один трансмембранний домен та взаємодіє з N- та C-кінцевими ділянками MCU. EMRE виступає своєрідним сенсором змін концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в міжмембранному середовищі/матриці та необхідний для взаємодії MCU із димерами MICU1/2 [20—25, 29—31]. Протеїни MCUR 1, UCP2/3, можливо, беруть участь в регуляції транспортної функції MCU. За надекспресії UCPs акумуляція  $\text{Ca}^{2+}$  зростала, в той же час нокдаун генів цих протеїнів її знижував; нокдаун MCUR1 мав наслідком інгібування ЕТЛ, а саме активності цитохром с-оксидази, та зниження потенціалу ВММ [2, 10, 11, 20, 21, 25, 26, 32].

MCU має низьку спорідненість до іонів Ca ( $K_{0,5} \leq 200$  мкМ залежно від об'єкта дослідження), за кінетичними розрахунками можлива наявність 2 сайтів зв'язування катіона. Активується за концентрацій  $\text{Ca}^{2+}$ , вищих за 200 нМ, насичувальна концентрація катіона сягає близько 200 мкМ. Високі концентрації цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  інгібують активність MCU, що може бути протидією  $\text{Ca}^{2+}$ -перевантаженню. Антагоністи CaM гальмують поглинання  $\text{Ca}^{2+}$ , що свідчить про пряму або опосередковану активацію MCU комплексом  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM [5, 11, 12, 16, 22, 27, 32—34]. Показано, що при деполаризації внутрішньої мітохондрійної мембрани MCU може працювати в реверсному режимі, забезпечуючи вихід  $\text{Ca}^{2+}$  [28]. MCU транспортує двовалентні катіони  $\text{Ca}^{2+} \sim \text{Sr}^{2+} > \text{Mn}^{2+} \sim \text{Ba}^{2+}$ , а також  $\text{Na}^+$  за відсутності двовалентних іонів, втім є непроникним до  $\text{K}^+$  та  $\text{Mg}^{2+}$  [10].

У МХ міометрія уніпортер має відносно низьку спорідненість до  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_{0,5} = 1\text{—}54$  мкМ), але високу максимальну швидкість акумуляції катіона (30—600 нмоль  $\text{Ca}^{2+}$ /мг протеїну за хвилину) [35—38].

Активність MCU модулюється різними ізоформами РКС (РКС $\beta$  — інгібує, РКС $\zeta$  — активує) та р38 MAP-кіназою [10, 12, 32]. Виявлено, що МХ міометрія менш ефективно накопичують  $\text{Ca}^{2+}$  за відсутності АТР, який забезпечує реверсну роботу АТР-синтази та рушійну силу для акумуляції катіона. Іони Mg у концентраціях до 5 мМ ефективно стимулюють транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  (константа активації за Mg сягає 1,7—4,3 мМ), але за концентрацій понад 10 мМ блокують накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  МХ [36, 37, 39]. Акумуляція  $\text{Ca}^{2+}$  МХ ефективно пригнічується за присутності інгібіторів дихального ланцюга (ціаніди, азид, ротенон, антимицин), протоніфоров (FCCP, CCCP, 2,4-динітрофенол) [27, 35]. Поліаміни (до 1 мМ), неорганічний фосфат (шляхом преципітації іонів Ca в матриці), таурин та флавоноїди активують транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  в МХ. Гальмівну дію на уніпортер мають лантаноїди, аналоги та похідні амilorиду, а також поліаміни (спермін) у концентраціях понад 1 мМ [2, 5, 7, 27, 32, 39].

### Швидкий кальцієвий вхід

Швидкий кальцієвий вхід або RaM (rapid mode uptake) спостерігали на ізольованих МХ печінки, серця, мозку (рис. 4.1, див. вклейку) [5, 33, 34, 38, 40—42]. RaM забезпечує локальні транзйентні (в межах мілісекунд) зростання концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в МХ. У випадку функціонування RaM швидкість акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  щонайменше в 300—1000 разів вища за працюючий у звичайному режимі MCU [43]. Вважають, що цього надходження  $\text{Ca}^{2+}$  достатньо для посилення синтезу АТР. Втім, RaM швидко інактивується  $\text{Ca}^{2+}$  при його концентрації в цитозолі до 100—200 нМ. Припускають, що RaM є не окремим типом  $\text{Ca}^{2+}$ -каналу, а певним станом MCU. Адже RaM, як і MCU, інгібується RuR та активується сперміном, а рушійною силою акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  є електричний потенціал на ВММ [3, 5, 16, 33, 34].

### Мітохондрійний ріанодиновий рецептор

Мітохондрійний ріанодиновий рецептор або mRyR (mitochondrial ryanodine receptor) — канал, який забезпечує швидке захоплення  $\text{Ca}^{2+}$ , характеризується високою провідністю та відносно низькою селективністю (рис. 4.1, див. вклейку) [16]. mRyR був ідентифікований як скелетно-м'язова ізоформа RyR1. mRyR відрізняється від RyR CP/EP чутливістю до кофеїну,  $\text{Mg}^{2+}$  та RuR. Щільність розподілу каналу в мембрані МХ у 10—20 разів менша, ніж у CP/EP. На відміну від RyR у мембрані CP/EP, зв'язування mRyR з ріанодиноном було кофеїн-нечутливе. Інгібуються mRyR ріанодиноном,  $\text{Mg}^{2+}$  та RuR, активуються імператоксином [5, 34, 44]. На МХ кардіоміоцитів показано біфазний характер залежності активності mRyR від  $\text{Ca}^{2+}$ :  $K_m$  за  $\text{Ca}^{2+}$  сягає 1—2 мкМ, максимальна активність транспортної системи має місце за концентрацій катіона 10—40 мкМ, але вже за 50 мкМ  $\text{Ca}^{2+}$  спостерігається її інгібування. Остання властивість може забезпечувати захисну роль від  $\text{Ca}^{2+}$ -перевантаження МХ та відкриття РТР. За деполяризації ВММ або  $\text{Ca}^{2+}$ -перевантаження активація mRyR забезпечує вихід  $\text{Ca}^{2+}$  з МХ, у такому випадку mRyR-опосередковане звільнення катіона може виконувати протекторну роль. Припускають, що в серцевому м'язі активація mRyR може лежати в основі  $\text{Ca}^{2+}$ -індукованої генерації АТР, яка необхідна для скорочення [5, 6, 16, 32, 34, 43]. Дисфункція mRyR може бути критичною в етіології скелетної/серцевої міопатії та нейродегенеративних захворювань [44].

## 4.2. Шляхи вивільнення $\text{Ca}^{2+}$ з мітохондрій

До систем транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  з МХ належать  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ - і  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінники ВММ та РТР, яка функціонує за умови перевантаження матрикса  $\text{Ca}^{2+}$ .  $\text{Na}^+$ -залежний обмінник існує в багатьох електрозбудливих тканинах, тоді як  $\text{Na}^+$ -незалежний  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник ідентифіковано в тканинах печінки, нирок, легенів, а також у гладеньких м'язах; у деяких об'єктах знайдено обидва типи обмінників [15, 19, 31, 45—47].

**$\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник**

$\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник МХ або  $\text{mNCX}$  використовує енергію градієнта  $\text{Na}^+$  для обміну  $3\text{Na}^+$  на  $1\text{Ca}^{2+}$  (є електрогенним) або  $2\text{Na}^+$  на  $1\text{Ca}^{2+}$  (електронейтральний обмін) залежно від типу тканини. Виведення іонів  $\text{Na}^+$  з матриксу здійснюється  $\text{H}^+$ - $\text{Na}^+$ -обмінником, молекулярна структура якого залишається невідомою [3, 11, 30, 33]. Протеїн масою 100—110 кДа, виділений з МХ та реконструйований у ліпосоми, виявляв активність  $\text{mNCX}$ . Показано, що в МХ серця та мозку він функціонує у формі димеру [25]. Гіпотеза, що  $\text{NCX}$  МХ та ПМ ідентичні, підтверджена наявністю 1—3 ізоформ  $\text{NCX}$  у мітохондрійній фракції. Проте катіонна селективність та чутливість до інгібіторів  $\text{mNCX}$  відрізняються від таких у  $\text{NCX}$  плазмалеми, а підвищення експресії останньої не викликає зміни активності  $\text{mNCX}$ . Продукт гена *fj22233* [48] проявляє активність  $\text{Li}^+$ - та  $\text{Na}^+$ -залежного  $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника та локалізований у ВММ [26]. Підвищення його експресії посилює вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з МХ, а нокаут/нокдаун цього гена супроводжується зникненням  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальної активності [20, 34, 48].

$\text{mNCX}$  більш специфічний до  $\text{Ca}^{2+}$ , ніж до  $\text{Mg}^{2+}$  та  $\text{Mn}^{2+}$ , та менш селективний до  $\text{Na}^+$ , так як  $\text{Li}^+$  може замінювати цей катіон, на відміну від  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{K}^+$  та  $\text{Rb}^+$ . Обмінник має високий афінітет до  $\text{Ca}^{2+}$  (у наномолярному діапазоні). Константа активації за  $\text{Na}^+$  сягає 7—10 мМ і навіть незначні коливання  $\text{Na}^+$  в цитозолі значно модулюють його роботу. Суттєве зростання концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозолі (мкМ) призводить до інгібування  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обміну до 70 %. Активність обмінника регулюється рН у вузькому діапазоні значень (7,5—7,6). Активується  $\text{mNCX}$  іонами  $\text{K}^+$  та коротколанцюговими алканолами, інгібується  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{La}^{3+}$  та органічними речовинами, а саме тетрафенілфосфонієм ( $K_i = 0,2$  мкМ), сполукою CGP-37157 ( $K_i = 0,4$  мМ), антагоністом СаМ трифлуоперазином, блокаторами  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів ПМ (дилтіазем, верапаміл), клоназепамом, беприділом, діетилпірокарбонатом, діуретиком амілоридом та його аналогами, циклоспорином А, RuR [3, 11, 33, 34, 48, 49]. Активність  $\text{mNCX}$  модулюється протеїнкіназами (PKC і PINK1) та антиапоптичним протеїном Bcl-2. В умовах деполяризації ВММ (за присутності FCCP) або блокування  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортера RuR  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник може працювати в реверсному режимі, а сам обмін не відбувається за відсутності  $\text{Na}^+$  у середовищі [32, 34].

 **$\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник мітохондрій**

На відміну від інших електрозбудливих тканин в міометрії було ідентифіковано  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмін, який не залежав від градієнта  $\text{Na}^+$ . Максимальна швидкість транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  залежала від початкової концентрації катіона в МХ: при вмісті  $\text{Ca}^{2+}$  40—50 та 200—300 нмоль/мг протеїну  $V_{\text{max}}$  становила відповідно 0,3—0,7 та 40—50 нмоль/мг протеїну за хвилину [35, 50]. Із використанням методу РНК-інтерферуючого скринінгу в S2-клітинах дрозофіли було виявлено протеїн LETM1, який був описаний як  $\text{H}^+$ - $\text{K}^+$ -обмінник, а згодом ідентифікований і як  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник [51]. У ліпосомах з вбудованим LETM1 закислення середовища інкубації викликало вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$ , тоді як його залу-

ження супроводжувалось накопиченням катіона. Таким чином,  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник може працювати в реверсному режимі, забезпечуючи накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  в МХ за його низьких цитозольних концентрацій ( $< 1$  мкМ), (див. рис. 4.1). [5, 10, 31, 32, 46, 52]. У різних тканинах демонструється як електрогенний обмін зі стехіометрією  $1\text{Ca}^{2+} : 1\text{H}^+$  або  $1\text{Ca}^{2+} : 3\text{H}^+$ , так і електронейтральний обмін  $1\text{Ca}^{2+} : 2\text{H}^+$  [20, 26, 32, 35, 46, 49, 53, 54]. Протеїн LETM1 та його дріжджові гомологи Mdm38 та Mrs7 можуть функціонувати також як  $\text{H}^+$ - $\text{K}^+$ -обмінники, регулюючи  $\text{K}^+$ -гомеостаз та об'єм МХ [32, 46, 55—57].

LETM1 (leucine zipper and EF-hand containing transmembrane protein 1) — висококонсервативний протеїн еукаріот, що має 31—83 % гомології в різних організмах, експресується переважно в МХ [46, 51, 58—59]. Показано його присутність також в ЕР, де він може забезпечувати підтримку рН-гомеостазу люмена. LETM1 людини — протеїн з молекулярною масою 83,4 кДа, у випадку дрозофіли його маса становить 113,6 кДа. Родина протеїнів LETM1 має короткий гідрофобний N-кінцевий домен, який знаходиться в міжмембранному просторі, консервативний збагачений на пролін трансмембранний домен, що може регулювати процес димеризації/олігомеризації, та великий гідрофільний C-кінцевий домен. Останній розташований у матриксі і містить субстратзв'язувальний сайт, суперспіралізовані ділянки та, окрім його дріжджових гомологів, два  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючі “EF-hand”-мотиви. Трансмембранний домен містить так званий TXXR мотив — сайт для фосфорилування РК С та казеїнкіназою 2 (СК2), який безпосередньо фланкує N-кінець трансмембранного домену [57, 58]. Припускають, що в мономерному вигляді LETM1 не забезпечує  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмін. Показано, що LETM1, Mdm38 та Mrs7 є компонентами високомолекулярних комплексів. Протеїни LETM1 та Mdm38 можуть бути як гомодимерами, так і гомоолігомерами та взаємодіяти з іншими протеїнами, наприклад шапероном BCS1L [46, 55, 56]. Дані електронної мікроскопії підтверджують, що LETM1 олігомеризується у гексамерну конфігурацію молекулярної масою близько 400 кДа, формуючи функціонально-активний обмінник, що володіє провідністю та чутливий до змін рН [51, 58, 60]. Втім, на разі передбачають у структурі LETM1 іншого трансмембранного домену, що змінює структуру та орієнтацію LETM1 у внутрішній мембрані мітохондрій, переміщуючи N-кінцевий домен з сайтом фосфорилування до матриксу [57, 59].

Було розраховано основні кінетичні параметри щодо функціональної активності LETM1. Константа активації за  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_{\text{Ca}}$ ) становила 137 нМ, значення початкової максимальної швидкості обміну ( $V_{\text{max}}$ ) дорівнювало 252 нмоль  $\text{Ca}^{2+}$ /мг протеїну за хвилину для вбудованого у ліпосому обмінника [52]. Відповідні величини для LETM1 МХ печінки такі:  $K_{\text{Ca}} = 8,4$  нМ,  $V_{\text{max}} = 1,2$ — $6,6$  нмоль  $\text{Ca}^{2+}$ /мг протеїну за хвилину, коефіцієнт Хілла становить 1,9—2,4,  $K_{0,5}$  для  $\text{H}^+$  = 52,1 нМ (рН 7,3) [53, 61]. Специфічних інгібіторів цього обмінника не виявлено, але блокувальний вплив мають роз'єднувачі окисного фосфорилування в низьких концентраціях (динітрофенол, протонофори FCCP та CCCP), ціаніди, RuR та Ru 360, іони  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  та лантанойди, частково сполука CGP-37157 [5, 27, 33, 49].  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмін МХ міометрія стимулювався естрогенами та простагландинами [35, 50].

Припускають, що LETM1/Mdm38 також відіграють роль у регуляції активності генів, які контролюють функціонування МХ. Нокаут гена LETM1 призводить до зниження вмісту протеїнів дихального ланцюга, зокрема цитохромів родини b, зменшення  $\Delta p$ , інтенсивності дихання поряд зі зростання генерації АФК та гальмуванням синтезу АТФ (тобто біоенергетичного колапсу), що супроводжується зупинкою клітинної проліферації. Водночас надекспресія LETM1 призводить до каспазонезалежної, некротичної загибелі клітини. Крім того, LETM1 може модулювати активність OPA1, впливаючи на морфологію МХ, а відсутність LETM1 призводить до фрагментації МХ [32, 46, 56, 62].

З порушенням синтезу LETM1 пов'язують низку патологічних станів. Делеція гена, що кодує LETM1, спостерігається у пацієнтів з синдромом Wolf-Hirschhorn [26, 54, 56] — захворюванням, яке характеризується відставанням у рості, розумовими відхиленнями, мікроцефалією, порушенням м'язового тону, гіпотонією, епілептичними судомми. Виникнення епілептичних судом за цієї хвороби пояснюється зменшенням рівня синтезу АТФ у МХ нейронів, наслідком чого є зниження поляризації нейролеми та порога збудливості [32, 46, 55]. Показано також, що в багатьох типах ракових пухлин, у тому числі матки, експресія LETM 1 є значно підвищеною [46, 62].

### Мітохондрійна пора перехідної провідності

Мітохондрійна пора перехідної провідності (permeability transition pore, РТР) являє собою неселективний мегаканал з кількома станами провідності, через який вільно проходять молекули менші за 1,5 кДа [63]. Цей канал включає компоненти ЗММ та ВММ, а саме VDAC, аденіннуклеотидний транслокатор (ANT), циклофілін D, бензодіазепіновий рецептор тощо (див. рис. 4.1). Припускають також асоціацію з ним димерів АТФ-синтази. Проте показано функціонування РТР і за відсутності аденіннуклеотидного транслокатора та циклофіліну D [20, 64]. Наразі поширене уявлення про домінуючу роль саме АТФ-синтази у структурі пори [29, 43, 63].

Відкриттю пори передують перевантаження матриксу іонами Са, гіперпродукція АФК, зростання вмісту окисленої форми пуринових нуклеотидів та дитіолів, деполяризація ВММ, збільшення рівня неорганічного фосфату в матриксі. Незворотне відкриття РТР призводить до вирівнювання іонних градієнтів та колапсу мембранного потенціалу, набухання МХ, розриву ЗММ, звільнення цитохрому c у цитозоль та наступної індукції апоптозу чи некрозу. Інгібується РТР імунодепресантом циклоспорином А (Csp A) в наномолярних концентраціях, який зв'язується з циклофіліном D, а також іонами Mg, Mn, відновленими пуриновими нуклеотидами та тіолами [6, 7, 64, 65].

В умовах підвищення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в МХ до межі, що перевищує транспортувальну здатність  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ - та  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінників, відбувається транзйентне відкриття РТР. Вважають, що транзйентні відкриття РТР, частота яких залежить від концентрації вільного  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксі, є фізіологічним процесом і можуть забезпечувати швидкий вихід  $\text{Ca}^{2+}$  з МХ за умови існування градієнта катіона та запобігати їх  $\text{Ca}^{2+}$ -перевантаженню [3, 6, 65, 66].

### 4.3. Значення іонів Ca у функціонуванні мітохондрій

Фізіологічна роль іонів Ca в МХ зумовлена їхнім значенням у регуляції фундаментальних біологічних процесів, що протікають в органелах і забезпечують життєдіяльність клітини: синтез АТР, енергетичний метаболізм, частина реакцій циклу сечовини, синтез стероїдних гормонів, підтримка  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостазу клітини, генерація АФК тощо [3, 31, 67, 68]. Крім того, МХ є провідною ланкою у запуску процесу запрограмованої загибелі клітини за дії несприятливих внутрішніх або зовнішніх чинників та регуляції шляхів переключення між апоптозом та некрозом. Органели містять проапоптичні фактори — цитохром c, фактор індукції апоптозу (AIF), прокаспаси 2, 3, 9, інгібітори протеїнів, що блокують апоптоз (Smac/DIABLO, Omi/HtrA2), які звільняються з органел у цитозоль при апоптичних сигналах, зокрема через РТР. Також у МХ локалізовані протеїни Вах та Вак з родини проапоптичних протеїнів Bcl-2, які сприяють підвищенню проникності ВММ при апоптозі [45].

Зовнішня мітохондрійна мембрана гладенька, характеризується відносно високим співвідношенням фосфоліпід/протеїни — 0,82. У ній локалізовані ацил-СоА-синтетаза, система подовження ланцюга жирних кислот, NADH-дегідрогеназа, моноамінооксидаза тощо. Зовнішня мембрана проникна для молекул масою 10 кДа і менше. ВММ високоспецифічна щодо речовин, які транспортуються, утворює кристи, глибоко занурені в матрикс, має напрочуд низьке значення відношення фосфоліпід/протеїни — 0,27, характеризується високим вмістом (близько 10 %) асиметрично розташованого фосфоліпиду кардіоліпіну (75 % його локалізовано на боці, що обернений до матриксу), який і зумовлює низьку проникність мембрани для іонів, зокрема  $\text{H}^+$ . ВММ містить компоненти дихального ланцюга, АТР-синтазу, транспортні протеїни, іонні канали ( $\text{Na}^+$ -канали, міто $\text{K}^+$ <sub>АТР</sub>-канали, міто $\text{K}^+$ <sub>Ca</sub>-канали високої провідності, потенціалзалежні  $\text{K}^+$ -канали, аніонні канали) та обмінники ( $\text{H}^+$ - $\text{K}^+$ ,  $\text{H}^+$ - $\text{Na}^+$ ,  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ ). Транспорт та внутрішньомітохондрійний розподіл протеїнів і деяких інших високомолекулярних сполук та низькомолекулярних метаболітів відбувається за рахунок протеїнових комплексів — транслокаторів зовнішньої та внутрішньої мембран [7, 9, 31, 69].

Зростання концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в клітині за її активації супроводжується посиленням інтенсивності протікання АТР-залежних реакцій та, відповідно, збільшенням споживання АТР. З іншого боку, в МХ  $\text{Ca}^{2+}$  стимулює окисне фосфорилування та продукцію АТР шляхом активації піруватдегідрогеназного комплексу (через  $\text{Ca}^{2+}$ -залежне дефосфорилування) та ензимів циклу Кребса — ізоцитратдегідрогенази,  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогенази, а також мембранозв'язаної гліцерол-3-фосфатдегідрогенази [30, 70]. Це забезпечує надходження відновлених еквівалентів NADH до ЕТЛ. Описано процес “мітохондрійної пам'яті” — довготривалої активації продукції АТР аж до 60 хв після  $\text{Ca}^{2+}$  сигналу. Водночас надмірне надходження  $\text{Ca}^{2+}$  в МХ та стимулювання дихального ланцюга є основним механізмом гіперпродукції АФК [2, 6, 12, 18].

Продемонстровано чутливість до  $\text{Ca}^{2+}$  самих комплексів дихального ланцюга, АТР-синтази, транслокази аденінових нуклеотидів та “EF-hand”-вмісних переносників метаболітів та кофакторів через ВММ, наприклад,  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних транслокаторів “aralar” та “citrin” [2, 4, 12, 25]. Іони Ca впливають на



процеси регуляторного фосфорилування/дефосфорилування протеїнів МХ. Прикладами таких ефектів є  $\text{Ca}^{2+}$ -опосередковане дефосфорилування  $\text{Mn}^{2+}$ -залежної супероксиддисмутази та фосфорилування компонентів дихального ланцюга й ензимів циклу Кребса [2].

Показано вплив іонів Са на рух та морфологію МХ. Максимальна рухливість МХ спостерігається за низьких (близько 100 нМ) концентрацій вільного  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозолі у стані спокою та повністю припиняється за зростання його концентрації до 1–2 мкМ, що полегшує поглинання  $\text{Ca}^{2+}$  МХ та стимулювання продукції АТР. Зростання внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  також ініціює транслокацію динамінспорідненої ГТРази до МХ, результатом чого є поділ та фрагментація МХ [2, 31, 71].

Транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  на рівні ПМ, ЕР/СР та МХ є взаємоузгодженим процесом. У збудливих клітинах МХ локалізовані поблизу потенціалкерованих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів ПМ і відіграють роль буфера для іонів Са, що надходять у клітину за деполяризації (в 20 нм від каналу рівень  $\text{Ca}^{2+}$  може сягати 100 мкМ), зменшуючи його локальну концентрацію. Крім того, солокалізація МХ з ЕР (~10–100 нм) та ПМ може забезпечувати перезаповнення ЕР, транспортуючи  $\text{Ca}^{2+}$  від ПМ до ЕР, оминаючи цитозоль. Розташування МХ біля каналів ПМ забезпечує підтримку каналів в активному стані за рахунок усунення інгібувальної дії іонів Са [2, 4, 6, 27, 32]. Продемонстрована наявність протеїнових містків між МХ (VDAC) та ЕР ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) — мембран, асоційованих з МХ (MAMs), що дає змогу здійснювати позитивну регуляцію поглинання  $\text{Ca}^{2+}$  МХ з боку ЕР [4, 25, 27, 29]. Контакти МХ із  $\text{Ca}^{2+}$ -акумуляуючими ділянками ЕР забезпечують перезаповнення ретикулярного пулу катіона під час та після стимуляції клітини, що необхідно для активації  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних шаперонів ЕР, які відповідають за фолдинг протеїнів [2, 6, 10, 11].

Таким чином, розташування МХ поблизу  $\text{Ca}^{2+}$ -мікродоменів (локальних областей високої концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  біля ЕР та ПМ) забезпечує швидку буферизацію катіона органелами, термінування  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналу, зменшуючи його амплітуду та поширення, а також надходження катіона до ЕР/СР [2, 11, 12, 31, 33].

Оскільки МХ багаті на ензими з високим вмістом тиольних залишків, залізо-сірчаних центрів, гемових груп, а також є джерелом утворення супероксид-аніона, вони виступають потенційною мішенню дії оксиду азоту або його редокс-форм [72, 73]. Оксид азоту, впливаючи на ефективність роботи ЕТЛ, ензимів матриксу та  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем ВММ, спроможний контролювати основні процеси, які забезпечують нормальне функціонування МХ і клітини в цілому [71, 74, 75].

#### 4.4. Роль NO в мітохондріях

Відкриття протягом останніх років можливості ендогенного синтезу NO в МХ, зумовленого роботою власної мітохондрійної NO-синтази (mtNOS) і нітрит/нітрат-редуктазною здатністю компонентів ЕТЛ [71, 75–77], переконливо свідчать про важливість оксиду азоту в регуляції функціональної активності МХ. Стационарну концентрацію NO в матриксі МХ за допомогою мікро-

#### 4.4. Роль NO в мітохондріях

електродної техніки вимірюють у наномолярному діапазоні, водночас інтактні органели здатні продукувати NO в суттєво вищих мікромольних концентраціях. Це вказує на те, що значна частина утвореного оксиду азоту реагує з мітохондрійними мішенями:  $O_2^-$ , гемовими та тіольними групами протеїнів тощо [78, 79].

NO за низьких фізіологічних концентрацій (наномольних) регулює ефективність окисного фосфорилування та впливає на рН матриксу [73, 78, 80, 81]. За нормального парціального тиску кисню NO знижує поглинання  $O_2$  в МХ і гальмує мітохондрійне дихання та окисне фосфорилування в різних тканинах, що розглядають як адаптивну фізіологічну відповідь [82—84]. Оксид азоту оборотно зв'язується та пригнічує активність комплексів ЕТЛ, найбільш чутливою мішенню вважають комплекс IV [74, 85—87]. Ендогенно синтезований NO, знижуючи активність цитохром с-оксидази, зменшує споживання кисню, що дає змогу оптимально функціонувати клітинним ензимам з низькою спорідненістю до  $O_2$  [71, 83, 88].

NO виступає важливим фактором регуляції споживання  $O_2$  клітинами в стінках великих судин та в тканинах на різних відстанях від капілярів. Розташовані ближче до кровотоку клітини інтенсивніше постачаються L-аргініном та  $O_2$ , що стимулює в них mtNOS та продукцію NO. Оксид азоту в подальшому обмежує споживання кисню цими добре окисгенованими клітинами, змушуючи  $O_2$  дифундувати до більш віддалених від кровотоку ділянок [86, 89, 90].

Комплекси дихального ланцюга мають різну чутливість до оксиду азоту. Відносно тривала дія 0,5—1 мкМ NO селективно і зворотно інгібує NADH-дегідрогеназу активність мітохондрійного комплексу I в інтактних клітинах та ізольованих органелах шляхом S-нітрозилування важливих тіольних залишків [75, 83, 91, 92]. Оксид азоту в концентраціях 0,3—0,5 мкМ гальмує транспорт електронів між цитохромами b та c1 в III комплексі дихального ланцюга, можливо, взаємодіючи з Fe-S-центрами [83, 92, 93]. У дослідях на МХ кардіоміоцитів, скелетного м'яза, печінки, нервових терміналей показано, що NO вже за концентрацій у матриксі 10—20 нМ зворотно зв'язується з цитохром с-оксидазою; оксид азоту нітрозилує залізо гема субодиниці a-a<sub>3</sub>, взаємодіє також і з Cu-вмісним центром, наслідком чого є інгібування перенесення електронів на  $O_2$ . Напівмаксимальне гальмування цитохром с-оксидази має місце за 50—100 нМ NO [83, 91, 92]. При інгібуванні цитохром с-оксидази зростає рівень відновлених компонентів ЕТЛ, зокрема убісеміхінону. Комплекс II, зважаючи на вміст залізо-сірчаних центрів, також здатний бути потенційною мішенню NO. Всі вище зазначені процеси можуть збільшувати швидкість продукції  $O_2^-$  та  $H_2O_2$  в МХ. Однак результатом NO-індукованого інгібування ЕТЛ є часткова деполаризація ВММ, що може мати протекторний ефект, навпаки знижуючи інтенсивність генерації АФК [83, 91, 93].

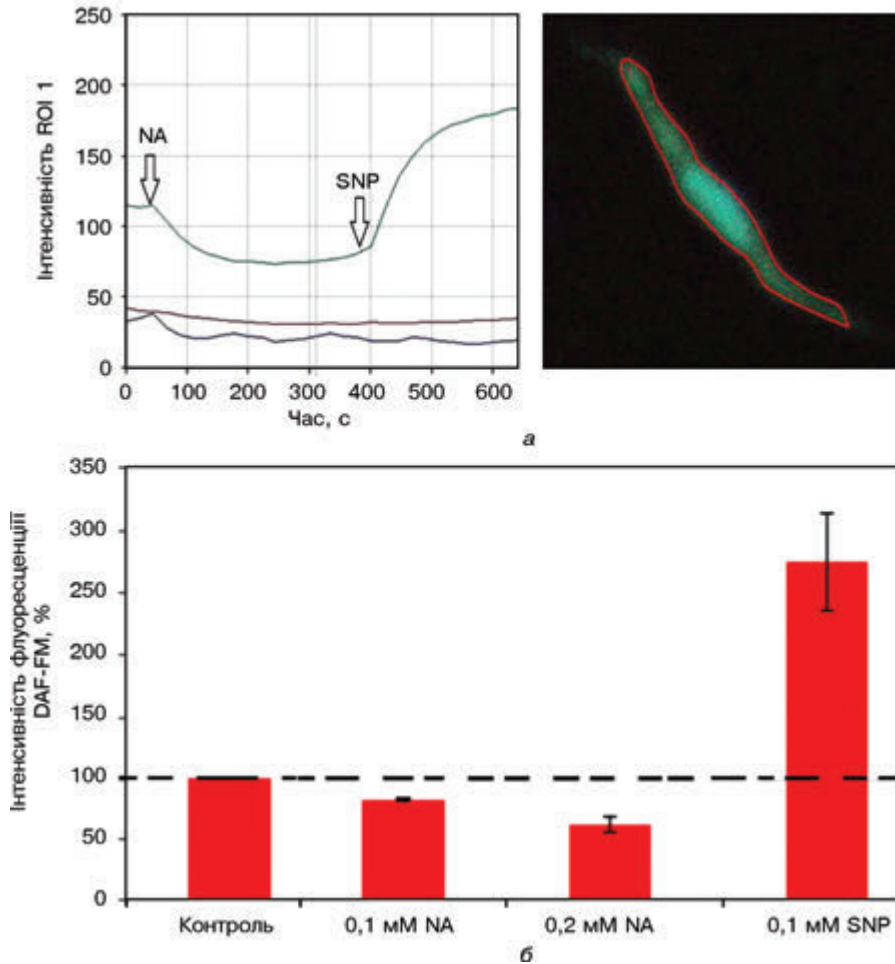
NO регулює гомеостаз  $Ca^{2+}$  в МХ і, відповідно,  $Ca^{2+}$ -залежні процеси в них [70, 71, 94]. Описано NO/cGMP-опосередковане зниження електричного потенціалу на ВММ, що змінює інтенсивність електрофоретичного поглинання  $Ca^{2+}$  [82]. Іони Ca можуть впливати на функціонування МХ, активуючи ключові метаболічні ензими [18, 70], і, зокрема, mtNOS [71, 73, 95]. Посилення роботи  $Ca^{2+}$ -залежних дегідрогеназ циклу Кребса, які постачають NADH

у дихальний ланцюг, призводить до збільшення поглинання кисню, в той час як стимулювання активності mtNOS веде до протилежного ефекту [70, 71, 94–96]. Отже, іони Ca реципрокно впливають на споживання кисню та інтенсивність окисного фосфорилування в МХ [75, 82, 94].  $\text{Ca}^{2+}$ -індуковане гальмування рухливості МХ відбувається на фоні посилення акумуляції катіона матриксом, активації біоенергетичних процесів (окисне фосфорилування, синтез АТР) та стимуляції ендогенної генерації оксиду азоту і в подальшому супроводжується NO-залежним зниженням поглинання кисню та інтенсивності окисного фосфорилування [71, 97]. Припускають, що поглинання  $\text{Ca}^{2+}$  дихаючими МХ та стимуляція mtNOS може підвищувати утворення ONOO<sup>-</sup>, який, у свою чергу, ініціює вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з матриксу через РТР з наступним падінням активності mtNOS [78, 96, 98]. Існує точка зору, що синтез АТР у МХ регулюється оксидом азоту cGMP-залежним шляхом [82, 99].

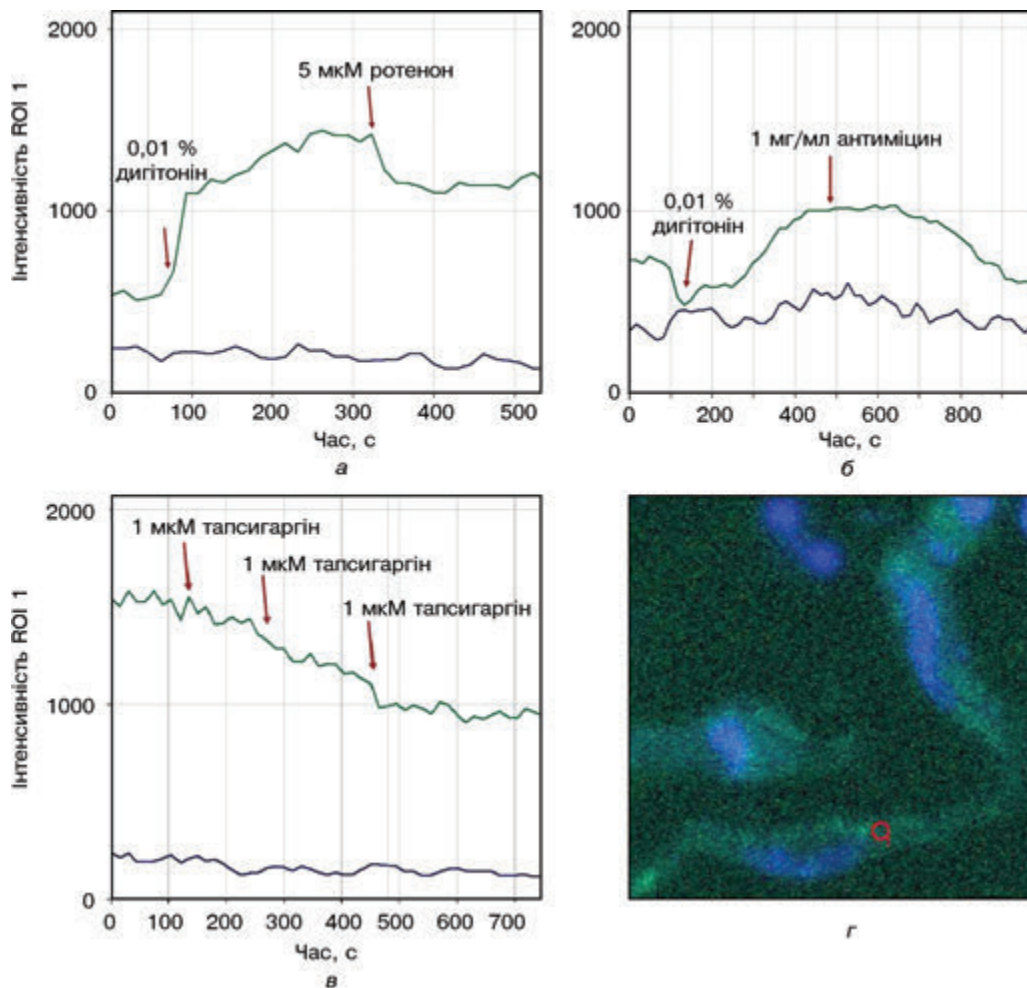
Оксид азоту стимулює біогенез МХ у тканинах різних типів і, зокрема, збільшує експресію сиртуїну-1, який разом з 5'-AMP-протеїнкіназою (АМРК) регулюють PGC-1 $\alpha$  (коактиватор-1 $\alpha$  рецептора- $\gamma$ , що активується проліфераторами пероксисом), який є модулятором мітохондрійного біогенезу [81–83, 87, 100, 101].

Показано, що NO може як запобігати, так і сприяти відкриттю РТР [82]. Це залежить одночасно від концентрації NO та інтенсивності генерації  $\text{O}_2^-$  в МХ. За фізіологічного рівня NO відкриття пори гальмується з константою напівінгібування близько 10 нМ [74]. Втім, високі концентрації NO сенситивізують РТР, роблячи її більш чутливою до таких факторів відкриття як підвищена концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксі, низький рівень АТР та посилення продукції  $\text{O}_2^-$ . Відкриття пори спричиняє різку деполаризацію, виснаження пулу АТР, апоптичну, а в окремих випадках і некротичну, загибель клітини. Для кардіоміоцитів було показано, що додавання донора NO SNAP викликало інгібування дихання (зростання флуоресценції NADH), зниження електричного потенціалу на ВММ та зменшення акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$ . За цих умов спостерігали NO-залежне інгібування РТР, що розглядали як один з механізмів кардіопротекції [18]. NO може безпосередньо впливати на РТР шляхом нітрування, а також опосередковано через активацію PKG або змінюючи концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксі та інтенсивність протікання оксидативного стресу. Показано також пряму взаємодію eNOS з VDAC, який є компонентом РТР [74]. Існує точка зору, що mtNOS відіграє важливу роль в регуляції активності РТР [74, 78, 102, 103].

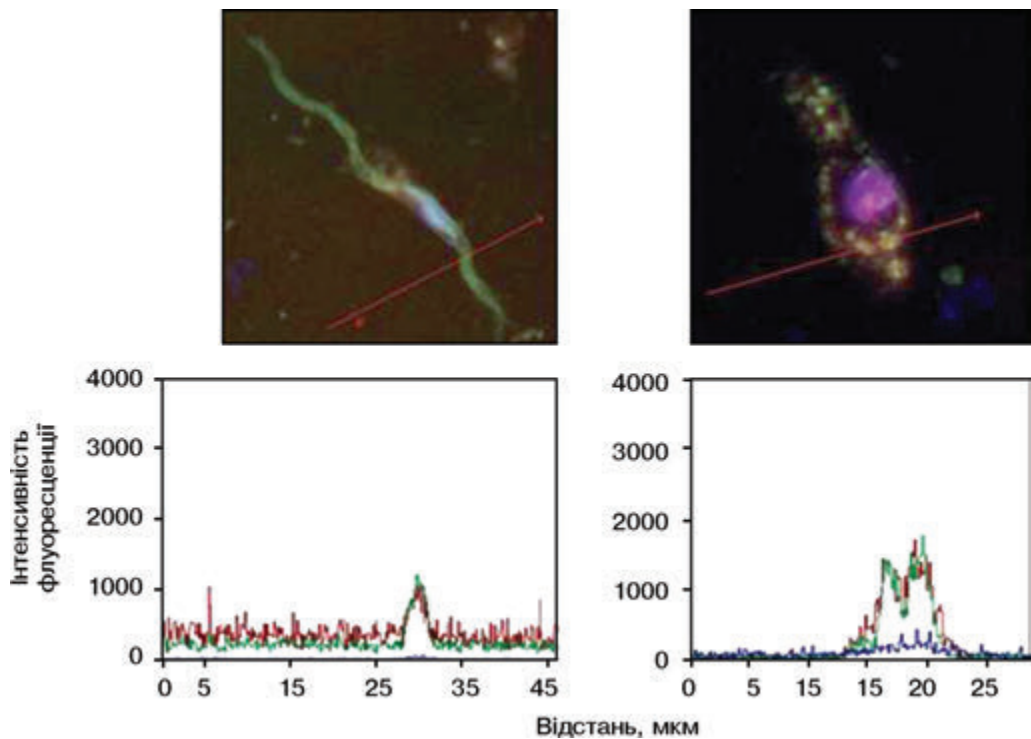
Гіперпродукція NO, наприклад, при запаленні та зростанні експресії iNOS, має наслідком конкуренцію NO з  $\text{O}_2$  за металопротеїни МХ, призводячи до NO-залежної гіпоксії (нітроксії). За цих умов у МХ спостерігається високий вміст АФК та пероксинітриду, які незворотно інгібують дихальний ланцюг, блокують синтез АТР, деполаризують мітохондрійну мембрану, спричиняють вивільнення цитохрому с у цитозоль. Останнє пов'язане або з втратою електричного потенціалу МХ, або з нітруванням залишку тирозину цитохрому с. Отже, надлишкове утворення ONOO<sup>-</sup> сприяє виходу  $\text{Ca}^{2+}$  та цитохрому с з МХ, призводить до розвитку Bcl-2-залежного апоптозу [82, 92, 104, 105]. Вивільнення цитохрому с за цих умов може не залежати від відкриття РТР [89].



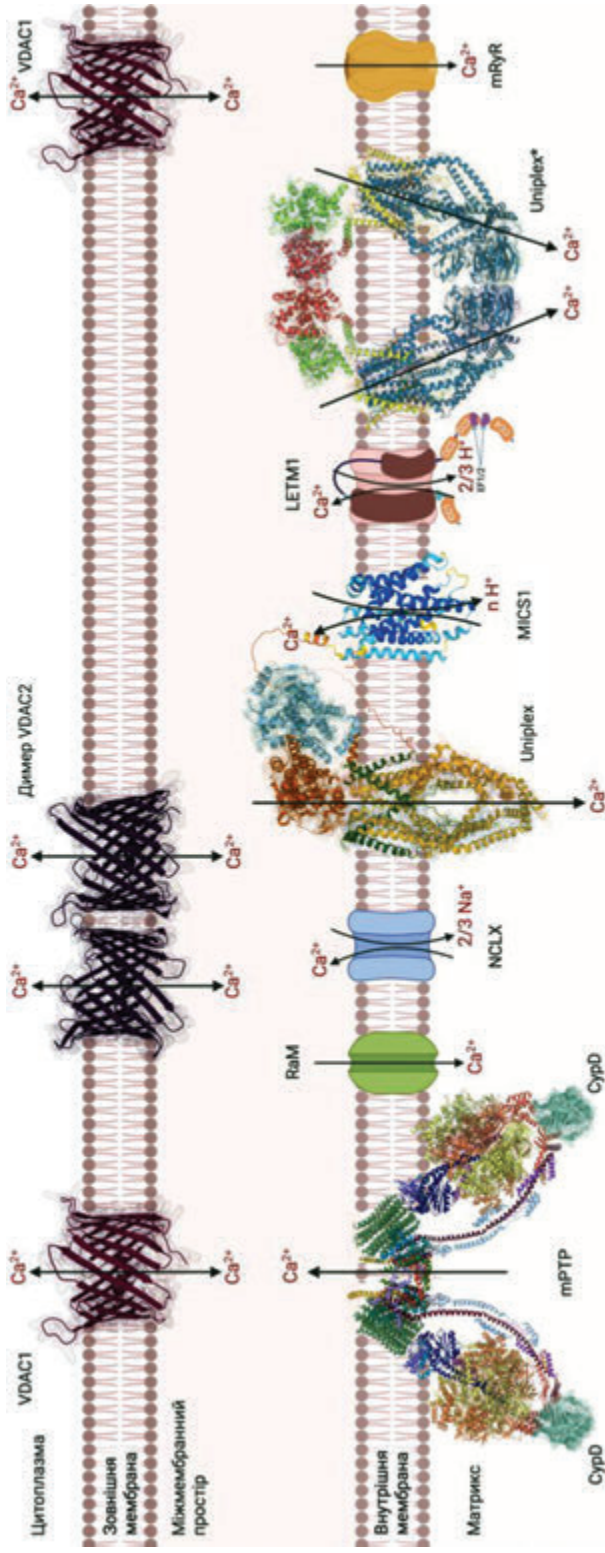
**Рис. 2.1.** Зміни інтенсивності флуоресценції DAF-FM у міоциті за додавання  $N^G$ -нітро-L-аргініну (NA, 0,2 мМ) та нітропрусиду натрію (SNP, 0,1 мМ): *а* — дані лазерної конфокальної мікроскопії: MitoTracker Orange CMTMRos, бура крива, канал 1; DAF-FM, зелена крива, канал 2; Hoechst 33342, синя крива, канал 3; *б* — кількісний аналіз змін інтенсивності флуоресценції DAF-FM у міоцитах за додавання NA та SNP відносно контролю без діючих речовин (100 %);  $M \pm m$ ,  $n = 3-7$



**Рис. 2.2.** Зміни флуоресценції NO-чутливого зонда DAF-FM за обробки клітин дигітоніном (а, б), ротеноном (а), антимицином А (б) та талсигаргіном (в). Дані лазерної конфокальної мікроскопії. Для кількісного аналізу результатів використана функція ROI (region of interests, г). DAF-FM (NO), зелена крива; Hoechst 33342 (ядро), синя крива



**Рис. 2.4.** Варіанти солокалізації флуоресцентних зондів DAF-FM та MitoTracker Orange SMTMRos у двох міоцитах. Показано результати тотожного розподілу барвників довільного оптичного зрізу клітин: бурий кольор — MitoTracker Orange SMTMRos, зелений — DAF-FM, синій — специфічний щодо ядра барвник Hoechst 33342



**Рис. 4.1.** Системи трансмембранного обміну  $Ca^{2+}$  в мітохондріях. ЗММ — зовнішня мітохондріальна мембрана; ВММ — внутрішня мітохондріальна мембрана; VDAS — потенціалзалежний аніонний канал (voltage-dependent anion channel); UNIPLEX — комплекс  $Ca^{2+}$ -уніпортера (calcium uniporter complex); MCU — мітохондріальний кальцевий уніпортер (mitochondrial calcium uniporter), MICU1/2 — розчинні мембранні ноасоційовані регуляторні протеїни, що містять  $Ca^{2+}$ -зв'язуючі EF-hand-домени (mitochondrial calcium uptake 1/2), EMRE —  $Ca^{2+}$ -сенсорний регуляторний протеїн (essential MCU regulator), UCPs — роз'єднуювальні протеїни (uncoupling proteins); mRyR — мітохондріальний р'янодінний рецептор (mitochondrial ryanodine receptor); RaM — система швидкого кальцевого входу (rapid mode uptake); NCLX — мітохондріальний  $Na^+$ - $Ca^{2+}$ -Li<sup>+</sup>-обмінник; SLP2 — стоматинподібний протеїн 2; LETM1 — протеїн, що забезпечує функціональну активність  $H^+$ - $Ca^{2+}$ -обміну (leucine zipper and EF-hand containing transmembrane protein 1); RTP — мітохондріальна пара перехідної провідності; ANT — транспортер аденінових нуклеотидів, CypD — циклофілін D, BPR — бензодіазепіновий рецептор, НК — гексокіназа, СК — креатинкіназа



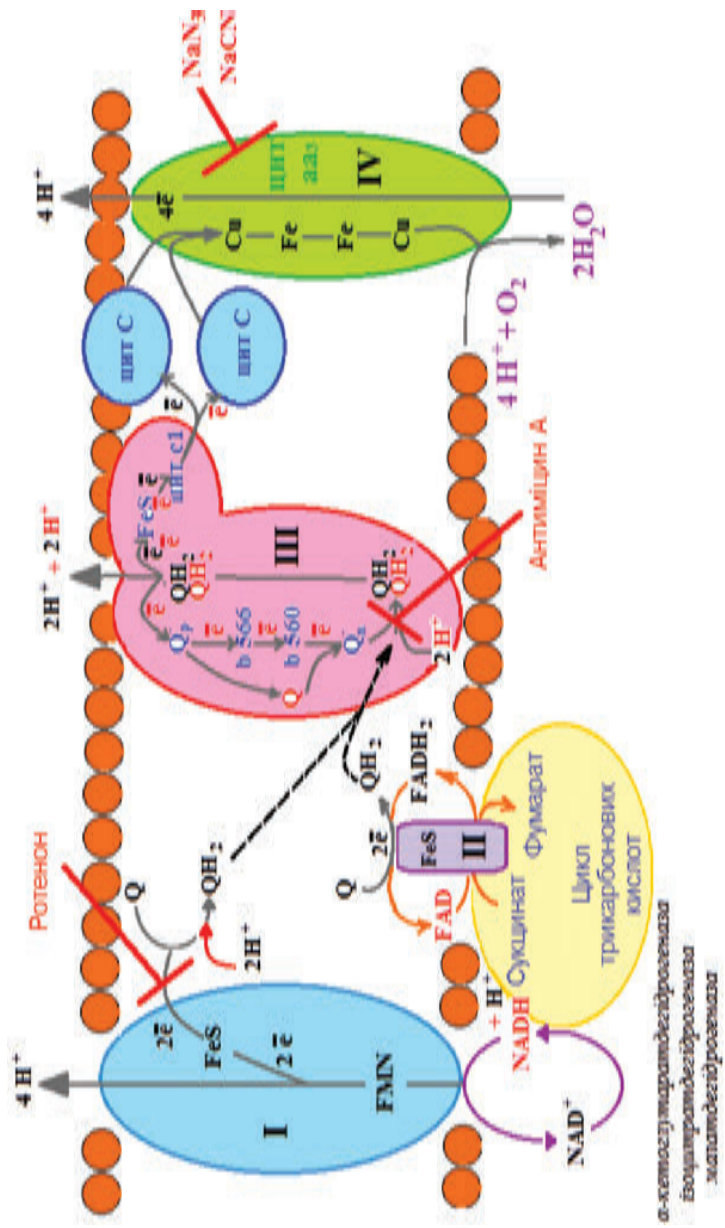
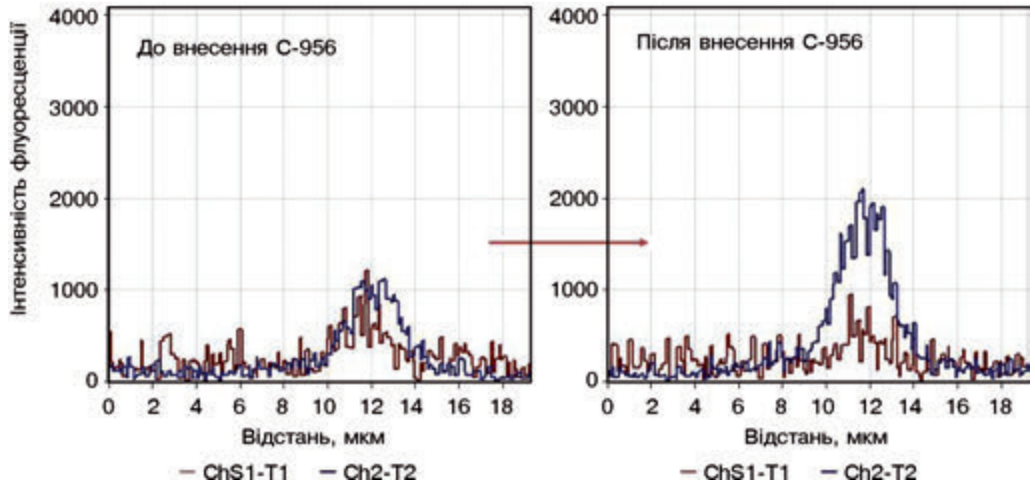
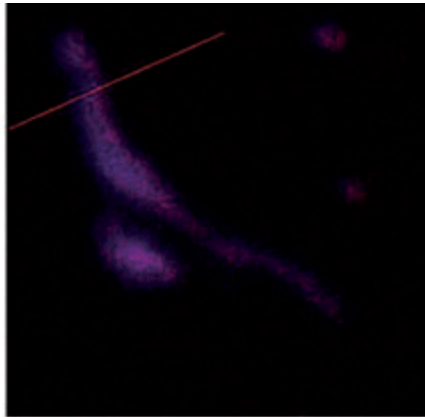


Рис. 6.1. Схема перенесення електронів та міця дії інгібіторів дихальних комплексів в електронтранспортному ланцюзі мітохондрій. Комплекси I — NADH-убіхінон оксидоредуктаза, II — сукцинатдегідрогеназа, III — убіхінон-цитохром с оксидоредуктаза, IV — цитохром с-оксидаза. Q — убіхінон, QH<sub>2</sub> — убіхінол





**Рис. 7.11.** Порівняння профілю розподілу в міоциті флуорофорного калікс[4]арену С-956 (синій колір) та специфічного щодо мітохондрій MitoTracker Orange СМТМRos (червоний колір). Для аналізу вибрана ділянка поза ядерною областю клітини

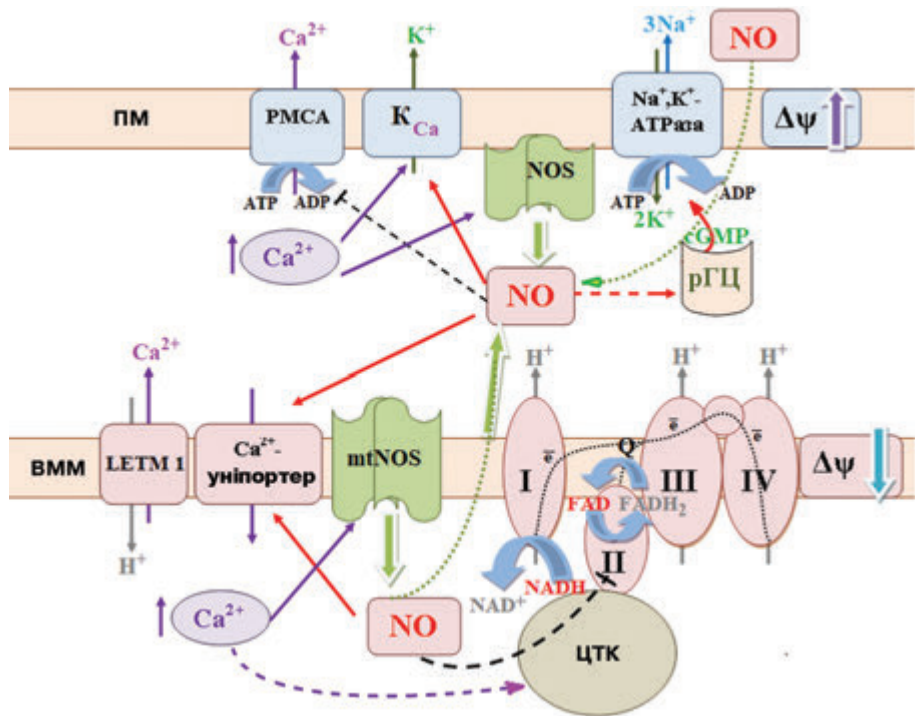


Схема 1. Біохімічні механізми, що лежать в основі регуляторної дії NO на рівні мітохондрій та плазматичної мембрани в м'язах матки



#### 4.4. Роль NO в мітохондріях

---

Має місце нітрозилування/нітрування багатьох мітохондрійних протеїнів, що часто супроводжується втратою їхньої функціональної активності [73—75, 82, 84, 89, 92, 94, 104, 106]. Пероксинітрит є причиною незворотної інактивації  $Mn^{2+}$ -вмісної супероксиддисмутази [107], матриксної аконітази [108, 109] та зниження вмісту відновленого глутатіону [110]. Він викликає окисне пошкодження ліпідів, ДНК [111, 112]. Нітрозативний стрес, викликаний пероксинітритом, спричинює нерепаровані розриви та інші пошкодження ДНК з наступною активацією полі-ADP-рибозополімерази (PARP-1) та транскрипційного фактора p53 як чинників, що забезпечують захисну функцію або ініціюють апоптоз [102, 104, 111—113].

Реакція NO з  $O_2^-$  розглядають як важливий фактор зниження біодоступності і фізіологічної активності оксиду азоту в МХ. Посилена генерація  $O_2^-$  та ONOO<sup>-</sup> спричиняє окислення  $BNH_4$ , що веде до “роз’єднання” mtNOS: з NO-генеруючого він перетворюється на  $O_2^-$ -продукуючий ензим, що призводить до подальшого порушення нормального функціонування ЕТЛ [74, 75, 84, 89, 111].

Описані патологічні явища, які мають наслідком колапс мітохондрійної енергетики та розвиток апоптозу, одержали назву мітохондрійної дисфункції. Остання, згідно з сучасними уявленнями, може зумовлювати й ендотелію дисфункцію [114, 115].

Наведені приклади свідчать, що як нормальне функціонування, так і загибель клітини значною мірою залежать від рівня продукції NO та інтенсивності генерації АФК саме в МХ. Оксид азоту, залежно від концентрації та хімічного мікрооточення, володіє як анти-, так і проапоптотичними ефектами, які реалізуються на рівні МХ [78, 81, 82, 92, 116]. Порушення балансу між анти- та прооксидантним статусом МХ, що супроводжується надмірним утворенням активних форм азоту та кисню, зокрема пероксинітриту та гідроксилрадикалу, призводить до виникнення їхньої дисфункції і лежить в основі біохімічних механізмів патогенезу артеріальної гіпертензії, серцевої недостатності та ішемічної хвороби серця, атеросклерозу, а також комплексних системних захворювань, таких як діабет II типу. Зазначені патологічні процеси навіть називають “мітохондрійними хворобами” [74, 111, 117, 118].

З урахуванням вищезазначеного, актуальним є дослідження біохімічних механізмів регуляції оксидом азоту концентрації  $Ca^{2+}$  в МХ міомерія, зокрема з’ясування впливу нітросполук на системи енергозалежної акумуляції  $Ca^{2+}$  та  $H^+$ - $Ca^{2+}$ -обмін ВММ. Це сприятиме кращому розумінню ролі оксиду азоту в мітохондрійзалежній регуляції  $Ca^{2+}$ -гомеостазу в гладенькому м’язі, а також  $Ca^{2+}$ -опосередкованій функціональній активності самих мітохондрій. Вирішення зазначених питань необхідно як для з’ясування ролі оксиду азоту в молекулярній фізіології мітохондрій, так і для більш глибокого розуміння причин та наслідків мітохондрійної дисфункції, зокрема спричиненої оксидативним/нітрозативним стресом.

## ОКСИД АЗОТУ ЯК РЕГУЛЯТОР ТРАНСПОРТУ $\text{Ca}^{2+}$ У ВНУТРІШНІЙ МІТОХОНДРІЙНІЙ МЕМБРАНІ

Електрохімічний потенціал на ВММ ( $\Delta\psi$ ) створюється за умови функціонування ЕТЛ і є безпосереднім наслідком формування та підтримання трансмембранного градієнта протонів в інтактних органелах. Він є інтегральним показником активності ЕТЛ та одним з основних регуляторів метаболічних та транспортних процесів в МХ. Електрохімічний потенціал складається з двох компонент: хімічної ( $\Delta\text{pH}$ ) та електричної ( $\Delta\phi$ ) [1, 2]. Робота  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортера залежить від ефективності транспорту протонів та електронів у ВММ і, відповідно, величини градієнта іонів водню. Суттєве зниження електрохімічного потенціалу мембрани органел призведе до гальмування електрофоретичної акумуляції ними  $\text{Ca}^{2+}$ . Водночас можна припустити, що домінуючим транспортним процесом у цьому випадку стане вивільнення катіона з матриксу в цитозоль. Із використанням  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливого зонда Fluo-4 AM та лазерної конфокальної мікроскопії продемонстровано [3] значне зростання флуоресценції цього барвника в міоцитах матки за дії 10 мкМ протонофору СССР без додавання екзогенного  $\text{Ca}^{2+}$ . Ці дані однозначно підтверджують суттєву роль МХ у підтриманні  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостазу в клітинах гладенького м'язу, а також значення електрохімічного потенціалу в процесах транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  в ВММ.

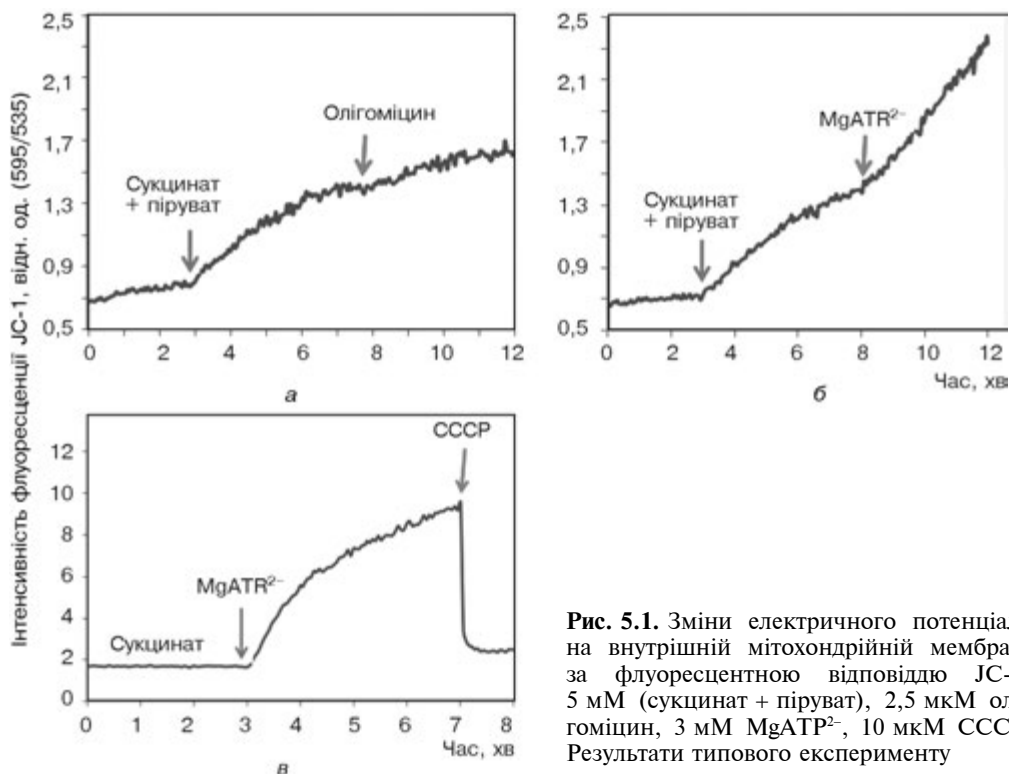
### 5.1. Стимуляція нітросполуками енергозалежної акумуляції іонів Са в мітохондріях міомерія

У дослідженнях із використанням радіоізотопної техніки ( $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ) на пермеабілізованих міоцитах матки щурів було продемонстровано, що акумуляція  $\text{Ca}^{2+}$  в МХ посилюється за присутності сукцинату та  $\text{MgATP}^{2-}$  в мілімолярних концентраціях [4–6]. Причиною посилення акумуляції катіона може бути зростання електричного потенціалу ВММ за цих умов. У серії експериментів для дослідження змін мембранного потенціалу ВММ у випадку штучної енергізації МХ нами було використано потенціалчутливий флуоресцентний зонд JC-1 (1 мкМ) [7, 8]. У концентраціях нижчих за 100 нМ JC-1 існує переважно як мономер та флуоресцює в зеленій області (525–535 нм). За вищих концентрацій JC-1 утворює агрегати (J-агрегати) зі зсувом інтенсивності флуоресценції в червону область (595 нм). Мембранний потенціал ВММ спричинює акумуляцію JC-1 у МХ завдяки більш негативному заряду з боку матриксу. Поляризовані МХ мають більшу інтенсивність флуоресценції в червоній об-

## 5.1. Стимуляція нітросполуками енергозалежної акумуляції іонів Са...

ласті від J-агрегатів, ніж у зеленій від мономерної форми зонда. Саме співвідношення інтенсивностей червоної/зеленої флуоресценцій (595/535) використовується як індикатор мембранного потенціалу, значення якого не залежить від концентрації зонда [9—11]. Відповідні експерименти здійснювали методом спектрофлуориметрії ( $\lambda_{\text{зб}} = 488 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{\text{фл}} = 535 \text{ нм}$  (мономер) та 595 (J-агрегат)), концентрація JC-1 становила 1 мкМ. Середовище інкубації мало склад, мМ: 20 Hepes (pH 7,4, 37 °C), 2 K<sup>+</sup>-фосфатний буфер (pH 7,4, 37 °C), 125 KCl, 25 NaCl. Вміст протеїну у мітохондрійній фракції становив 50 мкг.

Продемонстровано, що внесення субстратів дихання 5 мМ сукцинату та пірувату супроводжується зростанням електричного потенціалу на ВММ (рис. 5.1). Додавання 2,5 мкМ олігоміцину, який викликає штучну гіперполяризацію МХ унаслідок пригнічення транспорту протонів крізь субодиницю F<sub>0</sub> АТР-синтетази, має наслідком подальше зростання флуоресценції JC-1 (рис. 5.1, а). Внесення до мітохондрійної суспензії 3 мМ MgATP<sup>2-</sup> зумовлює генерацію електрохімічного градієнта протонів унаслідок обернення роботи АТР-синтетази, що також призводило до суттєвого збільшення флуоресцентної відповіді (рис. 5.1, б). Водночас додавання до інкубаційного середовища протонофору CCCP (10 мкМ) супроводжується зниженням флуоресценції JC-1 (рис. 5.1, в). Отже, флуоресцентний сигнал від JC-1 адекватно відображає зміни поляризації МХ, а їхня додаткова енергізація за додавання сукцинату та MgATP<sup>2-</sup> супроводжується зростанням електричного потенціалу на ВММ.



**Рис. 5.1.** Зміни електричного потенціалу на внутрішній мітохондрійній мембрані за флуоресцентною відповіддю JC-1: 5 мМ (сукцинат + піруват), 2,5 мкМ олігоміцину, 3 мМ MgATP<sup>2-</sup>, 10 мкМ CCCP. Результати типового експерименту

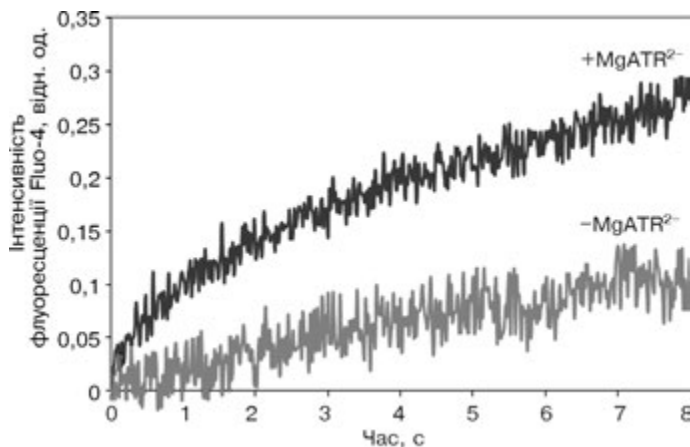


Рис. 5.2. Енергозалежна акумуляція  $\text{Ca}^{2+}$  за присутності 5 мМ сукцинату та 3 мМ Mg-ATP<sup>2-</sup>. Результат типового експерименту

Зміни рівня іонізованого Ca в матриксі ізольованих МХ досліджували з використанням Fluo-4 АМ. Навантаження МХ цим барвником в концентрації 2 мкМ виконували в середовищі, яке містило 10 мМ Hepes (рН 7,4, 37 °С), 250 мМ цукрози, 0,1 % бичачий сироватковий альбумін, 0,02 % Pluronic F-127 протягом 30 хв за температури 37 °С. Реєстрацію відносних значень флуоресценції Fluo-4 у МХ міометрія здійснювали за  $\lambda_{\text{вб}} = 490$  нм та  $\lambda_{\text{фл}} = 520$  нм. Середовище для енергозалежної акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  мало склад, мМ: 20 Hepes (рН 7,4, 37 °С), 2  $\text{K}^+$ -фосфатний буфер (рН 7,4, 37 °С), 250 цукроза, 3  $\text{MgCl}_2$ , 3 АТР, 5 сукцинат натрію. Концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  в середовищі без Mg-ATP<sup>2-</sup> становила 50 мкМ, з Mg-ATP<sup>2-</sup> — 80 мкМ, що відповідає концентрації вільного  $\text{Ca}^{2+}$  45 мкМ (розраховано за допомогою програми MAXCHEL [12]).

За присутності 3 мМ Mg-ATP<sup>2-</sup> та 5 мМ сукцинату ізольовані МХ ефективно накопичують  $\text{Ca}^{2+}$  із стандартного інкубаційного середовища, що супроводжується суттєвим зростанням рівня флуоресценції Fluo-4 (рис. 5.2). За відсутності Mg-ATP<sup>2-</sup> в середовищі електрофоретичне накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  суттєво нижче.

Надійна бар'єрна функція внутрішньої мембрани ізольованих МХ міометрія щодо  $\text{Ca}^{2+}$  ілюструється дослідями, в яких додавання  $\text{Ca}^{2+}$ -іонофору А-23187 (10 мкМ) разом із  $\text{Ca}^{2+}$ -хелатором ЕГТО (1 мМ) в умовах досягнення транспортним процесом стаціонарного рівня супроводжується різким падінням флуоресценції зонда, що свідчить про зниження концентрації катіона в МХ принаймні до початкового рівня [13]. Збільшення рівня  $\text{Ca}^{2+}$  в середовищі енергізованих МХ у межах 20—80 мкМ, які відповідали значенням концентрацій вільного катіона 11—45 мкМ, супроводжувалось зростанням флуоресцентної відповіді зонда, причому за цих умов досягається насичення за субстратом перенесення (рис. 5.3, а). Подальші розрахунки показали, що уявна константа активації за  $\text{Ca}^{2+}$  транспортного процесу ( $K_{\text{Ca}}$ ) становить  $29,1 \pm 3,7$  мкМ, що знаходиться в межах фізіологічного діапазону і відповідає концентрації катіона в клітині поблизу МХ (у межах контактів МХ-СР або МХ-ПМ) [14, 15]. Водночас використання надто високих концентрацій катіона здатне викликати порушення функціональної активності органел [16, 17].

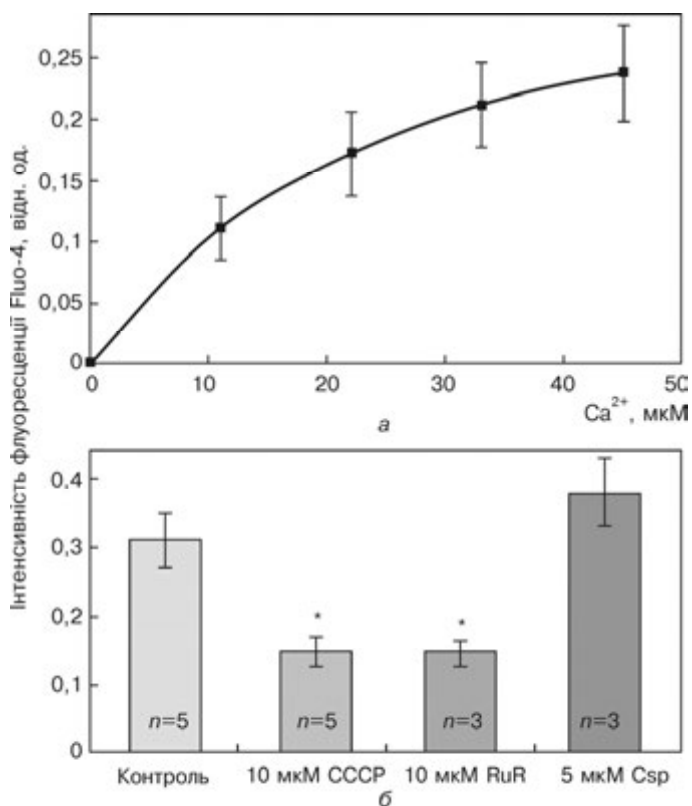
## 5.1. Стимуляція нітросполуками енергозалежної акумуляції іонів Са...

Початкова швидкість процесу акумуляції (за флуоресценцією Fluo-4)  $V_0$  дорівнює  $1,18 \pm 0,03$  ум. од. флуор./с, характеристичний час  $\tau_{1/2}$  (час напів-максимальної акумуляції катіона) становить  $140 \pm 8$  с. Методику розрахунку див. у виносці 1.

Відносно високе значення  $K_{Ca}$  підтверджує уявлення про низьку спорідненість  $Ca^{2+}$ -уніпортера до катіона. Величина константи не дуже сильно відрізняється від значень для ГМК матки (1–25 мкМ), судин (17 мкМ) та таєпіасолі (7 мкМ), отриманих радіоізотопним методом [18, 19].

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

В умовах дисипації протонного градієнта за присутності 10 мкМ протонофору CCCP і відповідного зниження рушійної сили електрофоретичного накопичення  $Ca^{2+}$  акумуляція катіона органелами знижується порівняно з контролем, але не набуває нульового значення (рис. 5.3, б). Одним із можливих пояснень цього залишкового рівня акумуляції може бути реверсне функціонування  $H^+$ - $Ca^{2+}$ -обмінника, адже в умовах деполяризації ВММ рН матриксу знижується, що може активувати  $\Delta pH$ -залежне накопичення  $Ca^{2+}$ .



**Рис. 5.3.** Акумуляція  $Ca^{2+}$  енергізованими мітохондріями залежно від концентрації  $Ca^{2+}$  в робочому середовищі ( $M \pm m$ ;  $n = 5$ ) (а), а також за присутності CCCP, RuR та Csp (б), \* —  $p < 0,05$ ,  $M \pm m$ ;  $n = 3-5$



За присутності блокатора  $\text{Ca}^{2+}$ -акумуляуючих систем RuR (10 мкМ) накопичення катіона також істотно зменшується порівняно з контролем (див. рис. 5.3, б). Наявність нечутливої до RuR компоненти транспортування  $\text{Ca}^{2+}$  в МХ можна пояснити функціонуванням численних каналних структур (аніонні, Вах/Вах-канали) та транслоказ, які за умови блокування  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем забезпечують акумуляцію катіона [20—22].

За присутності інгібітора РТР циклоспорину А (Csp) акумуляція іонів Са суттєво не змінювалась (див. 5.3, б). Отже, значення циклоспорин-чутливої пори в процесі обміну катіона в ізольованих МХ не є визначальним у нашому варіанті проведення досліджень. Можливо, це зумовлено наявністю в середовищі акумуляції  $\text{MgATP}^{2-}$  та сукцинату, які стабілізують роботу ЕТЛ протягом експерименту і забезпечують достатню енергізацію МХ, а отже, пригнічують РТР.

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

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

В умовах попередньої інкубації МХ із 100 мкМ SNP та SN протягом 15 хв спостерігалось суттєве зростання акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  органами порівняно з контролем (рис. 5.4). Зокрема, SNP посилював транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  приблизно в 1,6 раза. Ефект 100 мкМ SN виявився дещо менш інтенсивним, але статистично значущим. Подібні результати були одержані іншими авторами під час дослідження короткотривалого впливу нітрогліцерину *in vivo* в аорті, міокарді та печінці щурів [23]. Одночасно в цій праці було зареєстроване зниження мембранного потенціалу органел на 28—30 %. Отже, зростання ємності МХ до  $\text{Ca}^{2+}$  як *in vivo*, так і *in vitro* в різних тканинах може бути пов'язане із активацією безпосередньо  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортера і, можливо, мало залежить від змін мембранного потенціалу у відносно вузькому діапазоні.

За присутності протонофору СССР (10 мкМ) та RuR (10 мкМ) стимулювальний ефект SNP на акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  МХ не проявлявся (див. рис. 5.4), що доводить роль саме  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортера в досліджуваному нами процесі. Рівень накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  за дії СССР та RuR сягав величин, нижчих за контрольні значення без додавання SNP, оскільки рутенієвий червоний безпосередньо блокує  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортер, а СССР усуває саму рушійну силу транспорту катіона.

Інгібітор РТР 5 мкМ Csp майже не впливав на активоване SNP енергозалежне накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  МХ (див. рис. 5.4), хоча і спостерігалась тенденція до зростання акумуляції катіона за цих умов. Одержані результати вказують на несуттєву роль циклоспорин-чутливої пори в біохімічних механізмах стимуляції транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  в МХ у нашій моделі.

## 5.2. Біохімічні характеристики $H^+$ - $Ca^{2+}$ -обмінника у внутрішній мембрані...

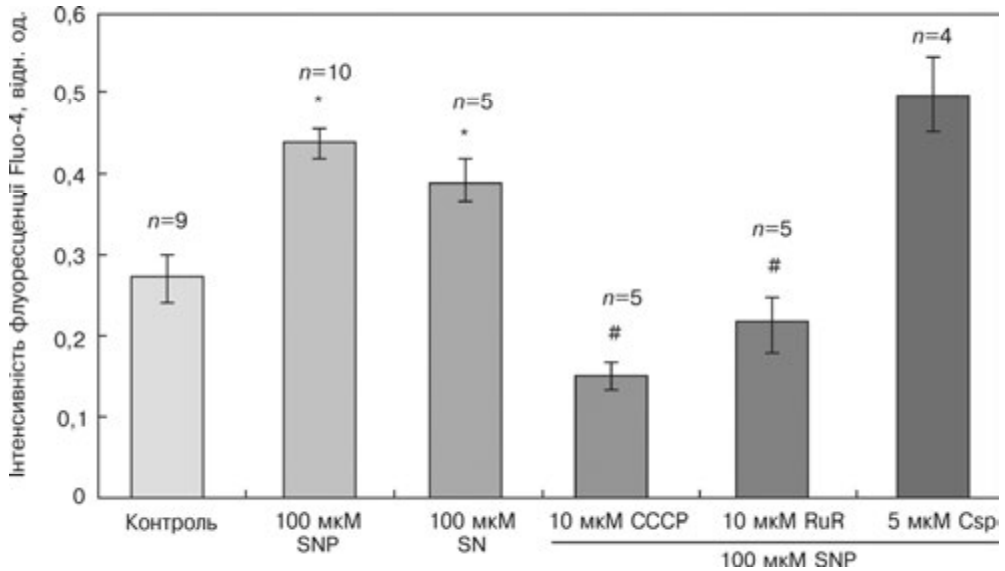


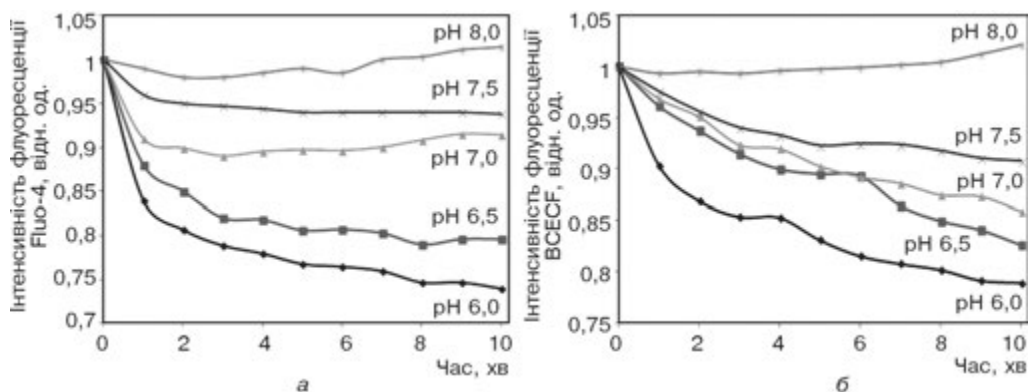
Рис. 5.4. Вплив нітросполук на енергозалежну акумуляцію  $Ca^{2+}$  в мітохондріях за присутності модифікаторів трансмембранного обміну катіона.  $M \pm m$ ; \* — зміни вірогідні відносно контролю,  $p \leq 0,05$ , # — відносно дії 100 мкМ SNP,  $p \leq 0,05$

Водночас в експериментах, проведених на аорті та міокарді щурів в умовах введення тваринам нітрогліцерину, показано, що підвищення  $Ca^{2+}$ -ємності МХ зумовлене саме інгібуванням РТР оксидом азоту [23, 24]. Тими ж авторами в досліді на ізольованих МХ, на відміну від експериментів *in vivo*, показано зниження  $Ca^{2+}$ -ємності органел за дії донора NO, яке пояснюється активацією вивільнення катіона через  $Ca^{2+}$ -уніпортер, спричинене деполяризацією МХ. Відмінності між наведеними результатами можуть бути зумовлені тканинспецифічністю впливу та, деякою мірою, різницею в хімічній структурі використаних нітросполук. Існує точка зору, що біохімічні механізми дії NO на міомерії суттєво відрізняються від тих, які притаманні іншим гладеньким м'язам [25, 26].

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

## 5.2. Біохімічні характеристики $H^+$ - $Ca^{2+}$ -обмінника у внутрішній мембрані мітохондрій та вплив оксиду азоту на цю транспортну систему

Наступна серія досліджень була спрямована на вивчення біохімічних особливостей  $H^+$ - $Ca^{2+}$ -обміну в МХ міомерія з огляду на його можливу чутливість/нечутливість до дії NO із залученням флуоресцентних зондів Fluo-4AM (2 мкМ), рН-чутливого BCECF-AM (5 мкМ) та методу спектрофлуори-



**Рис. 5.5.** Зміни концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  (а) та  $\text{H}^+$  (б) в матриці мітохондрій за умови функціонування  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обміну. Дані типових експериментів

метрії. Навантаження MX Fluor-4AM/BCECF-AM проводили у середовищі, яке містило 10 мМ Hepes (pH 7,4), 250 мМ цукроза, 0,1 % бичачий сироватковий альбумін та 0,02 % Pluronic F-127 протягом 30 хв за температури 25 °С. BCECF-AM, який не акумулювався в матриці, відокремлювали від MX шляхом переосадження при 12 тис. g протягом 15 хв. Реєстрацію змін флуоресценції BCECF-AM в MX виконували при  $\lambda_{\text{вб}} = 510$  нм,  $\lambda_{\text{фл}} = 535$  нм.

Дослідження  $\Delta\text{pH}$ -індукованого вивільнення іонів  $\text{Ca}^{2+}$  з MX попередню енергозалежну акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  проводили протягом 5 хв, як описано вище (див. підрозділ 5.1), після чого аліквоту суспензії (100 мкл) розводили в середовищі вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  (2 мл) такого складу, мМ: 20 Hepes (pH 6,0–8,0, 37 °С), 2  $\text{K}^+$ -фосфатний буфер (pH 6,0–8,0, 37 °С), 250 цукроза, 5 сукцинат натрію, 0,005 Ссп.

Було продемонстровано процес вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  із MX, акумульованого в енергозалежному процесі, та паралельне закислення матриксу (рис. 5.5). Інтенсивність вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  залежала від величини позамітохондрійного рН: при закисненні середовища суттєво посилюється вихід  $\text{Ca}^{2+}$  з MX.

Градієнти фізіологічно значущих моновалентних катіонів  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  та  $\text{Li}^+$  (за ізотонічних умов) не стимулювали транспортування  $\text{Ca}^{2+}$  з MX. Іони  $\text{Mg}$  (4,5 мМ) пригнічували  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмін. Інгібітор  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника 100 мкМ тетрафенілфосфоній [27] не впливав на  $\Delta\text{pH}$ -індукований транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  з MX (графічні дані не наведено). Наші експерименти підтверджують відсутність або незначну роль  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника у функціонуванні MX гладеньких м'язів, зокрема міометрія [18, 19], і відповідають уявленням про функціонування  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника у ВММ ГМК.

Усе вище описане добре корелює із результатами попередніх досліджень, проведених на ізольованих MX міометрія корів із застосуванням радіоізотопної техніки ( $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ). Зокрема було показано, що закислення середовища інкубації від 7,5 до 6,5 стимулювало вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  із MX, водночас зниження рН пригнічувало зворотній процес енергозалежної акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$ . Катіони  $\text{Na}$  та  $\text{K}$  також не впливали на досліджуваний транспорт [18]. В експериментах, виконаних на пермеабілізованих дигітоніном міоцитах матки шурів та-

## 5.2. Біохімічні характеристики $H^+$ - $Ca^{2+}$ -обмінника у внутрішній мембрані...

кож із використанням ізотопної техніки, демонструється, що закислення середовища призводить до гальмування рутенійзалежного включення  $Ca^{2+}$  в МХ, а ізотонічна заміна іонів К на іони Na виявилась не ефективною [6]. Принципова різниця між дослідженням процесів транспорту  $Ca^{2+}$  із використанням  $^{45}Ca^{2+}$  та флуоресцентних зондів полягає в тому, що в останньому випадку тестуються зміни саме концентрації іонізованого Ca, тобто того пулу катіона, який володіє функціональною активністю.

Динаміка  $\Delta pH$ -індукованого виходу  $Ca^{2+}$ , проаналізована за зміною флуоресценції Fluo-4, задовольняє кінетичні закономірності реакції першого порядку. Було розраховано кінетичні параметри  $\Delta pH$ -індукованого вивільнення  $Ca^{2+}$  за величини рН 6,5 позамітохондрійного середовища, а саме початкову швидкість  $V_0$  та характеристичний час  $\tau_{1/2}$  (час напіввиходу катіона з МХ) [28]. Методика розрахунку див. у виносці 2.

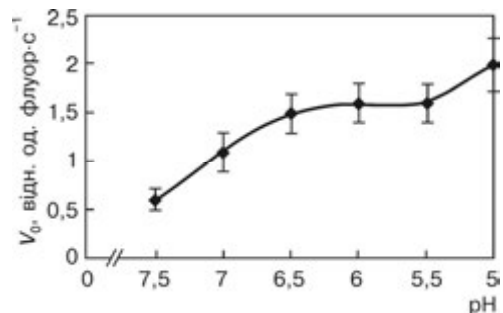
Початкова швидкість становить  $1,37 \pm 0,23$  ум. од. флуор./с, а  $\tau_{1/2}$  —  $64 \pm 9$  с. Крива залежності вивільнення  $Ca^{2+}$  з ізольованих МХ міометрія від концентрації протонів у середовищі їх розведення має тенденцію до насичення (рис. 5.6). Розраховане в координатах Хілла  $\{ \lg[(V_{\max} - V_0)/V_0]; \lg[H^+] \}$  рН активації становить  $6,9 \pm 0,1$ , що свідчить про можливість функціонування системи  $H^+$ - $Ca^{2+}$ -обміну за фізіологічних значень рН у міжмембранному просторі МХ [29—31]. Значення коефіцієнта Хілла ( $n_H$ ) наближається до одиниці, що вказує на стехіометрію обміну 1:1, тобто електрогенність транспортної системи.

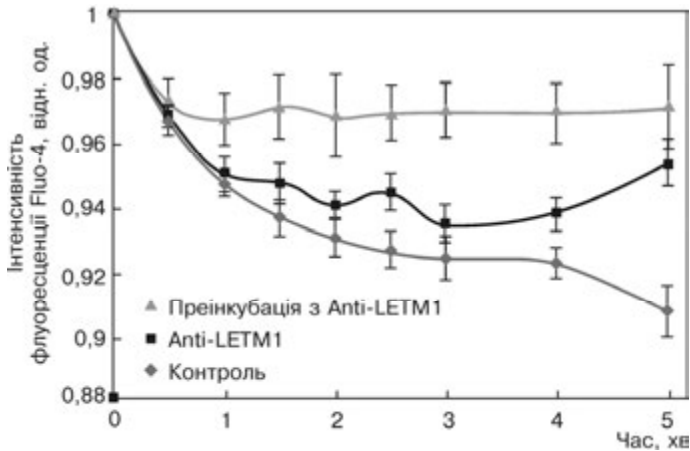
Згідно з сучасними уявленнями, молекулярною структурою, яка забезпечує функціонування  $H^+$ - $Ca^{2+}$ -обмінника у ВММ, виступає протеїн LETM1, який асоційований із білковим комплексом масою 300—500 кДа. Відсутність цього протеїну спричинює деполяризацію, набухання МХ та втрату крист. Тому LETM1 розглядають як частину молекулярної структури, яка бере участь у підтриманні осморегуляції органел [32—34]. Об'єм мітохондрій у нормі регулюється переважно двома структурами: міто $K_{ATP}$  та  $H^+$ - $K^+$ -обмінником. У літературі наведено докази того, що LETM1 є протеїном, який забезпечує функціонування  $H^+$ - $K^+$ -обміну у внутрішній мітохондрійній мембрані. Отже, постають фундаментальні біологічні питання: як співвідносяться системи обміну  $H^+$ ,  $K^+$  та  $Ca^{2+}$  в цих субклітинних структурах, і чи не є  $H^+$ - $K^+$ -обмінник та  $H^+$ - $Ca^{2+}$ -обмінник єдиним складним протеїном, що локалізований у внутрішній мембрані мітохондрій.

$\Delta pH$ -залежне вивільнення  $Ca^{2+}$  з МХ ефективно пригнічується антитілами проти протеїну LETM1 (рис. 5.7). Водночас антитіла повністю не інгібують транспортвальну систему, що можна пояснити видоспецифічністю білка-транспортера.

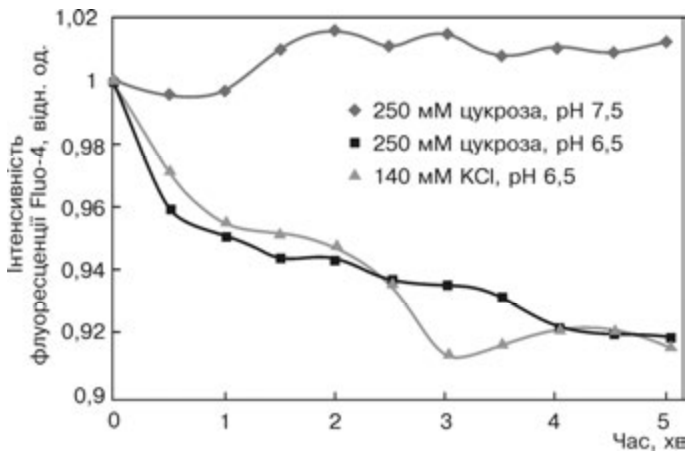
Ми дослідили вплив заміни цукрозного середовища (250 мМ цукро-

**Рис. 5.6.** Залежність початкової швидкості вивільнення іонів Ca ( $V_0$ ) з мітохондрій від концентрації протонів.  $M \pm m$ ,  $n = 6-8$





**Рис. 5.7.** Вплив Anti-LETM1 на  $\Delta p\text{H}$ -залежний транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  з матриксу мітохондрій (2,5 мкг антитіла до 100 мкг протеїну мітохондрій). Стандартне середовище інкубації (рН 6,5).  $M \pm m$ ,  $n = 6$



**Рис. 5.8.**  $\Delta p\text{H}$ -індукований транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  з матриксу мітохондрій за умови заміни середовища цукрози на KCl. Результат типового експерименту

за) 140 мМ KCl на  $\Delta p\text{H}$ -залежне вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з МХ. Встановлено, що введення в інкубаційне середовище  $\text{K}^+$  у фізіологічних концентраціях не впливало на активність  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника (рис. 5.8). Цей результат дає змогу припустити, що  $\text{H}^+$ - $\text{K}^+$ -обмінник та  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник є різними молекулярними структурами.

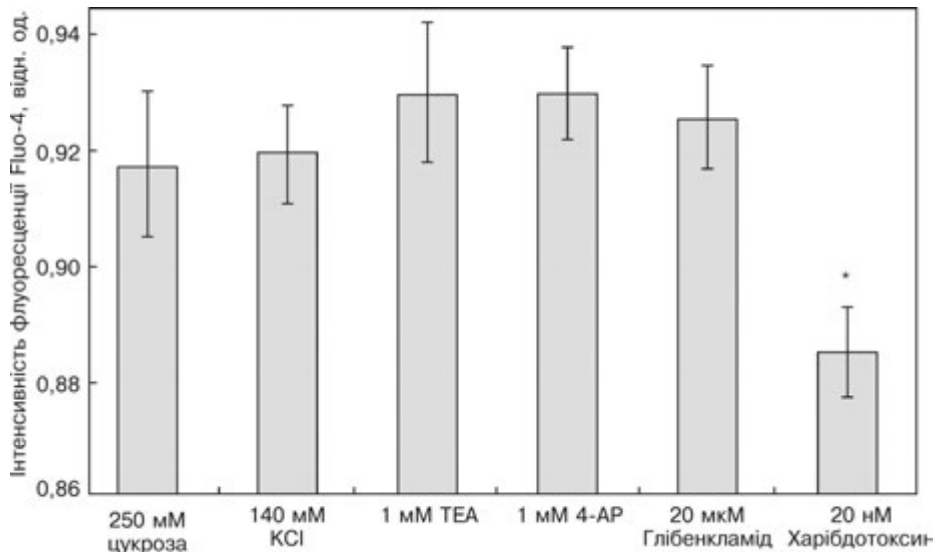
Щоб підтвердити або спростувати наше припущення, ми використали відомі інгібітори  $\text{K}^+$ -каналів: тетраетиламоній та 4-амінопіридин (потенціалкерованих), харібдотоксин (кальційактивованих) і глібенкламід (АТР-чутливих). Блокування  $\text{K}^+$ -каналів 1 мМ тетраетиламонієм (ТЕА) та 4-амінопіридином (4-АР), а також 20 мкМ глібенкламідом не впливало на функціонування  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника (рис. 5.9). Внесення 20 нМ харібдотоксину спричинювало більш ефективний  $\Delta p\text{H}$ -залежний вихід  $\text{Ca}^{2+}$  з МХ. На нашу думку, ефект харібдотоксину на  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник є опосередкованим. Блокування  $\text{Ca}^{2+}$ -залежного  $\text{K}^+$ -каналу має наслідком пригнічення надходження іонів калію до мітохондрійного матриксу і відповідне зниження їх концентрації в ньому. Це призведе до зменшення активності  $\text{H}^+$ - $\text{K}^+$ -обміну у ВММ і збільшить електрохімічний градієнт  $\text{H}^+$  як рушійну

## 5.2. Біохімічні характеристики $H^+$ - $Ca^{2+}$ -обмінника у внутрішній мембрані...

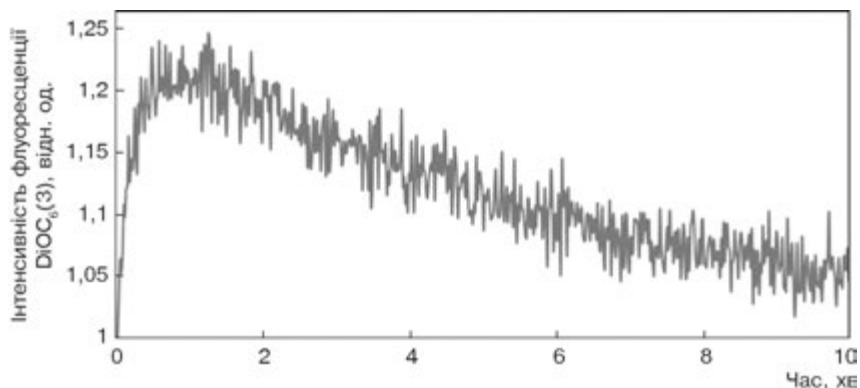
силу  $H^+$ - $Ca^{2+}$ -обмінника. Відповідні підтипи  $K^+$ -каналів володіють порівняно високою провідністю, тому саме їх блокування стимулює  $H^+$ - $Ca^{2+}$ -обмінник. Наведені результати свідчать на користь функціонального спряження систем обміну  $H^+$ ,  $K^+$  та  $Ca^{2+}$  у ВММ. Водночас відсутність ефекту заміни в середовищі цукрози на калій на  $H^+$ - $Ca^{2+}$ -обмінник залишає відкритим питання тотожності або структурно-функціональної єдності  $H^+$ - $Ca^{2+}$ - та  $H^+$ - $K^+$ -обмінника.

Розрахована величина коефіцієнта Хілла ( $n_H$ ) вказує на стехіометрію  $H^+$ - $Ca^{2+}$ -обміну 1:1 і відповідну електрогенність транспортувальної системи. Водночас наведено докази функціонування у внутрішній мембрані МХ гепатоцитів електронейтрального переносника, який здійснює антипорт одного  $Ca^{2+}$  із двома іонами  $H^+$  [15, 32, 35, 36]. Тому наступним етапом досліджень було підтвердити або спростувати електрогенність досліджуваної транспортувальної системи із застосуванням потенціалчутливих флуоресцентних зондів.

Мембранний потенціал реєстрували за зміною інтенсивності флуоресценції потенціалчутливого зонда карбоціанінового ряду 3,3'-дигексилокарбоціаніну ( $DiOC_6(3)$ ). Нами була доведена наявність флуоресцентної відповіді цього зонда на внесення протонофору СССР та інгібітора електронтранспортувального ланцюга азиду натрію [37], див. також розділ 3. Перед початком досліджень ми з'ясували, що інтенсивність флуоресценції  $DiOC_6(3)$  (10 нМ) не залежала від рН середовища. Показано (рис. 5.10), що вихід  $Ca^{2+}$  з МХ супроводжується зростанням поляризації ВММ (збільшенням інтенсивності флуоресценції зонда) з подальшим зниженням електричного потенціалу внаслідок входу  $H^+$  в матрикс органел і зменшення величини електрохімічного градієнта протонів.



**Рис. 5.9.**  $\Delta$ pH-індукований транспорт  $Ca^{2+}$  з матриксу мітохондрій (рН 6,5) за умови заміни середовища цукрози на КСІ та дії відомих інгібіторів  $K^+$ -каналів (ТЕА — тетраетиламоній, 4-АР — 4-амінопіридин),  $M \pm m$ , \* — зміни вірогідні відносно дослідів з КСІ,  $p < 0,05$ ,  $n = 3-4$



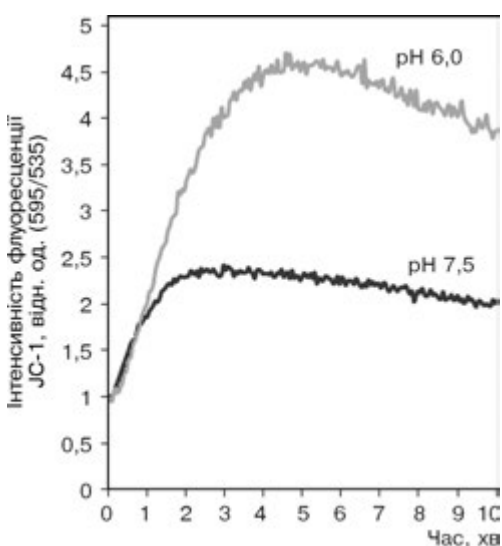
**Рис. 5.10.** Зміни флуоресценції потенціалчутливого зонда DiOC<sub>6</sub>(3) за умови функціонування H<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-обмінника (позамітохондрійне рН 6,0). Результат типового експерименту

Результати із застосуванням флуоресцентних зондів необхідно верифікувати через можливість залежності флуоресцентної відповіді від концентрації зонда, а також його впливу на функціонування ЕТЛ. Тому в наступній серії експериментів для дослідження змін мембранного потенціалу ВММ нами було застосовано інший потенціалчутливий флуоресцентний зонд JC-1 (1 мкМ).

Досліди з JC-1 (рис. 5.11) підтверджують біфазність змін потенціалу мітохондрійної мембрани в умовах функціонування H<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-обмінника, а також залежність фази зростання електричного потенціалу та наступної деполаризації від величини рН позамітохондрійного середовища. За умови відсутності умов для здійснення ΔрН-залежного вивільнення Ca<sup>2+</sup> біфазність відповіді JC-1 суттєво невілюється (див. рис. 5.11).

Отже, з використанням потенціалчутливих флуоресцентних зондів DiOC<sub>6</sub> (3) та JC-1 продемонстровано, що за функціональної активності H<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-обмінника інтенсивний вихід Ca<sup>2+</sup> з МХ супроводжується зростанням поляризації їхньої внутрішньої мембрани, а вхід H<sup>+</sup> призводить до наступного зниження електричного потенціалу. Одержані результати якісно підтверджують електрогенність H<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-обміну в МХ міомерія.

Для функціонування МХ та підтримання їхньої цілісності важливе значення має регулювання об'єму матриксу, який впливає на інтенсив-



**Рис. 5.11.** Зміни електричного потенціалу на внутрішній мітохондрійній мембрані згідно з флуоресцентною відповіддю JC-1 за умови функціонування H<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-обмінника (позамітохондрійне рН 6,0). Результати типового експерименту

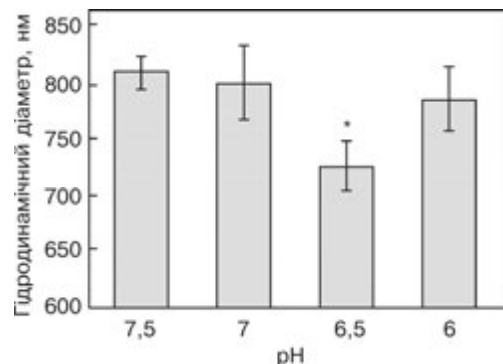
## 5.2. Біохімічні характеристики $H^+$ - $Ca^{2+}$ -обмінника у внутрішній мембрані...

ність дихання та рівень продукування АТР. Інтегральним показником об'єму МХ є величина їхнього гідродинамічного діаметра (ГД). Існує кореляція між змінами геометрії цих органел та такими явищами, як генерація АФК, поляризація ВММ, здатність до апоптозу [38—40].

Традиційним є оцінка процесу набухання за змінами оптичної густини/світлорозсіювання суспензії МХ. Досить інформативним та ефективним у випадку характеризування за розміром сферичноподібних частинок у розчинах є метод фотонної кореляційної спектроскопії. Метод є високочутливим (реєструються зміни об'єму вже починаючи з 0,1 %, а діаметр об'єктів, які підлягають аналізу, — від 0,001 до 20 мкм), потребує незначної кількості експериментального матеріалу та унеможливорює артефакти, пов'язані з малими розмірами субклітинних частинок, які мають місце у разі застосування інших оптичних підходів. У випадку ізольованих МХ міометрія метод фотонної кореляційної спектроскопії дає змогу визначити їхній гідродинамічний діаметр (ефективні розміри) за безпосередніх умов експерименту [41, 42]. Зміни гідродинамічного діаметра мітохондрій визначали на приладі “ZetaSizer-3” (“Malvern Instruments”, 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.

За умови попередньої енергозалежної акумуляції  $Ca^{2+}$  до матриксу закислення середовища інкубації МХ від 7,5 до 6,5, тобто створення умов для ефективного функціонування  $H^+$ - $Ca^{2+}$ -обмінника, супроводжувалось суттєвим зниженням величини ГД (рис. 5.12). Подальше закислення середовища (до 6,0) не змінює досліджуваний параметр відносно його величини за рН 7,5. Ініціація  $\Delta$ pH-залежного вивільнення  $Ca^{2+}$  супроводжується одночасним переміщенням асоційованих з іонами Са молекул води з матриксу, що може бути причиною зменшення досліджуваного параметра. Втім, більш суттєве закислення позамітохондрійного середовища за рН 6,0 спроможне іонізувати хімічні групи, експоновані на зовнішній мембрані органел, що збільшить ГД, нівелюючи попередній ефект.

Транспорт  $Ca^{2+}$  у ВММ чутливий до іонів Mg та діуретиків, зокрема амilorиду [43, 44]. У наших експериментах (рис. 5.14)  $Mg^{2+}$  за фізіологічних концентрацій пригнічував, а амilorид стимулював  $H^+$ - $Ca^{2+}$ -обмінник. У дослідженнях, проведених на пермеабілізованих міоцитах матки шурів із використанням радіоізотопного  $^{45}Ca^{2+}$ , реєструвався біфазний ефект іонів Mg на  $Ca^{2+}$ -уніпортер: за фізіологічних мілімолярних концентрацій (3 мМ) спостерігалась активація енергозалежної акумуляції  $Ca^{2+}$  МХ, але за суттєвого підвищення концентрації  $Mg^{2+}$  вище фізіологічного діапазону (7 мМ) мало місце пригнічення накопичення ка-



**Рис. 5.12.** Зміни розмірів ізольованих мітохондрій за умови  $\Delta$ pH-залежного вивільнення  $Ca^{2+}$  з матриксу. Зміни вірогідні відносно рН 7,5, \* —  $p < 0,05$ ,  $M \pm m$ ,  $n = 6$



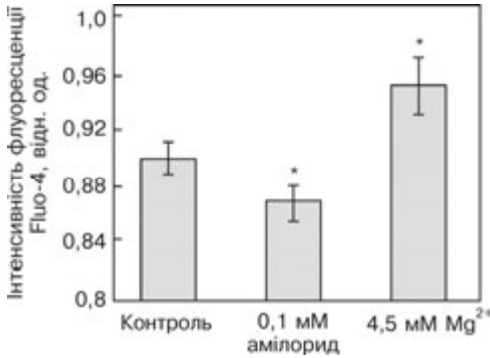


Рис. 5.13. Ефект модифікаторів трансмембранного обміну катіонів на  $\Delta\text{pH}$ -індукований транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  з мітохондрій (рН поза-мітохондрійного середовища 6,0).  $M \pm m$ , \* —  $p < 0,05$  відносно контролю,  $n = 5$

нів негативного заряду на ВММ, який забезпечує рушійну силу акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$ . У випадку пригнічення  $\text{Mg}^{2+}$  функціонування  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника (рис. 5.13) ми передбачаємо пряму дію катіона на транспортну систему. Через бар'єрну функцію ВММ мало вірогідним є проникнення іонів  $\text{Mg}$  до матриксу та їхню конкуренцію з  $\text{Ca}^{2+}$ .

Амілорид є ефективним інгібітором  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника ПМ та МХ. Продемонстрований його та аналогів інгібувальний ефект на  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортер ВММ [43]. Відповідно до наших результатів ефект діуретика на  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник є протилежним (рис. 5.13).

Попередня енергозалежна акумуляція  $\text{Ca}^{2+}$  МХ здатна призвести до деполаризації ВММ, що може забезпечити вивільнення катіона з органел через уніпортер за концентраційним градієнтом. Оскільки дія відомих модифікаторів на  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник та уніпортер виявилася протилежною, останнє пояснення результатів наших досліджень здається мало ймовірним. Це є підтвердженням того, що  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортер та  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник є різними структурами

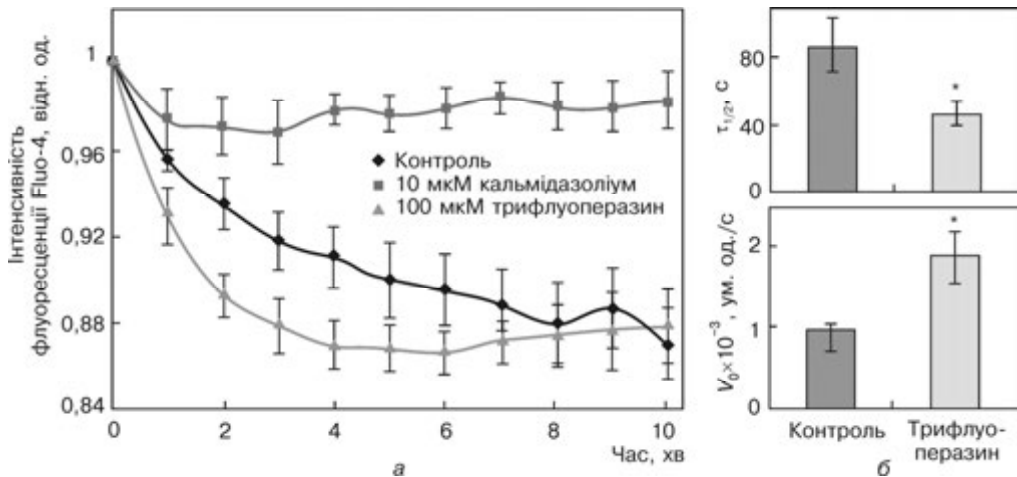


Рис. 5.14. Вплив антагоністів кальмодуліна на  $\Delta\text{pH}$ -індукований транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  з мітохондрій (рН позамітохондрійного середовища 6,5) (а) та зміни основних кінетичних параметрів вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  (б).  $M \pm m$ ,  $n = 5$ . \*  $p < 0,05$  — зміни вірогідні відносно контролю

## 5.2. Біохімічні характеристики $H^+$ - $Ca^{2+}$ -обмінника у внутрішній мембрані...

ВММ. Проте наявність  $C_{sp}$  у складі середовища дослідження  $H^+$ - $Ca^{2+}$ -обмінника ставить під сумнів суттєву роль транспорту  $Ca^{2+}$  через структури РТР.

Існують відомості, що в структурі  $H^+$ - $Ca^{2+}$ -обмінника МХ наявний СаМ-подібний  $Ca^{2+}$ -зв'язувальний мотив "EF-hand" [34, 36]. Не виключено також, що транспортвальні ензими ВММ підлягають регуляторному впливу комплексу  $Ca^{2+}$ -СаМ, наявність якого в МХ доведена [47]. У зв'язку з відсутністю даних щодо регуляції  $H^+$ - $Ca^{2+}$ -обмінника МХ цим комплексом було досліджено ефекти антагоністів СаМ на  $\Delta pH$ -залежний вихід  $Ca^{2+}$  з ізольованих МХ міомерія.

Виявлено, що антагоніст СаМ — кальмідазоліум у концентрації 10 мкМ практично повністю блокує  $\Delta pH$ -залежний вихід  $Ca^{2+}$  з ізольованих МХ (рис. 5.14, а).

Блокування  $H^+$ - $Ca^{2+}$ -обмінника кальмідазоліумом може призвести до зростання концентрації іонізованого  $Ca^{2+}$  в матриксі органел. Останній ефект за дії антагоністів СаМ продемонстровано іншими авторами в незалежних дослідженнях раніше [48].

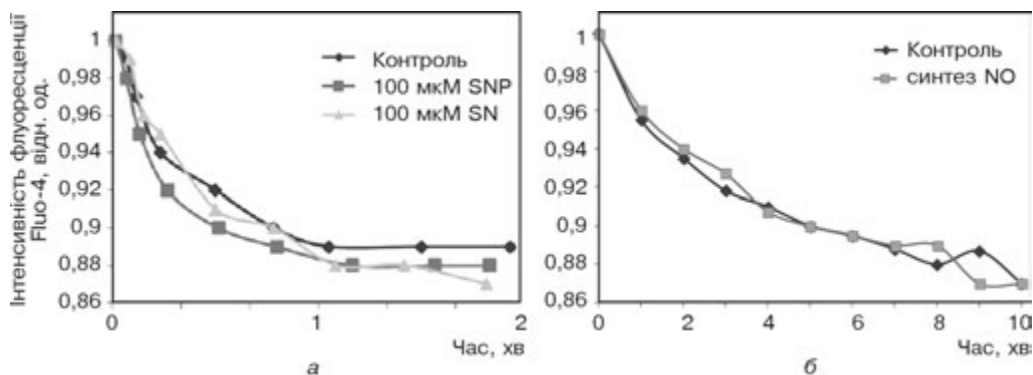
Інший антагоніст кальмодуліну 100 мкМ трифлуоперазин, який має відмінний від кальмідазоліуму механізм дії на  $Ca^{2+}$ -СаМ-залежні ензими (див. обговорення в розділі 2), спричинював більш швидкий початковий вихід  $Ca^{2+}$  з матриксу, але не впливав на платовий рівень флуоресценції Fluo-4 (рис. 5.14, а). Аналіз основних кінетичних параметрів транспортного процесу — початкової швидкості ( $V_0$ ) та величини характеристичного часу ( $\tau_{1/2}$ )  $\Delta pH$ -індукованого виходу  $Ca^{2+}$  виявив, що за дії досліджуваного антагоніста час напіввиходу катіона зменшувався, а початкова швидкість транспорту зростала (див. рис. 5.14, б). Тобто трифлуоперазин суттєво впливає на кінетичні характеристики  $\Delta pH$ -залежного обміну  $Ca^{2+}$  у ВММ гладенького м'яза. Але його дія як більш м'якого антагоніста СаМ менш виражена ніж кальмідазоліуму. Трифлуоперазин лише знижує ефективність взаємодії СаМ з транспортвальною системою, тоді як кальмідазоліум діє на комплекс СаМ—транспортвальна система, гальмуючи розпад останньої (виступаючи неконкурентним інгібітором), а також має більший афінитет до СаМ [49]. Ці дані непрямо свідчать, що СаМ виступає регулятором  $H^+$ - $Ca^{2+}$ -обмінника, інгібуючи обмін.

Зазначимо, що стимульвальний ефект трифлуоперазину на  $H^+$ - $Ca^{2+}$ -обмінник є протилежним його дії на  $Na^+$ - $Ca^{2+}$ -обмінник [50]. Це є ще одним непрямим підтвердженням відсутності або несуттєвої ролі  $Na^+$ - $Ca^{2+}$ -обмінника в МХ міомерія.

Таким чином, ВММ міоцитів матки містить, крім систем енергозалежної акумуляції  $Ca^{2+}$  в матрикс, також механізм транспорту іонів Са з матриксу в міоплазму, причому в основі останнього процесу лежить функціонування  $H^+$ - $Ca^{2+}$ -обмінника, який репрезентований протеїном LETM1.

У серії наступних досліджень продемонстровано, що  $H^+$ - $Ca^{2+}$ -обмінник є повністю резистентним до дії нітросполук (рис. 5.15, а). В іншому варіанті постановки експерименту стимулювання синтезу NO (в середовище попередньої акумуляції  $Ca^{2+}$  вносили 50 мкМ L-аргінін, 10 мкМ NADPH та  $BH_4$ ) також не спричинювало модуляцію  $\Delta pH$ -залежного виходу  $Ca^{2+}$  з МХ (рис. 5.15, б).

Відсутність ефекту NO на  $H^+$ - $Ca^{2+}$ -обмінник дає змогу протікати  $\Delta pH$ -залежному процесу вивільнення  $Ca^{2+}$  з матриксу МХ і подальшій його акуму-



**Рис. 5.15.** Відсутність впливу нітросполук (*a*) та синтезу NO (за присутності 50 мкМ L-аргініну, 10 мкМ NADPH та  $\text{BH}_4$ ) (*б*) на  $\Delta\text{pH}$ -індукований транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  з мітохондрій. Результати характерних дослідів. Стандартне середовище інкубації (pH 6,5)

ляції СР. Оскільки оксид азоту стимулює енергозалежне включення  $\text{Ca}^{2+}$  в ретикулум [51], за умови підвищеної концентрації NO в міометрії існує можливість нормальної роботи мітохондрійно-ретикулярного компартмента (слід згадати, що афінитет SERCA-помпи до  $\text{Ca}^{2+}$  вищий, ніж уніпортера MX) та подальшого виведення  $\text{Ca}^{2+}$  з клітини внаслідок взаємодії транспортувальних систем периферійного СР та ПМ. Отже, можна припустити наявність мембранних механізмів, які захищають MX від небезпечного  $\text{Ca}^{2+}$ -перевантаження.

Дія NO на  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаз MX ГМК передбачає можливість специфічних ефектів на  $\text{Ca}^{2+}$ -залежні біоенергетичні процеси. Вирішенню цих питань присвячений наступний розділ цієї книги.

#### ВИНОСКА 1

Початкову швидкість енергозалежної акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  ( $V_0$ ) та характеристичний час напівмаксимальної акумуляції катіона ( $\tau_{1/2}$ ) розраховували за формулами:

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

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

де  $k$  ( $\text{с}^{-1}$ ) — константа швидкості входу  $\text{Ca}^{2+}$ , яку знаходимо з лінійної залежності зміни флуоресценції Fluo-4 від часу в координатах  $\{\ln((F_{\max} - F_0)/(F_{\max} - F)); t\}$ . Тут  $F_0$  — 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.

#### ВИНОСКА 2

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

## 5.2. Біохімічні характеристики $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника у внутрішній мембрані...

---

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

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

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

## ЕЛЕКТРОНТРАНСПОРТУВАЛЬНИЙ ЛАНЦЮГ МІТОХОНДРІЙ ЯК МІШЕНЬ ДІЇ ОКСИДУ АЗОТУ

Генерація електричного потенціалу на мітохондрійній мембрані забезпечується комплексами *I–IV* дихального ланцюга, а первинними переносниками електронів при окислювальному фосфорилуванні є коензими NADH (нікотинамідаденіндинуклеотид) та FADH<sub>2</sub> (флавінаденіндинуклеотид). Окислення NADH та FADH<sub>2</sub> в мітохондрійному ЕТЛ призводить до транслокації протонів через комплекси *I, III* та *IV* внутрішньої мембрани з матриксу у міжмембранний простір, а протонний градієнт разом з АДР контролюють швидкість синтезу АТФ. Зміни інтенсивності дихання МХ позначаються на редокс-стані піридинового та флавінового нуклеотидів (рис. 6.1, див. вклейку). Співвідношення окисленої та відновленої форм NADH та FADH<sub>2</sub> виступає показником біоенергетики МХ.

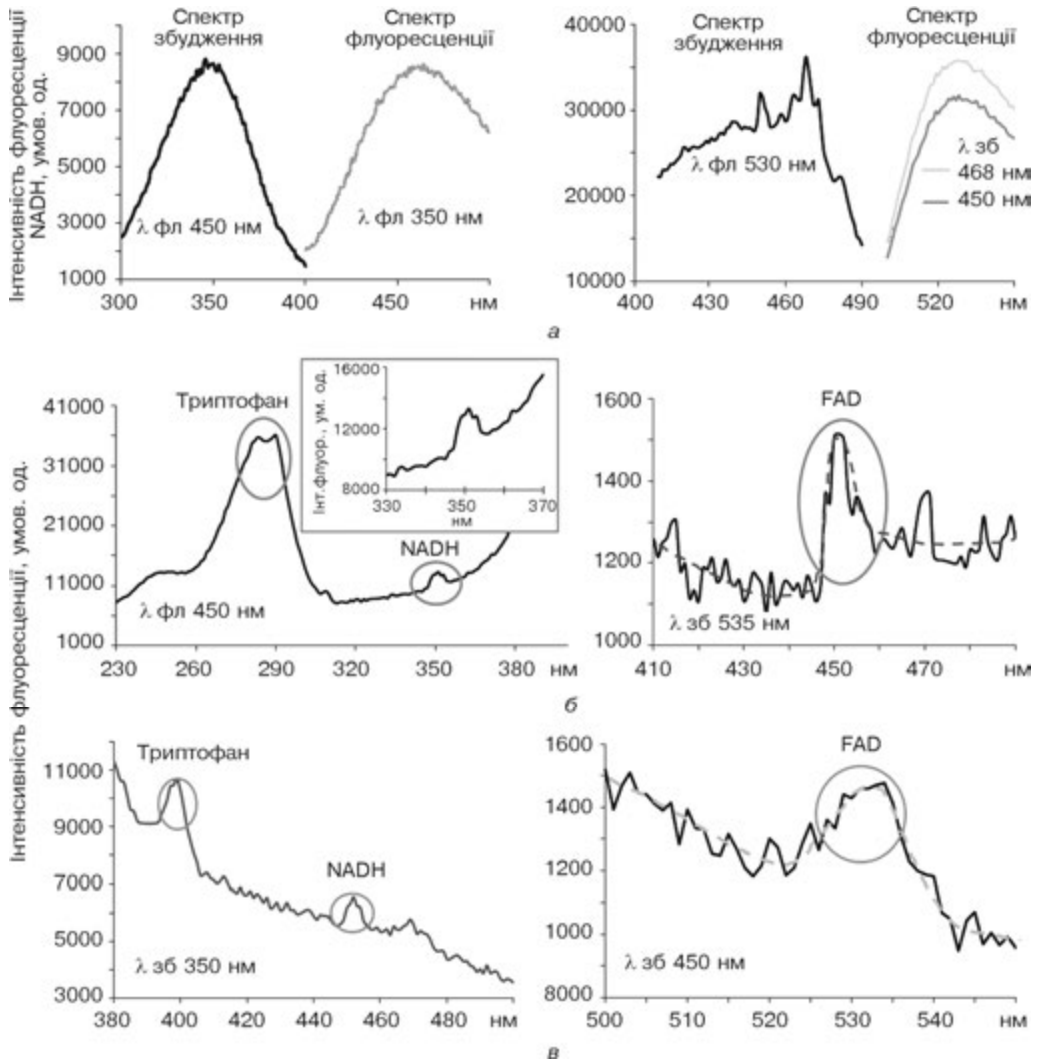
NADH є необхідним коензимом для каталітичних реакцій основних метаболічних шляхів та виступає домінантною компонентою клітинної аутофлуоресценції. Після віддачі водню, передусім в ЕТЛ МХ, окислена молекула NAD<sup>+</sup> не флуоресцює. На відміну від NADH, FADH<sub>2</sub> не має власної флуоресценції, проте FAD володіє зазначеною властивістю. Це дає змогу “візуалізувати” редокс-стан нуклеотидів з використанням оптичних методів без застосування флуоресцентних зондів. Таким чином, зміни у флуоресценції NADH та FAD можуть бути використані для оцінки ефективності роботи МХ та виступати маркером їхньої функціональної активності [1–3].

Вивчення редокс-стану переважно піридинового нуклеотиду застосовували в окремих біохімічних дослідженнях, зокрема з метою оцінки ступеня постсинаптичної нейрональної активації [4], наслідків окислативного стресу [5–7], детекції клітинної смерті [8]. Відповідні експерименти проводили на клітинах карциноми [9], легень [10], у тканині серця [11, 12]. Зміни редокс-стану піридинового нуклеотиду, як головної причини порушень дихання МХ за дії токсичного фторацетату, вивчали на клітинах асцидної карциноми Ерліха та МХ печінки щурів [13]. Щодо відповідних досліджень на клітинах та/або МХ гладеньких м’язів інформація в доступній нам літературі відсутня.

### 6.1. Оцінка функціонування електронтранспортного ланцюга мітохондрій міометрія за аутофлуоресценцією NADH та FAD

У МХ міоцитів матки максимуми спектрів збудження та флуоресценції від NADH становлять 350 та 450 нм відповідно, від FAD — 450 та 533 нм (рис. 6.2, б, в). Це узгоджується з даними літератури [3, 4, 8, 10, 14, 15]. Крім

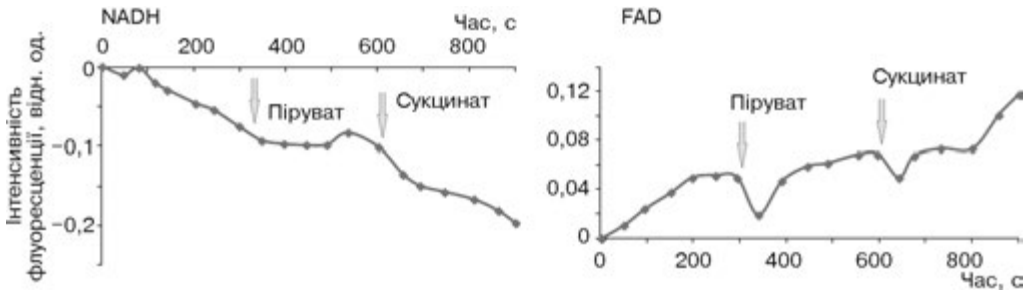
## 6.1. Оцінка функціонування електронтранспортного ланцюга мітохондрій...



**Рис. 6.2.** Спектри збудження та флуоресценції NADH і FAD у хімічно чистому вигляді (а, робочий розчин) та в ізольованих мітохондріях (б — збудження, в — флуоресценції)

того, спектри флуоресценції та збудження досліджуваних аденінових нуклеотидів збігаються із спектральними характеристиками відповідних хімічно чистих нуклеотидів у робочому середовищі (рис. 6.2, а). Зазначимо, що взаємодія NADH з протеїнами запобігає контакту (стекинг-взаємодії) між аденіном та відновленою нікотинамідною групою, в результаті чого зростає квантовий вихід флуоресценції, хоча для FAD такого ефекта не виявлено [14].

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



**Рис. 6.3.** Зміни флуоресценції NADH та FAD в ізольованих мітохондріях за додавання субстратів дихання — 5 мМ пірувату та 5 мМ сукцинату. Дані типового експерименту

Флуоресценція NADH з часом знижується за присутності субстратів дихання, що свідчить на користь зростання вмісту окисленої форми  $\text{NAD}^+$  за функціонування NADH-убіхінон оксидоредуктази або комплексу *I* (рис. 6.3). Поряд з цим, вміст  $\text{FADH}_2$  знижується, і, відповідно, збільшується флуоресценція від FAD, що відображає роботу сукцинатдегідрогеназного комплексу або комплексу *II* ЕТЛ (див. рис. 6.3). Таким чином, спостерігається реципрокність змін флуоресценції піридинового та флавінового аденіндинуклеотидів за нормального функціонування ЕТЛ МХ, що відповідає даним літератури [3, 4, 8–11, 16].

Комплекс *II* включає ключову ензиматичну компоненту циклу Кребса, що каталізує окислення сукцинату до фумарату в матриксі МХ. Окислення сукцинату поєднано з відновленням убіхінона у ВММ. Комплекс *II* складається з двох частин. Перша являє собою розчинну сукцинатдегідрогеназу, яка містить суб'єдиницю масою 70 кДа і ковалентно зв'язує FAD та суб'єдиницю масою 30 кДа, що включає FeS-кластери. Друга частина цього комплексу представлена мембранозв'язаним протеїном, який складається з двох суб'єдиниць (12 та 9 кДа), а також гема b. Внаслідок окислення сукцинату до фумарату суб'єдиницею 70 кДа відбувається відновлення FAD до  $\text{FADH}_2$ . Наступне відновлення убіхінону (Q), який зв'язується з суб'єдиницею 12 кДа, до убіхінолу ( $\text{QH}_2$ ) супроводжується окисленням  $\text{FADH}_2$ . Згідно з цими уявленнями, збільшення флуоресценції FAD (див. рис. 6.3), спричинене додаванням субстратів дихання, можна пояснити стимулюванням активності ензимів циклу Кребса, і сукцинатдегідрогенази зокрема, а наступне тривале зростання сигналу може бути наслідком інтенсивного окислення  $\text{FADH}_2$  внаслідок активації ланцюга перенесення електронів.

Внесення в середовище інкубації ротенону (5 мкМ), який блокує зв'язування убіхінону з комплексом *I*, призводить до збільшення вмісту NADH внаслідок блокування каталітичної активності NADH-дегідрогенази комплексу і відображається у зростанні флуоресценції піридинового нуклеотиду (рис. 6.4).

Цей результат узгоджується з даними, одержаними на клітинах легень, карциноми, нейронах мозку, ізольованих мітохондріях мозку та міокарду [4, 10, 13, 15, 17]. У той же час ротенон майже не впливав на динаміку змін флуоресценції від FAD (див. рис. 6.4).

## 6.1. Оцінка функціонування електронтранспортувального ланцюга мітохондрій...

Інгібітором *III* комплексу дихального ланцюга (убіхінол-цитохром с оксидоредуктази) є антибіотик антимицин А, який блокує перенесення електронів від убіхінолу на цитохром с [16, 18, 19].

Додавання антимицину (1 мкг/мл) викликало значне зростання інтенсивності флуоресценції від NADH та помірне зменшення від FAD порівняно з контролем (рис. 6.5). Цей результат свідчить про блокування *I* комплексу ЕТЛ та зниження функціональної активності *II* комплексу. За додавання антимицину і присутності сукцинату в середовищі інкубації сукцинатдегідрогеназа продовжує окислювати сукцинат до фумарату з подальшим відновленням убіхінону до убіхінолу, але з меншою інтенсивністю. За цих умов також можливий зворотний транспорт електронів від сукцинату через убіхінон до комплексу *I*, що супроводжується зростанням пулу NADH, внаслідок роботи NADH-дегідрогенази в реверсному режимі [17].

Специфічне інгібування *IV* комплексу цианідом натрія (1 мМ), який блокує перенесення електронів на кисень цитохромоксидазою, призводило до зростання флуоресценції NADH, тобто інгібування комплексу *I*, та зниження флуоресценції від FAD, що свідчить про блокування *II* комплексу дихального ланцюга (рис. 6.6). Цей експериментальний факт узгоджується з даними літератури. На клітинах легень та карциноми Ерліха також було показано зни-

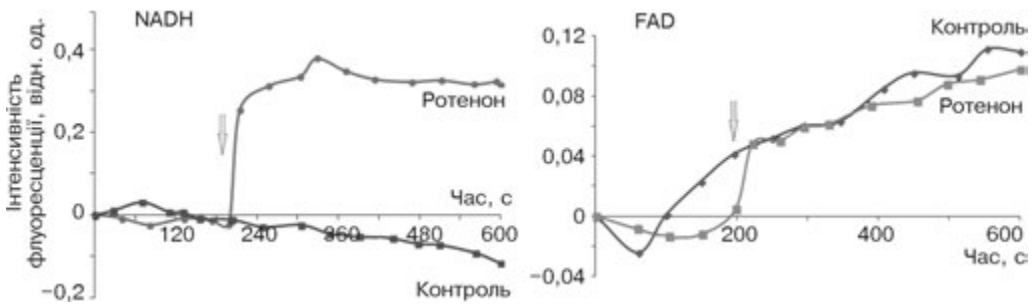


Рис. 6.4. Зміни флуоресценції NADH та FAD у мітохондріях за додавання 5 мкМ ротенон. Стрілочкою тут і надалі показаний момент внесення діючої речовини. Дані типового експерименту

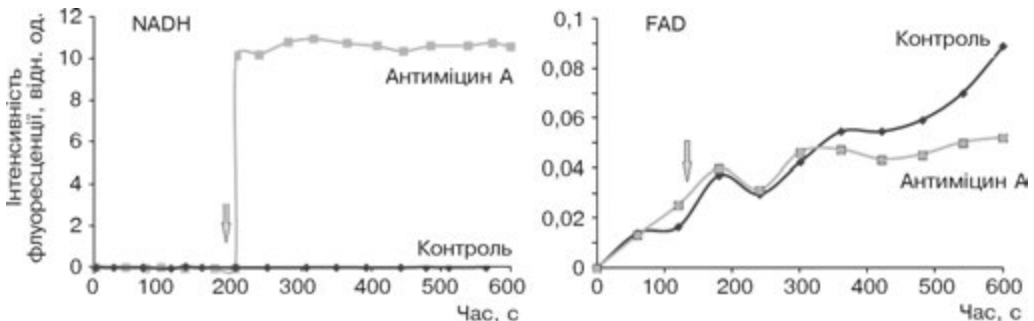
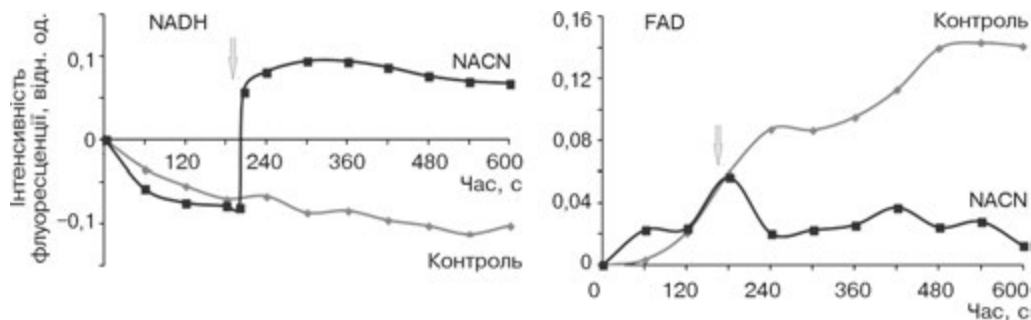
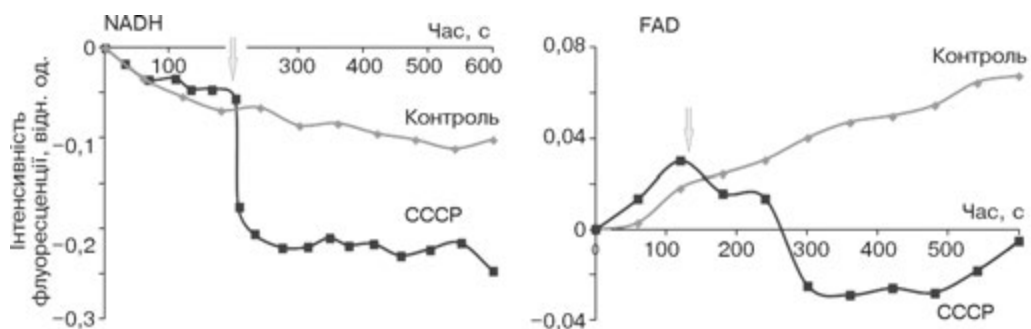


Рис. 6.5. Вплив антимицину А (1 мкг/мл) на флуоресценцію NADH та FAD у мітохондріях. Дані типового експерименту





**Рис. 6.6.** Вплив NaCN (1 мМ) на флуоресценцію NADH та FAD у мітохондріях. Дані типового експерименту



**Рис. 6.7.** Вплив протонифору CCCP (10 мкМ) на флуоресценцію NADH та FAD у мітохондріях. Дані типового експерименту

ження флуоресценції FAD за умови передінкубації з KCN та одночасне зростання сигналу від NADH [1, 2].

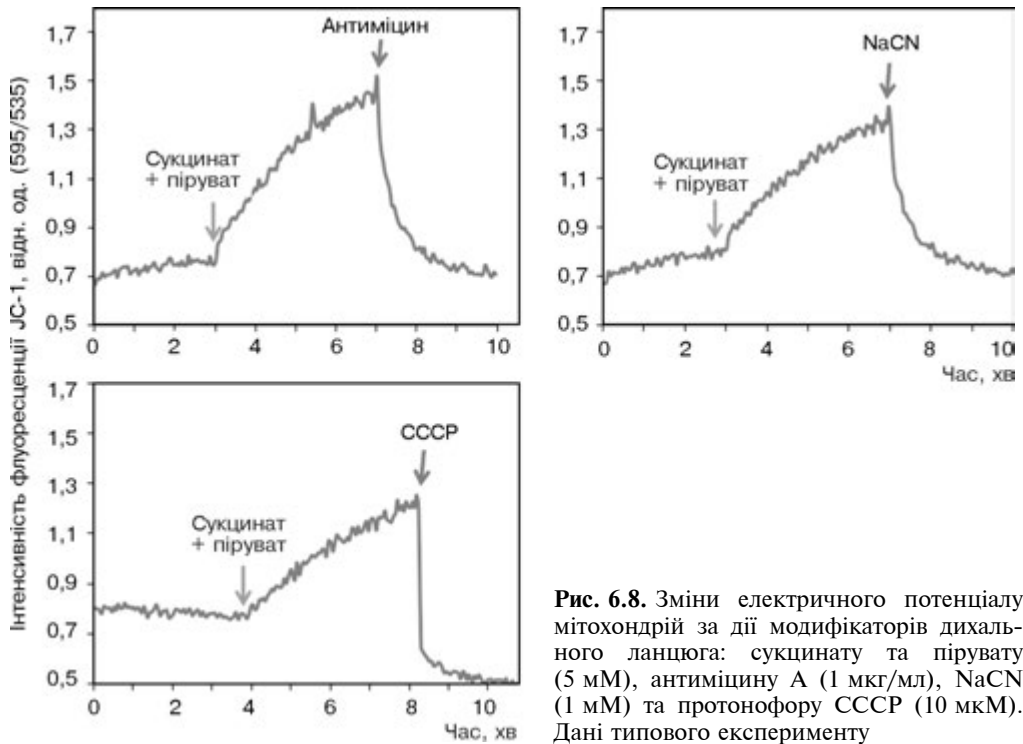
Дисипація електрохімічного градієнта протонів при внесенні в середовище інкубації протонифору CCCP (10 мкМ) мала наслідком різке зниження флуоресценції від NADH та FAD (рис. 6.7). Протонифори роз'єднують дихання та окисне фосфорилування за рахунок руйнування градієнта  $H^+$ , внаслідок чого відбувається компенсаторне посилення функціональної активності окремих елементів дихального ланцюга МХ [20]. Отримані результати вказують на стимулювання роботи I комплексу: рівень флуоресценції від NADH швидко знижується, надалі це падіння уповільнюється. Зменшення флуоресценції від FAD свідчить на користь блокування перенесення водню від сукцинату на убіхінон. За цих умов продовження окислення сукцинату, навіть зі зниженою швидкістю, сукцинатдегідрогеназою буде супроводжуватися зростанням рівня  $FADH_2$ .

Згідно з результатами зі зміни флуоресценції потенціалчутливого зонда JC-1, внесення субстратів дихання 5 мМ сукцинату та пірувату супроводжується зростанням електричного потенціалу мітохондрійної мембрани, інгібітори дихального ланцюга спричиняють швидке зниження потенціалу МХ (рис. 6.8). Ці дані відповідають наведеним вище дослідженням змін флуоресценції аденінових нуклеотидів за дії дихальних отрут.

## 6.1. Оцінка функціонування електронтранспортувального ланцюга мітохондрій...

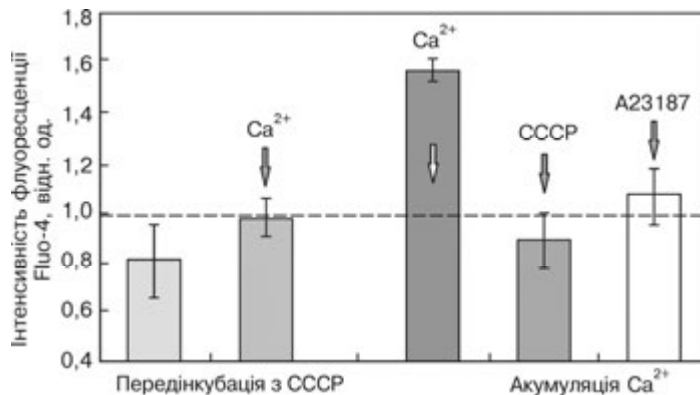
Передінкубація ізольованих МХ з протонифором CCCP призводить до зниження рівня іонізованого  $\text{Ca}^{2+}$  в матриці органел та унеможлиблює його подальшу акумуляцію, а також спричинює вихід попередньо акумульованого в енергозалежному процесі  $\text{Ca}^{2+}$  з МХ (рис. 6.9).

Відомо, що піруватдегідрогеназний комплекс та NAD-вмісні дегідрогенази циклу Кребса ( $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназа та ізоцитратдегідрогеназа) є  $\text{Ca}^{2+}$ -залежними ензимами [21]. Протонифор CCCP спричинює зниження іонів Ca в матриці МХ, що веде до зменшення активності  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних ен-



**Рис. 6.8.** Зміни електричного потенціалу мітохондрій за дії модифікаторів дихального ланцюга: сукцинату та пірувату (5 мМ), антиміцину А (1 мкг/мл), NaCN (1 мМ) та протонифору CCCP (10 мкМ). Дані типового експерименту

**Рис. 6.9.** Зміни вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  в матриці ізольованих мітохондрій в умовах руйнування електрохімічного градієнта протонів за присутності CCCP (10 мкМ). За "1" прийнято значення флуоресцентного сигналу Fluo-4 без додавання екзогенного  $\text{Ca}^{2+}$  (ендогенний іонізований Ca, базальний рівень). Концентрація екзогенного  $\text{Ca}^{2+}$  — 80 мкМ,  $\text{Ca}^{2+}$ -іонофора A23187 — 10 мкМ.  $M \pm m$ ,  $n = 5$ . Дані протокової цитометрії



змів циклу Кребса. Отже, зареєстроване нами зростання вмісту окисленого NAD (див. рис. 6.7.) може бути пояснено як компенсаторним відновленням градієнта протонів за рахунок посилення активності *I* комплексу ЕТЛ (такий шлях є енергетично вигідний для МХ), так і пригніченням відновлення NAD ензимами в мітохондрійному матриксі.

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

## 6.2. Вплив NO на аутофлуоресценцію мітохондрійних аденінових нуклеотидів

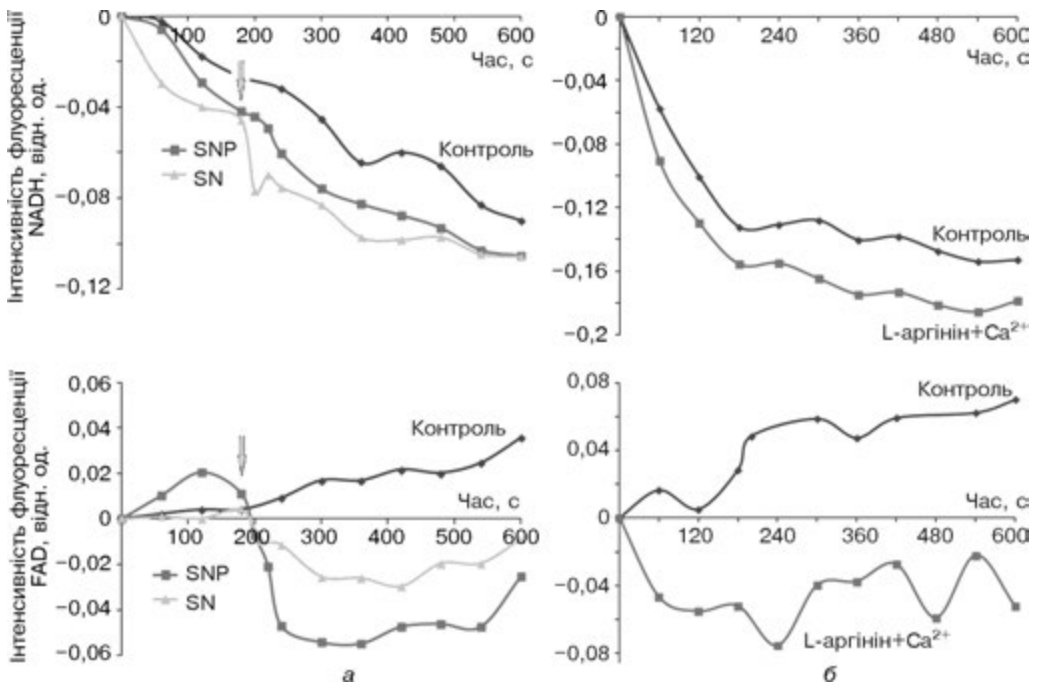
Основними наслідками дії NO в мітохондріях є: 1 — високоафінне зворотне інгібування *IV* комплексу ЕТЛ; 2 — нітрозилування протеїнів, що містять в активному центрі тіольні залишки (до них належать піруватдегідрогеназний комплекс та ензими циклу Кребса); 3 — нітрозилування окремих компонентів комплексів *I*, *II* та *III* ЕТЛ, що веде до гальмування їхньої активності [22—27].

З огляду на вищенаведене, ми дослідили зміни флуоресценції NADH та FAD за додавання 0,1 мМ SNP та SN. Нітросполуки викликали достовірне зниження флуоресценції NADH порівняно з контролем, що свідчить про накопичення в МХ окисленої форми піридинового нуклеотиду за їхньої дії. Досліджувані речовини викликали інгібування окиснення FADH<sub>2</sub>, з тенденцією до відновлення цього процесу з часом (рис. 6.10, *a*). Стимулювання власного синтезу NO МХ внесенням Ca<sup>2+</sup> та L-аргініну (100 та 50 мкМ відповідно) призводило до аналогічних змін флуоресценції аденінових нуклеотидів (рис. 6.10, *b*).

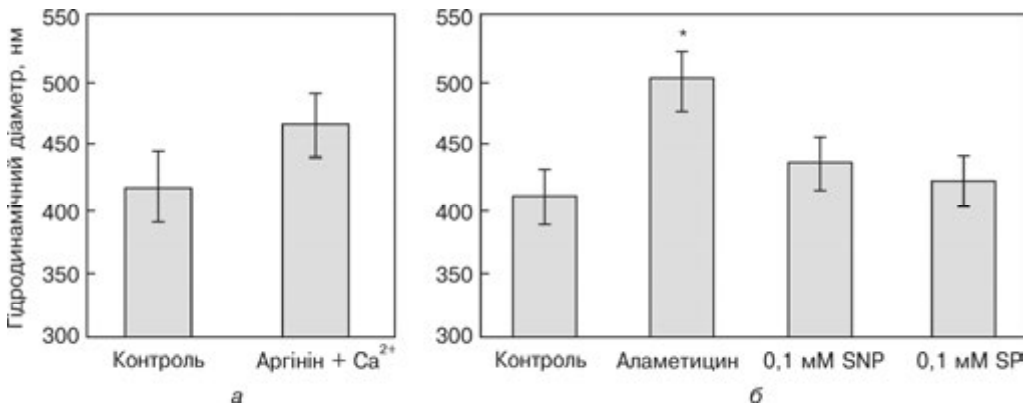
З нашої точки зору, зниження рівня FAD та NADH за дії нітросполук або за умови стимулювання синтезу NO МХ пов'язане як з гальмуванням роботи *II* комплексу ЕТЛ, так і зі зменшенням активності ензимів циклатрикарбонових кислот.

Зміни у функціонуванні ЕТЛ не призводять до суттєвого набухання МХ (рис. 6.11). Отже, оксид азоту, що синтезується МХ, та його донори у досліджуваних концентраціях не спричинюють видимої дисфункції органел, яка може ініціювати біохімічні процеси загибелі міоцитів.

## 6.2. Вплив NO на аутофлуоресценцію мітохондрійних аденінових нуклеотидів



**Рис. 6.10.** Зміни флуоресценції NADH та FAD у мітохондріях за впливу 0,1 мМ SNP та SN (а) та активації реакції синтезу NO в присутності 50 мкМ L-аргінінату 100 мкМ Ca<sup>2+</sup> (б). Дані типових експериментів



**Рис. 6.11.** Відсутність набухання мітохондрій за активації реакції синтезу NO в присутності 50 мкМ L-аргініну та 100 мкМ Ca<sup>2+</sup> (а) та впливу SNP і SN (б).  $M \pm m$ ,  $n=5$ , \* —  $p \leq 0,05$  відносно контролю. Аламетіцин (каналіформер) — 7,5 мкг/мл

### 6.3. Протекторна дія NO щодо мітохондрій

#### Вплив оксиду азоту на електричний потенціал мітохондрій

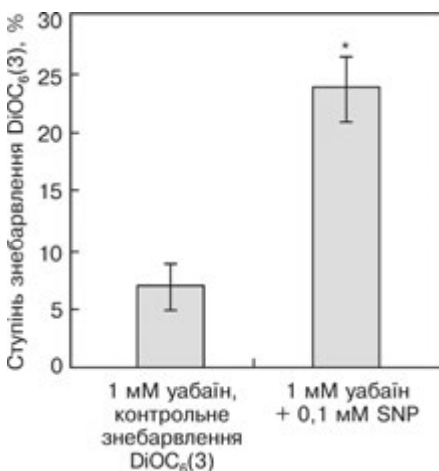
Окрім сигнальної та регуляторної функцій, оксид азоту або його похідні володіють цитопротекторними властивостями. Відомо, що NO регулює експресію ензимів антипероксидного та антирадикального захисту, здатний безпосередньо обривати ланцюги вільнорадикального окислення ліпідів, взаємодіючи із ліпопероксидами [28, 29]. Протекторні та цитотоксичні властивості оксиду азоту безпосередньо залежать від його концентрації та хімічного мікрооточення, передусім рівня АФК, а також інтенсивності прооксидантних процесів. Передбачають, що оксид азоту за низьких концентрацій спроможний захищати МХ від оксидативного/нітрозативного стресів та відповідної дисфункції [30–32].

Електричний потенціал ВММ — інтегральний показник функціональної активності МХ. Від його величини залежать робота  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем МХ та відкриття РТР. Гіперполяризація ВММ має негативні наслідки, що проявляються в змінах морфології МХ, супроводжуються  $\text{Ca}^{2+}$ -перевантаженням та гіперпродукцією АФК. Зростання потенціалу на ВММ призводить до посиленої генерації супероксид-аніона в дихальному ланцюзі. Причинами цього явища можуть бути зворотний транспорт електронів за участю комплексу I, а також гальмування перенесення електронів у цитохромній системі, що призводить до накопичення убісеміхінону. Саме тому явище “м’якого роз’єднання” дихання і фосфорилування внаслідок дисипації електрохімічного градієнта протонів за участю роз’єднувальних протеїнів МХ та жирних кислот розглядають як захисну реакцію, спрямовану на попередження гіперпродукції АФК [17, 33, 34].

З огляду на це, цікавими є наші результати на пермеабілізованих дигітоніном міоцитах щодо помірного зниження мембранного потенціалу МХ (близько 17 %) за дії SNP (рис. 6.12). У порівняльних дослідженнях SN у зазначеній концентрації не чинив ефекту на флуоресценцію  $\text{DiOC}_6(3)$ .

Отже, принаймні окремі нітросполуки здатні знижувати поляризацію МХ міоетрія, причому ефект може бути пов’язаний із їхнім безпосереднім впливом на органи. Одержаний результат був якісно підтверджений нами із використанням методу протокової цитометрії [35].

Причиною помірного зниження електричного потенціалу на ВММ за дії окси-



**Рис. 6.12.** Зменшення інтенсивності флуоресценції  $\text{DiOC}_6(3)$  у міоцитах матки за дії SNP у присутності уабайну;  $M \pm m$ , \* —  $p < 0,05$ , для аналізу використано 10 клітин, реєстрація процесу здійснювалась протягом 5 хв. Метод лазерної конфокальної мікроскопії

ду азоту є його вплив на окремі компоненти ЕТЛ та зниження рівня відновленого NAD у МХ. Зазначена властивість NO може лежати в основі захисту органел від надмірної генерації АФК [30, 31]. Імовірно, існують функціонально-значущі зворотні зв'язки між транспортом  $\text{Ca}^{2+}$  в матрикс, активністю  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних дегідрогеназ, функціонуванням ЕТЛ і генерацією АФА та АФК у МХ. Як було показано раніше (див. розділ 5), SNP та SN стимулювали енергозалежну акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  в МХ. Посилення трансмембранного перенесення позитивних іонів Ca за дії NO також може лежати в основі помірною зниження потенціалу на мембрані МХ.

#### **Захист оксидом азоту мітохондрій від висококальцієвого набухання**

У попередніх розділах мова йшла переважно про функціонально-значущі концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ , які регулюють біоенергетичні процеси в МХ та впливають на продукцію NO мітохондрійною NOS. Поряд з цим існує феномен  $\text{Ca}^{2+}$ -перевантаження МХ, асоційований з такими негативними наслідками як нітрозативний/оксидативний стрес, відкриття РТР, різке падіння електричного потенціалу на ВММ, біоенергетичний колапс тощо. В кінцевому рахунку розвивається апоптоз або некроз клітини. Одним із важливих процесів, пов'язаних з мітохондрійною дисфункцією, є порушення осмобалансу між матриксом та позамітохондрійним середовищем, набухання МХ, розпрямлення крист, розрив ЗММ, що супроводжується посиленням вивільненням факторів апоптозу в цитозоль [36—39]. Існує гіпотеза, що помірні концентрації NO здатні запобігати цим процесам, зокрема, гальмуючи відкриття РТР. Для перевірки цього припущення нами була застосована модель набухання МХ у гіперкальцієвому середовищі з метою з'ясування ролі оксиду азоту та інших сполук, зокрема екзогенного АТР у модуляції цього процесу.

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

У досліджах *in vitro* на суспензії ізольованих МХ використовують доволі різноманітні підходи для ініціації набухання органел: пермеабілізація ВММ антибіотиками, навантаження матриксу  $\text{Ca}^{2+}$  за присутності  $\text{Ca}^{2+}$ -іонофора А-23187, індукція неспецифічної проникності мембрани іонами Ca та довголанцюговими насиченими жирними кислотами тощо [40—42]. Нами запропоновано ще один модельний підхід для ініціації зростання неспецифічної проникності ВММ та збільшення об'єму матриксу — використання іонів Ca у надвисоких (десятки мМ) концентраціях. З нашої точки зору, це менш інвазивна і деструктивна модель набухання ізольованих МХ *in vitro*. Зокрема, в ній не застосовуються перфорація внутрішньої мембрани та значна хімічна модифікація ліпідного бішару.

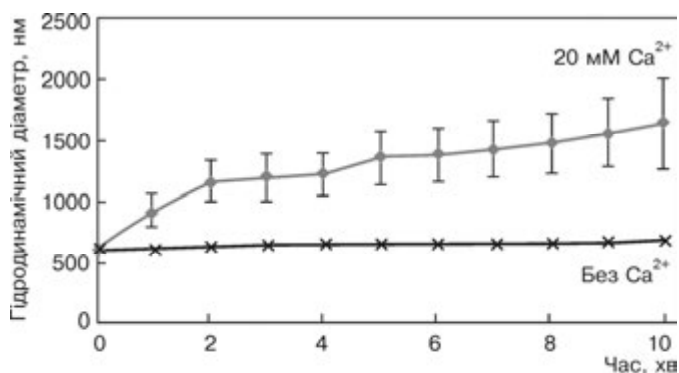


Рис. 6.13. Динаміка індукованого 20 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  набухання мітохондрій у цукрозному середовищі;  $M \pm m$ ,  $n = 5$

Для оцінки змін гідродинамічного діаметра (об'єму) органел був використаний метод фотонної кореляційної спектроскопії, як описано вище. Встановлено, що ГД мітохондрій знаходиться в діапазоні від 500 до 700 нм, що узгоджується з результатами електронної мікроскопії.

За відсутності в середовищі  $\text{Ca}^{2+}$  статистично значущого збільшення об'єму ізольованих органел не спостерігається принаймні протягом 10-хвилинних спостережень як у цукрозному робочому середовищі (рис. 6.13), так і за присутності фізіологічних концентрацій  $\text{K}^+$ . Протягом 10 хв процес набухання, ініційований 20 мМ  $\text{Ca}^{2+}$ , досягав стаціонарного стану (див. рис. 6.13). Суттєве збільшення об'єму МХ зафіксоване лише в середовищі, яке містило 15–25 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  (табл. 6.1.) за відсутності  $\text{MgATP}^{2-}$  (обов'язкова умова).

Збільшення ГД виявилось залежним від концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ : зміни останньої від 0 до 25 мМ супроводжувались суттєвим зростанням характеристичних розмірів органел, також мало місце насичення за концентрацією катіона. Бар'єрна функція ВММ настільки потужна, що навіть 10 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  не викликав достовірного збільшення ГД (див. табл. 6.1). У концентраціях 15–25 мМ іони Са зумовлюють зростання ГД навіть більше, ніж за присутності класичного каналотворювального антибіотика аламетицину (7,5 мкг/мл) [42]. У випадку дії каналоформера збільшення ГД мало місце як за присутності, так і за відсутності комплексу  $\text{MgATP}^{2-}$ .

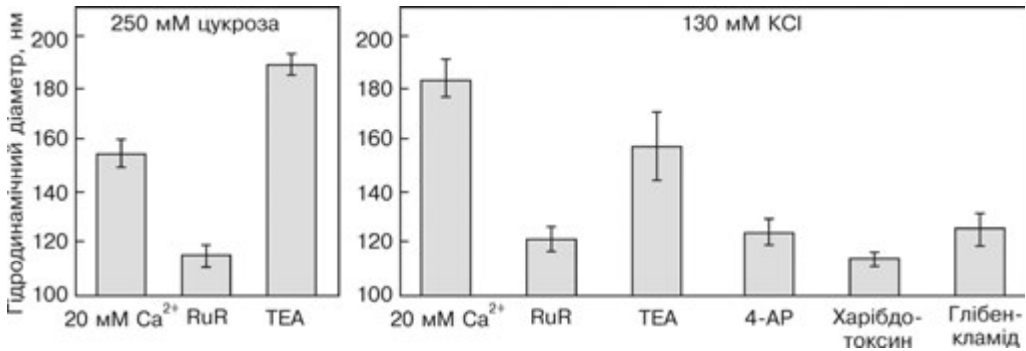
Рутенієвий червоний (RuR, 10 мкМ) — барвник, який взаємодіє з мукополісахаридами та сіаловими кислотами біомембран [43, 44] і розглядається як інгібітор  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних шляхів ВММ [45, 46], ефективно пригнічував процес набухання в середовищі як з цукрозою, так і з хлоридом калію, за умови дії 20 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  (рис. 6.14). Очевидно, що зростання ГД по-

Таблиця 6.1. Набухання мітохондрій, спричинене екзогенним  $\text{Ca}^{2+}$  у різних концентраціях, у цукрозному середовищі

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

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

### 6.3. Протекторна дія NO щодо мітохондрій



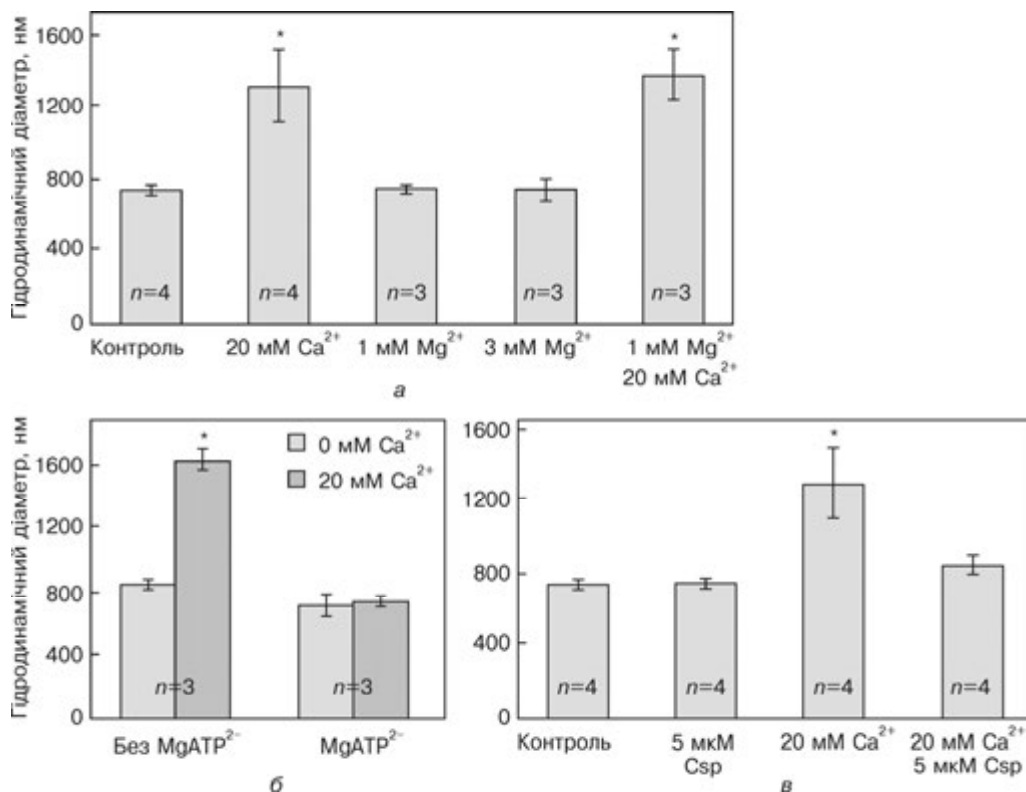
**Рис. 6.14.** Індуковані Ca<sup>2+</sup> у надвисоких концентраціях (20 мМ) зміни гідродинамічного діаметра мітохондрій за присутності рутенієвого червоного та інгібіторів K<sup>+</sup>-каналів. За 100 % прийнято об'єм мітохондрій як середнє значення за 10 хв вимірювань до внесення Ca<sup>2+</sup>. Контрольний стовпчик — набухання, індуковане іонами Са. Концентрації діючих речовин: 10 мкМ RuR (рутенієвий червоний), 1 мМ ТЕА (тетраетиламоній), 1 мМ 4-АР (4-амінопіридин), 20 нМ харібдотоксин, 20 мкМ глібенкламід;  $M \pm m$ ,  $n = 5$ . Всі зміни вірогідні відносно контролю ( $p \leq 0,05$ )

в'язане не лише із надходженням Ca<sup>2+</sup> до МХ крізь Ca<sup>2+</sup>-уніпортер, оскільки не тільки не стимулюється, а й ефективно пригнічується за присутності комплексу MgATP<sup>2-</sup>, який сприяє електрофоретичному накопиченню Ca<sup>2+</sup> МХ (рис. 6.15, б). Відомо, що RuR не є достатньо селективним інгібітором Ca<sup>2+</sup>-уніпортеру, а впливає також на інші Ca<sup>2+</sup>-транспортувальні системи МХ [45, 46] і навіть на Ca<sup>2+</sup>-канали ER [47]. Ця особливість пов'язана, можливо, із неспецифічною модифікацією субклітинних мембранних структур. Отже, посилення набухання МХ за дії екзогенних надвисоких концентрацій іонів Са ми пояснюємо зростанням неспецифічної проникності внутрішньої мембрани органел до цього катіона з подальшим зростанням його концентрації в матриксі.

Припущення щодо можливої ролі K<sup>+</sup>-проникності ВММ у механізмах зростання ГД органел у гіперкальцієвому середовищі спонукали нас до вивчення впливу відомих блокторів K<sup>+</sup>-каналів на процес набухання. Через відсутність достатньої концентрації K<sup>+</sup> (варіант дослідів із цукрозним середовищем) відомий інгібітор K<sup>+</sup>-каналів 1 мМ тетраетиламоній не перешкодив набухання органел (див. рис. 6.14). За наявності фізіологічної концентрації K<sup>+</sup> (130 мМ), що є передумовою функціональної активності K<sup>+</sup>-каналів МХ, зростання ГД під впливом 20 мМ Ca<sup>2+</sup> є більш суттєвим, ніж у цукрозному середовищі (див. рис. 6.14). Це може бути пояснено активацією транспорту K<sup>+</sup> крізь каналні структури в матрикс із наступним порушенням осмотичного балансу МХ за дії Ca<sup>2+</sup> у надвисоких концентраціях, який, імовірно, спроможний активувати окремі підтипи K<sup>+</sup>-каналів. Суттєве пригнічення набухання органел (див. рис. 6.14) спостерігається за умов використання інгібіторів потенціалкерованих K<sup>+</sup>-каналів тетраетиламонію та 4-амінопіридину (1 мМ), блоктора Ca<sup>2+</sup>-залежних K<sup>+</sup>-каналів харібдотоксину (20 нМ) та АТР-чутливих K<sup>+</sup>-каналів глібенкламід (20 мкМ).

Створення високої концентрації іонізованого Са в матриксі поряд із низьким рівнем АТР призводять до відкриття РТР і порушення осмотичного





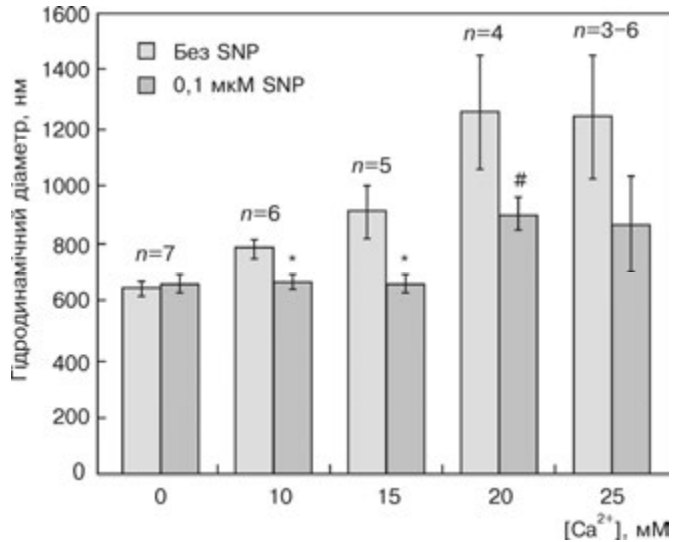
**Рис. 6.15.** Залежність індукованого 20 мМ Ca<sup>2+</sup> набухання мітохондрій від наявності в середовищі Mg<sup>2+</sup>(а), 3 мМ MgATP<sup>2-</sup> (б) та циклоспорину А (Csp) (в).  $M \pm m$ ,  $n = 3-4$ , \* —  $p < 0,02$

балансу між матриксом та позамітохондрійним середовищем [38]. За присутності комплексу MgATP<sup>2-</sup> (3 мМ, в еквімолярних кількостях Mg<sup>2+</sup> та АТР<sup>4-</sup>) в наших умовах проведення експерименту набухання не спостерігається (рис. 6.15, б). Нами також показано, що самі по собі іони Mg (1–3 мМ) не чинили впливу на ГД МХ і не захищали органели від набухання (рис. 6.15, а). Втім, Ca<sup>2+</sup>-індуковане зростання об'єму матриксу усувається 5 мкМ Csp (рис. 6.15, в), що свідчить про суттєве значення циклоспорин-чутливої РТР у процесі набухання МХ.

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

Суттєва зміна гідродинамічного діаметра МХ у контролі та за дії надвисоких концентрацій Ca<sup>2+</sup> (див. табл. 6.1) свідчить про високу вірогідність не лише набухання, а й злиття субклітинних часточок у процесі експерименту. Втім,

### 6.3. Протекторна дія NO щодо мітохондрій



**Рис. 6.16.** Протекторна дія нітропрусиду натрію (SNP) проти висококальцієвого набухання мітохондрій.  $M \pm m$ , \* —  $p < 0,02$ , # —  $p < 0,1$  відносно дослідів із  $\text{Ca}^{2+}$

первинними факторами, згідно з наведеними вище експериментальними даними, які спричинюють досліджувані процеси, є саме порушення іонного гомеостазу та осмотичного балансу в МХ.

Було виявлено, що SNP у доволі низькій концентрації (0,1 мкМ) ефективно пригнічував  $\text{Ca}^{2+}$ -залежне набухання МХ (рис. 6.16), що може бути пояснено гальмівною дією NO на РТР у міоцитах матки.

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

Розуміння ролі оксиду азоту в регуляції  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостазу та функціональної активності МХ у ГМК є основою для пошуку селективних екзогенних нетоксичних модуляторів транспорту  $\text{Ca}^{2+}$ , біоенергетики та біосинтезу NO в цих субклітинних структурах. У біохімічних і фізіологічних дослідженнях останніх років значна увага приділяється супрамолекулярним макроциклічним сполукам чашоподібної будови — каліксаренам, що є продуктами циклічної конденсації *para*-заміщених фенолів (або резорцинів) з формальдегідом під дією кислот або лугів як каталізаторів, завдяки їхньому широкому спектру біологічної активності [48]. Калікс[4]арени володіють противірусною, антитромботичною, антибактеріальною дією [49—51]. Багато калікс[4]аренів здатні виступати інгібіторами ензимів [49, 52, 53]. Доведено, що окремі калікс[4]арени специфічно впливають на катіонтранспортивальні системи субклітинних структур, у тому числі МХ, та на ефективність гідролізу АТР актоміозиновим комплексом у гладенькому м'язі матки [54—57]. Встановлено, що калікс[4]арени модулюють контрактильну активність міометрія [58—60]. Продовження досліджень у цьому напрямку — шлях для майбутнього створення фармпрепаратів, які б мали змогу ефективно регулювати роботу внутрішніх органів, зокрема й контрактильну здатність матки.

## **КАЛІКС[4]АРЕНИ ЯК ПЕРСПЕКТИВНИЙ СЕЛЕКТИВНИЙ ІНСТРУМЕНТ ВПЛИВУ НА $Ca^{2+}$ -ЗАЛЕЖНИЙ СИНТЕЗ ПО ТА БІОЕНЕРГЕТИЧНІ ПРОЦЕСИ В МІТОХОНДРІЯХ**

*Калікс[4]арени були синтезовані та охарактеризовані методами ЯМР та інфрачервоної спектроскопії у відділі хімії макроциклічних сполук Інституту органічної хімії НАН України доктором хімічних наук Р.В. Родіком та доктором хімічних наук С.О. Черенком під керівництвом академіка НАН України В.І. Кальченка.*

### **7.1. Структура та можливості застосування каліксаренів у хімії, біології та медицині**

Унікальні властивості та широкий спектр застосування каліксаренів зумовлені своєрідною будовою молекули, як показано на рис. 7.1, утвореної центральними ареновими залишками (калікс[4]аренова чаша) та замісниками, які формують верхній та нижній вінці. В поєднанні ці структурні фрагменти утворюють гідрофобну порожнину, здатну зв'язувати іони або нейтральні молекули. При зміні розмірів та хімічної природи замісників на верхньому та нижньому вінцях чаші можна синтезувати сполуки з новими властивостями [1–6].

Каліксаренам присвячена значна кількість досліджень, результати яких свідчать про перспективність їхнього застосування в біології та медицині. Селективність та чутливість до дії хімічних сполук забезпечує використання каліксаренів у різних галузях біотехнології як біосенсорів (наприклад, у діагностиці пріонів), для дизайну специфічних рецепторів біомолекул, платформ ДНК-чипів, імітаторів ензимів та в нанотехнологіях (мається на увазі нанорозмірність) [7–10]. Можливість візуалізації (bioimaging) каліксаренів зумовлює їх використання для таргетної доставки ліків та трансфекції генів тощо [9–10]. Мала токсичність для ссавців та специфічність дії забезпечує застосування каліксаренів як терапевтичних агентів: антивірусних, антибактеріальних, антигрибкових, антиракових, антитромботичних, антиоксидантних препаратів [4–5, 10]. Також важливою сферою використання цих сполук є інгібування ензимів (наприклад, протеїнтирозинфосфатаз) та іонних каналів [2, 5]. Особливо перспективними в біологічних дослідженнях та як можливі фармакологічні агенти виявились каліксарени з чотирма фенольними залишками в макроциклі — калікс[4]арени (див. рис. 7.1). Показано, що калікс[4]арени можуть впливати на процеси імунної відповіді, скорочення м'язів, зсідання крові, активність катіонтранспортувальних систем субклітинних структур [3, 11].

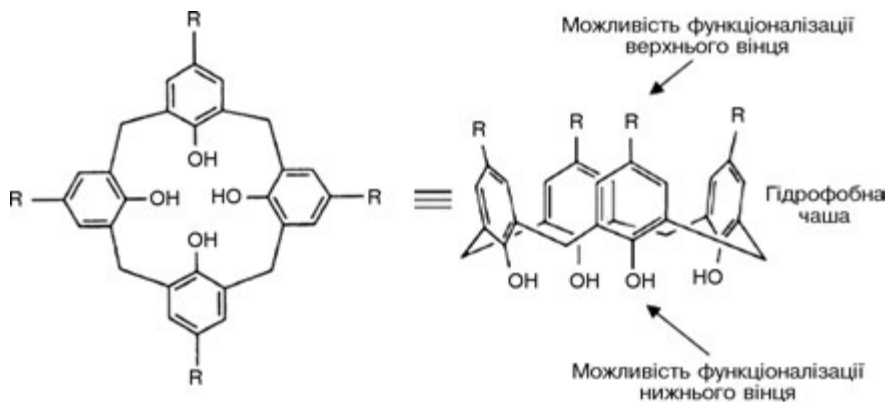


Рис. 7.1. Структура молекули калікс[4]арену

Серед переваг калікс[4]аренів можна виокремити їх легкий синтез, можливість модифікацій різноманітними функціональними групами, а також низьку токсичність (при концентрації 200 мМ виживаність клітин ~70 % [9, 10]) та незначну імуногенність [3].

## 7.2. Біохімічна активність калікс[4]аренів у клітинах гладенького м'яза та їхній вплив на функціонування мітохондрій

Можливість модифікації калікс[4]аренів по нижньому та верхньому вінцю замісниками різної хімічної будови забезпечує їх використання як спрямованих ефektorів ензимів. Для ГМ матки показано, зокрема, що вони з високою спорідненістю модулюють активність низки катіонтранспортувальних АТРаз [1], що привертає увагу щодо їх використання з метою впливу на гомеостаз  $\text{Ca}^{2+}$  в міоцитах.

На прикладі сполук С-97, С-99, С-107 (рис. 7.2) продемонстроване ефективну дію калікс[4]аренів на АТР-гідролазні реакції у ГМК. Зазначені калікс[4]арени є високоафінними інгібіторами  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-азної активності ПМ міомерія, але практично не мають впливу на "базальну"  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазмалеми. Значення коефіцієнта інгібування  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази для С-107 становить 50 нМ (за концентрації 100 мкМ спостерігається повне пригнічення ензиматичної активності); для С-97 — 30 нМ (за концентрації 100 мкМ — повне інгібування активності ензиму); для С-99 — 100 нМ (за концентрації 100 мкМ спостерігається близько 14 % залишкової активності). Зазначимо, що наведені калікс[4]арени мають у своїй молекулі один або дві фосфонові групи, а також піридинові фрагменти (С-107). Наявність цих структур забезпечує ефективне інгібування натрієвої помпи. За кінетичними розрахунками (на прикладі С-97 та С-107) зазначені калікс[4]арени не впливають на спорідненість  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази до іонів  $\text{Mg}$ , АТР, а також  $\text{K}^+$ , але зменшують спорідненість до  $\text{Na}^+$ . Високоєфективна інгібувальна дія вибраних калікс[4]аренів (С-97, С-107) має неконкурентний характер і впливає тільки на  $V_{\text{max}}$  ензиму,

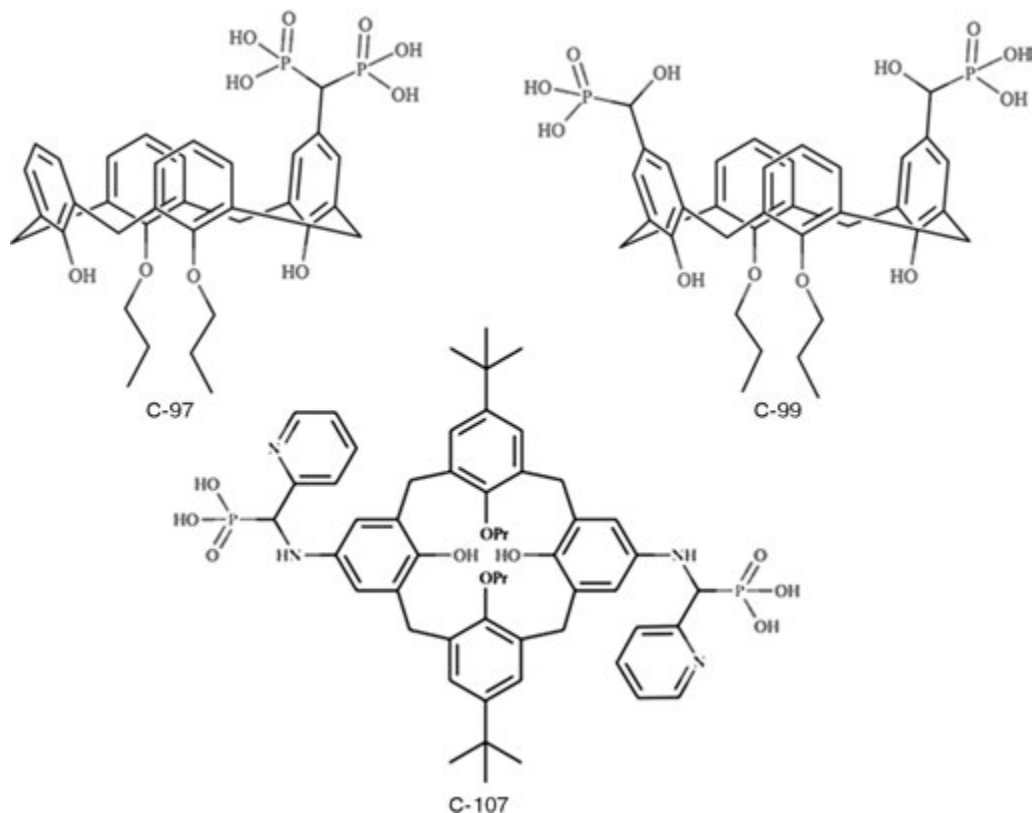


Рис. 7.2. Структурні формули калікс[4]аренів С-97, С-99 та С-107

тобто знижує число обертів. Водночас вони значно підвищують (майже в 4 рази) спорідненість ензиму до убаїну. В тензометричних експериментах калікс[4]арени С-99 та С-107, аналогічно убаїну, знижували скоротливу активність смужок міометрія. Отже, сполуки С-97, С-99 та С-107 є високоефективними ( $I_{0,5} = 30\text{--}100\text{ нМ}$ ) порівняно з убаїном ( $I_{0,5} = 22\text{ мкМ}$ ) інгібіторами  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази ПМ [12–14].

Продемонстровано, що калікс[4]арени С-97 та С-99 виявляють гальмівний вплив також на АТР-гідролазну активність актоміозину та АТРази субфрагмента-1 голівки міозину (С-99) міометрія, але навіть за концентрації 100 мкМ максимальний ефект інгібування сягав 50 % для С-97 та 70 % для С-99 [15]. Із використанням методів комп'ютерного моделювання доведено, що в основі взаємодії С-97 з субфрагментом-1 голівки залучені гідрофобні, електростатичні та стекінг-взаємодії між калікс[4]ареном та амінокислотними залишками, розташованими поряд з активним центром АТРази міозину [16]. Кінетичні розрахунки вказують на неконкурентне інгібування вибраними калікс[4]аренами (на прикладі С-99) АТРази голівки міозину щодо  $\text{Mg}^{2+}$  та АТР, але зменшення числа обертів АТРази [17]. У той же час калікс[4]арен С-107 концентраційнозалежно (10–100 мкМ) активував удвічі як АТРазну активність актоміозину, так і субфрагмента-1 міозину міометрія [15].

## 7.2. Біохімічна активність калікс[4]аренів у клітинах гладенького м'яза...

Таким чином, калікс[4]арени C-97, C-99 та C-107 здатні не лише ефективно інгібувати активність  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази ПМ, а й впливати на активність актомиозинового комплексу міоцитів матки.

Ключова роль  $\text{Ca}^{2+}$ -помп ПМ та СР у регулюванні  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостазу в спокої та залучення в процеси скорочення/розслаблення ГМК зумовлює пошук ефektorів їхньої активності. І якщо для SERCA високоафінними інгібіторами знайдені тапсигаргін та циклопіазонієва кислота, то для РМСА це питання залишається відкритим.

Було показано, що калікс[4]арен C-90, який модифікований по верхньому вінцю сульфониламідинними групами (рис. 7.3), інгібує  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазу як у фракції ПМ ( $I_{0,5} = 20$  мкМ), так і солюбілізований очищений ензим ( $I_{0,5} = 60$  мкМ) [18]. Він виступає неконкурентним інгібітором відносно  $\text{Ca}^{2+}$ , АТР і  $\text{Mg}^{2+}$  та зменшує максимальну швидкість гідролізу АТР [19]. На суспензії міоцитів було продемонстровано, що C-90 та його аналог C-956 ефективно пригнічують як  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазу ПМ ( $I_{0,5} = 20$  мкМ та 15 мкМ відповідно), так і  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазу СР ( $I_{0,5} = 57$  мкМ для C-90) [20, 21]. Інгібувальна дія обох калікс[4]аренів має неконкурентний характер. Зазначені сполуки (20 мкМ) викликають зростання іонізованого Са в цитоплазмі міоцитів та зменшують їхній гідродинамічний діаметр на 30 % (C-90) та 50 % (C-956), аналогічно до дії утеротоніка окситоцину (100 нМ), який знижує цей показник на 20–30 % [20–22]. Разом з тим, виявлено активуючий вплив C-90 на АТРапу активність актомиозину [23].

У праці [24] продемонстровано зниження сили скорочень гладенького м'яза матки шурів під дією каліксарену C-90, яке відбувається NO-залежним шляхом. Також зареєстровано уповільнення розслаблення (зменшення нормованої максимальної швидкості розслаблення), скоріше за все пов'язане як з пригніченням  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальної функції кальцієвої помпи ПМ, так і з

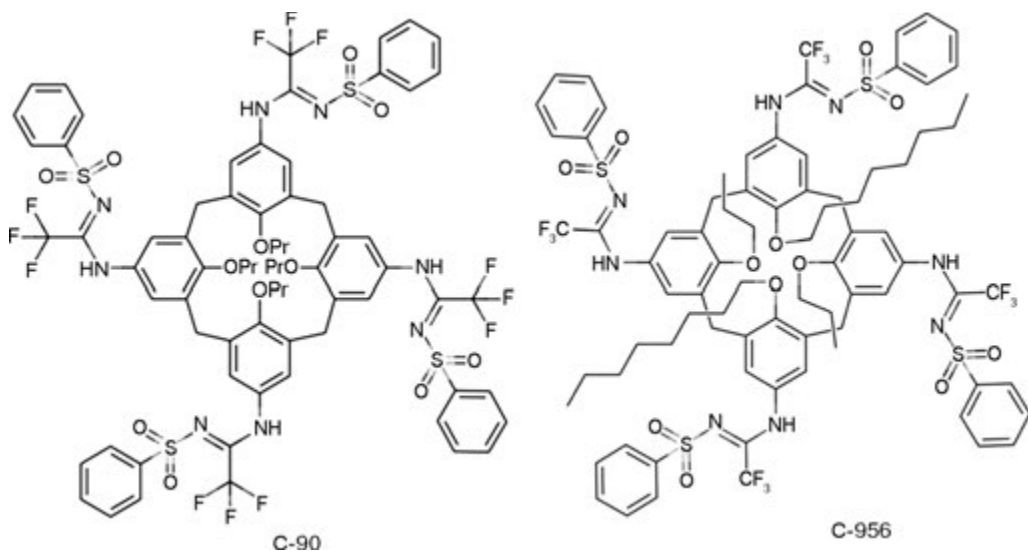


Рис. 7.3. Структурні формули калікс[4]аренів C-90 та C-956

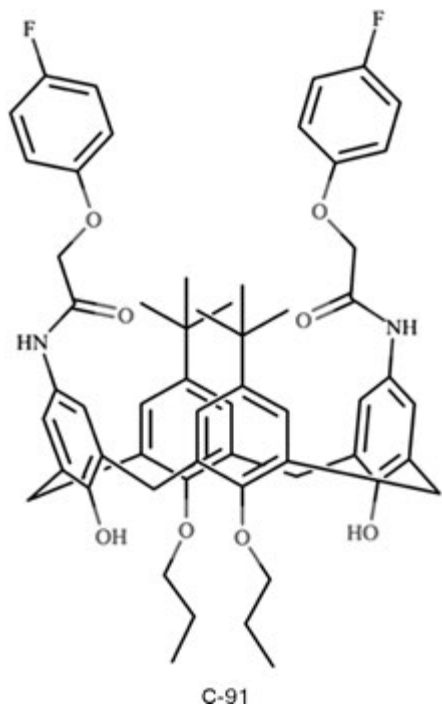


Рис. 7.4. Структурна формула калікс[4]арену С-91

активує впливом на АТРазу скоротливих протеїнів.

На пермеабілізованих дигітоніном міоцитах матки показано, що макроцикл С-91 (рис. 7.4) в концентрації 10–100 мкМ стимулює енергозалежну акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  в МХ, але не впливає на пасивний вихід катіона з органел та накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  в СР [25].

Калікс[4]арени, що містять на нижньому вінці макроциклу халкони — ароматичні кетони представники класу флавоноїдів (рис. 7.5), викликають зростання поляризації ВММ клітин міометрія, зокрема С-136 та С-137, які містять по 2 халконових замісники. За їх присутності зростає концентрація іонізованого Са в матриці та стимулюється його енергозалежна акумуляція (більш ефективним виявився С-138 з 1 халконовим замісником) [26, 27].

Отже калікс[4]арени є перспективними для використання їх як модуляторів  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних процесів, у тому числі синтеза NO та функціонування ЕТЛ у клітинах гладеньких м'язів, зокрема міометрія.

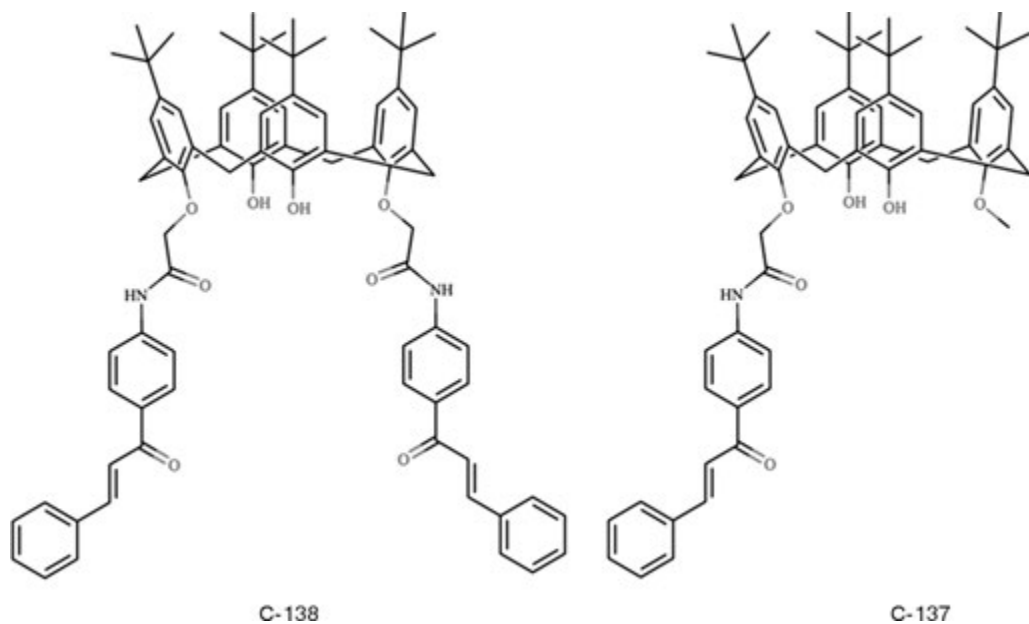


Рис. 7.5. Структурні формули халконовмісних калікс[4]аренів

### 7.3. Біохімічні механізми NO, Ca<sup>2+</sup>-залежної дії калікс[4]аренів на функціонування мітохондрій

Здатність калікс[4]аренів впливати на катіонтранспортувальну активність як ізольованих мітохондрій, так і органел пермеабілізованих міоцитів ставить питання щодо їх проникнення крізь ПМ та здатності взаємодії з органелами. Відповідь на нього є передумовою пошуку калікс[4]аренів, які могли б спрямовано впливати на функціонування МХ та, по можливості, перешкоджати розвитку мітохондрійної дисфункції.

Результати нижчеописаних експериментів стосуються вивчення взаємодії калікс[4]аренів (на прикладі макроцикла С-956) з міоцитами матки та їх проникнення до цитозолу і взаємодії з мітохондріями. А також встановлення іонних та мембранних механізмів, які лежать в основі дії вибраних калікс[4]аренів на Ca<sup>2+</sup>-гомеостаз і біоенергетику МХ міометрія, здатності калікс[4]аренів модулювати біосинтез NO в органелах тощо.

#### Взаємодія калікс[4]арену С-956 з міоцитами

Калікс[4]арени є гідрофобними сполуками, які можуть ефективно проникати крізь ліпідний бішар субклітинних мембранних структур. Калікс[4]арен С-956 (*5,11,17,23-тетра(трифтор)метил(фенілсульфоніліміно)метиламіно-25,27-діоктилокси-26,28-дипропокси-калікс[4]арен*) (рис. 7.6) містить чотири фенілсульфоніламідинові групи на верхньому вінці чаші і два октанольні залишки на нижньому вінці. Це, ймовірно, може сприяти більш ефективному вбудовуванню молекули калікс[4]арену в ПМ клітин. Показано, що гідрофобність безпосередньо корелює з біохімічною активністю калікс[4]аренів [28].

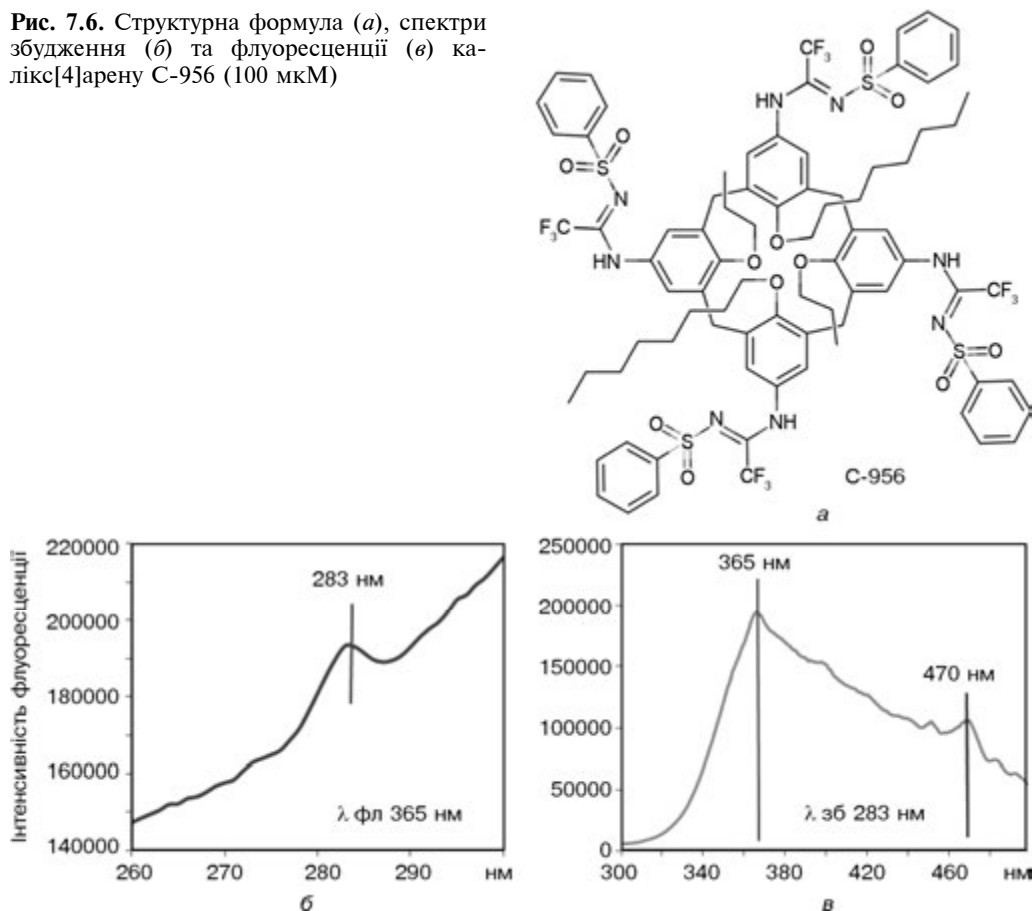
З використанням методу спектрофлуориметрії нами виявлено, що калікс[4]арен С-956 має власну флуоресценцію в синьо-фіолетовій ділянці спектра: довжини хвилі максимумів збудження ( $\lambda_{зб}$ ) та флуоресценції ( $\lambda_{фл}$ ) становлять 283 нм та 365 нм відповідно (див. рис. 7.6). Інтенсивність флуоресценції калікс[4]арену С-956 лінійно зростала залежно від його концентрації (10–100 мкМ) у робочому розчині без клітин (рис. 7.7).

Детергент дигітонін (0,01 %), який надалі використовували з метою підвищення неспецифічної проникності ПМ, не впливав на флуоресценцію С-956 в робочому безклітинному середовищі (див. рис. 7.6). Грунтуючись на цих попередніх результатах, було проведено дослідження змін флуоресценції С-956 при взаємодії з міоцитами (рис. 7.8).

При внесенні у середовище з калікс[4]ареном С-956 аліквоти суспензії міоцитів спостерігали різкий спалах інтенсивності флуоресценції калікс[4]арену з подальшим поступовим її зниженням (рис. 7.8, а). Початкове зростання та наступне гасіння флуоресценції С-956 залежить від його концентрації: зі збільшенням концентрації ступінь спалаху зменшується, а гасіння зростає (рис. 7.8, а, 7.9, а). Збільшення флуоресценції С-956, цілком імовірно, зумовлене взаємодією калікс[4]арену з ПМ міоцитів, тобто його адсорбцією на поверхні клітини і відповідним переходом у більш гідрофобне середовище. Зменшення інтенсивності спалаху зі збільшенням концентрації калікс[4]арену можна пояснити взаємодією молекул С-956 між собою на поверхні клітини,



Рис. 7.6. Структурна формула (а), спектри збудження (б) та флуоресценції (в) калікс[4]арену С-956 (100 мкМ)

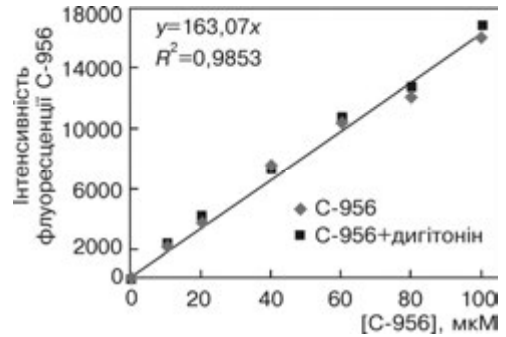


що і спричинює ефект самогасіння. Детергент дигітонін (0,01 %) не впливав на величину початкового спалаху флуоресценції калікс[4]арену за різних його концентрацій (рис. 7.8, б, 7.9, а), що підтверджує наше припущення стосовно зв'язку ефекту зростання флуоресценції С-956, пов'язаного саме з його адсорбцією на поверхні клітини.

Наступний процес швидкого зниження інтенсивності сигналу від С-956 (див. рис. 7.8, а, б), вірогідно, пов'язаний також з проникненням калікс[4]арену через ліпідний бішар ПМ до цитоплазми. Швидкість гасіння флуоресценції зростає в межах концентрацій С-956 10–40 мкМ та дещо зменшується зі збільшенням концентрації калікс[4]арену до 100 мкМ (рис. 7.10). На цьому етапі відбувається перерозподіл С-956 в цитозолі, взаємодія з субклітинними структурами, можлива димеризація. В умовах порушення інтактності ПМ за присутності дигітоніну зростає ефективність взаємодії С-956 з гідрофобними компонентами цитоплазми клітин, зокрема субклітинними мембранними структурами, і ступінь гасіння його флуоресценції зменшується (див. рис. 7.8, б, 7.9, б). Поряд з цим знижується також інтенсивність процесів самогасіння на поверхні ПМ.

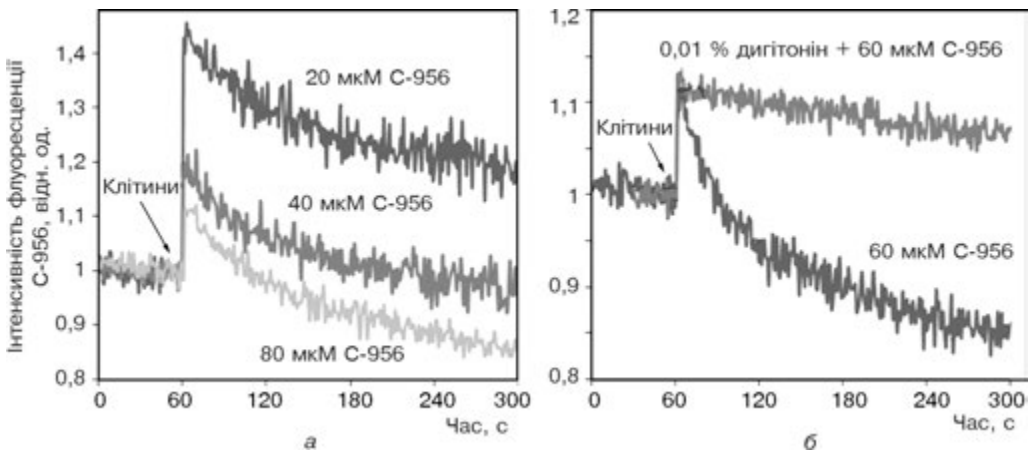
### 7.3. Біохімічні механізми NO, Ca<sup>2+</sup>-залежної дії калікс[4]аренів...

**Рис. 7.7.** Залежність інтенсивності флуоресценції С-956 в робочому середовищі (клітини відсутні) та за присутності 0,01 % дигітоніну

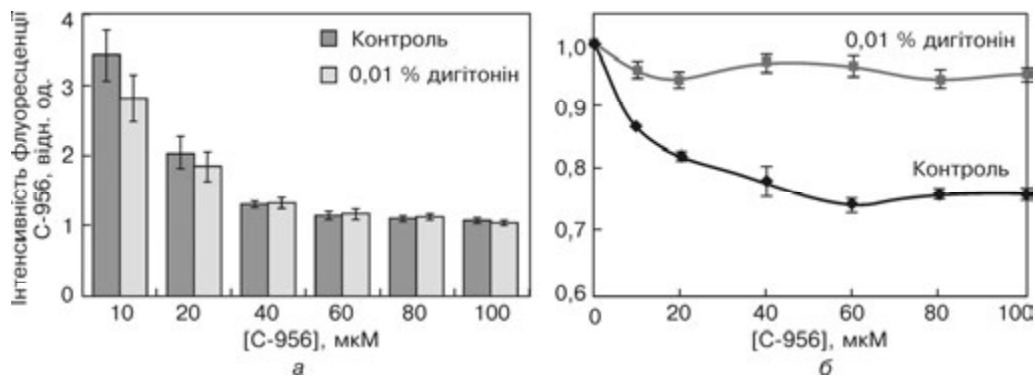


Втім, вищеописані результати можна пояснити і дещо простіше. Перехід флуоресціюючої сполуки в більш гідрофобне середовище внаслідок сорбції на поверхні плазмалемі призводить до зростання флуоресцентного сигналу. Процеси подальшої агрегації С-956 мають наслідком зниження інтенсивності флуоресценції. Вочевидь ці ефекти будуть залежати від концентрації калікс[4]арену: з її збільшенням спалах флуоресценції знижується через посилення процесів агрегації на поверхні ПМ, тоді як подальше гасіння сигналу зростає. Руйнування цілісності мембранної поверхні детергентом викликає інтенсивне надходження калікс[4]арену до цитоплазми, тому процеси агрегації майже зникають і флуоресценція залишається на постійному рівні.

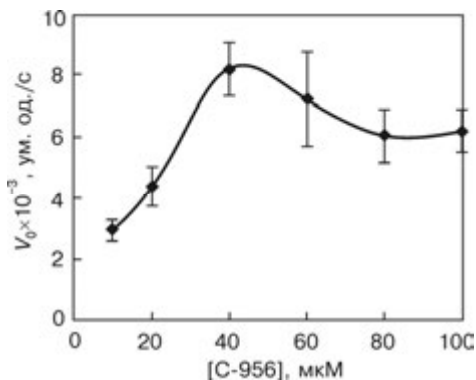
Для візуалізації процесу саме проникнення С-956 в цитоплазму (абсорбція клітиною) ми використали метод конфокальної мікроскопії. Клітини флуоресціюють в синьо-фіолетовій ділянці спектра при збудженні 360 нм ультрафіолетовою лампою або лазером за довжини хвилі 405 нм (рис. 7.11, див. вклейку). При аналізі оптичного зрізу клітини, а саме ділянки цитоплазми поза ядром, спостерігається подібний розподіл синьої аутофлуоресценції клітини та флуоресценції потенціалчутливого мітохондрійного зонда (червоний сигнал) MitoTracker Orange CMTMROS (рис. 7.11, ліва частина). Синя флуоресценція міоцитів зумовлена, скоріше за все, сигналом від триптофанвісних протеїнів (наприклад, актину, міозину, тропоніну) в цитоплазмі та аденінових



**Рис. 7.8.** Кінетика взаємодії С-956 з клітинами за різних його концентрацій (а) та вплив дигітоніну на цей процес (б). За "1" прийнято флуоресценцію С-956 в середовищі інкубації (розчин Хенкса)



**Рис. 7.9.** Концентраційна залежність змін флуоресценції С-956 в контролі та за присутності дигітоніну: *а* — концентраційна залежність спалаху флуоресценції при взаємодії з міоцитами, *б* — концентраційна залежність гасіння флуоресценції після взаємодії з міоцитами.  $M \pm m$ ,  $n = 5$



**Рис. 7.10.** Залежність початкової швидкості гасіння флуоресценції С-956 від його концентрації.  $M \pm m$ ,  $n = 5$

нуклеотидів, вміст яких особливо високий у МХ. Після внесення калікс[4]арену С-956 (рис. 7.11, права частина) інтенсивність сигналу на синій ділянці зростає вдвічі. При цьому не змінюється солоколізація синього та червоного сигналів у цитоплазмі. Ці результати свідчать про можливість проникнення С-956 в клітину та взаємодію калікс[4]арену з МХ.

Вивчали також кінетику взаємодії С-956 за концентрації 20 мкМ з міоцитами методом конфокальної мікроскопії. Додавання аліквоти калікс[4]арену С-956 в концентрації 20 мкМ спричиняло початковий спалах флуоресценції з подальшим її гасінням (графічні дані не наведено). Поступове збільшення концентрації С-956 в середовищі знижувало початкову компоненту флуоресцентного сигналу. Тобто одержані результати якісно відповідають раніше одержаним даним спектрофлуориметричного аналізу.

Сукупне застосування методів спектрофлуориметрії та лазерної конфокальної мікроскопії вказує на те, що каліксарен С-956 сорбується поверхнею міоцитів та проникає до міоплазми, взаємодіючи з МХ.

### **Вплив калікс[4]арену С-956 на $H^+$ - $Ca^{2+}$ -обмінник у мітохондріях міомерія, синтез NO та активність електронтранспортного ланцюга**

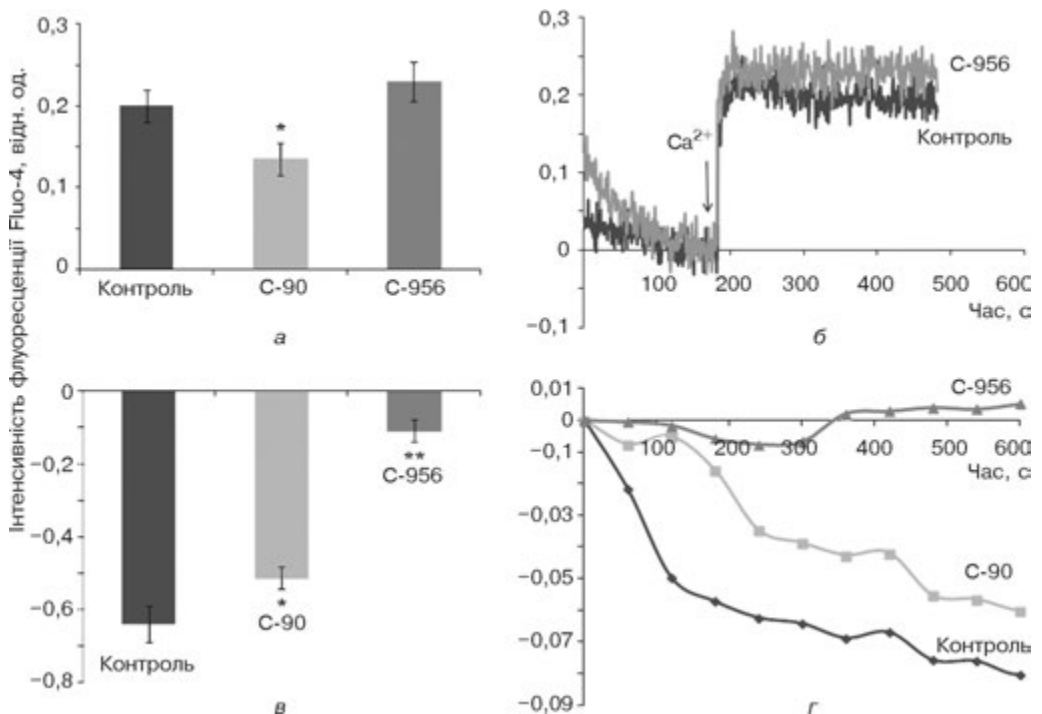
З урахуванням даних літератури щодо впливу калікс[4]арену С-956 на зміни вмісту іонізованого Са в міоцитах та можливої участі МХ у зниженні концентрації  $Ca^{2+}$  після його транзйенту [21], наступним завданням було з'я-

### 7.3. Біохімічні механізми NO, Ca<sup>2+</sup>-залежної дії калікс[4]аренів...

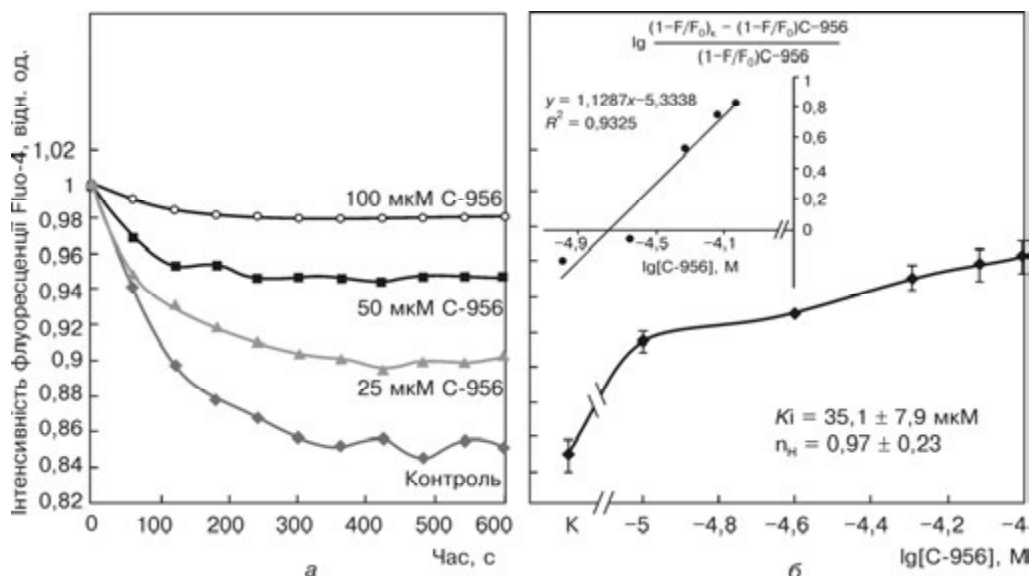
сувати ефекти С-956 та його аналога С-90 (в порівняльному аспекті) на системи транспорту Ca<sup>2+</sup> в ізольованих МХ гладенького м'яза матки з метою пошуку можливих ефективних регуляторів обміну іонів Ca та Ca<sup>2+</sup>-залежних процесів, зокрема синтезу NO, в цих субклітинних структурах.

Нами було показано, що калікс[4]арен С-90 (100 мкМ) має лише тенденцію до зниження енергозалежної акумуляції іонів Ca в МХ, водночас С-956 (100 мкМ) не чинить ніякого впливу на цей процес (рис. 7.12, а, б). Поряд з цим, С-956 (100 мкМ) ефективно блокує ΔpH-залежний вихід Ca<sup>2+</sup> з ізольованих МХ. Його структурний аналог С-90 за такої ж концентрації достовірно не впливає на H<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-обмінник ВММ (рис. 7.12, в, г). Таким чином, С-90 виявляє низьку інтенсивність дії на обидві системи обміну Ca<sup>2+</sup> у ВММ. У той же час С-56 ефективно пригнічує лише ΔpH-залежний вихід Ca<sup>2+</sup> з ізольованих МХ. Цей факт свідчить на користь того, що калікса[4]арен С-956, пригнічуючи H<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-обмінник МХ, може призвести до зміщення рівноваги у роботі Ca<sup>2+</sup>-транспортувальних систем ВММ у бік акумуляції катіона і відповідного зростання його концентрації в матриксі.

Унікальність калікс[4]аренів полягає у вираженій специфіці впливу їхніх окремих представників на катіонтранспортувальні системи субклітинних



**Рис. 7.12.** Енергозалежна акумуляція Ca<sup>2+</sup> ізольованими мітохондріями (а, б) та ΔpH-залежний вихід Ca<sup>2+</sup> з них (в, г) за присутності в середовищі інкубації калікс[4]аренів С-90 та С-956 (100 мкМ). Статистична обробка результатів: а — на 5-й хв акумуляції Ca<sup>2+</sup>, в — на 10-й хв вивільнення Ca<sup>2+</sup>, \* —  $p < 0,1$ , \*\* —  $p < 0,05$  відносно контролю.  $M \pm m$ ,  $n = 4-6$ ; б, г — результати типового експерименту



**Рис. 7.13.** Концентраційна та часова залежності впливу калікс[4]арену С-956 на  $\Delta pH$ -індукований вихід  $Ca^{2+}$  з ізольованих мітохондрій: *a* — часова залежність вивільнення  $Ca^{2+}$  за різних концентрацій калікс[4]арену С-956, результат характерного досліді; *б* — концентраційна залежність інгібувального впливу калікс[4]арену С-956, К — контроль за відсутності калікс[4]арену,  $M \pm m$ ,  $n = 5$ . Вставка: приклад розрахунку константи інгібування ( $K_i$ ) в координатах Хілла;  $F_0$  — початкова флуоресценція,  $F$  — флуоресценція за відповідні проміжки часу. Результат типового досліді ( $n = 5$ )

структур залежно від хімічної будови [23]. Одержані результати щодо специфічного інгібування  $H^+$ - $Ca^{2+}$ -обмінника МХ спрямовують наступні дослідження в напрямку з'ясування кінетичних закономірностей впливу калікс[4]арену С-956 на  $\Delta pH$ -залежний вихід  $Ca^{2+}$  з ізольованих МХ.

Ми дослідили концентраційну та часову залежності гальмівного впливу калікс[4]арену С-956 на  $\Delta pH$ -індукований вихід  $Ca^{2+}$  з ізольованих МХ у діапазоні його концентрацій 10–100 мкМ (рис. 7.13, наведено дані лише для трьох концентрацій у випадку 7.13, *a*).

Часова залежність процесу вивільнення катіона як у контролі, так і за дії калікс[4]арену має експоненційний характер, а концентрація катіона у матриксі, згідно зі змінами флуоресценції Fluo-4, виходить на стаціонарний рівень і, відповідно, не досягає нульових значень (рис. 7.13, *a*). На основі одержаних результатів розрахували константу інгібування  $K_i$  калікс[4]ареном  $H^+$ - $Ca^{2+}$ -обмінника МХ (рис. 7.13, *б*), яка становила  $35,1 \pm 7,9$  мкМ. Відповідний коефіцієнт Хілла ( $n_H$ ) становить  $0,97 \pm 0,23$ . Величина  $n_H$  може дати певну інформацію стосовно механізмів взаємодії калікс[4]арену з транспортним ензимом. Оскільки його величина близька до одиниці, це вказує на вірогідність зв'язування однієї молекули калікс[4]арену з білковою структурою LETM1, яка репрезентує  $H^+$ - $Ca^{2+}$ -обмінник.

За дії калікс[4]арену С-956 (10–100 мкМ) показано також зменшення початкової швидкості  $V_0$  (число обертів  $H^+$ - $Ca^{2+}$ -обмінника) та збільшення

характеристичного часу  $\tau_{1/2}$   $\Delta pH$ -індукованого виходу Ca<sup>2+</sup> з МХ залежно від його концентрації (рис. 7.14). Зміни цих параметрів відображають гальмівний вплив калікс[4]арену у мікромолярних концентраціях на H<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-обмінник.

Результати попередніх досліджень показали (див. розділ 5), що H<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-обмінник ВММ у клітинах міотерія є електрогенною системою. Інша субклітинна транспортна система гладенького м'яза матки РМСА також функціонує в електрогенному режимі і може здійснювати транспорт одного іона Ca<sup>2+</sup> з клітини в обмін на H<sup>+</sup> [30]. У кожному випадку протиіоном при перенесенні Ca<sup>2+</sup> через мембрану може бути H<sup>+</sup>. З огляду на те, що обидві системи високочутливі до інгібуючої дії С-956 і мають аналогічні за порядком константи інгібування (десятки мкМ), [21] можна висунути припущення, що мішенню дії калікс[4]арену є саме їхня H<sup>+</sup>-транспортна структура. Більш детальні дослідження будови транспортерів поряд із подальшим з'ясуванням механізмів інгібувальної дії С-956 можуть підтвердити або спростувати нашу гіпотезу.

Отже, одержані результати вказують на таке: калікс[4]арен С-956 у мікромолярних концентраціях виявив виражений гальмівний вплив на H<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-обмінник, який зумовлений зниженням початкової швидкості  $V_0$  та, як наслідок, збільшенням характеристичного часу  $\tau_{1/2}$   $\Delta pH$ -індукованого виходу Ca<sup>2+</sup> з МХ. Поряд з цим С-956 не впливає на енергозалежну акумуляцію катіона цими субклітинними структурами. Ці дані є підставою для подальшого дослідження ефектів С-956 на Ca<sup>2+</sup>-чутливі процеси в МХ: біосинтез АФА та АФК, функціональну активність ЕТЛ.

З використанням методу протокової цитометрії та NO-чутливого флуоресцентного барвника DAF-FM було досліджено вплив калікс[4]арену С-956 на NO-синтазну активність в ізольованих МХ. У цих дослідженнях використане інкубаційне середовище, склад якого є оптимальним, як встановлено нами раніше, для прояву NO-синтазної активності в МХ. За наявності екзогенних 50 мкМ L-аргініну та 100 мкМ Ca<sup>2+</sup>, а також за умови присутності в інкубаційному середовищі 10 мкМ NADPH, 10 мкМ BH<sub>4</sub> та субстратів дихання (5 мМ піруват та сукцинат) активність mtNOS становила  $0,28 \pm 0,04$  відн. од.

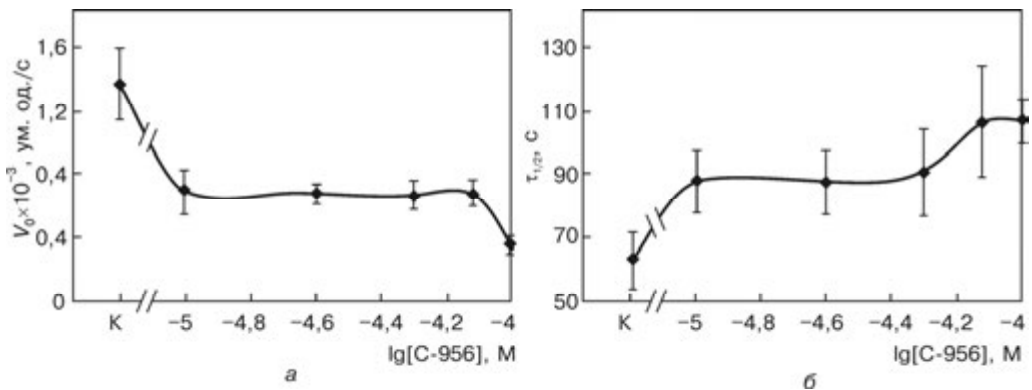


Рис. 7.14. Залежність початкової швидкості  $V_0$  (а) та характеристичного часу  $\tau_{1/2}$  (б)  $\Delta pH$ -індукованого виходу Ca<sup>2+</sup> з мітохондрій від концентрації калікс[4]арену С-956; К — контроль за відсутності калікс[4]арену,  $M \pm m$ ,  $n = 5$

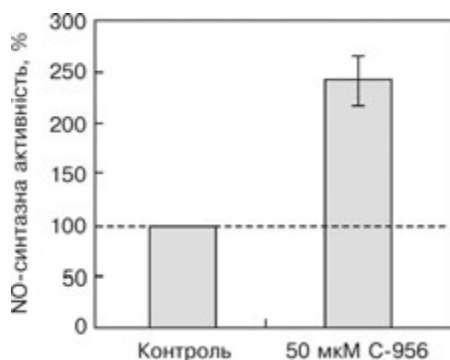


Рис. 7.15. Вплив калікс[4]арену С-956 на NO-синтазну активність в мітохондріях.  $M \pm m$ ,  $n = 5$

флуор. DAF-FM/мг протеїну за хв ( $n = 5$ ). Показано, що 50 мкМ калікс[4]арен С-956 стимулює синтез NO мітохондрійною NO-синтазою приблизно в 2,5 раза (рис. 7.15).

Гальмування  $\Delta pH$ -залежного вивільнення  $Ca^{2+}$  з МХ призводить до зростання концентрації катіона в матриксі, що може стимулювати активність mtNOS. Втім, не виключений також безпосередній вплив С-956 на досліджуваний ензим або ЕТЛ.

Як було зазначено раніше, оксид азоту в МХ є регулятором низки процесів, у тому числі функціональної активності комплексів дихального ланцюга, зворотно/незворотно пригнічуючи ЕТЛ залежно від концентрації та наявності АФК [29]. Отже, посилення синтезу NO МХ за впливу С-956 може призвести до змін у функціонуванні відповідних комплексів.

У попередньому розділі наведено докази того, що біомаркерами функціональної активності комплексів дихального ланцюга є зміни редокс-стану аденинових нуклеотидів, які мають власну флуоресценцію. За додавання 50 мкМ С-956 спостерігається гальмування окиснення NADH та  $FADH_2$  в ЕТЛ (рис. 7.16). Цей ефект пояснюється стимулюванням за дії калікс[4]арену біосинтезу NO в МХ, останній призведе до гальмування комплексів I та II. Не виключений також прямий ефект С-956 на ЕТЛ.

Відомо, що збільшення концентрації  $Ca^{2+}$  в матриксі, посилення продукції NO та гальмування активності комплексів дихального ланцюга в МХ можуть бути чинниками змін генерації в них АФК. Одним з механізмів їх продукції є стимуляція дихального ланцюга іонами кальцію [30]. NO-залежне інгібування ланцюга транспорту електронів може бути захисним фактором проти

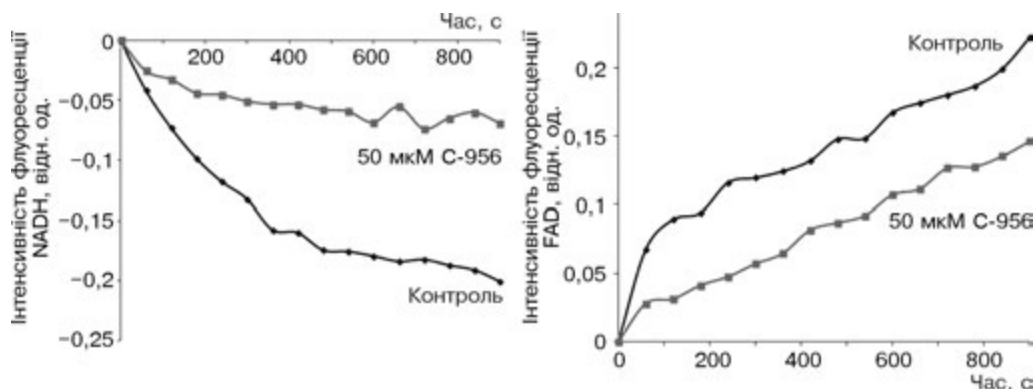


Рис. 7.16. Зміни флуоресценції NADH та FAD у мітохондріях міомерія за присутності калікс[4]арену С-956. Результат типового досліджу

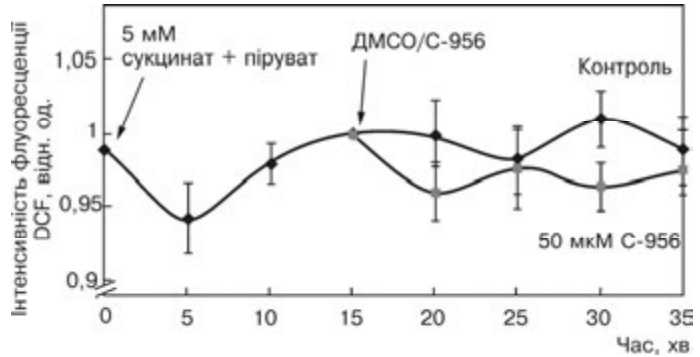


Рис. 7.17. Зміни флуоресценції DCF у мітохондріях за присутності калікс[4]арену С-956.  $M \pm m, n = 5$

утворення надмірних кількостей АФК. У наших дослідженнях калікс[4]арен С-956 практично не змінює DCF-флуоресценцію в МХ (рис. 7.17).

Відсутність впливу досліджуваного калікс[4]арену на утворення АФК у МХ може вказувати на користь того, що процеси, які активуються/гальмуються за присутності С-956, не призводять до шкідливих для МХ наслідків, тобто розвитку мітохондрійної дисфункції, пов'язаної з оксидативним/нітративним стресом. Водночас посиленням біосинтезу NO вибраний калікс[4]арен може мати модулювальний вплив на функціонування ЕТЛ і біоенергетику МХ.

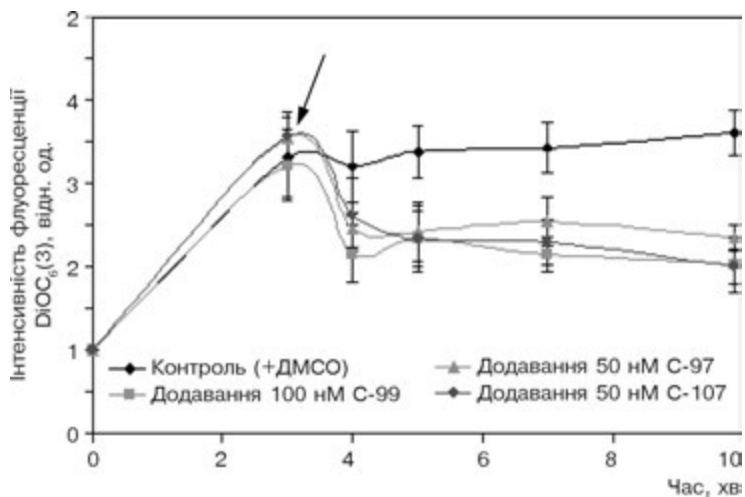
Таким чином, у проведеному циклі досліджень показано, що калікс[4]арен С-956 взаємодіє з ПМ, проникає в цитоплазму та солокалізується з МХ. Встановлено, що сполука С-956 інгібує рН-залежний вихід Ca<sup>2+</sup> з МХ, активує мітохондрійну NO-синтазу і гальмує окислення NADH та FADH<sub>2</sub> в ЕТЛ, але не впливає на синтез АФК у МХ. Отже, досліджуваний калікс[4]арен шляхом Ca<sup>2+</sup>-залежного впливу на біосинтез NO може мати корегувальний ефект на МХ, знижуючи інтенсивність окисного фосфорильовання і захищаючи клітини від енергетичного перевантаження.

### **Вплив калікс[4]аренів С-97, С-99, С-107 та С-1193 на поляризацію плазматичної та внутрішньої мітохондрійної мембран, H<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> обмін, синтез NO та активність електронтранспортного ланцюга**

Оскільки електричний потенціал на ПМ та ВММ регулює функціонування локалізованих у них катіонтранспортувальних систем, зумовлюючи зміни концентрації Ca<sup>2+</sup> в цитоплазмі необхідні для регуляції скоротливої здатності ГМК [31], актуальним є пошук сполук, які могли б спрямовано впливати на поляризацію цих субклітинних структур. З огляду на це, нашу увагу привернули калікс[4]арени С-97, С-99, С-107, які здатні змінювати електричний потенціал ПМ у зв'язку з їх убаїноподібним інгібуванням Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТРазиної активності в міомерії.

При дослідженні впливу калікс[4]аренів на електричний потенціал ПМ клітини попередньо інкубували з 5 мМ азидом натрію протягом 5 хв з метою деполаризації ВММ. Встановлено, що каліксарени С-97 (50 нМ), С-99 (100 нМ) та С-107 (50 нМ) у концентраціях, які відповідають значенням коефіцієнтів інгібування IC<sub>50</sub> для Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТРази (див. підрозділ 7.2), знижують





**Рис. 7.18.** Вплив калікс [4]аренів C-99, C-97 та C-107 на поляризацію плазматичної мембрани міоцитів матки. Стрілочкою вказано час додавання калікс[4]аренів або ДМСО в контролі.  $M \pm t$ ,  $n = 5$ . Флуоресцентний зонд — 100 нМ DiOC<sub>6</sub>(3). Дані протокової цитометрії

флуоресцентну відповідь потенціалчутливого зонда DiOC<sub>6</sub>(3), що свідчить на користь зменшення електричного потенціалу ПМ і зумовлено їхнім інгібувальним впливом на Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТРази (рис. 7.18). Концентраційнозалежних змін в інтенсивності флуоресценції DiOC<sub>6</sub>(3) за використання C-97 та C-107 не спостерігали. Останнє може бути пояснене значним негативним зарядом досліджуваних калікс[4]аренів через наявність фосфонових залишків, що, за умови зростання їх концентрації, може вплинути на потенціалзалежну акумуляцію зонда.

Водночас калікс[4]арен C-150 (25, 27-дипропоксикаліксарен) — суто каліксаренова “чаша”, до якої натрієва помпа є резистентною [12], навіть за концентрації 500 нМ не викликає істотних змін у поляризації ПМ у перші 4 хв інкубації з клітинами, і лише на 7-й хв спостерігається зниження її рівня (графічні дані не наведено). Оскільки C-150 не впливає на активність Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТРази, його відносно слабо виражений деполаризуючий ефект можна пояснити, зокрема, безпосередньою дією на системи пасивного транспорту потенціалоутворювальних іонів у ПМ.

Подальші дослідження були спрямовані на з’ясування впливу вибраних калікс[4]аренів на поляризацію МХ міометрія, системи обміну іонів Ca у ВММ, синтез NO та функціонування ЕТЛ.

Для виявлення ефектів калікс[4]аренів на поляризацію ВММ міоцити попередньо інкубували 5 хв з 1 мМ убаїном з метою надійної деполаризації ПМ. Встановлено, що сполуки C-97, C-99 та C-107 викликали транзйентну поляризацію мітохондрійної мембрани, тривалість якої становила близько 5 хв після внесення досліджуваних речовин (рис. 7.19, а, крива І). Максимальний рівень поляризації за впливу калікс[4]аренів сягав 40 % (за 100 % прийнято значення інтенсивності флуоресценції зонда після інкубації міоцитів з убаїном). За цих же умов калікс[4]аренова “чаша” C-150 практично не впливала на електричний потенціал мітохондрійної мембрани. За умов деполари-

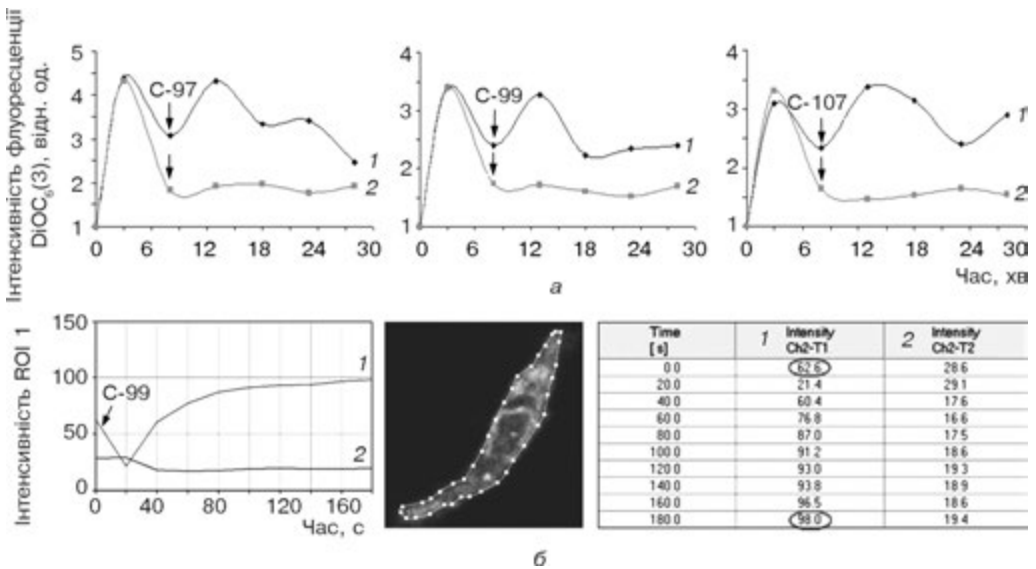
### 7.3. Біохімічні механізми NO, Ca<sup>2+</sup>-залежної дії калікс[4]аренів...

зації і ПМ, і мітохондрійної мембрани, спричиненої попередньою інкубацією клітин з 1 мМ убаїном та 5 мМ азидом натрію, внесення зазначених калікс[4]аренів не викликало змін в інтенсивності флуоресценції зонда (рис. 7.19, а, крива 2).

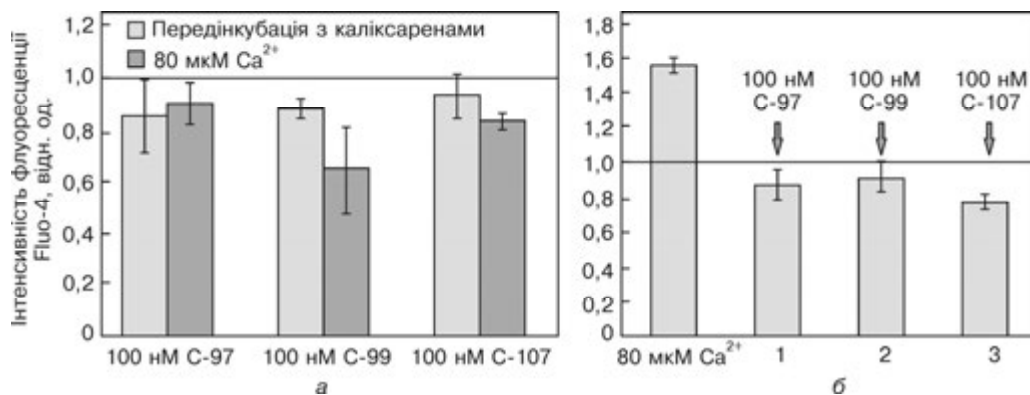
Одержані результати якісно підтверджуються дослідями із використанням методу лазерної конфокальної мікроскопії. Встановлено, що калікс[4]арени С-99 (рис. 7.19, б) та С-107 викликали ефективно зростання флуоресценції окремих міоцитів, попередньо навантажених DiOC<sub>6</sub>(3) за присутності 1 мМ убаїну. Таким чином, вибрані калікс[4]арени викликають короткотривале зростання мембранного потенціалу МХ.

Сполуки С-97, С-99 та С-107 у концентрації 100 нМ ефективно перешкоджають енергозалежній акумуляції Ca<sup>2+</sup> МХ (рис. 7.20, а). Має місце також тенденція до зниження вмісту ендogenous іонізованого Ca<sup>2+</sup> в МХ за умови 5-хвилинної передінкубації з ними органел. Втім, останній ефект не є статистично значущим.

Внесення калікс[4]аренів у середовище інкубації після енергозалежної акумуляції Ca<sup>2+</sup> призводить до статистично значущого зниження його вмісту в матриксі, навіть нижче від базального (рис. 7.20, б). Ці ефекти не залежали



**Рис. 7.19.** Кінетичні закономірності дії калікс[4]аренів С-97, С-99, С-107 на поляризацію внутрішньої мітохондрійної мембрани: а — стрілочкою вказано момент додавання (на 3-й хв інкубації клітин з зондом) 1 мМ убаїну (1) або 1 мМ убаїну + 5 мМ NaN<sub>3</sub> (2) та (на 8-й хв) каліксаренів (100 нМ). Результати характерного дослідження, метод протокової цитометрії; б — збільшення інтенсивності флуоресценції міоциту при внесенні 100 нМ С-99, попередньо навантаженого DiOC<sub>6</sub>(3) за присутності 1 мМ убаїну. Результати характерного дослідження, метод конфокальної мікроскопії; для б: ліва панель — кінетика спалаху флуоресценції DiOC<sub>6</sub>(3) (крива 1) після внесення С-99, крива 2 — інтенсивність флуоресценції ядерного барвника Hoechst 33342; права панель — цифрова презентація графічних результатів (1 — DiOC<sub>6</sub>(3), 2 — Hoechst 33342); результати одержані на основі оцінювання інтенсивності флуоресценції, усередненої по площині оптичного зрізу міоциту (верхня панель), параметр ROI 1



**Рис. 7.20.** Вплив калікс[4]аренів на концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  в матриці мітохондрій та енергозалежну акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  органелами.  $M \pm m$ ,  $n = 5$ : *а* — передінкубація з калікс[4]аренами протягом 5 хв (лівий стовпчик) та наступне додавання 80 мкМ  $\text{Ca}^{2+}$  (правий стовпчик); *б* — додавання речовин після енергозалежної акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями

від хімічної структури та взаєморозташування замісників у макроциклі. Також було продемонстровано, що калікс[4]арени C-97 та C-99, але не C-107, здатні стимулювати  $\Delta\text{pH}$ -залежний вихід іонів Ca з МХ гладенького м'яза матки (графічні дані не наведено).

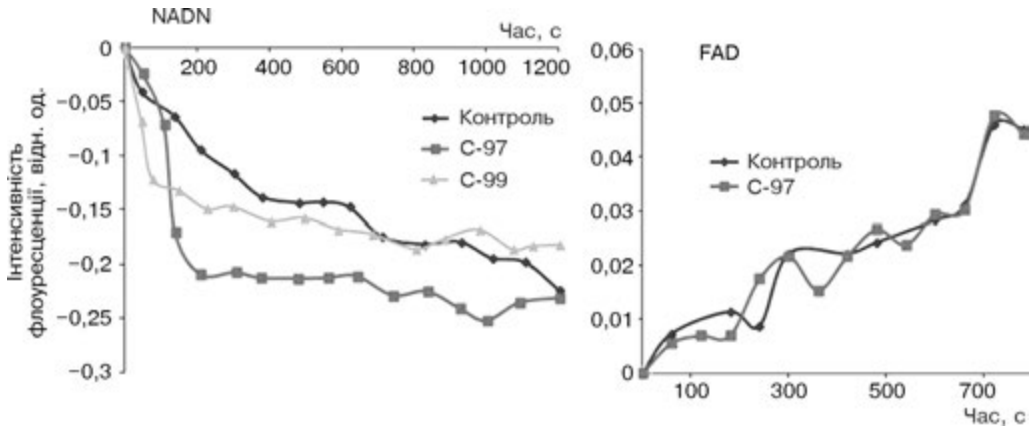
Отже, вибрані калікс[4]арени працюють на зниження концентрації катіона в матриці. Така спрямованість впливу досліджуваних сполук може мати наслідком зменшення активності  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних мітохондрійних дегідрогеназ і відповідного гальмування роботи ЕТЛ з часом незалежно від початкового короткотривалого зростання потенціалу на ВММ. Щоб перевірити це припущення, ми вивчили вплив досліджуваних калікс[4]аренів на функціональну активність ЕТЛ.

Внесення калікс[4]аренів у перші хвилини експерименту спричинювало більш інтенсивне зниження флуоресценції від NADH (посилення окислення цього нуклеотиду) ізольованих МХ (рис. 7.21), що може бути зумовлено стимулюванням I комплексу ЕТЛ і пояснює транзйентне зростання електричного потенціалу на ВММ. З часом флуоресценція NADH повертається до контрольних значень, що може бути наслідком зниження концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в матриці і відповідного гальмування ЕТЛ. Разом з цим має місце відсутність змін флуоресценції від FAD відносно контролю (див. рис. 7.21.). Не виключено, що початковий гіперполяризуючий ефект калікс[4]аренів пов'язаний також із безпосереднім впливом на ЕТЛ.

Виявлено, що досліджувані калікс[4]арени (100 нМ) помірно, в межах 30 %, знижують активність мітохондрійної NO-синтази (рис. 7.22). Цей ефект може бути наслідком зменшення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в матриці МХ.

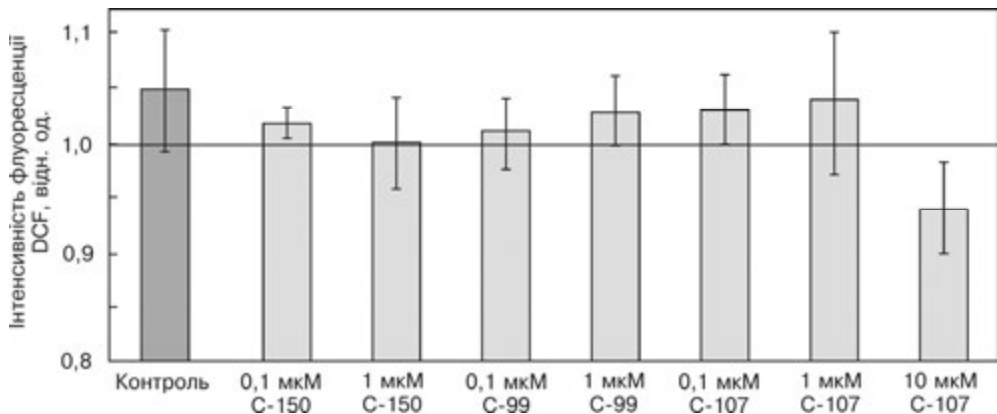
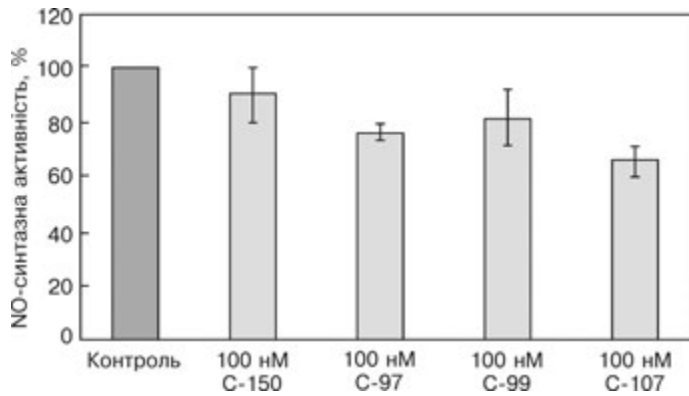
Також було продемонстровано, що досліджувані калікс[4]арени в концентраціях 0,1 мкМ та 1 мкМ не спричинюють посилення генерації АФК (рис. 7.23). Тобто їхня дія у використаних концентраціях на МХ не призводить до розвитку оксидативного/нітрозативного стресу і відповідної мітохондрійної дисфункції. Це дуже важливо, оскільки створює перспективи для їх

### 7.3. Біохімічні механізми NO, Ca<sup>2+</sup>-залежної дії калікс[4]аренів...

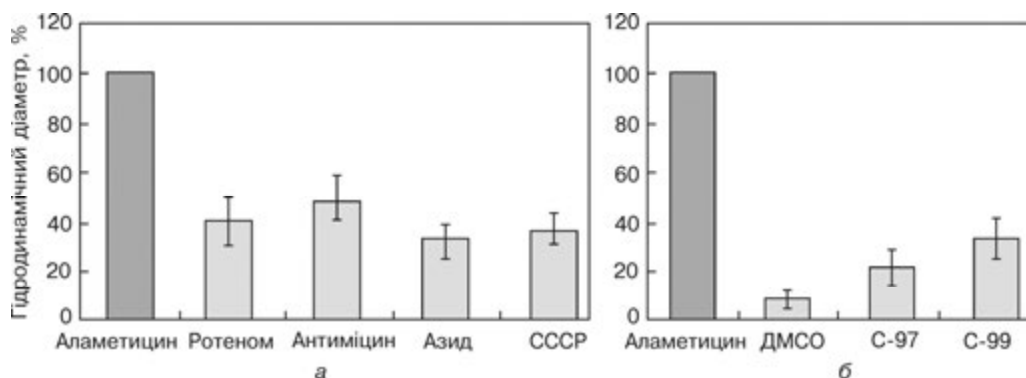


**Рис. 7.21.** Динаміка змін флуоресценції NADH та FAD у мітохондріях за впливу сполук C-97 та C-99 (100 нМ). Контроль — зміни флуоресценції нуклеотидів за присутності ДМСО. Дані типового експерименту

**Рис. 7.22.** Вплив вибраних калікс[4]аренів на NO-синтазну активність в мітохондріях.  $M \pm m$ ,  $n = 5$



**Рис. 7.23.** Ефекти калікс[4]аренів C-99 та C-107, а також калікс[4]аренової “чаші” — C-150 на флуоресценцію DCF у мітохондріях.  $M \pm m$ ,  $n = 5$ . За “1” прийнято значення флуоресценції DCF до внесення речовин. Наведено відносні одиниці флуоресценції на 20 хв дії сполук



**Рис. 7.24.** Вплив інгібіторів електронтранспортного ланцюга (5 мкМ ротенон, 1 мкг/мл антиміцин, 5 мМ азид натрія, 10 мкМ СССР) (а) та калікс[4]аренів С-97 і С-99 (100 нМ) (б) на гідродинамічний діаметр мітохондрій,  $M \pm m$ ,  $n = 5$

використання як сполук, що захищають МХ від  $\text{Ca}^{2+}$ -перевантаження і гіперпродукції АФА/АФК.

Беручи до уваги, що важливою морфофункціональною ознакою МХ є їхній об'єм, нами було досліджено вплив речовин-модифікаторів функціонування дихального ланцюга та трансмембранного обміну катіонів у МХ на зміни характеристичних розмірів (гідродинамічного діаметра, ГД) органел методом фотонної кореляційної спектроскопії. Середнє значення ГД МХ у контролі становить  $547 \pm 49$  нм та відповідає їхнім ефективним розмірам (див. вище). За додавання антибіотика аламетицину (7,5 мкг/мл) ГД органел зростає до  $800 \pm 39$  нм. Зміни ГД після внесення каналоформера аламетицину були прийняті як контроль (100 % набухання).

Руйнування електрохімічного потенціалу ВММ унаслідок впливу екзогенних ефекторів призводить до порушення осмотичного балансу між матриксом та позамітохондрійним середовищем. На прикладі інгібіторів I, III та IV комплексів дихального ланцюга нами продемонстровано, що внесення інгібіторів ЕТЛ ротенону (5 мкМ), антиміцину (1 мкг/мл), азиду натрію (5 мМ), а також протонифору СССР (10 мкМ) призводить до збільшення ГД МХ у середньому на 40 % порівняно з контрольним набуханням (рис. 7.24, а). Блокування відповідних комплексів ЕТЛ має наслідком зменшення електрохімічного потенціалу ВММ, порушення трансмембранного обміну катіонів, зокрема іонів К та  $\text{P}_i$ , наслідком чого є набухання органел [32, 33]. Калікс[4]арени викликали збільшення ГД МХ на  $22 \pm 6$  % (С-97) та  $34 \pm 8$  % (С-99) (рис. 7.24, б) порівняно з контрольним набуханням. Таке набухання не є критичним для функціонування МХ. Адже зростання об'єму матриксу активує дихальний ланцюг та посилення продукції АТР [32, 33]. Більш небезпечним є, навпаки, зменшення об'єму матриксу, яке супроводжується гіперполяризацією ВММ, посиленням генерації АФК та пригніченням перенесення електронів [34–36].

Отже, калікс[4]арени С-97, С-99 та С-107 знижують концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксі шляхом пригнічення його енергозалежної акумуляції та стимулюванням  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника (С-97 та С-99), зменшують  $\text{Ca}^{2+}$ -залежну  $\text{NO}$ -

синтазну активність в МХ та викликають транзйентну поляризацію ВММ, з часом електричний потенціал ВММ набуває контрольних значень.

Наразі синтезована сполука С-1193 (аналог С-99), яка містить у своєму складі чотири атоми сірки, що зумовлює більші розміри молекули і відстань між фосфоновими залишками порівняно з С-99 (рис. 7.25). Наявність у сірки нуклеофільних властивостей і, відповідно, підвищена реакційна здатність С-1193 робить перспективним дослідження дії тіакалікс[4]арену на ефективність роботи електронтранспортувального ланцюга для подальшого використання як ефективного модулятора мітохондрійної біоенергетики, а також з метою впливу на синтез оксиду азоту МХ.

Досліджуваний калікс[4]арен залежно від часу та концентрації (0,01—1 мкМ) гальмував окислення NADH в ЕТЛ (рис. 7.26.). Спостерігали також ефективне пригнічення окислення FADH<sub>2</sub>, втім концентраційної залежності зареєструвати не вдалося (графічні дані не наведено).

Цей ефект за умови наших експериментів (номінальна відсутність Ca<sup>2+</sup> в середовищі реєстрації флуоресцентного сигналу від NADH та FAD) може бути пов'язаний з безпосереднім впливом на електронтранспортувальний ланцюг. Втім, у ситуації *in vivo* така дія С-1193 може бути також пов'язана з гальмуванням надходження екзогенного Ca<sup>2+</sup> до мітохондрій. Відсутність вираженої концентраційної залежності ефекту С-1193 на окислення FADH<sub>2</sub> може вказувати на складний характер впливу досліджуваного калікс[4]арену на електронтранспортувальний ланцюг.

Ми припускаємо, що в основі дії калікс[4]арену С-1193 лежить пригнічення функціональної активності I та II комплексів. Унаслідок зниження інтенсивності транспорту електронів у дихальному ланцюзі спостерігається також зменшення генерації АФК у МХ за присутності С-1193. Ефект виявився концентраційнозалежним у діапазоні 0,1—100 мкМ С-1193 (рис. 7.27). Ефективність функціонування ЕТЛ корелює з рівнем продукції АФК у МХ. Їх посилення генерація призводить до розвитку окисного стресу, наслідком якого є мітохондрійна дисфункція. Зниження інтенсивності активності комплексів ЕТЛ за дії С-1193 може свідчити на користь його захисної дії щодо МХ.

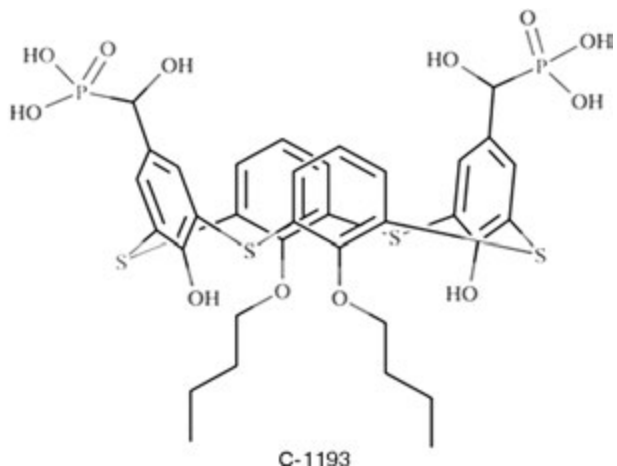


Рис. 7.25. Структура калікс[4]арену С-1193

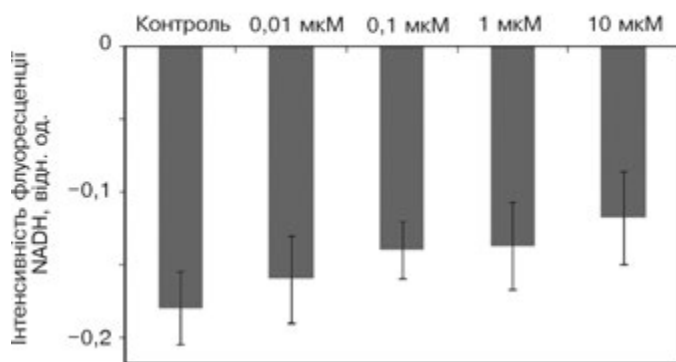
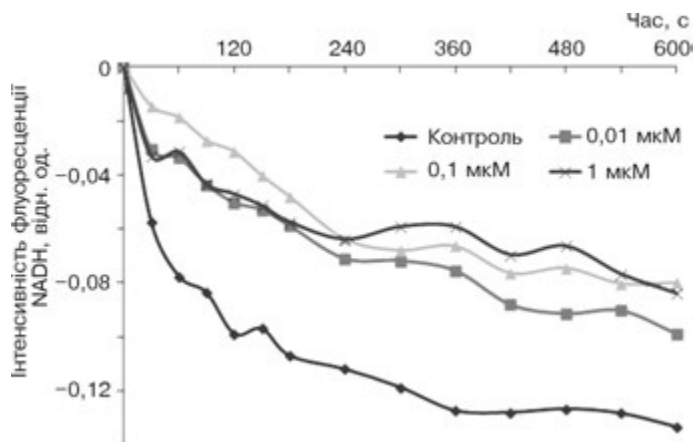


Рис. 7.26. Вплив калікс[4]арену С-1193 на окислення NADH у мітохондріях. Верхня панель — дані типового експерименту; нижня панель —  $M \pm m$ ,  $n = 5$

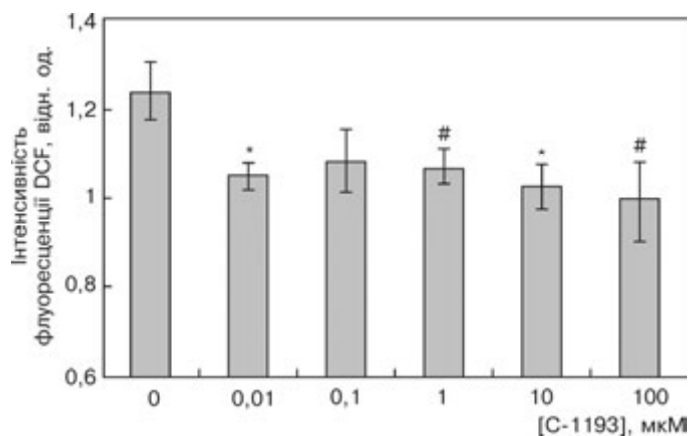


Рис. 7.27. Дія калікс[4]арену С-1193 на утворення АФК у мітохондріях.  $M \pm m$ ,  $n = 5$ , \* —  $p < 0,01$ , # —  $p = 0,05$

Виразене гальмування окислення аденовіних нуклеотидів у МХ відображає можливість модуляції їхньої енергетики та, відповідно, роботи  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем, що забезпечують енергозалежну акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  до матриксу. Присутність в середовищі комплексу  $\text{MgATP}^{2-}$  забезпечує зрос-

тання потенціалу на ВММ та супроводжується більш ефективною акумуляцією катіона (див. підрозділ 5.1). Нами продемонстровано залежне від часу та концентрації калікс[4]арену С-1193 (0,01—10 мкМ) пригнічення акумуляції Ca<sup>2+</sup> МХ, яке не залежало від наявності в середовищі MgATP<sup>2-</sup> (рис. 7.28). Втім, С-1193 у досліджуваних концентраціях не мав впливу на ΔрН-залежний вихід Ca<sup>2+</sup> з матрикси органел.

Зниження інтенсивності надходження Ca<sup>2+</sup> в МХ буде супроводжуватись зменшенням концентрації катіона в матриксі і здатне впливати на інтенсивність перебігу Ca<sup>2+</sup>-залежних процесів, зокрема функціонування ЕТЛ ВММ. Також NAD-вмісні ферменти циклу Кребса α-кетоглутаратдегідрогеназний комплекс, ізоцитратдегідрогеназа та піруватдегідрогеназний комплекс є Ca<sup>2+</sup>-залежними ферментами. Синтез активних форм азоту і кисню, зокрема NO, також стимулюється іонами Са. Проте Ca<sup>2+</sup> перевантаження МХ небезпечне і здатне призвести до мітохондрійної дисфункції. В цьому контексті гальмування енергозалежного надходження Ca<sup>2+</sup> до МХ може трактуватися як можлива протекторна дія С-1193.

Гальмування надходження Ca<sup>2+</sup> в МХ та пригнічення функціонування ЕТЛ може мати наслідком модуляцію їхньої NO-синтазної здатності. Калікс[4]арен С-1193 ефективно концентраційнозалежно (0,001—100 мкМ) інгібував синтез оксиду азоту МХ (рис. 7.29). Розрахована в координатах Хілла константа інгібування становить 5,5 ± 1,7 нМ (n = 7), що робить досліджувану сполуку високоафінним блокатором ендогенної генерації NO. Такий високий афінитет сполуки С-1193 щодо синтезу NO МХ може бути також пояснений безпосереднім впливом на мітохондрійну NO-синтазу, яка асоційована з ВММ.

Наразі доведено, що NO, зокрема синтезований ендогенно, регулює функціональну активність МХ [37]. Водночас надлишкова продукція NO на фоні посилення утворення супероксид-аніона в МХ супроводжується генерацією значних кількостей пероксинітриду, пошкодженням компонентів ЕТЛ, незворотною деполаризацією органел і розвитком мітохондрійної дисфункції. Нітрозативний стрес має наслідком порушення структурно-функціональних властивостей ліпідів, ДНК (нерепаровані розриви та інші пошкодження), протеї-

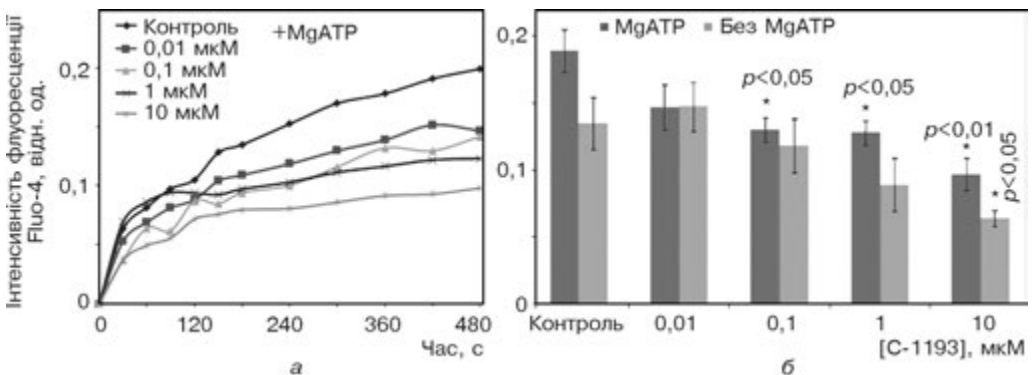
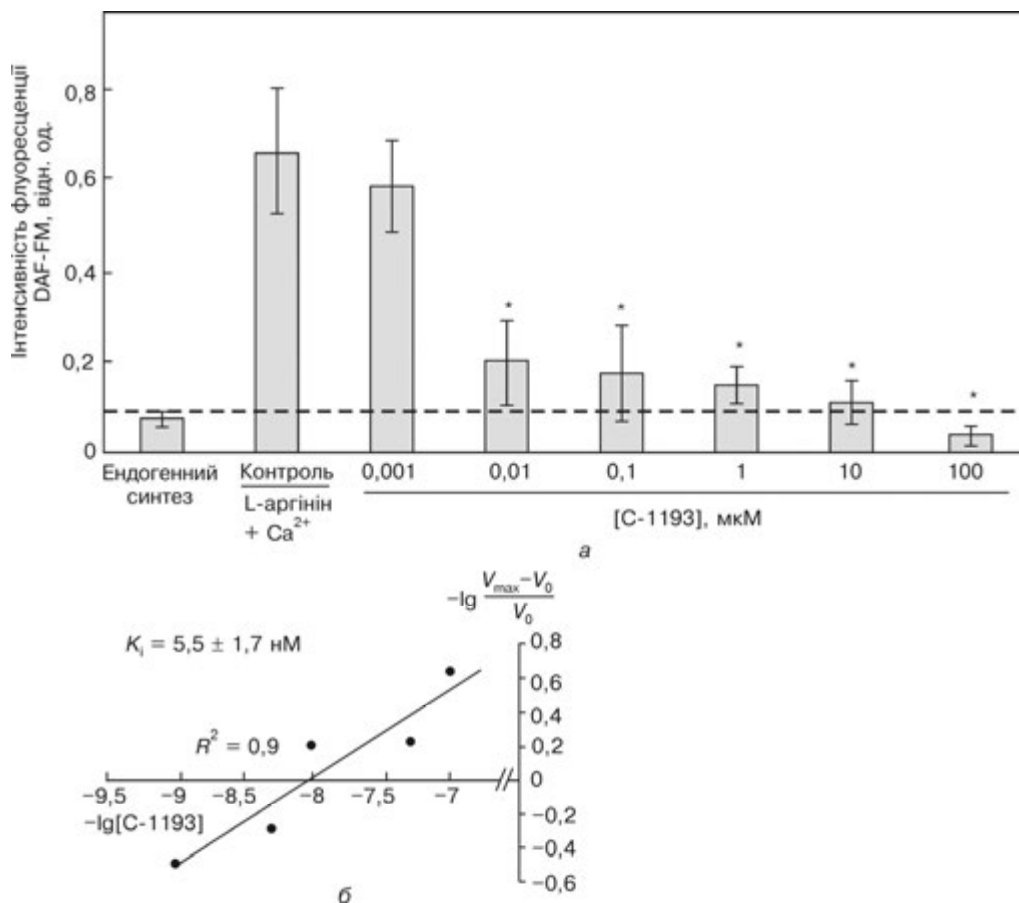


Рис. 7.28. Вплив калікс[4]арену С-1193 на акумуляцію Ca<sup>2+</sup> в мітохондріях: а — результат типового дослід, б — статистична обробка результатів.  $M \pm m$ , n = 4–6





**Рис. 7.29.** Вплив калікс[4]арену C-1193 на Ca<sup>2+</sup>-залежний синтез оксиду азоту в мітохондріях (а); \* —  $p < 0,01$  відносно контролю,  $M \pm m$ ,  $n = 7$ ; б — розрахунок константи інгібування в координатах Хілла;  $V_{\max}$  — зміни флуоресценції DAF-FM (відн. од.) у контролі,  $V_0$  — зміни флуоресценції DAF-FM (відн. од.) за присутності C-1193

нів. Нітрозативний/оксидативний стрес у кінцевому підсумку може призвести до розвитку апоптозу або навіть некрозу. Ось чому ефективне пригнічення синтезу NO з боку калікс[4]арену C-1193 є передумовою його можливого застосування з метою запобігання розвитку нітрозативного/оксидативного стресу в МХ і відповідної мітохондрійної дисфункції.

Одержані результати дають змогу застосовувати C-1193 з метою пригнічення гіперпродукції активних форм азоту і кисню МХ гладенького м'яза та запобігання Ca<sup>2+</sup>-перевантаження цих субклітинних структур.

Модулюючи впливи на ЕТЛ призводять до змін об'єму органел. З використанням фотонної кореляційної спектроскопії ми продемонстрували, що C-1193 в концентрації 1 та 10 мкМ достовірно на впливає на гідродинамічний діаметр МХ (рис. 7.30).

### 7.3. Біохімічні механізми NO, Ca<sup>2+</sup>-залежної дії калікс[4]аренів...

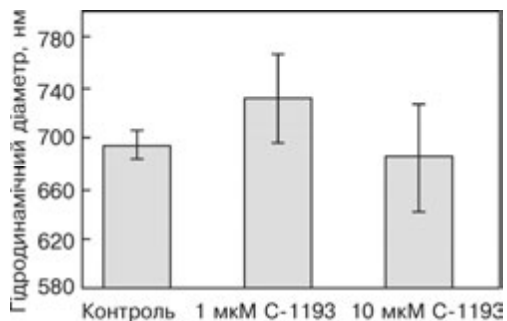


Рис. 7.30. Дія калікс[4]арену С-1193 на об'єм мітохондрій;  $M \pm m$ ,  $n = 4$

Таким чином, досліджені нами калікс[4]арени можуть бути в перспективі використані як регулятори Ca<sup>2+</sup>-гомеостазу в МХ та ефективності функціонування ЕТЛ. Одним із механізмів цих ефектів є дія калікс[4]аренів на активність mtNOS та NO-залежний вплив на функціонування МХ. Важливим для їхнього майбутнього застосування у практиці є те, що вибрані калікс[4]арени не підвищують продукцію АФК у МХ.

Оксид азоту визнано універсальною сигнальною і регуляторною молекулою в клітині. Залежно від концентрації та хімічного мікрооточення NO виявляє функціональну активність, впливаючи на перебіг фізіологічних процесів або бере участь у розвитку різноманітних патологічних станів [1]. За низьких концентрацій оксид азоту взаємодіє з біологічними мішенями, зумовлюючи антиоксидантні ефекти. У високих концентраціях, опосередковано через утворення високореактивних форм азоту (наприклад пероксинітриду) при реакції з молекулярним киснем або АФК, виявляє прооксидантну дію і призводить до розвитку нітрозативного/оксидативного стресу [2]. Оксид азоту виступає ключовим гравцем у багатьох фізіологічних процесах: регулює тонус і проникність кровоносних судин, знижує агрегацію формених елементів крові та їхню адгезію до судинної стінки, бере участь у функціонуванні нервової, ендокринної, імунної систем [3–7]. Наразі доведено значення оксиду азоту в процесах релаксації міометрія та зменшення його чутливості до утероконстрикторних агентів, що має місце за вагітності в умовах підвищеного рівня прогестерону в тканинах матки (прогестеронова блокада) [8–11].

Деякі дослідники розглядають MX як основну мішень дії NO в клітині. MX відіграють ключову роль для нормальної життєдіяльності, забезпечуючи її енергією, є місцем перебігу універсальних метаболічних процесів, джерелом активних форм азоту і кисню як сигнальних молекул, регулятором запуску апоптозу/некрозу та низки інших спеціалізованих функцій. Чільне місце посідає їх значення в підтриманні внутрішньоклітинного  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостазу, адже MX є високоємнісним  $\text{Ca}^{2+}$ -депо, здатні термінувати  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал, а також підтримувати низьку фізіологічно-значущу концентрацію цього катіона в цитозолі, захищаючи клітини від  $\text{Ca}^{2+}$ -перевантаження [12–16]. Водночас біологічна активність MX має  $\text{Ca}^{2+}$ -залежний характер: зростання концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксі активує піруватдегідрогеназний комплекс, ензими циклу трикарбонових кислот та синтез АТР, а перевантаження органел катіоном індукують клітинну загибель [17–20]. Регулятором енергетичних, метаболічних і транспортних процесів у MX виступає оксид азоту [21]. Результати сучасних досліджень підтверджують роль NO як важливої ланки підтримання оптимальної концентрації іонів Са як у міоплазмі, так і в мітохондрійному матриксі [22, 23].

Скоротлива активність гладеньких м'язів контролюється передусім іонами Са, низька фізіологічно значуща концентрація яких у міоплазмі підтримується за рахунок функціонування системи NO [24, 25]. Роль оксиду азоту в репродуктивній жіночій системі як токолітика набуває особливого значення

за нормального перебігу виношування плоду, а також зі збільшенням терміну вагітності: продукція NO та чутливість до нього знижуються наприкінці вагітності, що передує початку пологової активності [9, 10, 26—28].

В основі порушення  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостазу і спричиненої цим клітинної патології може лежати дезорганізація роботи  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем, локалізованих у мембранах МХ [12, 15, 29—31]. Руйнація узгодженого функціонування  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем, які локалізовані у ВММ, може призвести до явища  $\text{Ca}^{2+}$ -перевантаження матриксу, гіперполяризації, порушення  $\text{Ca}^{2+}$ -залежного метаболізму АФА та АФК та їхньої гіперпродукції. Спричинений цими процесами нітрозативний/оксидативний стрес має наслідком, за умови недостатнього функціонування захисних систем, дисфункцію МХ, проявом якої є порушення функціонування ЕТЛ, гіпер/деполяризація (незворотня) внутрішньої мембрани, руйнація осмотичного балансу між матриксом МХ та міоплазмою тощо [21, 32—38]. Перелічені явища супроводжують контрактильну дисфункцію гладенького м'яза за патологічних станів різного генезу. У випадку міометрія вони можуть бути причинами передчасних пологів та зриву вагітності.

Здатність NO розслабляти міометрій зумовлює інтерес до вивчення біохімічних закономірностей його синтезу в ГМК матки та впливу на  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаз клітин міометрія. Наразі показано, що джерелами NO в матці можуть слугувати її ендометріальна тканина, ендотелій судин та нервові закінчення, а також плацента за вагітності [9, 39—44]. Синтез NO, переважно досліджений у матці вагітних жінок та тварин, забезпечується eNOS та iNOS, експресія та регуляція яких знаходяться під впливом прогестерону [11, 45—47]. Припускають, що iNOS відповідає за великі кількості NO, які генеруються в матці та плаценті за вагітності, водночас як eNOS бере участь у вазодилатації в цей період [48—50]. Наразі фактів щодо базального синтезу NO в міоцитах у стані відносного спокою у літературі не наведено. Виходячи з аналізу даних літератури стосовно інших тканин, потужним джерелом NO в міометрії можуть слугувати МХ [21, 22, 51—53]. Оксид азоту у фізіологічних концентраціях (наномольних) розглядають як протекторну молекулу, яка здатна захищати органели від дисфункції, спричиненої гіперполяризацією внутрішньої мембрани, надлишковою продукцією АФК і окисним стресом [22, 23, 37, 54—59].

З огляду на важливість оксиду азоту як сигнальної і регуляторної молекули в контролі скоротливої функції гладеньких м'язів, що зумовлює нормальну роботу внутрішніх органів, зокрема міометрія, нагальним є вирішення трьох фундаментальних наукових питань: 1 — дослідження біохімічних закономірностей синтезу NO в МХ міоцитів; 2 — вивчення молекулярних механізмів дії оксиду азоту як можливого ендогенного специфічного регулятора концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в міоцитах та функціонування  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем МХ, а також біоенергетичних процесів, зокрема роботи ЕТЛ та поляризації їхньої внутрішньої мембрани; 3 — пошук екзогенних нетоксичних модуляторів функціональної активності МХ, які б мали мішенню впливу їхню NO-синтазну здатність, біоенергетику та  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаз.

У ході виконання експериментальної частини роботи нами вперше із застосуванням NO-чутливого флуоресцентного зонда DAF-FM, методів лазерної конфокальної мікроскопії та протокової цитометрії продемонстровано утворення NO в МХ ГМК матки. Значення ключових кінетичних параметрів реакції синтезу NO (уявної константи Міхаеліса за L-аргініном та константи активації за  $\text{Ca}^{2+}$ ) знаходяться в межах фізіологічних значень їх концентрацій у матриксі МХ. Синтез NO в МХ є чутливим до інгібіторів конститутивних NO-синтаз ( $\text{N}^{\text{G}}$ -нітро-L-аргініну та 2-амінопіридину) та  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортера, пригнічується антагоністами кальмодуліну (кальмідазоліумом і трифлуоперазином), а також іонами Mg. Біосинтез оксиду азоту в МХ суттєво залежить від рівня енергізації і величини електрохімічного градієнта іонів водню на ВММ. Одержані нами результати переконливо свідчать про те, що синтез NO забезпечується  $\text{Ca}^{2+}$ -залежною конститутивною NOS, не виключено що сплайс-варіантом nNOS, та залежить від ефективності надходження іонів Ca та функціональної активності комплексів ЕТЛ.

З використанням панелі інгібіторів (сполука КН7, поліпептид клітинного походження РКІ) та активаторів (форсколін,  $\text{NaHCO}_3$ , АТР) аденілатциклази та протеїнкінази А [60–63] було доведено залучення аденілатциклазного сигнального каскаду в регуляцію синтезу NO в МХ міометрія та можливість активаторного фосфорилування мітохондрійної NOS з боку протеїнкінази А. Припускають, що сАМР/РКА сигнальний шлях у МХ є своєрідним метаболічним сенсором, який визначає рівень окисного фосфорилування і продукцію АФК [64–66]. У цьому сенсі сАМР-залежна модуляція синтезу NO МХ може виступати важливим регулятором біоенергетики і метаболічних процесів у цих субклітинних структурах.

Продемонстрований зв'язок між  $\text{K}^+$ -проникністю та NO-синтазною здатністю МХ: синтез оксиду азоту зменшувався в разі зменшення концентрації іонів  $\text{K}^+$  або присутності інгібіторів  $\text{K}^+$ -каналів у середовищі інкубації. Можливим механізмом дії іонів калію на біосинтез NO МХ може бути вплив на  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаз матриксу та свідчити на користь функціонального взаємозв'язку  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -,  $\text{H}^+$ - $\text{K}^+$ -обміну та  $\text{Ca}^{2+}$ -залежного біосинтезу NO. Зміни в біосинтезі оксиду азоту, в свою чергу, будуть впливати як на активність  $\text{K}^+$ -каналів (що надійно показано у випадку ПМ), так і на осморегуляцію. Регулювання об'єму матриксу має важливе значення для функціонування МХ, що впливає на інтенсивність дихання, продукування АТР, генерацію АФК, поляризацію ВММ, здатність до апоптозу тощо [67, 68]. За цим механізмом може реалізовуватись протекторна щодо МХ функція оксиду азоту [69].

З використанням детергентної техніки та специфічного інгібітора SERCA помпи тапсигаргіну показано, що джерелами оксиду азоту, які забезпечують його синтез у клітинах гладенького м'яза матки, можуть виступати також NOS, асоційовані з ПМ та, можливо, СР.

Можливість біосинтезу NO в МХ ГМК матки та наявність значної кількості його молекулярних мішеней у ВММ та матриксі (високий вміст тільних залишків, залізо-сірчаних центрів та гемових груп) вказують на те, що оксид азоту є регулятором функціональної активності цих органел [21, 37,

51, 56, 70]. Особливо важливим може бути вплив нітросполук на системи ВММ, що контролюють  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаз МХ, оскільки від концентрації Са в матриксі залежить активність комплексів ЕТЛ, ефективність біоенергетичних процесів та рівень електричного потенціалу на мітохондрійній мембрані [12, 29—31].

Електричний потенціал на ВММ є інтегральним показником активності ЕТЛ та важливим регулятором транспортних і метаболічних процесів в МХ. З використанням лазерної конфокальної мікроскопії та протокової цитометрії нами продемонстровано, що руйнування електрохімічного градієнта протонів на ВММ супроводжується зростанням концентрації іонів Са в міоплазмі клітин гладенького м'язу матки, що доводить суттєву роль цих субклітинних структур у підтриманні  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостазу міоцитів. Були підстави очікувати, що нітросполуки будуть впливати на компоненти ЕТЛ, електричний потенціал органел та регулювати активність  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортних структур МХ.

Як нітросполуки ми використали нітропрурид та нітрит натрія (SNP та SN) — донор та попередник NO відповідно. SNP утворює в розчинах катіон нітрозонію, який виявляє властивості потужного нітрозилуючого агента. SN продукує NO (переважно в кислому середовищі) та його редокс-похідні за присутності гемових груп та залізо-сірчаних комплексів, на які багаті МХ [71, 72].

Встановлено, що чутлива до рутенієвого червоного енергозалежна акумуляція  $\text{Ca}^{2+}$  в МХ стимулюється SNP та SN; цей ефект опосередкований активацією  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортера та не залежить від функціонування циклоспоринчутливої РТР. Він може мати значення для швидкого зниження концентрації катіона в цитоплазмі після  $\text{Ca}^{2+}$  транзієнта. В даному випадку, ймовірно, мішенню дії нітросполук виступають функціонально важливі тіольні групи  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортера, нітрозилування яких супроводжується стимулюванням енергозалежного транспорту  $\text{Ca}^{2+}$ , водночас рушійна сила електрофоретичної акумуляції лишається цілком достатньою для ефективного накопичення катіона. Крім того, система вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з МХ міометрія, яка здійснюється за участю  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника і являє собою, як нами з'ясовано, протеїн LETM1, є резистентною до впливу оксиду азоту. Відсутність ефекту NO на  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник дає змогу протікати  $\Delta\text{pH}$ -залежному процесу вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з матриксу МХ із подальшою його акумуляцією СР, що уможливлює припустити наявність мембранних механізмів, які захищають МХ від небезпечного зростання рівня  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксі.

Іони Са у функціонально значущих концентраціях регулюють біоенергетичні процеси в МХ та впливають на продукцію NO мітохондрійною NOS. Поряд з цим існує феномен  $\text{Ca}^{2+}$ -перевантаження МХ, асоційований з такими негативними процесами як нітрозативний/оксидативний стрес, різке падіння електричного потенціалу на ВММ, відкриття РТР, біоенергетичний колапс тощо. Всі ці події мають наслідком розвиток апоптозу або некрозу [73]. Одним із важливих процесів, пов'язаних з мітохондрійною дисфункцією, є порушення осмобалансу між матриксом та позамітохондрійним се-

редовищем, набухання МХ, розпрявлення крист, розрив ЗММ, що супроводжується посиленням вивільненням факторів апоптозу в цитозоль. Припускають, що помірні концентрації NO здатні запобігати цим процесам, зокрема, знижуючи проникність РТР [56, 74, 75]. Результати наших досліджень показали, що NO може чинити протекторну дію на МХ шляхом помірною зниження електричного потенціалу на їхній внутрішній мембрані через пригнічення роботи ЕТЛ, яке відображається у гальмуванні окислення  $FADH_2$ . Крім того, оксид азоту протидіє процесам набухання МХ, спричиненим висококальцієвим розчином.

Отже, нами зареєстроване посилення акумуляції  $Ca^{2+}$  в МХ на фоні помірною зниження трансмембранного потенціалу під впливом NO. Зміни потенціалу на ВММ можуть мати значення для потенціалзалежних процесів транспорту іонів через мембрану, зокрема й змінюючи активність  $Ca^{2+}$ -уніпортера. Помірний деполаризуючий ефект NO може бути наслідком початкового посилення транспорту  $Ca^{2+}$  (позитивно заряджених іонів) крізь ВММ, що надалі спричинює стимулювання активності комплексів ЕТЛ і відновлення рівня поляризації мембрани. Поряд з цим, зростання концентрації іонів Ca в МХ супроводжується стимуляцією  $Ca^{2+}$ -залежного синтезу ними NO. Отже, транспорт  $Ca^{2+}$  в МХ, зміни мембранного потенціалу їхньої внутрішньої мембрани та біосинтез NO є взаємокерованими процесами. Зниження електричного потенціалу на ВММ за дії NO може захищати МХ від гіперполяризації, надлишкового транспорту  $Ca^{2+}$  в матрикс та гіперпродукції АФК.

Концентрація  $Ca^{2+}$  в матриксі та функціонування  $Ca^{2+}$ -транспортувальних систем, ефективність окислення аденозину нуклеотидів ( $NADH/FADH_2$ ), інтенсивність генерації АФК та об'єм органел є фундаментальними показниками функціонування МХ. Перелічені біофізикохімічні параметри впливають або залежать від потенціалу ВММ, а ефектори, що його змінюють, зокрема нітросполуки, будуть модулювати функціональну активність органел. Із застосуванням методології солокалізації флуоресцентних зондів, а саме потенціалчутливого  $DiOC_6(3)$  та специфічного щодо енергізованих МХ MitoTracker Orange CMTRos, а також методу лазерної конфокальної мікроскопії продемонстровано, що плазмалема і МХ у наших експериментальних умовах володіють стабільним у часі електричним потенціалом. Оксид азоту, що синтезується в міоцитах, або позаклітинного походження (ендометрій, ендотелій судин, донори та попередники NO) може впливати на електричний потенціал ПМ та відповідні катіонтранспортувальні системи в ній. Центральним етапом Е(Ф)МС 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 [24, 25, 76–80]. Релаксуючий ефект NO в ГМК пов'язують із зростанням вмісту cGMP у міоплазмі [1], альтернативним напрямком дії NO в гладеньких м'язах, зокрема в міометрії, може бути безпосередній вплив (шляхом S-нітрозилування) на катіонтранспортувальні системи плазмалеми, який здійснюється нітрозилуючими похідними оксиду азоту [5, 81–85].

Наші дослідження показали, що в ГМК матки поляризує ефект оксиду азоту на рівні ПМ зумовлений зростанням  $K^+$ -проникності плазмалеми і залежить від іонів Са. Це дає змогу припустити, що він пов'язаний саме із активацією  $Ca^{2+}$ -залежних  $K^+$ -каналів, можливо опосередкованою нітросилуванням тіольних залишків протеїнів, що утворюють канал, або РКГ-залежними шляхами [86—90]. Локальне субплазмалемне зростання концентрації  $Ca^{2+}$  може відбутися, як свідчать результати наших експериментів, внаслідок тимчасового пригнічення оксидом азоту РМСА. Збільшення  $K^+$ -проникності ПМ за умови відносного функціонального спокою міоцитів здатне виступати важливим  $Ca^{2+}$ , NO-залежним фактором підтримання незбудливості міомерія в період вагітності. Зростання електричного потенціалу на ПМ за дії нітросполук можна пояснити також зареєстрованим нами сGMP-залежним стимулюванням активності  $Na^+, K^+$ -АТРази. Вірогідним наслідком активації різних підтипів  $K^+$ -каналів оксидом азоту є гіперполяризація плазмалеми, що має наслідком зміщення мембранного потенціалу від його порогових значень, необхідних для активації потенціалкерованих іонтранспортувальних систем [88, 91] та зменшення концентрації  $Ca^{2+}$  в міоплазмі.

Результати наших досліджень підтверджують факт впливу оксиду азоту на  $Ca^{2+}$ -гомеостаз міоцитів, а саме пригнічення ним шляхів зростання іонів Са в міоплазмі у разі дії фізіологічно значущих агоністів — карбахолу та окситоцину. Поряд з цим донори оксиду азоту SNP та SN викликали збільшення характеристичних розмірів міоцитів, що корелює з даними літератури про здатність NO викликати релаксацію ГМК.

Результати наведених вище досліджень щодо механізмів синтезу NO в МХ, його регуляторної ролі в біохімічних процесах трансмембранного обміну  $Ca^{2+}$ , поляризації субклітинних структур, редокс-стану аденінових нуклеотидів,  $Ca^{2+}$ -гомеостазу міоцитів матки показано на схемі 1 (див. вклейку).

Важливість нормального перебігу біохімічних процесів у МХ для функціонування клітини, а також безпосередній зв'язок між мітохондрійною дисфункцією та розвитком патології гладенького м'яза зумовлюють пошук екзогенних нетоксичних сполук, які б могли ефективно і вибірково регулювати транспорт  $Ca^{2+}$  у ВММ та впливати на  $Ca^{2+}$ -залежні процеси, зокрема синтез АФА, АФК та мітохондрійну біоенергетику. Для вирішення цієї задачі ми звернули увагу на макроциклічні сполуки калікс[4]арени, які є малотоксичними, володіють широким спектром біологічної активності і, що особливо важливо, виявились перспективними для використання їх як модуляторів  $Ca^{2+}$ -залежних процесів [92—96].

Здатність окремих калікс[4]аренів впливати на активність  $Ca^{2+}$ -помп ПМ та СР у гладеньких м'язах привертає увагу до цих сполук як можливих ефекторів  $Ca^{2+}$ -гомеостазу міоцитів [97, 98]. Зазначені транспортні АТРази підтримують низьку концентрацію іонів Са в міоплазмі, а також забезпечують зниження концентрації катіона після  $Ca^{2+}$  транзєнта, забезпечуючи релаксацію гладеньком'язової клітини. У праці [98] продемонстровано, що додавання до міоцитів калікс[4]арену С-956 призводить до зростання вмісту іонізованого  $Ca^{2+}$  в цитоплазмі, скоріше за все, внаслідок інгібування  $Ca^{2+}$ -помпи ПМ (та



не виключено, що й СР). Досліджувана сполука зменшувала об'єм міоцитів, аналогічно до дії утеротоніка окситоцину. Ці результати дають змогу припустити залучення в ефекти калікс[4]аренів на  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаз також інших  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем, зокрема локалізованих у МХ.

Наші дослідження продемонстрували можливість проникнення калікс[4]арену С-956 у міоплазму клітин та його взаємодію з МХ. Калікс[4]арен С-956 ефективно інгібує  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник у МХ, майже не впливаючи на енергозалежну акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$ . Сполука С-956 стимулює мітохондрійну NO-синтазу, можливо внаслідок зростання концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксі МХ, і гальмує окислення NADH та  $\text{FADH}_2$  в ЕТЛ, що має результатом зниження поляризації мітохондрійної мембрани. Поряд з цим, С-956 не спричинює утворення АФК у цих субклітинних структурах. Отже, досліджуваний калікс[4]арен шляхом впливу на біосинтез NO може мати корегувальний ефект у МХ, знижуючи інтенсивність окисного фосфорилування і захищаючи клітини від енергетичного перевантаження.

Наразі актуальним є пошук сполук, які могли б спрямовано впливати на поляризацію ПМ та ВММ, оскільки електричний потенціал є регулятором функціонування локалізованих у них катіонтранспортувальних систем, зумовлюючи зміни концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазмі, необхідні для регуляції скоротливої здатності ГМК. Показаний інгібувальний вплив калікс[4]аренів С-97, С-99, С-107 на  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРазну активність в міометрії, аналогічно до дії убаїну [99]. Отже, зазначені сполуки здатні змінювати електричний потенціал ПМ. Нами показано, що калікс[4]арени С-97, С-99 та С-107 викликають деполаризацію ПМ міоцитів матки. Проникаючи в міоплазму та взаємодіючи з МХ, сполуки С-97, С-99 та С-107 викликають інгібування  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортера ВММ і одночасну стимуляцію її  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника (С-97, С-99), що призводить до відповідного зменшення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксі та помірного пригнічення активності mtNOS. Поряд з цим має місце транзйентна гіперполяризація мітохондрійної мембрани, яка пов'язана з початковим посиленням окислення NADH та, можливо, стимулюванням електрогенного  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника. Водночас не спостерігається посилення генерації АФК за дії досліджуваних сполук. Зареєстроване за цих умов уповільнення інтенсивності функціонування ЕТЛ через зменшення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксі може мати наслідком відновлення рівня поляризації МХ.

Сірковмісний калікс[4]арен С-1193 знижує енергозалежну акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  в МХ, ефективно пригнічує синтез ними NO та має виражений гальмівний вплив на функціонування ЕТЛ МХ міометрія. Досліджуваний калікс[4]арен зменшує утворення активних форм кисню в МХ і не впливає на об'єм органел. Наведені дані вказують на те, що модуляція сполукою С-1193 досліджуваних процесів у МХ не призводить до розвитку їх дисфункції. Ці результати є основою можливого застосування вибраного калікс[4]арену як інструмента в дослідженнях біохімічних процесів, які асоційовані з МХ, та спрямованої регуляції функціонування гладенького м'яза.

Відсутність впливу всіх досліджуваних калікс[4]аренів на утворення АФК у МХ або навіть зниження їхньої генерації може вказувати на користь того,

що процеси, які активуються/гальмуються за присутності цих сполук, не призводять до шкідливих для МХ наслідків, тобто розвитку мітохондрійної дисфункції, зумовленої оксидативним стресом. Водночас шляхом посилення/пригнічення біосинтезу NO вони можуть мати модулюючий вплив на функціонування ЕТЛ і біоенергетику МХ. Описані вище шляхи та механізми впливу калікс[4]аренів на концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  в МХ, синтез NO та функціонування ЕТЛ викладено на схемі 2 (див. вклейку).

Наведені результати досліджень впливу вибраних калікс[4]аренів на транспорт  $\text{Ca}^{2+}$ , синтез оксиду азоту, функціональну активність ЕТЛ та електричний потенціал ВММ можуть слугувати теоретичною основою подальших медико-біологічних досліджень з метою спрямованого пошуку серед них сполук, які б мали змогу селективно, достатньо афінно та оборотно впливати на біоенергетику та  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостазу в МХ. Це, в перспективі, сприятиме появі в фармацевтиці нових ефекторів контрактильної активності гладеньких м'язів, зокрема матки.

Монографія присвячена аналізу результатів власних досліджень біохімічних закономірностей синтезу NO у мітохондріях гладеньком'язових клітин матки, вивченню молекулярних механізмів дії оксиду азоту як можливого ендogenousного специфічного регулятора концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у міоцитах, функціонування  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем мітохондрій та біоенергетичних процесів у них. Проаналізовано експериментальні дані щодо впливу калікс[4]аренів — екзогенних нетоксичних модуляторів функціональної активності мітохондрій — на NO-синтазу здатність, біоенергетику та  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаз органел.

Із застосуванням NO-чутливого флуоресцентного зонда DAF-FM, методів лазерної конфокальної мікроскопії та протокової цитометрії авторами вперше продемонстровано утворення NO в гладеньком'язових клітинах матки. Доведено, що потужним джерелом NO у міоциті є мітохондрії. Синтез NO у мітохондріях є чутливим до інгібіторів конститутивних NO-синтаз та  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортера, пригнічується антагоністами кальмодуліну, стимулюється за активації компонентів аденілатциклазного сигнального шляху і суттєво залежить від рівня енергізації внутрішньої мітохондрійної мембрани та її  $\text{K}^{+}$ -проникності. Джерелами оксиду азоту в міоцитах можуть виступати NO-синтази, асоційовані з плазматичною мембраною та, можливо, саркоплазматичним ретикулулом.

У мітохондріях гладенького м'яза матки NO стимулює акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  шляхом активації саме  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортера. Система вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з мітохондрій —  $\text{H}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник, який репрезентований протеїном LETM1, є резистентною до впливу оксиду азоту. NO викликає помірне зниження електричного потенціалу на внутрішній мембрані органел, зумовлене пригніченням роботи комплексів дихального ланцюга, і протидіє процесам набухання мітохондрій.

Продемонстровано, що оксид азоту пригнічує шляхи підвищення концентрації іонів Ca в міоплазмі у разі дії на міоцити карбахолу та окситоцину, а також викликає збільшення характеристичних розмірів міоцитів. Зареєстровано зростання електричного потенціалу плазмалеми за дії оксиду азоту, яке зумовлене збільшенням її  $\text{K}^{+}$ -проникності і залежить від іонів Ca, а також сGMP-опосередкованим стимулюванням активності  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{K}^{+}$ -АТРази. Запропоновано схему біохімічних механізмів регуляторної дії NO на рівні мітохондрій та плазматичної мембрани у міоцитах матки.

Результати дослідження впливу калікс[4]аренів на транспорт  $\text{Ca}^{2+}$ , синтез оксиду азоту, функціональну активність електронтранспортувального ланцюга та електричний потенціал внутрішньої мітохондрійної мембрани можуть

## Підсумки

---

служувати основою скринінгу зазначених сполук з метою пошуку селективних, достатньо афінних та оборотних модифікаторів біоенергетики та  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостазу в мітохондріях.

Отже, в монографії наведено результати комплексних досліджень біохімічних механізмів синтезу та функціональної активності оксиду азоту в мітохондріях гладенького м'яза матки. Проаналізовані дані щодо впливу NO на концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  в міоцитах і вивчення можливих мембранних та іонних механізмів, які лежать в його основі. Сформульовані нові відповіді на фундаментальні питання щодо ролі оксиду азоту і мітохондрій у регуляції функціональної активності гладенького м'яза. Наведено докази того, що вибрані калікс[4]арени можуть бути використані в біохімічних дослідженнях та медичній практиці як регулятори функціональної активності матки.

## SUMMARY

---

The monograph focuses on the analysis of original research findings concerning the biochemical pathways of nitric oxide (NO) synthesis within the mitochondria of uterine smooth muscle cells. It investigates the molecular mechanisms by which NO may act as an endogenous regulator of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations in myocytes. The study encompasses the dynamics of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  transport systems and their associated bioenergetic processes. Additionally, experimental data were examined regarding the influence of calix[4]arenes, which are exogenous non-toxic modulators of mitochondrial functionality, on NO synthase activity, mitochondrial bioenergetics, and  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis within the organelles.

Using the NO-sensitive fluorescent probe DAF-FM, along with laser confocal microscopy and flow cytometry techniques, the authors have demonstrated for the first time the formation of NO in uterine smooth muscle cells. It has been proven that mitochondria are a potent source of NO in the myometrium. NO synthesis in mitochondria is sensitive to inhibitors of constitutive NO synthases and the  $\text{Ca}^{2+}$ -uniporter, is inhibited by calmodulin antagonists, is stimulated by activation of components of the adenylyl cyclase signaling pathway, and significantly depends on the energization level of the inner mitochondrial membrane and its  $\text{K}^+$  permeability. In myocytes, sources of nitric oxide may include NO synthases associated with the plasma membrane and possibly the sarcoplasmic reticulum.

NO stimulates  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation by activating the  $\text{Ca}^{2+}$ -uniporter in uterine smooth muscle mitochondria. The  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  — exchanger is the system of  $\text{Ca}^{2+}$  efflux from mitochondria which is represented by the LETM1 protein. It is resistant to the effects of nitric oxide. NO causes a moderate decrease in the electrical potential on the inner membrane of organelles due to the inhibition of respiratory chain complexes and counteracts the processes of mitochondrial swelling.

It has been demonstrated that nitric oxide inhibits the pathways of increasing the concentration of Ca ions in the myoplasm when myocytes are exposed to carbachol and oxytocin, and also causes an increase in the characteristic size of myocytes. An increase in the electrical potential of the plasmalemma under the action of nitric oxide was recorded, which is due to an increase in its  $\text{K}^+$  permeability and depends

## Summary

---

on Ca ions, as well as cGMP-mediated stimulation of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity. We propose a scheme of biochemical mechanisms of NO regulatory action on mitochondria and plasma membrane in uterine myocytes.

The research findings on the impact of calix[4]arenes on Ca<sup>2+</sup> transport, nitric oxide synthesis, functional activity of the electron transport chain, and the electrical potential of the inner mitochondrial membrane can serve as a basis for screening these compounds to find selective, affinity, and reversible modifiers of ion transport in mitochondria.

Thus, the monograph presents the results of comprehensive studies of the biochemical mechanisms of nitric oxide synthesis and functional activity in uterine smooth muscle mitochondria. We analyzed the data on the effect of NO on myocyte Ca<sup>2+</sup> concentration and studied the possible membrane and ionic mechanisms underlying it. We formulated new answers to fundamental questions about the role of nitric oxide and mitochondria in the regulation of functional activity of smooth muscle. It was proved that the selected calix[4]arenes can be used in biochemical research and medical practice as regulators of uterine functional activity.

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

---

ГМК	— гладеньком'язові клітини	РТР	— пора перехідної провідності
ПМ	— плазматична мембрана	Е(Ф)МС	— електро(фармако)механічне спряження
ЕР/СР	— ендоплазматичний/сарко- плазматичний ретикулум	MLCK	— кіназа легких ланцюгів міозину
MX	— мітохондрії	MLCP	— фосфатаза легких ланцюгів міозину
ЗММ	— зовнішня мітохондрійна мембрана	LETMI	— протеїн, що репрезентує H <sup>+</sup> -Ca <sup>2+</sup> -обмінник у мітохонд- ріях (leucine zipper, EF-hand containing transmembrane protein 1)
ВММ	— внутрішня мітохондрійна мембрана	PK B (Akt)	— протеїнкіназа B
ЕТЛ	— електронтранспортувальний ланцюг	PK A	— протеїнкіназа A (сАМР-залежна)
NOS	— NO-синтаза	PK G	— протеїнкіназа G (сGMP-залежна)
mtNOS	— мітохондрійна NO-синтаза	PK C	— протеїнкіназа C
PMCA	— Ca <sup>2+</sup> -помпа плазматичної мембрани, Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> -АТРаза	АМРК-5'	— АМР-протеїнкіназа
SERCA	— Ca <sup>2+</sup> -помпа сарко(ендо)плаз- матичного ретикулума	МАРК	— мітогенактивована протеїн- кіназа
NCX	— Na <sup>+</sup> -Ca <sup>2+</sup> -обмінник плазма- тичної мембрани	РІЗ-кіназа	— фосфатидилінозитол-3-кі- наза
VDAC	— потенціалзалежний аніонний канал	CaMK II	— CaM-залежна протеїн- кіназа II
VOCC	— потенціалкеровані Ca <sup>2+</sup> -кана- ли	CaM	— кальмодулін
ROCC	— рецепторкеровані Ca <sup>2+</sup> -кана- ли	Ca <sup>2+</sup> -	— комплекс Ca <sup>2+</sup> з кальмодулі- ном
SMOCC	— Ca <sup>2+</sup> -канали, керовані вто- ринними месенджерами	CaM	— активні форми кисню
SOCC	— пулкерований канал входу Ca <sup>2+</sup> в цитоплазму	АФК	— активні форми азоту
SOCE	— пулкерований вхід Ca <sup>2+</sup> в ци- топлазму	АФА	— оксид азоту
RyR	— канал ріанодинового рецеп- тора саркоплазматичного ретикулума	NO	— нітрит-аніон
ІР <sub>3</sub> R	— ІР <sub>3</sub> -чутливі рецептори сарко- плазматичного ретикулума	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	— нітрит-аніон
СІСР	— Ca <sup>2+</sup> -індуковане вивільнення Ca <sup>2+</sup> через RyR	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	— нітрат-аніон
STOCs	— спонтанні транзйентні вихідні токи	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	— супероксид аніон (радикал)
BK <sub>Ca</sub>	— Ca <sup>2+</sup> -активовані K <sup>+</sup> -канали високої провідності	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	— пероксид водню
SK <sub>Ca</sub>	— Ca <sup>2+</sup> -активовані K <sup>+</sup> -канали низької провідності	ONOO <sup>-</sup>	— пероксинітрит
K <sub>v</sub>	— потенціалзалежні K <sup>+</sup> -канали	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	— внутрішньоклітинна (цито- зольна) концентрація Ca <sup>2+</sup>
K <sub>АТР</sub>	— АТР-залежні K <sup>+</sup> -канали	сАМР	— циклічний аденозин-3',5'- монофосфат
		сGMP	— циклічний гуанозин-3',5'- монофосфат, p8-Vg-cGMP — його мембранопроникний аналог

## Перелік умовних скорочень

---

IP <sub>3</sub>	— інозитол-1,4,5,-трисфосфат	SNAP	— S-нітрозо-N-ацетил-DL1-пеніциламін, донор NO
DAG	— діацилгліцерол	L-NAME	— N <sup>G</sup> -нітро-L-аргінін метиловий ефір
NADH (NADPH)	— нікотинаміддинуклеотид (фосфат)	L-NMME	— N <sup>G</sup> -монометил-L-аргінін
FADH <sub>2</sub>	— флавінаденіндинуклеотид	NA	— N <sup>G</sup> -нітро-L-аргінін
FMN	— флавінаденінмононуклеотид	Csp	— циклоспорин А
BH <sub>4</sub>	— 6(^)-5,6,7,8-тетрагідробіоптерін	CCCP	— карбонілціанід m-хлорофенілгідрозон
RuR	— рутенієвий червоний	2-AP	— 2-амінопіридин
SNP	— нітропрусид натрію, донор NO	4-AP	— 4-амінопіридин
SN	— нітрит натрію, попередник NO	TEA	— тетраетиламоній



## До вступу

1. Treuer A.V., Gonzalez D.R. Nitric oxide synthases, S-nitrosylation and cardiovascular health: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities (Review). *Molecular Medicine Reports*. 2015. Vol. 11. P. 1555—1565.
2. Ghimire K., Altmann H.M., Straub A.C., Isenberg J.S. Nitric oxide: what's new to NO? *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 2017. Vol. 312. P. C254—C262.
3. Bryan N.S., Bian K., Murad F. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development. *Frontiers in Bioscience*. 2009. Vol. 14. P. 1—18.
4. Philippu A. Nitric Oxide: A Universal Modulator of Brain Function. *Current Medical Chemistry*. 2016. Vol. 23, N 24. P. 2643—2652.
5. Pitocco D., Zaccardi F., Di Stasio E., Romitelli F., Santini S.A., Zuppi C., Ghirlanda G. Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. *The Review of Diabetic Studies*. 2010. Vol. 7, N 1. P. 15—25.
6. Sladek M.S., Magness R.R., Conrad K.P. Nitric oxide and pregnancy. *American Journal of Physiology*. 1997. Vol. 272, N 2. P. R441-R463.
7. Buxton I.L.O. Regulation of uterine function: a biochemical conundrum in the regulation of smooth muscle relaxation. *Molecular Pharmacology*. 2004. Vol. 65, N 6. P. 1051—1059.
8. Buxton I.L.O. The regulation of uterine relaxation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2007. Vol. 18, N 3. P. 340—347.
9. Tiboni G.M., Giampietro F., Lamonaca D. The soluble guanylate cyclase inhibitor methylene blue evokes preterm delivery and fetal growth restriction in a mouse model. *In Vivo*. 2001. Vol. 15. P. 333—337.
10. Bao S., Rai J., Schreiber J. Expression of nitric oxide synthase isoforms in human pregnant myometrium at term. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 2002. Vol. 9, N 6. P. 351—356.
11. Buxton I.L., Kaiser R.A., Malmquist N.A., Tichenor S. NO-induced relaxation of labouring and non-labouring human myometrium is not mediated by cyclic GMP. *British Journal of Pharmacology*. 2001. Vol. 134. P. 206—214.
12. Farina M., Ribeiro M.L., Franchi A. Nitric oxide synthases in pregnant rat uterus. *Reproduction*. 2001. Vol. 121, N 3. P. 403—407.
13. Okawa T., Vedernikov Y.P., Saade G.R., Garfield R.E. Effect of nitric oxide on contractions of uterine and cervical tissues from pregnant rats. *Gynecological Endocrinology*. 2004. Vol. 18, N 4. P. 186—193.
14. Wray S., Jones K., Kupittayanant S., Li Y., Matthew A., Monir-Bishty E., Noble K., Pierce S.J., Quenby S., Shmygol A.V. Calcium signaling and uterine contractility. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 2003. Vol. 10, N 5. P. 252—64.
15. Wray S. Calcium Signaling in Smooth Muscle. *Handbook of Cell Signaling*. 2010. P. 1009—1025. doi:10.1016/b978-0-12-374145-5.00127-3.
16. Wray S., Prendergast C. The Myometrium: From Excitation to Contractions and Labour. Springer Nature Singapore Pte Ltd. H. Hashitani, R. J. Lang (eds.). *Smooth Muscle Spontaneous Activity. Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2019. 1124 p.
17. Nadeem L., Shynlova O., Mesiano S., Lye S. Progesterone Via its Type-A Receptor Promotes Myometrial Gap Junction Coupling. *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7, N 1. P. 13357.
18. Karasinski J., Galas J., Semik D., Fiertak A., Bilinska B., Kilarski W.M. Changes of connexin 43 expression in non-pregnant porcine myometrium correlate with progesterone concentration during oestrous cycle. *Reproduction in Domestic Animals*. 2010. Vol. 45, N 6. P. 959—966.

19. Данилович Ю.В., Тугай В.А. Утворення NO та H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> у стромальних клітинах ендометрія за дії ацетилхоліну. *Український біохімічний журнал*. 2001. Т. 73, № 2. С. 110—115.
20. Данилович Ю.В. Вплив стероїдних гормонів і окситоцину на утворення NO і H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в ендометрії. *Український біохімічний журнал*. 2004. Т. 76, № 1. С. 88—96.
21. Cameron I.T., Campbell S. Nitric oxide in the endometrium. *Human Reproduction Update*. 1998. Vol. 4, N 5. P. 565—569.
22. Khorram O., Gartwaite M., Magness R.R. Endometrial and myometrial expression of nitric oxide synthase isoforms in pre- and postmenopausal women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1999. Vol. 84, N 6. P. 2226—2232.
23. Valdes G., Corthorn J. Review: the angiogenic and vasodilatory uteroplacental network. *Placenta*. 2011. Vol. 32, Suppl. 2. P. S170—175.
24. Yellon S.M., Mackler A.M., Kirby M.A. The role of leukocyte traffic and activation in parturition. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 2003. Vol. 10, N 6. P. 323—338.
25. Zhang J., Massmann G.A., Mirabile C.P., Figueroa J.P. Nonpregnant sheep uterine type 1 and type 2 nitric oxide synthase expression is differentially regulated by estrogen. *Biology of Reproduction*. 1999. Vol. 60, N 5. P. 1198—1203.
26. Toda N., Toda H., Okamura T. Regulation of myometrial circulation and uterine vascular tone by constitutive nitric oxide. *European Journal of Pharmacology*. 2013. Vol. 714, N 1—3. P. 414—423.
27. Tota B., Quintieri A.M., Angelone T. The emerging role of nitrite as an endogenous modulator and therapeutic agent of cardiovascular function. *Current Medical Chemistry*. 2010. Vol. 17, N 18. P. 1915—1925.
28. Ghafourifar P., Cadenas E. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2005. Vol. 26, N 4. P. 190—195.
29. Giulivi C., Kato K., Cooper C.E. Nitric oxide regulation of mitochondrial oxygen consumption I: cellular physiology. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 2006. Vol. 291, N 6. P. C1225—C1231.
30. Zaobornyj T., Ghafourifar P. Strategic localization of heart mitochondrial NOS: a review of the evidence. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. 2012. Vol. 303, N 11. P. H1283—H1293.
31. Elfering S.L., Sarkela Th.M., Giulivi C. Biochemistry of Mitochondrial Nitric-oxide Synthase. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002. Vol. 277, N 41. P. 38079—38086.
32. Valdez L.B., Zaobornyj T., Boveris A. Mitochondrial metabolic states and membrane potential modulate mtNOS activity. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006. Vol. 1757, N 3. P. 166—172.
33. Wang C.H., Wei Y.H. Role of mitochondrial dysfunction and dysregulation of Ca<sup>2+</sup> homeostasis in the pathophysiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Journal of Biomedical Science*. 2017. Vol. 24. P. 70
34. Alston C.L., Rocha M.C., Lax N.Z., Turnbull D.M., Taylor R.W. The genetics and pathology of mitochondrial disease. *The Journal of Pathology*. 2017. Vol. 241. P. 236—250.
35. Bravo-Sagua R., Parra V., López-Crisosto C., Díaz P., Quest A.F.G., Lavandero S. Calcium Transport and Signaling in Mitochondria. *Comprehensive Physiology*. 2017. Vol. 7. P. 623—634.
36. Anderson A.J., Jackson T.D., Stroud D.A., Stojanovski D. Mitochondria-hubs for regulating cellular biochemistry: emerging concepts and networks. *Open Biology*. 2019. Vol. 9. P. 190126.
37. Yeh C.H., Chou Y.J., Kao C.H., Tsai T.F. Mitochondria and Calcium Homeostasis: Cisd2 as a Big Player in Cardiac Ageing. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. Vol. 21. P. 9238.
38. Kuznetsov A.V., Javadov S., Hagenbuchner J., Ausserlechner M.J. Mitochondrial Involvement in the Molecular Mechanisms of Ischemia-Reperfusion Injury in the Heart. *Recent Research Advances in Biology*. 2021. Vol. 8, N 6. P. 64—85.
39. Takeuchi A., Kim B., Matsuoka S. The destiny of Ca(2+) released by mitochondria. *The Journal of Physiological Sciences*. 2015. Vol. 65, N 1. P. 11—24.
40. Gellerich F.N., Gizatullina Z., Trumbeckaite S., Nguyen H.P., Pallas T., Arandarcikaitė O., Vielhaber S., Seppet E., Striggow F. The regulation of OXPHOS by extramitochondrial calcium. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010. Vol. 1797, N 6-7. P. 1018—1027.

41. Gellerich F.N., Gizatullina Z., Gainutdinov T., Muth K., Seppet E., Vielhaber S. The of brain mitochondrial energization by cytosolic calcium: the mitochondrial gas pedal. *IUBMB Life*. 2013. Vol. 65, N 3. P. 180–190.
42. Cao J.L., Adaniya S.M., Cypress M.W., Suzuki Y., Kusakari Y., Jhun B.S., O-Uchi J. Role of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in cardiac muscles. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2019. Vol. 663. P. 276–287.
43. Naumova N., Šachl R. Regulation of Cell Death by Mitochondrial Transport Systems of Calcium and Bcl-2 Proteins. *Membranes*. 2020. Vol. 10. P. 299.
44. Bock F.J., Tait S.W.G. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2020. Vol. 21, N 2. P. 85–100.
45. Kosterin S.A., Burdyga Th.V., Fomin V.P., Grover A.K. Mechanism of  $\text{Ca}^{2+}$ -transport in myometrium. Control of Uterine Contractility. Eds. R.E. Garfield, T.N. Tabb. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, 1994. P. 129–153.
46. McCarron J.G., Olson M.L., Wilson C., Sandison M.E., Chalmers S. Examining the role of mitochondria in  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in native vascular smooth muscle. *Microcirculation*. 2013. Vol. 20. P. 317–329.
47. Davidson S.M., Duchon M.R. Effects of NO on mitochondrial function in cardiomyocytes: pathophysiological relevance. *Cardiovascular Research*. 2006. Vol. 71, N 1. P. 10–21.
48. Brown G.C., Borutaite V. Nitric oxide and mitochondrial respiration in the heart. *Cardiovascular Research*. 2007. Vol. 75, N 2. 283–290.
49. Carreras M.C., Poderoso J.J. Mitochondrial nitric oxide in the signaling of cell integrated responses. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 2007. Vol. 292. P. C1569–C1580.
50. Santos C.X.C., Anilkumar N., Zhang M., Brewer A.C., Shah A.M. Redox signaling in cardiac myocytes. *Free Radical Biology & Medicine*. 2011. Vol. 50, N 7. P. 777–793.
51. Levine A.B., Punihaole D., Levine T.B. Characterization of the role of nitric oxide and its clinical applications. *Cardiology*. 2012. Vol. 122. P. 55–68.
52. Crouser E.D. Mitochondrial dysfunction in septic shock and multiple organ dysfunction syndrome. *Mitochondrion*. 2004. Vol. 4. P. 729–741.
53. Piantadosi C.A., Suliman H.B. Redox regulation of mitochondrial biogenesis. *Free Radical Biology & Medicine*. 2012. Vol. 53, N 11. P. 2043–2053.
54. Talib J., Kwan J., Suryo Rahmanto A., Witting P.K., Davies M.J. The smoking-associated oxidant hypothiocyanous acid induces endothelial nitric oxide synthase dysfunction. *Biochemical Journal*. 2014. Vol. 457. P. 89–97.
55. Liu Z., Khalil R.A. Evolving mechanisms of vascular smooth muscle contraction highlight key targets in vascular disease. *Biochemical Pharmacology*. 2018. Vol. 153. P. 91–122.
56. Tarasova N.V., Vishnyakova P.A., Logashina Yu.A., Elchaninov A.V. Mitochondrial Calcium Uniporter structure and function in different types of muscle tissues in health and disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. Vol. 20, N 19. P. 4823.
57. Radi R., Cassina A., Hodara R. Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. *Biological Chemistry*. 2002. Vol. 383, N 3-4. P. 401–409.
58. De Palma C., Clementi E. Nitric oxide regulation of mitochondrial biogenesis. Mitochondrial signaling in health and disease. Ed. S. Orrenius, L. Packer, E. Cadenas. 2012. P. 157–167.
59. Sanchez-Padilla J., Guzman J.N., Ilijic E., Kondapalli J., Galtieri D.J., Yang B., Schieber S., Oertel W., Wokosin D., Schumacker P.T., Surmeier D.J. Mitochondrial oxidant stress in locus coeruleus is regulated by activity and nitric oxide synthase. *Nature Neuroscience*. 2014. Vol. 17, N 6. P. 832–840.
60. Shiva S. Mitochondria as metabolizers and targets of nitrite. *Nitric Oxide*. 2010. Vol. 22, N 2. P. 64–74.
61. Tengan C.H., Rodrigues G.S., Godinho R.O. Nitric oxide in skeletal muscle: role on mitochondrial biogenesis and function. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012. Vol. 13, N 12. P. 17160–17184.
62. Traaseth N., Elfering S., Solien J., Haynes V., Giulivi C. Role of calcium signaling in activation of mitochondrial nitric oxide synthase and citric acid cycle. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2004. Vol. 1658, N 1-2. P. 64–71.

63. Векліч Т.О., Костерін С.О., Шинлова О.П. Катіонна специфічність системи акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях клітин міометрія. *Український біохімічний журнал*. 2002. Т. 74, № 1. С. 42—48.
64. Шинлова О.П., Костерін С.А., Векліч Т.А. Подавляемый рутениевым красным энергозависимый и пассивный транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  в пермеабилizированных гладкомышечных клетках. *Биохимия*. 1996. Т. 61, № 8. С. 1440—1447.
65. Austin S., Nowikovsky K. LETM1: essential for mitochondrial biology and cation homeostasis? *Trend in Biochemical Sciences*. 2019. Vol. 44, N 8. P. 648—658.
66. Lin Q-T., Stathopoulos P.B. Molecular Mechanisms of Leucine Zipper EF-Hand Containing Transmembrane Protein-1 Function in Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. Vol. 20. P. 286.
67. Natarajan G.K., Mishra J., Camara A.K.S., Kwok W-M. LETM1: A Single Entity With Diverse Impact on Mitochondrial Metabolism and Cellular Signaling. *Frontiers in Physiology*. 2021. Vol. 12. P. 637852.
68. Костерін С.О., Кальченко В.І., Векліч Т.О., Бабіч Л.Г., Шликов С.Г. Каліксарени як модулятори АТР-гідролазних систем гладеньком'язових клітин. Київ: Наукова думка, 2019. 256 с.
69. Perret F, Lazar A.N, Coleman A.W. Biochemistry of the para-sulfonato-calix[n]arenes. *Chemical Communications*. 2006. Vol. 23. P. 2425—2438.
70. Бухаров С.В., Нугуманова Г.Н., Тагашева Р.Г. Полифенольные антиоксиданты на основе каліксаренов. Казань. Изд-во КНИТУ, 2016.
71. Pan Y.C., Hu X.Y., Guo D.S. Biomedical applications of calixarenes: state of the art and perspectives. *Angewandte Chemie International edition in English*. 2021. Vol. 60, N 6. P. 2768—2794.
72. Vovk A.I., Kalchenko V.I., Cherenok S.A., Kukhar V.P., Muzychka O.V., Lozynsky M.O. Calix[4]arene methylenebisphosphonic acids as calf intestine alkaline phosphatase inhibitors. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2004. Vol. 2, N 21. P. 3162—3166.
73. Buldenko V.M., Trush V.V., Kobzar O.L., Drapailo A.B., Kalchenko V.I., Vovk A.I. Calixarene-based phosphinic acid as inhibitors of protein tyrosine phosphatase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2019. Vol. 29, N 6. P. 797—801.
74. Векліч Т.О., Шкрабак О.А., Мазур Ю.Ю., Родік Р.В., Кальченко В.І., Костерін С.О. Кінетика інгібіторної дії калікс[4]арену С-90 на активність транспортної  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазі плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2014. Vol. 86, N 5. P. 37—46.
75. Векліч Т.О., Костерін С.О., Родік Р.В., Черенок С.О., Бойко В.І., Кальченко В.І. Вплив каліксаренфосфонових кислот на  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-азну активність у плазматичній мембрані гладеньком'язових клітин. *Український біохімічний журнал*. 2006. Т. 78, № 1. С. 70—78.
76. Векліч Т.О., Шкрабак О.А., Родік Р.В., Кальченко В.І., Костерін С.О. Вплив каліксарену С-107 на кінетичні параметри  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-азі плазматичної мембрани міоцитів матки. *Український біохімічний журнал*. 2011. Т. 83, № 2. С. 36—44.
77. Шликов С.Г., Бабіч Л.Г., Сліщенко Н.М., Родік Р.В., Бойко В.І., Кальченко В.І., Костерін С.О. Каліксарен С-91 стимулює акумуляцію іонів Са в мітохондріях міометрія. *Український біохімічний журнал*. 2007. Т. 79, № 4. С. 28—33.
78. Бабіч Л.Г., Шлыков С.Г., Бойко В.И., Клячина М.А., Костерін С.А. Калікс[4]-аренхалконамиды С-136 и С-137 гиперполяризуют мембрану митохондрий миометрия. *Биоорганическая химия*. 2013. Т. 39, № 6. С. 728—735.
79. Бабіч Л.Г., Шликов С.Г., Кушнар'ова А.М., Єсипенко О.А., Костерін С.О. Халкон-вмісні калікс[4]арени — нанорозмірні модулятори поляризації мембран мітохондрій та вмісту йонізованого Са в них. *Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології*. 2017. Т. 15, № 1. С. 193—202.
80. Цимбалюк О.В., Онуфрійчук О.В., Векліч Т.О., Черенок С.О., Кальченко В.І., Мірошниченко М.С., Костерін С.О. Порівняльне дослідження впливу оубаїну і каліксарен біс-гідроксиметилфосфонової кислоти на активність  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРазі та механокінетику процесу «скорочення-розслаблення» гладенького м'яза. *Фізика живого*. 2006. Т. 14, № 1. С. 53—72.

81. Цимбалюк О.В., Родік Р.В., Кальченко В.І., Костерін С.О. Механокінетичні параметри скоротливої активності гладеньких м'язів саесит шура за умов хронічної дії каліксарену С107 in vivo. *Фізика живого*. 2010. Т. 18, № 1. С. 47—51.

82. Цимбалюк О.В., Костерін С.О. Вплив каліксарену С-90 на скоротливу активність гладеньких м'язів міометрія шурів. *Біологічні студії*. 2013. Т. 7, № 3. С. 5—20.

### До розділу 1

1. Furchgott R.F., Cherry P.D., Zawadzki J.V., Jothianandan D. Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 1984. Vol. 6 N 2. P. S336—343.

2. Ignarro L.J. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circulation Research*. 1989. Vol. 65, N 1. P. 1—21.

3. Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacological Reviews*. 1991. Vol. 43, N 2. P. 109—142.

4. Marsh N., Marsh A. A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2000. Vol. 27, N 4. P. 313—319.

5. Treuer A.V., Gonzalez D.R. Nitric oxide synthases, S-nitrosylation and cardiovascular health: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities (Review). *Molecular Medicine Reports*. 2015. Vol. 11, N 3. P. 1555—1565.

6. Ghimire K., Altmann H.M., Straub A.C., Isenberg J.S. Nitric oxide: what's new to NO? *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 2017. Vol. 312, N 3. P. C254—C262.

7. Bryan N.S., Bian K., Murad F. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development. *Frontiers in Bioscience*. 2009. Vol. 14, N 1. P. 1—18.

8. Philippu A. Nitric Oxide: A Universal Modulator of Brain Function. *Current Medical Chemistry*. 2016. Vol. 23, N 24. P. 2643—2652.

9. Pitocco D., Zaccardi F., Di Stasio E., Romitelli F., Santini S.A., Zuppi C., Ghirlanda G. Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. *The Review of Diabetic Studies*. 2010. Vol. 7, N 1. P. 15—25.

10. Krauss G. Biochemistry of Signal Transduction and Regulation Fifth, Completely Revised Edition. Wiley-VCH, Verlag GmbH&Co.KGaa, 2014, 815 p.

11. Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*. 2001. Vol. 357, Pt. 3. P. 593—615.

12. Thomas D.D., Liu X., Kantrow S.P., Lancaster J.R. Jr. The biological lifetime of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O<sub>2</sub>. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2001. Vol. 98, N 1. P. 355—360.

13. Levine A.B., Punihale D., Levine T.B. Characterization of the role of nitric oxide and its clinical applications. *Cardiology*. 2012. Vol. 122, N 1. P. 55—68.

14. Zhao Y., Vanhoutte P.M., Leung S.W. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2015. Vol. 129, N 2. P. 83—94.

15. Lundberg J.O., Weitzberg E., Gladwin M.T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2008. Vol. 7, N 2. P. 156—167.

16. Omar S.A., Webb A.J., Lundberg J.O., Weitzberg E. Therapeutic effects of inorganic nitrate and nitrite in cardiovascular and metabolic diseases. *Journal of Internal Medicine*. 2016. Vol. 279, N 4. P. 315—336.

17. Forstermann U., Sessa W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*. 2012. Vol. 33, N 7. P. 829—837.

18. Daff S. NO synthase: structures and mechanisms. *Nitric Oxide*. 2010. Vol. 23, N 1. P. 1—11.

19. Andrew P.J., Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovascular Research*. 1999. Vol. 43, N 3. P. 521—531.

20. Nosarev A.V., Smagliy L.V., Anfinogenova Y., Popov S.V., Kapilevich L.V. Exercise and NO production: relevance and implications in the cardiopulmonary system. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2015. Vol. 2. P. 73.

21. Forstermann U., Closs E.I., Pollock J.S., Nakane M., Schwarz P., Gath I., Kleinert H. Nitric Oxide Synthase Isozymes. Characterization, Purification, Molecular Cloning, and Functions. *Hypertension*. 1994. Vol. 23, N 6, Pt. 2. P. 1121—1131.

22. Tengan C.H., Rodrigues G.S., Godinho R.O. Nitric oxide in skeletal muscle: role on mitochondrial biogenesis and function. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012. Vol. 13, N 12. P. 17160—17184.
23. Silvagno F., Xia H., Bredt D.S. Neuronal nitric-oxide synthase-mu, an alternatively spliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*. 1996. Vol. 271, N 19. P. 11204—11208.
24. Brenman J.E., Chao D.S., Gee S.H., McGee A.W., Craven S.E., Santillano D.R., Wu Z., Huang F., Xia H., Peters M.F., Froehner S.C. and Bredt D.S. Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and  $\alpha$ 1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell*. 1996. Vol. 84, N 5. P. 757—767.
25. Brenman J.E., Xia H., Chao D.S., Black S.M., Bredt D.S. Regulation of neuronal nitric oxide synthase through alternative transcripts. *Developmental Neuroscience*. 1997. Vol. 19, N 3. P. 224—231.
26. Kone B.C., Kunczewicz T., Zhang W., Yu Z.Y. Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *American Journal of Physiology Renal Physiology*. 2003. Vol. 285, N 2. P. F178—F190.
27. Daff S., Sagami I., Shimizu T. The 42-amino acid insert in the FMN domain of neuronal nitric-oxide synthase exerts control over Ca(2+)/calmodulin-dependent electron transfer. *Journal of Biological Chemistry*. 1999. Vol. 274, N 43. P. 30589—30595.
28. De Palma C., Clementi E. Nitric oxide regulation of mitochondrial biogenesis. Mitochondrial signaling in health and disease. Ed. S. Orrenius, L. Packer, E. Cadenas. 2012. P. 157—167.
29. Duan W., Zhou J., Li W., Zhou T., Chen Q., Yang F., Wei T. Plasma membrane calcium ATPase 4b inhibits nitric oxide generation through calcium-induced dynamic interaction with neuronal nitric oxide synthase. *Protein & Cell*. 2013. Vol. 4, N 4. P. 286—298.
30. Hemmens B., Woschitz S., Pitters E., Klösch B., Völker C., Schmidt K., Mayer B. The protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase (PIN): characterization of its action on pure nitric oxide synthases. *FEBS Letters*. 1998. Vol. 430, N 3. P. 397—400.
31. Rodriguez-Crespo I., Straub W., Gavilanes F., Ortiz de Montellano P.R. Binding of dynein light chain (PIN) to neuronal nitric oxide synthase in the absence of inhibition. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1998. Vol. 359, N 2. P. 297—304.
32. Heinonen I., Saltin B., Hellsten Y., Kalliokoski K.K. The effect of nitric oxide synthase inhibition with and without inhibition of prostaglandins on blood flow in different human skeletal muscles. *European Journal of Applied Physiology*. 2017. Vol. 117, N 6. P. 1175—1180.
33. Li Q., Chen Y., Zhang X., Zuo S., Ge H., Chen Y., Liu X., Zhang J.H., Ruan H., Feng H. Scutellarin attenuates vasospasm through the Erk5-KLF2-eNOS pathway after subarachnoid hemorrhage in rats. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2016. Vol. 34. P. 264—270.
34. Lee J.E., Yuan H., Liang F.X., Sehgal P.B. Nitric oxide scavenging causes remodeling of the endoplasmic reticulum, Golgi apparatus and mitochondria in pulmonary arterial endothelial cell. *Nitric Oxide*. 2013. Vol. 33. P. 64—73.
35. Duran W.N., Breslin J.W., Sanchez F.A. The NO cascade, eNOS location, and microvascular permeability. *Cardiovascular Research*. 2010. Vol. 87, N 2. P. 254—261.
36. Shaul P.W., Smart E.J., Robinson L.J., German Z., Yuhanna I.S., Ying Y., Anderson R.G., Michel T. Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *Journal of Biological Chemistry*. 1996. Vol. 271, N 11. P. 6518—6522.
37. Davidson S.M., Duchon M.R. Effects of NO on mitochondrial function in cardiomyocytes: pathophysiological relevance. *Cardiovascular Research*. 2006. Vol. 71, N 1. P. 10—21.
38. Komeima K., Hayashi Y., Naito Y., Watanabe Y. Inhibition of neuronal nitric-oxide synthase by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha through Ser847 phosphorylation in NG108-15 neuronal cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2000. Vol. 275, N 36. P. 28139—28143.
39. Mutchler S.M., Straub A.C. Compartmentalized nitric oxide signaling in the resistance vasculature. *Nitric Oxide*. 2015. Vol. 49. P. 8—15.
40. Bauer E.M., Qin Y., Miller T.W., Bandle R.W., Csanyi G., Pagano P.J., Bauer P.M., Schnermann J., Roberts D.D., Isenberg J.S. Thrombospondin-1 supports blood pressure by limiting eNOS activation and endothelial-dependent vasorelaxation. *Cardiovascular Research*. 2010. Vol. 88, N 3. P. 471—481.

41. Rogers N.M., Sharifi-Sanjani M., Csányi G., Pagano P.J., Isenberg J.S. Thrombospondin-1 and CD47 regulation of cardiac, pulmonary and vascular responses in health and disease. *Matrix Biology*. 2014. Vol. 37. P. 92–101.
42. Shashar M., Chernichovski T., Pasvolsky O., Levi S., Grupper A., Hershkovitz R., Weinstein T., Schwartz I.F. Vascular endothelial growth factor augments arginine transport and nitric oxide generation via a KDR receptor signaling pathway. *Kidney and Blood Pressure Research*. 2017. Vol. 42, N 2. P. 201–208.
43. Wu G., Morris S.M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochemical Journal*. 1998. Vol. 336, Pt. 1. P. 1–17.
44. Litvinova L., Atochin D.N., Fattakhov N., Vasilenko M., Zatolokin P., Kirienkova E. Nitric oxide and mitochondria in metabolic syndrome. *Frontiers in Physiology*. 2015. Vol. 6. P. 20.
45. Carreras M.C., Poderoso J.J. Mitochondrial nitric oxide in the signaling of cell integrated responses. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 2007. Vol. 292. P. C1569–C1580.
46. Tsai K.D., Chen W., Wang S.H., Hsiao Y.W., Chi J.Y., Wu H.Y., Lee Y.J., Wong H.Y., Tseng M.J., Lin T.H. Downregulation of connective tissue growth factor by LPS/IFN- $\gamma$ -induced nitric oxide is reversed by aristolochic acid treatment in glomerular mesangial cells via STAT-1 $\alpha$  and NF- $\kappa$ B signaling. *Chemico-Biological Interactions*. 2014. Vol. 210. P. 86–95.
47. Tripathi P. Nitric oxide and immune response. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*. 2007. Vol. 44, N 5. P. 310–319.
48. Siomek A. NF- $\kappa$ B signaling pathway and free radical impact. *Acta Biochimica Polonica*. 2012. Vol. 59, N 2. P. 323–329.
49. Connely L., Jacobs A.T., Palacios-Callender M., Moncada S., Hobbs A.J. Macrophage endothelial nitric-oxide synthase autoregulates cellular activation and pro-inflammatory protein expression. *Journal of Biological Chemistry*. 2003. Vol. 278, N 29. P. 26480–26487.
50. Van Straaten J.F., Postma D.S., Coers W., Noordhoek J.A., Kauffman H.F., Timens W. Macrophages in lung tissue from patients with pulmonary emphysema express both inducible and endothelial nitric oxide synthase. *Modern Pathology*. 1998. Vol. 11, N 7. P. 648–655.
51. Nagano T., Friedovich I. The co-oxidation of ammonia to nitrite during the aerobic xanthine oxidase reaction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1985. Vol. 241, N 2. P. 596–601.
52. Dull B.J., Hotchkins J.H. Activated oxygen and mammalian nitrate biosynthesis. *Carcinogenesis*. 1984. Vol. 5, N 9. P. 1161–1164.
53. Guerra D.D., Hurt K.J. Gasotransmitter in pregnancy: from conception to uterine involution. *Biology of Reproduction*. 2019. Vol. 101, N 1. P. 4–25.
54. Lundberg J.O., Weitzberg E. NO-synthase independent NO generation in mammals. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010. Vol. 396, N 1. P. 39–45.
55. Thomas D.D., Ridnour L.A., Isenberg J.S., Flores-Santana W., Switzer C.H., Donzelie S., Hussain P., Vecoli C. et al. The Chemical biology of nitric oxide. Implication in cellular signaling. *Free Radical Biology & Medicine*. 2008. Vol. 45, N 1. P. 18–31.
56. Siervo M., Scialò F., Shannon O.M., Stephan B.C.M., Ashor A.W. Does dietary nitrate say NO to cardiovascular ageing? Current evidence and implications for research. *Proceeding of the Nutrition Society*. 2018. Vol. 77, N 2. P. 112–123.
57. Lundberg J.O., Weitzberg E. NO generation from nitrite and its role in vascular control. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2005. Vol. 25, N 5. P. 915–922.
58. Сибірна Н.О., Люта М.Я., Климишин Н.І. Молекулярні механізми депонування оксиду азоту в еритроцитах. *Біологічні студії*. 2010. Vol. 4, N 1. P. 143–160.
59. Shiva S. Mitochondria as metabolizers and targets of nitrite. *Nitric Oxide*. 2010. Vol. 22, N 2. P. 64–74.
60. Shiva S. Nitrite: A Physiological Store of Nitric Oxide and Modulator of Mitochondrial Function. *Redox Biology*. 2013. Vol. 1, N 1. P. 40–44.
61. Soodaeva S., Klimanov I., Kubysheva N., Popova N., Batyrrshin I. The state of the nitric oxide cycle in respiratory tract diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2020. Article ID 4859260.
62. Lundberg J.O., Weitzberg E. NO generation from inorganic nitrate and nitrite: Role in physiology, nutrition and therapeutics. *Archives of Pharmacal Research*. 2009. Vol. 32, N 8. P. 1119–1126.

63. Welland A., Daff S. Conformation-dependent hydride transfer in neuronal nitric oxide synthase reductase domain. *The FEBS Journal*. 2010. Vol. 277. P. 3833–3843.
64. Nishida C.R., Ortiz de Montellano P.R. Autoinhibition of endothelial nitric-oxide synthase. Identification of an electron transfer control element. *Journal of Biological Chemistry*. 1999. Vol. 274, N 21. P. 14692–14698.
65. Chreifi G., Li H., McInnes C.R., Gibson C.L., Suckling C.J., Poulos T.L. Communication between the zinc and tetrahydrobiopterin binding sites in nitric oxide synthase. *Biochemistry*. 2014. Vol. 53, N 25. P. 4216–4223.
66. Talib J., Kwan J., Suryo Rahmanto A., Witting P.K., Davies M.J. The smoking-associated oxidant thiocyanous acid induces endothelial nitric oxide synthase dysfunction. *Biochemical Journal*. 2014. Vol. 457, N 1. P. 89–97.
67. Crabtree M.J., Tatham A.L., Al-Wakeel Y., Warrick N., Hale A.B., Cai S., Channon K.M., Alp N.J. Quantitative Regulation of Intracellular Endothelial Nitric-oxide Synthase (eNOS) Coupling by Both Tetrahydrobiopterin-eNOS Stoichiometry and Biopterin Redox Status. *Journal of Biological Chemistry*. 2009. Vol. 284, N 2. P. 1136–1144.
68. Schmidt T.S., Alp N.J. Mechanisms for the role of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease. *Clinical Science (Lond)*. 2007. Vol. 113, N 2. P. 47–63.
69. Li H., Poulos T.L. Structure-function studies on nitric oxide synthases. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2005. Vol. 99, N 1. P. 293–305.
70. Cosentino F., Katusic Z.S. Tetrahydrobiopterin and dysfunction of endothelial nitric oxide synthase in coronary arteries. *Circulation*. 1995. Vol. 91, N 1. P. 139–144.
71. Горпен А.К.Ф., Майер Б. Универсальная и комплексная энзимология синтазы оксида азота. *Биохимия*. 1998. Т. 63, № 7. С. 870–880.
72. Sheng J.Zh., Wang D., Braun A.P. DAF-FM (4-Amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein) Diacetate detects impairment of agonist-stimulated nitric oxide synthesis by elevated glucose in human vascular endothelial cells: reversal by vitamin C and L-sepiapterin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2005. Vol. 315, N 2. P. 931–940.
73. Santos C.X.C., Anilkumar N., Zhang M., Brewer A.C., Shah A.M. Redox signaling in cardiac myocytes. *Free Radical Biology & Medicine*. 2011. Vol. 50, N 7. P. 777–793.
74. Dedkova E.N., Blatter L.A. Characteristics and function of cardiac mitochondrial nitric oxide synthase. *The Journal of Physiology*. 2009. Vol. 587, Pt. 4. P. 851–872.
75. Chuaiphichai S., McNeill E., Douglas G., Crabtree M.J., Bendall J.K., Hale A.B., Alp N.J., Channon K.M. Cell-autonomous role of endothelial GTP cyclohydrolase 1 and tetrahydrobiopterin in blood pressure regulation. *Hypertension*. 2014. Vol. 64, N 3. P. 530–540.
76. Simon A., Plies L., Habermeier A., Martiné U., Reining M., Closs E.I. Role of neutral amino acid transport and protein breakdown for substrate supply of nitric oxide synthase in human endothelial cells. *Circulation Research*. 2003. Vol. 93, N 9. P. 813–820.
77. Santhanam L., Christianson D.W., Nyhan D., Berkowitz D.E. Arginase and vascular aging. *Journal of Applied Physiology*. 2008. Vol. 105, N 5. P. 1632–1642.
78. Hsu C.-N., Tain Y.-L. Impact of Arginine Nutrition and Metabolism during Pregnancy on Offspring Outcomes. *Nutrients*. 2019. Vol. 11, N 7. P. 1452.
79. Closs E.I., Scheld J.S., Sharafi M., Forstermann U. Substrate supply for nitric-oxide synthase in macrophages and endothelial cells: role of cationic amino acid transporters. *Molecular Pharmacology*. 2000. Vol. 57, N 1. P. 68–74.
80. Durante W., Johnson F.K., Johnson R.A. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2007. Vol. 34, N 9. P. 906–911.
81. Morris S.M. Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases. *British Journal of Pharmacology*. 2009. Vol. 157, N 6. P. 922–930.
82. Elms S., Chen F., Wang Y., Qian J., Askari B., Yu Y., Pandey D., Iddings J., Caldwell R.B., Fulton D.J. Insights into the arginine paradox: evidence against the importance of sub-cellular location of arginase and eNOS. *The American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. 2013. Vol. 305, N 5. P. H651–H666.
83. Ференц І.В., Броляк І.В., Люта М.Я., Бурда В.А., Федорович А.М., Сибірна Н.О. Вплив агматину на метаболізм L-аргініну в еритроцитах крові за умов стрептозотонін-індукованого діабету у щурів. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2012. Vol. 84, N 3. P. 55–62.



84. Pollock J.S., Forstermann U., Mitchell J.A., Warner T.D., Schmidt H.H., Nakane M., Murad F. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1991. Vol. 88, N 23. P. 10480—10484.
85. Ash D.E. Structure and Function of Arginases. *Journal of Nutrition*. 2004. Vol. 134, N 10. P. 2760S—2767S.
86. Porcelli V., Fiermonte G., Longo A., Palmieri F. The Human Gene SLC25A29, of Solute Carrier Family 25, Encodes a Mitochondrial Transporter of Basic Amino Acids. *Journal of Biological Chemistry*. 2014. Vol. 289, N 19. P. 13374—13384.
87. Boucher J.L., Moali C., Tenu J.P. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 1999. Vol. 55, N 8-9. P. 1015—1028.
88. Que L.G., George S.E., Gotoh T., Mori M., Huang Y.C. Effects of arginase isoforms on NO Production by nNOS. *Nitric Oxide*. 2002. Vol. 6, N 1. 1—8.
89. Peng H., Chen L., Huang X., Yang T., Yu Z., Cheng G., Zhang G., Shi R. Vascular peroxidase 1 up regulation by angiotensin II attenuates nitric oxide production through increasing asymmetrical dimethylarginine in HUVECs. *Journal of the American Society of Hypertension*. 2016. Vol. 10, N 9. P. 741—751.
90. Brown G.C., Borutaite V. Nitric oxide and mitochondrial respiration in the heart. *Cardiovascular Research*. 2007. Vol. 75, N 2. 283—290.
91. Feron O., Belhassen L., Kobzik L., Smith T.W., Kelly R.A., Michel T. Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1996. Vol. 271, N 37. P. 22810—22814.
92. Sanchez-Padilla J., Guzman J.N., Ilijic E., Kondapalli J., Galtieri D.J., Yang B., Schieber S., Oertel W., Wokosin D., Schumacker P.T., Surmeier D.J. Mitochondrial oxidant stress in locus coeruleus is regulated by activity and nitric oxide synthase. *Nature Neuroscience*. 2014. Vol. 17, N 6. P. 832—840.
93. Zaobornyj T., Ghafourifar P. Strategic localization of heart mitochondrial NOS: a review of the evidence. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. 2012. Vol. 303, N 11. P. H1283—H1293.
94. Butcher J.T., Johnson T., Beers J., Columbus L., Isakson B.E. Hemoglobin  $\alpha$  in the blood vessel wall. *Free Radical Biology & Medicine*. 2014. Vol. 73. P. 136—142.
95. Lin X., Xu Q., Veenstra R.D. Functional formation of heterotypic gap junction channels by connexins-40 and -43. *Channels (Austin)*. 2014. Vol. 8, N 5. P. 433—443.
96. Pogoda K., Füller M., Pohl U., Kameritsch P. NO, via its target Cx37, modulates calcium signal propagation selectively at myoendothelial gap junctions. *Cell Communication and Signaling*. 2014. Vol. 12. P. 33.
97. Fernando V., Zheng X., Walia Y., Sharma V., Letson J., Furuta S. S-Nitrosylation: an emerging paradigm of redox signaling. *Antioxidants*. 2019. Vol. 8, N 9. P. 404.
98. Liu Chao, Cheng L.M., Wah S.T. Nitric Oxide, Iron and Neurodegeneration. *Frontiers in Neuroscience*. 2019. Vol. 13. Article 114.
99. Kleschyov A.L. The NO-heme signaling hypothesis. *Free Radical Biology & Medicine*. 2017. Vol. 112. P. 544—552.
100. Corbin J.D. Mechanisms of action of PDE5 inhibition in erectile dysfunction. *International Journal of Impotence Research*. 2004. Vol. 16, Suppl. 1. P. S4—S7.
101. Buxton I.L.O. Regulation of uterine function: a biochemical conundrum in the regulation of smooth muscle relaxation. *Molecular Pharmacology*. 2004. Vol. 65, N 6. P. 1051—1059.
102. Leite A.C.R., Oliveira H.C.F., Utino F.L., Garcia R., Alberici L.C., Fernandes M.P., Castilho R.F., Verces A.E. Mitochondria generated nitric oxide protects against permeability transition via formation of membrane protein S-nitrosothiols. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010. Vol. 1797, N 6-7. P. 1210—1216.
103. Franco M.C., Antico Arciuch V.G., Peralta J.G., Galli S., Levisman D., Lopez L.M., Romorini L., Poderoso J.J., Carreras M.C. Hypothyroid Phenotype Is Contributed by Mitochondrial Complex I Inactivation Due to Translocated Neuronal Nitric-oxide Synthase. *Journal of Biological Chemistry*. 2006. Vol. 281, N 8. P. 4779—4786.

104. Giulivi C. Mitochondria as generators and targets of nitric oxide. *Novartis Foundation Symposium*. 2007. Vol. 287. P. 92—104.
105. Korshunov S.S., Skulachev V.P., Starkov A.A. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria, *FEBS Letters*. 1997. Vol. 416, N 1. P. 15—18.
106. Traaseth N., Elfering S., Solien J., Haynes V., Giulivi C. Role of calcium signaling in activation of mitochondrial nitric oxide synthase and citric acid cycle. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2004. Vol. 1658, N 1-2. P. 64—71.
107. Piantadosi C.A., Suliman H.B. Redox regulation of mitochondrial biogenesis. *Free Radical Biology & Medicine*. 2012. Vol. 53, N 11. P. 2043—2053.
108. Ulrich C., Quilici D.R., Schlauch K.A., Buxton I.L.O. The human uterine smooth muscle S-nitrosoproteome fingerprint in pregnancy, labor, and preterm labor. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 2013. Vol. 305, N 8. P. C803—C816.
109. Garfield R.E., Saade G., Buhimschi C., Buhimschi I., Shi L., Shi S.Q., Chwalisz K. Control and assessment of the uterus and cervix during pregnancy and labour. *Human Reproduction Update*. 1998. Vol. 4, N 5. P. 673—695.
110. Bulbul A., Yağci A., Altunbaş K., Sevimli A., Celik H.A., Karadeniz A., Akdağ E. The role of nitric oxide in the effects of ovarian steroids on spontaneous myometrial contractility in rats. *Theriogenology*. 2007. Vol. 68, N 8. P. 1156—1168.
111. Hertelendy F., Zakar T. Regulation of myometrial smooth muscle function. *Current Pharmaceutical Design*. 2004. Vol. 10, N 20. P. 2499—2517.
112. Mesiano S. Myometrial progesterone responsiveness and the control of human parturition. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 2004. Vol. 11, N 4. P. 193—202.
113. Havelock J.C., Keller P., Muleba N., Mayhew B.A., Casey B.M., Rainey W.E., Word R.A. Human myometrial gene expression before and during parturition. *Biology of Reproduction*. 2005. Vol. 72, N 3. P. 707—719.
114. Ravanos K., Dagklis T., Petousis S., Margioulas-Siarkou C., Prapas Y., Prapas N. Factors implicated in the initiation of human parturition in term and preterm labor: a review. *Gynecological Endocrinology*. 2015. Vol. 31, N 9. P. 679—683.
115. Alotaibi M.F. The response of rat and human uterus to oxytocin from different gestation stages in vitro. *General Physiology and Biophysics*. 2017. Vol. 36, N 1. P. 75—82.
116. Wray S., Prendergast C. The Myometrium: From Excitation to Contractions and Labour. Springer Nature Singapore Pte Ltd. H. Hashitani, R.J. Lang (eds.). Smooth Muscle Spontaneous Activity, *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2019. 1124 p.
117. Aguilar H.N., Mitchell B.F. Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility. *Human Reproduction Update*. 2010. Vol. 16, N 6. P. 725—744.
118. Yallampalli C., Garfield R.E., Byam-Smith M. Nitric oxide inhibits uterine contractility during pregnancy but not during delivery. *Endocrinology*. 1993. Vol. 133, N 4. P. 1899—1902.
119. Toda N., Toda H., Okamura T. Regulation of myometrial circulation and uterine vascular tone by constitutive nitric oxide. *European Journal of Pharmacology*. 2013. Vol. 714, N 1-3. P. 414—423.
120. Norman J.E., Cameron I.T. Nitric oxide in the human uterus. *Reviews of Reproduction*. 1996. Vol. 1, N 1. P. 61—68.
121. Zullino S., Buzzella F., Simoncini T. Nitric oxide and biology of pregnancy. *Vascular Pharmacology*. 2018. Vol. 110. P. 71—74.
122. Buxton I.L., Kaiser R.A., Malmquist N.A., Tichenor S. NO-induced relaxation of labouring and non-labouring human myometrium is not mediated by cyclic GMP. *British Journal of Pharmacology*. 2001. Vol. 134, N 1. P. 206—214.
123. Valdes G., Corthorn J. Review: the angiogenic and vasodilatory uteroplacental network. *Placenta*. 2011. Vol. 32, Suppl. 2. P. S170—175.
124. Yellon S.M., Mackler A.M., Kirby M.A. The role of leukocyte traffic and activation in parturition. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 2003. Vol. 10, N 6. P. 323—338.
125. Xiao D., Pearce W.J., Zhang L. Pregnancy enhances endothelium-dependent relaxation of ovine uterine artery: role of NO and intracellular Ca<sup>2+</sup>. *The American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. 2001. Vol. 281, N 1. P. H183—H190.

126. Arthur P., Taggart M.J., Zeilnik B., Wong S., Mitchell B.F. Relationship between gene expression and function of uterotonic systems in rat gestation, uterine activation and both term and preterm labour. *The Journal of Physiology*. 2008. Vol. 586, N 24. P. 6063–6076.
127. Данилович Ю.В., Тугай В.А. Утворення NO та H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> у стромальних клітинах ендометрія за дії ацетилхоліну. *Український біохімічний журнал*. 2001. Т. 73, № 2. С. 110–115.
128. Данилович Ю.В. Механізми ацетилхолінзалежної продукції NO<sub>2</sub><sup>-</sup> та H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> стромальними клітинами ендометрія. *Український біохімічний журнал*. 2003. Т. 75, № 5. С. 77–84.
129. Данилович Ю.В. Вплив стероїдних гормонів і окситоцину на утворення NO і H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в ендометрії. *Український біохімічний журнал*. 2004. Т. 76, № 1. С. 88–96.
130. Semer D., Reisler K., MacDonald P.C., Casey M.L. Responsiveness of human endometrial stromal cells to cytokines. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1991. Vol. 622. P. 99–110.
131. Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J., Skipper P.L., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*. 1982. Vol. 126, N 1. P. 131–138.
132. Коцюрuba А.В., Семиконна Т.В., Вікторов О.П. Спосіб кількісного визначення нітрит-аніону в біологічній рідині. Деклараційний патент на винахід 31600 А. 15.12.2000. Бюлетень № 7-11.
133. Сагач В.Ф., Доломан Л.Б., Коцюрuba А.В., Буханевич О.М., Курданов Х.А., Бесплянеєв І.А., Бекузарова С.А. Збільшений вміст стабільних метаболітів оксиду азоту в крові мешканців високогір'я. *Фізіологічний журнал*. 2002. Т. 48. № 5. С. 3–8.
134. Bartlett S.R., Bennett P.R., Campa J.S., Dennes W.J.B., Slater D.M., Mann G.E., Poston L., Poston R. Expression of nitric oxide synthase isoforms in pregnant human myometrium. *Journal of Physiology*. 1999. Vol. 521, N 3. P. 705–716.
135. Cameron I.T., Campbell S. Nitric oxide in the endometrium. *Human Reproduction Update*. 1998. Vol. 4, N 5. P. 565–569.
136. Li Y., Zhou X., Wei Q.W., Huang R.H., Shi F.X. Cell-specific expression and immunolocalization of nitric oxide synthase isoforms and soluble guanylyl cyclase  $\alpha$  and  $\beta$  subunits in postnatal porcine uteri. *Acta Histochemica*. 2014. Vol. 116, N 3. P. 466–473.
137. Farina M., Ribeiro M.L., Franchi A. Nitric oxide synthases in pregnant rat uterus. *Reproduction*. 2001. Vol. 121, N 3. P. 403–407.
138. Garfield R.E., Saade G., Buhimschi C., Buhimschi I., Shi L., Shi S.Q., Chwalisz K. Control and assessment of the uterus and cervix during pregnancy and labour. *Human Reproduction Update*. 1998. Vol. 4, N 5. P. 673–695.
139. Buhimschi I.A., Saade G.R., Chwalisz K., Garfield R.E. The nitric oxide pathway in pre-eclampsia: pathophysiological implications. *Human Reproduction Update*. 1998. Vol. 4, N 1. P. 25–42.
140. Tiboni G.M., Corso A.D., Marotta F. Progestational agents prevent preterm birth induced by a nitric oxide synthesis inhibitor in the mouse. *In Vivo*. 2008. Vol. 22, N 4. P. 447–450.
141. Rytlewski K., Olszanecki R., Lauterbach R., Grzyb A. Effects of oral L-arginine on the pulsatility indices of umbilical artery and middle cerebral artery in preterm labor. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2008. Vol. 138, N 1. P. 23–28.
142. Aljameil N., Tabassum H., AlMayouf H., Alshenefy A., Almohizea M.M., Ali M.N. Identification of serum cytokines as markers in women with recurrent pregnancy loss or miscarriage using MILLIPLEX analysis. *Biomedical Research*. 2018. Vol. 29. P. 3512–3517.
143. Cella M., Farina M.G., Dominguez Rubio A.P. et al. Dual effect of nitric oxide on uterine prostaglandin synthesis in a murine model of preterm labour. *British Journal of Pharmacology*. 2010. Vol. 161, N 4. P. 844–855.
144. Javadi-Paydar M., Lesani A., Vakilipour R. et al. Evaluation of the tocolytic effect of morphine in a mouse model of lipopolysaccharide-induced preterm delivery: the role of nitric oxide. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2009. Vol. 147, N 2. P. 166–172.

145. Ramesh S., Morrell C.N., Tarango C. et al. Antiphospholipid antibodies promote leukocyte-endothelial cell adhesion and thrombosis in mice by antagonizing eNOS via  $\beta$ 2GPI and apoER2. *Journal of Clinical Investigation*. 2011. Vol. 121, N 1. P. 120—131.
146. Gomez-Guzman M., Jiménez R., Romero M. et al. Chronic hydroxychloroquine improves endothelial dysfunction and protects kidney in a mouse model of systemic lupus erythematosus. *Hypertension*. 2014. Vol. 64, N 2. P. 330—337.
147. Miranda S., Billoir P., Damian L., Thiebaut P.A., Schapman D., Le Besnerais M. et al. Hydroxychloroquine reverses the prothrombotic state in a mouse model of antiphospholipid syndrome: Role of reduced inflammation and endothelial dysfunction. *PLoS ONE*. 2019. Vol. 14, N 3. e0212614.
148. Myatt L., Brockman D.E., Eis A.L.W., Pollock J.S. Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the human placenta. *Placenta*. 1993. Vol. 14, N 5. P. 487—495.
149. Buttery L.D.K., McCarthy A., Springall D.R., Sullivan M.H.F., Elder M.G., Michel T., Polak J.M. Endothelial nitric oxide synthase in the human placenta: regional distribution and proposed regulatory role at the feto-maternal interface. *Placenta*. 1994. Vol. 15, N 3. 257—265.
150. Khorram O., Gartwaite M., Magness R.R. Endometrial and myometrial expression of nitric oxide synthase isoforms in pre- and postmenopausal women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1999. Vol. 84, N 6. P. 2226—2232.
151. Zhang J., Massmann G.A., Mirabile C.P., Figueroa J.P. Nonpregnant sheep uterine type 1 and type 2 nitric oxide synthase expression is differentially regulated by estrogen. *Biology of Reproduction*. 1999. Vol. 60, N 5. P. 1198—1203.
152. Papka R.E., McNeill D.L., Thompson D. Nitric oxide nerves in the uterus are parasympathetic, sensory, and contain neuropeptides. *Cell and Tissue Research*. 1995. Vol. 279, N 2. P. 339—349.
153. Bernardi P., Rasola A. Calcium and cell death: the mitochondrial connection. *Subcellular Biochemistry*. 2007. Vol. 45. P. 481—506.
154. Chalmers S., Nicholls D.G. The relationship between free and total calcium concentrations in the matrix of liver and brain mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. 2003. Vol. 278, N 21. P. 19062—19070.
155. Rizzuto R., Marchi S., Bonora M., Aguiary P., Bononi A.  $\text{Ca}^{2+}$  transfer from the ER to mitochondria: When, how and why. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009. Vol. 1787, N 11. P. 1342—1351.
156. Graier W.F., Frieden M., Malli R. Mitochondria and  $\text{Ca}^{2+}$  signaling: old quests, new functions. *European Journal of Physiology*. 2007. Vol. 455, N 3. P. 375—396.
157. Takeuchi A., Kim B., Matsuoka S. The destiny of  $\text{Ca}^{2+}$  released by mitochondria. *The Journal of Physiological Sciences*. 2015. Vol. 65, N 1. P. 11—24.
158. Bernardi P., von Stockum S. The permeability transition pore as a  $\text{Ca}^{2+}$  release channel: New answers to an old question. *Cell Calcium*. 2012. Vol. 52, N 1. P. 22—27.
159. Rasola A., Bernardi P. Mitochondrial permeability transition in  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium*. 2011. Vol. 50, N 3. P. 222—233.
160. Bock F.J., Tait S.W.G. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2020. Vol. 21, N 2. P. 85—100.

## До розділу 2

1. Campbell A. Intracellular calcium. Springer, 2015.
2. Krauss G. Biochemistry of Signal Transduction and Regulation Fifth, Completely Revised Edition. Wiley-VCH, Verlag GmbH&Co.KG&A, 2014, 815 p.
3. Traaseth N., Elfering S., Solien J., Haynes V., Giulivi C. Role of calcium signaling in activation of mitochondrial nitric oxide synthase and citric acid cycle. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2004. Vol. 1658, N 1-2. P. 64—71.
4. Bernardi P., von Stockum S. The permeability transition pore as a  $\text{Ca}^{2+}$  release channel: New answers to an old question. *Cell Calcium*. 2012. Vol. 52, N 1. P. 22—27.
5. Anderson A.J., Jackson T.D., Stroud D.A., Stojanovski D. Mitochondria-hubs for regulating cellular biochemistry: emerging concepts and networks. *Open Biology*. 2019. Vol. 9. P. 190126.

6. Giulivi C. Mitochondria as generators and targets of nitric oxide. *Novartis Foundation Symposium*. 2007. Vol. 287. P. 92—104.
7. Santos C.X.C., Anilkumar N., Zhang M., Brewer A.C., Shah A.M. Redox signaling in cardiac myocytes. *Free Radical Biology & Medicine*. 2011. Vol. 50, N 7. P. 777—793.
8. Ghafourifar P., Richter Ch. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Letters*. 1997. Vol. 418. P. 291—296.
9. Giulivi C., Poderoso J.J., Boveris A. Production of nitric oxide by mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. 1998. Vol. 273. P. 11038—11043.
10. Haynes V., Elfering S., Traaseth N., Giulivi C. Mitochondrial Nitric-Oxide Synthase: Enzyme Expression, Characterization, and Regulation. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2004. Vol. 36, N 4. P. 341—346.
11. Valdez L.B., Zaobornyj T., Boveris A. Mitochondrial metabolic states and membrane potential modulate mtNOS activity. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006. Vol. 1757, N 3. P. 166—172.
12. Dedkova E.N., Blatter L.A. Characteristics and function of cardiac mitochondrial nitric oxide synthase. *The Journal of Physiology*. 2009. Vol. 587, Pt. 4. P. 851—872.
13. Tatoyan A., Giulivi C. Purification and Characterization of a Nitric-oxide Synthase from Rat Liver Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. 1998. Vol. 273, N 18. P. 11044—11048.
14. Davidson S.M., Duchon M.R. Effects of NO on mitochondrial function in cardiomyocytes: pathophysiological relevance. *Cardiovascular Research*. 2006. Vol. 71, N 1. P. 10—21.
15. Litvinova L., Atochin D.N., Fattakhov N., Vasilenko M., Zatolokin P., Kirienkova E. Nitric oxide and mitochondria in metabolic syndrome. *Frontiers in Physiology*. 2015. Vol. 6. P. 20.
16. Elfering S.L., Sarkela Th.M., Giulivi C. Biochemistry of Mitochondrial Nitric-oxide Synthase. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002. Vol. 277, N 41. P. 38079—38086.
17. Carreras M.C., Poderoso J.J. Mitochondrial nitric oxide in the signaling of cell integrated responses. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 2007. Vol. 292. P. C1569—C1580.
18. Ghafourifar P., Cadenas E. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2005. Vol. 26, N 4. P. 190—195.
19. Zaobornyj T., Ghafourifar P. Strategic localization of heart mitochondrial NOS: a review of the evidence. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. 2012. Vol. 303, N 11. P. H1283—H1293.
20. Tengan C.H., Rodrigues G.S., Godinho R.O. Nitric oxide in skeletal muscle: role on mitochondrial biogenesis and function. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012. Vol. 13, N 12. P. 17160—17184.
21. Franco M.C., Antico Arciuch V.G., Peralta J.G., Galli S., Levisman D., Lopez L.M., Romorini L., Poderoso J.J., Carreras M.C. Hypothyroid Phenotype Is Contributed by Mitochondrial Complex I Inactivation Due to Translocated Neuronal Nitric-oxide Synthase. *Journal of Biological Chemistry*. 2006. Vol. 281, N 8. P. 4779—4786.
22. Persichini T., Mazzone V., Polticelli F., Moreno S., Venturini G., Clementi E., Colasanti M. Mitochondrial type I nitric oxide synthase physically interacts with cytochrome c oxidase. *Neuroscience Letters*. 2005. Vol. 384. P. 254—259.
23. Levine A.B., Punihaole D., Levine T.B. Characterization of the role of nitric oxide and its clinical applications. *Cardiology*. 2012. Vol. 122. P. 55—68.
24. Parihar M.S., Nazarewicz R.R., Kincaid E., Bringold U., Ghafourifar P. Association of mitochondrial nitric oxide synthase activity with respiratory chain complex I. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008. Vol. 366. P. 23—28.
25. Gutierrez J., Ballinger S.W., Darley-Usmar V.M., Landar A. Free radicals, mitochondria, and oxidized lipids: the emerging role in signal transduction in vascular cells. *Circulation Research*. 2006. Vol. 99. P. 924—932.
26. Valdez L.B., Zaobornyj T., Boveris A. Functional activity of mitochondrial nitric oxide synthase. *Methods in Enzymology*. 2005. Vol. 396. P. 444—455.
27. Valdez L.B., Boveris A. Mitochondrial nitric oxide synthase, a voltage-dependent enzyme, is responsible for nitric oxide diffusion to cytosol. *Frontiers in Bioscience*. 2007. Vol. 12. P. 1210—1219.

28. Brookes P.S., Kraus D.W., Shiva S., Doeller J.E., Barone M.C., Patel R.P., Lancaster J.R. Jr., Darley-Usmar V. Control of mitochondrial respiration by NO: effects of low oxygen and respiratory state. *Journal of Biological Chemistry*. 2003. Vol. 278. P. 31603—31609.
29. Alvarez S., Boveris A. Mitochondrial nitric oxide metabolism in rat muscle during endotoxemia. *Free Radical Biology & Medicine*. 2004. Vol. 37, N 9. P. 1472—1478.
30. Porcelli V., Fiermonte G., Longo A., Palmieri F. The Human Gene *SLC25A29*, of Solute Carrier Family 25, Encodes a Mitochondrial Transporter of Basic Amino Acids. *Journal of Biological Chemistry*. 2014. Vol. 289, N 19. P. 13374—13384.
31. Giulivi C. Functional implications of nitric oxide produced by mitochondria in mitochondrial metabolism. *Biochemical Journal*. 1998. Vol. 332. P. 673—679.
32. Dolińska M., Albrecht J. L-arginine uptake in rat cerebral mitochondria. *Neurochemistry International*. 1998. Vol. 33, N 3. P. 233—236.
33. Boucher J.L., Moali C., Tenu J.P. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 1999. Vol. 55, N 8-9. P. 1015—1028.
34. Morris S.M. Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases. *British Journal of Pharmacology*. 2009. Vol. 157. P. 922—930.
35. Ференц І.В., Броляк І.В., Люта М.Я., Бурда В.А., Федорович А.М., Сибірна Н.О. Вплив агматину на метаболізм L-аргініну в еритроцитах крові за умов стрептозотонін-індукованого діабету у щурів. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2012. Vol. 84, N 3. P. 55—62.
36. Rochette L., Lorin Ju., Zeller M., Guillard J.-C., Lorgis L., Cottin Y., Vergely C. Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: possible therapeutic targets? *Pharmacology & Therapeutics*. 2013. Vol. 140, N 3. P. 239—257.
37. Maas R. Pharmacotherapies and their influence on asymmetric dimethylarginine (ADMA). *Vascular Medicine*. 2005. Vol. 10, Suppl. 1. P. S49—S57.
38. Nisoli E., Carruba M.O. Nitric oxide and mitochondrial biogenesis. *Journal of Cell Science*. 2006. Vol. 119, N 14. P. 2856—2862.
39. Riobo N.A., Melani M., Sanjuan N., Fiszman M.L., Gravielle M.C., Carreras M.C., Cadenas E., Poderoso J.J. The modulation of mitochondrial nitric-oxide synthase activity in rat brain development. *Journal of Biological Chemistry*. 2002. Vol. 277, N 45. P. 42447—42455.
40. Lores-Arnaiz S., D'Amico G., Czerniczyniec A., Bustamante J., Boveris A. Brain mitochondrial nitric oxide synthase: in vitro and in vivo inhibition by chlorpromazine. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2004. Vol. 430, N 2. P. 170—177.
41. Boveris A., Valdez L.B., Alvarez S., Zaborny T., Boveris A.D., Navarro A. Kidney mitochondrial nitric oxide synthase. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2003. Vol. 5, N 3. P. 265—271.
42. Bustamante J., Bersier G., Romero M., Badin R.A., Boveris A. Nitric Oxide Production and Mitochondrial Dysfunction during Rat Thymocyte Apoptosis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2000. Vol. 376, N 2. P. 239—247.
43. Giulivi C., Kato K., Cooper C.E. Nitric oxide regulation of mitochondrial oxygen consumption I: cellular physiology. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 2006. Vol. 291, N 6. P. C1225—C1231.
44. Shiva S. Nitrite: A Physiological Store of Nitric Oxide and Modulator of Mitochondrial Function. *Redox Biology*. 2013. Vol. 1, N 1. P. 40—44.
45. Nakatsubo N., Kojima H., Kikuchi K., Nagoshi H., Hirata Y., Maeda D., Imai Y., Irimura T., Nagano T. Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diamino fluoresceins. *FEBS Letters*. 1998. Vol. 427. P. 263—266.
46. Lopez-Figueroa M.O., Caamano C., Morano M.I., Ronn L.C., Akil H., Watson S.J. Direct Evidence of Nitric Oxide Presence within Mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000. Vol. 272, N 1. P. 129—133.
47. Cortese-Krott M.M., Rodriguez-Mateos A., Kuhnle G.G.C., Brown G., Feelisch M., Kelm M. A multilevel analytical approach for detection and visualization of intracellular NO production and nitrosation events using diamino fluoresceins. *Free Radical Biology and Medicine*. 2012. Vol. 53. P. 2146—2158.
48. Li H., Wan A. Fluorescent probes for real-time measurement of nitric oxide in living cells. *Analyst*. 2015. Vol. 140. P. 7129—7141.

49. Moller M.N., Rios N., Trujillo M., Radi R., Denicola A., Alvarez B. Detection and quantification of nitric oxide-derived oxidants in biological systems. *Journal of Biological Chemistry*. 2019. Vol. 294, N 40. P. 14776–14802.
50. Mollard P., Mironneau J., Amedee T. et al. Electrophysiological characterization of single pregnant rat myometrial cells in short-term primary culture. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 1986. Vol. 250, N 1. P. C47–C54.
51. Бабич Л.Г., Шлыков С.Г., Борисова Л.А., Костерин С.А. Энергозависимый транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  во внутриклеточных структурах гладкой мышцы. *Биохимия*. 1994. Т. 9. № 8. С. 1218–1229.
52. Шлыков С.Г., Бабич Л.Г., Костерин С.А. Суспензия гладкомышечных клеток, обработанных раствором дигитонина, как модель для изучения кальциевого насоса эндоплазматического ретикулума миомерии. *Биохимия*. 1997. Т. 62. № 12. С. 1666–1671.
53. Vitecek J., Lojek A., Valacci G., Kubala L. Arginine-based inhibitors of nitric oxide synthase: therapeutic potential and challenges. *Mediators of Inflammation*. 2012. Article ID 318087.
54. Fiskum G. Intracellular levels and distribution of  $\text{Ca}^{2+}$  in digitonin-permeabilised cell. *Cell Calcium*. 1985. Vol. 6, N 1-2. P. 25–27.
55. Duran W.N., Breslin J.W., Sanchez F.A. The NO cascade, eNOS location, and microvascular permeability. *Cardiovascular Research*. 2010. Vol. 87. P. 254–261.
56. Ghimire K., Altmann H.M., Straub A.C., Isenberg J.S. Nitric oxide: what's new to NO? *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 2017. Vol. 312. P. C254–C262.
57. Bovo E., Mazurek S.R., Blatter L.A., Zima A.V. Regulation of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  leak by cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  in rabbit ventricular myocytes. *The Journal of Physiology*. 2011. Vol. 589, N 24. P. 6039–6050.
58. Szydłarska J., Weiss C., Marycz K. The Effect of Methyl- $\beta$ -cyclodextrin on Apoptosis, Proliferative Activity, and Oxidative Stress in Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells of Horses Suffering from Metabolic Syndrome (EMS). *Molecules*. 2018. Vol. 23, N. 2. P. E287.
59. Yang Q., Miyagawa M., Liu X., Zhu B., Munemasa S., Nakamura T., Murata Y., Nakamura Y. Methyl- $\beta$ -cyclodextrin potentiates the BITC-induced anti-cancer effect through modulation of the Akt phosphorylation in human colorectal cancer cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2018. P. 1–10.
60. Buckman J.F., Hernández H., Kress G.J., Votyakova T.V., Pal S., Reynolds I.J. Mitotracker labeling in primary neuronal and astrocytic cultures: influence of mitochondrial membrane potential and oxidants. *Journal of Neuroscience Methods*. 2001. Vol. 104, N 2. P. 165–176.
61. Valdez L.B., Zaobornyj T., Alvarez S., Bustamante J., Costa L.E., Boveris A. Heart mitochondrial nitric oxide synthase. Effects of hypoxia and aging. *Molecular Aspects of Medicine*. 2004. Vol. 25. P. 49–59.
62. Костерин С.А., Браткова Н.Ф., Курский М.Д. Роль сарколеммы и митохондрий в обеспечении кальциевого контроля расслабления миомерии. *Биохимия*. 1985. Т. 50. № 8. С. 1350–1361.
63. Cortese-Krott M.M., Rodriguez-Mateos A., Kuhnle G.G.C., Brown G., Feelisch M., Kelm M. A multilevel analytical approach for detection and visualization of intracellular NO production and nitrosation events using diaminofluoresceins. *Free Radical Biology and Medicine*. 2012. Vol. 53. P. 2146–2158.
64. Crabtree M.J., Tatham A.L., Al-Wakeel Y., Warrick N., Hale A.B., Cai S., Channon K.M., Alp N.J. Quantitative Regulation of Intracellular Endothelial Nitric-oxide Synthase (eNOS) Coupling by Both Tetrahydrobiopterin-eNOS Stoichiometry and Biopterin Redox Status. *Journal of Biological Chemistry*. 2009. Vol. 284, N 2. P. 1136–1144.
65. Talib J., Kwan J., Suryo Rahmanto A., Witting P.K., Davies M.J. The smoking-associated oxidant hypothiocyanous acid induces endothelial nitric oxide synthase dysfunction. *Biochemical Journal*. 2014. Vol. 457. P. 89–97.
66. Agarwal B., Dash R.K., Stowe D.F., Bosnjak Z.J., Camara A.K. Isoflurane modulates cardiac mitochondrial bioenergetics by selectively attenuating respiratory complexes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2014. Vol. 1837, N 3. P. 354–365.
67. Haggmann W.K., Caldwell C.G., Chen P., Durette P.L., Esser C.K., Lanza T.J., Kopka I.E., Guthikonda R., Shah S.K., MacCoss M., Chabin R.M., Fletcher D., Grant S.K., Gre-

- en B.G., Humes J.L., Kelly T.M., Luell S., Meurer R., Moore V., Pacholok S.G., Pavia T., Williams H.R., Wong K.K. Substituted 2-aminopyridines as inhibitors of nitric oxide synthases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2000. Vol. 10. P. 1975—1978.
68. Kang S., Li H., Tang W., Martásek P., Roman L.J., Poulos T.L., Silverman R.B. 2-Aminopyridines With a Truncated Side Chain To Improve Human Neuronal Nitric Oxide Synthase Inhibitory Potency and Selectivity. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2015. Vol. 58, N 14. P. 5548—5560.
69. Tica V.I., Tica A.A., Carling V., Banica O.S. Magnesium ion inhibits spontaneous and induced contractions of isolated uterine muscle. *Gynecological Endocrinology*. 2007. Vol. 23, N 7. P. 368—372.
70. Fomin V.P., Gibbs S.G., Vanam R., Morimiya A., Hurd W.W. Effect of magnesium sulfate on contractile force and intracellular calcium concentration in pregnant human myometrium. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2006. Vol. 194, N 5. P. 1384—1390.
71. Костерин С.А., Бурдыга Ф.В. Транспорт и внутриклеточный гомеостаз  $\text{Ca}^{2+}$  в миомерии. *Успехи современной биологии*. 1993. Т. 113. № 4. С. 485—506.
72. Бабич Л.Г., Борисова Л.А., Шлыков С.Г., Титус О.В., Костерин С.А. Эффект ионов Mg и спермина на АТР-зависимый транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  в внутриклеточных структурах миомерии. I. Сравнительное исследование аккумуляции  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях и саркоплазматическом ретикулуме. *Український біохімічний журнал*. 2004. Т. 76, № 5. С. 52—60.
73. Веклич Т.О., Костерин С.О., Шинлова О.П. Катіонна специфічність системи аккумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях клітин міомерии. *Український біохімічний журнал*. 2002. Т. 74. № 1. С. 42—48.
74. Шинлова О.П., Костерин С.А., Веклич Т.А. Подавляемый рутениевым красным энергозависимый и пассивный транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  в пермеабиллизированных гладкомышечных клетках. *Биохимия*. 1996. Т. 61. № 8. С. 1440—1447.
75. Alevriadou B.R., Patel A., Noble M., Ghosh S., Gohil V.M., Stathopoulos P.B., Madesh M. Molecular nature and physiological role of the mitochondrial calcium uniporter channel. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 2021. Vol. 320. P. C465—C482.
76. Pallafacchina G., Zanin S., Rizzuto R. From the Identification to the Dissection of the Physiological Role of the Mitochondrial Calcium Uniporter: An Ongoing Story. *Biomolecules*. 2021. Vol. 11. P. 786.
77. Nowikovsky K., Pozzan T., Rizzuto R., Scorrano L., Bernardi P. The Pathophysiology of LETM1. *The Journal of General Physiology*. 2012. Vol. 139, N 6. P. 445—454.
78. Lin Q.-T., Stathopoulos P.B. Molecular Mechanisms of Leucine Zipper EF-Hand Containing Transmembrane Protein-1 Function in Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. Vol. 20. P. 286.
79. Natarajan G.K., Mishra J., Camara A.K.S., Kwok W.-M. LETM1: A Single Entity With Diverse Impact on Mitochondrial Metabolism and Cellular Signaling. *Frontiers in Physiology*. 2021. Vol. 12. P. 637852.
80. Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*. 2001. Vol. 357: P. 593—615.
81. Forstermann U., Sessa W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*. 2012. Vol. 33. P. 829—837.
82. Moreau B., Nelson C., Parekh A.B. Biphasic regulation of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. *Current Biology*. 2006. Vol. 16, N 16. P. 1672—1677.
83. Satrústegui J., Pardo B., Del Arco A. Mitochondrial transporters as novel targets for intracellular calcium signaling. *Physiological Reviews*. 2007. Vol. 87, N 1. P. 29—67.
84. Бабич Л.Г., Шликов С.Г., Наумова Н.В., Костерин С.О. Використання методу протокової цитометрії для визначення вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях та впливу на нього антагоністів кальмодуліну. *Український біохімічний журнал*. 2008. Т. 80. № 4. С. 51—58.
85. Шликов С.Г., Бабич Л.Г., Євтушенко М.Є., Карахім С.О., Костерин С.О. Модуляція мембранного потенціалу митохондрій міомерии антагоністами кальмодуліну. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2014. Vol. 86, N 1. P. 29—41.
86. Shlykov S.G., Babich L.G., Yevtushenko M.E., Karakhim S.O., Kosterin S.O. Calmodulin antagonists effect on  $\text{Ca}^{2+}$  level in the mitochondria and cytoplasm of myometrium cells. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2015. Vol. 87, N 5. P. 54—60.



87. Sobieszek A. Calmodulin antagonist action in smooth-muscle myosin phosphorylation. Different mechanisms for trifluoperazine and calmidazolium inhibition. *Biochemical Journal*. 1989. Vol. 262, N 1. P. 215–223.
88. James L.R., Griffiths C.H., Garthwaite J., Bellamy T.C. Inhibition of nitric oxide-activated guanylyl cyclase by calmodulin antagonists. *British Journal of Pharmacology*. 2009. Vol. 158, N 6. P. 1454–1464.
89. Chance B., Williams G.R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state. *Journal of Biological Chemistry*. 1955. Vol. 217. P. 409–427.
90. Boveris A., Valdez L.B., Zaborny T., Bustamante J. Mitochondrial metabolic states regulate nitric oxide and hydrogen peroxide diffusion to the cytosol. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006. Vol. 1757, N 5-6. P. 535–542.
91. Brown G.C., Borutaite V. Nitric oxide and mitochondrial respiration in the heart. *Cardiovascular Research*. 2007. Vol. 75, N 2. 283–290.
92. Dedkova E.N., Blatter L.A. Measuring mitochondrial function in intact cardiac myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2012. Vol. 52, N 1. P. 48-61.
93. Bernardi P. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. *Journal of Biological Chemistry*. 1992. Vol. 267. P. 8834–8839.
94. Murphy E., Eisner D.A. Regulation of intracellular and mitochondrial Na in health and disease. *Circulation Research*. 2009. Vol. 104, N 3. P. 292–303.
95. Гривенникова В.Г., Виноградов А.Д. Генерация активных форм кислорода митохондриями. *Успехи биологической химии*. 2013. Т. 53. С. 245–296.
96. Chen Y.-R., Zweier J.L. Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation. *Circulation Research*. 2014. Vol. 114. P. 524–237.
97. Вадзюк О.Б. АТФ-чутливі K<sup>+</sup>-канали м'язових клітин: властивості та фізіологічна роль. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2014. Vol. 86, N 3. P. 5–22.
98. Szabo I., Zoratti M. Mitochondrial channels: ion fluxes and more. *Physiological Reviews*. 2014. Vol. 94, N 2. P. 519–608.
99. Kaasik A., Safiulina D., Zharkovsky A., Veksler V. Regulation of mitochondrial matrix volume. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 2007. Vol. 292. P. C157–C163.
100. Nowikowski K., Schweyen R.J., Bernardi P. Pathophysiology of mitochondrial volume homeostasis: potassium transport and permeability transition. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009. Vol. 1787, N 5. P. 345–350.
101. Струтинська Н. А., Струтинський Р. Б., Чорна С. В., Семенихіна О. М., Мись Л. А., Мойбенко О. О., Сагач В. Ф. Нові фторвмісні активатори аденозинтрифосфат-чутливих кальєвих каналів флокалін і тіофлокалін пригнічують кальційіндуковане відкриття митохондриальної пори у серці щурів *Фізіологічний журнал*. 2013. Т. 59. № 6. С. 3–11.
102. Danylovyh Yu.V., Chunikhin A.Y., Danylovyh G.V., Kolomiets O.V. The use of the Petri net method in the simulation modeling of mitochondrial swelling. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2016. Vol. 88, N 4. P. 66–74.
103. Nowikovsky K., Pozzan T., Rizzuto R., Scorrano L., Bernardi P. The Pathophysiology of LETM1. *The Journal of General Physiology*. 2012. Vol. 139, N 6. P. 445–454.
104. Santo-Domingo J., Demarex N. Calcium uptake mechanisms of mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010. Vol. 1797, N 6-7. P. 907–912.
105. Dimmer K.S., Navoni F., Casarin A., Trevisson E., Endeles S., Winterpacht A., Salvati L., Scorrano L. LETM1, deleted in Wolf-Hirschhorn syndrome is required for normal mitochondrial morphology and cellular viability. *Human Molecular Genetics*. 2008. Vol. 17, N 2. P. 201–214.
106. Bae H., Choi J., Kim Y.-W., Lee D., Kim J.-H., Ko J.-H., Bang H., Kim T., Lim I. Effects of Nitric Oxide on Voltage-Gated K<sup>+</sup> Currents in Human Cardiac Fibroblasts through the Protein Kinase G and Protein Kinase A Pathways but Not through S-Nitrosylation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018. Vol. 19. P. 814.
107. Walewska A., Szweczyk A., Koprowski P. Gas Signaling Molecules and Mitochondrial Potassium Channels. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018. Vol. 19, N 10. P. 3227.

108. Bai Y., Murakami M.H., Iwasa M., Sumi S., Yamada Y., Ushikoshi H., Aoyama T., Nishigaki K., Takemura G., Uno B., Minatoguchi S. Cilostazol protects the heart against ischaemia reperfusion injury in a rabbit model of myocardial infarction: focus on adenosine, nitric oxide and mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2011. Vol. 38, N 10. P. 658–665.
109. Braun T., Dods R.F. Development of a Mn-2+-sensitive, “soluble” adenylyl cyclase in rat testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1975. Vol. 72, N 3. P. 1097–1101.
110. Litvin T.N., Kamenetsky M., Zarifyan A., Buck J., Levin L.R. Kinetic properties of “soluble” adenylyl cyclase. Synergism between calcium and bicarbonate. *Journal of Biological Chemistry*. 2003. Vol. 278, N 18. P. 15922–15926
111. Zippin J.H., Chen Y., Nahirney P., Kamenetsky M., Wuttke M.S., Fischman D.A., Levin L.R., Buck J. Compartmentalization of bicarbonate-sensitive adenylyl cyclase in distinct signaling microdomains. *FASEB Journal*. 2003. Vol. 17, N 1. P. 82–84.
112. Valsecchi F., Ramos-Espiritu L.S., Buck J., Levin L.R., Manfredi G. cAMP and Mitochondria. *Physiology (Bethesda)*. 2013. Vol. 28, N 3. P. 199–209.
113. Valsecchi F., Konrad C., Manfredi G. Role of soluble adenylyl cyclase in mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2014. Vol. 1842, N 12, Pt. B. P. 2555–2560.
114. Di Benedetto G.D., Lefkimmiatis K., Pozzan T. The basics of mitochondrial cAMP signalling: where, when, why. *Cell Calcium*. 2021. Vol. 93. P. 102320.
115. Amer Y.O., Hebert-Chatelain E. Mitochondrial cAMP-PKA signaling: What do we really know? *Biochimica et Biophysica Acta. Bioenergetics*. 2018. Vol. 1859. P. 868–877.
116. Modis K., Panopoulos P., Coletta C., Papapetropoulos A., Szabo C. Hydrogen sulfide-mediated stimulation of mitochondrial electron transport involves inhibition of the mitochondrial phosphodiesterase 2A, elevation of cAMP and activation of protein kinase A. *Biochemical Pharmacology*. 2013. Vol. 86. P. 1311–1319.
117. Covian Raul, Balaban R.S. Cardiac mitochondrial matrix and respiratory complex protein phosphorylation. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. 2012. Vol. 303. P. H940–H966.
118. Zhao X., Leon I.R., Bak S., Mogensen M., Wrzesinski K., Hojlund K., Jensen O.N. Phosphoproteome analysis of functional mitochondria isolated from resting human muscle reveals extensive phosphorylation of inner membrane protein complexes and enzymes. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2011. Vol. 10, N 1. P. M110.000299.
119. Hurley J.H. Structure, Mechanism, and Regulation of Mammalian Adenylyl Cyclase. *The Journal of Biological Chemistry*. 1999. Vol. 274, N 12. P. 7599–7602.
120. Bitterman J.L., Ramos-Espiritu L., Diaz A., Levin L.R., Buck J. Pharmacological Distinction between Soluble and Transmembrane Adenylyl Cyclases. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2013. Vol. 347. P. 589–598.
121. Liu C., Ke P., Zhang J., Zhang X., Chen X. Protein Kinase Inhibitor Peptide as a Tool to Specifically Inhibit Protein Kinase A. *Frontiers in Physiology*. 2020. Vol. 11. Article 574030.
122. Wiggins S.V., Steegborn C., Levin L.R., Buck J. Pharmacological modulation of the CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/pH-, calcium-, and ATP-sensing soluble adenylyl cyclase. *Pharmacology & Therapeutics*. 2018. Vol. 190. P. 173–186.
123. Veloso C., Rodrigues V.G., Ferreira R.C.M., Duarte L.P., Klein A., Duarte I.D., Romero T.R.L., Perez A.C. Tingenone, a pentacyclic triterpene, induces peripheral antinociception due to NO/cGMP and ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels pathway activation in mice. *European Journal of Pharmacology*. 2015. Vol. 755. P. 1–5.
124. Tresguerres M., Levin L.R., Buck J. Intracellular cAMP signaling by soluble adenylyl cyclase. *Kidney International*. 2011. Vol. 79, N 12. P. 1277–1288.
125. Di Benedetto G., Scalzotto E., Mongillo M., Pozzan T. Mitochondrial Ca(2+)(+) uptake induces cyclic AMP generation in the matrix and modulates organelle ATP levels. *Cell metabolism*. 2013. Vol. 17. P. 965–975.
126. Nadeem L., Shynlova O., Mesiano S., Lye S. Progesterone Via its Type-A Receptor Promotes Myometrial Gap Junction Coupling. *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7, N 1. P. 13357.

127. Karasinski J., Galas J., Semik D., Fiertak A., Bilinska B., Kilarski W.M. Changes of connexin 43 expression in non-pregnant porcine myometrium correlate with progesterone concentration during oestrous cycle. *Reproduction in Domestic Animals*. 2010. Vol. 45, N 6. P. 959–966.
128. Wray S., Prendergast C. The Myometrium: From Excitation to Contractions and Labour. Springer Nature Singapore Pte Ltd. H. Hashitani, R.J. Lang (eds.), Smooth Muscle Spontaneous Activity, Advances in Experimental Medicine and Biology. 2019. 1124 p.
129. Mitchell B.F., Aguilar H.N., Mosher A., Wood S., Slater D.M. The uterine myocyte as a target for prevention of preterm birth. *Facts, Views and Vision in Obstetrics and Gynaecology*. 2013. Vol. 5, N 1. P. 72–81.
130. Aguilar H.N., Mitchell B.F. Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility. *Human Reproduction Update*. 2010. Vol. 16, N 6. P. 725–744.
131. Bezprozvanny I. Inositol 1,4,5-triphosphate receptor, calcium signalling and huntington's disease. *Subcellular Biochemistry*. 2007. Vol. 45. P. 323–335.
132. Chalmers S., Olson M.L., MacMillan D., Rainbow R.D., McCarron J.G. Ion channels in smooth muscle: regulation by the sarcoplasmic reticulum and mitochondria. *Cell Calcium*. 2007. Vol. 42, N 4-5. P. 447–466.
133. Arthur P., Taggart M.J., Zeilnik B., Wong S., Mitchell B.F. Relationship between gene expression and function of uterotonic systems in rat gestation, uterine activation and both term and preterm labour. *The Journal of Physiology*. 2008. Vol. 586, N 24. P. 6063–6076.
134. Trebak M., Ginnan R., Singer H.A., Jourd'heuil D. Interplay between calcium and reactive oxygen/nitrogen species: an essential paradigm for vascular smooth muscle signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2010. Vol. 12, N 5. P. 657–673.
135. Sakurada S., Okamoto H., Takawa N., Sugimoto N., Takawa Y. Rho activation in excitatory agonist-stimulated vascular smooth muscle. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 2001. Vol. 281, N 2. P. C571–C578.
136. Van Bavel E., van der Meulen E.T., Spaan J.A. Role of Rho-associated protein kinase in tone and calcium sensitivity of cannulated rat mesenteric small arteries. *Experimental Physiology*. 2001. Vol. 86, N 5. P. 585–592.
137. Liu Z., Khalil R.A. Evolving Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Contraction Highlight Key Targets in Vascular Disease. *Biochemical Pharmacology*. 2018. Vol. 153. P. 91–122.
138. Aguilar H.N., Tracey C.N., Zielnik B., Mitchell B.F. Rho-kinase mediates diphosphorylation of myosin regulatory light chain in cultured uterine but not vascular smooth muscle cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2012. Vol. 16, N 12. P. 2978–2989.
139. Szasz T., Webb R.C. Rho-Mancing to Sensitize Calcium Signaling for Contraction in the Vasculature: Role of Rho Kinase. *Advances in Pharmacology*. 2017. Vol. 78. P. 303–322.
140. Alotaibi M.F. The response of rat and human uterus to oxytocin from different gestation stages in vitro. *General Physiology and Biophysics*. 2017. Vol. 36. P. 75–82.
141. Garfield R.E., Saade G., Buhimschi C., Buhimschi I., Shi L., Shi S.Q., Chwalisz K. Control and assessment of the uterus and cervix during pregnancy and labour. *Human Reproduction Update*. 1998. Vol. 4, N 5. P. 673–695.
142. Tarasova N.V., Vishnyakova P.A., Logashina Yu.A., Elchaninov A.V. Mitochondrial Calcium Uniporter structure and function in different types of muscle tissues in health and disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. Vol. 20, N 19. P. 4823.

### До розділу 3

1. Raiagopal S., Ponnusamy M. Calcium signaling: from physiology to diseases. Springer. 2017.
2. Aguilar H.N., Mitchell B.F. Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility. *Human Reproduction Update*. 2010. Vol. 16, N 6. P. 725–744.
3. Zhao C., Wu A.Y.-H., Yu X., Gu Y., Lu Y., Song X., An N., Zhang Y. Microdomain elements of airway smooth muscle in calcium regulation and cell proliferation. *Journal of Physiology and Pharmacology Advances*. 2018. Vol. 69, N 2. P. 151–163.
4. George A.L. Jr., Knittle T.J., Tamkun M.M. Molecular cloning of an atypical voltage-gated sodium channel expressed in human heart and uterus: evidence for a distinct gene family. *Proceedings of the National Academy of the USA*. 1992. Vol. 11. P. 4893–4897.

5. Boyle M.B., Heslip L.A. Voltage-dependent Na<sup>+</sup> channel mRNA expression in pregnant myometrium. *Receptors and Channels*. 1994. Vol. 3. P. 249–253.
6. Campbell A. Intracellular calcium. Springer. 2015.
7. Wray S., Prendergast C. The Myometrium: From Excitation to Contractions and Labour. Springer Nature Singapore Pte Ltd. H. Hashitani, R. J. Lang (eds.), Smooth Muscle Spontaneous Activity, Advances in Experimental Medicine and Biology. 2019. 1124 p.
8. Reinl E.L., Zhao P., Wu W., Ma X., Amazu C., Bok R., Hurt K.J., Wang Y., England S.K. Na<sup>+</sup>-Leak Channel, Non-Selective (NALCN) Regulates Myometrial Excitability and Facilitates Successful Parturition. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018. Vol. 48. N 2. P. 503–515.
9. Lorca R.A., Prabakaran M., England S.K. Functional insights into modulation of BKCa channel activity to alter myometrial contractility. *Frontiers in Physiology*. 2014. Vol. 5. Article 289.
10. Koval O.M., Fan Y., Rothberg B.S. A role for the S0 transmembrane segment in voltage-dependent gating of BK channels. *The Journal of General Physiology*. 2007. Vol. 129, N 3. P. 209–220.
11. Cui J., Yang H., Lee U.S. Molecular mechanisms of BK channel activation. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2009. Vol. 66, N 5. P. 852–75.
12. Vetter S.W., Leclerc E. Novel aspects of calmodulin target recognition and activation. *European Journal of Biochemistry*. 2003. Vol. 270. P. 404–414.
13. Kim H., Oh K.H. Protein Network Interacting with BK Channels. *International Review of Neurobiology*. 2016. Vol. 128. P. 127–161.
14. Horrigan F.T. Perspectives on: conformational coupling in ion channels: conformational coupling in BK potassium channels. *The Journal of General Physiology*. 2012. Vol. 140, N 6. P. 625–634.
15. Daniel E.E., El-Yazbi A., Cho W.J. Caveolae and calcium handling, a review and a hypothesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2006. Vol. 10, N 2. P. 529–544.
16. Liu Z., Khalil R.A. Evolving Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Contraction Highlight Key Targets in Vascular Disease. *Biochemical Pharmacology*. 2018. Vol. 153. P. 91–122.
17. Zhang C., Wang L., Thomas S., Wang K., Lin D.-H., Rinehart J., Wang W.-H. Src family protein tyrosine kinase regulates the basolateral K channel in the distal convoluted tubule (DCT) by phosphorylation of KCNJ10 protein. *Journal of Biological Chemistry*. 2013. Vol. 288, N 36. P. 26135–26146.
18. Warsi J., Singh Y., Elvira B., Hosseinzadeh Z., Lang F. Regulation of Large Conductance Voltage- and Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channels by the Janus Kinase JAK3. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2015. Vol. 37, N 1. P. 297–305.
19. Wang L., Zhang C., Su X., Lin D.-H., Wang W. Caveolin-1 Deficiency Inhibits the Basolateral K<sup>+</sup> Channels in the Distal Convoluted Tubule and Impairs Renal K<sup>+</sup> and Mg<sup>2+</sup> Transport. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2015. Vol. 26, N 11. P. 2678–2690.
20. Muroph J., Maier L.S., Wagner S. CaMKII regulation of cardiac K channels. *Frontiers in Pharmacology*. 2014. Vol. 21, N 5. P. 20.
21. Hristov Kiril L., Amy C. Smith, Shankar P. Parajuli, John Malysz, and Georgi V. Petkov. Large-conductance voltage- and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel regulation by protein kinase C in guinea pig urinary bladder smooth muscle. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 2014. Vol. 306. P. C460–C470.
22. Behringer E.J., Hakim M.A. Functional Interaction among KCa and TRP Channels for Cardiovascular Physiology: Modern Perspectives on Aging and Chronic Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. Vol. 20. P. 1380.
23. Liu B., Shi R., Li X., Liu Y., Feng X., Chen X., Fan X., Zhang Y., Zhang W., Tang J., Zhou X., Li N., Lu X., Xu Z. Downregulation of L-Type Voltage-Gated Ca<sup>2+</sup>, Voltage-Gated K<sup>+</sup>, and Large-Conductance Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channels in Vascular Myocytes From Salt-Loading Offspring Rats Exposed to Prenatal Hypoxia. *Journal of the American Heart Association*. 2018. Vol. 7, N 6. P. e008148.
24. Jackson W.F. Potassium Channels in Regulation of Vascular Smooth Muscle Contraction and Growth. *Advances in Pharmacology*. 2017. Vol. 78. P. 89–144.
25. Bae H., Choi J., Kim Y.-W., Lee D., Kim J.-H., Ko J.-H., Bang H., Kim T., Lim I. Effects of Nitric Oxide on Voltage-Gated K<sup>+</sup> Currents in Human Cardiac Fibroblasts through the

Protein Kinase G and Protein Kinase A Pathways but Not through S-Nitrosylation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018. Vol. 19. P. 814.

26. Brainard A.M., Korovkina V.P., England S.K. Potassium channels and uterine function. *Seminars in Cell and Development Biology*. 2007. Vol. 18, N 3. P. 332–339.

27. Smith R.C., McClure M.C., Smith M.A., Abel P.W., Bradley M.E. The role of voltage-gated potassium channels in the regulation of mouse uterine contractility. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2007. Vol. 5. P. 41.

28. Noble K., Floyd R., Shmygol A., Shmygol A., Mobasheri A., Wray S. Distribution, expression and functional effects of small conductance Ca-activated potassium (SK) channels in rat myometrium. *Cell Calcium*. 2010. Vol. 47, N 1. P. 47–54.

29. Ferreira J.J., Butler A., Stewart R., Gonzalez-Cota A.L., Lybaert P., Amazu C., Reinl E.L., Wakle-Prabakaran M., Salkoff L., England S.K., Santi C.M. Oxytocin can regulate myometrial smooth muscle excitability by inhibiting the Na<sup>+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel, Slo2.1. *The Journal of Physiology*. 2019. Vol. 597, N 1. P. 137–149.

30. Jones K., Shmygol A., Kupittayanant S., Wray S. Electrophysiological characterization and functional importance of calcium-activated chloride channel in rat uterine myocytes. *Pflügers Archiv*. 2004. Vol. 1. P. 36–43.

31. Sommer B., Flores-Soto E., Gonzalez-Avila G. Cellular Na<sup>+</sup> handling mechanisms involved in airway smooth muscle contraction. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017. Vol. 40, N 1. P. 3–9.

32. Zhang L., Staehra C., Zeng F., Bouzinovaa E.V., Matchkov V.V. The Na,K-ATPase in vascular smooth muscle cells. *Current Topics in Membranes*. 2019. Vol. 83. P. 152–175.

33. Orlov S.N., Platonova A.A., Hamet P., Grygorczyk R. Cell volume and monovalent ion transporters: their role in cell death machinery triggering and progression. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 2013. Vol. 305. P. C361–C372.

34. Scheiner-Bobis G. The sodium pump. Its molecular properties and mechanics of ion transport. *European Journal of Biochemistry*. 2002. Vol. 269. P. 2424–2433.

35. Sweadner K.J., Donnet C. Structural similarities of Na,K-ATPase and SERCA, the Ca<sup>2+</sup>-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Biochemical Journal*. 2001. Vol. 356. P. 685–704.

36. Despa S., Bers D.M. Na<sup>+</sup> transport in the normal and failing heart – remember the balance. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2013. Vol. 61. P. 2–10.

37. Schoner W. Endogenous cardiac glycosides, a new class of steroid hormones. *European Journal of Biochemistry*. 2002. Vol. 269. P. 2440–2448.

38. Webb R.C. Smooth muscle contraction and relaxation. *Advances in Physiology Education*. 2003. Vol. 27, N 4. P. 201–206.

39. Matthew A., Shmygol A., Wray S. Ca<sup>2+</sup> entry, efflux and release in smooth muscle. *Biological Research*. 2004. Vol. 37, N 4. P. 617–624.

40. Sanders K.M. Mechanisms of calcium handling in smooth muscles. *Journal of Applied Physiology*. 2001. Vol. 91, N 3. P. 1438–1449.

41. Chalmers S., Olson M.L., MacMillan D., Rainbow R.D., McCarron J.G. Ion channels in smooth muscle: regulation by the sarcoplasmic reticulum and mitochondria. *Cell Calcium*. 2007. Vol. 42, N 4-5. P. 447–466.

42. Wray S., Kupittayanant S., Shmygol A., Smith R.D., Burdyga T. The physiological basis of uterine contractility: a short review. *Experimental Physiology*. 2001. Vol. 86, N 2. P. 239–246.

43. Corbett E.F., Michalak M. Calcium, a signaling molecule in the endoplasmic reticulum? *Trends in Biochemical Sciences*. 2000. Vol. 25, N 7. P. 307–311.

44. Bravo-Sagua R., Parra V., Mucoz-Cordova F., Sanchez-Aguilera P., Garrido V., Contreras-Ferrat A., Chiong M., Lavandero S. Sarcoplasmic reticulum and calcium signaling in muscle cells: Homeostasis and disease. *International Review of Cell and Molecular Biology*. 2020. Vol. 350. P. 197–264.

45. Manoury B., Idres S., Leblais V., Fischmeister R. Ion channels as effectors of cyclic nucleotide pathways: Functional relevance for arterial tone regulation. *Pharmacology & Therapeutics*. 2020. Vol. 209. P. 107499.

46. Krauss G. Biochemistry of Signal Transduction and Regulation Fifth, Completely Revised Edition. Wiley-VCH, Verlag GmbH&Co.KGAA, 2014, 815 p.

47. Trebak M., Ginnan R., Singer H.A. [et al.]. Interplay between calcium and reactive oxygen/nitrogen species: an essential paradigm for vascular smooth muscle signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2010. Vol. 12, N 5. P. 657—673.
48. Berridge M.J. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. *The Journal of Physiology*. 2008. Vol. 586, Pt. 21. P. 5047—5061.
49. Venkatachalam K., van Rossum D.B., Patterson R.L. [et al.]. The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry. *Nature Cell Biology*. 2002. Vol. 4, N 11. P. 263—272.
50. Parekh A.B., Putney J.W.Jr. Store-operated calcium channels. *Physiological Reviews*. 2005. Vol. 85, N 2. P. 757—810.
51. Шликов С.Г. Окситоцин та його роль у контролі внутрішньоклітинного рівня іонів кальцію в міометрії. *Український біохімічний журнал*. 2010. Т. 82. № 2. С. 5—17.
52. Mitchell B.F., Aguilar H.N., Mosher A., Wood S., Slater D.M. The uterine myocyte as a target for prevention of preterm birth. *Facts, Views and Vision in Obstetrics and Gynaecology*. 2013. Vol. 5, N 1. P. 72—81.
53. Sakurada S., Okamoto H., Takuwa N., Sugimoto N., Takuwa Y. Rho activation in excitatory agonist-stimulated vascular smooth muscle. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 2001. Vol. 281, N 2. P. C571—C578.
54. Van Bavel E., van der Meulen E.T., Spaan J.A. Role of Rho-associated protein kinase in tone and calcium sensitivity of cannulated rat mesenteric small arteries. *Experimental Physiology*. 2001. Vol. 86, N 5. P. 585—592.
55. Chang Y., Auradé F., Larbret F., Zhang Y., Le Couedic J.-P., Momeux L., Larghero J., Bertoglio J., Louache F., Cramer E., Vainchenker W., Debili N. Proplatelet formation is regulated by the Rho/ROCK pathway. *Blood*. 2007. Vol. 109, N 10. P. 4229—4236.
56. Hilgers R.H.P., Webb R.C. Molecular aspects of arterial smooth muscle contraction: focus on Rho. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*. 2005. Vol. 230, N 11. P. 829—835.
57. Mizuno Y., Isotani E., Huang J., Ding H., Stull J.T., Kamm K.E. Myosin light chain kinase activation and calcium sensitization in smooth muscle in vivo. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 2008. Vol. 295, N 2. P. C358—C364.
58. Aguilar H.N., Tracey C.N., Zielnik B., Mitchell B.F. Rho-kinase mediates diphosphorylation of myosin regulatory light chain in cultured uterine but not vascular smooth muscle cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2012. Vol. 16, N 12. P. 2978—29789.
59. Szasz T., Webb R.C. Rho-Mancing to Sensitize Calcium Signaling for Contraction in the Vasculature: Role of Rho Kinase. *Advances in Pharmacology*. 2017. Vol. 78. P. 303—322.
60. Chakraborti S., Dhalla N.S. Regulation of Ca<sup>2+</sup>-ATPases, V-ATPases and F-ATPases. Springer, 2016.
61. Vallot O., Combettes L., Lompre A.-M. Functional coupling between the caffeine/ryanodine-sensitive Ca<sup>2+</sup> store and mitochondria in rat aortic smooth muscle cells. *Biochemical Journal*. 2001. Vol. 357, Pt. 2. P. 363—371.
62. Lee S.E., Ahn D.S., Lee Y.H. Role of T-type Ca Channels in the Spontaneous Phasic Contraction of Pregnant Rat Uterine Smooth Muscle. *Korean Journal of Physiology & Pharmacology*. 2009. Vol. 13, N 3. P. 241—249.
63. Floyd R., Wray S. Calcium transporters and signalling in smooth muscles. *Cell Calcium*. 2007. Vol. 42, N 4-5. P. 467—476.
64. Hirota S., Helli P., Janssen L.J. Ionic mechanisms and Ca<sup>2+</sup> handling in airway smooth muscle. *European Respiratory Journal*. 2007. Vol. 30, N 1. P. 114—133.
65. Catterall W.A. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harbor Perspective in Biology*. 2011. Vol. 3, N 8. P. a003947.
66. Bovo E., Mazurek S.R., Blatter L.A., Zima A.V. Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak by cytosolic Ca<sup>2+</sup> in rabbit ventricular myocytes. *The Journal of Physiology*. 2011. Vol. 589, N 24. P. 6039—6050.
67. Albert A.P., Saleh S.N., Peppiatt-Wildman C.M., Large W.A. Multiple activation mechanisms of store-operated TRPC channels in smooth muscle cells. *The Journal of Physiology*. 2007. Vol. 583, Pt. 1. P. 25—36.
68. Bhardwaja R., Hedigera M.A., Demareux N. Redox modulation of STIM-ORAI signaling. *Cell Calcium*. 2016. Vol. 60. P. 142—152.

69. Sutovska M., Kocmalova M., Sadlonova V., Dokus K., Adamkov M., Luptak J., Franova S. Orail protein expression and the role of calcium release-activated calcium channels in the contraction of human term-pregnant and non-pregnant myometrium. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2015. Vol. 41, N 5. P. 704–711.
70. Chin-Smith E.C., Slater D.M., Johnson M.R., Tribe R.M. STIM and Orai isoform expression in pregnant human myometrium: a potential role in calcium signaling during pregnancy. *Frontiers in Physiology*. 2014. Vol. 5. P. 169.
71. Rizzuto R., Marchi S., Bonora M., Aguiary P., Bononi A. Ca<sup>2+</sup> transfer from the ER to mitochondria: When, how and why. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009. Vol. 1787, N 11. P. 1342–1351.
72. Noble K., Matthew A., Burdyga T., Wray S. A review of recent insights into the role of the sarcoplasmic reticulum and Ca entry in uterine smooth muscle. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2009. Vol. 144, Suppl. 1. P. S11–9.
73. Tribe R.M., Moriarty P., Dalrymple A., Hassoni A.A., Poston L. Interleukin-1beta induces calcium transients and enhances basal and store operated calcium entry in human myometrial smooth muscle. *Biology of Reproduction*. 2003. Vol. 68, N 5. P. 1842–1849.
74. Dalrymple A., Mahn K., Poston L., Songu-Mize E., Tribe R.M. Mechanical stretch regulates TRPC expression and calcium entry in human myometrial smooth muscle cells. *Molecular Human Reproduction*. 2007. Vol. 13, N 3. P. 171–179.
75. Chadwick D.J., Goode J.A. (Ed.). Role of the sarcoplasmic reticulum in smooth muscle. *Novartis Foundation Symposium*. John WILEY&SONS, LTD, 2002. 246 p.
76. Shmygol A., Wray S. Functional architecture of the SR calcium store in uterine smooth muscle. *Cell Calcium*. 2004. Vol. 35, N 6. P. 501–508.
77. Noble K., Zhang J., Wray S. Lipid rafts, the sarcoplasmic reticulum and uterine calcium signalling: an integrated approach. *The Journal of Physiology*. 2006. Vol. 570, Pt. 1. P. 29–35.
78. Beard N.A., Wei L., Dulhunty A.F. Control of muscle ryanodine receptor calcium release channels by proteins in the sarcoplasmic reticulum lumen. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2009. Vol. 36, N 3. P. 340–345.
79. Wray S., Shmygol A. Role of the calcium store in uterine contractility. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2007. Vol. 18, N 3. P. 315–320.
80. Mesonero J.E., Tanfin Z., Hilly M., Colosetti P., Mauger J.P., Harbon S. Differential expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor types 1, 2, and 3 in rat myometrium and endometrium during gestation. *Biology of Reproduction*. 2000. Vol. 63, N 2. P. 532–537.
81. Bezprozvanny I. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, calcium signalling and huntington's disease. *Subcellular Biochemistry*. 2007. Vol. 45. P. 323–335.
82. Arthur P., Taggart M.J., Zeilnik B., Wong S., Mitchell B.F. Relationship between gene expression and function of uterotonic systems in rat gestation, uterine activation and both term and preterm labour. *The Journal of Physiology*. 2008. Vol. 586, N 24. P. 6063–6076.
83. Martin C., Chapman K.E., Thornton S., Ashley R.H. Changes in the expression of myometrial ryanodine receptor mRNAs during human pregnancy. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1999. Vol. 1451, N 2-3. P. 343–352.
84. Matsuki K., Takemoto M., Suzuki Y., Yamamura H., Ohya S., Takeshima H., Imaizumi Y. Ryanodine receptor type 3 does not contribute to contractions in the mouse myometrium regardless of pregnancy. *Pflügers Archiv*. 2017. Vol. 469, N 2. P. 313–326.
85. Данилович Ю.В. Характеристики пасивного транспорту Ca з саркоплазматичного ретикулулу клітин міометрія щурів. *Фізіологічний журнал*. 2007. Т. 53, № 1. С. 55–61.
86. Laver D.R. Ca<sup>2+</sup> stores regulate ryanodine receptor Ca<sup>2+</sup> release channels via luminal and cytosolic Ca<sup>2+</sup> sites. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2007. Vol. 34. P. 889–896.
87. Sharma A., Nakade U.P., Choudhury S., Garg S.K. Functional involvement of protein kinase C, Rho-kinase and TRPC3 decreases while PLC increases with advancement of pregnancy in mediating oxytocin-induced myometrial contractions in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*. 2017. Vol. 92. P. 176–189.
88. Wray S. Calcium Signaling in Smooth Muscle. *Handbook of Cell Signaling*. 2010. P. 1009–1025.

89. Костерин С.А. Транспорт кальция в гладких мышцах. Киев: Наукова думка, 1990. 216 с.
90. Бабич Л.Г., Шлыков С.Г., Струтинская Н.А., Костерин С.А. Свойства кальциевого насоса эндоплазматического ретикулума гладкомышечных клеток. *Український біохімічний журнал*. 1999. Т. 71, № 2. С. 20—27.
91. Бурчинская Н.Ф., Костерин С.А., Бабич Л.Г. Синергизм энергозависимых кальциевых потоков через плазматическую мембрану гладкомышечных клеток. *Биохимия*. 1991. Т. 56. № 11. С. 2097—2110.
92. Carafoli E., Brini M. Calcium pumps: structural basis for and mechanism of calcium transmembrane transport. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2000. Vol. 4, N 2. P. 152—161.
93. Lee A.G., East J.M. What the structure of a calcium pump tells us about its mechanism. *Biochemical Journal*. 2001. Vol. 356, N 3. P. 665—683.
94. Векліч Т.О., Шкрабак О.А., Мазур Ю.Ю., Родік Р.В., Бойко В.І., Кальченко В.І., Костерін С.О. Кінетичні закономірності дії калікс[4]арену C-90 на  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРазу активність плазматичної мембрани та на концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  в незбуджених клітинах міометрія. *Український біохімічний журнал*. 2013. Т. 85. № 4. С. 20—29.
95. Костерин С.А., Бурдыга Ф.В. Транспорт и внутриклеточный гомеостаз  $\text{Ca}^{2+}$  в миомерии. *Успехи современной биологии*. 1993. Т. 113. № 4. С. 485—506.
96. Kosterin S.O. Kinetics and energetics of  $\text{Mg}^{2+}$ , ATP-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  transport in the plasma membrane of smooth muscle cells. *Нейрофизиология / Neurophysiology*. 2003. Т. 35, № ¾. С. 215—228.
97. Somlyo A.P., Wasserman A.J., Kitazawa T. Calcium and sodium distribution and movements in smooth muscle. *Experientia*. 1985. Vol. 41, N 8. P. 981—988.
98. Busa W.B. Mechanisms and consequences of pH-mediated cell regulation. *Annual Review of Physiology*. 1986. Vol. 48. P. 389—402.
99. Pierce S.J., Kupittayanant S., Shmygol T., Wray S. The effects of pH change on  $\text{Ca}(++)$  signaling and force in pregnant human myometrium. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2003. Vol. 188, N 4. P. 1031—1038.
100. Tribe R.M. Regulation of human myometrial contractility during pregnancy and labour: are calcium homeostatic pathway important? *Experimental Physiology*. 2001. Vol. 86, N 2. P. 247—254.
101. Caroni P., Zurini M., Clark A., Carafoli E. Further characterization and reconstitution of the purified  $\text{Ca}^{2+}$ -pumping ATPase of heart sarcolemma. *Journal of Biological Chemistry*. 1983. Vol. 58, N 1. P. 7305—7310.
102. Furukawa R.-J., Nakamura H. Characterization of the ( $\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+}$ ) ATPase purified by calmodulin-affinity chromatography from bovine aortic smooth muscle. *Journal of Biochemistry*. 1984. Vol. 96, N 5. P. 1343—1350.
103. Karaki H., Ozaki H., Hori M., Mitsui-Saito M., Amano K., Harada K., Miyamoto S., Nakazawa H., Won K.J., Sato K. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacological Reviews*. 1997. Vol. 49, N 2. P. 157—230.
104. Padanyi R., Paszty K., Penheiter A.R., Filoteo A.G., Penniston J.T., Enyedi A. Intramolecular interactions of the regulatory region with the catalytic core in plasma membrane calcium pump. *Journal of Biological Chemistry*. 2003. Vol. 278, N 37. P. 35798—35804.
105. Bruce J.I.E. Metabolic regulation of the PMCA: Role in cell death and survival. *Cell Calcium*. 2018. Vol. 69. P. 28—36.
106. Курский М.Д., Слинченко Н.Н., Любаковская Л.А. Реконструкция очищенной  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРазы сарколемы миометрия в липосомы и ее каталитические свойства. *Украинский биохимический журнал*. 1990. Т. 62, № 3. С. 66—71.
107. Любаковская Л.А., Слинченко Н.Н., Бурчинская Н.Ф., Курский М.Д. Каталитические свойства очищенной  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРазы сарколемы миометрия. *Биохимия*. 1990. Т. 55, № 7. С. 1237—1243.
108. Слинченко Н.Н., Любаковская Л.А., Курский М.Д., Сопель Л.В. Выделение и очистка  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРазы плазматических мембран миометрия. *Украинский биохимический журнал*. 1990. Т. 62. № 3. С. 60—65.



109. Костерин С.А., Браткова Н.Ф., Курский М.Д., Зими́на В.П. Свойства системы АТФ-зависимого транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  во фракции плазматических мембран клеток миомеритрия. *Биохимия*. 1983. Т. 48. № 2. С. 244–253.
110. Костерин С.А., Слинченко Н.Н., Гергалова Г.Л. Энергетические характеристики АТФ-гидролазной реакции, катализируемой солибулизированной  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазой плазматической мембраны гладкомышечных клеток. *Биохимия*. 1994. Т. 59, № 6. С. 889–904.
111. Костерин С.А., Браткова Н.Ф., Бабич Л.Г., Шинлова О.П., Слинченко Н.Н., Шлыков С.Г., Зими́на В.П., Ровенец Н.А., Веклич Т.А. Влияние ингибиторов энергозависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортирующих систем на кальциевые насосы гладкомышечной клетки. *Украинский биохимический журнал*. 1996. Т. 68, № 6. С. 50–61.
112. Carafoli E. The  $\text{Ca}^{2+}$ -pump of the plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry*. 1992. Vol. 267, N 4. P. 2115–2118.
113. Deliconstantinos G., Fotiou S. Effect of prostaglandins  $\text{E}_2$  and  $\text{F}_2$  alpha on membrane calcium binding,  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity and membrane fluidity in rat myometrial plasma membranes. *Journal of Endocrinology*. 1986. Vol. 110, N 3. P. 395–404.
114. Soloff M.S., Sweet P. Oxytocin inhibition of  $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -ATPase activity in rat myometrial plasma membranes. *Journal of Biological Chemistry*. 1982. Vol. 257, N 18. P. 10687–10693.
115. Chen H.H., Lin Y.R., Peng Q.G., Chan M.H. Effects of trichloroethylene and perchloroethylene on muscle contractile responses and epithelial prostaglandin release and acetylcholinesterase activity in swine trachea. *Toxicological Sciences*. 2005. Vol. 83, N 1. P. 149–154.
116. Chaudhary J., Walia M., Matharu J., Escher E., Grover A.K. Caloxin: a novel plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump inhibitor. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 2001. Vol. 280, N 4. P. C1027–C1030.
117. Holmes M.E., Chaudhary J., Grover A.K. Mechanism of action of the novel plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -pump inhibitor caloxin. *Cell Calcium*. 2003. Vol. 33, N 4. P. 241–245.
118. Pande J., Mallhi K.K., Grover A.K. A novel plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -pump inhibitor: caloxin 1A1. *European Journal of Pharmacology*. 2005. Vol. 508, N 1-3. P. 1–6.
119. Pande J., Mallhi K.K., Grover A.K. Role of third extracellular domen of plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase based on novel inhibitor caloxin 3A1. *Cell Calcium*. 2005. Vol. 37, N 3. P. 245–250.
120. Veklich T.O., Skrabak O.A., Nikonishyna Yu.V., Rodik R.V., Kalchenko V.I., Kosterin S.O. Calix[4]arene C-956 selectively inhibits plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase in myometrial cells. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2018. Vol. 90, N 5. P. 34–42.
121. Smeazzetto S., Armanious G.P., Moncelli M.R., Bak J.J., Lemieux M.J., Young H.S., Tadini-Buoninsegni F. Conformational memory in the association of the transmembrane protein phospholamban with the sarcoplasmic reticulum calcium pump SERCA. *Biological Chemistry*. 2017. Vol. 292, N 52. P. 21330–21339.
122. Zafar S., Hussain A., Liu Y., Lewis D., Inesi G. Specificity of ligand binding to transport sites:  $\text{Ca}^{2+}$  binding to the  $\text{Ca}^{2+}$  transport ATPase and its dependence on  $\text{H}^+$  and  $\text{Mg}^{2+}$ . *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2008. Vol. 476. P. 87–94.
123. Hovnanian A. SERCA pumps and human diseases. *Subcellular Biochemistry*. 2007. Vol. 45. P. 337–363.
124. Mattiazzi A., Mundina-Weilenmann C., Vittone L., Said M. Phosphorylation of phospholamban in ischemia-reperfusion injury: functional role of Thr17 residue. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2004. Vol. 263, N 1-2. P. 131–136.
125. Stammers A.N., Susser S.E., Hamm N.C., Hlynsky M.W., Kimber D.E., Kehler D.S., Duhamel T.A. The regulation of sarco(endo)plasmic reticulum calcium-ATPases (SERCA). *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2015. Vol. 93, N 10. P. 843–854.
126. Primeau J.O., Armanious G.P., Fisher M.E., Young H.S. The SarcoEndoplasmic Reticulum Calcium ATPase. *Subcellular Biochemistry*. 2018. Vol. 87. P. 229–258.
127. DeLuca H.F., Engstrom G.W. Calcium uptake by rat kidney mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1961. Vol. 47, N 11. P. 1744–1750.

128. Lehninger A.L., Rossi C.S., Greenawalt J.W. Respiration-dependent accumulation of inorganic phosphate and Ca ion by rat liver mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1963. Vol. 10, N 3. P. 444—448.
129. Carafoli E., Rossi C.S., Lehninger A.L. Uptake of adenine nucleotides by respiring mitochondria during active accumulation of Ca<sup>2+</sup> and phosphate. *Journal of Biological Chemistry*. 1965. Vol. 240, N 5. P. 2254—2261.
130. Bernardi P., Rasola A. Calcium and cell death: the mitochondrial connection. *Subcellular Biochemistry*. 2007. Vol. 45. P. 481—506.
131. Chalmers S., Nicholls D.G. The relationship between free and total calcium concentrations in the matrix of liver and brain mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. 2003. Vol. 278, N 21. P. 19062—19070.
132. Bootman M.D., Bultynck G. Fundamentals of Cellular Calcium Signaling: A Primer. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 2019. a038802.
133. Graier W.F., Frieden M., Malli R. Mitochondria and Ca<sup>2+</sup> signaling: old quests, new functions. *European Journal of Physiology*. 2007. Vol. 455, N 3. P. 375—396.
134. Bravo-Sagua R., Parra V., López-Crisosto C., Díaz P., Quest A.F.G., Lavandero S. Calcium Transport and Signaling in Mitochondria. *Comprehensive Physiology*. 2017. Vol. 7. P. 623—634.
135. Takeuchi A., Kim B., Matsuoka S. The destiny of Ca(2+) released by mitochondria. *Journal of Physiological Sciences*. 2015. Vol. 65, N 1. P. 11—24.
136. Pan S., Ryu S.-Y., Sheu S.-S. Distinctive characteristics and functions of multiple mitochondrial Ca<sup>2+</sup> influx mechanisms. *Science China Life Sciences*. 2011. Vol. 54, N 8. P. 763—769.
137. Szabadkai G., Duchen M.R. Mitochondria: The Hub of Cellular Ca<sup>2+</sup> Signaling. *Physiology*. 2008. Vol. 23. P. 84—94.
138. Szabo I., Zoratti M. Mitochondrial channels: ion fluxes and more. *Physiological Reviews*. 2014. Vol. 94. P. 519—608.
139. Rizzuto R., De Stefani D., Raffaello A., Mammucari C. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2012. Vol. 13. P. 566—578.
140. Zhao H., Pan X. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> and cell cycle regulation. *International Review of Cell and Molecular Biology*. 2021. Vol. 362. P. 171—207.
141. Drumm B.T., Rembetski B.E., Cobine C.A., Baker S.A., Sergeant G.P., Hollywood M.A., Thornbury K.D. Ca<sup>2+</sup> Signalling in Mouse Urethral Smooth Muscle in Situ: Role of Ca<sup>2+</sup> Stores and Ca<sup>2+</sup> Influx Mechanisms. *The Journal of Physiology*. 2018. Vol. 596. N 8. P. 1433—1466.
142. Burdyga T., Lang R.J. Excitation-Contraction Coupling in Ureteric Smooth Muscle: Mechanisms Driving Ureteric Peristalsis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2019. Vol. 1124. P. 103—119.
143. Berridge M.J. Inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Calcium Mobilization Is Localized in Xenopus Oocytes. *Proceeding of the Royal Society London B: Biological Sciences*. 1989. Vol. 238. N 1292. P. 235—43.
144. Dupont G., Berridge M.J., Goldbeter A. Signal-induced Ca<sup>2+</sup> Oscillations: Properties of a Model Based on Ca(2+)-induced Ca<sup>2+</sup> Release. *Cell Calcium*. 1991. Vol. 12, N 2-3. P. 73—85.
145. Dupont G., Pontes J., Goldbeter A. Modeling Spiral Ca<sup>2+</sup> Waves in Single Cardiac Cells: Role of the Spatial Heterogeneity Created by the Nucleus. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 1996. Vol. 271, N 4, Pt. 1. P. C1390—C1399.
146. Navarro-Dorado J., Garcia-Alonso M., van Breemen C., Tejerina T., Fameli N. Calcium Oscillations in Human Mesenteric Vascular Smooth Muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2014. Vol. 445, N 1. P. 84—88.
147. Jeffries O., McGahon M.K., Bankhead P., Lozano M.M., Scholfield C.N., Curtis T.M., McGeown J.G. cAMP/PKA-dependent Increases in Ca Sparks, Oscillations and SR Ca Stores in Retinal Arteriolar Myocytes After Exposure to Vasopressin. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2010. Vol. 51, N 3. P. 1591—1598.
148. Berridge M.J., Rapp P.E. A Comparative Survey of the Function, Mechanism and Control of Cellular Oscillators. *The Journal of Experimental Biology*. 1979. Vol. 81. P. 217—279.

149. Woods N.M., Cuthbertson K.S., Cobbold P.H. Repetitive transient rises in cytoplasmic free calcium in hormone-stimulated hepatocytes. *Nature*. 1986. Vol. 319, N 6054. P. 600–602.
150. Rooney T.A., Sass E.J., Thomas A.P. Characterization of cytosolic calcium oscillations induced by phenylephrine and vasopressin in single fura-2-loaded hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 1989. Vol. 264, N 29. P. 17131–17141.
151. Thomas A.P., Renard-Rooney D.C., Hajnyczky G., Robb-Gaspers L.D., Lin C., Rooney T.A. Subcellular Organization of Calcium Signalling in Hepatocytes and the Intact Liver. *Ciba Foundation Symposium*. 1995. Vol. 188. P. 18–35. Discussion 35–49.
152. Benninger R.K.P., Hutchens T., Head W.S., McCaughey M.J., Zhang M., Le Marchand S.J., Satin L.S., Piston D.W. Intrinsic Islet Heterogeneity and Gap Junction Coupling Determine Spatiotemporal  $\text{Ca}^{2+}$  Wave Dynamics. *Biophysical Journal*. 2014. Vol. 107, N 11. P. 2723–2733.
153. Das P.N., Mehrotra P., Mishra A., Bairagi N., Chatterjee S. Calcium Dynamics in Cardiac Excitatory and Non-Excitatory Cells and the Role of Gap Junction. *Mathematical Biosciences*. 2017. Vol. 289. P. 51–68.
154. Bolton T.B., Gordienko D.V., Povstyan O.V., Harhun M.I., Pucovsky V. Smooth Muscle Cells and Interstitial Cells of Blood Vessels. *Cell Calcium*. 2004. Vol. 35, N 6. P. 643–657.
155. Sanders K.M. Spontaneous Electrical Activity and Rhythmicity in Gastrointestinal Smooth Muscles. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2019. Vol. 1124. P. 3–46.
156. Bootman M.D., Roderick H.L., O'Connor R., Berridge M.J. Intracellular Calcium Signaling. *Handbook of Cell Signaling*. 2003. P. 51–56.
157. Bolton T.B., Gordienko D.V., Pucovsky V., Parsons S., Povstyan O. Calcium Release Events in Excitation-Contraction Coupling in Smooth Muscle. *Novartis Foundation Symposium*. 2002. Vol. 246, N 154–168. Discussion 168-173, 221-227.
158. Kotlikoff M.L., Wang Y.-X., Xin H.-B., Ji G. Calcium Release by Ryanodine Receptors in Smooth Muscle. *Novartis Foundation Symposium*. 2002. Vol. 246, N 108–119. Discussion 119-124, 221-227.
159. Pucovsky V., Gordienko D.V., Bolton T.B. Effect of nitric oxide donors and noradrenaline on  $\text{Ca}^{2+}$  release sites and global intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in myocytes from guinea-pig small mesenteric arteries. *The Journal of Physiology*. 2002. Vol. 539, Pt. 1. P. 25–39.
160. Borysova L., Dora K.A., Garland C.J., Burdyga T. Smooth Muscle Gap-Junctions Allow Propagation of Intercellular  $\text{Ca}^{2+}$  Waves and Vasoconstriction Due to  $\text{Ca}^{2+}$  Based Action Potentials in Rat Mesenteric Resistance Arteries. *Cell Calcium*. 2018. Vol. 75. P. 21–29.
161. Bryan N.S., Bian K., Murad F. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development. *Frontiers in Bioscience*. 2009. Vol. 14. P. 1–18.
162. Zima A.V., Blatter L.A. Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. *Cardiovascular Research*. 2006. Vol. 71, N 2. P. 310–321.
163. Ford P.C., Miranda K.M. The solution chemistry of nitric oxide and other reactive nitrogen species. *Nitric Oxide*. 2020. Vol. 103. P. 31–46.
164. Реутов В.П. Цикл оксида азота у млекопитающих и принцип цикличности. *Биохимия*. 2002. Т. 67, № 3. С. 293–311.
165. Горпен А.К.Ф., Майер Б. Универсальная и комплексная энзимология синтазы оксида азота. *Биохимия*. 1998. Т. 63, № 7. С. 870–880.
166. Schmidt H.H.H.W., Hofmann H., Ogilvie P. The role of nitric oxide in physiology and Pathophysiology. Springer. 1995. P. 75–86.
167. Ignarro L.I., Fukuto I.M., Griscavage I.M. Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: Comparison with enzymatically found nitric oxide from L-arginine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1993. Vol. 90, N 17. P. 8103–8107.
168. Nosarev A.V., Smaglyi L.V., Anfinogenova Y., Popov S.V., Kapilevich L.V. Exercise and NO production: relevance and implications in the cardiopulmonary system. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2015. Vol. 2. P. 73.
169. Ghimire K., Altmann H.M., Straub A.C., Isenberg J.S. Nitric oxide: what's new to NO? *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 2017. Vol. 312. P. C254–C262.
170. Zhao Y., Vanhoutte P.M., Leung S.W. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2015. Vol. 129, N 2. P. 83–94.

171. Tejero J., Shiva S., Gladwin M.T. Sources of vascular nitric oxide and reactive oxygen species and their regulation. *Physiological Review*. 2019. Vol. 99. P. 311—379.
172. Bartesaghi S., Radi R. Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Redox Biology*. 2018. Vol. 14. P. 618—625.
173. Montfort W.R., Wales J.A., Weichsel A. Structure and Activation of Soluble Guanylyl Cyclase, the Nitric Oxide Sensor. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2017. Vol. 26, N 3. P. 107—121.
174. Sandner P., Zimmer D.P., Milne G.T., Follmann M., Hobbs A., Stasch J.-P. Soluble Guanylate Cyclase Stimulators and Activators. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2018. P. 355—394.
175. Najibi S., Cohen R.A. Enhanced role of  $K^+$  channels in relaxations of hypercholesterolemic rabbit carotid artery to NO. *American Journal of Physiology*. 1995. Vol. 269, N 3. P. H805—H811.
176. Bialecki R.A., Stinson-Fisher C.  $K_{Ca}$  channel antagonists reduce NO donor-mediated relaxation of vascular and tracheal smooth muscle. *American Journal of Physiology*. 1995. Vol. 268, N 1. P. L152—L159.
177. Okawa T., Vedernikov Y.P., Saade G.R., Longo M., Olson G.L., Chwalisz K., Garfield R.E. Roles of potassium channels and nitric oxide in modulation of uterine contractions in rat pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1999. Vol. 181, N 3. P. 649—655.
178. Buxton I.L.O. Regulation of uterine function: a biochemical conundrum in the regulation of smooth muscle relaxation. *Molecular Pharmaceutics*. 2004. Vol. 65, N 6. P. 1051—1059.
179. Roberts O.L., Kamishima T., Barrett-Jolley R., Quayle J.M., Dart C. Exchange protein activated by cAMP (Epac) induces vascular relaxation by activating  $Ca^{2+}$ -sensitive  $K^+$  channels in rat mesenteric artery. *The Journal of Physiology*. 2013. Vol. 591, N 20. P. 5107—5123.
180. Kone B.C., Kunczewicz T., Zhang W., Yu Z.-Y. Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *American Journal of Physiology Renal Physiology*. 2003. Vol. 285. P. F178—F190.
181. Treuer A.V., Gonzalez D.R. Nitric oxide synthases, S-nitrosylation and cardiovascular health: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities (Review). *Molecular Medicine Reports*. 2015. Vol. 11, N 3. P.1555—1565.
182. Cohen R.A., Adachi T. Nitric-Oxide-Induced Vasodilatation: Regulation by Physiologic S-Glutathiolation and Pathologic Oxidation of the Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2006. Vol. 16, N 4. P. 109—114.
183. Ishii T., Sunami O., Saitoh N., Nishio H., Takeuchi T., Hata F. Inhibition of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase by nitric oxide. *FEBS Letters*. 1998. Vol. 440, N 1-2. P. 218—222.
184. Yu J.-Z., Zhang D.X., Zou A.-P., Campbell W.B., Li P.-L. Nitric oxide inhibits  $Ca^{2+}$  mobilization through cADP-ribose signaling in coronary arterial smooth muscle cell. *The American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. 2000. Vol. 279. P. H873—H881.
185. Duan W., Zhou J., Li W., Zhou T., Chen Q., Yang F., Wei T. Plasma membrane calcium ATPase 4b inhibits nitric oxide generation through calcium-induced dynamic interaction with neuronal nitric oxide synthase. *Protein & Cell*. 2013. Vol. 4. P. 286—298.
186. Cartwright E.J., Oceandy D., Neyses L. Physiological implications of the interaction between the plasma membrane calcium pump and nNOS. *Pflügers Archiv*. 2009. Vol. 457, N 3. P. 665—671.
187. Mohamed T.M.A., Oceandy D., Prehar S., Alatwi N., Hegab Z., Baudoin F.M., Pickard A., Zaki A.O., Nadif R., Cartwright E.J., Neyses L. Specific Role of Neuronal Nitric-oxide Synthase when Tethered to the Plasma Membrane Calcium Pump in Regulating the  $\alpha$ -Adrenergic Signal in the Myocardium. *Journal of Biological Chemistry*. 2009. Vol. 284, N 18. P. 12091—12098.
188. Mohamed T.M., Oceandy D., Zi M., Prehar S., Alatwi N., Wang Y., Shaheen M.A., Abou-Leisa R., Schelcher C., Hegab Z., Baudoin F., Emerson M., Mamas M., Di Benedetto G., Zaccolo M., Lei M., Cartwright E.J., Neyses L. Plasma membrane calcium pump (PMCA4)-neuronal nitric-oxide synthase complex regulates cardiac contractility through modulation of a compartmentalized cyclic nucleotide microdomain. *Journal of Biological Chemistry*. 2011. Vol. 286, N 48. P. 41520—41529.

189. Степура И.И., Опарин А.Ю., Степура В.И., Маскевич С.А., Титов В.Ю. Окисление тиамин под действием диоксида азота, генерируемого ферриформами миоглобина и гемоглобина в присутствии нитрита и пероксида водорода. *Биохимия*. 2012. Т. 77, № 1. С. 53—57.
190. Zhou X.-B., Wang G.X., Ruth P., Hüneke B., Korth M. BKCa channel activation by membrane-associated cGMP kinase may contribute to uterine quiescence in pregnancy. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 2000. Vol. 279, N 6. P. C1751—C1759.
191. Данилович Ю.В. Вплив активних сполук азоту та кисню на обмін  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{H}^+$  через плазматичну мембрану клітин міометрія. *Український біохімічний журнал*. 2001. Т. 73, № 4. С. 49—54.
192. Данилович Ю.В. Порівняльний аналіз впливу активних метаболітів азоту і кисню на  $\text{K}^+$ - та тапсигаргін-індукований вхід  $\text{Ca}^{2+}$  в міоцити матки щурів. *Буковинський медичний вісник*. 2005. Т. 9, № 2. С. 78—79.
193. Molecular probes handbook. A guide to fluorescent probes and labeling technologies. 11-th edition. 2010. Chapter 22. Probes for membrane potential.
194. Marchetti C., Jouy N., Leroy-Martin B., Defossez A., Formstecher P., Marchetti P. Comparison of four fluorochromes for the detection of the inner mitochondrial membrane potential in human spermatozoa and their correlation with sperm motility. *Human Reproduction*. 2004. Vol. 12, N 10. P. 2267—2276.
195. Brewis I.A., Morton I.E., Mohammad S.N., Browes C.E., Moore H.D. Measurement of intracellular calcium concentration and plasma membrane potential in human spermatozoa using flow cytometry. *Journal of Andrology*. 2000. Vol. 21, N 2. P. 238—249.
196. Patrat C., Serres C., Jouannet P. Progesterone induces hyperpolarization after a transient depolarization phase in human spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 2002. Vol. 66(6). P. 1775—1780.
197. Mattiasson G. Flow cytometric analysis of isolated liver mitochondria to detected changes relevant to cell death. *Cytometry*. 2004. Vol. 60, N 2. P. 145—154.
198. Sauvat A., Wang Y., Segura F., Spaggiari S., Muller K., Zhou H., Galluzzi L., Kepp O., Kroemer G. Quantification of cellular viability by automated microscopy and flow cytometry. *OncoTarget*. 2015. Vol. 6, N 11. P. 9467—9475.
199. Shoji K.F., Debure L. Fluorometric methods for detection of mitochondrial membrane depolarization induced by CD95 activation. *Methods in Molecular Biology*. 2017. Vol. 1557. P. 49—62.
200. Chen G., Yang Y., Xu C., Gao S. A flow cytometry-based assay for measuring mitochondrial membrane potential in cardiac myocytes after hypoxia/reoxygenation. *Journal of Visualized Experiments*. 2018. Vol. 137. P. 57725.
201. Kalbocova M., Vrbacky M., Drahota Z., Melková Z. Comparison of the effect of mitochondrial inhibitors on mitochondrial membrane potential in two different cell lines using flow cytometry and spectrofluorometry. *Cytometry*. 2003. Vol. 52, N 2. P. 110—116.
202. Данилович Ю.В., Тугай В.А. Вплив активних метаболітів азоту і кисню на рівень cGMP в міоцитах матки. *Український біохімічний журнал*. 2006. Т. 78. № 1. С. 102—106.
203. Акопова О.В., Харламова О.М., Коцюрба А.В. Вплив оксиду азоту на  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазу в тканині аорти щурів. *Фізіологічний журнал*. 2009. Т. 55, № 1. С. 27—35.
204. Chen C., Schofield G.G. Nitric oxide donors enhanced  $\text{Ca}^{2+}$  currents and blocked noradrenalin-induced  $\text{Ca}^{2+}$  current inhibition in rat sympathetic neurons. *The Journal of Physiology (Lond.)*. 1995. Vol. 482, Pt. 3. P. 521—531.
205. Khurana G., Bennett M.R. Nitric oxide and arachidonic acid modulation of calcium currents in postganglionic neurons of avian cultured ciliary ganglia. *British Journal of Pharmacology*. 1993. Vol. 109, N 2. P. 480—485.
206. Мончин А.А., Недвецкий П.И., Федорович С.В. Деполяризация изолированных нервных окончаний мозга донорами окиси азота: мембранные механизмы. *Биохимия*. 1998. Т. 63, № 6. С. 787—796.
207. Santo-Domingo J., Demareux N. Calcium uptake mechanisms of mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010. Vol. 1797, N 6-7. P. 907—912.

До розділу 4

1. Костерин С.А. Транспорт кальция в гладких мышцах. Киев: Наукова думка, 1990. 216 с.
2. Graier W.F., Frieden M., Malli R. Mitochondria and Ca<sup>2+</sup> signaling: old quests, new functions. *European Journal of Physiology*. 2007. Vol. 455, N 3. P. 375—396.
3. Bernardi P., Rasola A. Calcium and cell death: the mitochondrial connection. *Subcellular Biochemistry*. 2007. Vol. 45. P. 481—506.
4. Rizzuto R., Marchi S., Bonora M., Aguiary P., Bononi A. Ca<sup>2+</sup> transfer from the ER to mitochondria: When, how and why. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009. Vol. 1787, N 11. P. 1342—1351.
5. Pan S., Ryu S.-Y., Sheu S.-S. Distinctive characteristics and functions of multiple mitochondrial Ca<sup>2+</sup> influx mechanisms. *Science China Life Sciences*. 2011. Vol. 54, N 8. P. 763—769.
6. Feissner R.F., Skalska J., Gaum W.E. Crosstalk signaling between mitochondrial Ca<sup>2+</sup> and ROS. *Frontiers in Bioscience*. 2009. Vol. 14, N 4. P. 1197—1218.
7. Костюк П.Г., Костюк О.П., Лук'янець О.О. Внутрішньоклітинна кальцієва сигналізація: структура і функції. Київ: Наукова думка, 2010. 175 с.
8. Chalmers S., Nicholls D.G. The relationship between free and total calcium concentrations in the matrix of liver and brain mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. 2003. Vol. 278, N 21. P. 19062—19070.
9. Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers and permeability transition. *Physiological Reviews*. 1999. Vol. 7, N 4. P. 1127—1155.
10. Malli R., Graier W.F. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> channels: Great unknowns with important functions. *FEBS Letters*. 2010. Vol. 584, N 10. P. 1942—1947.
11. Szabadkai G., Duchen M.R. Mitochondria: The Hub of Cellular Ca<sup>2+</sup> Signaling. *Physiology*. 2008. Vol. 23. P. 84—94.
12. Campbell A. Intracellular calcium. Springer, 2015.
13. Shoshan-Barmatz V., De Pinto V., Zweckstetter M., Raviv Z., Keinan N., Arbel N. VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Molecular Aspects of Medicine*. 2010. Vol. 31, N 3. P. 227—285.
14. Pallafacchina G., Zanin S., Rizzuto R. From the identification to the dissection of the physiological role of the mitochondrial calcium uniporter: an ongoing story. *Biomolecules*. 2021. Vol. 11, N 6. P. 786.
15. Alevriadou B.R., Patel A., Noble M., Ghosh S., Gohil V.M., Stathopoulos P.B. et al. Molecular nature and physiological role of the mitochondrial calcium uniporter channel. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 2021. Vol. 320, N 4. P. C465—C482.
16. Ryu S.-Y., Beutner G., Dirksen R.T., Kinnally K.W., Sheu S.-S. Mitochondrial ryanodine receptors and other mitochondrial Ca<sup>2+</sup> permeable. *FEBS Letters*. 2010. Vol. 584, N 10. P. 1948—1955.
17. Griffiths E.J. Mitochondrial calcium transport in the heart: physiological and pathological roles. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2009. Vol. 46, N 6. P. 789—803.
18. Griffiths E.J., Balaska D., Cheng W.H. The ups and downs of mitochondrial calcium signalling in the heart. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010. Vol. 1797, N 6-7. P. 856—864.
19. Marchi S., Pinton P. The mitochondrial calcium uniporter complex: molecular components, structure and physiopathological implications. *The Journal of Physiology*. 2014. Vol. 592, N 5. P. 829—839.
20. Santo-Domingo J., Wiederkehr A., De Marchi U. Modulation of the matrix redox signaling by mitochondrial Ca<sup>2+</sup>. *World Journal of Biological Chemistry*. 2015. Vol. 6, N 4. P. 310—323.
21. Tarasova N.V., Vishnyakova P.A., Logashina Yu.A., Elchaninov A.V. Mitochondrial Calcium Uniporter Structure and Function in Different Types of Muscle Tissues in Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. Vol. 20, N 19. P. 4823.
22. Kamer K.J., Mootha V.K. The molecular era of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2015. Vol. 16, N 9. P. 545—553.
23. Foskett J.K., Philipson B. The Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Uniporter Complex. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2015. Vol. 78. P. 3—8.

24. De Stefani D., Patron M., Rizzuto R. Structure and function of the mitochondrial calcium uniporter complex. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2015. Vol. 1853, N 9. P. 2006—2011.
25. Cao J.L., Adaniya S.M., Cypress M.W., Suzuki Y., Kusakari Y., Jhun B.S., Jhun B.S., O-Uchi J. Role of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> homeostasis in cardiac muscles. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2019. Vol. 663. P. 276—287.
26. Tanwar J., Singh J.B., Motiani R.K. Molecular machinery regulating mitochondrial calcium levels: the nuts and bolts of mitochondrial calcium dynamics. *Mitochondrion*. 2021. Vol. 57. P. 9—22.
27. Csordás G., Várnai P., Golenár T., Sheu S.S., Hajnóczky G. Calcium transport across the inner mitochondrial membrane: molecular mechanisms and pharmacology. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2012. Vol. 353, N 1-2. P. 109—113.
28. Baughman J.M., Perocchi F., Girgis H.S., Plovanich M., Belcher-Timme C.A., Sancak Y., Bao X.R., Strittmatter L., Goldberger O., Bogorad R.L., Koteliensky V., Mootha V.K. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*. 2011. Vol. 476, N 7360. P. 341—345.
29. Carvalho E.J., Stathopoulos P.B., Madesh M. Regulation of Ca<sup>2+</sup> exchanges and signaling in mitochondria. *Current Opinion in Physiology*. 2020. Vol. 17. P. 197—206.
30. Murphy E., Steenbergen C. Regulation of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake. *Annual Review of Physiology*. 2020. Vol. 83. P. 107—126.
31. Anderson A.J., Jackson T.D., Stroud D.A., Stojanovski D. Mitochondria-hubs for regulating cellular biochemistry: emerging concepts and networks. *Open Biology*. 2019. Vol. 9, N 8. P. 190126.
32. Santo-Domingo J., Demaurex N. Calcium uptake mechanisms of mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010. Vol. 1797, N 6-7. P. 907—912.
33. Gunter T.E., Gunter E., Yule D.L., Gunter K.K., Eliseev R.A., Salter J.D. Calcium and mitochondria. *FEBS Letters*. 2004. Vol. 567, N 1. P. 96—102.
34. Hoppe U.C. Mitochondrial calcium channels. *FEBS Letters*. 2010. Vol. 584, N 10. P. 1975—1981.
35. Костерин С.А., Бурдыга Ф.В. Транспорт и внутриклеточный гомеостаз Ca<sup>2+</sup> в миомерии. *Успехи современной биологии*. 1993. Т. 113. № 4. С. 485—506.
36. Веклич Т.О., Костерин С.О., Шинлова О.П. Катіонна специфічність системи акумуляції Ca<sup>2+</sup> в мітохондріях клітин міомерії. *Український біохімічний журнал*. 2002. Т. 74, № 1. С. 42—48.
37. Шинлова О.П., Костерин С.А., Веклич Т.А. Подавляемый рутениевым красным энергозависимый и пассивный транспорт Ca<sup>2+</sup> в пермеабилizированных гладкомышечных клетках. *Биохимия*. 1996. Т. 61, № 8. С. 1440—1447.
38. Bazil J.N., Dash R.K. A minimal model for the mitochondrial rapid mode of Ca<sup>2+</sup> uptake mechanism. *PLoS One*. 2011. Vol. 6, N 6. e21324.
39. Костерин С.О., Бабіч Л.Г., Шликов С.Г., Данилович Ю.В., Веклич Т.О., Мазур Ю.Ю. Біохімічні властивості та регуляція Ca<sup>2+</sup>-транспортувальних систем гладеньком'язових клітин. Київ: Наукова думка, 2016. 206 с.
40. Dedkova E.N., Blatter L.A. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> and the heart. *Cell Calcium*. 2008. Vol. 44, N 1. P. 77—91.
41. Buntinas L., Gunter K.K., Sparagna G.C., Gunter T.E. The rapid mode of calcium uptake into heart of mitochondria (RaM): comparison to RaM in liver mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2001. Vol. 1504, N 2-3. P. 248—261.
42. Gunter T.E., Sheu S.S. Characteristics and possible function of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transport mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009. Vol. 1787, N 11. P. 1291—1308.
43. Xu Z., Zhang D., He X., Huang Y., Shao H. Transport of Calcium ions into mitochondria. *Current Genomics*. 2016. Vol. 17, N 3. P. 215—219.
44. Beutner G., Sharma V.K., Lin L., Ryu S.-Y., Dirksen R.T., Sheu S.-S. Type 1 ryanodine receptor in cardiac mitochondria: transducer of excitation-metabolism coupling. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2005. Vol. 1717, N 1. P. 1—10.
45. Naumova N., Šachl R. Regulation of Cell Death by Mitochondrial Transport Systems of Calcium and Bcl2 Proteins. *Membranes*. 2020. Vol. 10. P. 299.

46. Nowikovsky K., Pozzan T., Rizzuto R., Scorrano L., Bernardi P. The Pathophysiology of LETM1. *The Journal of General Physiology*. 2012. Vol. 139, N 6. P. 445—454.
47. McCarron J.G., Olson M.L., Wilson C., Sandison M.E., Chalmers S. Examining the role of mitochondria in  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in native vascular smooth muscle. *Microcirculation*. 2013. Vol. 20. P. 317—329.
48. Palty R., Hershinkel M., Sekler I. Molecular identity and functional properties of the mitochondrial  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger. *Journal of Biological Chemistry*. 2012. Vol. 287, N 38. P. 31650—31657.
49. Gunter T.E., Pfeiffer D.R. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *American Journal of Physiology*. 1990. Vol. 258, N 5, Pt. 1. P. C755—C786.
50. Курский М.Д., Костерин С.А., Бурчинская Н.Ф., Шлыков С.Г. Пассивний транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  во фракції мітохондрій міометрія. *Український біохімічний журнал*. 1987. Т. 59, № 3. С. 35—39.
51. Shao J., Fu Z., Ji Y., Guan X., Guo S., Ding Z., Yang X., Cong Y., Shen Y. Leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1 (LETM1) forms a  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  antiporter. *Scientific Reports*. 2016. Vol. 6. P. 34174.
52. Jiang D., Zhao L., Clapham D.E. Genome-wide RNAi screen identifies Letm1 as a mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  antiporter. *Science*. 2009. Vol. 326, N 5949. P. 144—147.
53. Gunter T.E., Wingrove D.E. Kinetics of mitochondrial calcium transport. I. Characteristics of the sodium-independent calcium efflux mechanism of liver mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. 1986. Vol. 261, N 32. P. 15159—15165.
54. Takeuchi A., Kim B., Matsuoka S. The destiny of  $\text{Ca}^{2+}$  released by mitochondria. *Journal of Physiological Sciences*. 2015. Vol. 65, N 1. P. 11—24.
55. Schlickum S., Moghekar A., Simpson J.C., Steglich C., O'Brien R.J., Winterpacht A., Endele S.U. LETM1, a gene deleted in Wolf-Hirschhorn syndrome, encodes an evolutionarily conserved mitochondrial protein. *Genomics*. 2004. Vol. 83, N 2. P. 254—261.
56. Dimmer K.S., Navoni F., Casarin A., Trevisson E., Endele S., Winterpacht A., Salvati L., Scorrano L. LETM1, deleted in Wolf-Hirschhorn syndrome is required for normal mitochondrial morphology and cellular viability. *Human Molecular Genetics*. 2008. Vol. 17, N 2. P. 201—214.
57. Austin S., Nowikovsky K. LETM1: essential for mitochondrial biology and cation homeostasis? *Trends in Biochemical Sciences*. 2019. Vol. 44, N 8. P. 648—658.
58. Lin Q.-T., Stathopoulos P.B. Molecular Mechanisms of Leucine Zipper EF-Hand Containing Transmembrane Protein-1 Function in Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. Vol. 20. P. 286.
59. Natarajan G.K., Mishra J., Camara A.K.S., Kwok W.-M. LETM1: A Single Entity With Diverse Impact on Mitochondrial Metabolism and Cellular Signaling. *Frontiers in Physiology*. 2021. Vol. 12. P. 637852.
60. Li Y., Tran Q., Shrestha R., Piao L., Park L., Park Jis., Park Jon. LETM1 is required for mitochondrial homeostasis and cellular viability (Review). *Molecular Medicine Reports*. 2019. Vol. 19, N 5. P. 3367—3375.
61. Вовканич Л.С., Дубицький Л.О. Кінетичні властивості  $\text{H}^+$ -стимульованого виходу  $\text{Ca}^{2+}$  з мітохондрій печінки. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*. 2001. Т. 3. С. 34—38.
62. Piao I., Li Y., Kim S.J., Byun H.S., Huang S.M. et al. Association of LETM1 and MRPL36 Contributes to the Regulation of Mitochondrial ATP Production and Necrotic Cell Death. *Cancer Research*. 2009. Vol. 69, N 8. P. 3397—3404.
63. Romero-Garcia S., Prado-Garcia H. Mitochondrial calcium: transport and modulation of cellular processes in homeostasis and cancer (review). *International Journal of Oncology*. 2019. Vol. 54, N 4. P. 1155—1167.
64. Bernardi P., von Stockum S. The permeability transition pore as a  $\text{Ca}^{2+}$  release channel: New answers to an old question. *Cell Calcium*. 2012. Vol. 52, N 1. P. 22—27.
65. Rasola A., Bernardi P. Mitochondrial permeability transition in  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium*. 2011. Vol. 50, N 3. P. 222—233.



66. Акопова О.В. Роль мітохондріальної пори перехідної провідності у трансмембранному обміні  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях. *Український біохімічний журнал*. 2008. Т. 80. № 3. С. 40—47.
67. Griffiths E.J., Rutter G.A. Mitochondrial calcium as a key regulator of mitochondrial ATP production in mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009. Vol. 1787, N 11. P. 1324—1333.
68. Cali T., Ottolini D., Brini M. Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  as a key regulator of mitochondrial activities. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2012. Vol. 942. P. 53—73.
69. Duchen M.R., Verkhatsky A., Muallem S. Mitochondria and calcium in health and disease. *Cell Calcium*. 2008. Vol. 44, N 1. P. 1—5.
70. Gellerich F.N., Gizatullina Z., Trumbeckaite S., Nguyen H.P., Pallas T., Arandarcikaitė O., Vielhaber S., Seppet E., Striggow F. The regulation of OXPHOS by extramitochondrial calcium. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010. Vol. 1797, N 6-7. P. 1018—1027.
71. Giulivi C., Kato K., Cooper C.E. Nitric oxide regulation of mitochondrial oxygen consumption I: cellular physiology. *American Journal of Physiology*. 2006. Vol. 291, N 6. P. C1225—C1231.
72. Tejero J., Shiva S., Gladwin M.T. Sources of vascular nitric oxide and reactive oxygen species and their regulation. *Physiological Review*. 2019. Vol. 99. P. 311—379.
73. Giulivi C. Mitochondria as generators and targets of nitric oxide. *Novartis Foundation Symposium*. 2007. Vol. 287. P. 92—104.
74. Davidson S.M., Duchen M.R. Effects of NO on mitochondrial function in cardiomyocytes: pathophysiological relevance. *Cardiovascular Research*. 2006. Vol. 71, N 1. P. 10—21.
75. Ghafourifar P., Cadenas E. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2005. Vol. 26, N 4. P. 190—195.
76. Tota B., Quintieri A.M., Angelone T. The emerging role of nitrite as an endogenous modulator and therapeutic agent of cardiovascular function. *Current Medical Chemistry*. 2010. Vol. 17, N 18. P. 1915—1925.
77. Реутов В.П. Цикл оксида азота у млекопитаючих и принцип цикличности. *Биохимия*. 2002. Т. 67, № 3. С. 293—311.
78. Zaobornyj T., Ghafourifar P. Strategic localization of heart mitochondrial NOS: a review of the evidence. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. 2012. Vol. 303, N 11. P. H1283—H1293.
79. Giulivi C., Poderoso J.J., Boveris A. Production of nitric oxide by mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. 1998. Vol. 273. P. 11038—11043.
80. Ghimire K., Altmann H.M., Straub A.C., Isenberg J.S. Nitric oxide: what's new to NO? *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 2017. Vol. 312. P. C254—C262.
81. Piantadosi C.A., Suliman H.B. Redox Regulation of Mitochondrial Biogenesis. *Free Radical Biology & Medicine*. 2012. Vol. 53, N 11. P. 2043—2053.
82. Levine A.B., Punihaole D., Levine T.B. Characterization of the role of nitric oxide and its clinical applications. *Cardiology*. 2012. Vol. 122. P. 55—68.
83. Tengan C.H., Rodrigues G.S., Godinho R.O. Nitric oxide in skeletal muscle: role on mitochondrial biogenesis and function. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012. Vol. 13, N 12. P. 17160—17184.
84. Brown G.C., Borutaite V. Nitric oxide and mitochondrial respiration in the heart. *Cardiovascular Research*. 2007. Vol. 75, N 2. P. 283—290.
85. Gutierrez J., Ballinger S.W., Darley-Usmar V.M., Landar A. Free radicals, mitochondria, and oxidized lipids: the emerging role in signal transduction in vascular cells. *Circulation Research*. 2006. Vol. 99, N 9. P. 924—932.
86. Shiva S. Mitochondria as metabolizers and targets of nitrite. *Nitric Oxide*. 2010. Vol. 22, N 2. P. 64—74.
87. De Palma C., Clementi E. Nitric oxide regulation of mitochondrial biogenesis. Mitochondrial signaling in health and disease. Ed. S. Orrenius, L. Packer, E. Cadenas. 2012. P. 157—167.
88. Valdez L.B., Zaobornyj T., Boveris A. Mitochondrial metabolic states and membrane potential modulate mtNOS activity. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006. Vol. 1757, N 3. P. 166—172.

89. Haynes V., Elfering S.L., Squires R.J., Traaseth N., Solien J., Ettl A., Giulivi C. Mitochondrial Nitric-oxide Synthase: Role in Pathophysiology. *IUBMB Life*. 2003. Vol. 55, N 10-11. P. 599—603.
90. Nagendran J., Michelakis E.D. Mitochondrial NOS is upregulated in the hypoxic heart: implications for the function of the hypertrophied right ventricle. *The American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. 2009. Vol. 296, N 6. P. H1723—H1726.
91. Franco M.C., Antico Arciuch V.G., Peralta J.G., Galli S., Levisman D., Lopez L.M., Romorini L., Poderoso J.J., Carreras M.C. Hypothyroid Phenotype Is Contributed by Mitochondrial Complex I Inactivation Due to Translocated Neuronal Nitric-oxide Synthase. *Journal of Biological Chemistry*. 2006. Vol. 281, N 8. P. 4779—4786.
92. Carreras M.C., Poderoso J.J. Mitochondrial nitric oxide in the signaling of cell integrated responses. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 2007. Vol. 292. P. C1569—C1580.
93. Poderoso J.J., Carreras M.C., Schopfer F., Lisdero C., Riobor N., Giulivi C., Boveris A., Boveris A.A., Cadenas E. The reaction of nitric oxide with ubiquinol: kinetic properties and biological significance. *Free Radical Biology & Medicine*. 1999. Vol. 26. P. 925—935.
94. Traaseth N., Elfering S., Solien J., Haynes V., Giulivi C. Role of calcium signaling in activation of mitochondrial nitric oxide synthase and citric acid cycle. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2004. Vol. 1658, N 1-2. P. 64—71.
95. Dedkova E.N., Ji X., Lipsius S.L., Blatter L.A. Mitochondrial calcium uptake stimulates nitric oxide production in mitochondria of bovine vascular endothelial cell. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 2004. Vol. 286, N 2. P. C406—C415.
96. Sanchez-Padilla J., Guzman J.N., Ilijic E., Kondapalli J., Galtieri D.J., Yang B., Schieber S., Oertel W., Wokosin D., Schumacker P.T., Surmeier D.J. Mitochondrial oxidant stress in locus coeruleus is regulated by activity and nitric oxide synthase. *Nature Neuroscience*. 2014. Vol. 17, N 6. P. 832—840.
97. Yi M., Weaver D., Hajnoczky G. Control of mitochondrial motility and distribution by the calcium signal: a homeostatic circuit. *Journal of Biological Chemistry*. 2004. Vol. 167, N 4. P. 661—672.
98. Bringold U., Ghafourifar P., Richter C. Peroxynitrite formed by mitochondrial NO synthase promotes mitochondrial Ca<sup>2+</sup> release. *Free Radical Biology & Medicine*. 2000. Vol. 29, N 3-4. P. 343—348.
99. Forstermann U., Sessa W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*. 2012. Vol. 33. P. 829—837.
100. Nisoli E., Carruba M.O. Nitric oxide and mitochondrial biogenesis. *Journal of Cell Science*. 2006. Vol. 119, N 14. P. 2856—2862.
101. Shiva S. Nitrite: A Physiological Store of Nitric Oxide and Modulator of Mitochondrial Function. *Redox Biology*. 2013. Vol. 1, N 1. P. 40—44.
102. Brown G.C. Nitric oxide and neuronal death. *Nitric oxide*. 2010. Vol. 23, N 3. P. 153—165.
103. Dedkova E.N., Blatter L.A. Characteristics and function of cardiac mitochondrial nitric oxide synthase. *The Journal of Physiology*. 2009. Vol. 587, Pt. 4. P. 851—872.
104. Santos C.X.C., Anilkumar N., Zhang M., Brewer A.C., Shah A.M. Redox signaling in cardiac myocytes. *Free Radical Biology & Medicine*. 2011. Vol. 50, N 7. P. 777—793.
105. Ghafourifar P., Schenk U., Klein S.D., Richter Ch. Mitochondrial Nitric-oxide Synthase Stimulation Causes Cytochrome c Release from Isolated Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. 1999. Vol. 274, N 44. P. 31185—31188.
106. Elfering S.L., Haynes V.L., Traaseth N.J., Ettl A., Giulivi C. Aspects, mechanism, and biological relevance of mitochondrial protein nitration sustained by mitochondrial nitric oxide synthase. *The American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. 2004. Vol. 286, N 1. P. H22—H29.
107. Demicheli V., Moreno D.M., Jara G.E., Lima A., Carballal S., Rios N., Batthyany C., Ferrer-Sueta G., Quijano C., Estrin D.A., Marti M.A., Radi R. Mechanism of the reaction of human manganese superoxide dismutase with peroxynitrite: nitration of critical tyrosine 34. *Biochemistry*. 2016. Vol. 55, N 24. P. 3403—3417.
108. Tortora V., Quijano C., Freeman B., Radi R., Castro L. Mitochondrial aconitase reaction with nitric oxide, S-nitrosoglutathione, and peroxynitrite: mechanisms and relative contribu-

- tions to aconitase inactivation. *Free Radical Biology & Medicine*. 2007. Vol. 42, N 7. P. 1075–1088.
109. Liu C., Cheng L.M., Wah S.T. Nitric Oxide, Iron and Neurodegeneration. *Frontiers in Neuroscience*. 2019. Vol. 13. Article 114.
110. Leite A.C.R., Oliveira H.C.F., Utino F.L., Garcia R., Alberici L.C., Fernandes M.P., Castilho R.F., Verces A.E. Mitochondria generated nitric oxide protects against permeability transition via formation of membrane protein S-nitrosothiols. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010. Vol. 1797, N 6-7. P. 1210–1216.
111. Litvinova L., Atochin D.N., Fattakhov N., Vasilenko M., Zatolokin P., Kirienkova E. Nitric oxide and mitochondria in metabolic syndrome. *Frontiers in Physiology*. 2015. Vol. 6. P. 20.
112. Salem M.M., Shalhaf M., Gibbons N.C., Chavan B., Thornton J.M., Schallreuter K.U. Enhanced DNA binding capacity on up-regulated epidermal wild-type p53 in vitiligo by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated oxidation: a possible repair mechanism for DNA damage. *FASEB Journal*. 2009. Vol. 23, N 11. P. 3790–3807.
113. Gong L., Liu F.Q., Wang J., Wang X.P., Hou X.G., Sun Y., Qin W.D., Wei S.J., Zhang Y., Chen L., Zhang M.X. Hyperglycemia induces apoptosis of pancreatic islet endothelial cells via reactive nitrogen species-mediated Jun N-terminal kinase activation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011. Vol. 1813, N 6. P. 1211–1219.
114. Talib J., Kwan J., Suryo Rahmanto A., Witting P.K., Davies M.J. The smoking-associated oxidant hypothiocyanous acid induces endothelial nitric oxide synthase dysfunction. *Biochemical Journal*. 2014. Vol. 457. P. 89–97.
115. Crouser E.D. Mitochondrial dysfunction in septic shock and multiple organ dysfunction syndrome. *Mitochondrion*. 2004. Vol. 4. P. 729–741.
116. Radi R., Cassina A., Hodara R. Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. *Biological Chemistry*. 2002. Vol. 383, N (3-4). H. 401–409.
117. Duchon M.R. Roles of mitochondria in health and disease. *Diabetes*. 2004. Vol. 53, Suppl. 1. P. S96–S102.
118. Zhao Y., Vanhoutte P.M., Leung S.W. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2015. Vol. 129, N 2. P. 83–94.

### До розділу 5

1. Бабський А., Іккерт О., Манько В. Основи біоенергетики. Львів: ЛНУ імені Івана Франка, Серія “Біологічні Студії”, 2017. 312 с.
2. Zorova L.D., Popkova V.A., Plotnikova E.Y., Silacheva D.N., Pevzner I.B., Jankauskasa S.S., Babenko V.A., Zorov S.D., Balakirevad A.V., Juhaszovae M., Sollotte S.J., Zorov D.B. Mitochondrial membrane potential. *Analytical Biochemistry*. 2018. Vol. 552. P. 50–59.
3. Danylovych Yu.V., Karakhim S.A., Danylovych G.V., Kolomiets O.V., Kosterin S.O. Electrochemical potential of the inner mitochondrial membrane and Ca<sup>2+</sup> homeostasis of myometrium cells. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2015. Vol. 87, N 5. P. 56–65.
4. Костерин С.А., Браткова Н.Ф., Бабич Л.Г., Шинлова О.П., Слинченко Н.Н., Шлыков С.Г., Зимина В.П., Ровенец Н.А., Веклич Т.А. Влияние ингибиторов энергозависимых Ca<sup>2+</sup>-транспортирующих систем на кальциевые насосы гладкомышечной клетки. *Український біохімічний журнал*. 1996. Т. 68, № 6. С. 50–61.
5. Веклич Т.О., Костерин С.О., Шинлова О.П. Катіонна специфічність системи акумуляції Ca<sup>2+</sup> в мітохондріях клітин міометрія. *Український біохімічний журнал*. 2002. Т. 74, № 1. С. 42–48.
6. Шинлова О.П., Костерин С.А., Веклич Т.А. Подавляемый рутениевым красным энергозависимый и пассивный транспорт Ca<sup>2+</sup> в пермеабилizированных гладкомышечных клетках. *Биохимия*. 1996. Т. 61, № 8. С. 1440–1447.
7. Salvioli S., Ardizzoni A., Franceschi C., Cossarizza A. JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess delta psi changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Letters*. 1997. Vol. 411, N 1. P. 77–82.
8. Marchetti C., Jouy N., Leroy-Martin B., Defossez A., Formstecher P., Marchetti P. Comparison of four fluorochromes for the detection of the inner mitochondrial membrane potential in

- human spermatozoa and their correlation with sperm motility. *Human Reproduction*. 2004. Vol. 12, N 10. P. 2267–2276.
9. Perry S.W., Norman J.P., Barbieri J., Brown E.B., Gelbard H.A. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques*. 2011. Vol. 50, N 2. P. 98–115.
10. Wolken G.G., Arriaga E.A. Simultaneous Measurement of Individual Mitochondrial Membrane Potential and Electrophoretic Mobility by Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry*. 2014. Vol. 86. P. 4217–4226.
11. Sivandzade F., Bhalerao A., Cucullo L. Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe. *Bio-Protocol*. 2019. Vol. 9, N 1. e3128.
12. <https://somapp.ucdmc.ucdavis.edu/pharmacology/bers/maxchelator/downloads.htm>
13. Коломієць О.В., Данилович Ю.В., Данилович Г.В., Костерін С.О. Вивчення акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  в ізольованих мітохондріях гладенького м'яза за допомогою зонда Fluo-4 AM. *Український біохімічний журнал*. 2013. Т. 85, № 4. С. 30–39.
14. Pan S., Ryu S.-Y., Sheu S.-S. Distinctive characteristics and functions of multiple mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  influx mechanisms. *Science China Life Sciences*. 2011. Vol. 54, N 8. P. 763–769.
15. Takeuchi A., Kim B., Matsuoka S. The destiny of  $\text{Ca}^{2+}$  released by mitochondria. *Journal of Physiological Sciences*. 2015. Vol. 65, N 1. P. 11–24.
16. Костюк П.Г., Костюк О.П., Лук'янець О.О. Внутрішньоклітинна кальцієва сигналізація: структура і функції. Київ: Наукова думка, 2010. 175 с.
17. Vallot O., Combettes L., Lompre A.-M. Functional coupling between the caffeine/ryanodine-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  store and mitochondria in rat aortic smooth muscle cells. *Biochemical Journal*. 2001. Vol. 357, Pt. 2. P. 363–371.
18. Костерин С.А. Транспорт кальция в гладких мышцах. Киев: Наукова думка, 1990. 216 с.
19. Костерин С.А., Бурдыга Ф.В. Транспорт и внутриклеточный гомеостаз  $\text{Ca}^{2+}$  в миомертии. *Успехи современной биологии*. 1993. Т. 113, № 4. С. 485–506.
20. Gincel D., Zaid H., Shoshan-Barmatz V. Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. *Biochemical Journal*. 2001. Vol. 358, Pt. 1. P. 147–155.
21. Arnoult D. Apoptosis-associated mitochondrial outer membrane permeabilization assays. *Methods*. 2008. Vol. 44(3). P. 229–234.
22. Zhou L., Chang D.C. Dynamics and structure of the Bax-Bak complex responsible for releasing mitochondrial proteins during apoptosis. *Journal of Cell Science*. 2008. Vol. 121, Pt. 13. P. 2186–2196.
23. Акопова О.В., Сагач В.Ф. Влияние доноров NO на аккумуляцию  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях миокарда и печени крыс. *Український біохімічний журнал*. 2005. Т. 77, № 2. С. 82–87.
24. Акопова О.В., Коркач Ю.П., Коцюрба А.В., Колчинська А.В., Сагач В.Ф. Метаболізм активних форм азоту та кисню в мітохондріях міокарда щурів за умов введення донора оксиду азоту. *Фізіологічний журнал*. 2012; Т. 58, № 2. С. 3–15.
25. Buxton I.L.O. The regulation of uterine relaxation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2007. Vol. 18, N 3. P. 340–347.
26. Sladek M.S., Magness R.R., Conrad K.P. Nitric oxide and pregnancy. *American Journal of Physiology*. 1997. Vol. 272, N 2. P. R441–R463.
27. Gunter T.E., Pfeiffer D.R. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *American Journal of Physiology*. 1990. Vol. 258, N 5, Pt. 1. P. C755–C786.
28. Danylovyh G.V., Kolomiets O.V., Danylovyh Yu.V., Rodik R.V., Kalchenko V.I., Kosterin S.O. Calix[4]arene C-956 is effective inhibitor of  $\text{H}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -exchanger in smooth muscle mitochondria. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2018. Vol. 90, N 1. P. 25–31.
29. Murphy E., Eisner D.A. Regulation of intracellular and mitochondrial Na in health and disease. *Circulation Research*. 2009. Vol. 104, N 3. P. 292–303.
30. Santo-Domingo J., Demaurex N. Calcium uptake mechanisms of mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010. Vol. 1797, N 6-7. P. 907–912.

31. Zaobornyj T., Ghafourifar P. Strategic localization of heart mitochondrial NOS: a review of the evidence. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. 2012. Vol. 303, N 11. P. H1283—H1293.
32. Jiang D., Zhao L., Clapham D.E. Genome-wide RNAi screen identifies Letm1 as a mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  antiporter. *Science*. 2009. Vol. 326, N 5949. P. 144—147.
33. Nowikovsky K., Pozzan T., Rizzuto R., Scorrano L., Bernardi P. The Pathophysiology of LETM1. *The Journal of General Physiology*. 2012. Vol. 139, N 6. P. 445—454.
34. Waldeck-Weirmair M., Jean-Quartier C., Rost R. Leucine zipper EF hand-containing transmembrane protein 1 (Letm1) and uncoupling proteins 2 and 3 (UCP2/3) contribute to two distinct mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake pathways. *The Journal of Biological Chemistry*. 2012. Vol. 286, N 32. P. 28444—28455.
35. Tsai M.F., Jiang D., Zhao L., Clapham D., Miller C. Functional reconstitution of the mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  antiporter Letm1. *The Journal of General Physiology*. 2014. Vol. 143, N 1. P. 67—73.
36. Shao J., Fu Z., Ji Y., Guan X., Guo S., Ding Z., Yang X., Cong Y., Shen Y. Leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1 (LETM1) forms a  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  antiporter. *Scientific Reports*. 2016. Vol. 6. P. 34174.
37. Danylovyh H.V., Danylovyh Yu.V., Kosterin S.O. Nitric oxide induced polarization of myometrium cells plasmalemma revealed by application of fluorescent dye 3,3'-dihexyloxacarbocyanine. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*. 2019. Vol. 55. P. 34—45.
38. Kaasik A., Safiulina D., Zharkovsky A., Veksler V. Regulation of mitochondrial matrix volume. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 2007. Vol. 292, N 1. P. C157—C163.
39. Nowikovsky K., Schweyen R.J., Bernardi P. Pathophysiology of mitochondrial volume homeostasis: potassium transport and permeability transition. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009. Vol. 1787, N 5. P. 345—350.
40. Natarajan G.K., Mishra J., Camara A.K.S., Kwok W.-M. LETM1: A Single Entity With Diverse Impact on Mitochondrial Metabolism and Cellular Signaling. *Frontiers in Physiology*. 2021. Vol. 12. P. 637852.
41. Merkus H.G. Particle size measurements. Fundamentals, practice, quality. Springer, 2009.
42. Кандаурова Н.В., Чуніхін А.Ю., Бабіч Л.Г., Шликов С.Г., Костерін С.О. Модулятори трансмембранного кальцієвого обміну в мітохондріях міометрія змінюють їхній гідродинамічний діаметр. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2010. Vol. 82, N 6. P. 52—57.
43. Gunter T.E., Sheu S.S. Characteristics and possible function of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  transport mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009. Vol. 1787, N 11. P. 1291—1308.
44. Weiss R.G., Lakatta E.G., Gerstenblith G. Effects of amiloride on metabolism and contractility during reoxygenation in perfused rat hearts. *Circulation Research*. 1990. Vol. 66, N 4. P. 1012—1022.
45. Бабіч Л.Г., Борисова Л.А., Шликов С.Г., Тігус О.В., Костерін С.А. Influence of Mg ions and spermine on ATP-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  transport in myometrial intracellular structures. II. Comparative study of spermine, Mg ions and cyclosporin A effects on  $\text{Ca}^{2+}$  transport in mitochondria. *Український біохімічний журнал*. 2004. Т. 76. С. 55—62.
46. Pradhan R.K., Qi F., Beard D.A., Dash R.K. Characterization of  $\text{Mg}^{2+}$  inhibition of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by a mechanistic model of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uniporter. *Biophysical Journal*. 2011. Vol. 101, N 9. P. 2071—2081.
47. Odagiri K., Katoh H., Kawashima H., Tanaka T., Ohtani H., Saotome M., Urushida T., Satoh H., Hayashi H. Local control of mitochondrial membrane potential, permeability transition pore and reactive oxygen species by calcium and calmodulin in rat ventricular myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2009. Vol. 46, N 6. P. 989—997.
48. Babich L.G., Shlykov S.G., Kushnarova A.M., Kosterin S.O.  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent regulation of the  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in the myometrium mitochondria. I. Trifluoperazine effects on mitochondria membranes polarization and  $[\text{Ca}^{2+}]_m$ . *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2016. Vol. 88, N 4. P. 5—11.
49. Sobieszek A. Calmodulin antagonist action in smooth-muscle myosin phosphorylation. Different mechanisms for trifluoperazine and calmidazolium inhibition. *Biochemical Journal*. 1989. Vol. 262, N 1. P. 215—223.

50. Palty R., Hershfinkel M., Sekler I. Molecular identity and functional properties of the mitochondrial  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger. *Journal of Biological Chemistry*. 2012. Vol. 287, N 38. P. 31650—31657.

51. Данилович Ю.В. Вплив оксидів азоту та пероксиду водню на транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  в ретикулумі пермеабілізованих міоцитів матки шурів. *Фізіологічний журнал*. 2010. Т. 56, № 1. С. 72—78.

### До розділу 6

1. Heikal A.A. Intracellular coenzymes as natural biomarkers for metabolic activities and mitochondrial anomalies. *Biomarker in Medicine*. 2010. Vol. 4, N 2. P. 241—263.

2. Skala M.C., Riching K.M., Gendron-Fitzpatrick A., Eickhoff J., Eliceiri K.W., White J.G., Ramanujam N. In vivo multiphoton microscopy of NADH and FAD redox states, fluorescence lifetimes, and cellular morphology in precancerous epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2007. Vol. 104, N 49. P. 19494—19499.

3. Kosterin P., Kim G.H., Muschol M., Obaid A.L., Salzberg B.M. Changes in FAD and NADH fluorescence in neurosecretory terminals are triggered by calcium entry and by ADP production. *The Journal of Membrane Biology*. 2005. Vol. 208, N 2. P. 113—124.

4. Shuttleworth C.W. Use of NAD(P)H and flavoprotein autofluorescence transients to probe neuron and astrocyte responses to synaptic activation. *Neurochemistry International*. 2010. Vol. 56, N 3. P. 379—386.

5. Schaeue D., Ratikan J.A., Iwamoto K.S. Cellular autofluorescence following ionizing radiation. *PLoSone*. 2012. Vol. 7, N 2. e32062.

6. Daiber A. Redox signaling (cross-talk) from and to mitochondria involves mitochondrial pores and reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010. Vol. 1797, N 6-7. P. 897—906.

7. Schafer F.Q., Buettner G.R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology & Medicine*. 2001. Vol. 30, N 11. P. 1191—1212.

8. Wang H.W., Wei Y.H., Guo H.W. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) fluorescence for detection of cell death. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 2009. Vol. 9, N 9. P. 1012—1017.

9. Shah A.T., Beckler M.D., Walsh A.J., Jones W.P., Pohlmann P.R., Skala M.C. Optical metabolic imaging of treatment response in human head and Neck squamous cell carcinoma. *PLoSone*. 2014. Vol. 9, N 3. e90746.

10. Staniszewski K., Audi S.H., Sepehr R., Jacobs E.R., Ranji M. Surface fluorescence studies of tissue mitochondrial redox state in isolated perfused rat lungs. *Annals of Biomedical Engineering*. 2013. Vol. 41, N 4. P. 827—836.

11. Stowe D.F., Gadicherla A.K., Zhou Y., Aldakkak M., Cheng Q., Kwok W.-M., Jiang M.T., Heisner J.S., Yang M., Camara A.K.S. Protection against cardiac injury by small  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive  $\text{K}^+$ -channels identified in guinea pig cardiac inner mitochondrial membrane. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013. Vol. 1828, N 2. P. 427—442.

12. Riess M.L., Camara A.K., Kevin L.G., An J., Stowe D.F. Reduced reactive  $\text{O}_2$  species formation and preserved mitochondrial NADH and  $[\text{Ca}^{2+}]$  levels during short-term 17 degrees C ischemia in intact hearts. *Cardiovascular Research*. 2004. Vol. 61, N 3. P. 580—590.

13. Зинченко В.П., Гончаров Н.В., Теплова В.В., Касьмов В.А., Петрова О.И., Бережнов А.В., Сенченков Е.В., Миндукшев И.В., Дженкинс Р.О., Радилов А.С. Изучение взаимосвязи внутриклеточных сигнальных и метаболических путей при ингибировании митохондриальной аконитазы фторацетатом. *Цитология*. 2007. Т. 49, № 12. С. 1023—1031.

14. Lakowicz J.R. Principles of fluorescence spectroscopy. Second edition. Plenum Publisher, New York, 1999.

15. Islam M.S., Honma M., Nakabayashi T., Kinjo M., Ohta N. pH Dependence of the Fluorescence Lifetime of FAD in Solution and in Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013. Vol. 14, N 1. P. 1952—1963.

16. Ying W. NAD<sup>+</sup>/NADH and NADP<sup>+</sup>/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2008. Vol. 10, N 2. P. 179—206.

17. Agarwal B., Dash R.K., Stowe D.F., Bosnjak Z.J., Camara A.K. Isoflurane modulates cardiac mitochondrial bioenergetics by selectively attenuating respiratory complexes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2014. Vol. 1837, N 3. P. 354–365.
18. Trumppower B.L. The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bcl complex. *The Journal of Biological Chemistry*. 1990. Vol. 265, N 20. P. 11409–11412.
19. Hunte C., Palsdottir H., Trumppower B.L. Protonmotive pathways and mechanisms in the cytochrome bcl complex. *FEBS Letters*. 2003. Vol. 545, N 1. P. 39–46.
20. Watzke N., Diekert K., Obrdlík P. Electrophysiology of respiratory chain complexes and the ADP-ATP exchanger in native mitochondrial membranes. *Biochemistry*. 2010. Vol. 49, N 48. P. 10308–10318.
21. Gellerich F.N., Gizatullina Z., Trumbeckaite S., Nguyen H.P., Pallas T., Arandarcikaitė O., Vielhaber S., Seppet E., Striggow F. The regulation of OXPHOS by extramitochondrial calcium. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010. Vol. 1797, N 6-7. P. 1018–1027.
22. Ghafourifar P., Cadenas E. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2005. Vol. 26, N 4. P. 190–195.
23. Tengan C.H., Rodrigues G.S., Godinho R.O. Nitric oxide in skeletal muscle: role on mitochondrial biogenesis and function. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012. Vol. 13, N 12. P. 17160–17184.
24. Brown G.C., Borutaite V. Nitric oxide and mitochondrial respiration in the heart. *Cardiovascular Research*. 2007. Vol. 75, N 2. 283–290.
25. Carreras M.C., Poderoso J.J. Mitochondrial nitric oxide in the signaling of cell integrated responses. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 2007. Vol. 292. P. C1569–C1580.
26. Poderoso J.J., Carreras M.C., Schopfer F., Lisdero C., Riobó N., Giulivi C., Boveris A., Boveris A.A., Cadenas E. The reaction of nitric oxide with ubiquinol: kinetic properties and biological significance. *Free Radical Biology & Medicine*. 1999. Vol. 26. P. 925–935.
27. Zaobornyj T., Ghafourifar P. Strategic localization of heart mitochondrial NOS: a review of the evidence. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. 2012. Vol. 303, N 11. P. H1283–H1293.
28. Турпаев К.Т. Роль окиси азота в передаче сигнала между клетками. *Молекулярная биология*. 1998. Т. 32, № 4. С. 581–591.
29. Проскураков С.Я., Конопляников А.Т., Иванников А.И. [и др.]. Биология окиси азота. *Успехи современной биологии*. 1999. Т. 119, № 4. С. 380–395.
30. Davidson S.M., Duchon M.R. Effects of NO on mitochondrial function in cardiomyocytes: pathophysiological relevance. *Cardiovascular Research*. 2006. Vol. 71, N 1. P. 10–21.
31. Giulivi C., Kato K., Cooper C.E. Nitric oxide regulation of mitochondrial oxygen consumption I: cellular physiology. *American Journal of Physiology*. 2006. Vol. 291, N 6. P. C1225–C1231.
32. Plotnikov E.Y., Kazachenko A.V., Vysokikh M.Y., Vasileva A.K., Tcvirkun D.V., Isaev N.K., Kirpatovsky V.I., Zorov D.B. The role of mitochondria in oxidative and nitrosative stress during ischemia/reperfusion in the rat kidney. *Kidney International*. 2007. Vol. 72, N 12. P. 1493–1502.
33. Chen Y.-R., Zweier J.L. Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation. *Circulation Research*. 2014. Vol. 114, N 3. P. 524–537.
34. Schönfeld P., Wojtczak L. Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: the cellular perspective. *Journal of Lipid Research*. 2016. Vol. 57, N 6. P. 943–954.
35. Danylovyh H.V., Danylovyh Yu.V., Kosterin S.O. Nitric oxide induced polarization of myometrium cells plasmalemma revealed by application of fluorescent dye 3,3'-dihexyloxacarbocyanine. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*. 2019. Vol. 55. P. 34–45.
36. Brocard J.B., Rintoul G.L., Reynolds I.J. New perspectives on mitochondrial morphology in cell function. *Biology of the Cell*. 2003. Vol. 95, N 5. P. 239–242.
37. Okamoto K., Shaw J.M. Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annual Review of Genetic*. 2005. Vol. 39. P. 503–536.
38. Kaasik A., Safiulina D., Zharkovsky A., Veksler V. Regulation of mitochondrial matrix volume. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 2007. Vol. 292, N 1. P. C157–C163.

39. Nowikovsky K., Schweyen R.J., Bernardi P. Pathophysiology of mitochondrial volume homeostasis: potassium transport and permeability transition. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009. Vol. 1787, N 5. P. 345—350.
40. Пономаренко О.В., Бабіч Л.Г., Горчев В.Ф., Костерін С.О. Дослідження  $\text{Ca}^{2+}$ -залежного набухання мітохондрій гладенького м'язу за допомогою метода проточної цитометрії та вплив сперміна на цей процес. *Український біохімічний журнал*. 2006. Т. 78, № 6. С. 38—45.
41. Белослюдцев К.Н., Белослюдцева Н.В., Дубинин М.В., Гудков С.В., Пеньков Н.В., Самарцев В.Н. Влияние спермина на  $\text{Ca}(2+)$ -зависимую проницаемость митохондрий и липосом, индуцированную пальмитиновой и  $\alpha, \omega$ -гексадекандиоловой кислотами. *Биофизика*. 2014. Т. 59. № 5. С. 895—901.
42. Gostimskaya I.S., Grivennikova V.G., Zharova T.V., Bakeeva L.E., Vinogradov A.D. In situ assay of the intramitochondrial enzymes: use of alamethicin for permeabilization of mitochondria. *Analytical Biochemistry*. 2003. Vol. 313, N 1. P. 46—52.
43. Chan L., Wong Y.C. Cytochemical localisation and characterisation of proteoglycans (glycosaminoglycans) in the epithelial-stromal interface of the seminal vesicle of the guinea pig. *Journal of Anatomy*. 1992. Vol. 180, Pt. 1. P. 41—56.
44. Wieraszko A. Evidence that ruthenium red disturbs the synaptic transmission in the rat hippocampal slices through interacting with sialic acid residues. *Brain Research*. 1986. Vol. 378, N 1. P. 120—126.
45. Ryu S.-Y., Beutner G., Dirksen R.T., Kinnally K.W., Sheu S.-S. Mitochondrial ryanodine receptors and other mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  permeable. *FEBS Letters*. 2010. Vol. 584, N 10. P. 1948—1955.
46. Santo-Domingo J., Demaurex N. Calcium uptake mechanisms of mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010. Vol. 1797, N 6-7. P. 907—912.
47. Herrmann-Frank A., Darling E., Meissner G. Functional characterization of the  $\text{Ca}^{2+}$ -gated  $\text{Ca}^{2+}$  release channel of vascular smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Pflügers Archiv*. 1991. Vol. 418, N 4. P. 353—359.
48. Костерін С.О., Кальченко В.І., Векліч Т.О., Бабіч Л.Г., Шликов С.Г. Каліксарени як модулятори АТФ-гідролазних систем гладеньком'язових клітин. Київ: Наукова думка, 2019. 256 с.
49. Perret F., Lazar A.N., Coleman A.W. Biochemistry of the para-sulfonato-calix[n]arenes. *Chemical Communications*. 2006. Vol. 23. P. 2425—2438.
50. Бухаров С.В., Нугуманова Г.Н., Тагашева Р.Г. Полифенольные антиоксиданты на основе каліксаренов. Казань: Изд-во КНИТУ, 2016.
51. Pan Y.-C., Hu X.-Y., Guo D.-S. Biomedical Applications of Calixarenes: State of the Art and Perspectives. *Angewandte Chemie International Edition*. 2021. Vol. 60, N 6. P. 2768—2794.
52. Vovk A.I., Kalchenko V.I., Cherenok S.A., Kukhar V.P., Muzychka O.V., Lozynsky M.O. Calix[4]arene methylenebisphosphonic acids as calf intestine alkaline phosphatase inhibitors. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2004. Vol. 2, N 21. P. 3162—3166.
53. Buldenko V.M., Trush V.V., Kobzar O.L., Drapailo A.B., Kalchenko V.I., Vovk A.I. Calixarene-based phosphinic acids as inhibitors of protein tyrosine phosphatases *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2019. Vol. 29, N 6. P. 797—801.
54. Лабинцева Р.Д., Слінченко Н.М., Векліч Т.О., Родік Р.В., Черенок С.О., Бойко В.І., Кальченко В.І., Костерін С.О. Порівняльне дослідження впливу каліксаренів на  $\text{Mg}^{2+}$ -залежні АТФ-гідролазні ферментативні системи гладеньком'язових клітин матки. *Український біохімічний журнал*. 2007. Т. 79, № 3. С. 44—54.
55. Шликов С.Г., Бабіч Л.Г., Слінченко Н.М., Родік Р.В., Бойко В.І., Кальченко В.І., Костерін С.О. Каліксарен С-91 стимулює акумуляцію іонів Са в мітохондріях міометрії. *Український біохімічний журнал*. 2007. Т. 79, № 4. С. 28—33.
56. Векліч Т.О., Шкрабак О.А., Мазур Ю.Ю., Родік Р.В., Кальченко В.І., Костерін С.О. Кінетика інгібіторної дії калікс[4]арену С-90 на активність транспортної  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2014. Vol. 86, N 5. P. 37—46.



57. Бабіч Л.Г., Шликов С.Г., Кушнарьова А.М., Єсипенко О.А., Костерін С.О. Халкон-вмісні калікс[4]арени — нанорозмірні модулятори поляризації мембран мітохондрій та вмісту йонізованого Са в них. *Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології*. 2017. Т. 15, № 1. С. 193—202.
58. Цимбалюк О.В., Онуфрійчук О.В., Векліч Т.О., Черенок С.О., Кальченко В.І., Мірошніченко М.С., Костерін С.О. Порівняльне дослідження впливу оубаїну і каліксарен біс-гідроксиметилфосфонової кислоти на активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРази та механокінетику процесу «скорочення-розслаблення» гладенького м'язу. *Фізика живого*. 2006. Т. 14, № 1. С. 53—72.
59. Цимбалюк О.В., Родік Р.В., Кальченко В.І., Костерін С.О. Механокінетичні параметри скоротливої активності гладеньких м'язів саесит шура за умов хронічної дії каліксарену С107 in vivo. *Фізика живого*. 2010. Т. 18, № 1. С. 47—51.
60. Цимбалюк О.В., Костерін С.О. Вплив каліксарену С-90 на скоротливу активність гладеньких м'язів міометрія шурів. *Біологічні студії*. 2013. Т. 7, № 3. С. 5—20.

### До розділу 7

1. Костерін С.О., Кальченко В.І., Векліч Т.О., Бабіч Л.Г., Шликов С.Г. Каліксарени як модулятори АТР-гідролазних систем гладеньком'язових клітин. Київ: Наукова думка, 2019. 256 с.
2. Фёгле Ф., Вебер Э. Каліксарени. Химия комплексов «гость-хозяин». Синтез, структуры и применения. Москва: Мир; 1988. С. 445—502.
3. Атамась Л.І., Бойко В.І., Драпайло А.Б., Єсипенко О.А., Кальченко О.І., Клячина М.А., Матвеев Ю.І., Мірошніченко С.І., Родік Р.В., Черенок С.О., Кальченко В.І. Супрамолекулярна хімія каліксаренів. *Журнал органічної та фармакологічної хімії*. 2009. Т. 7, вип. 2. № 26. С. 28—36.
4. Бухаров С.В., Нугуманова Г.Н., Тагашева Р.Г. Полифенольные антиоксиданты на основе каліксаренов. Казань: Изд-во КНИТУ, 2016.
5. Perret F., Lazar A.N., Coleman A.W. Biochemistry of the para-sulfonato-calix[n]arenes. *Chemical Communications*. 2006. Vol. 23. P. 2425—2438.
6. Gutshe D. Calixarenes Revisited. RSC Monographs in Chemistry. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1998. P. 32—40.
7. Xiong D. Colorimetric detection of pesticides based on calixarene modified silver nanoparticles in water. *Nanotechnology*. 2008. Vol. 19, N 46. P. 126—135.
8. Nimse S. Biological applications of functionalized calixarenes. *Chemical Society Reviews*. 2013. Vol. 42, N 1. P. 366—386.
9. Родік Р.В. Застосування каліксаренів для трансфекції ДНК у клітини. *Український біохімічний журнал*. 2012. Т. 84. № 5. С. 5—15.
10. Pan Y.-C., Hu X.-Y., Guo D.-S. Biomedical Applications of Calixarenes: State of the Art and Perspectives. *Angewandte Chemie International Edition*. 2021. Vol. 60, N 6. P. 2768—2794.
11. Позняк Т.А.; винахідник. Антитромботичні каліксарени. Патент України № а 2010 04273. 26 грудня 2011.
12. Цимбалюк О.В., Онуфрійчук О.В. Векліч Т.О., Черенок С.О., Кальченко В.І., Мірошніченко М.С., Костерін С.О. Порівняльне дослідження впливу оубаїну і каліксаренбіс-гідроксиметилфосфонової кислоти на активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРази та механокінетику процесу «скорочення-розслаблення» гладенького м'язу. *Фізика живого*. 2006. Т. 14, № 1. С. 53—72.
13. Векліч Т.О., Костерін С.О., Родік Р.В., Черенок С.О., Бойко В.І., Кальченко В.І. Вплив каліксаренфосфонових кислот на  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРазну активність у плазматичній мембрані гладеньком'язових клітин *Український біохімічний журнал*. 2006. Т. 78, № 1. С. 70—78.
14. Векліч Т.О., Шкрабак О.А., Родік Р.В., Кальченко В.І., Костерін С.О. Каліксарен С-107 збільшує спорідненість  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин до убаїну. *Український біохімічний журнал*. 2011. Т. 83, № 1. С. 38—44.
15. Векліч Т.О., Шкрабак О.А., Родік Р.В., Кальченко В.І., Костерін С.О. Вплив каліксарену С-107 на кінетичні параметри  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРази плазматичної мембрани міоцитів матки. *Український біохімічний журнал*. 2011. Т. 83, № 2. С. 36—44.

16. Бевза А.А., Лабинцева Р.Д., Родік Р.В., Черенок С.О., Костерін С.О., Кальченко В.І. Вплив калікс[4]аренів на активність АТР-ази актоміозинового комплексу та субфрагмента-1 міозину міометрія. *Український біохімічний журнал*. 2009. Т. 81, № 6. С. 49—58.
17. Лабинцева Р.Д., Бевза А.А., Бевза О.В., Черенок С.О., Кальченко В.І., Костерін С.О. Структурно-функціональні основи міжмолекулярної взаємодії калікс[4]арену С-97 із субфрагментом-1 міозину міометрія. *Український біохімічний журнал*. 2012. Т. 84, № 1. С. 34—44.
18. Бевза А.А., Лабинцева Р.Д., Бевза О.В., Черенок С.О., Кальченко В.І., Костерін С.О. Кінетичні закономірності та механізм дії калікс[4]арену С-99 на АТР-азну активність субфрагмента-1 міозину міометрія. *Український біохімічний журнал*. 2010. Т. 82, № 6. С. 22—32.
19. Веклич Т.А., Шкрабак А.А., Слінченко Н.Н., Мазур Ю.Ю., Костерін С.А., Родік Р.В., Бойко В.И., Кальченко В.И. Калікс[4]арен С-90 селективно інгібує  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматической мембрани клеток миометрия. *Биохимия*. 2014. Т. 79, № 5. С. 417—424.
20. Веклич Т.О., Шкрабак О.А., Мазур Ю.Ю., Родік Р.В., Кальченко В.І., Костерін С.О. Кінетика інгібіторної дії калікс[4]арену С-90 на активність транспортної  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2014. Vol. 86, N 5. P. 37—46.
21. Veklich T.O. The inhibitory influence of calix[4]arene of C-90 on the activity of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPases in plasma membrane and sarcoplasmic reticulum in myometrium cells. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2016. Vol. 88, N 2. P. 5—15.
22. Veklich T.O., Skrabak O.A., Nikonishyna Yu.V., Rodik R.V., Kalchenko V.I., Kosterin S.O. Calix[4]arene C-956 selectively inhibits plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase in myometrial cells. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2018. Vol. 90, N 5. P. 34—42.
23. Веклич Т.О., Шкрабак О.А., Мазур Ю.Ю., Родік Р.В., Бойко В.І., Кальченко В.І., Костерін С.О. Кінетичні закономірності дії калікс[4]арену С-90 на  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРази активність плазматичної мембрани та на концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  в незбуджених клітинах міометрія. *Український біохімічний журнал*. 2013. Т. 85, № 4. С. 20—29.
24. Лабинцева Р.Д., Слінченко Н.М., Веклич Т.О., Родік Р.В., Черенок С.О., Бойко В.І., Кальченко В.І., Костерін С.О. Порівняльне дослідження впливу каліксаренів на  $\text{Mg}^{2+}$ -залежні АТР-гідролазні ферментативні системи гладеньком'язових клітин матки. *Український біохімічний журнал*. 2007. Т. 79, № 3. С. 44—54.
25. Цимбалюк О.В., Костерін С.О. Вплив каліксарену С-90 на скоротливу активність гладеньких м'язів міометрія шурів. *Біологічні студії*. 2013. Т. 7, № 3. С. 5—20.
26. Шликов С.Г., Бабіч Л.Г., Слінченко Н.М., Родік Р.В., Бойко В.І., Кальченко В.І., Костерін С.О. Каліксарен С-91 стимулює акумуляцію іонів Са в мітохондріях міометрія. *Український біохімічний журнал*. 2007. Т. 79, № 4. С. 28—33.
27. Бабіч Л.Г., Шликов С.Г., Бойко В.И., Клячина М.А., Костерін С.А. Калікс[4]аренхалконамиды С-136 и С-137 гиперполяризуют мембрану митохондрий миометрия. *Биоорганическая химия*. 2013. Т. 39(6). С. 728—735.
28. Бабіч Л.Г., Шликов С.Г., Кушнарьова А.М., Єсипенко О.А., Костерін С.О. Халкон-вмісні калікс[4]арени — нанорозмірні модулятори поляризації мембран мітохондрій та вмісту йонізованого Са в них. *Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології*. 2017. Т. 15, № 1. С. 193—202.
29. Mazur Ju., Veklich T., Shkrabak A., Kosterin S. New myometrium plasma membrane calcium pump suppressor — calix[4]arene C-90 and its structural peculiarities which determine efficiency of its action. "European Muscle Conference": abstracts of the 44<sup>th</sup> International conference. Warsaw, Poland, 2015. 62 p.
30. Бабіч Л.Г., Фомин В.П., Костерін С.А. Влияние мембранного потенциала на  $\text{Mg}^{2+}$ , АТР-зависимый транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  через сарколемму гладкомышечных клеток. *Биохимия*. 1990. Т. 55, № 10. С. 1890—1901.
31. Piantadosi C.A., Suliman H.B. Redox Regulation of Mitochondrial Biogenesis. *Free Radical Biology & Medicine*. 2012. Vol. 53, N 11. С. 2043—2053.

32. Feissner R.F., Skalska J., Gaum W.E. Crosstalk signaling between mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  and ROS. *Frontiers in bioscience*. 2009. Vol. 14, N 4. P. 1197–1218.
33. Xie Z., Cai T.  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function. *Molecular interventions*. 2003. Vol. 3, N 3. P. 157–168.
34. Kaasik A., Safiulina D., Zharkovsky A., Veksler V. Regulation of mitochondrial matrix volume. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 2007. Vol. 292, N 1. P. C157–C163.
35. Вадзюк О.Б. АТР-чутливі  $\text{K}^+$ -канали м'язових клітин: властивості та фізіологічна роль. *Український біохімічний журнал*. 2014. Т. 86, № 3. С. 5–22.
36. Dzeja P.P., Holmuhamedov E.L., Ozcan C., Pucar D., Jahangir A., Terzic A. Mitochondria. Gateway for Cytoprotection. *Circulation Research*. 2001. Vol. 89, N 9. P. 744–746.
37. Marchi S., Giorgi C., Suski J.M., Agnoletto C., Bononi A., Bonora M., De Marchi E., Missiroli S., Patergnani S., Poletti F., Rimessi A., Duszynski J. et al. Mitochondria-Ros Crosstalk in the Control of Cell Death and Aging. *Journal of Signal Transduction*. 2012. Vol. 2012: Article ID 329635.
38. Zorova L.D., Popkova V.A., Plotnikova E.Y., Silacheva D.N., Pevzner I.B., Jankauskasa S.S., Babenko V.A., Zorov S.D., Balakirevad A.V., Juhaszovae M., Sollotte S.J., Zorov D.B. Mitochondrial membrane potential. *Analytical Biochemistry*. 2018. Vol. 552. P. 50–59.
39. Carreras M.C., Poderoso J.J. Mitochondrial nitric oxide in the signaling of cell integrated responses. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 2007. Vol. 292, N 5. P. C1569–C1580.

### До узагальнення

1. Bryan N.S., Bian K., Murad F. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development. *Frontiers in Bioscience*. 2009. Vol. 14. P. 1–18.
2. Fernando V., Zheng X., Walia Y., Sharma V., Letson J., Furuta S. S-Nitrosylation: an emerging paradigm of redox signaling. *Antioxidants*. 2019. Vol. 8, N 9. P. 404.
3. Philippu A. Nitric Oxide: A Universal Modulator of Brain Function. *Current Medical Chemistry*. 2016. Vol. 23, N 24. P. 2643–2652.
4. Treuer A.V., Gonzalez D.R. Nitric oxide synthases, S-nitrosylation and cardiovascular health: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities (Review). *Molecular Medicine Reports*. 2015. Vol. 11. P. 1555–1565.
5. Ghimire K., Altmann H.M., Straub A.C., Isenberg J.S. Nitric oxide: what's new to NO? *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 2017. Vol. 312. P. C254–C262.
6. Litvinova L., Atochin D.N., Fattakhov N., Vasilenko M., Zatulokin P., Kirienkova E. Nitric oxide and mitochondria in metabolic syndrome. *Frontiers in Physiology*. 2015. Vol. 6. P. 20.
7. Nosarev A.V., Smagliy L.V., Anfingenova Y., Popov S.V., Kapilevich L.V. Exercise and NO production: relevance and implications in the cardiopulmonary system. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2015. Vol. 2. P. 73.
8. Okawa T., Vedernikov Y.P., Saade G.R., Garfield R.E. Effect of nitric oxide on contractions of uterine and cervical tissues from pregnant rats. *Gynecological Endocrinology*. 2004. Vol. 18, N 4. P. 186–193.
9. Buxton I.L.O. The regulation of uterine relaxation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2007. Vol. 18, N 3. P. 340–347.
10. Sladek M.S., Magness R.R., Conrad K.P. Nitric oxide and pregnancy. *American Journal of Physiology*. 1997. Vol. 272, N 2. P. R441–R463.
11. Hertelendy F., Zakar T. Regulation of myometrial smooth muscle function. *Current Pharmaceutical Design*. 2004. Vol. 10, N 20. P. 2499–2517.
12. Anderson A.J., Jackson T.D., Stroud D.A., Stojanovski D. Mitochondria-hubs for regulating cellular biochemistry: emerging concepts and networks. *Open Biology*. 2019. Vol. 9, N 8. P. 190126.
13. Xu Z., Zhang D., He X., Huang Y., Shao H. Transport of Calcium ions into mitochondria. *Current Genomics*. 2016. Vol. 17, N 3. P. 215–219.
14. Zhao H., Pan X. Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  and cell cycle regulation. *International Review of Cell and Molecular Biology*. 2021. Vol. 362. P. 171–207.

15. Cao J.L., Adaniya S.M., Cypress M.W., Suzuki Y., Kusakari Y., Jhun B.S., O-Uchi J. Role of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> homeostasis in cardiac muscles. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2019. Vol. 663. P. 276—287.
16. Bravo-Sagua R., Parra V., López-Crisosto C., Díaz P., Quest A.F.G., Lavandero S. Calcium Transport and Signaling in Mitochondria. *Comprehensive Physiology*. 2017. Vol. 7. P. 623—634.
17. Gellerich F.N., Gizatullina Z., Trumbeckaite S., Nguyen H.P., Pallas T., Arandarcikaitė O., Vielhaber S., Seppet E., Striggow F. The regulation of OXPHOS by extramitochondrial calcium. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010. Vol. 1797, N 6-7. P. 1018—1027.
18. Rasola A., Bernardi P. Mitochondrial permeability transition in Ca<sup>2+</sup>-dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium*. 2011. Vol. 50, N 3. P. 222—233.
19. Cali T., Ottolini D., Brini M. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> as a key regulator of mitochondrial activities. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2012. Vol. 942. P. 53—73.
20. Naumova N., Šachl R. Regulation of Cell Death by Mitochondrial Transport Systems of Calcium and Bcl-2 Proteins. *Membranes*. 2020. Vol. 10. P. 299.
21. Shiva S. Mitochondria as metabolizers and targets of nitrite. *Nitric Oxide*. 2010. Vol. 22, N 2. P. 64—74.
22. Giulivi C., Kato K., Cooper C.E. Nitric oxide regulation of mitochondrial oxygen consumption I: cellular physiology. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 2006. Vol. 291, N 6. P. C1225—C1231.
23. Traaseth N., Elfering S., Solien J., Haynes V., Giulivi C. Role of calcium signaling in activation of mitochondrial nitric oxide synthase and citric acid cycle. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2004. Vol. 1658, N 1-2. P. 64—71.
24. Aguilar H.N., Mitchell B.F. Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility. *Human Reproduction Update*. 2010. Vol. 16, N 6. P. 725—744.
25. Wray S., Prendergast C. The Myometrium: From Excitation to Contractions and Labour. Springer Nature Singapore Pte Ltd. H. Hashitani, R. J. Lang (eds.), Smooth Muscle Spontaneous Activity. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2019. 1124 p.
26. Norman J.E., Cameron I.T. Nitric oxide in the human uterus. *Reviews of Reproduction*. 1996. Vol. 1, N 1. P. 61—68.
27. Ekerhovd E., Weidegård B., Brännström M., Norström A. Nitric oxide-mediated effects on myometrial contractility at term during prelabor and labor. *Obstetrics and Gynecology*. 1999. Vol. 93, N 6. P. 987—994.
28. Bao S., Rai J., Schreiber J. Expression of nitric oxide synthase isoforms in human pregnant myometrium at term. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 2002. Vol. 9, N 6. P. 351—356.
29. Gunter T.E., Gunter E., Yule D.I., Gunter K.K., Eliseev R.A., Salter J.D. Calcium and mitochondria. *FEBS Letters*. 2004. Vol. 567, N 1. P. 96—102.
30. Graier W.F., Frieden M., Malli R. Mitochondria and Ca<sup>2+</sup> signaling: old quests, new functions. *European Journal of Physiology*. 2007. Vol. 455, N 3. P. 375—396.
31. Szabadkai G., Duchen M.R. Mitochondria: The Hub of Cellular Ca<sup>2+</sup> Signaling. *Physiology*. 2008. Vol. 23. P. 84—94.
32. Haynes V., Elfering S.L., Squires R.J., Traaseth N., Solien J., Ettl A., Giulivi C. Mitochondrial Nitric-oxide Synthase: Role in Pathophysiology. *IUBMB Life*. 2003. Vol. 55, N 10-11. P. 599—603.
33. Davidson S.M., Duchen M.R. Effects of NO on mitochondrial function in cardiomyocytes: pathophysiological relevance. *Cardiovascular Research*. 2006. Vol. 71, N 1. P. 10—21.
34. Giulivi C. Mitochondria as generators and targets of nitric oxide. *Novartis Foundation Symposium*. 2007. Vol. 287. P. 92—104.
35. Santos C.X.C., Anilkumar N., Zhang M., Brewer A.C., Shah A.M. Redox signaling in cardiac myocytes. *Free Radical Biology & Medicine*. 2011. Vol. 50, N 7. P. 777—793.
36. Carreras M.C., Poderoso J.J. Mitochondrial nitric oxide in the signaling of cell integrated responses. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 2007. Vol. 292. P. C1569—C1580.
37. Levine A.B., Punihaole D., Levine T.B. Characterization of the role of nitric oxide and its clinical applications. *Cardiology*. 2012. Vol. 122. P. 55—68.

38. Brown G.C., Borutaite V. Nitric oxide and mitochondrial respiration in the heart. *Cardiovascular Research*. 2007. Vol. 75, N 2. P. 283—290.
39. Valdes G., Corthorn J. Review: the angiogenic and vasodilatory uteroplacental network. *Placenta*. 2011. Vol. 32, Suppl. 2. P. S170—175.
40. Yellon S.M., Mackler A.M., Kirby M.A. The role of leukocyte traffic and activation in parturition. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 2003. Vol. 10, N 6. P. 323—338.
41. Данилович Ю.В., Тугай В.А. Утворення NO та H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> у стромальних клітинах ендометрія за дії ацетилхоліну. *Український біохімічний журнал*. 2001. Т. 73, № 2. С. 110—115.
42. Cameron I.T., Campbell S. Nitric oxide in the endometrium. *Human Reproduction Update*. 1998. Vol. 4, N 5. P. 565—569.
43. Yoshiki N., Kubota T., Matsumoto Y. Expression of inducible nitric oxide synthase in human cultured endometrial stromal cells. *Molecular Human Reproduction*. 1999. Vol. 5, N 4. P. 353—357.
44. Myatt L., Brockman D.E., Eis A.L.W., Pollock J.S. Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the human placenta. *Placenta*. 1993. Vol. 14, N 5. P. 487—495.
45. Farina M., Ribeiro M.L., Franchi A. Nitric oxide synthases in pregnant rat uterus. *Reproduction*. 2001. Vol. 121, N 3. P. 403—407.
46. Nadeem L., Shynlova O., Mesiano S., Lye S. Progesterone Via its Type-A Receptor Promotes Myometrial Gap Junction Coupling. *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7, N 1. P. 13357.
47. Karasinski J., Galas J., Semik D., Fiertak A., Bilinska B., Kilarski W.M. Changes of connexin 43 expression in non-pregnant porcine myometrium correlate with progesterone concentration during oestrous cycle. *Reproduction in Domestic Animals*. 2010. Vol. 45, N 6. P. 959—966.
48. Buhimschi I.A., Saade G.R., Chwalisz K., Garfield R.E. The nitric oxide pathway in pre-eclampsia: pathophysiological implications. *Human Reproduction Update*. 1998. Vol. 4, N 1. P. 25—42.
49. Garfield R.E., Saade G., Buhimschi C., Buhimschi I., Shi L., Shi S.Q., Chwalisz K. Control and assessment of the uterus and cervix during pregnancy and labour. *Human Reproduction Update*. 1998. Vol. 4, N 5. P. 673—695.
50. Zullino S., Buzzella F., Simoncini T. Nitric oxide and biology of pregnancy. *Vascular Pharmacology*. 2018. Vol. 110. P. 71—74.
51. Zaobornyj T., Ghafourifar P. Strategic localization of heart mitochondrial NOS: a review of the evidence. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. 2012. Vol. 303, N 11. P. H1283—H1293.
52. Elfering S.L., Sarkela Th.M., Giulivi C. Biochemistry of Mitochondrial Nitric-oxide Synthase. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002. Vol. 277, N 41. P. 38079—38086.
53. Valdez L.B., Zaobornyj T., Boveris A. Mitochondrial metabolic states and membrane potential modulate mtNOS activity. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006. Vol. 1757, N 3. P. 166—172.
54. Sanchez-Padilla J., Guzman J.N., Ilijic E., Kondapalli J., Galtieri D.J., Yang B., Schieber S., Oertel W., Wokosin D., Schumacker P.T., Surmeier D.J. Mitochondrial oxidant stress in locus coeruleus is regulated by activity and nitric oxide synthase. *Nature Neuroscience*. 2014. Vol. 17, N 6. P. 832—840.
55. Dedkova E.N., Blatter L.A. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> and the heart. *Cell Calcium*. 2008. Vol. 44, N 1. P. 77—91.
56. Piantadosi C.A., Suliman H.B. Redox regulation of mitochondrial biogenesis. *Free Radical Biology & Medicine*. 2012. Vol. 53, N 11. P. 2043—2053.
57. Nisoli E., Carruba M.O. Nitric oxide and mitochondrial biogenesis. *Journal of Cell Science*. 2006. Vol. 119, N 14. P. 2856—2862.
58. Tengan C.H., Rodrigues G.S., Godinho R.O. Nitric oxide in skeletal muscle: role on mitochondrial biogenesis and function. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012. Vol. 13, N 12. P. 17160—17184.
59. Yi-Dong Y., Li M.-M., Xu G., Zhang E.-L., Chen J., Sun B., Chen D.-W., Gao Y.-Q. Targeting mitochondria-associated membranes as a potential therapy against endothelial injury induced by hypoxia. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2019. Vol. 120, N 11. P. 18967—18978.

60. Valsecchi F., Konrad C., Manfredi G. Role of soluble adenylyl cyclase in mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2014. Vol. 1842, N 12, Pt. B. P. 2555–2560.
61. Hurley J.H. Structure, Mechanism, and Regulation of Mammalian Adenylyl Cyclase. *The Journal of Biological Chemistry*. 1999. Vol. 274, N 12. P. 7599–7602.
62. Bitterman J.L., Ramos-Espiritu L., Diaz A., Levin L.R., Buck J. Pharmacological Distinction between Soluble and Transmembrane Adenylyl Cyclases. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2013. Vol. 347. P. 589–598.
63. Liu C., Ke P., Zhang J., Zhang X., Chen X. Protein Kinase Inhibitor Peptide as a Tool to Specifically Inhibit Protein Kinase A. *Frontiers in Physiology*. 2020. Vol. 11. Article 574030.
64. Di Benedetto G., Scalzotto E., Mongillo M., Pozzan T. Mitochondrial Ca(2)(+) uptake induces cyclic AMP generation in the matrix and modulates organelle ATP levels. *Cell metabolism*. 2013. Vol. 17. P. 965–975.
65. Di Benedetto G.D., Lefkimmiatis K., Pozzan T. The basics of mitochondrial cAMP signalling: where, when, why. *Cell Calcium*. 2021. Vol. 93. P. 102320.
66. Amer Y.O., Hebert-Chatelain E. Mitochondrial cAMP-PKA signaling: What do we really know? *Biochimica et Biophysica Acta — Bioenergetics*. 2018. Vol. 1859. P. 868–877.
67. Kaasik A., Safiulina D., Zharkovsky A., Veksler V. Regulation of mitochondrial matrix volume. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 2007. Vol. 292. P. C157–C163.
68. Nowikowski K., Schweyen R.J., Bernardi P. Pathophysiology of mitochondrial volume homeostasis: potassium transport and permeability transition. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009. Vol. 1787, N 5. P. 345–350.
69. Bai Y., Murakami M.H., Iwasa M., Sumi S., Yamada Y., Ushikoshi H., Aoyama T., Nishigaki K., Takemura G., Uno B., Minatoguchi S. Cilostazol protects the heart against ischaemia reperfusion injury in a rabbit model of myocardial infarction: focus on adenosine, nitric oxide and mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2011. Vol. 38, N 10. P. 658–665.
70. Radi R., Cassina A., Hodara R. Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. *Biological Chemistry*. 2002. Vol. 383, N 3-4. P. 401–409.
71. Степуро И.И., Опарин А.Ю., Степуро В.И., Маскевич С.А., Титов В.Ю. Окисление тиаминa под действием диоксида азота, генерируемого ферриформами миоглобина и гемоглобина в присутствии нитрита и пероксида водорода. *Биохимия*. 2012. Т. 77, № 1. С. 53–57.
72. Реутов В.П. Цикл оксида азота у млекопитающих и принцип цикличности. *Биохимия*. 2002. Т. 67, № 3. С. 293–311.
73. Bock F.J., Tait S.W.G. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2020. Vol. 21, N 2. P. 85–100.
74. Bernardi P., von Stockum S. The permeability transition pore as a Ca<sup>2+</sup> release channel: New answers to an old question. *Cell Calcium*. 2012. Vol. 52, N 1. P. 22–27.
75. Leite A.C.R., Oliveira H.C.F., Utino F.L., Garcia R., Alberici L.C., Fernandes M.P., Castilho R.F., Verces A.E. Mitochondria generated nitric oxide protects against permeability transition via formation of membrane protein S-nitrosothiols. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010. Vol. 1797, N 6-7. P. 1210–1216.
76. Webb R.C. Smooth muscle contraction and relaxation. *Advances in Physiology Education*. 2003. Vol. 27, N 4. P. 201–206.
77. Zhao C., Wu AY.-H., Yu X., Gu Y., Lu Y., Song X., An N., Zhang Y. Microdomain elements of airway smooth muscle in calcium regulation and cell proliferation. *Journal of Physiology and Pharmacology Advances*. 2018. Vol. 69, N 2. P. 151–163.
78. Chalmers S., Olson M.L., MacMillan D., Rainbow R.D., McCarron J.G. Ion channels in smooth muscle: regulation by the sarcoplasmic reticulum and mitochondria. *Cell Calcium*. 2007. Vol. 42, N 4-5. P. 447–466.
79. Raiagopal S., Ponnusamy M. Calcium signaling: from physiology to diseases. Springer, 2017.
80. Trebak M., Ginnan R., Singer H.A., Jourdain D. Interplay between calcium and reactive oxygen/nitrogen species: an essential paradigm for vascular smooth muscle signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2010. Vol. 12, N 5. P. 657–673.

## Список літератури

81. Bartesaghi S., Radi R. Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Redox Biology*. 2018. Vol. 14. P. 618–625.
82. Zhao Y., Vanhoutte P.M., Leung S.W. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2015. Vol. 129, N 2. P. 83–94.
83. Ulrich C., Quilici D.R., Schlauch K.A., Buxton I.L.O. The human uterine smooth muscle S-nitrosoproteome fingerprint in pregnancy, labor, and preterm labor. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 2013. Vol. 305, N 8. P. C803–C816.
84. Barnett S.D., Smith C.R., Ulrich C.C., Baker J.E., Buxton I.L.O. S-Nitrosogluthathione reductase underlies the dysfunctional relaxation to nitric oxide in preterm labor. *Scientific Reports*. 2018. Vol. 8, N 1. P. 5614.
85. Guerra D.D., Hurt K.J. Gasotransmitter in pregnancy: from conception to uterine involution. *Biology of Reproduction*. 2019. Vol. 101, N 1. P. 4–25.
86. Brakemeier S., Eichler I., Knorr A., Fassheber T., Kuhler R., Hoyer J. Modulation of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel in renal artery endothelium in situ by nitric oxide and reactive oxygen species. *Kidney International*. 2003. Vol. 64, N 1. P. 199–207.
87. Jackson W.F. Potassium Channels in Regulation of Vascular Smooth Muscle Contraction and Growth. *Advances in Pharmacology*. 2017. Vol. 78. P. 89–144.
88. Brainard A.M., Korovkina V.P., England S.K. Potassium channels and uterine function. *Seminars in Cell and Development Biology*. 2007. Vol. 18, N 3. P. 332–339.
89. Lang R.J., Harvey J.R., McPhee G.J., Klemm M.F. Nitric oxide and thiol reagent modulation of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> (BK<sub>Ca</sub>) channels in myocytes of the guineapig taenia caeci. *Journal of Physiology*. 2000. Vol. 525, N 2. P. 363–376.
90. Bae H., Choi J., Kim Y.-W., Lee D., Kim J.-H., Ko J.-H., Bang H., Kim T., Lim I. Effects of Nitric Oxide on Voltage-Gated K<sup>+</sup> Currents in Human Cardiac Fibroblasts through the Protein Kinase G and Protein Kinase A Pathways but Not through S-Nitrosylation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018. Vol. 19. P. 814.
91. Smith R.C., McClure M.C., Smith M.A., Abel P.W., Bradley M.E. The role of voltage-gated potassium channels in the regulation of mouse uterine contractility. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2007. Vol. 5. P. 41.
92. Perret F., Lazar A.N., Coleman A.W. Biochemistry of the para-sulfonato-calix[n]arenes. *Chemical Communications*. 2006. Vol. 23. P. 2425–2438.
93. Pan Y.-C., Hu X.-Y., Guo D.-S. Biomedical applications of calixarenes: state of the art and perspectives. *Angewandte Chemie International edition in English*. 2021. Vol. 60, N 6. P. 2768–2794.
94. Атамась Л.І., Бойко В.І., Драпайло А.Б., Єсипенко О.А., Кальченко О.І., Клячина М.А., Матвєєв Ю.І., Мірошніченко С.І., Родік Р.В., Черенок С.О., Кальченко В.І. Супрамолекулярна хімія каліксаренів. *Журнал органічної та фармакологічної хімії*. 2009. Т. 7, Вип. 2. №26. С. 28–36.
95. Nimse S. Biological applications of functionalized calixarenes. *Chemical Society Reviews*. 2013. Vol. 42, N 1. P. 366–386.
96. Костерін С.О., Кальченко В.І., Векліч Т.О., Бабіч Л.Г., Шликов С.Г. Каліксарени як модулятори АТР-гідролазних систем гладеньком'язових клітин. Київ: Наукова думка, 2019. 256 с.
97. Veklich T.O. The inhibitory influence of calix[4]arene of C-90 on the activity of Ca<sup>2+</sup>,Mg<sup>2+</sup>-ATPases in plasma membrane and sarcoplasmic reticulum in myometrium cells. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2016. Vol. 88, N 2. P. 5–15.
98. Veklich T.O., Skrabak O.A., Nikonishyna Yu.V., Rodik R.V., Kalchenko V.I., Kosterin S.O. Calix[4]arene C-956 selectively inhibits plasma membrane Ca<sup>2+</sup>,Mg<sup>2+</sup>-ATPase in myometrial cells. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2018. Vol. 90, N 5. P. 34–42.
99. Векліч Т.О., Кочешкова Н.С., Родік Р.В., Бойко В.І., Воробець З.Д., Костерін С.О. Порівняльне дослідження впливу каліксаренів на Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТРазну активність в плазматичній мембрані скоротливих та рухливих клітин. *Український біохімічний журнал*. 2007. Т. 79, № 3. С. 19–28.

ПЕРЕДМОВА .....	5
ВСТУП .....	9
<b>Р О З Д І Л 1. МЕТАБОЛІЗМ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНА АКТИВНІСТЬ ОКСИДУ АЗОТУ .....</b>	<b>13</b>
1.1. Біосинтез оксиду азоту .....	13
1.2. Структура, каталітична активність та локалізація NOS .....	19
1.3. Вибрані біохімічні механізми, які лежать в основі функціональної активності NO ...	24
1.4. Утворення та фізіологічне значення оксиду азоту в матці .....	26
<b>Р О З Д І Л 2. УТВОРЕННЯ ОКСИДУ АЗОТУ В МІТОХОНДРІЯХ .....</b>	<b>31</b>
2.1. Особливості синтезу оксиду азоту в мітохондріях за присутності кисню .....	31
2.2. Синтез оксиду азоту в мітохондріях міомерія та біохімічні характеристики цього процесу .....	33
<b>Р О З Д І Л 3. <math>Ca^{2+}</math>-ГОМЕОСТАЗ У КЛІТИНАХ ГЛАДЕНЬКОГО М'ЯЗА І ЙОГО РЕГУЛЯЦІЯ ОКСИДОМ АЗОТУ .....</b>	<b>56</b>
3.1. Загальна характеристика процесів збудження і скорочення гладеньком'язових клітин .....	56
3.2. Системи пасивного транспорту $Ca^{2+}$ в міоцитах .....	60
3.3. Системи енергозалежного транспорту $Ca^{2+}$ в клітинах гладеньких м'язів .....	63
3.4. Просторово-часові характеристики $Ca^{2+}$ -сигналу .....	67
3.5. Окремі приклади впливу NO на катіонтранспортувальні системи клітини .....	70
3.6. Біохімічні механізми дії оксиду азоту на $Ca^{2+}$ -гомеостаз та поляризацію субклітинних мембранних структур у гладенькому м'язі .....	71
<b>Р О З Д І Л 4. <math>Ca^{2+}</math>-ТРАНСПОРТУВАЛЬНІ СИСТЕМИ МІТОХОНДРІЙ КЛІТИН ГЛАДЕНЬКОГО М'ЯЗА .....</b>	<b>80</b>
4.1. Шляхи надходження $Ca^{2+}$ у мітохондрії .....	80
4.2. Шляхи вивільнення $Ca^{2+}$ з мітохондрій .....	83
4.3. Значення іонів Ca у функціонуванні мітохондрій .....	87
4.4. Роль NO в мітохондріях .....	88
<b>Р О З Д І Л 5. РЕГУЛЮВАННЯ ОКСИДОМ АЗОТУ ТРАНСПОРТУ <math>Ca^{2+}</math> У ВНУТРІШНІЙ МІТОХОНДРІЙНІЙ МЕМБРАНІ .....</b>	<b>92</b>
5.1. Стимуляція нітросполуками енергозалежної акумуляції іонів Ca в мітохондріях міомерія .....	92
5.2. Біохімічні характеристики $H^+$ - $Ca^{2+}$ -обмінника у внутрішній мембрані мітохондрій та вплив оксиду азоту на цю транспортну систему .....	97



<b>Р О З Д І Л 6. ЕЛЕКТРОНТРАНСПОРТУВАЛЬНИЙ ЛАНЦЮГ МІТОХОНДРІЙ ЯК МІШЕНЬ ДІЇ ОКСИДУ АЗОТУ</b> .....	108
6.1. Оцінка функціонування електронтранспортного ланцюга мітохондрій міометрія за аутофлуоресценцією NADH та FAD .....	108
6.2. Вплив NO на аутофлуоресценцію мітохондрійних аденінових нуклеотидів .....	114
6.3. Протекторна дія NO щодо мітохондрій .....	116
<b>Р О З Д І Л 7. КАЛІКС[4]АРЕНИ ЯК ПЕРСПЕКТИВНИЙ СЕЛЕКТИВНИЙ ІНСТРУМЕНТ ВПЛИВУ НА <math>Ca^{2+}</math>-ЗАЛЕЖНИЙ СИНТЕЗ NO ТА БІОЕНЕРГЕТИЧНІ ПРОЦЕСИ В МІТОХОНДРІЯХ</b> .....	122
7.1. Структура та можливості застосування каліксаренів у хімії, біології та медицині ....	122
7.2. Біохімічна активність калікс[4]аренів у клітинах гладенького м'яза та їхній вплив на функціонування мітохондрій .....	123
7.3. Біохімічні механізми NO, $Ca^{2+}$ -залежної дії калікс[4]аренів на функціонування мітохондрій .....	127
УЗАГАЛЬНЕННЯ .....	146
ПІДСУМКИ .....	154
SUMMARY .....	156
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ .....	158
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ .....	160

# CONTENTS

---

FOREWORD .....	5
INTRODUCTION .....	9
<b>CHAPTER 1. METABOLISM AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF NITRIC OXIDE</b> .....	13
1.1. Biosynthesis of nitric oxide .....	13
1.2. Structure, catalytic activity and localization of NOS .....	19
1.3. Selected biochemical mechanisms underlying the functional activity of NO .....	24
1.4. Formation and physiological significance of nitric oxide in the uterus .....	26
<b>CHAPTER 2. FORMATION OF NITRIC OXIDE IN MITOCHONDRIA</b> .....	31
2.1. Features of nitric oxide synthesis in mitochondria in the presence of oxygen .....	31
2.2. Generation of nitric oxide in myometrial mitochondria and biochemical characteristics of this process .....	33
<b>CHAPTER 3. CA<sup>2+</sup>-HOMEOSTASIS IN SMOOTH MUSCLE CELLS AND ITS REGULATION BY NITRIC OXIDE</b> .....	56
3.1. General characteristics of the processes of excitation and contraction of smooth muscle cells .....	56
3.2. Systems of passive Ca <sup>2+</sup> transport in myocytes .....	60
3.3. Systems of energy-dependent Ca <sup>2+</sup> transport in smooth muscle cells .....	63
3.4. Spatial and temporal characteristics of Ca <sup>2+</sup> signal .....	67
3.5. Some examples of NO effect on cation transport systems in cells .....	70
3.6. Biochemical mechanisms of nitric oxide action on Ca <sup>2+</sup> homeostasis and polarization of subcellular membrane structures in smooth muscle .....	71
<b>CHAPTER 4. CA<sup>2+</sup>-TRANSPORT SYSTEMS OF MITOCHONDRIA IN SMOOTH MUSCLE CELLS</b> .....	80
4.1. Ways of Ca <sup>2+</sup> influx into mitochondria .....	80
4.2. Ways of Ca <sup>2+</sup> efflux from mitochondria .....	83
4.3. The importance of Ca ions in the functioning of mitochondria .....	87
4.4. The role of NO in mitochondria .....	88
<b>CHAPTER 5. REGULATION OF CA<sup>2+</sup> TRANSPORT BY NITRIC OXIDE IN THE INNER MITOCHONDRIAL MEMBRANE</b> .....	92
5.1. Stimulation of energy-dependent Ca ion accumulation in myometrial mitochondria by nitrocompounds .....	92
5.2. Biochemical characteristics of the H <sup>+</sup> -Ca <sup>2+</sup> exchanger in the mitochondrial inner membrane and the effect of nitric oxide on this transport system .....	97

## Contents

---

<b>CHAPTER 6. MITOCHONDRIAL ELECTRON TRANSPORT CHAIN AS A TARGET OF NITRIC OXIDE ACTION</b> .....	108
6.1. Evaluation of the functioning of the mitochondrial electron transport chain in myometrium by NADH and FAD autofluorescence .....	108
6.2. Effect of NO on the autofluorescence of mitochondrial adenine nucleotides .....	114
6.3. Protective effect of NO on mitochondria .....	116
<b>CHAPTER 7. CALIX[4]ARENES AS A PROSPECTIVE SELECTIVE EFFECTOR ON CA<sup>2+</sup>-DEPENDENT NO SYNTHESIS AND BIOENERGETIC PROCESSES IN MITOCHONDRIAS</b> .....	122
7.1. Structure and potential applications of calixarenes in chemistry, biology and medicine .....	122
7.2. Biochemical activity of calix[4]arenes in smooth muscle cells and their effect on mitochondrial function .....	123
7.3. Biochemical mechanisms of NO, Ca <sup>2+</sup> -dependent action of calix[4]arenes on mitochondrial functioning .....	127
FINAL SECTION .....	154
SUMMARY .....	156
ABBREVIATIONS .....	158
REFERENCES .....	160

*Наукове видання*

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

ДАНИЛОВИЧ Ганна Вікторівна  
ДАНИЛОВИЧ Юрій Володимирович

**СИНТЕЗ  
ТА БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ  
ОКСИДУ АЗОТУ  
В МІТОХОНДРІЯХ  
ГЛАДЕНЬКОГО М'ЯЗА**

Художнє оформлення *М.А. Панасюк*  
Художній редактор *Я.Ю. Савицька*  
Технічний редактор *Т.С. Березяк*  
Оператор *О.О. Пономаренко*  
Комп'ютерна верстка *Т.О. Ценцеус*

Оригінал-макет виготовлено  
у НВП «Видавництво “Наукова думка” НАН України»  
Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи  
до Державного реєстру видавців, виготівників і розповсюджувачів  
видавничої продукції ДК № 2440 від 15.03.2006 р.  
01601 Київ 1, вул. Терещенківська, 3

Підп. до друку 05.12.2024. Формат 70×100/16.  
Гарн. Таймс. Ум. друк. арк. 17,88. Обл.-вид. арк. 19,50.  
Тираж 100 прим. Зам. № 7500

Віддруковано ВД «Академперіодика» НАН України  
вул. Терещенківська, 4, м. Київ, 01024  
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 544 від 27.07.2001

## СИНТЕЗ ТА БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ОКСИДУ АЗОТУ В МІТОХОНДРІЯХ ГЛАДЕНЬКОГО М'ЯЗА



### **ДАНИЛОВИЧ Ганна Вікторівна**

Доктор біологічних наук,  
старший дослідник.  
Провідний науковий співробітник  
відділу біохімії м'язів Інституту біохімії  
ім. О.В. Палладіна НАН України.  
Лауреат премії з біохімії  
імені О.В. Палладіна НАН України (2023 р.).  
Фахівець у галузі біохімії м'язів  
та біохімічної мембранології.  
Автор та співавтор понад 70 наукових  
публікацій та однієї монографії.



### **ДАНИЛОВИЧ Юрій Володимирович**

Доктор біологічних наук,  
старший науковий співробітник.  
Провідний науковий співробітник  
відділу біохімії м'язів Інституту біохімії  
ім. О.В. Палладіна НАН України.  
Лауреат премії з біохімії  
імені О.В. Палладіна НАН України (2023 р.).  
Фахівець у галузі біохімії м'язів  
та біохімічної мембранології.  
Читає лекції на кафедрі молекулярної  
біотехнології та біоінформатики  
Навчально-наукового інституту високих  
технологій Київського національного  
університету імені Тараса Шевченка.  
Автор та співавтор близько  
120 наукових публікацій, двох навчальних  
посібників та двох монографій.

