КОСТЕРІН С.О., БАБІЧ Л.Г., ШЛИКОВ С.Г., ДАНИЛОВИЧ Ю.В., ВЕКЛІЧ Т.О., МАЗУР Ю.Ю.

БІОХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ТА РЕГУЛЯЦІЯ Ca²⁺-ТРАНСПОРТУВАЛЬНИХ СИСТЕМ МЕМБРАННИХ СТРУКТУР ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВИХ КЛІТИН

Київ – 2016

90-річчю Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України та 70-річчю відділу біохімії м'язів Інституту присвячується

АНОТАЦІЯ

КОСТЕРІН С.О., БАБІЧ Л.Г., ШЛИКОВ С.Г., ДАНИЛОВИЧ Ю.В., ВЕКЛІЧ Т.О., МАЗУР Ю.Ю. БІОХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ТА РЕГУЛЯЦІЯ Са²⁺-ТРАНСПОРТУВАЛЬНИХ СИСТЕМ МЕМБРАННИХ СТРУКТУР ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВИХ КЛІТИН. Київ – 2016. «Наукова Думка», ... стор.

Монографію присвячено узагальненню, аналізу та систематизації літературних та власних експериментальних результатів, одержаних групою співробітників відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім.О.В.Палладіна Національної Академії Наук України в галузі з'ясування біохімічних аспектів регуляції концентрації іонів Са в гладеньком'язових клітинах. Переважно акцент зроблено на вивченні іонних, молекулярних та мембранних механізмів контролю скоротливої активності міометрія. Хоча монографію присвячено нагальним проблемам біохімії гладеньком'язових клітин, для неї є притаманною «трансдисциплінарність»: результати досліджень, що описані на її сторінках, були одержані на стику біохімії, біофізики та біофізичної хімії. Монографія складається з двох розділів, яким передує «Вступ». Розділ І присвячений проблемі транспорту іонів Са в мембранних структурах гладеньком'язових клітин. Цей розділ містить дві глави. В главі 1 акцентується увага на сучасних знаннях щодо структури, властивостей та функції Ca²⁺-помпи плазматичної мембрани, в главі 2 обговорюються нагальні питання трансмембранного обміну іонів Са в мітохондріях. В розділі II переважно сфокусовано увагу на описі механізмів регуляції трансмембранного обміну іонів Са в гладеньком'язових клітинах матки. Тут маємо три глави. У главі 3 описані загальні уявлення щодо механізмів регуляції активності систем транспорту Ca²⁺ в міоцитах матки, в розглядаються ефекти утеротонічного пептидного гормону главі 4 окситоцину як модулятора систем транспорту іонів Са в клітинах міометрія. В главі 5 аналізуються експериментальні результати щодо оксиду азоту як модулятора систем транспорту іонів Са в міоцитах матки. В «Заключному розділі» коротко узагальнені результати, що були наведені в тексті монографії.

Монографія призначена для фахівців у галузі біохімії та біофізичної хімії гладеньких м'язів, системної біології м'язової клітини, біохімічної мембранології та фармакології, а також для студентів та аспірантів – біохіміків, біофізиків, фізіологів.

Науковий редактор – академік НАН та НАМН України С.В.Комісаренко.

Рецензенти – академік НАН України М.С.Веселовський (Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України);

доктор біологічних наук, професор О.П.Матишевська (ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету ім. Тараса Шевченка).

АВТОРИ МОНОГРАФІЇ



КОСТЕРІН СЕРГІЙ ОЛЕКСІЙОВИЧ – академік НАН України, доктор біологічних професор. Випускник кафедри наук, біофізики Київського Національного Університету імені Тараса Шевченка. Заступник директора з наукової роботи та завідувач відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. Професор кафедри біофізики Київського Національного Університету імені Тараса Шевченка та кафедри Національного Університету біології «Києво-Могилянська Академія». Фахівець у галузі біохімії та біофізики м'язів, біохімічної мембранології, кінетики і термодинаміки біохімічних процесів. Автор та співавтор 315 наукових публікацій та 4 монографій (одна з них вийшла у США). Підготував 13 кандидатів та 4 докторів наук. Член Відділення біохімії, фізіології і молекулярної біології НАН України. Віце-президент Українського біохімічного товариства. Лауреат Державної премії України в галузі науки і техніки (2010) та Премії ім. О.В.Палладіна НАН України (1992). Лауреат премії "Золота Фортуна-2012" з врученням ордена Святого Князя Володимира Великого III ступ. Нагороджений Відзнакою Верховної Ради України «За заслуги перед Українським народом» (2013).



БАБІЧ ЛІДІЯ ГРИГОРІВНА - доктор біологічних наук, старший науковий співробітник. Випускниця кафедри біохімії Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Провідний науковий співробітник відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. Фахівець у галузі біохімії м'язів та клітинної біології. Автор та співавтор 99 наукових публікацій.



ШЛИКОВ СЕРГІЙ ГЕОРГІЙОВИЧ – доктор біологічних наук, старший науковий співробітник. Випускник кафедри біохімії Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Провідний науковий співробітник відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. Фахівець у галузі біохімії м'язів та клітинної біології. Автор та співавтор 102 наукових публікацій. Лауреат премії Товариства гінекологічних досліджень США (Society for Gynecologic Investigation, USA).



ДАНИЛОВИЧ ЮРІЙ ВОЛОДИМИРОВИЧ – доктор біологічних наук, старший науковий співробітник. Випускник природничо-географічного факультету Національного педагогічного університету iм. М.П. Драгоманова спеціальністю «біологія-хімія». Старший науковий за співробітник відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. Фахівець у галузі біохімії м'язів та біохімічної мембранології. Читає лекції на кафедрі біохімії Київського Національного Університету імені Тараса Шевченка. Автор та співавтор 78 наукових публікацій та 2 навчальних посібників.



ВЕКЛІЧ ТЕТЯНА ОЛЕКСАНДРІВНА – кандидат біологічних наук. Випускниця кафедри біофізики Київського Національного Університету імені Тараса Шевченка. Старший науковий співробітник відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. Викладач філії біотехнології кафедри біохімії Київського Національного Університету імені Тараса Шевченка. Фахівець у галузі біохімії та біофізики м'язів, біохімічної мембранології, кінетики біохімічних процесів. Автор та співавтор 100 наукових публікацій.



МАЗУР ЮЛІЯ ЮРІЇВНА - аспірантка відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. Випускниця природничого факультету Національного університету «Києво-Могилянська академія» за спеціальністю «біологія». Спеціалізується у галузі біохімії м'язів та математичного моделювання біологічних процесів. Автор та співавтор 7 наукових публікацій.

ЗМІСТ

ПЕРЕДМОВА	14
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	19
вступ	23
РОЗДІЛ І. ТРАНСПОРТ ІОНІВ Са В МЕМБРАННИХ СТРУК	ТУРАХ
ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВИХ КЛІТИН	31
ГЛАВА 1. СТРУКТУРА, ВЛАСТИВОСТІ ТА ФУНКЦІЇ Са ²⁺ -Г	ЮМПИ
ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ	31
1.1. Структурно-функціональні властивості Ca ²⁺ ,Mg ²⁺ -ATРази	34
 1.1.1.Структурна організація Са²⁺, Мg²⁺-АТРази 	34
 1.1.2. Молекулярна біологія Са²⁺, Mg²⁺-АТРази 	36
• 1.1.3. Кінетичні та каталітичні властивості Ca ²⁺ ,Mg ²⁺ -ATРази	39
 1.1.4. Ca²⁺, Mg²⁺-ATPаза та Mg²⁺, ATP-залежний транспорт Ca²⁺ 	40
 1.1.5. Молекулярний механізм спряження Ca²⁺,Mg²⁺-зал 	ежного
ензиматичного гідролізу АТР та Mg ²⁺ ,АТР-залежного акт	ивного
транспорту іонів Са. Енергетика кальцієвої помпи	42
 1.1.6. Функціональна роль Са²⁺, Mg²⁺-АТРази 	43
 1.1.7. Специфіка локалізації Са²⁺-помпи у клітинах 	51
1.2. Регуляція та модифікація активності Ca ²⁺ ,Mg ²⁺ -ATРази	фізико-
хімічними факторами та низькомолекулярними ефекторами	52
• 1.2.1.Фізико-хімічні фактори	53
• 1.2.2. Низькомолекулярні ефектори	59
1.3. Метаболічна регуляція Ca ²⁺ ,Mg ²⁺ -АТРази	68
• 1.3.1. Кальмодулін	68
 1.3.2. Ліпідне оточення 	69
• 1.3.3. Мінорні ліпіди	72
• 1.3.4. Спермін	73

• 1.3.5. Фосфорилювання73
• 1.3.6. Простагландини75
• 1.3.7. Пептидні гормони76
• 1.3.8. Інші фактори77
1.4. Mg ²⁺ , ATP-залежна кальцієва помпа та патології скоротливої
функції
1.5. Mg ²⁺ ,ATP-залежна кальцієва помпа та фармакологія гладеньких
м'язів
ГЛАВА 2. ТРАНСМЕМБРАННИЙ ОБМІН ЮНІВ Са В МІТОХОНДРІЯХ85
2.1. Системи, що забезпечують надходження Са ²⁺ до мітохондрій85
• 2.1.1. Вхід Са ²⁺ крізь зовнішню мембрану мітохондрій85
• 2.1.2. Вхід Са ²⁺ крізь внутрішню мембрану мітохондрій87
 2.1.2.1. Ca²⁺ уніпортер
 2.1.2.2. Система швидкого захоплення Ca²⁺ (RaM)91
 2.1.2.3. Ріанодин-чутливі Са²⁺ канали (RyR)91
 2.1.2.4. Na⁺-Ca²⁺ та H⁺-Ca²⁺ антипортери
2.2. Системи, що забезпечують вивільнення Ca ²⁺ із мітохондрій93
• 2.2.1. Na ⁺ -Ca ²⁺ антипортер
• 2.2.2. H ⁺ -Ca ²⁺ антипортер94
• 2.2.3. Оборотність уніпортеру
• 2.2.4. Мітохондріальна пора транзієнтної проникності95
2.3. Мітохондрії та Са ²⁺ -гомеостаз96
• 2.3.1. Ефекти мітохондріального Ca ²⁺ на продукування
енергії

2.3.2. Ефекти мітохондріального Ca²⁺ на Ca²⁺ сигналізацію у 2.3.3. Обмін Ca²⁺ в клітині та поляризація мембран мітохондрій • міометрія......100

•

РОЗДІЛ ІІ. РЕГУЛЯЦІЯ ТРАНСМЕМБРАННОГО ОБМІНУ ІОНІВ Са В ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВИХ КЛІТИНАХ МАТКИ......104 ГЛАВА 3. МЕХАНІЗМИ РЕГУЛЯЦІЇ АКТИВНОСТІ СИСТЕМ ТРАНСПОРТУ 3.1. Вивчення іонних, молекулярних та мембранних механізмів контролю електро- та фармакомеханічного спряження – нагальна проблема біохімії 3.2. Вивчення експресії TrpC на рівні mRNA та протеїнів у клітинах міометрія за різних функціональних станів......113 • 3.2.1. Експресія TrpC на рівні mRNA та протеїнів у міометрії • 3.2.2. Експресія TrpC на рівні mRNA у міометрії жінок......116 3.4. З'ясування закономірностей дії мембранного потенціалу та натрієвого градієнта на Mg²⁺, ATP-залежний транспорт іонів Са через сарколему мембранного потенціалу на Mg²⁺, ATP-залежний • 3.4.1. Вплив транспорт Ca²⁺ крізь сарколему міометрія......119 • 3.4.2. Синергізм енергозалежних Са²⁺ потоків крізь плазматичну мембрану......121 3.5. Енергія активації кальцієвої помпи плазматичної мембрани міоцитів Са²⁺,Мg²⁺-АТРазної активності 3.6. регуляція сАМР-залежна V плазматичних мембранах клітин міометрія......126 3.7. Енергозалежна акумуляція Ca²⁺ у саркоплазматичному ретикулумі Акумуляція Ca²⁺ у мітохондріях клітин міометрія, оброблених 3.8.

ГЛАВА 4. ОКСИТОЦИН ЯК МОДУЛЯТОР СИСТЕМ ТРАНСПОРТУ ЮНІВ
Са В КЛІТИНАХ МІОМЕТРІЯ143
4.1. Міометрій та окситоцин143
4.2. З'ясування рівня експресії ТrpC білків у гладенькому м'язі
матки148
• 4.2.1. Встановлення зв'язку між дією окситоцину та активністю TrpC
каналів <mark>у</mark> гладеньком'язових клітинах матки
• 4.2.2. Експресія hTrpC mRNA у міометрії вагітних жінок та в клітинній
лінії РНМ1-41149
• 4.2.3. Експресія hTrpC білків у міометрії вагітних жінок та в клітинній
лінії РНМ1-41151
4.3. Біохімічні механізми регуляції окситоцином каналів ємнісно-
оперованого входу іонів Са в клітини міометрія
• 4.3.1. Надекспресія hTrpC білків змінює властивості входу іонів
кальцію в клітинах РНМ1-41 після спустошення саркоплазматичного
ретикулума152
• 4.3.2. Вхід Ca ²⁺ до клітин міометрія, що індукується аналогом
діацилгліцеролу – ОАG154

5.5. Вплив нітросполук на Na⁺, K⁺-ATP-азу та дослідження процесів, які регулюють транспорт потенціалутворюючих іонів в плазматичній мембрані 5.6. Дія оксиду азоту на пасивний і енергозалежний транспорт Ca²⁺ в саркоплазматичному ретикулумі та пул-кероване надходження іонів Са в 5.8. Вплив оксиду азоту на основні Са²⁺-транспортувальні системи мітохондрій та поляризацію внутрішньої мітохондріальної 5.9. Вплив нітросполук на поляризацію мембрани мітохондрій......195 5.10. Зв'язування Ca²⁺ з кальмодуліном за присутності оксиду

ЗАКЛЮЧНИЙ РОЗДІЛ	203
ЛІТЕРАТУРА	208

ПЕРЕДМОВА

Шановні читачі !

Розмірковуючи над питанням перспектив та тенденцій розвитку медикобіологічного сучасної Біології, зокрема, галузі наук У та біотехнологічного циклу, не можна не звернути увагу на наступне: в останні десятиріччя має місце інтенсивне проникнення фізико-хімічних уявлень, концепцій, методів та методологій в біологічні науки, зокрема в біохімію. Інакше чим можна пояснити виникнення та інтенсивний розвиток таких «перехресних» наукових напрямів, як, наприклад, біофізична хімія, фізична біохімія. біохімічна фізика, хімічна біофізика, нанобіотехнологія. комп'ютерна біохімія? До категорії комплексних трансдисциплінарних біофізикохімічних проблем належить, безперечно, i проблема внутрішньоклітинної кальцієвої сигналізації, зокрема, в м'язах. В значному ступені, керуючись саме такими міркуваннями, я надав свою згоду бути науковим редактором цієї монографії.

Її було написано співробітниками відділу біохімії м'язів – одного з класичних наукових відділів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України – академічної дослідної установи, яка у 2015 р. відзначає своє 90річчя. В монографії систематизовано, узагальнено та ґринтовно проаналізовано оригінальні експериментальні результати, ЩО були одержані авторським колективом під керівництвом академіка НАН України лауреата Державної премії України в галузі науки і техніки та Премії ім. О.В. Палладіна НАН України професора С.О. Костеріна при вивченні однієї з нагальних проблем сучасної біохімії та біофізичної хімії гладеньких мова йде за з'ясування іонних, молекулярних та мембранних м'язів -Са²⁺-транспортувальних механізмів регуляції активності систем гладеньком'язових клітин.

В певному розумінні можна стверджувати, що зазначена монографія є логічним продовженням інших монографічних видань, які були написані С.О. Костеріним та його колегами раніше, і присвячені питанням фізикохімічної біології гладеньком'язових клітин (Курский М.Д., Костерин С.А., Воробец З.Д. Регуляция внутриклеточной концентрации кальция є мышцах. Киев. Наукова думка, 1987. 144 с.; Костерин С.А. Транспорт кальция в гладкой мышце. Київ. Наукова думка, 1990. 216 с.; Kosterin S.A. et al. Mechanisms of Ca²⁺ transport in myometrium. Chapter 6. In: "Control of Uterine Contractility". CRC Press, Boca Raton, USA. 1994. pp. 129-154).

Автори присвятили свою монографію 90-річному ювілею нашого Інституту та 70-річчю відділу біохімії м'язів. У ювілейний для Інституту рік буде доцільним та справедливим наголосити, що у свій час вагомий внесок у започаткування та розвиток м'язової біохімії зробив фундатор Інституту академік О.В. Палладін. Що ж стосується саме відділу біохімії м'язів, то його було створено (спочатку – у форматі лабораторії) у травні 1944 р. Організатором та незмінним керівником відділу до січня 1970 р. був видатний біохімік член-кор. АН СРСР та АН УРСР Д.Л. Фердман. Із січня 1970 р. до травня 1973 р. обов'язки завідувача відділу виконувала к.б.н. В.А. Григор'єва, а з травня 1973 р. відділ очолював д.б.н. проф. М.Д. Курський. У цьому відділі також працювали такі знані вчені – фахівці у галузі біохімії м'язів, як проф. Г.І. Силакова, проф. С.Ф. Епштейн, проф. 3.Ю. Нечипоренко. У вересні 1988 р. в Інституті, відповідно до рішення Вченої ради, після кадрової реорганізації відділу біохімії м'язів, було створено новий відділ – біохімічної кінетики (завідувач – С.О. Костерін), а у липні 1996 р. після структурної реорганізації Інституту, згідно з постановою Вченої ради, відділ біохімії м'язів було розформовано, а відділ біохімічної кінетики перейменовано у відділ біохімії м'язів. І тут я, як директор Інституту, повинен наголосити на наступному: у теперішньому своєму складі цей відділ, в якому успішно співпрацюють біохіміки, біофізики та хіміки, гідно продовжує славні наукові традиції, які у свій час були

започатковані видатними біохіміками О.В. Палладіним та Д.Л. Фердманом при вивченні фундаментальних питань біохімії м'язів.

Я б відзначив наступні особливості наукового змісту цієї монографії та складу її авторського колективу.

Як вже підкреслювалося, у фокусі уваги авторів монографії переважно проблема трансмембранного обміну іонів Са у міоцитах. Дійсно, ця проблема знаходиться на передових рубежах сучасної клітинної біології Ca²⁺ бо фізіології, E головним та молекулярної неорганічним внутрішньоклітинним «сигналізатором», який контролює протікання великої кількості біохімічних, біофізичних та фізіологічних процесів, у тому числі й скорочення – розслаблення м'язів. Із суттєвих результатів, які були одержані колективом відділу біохімії м'язів Інституту в останні 10 – 15 років при вивченні біохімічних механізмів внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу та електро- і фармакомеханічного спряження в гладеньких зокрема, наступні (деякі Я б м'язах. відзначив, 3 них знайшли віддзеркалення на сторінках монографії).

У відділі були фундаментальні напрацьовані дані щодо Са²⁺-транспортуючих енергозалежних мембранозв'язаних систем плазматичної мембрани, саркоплазматичного ретикулума та мітохондрій гладеньком'язових клітин, ґрунтовно вивчені кінетичні, каталітичні та енергетичні властивості, регуляція та функціональна роль цих систем, їхня чутливість до дії різних метаболічних чинників, фізико-хімічних факторів та ефекторів.

Вперше в світі було досліджено (у співпраці з член.-кор. НАН України B.I. його колегами, IOX HAH Кальченком та України) біохімічні закономірності впливу супрамолекулярних сполук - каліксаренів на системи активного транспорту іонів Са та Na у мембранних структурах гладеньких м'язів, а також на ензиматичний та неензиматичний гідроліз АТФ, ідентифіковано калікс[4]аренів, низку які можуть слугувати «молекулярними платформами» для подальшої розбудови оборотних,

селективних та афінних ефекторів (активаторів, інгібіторів) енергозалежних катіон-транспортуючих систем плазматичної мембрани, мітохондрій, а також АТРази субфрагменту-1 міозину. Було доведено, що калікс[4]арен С-90 є селективним інгібітором кальцієвої помпи плазматичної мембрани. Окрім того, було відкрите явище неензиматичного каліксарен-індукованого гідролізу нуклеозидтрифосфату АТР. І я цілком не виключаю, що наступну монографію авторів буде написано «на перехресті» супрамолекулярної хімії та біохімії і присвячено біофізикохімічним механізмам дії каліксаренів на ензиматичні системи гідролізу АТР та іонні помпи.

У відділі також було з'ясовано чутливість Mg²⁺,ATP-залежних кальцієвих помп плазматичної мембрани та саркоплазматичного ретикулума міометрія до інгібуючої дії утеротонічного пептидного гормону окситоцину, а Ca²⁺-уніпортеру мітохондрій – до активуючої дії поліаміну сперміну. Доведено чутливість кальцієвої помпи плазматичної мембрани міоцитів матки до зміни мембранного потенціалу (модельна система «мембранні везикули-К⁺-валіноміцин»). Цікавими є й результати щодо дії антагоністів кальмодуліну на акумуляцію іонів Са в мітохондріях міометрія та на їхній мембранний потенціал.

I, нарешті, у відділі було одержано докази можливого регуляторного впливу оксиду азоту на Ca²⁺-гомеостаз клітин гладенького м'язу матки.

Безперечно, експериментальний фактаж, ЩО був одержаний колективом відділу біохімії м'язів (вище я перерахував звичайно не всі дані), є суттєвими для розуміння молекулярних та мембранних механізмів регуляції внутрішньоклітинної концентрації іонів Са та Ca²⁺-залежного контролю скоротливої активності гладеньких м'язів. Накопичені результати (зокрема, у галузі вивчення дії калікс[4]аренів на системи активного мембранного транспорту іонів) перспективні для розбудови ліків нового («супрамолекулярного») покоління – регуляторів внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу в міоцитах випадку його V порушень за патологічних станів скоротливої функції гладеньких м'язів.

Хоча монографію присвячено нагальним питанням біохімії м'язів, втім, фактичний матеріал, що наведений в ній, є трансдисциплінарним. Адже читачі монографії не зможуть не звернути увагу на те, що при одержанні, описі та інтерпретації експериментальних результатів автори широко застосовували методи та уявлення не лише біохімії, але й біофізики. При проведенні експериментальних біофізичної хімії та досліджень у відділі біохімії м'язів його співробітники залучували (-али?) фізико-хімічні експериментальні та сучасні теоретичні підходи спектрофлуориметрію, проточну цитофлуориметрію, електронну та конфокальну мікроскопію, мас-спектрометрію, фотон-кореляційну спектроскопію, ізотопний (⁴⁵Ca²⁺-⁴⁰Ca²⁺) обмін, хімічну та біохімічну кінетику, докінг та молекулярну динаміку, математичне моделювання тощо.

I, нарешті, в монографії, зокрема, знайшли відображення експериментальні результати у галузі молекулярної біології Ca²⁺транспортуючих (-вальних?) систем міоцитів матки, які були одержані її співавторами - співробітниками відділу біохімії м'язів С.Г. Шликовим та Л.Г. Бабіч під час їхньої наукової роботи у 2000 – 2003 рр. в університетах штатів Техас та Колорадо (США).

Суттєво, що серед авторів монографії є як досвідчені вчені – фахівці у галузі біохімії м'язів та біохімічної мембранології – академік НАН України С.О. Костерін, д.б.н. Л.Г. Бабіч, д.б.н. С.Г. Шликов, так і молоді науковці д.б.н. Ю.В. Данилович, к.б.н. Т.О. Векліч, а також аспірантка Ю.Ю. Мазур.

Я маю надію, що ця монографія зацікавить біохіміків, біофізиків, фармакологів, які професійно працюють у галузі системної біології міоцитів. Думаю, вона приверне увагу й молодих представників біохімічної спільноти - аспірантів, пошукувачів та студентів. Хочу побажати їм успіхів в опануванні знаннями щодо біохімічних аспектів одного з видатних загальнобіологічних феноменів – внутрішньоклітинного кальцієвого сигналінгу.

Директор Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, академік НАН та НАМН України

С.В. Комісаренко

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- ГМ гладенькі м'язи
- ГМК гладеньком'язова клітина
- ЕР ендоплазматичний ретикулум
- МХ мітохондрії
- ПЛР полімеразна ланцюгова реакція
- ПК протеїнкіназа
- ПМ плазматична мембрана
- СР саркоплазматичний ретикулум
- ANT аденіннуклеотидтрансфераза
- АТР трифосфорний ефір аденозину
- сАМР циклічний аденозин-3',5'-монофосфат
- сGMP циклічний гуанозин-3',5'-монофосфат

ССЕ – вхід катіонів до клітини, що спричинений спустошенням внутрішньоклітинних пулів (ємніснооперований або депо-керований вхід катіонів)

DMSO чи ДМСО? – диметилсульфоксид

- eGFP зелений флуоресцентний білок
- IP₃- інозитол-1,4,5-трифосфат
- mRNA інформаційна РНК

NOS – NO-синтаза

ОАG – синтетичний аналог діацилгліцеролу

ОТ – окситоцин

PIP2 - фосфатидилінозитол-4,5-бісфосфат

РНМ1-41 – лінія клітин з міометрія вагітних жінок

РТР - мітохондріальна пора транзієнтної проникності

RaM - система швидкого захоплення Ca²⁺ (в МХ)

RyR - ріанодин-чутливі Са²⁺ канали в МХ

SNP - нітропрусид натрію

SN – нітрит натрію

TG – тапсигаргін

TrpC канали (transient receptor potential) – канали транзієнтного рецепторного потенціалу

VDAC - потенціал-залежний аніонний канал (в зовнішній мембрані МХ)

Ca²⁺,Mg²⁺-ATРаза – Ca²⁺-транспортуюча Mg²⁺-залежна ATРаза ПМ чи CP (EP)

Mg²⁺-АТРаза – Са²⁺-незалежна Mg²⁺-залежна («базальна») АТРаза ПМ

Na⁺,K⁺-ATPaзa – Mg²⁺-залежна Na⁺,K⁺-транспортуюча ATPaзa ПМ

Na⁺-Ca²⁺-обмінник - Na⁺-Ca²⁺-антипортер іонів Na та Ca (в ПМ чи МХ)

Н⁺-Са²⁺-обмінник - Н⁺-Са²⁺-антипортер іонів Na та Са (в МХ)

СаМ - кальмодулін

NO – оксид азоту

 ΔG – вільна енергія Гіббса

[Ca²⁺]_e та [Ca²⁺]_i – концентрація іонізованого Са у позаклітинному просторі та в цитоплазмі відповідно

Ratio 340/380 – співвідношення інтенсивності флуоресценції кальційчутливого зонда Fura-2 при довжині хвилі світла 340 та 380 нм

Δψ – трансмембранний електричний потенціал

I_{0,5} – коефіціент інгібування

n_н – коефіцієнт Хілла

Е_а – енергія активації

К_{Са}– константа активації по іонах Са

К_{мд} – константа активації по іонах Мд

К_m – константа Міхаеліса по АТР (чи по хелатному комплексу MgATP)

К_D – константа дисоціації

V_{max} – максимальна швидкість ензиматичного (транспортного) процесу

t_{1/2} – характеристичний час фізик<mark>о</mark>-хімічного, хімічного чи біохімічного процесу (активації, інактивації, ензиматичного перетворення, трансмембранного переносу речовини)

Т – абсолютна температура, °К

F – число Фарадея

R- газова стала

вступ

закономірностей регуляції концентрації Вивчення іонізованого кальцію (Ca²⁺) в цитоплазмі - нагальна комплексна проблема сучасної біології (незважаючи на те, які фахівці займаються цією проблемою біохіміки, біофізики, фізіологи, фармакологи тощо). Адже іонам Са належить видатне універсальне значення у забезпеченні функціональної активності клітин практично усіх тканин. В певному розумінні можна навіть стверджувати, що проблема оборотної регуляції концентрації іонізованого Са в клітині (в діапазоні концентрацій наближено 100 нМ – 1 мкМ) є загальнобіологічною проблемою. фундаментальною Дійсно, різноманітні біохімічні, біофізичні і фізіологічні процеси та явища, наприклад: м'язове скорочення, активація та регуляція каталітичної активності багатьох ензимів, передача внутрішньоклітинного сигналу від плазматичної мембрани до внутрішньоклітинних мембранних структур, контроль проникності біологічних мембран, розповсюдження нервового імпульсу, клітинний поділ, секреція, запліднення тощо – всі ці видатні біологічні феномени контролюються іонізованим кальцієм. При цьому принципове значення має саме зміна величини концентрації іонів Са у цитоплазмі.

Втім, виникає запитання: чому ж саме Ca²⁺ був обраний ПРИРОДОЮ в якості головного неорганічного внутрішньоклітинного сигналізатора? У цьому контексті важливими є, як мінімум, наступні аргументи (зокрема, відповідно до уявлень проф. Д.О.Левицького).

 Для іону Са є притаманним утворення великої кількості координаційних зв'язків – переважно 7 чи 8.

2. Довжина зв'язку, що утворюється при взаємодії іону Са з лігандами, варіює у вельми широкому діапазоні (для зв'язку Са-О, наприклад – 0,23 – 0,26 нм).

3. Внаслідок вищенаведеного іон Са здатний "підлаштовуватися" під гнучку структуру сайту зв'язування на різноманітних протеїнах.

4. Іон Са не здатний утворювати зв'язки з атомами азоту у складі протеїнових молекул.

5. Іони Са здатні до надзвичайно динамічного багатофазного (поліекспоненційного) обміну ٧ клітинах і тканинах. Дійсно, iз використанням різноманітних методичних підходів (ізотопний ⁴⁵Ca²⁺-⁴⁰Ca²⁺обмін, Ca²⁺-чутливі флуоресцентні зонди тощо) та залученням різних експериментальних моделей (субклітинні структури, клітинні та тканинні препарати) багато дослідників ідентифікують декілька (3 - 6) експоненційних компонент кальцієвого обміну в тканинах (цікаво, що така багатоекспоненційна кінетика іонного обміну не є властивою для таких одновалентних катіонів, як Na та K).

6. Ca²⁺ виявляє свою месенжерну дію завдяки існуванню суттєвого власного трансмембранного (на рівні плазматичної мембрани (ПМ)) градієнта (вільна енергія Гіббса ΔG_{пм} = - (?)RTIn{[Ca²⁺]_e/[Ca²⁺]_i}+2FΔψ = - (?)38,8 кДж/моль, де [Ca²⁺]_e та [Ca²⁺]_i – концентрація іонізованого Са у позаклітинному просторі та в цитоплазмі відповідно, Δψ – трансмембранний електричний потенціал, T – абсолютна температура, ^оK, F – число Фарадея, R- газова стала).

7. Мобілізація іонів Са у клітині здійснюється не лише хімічним шляхом (наприклад, під дією IP₃), але й внаслідок електричних процесів на мембранах.

8. Мішенями для іонів Са можуть слугувати як "розчинні" (наприклад, кальмодулін), так і інтегральні мембранні протеїни.

Все вищенаведене принципово відрізняє біохімічні та фізико-хімічні закономірності обміну іонів Са в тканинах від закономірностей, притаманних обміну інших фізіологічнозначущих неорганічних іонів - Mg, K та Na.

У позаклітинному середовищі значення концентрації іонів Са становить коло 1 мМ. Відповідно до багаточисельних даних, що були накопичені з використанням різноманітних Ca²⁺-чутливих флуоресцентних зондів, у стані спокою концентрація Ca²⁺ у цитоплазмі становить приблизно 100 нМ. При збудженні (при дії фізіологічно активних та/і фармакологічних речовин та т. інш.) ця концентрація збільшується до декількох сотень нМ, принаймні, не більше ніж до 1 мкМ (хоча значення локальної концентрації Са²⁺, особливо, у примембранних шарах, може бути і більшим). Таке підвищення концентрації цитоплазматичного Са, що має місце під дією збуджуючих факторів, відбувається внаслідок надходження іонів Са у клітину через ПМ як результат активації різноманітних кальцієвих каналів, що ідентифіковані у цій субклітинній структурі, а також як наслідок викиду Ca²⁺ із головного внутрішньоклітинного кальцієвого депо ендо(сарко)плазматичного ретикулума. Мітохондрії (МХ) також здатні звільняти іони Са. Отже, при індукції підвищення концентрації вільного Са у мембранозв'язані цитоплазмі задіяні системи пасивного (енергонезалежного) транспорту цього катіону – кальцієві канали, а відновлення ж "статус-кво" по концентрації вільного Са у клітині «релаксація» («термінація») кальцієвого транзієнту в середньому до рівня внутрішньоклітинного Ca^{2+} (100 нМ), концентрації забезпечується (енергозалежного) функціонуванням так званих систем активного транспорту катіону. Такі системи ідентифіковані ΠМ цього V Na⁺-Ca²⁺-Mg²⁺,ATP-залежна (тапсигаргіннечутлива кальцієва помпа, ендо(сарко)плазматичному ретикулум (тапсигаргінчутлива обмінник). Mg²⁺,АТР-залежна кальцієва помпа) та у МХ (електрофоретичний Ca²⁺уніпортер). В цілому ж в першому наближенні є підстави вважати, що динаміка зміни внутрішньоклітинної концентрації іонів Са зумовлена суперпозицією енергонезалежних та енергозалежних кальцієвих потоків. Отже, цілком зрозуміло: вивчення енергонезалежних та енергозалежних Са²⁺-транспортуючих систем, а саме - їх властивостей (кінетичних,

каталітичних, енергетичних), особливостей регуляції під дією фізіологічно активних та фармакологічних речовин, а також функціональної ролі – це найважливіша проблема сучасної біохімії та біохімічної мембранології.

Але в останні роки стає все більш очевидним, що зазначена фундаментальна проблема повинна, безперечно, розглядатися у значно більш широкому аспекті. Виявляється, неможливо зрозуміти закономірності виникнення та реалізації кальцієвого сигналу («кальцієвого транзієнту») у клітині, виходячи лише із знань щодо властивостей окремих ізольованих та реконструйованих Са²⁺-транспортуючих протеїнів. Дійсно, феномен прецизійного контролю внутрішньоклітинної концентрації іонів Са є комплексним («концертним»!). Іншими словами, у фундаментальному відношенні ми повинні сьогодні розглядати клітину будь-якої тканини (зокрема, і м'язової) як складну рецепторну нелінійну неадитивну кооперативну синергічну систему, для якої є властивою (щодо контролю внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу) низка позитивних та негативних регуляторних зворотних зв'язків, тобто як об'єкт дослідження у галузі системної біології.

Натомість, проблема внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу є вкрай важливою і в практичному відношенні. Дійсно, наразі є вагомі різноманітних небезпечних підстави стверджувати, ЩО виникнення патологій (гіпертензія, порушення скоротливої функції скелетних, гладеньких та серцевого м'язів, діабет, гіпоксія/ішемія, різноманітні пухлинний ріст тощо) суттєво пов'язане із змінами у нейропатії, внутрішньоклітинному кальцієвому гомеостазі. Так, відомо, що при деяких патологічних станах можуть змінюватися експресія мембранозв'язаних білків, що забезпечують пасивний та активний транспорт іонів Са, а також суто властивості (зокрема, кінетичні) та особливості регуляції Ca²⁺транспортувальних систем. Саме тому подальше систематичне та всебічне вивчення мембранозв'язаних Ca²⁺-транспортувальних протеїнів в нормі та за патологічних станів, зокрема, відпрацювання методології пошуку нових

оборотних високоафінних нетоксичних (малотоксичних) селективних (інгібіторів, активаторів) ефекторів систем транспорту іонів Ca. дослідження механізмів дії зазначених речовин на трансмембранний кальцієвий обмін - це важливий етап у розробці сучасних фармакологічних підходів до лікування тяжких захворювань, що пов'язані із порушенням Са²⁺-транспортувальних функціонування відповідно, систем та, внутрішньоклітинного гомеостазу Ca²⁺.

В цілому ж цілком очевидно, що проблема внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу - це "перехресна" (трансдисциплінарна) проблема, вирішення якої потребує залучення методів, гіпотез, теорій, уявлень, які є притаманними різним наукам біологічного та медичного циклу.

Така постановка питання цілком розповсюджується і на м'язову біохімію. Дійсно, на теперішній час абсолютно надійно доведена "лімітуюча" роль іонів Са у контролі електро- та фармакомеханічного спряження у м'язах – скелетних, міокарді та гладеньких. Значною мірою має сенс таке формулювання проблеми: зрозуміти механізм м'язового скорочення – це, зокрема, пізнати й молекулярні та мембранні механізми контролю концентрації іонізованого Са у міоплазмі.

Що ж стосується ідентифікації, властивостей та особливостей регуляції систем пасивного та активного транспорту іонів Са саме у гладеньком'язових клітинах (ГМК), функціональна активність ЯКИХ контролюється багатьма факторами (катіонами, протонами H⁺, статевими та пептидними гормонами, розтягуванням тощо), то наші уявлення щодо цього потребують, безсумнівно, подальшого розвитку. Безперечно, певний дефіцит відповідних важливих фундаментальних даних ЩОДО трансмембранного обміну іонів Са в ГМК є суттєвою перешкодою на шляху розробки нових фармакологічних препаратів з метою корекції порушень скоротливої активності ГМ за патологічних станів. У зазначеному контексті маємо, як мінімум, три важливі проблеми. 1/. Потребують активного розвитку подальші дослідження із надійної ідентифікації окремих

Са²⁺-транспортувальних мембранозв'язаних систем V субклітинних мембранних структурах ГМК; 2/. Необхідним є ґрунтовне та всебічне властивостей (кінетичних, вивчення ЦИХ систем ензиматичних, енергетичних, їхньої чутливості до дії різноманітних фізико-хімічних факторів та ефекторів), біохімічних закономірностей їхньої регуляції метаболічними чинниками; 3/. Суттєвим є питання щодо розуміння загальних принципів, що покладені в основу узгодженого ефекту, на підтримання кальцієвого гомеостазу ГМК, із налаштованого В урахуванням вельми своєрідної системи позитивних та негативних зворотних зв'язків (Ca²⁺-залежна інактивація кальцієвих каналів ПМ, Ca²⁺індукований викид іонів Са із саркоплазматичного ретикулума (СР), депоміоцити, кероване надходження іонів Ca y функціонування циклоспоринчутливої мітохондріальної пори перехідної провідності тощо). В цілому ж можна стверджувати, що кооперативні, нелінійні, неадитивні синергічні ефекти, які скоординовані та узгоджені у просторі та часі і є властивими для феномену внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу в ГМК, віддзеркалюють злагоджене сукупне ("концертне"!) суперпозиційне функціонування різних мембранозв'язаних систем активного (первинного, вторинного) та пасивного транспорту іонів Са в клітині ГМ як в складній тензоелектрохімічній системі. Серед рецепторній гладеньком'язових органів матці - об'єкту експериментальних досліджень авторів монографії належить особливе значення, з огляду на її унікальну роль в організмі. Подальше дослідження біохімічних механізмів Ca²⁺-залежного контролю скорочення-розслаблення матки – це шлях не лише до пізнання особливостей спряження процесів збудження та скорочення у міометрії, Й розуміння закономірностей порушень але ДО нормального функціонування його у випадку різноманітних патологічних станів (мова йде, наприклад, за слабість пологової діяльності, гіпо- та гіпертонус матки, невиношування плоду, викидні, передчасні пологи тощо).

Цю монографію присвячено узагальненню, аналізу та систематизації літературних та деяких власних експериментальних результатів, одержаних в останнє десятиріччя групою співробітників відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна Національної Академії Наук України, у галузі вивчення біохімічних механізмів регуляції концентрації іонів Са в ГМК матки. По-суті, мова йде за вивчення біохімічних основ іонних, молекулярних та мембранних механізмів контролю скоротливої активності міометрія. Хоча монографію присвячено нагальним проблемам біохімії ГМК, втім, для неї є притаманною «трансдисциплінарність»: результати досліджень, що описані в ній, були одержані на стику біохімії, біофізики, біомембранології, біофізичної хімії, супрамолекулярної хімії, фізичної хімії, а також комп'ютерного та математичного моделювання.

Монографія складається з двох розділів, яким передує «Вступ» (*авт.* – *С.О. Костерін*).

Розділ I присвячений проблемі транспорту іонів Са в мембранних структурах ГМК. Цей розділ містить дві глави. В главі 1 акцентується увага на сучасних знаннях щодо структури, властивостей та функції Са²⁺-помпи ПМ (*авт. – Т.О. Векліч, Ю.Ю. Мазур, С.О. Костерін*), а в главі 2 обговорюються нагальні питання трансмембранного обміну іонів Са в мітохондріях МХ (*авт. – Л.Г. Бабіч, С.Г. Шликов, С.О. Костерін*).

В розділі II переважно сфокусовано увагу на описі механізмів регуляції трансмембранного обміну іонів Са в ГМК матки. Тут маємо три глави. У главі 3 описані загальні уявлення щодо механізмів регуляції активності систем транспорту Ca²⁺ в міоцитах матки (*авт. – Л.Г. Бабіч*), в главі 4 розглядаються ефекти утеротонічного пептидного гормону окситоцину як модулятора систем транспорту іонів Са в клітинах міометрія (*авт. – С.Г. Шликов*). І, нарешті, в главі 5 аналізуються експериментальні результати щодо оксиду азоту як модулятора систем транспорту іонів Са в міоцитах матки (*авт. – Ю.В. Данилович*).

У «Заключному розділі» (*авт. – С.О. Костерін*) коротко узагальнені результати, що були наведені в тексті монографії.

Сподіваємося, що монографія зацікавить фахівців у галузі біохімії та біофізичної хімії ГМ, системної біології м'язової клітини, біохімічної мембранології та фармакології.

Автори монографії висловлюють свою щиру вдячність: - директору Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України академіку НАН та НАМН України професору С.В. Комісаренку за активну підтримку досліджень у галузі біохімії, біофізичної хімії та біохімічної мембранології гладеньких м'язів, які систематично проводяться у відділі біохімії м'язів нашого Інституту; - директору Інституту органічної хімії НАН України членкореспонденту НАН України професору В.І. Кальченку та його колегам за плідну наукову співпрацю у галузі вивчення впливу калікс[4]аренів на АТРгідролазні та катіон-транспортуючі системи ГМК; - усім співробітникам відділу біохімії м'язів та лабораторії оптичних методів дослідження Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України за творчу дослідницьку співпрацю з вивчення біофізикохімічних механізмів регуляції концентрації іонізованого Са в гладеньком'язових клітинах.

РОЗДІЛ І. ТРАНСПОРТ ІОНІВ Са В МЕМБРАННИХ СТРУКТУРАХ ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВИХ КЛІТИН

У цьому розділі переважно акцентується увага на описі біофізикохімічних властивостей та особливостей регуляції активності систем транспорту іонів Са на рівні ПМ та МХ ГМК. Відповідно, мова буде йти за Ca²⁺,Mg²⁺-ATPaзy (Mg²⁺,ATP-залежну кальцієву промпу) ПМ та системи трансмембранного обміну Ca²⁺ в МХ.

ГЛАВА 1. СТРУКТУРА, ВЛАСТИВОСТІ ТА ФУНКЦІЇ Са²⁺-ПОМПИ ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ

Іони Са є універсальним клітинним неорганічним месенджером і саме під контролем Са²⁺-залежних сигнальних шляхів знаходиться більшість клітинних процесів: скорочення, проліферація, секреція, апоптоз чи некроз. Кальцієві сигнали значною мірою залежать від регуляції концентрації цитоплазматичного [Ca²⁺]_i, у чому особливу роль відіграють як енергонезалежні системи транспорту Ca²⁺ у клітину, так і енергозалежні системи викиду зазначеного іону з цитоплазми.

У ГМ Са²⁺ потрапляє до цитоплазми з позаклітинного простору через ПМ та/або з внутрішньоклітинних Са²⁺ депо, в основному з СР. За вхід Са²⁺ в цитоплазму відповідають Са²⁺-канали, розташовані на ПМ та СР. У ПМ знаходяться 3 типи Са²⁺-каналів: потенціал- та ліганд-чутливі, а також депо-керовані Са²⁺-канали; тоді як на мембрані СР – 2 типи: ріанодинові та IP₃-чутливі [1, 2]. IP₃-чутливі рецептори на СР ГМК відкриваються під впливом IP₃, що утворюється під дією фосфоліпази С внаслідок активації G-протеїну (гетеротримерних G-протеїнів?) або тирозин-кінази спряжених рецепторів (рецепторів із внутрішньою тирозинкіназною активністю та не рецепторних тирозинкіназ?) (GPCR/TKCR). Ріанодинові рецептори

активуються кофеїном, підвищенням [Ca²⁺]_і та перевантаженням іонами Ca CP [3]. Джерела входу Ca²⁺ в цитоплазму взаємопов'язані між собою. Наприклад, вивільнення Ca²⁺ з CP може змінювати активність іонних каналів, що знаходяться на ПМ та впливають на мембранний потенціал, і, таким чином, обумовлювати вхід Ca²⁺ через потенціал-залежні Ca²⁺-канали [3]. У той же час зменшення [Ca²⁺] в CP активує так звані депо-керовані Ca²⁺-канали ПМ (trp) (рис. 1.1) [4].

Основними системами видалення Ca²⁺ з цитозолю є Ca²⁺,Mg²⁺-ATPasa ПМ, Ca²⁺,Mg²⁺-ATPasa CP, Na⁺-Ca²⁺-обмінник та Ca²⁺-уніпортер МХ (рис. 1.1) [1-3, 5]. Na⁺-Ca²⁺-обмінник є низькоафінним щодо Ca²⁺, тоді як Са²⁺-помпи СР та ПМ, хоч і мають високий афінітет до Са²⁺ (К_{са}=0,1-0,3 мкМ), але їм притаманна відносно невелика кількість обертів [6-8]. Таким чином, Ca²⁺,Mg²⁺-ATРази ПМ та СР можуть відповідати за контроль гомеостазу [Ca²⁺]_с у спокої, тоді як Na⁺-Ca²⁺-обмінник, мабуть, відіграє певну роль при регуляції високих, стимуляторних концентрацій Ca²⁺ [6]. Внесок кожної з зазначених систем в усунення Ca²⁺ з цитоплазми залежить від типу ГМК, але загалом Na⁺-Ca²⁺-обмінник відповідає наближено за 60 % усунення Ca²⁺ з цитозолю, а на роль кожної з помп відводиться по 20-30 % [7]. Експериментальні результати [9] вказують на те, що МХ також можуть діяти як система зниження [Ca²⁺]. У такому випадку енергія дихального ланцюга, яка зазвичай використовується для синтезу АТР, йде на транспорт Ca²⁺ (рис 1.1). Афінність до Ca²⁺ у такому процесі незначна (К_{са}=10-20 мкМ) [7], тому раніше вважалося, що такий шлях не може використовуватися для регуляції гомеостазу Ca²⁺ у цитоплазмі в умовах низьких концентрації [Ca²⁺]_i, хоча експериментально була показано можливість накопичення значної кількості Ca²⁺ ізольованими МХ. Сьогодні доведено, що такий шлях має місце за рахунок асоціації СР і МХ, що зближує домени з високою концентрацією Ca²⁺, утворені внаслідок вивільнення Ca²⁺ з ретикулума, з низькоафінним мітохондріальним уніпортером [9]. До того ж накопичення Ca²⁺ МХ стимулює утворення АТР,

оскільки Ca²⁺ є позитивним регулятором кількох ензимів циклу Кребса. Зростання рівня АТР опосередковано впливає на [Ca²⁺]_i, бо АТР є джерелом енергії для функціонування помп, які усувають Ca²⁺ з цитоплазми [3].



Рис. 1.1. Шляхи та механізми транспорту Ca^{2+} у ГМК (адаптовано з [1]). Скорочення: ПМ — плазматична мембрана, СР — саркоплазматичний ретикулум, Р — рецептор, NCO — Na⁺-Ca²⁺-обмінник, PP — ріанодинові рецептори, IP₃ — інозитолтрифосфат, IP₃P — інозитолтрифосфатний рецептор, ФІФ₂ — фосфатидилбіфосфат, CC — Ca²⁺ сенсор у СР (STIM1), НСКК — не селективні катіонні канали, РККК — рецепторкеровані катіонні канали, ДКК — депокеровані канали, ПЧСК — потенціал чутливі Ca²⁺канали.

Через те, що у ГМК основним джерелом Ca²⁺ при скороченні є позаклітинне середовище, головна роль у видаленні Ca²⁺ з клітини належить саме енергозалежним Ca²⁺-транспортуючим структурам ПМ. Ca²⁺,Mg²⁺-ATPaзa, разом з Na⁺-Ca²⁺-обмінником, становить основну транспортну систему ГМК, відповідальну за довготривалу регуляцію концентрації Ca²⁺ у спокої, тобто за обмін Ca²⁺ між внутрішньоклітинним та позаклітинним середовищем [7]. Парціальний внесок Na⁺-Ca²⁺-обмінника та Ca²⁺-помпи залежить від типу тканини. Наприклад, у ГМ матки саме

Ca²⁺,Mg²⁺-АТРаза ПМ відповідає за значну частину викиду Ca²⁺: за допомогою методу фіксації напруги [10] встановлено, що від її активності залежить 70 % відкачаного Ca²⁺, тоді як на роль Na⁺-Ca²⁺-обмінника припадають 30 %. Зважаючи на експресію зазначеної помпи у всіх тканинах та її низьку транспортну здатність, було висунуто припущення, що роль цієї системи полягає у встановленні та підтриманні фізіологічно значущого рівня [Ca²⁺]_i [5].

У зазначеній главі, з огляду на важливу роль Ca²⁺,Mg²⁺-ATPaзи ПМ у підтриманні концентрації іонів Ca²⁺ у ГМК у стані спокою, розглянуті основні властивості кальцієвої помпи ПМ, її структурну організацію, молекулярну біологію, а також регуляцію активності зазначеної помпи як фізіологічними чинниками, так і синтетичними ефекторами.

1.1. Структурно-функціональні властивості Ca²⁺,Mg²⁺-АТРази

1.1.1. Структурна організація Са²⁺, Mg²⁺-АТРази

Перші уявлення про первинну структуру Ca²⁺,Mg²⁺-ATPaзи ПМ були отримані в 1988 з використанням структури комплементарної ДНК. Топологія помпи була розроблена на основі структури кальцієвих помп, які також належать до помп Р_{2в}-типу, беручи за основу Ca²⁺-помпу CP [5]. Загальна схематична модель структурної організації показана на рис 1.2. Ca²⁺-помпа ПМ містить 10 трансмембранних ділянок, NH₂- та COOH-кінці локалізовані з цитоплазматичного боку мембрани. Основна маса протеїну (близько 80 %) знаходиться в цитозолі та складається з трьох основних частин [2]. Перша (А-петля) складається з суто внутрішньоклітинної петлі між трансмембранними сегментами 2 та 3, що в основному сформована з β-складчатих шарів. Ця ділянка бере участь у спряженні гідролізу АТР та транслокації Ca²⁺, передає інформацію щодо конформаційних змін, які виникають під час реакційного циклу, та містить одну з послідовностей, що формують відповідь на кислі фосфоліпіди. Друга частина (N-петля) знаходиться в петлі між трансмембранними сегментами 4 та 5, де сайт утворення проміжного аспартил-фосфату міститься та сайт приєднання АТР. Вважається, що ця петля має підвищену рухливість, оскільки зазначені ділянки повинні зближуватися під час реакційного циклу. Зазначені дві частини протеїну характерні для всіх АТРаз Р-типу, але третя частина (Р-петля) є особливою структурою, характерною лише для Ca²⁺помпи ПМ, та складається з видовженого СООН-хвоста, який містить як βскладчаті шари, так і α-спіралі. На цій ділянці розміщені сайти регуляції активності помпи, у тому числі сайт зв'язування з кальмодуліном [2, 11, 12]. Загалом, структура Ca²⁺-помпи ПМ дуже подібна до структури інших АТРаз Р₂-типу, у тому числі Ca²⁺-помпи СР. Але основна відмінність полягає у наявності СООН-хвоста, який у Са²⁺-помпи СР (20-50 залишків) значно менший за такий у Ca²⁺-помпи ПМ (70-200 залишків) [12].



Рис 1.2. Структурна організація Са²⁺-помпи ПМ (адаптовано з [12]). Скорочення: КДЗ – кальмодулін-зв'язучий домен, ФЧ – фосфоліпідчутлива ділянка, ТМ – трансмембранні домени, Асп – сайт формування аспартилового залишку, PDZ – домен зв'язування postsynaptic density protein.

1.1.2. Молекулярна біологія Ca²⁺,Mg²⁺-АТРази

У геномі ссавців Са²⁺-помпа ПМ кодується 4 неалельними генами [13]. Відомо локуси генів людини: 12q21-q23 для Са²⁺-помпи 1 [14], 3p25p26 для Са²⁺-помпи 2 [15], Xq28 для Са²⁺-помпи 3 [15, 16], 1q25-q32 для Ca²⁺-помпи 4 [14]. Гени Са²⁺-помпи ПМ ссавців мають подібну екзонінтронну структуру та консервативне розташування інтронів [12]. За розміром гени великі, їхній розмір коливається від 70 кб (для 3 ізоформи миші) [17] до більш ніж 100 кб для Са²⁺-помпи ізоформ 1 та 2 людини [12, 18]. Ізоформи мають 80 % амінокислотної подібності, N- та С-кінці мають найменший ступінь подібності і відповідають за структурні відмінності між ізоформами [5]. Усі первинні транскрипти підлягають альтернативному сплайсингу, який відбувається в 3-х точках: А, В, С (рис 1.2), – більш як 20 сплайс-варіантів РНК було ідентифіковано [12].

Номенклатура форм альтернативного сплайсингу є досить складною. На сьогодні найбільш вживаною є наступна: після назви ензиму ставлять номер, який символізує ген (1, 2, 3, 4), потім знаходиться відповідна буква. Якщо сплайсинг відбувся на С-кінці молекули, використовується буква з початку алфавіту в історичному порядку відкриття (a, b, c, …) ізоформи; якщо сплайсинг на N-термінальному кінці – використовується буква з кінця алфавіту, так само за хронологічним порядком відкриття (w, x, y, z). Всього існує три сайти сплайсингу – A, B, C (рис 1.2) [12].

Сайт альтернативного сплайсингу А локалізований вище фосфоліпідзв'язуючого домену, у першій внутрішньоклітинній петлі, нижче послідовності зв'язування з кальмодулін-зв'язуючою послідовністю С-кінця [19]. Альтернативний сплайсинг у точці А утворює малий екзон 36-42 нт довжиною, що кодує короткий сегмент першої внутрішньоклітинної петлі. Наявність цього екзону є варіативною для всіх ізоформ, окрім Ca²⁺-помпи 1 – у цьому протеїні екзон довжиною 39 нт присутній завжди. Для Ca²⁺помпи 2 у сайті сплайсигу А можлива варіативна вставка з 3 екзонів: 33, 60,
42 нт. Ca²⁺-помпи 3 та 4 мають єдиний екзон (42 та 36 нт відповідно) у зазначеному сайті сплайсингу. Альтернативний сплайсинг у точці В є досить рідкісним: для Ca²⁺-помп 1 та 3 характерна наявність 108 нт екзону, також було ідентифіковано транскрипти альтернативного сплайсингу Ca²⁺помпи 2 та -4. Видалення цього екзону призводить до видалення 10-го трансмембранного домену, і СООН-хвіст спрямований поза межі клітини [12]. Сайт сплайсингу С знаходиться всередині кальмодулін-зв'язуючого домену, у С-термінальному хвості [19]. Альтернативний сплайсинг у сайті С характерний для всіх ізоформ і є найбільш різноманітним. Для Ca²⁺-помпи 1 характерно 5 ізоформ, які виникають у результаті сплайсингу; у Ca²⁺помпи 2 є два екзони, що утворюють 3 варіанти; Са²⁺-помпа 3 має також два екзони з внутрішніми донорними сайтами, які утворюють 6 сплайсізоформ; Ca²⁺-помпа 4 має єдиний екзон для сплайсингу, але його вставка викликає зсув рамки зчитування, що призводить до утворення коротшого СООН-термінального домену [12]. Альтернативний сплайсинг Са²⁺-помпи в 3-х сайтах призводить до утворення кількох протеїнів. Але саме сплайс-варіанти в сайті С призводять до утворення ензимів, що відрізняються за структурою С-термінальних доменів, тобто за регуляторними властивостями. У результаті формуються ізоформи Ca²⁺помп з подібними каталітичними характеристиками, але різною регуляцією кальмодуліном та протеїнкіназою (**ПK**) А [12, 13]. Регуляція альтернативного сплайсингу є не до кінця з'ясованим процесом. Основними факторами, які змінювали експресію того чи іншого сплайсваріанту, були: зміна внутрішньоклітинної концентрації Ca²⁺, деполяризація КСІ у високих концентраціях (клітини нейробластоми), пролонгована деполяризація, диференціація (гранулярні клітини). Можливий механізм впливу на процес альтернативного сплайсингу може залучати активацію кальмодулін-залежної кінази IV, яка взаємодіє та фосфорилює визначені нуклеотидні послідовності генів Ca²⁺-помпи ПМ [19].

Розподіл ізоформ Ca²⁺-помпи ПМ у клітинах залежить від потреб клітин у підтриманні гомеостазу Ca²⁺. Ca²⁺-помпи 1 та 4 містяться у всіх тканинах і є єдиними ізоформами, які присутні у ГМ [7]. Ca²⁺-помпа 3 у дорослих людей міститься тільки в мозку (7,5 кб мРНК) та посмугованих м'язах (4,5 кб мРНК), а Ca²⁺-помпа 2 – у клітинах Пуркін'є мозочка та волосяних клітинах равлика, хоча може бути присутня і у матці, нирках, печінці, міокарді, і має досить високий локальний рівень вмісту у молочних залозах [7, 12, 17]. Важливо, що Ca²⁺-помпа 2 функціонує ефективно без стимуляції кальмодуліном [20].

Регіони, які підлягають альтернативному сплайсингу, залучені в регуляторні взаємодії диференційну локалізацію та помпи. Від альтернативного сплайсингу С-кінця залежить ступінь його аутоінгібування, кальмодуліном, взаємодія кінетика взаємодії 3 3 регуляторними протеїнами. Сплайс-ізоформи, які відрізняються за С-кінцем, позначаються як а та b [5, 8]. Так, порівняно з Ca²⁺-помпою 4b, Ca²⁺-помпа 4a менш чутлива до кальмодуліну: концентрація комплексу «Са²⁺-кальмодулін», необхідна для напівмаксимальної активації помпи 4а, в 7 разів вища, ніж для Ca²⁺-помпи 4b. Кальмодулін (1,5 мкМ) також мав різний вплив на афінність ізоформ Ca²⁺-помп ПМ до Ca²⁺: К_{Ca} для Ca²⁺-помпи 4а – 0,54 мкМ, а для Ca²⁺-помпи 4b – 0,25 мкМ. Відмінність між ізоформами у першу чергу впливає на спорідненість до кальмодуліну, а це, відповідно, впливає на афіннітет до Ca²⁺. Ізоформа 4b Ca²⁺-помпи є більш поширеною за Ca²⁺помпу 4а. Са²⁺-помпа 4а зустрічається лише у мозку, ГМ та, можливо, у серці. Імовірно, що наявність Ca²⁺-помпи 4а пов'язана з необхідністю підтримання вищої за середню концентрації Са²⁺ в клітинах [21]. Цікаво, що, незважаючи на більшу спорідненість кальмодуліну до Ca²⁺-помпи 4b, швидкість активації кальмодуліном ензиматичної активності у 4 рази вища для Ca²⁺-помпи 4a, так само і швидкість інактивації при зменшенні концентрації комплексу «Са²⁺-кальмодулін» ізоформи 4а відбувається у 30 разів швидше, ніж ізоформи 4b. Необхідність швидкої відповіді на

зростання концентрації Ca²⁺ також визначає місцезнаходження помпи у певних типах клітин. Так, помпа 4b має повільну відповідь на зростання [Ca²⁺]_i (t_{1/2}=46 c) та малу швидкість інактивації (t_{1/2}=23 хв), таким чином, клітини, які містять переважно цей тип ізоформи, потребують тривалого періоду зменшення активності Ca²⁺-помпи ПМ (гематопоетичні стовбурові клітини). Клітини, які потребують більш швидкої відповіді на Ca²⁺ сигнали (нервові чи м'язеві), містять ізоформу 4а [22, 23].

1.1.3. Кінетичні та каталітичні властивості Ca²⁺,Mg²⁺-ATРази

На теперішній час накопичена значна кількість експериментальних даних по вивченню кінетичних та каталітичних властивостей Ca²⁺,Mg²⁺-АТРази ПМ, у тому числі ГМК.

У ГМ активність Ca²⁺,Mg²⁺-АТРази у фракції ПМ низька (одиниці мкмоль P_i/мг протеїну за год) [24-27]. Вона майже у 10 разів менша, ніж активність "базальної" Mg²⁺-ATРази, яка маскує Ca²⁺,Mg²⁺-ATРазу [28]. У наших експериментах значення питомої ензиматичної активності Ca²⁺,Mg²⁺-ATРази ПМ міоцитів матки становить 3-4 мкмоль P_i/мг протеїну за 1 год [27, 29]. Очищена методом афінної хроматографії на кальмодулінсефарозі «4Б» у присутності азолектину солюбілізована Ca²⁺,Mg²⁺-ATРаза з ПМ клітин міометрія має питому активність до 80 мкмоль P_i /мг протеїну за 1 год [30, 31].

Показник активності Ca²⁺,Mg²⁺-АТРази змінюється залежно від фізіологічного стану м'язу матки. Наприклад, протягом вагітності активність солюбілізованої Ca²⁺,Mg²⁺-АТРази суттєво зменшується: з 87,2±6,3 (n=6) до 34,1±3,1 (n=5) мкмоль Р_і/год на 1 мг протеїну. Як у стані фізіологічного спокою, так і під час вагітності, рівень накопичення Ca²⁺ у фракції везикул ПМ істотно домінує над рівнем, встановленим для інших фракцій [32].

Спорідненість Ca²⁺,Mg²⁺-АТРази до Mg²⁺ є вельми невисокою у сарколемі для тканин коронарної артерії, товстої кишки та міометрія: значення коефіцієнту активації іонами Mg К_{мg} дорівнюють 0,2 - 1,2 мМ [24] та 0,7 мМ [33] відповідно.

Значення константи спорідненості (К_{мдАТР}) для суто субстратної ензиматичної реакції MgATP²⁻ у випадку очищеної солюбілізованої Ca²⁺,Mg²⁺-ATPaзи ПМ клітин міометрія становило 0,56 мМ [25].

Після перевірки у якості субстратів очищеної Ca²⁺,Mg²⁺-ATPaзи ПМ клітин міометрія різних нуклеозидтрифосфатів - ATP, GTP, UTP та CTP, було показано, що ензим є дуже специфічним відносно саме ATP та гідролізує виключно цей нуклеозидтрифосфат [24].

Максимальна АТР-гідролазна активність спостерігається при концентрації іонів Са 5-29 мкМ (значення К_{Са} становить 0,19 та 0,17 мкМ у фракції везикул ПМ та очищеного ензиму відповідно) [25, 34].

Оптимальне значення рН для солюбілізованого ензиму — 7,5-8,0, для Ca²⁺,Mg²⁺-АТРази в мембранному препараті — 6,4-7,0 [25, 35]. Ця різниця в оптимумі рН, імовірно, є наслідком різної просторової конфігурації ензиму, i доступності активного а отже. центру молекули ензиму В солюбілізованому стані і в мембрані. Температурний оптимум для солюбілізованої Ca²⁺,Mg²⁺-АТРази ПМ еритроцитів спостерігався при 37–41 ⁰С, а для Ca²⁺,Mg²⁺-АТРази ПМ клітин міометрія – при 40–45 ⁰С. Подальше підвищення температури до 50 °С призводило до значного зниження активності очищеного ензиму. Енергія активації Е_а АТР-гідролазної реакції, що каталізується цим ензимом, дорівнює 56,4 кДж/моль [36].

1.1.4. Ca²⁺,Mg²⁺-ATPаза та Mg²⁺,ATP-залежний транспорт Ca²⁺

Результати, отримані Костеріним та співавторами [24], свідчать про те, що функціонування Ca²⁺,Mg²⁺-ATРази ПМ ГМК забезпечує трансмембранне активне перенесення Ca²⁺ із внутрішньоклітинного простору у зовнішньоклітинне середовище.

Так, максимальна активність Ca²⁺,Mg²⁺-ATPaзи і Mg²⁺,ATP-залежного накопичення Ca²⁺ спостерігаються при однаковій концентрації Mg²⁺ - 3-5 мМ (концентрація ATP в середовищі інкубації – 3 мМ). Величини K_{Mg} і V_{max} по Mg²⁺, відповідно, складають: у випадку Ca²⁺,Mg²⁺-ATPaзної активності – 0,18 мМ і 7,7 мкмоль P_i/мг протеїну за год; у випадку Mg²⁺,ATP-залежного накопичення Ca²⁺ – 0,39 мМ і 17,4 нмоль Ca²⁺/мг протеїну за 15 хв [35]. Як видно, величини констант активації за Mg²⁺ (K_{Mg}) практично однакові. У випадку міометрія їх значення практично відповідають тим, що були отримані для Ca²⁺,Mg²⁺-ATPaзи сарколеми ГМ коронарної артерії і товстої кишки (0,2 і 1,2 мМ відповідно) [37].

Величини Ca²⁺,Mg²⁺-ATPазної активності і Mg²⁺,ATP-залежного накопичення Ca²⁺ максимальні за концентрації ATP 1 мМ (концентрація MgCl₂ в середовищі інкубації – 5 мМ). Значення K_{Mg} і V_{max} по Mg²⁺ відповідно складають: 0,16 мМ і 8,0 мкмоль P_i/мг протеїну за год (для Ca²⁺,Mg²⁺-ATPазної активності) та 0,25 мМ і 18,0 нмоль Ca²⁺/мг протеїну за 15 хв (для Mg²⁺,ATP-залежного накопичення Ca²⁺). І у цьому випадку значення K_{Mg} для Ca²⁺,Mg²⁺-ATPазної реакції і Mg²⁺,ATP-залежного накопичення Ca²⁺).

Також для обох випадків має місце висока субстратна специфічність відносно ATP та абсолютна необхідність присутності Mg²⁺ у середовищі інкубації [24].

Вивчення впливу величини pH на активність Ca²⁺,Mg²⁺-ATPази і рівень накопичення Ca²⁺ у фракції сарколеми міометрія показало, що у випадку використання 50 мМ тріс-малеат/NaOH буферного розчину оптимальним для обох параметрів є значення pH 6,4-7,0 (при 37 ⁰C) [24].

Важливо відзначити, що Ca²⁺,Mg²⁺-ATPasa, солюбілізована з ПМ клітин міометрія з використанням методу афінної хроматографії на кальмодулін-сефарозі «4Б», була реконструйована в азолективнових ліпосомах (з використанням методу холатного діалізу), і одержані

протеоліпосоми були здатні активно накопичувати іони Ca у Mg²⁺,ATPзалежному процесі [38].

Вищенаведені результати однозначно вказують на той факт, що саме Ca²⁺,Mg²⁺-ATPаза є «молекулярною машиною», яка забезпечує Mg²⁺,ATPзалежний активний транспорт іонів Ca через ПМ ГМК.

1.1.5. Молекулярний механізм спряження Ca²⁺,Mg²⁺-залежного ензиматичного гідролізу ATP та Mg²⁺,ATP-залежного активного транспорту іонів Ca. Енергетика кальцієвої помпи

Са²⁺-помпа ПМ ГМК належить до АТРаз Р-типу підродини Р₂, які утворюють проміжний фосфорильований ензим, що пов'язано з процесом перенесення іону [2, 13, 39]: γ-фосфат АТР реагує з аспартатним залишком ензиму [7, 13]. Також для Ca²⁺-помпи ПМ характерний контртранспорт протону H⁺, що може призводити до змін рН навколо ГМК, впливаючи на активність Ca²⁺-помпи ПМ та на значення внутрішньоклітинного рН [6, 40].

Точний механізм активного перенесення іонів Са Са²⁺-помпою ПМ невідомий, одначе уявлення щодо нього були розбудовані на прикладі Са²⁺-помпи СР, що також належить до АТРаз Р-типу. Проміжні етапи реакції було сформульовано у 4-етапній схемі (рис. 1.3) [2, 19].

Вважають, що у E_1 конформації Ca^{2+} -помпа ПМ має високу спорідненість до Ca^{2+} з цитоплазматичного боку ($K_{Ca} \sim 10^{-7} - 10^{-6}$ M). Приєднання Ca^{2+} та АТР до конформеру у стані E_1 призводить до структурних змін, які обумовлють переміщення Ca^{2+} у позаклітинне середовище (E_2 стан). У результаті відбувається вивілення Ca^{2+} у позаклітинний простір після гідролітичного розщеплення фосфорильованого проміжного продукту, оскільки фосфорильована форма помпи має низьку афінність до Ca^{2+} ($K_{Ca} \sim 10^{-3}$ M). Після вивільнення іонів Са помпа повертається до початкової конформації (E_1) (рис. 1.3) [41, 42]. Етап дефосфорилювання прискорюється K^+ або приєднанням АТР до

регуляторного, низькоафінного сайту. Кальмодулін підвищує прискорення гідролізу АТР на етапі дефосфорилювання. Перехід з Е₂ до Е₁ конформації інгібується у присутності Ca²⁺ у мілімолярних концентраціях, власне кальмодулін та К⁺ прискорюють E₂-E₁ трансформацію [41]. Також присутність Ca²⁺ та кальмодуліну призводить до утворення більш гнучкої конформації СООН-кінця у стані повної активації [43].



Рис 1.3. Схема каталітичного циклу Mg²⁺,ATP-залежної Ca²⁺-помпи (Ca²⁺,Mg²⁺-ATPaзи) ПМ [44].

Показано, що у випадку ощищеної Ca²⁺-помпи ПМ найбільша питома активність виявляється при 40 ⁰C [36]. Розраховані із графіків Арреніуса величини енергії активації E_a гідролізу ATP солюбілізованою, реконструйованою в азолектинових ліпосомах Ca²⁺,Mg²⁺-ATPазою, а також Mg²⁺,ATP-залежного транспорту Ca²⁺ вказаним реконструйованим ензимом, складають 56,4<u>+</u>1,5, 68,0<u>+</u>5,1 та 63,1<u>+</u>2,9 кДж/моль відповідно [36].

1.1.6.Функціональна роль Ca²⁺, Mg²⁺-АТРази

Відсутність специфічних інгібіторів кальцієвої поми ПМ значно обмежує вивчення її фізіологічної ролі, тому більшість уявлень про участь зазначеної помпи у тих чи інших процесах сформовані на підставі аналізу результатів, отриманих на генетично модифікованих організмах.

Численні дослідження вказують на те, що Ca²⁺-помпа ПМ необхідна для підтримання внутрішньоклітинного Ca²⁺-гоместазу та нормального функціонування ГМК [8]. Висока афінність Ca²⁺-помпи до Ca²⁺ (K_{Ca} ~ 0,3-0,6 мкМ) робить її ідеальною системою для підтримання низької фізіологічно значущої сталої концентрації вільного Ca²⁺ (80-100 нМ) у цитозолі в умовах стану спокою [45-47]. За результатами проведеного нами математичного моделювання використання такого селективного інгібітора, як калікс[4]арен C-90, специфічного саме для Ca²⁺,Mg²⁺-ATPaзи ПМ (див. нижче), мало б призводити до зростання [Ca²⁺]_і (рис. 1.4) [27], що підтверджується результатами конфокальної мікроскопії, одержаними при використанні іммобілізованих на полі-L-лізині ГМК (див далі).



Рис. 1.4 Моделювання залежності рівноважної базальної концентрації іонів Са в незбуджених клітинах міометрія від концентрації калікс[4]арену С-90 (специфічного інгібітора Са²⁺-помпи ПМ, І_{0,5} = 20 мкМ).

Домінування того чи іншого шляху викиду Ca²⁺ з клітини залежить від концентрації Ca²⁺ у цитоплазмі: як вже було зазначено, Ca²⁺-помпа ПМ має високу афінність, але низьку максимальну швидкість, тому вона важлива саме для підтримання [Ca²⁺]_i у стані спокою [48]. В ізольованих міоцитах ГМ судин, сечового міхура, матки [7] викид значної частини іонів Ca, які надійшли до клітини при скороченні, відбувається через Ca²⁺-помпу та Na⁺- Са²⁺-обмінник ПМ. Інгібування обох механізмів повністю блокувало б вихід Са²⁺ з клітини. Зокрема, у ГМ матки, незалежно від походження [Ca²⁺], основна роль у його викиді належить Ca²⁺-помпі ПМ 4. Це підтверджується результатами експериментів на нокаутованих по Ca²⁺-помпі ПМ 4 мишах – у цьому випадку релаксація м'язевого скорочення уповільнюється на 50 % [6], тому припускається, що у ГМ матки внесок Ca²⁺-помпи ПМ у релаксацію м'яза складає 65 – 85 % [6, 7], а у видалення Ca²⁺ з цитоплазми - 70 % [6, 8, 49]. У дослідженнях, виконаних на сечовому міхурі, значення Na⁺-Ca²⁺обмінника ПМ у видаленні Ca²⁺ з клітини зростає: вказаний протеїн відповідає за 56 – 75 % викиду з міоплазми Ca²⁺, Ca²⁺-помпа ПМ – за 25 – 27 %, Ca²⁺-помпа CP – за 31 % [8, 49-51]. З використанням мишей з мутантними генами Ca²⁺-помпи ПМ розраховано, що внесок Ca²⁺-помпи ПМ у розслаблення ГМ сечового міхура становить 25 – 30 % [52]. На ГМ аорти показано, що загалом Ca²⁺-помпи CP та ПМ відповідають за 60 – 70 % розслаблення [53].

Було продемонстровано, що Ca²⁺-помпа ПМ 1 залучена до комплексної загальної системи видалення Ca²⁺ з цитозолю [54], і повне видалення гену помпи є летальним на етапі ембріогенезу [55]; тоді як повноцінне функціонування Ca²⁺-помпи ПМ 4 необхідне для адекватної зміни [Ca²⁺]_і при активації ацетилхолінового рецептора [54]. Так, за неефективної роботи Ca²⁺-помпи ПМ 4 сигнал від ацетилхолінового рецептора маскується внаслідок активації Ca²⁺-чутливих К⁺-каналів за умов високої [Ca²⁺]_і [50, 56].

Активність кальцієвої помпи включає антипорт протонів, який, за інтенсивної активності, призводить ДО значного закислення внутрішньоклітинного середовища. Такий ефект, одночасно зі зменшенням [Ca²⁺]_і, сприяє релаксації ГМ, оскільки низьке значення рН зменшує Са²⁺-каналів активність L-типу. Отже. рН-індуковане інгібування електричної активності синхронізоване з [Ca²⁺]-залежною механічною релаксацією. Оскільки зміни внутрішньоклітинного рН пов'язані із силою

скорочення, то чим сильніше скорочення – тим більші зміни рН і більше розслаблення. У ГМ матки завдяки одночасному закисленню цитоплазми та скороченню етап розслаблення є пролонгованим, що дозволяє запобігати гіпоксичному ушкодженню тканин матки та плоду. Водночас внутрішньоклітинне зменшення рН корелює з позаклітинним підвищенням рН, яке призводить до зростання амплітуди коливань [Ca²⁺]_і та сили скорочення [40].

Хоча Ca²⁺-помпа ПМ відіграє важливу роль саме у підтриманні низької [Ca²⁺]_і [57], функціональне значення цієї транспортної системи не обмежене тільки цим [46, 48, 51]. Дійсно:

• антипорт протонів під час АТР-залежного викиду Ca²⁺ через ПМ може призводити до закислення клітин та змінювати спорідненість Ca²⁺- зв'язуючих протеїнів до Ca²⁺, оскільки протони можуть конкурувати з Ca²⁺ за зв'язування з протеїнами;

• зниження активності Ca²⁺-помпи ПМ сприяє відновленню пулу Ca²⁺ у внутрішньоклітинних Ca²⁺-депо;

• за умов функціонування Ca²⁺-помпи ПМ може мати місце опосередкована стимуляція Ca²⁺-помпи CP, оскільки pH оптимум її активності становить 6,8;

• є підстави припускати зв'язок між асоціацією Са²⁺-помпи ПМ та регуляцією росту ГМК: надекспресія Ca²⁺-помпи ПМ призводить до уповільнення росту клітин. І навпаки: зменшення активності Ca²⁺-помпи ПМ змінює проліферацію ГМК судин; цей процес важливий в етіології серцевосудинних захворювань;

• цілком можлива зміна амплітуди та частоти Ca²⁺ сигналів та Ca²⁺-осциляцій при модуляції активності кальцієвої помпи ПМ;

• не можна виключати з боку кальцієвої помпи ПМ контроль примембранної концентрації Ca²⁺, що суттєво, наприклад, для процесів секреції, вивільнення нейтротрасміттерів, клітинної проліферації, скорочення ГМ;

• i, нарештi, iснує припущення, що порушення викиду Ca²⁺ з клiтин внаслiдок зменшення активностi Ca²⁺-помпи ПМ пов'язано з процесом старiння.

Останнім часом все більшого визнання набуває думка, що різні ізоформи Ca²⁺-помпи ПМ, більше того – різні сплайс-варінти, відіграють різну роль в клітинах. У ГМК переважно знаходять ізоформи Ca²⁺-помпи ПМ 1 та -4, які експресуються у всіх тканинах, тоді як ізоформи -2 та -3 зустрічаються значно рідше.

Було проведено багато досліджень з нокаутованим геном Ca²⁺-помпи ПМ 1, їхні результати вказують на його роль як гена «домашнього господарства». Нуль-мутанти Ca²⁺-помпи ПМ 1 були летальними ще під час ранніх стадій ембріогенезу, хоча гетерозиготи не мали значних відхилень [2]. Оскільки Ca²⁺-помпа ПМ 1b є найбільш поширеною формою, вважається, що саме вона виконує найбільше базових функцій у клітині [58]. Її рівень у ГМК судин залежить від фази клітинного циклу. В інтерфазі G₁/S відбувається транскрипційна репресія за допомогою фактора с-Муb, і рівень експресії Ca²⁺-помпи ПМ 1 зменшується на 40 порівняно з фазою G₀. Суперекспресія Ca²⁺-помпи ПМ зменшує проліферацію клітин у 2,5 рази [2], натомість аплікація неспецифічних (карбоксиеозин, іони La) та специфічних (калоксин 1b1) інгібіторів Са²⁺-помпи ПМ до ГМК повітряних шляхів підсилювала проліферацію цих клітин [59]. Також під час проліферації ГМК судин змінюється профіль інших сплайс-ізоформ Ca²⁺помп ПМ у [60], а саме – зростає рівень мРНК Са²⁺-помпи ПМ 4а. Зміна співвідношення сплайс-ізоформ Ca²⁺-помпи ПМ 4a Ca²⁺-помпи ПМ 4b пов'язана з їх спорідненістю до кальмодуліну та Ca²⁺. Таким чином, зростання експресії Ca²⁺-помпи ПМ 4а, що має нижчу спорідненість до Са²⁺, призведе до підвищення [Са²⁺]_і у стані спокою. У той же час Са²⁺помпа ПМ 4b має найнижчу базальну активність та найбільшу активацію кальмодуліном. Особливості активації кальмодуліном вказують на те, що ця ізоформа залучена до розвитку та тривалості Ca²⁺-сигналу, вона

дозволяє розвинутися першому Ca²⁺-спайку впродовж кількох секунд перед тим, як бути активованою, та лишається активною на кілька хвилин після дисипації спайку; таким чином, відповідь на наступний спайк формується значно швидше [2, 43, 61].

Для сплайс-ізоформ b властивим є низький рівень взаємодій через PDZ-домен, які характерні в основному для нервових тканин, хоча деякі взаємодії (MAGUS, PISP) можуть бути властивими і для ГМ. Також показана взаємодія RASSF1 з ізоформою Ca²⁺-помпи ПМ 4b, що призводить до інгібування EGF-залежної активації мітоген-активованої ПК Erk [62]. Це дає підстави вважати, що Ca²⁺-помпа ПМ бере участь у регуляції апоптозу, що також підтверджується результатами, за якими інгібування Ca²⁺-помпи ПМ призводить до активації процесу апоптозу в ГМ судин [63], хоча це може відбуватися і завдяки підвищенню [Ca²⁺]_i.

З використанням трансгенних мишей [2, 64], які мали суперекспресію Са²⁺-помпи ПМ 4b в ГМ судин, було встановлено, що за таких умов спостерігається підвищення кров'яного тиску при збереженні ендотелін (ендотелій?)-залежної релаксації та зростання скорочення судин у відповідь на деполяризацію. Такі результати корелюють з гіпотезою, що участь Ca²⁺-помпи ПМ у регуляції тонусу м'язів не обмежується безпосередньою регуляцією скорочення, а відбувається і завдяки регуляції передачі сигналів у клітині (рис. 1.5). Через PDZ-зв'язуючий домен Ca²⁺помпа ПМ взаємодіє з нейрональною синтазою оксиду азоту (nNOS) у кавеолах і інгібує активність останнього в залежності від рівня комплексу «Са²⁺-кальмодулін» [65]. Утворення комплексу «Са²⁺-помпа ПМ/nNOS» відбувається завдяки α1-синтропіну, який приєднується до Ca²⁺-помпи ПМ у внутрішньоклітинній петлі між трансмембранними доменами 4 та 5. До того ж Ca²⁺-помпа ПМ 4 у серцевому м'язі «негативно» регулює активність nNOS, оскільки зменшує концентрацію Ca²⁺ у безпосередній близькості до синтази. Зменшення активності nNOS, у свою чергу, зменшує утворення сGMP гуанілатциклазою. У результаті зменшується фосфодіестеразна

активність, що уповільнює деградацію сАМР, та збільшується активність ПК А. Тому змінюються параметри скорочення у відповідь на стимуляцію агоністом β-адренергічних рецепторів, оскільки відбувається фосфорилювання групи протеїнів, залучених до спряження збудженняскорочення.

Також Ca²⁺-помпа ПМ 4 може бути важливою при регуляції кальциневрин/NFAT сигнального шляху (рис. 1.5). Цi два протеїни безпосередньо внутрішньоклітинної приєднуються ДО петлі між трансмембранними доменами 4 та 5. Кальциневрин (серин/треонінова фосфатаза) активується при підвищенні [Ca²⁺], та дефосфорилює NFAT (ядерний фактор активованих Т-клітин), який переміщує в ядро та активує Са²⁺-помпи Суперекспресія гіпертрофії [49]. ΠМ 4 інгібує гени кальциневрин, що в результаті має протекторну дію при розвитку патологічної гіпертрофії.



Рис. 1.5 Участь Mg²⁺,ATP-залежної Ca²⁺-помпи ПМ у регуляції сигнальних шляхів із залученням кальциневрину та nNOS (адаптовано з [49]). Скорочення: ПМ — плазматична мембрана, ЯФАТК — ядерний фактор активованих T-клітин, nNOS — нейрональна NO-синтаза, sGC — розчинна гуанілатциклаза, ФДЕ — фосфодівствраза.

В іншому дослідженні трансгенні миші, що містили ген Ca²⁺-помпи ПМ 4 в промотором, міокарді під керованим не змін мали У скороченні/розслабленні м'яза, але при цьому змінювалася амплітуда α- та β-адренергічного сигналу завдяки близькому розміщенню в кавеолах відповідних рецепторів та Ca²⁺-помпи ПМ, що було доведено за колокалізацією з кавеоліном-3. Тому роль Ca²⁺-помпи ПМ 4 у міокарді може полягати навіть не в регуляції серцевих скорочень, а в регуляції росту міокарду завдяки модуляції передачі сигналів у кавеолах [66].

Окрім взаємодії з nNOS, показаний вплив на функціонування eNOS, NOS-3, кальциневрину А через зв'язування відповідних ензимів з внутрішньоклітинною петлею між трансмембранними доменами 4 та 5 Ca²⁺-помпи ПМ. Зменшення Ca²⁺ у мікрооточенні зазначених сигнальних протеїнів призводить до інгібування їх активності [67].

Таким чином, транспортна Ca²⁺,Mg²⁺-АТРаза ПМ є важливою у підтримці фізіологічної концентрації Са²⁺ в міоцитах ГМ, компенсуючи пасивний потік іонів Са в клітину, який відбувається у стані спокою. У зв'язку із тим, що внутрішньоклітинні пули Ca²⁺ (перш за все, CP) розвинені слабо, ΓМ розслаблення відбувається В OCHOBHOMV за рахунок енергозалежного викиду іонів Са у позаклітинний простір [68]. Тому таргетна регуляція Ca²⁺-помпи ПМ має важливе значення у забезпеченні контролю розслаблення ГМ, а саме – у зниженні концентрації Са²⁺ до його фізіологічного рівня в клітині, а також в регуляції багатьох Ca²⁺-залежних сигнальних шляхів, що може сприяти як проліферації клітин, так і апоптозу.

Нажаль, багато свідчень про роль Ca²⁺-помпи ПМ у ГМ отримано на генетично модифікованих організмах, що суттєво порушує чистоту результатів, оскільки зниження чи підвищення експресії помпи може викликати зміну експресії компенсаторних систем щодо надходження чи викиду Ca²⁺. Саме тому важливим є пошук селективних низькомолекулярних ефекторів, які з високим афінітетом дозволяли б модифікувати активність Ca²⁺-помпи ПМ. Використання таких ефекторів

дозволило б розширити існуючі уявлення про функціональну роль Ca²⁺помпи ПМ у клітинах.

1.1.7. Специфіка локалізації Са²⁺-помпи у клітинах

Вміст Ca²⁺-помпи ПМ у мембрані не є високим – 0,1% від усіх мембранних протеїнів [69]. Отже, існування ділянок у мембрані, де мала б місце підвищена концентрація протеїну помпи, дозволяло б створити мікродомени з чітко регульованою концентрацією Ca²⁺. Такими ділянками можуть бути кавеоли, оскільки рядом авторів була продемонстрована асоціація з ними Ca²⁺-помп ПМ [8, 46, 70, 71]. Так, у кавеолах вміст цього Са²⁺-транспортуючого протеїну у 18-25 рази вищий, ніж в інших частинах мембрани. Кавеоли є мембранними інвагінаціями, діаметром 50-100 нм, збагачені сфінголіпідами, холестеролом, фосфатидилсерином та є стійкими до дії детергентів [70]. Вважають, шо оскільки вищеперелічені сполуки підвищують активність Ca²⁺-помпи ПМ, то локалізація помпи у кавеолах повинна підвищувати загальний викид Ca²⁺, хоча ці результати й не підтверджуються in vitro [70]. Локалізація помпи в кавеолах має функціональне значення, оскільки кавеоли (наприклад, у ГМ) знаходяться у тісному контакті з СР і підсилюють викид Са²⁺, спричинений ним [72], та містять рецептори, транспортери, інші протеїни, які залучені в передачу сигналу, пов'язаного зі зміною локальної концентрації Ca²⁺, зокрема NOS [73], Ca²⁺-чутливі рецептори, ізоформи ПК [46]. Таким чином, кавеоли можуть слугувати ініціаторними точками Ca²⁺-хвиль, що дозволяє припустити важливу роль цих структур в сигнальній трансдукції [46].

Спільна локалізація Ca²⁺-помпи та фосфоліпази C у кавеолах створює можливий механізм регуляції активності помпи, оскільки внаслідок гідролізу PIP₂ фосфоліпазою зменшується загальний пул кислого фосфоліпіду, що інгібує активність помпи. Окрім того, можливий незалежний механізм інгібування помпи продуктом гідролізу – IP₃, що буде призводити до зростання концентрації цитоплазматичного Ca²⁺ [46, 70].

Все ж таки більша частина молекул Ca²⁺-помпи не локалізована в кавеолах, оскільки під час препаративного очищення білок помпи розчиненій детергентом, виділяється V фракції, тоді ЯК кавеоли знаходяться у нерозчинній детергентом фракції [2, 13]. Але помпа у мембрані не розташована випадковим чином. Участь у локальній орієнтації Ca²⁺-помпи ПМ можуть відігравати члени MAGUK родини та PISP. Відома взаємодія багатьох протеїнів з вказаних родин [74] з PDZ-доменом Ca²⁺помпи 2b та 4b у ГМ з різним ступенем спорідненості (значення К_D становить 1,6 нМ - 1,2 мкМ). Зважаючи на те, що PDZ-вмісні протеїни відіграють важливу роль V встановленні підтриманні та апікобазолатеральної полярності в епітелії, можна припустити, що взаємодія Ca²⁺-помпи ПМ та MAGUK [75, 76], NHERF2 [77] (апікально) або PISP [78] (базолатерально) дозволяє регулювали локалізацію помпи та утримувати окремі її ізоформи в необхідних ділянках мембрани або цитоскелету. При цьому фрагмент Ca²⁺-помпи ПМ, отриманий внаслідок дії каспази-3, тобто без С-кінця, зберігає специфічне розташування у базолатеральній мембрані [79]. Локальний вміст окремих ізоформ Ca²⁺помпи ПМ на ділянках мембрани забезпечує необхідні властивості Ca²⁺ сигналу [5].

1.2. Регуляція та модифікація активності Ca²⁺,Mg²⁺-ATРази фізикохімічними факторами та низькомолекулярними ефекторами

Виконуючи у клітинах роль транспортної системи, що регулює концентрацію іонів Ca, Ca²⁺,Mg²⁺-ATPaзa ПМ сама є мішенню для дії великої кількості регуляторів. Її активність та спорідненість до Ca²⁺ можуть значною мірою модулюватися фізико-хімічними та багатьма білковими та небілковими факторами - кальмодуліном, кислими фосфоліпідами ПМ,

двохвалентними іонами, сАМР-залежною ПК та ПК С, процесом обмеженого протеолізу тощо.

1.2.1. Фізико-хімічні фактори

Мембранний потенціал

У дослідах, проведених, на фракції везикул ПМ клітин міометрія, було показано, що електричний потенціал, створений за допомогою градієнта К⁺ (система "К⁺-валіноміцин", знак «-» всередині везикул), стимулює енергозалежне (тобто спричинене активністю Mg²⁺,ATP-залежної Ca²⁺-помпи ПМ) перенесення Ca²⁺. Електричний потенціал у діапазоні від 0 до - 80 мВ впливав на початкову швидкість акумуляції Ca²⁺, але не на максимальну кількість накопиченого Ca²⁺. Тобто від'ємний потенціал активує Ca²⁺-помпу ПМ ГМК. При цьому мало місце збільшення числа обертів ензиму, але без зміни спорідненості до субстрату переносу. Можна припустити, що залежність активності Ca²⁺-помпи ПМ від електричного потенціалу має значення для реалізації дії медіаторів і фізіологічно активних речовин, які деполяризують сарколему [24, 80].

Концентрація протонів

Активність Ca²⁺-помпи ПМ підвищується при деполяризації, що призводить до підвищення pH позаклітинного простору [81]. При цьому функціонування помпи залежить від pH, оскільки Ca²⁺ транспорт потребує контртранспорту протону H⁺, тому при підвищенні зовнішньоклітинного pH (до pH=8,8) [54] та при закисленні внутрішньоклітинного середовища [82] відбувається практично повне інгібування транспорту Ca²⁺. Ефект інгібування Ca²⁺-помпи при підвищені позаклітинного pH можна пояснити відсутністю доступних H⁺ у позаклітинному середовищі [82]. В цілому ж

можна вважати, що регуляція Ca²⁺-помпи ПМ протонами Н⁺ відбувається за типом зворотнього зв'язку [8].

Було продемонстровано вплив pH на співвідношення Ca²⁺:H⁺ у випадку функціонування Ca²⁺-помпи ПМ. В еритроцитах воно змінювалося від 1:2 при зовнішньоклітинному pH 6,5 до 1:0 при pH = 8,0. У ГМ при зовнішньоклітинному pH 6,5 співвідношення Ca²⁺:H⁺ становило 1:3, а при 8,2 – 1:1. Іншими словами, чим більше протонів H⁺ доступно у позаклітинному просторі, тим більше їх буде закачуватися до клітини. Хоча серед деяких авторів є думка, що зміни у співвідношенні Ca²⁺:H⁺ швидше є похибкою при вимірюванні чи просто пов'язані зі зміною активності помпи [82].

Іони металів

Досить багато іонів важких металів є потенційними неспецифічними інгібіторами Ca²⁺-помпи ПМ. Величина коефіцієнта інгібування I_{0,5} залежить від іонного радіусу, ентальпії гідратації, константи стабільності комплексу іону з оксиген-вмісними біолігандами. На ізольованій Ca²⁺-помпі ПМ зі шлунку мурчаків було досліджено вплив важких металів на зазначену помпу. Величина I_{0,5} (мМ) змінюється в такому порядку: Ba²⁺ (0,336) > Sr²⁺ (0,251) > Mn²⁺ (0,099) > Co²⁺ (0,029) > Cd²⁺ (0,016) [83].

Залежно від температури та концентрації La³⁺ (цей катіон має радіус, близький до радіусу іонів Ca) також неспецифічно інгібує викид Ca²⁺ кальцієвою помпою ПМ [2, 51]. Причому його дія є досить незвичною, оскільки серед інших помп Р-типу La³⁺ тільки у випадку Ca²⁺-помпи ПМ блокує конформаційний перехід фосфорильованої проміжної сполуки від E₁-P до E₂-P стану. Це дозволяє ідентифікувати La³⁺-чутливу Ca²⁺-помпу в ПМ, в якій міститься багато інших помп Р-типу [84].

Eu³⁺ – представник лантаноїдів, також дуже близький за іонним радіусом до Ca²⁺. Він здатний електростатично взаємодіяти з тими ж

ділянками протеїну, що й Ca²⁺ (переважно з атомами кисню карбоксильних та гідроксильних груп). Тому лантаноїди здатні заміщати Ca²⁺ у Ca²⁺зв'язуючих ділянках протеїнів. Встановлено, що Eu³⁺ гальмує Ca²⁺-ATPaзy СР міоцитів серця [85], скелетних м'язів, Са²⁺-транспортуючу активність АТРази ПМ клітин міометрія [86]. При концентрації вказаного іону 5.10-5 М гальмування досягало майже 100 %, коефіцієнт інгібування І_{0.5} для Са²⁺,Мq²⁺-АТРази ПМ клітин міометрія іонами Ец становив 8,7+2,7 мкМ [24]. Гальмування активності Ca²⁺,Mg²⁺-АТРази ПМ іонами Eu може бути обумовлене декількома факторами: по-перше, Eu³⁺ може зв'язуватись з Са²⁺-зв'язуючими ділянками високої спорідненості, важливими для функціонування ензиму; по-друге, іони Eu, подібно до Mg²⁺, можуть зв'язуватись з β- та γ-фосфатами АТР, при цьому іони європію зв'язуються з АТР у розчині значно сильніше, ніж іони Мд (константи зв'язування різняться більше, ніж на порядок [85]).

Цікавими є результати вивчення інгібування Са²⁺-помпи ПМ іонами Cd, який є дуже ефективним неспецифічним інгібітором (I_{0,5} = 2 нМ); хоч природа інгібування є предметом дискусій: механізм інтерпретується як неконкурентний, або ж як конкурентний щодо Ca²⁺ [87,88]. При використані інтактних клітин ефект Cd²⁺ доволі слабкий (I_{0,5} становить 1,5 мМ при рН 7,2 і 0,35 мМ при рН 8,1) [89], отже, іони Cd здатні пригнічувати активність Ca²⁺-помпи ПМ, діючи тільки зі сторони цитоплазми [90].

Інгібіторний вплив іонів інших металів на Ca²⁺-помпу ПМ викликає дещо менший інтерес. Іони Ni²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺ пригнічують АТРазну активність Ca²⁺-помпи ПМ конкурентно щодо Ca²⁺ [90]. Доведено також інгібування Ca²⁺-помпи ПМ солями свинцю [90].

Інші фактори (вільні радикали, електромагнітні поля, органічні розчинники)

In vivo на активність Ca²⁺-помпи ПМ впливають вільні радикали, що відбувається як через безпосередній їхній вплив на неї, так і через окиснення жирних кислот, які входять до складу мембрани.

Наприклад, Ca²⁺-помпа ПМ еритроцитів інгібується активованими нейтрофілами внаслідок пошкодження вільними радикалами. Аналогічно, в альвеолярних макрофагах *t*-бутил гідропероксид-керований (активований?) оксидативний підвищення стрес спричиняє концентрації цитоплазматичного Ca²⁺, що асоційовано з інгібуванням Ca²⁺-помпи ПМ [46]. Са²⁺-помпа ПМ також чутлива до пероксинітриту (ONOO⁻). Так, у хронічних мікромолярних дозах радикали призводять до утворення похідного нітротирозину Ca²⁺-помпи ПМ, що знижує її термостабільність та незворотньо інгібує функціонування помпи на 75 %: зменшується максимальна швидкість процесу V_{max}, майже у 2 рази збільшується константа активації К_{са} (з 0,11±0,01 мкМ до 0,18±0,01 мкМ) та у 5 разів збільшується константа Міхаеліса К_{малт} (від 49±5 мкМ до 231±15 мкМ); у результаті [Ca²⁺]_с зростає до 400 нМ [45]. Окрім того, оксидативний стрес та антиоксидантні системи захисту призводять до перекисного окиснення активність Ca²⁺-помпи ΠМ ліпідів. ЩО зменшує [91]. Натомість супероксидний радикал (O^{2*-}), мабуть O₂⁻ підвищує активність Ca²⁺-помпи ПМ ГМК судин бичачих легень [92].

Є результати, за якими низькочастотне електромагнітне поле стабілізує ПМ, що сприятливо впливає на Ca²⁺,Mg²⁺-ATPaзну активність [91].

Органічні розчинники характеризуються різним значенням діелектричної проникності, яка впливає на функціонування Ca²⁺-помпи ПМ. Так, зростання величини діелектричної проникності середовища інкубації повинно підсилювати притягування протилежно і відштовхування однойменно заряджених іонів. При цьому буде полегшуватися взаємодія Mg²⁺ з ATP⁴⁻, що призведе до збільшення концентрації істинного субстрату ATP-гідролазної ензиматичної реакції – хелатного комплексу MgATP²⁻, а

також полегшення зв'язування аніонного субстрату MgATP²⁻ з позитивно зарядженим активним центром Ca²⁺, Mg²⁺-ATPaзи та преципітації катіонів Са, які акумулюються у внутрішньовезикулярному об'ємі, з фосфатаніонами. Натомість зниження діелектричної проникності середовища зменшує відштовхування зарядів внаслідок електростатичних взаємодій між позитивно зарядженим активним центром ензима і продуктом АТРгідролазної реакції – аніонним хелатним комплексом MgATP²⁻. Доведено, показника діалектричної проникності на одиницю ЩО зменшення призводить до зниження активності Ca²⁺, Mg²⁺-АТРази ПМ ГМК матки на 10-15 %. Зниження діелектричної проникності від 73,05 до 68,8 спричиняло зменшення максимальної швидкості гідролізу АТР V_{max} у два рази та збільшення константи Міхаеліса К_т у 2,8 разів, таким чином, каталітична ефективність Ca²⁺, Mg²⁺-АТРази за гідролізом АТР загалом зменшується у 5-6 разів. Отже, електростатичні іон-іонні взаємодії між активним центром ензиму та продуктами реакції мають важливе значення у забезпеченні Са²⁺,Мq²⁺-залежної АТР-гідролазної реакції [93].

Органічні розчинники (діоксан, ацетон, етанол, ДМСО) у концентрації до 10 % інгібують активність Ca²⁺-помпи ПМ ГМК матки, при цьому за константою напівінгібування (I_{0,5}) їх можна розташувати у такий ряд (від найбільш до найменш ефективного): діоксан>ацетон=етанол>ДМСО. При цьому зниження початкової максимальної активності Ca²⁺,Mg²⁺-ATPази, хоча і залежало від хімічної природи органічних розчинників, але лімітувалося саме величиною діелектричної проникності середовища інкубації [93].

Етанол впливає на активність Ca²⁺,Mg²⁺-АТРази ПМ дозозалежно. У низьких концентраціях зазначений розчинник стимулював активність реконструйованої Ca²⁺-помпи ПМ. Причому найбільш ефективна стимуляція (до 74 % від максимальної активності Ca²⁺-помпи ПМ) була досягнена з використанням 5 % етанолу [94]. Транспортну активність солюбілізованого та реконструйованого ензиму найбільш ефективно (на 20

%) стимулював етанол у концентрації 2 % [95]. Припускається, що під час активації відбувається безпосередня взаємодія етанолу з молекулою протеїну, оскільки активаційний ефект залежить як від конформаційного Ca²⁺.Mq²⁺-ATРази, стану від якісного вмісту так ліпідів i (3 фосфатидилхоліном активаційний ефект кращий, ніж 3 фосфатидилсерином), до того ж у нативної конформації активація вища, ніж у обробленої трипсином чи за присутності кальмодуліну [94]. Механізм активації може включати відкриття аутоінгібіторного домену, оскільки етанол може взаємодіяти з Ca²⁺-помпою ПМ у її аутоінгібіторному домені кальмодулін-зв'язуючого домену (рис. 1.6). Натомість етанол, біля використаний у високих концентраціях, може порушувати гідрофобні контакти та водневі зв'язки у структурі молекули, знижувати полярність середовища інкубації та величину діелектричної проникності [95]. Етанол у концентрації вище 5 % інгібує помпу, що може відбуватися внаслідок порушення структури ліпідного бішару [94], а саме перекисного впливу етанолу на мембранні ліпіди, поверхневі властивості та базальну Ca²⁺проникність ПМ. Окрім того, не слід виключати можливості зниження діелектричної проникності середовища (ефект від чого описано вище) та зменшення концентрації H₂O, що є одним з компонентів ATP-гідролазної реакції [95]. Таким чином, інтоксикація етанолом може впливати на активність Ca²⁺-помпи ПМ, що впливає на внутрішньоклітинний гомеостаз Ca²⁺.



Рис. 1.6. Модель взаємодії етанолу з очищеною Са²⁺-помпою ПМ, реконструйованою в фосфатидилсерин або фосфатидилхолін: (1) — кальмодулін-зв'зуючий сайт, (2) — сайт взаємодії з етанолом [94].

1.2.2. Низькомолекулярні ефектори

Останнім часом особлива увага дослідників приділяється пошуку низькомолекулярних сполук, які б дозволяли специфічно змінювати (зокрема, знижувати) активність Ca²⁺-помпи ПМ. Давно відомими є неспецифічні інгібітори Ca²⁺-помпи ПМ, тобто ті, які впливають також і на активність інших мембранозв'язаних АТРаз. Такими інгібіторами є еозин (тетрабромофлуресцеїн), ортованадат, п-хлормеркурібензоат, а також перелічені вище іони важких металів (La, Eu, Cd). Звичайно проводиться скринінг речовин, які могли б селективно змінювати активність Ca²⁺-помпи ПМ, і, таким чином, дозволили б вивчати внесок зазначеної помпи у загальний обмін Ca²⁺ у клітині, та роль у формуванні різноманітних патологій. На сьогодні існує два напрями у розробці специфічних інгібіторів: на основі пептидних сполук – калоксинів, та циклічних олігомерів фенолів – каліксаренів. Узагальнена інформація щодо відомих інгібіторів Ca²⁺-помпи ПМ наведена у табл. 1.

Таблиця 1

Речовина	I _{0,5} ,	Гіпотетичний механізм дії	Коментарі	Посиланн			
	мкМ			я			
Неспецифічні інгібітори							
La ³⁺	1	Стабілізує утворення	Специфічний вплив	[69, 84]			
		проміжної	на Са ²⁺ -помпу ПМ				
		фосфорильованої сполуки,	дозволяє				
		уповільнює перехід від Е ₁ -Р	ідентифікувати цю				
		до Е ₂ -Р стану.	помпу в мембрані,				
			серед інших помп Р-				
			типу.				

Eu ³⁺	8,7	1. Взаємодіє з Са ²⁺ -		[24, 85]
		зв'язуючими ділянками		
		високої спорідненості.		
		2. Подібно до Mg ²⁺ ,		
		зв'язується з β- та γ-		
		фосфатними залишками		
		АТР зі значно більшою		
		спорідненістю, ніж Mg ²⁺ .		
Cd ²⁺	0,002	Ефективно конкурує з Ca ²⁺ ,	Інгібуюча дія	[90]
		бо є його ефективним	спостерігається	
		аналогом.	тільки з боку	
			цитоплазми.	
Еозин Ү	1	Приєднується до АТР-	Має низьку	[38, 46]
		зв'язуючої ділянки помпи.	проникність до	
			інтактних клітин. Втім,	
			існує аналог	
			карбоксиеозин, який	
			проникний до клітин.	
Ортованад	4,7	Зв'язується з аспарагіновою	Гальмує також	[2, 38, 96-
		кислотою, яка бере участь в	кальцієву помлу СР	981
ат			nesisdies) nemij er i	••]
ат		утворенні проміжного]
ат		утворенні проміжного фосфоризованого продукту		eo]
ar		утворенні проміжного фосфоризованого продукту Ca ²⁺ ,Mg ²⁺ -АТРази. Блокує]
ar		утворенні проміжного фосфоризованого продукту Ca ²⁺ ,Mg ²⁺ -АТРази. Блокує гідроліз АТР в активному]
ar		утворенні проміжного фосфоризованого продукту Ca ²⁺ ,Mg ²⁺ -АТРази. Блокує гідроліз АТР в активному центрі і знижує]
ar		утворенні проміжного фосфоризованого продукту Са ²⁺ ,Mg ²⁺ -АТРази. Блокує гідроліз АТР в активному центрі і знижує спорідненість ензиму до]
ar		утворенні проміжного фосфоризованого продукту Ca ²⁺ ,Mg ²⁺ -АТРази. Блокує гідроліз АТР в активному центрі і знижує спорідненість ензиму до АТР у АТР-регуляторній]
ar		утворенні проміжного фосфоризованого продукту Ca ²⁺ ,Mg ²⁺ -АТРази. Блокує гідроліз АТР в активному центрі і знижує спорідненість ензиму до АТР у АТР-регуляторній ділянці.		
ат П-	3,2	утворенні проміжного фосфоризованого продукту Са ²⁺ ,Mg ²⁺ -АТРази. Блокує гідроліз АТР в активному центрі і знижує спорідненість ензиму до АТР у АТР-регуляторній ділянці. Приєднується до SH-груп	Гальмує також	[99]
ат п- хлормерку	3,2	утворенні проміжного фосфоризованого продукту Ca ²⁺ ,Mg ²⁺ -АТРази. Блокує гідроліз АТР в активному центрі і знижує спорідненість ензиму до АТР у АТР-регуляторній ділянці. Приєднується до SH-груп протеїну, що призводить до	Гальмує також активність Ca ²⁺ -	[99]
ат п- хлормерку рібензоат	3,2	утворенні проміжного фосфоризованого продукту Ca ²⁺ ,Mg ²⁺ -АТРази. Блокує гідроліз АТР в активному центрі і знижує спорідненість ензиму до АТР у АТР-регуляторній ділянці. Приєднується до SH-груп протеїну, що призводить до інгібіторного ефекту.	Гальмує також активність Ca ²⁺ - помпи CP, впливає на	[99]
ат п- хлормерку рібензоат	3,2	утворенні проміжного фосфоризованого продукту Ca ²⁺ ,Mg ²⁺ -АТРази. Блокує гідроліз АТР в активному центрі і знижує спорідненість ензиму до АТР у АТР-регуляторній ділянці. Приєднується до SH-груп протеїну, що призводить до інгібіторного ефекту.	Гальмує також активність Ca ²⁺ - помпи CP, впливає на активність Na ⁺ /Ca ²⁺ -	[99]
ат п- хлормерку рібензоат	3,2	утворенні проміжного фосфоризованого продукту Ca ²⁺ ,Mg ²⁺ -АТРази. Блокує гідроліз АТР в активному центрі і знижує спорідненість ензиму до АТР у АТР-регуляторній ділянці. Приєднується до SH-груп протеїну, що призводить до інгібіторного ефекту.	Гальмує також активність Ca ²⁺ - помпи CP, впливає на активність Na ⁺ /Ca ²⁺ - обмінника.	[99]

Калоксин	100	Зв'язується з першим		[61]
1A1		зовнішньоклітинним		
		доменом Са ²⁺ -помпи,		
		стабілізує Са ²⁺ -залежне		
		утворення ацилфосфату.		
калоксин	0,4	Селективно зв'язується з	Його інгібування є	[100, 101]
2A1		другим зовнішньоклітинним	неконкурентним по	
		доменом Ca ²⁺ -помпи.	відношенню до Ca ²⁺ ,	
			АТР, кальмодуліну.	
Калікс[4]ар	20.2	Інгібувальна дія пов'язана з	V концентрації 20 мкМ	[07 20]
	,_	······ / - ···· / - ··· · · · · · · · · · · · · · · · · ·	з концонтраци до мки	[27, 29]
ен С-90	,_	кооперативним впливом	збільшує	[27, 29]
ен С-90	,	кооперативним впливом чотирьох просторово	збільшує концентрацію Ca ²⁺ у	[27, 29]
ен С-90	,_	кооперативним впливом чотирьох просторово орієнтованих	збільшує концентрацію Ca ²⁺ у ГМК. Його інгібування	[27, 29]
ен С-90	,_	кооперативним впливом чотирьох просторово орієнтованих сульфониламідинових груп	збільшує концентрацію Ca ²⁺ у ГМК. Його інгібування є неконкурентним по	[27, 29]
ен С-90	,_	кооперативним впливом чотирьох просторово орієнтованих сульфониламідинових груп на верхньому вінці калікс	збільшує концентрацію Ca ²⁺ у ГМК. Його інгібування є неконкурентним по відношенню до Ca ²⁺ ,	[27, 29]

Неспецифічні інгібітори

Еозин Y (тетрабромофлуоресцеїн) – найпотужніший з відомих неспецифічних інгібіторів Ca²⁺-помпи ПМ: властиві для його дії константи інгібування I_{0,5} для помп кардіоміоцитів та еритроцитів становлять 1,00 та 0,04 мкМ відповідно [8, 44, 102, 103]. Причому еозин Y, оборотно гальмуючи Ca²⁺-помпу ПМ, навіть у концентраціях 20-100 мкМ не впливав на іншу Ca²⁺-транспортувальну систему ПМ – Na⁺-Ca²⁺ обмінник [103, 104]. Отже, на рівні ПМ цей інгібітор селективно (щодо Na⁺-Ca²⁺-обмінника) інгібує Ca²⁺-помпу. Значення уявної константи інгібування I_{0,5} під дією еозину для Ca²⁺-помпи ПМ міоцитів матки становить 1 мкМ [38]. Проте у цієї сполуки є один вагомий недолік: низька проникність до інтактних клітин; така проникність є необхідною для забезпечення впливу еозину на Ca²⁺-помпу ПМ, оскільки приєднання до ензиму відбувається на АТР-зв'язуючій ділянці, яка знаходиться з цитоплазматичного боку [46]. Тому

часто використовується аналог еозину - проникний сукцимідиловий естер – карбоксиеозин, що дозволяє блокувати активність Ca²⁺-помпи в інтактних клітинах [46].

неспецифічним інгібітором Класичним катіон-транспортувальних АТРаз Р-типу є ортованадат (п'ятивалентний стеричний аналог фосфату) [96, 105, 106]. Ця сполука гальмує Ca²⁺-помпи ПМ та CP, але чутливість цих систем до нього відрізняється [2, 96, 97]. Припускають, що ванадат пригнічує активність АТРази, зв'язуючись з аспарагіновою кислотою, яка бере участь в утворенні проміжного фосфоризованого продукту Ca²⁺.Mg²⁺-АТРази [96]. Ортованадат блокує гідроліз АТР в активному центрі і знижує спорідненість ензиму до АТР у АТР-регуляторній ділянці [38, 98]. У результаті цей інгібітор уможливлює кристалізацію транспортної АТРази і стабілізує її у Е2-конформації [105, 107]. Ортованадат натрію у концентрації 0,1-100 мкМ неспецифічно інгібує активність Ca²⁺-помпи ПМ на 95 % відносно контрольного рівня, I_{0.5} = 4,7 мкМ [38]. У ГМ ортованадат також стимулює звільнення Ca²⁺ із внутрішньоклітинних депо [108].

Основними неспецифічними необоротними інгібіторами транспортної Ca²⁺,Mg²⁺-ATPaзи ПМ є п-хлормеркурібензоат (значення I_{0,5} дорівнює 3,2 мкМ, повне інгібування помпи відбувається за концентрації 10⁻⁵ М) та іони La (I_{0,5} дорівнює 1 мкМ).

З Grevillea striata було отримано синтетичний аналог стріатолу, що є біс-фенольною сполукою, яка інгібує РМСА-залежний викид Ca²⁺ з інтактних еритроцитів та ГМК аорти. Селективність ефекту цієї сполуки є дозо-залежною, а на ефективність її дії значною мірою впливає якісний склад мембрани [46].

Зважаючи на те, що специфічний інгібітор для Ca²⁺-помпи ПМ відсутній, у дослідженнях по встановленню активності вищезазначеної АТРази, використовують специфічні інгібітори інших Ca²⁺-транспортуючих систем, що дозволяє визначати залишкову, тобто не чутливу до дії цих інгібіторів, АТР-гідролазну або Ca²⁺-транспортуючу активність Ca²⁺-помпи ПМ. Так, терпеновий лактон тапсигаргін – селективний інгібітор Ca²⁺-помпи СР (I_{0.5} ~ 10 нМ), використаний у інтервалі концентрацій 5-100 нМ, зменшує активність очищеної транспортної Ca²⁺,Mg²⁺-АТРази, солюбілізованої із ПМ клітин міометрія, не більше, ніж на 10 % по відношенню до контрольного Також циклопіазонієва кислота, використана у діапазоні значення. концентрації 0,05 - 1 мкМ, – інший селективний інгібітор Са²⁺-помпи СР (І05 ~ 1 мкМ), абсолютно не впливає на активність очищеної транспортної Ca²⁺,Mg²⁺-АТРази, солюбілізованої із ПМ клітин міометрія, але при збільшені концентрації інгібітора від 1 до 10 мкМ ця активність зменшується на 20 % відносно контрольного рівня [109]. Рутенієвий червоний у концентраціях, які повністю гальмують Ca²⁺-помпу CP та енергозалежне транспортування Ca^{2+} у мітохондріях, на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазу ПМ ГМК практично не впливає. 10 мМ азид натрію, який використовують для повного блокування транспортування Ca²⁺ у мітохондріях, спричиняє незначне інгібування (до 14 %) активності Са²⁺-транспортувальної АТРази ΠM [38].

Таким чином, перелічені сполуки можна використовувати для опосередкованого встановлення активності Ca²⁺,Mg²⁺-ATPaзи ПМ, оскільки абсолютно специфічний інгібітор цієї транспортної системи на сьогодні не є відомий.

Специфічні інгібітори на основі пептидів

Для пошуку селективного інгібітора Ca²⁺-помпи ПМ було використано пептиди завдяки їх здатності специфічно розпізнавати окремі ділянки на поверхні протеїнів. Отже, було знайдено пептиди, які мімікрували дію автокаталітичного домену Ca²⁺-помпи ПМ, але їх використання було обмеженим у випадку інтактних клітин, оскільки приєднання таких пептидів до Ca²⁺-помпи відбувається з боку цитоплазми [39]. Таким чином, подібний тип інгібіторів не набув широкого використання.

В останні роки в літературі з'явилися повідомлення про використання специфічних інгібіторів Ca²⁺,Mg²⁺-АТРази ПМ – синтетичних пептидів класу калоксинів 1А1, 2А1 та ЗА1, які зв'язуються з першим, другим та третім зовнішньоклітинними доменами ензиму відповідно [13, 61, 110, 111] (таблиця 1). Калоксини приєднуються до позаклітинного домену помпи та можуть використовуватися для інгібування активності Ca²⁺,Mg²⁺-ATPaзи ПМ в інтактних клітинних системах [72]. Калоксин 1А1, зв'язуючись з першим зовнішньоклітинним доменом, стабілізує Ca²⁺-залежне утворення ацилфосфату (140 кДа). Константа інгібування Іол дорівнює 100 мкМ. Цей калоксин також незначною мірою інгібує Ca²⁺,Mq²⁺-ATPaзy CP [61]. Найбільший інтерес викликає пептидний інгібітор калоксин 2А1, який селективно зв'язується з другим зовнішньоклітинним доменом Ca²⁺, Mg²⁺-АТРази ПМ, амінокислотна послідовність якого є подібною для різних ПМ. Калоксин інгібує Ca²⁺.Mg²⁺-АТРазу Ca²⁺-помпи 2A1 идофори $(I_{0.5}=0.4\pm0.1 \text{ мкM})$, не впливаючи на Mg²⁺-ATPasy, Na⁺,K⁺-ATPasy ПМ та на Ca²⁺,Mg²⁺-АТРазу СР. Його інгібування є неконкурентним по відношенню до Ca²⁺, ATP, кальмодуліну. Також він інгібує утворення ацилфосфату, таким чином впливаючи на конформаційні переходи протягом реакційного циклу Ca²⁺-помпи [100, 101]. Використання калоксинів обмежує високе значення Кі для 2А1, тоді як підвищення спорідненості призводить до втрати селективності [61].

Специфічні інгібітори на основі каліксаренів

Важливо зазначити, що можливість охарактеризувати роль Ca²⁺помпи ПМ у фізіології ГМ значно покращиться з перспективою використання її селективного фармакологічного інгібітора [46]. Щоб обійти використання інгібіторів, було залучено генетичні підходи knock-out, knockin та conditional targeting для Ca²⁺-помпи ПМ [8]. Втім за таких методичних прийомів результати щодо функцій Ca²⁺-помпи ПМ у клітинах або органах не можуть інтерпретуватися напряму, оскільки зміна експресії Ca²⁺-помпи ПМ може викликати зміну експресії інших систем, які контролюють концентрацію Ca²⁺ у клітині або виконують подібні до Ca²⁺-помпи сигнальні функції. Нажаль, електрофізіологічно не можна визначити обіг Ca²⁺, який здійснюється Ca²⁺-помпою ПМ, через низьку швидкість обертів помпи [56]. Тому одним з перших завдань у дослідженні функціональної активності Ca²⁺-помпи ПМ стоїть розробка її специфічного та високоафінного інгібітора.

В останні роки все більша увага з боку біохіміків, молекулярних та клітинних біологів приділяється таким малотоксичним супрамолекулярним сполукам, як циклічні олігомери фенолів – каліксарени [112-116]. Так, зазначені сполуки (принаймні, деякі з них) демонструють мембранотропну дію, добре проникають через ПМ, а також слугують ефекторами (інгібіторами та активаторами) ензиматичних, рецепторних та транспортних мембранозв'язаних протеїнів, пригнічують адгезію клітин, виявляють антитромботичну дію, гальмують процеси пухлинного росту тощо [115-119].

У співпраці з член-кор. НАН України проф. В.І.Кальченком та його співробітниками ми дослідили вплив синтезованих та охарактеризованих з використання методів ЯМР та інфрачервоної спектроскопії вибраних калікс[4]аренів на активність транспортної Ca²⁺,Mg²⁺-ATPaзи ПМ.

Ми показали, що калікс[4]арен С-90 (5,11,17,23тетра(трифтор)метил(фенілсульфониліміно)-метиламіно-25,26,27,28тетрапропоксі-калікс[4]арен) (100 мкМ) пригнічує активність Ca²⁺,Mg²⁺-АТРази як у фракції ПМ міоцитів матки (на 75 % відносно контрольного значення), так і у випадку препарату очищеної солюбілізованої Ca²⁺,Mg²⁺-АТРази (на 70 % відносно контрольного значення). При цьому він практично не впливає на ензиматичні активності Na⁺,K⁺-АТРази і "базальної" Mg²⁺-АТРази ПМ міоцитів матки (рис. 1.7) [27, 29]. Величина

коефіцієнта інгібування I_{0,5} становить 20,2 мкМ, значення коефіцієнта Хілла n_н – 0,55 (рис. І.8) [27, 34, 120].



Рис 1.7. Порівняльне дослідження впливу калікс[4]арену С-90 (100 мкМ) на АТР-гідролазні активності в ПМ клітин міометрія свиней (М <u>+</u> m, n = 5).

Також було показано, що «каліксаренова чаша» – калікс[4]арен С-150 (25,27-дипропоксикалікс[4]арен) та модельний сульфониламідин – сполука M-1 (N-(4-етоксифеніл)-N'-(фенілсульфонил)трифторометилацетімідоамід), яка функціоналізує «чашу» по верхньому вінцю, незначно (на 12-13 %) знижували Ca²⁺,Mg²⁺-ATPaзну активність [27, 29, 34], що свідчить на користь того, що інгібувальна дія калікс[4]арену С-Ca²⁺,Mg²⁺-ATPазну активність 90 на передусім пов'язана саме 3 кооперативним просторово орієнтованих впливом чотирьох на калікс[4]ареновій платформі сульфониламідинових груп, а не з дією тетрафенольного макроциклу як такого чи з дією окремої фармакофорної групи.



Рис 1.8. Концентраційна залежність інгібуючої дії калікс[4]арену С-90 на ензиматичну активність Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРази в ПМ клітин міометрія (М <u>+</u> m, n = 5).

За 100 % прийнято значення ензиматичної активності за відсутності калікс[4]арену С-90 в середовищі інкубації.

Отже, ми вважаємо, що калікс[4]арен С-90 на рівні ПМ є селективним і достатньо афінним інгібітором Ca²⁺-помпи ПМ. В наших останніх дослідженнях з використанням лазерної конфокальної мікроскопії на підставі зміни флуоресцентного сигналу Са²⁺-чутливого зонду fluo-4 AM аплікація калікс[4]арену С-90 (20 було встановлено, ЩО мкМ) до іммобілізованих ГМК обумовлює зростання внутрішньоклітинної концентрації Са. Окрім того в незалежних дослідах продемонстровано, що під дією С-90 у клітинах міометрія загальмовується термінація Ca²⁺сигналу, індукованого утеротоніком окситоцином (Л.Г. Бабіч, С.Г. Шликов), а також знижується швидкість релаксації і механічної напруги у випадку спонтанної активності міометрія (О.В. Цимбалюк).

1.3. Метаболічна регуляція Ca²⁺,Mg²⁺-ATРази



Рис 1.9. Загальне розміщення регуляторних доменів Са²⁺-помпи ПМ для метаболічних сполук [84].

1.3.1. Кальмодулін

Позитивним модулятором Ca²⁺,Mg²⁺-АТРази ПМ є кальмодулін. Перші відомості про регуляцію Ca²⁺,Mq²⁺-АТРази ПМ кальмодуліном були отримані на початку 70-х років Бондом та Клау [121]. Було показано, що для переведення ензиму з менш активної форми А в більш активну форму В було необхідним додавання до виділених мембран не лише іонів Ca²⁺ Ca²⁺. для моделювання реакції накопичення іонів а також внутрішньоклітинного вмісту, який, напевно, містив деякий "фактор активації". Пізніше цей фактор було виділено, охарактеризовано та названо кальмодуліном. Взаємодія Ca²⁺,Mg²⁺-АТРази з кальмодуліном призводить до підвищення спорідненості ензиму до іонів Са, кальмодулін також підвищує швидкість гідролізу АТР та транспорту катіонів [44, 72, 122]. Са²⁺,Мg²⁺-АТРаза ПМ внаслідок гідролізу однієї молекули АТР транспортує один іон Са. Так, для Са²⁺-помпи ПМ міометрія щурів встановлено, що кальмодулін удвічі збільшував максимальну швидкість транспортувального процесу у везикулах ПМ та на порядок підвищував спорідненість цієї системи до Са²⁺ [123].

умов низької концентрації Ca²⁺-помпа перебуває у стані 3a аутоінгібування, оскільки її СООН-термінальний регіон, локалізований на 40 залишків нижче останнього трансмембранного домену, перешкоджає функціонуванню каталітичного циклу. Якщо концентрація Са зростає, «Са²⁺-кальмодулін», який комплекс утворюється приєднується ДО аутоінгібіторного домену Ca²⁺-помпи ПМ, звільняючи її від інгібування та відновлюючи її активність [12]. Було виявлено, що Ca²⁺-помпа ПМ має дві ділянки зв'язування з кальмодуліном: у С-термінальному хвості довжиною 25 залишків та біля фосфоліпід-зв'язуючого домену в другій цитозольній петлі, локалізованій між сайтами фосфорилювання та зв'язування АТР – 537-544 залишки для ізоформи Ca²⁺-помпи ПМ 4 (рис. 1.9) [123]. Кристалографічні дослідження ензиму в стані аутоінгібування вказують, що СООН-термінальний регуляторний домен запобігає доступу субстрату та відсутності Са²⁺-кальмодуліну [12]. ATP за зв'язуванню Оскільки кальмодулін має високу Ca²⁺-афінність, імовірно, він насичується іонами Са навіть за низької концентрації Са²⁺ у клітині, тобто у стані спокою. Таким чином, кальмодулін може взаємодіяти з кальмодулін-зв'язучим доменом, Ca²⁺-помпу підтримуючи в достатній активності навіть за низької концентрації [Ca²⁺], [44].

Ізоформи Ca²⁺-помпи ПМ мають певні особливості в регуляції кальмодуліном: у них різна базальна активність, різна афінність до кальмодуліну, швидкість активації та інактивації у відповідь на приєднання та дисоціацію кальмодуліну [2].

1.3.2. Ліпідне оточення

Стимуляція Са²⁺-помпи ПМ відбувається під впливом кислих фосфоліпідів та поліненасичених жирних кислот. Кислі фосфоліпіди, такі фосфатидилсерин, фосфатидилінозитол, фосфатидна ЯК: кислота, Ca²⁺, кардіоліпін, збільшують афінність помпи ДО швидкість його

транспорту, кооперативність щодо Ca²⁺. Важливо, що концентрація ліпідів in vivo у мембрані достатня для напівмаксимальної активації помпи. До того ж кислі фосфоліпіди є більш ефективними активаторами помпи, ніж кальмодулін [2], що призвело до припущення, за яким кальмодулін та кислі фосфоліпіди активують Ca²⁺-ATPaзу за різними механізмами із залученням різних зв'язуючих сайтів [124, 125]. Робота з різними протеолітичними фрагментами Ca²⁺-помпи ПМ та з синтетичними пептидами дозволила відкрити два окремих фосфоліпід-зв'язуючих домени у помпі: один є кальмодулін-зв'язуючим, а інший – розташований у цитозольній петлі між 2 та 3 трансмембранним доменом та містить 40 основних амінокислот [44, 48, 72]. Істотна стимуляція активності Са²⁺-помпи ПМ фосфоліпідами відбувається завдяки зміні конформації кальмодулін-зв'язуючого домену [44, 124], що ймовірно підвищує доступність кальмодуліну для зв'язування з послідовністю Ca²⁺-помпи ПМ. Також у АТРаз Р-типу відбуваються значні конформаційні зміни при переході від Е1 до Е2 стану, і ліпідне оточення може впливати на транспорт Ca²⁺ завдяки впливу на конформаційні перебудови [124].

Активація кислими фосфоліпідами має значення для функціонування Ca²⁺-помпи ПМ *in vivo*, оскільки вони є одним з компонентів мембранного оточення помпи [72]. Саме завдяки ліпідному оточенню помпа є постійно активованою. В експериментах з реконтруйованою Ca²⁺-помпою ПМ було показано, що фосфоліпіди мембрани забезпечують 50 % максимальної швидкості Ca²⁺-помпи ПМ [44, 72, 126]. Причому різні фосфоліпіди мають різне значення в умовах *in vivo*. Так, концентрація фосфатидилсерину та подібних до нього кислих фосфоліпідів у ПМ незмінна для кожного окремого типу клітин, натомість концентрація фосфатидилінозитолу та його фосфорильованих продуктів (фосфатидилінозитол-4,5-бісфосфат PIP_{1,2}) у мембрані змінюється під впливом регуляторних систем клітини, що робить їх більш імовірними модуляторами активності Ca²⁺-помпи ПМ [44]. Загалом, з-поміж перелічених сполук фосфатидилінозитол-4,5-бісфосфат є

найефективнішим стимулятором помпи [2, 61]. Таким чином PIP₂ є важливим для збереження активності Ca²⁺-помпи ПМ у клітинах у стані спокою, коли концентрація вільного Ca²⁺ є низькою та стимуляція кальмудуліном є мінімальною [2, 48, 61]. Варто зазначити, що концентрація PIP_{1,2} залежить від Ca²⁺-споріднених сигнальних процесів, тому можливий зворотній цикл регуляції Ca²⁺-помпи ПМ [72].

Важливими компонентами ПМ є сфінгомієлін та холестерол, які, як і Са²⁺-помпа, переважно знаходяться у ліпідних рафтах. Вміст зазначених сполук у мембрані обернено пропорційно корелює з активністю Са²⁺-помпи ПМ [71].

Іншими ефективними стимуляторами та невід'ємними компонентами мембран є жирні кислоти. Загалом, насичені жирні кислоти не впливають на активність помпи, а у випадку ненасичених жирних кислот важливим є співвідношення між кількістю подвійних зв'язків, довжиною аліфатичного ланцюга та впорядкованістю ацильних залишків, оскільки у повністю впорядкованому оточенні ацильних залишків Ca²⁺-помпа ПМ сильніше асоціюється з фосфатидилсерином, ніж з фосфатидилхоліном, а в невпорядкованому оточенні – навпаки [127]. Серед жирних кислот найбільш виражений вплив на Ca²⁺-помпу ПМ має арахідонова кислота (C20:4). Помічена кореляція між внутрішньоклітинним рівнем Ca²⁺ та вмістом арахідонової кислоти в ПМ: підвищення концентрації останньої одразу ж спричиняє збільшення рівня внутрішньоклітинного Ca²⁺, що може відбуватися через стимуляцію зазначеною кислотою виходу Ca²⁺ з внутрішньоклітинних депо. Вплив на Ca²⁺-помпу ПМ арахідонової кислоти є концентраційнозалежним. За її концентрації 5 мкМ відбувається максимальна активація Ca²⁺-помпи ПМ арахідоновою кислотою: хоча спорідненість до Ca²⁺ практично не змінюється, але прискорюється етап дефосфорилювання ензиму (перехід з Е2 в Е1 конформацію). Такий ефект також спостерігається під дією олеїнової та ліноленової кислоти. Але при підвищенні концентрації до 50 мкМ арахідонова кислота має інгібіторний

вплив на активність помпи, що, можливо, пов'язано з неспецифічним та нефізіологічним впливом жирних кислот з довгим ланцюгом на АТРазу Ртипу: зменшується спорідненість до Ca²⁺ та зменшується стабільність фосфоензиму. Також існує припущення, що за цих обставин відбувається роз'єднання гідролізу АТР та транспорту Са²⁺. Сайти приєднання арахідонової кислоти локалізовані внутрішньоклітинно, незалежно від кальмодулін-зв'язуючого домену та сайтів приєднання кислих фосфоліпідів [47]. Продукти перекисного окиснення ліпідів мають негативний вплив на активність Ca²⁺-помпи ПМ, N-гліцерований фосфоетанол зменшує спорідненість помпи до фосфоліпідів мембрани та зменшується її термостабільність [128], також 4-ОН-2,3-транс-ноненаль інгібує активність Са²⁺-помпи ПМ. Такий механізм інгібування активності Са²⁺-помпи може мати місце, наприклад, при серцево-судинних захворюваннях [46].

Оскільки на активність Ca²⁺-помпи ПМ впливає склад та композиція ліпідів мембрани, то зміни в ліпідній композиції, у зв'язку зі старінням або захворюванням, можуть впливати на функціонування помпи, і відповідно, на [Ca²⁺]_i.

1.3.3. Мінорні ліпіди

Сполуки ряду N-ацилетаноламінів легко вбудовуються у ПМ та викликають зміни її ліпідного складу. Наприклад, N-пальмітоїлетаноламін модифікував фосфоліпідний склад ПМ: зростав відсотковий вміст фосфатидінозитолу (на 20,2 %), що активує функціонуваня помпи, та лізофосфатидилхоліну (у 2,7 разів). Оскільки на солюбілізованій формі Ca²⁺-помпи активуючого вливу N-пальмітоїлетаноламін не мав, логічно припустити, що активуючий ефект пов'язаний з впливом на ліпідний склад ПМ і, можливо, є важливою ланкою у механізмі скорочення-розслаблення міометрія. На фоні цих результатів N-пальмітоїлетаноламін знижує амплітуду та тривалість спонтанних скорочень смужок міометрія [129].
1.3.4. Спермін

Полікатіон спермін належить до ендогенних поліамінів, які виконують важливу роль у регуляції процесів росту та диференціації клітин. Регуляторну роль спермін відіграє у функціонуванні такого репродуктивного органу, як матка, оскільки під час розвитку вагітності в матці підвищується вміст поліамінів. Ці показники досягають максимуму в середині вагітності і знижуються з наближенням пологів [38].

Вплив поліаміну сперміну на активність очищеної Ca²⁺,Mg²⁺-ATРази ПМ є двофазним: за концентрації поліаміну 0,1-0,5 мМ спостерігається тенденція до активації ензиму (~ 10 %), подальше підвищення його концентрації призводить до зниження активності. Коефіцієнт інгібування І0.5 мΜ (n=4). Спермін, становить 5.5 + 0.3зв'язуючись 3 кислими фосфоліпідами, може зменшувати необхідну їх кількість в оточенні Ca²⁺помпи ПМ і в такий спосіб знижувати її активність. Можливість такого зв'язування експериментально [38]. Інгібіторний ефект доведено полікатіонів включає взаємодію з негативно зарядженими групами амінокислот на петлях ензиму, орієнтованих у цитозоль, утворення між ними містків та блокування доступу субстрату [2].

1.3.5. Фосфорилювання

Кіназа-кероване фосфорилювання також впливає на активність Ca²⁺помпи ПМ [54]. Це вперше було показано у випадку помпи з мембрани сарколеми серця та пов'язано з сАМР-залежною ПК [44]. Вважається, що саме сАМР-залежна ПК є основним протеїном, який фосфорилює Ca²⁺помпу ПМ, сайт фосфорилювання представлений сериновим залишком між СООН-кінцем та кальмодулін-зв'зуючим доменом [48]. Але такий шлях активації властивий лише для ізоформ Ca²⁺-помпи 1 [48], оскільки лише Ca²⁺-помпа 1b містить залишок Cep (може Ser?), описаний вище [2]. Фосфорилювання призводить до зменшення значення K_{Ca} до 1 мкМ [44], також спостерігається підвищення максимальної швидкості каталітичного процесу у 2 рази. Стимуляція кальмодуліном та ПК A не є адитивною [2], що, мабуть, свідчить про єдиний механізм активації та спільні центри взаємодії кальмодуліну та ПК.

сGMP-залежна ПК також підвищує максимальну швидкість та Ca²⁺афіннітет Ca²⁺-помпи. Хоча невідомо, чи відбувається це безпосередньо завдяки фосфорилюванню помпи [2], або через фосфорилювання 240 кДа протеїну [48].

Активація ПК С є більш складною, оскільки може як активувати, так і інгібувати активність Ca²⁺-помпи ПМ. Фосфорилювання помпи зазначеною кіназою описано кількома авторами [41, 56, 130-134]. ПК С підвищує значення V_{max}, хоча менш ефективно, ніж ПК А. Фосфорилювання Ca²⁺помпи ПМ ПКС відбувається по треоніновим та сериновим залишкам, які знаходяться в СОО-кінці, нижче кальмодулін-зв'язуючого домену [44]. Значно рідше відбувається фосфорилювання в інших ділянках С-кінця, треонін 3 таких V кальмодулін-зв'язуючому домені. одна i фосфорилювання в такому випадку аналогічне дії кальмодуліну, оскільки звільняє від аутоінгібування. Важливо, ефект помпу ЩО від фосфорилювання ПК С є ізоформ-залежним. У випадку Ca²⁺-помп 2а та 3а сайт фосфорилювання ПК С знаходиться тільки у кальмодулін-зв'язуючому домені, що перешкоджає зв'язуванню кальмодуліну, за цих умов інгібується активація помпи, і, як наслідок, фосфорильована ПК С Са²⁺-помпа має постійну низьку активність [2], тоді як у випадку Ca²⁺-помпи 4a фосфорилювання не впливає на базальну стимуляцію її кальмодуліном [56]. У той же час активація помпи під впливом ПК С спостерігається в ендотеліальних клітинах та деяких клітинних лініях, наприклад, у випадку Са²⁺-помпи 4b в нейронах, оскільки ПК С фосфорилює зазначену ізоформу нижче від сайту приєднання кальмодуліну [56]. Таким чином, патерн

експресії помпи визначає ефект фосфорилювання та енегозалежний викид Ca²⁺. Сайти фосфорилювання є ізоформ-специфічними та альтернативний сплайсинг первинного транскрипту змінює їх розташування та наявність [56], що визначає їх відповідь на фосфорилювання.

Цікавим є вплив кальмодуліну на фосфорильовану Ca²⁺-помпу ПМ. У деяких випадках після фосфорилювання приєднання кальмодуліну ще більше стимулює помпу. Послідовність підвищення V_{max} кальмодуліном можна розташувати у такому порядку: ПК С -фосфорильований ензим > ПК А-фосфорильований нативний Окрім ензим > ензим. того, фосфорилювання впливає на швидкість зв'язування кальмодуліну: фосфорилювання ПК А зменшує цей показник, а ПК С – збільшує. Але присутність кальмодуліну на ензимі до фосфорилювання запобігає дії як ПК А, так і ПК С, оскільки зменшує кількість сайтів, доступних кіназам. Таким чином, ПК А та ПК С можуть мати різну функціональну роль у процесі фосфорилювання.

Дефосфорилювання Ca²⁺-помпи ПМ є дещо менш описаним і показано тільки на очищеному ензимі *in vitro* (нейрональна тканина, фосфатази PP1 та PP2A). У будь-якому випадку дефосфорилювання є механізмом, необхідним для підтримання гомеостазу Ca²⁺ за надмірної активації помпи.

1.3.6<mark>.</mark> Простагландини

Простагландини – гормоноподібні регуляторні молекули, похідні арахідонової та інших поліненасичених жирних кислот, які досить широко використовуються у медичній практиці. Механізм дії простагландинів, що призводить до стимуляції скорочень міометрія, майже не досліджений, але існує думка, що однією з причин стимуляції скоротливої активності ГМ матки під впливом цих сполук може бути підвищення концентрації внутрішньоклітинного Ca²⁺ внаслідок інгібування простагландинами Ca²⁺- помпи ПМ.

Дослідження, проведені на очищеній Ca²⁺,Mg²⁺-ATPaзi ПМ, показали, що простагландини E₂ та F_{2α} у широкому діапазоні концентрацій (10⁻⁸ – 10⁻⁴ M) абсолютно не впливають на її активність [25]. Поряд з цим, Попеску і співавтори показали, що ці ж простагландини гальмують Ca²⁺-помпу ПМ міометрія вагітних жінок [37]. Такі дані, очевидно, пояснюються тим, що простагландини впливають на активність Ca²⁺-транспортуючої АТРази ПМ не безпосередньо, а через рецептор та системи, що забезпечують спряження останнього з Ca²⁺-транспортуючим ензимом.

1.3.7. Пептидні гормони

Окситоцин (ОТ) – пептидний нейрогормон, який впливає на різні функціональні системи організму людини і тварин. Він складається з 9 супраоптичних амінокислотних залишків, синтезується в та паравентрикулярних ядрах гіпоталамуса, накопичується у задній долі гіпофіза, звідки секретується в кров. Введення ОТ викликає скорочення міоепітеліальних клітин молочних залоз та ГМ матки, а останнє стимулює пологову активність. Окситоцинові рецептори розміщені на поверхні ПМ клітин-мішеней і належать до родопсинподібних рецепторів GPCR-родини. Дія ОТ пов'язана з активацією Ca²⁺-каналів ПМ та викидом Ca²⁺ з CP, а також з інгібуванням активності Ca²⁺,Mq²⁺-АТРази ПМ та СР. Втім, навіть при використанні насичуючих концентрацій ОТ (10⁻⁷ М) активність помпи повністю не пригнічується [135-137].

Брадикініни є «больовими» пептидами, які утворюються в місці ушкодження тканин та запалення. Вони, як наприклад, і АТР, активують метаботропні рецептори (P2Y₁ або B2) в нейронах. Стимуляція метаботропних рецепторів також призводить до активації фосфоліпази C, утворення диацилгліцеролу та IP₃. Оскільки Ca²⁺-помпа ПМ стимулюється

ПК С і брадикініни підвищують вихід Ca²⁺ з клітин [56], цей викид відбувається завдяки активації Ca²⁺-помпи ПМ.

Рецептори ендотеліну спряжені з Ca²⁺-помпою ПМ та фосфоліпазою С через різні G протеїни, у тому числі G_s та G_q. Ендотелін інгібує активність Ca²⁺-помпи ПМ, що призводить до зростання [Ca²⁺]_i, та контролює гомеостаз Ca²⁺ у клітині [138]. Окрім того, контроль Ca²⁺-помпи ПМ здійснюється через G-протеїн паратиреоїдним гормоном, вазопресином та глюкагоном [48].

1.3.8. Інші фактори

На додачу до регуляції кальмодуліном, на С-термінальний регіон Са²⁺-помпи ПМ впливає незворотній активатор кальпаїн та PDZ (Postsynaptic density protein-розшифровка абревіатури була раніше!) протеїни (рис. 1.9) [44]. Селективний протеоліз ізольованої помпи кальпаїном призводить до від'єднання кальмодулін-зв'зуючого домену, залишаючи 124 кД фрагмент з Ca²⁺-залежною активністю [48]. Найбільш чутливою до такого типу регуляції є Са²⁺-помпа 1 [139]. Така взаємодія може бути корисною для локальної організації Са²⁺-сигнальних доменів у ПМ або в умовах патологічного перенасичення Ca²⁺, що вимагає підвищення експорту Ca²⁺ [72] та для заякорювання Ca²⁺-регуляторних комплексів у цитоскелет [44]. Са²⁺-помпа ПМ також активується димеризацією через взаємодію двох кальмодулін-зв'язуючих доменів [48], за таких умов приєднання кальмодуліну (якщо воно можливе) не спричиняє помпи. Також була подальшої активації відкрита димеризація/олігомеризація помпи за умов активації кальмодуліном та її високої концентрації (це може відбуватися в кавеолах), але у цьому випадку впливу на функціональну активність помпи показано не було.

На С-термінальному "хвості" кальцієвої помпи ПМ виявлена консенсусна послідовність для розрізання каспазою-3, яка знаходиться

вище кальмодулін-зв'язуючого домену. Після розрізання утворюється 120 кДа протеїн, який є конститутивно активним, оскільки аутоінгібіторний домен видалено [140]. Оскільки каспази активуються під час апоптозу, повна активація помпи може забезпечувати додаткову регуляцію [Ca²⁺]_і через те, що під час апоптозу концентрація іонів Са значно зростає.

На додачу до СОО⁻-термінального домену й інші регіони помпи взаємодіють з протеїновими партнерами. Основна внутрішньоклітинна петля, яка з'єднує трансмембранні домени 4 та 5, приєднує RASSF1 (супресор пухлин RAS-асоційований фактор 1) (рис. 1.9), що інгібує активацію помпи під впливом епідермального фактору росту, у сигнальному шляху RAS [72]. Також приєднання Ras-споріднених протеїнів призводить до інгібування активності Ca²⁺-помпи ПМ. Так, Rap1 GTPзв'язуючий протеїн регулює викид Ca²⁺ з клітин ГМ [48]. Також основна внутрішньоклітинна петля взаємодіє з α-синтропіном, що пригнічує активність Ca²⁺-помпи ПМ.

NH₂-термінальний цитозольний регіон Ca²⁺-помпи має низький рівень гомології між ізоформами, тому часто використовується для пошуку специфічних взаємодій. Наприклад, загальнопоширений малий кислий протеїн, що регулює передачу сигналів, внутрішньоклітинний метаболізм, транскрипцію і апоптоз – 14.3.3 (рис. 1.9) – пригнічує активність Ca²⁺-помпи ПМ. Характерно, що взаємодія є ізоформ-специфічною, так, Ca²⁺-помпи 4, - 3 та -1 взаємодіють з протеїном 14-3-3є та лише Ca²⁺-помпа 3 взаємодіє з 14-3-3ζ [20].

Нарешті Ca²⁺-помпа ПМ інгібується глюкозою, що свідчить про те, що помпа бере участь у контролі гомеостазу Ca²⁺ у β-клітинах [72].

Гепарин, глікозамінглікан, який володіє антикоагуляторними властивостями, інгібує як гідроліз АТР, так і транспорт Ca²⁺-помпою, приєднуючись до вказаного транспортного протеїну в E₂ конформації, антагоністом у цьому процесі є K⁺. I_{0,5} гепарину практично не залежить від присутності кальмодуліну (I_{0,5} становить 0,2±0,04 та 0,47±0,26 мкг/мл за

відсутності та наявності кальмодуліну відповідно). Інші сульфорильовані глікозамінглікани також інгібують активність Ca²⁺-помпи ПМ: для фукозильованого хондроїтин сульфату властиве значення I_{0,5}, близьке до такого, притаманного гепарину - 0,2 мкг/мл), хондроїтин сульфат з нижчим вмістом сульфатів також інгібує активність Ca²⁺-помпи, але значення I_{0,5} підвищується у 1000 разів. Сульфонільовані полісахариди фізіологічно підвищують [Ca²⁺]_і у стані спокою, блокуючи активність Ca²⁺-помпи ПМ [126].

Показано, що стероїдні гормони також змінюють активність Ca^{2+} помпи ПМ. Так, 17 β естрадіол та дигідротестостерон, у концентраціях 10^{-10} М та 10^{-11} М відповідно у 1,5 рази стимулювали активність помпи у ниркових дистальних трубочках, подальше збільшення концентрації естрадіолу не збільшувало активність. Окрім того, 17 α естрадіол не мав помітного впливу на активність зазначеної помпи [141]. Описані ефекти швидше за все відбуваються опосередковано через ПК С, яку активує естрадіол, та яка фосфорилює та активує Ca²⁺-помпу ПМ.

АТРазна активність Ca²⁺-помпи ПМ залежить від концентрації протеїну в мембрані: її активність зростає в 1,5-5 разів при зменшенні концентрації протеїнів у мембрані від 50 до 1 мкг/мл. Існує гіпотеза, що зміна активності пов'язана із взаємодією з протеїнами цитоскелету, в першу чергу актину [142]. Інший білок цитоскелету, такий як ацетильований тубулін, також змінює активність Ca²⁺-помпи ПМ, але ефект залежить від концентрації та оточення: в оточенні кислих ліпідів тубулін має активуючий вплив завжди, а в оточенні нейтральних ліпідів при концентрації до 50 мкг/мл тубуліну помпа активується, при вищій – інгібується (при концентрації 300 мкг/мл АТРазна активність знижується на 80 %) [143].

Існує припущення, що у ГМ судин Ca²⁺-помпа ПМ може підлягати Sглутатіонілюванню, оскільки диамід підвищував величину [Ca²⁺]_i та стимулював синхронні осциляції Ca²⁺ (за умов інгібуванням фосфоліпази C та IP₃ рецептора) [144].

Очевидно, що кількісний вміст Ca²⁺-помпи у ПМ буде впливати на швидкість зменшення [Ca²⁺], після збудження клітини, а також на [Ca²⁺], у стані спокою. Тому регуляція на етапі транскрипції відіграє важливу роль у регуляції Са²⁺-сигналів, хоча вона і не є достатньо дослідженою. У Влімфоцитах β-клітинах панкреатичної залози та показано, ЩО транскрипційний фактор *с-тус* (можливо с-МҮС?) репресує експресію Ca²⁺помпи ПМ 4 та Ca²⁺-помпи ПМ 1,2 відповідно. Швидше за все подібний механізм регуляції характерний і для інших клітин. У клітинах епітелію нирок, остеобластах, клітинах дванадцятипалої кишки вітамін D₃ індукував експресію Ca²⁺-помпи ПМ 1, також індукція в клітинах дванадцятипалої кишки спостерігалася під впливом синтетичних протизапальних стероїдів [145]. Беручи до уваги, що зміна експресії Са²⁺-помпи ПМ відбувається при багатьох захворюваннях (діабет, пухлини, остеопороз) дослідження регуляції транскрипції гену цієї помпи потребує більшої уваги.

1.4. Mg²⁺,ATP-залежна кальцієва помпа та патології скоротливої функції

Дослідження, виконані на ізольованих клітинах та тканинах свідчать, що дисфункція Ca²⁺-помпи ПМ пов'язана з багатьма захворюваннями, включаючи діабет, остеопороз, гіперкальціурія, гіпертензія, рак, нейродегенеративні захворювання. Це дозволяє припустити, що Ca²⁺помпа ПМ відіграє центральну роль у формуванні патологій, хоча у більшості випадків змінена експресія/активність швидше є наслідком, а не хвороби [146, 147]. Більшість з того, відомо про причиною ШО патофізіологічні аспекти функціонування Ca²⁺-помпи ПМ, отримано з генетично модифікованих мишах. експериментів на Наприклад, нокаутовані за геном Ca²⁺-помпи ПМ 1 миші вмирають протягом раннього ембріонального розвитку, накаутовані за геном Ca²⁺-помпи ПМ 2 – мають глухоту; видалення Ca²⁺-помпи ПМ 4 призводить атаксію та ДО

знерухомлення сперматозоїдів подальшої стерильності, та змін функціонування тромбоцитів та їх агрегації [49], але основне те, що у нульмутантів спостерігаються зміни скоротливої активності та схильність до апоптозу у ГМ [69]. Відомо, що поліморфізм нуклеотидів у гені Ca²⁺-помпи ПМ 1 має чітку кореляцію з варіаціями кровоносного тиску, гіпертензії та ризиком серцево-судинних захворювань [146]. Суперекспресія Ca²⁺-помпи 4 посилює міогенну відповідь та підвищує чутливість до вазоконстрикторів, що супроводжується значним зростанням кровоносного тиску, хоча змін у [Ca²⁺], не спостерігалося [147]. Таким чином, зміна функціональної Ca²⁺-помпи ΠМ активності Э підставою формування судинних патофізіологічних процесів.

Гетерозиготні по гену Ca²⁺-помпи ПМ 1 миші, порівняно з диким типом, мали підвищену силу скоротливої відповіді ГМ сечового міхура (на 150-190 %) у відповідь на К⁺-залежну деполяризацію та збільшення концентрації [Ca²⁺]_і (130-180 %) під час стимуляції як карбахолом, так і у випадку калієвої деполяризації [54].

Хоча у серцевому м'язі Ca²⁺-помпа ПМ не має значного внеску у підтримання сталої концентрації Ca²⁺, оскільки основна роль у цьому процесі належить електрогенному Na⁺-Ca²⁺-обміннику ПМ та Ca²⁺-помпі СР, але саме у серцевому м'язі Ca²⁺-помпа ПМ має суттєве значення у регуляції сигнальних шляхів, пов'язаних зі зміною [Ca²⁺]_i. Так, порушення функціонування Ca²⁺-помпи ПМ 4 призводить до гіпертрофії серця, що опосередковано регуляцією кальциневрин/NFAT сигнального шляху. Також руйнування комплексу між Ca²⁺-помпою ПМ 4, nNOS, α 1-синтропіном та потенціал-керованими натрієвими каналами (Nav1.5) асоційовано з синдромом подовженого періоду QT, оскільки порушується негативна регуляція Ca²⁺-помпою ПМ активності nNOS [49, 57, 146].

1.5. Mg²⁺, АТР-залежна кальцієва помпа та фармакологія

Сигетин (сіль мезо-3,4-ді(n-сульфо-фенил)-гексану) – це лікарський препарат, який у свій час знайшов застосування в акушерській практиці для стимуляції пологової активності і підсилення скорочення міометрія. Показано, що механізм його дії пов'язаний, перш за все, з активацією електрокерованих Ca²⁺-каналів, по яким Ca²⁺ входить всередину міоциту. Але, поряд з тим, сигетин (5 мМ) інгібує Mg²⁺, АТР-залежний викид Ca²⁺ з клітин, причому ступінь інгібування активного транспорту Ca²⁺ вищий, ніж у випадку окситоцина [136]. Під впливом зазначеної сполуки відбувається зменшення V₀ Ca²⁺,Mq²⁺-ATРази з 2,5±0,6 до 0,8±0,2 нмоль Ca²⁺ на 1 мг протеїну за 1 хв (n=4) та зменшення ензиматичної активності на 80 % та 30 % у випадку солюбілізованої та реконструйованої в ліпосоми Ca²⁺,Mg²⁺-АТРази відповідно [148]. Са²⁺-помпа ПМ пригнічується інгаляційними анестетиками типу галотану, закисом азоту і ксеноном [90]. Один еквівалент мінімальної ефективної дози галотану інгібує активність Ca²⁺помпи ПМ синаптосом криси на 30 %, а ксенону і закису азоту – на 20 %. Важливо, що не спостерігалось аналогічного ефекту на Ca²⁺-помпу CP і Na⁺,К⁺-АТРазу. Місцеві анестетики (дибукаїн та лідокаїн) також інгібують активність Ca²⁺-помпи ПМ синаптичнмх мембран за неконкурентним механізмом щодо субстрату [90].

Нейролептики фенотіазинового ряду інгібують активацію Ca²⁺-помпи ПМ не тільки кальмодуліном, але і кислими фосфоліпідами, і обмеженим протеолізом [90]. Тому був зроблений висновок, що фенотіазіни неспецифічно зв`язуються і з ліпідами, і безпосередньо з Ca²⁺-помпою ПМ.

Як вже було відзначено, при оцінці ролі Ca²⁺-помпи ПМ в підтриманні Ca²⁺-гомеостазу в міоцитах та функціонуванні ГМ проблематичним є низький рівень експресії генів зазначеної помпи та відсутність специфічних інгібіторів [2, 149].

На підставі всьго вищенаведеного ми повинні разглядати ГМК як складну рецепторну тензоелектрохімічну систему, для якої притаманні внутрішньоклітинного Ca²⁺ гомеостазу) такі (щодо властивості, ЯК неадитивність, нелінійність, синергістичність, кооперативність, наявність та «негативних» зворотніх зв'язків, мережі «ПОЗИТИВНИХ» феномен градієнту спорідненості до іонів Са (на рівні різних енергозалежних Са²⁺транспортних систем). Отже, зважаючи на те, що Ca²⁺ є важливим внутрішньоклітинним неорганічним месенджером, який бере участь у фармакомеханічному спряженні у ГМК, біохімічні системи та механізми, які підтримують або регулюють його концентрацію у цитоплазмі, заслуговують на особливу увагу. Одним з таких механізмів є активний транспорт іонів Са із клітини, що забезпечується Ca²⁺,Mg²⁺-АТРазою ПМ, яка є суттєво важливою для підтримання гомеостазу Ca²⁺ у ГМК. Mg²⁺, АТР-залежна Ca²⁺помпа ПМ, як і інші помпи Р-типу, складається з 10 трансмембранних доменів та трьох цитоплазматичних петель. Основна відмінність Ca²⁺помпи ПМ від такої у випадку СР полягає у наявності СООН-хвоста, що містить послідовності приєднання до кальмодуліну, характеризується відповідю на кислі фосфоліпіди, має сайти фосфорилювання та PDZдомен. Процес перенесення Ca²⁺ крізь мембрану ПМ подібний до такого у Са²⁺-помпи СР: це 4-х етапна схема, в якій відбувається зміна спорідненості помпи до Ca²⁺ внаслідок зміни конформації та гідролізу АТР. У геномі ген Ca²⁺-помпи ПМ представлений 4 ізоформами, які до того ж підлягають подальшому альтернативному сплайсингу. Важливим є факт, що сплайсізоформи характеризуються різною спорідненістю до Ca²⁺ та до модуляторів активності помпи (наприклад, кальмодулін, фосфорилювання) та їх патерн розташування є унікальним для багатьох типів тканин та клітин. Таким чином сплайсізоформи можуть виконувати різні функції: підтримання базальної концентрації Ca²⁺ у цитоплазмі, - релаксація м'язевої напруги, - зміна сили м'язевого скорочення завдяки закисленню внутрішньоклітинного середовища, регуляція проліферативної активності,

апоптозу, і вони є одним з компонентів сигнальних систем, оскільки регулюють активність таких протеїнів, як nNOS, кальциневрин, особливо у кавеолах, у яких вміст помпи є підвищенним. Са²⁺-помпи ПМ регулюються природними чинниками: фізико-хімічними факторами багатьма (мембранний потенціал, pH, вільні радикали тощо); внутрішньоклітинними метаболітами (кальмодулін, кислі фосфоліпіди, жирні кислоти, протеїнкінази різних типів). Регуляція помпи відбувається також за домогою гормонів (простагландини, окситоцин, брадикініни, вазопресин, глюкагон, стероїдні гормони). Показано, що деякі захворювання серцевосудинної системи пов'язані з генетичними дефектами Ca²⁺-помпи ПМ. Але не зважаючи на широкопланову інформацію щодо властивостей Mg²⁺, ATPзалежної Са²⁺-помпи ПМ, ми повинні підкреслити, що абсолютно специфічного афінного низькомолекулярного інгібітора Ca²⁺,Mg²⁺-ATРази ПМ на теперішній час не існує. Втім, очевидно, що використання такого інгібітора дозволило б у повній мірі охарактеризувати роль помпи ПМ у ГМК у підтриманні внутрішньоклітинної концентрації Ca²⁺ або участі помпи у формуванні сигнальних каскадів та взаємодії з сигнальними протеїнами, а також оцінити її причетність до виникнення патологічних станів. Одначе що подальше вдосконалення структурної організації МИ вважаємо. циклічного олігомеру фенолів - калікс[4]арену С-90 є перспективним для створення низькомолекулярних селективних інгібіторів Mg²⁺, ATP-залежної Са²⁺-помпи ПМ, що є важливим з точки зору розробки фармакологічних препаратів, які використовуються.

ГЛАВА 2. ТРАНСМЕМБРАННИЙ ОБМІН ЮНІВ Са В МІТОХОНДРІЯХ

Мітохондрії (МХ) – це мобільні внутрішньоклітинні високоенергетичні інтегратори метаболічних та іонних сигналів, які здатні акумулювати Ca²⁺ у значних кількостях. Надходження Ca²⁺ в середину МХ в основному забезпечується чутливим до рутенієвого червоного електрофоретичним уніпортером, активність якого залежить від електрохімічного протонного градієнта на внутрішній мітохондріальній мембрані [1]. До систем, що забезпечують накопичення Ca²⁺ у матриксі МХ, відносять також систему швидкого захоплення катіона (RaM) та ріанодин-чутливі Ca²⁺ канали (RyR) [2-4]. Вихід Ca²⁺ з МХ до цитоплазми забезпечується, головним чином, Na⁺-залежними та Na⁺-незалежними Ca²⁺ двома типами механізмів: обмінниками [2, 3, 5, 6]. Вихід Са²⁺ з МХ також спостерігається за умов активації пори транзієнтної проникності (РТР) [2]. Зміна концентрації іонів Са у матриксі МХ впливає на швидкість синтезу АТР, кальцієву сигналізацію у цитоплазмі клітини та є одним із чинників апоптозу [7-9]. Отже перейдемо до розгляду систем транспорту іонів Са у МХ.

2.1. Системи, що забезпечують надходження Ca²⁺ до мітохондрій

2.1.1. Вхід Ca²⁺ крізь зовнішню мембрану мітохондрій

Перш ніж потрапити до матриксу, іони Са мають пройти крізь зовнішню мембрану МХ. Традиційно вважалось, що іони Са вільно проходять крізь зовнішню мембрану МХ [10]. Проте з часом було доведено, що потенціал-залежний аніонний канал (VDAC), вбудований у ліпідні бішари, проводить Ca²⁺ та моновалентні іони до міжмембранного простору [11]. VDAC може функціонувати як Ca²⁺-активований Ca²⁺ канал [12]. Втім, сама назва каналу, потенціал-залежний аніонний канал, викликає низку питань.

зовнішній мембрані. По-перше, ЦЯ структура знаходиться y Вважається, що потенціал утворюється тільки на внутрішній мембрані. То чим зумовлена залежність від потенціалу? Проте було показано, що за низьких значень потенціалу (10 mV), канал знаходиться у стабільно відкритому стані. При значеннях потенціалу, як (-) так і (+), більших за 40 mV, канал має різну провідність та селективність [13]. Феномен потенціалзалежності каналу реєструється і сьогодні тільки у експериментах іn vitro. Не відомо, чи існує потенціал на зовнішній мітохондріальній мембрані. Тим не менше розрахунки показують, що потенціал внутрішньої мембрани може впливати й на властивості зовнішньої мембрани в залежності від відстані між ними чи в місцях контактів [13].

По-друге, назва каналу підкреслює його селективність до аніонів, хоч сьогодні доведено, що канал проводить і катіони. Ця назва склалась історично. Аніонна селективність каналу, що відображена у його назві, базується на роботах 70х років минулого століття, в яких було розраховано відношення селективності каналу: більш ніж 7 СІ⁻ на 1 К⁺ [13].

Стосовно іонів Са панувала думка, що вони вільно проходять крізь VDAC у міжмембранний простір [14, 15]. Проте більш пізні дані дають підстави висунути припущення, що VDAC може слугувати бар'єром для вільної дифузії катіона і може тонко контролювати надходження Ca²⁺ до MX. Так нещодавно було показано, що у закритому стані VDAC має високу провідність для іонів Ca [3, 14].

Структури, що забезпечують обмін Ca²⁺ у MX, розташовані, головним чином, у внутрішній мембрані [2-4, 16]. Для зручності проведемо умовний поділ всіх систем за напрямком переміщення катіона: 1) системи, що забезпечують накопичення іонів кальцію у матриксі MX та 2) системи, що забезпечують його вихід до цитоплазми.

2.1.2. Вхід Са²⁺ крізь внутрішню мембрану мітохондрій

До основних систем, що забезпечують накопичення Ca²⁺ у матриксі МХ, відносять Ca²⁺-уніпортер, систему швидкого захоплення катіона (RaM) та ріанодин-чутливі Ca²⁺ канали (RyR) [2-4]. Крім того є припущення, що мітохондріальна пора перехідної провідності (PTP) може також функціонувати як система, що забезпечує надходження катіона до МХ за дисипації потенціалу на внутрішній мембрані [17]. За умов деполяризації внутрішніх мембран накопичення іонів Ca у матриксі МХ може відбуватись також за участі Na⁺-Ca²⁺ антипортера [8, 18, 19]. Отже, розглянемо системи транспорту іонів Ca до матриксу МХ.

2.1.2.1. Ca²⁺ уніпортер.

Надходження Ca²⁺ в середину МХ в основному забезпечується чутливим до рутенієвого червоного електрофоретичним уніпортером, рушійною силою якого є електрохімічний протонний градієнт на внутрішній мембрані (знак «-» на внутрішній поверхні) [6, 8, 10]. Цей електрохімічний градієнт створюється протонною помпою, котра спряжена або через електрон-транспортуючу систему 3 субстратним або окисленням. медіюється F₀F₁-ATPазою, яка використовує енергію гідролізу ATP. Якщо поглинання Ca²⁺ пов'язане з процесом субстратного окислення, воно ефективно блокується різноманітними інгібіторами метаболізму, але не олігоміцином - інгібітором АТРази. Коли ж для транспортного процесу потрібна енергія гідролізу АТР, в такому разі транспорт катіона блокується олігоміцином [20]. Gunter та Pfeiffer (чи українською?) [21] у своєму огляді наводять кінетичні параметри транспорту Ca²⁺ у МХ. Автори констатують велику розбіжність у значеннях такого параметру, як V_{max} транспортного процесу. Зумовлене це, перш за все, тим, що висока швидкість акумуляції катіона у МХ призводить до зниження мембранного потенціалу, котрий і є рушійною силою для поглинання Ca²⁺. Різними авторами показано, що ці

структури акумулюють 0,1-1 мкмоль Ca²⁺ на 1 мг білка, значення максимальної швидкості накопичення V_{max} дорівнює 30-600 нмоль Ca²⁺ на 1 мг білка за 1 хв. Транспортна система характеризується низькою спорідненістю до Ca²⁺; К_{са} дорівнює 1-25 мкМ. Значення К_т по АТР дорівнює 0,5 мМ [22]. Для активності уніпортеру властива біфазна Ca²⁺: залежність концентрації цитоплазматичного збільшення від Са²⁺ у цитоплазмі може концентрації активувати або інгібувати накопичення катіона у МХ в залежності від тривалості існування підвищених концентрацій [14].

Ми показали, що ГМК матки, оброблені розчином дигітоніну, накопичували 1900±450 пмоль Ca²⁺ на 10⁶ міоцитів за 5 хв при 37 С із середовища інкубації, що містило 50 мМ тріс-HCl, pH 7,4, 125 мМ KCl, 25 мМ NaCl, 3 мМ ATP, 3 мМ сукцинат натрію, 3 мМ MgCl₂, 2 мМ фосфат калію, 10 мкМ CaCl₂ (контроль). У відсутності у середовищі інкубації сукцинату натрію накопичення Ca²⁺ зменшувалось на 30-40 %, а за умов відсутності як сукцинату натрію, так і АТР – на 89-93 % відносно контролю. При тих же умовах фракція МХ, що була виділена із міоцитів матки, із середовища інкубації вищенаведеного складу акумулювала 149±18 нмоль Ca²⁺ на 1 мг білка за 5 хв (контроль), у цьому разі у відсутності у середовищі інкубації сукцинату натрію накопичення Ca²⁺ зменшувалось на 9-23 %, а за умов відсутності у ньому як субстрату окислення, так і АТР – на 97-98 % відносно контролю. Інгібітори енергозалежного транспорту Ca²⁺ у МХ – азид натрію (5 мМ) та рутенієвий червоний (10 мкМ) – пригнічували накопичення Ca²⁺ у пермеабілізованих ГМК на 64-72 та 80-88 % відносно контролю. Аналогічно, азид натрію та рутенієвий червоний, що були використані у тих же концентраціях, пригнічували акумуляцію Ca²⁺ у фракції МХ, виділених із ГМК матки, на 52-68 та 96-98 % відносно контролю. Інгібуючий вплив рутенієвого червоного на енергозалежну акумуляцію Ca²⁺ у ГМК, що оброблені розчином дигітоніну, був значно ефективнішим, ніж азиду натрію: значення константи інгібування Іол

становило 0,7±0,3 мкМ та 1,1±0,4 мМ відповідно (n=3). Кальцієвий іонофор А23187 (1 мкМ), який вносили до середовища інкубації після зупинки процесу енергозалежного включення Ca²⁺ в міоцити рутенієвим червоним (10 мкМ), викликав звільнення акумульованого катіона до зовнішнього розчину [23]. Наведені результати вказують на наявність у клітинах міометрія системи енергозалежної акумуляції Са²⁺, що локалізована у МХ. В основі цієї акумуляції лежить накопичення Ca²⁺ саме усередині МХ, а не адсорбція іонів на їх поверхні. Дійсно, порушення бар'єрної (відносно Ca²⁺) функції мембрани цих внутрішньоклітинних структур у присутності іонофору A23187 стимулювало викид попередньо накопиченого Ca²⁺ до середовища інкубації. Останнє також вказує на те, що Ca²⁺, котрий накопичився у мітохондріях ГМ матки протягом енергозалежного процесу, не є міцно зв'язаний, отже він акумулюється у цих субклітинних структурах зворотно. Зауважимо, що одержані дані підтверджують раніше висловлену у літературі точку зору про домінуючу, у порівнянні з субстратами дихання, роль АТР у забезпеченні акумуляції Са²⁺ у МХ міометрія [24, 25].

Слід окремо підкреслити, що, у відповідності з даними літератури, катіон-транспортуюча система МХ має нижчу спорідненість до Ca²⁺ ніж кальцієві помпи сарко(ендо)плазматичного ретикулума [26].

Деякі іони є конкурентними інгібіторами акумуляції Ca²⁺ у MX; до них належать Sr²⁺, Mn²⁺, Ba²⁺, Fe²⁺, а також лантаніди (чи лантаноїди?) [2, 20]. Рутенієвий червоний, гексавалентний полікатіонний барвник, неконкурентно інгібує Ca²⁺-уніпортер, значення $I_{0,5}$ становить 30 нМ. Для блокування акумуляції Ca²⁺ у MX дослідники використовують рутенієвий червоний у концентрації 1-10 мкМ. Але, на фоні досить високої афінності рутенієвого червоного до досліджуваної транспортної системи, ця сполука має, нажаль, недолік – низьку селективність. Показано, що рутенієвий червоний також інгібує канали Ca²⁺-залежного викиду Ca²⁺, котрі розташовані у мембрані CP, Na⁺-залежний викид Ca²⁺ з MX і зв'язується з поліфосфоінозитидами [8, 12, 27, 28]. Мітохондріальний уніпортер також

інгібується Mg²⁺ у мілімолярних концентраціях, а також сперміном і спермідіном у високих концентраціях [29]. Mg²⁺ та поліаміни можуть спричиняти це інгібування за рахунок зв'язування біля транспортуючої ділянки, або за рахунок екранування заряду.

Іонам Mg належить суттєва роль у забезпеченні скорочення ГМ, зокрема міометрія [30]. У наших експериментах, на моделі пермеабілізованих міоцитів матки за умов підвищення концентрації іонів Mg до 5 мM, активність Ca²⁺-транспортувальних систем MX ефективно стимулювалася (значення уявної константи активації К_{мg} за Mg²⁺ становить 2,8 мM) [31, 32].

Поліаміни - це природні полікатіони, які задіяні, перш за все, у регуляції процесів росту та диференціації клітин [33, 34]. Це найбільш досліджена, але не єдина роль поліамінів у клітині. Зокрема, показано, що поліаміни сприяють релаксації ГМ, в тому числі і матки [35]. Механізм релаксуючого впливу поліамінів залишається не визначеним. В наших експериментах за дії сперміну на накопичення іонів Са у МХ було виявлено складну концентраційну залежність, яка описується куполоподібною кривою, що має максимум при концентрації поліаміну 1 мМ, і характеризується фазами активації (концентрація поліаміну – до 1 мМ) та інгібування (концентрація поліаміну > 1 мМ) [31, 32].

Для досягнення повного блокування транспорту Ca²⁺ до матриксу МХ в експерименті використовуються такі фармакологічні сполуки, які безпосередньо не впливають на Ca²⁺-уніпортер, а впливають на процеси, пов'язані з генерацією протонного градієнта і, як результат, за цих умов відбувається інгібування акумуляції Ca²⁺ у МХ. До таких сполук належать азид натрію (10 мМ), олігоміцин (10 мкМ), антиміцин (10 мкМ) та протонофор FCCP (10 мкМ) [20]. Деполяризація мітохондріальної мембрани протонофорами FCCP або СССР веде до інгібування активності Ca²⁺ уніпортеру [2]. Взагалі усі фактори, які впливають на рівень поляризації внутрішньої мітохондріальної мембрани, будуть впливати на

обмін Ca²⁺ у MX, оскільки основні системи, що забезпечують транспорт цього катіона до матриксу MX, є потенціалзалежними [36].

2.1.2.2. Система швидкого захоплення Ca²⁺ (RaM)

На ізольованих МХ серця описана система швидкого поглинання Са²⁺, яка функціонує транзієнтно протягом початкової фази збільшення позамітохондріальної концентрації цього катіона [2, 10, 37. 38]. Надходження іонів Са через систему швидкого захоплення RaM відбувається що найменше у 300 разів швидше, ніж у випадку Ca²⁺уніпортеру [14, 37]. Інактивується ця система за рахунок надлишкового Система швидкого захоплення Са²⁺ блокується зв'язування Ca²⁺. роз'єднувачами окисного фосфорилювання, рутенієвим червоним, активується сперміном, що використаний у фізіологічних концентраціях, та АТР у мілімолярних концентраціях [10]. Проте маємо зазначити, що молекулярна природа цієї системи не визначена, навіть є погляди, що сам існування такої системи є досить ілюзорним [14]. Сьогодні факт фізіологічна функція RaM не відома, більш того, не можна з впевненістю стверджувати, чи ця система є альтернативною конформацією уніпортеру, чи, дійсно, являє собою інший транспортний механізм [10].

2.1.2.3. Ріанодин-чутливі Са²⁺ канали (RyR)

Показано, що ріанодин-чутливі Ca²⁺ канали розташовані у внутрішній мембрані МХ серця щурів. Було зроблено припущення, що ці структури є одним з шляхів надходження Ca²⁺ до матриксу [39-41]. Мітохондріальні RyR мають біохімічні, фармакологічні та функціональні властивості, подібні до таких RyR I типу CP скелетних м'язів [39-41]. Для мітохондріальних RyR властива куполоподібна залежність від концентрації іонів Ca, максимальна активність спостерігається за концентрації цього катіона 10 мкМ, повне блокування транспортної системи має місце при концентрації Ca²⁺ 0,1-1 мМ [39]. Зв'язування Ca²⁺ з цими каналами інгібується іонами Mg та рутенієвим червоним, але не регулюється кофеїном [40]. Маємо зауважити, що RyR були знайдені тільки у МХ серця, стосовно інших тканин це питання залишається відкритим [4]. Саме ця обставина дає можливість для припущення, що реєстрація ріанодин-чутливих Ca²⁺ каналів у МХ може бути наслідком часткового забруднення препаратів МХ фрагментами мембран СР [7]. Одержані на теперішній час дані не дозволяють повністю виключити таку можливість. Також остаточно не наступне питання: ЧИ RaM та мітохондріальні RyR є вирішене самостійними системами транспорту Ca²⁺ до МХ, чи ці системи є проявом різних конформаційних станів уніпортеру [2].

2.1.2.4. Na⁺-Ca²⁺ та H⁺-Ca²⁺ антипортери

Мітохондріальні Na⁺-Ca²⁺ та H⁺-Ca²⁺ антипортери забезпечують вивільнення іонів Са з цих органел. Проте, подібно до сарколемального, мітохондріальний Na⁺-Ca²⁺ антипортер може функціонувати у зворотному напрямку, тобто забезпечувати накопичення іонів Са у матриксі МХ за умов деполяризації внутрішньої мембрани [8, 18, 19]. Цей транспортний процес інгібувався у відсутності Na у середовищі інкубації [18]. На інтактних кардіоміоцитах щурів та МССК клітинах, які вирощували в умовах гіпоксії, що приводило до повної або часткової деполяризації мітохондріальних мембран, було показано значно нижче накопичення Ca²⁺ у клітинах зі вмістом Na⁺ [19]. Автори вважають, що це зумовлене зниженим функціонуванням Na⁺-Ca²⁺ антипортера у зворотному напрямку. Одержані результати практичне значення, оскільки, мають ЯК відомо, перенавантаження МХ онами Са є ключовим ушкоджуючим клітини фактором за умов гіпоксії [4].

У наших експериментах показано, що інкубація МХ міометрія з 1 мкМ протонофором СССР, 10 мМ NaN₃ або 100 мкМ Са²⁺ (середовище інкубації містило ATP та Mg), призводить до швидкої деполяризації не мітохондріальної мембрани (рівень поляризації мембрани визначали за допомогою потенціал чутливого флуоресцентного зонда TMRM). Проте за іонів Ca інкубаційного таких умов внесення ДО середовища супроводжується збільшенням інтенсивності флуоресценції Ca²⁺-чутливого зонда fluo-3AM, навантаженого у ізольовані МХ міометрія. При цьому рівень іонізованого Са у матриксі залежить від концентрації катіона у середовищі інкубації. Деполяризація мітохондріальних мембран, як відомо, веде до гальмування функціонування Ca²⁺ уніпортеру [2]. Ми припускаємо, що у деполяризованих мітохондріях міометрія Ca²⁺-H⁺ обмінник може виконувати роль системи, що забезпечує надходження онів Са до матриксу за наявності Ca²⁺ градієнта, спрямованого у середину органел [42].

2.2. Системи, що забезпечують вивільнення Ca²⁺ із мітохондрій

Концентрація вільного Са у МХ залежить від концентрації фосфату та аденінових нуклеотидів: контроль концентрації вільного Са в матриксі відбувається, зокрема, через утворення оборотних Са²⁺-фосфатних комплексів [10]. Баланс поміж вмістом вільного та зв'язаного кальцію залежить також від значення рН матриксу: закислення матриксу, індуковане дією протонофорів, перешкоджає утворенню Са²⁺-фосфатних комплексів, що значно зменшує Са²⁺ буферну ємність МХ і збільшує вихід зазначеного катіона з цих органел [43]. Протягом тривалого часу панувала думка, що вихід Са²⁺ з МХ до цитоплазми забезпечується двома типами механізмів: Na⁺-залежним та Na⁺-незалежним Ca²⁺ обмінниками [2, 3, 5, 6]. Проте наразі також доведена можливість вивільнення Са²⁺ з МХ за участі Са²⁺-уніпортеру (у деполяризованих МХ) та за участі РТР.

2.2.1<mark>.</mark> Na⁺-Ca²⁺ антипортер

Na⁺-Ca²⁺ антипортер властивий для МХ збудливих тканин (серце, скелетні м'язи, мозок). Na⁺-залежний механізм виведення Ca²⁺ з MX серцевого м'яза забезпечується наявністю Na⁺ градієнта на внутрішній мембрані органел [2, 3, 44]. Доведено також існування системи Na⁺-H⁺ обміну на внутрішній мембрані мітохондрій, яка забезпечує виведення іонів Na з мітохондрій до цитоплазми. Саме через систему Na⁺-H⁺ обміну виведення іонів Са з мітохондрій спряжене з рухом протонів під час дихання [2]. Проте дослідникам не вдалось зареєструвати більш-менш суттєвих змін у цитоплазматичній концентрації Na⁺ протягом нормального перебігу циклу скорочення серцевого м'яза [45]. Припускається, що Na⁺-Ca²⁺ обмінник буде виносити іони Са з матриксу до того часу, поки іони Na, що потрапили до матриксу, матимуть можливість, у свою чергу, повертатись до цитозолю через Na⁺-H⁺ обмін [36]. Залишається також не вирішеним питання про наявність або відсутність електрогенності Na⁺-Ca²⁺ антипортеру [2]. В науковій літературі висловлювалась думка, що цей механізм функціонує в електронейтральному режимі. Проте більш пізні роботи показали, що Na⁺-Ca²⁺ антипортер переносить 1Ca²⁺ в обмін на 3Na⁺, тобто є електрогенним [3].

2.2.2. H⁺-Ca²⁺ антипортер

H⁺-Ca²⁺ антипортер МХ властивий, переважно, для клітин електронезбудливих тканин: печінки, нирок та інших вісцеральних органів [10, 14, 46]. Проте він також присутній у МХ клітин міометрія [22, 24]. H⁺-Ca²⁺ антипортер функціонує в електронейтральному режимі – вихід 1Ca²⁺ супроводжується входом 2H⁺ [3].

2.2.3. Оборотність Са²⁺-уніпортеру

Вивільнення Ca²⁺ з МХ є досить складним процесом, котрий може забезпечуватись й іншими механізмами, зокрема, оборотністю Ca²⁺-уніпортеру [36, 47]. За умов in vitro оборотність уніпортеру може бути викликана або сполуками, ЩО здатні призводити до порушень окисного фосфорилювання, або інгібіторами передачі електронів. Ці сполуки, за рахунок колапсу мембранного потенціалу МХ, спричинюють пасивну дифузію Ca²⁺ за його електрохімічним градієнтом з матриксу до цитозолю. Можливість того, що цей процес відбувається у МХ за фізіологічних умов, здається малоймовірною, хоча щось подібне може мати місце in vivo під час отруєння мітохондріальними отрутами або за ішемії.

2.2.4. Мітохондріальна пора транзієнтної проникності (РТР)

проникності внутрішньої Драматичні зміни y мітохондріальної мембрани, спричинені різноманітними які речовинами та експериментальними умовами, вперше були описані ще у 1970х роках. Значно пізніше було доведено, що це явище зумовлене активацією неспецифічного іонного каналу, провідність якого становить > 1 nS [48]. За умов активації цього каналу спостерігається колапс мітохондріального потенціалу і вихід Ca²⁺. Показано, що відкривання мітохондріальної пори транзієнтної проникності (РТР) веде до виходу з МХ речовин з молекулярною масою до 1,5 kDa [2]. РТР являє собою канал з високою провідністю, якому властива значна кількість субпровідних станів. Концентрація Ca²⁺ у матриксі, значення pH, аденінові нуклеотиди, вільні радикали а також величина мембранного потенціалу можуть впливати на стан пори [14].

Молекулярна природа РТР ще не з'ясована [14]. Проте вважається, що цей канал є багатопротеїновим комплексом, до складу якого входять аденіннуклеотид трансфераза (ANT), потенціал-залежний аніонний канал зовнішньої мембрани (VDAC), F₀F₁ ATP-синтетаза та циклофілін D [49]. Деякі автори вважають, що і мітохондріальний транспортер фосфату також формуванні пори [50]. PTP задіяний V активується високими матриксі, окислювальним концентраціями іонів Са y стресом та деполяризацією, інгібується – циклоспорином А [2]. Показано, що фактори, які впливають на формування преципітатів Ca²⁺ та фосфату у матриксі, регулюють рівень Ca²⁺-порогу для активації РТР [51]. Було зроблено припущення, що активація РТР веде до колапсу мембранного потенціалу та виходу іонів Са через пору та/або через Са²⁺-уніпортер, що функціонує у зворотному напрямку [7, 36]. Проте питання щодо функціонування РТР як каналу, що забезпечує вивільнення Ca²⁺ з MX за фізіологічних умов, залишається дискусійним.

2.3. Мітохондрії та Ca²⁺-гомеостаз

Мітохондріальний метаболізм і внутрішньоклітинна Ca²⁺-сигналізація тісно між собою пов'язані. Можна виділити що найменше два аспекти:

1) Вплив Ca²⁺ на продукування енергії.

2) Вплив мітохондріального Ca²⁺ на Ca²⁺-сигналізацію в клітині.

2.3.1. Ефекти Ca²⁺ на продукування енергії

МХ типової тваринної клітини продукують приблизно 92 <mark>%</mark> від загальної кількості АТР [38]. Концентрація Са²⁺ у матриксі МХ є важливим ЩО контролює синтез ATP. Три параметром системи, ключових мітохондріальні ензими піруват-, α-кетоглютаратта ізоцитратдегідрогенази, у різний спосіб активуються іонами Са: перший – за рахунок Ca²⁺-залежного дефосфорилювання, інші – за рахунок безпосереднього зв'язування катіона з регуляторною субодиницею [3, 14,

52]. Активність Ca²⁺-чутливих дегідрогеназ та інших метаболічних процесів, котрі відбуваються у матриксі МХ, спряжені з утворенням АТР, яка необхідна для забезпечення енергетичних потреб клітини [6, 53]. За фізіологічних умов підвищення концентрації Ca²⁺ у цитоплазмі призводить до збільшення поглинання цього катіона МХ, що, у свою чергу, веде до багаторазового збільшення активності цих ензимів. Отже, передача цитоплазматичного кальцієвого сигналу до МХ дозволяє модулювати мітохондріальний метаболізм у відповідності з енергетичними потребами клітини [6, 54]. Припускається, що іони Са можуть активувати синтез АТР за рахунок безпосереднього зв'язування з F₀F₁ ATP-синтетазою [10, 55]. зумовлені При деяких патологічних станах, ЩО порушеннями рівні, Ca²⁺-акумулююча метаболізму на генетичному енергетичного спроможність МХ значно менша, якщо порівнювати з нормою. Ці стани також характеризуються збільшеною концентрацією цитоплазматичного Са²⁺ [Са²⁺], та зменшеним мембранним потенціалом МХ.

За фізіологічних умов F₀F₁ ATP-синтетаза функціонує як система, яка забезпечує синтез ATP. Проте за патологічних станів, наприклад, ішемії, цей ензим може функціонувати як H⁺-ATPаза, виводячи надлишок протонів з матриксу з метою збереження поляризації внутрішньої мембрани MX [1].

Показано, що іони Са можуть безпосередньо активувати транспорт метаболітів до матриксу МХ. Деякі транспортери метаболітів, які розташовані у внутрішній мембрані МХ, містять у своїй структурі Ca²⁺зв'язуючі ділянки, так звані, EF-«руки», які мають високий ступінь гомологічності з відповідними ділянками кальмодуліну [55]. Мова йде про аспартат-глютамат та ATP-Mg/P_i переносники. Наслідком активації цих структур є збільшення поляризації мітохондріальної мембрани, що, у свою чергу, сприятиме збільшенню надходження іонів Са до матриксу [55].

2.3.2. Ефекти мітохондріального Ca²⁺ на Ca²⁺ сигналізацію у клітині

Протягом досить тривалого часу (1960-1980 pp.) у науковій літературі ЩО МХ – то є важливий, якщо панувала думка. не головний, внутрішньоклітинний пул Ca²⁺, котрий забезпечує низьку концентрацію цього катіона у цитоплазмі [16]. Проте з часом дослідники почали стверджувати, що МХ не відіграють суттєвої ролі у підтримці кальцієвого гомеостазу в клітині. Так, на скінованих ГМК було показано, що за "фізіологічних" концентрацій вільного Ca^{2+} у клітині $[Ca^{2+}]_i$ (10⁻⁷-10⁻⁵ М) МХ поглинають не більше 15 % від загальної кількості ⁴⁵Са²⁺, що був внесений у середовище інкубації [56]. Отже, низька афінність Ca²⁺-уніпортеру МХ (К_{са} > 1 мкМ) є основним аргументом у запереченні можливості ефективної субклітинними акумуляції іонів Ca зазначеними структурами за фізіологічних умов [4, 7, 10]. Вважалося, що МХ задіяні у контролі Ca²⁺ гомеостазу у клітинах тільки за умов патологічних станів, коли цитоплазма цим катіоном [57]. Як наслідок багатьох подібних перевантажена результатів, інтерес дослідників до вивчення МХ, як кальцієвого депо, різко зменшився і протягом майже десятиріччя був сконцентрований виключно дослідженні Ca²⁺-залежності ензиматичної активності декількох на [58]. дегідрогеназ Проте поступово В літературі продовжували публікуватися окремі повідомлення, які вказували на те, що зміни концентрації Ca²⁺ у МХ мають суттєве фізіологічне значення і можуть виникати протягом або внаслідок фізіологічних змін концентрації Ca²⁺ v цитоплазмі клітини [Ca²⁺]; [4, 16]. Дослідження цього питання розпочалося у 1992р., коли Rizzuto з колегами [59, 60] довели ймовірність існування так званих "Ca²⁺ мікропулів". Вони показали, що відкривання IP₃-залежних Са²⁺ каналів СР веде до різкого збільшення концентрації катіона безпосередньо біля каналу. МХ розташовані поблизу цих каналів, отже концентрація кальцію [Ca²⁺], біля МХ може бути значно більшою, ніж у цитоплазмі, що і забезпечує активацію низькоафінного Ca²⁺-уніпортеру. У

подальшому цей факт було підтверджено на багатьох типах клітин [7, 12, 14, 16]. Зокрема, в секреторних клітинах слинних залоз личинки дзвінця підтверджено існування так званої ендоплазматично-мітохондріальної Ca²⁺-функціональної одиниці [61]. Доведено, що одним з механізмів, за рахунок якого встановлюється комунікація поміж ЕР та МХ, полягає у тісному контакті між цими органелами, який утворюється за рахунок асоційованої з МХ ретикулярної мембрани (mitochondria-associated membranes, MAM) [62]. Формування цих контактних ділянок необхідне для протікання ключових клітинних подій, зокрема, транспорту іонів Ca з ЕР до МХ [62, 63]. Отже, МХ є важливими учасниками внутрішньоклітинної кальцієвої сигналізації.

Активність МХ як Ca²⁺-буфера зазнає значних змін протягом різних етапів життя клітини. Кількість, розмір і розподіл МХ, а також їх чутливість до іонів Ca, контролюються різноманітними сигнальними системами. МХ знаходяться поблизу місць вивільнення Ca з CP, отже вони захоплюють значну частину катіона, який потрапляє у цитоплазму за умов відкривання відповідних каналів, що розташовані на поверхні CP, а також ПМ [64]. Крім того, знаходячись поруч з кальцієвими каналами, MX подовжують існування відкритого стану каналів за рахунок зменшення концентрації іонів Ca в цитоплазмі внаслідок зв'язування Ca, який інактивує ці канали [52]. Висловлювалась також думка, що зв'язок між CP та MX відіграє ключову роль у різноманітних механізмах, що забезпечують виживання або загибель клітини [15].

Таким чином, МХ, виконуючи роль Ca²⁺-буфера, впливають на розповсюдження так званих Ca²⁺-хвиль, модулюють активність Ca²⁺ каналів та Ca²⁺-транспортерів ПМ, прискорюють процес реакумуляції Ca²⁺ у внутрішньоклітинних пулах [65].

2.3.3. Обмін Ca²⁺ в клітині та поляризація мембран мітохондрій міометрія.

Добре відомо, що Ca²⁺-зв'язуючий протеїн кальмодулін (CaM) є посередником чисельних внутрішньоклітинних ефектів іонів Са за рахунок оборотного утворення комплексу «CaM-Ca²⁺», який, у свою чергу, здатен Са²⁺-залежних внутрішньоклітинних кількість регулювати величезну процесів [66]. СаМ - достатньо «консервативний» протеїн (148 амінокислот, молекулярна вага 16,7 kDa чи кДа?), він належить до суперсімейства Ca²⁺зв'язуючих протеїнів, які використовують один і той самий Са²⁺-зв'язуючий структурний домен. У відповідь на кальцієвий сигнал СаМ може зв'язуватися із великою кількістю різних протеїнів-мішеней, таких як кіназа легких ланцюгів міозину, фосфодіестераза, аденілатциклаза, Ca²⁺/CaMзалежна кіназа, протеїнфосфатаза, кальцінейрин, Ca²⁺-активовані К⁺канали, кальцієві канали L-типу, ріанодинові рецептори та інші [66-70]. В літературі маємо дані щодо регуляції активності Ca²⁺-уніпортеру МХ клітин RBL-1 іонами Са за участі СаМ [71]. На моделі ізольованих МХ міометрія, з використанням Ca²⁺-чутливого флуоресцентного зонда, ми показали, що комплекс "CaM-Ca²⁺" приймає участь у регуляції активності Ca²⁺ уніпортеру МХ ГМ м'язу матки [72]. Ця точка зору знаходиться у відповідності з літературними даними [71]. З іншого боку доведено, що поляризація мембрани МХ та активність Ca²⁺-уніпортеру – взаємопов'язані процеси [1, 24]. Зокрема, нами також було показано, що антагоністи кальмодуліну СаМ модулюють рівень поляризації мітохондріальних мембран. Для візуалізації дії антагоністів СаМ на мембранний потенціал МХ клітин міометрія ми використали конфокальний мікроскоп та потенціалчутливі флуоресцентні зонди – MTG та TMRM. Показано, що інкубація клітин міометрія протягом з антагоністами 10 хвилин СаМ кальмідазоліумом (10 мкМ) або трифлуоперазином (100 мкМ) (рис. 2.1) веде до суттєвого зниження

інтенсивності флуоресценції ТМRM, що свідчить про деполяризуючий ефект цих сполук [73].



Рис. 2.1. Вплив трифлуоперазину (100 мкМ) на мембранний потенціал МХ клітин міометрія, що були попередньо навантажені флуоресцентними зондами МТG та TMRM.

1 — флуоресценція зонда МТG (нижня панель демонструє рівень відносної інтенсивності флуоресценції зонда МTG вздовж червоної лінії), 2 — флуоресценція зондів МTG та TMRM (нижня панель демонструє відносну інтенсивність флуоресценції зондів МTG та TMRM вздовж червоної лінії), 3 — вплив трифлуоперазину на мембранний потенціал МХ клітин міометрія через 10 хвилин (нижня панель демонструє падіння відносної інтенсивності флуоресценції зонда TMRM вздовж червоної лінії).

Рівень поляризації мембран МХ та обмін іонів Са в них – ключові параметри, які відображають функціональний стан цих субклітинних структур у нормі та за патології [74,75]. Значна кількість патологічних станів від нейродегенеративних процесів до раку мають у своїй основі дефекти апоптозу [76]. В науковій літературі висловлювалась думка, що гіперполяризація мембран МХ сприяє збільшенню утворення активних форм кисню і може бути основою першого етапу на шляху до апоптозу, отже, до загибелі клітини [77-79]. Таким чином пошук (або створення) ефекторів нової оборотних генерації, здатних модулювати рівень поляризації мітохондріальних мембран, має важливе як теоретичне, так і практичне значення. І тут варто відзначити, що останнім часом все більше уваги дослідники приділяють каліксаренам – макроциклічним сполукам, які одержують прецизійною циклоконденсацією пара-заміщених фенолів та формальдегіду [80, 81]. Каліксарени, завдяки їх здатності утворювати супрамолекулярні комплекси з біологічно важливими молекулами та іонами, можуть впливати на перебіг різноманітних біохімічних процесів [82, 83]. Ми, у співпраці з член.-кор. НАНУ В.І. Кальченком та його колегами (Інститут органічної хімії НАН України), показали, що попередня інкубація пермеабілізованих клітин міометрія 3 10 мкМ халконвмісними калікс[4]аренами С-136 або С-137, веде до збільшення поляризації мітохондріальних мембран [84].

Продемонстрований нами деполяризуючий ефект антагоністів кальмодуліну та гіперполяризуючий ефект калікс[4]аренів С-136 та С-137 на мембрану МХ міометрія може мати подальше застосування за необхідності корекції величини мембранного потенціалу зазначених субклітинних структур.

Вищенаведена інформація свідчить про те, що однією з головних функцій МХ у клітині, у тому числі і у гладеньком'язовій, є їх участь у обміні іонів Са, який забезпечується потенціалзалежними системами акумуляції цього катіона у мітохондріальному матриксі та системами виходу катіона до цитоплазми. Доведено, що активність Ca²⁺-транспортуючих систем МХ модулюється різноманітними сполуками, як то, іонами Mg, сперміном, антагоністами КаМ та калікс[4]аренами. Подальше поглиблення суто теоретичних знань стосовно цієї субклітинної структури, буде сприяти пошуку специфічних молекул, здатних модулювати транспорт іонів Са у МХ, що є важливим етапом на шляху створення фармакологічних препаратів спрямованої дії.

Отже, аналізу літератури на підставі даних та власних експериментальних результатів стосовно властивостей та шляхів регуляції активності Ca²⁺-транспортуючих систем МХ можна стверджувати, що до основних систем, що забезпечують накопичення Ca²⁺ у матриксі, відносять мітохондріальний уніпортер, систему швидкого захоплення катіона RaM та ріанодин-чутливі Ca²⁺ канали RyR. Вихід Ca²⁺ з МХ забезпечується Na⁺залежними та Na⁺-незалежними Ca²⁺ обмінниками. Пора транзієнтної проникності МТР також може функціонувати як система виходу Ca²⁺ з МХ. Накопичення іонів Са у матриксі МХ супроводжується збільшенням поляризації внутрішньої мембрани, зростанням швидкості синтезу АТР та транспорту метаболітів. Дисипація мембранного потенціалу МХ має Ca²⁺ надходження матриксу. гальмувати до Встановлені нами деполяризуючий ефект антагоністів кальмодуліну та гіперполяризуючий ефект циклічних олігомерів фенолів - калікс[4]аренів С-136 та С-137 на МХ міометрія можуть мати застосування за необхідності корекції величини мембранного потенціалу цих субклітинних структур.

РОЗДІЛ ІІ. РЕГУЛЯЦІЯ ТРАНСМЕМБРАННОГО ОБМІНУ ІОНІВ Са В ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВИХ КЛІТИНАХ МАТКИ

ГЛАВА 3. МЕХАНІЗМИ РЕГУЛЯЦІЇ АКТИВНОСТІ СИСТЕМ ТРАНСПОРТУ Ca²⁺ У МІОЦИТАХ

3.1. Вивчення іонних, молекулярних та мембранних механізмів контролю електро- та фармакомеханічного спряження – нагальна проблема біохімії гладеньких м'язів

ГМ належить фундаментальна роль у забезпеченні функціонування внутрішніх органів та систем органів. Ці м'язи входять до складу судинної, дихальної, шлунково-кишкової та урогенітальної систем, відповідаючи за підтримку кров'яного тиску, контролюючи надходження повітря до організму та проходження їжі, пересування сперми та яйцеклітин а також народження дитини [1]. Доведено, що ГМК задіяні у різноманітних процесах, таких, наприклад, як міграція та проліферація, продукування цитокінів, хемокінів, екстраклітинних білків, факторів росту тощо [1]. Проте головною фізіологічною функцією ГМ є їх скорочення-розслаблення [2, 3].

Міометрій – ГМ матки, який забезпечує скоротливу активність цього органу. ГМК складають домінуючу популяцію клітин, з яких побудована стінка матки [4, 5]. Добре відомо, що скорочення матки – це комплексний та динамічний процес, який регулюється різноманітними фізіологічноактивними сполуками [4, 6, 7]. З іншого боку, матка має здатність скорочуватись без втручання нервових та гормональних сигналів [8]. В цілому ж можна стверджувати, що клітини міометрія являють собою складну тензоелектрохімічну систему, функціональна активність якої регулюється як метаболічними (пептидні та статеві гормони, нейромедіатори та ін.), так і фізико-хімічними (катіони Ca, Mg, Na, K, протони H, мембранний потенціал) факторами.

Функціонування ГМ залежить від ключової події – збільшення внутрішньоклітинної концентрації іонів Са [1, 9-13]. У стані спокою концентрація Ca²⁺ у цитоплазмі ГМК дорівнює приблизно 100 нМ [14]. Швидкі транзієнтні зміни концентрації Са²⁺ у цитоплазмі безпосередньо регулюють м'язове скорочення, рухливість клітини, секрецію гормонів та нейротрансмісію. Більш тривале у часі збільшення концентрації Ca²⁺ у цитоплазмі відіграє центральну роль у біологічних процесах від запліднення до апоптозу [10]. Участь іонів Са у такій кількості клітинних процесів, безперечно, висуває вимоги щодо ефективного та точного контролю внутрішньоклітинної кальцієвої сигналізації. Чотири основних класи мембранних протеїнів безпосередньо задіяні у забезпеченні Ca²⁺ гомеостазу у клітині – кальцієві канали, помпи, обмінники та уніпортери. Вивчення кінетичних та ензиматичних властивостей Ca²⁺-транспортуючих систем та шляхів регуляції їх активності є актуальним питанням як з теоретичної, так і практичної точки зору.

Теоретичний аспект проблеми пов'язаний з подальшим з'ясуванням фундаментальних механізмів трансмембранного обміну іонів Са у ГМК. Зокрема, добре відомо, що головним джерелом іонів Са, які необхідні для скорочення ГМК, є позаклітинний пул цього катіона [1]. Надходження Са²⁺ до цитоплазми забезпечується різноманітними кальцієвими каналами ПМ, серед яких домінуючу роль відіграють потенціал-керовані Са²⁺ канали [1, 15-17]. Проте у ПМ також розташовані потенціал-незалежні канали. Мова йде за вивчення нової сім'ї мембранних протеїнів, яка отримала назву «білки каналів транзієнтного рецепторного потенціалу» (TrpC) [18]. На клітинах міометрія такі дослідження майже не проводились. Проте білки, які входять до одного з підкласів цього сімейства, а саме TrpC, безпосередньо задіяні у регуляції концентрації іонів Са у клітинах. Отже нагальним стало дослідження експресії TrpC на рівні білків та mRNA у

міометрії за різних функціональних станів, з'ясування їх участі у контролі цитоплазматичної концентрації Са²⁺.

Потребували також подальшого дослідження механізми регуляції активності енергозалежних Ca²⁺ транспортуючих систем, які забезпечують зниження концентрації цього катіона у цитоплазмі збуджених міоцитів, тобто контролюють релаксацію механічної напруги матки.

Сьогодні маємо значний обсяг інформації стосовно властивостей кальцієвої помпи ПМ клітин ГМ. Проте на час проведення досліджень, результати яких будуть описані нижче, існувало багато питань, які залишились поза увагою дослідників або не одержали однозначного вирішення. Це, перш за все, питання щодо механізмів регуляції активності Mg²⁺,ATP-залежної кальцієвої помпи сарколеми метаболічними та фізикохімічними факторами. Зокрема, мова йде за регуляцію активності цієї помпи мембранним потенціалом. Важливим є також питання впливу сАМРзалежного фосфорилювання на активність цієї транспортної системи. Не з'ясованим залишилися питання стосовно впливу градієнта іонів Na на активність Ca²⁺-помпи ПМ ГМК. Костерін та співр. [19] показали, що у ГМК матки тільки наближено 30 % енергії натрієвого градієнта йде на забезпечення антипортного транссарколемального перенесення Ca²⁺. Цілком ймовірно, що у ГМК енергія градієнта іонів Na може бути використана не тільки для антипортного викиду Ca²⁺ із міоцитів, але і для активації інших транспортних процесів. Це може мати місце у разі, коли, наприклад, кальцієва помпа ПМ ГМК є Mg²⁺, АТР-залежним Na⁺-Ca²⁺обмінником. Припущення, що кальцієва помпа здатна функціонувати як Mg²⁺, ATP-залежний Na⁺-Ca²⁺-обмінник, співпадає з раніше висловленою ідеєю про можливість, з точки зору молекулярної структури, неповної незалежності двох транспортних систем: не виключають, що вони являють собою одну і ту ж систему - кальцієву помпу, що знаходиться у різних станах. Перехід від одного стану до іншого залежить від концентрації іонів Na та Ca у зовнішньо- та внутрішньоклітинному просторах відповідно [20].

Однак питання щодо впливу градієнта іонів Na нa активність Mg²⁺,ATPзалежної кальцієвої помпи сарколеми потребувало подальшого дослідження. Не було також визначено енергетичні параметри, зокрема енергію активації E_a кальцієвої помпи ГМК матки. Проте цей енергетичний показник є вкрай важливим, адже він дозволяє оцінити, з енергетичної точки зору, внесок Ca²⁺ помпи сарколеми у процеси, що забезпечують розслаблення збудженої м'язової тканини.

Хоча кальцієвій помпі ПМ належить суттєва роль у забезпеченні зниження концентрації Ca²⁺ у цитоплазмі ГМК, проте певний внесок у контроль релаксації механічної напруги роблять й інші системи, зокрема, Mg²⁺,ATP-залежна Ca²⁺ помпа CP. CP є головним внутрішньоклітинним Ca²⁺ депо. Відсутність адекватної експериментальної моделі для вивчення акумуляції іонів Ca у зазначених субклітинних структурах ГМ матки дещо загальмувала дослідження кінетичних та каталітичних властивостей цієї Ca²⁺-транспортуючої системи. Отже постало питання про відпрацювання надійної біохімічної експериментальної моделі для вивчення властивостей кальцієвої помпи CP та шляхів регуляції її активності.

МХ – це мобільні внутрішньоклітинні високоенергетичні інтегратори метаболічних та іонних сигналів, які здатні акумулювати Ca²⁺ у значних кількостях. Надходження Ca²⁺ в середину МХ в основному забезпечується чутливим до рутенієвого червоного уніпортером, активність якого залежить від електрохімічного протонного градієнта на внутрішній мітохондріальній мембрані [21]. До ендогенних регуляторів цієї транспортної системи відносять поліаміни. Поліаміни – природні полікатіони, які задіяні, перш за все, у регуляції процесів росту та диференціації клітин [22, 23]. Це найбільш досліджена, але не єдина роль поліамінів у клітині. Зокрема, показано, що поліаміни сприяють релаксації ГМ, в тому числі і матки [24]. Механізм релаксуючого впливу поліамінів на механічну напругу міометрія залишався невизначеним. Відомо, що Ca²⁺-зв'язуючий білок кальмодулін внутрішньоклітинним "сенсором" (CaM) Э первинним іонів Ca i

посередником їхніх внутрішньоклітинних ефектів [25]. В літературі Ca²⁺ можливість регуляції активності обговорюється питання про МХ комплексом "кальмодулін-Са²⁺" [26]. уніпортеру З іншого боку, Ca²⁺ активність уніпортеру MX залежить від також поляризації мітохондріальної мембрани [4, 21]. Очевидно, що змістовним є питання щодо вивчення можливості модуляції антагоністами СаМ рівня поляризації мітохондріальних мембран. Дійсно, величина мембранного потенціалу МХ є суттєвим фактором регуляції низки важливих енергозалежних процесів, зокрема, акумуляції іонів Са у цих субклітинних структурах. У той же час, акумуляція Ca²⁺ у мітохондріальному матриксі опосередковано впливає на рівень поляризації зазначених мембран. Тому дослідження регуляції рівня поляризації внутрішньої мембрани МХ міометрія становить безсумнівний інтерес.

З фундаментальної точки зору вирішення вищесформульованих проблем повинно сприяти кращому розумінню іонних, молекулярних та мембранних механізмів контролю електро- та фармакомеханічного спряження в міометрії.

З практичної точки зору більш глибоке тлумачення окремих етапів Са²⁺ гомеостазу в ГМК може бути підґрунтям для створення високоафінних та селективних фармакологічних засобів для корекції відхилень моторики міометрія від норми у випадку різноманітних патологічних станів (гіпер- та гіпотонус матки, спонтанні викидні тощо).

В контексті зазначеного ми намагалися визначити деякі властивості, з'ясувати механізми регуляції та функціональну роль систем пасивного та активного транспорту іонів Са у клітинах міометрія. При цьому акцент було зроблено: на - вивчення експресії TrpC на рівні mRNA та протеїнів у клітинах міометрія за різних функціональних станів; - з'ясування закономірностей дії мембранного потенціалу та натрієвого градієнта на Mg²⁺,ATP-залежний транспорт іонів Ca через сарколему міометрія, розрахунок енергетичних параметрів цього процесу; - дослідження
закономірностей енергозалежної акумуляції іонів Са в СР та в МХ ГМК матки; - вивчення Ca²⁺-індукованих змін мембранного потенціалу МХ міометрія.

Коротко охарактеризуємо експериментальні методи, які були використані нами при виконанні досліджень, результати яких наведені у цій главі.

біології: У цьому циклі дослідів, що були Методи молекулярної проведені в університеті медичної школи штату Техас та університеті штату Колорадо (США), використовували матку щурів та фрагменти тканини матки жінок, які одержували у клініці медичної школи штату Техас під час хірургічного втручання. Дослідження на лабораторних тваринах та проводились відповідності жіночому матеріалі V 3 протоколами університету медичної школи штату Техас та університету штату Колорадо (США). Загальну RNA отримували з міометрія щурів та людини з використанням TRI Reagent (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, США). Інформаційну RNA отримували з загальної RNA з використанням FastTrack 2.0 Kit mRNA (Invitrogen, Carlsbad, CA, США). Праймери для ПЛР для β-актину та TrpC1–7 створювали, використовуючи описані у GenBank відповідні сиквенси щурів. При проведенні оберненої транскриптазної реакції (RT) та полімеразної ланцюгової реакції (PCR) первинну копію cDNA отримували з 300 нг mRNA з використанням AMV оберненої транскриптази (Promega, Madison, WI, США) та 100 нг oligo-dT. Стандартні умови проведення PCR були такими: 10 мМ Tris-HCl, pH 8,3; 50 мМ KCl; 2,1-2,5 мМ MgCl₂; 0,2 мМ dNTP; 0,5 мМ прямий та зворотній праймери; 2,5 U Jump Start Taq DNA полімераза (Sigma, St. Louis, MO, США) у загальному об'ємі 50 мкл. Кількісну RT-PCR у реальному часі проводили з SmartCycler instrument (Cepheid, США) та використанням приладу QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen, Valencia, CA, CШA). Вестернблот аналіз проводили за стандартним протоколом, використовуючи фракцію ПМ клітин міометрія та мозку щурів. Ампліфіковані PCR-продукти

109

розділяли за допомогою електрофорезу у 1,5 % агарозному гелі. Смужки ДНК візуалізували за допомогою барвника SYBR Green. Усі одержані зразки мали очікуваний розмір і були клоновані у pCR2.1/TOPO вектор, використовуючи TOPO-TA cloning kit (Invitrogen, California, USA). Ідентичність отриманих зразків була підтверджена прямим сиквенсом.

Методи препаративної біохімії. У відповідному циклі досліджень використовували матку тварин (свині, щури). Матку свиней отримували на Дарницькому м'ясокомбінаті (Київ, Україна). Дослідження на лабораторних тваринах (щурах) проводились у відповідності з протоколом комісії з правилами роботи з експериментальними контролю за тваринами Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. Фракцію ПМ клітин міометрія одержували за допомогою диференційного центрифугування з використанням градієнта цукрози за вдосконаленим нами методом [27] та характеризували за активністю маркерних ензимів. Суспензію міоцитів матки невагітних щурів, естрогенізованих за добу до забору тканини, одержували за допомогою методу Міронно та співр. [28] з деякими модифікаціями. Фракцію МХ одержували із міометрія свині та щура за методом, описаним раніше [29]. Каталітичну субодиницю сАМР-залежної міокарду великої рогатої худоби протеїнкінази одержували із за розробленим Клітини міометрія невагітних нами методом. жінок одержували від компанії Clonetics, East Rutherford, США та переводили в культуру. Іморталізовані клітинні лінії міометрія вагітних жінок РНМ-1 та РНМ-2 були створені співробітниками лабораторії професора Б.Сенборн (факультет біохімії та молекулярної біології медичного університету м. Хьюстон, штат Техас). Клітини міометрія невагітних щурів одержували за допомогою обробки тканини колагеназою [28] та переводили в культуру. Дослідження транспорту Ca²⁺ у субклітинних структурах проводили з

використанням ізотопного методу (⁴⁵Ca²⁺). При дослідженні пасивного транспорту Ca²⁺ у везикулах ПМ міометрія свині мембранні везикули попередньо «навантажували» ⁴⁵Ca²⁺ протягом ночі при 4 ⁹C у середовищі:

10 мМ Hepes, pH 7,0, 50 мМ КСІ, 110 мМ ChCl, 1 мМ CaCl₂. Вихід Ca²⁺ ініціювали 25-кратним ізотонічним розведенням аліквоти везикул. Вплив мембранного потенціалу на Mg²⁺,ATP-залежний транспорт Ca²⁺ у фракції сарколеми ГМ вивчали на мембранних препаратах двох типів: 300 мМ К_і+/А $MM K_{e}^{+} + B MM Ch_{e}^{+}$ (A MM < 300 MM, A MM + B MM = 300 MM, Δψ < 0); 300 мМ $K_i^+/300$ мМ K_e^+ ($\Delta \psi = 0$)). Концентрація K^+ -іонофору валіноміцину у середовищі інкубації дорівнювала 4[.]10⁻⁸ М. Накопичення Са²⁺ вимірювали у середовищі інкубації (об'єм 0,5 мл), що містило 20 мМ тріс-НСІ (рН 7,4), КСІ та ChCl у відповідних концентраціях, 5 мМ MgCl₂, 3 мМ ATP, 100 мкМ ⁴⁵CaCl₂+⁴⁰CaCl₂ (2 мкКі/мл), 50-100 мкг білка. Енергозалежний транспорт Са²⁺ у СР пермеабілізованих міоцитів досліджували з використанням ⁴⁵Ca²⁺. Склад стандартного середовища інкубації (об'єм – 0,5 мл): 20 мМ Hepes-KOH (ado 50 mM tpic-HCl) pH 7,4, 125 mM KCl, 25 mM NaCl, 3 mM АТР, 3 мМ MqCl₂, 0,01 мМ рутенієвий червоний (або 10 мМ NaN₃), 10 мМ оксалат К, 0,01 мМ (⁴⁰CaCl₂+ ⁴⁵CaCl₂) (0,1 мкКі/мл). Концентрація дигітоніну у середовищі інкубації 0,1 мг/мл. Кількість клітин – (4-5)[·]10⁵/мл. Енергозалежний транспорт Ca²⁺ у МХ, що були одержані із міометрія свині і щурів, та у МХ пермеабілізованих клітин міометрія щурів визначали у стандартному середовищі інкубації, яке містило: 50 мМ тріс-HCI (або 20 мМ Hepes), pH 7,4, 125 MM KCl, 25 MM NaCl, 3 MM ATP, 3 MM MgCl₂, 3 MM сукцинат натрію, 2 мМ фосфат калію, 0,01 (⁴⁰CaCl₂ + ⁴⁵CaCl₂) (0,1 мкКі/мл). У разі використання міоцитів концентрація дигітоніну у середовищі інкубації була 0,1 мг/мл (0,01 %), кількість клітин – (4-5) 10⁵/мл, енергозалежну акумуляцію Ca²⁺ у CP пригнічували тапсигаргіном (50 нМ).

Визначення рівня фосфорилювання білків проводили з використанням [ү-³²P]-АТР. Визначення активності препаратів сАМР-залежної протеїнкінази та її каталітичної субодиниці проводили в інкубаційному середовищі, яке містило 10 мМ К-фосфатний буфер, pH 7,0, 1 мМ MgCl₂, 0,1 % протамінсульфат, 50 мкМ АТР. Ендогенне фосфорилювання білків ПМ міометрія свині проводили у відповідності з методом, наведеним раніше [30].

Флуоресцентні методи. Визначення рівня іонізованого Са у клітинах міометрія проводили з використанням флуоресцентного зонда fura 2-AM та (Nikon за допомогою флуоресцентного мікроскопа TSM, Японія). Створення та реєстрацію К⁺-дифузійного мембранного потенціалу на везикулах ПМ проводили із використанням системи «К⁺-валіноміцин» за допомогою флуоресцентного зонда disC3-5 та спектрофлуориметра. Чистоту препарату МХ досліджували за допомогою флуоресцентного барвника NAO та проточного цитометра COULTER EPICS XL™ (Beckman Coulter, США) з аргоновим лазером. Реєстрацію мембранного потенціалу $\Delta \psi$ MX проводили за допомогою флуоресцентних зондів TMRM та MTG з використанням проточного цитометра COULTER EPICS XL™ (Beckman Coulter, США) та конфокального лазерного сканувального мікроскопа LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Німеччина). Рівень іонізованого Са у МХ визначали за допомогою флуоресцентного зонда fluo 3-AM та проточного цитометра COULTER EPICS XL[™] (Beckman Coulter, США).

Інші методи. Гомогенність та молекулярну масу каталітичної субодиниці сАМР-залежної протеїнкінази визначали за допомогою електрофорезу у поліакріламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію [31]. Розмір ізольованих мітохондрій визначали за допомогою лазерного фотон-кореляційного спектрометра PCS 100 (Malvern Instrument Limited, UK) та трансмісійної електронної мікроскопії за допомогою електронного мікроскопу JEOL EM-1230 (Tokio Boeki, Японія).

Кінетичні параметри Mg²⁺,ATP-залежного транспорту Ca²⁺ визначали за допомогою методу, запропонованого Костеріним С.О. [32]. Уявні константу активації по Mg²⁺ (K_{Mg}) і константу Міхаеліса по ATP (K_m) розраховували за методом Едді-Хофсті [33] з використанням відповідних графіків концентраційних залежностей, які лінеаризували за допомогою методу найменших квадратів (значення коефіцієнту кореляції г 0,90-0,99).

112

Значення коефіцієнта інгібування I_{0,5}, що характеризує ефективність впливу інгібіторів на Mg²⁺,ATP-залежну кальцієву помпу CP, розраховували як такі величини концентрації інгібіторів, при яких рівень транспортної активності складав 50 % від контрольної величини (так звана «нульова точка», тобто у відсутності інгібітора в середовищі інкубації). Статистичний аналіз проводили за допомогою дисперсійного методу (ANOVA) та шляхом визначення коефіцієнта Стьюдента. Експериментальні дані аналізували з використанням методів варіаційної статистики.

Питання біоетики. Частина роботи, яка пов'язана з використанням клітин міометрія вагітних жінок, була виконана в період наукового відрядження автора глави до Сполучених Штатів Америки (університети штатів Техас та Колорадо). Перед виконанням наукових досліджень автором були складені відповідні іспити та одержано сертифікат для роботи з біологічними матеріалами людини.

3.2. Вивчення експресії TrpC на рівні mRNA та протеїнів у клітинах міометрія за різних функціональних станів

3.2.1. Експресія TrpC на рівні mRNA та протеїнів у міометрії щурів

Вхід Ca²⁺ з позаклітинного простору до міометріальних клітин має виключне значення для скорочення матки, і отже, для нормального перебігу пологів [34]. У той же час активація гормонами скорочення ГМ відбувається за рахунок не тільки входу катіона ззовні, а також й виходу з внутрішньоклітинних пулів [35]. Вихід Ca²⁺ з внутрішньоклітинних пулів має важливе значення для підтримки тривалої скорочувальної активності [34, 36, 37]. Крім того, спустошення СР стимулює додаткове надходження катіона з позаклітинного простору. Припускається, що канали, які забезпечують додаткове надходження катіона, побудовані з протеїнів, що належать до сімейства білків транзієнтного рецепторного потенціалу (Trp), зокрема TrpC [38, 39].

Ми досліджували експресію TrpC на рівні mRNA та протеїнів у міометрії невагітних щурів та протягом вагітності і пологів. У дослідах використовували такі методи, як RT-PCR та вестерн блот.

Результати традиційного RT-PCR показали, що у міометрії щурів експресовані TrpC1, TrpC2, TrpC4, TrpC5, TrpC6 та TrpC7 на рівні mRNA. Усі продукти були клоновані та проведено їх сиквенс. Аналіз показав, що одержані фрагменти TrpC1, TrpC2, TrpC4, TrpC5, TrpC6 мають 99-100 % ідентичності відповідним сиквенсам у GenBank. Сиквенс TrpC7 мав 90 <mark>%</mark> гомологічності з TrpC7 миші та 88 % з TrpC7 людини. Нам не вдалость ампліфікувати TrpC3 з mRNA міометрія щурів, проте праймери, які ми використовували, дозволили ампліфікувати TrpC3 на рівні mRNA з мозку щурів. Вестерн блот аналіз показав експресію TrpC1, TrpC4, TrpC5 та TrpC6 на рівні протеїнів у міометрії невагітних щурів та на 13 та 21 день вагітності. Кількісну RT-PCR використовували для визначення відносної експресії TrpC на рівні mRNA. Принцип цього методу ґрунтується на зворотній лінійній залежності поміж номером циклу. за ЯКОГО ампліфікований продукт вперше з'являється, та логарифмом концентрації сDNA. Були побудовані стандартні криві для всіх TrpC та β-актину з використанням cDNA визначеної концентрації та сиквенсу. Кількість кожного PCR продукту визначалась з використанням індивідуальних калібрувальних кривих, а потім нормалізувалась по відношенню до βактину, експресія якого визначалась у тих самих зразках mRNA. Показано, що у міометрії невагітних щурів відносний рівень експресії TrpC4 mRNA був а TrpC2 mRNA – найнижчим у порівнянні з іншими найвищим, досліджуваними протеїнами (рис. 3.1). Експресія TrpC7 mRNA була також низькою, проте значно вищою, ніж TrpC2 mRNA. Рівень експресії TrpC1 та TrpC5 mRNA були приблизно однаковими. Експресія TrpC6 mRNA була вищою, ніж TrpC1 mRNA, проте значно нижчою, ніж TrpC4 mRNA (рис.3.1).



Рис. 3.1. Експресія TrpC на рівні mRNA міометрія щурів. mRNA отримували з міометрія невагітних щурів. Різні літери над стовпчиками вказують на статистично достовірну різницю поміж групами, P < 0,05 (n = 3-4).

Далі було вивчено експресію TrpC на рівні mRNA міометрія щурів протягом вагітності (13, 16, 19 та 21 день) та під час пологів. Усі досліджувані TrpC mRNA експресовані у міометрії протягом вагітності та пологів. TrpC4 mRNA мала найвищу відносну експресію, але її рівень не змінювався протягом вагітності. Експресія TrpC5 та TrpC6 mRNA була більшою у міометрії невагітних тварин, ніж протягом вагітності (рис. 3.2). Експресія TrpC2 та TrpC7 mRNA була дуже низькою і не змінювалась протягом вагітності.



Рис. 3.2. Експресія TrpC1, TrpC4, TrpC5, TrpC6 на рівні mRNA у міометрії щурів – невагітних (HB), вагітних (13, 16, 19, 21 день) та під час пологів (П). Різні літери над стовпчиками вказують на статистично достовірну різницю поміж групами, P < 0,05 (n = 3-4). Немає вісей; P чи p?

Результати Вестерн блот аналізу показали експресію TrpC1, TrpC4, TrpC5 та TrpC6 на рівні протеїнів у міометрії невагітних щурів та на 13 та 21 день вагітності.

Таким чином, було доведено, що TrpC1, TrpC2, TrpC4, TrpC5, TrpC6 та TrpC7 mRNA та протеїни експресовані у міометрії щурів. Найбільша відносна експресія властива для TrpC4 mRNA. Протягом вагітності зменшувалась експресія TrpC5 та TrpC6 mRNA.

3.2.2. Експресія TrpC на рівні mRNA у міометрії жінок

mRNA одержували з таких об'єктів: іморталізовані клітинні лінії РНМ-1 та РНМ-2, первинна клітинна лінія міометрія жінок, міометрій вагітних жінок

та міометрій жінок під час пологів. Експресію TrpC на рівні mRNA досліджували за допомогою кількісної RT-PCR. Відносний рівень експресії TrpC розраховували, використовуючи індивідуальні калібрувальні криві та нормалізували на вміст β-актину, який визначали у тих самих зразках mRNA. Результати показали, що у клітинних лініях, які досліджувались, експресовані TrpC1, TrpC3, TrpC4, TrpC5, TrpC6, TrpC7 mRNA. Експресія та TrpC4 mRNA була найбільшою у порівнянні з іншими TrpC1 представниками цієї групи. Маємо зауважити, що за рівнем експресії TrpC ізоформ іморталізовані клітинні лінії (РНМ-1 та РНМ-2) майже не відрізнялись від первинної клітинної лінії міометрія жінок. Експресію ТrpC mRNA досліджували також у міометрії вагітних жінок до початку та під час пологів. Було показано, що TrpC1 та TrpC4 mRNA мали найбільший рівень експресії у цих зразках також (рис. 3.3). Рівень експресії TrpC4 mRNA знижується під час пологів у порівнянні з таким вагітних жінок.

Таким чином, у іморталізованих клітинних лініях РНМ-1 та РНМ-2, первинній клітинній лінії міометрія жінок, міометрії вагітних жінок та міометрії жінок під час пологів, експресовані TrpC1, TrpC3, TrpC4, TrpC5, TrpC6, TrpC7 mRNA. TrpC1 та TrpC4 mRNA мали найбільший рівень експресії. Експресія TrpC4 mRNA знижується під час пологів у порівнянні з такою у вагітних жінок.



Рис. 3.3. Експресія TrpC на рівні mRNA у міометрії вагітних жінок: 1 – до початку пологів (n=7-10), 2 – під час пологів (n=8-11). */ - позначено статистично достовірні зміни (P < 0,01).

3.3. Депо-керований вхід Ca²⁺ у клітинах міометрія жінок

Наступним нашим кроком була спроба зареєструвати внесок депокерованих Ca²⁺ каналів у збільшення концентрації цього катіона у цитоплазмі за стимуляції міометріальних клітин утеротоніком окситоцином (100 нМ). З метою ідентифікації внеску депо-керованих Ca²⁺ каналів використовували блокатор цих каналів – SKF9636, а також блокатор потенціал-керованих каналів – верапаміл [40-42]. Досліди проводились на первинній культурі міометріальних клітин жінок. Було показано, що SKF9636 $(EC_{50}=10.8)$ HM) дозо-залежно гальмував збільшення цитоплазматичної концентрації Ca²⁺ за умов стимуляції міометріальних клітин окситоцином. Верапаміл, за такої постановки експерименту, не проявив свого блокуючого впливу. Маємо зазначити, що SKF96365 у концентрації 100 нМ не впливав на рівень Ca²⁺ у клітинах за умов відсутності окситоцину.

Таким чином, було показано наявність депо-керованого входу Ca²⁺ в клітини міометрія. SKF9636 у концентрації < 100 нМ селективно блокує депо-керований вхід Ca²⁺ у міометріальних клітинах жінок. Верапаміл не впливає на цей процес, отже, потенціал-керовані Ca²⁺ канали не задіяні у забезпеченні додаткового входу Ca²⁺ у відповідь на спустошення внутрішньоклітинних пулів.

3.4. З'ясування закономірностей дії мембранного потенціалу та натрієвого градієнта на Mg²⁺,ATP-залежний транспорт іонів Са через сарколему міометрія, розрахування енергетики цього процесу

3.4.1. Вплив мембранного потенціалу на Mg²⁺,ATP-залежний транспорт Ca²⁺ крізь сарколему міометрія

Квазірівноважний К⁺-дифузійний мембранний потенціал на везикулах сарколеми створювали за допомогою «К⁺-валіноміцинової системи», реєстрували з використанням потенціал-чутливого флуоресцентного зонда dis-C3-(5) (3,3'-діпропілтіодікарбоцианін) (λ_{збуд}=640нм, λ_{флу}=675нм), значення мембранного потенціалу розраховували за рівнянням Нернста.

У середовищі, що містило валіноміцин (4·10⁻⁸ М), везикули мембран типу 300 мМ K_i⁺/12 мМ K_e⁺ + 288 мМ Ch_e⁺ ($\Delta \psi$ = -86 мВ, внутрішня поверхня заряджена негативно) у ході Mg²⁺,АТР-залежного процесу накопичували Ca²⁺ з більшою швидкістю, ніж везикули типу 300 мМ K_i⁺/300 мМ K_e⁺ ($\Delta \psi$ = 0 мВ). Дійсно, початкова швидкість акумуляції іонів Са становила 6,6 та 2,7 нмоль на 1 мг білка за 1 хв. при $\Delta \psi$ = -86 мВ та 0 мВ відповідно (рис. 3.4).

Вивчення впливу різних концентрацій іонізованого кальцію на активність транспортної системи показало, що зміна величини $\Delta \psi$ від 0 до -86 мВ стимулює збільшення V_{o,max}, але не впливає на величину константи активації K_a за Ca²⁺. Дійсно, при $\Delta \psi = 0$ мВ значення K_{Ca} становило 0,61 мкM, а при $\Delta \psi = -86$ мВ — K_{Ca} = 0,41 мкM. Таким чином, поляризація везикул не змінює спорідненості кальцієвої помпи ПМ до субстрату переносу.



Рис. 3.4. Кінетичний аналіз Mg^{2+} , ATP-залежної акумуляції Ca^{2+} у фракції везикул сарколеми за різних значень $\Delta \psi$; 1 – $\Delta \psi$ =-86 мB, 2 – $\Delta \psi$ =0 мB; а – кінетика енергозалежного транспорту Ca^{2+} , б – лінеаризація кінетичних кривих для розрахунку початкової швидкості v_0 (екстраполяція лінійних графіків на вісь ординат).

Термодинамічний аналіз показав, що у ході елементарного транспортного процесу Mg²⁺,ATP-залежна кальцієва помпа ПМ ГМК переносить всередину інвертованих везикул сарколеми один позитивний заряд. Це означає, що Mg²⁺,ATP-залежний електрогенний транспорт Ca²⁺ крізь ПМ ГМК відбувається симпортно з одновалентним аніоном (наприклад, Cl⁻) або антипортно з одновалентним катіоном (Na⁺) чи протоном (H⁺).

Таким чином, у присутності валіноміцину калієвий градієнт, що спрямований із внутрішньовезикулярного простору назовні, стимулює енергозалежне перенесення Ca²⁺ у середину везикул ПМ ГМК.

3.4.2. Синергізм енергозалежних Са²⁺ потоків крізь плазматичну мембрану

Перш за все ми ідентифікували енергозалежні кальцієві потоки у препараті везикул сарколеми міометрія. У відсутності початкового (у момент часу t=0) кальцієвого градієнта ($[Ca^{2+}]_i = [Ca_e^{2+}]_e = 100$ мкМ) везикули, що характеризуються спрямованим із внутрішньовезикулярного простору назовні натрієвим градієнтом (100 мМ K_i⁺ + 150 мМ Na_i⁺ / 100 мМ K_e⁺ + 25 мМ Na_e⁺ + 125 мМ Ch_e⁺), активно накопичували Ca²⁺. Трансмембранне переміщення Ca²⁺ дійсно залежало від енергії градієнта іонів натрію, тому що моненсін (50 мкМ), який призводить до дисипації цього градієнта, пригнічував активне накопичення двовалентного катіона у мембранних пухирцях.

Фракція сарколеми ГМ накопичувала Ca²⁺ також у Mg²⁺,ATPзалежному процесі із середовища інкубації, що містило Ca²⁺ у концентрації 10⁻⁵ М.

За умов існування початкового кальцієвого градієнта, що спрямований із внутрішньовезикулярного простору назовні ([Ca²⁺]_i = 2 мМ, [Ca²⁺]_e = 5 мкМ), спостерігається пасивне вивільнення Ca²⁺ із везикул ПМ ГМК, попередньо навантажених К⁺ (100 мМ) та Na⁺ (150 мМ), в ізотонічне (по К⁺ та Na⁺) середовище розведення, що містило АТР (1 мМ) і не містило Mg²⁺ (везикули типу 100 мМ K_i⁺ + 150 мМ Na_i⁺ / 100 мМ K_e⁺ + 150 мМ Na_e⁺ + 1 мМ АТР_e) (рис. 3.5,а, крива 1).



Рис<mark>.</mark> 3.5. Компенсація пасивного виходу Са²⁺ з везикул сарколеми системами енергозалежного транспорту цього катіона. а) – кінетика транспорту Ca²⁺: 1 – пасивний вихід Ca²⁺ з везикул; 2 – те ж саме в умовах функціонування Na⁺-Ca²⁺ обмінника; 3 – те ж саме в умовах функціонування кальцієвої помпи; 4 – те ж саме в умовах сумісного функціонування Na⁺/Ca²⁺ обмінника та кальцієвої помпи; б) – синергізм енергозалежних кальцієвих потоків; 5 – розрахункове значення компенсаційного ефекту, сумою загального яке парціальних Э компенсаційних ефектів ((крива 2 – крива 1) + (крива 3 – крива 1)); 6 – компенсаційний ефект за умов сумісного функціонування катіонного антипортеру та кальцієвої помпи (крива 4 – крива 1).

Ізотонічна заміна у зовнішньому розчині Na⁺ на Ch⁺, тобто створення спрямованого із внутрішньовезикулярного простору назовні початкового натрієвого градієнта за ізотонічних умов, частково перешкоджала пасивному виходу Ca²⁺ із мембранних везикул (за рахунок функціонування Na⁺-Ca²⁺ обмінника) (рис. 3.5,а, крива 2). За умов відсутності початкового натрієвого градієнта внесення Mg²⁺ (3 мМ) у середовище, що містило АТР, також перешкоджало пасивному виходу Ca²⁺ із мембранних пухирців (рис. 3.5,а, крива 3). У цьому випадку часткова компенсація виходу Ca²⁺ обумовлена функціонуванням у цій субклітинній структурі кальцієвої помпи. Якщо ж створити умови для сумісного функціонування катіонного антипортеру та кальцієвої помпи, спостерігалась ефективна компенсація пасивного виходу Ca²⁺ із везикул сарколеми, до того ж вміст катіона у мембранних пухирцях перевищував рівень, характерний для моменту часу t=0 («нульова точка») (рис. 3.5,а, крива 4). Розрахунок показує (рис. 3.5,б, криві 5 та 6), що у режимі спільного функціонування катіонного антипортеру та кальцієвої помпи компенсаційний ефект (крива 6 = крива 4 - крива 1) більший, ніж за умов окремого функціонування кожної із систем енергозалежного транспорту Ca²⁺, якщо скласти парціальні компенсаційні ефекти (крива 5 = (крива 2 - крива 1) + (крива 3 - крива 1)). Синергізм енергозалежних кальцієвих потоків у фракції везикул сарколеми спостерігався і за умов відсутності початкового трансмембранного градієнта Ca²⁺.

При фіксованій концентрації Ca²⁺ (2 мМ) усередині інвертованих везикул сарколеми синергічний ефект стимулювався збільшенням концентрації цього катіона у зовнішньому просторі (10⁻⁷ - 10⁻⁵ М). Концентраційна залежність ефекту характеризується насиченням за субстратом перенесення, величина K_{Ca} по Ca²⁺ дорівнює 1,1 мкМ. Це значення досить близьке до величини K_{Ca} , що властива кальцієвій помпі ($K_{Ca} = 0,4-0,6$ мкМ), але не Na⁺-Ca²⁺ обміннику ($K_{Ca} = 30-60$ мкМ) сарколеми ГМ [4].

Таким чином, трансмембранний натрієвий градієнт у ГМ матки не лише забезпечує антипортний транспорт іонів Са (Na⁺-Ca²⁺ обмін), але й стимулює функціональну активність Mg²⁺,ATP-залежної кальцієвої помпи ПМ.

3.5. Енергія активації кальцієвої помпи плазматичної мембрани міоцитів матки

У електрофізіологічних дослідах, виконаних із використанням смужечок м'язової тканини матки невагітних щурів, було показано, що збільшення температури безкальцієвого гіперкалієвого розчину від 24 до 31 °C призводило до зниження амплітуди та тривалості індукованої карбахолом (0,1 мМ) скорочувальної відповіді. Тобто, збільшення температури омиваючого смужечку розчину веде до прискорення релаксації механічної напруги ГМ [43]. Отже, виникає питання – який механізм лежить в основі цього явища?

Mg²⁺,ATP-залежній кальцієвій помпі належить фундаментальне значення у забезпеченні енергозалежного викиду іонів Са з міоцитів у позаклітинний простір. Ми показали, що підвищення температури (23-37 °C) середовища інкубації призводило до суттєвої стимуляції Mg²⁺,ATPзалежного транспорту Ca²⁺ у везикулах ПМ ГМК (рис. 3.6).



Рис<mark>.</mark> 3.6. Вплив температури на кінетику транспорту Са²⁺ в везикулах сарколеми міометрія (n=3-5); 1 – 23 [°]C, 2 – 30 [°]C, 3 – 37 [°]C

Величина енергії активації $E_a Mg^{2+},ATP$ -залежного транспорту $Ca^{2+},$ яку було розраховано за формулою Вант-Гоффа $E_a = [RT_1T_2 / (T_2-T_1)]$ $ln(v_{0T2}/v_{0T1}),$ становить 61±7 кДж/моль (n=5) (v_{0T2} та v_{0T1} - початкові швидкості акумуляції Ca^{2+} при температурах $T_2 = 303$ та $T_1 = 296$ [°] К відповідно). Одержане нами значення енергії активації Mg^{2+},ATP -залежного транспорту Ca^{2+} у везикулах сарколеми досить добре співпадає з величиною E_a для процесу релаксації карбахолової контрактури ($E_a = 67\pm 6$ кДж/моль) [43] та механічного напруження, котре активувалось калієвою деполяризацією сарколеми (60 кДж/моль) [44].

Отже, є підстави стверджувати, що Mg²⁺,ATP-залежний транспорт Ca²⁺ через сарколему ГМ матки контролює релаксацію карбахолової контрактури міометрія.

3.6. сАМР-залежна регуляція Ca²⁺,Mg²⁺-АТРазної активності у плазматичних мембранах клітин міометрія

На час виконання цієї частини роботи було відомо, що сАМР-залежне регулює скорочувальну активність фосфорилювання матки ШЛЯХОМ фосфорилювання кінази легких ланцюгів міозину, що гальмує взаємодію Проте вплив сАМР-залежного останнього 3 актином. питання про фосфорилювання на системи транспорту Ca²⁺ залишалось відкритим. Ca²⁺,Mg²⁺-АТРазна активність є біохімічним проявом функціонування кальцієвої помпи ПМ. Було показано, що ендогенне дефосфорилювання Ca²⁺,Mq²⁺-ATРазної зниженням супроводжується білків сарколеми активності на 25 % (Рис. 3.7). Фосфорилювання білків ПМ каталітичною субодиницею сАМР-залежної протеїнкінази супроводжується збільшенням 30 активності помпи на %. Фосфорилювання білків попередньо дефосфорильованих препаратів ПМ приводить до відновлення активності помпи до контрольного рівня.



Puc. 3.7. Ca²⁺,Mg²⁺-ATPазна активність сарколеми міометрія регулюється сАМР-залежним фосфорилюванням. 1 - контроль, 2 - + каталітична субодиниця сАМР-залежної протеїнкінази (M ± m, n=4). * - відмінність щодо контролю (для нативних мембран) є достовірною (p<0,05)

Таким чином, Ca²⁺,Mg²⁺-АТРазна активність сарколеми міометрія збільшується за умов сАМР-залежного фосфорилювання білків цієї структури.

3.7. Енергозалежна акумуляція Ca²⁺ у саркоплазматичному ретикулумі клітин міометрія, оброблених розчином дигітоніну

З метою дослідження властивостей внутрішньоклітинних кальцієвих пулів міометрія ми використали суспензію міоцитів матки, оброблених розчином дигітоніну. Нами була встановлена максимально ефективна концентрація дигітоніну (0,01 %) для обробки клітин, яка зумовлювала збільшування неспецифічної проникливості сарколеми, але не забезпечувала ушкодження внутрішньоклітинних мембранних структур (СР та МХ). Відомо, що в основі дії дигітоніну на ПМ лежить його здатність утворювати малорозчинні комплекси з холестерином, ЩО веде до ушкодження цієї мембрани [45]. Вміст холестерину у ПМ у 10-100 разів вищий, ніж у внутрішньоклітинних мембранах [45]. Тестування Ca²⁺-помпи СР проводили за наявності у середовищі інкубації рутенієвого червоного (10 мкМ) або азиду натрію (10 мМ) – інгібіторів акумуляції іонів Са у МХ. В наших експериментах було показано, що фактори збільшення кальцієвої ємності СР – оксалат (10 мМ) та фосфат (20 мМ) суттєво стимулювали нечутливе до дії рутенієвого червоного енергозалежне включення Ca²⁺ в пермеабілізовані міоцити із стандартного середовища інкубації, що містило АТР та Mg²⁺. Накопичення Ca²⁺ зростало зі збільшенням як часу інкубації, концентрації Са²⁺-преципітуючого аніона. цьому так i При було встановлено, що як у відсутності, так і у присутності оксалату Ca²⁺ енергозалежне включення V гладеньком'язеві клітини не

спостерігалось у відсутності Mg²⁺ у середовищі інкубації. Кальцієвий іонофор А23187 (5 мкМ), попередньо внесений до стандартного середовища інкубації, що містило оксалат (10 мМ) або фосфат (20 мМ), перешкоджав включенню Ca²⁺ у пермеабілізовані клітини міометрія. Значення уявних констант активації по Mg²⁺ К_{ма} та константи Міхаеліса по АТР К_т, які розраховували із одержаних у присутності 10 мМ оксалату концентраційних залежностей, дорівнювали 0,6 та 1,0 мМ відповідно. Селективний інгібітор кальцієвої помпи сарко(ендо)плазматичного ретикулума тапсигаргін інгібував цей процес, значення I_{0.5} становить 2 нМ. Інший селективний інгібітор кальцієвої помпи ретикулума - циклопіазонієва кислота також досить ефективно пригнічувала активність кальцієвої помпи СР клітин міометрія: значення I_{0.5} становило 0,3 мкМ (рис. 3.8). Досліджувались також ефекти інших інгібіторів активного транспорту іонів Са: для n-хлормеркурібензоату I_{0.5} становить 0,6 мкМ; для еозину (тетрабромофлюоресцеіну) І_{0.5} становить 1 мкМ; для ортованадату І_{0.5} становить 45 мкМ. Рутенієвий червоний у широкому діапазоні концентрацій (10⁻⁸-10⁻⁴ М) практично не впливав на енергозалежне накопичення іонів Са у СР міометрія за умов наявності у середовищі інкубації азиду натрію (10 мМ). який пригнічує акумуляцію Ca²⁺ у МХ.



Рис. 3.8. Концентраційні залежності впливу різних інгібіторів на Mg²⁺,ATP-залежну акумуляцію Ca²⁺ у саркоплазматичному ретикулумі пермеабілізованих клітин міометрія: 1,2,3,4,5, та 6 – у присутності тапсигаргіну, циклопіазонієвої кислоти, п-хлормеркурібензоату, еозину Y, о-ванадату або рутенієвого червоного відповідно; 1-5 – стандартне середовище інкубації містило 10 мкМ рутенієвий червоний; 6 – стандартне середовище інкубації містило 10 мМ азид натрію.

Таким чином було показано, що зручною біохімічною моделлю для вивчення енергозалежної акумуляції Са²⁺ в СР є пермеабілізовані клітини міометрія. Було досліджено властивості Са²⁺-помпи СР матки. Встановлено, що значення уявних константи активації по Mg²⁺ K_{Mg} та константи Міхаеліса по АТР К_m дорівнювали 0,6 та 1,0 мМ відповідно. Ефективність інгібуючої дії на зазначену помпу досліджуваних ефекторів задовольняє послідовності: тапсигаргін >> циклопіазонієва кислота ≥ nхлормеркурібензоат ≥ еозин Y >> ортованадат.

3.8. Акумуляція Ca²⁺ у мітохондріях клітин міометрія, оброблених розчином дигітоніну

ГМК матки, які були оброблені розчином дигітоніну (0,01 %), мали здатність накопичувати 1900±450 пмоль Ca²⁺ на 10⁶ міоцитів за 5 хв при 37 ²С із середовища інкубації, що містило 50 мМ тріс-НСІ, рН 7,4, 125 мМ КСІ, 25 мМ NaCl, 3 мМ ATP, 3 мМ сукцинат натрію, 3 мМ MgCl₂, 2 мМ фосфат калію, 10 мкМ CaCl₂ (контроль). За відсутності у середовищі інкубації сукцинату натрію накопичення Ca²⁺ зменшувалось на 30-40 %, а за умов відсутності як сукцинату натрію, так і АТР – на 89-93 % відносно контролю. За тих же умов фракція МХ, що була виділена із міоцитів матки, із середовища інкубації вищенаведеного складу акумулювала 149±18 нмоль Ca²⁺ на 1 мг білка за 5 хв (контроль), у цьому разі за відсутності у середовищі інкубації сукцинату натрію накопичення Са²⁺ зменшувалось на 9-23 %, а за умов відсутності у ньому як субстрату окислення, так і АТР - на 97-98 <mark>%</mark> відносно контролю. Інгібітори енергозалежного транспорту Ca²⁺ у МХ – азид натрію (5 мМ) та рутенієвий червоний (10 мкМ) – пригнічували накопичення Ca²⁺ у пермеабілізованих ГМК на 64-72 та 80-88 % відносно контролю. Аналогічно, азид натрію та рутенієвий червоний, що були використані у тих же концентраціях, пригнічували акумуляцію Ca²⁺ у фракції МХ, виділених із ГМК, на 52-68 та 96-98 % відносно контролю. Інгібуючий вплив рутенієвого червоного на енергозалежну акумуляцію Ca²⁺ у ГМК, що були оброблені розчином дигітоніну, був значно ефективнішим, ніж азиду натрію: значення константи інгібування Іо 5 становило 0,7±0,3 мкМ та 1,1±0,4 мМ відповідно (n=3). Кальцієвий іонофор А23187 (1 мкМ), який вносили до середовища інкубації після зупинки процесу енергозалежного включення Ca²⁺ в міоцити рутенієвим червоним (10 мкМ), викликав звільнення акумульованого катіона до зовнішнього розчину.

Наведені результати вказують на наявність у клітинах міометрія високоємнісної системи енергозалежної акумуляції Са²⁺, що локалізована у MX.

3.9. Регуляторний вплив іонів Mg та сперміну на АТР-залежний транспорт Ca²⁺ у внутрішньоклітинних структурах клітин міометрія, оброблених розчином дигітоніну

Іонам Mg належить суттєва роль у забезпеченні скорочення ГМ, зокрема міометрія [46]. Відомо, що Mg²⁺ широко використовують як токолітичний агент для пригнічення скорочення міометрія під час вагітності. Mg²⁺ пригнічує спонтанні міометріальні скорочення у концентрації 3 мМ, а також інгібує окситоцин-індуковані скорочення міометрія на 30-40 % у концентрації 8 мМ [47]. У наших експериментах за умов підвищення концентрації іонів Mg до 5 мМ ефективно стимулювалася активність Ca²⁺-транспортних систем МХ та CP (значення уявних констант активації K_a за Mg²⁺ становлять 2,8 та 0,6 мМ відповідно).

Поліаміни – це природні полікатіони, які у своїй структурі містять дві або більше аміногруп [22, 23]. Найбільш розповсюдженими представниками цієї групи є спермін, спермідін, кадаверін та путресцин. Загальна концентрація поліамінів у клітині становить 0,5-1 мМ [48]. Більшість клітинних ефектів поліамінів зумовлена їх полікатіонною природою. Зокрема показано, що поліаміни сприяють релаксації механічної напруги ГМ, в тому числі і матки [24]. Проте механізм релаксуючого впливу поліамінів на м'язову тканину залишається невизначеним. В наших експериментах за дії сперміну на накопичення іонів Са в МХ міометрія було концентраційну залежність, виявлено складну яка описується куполоподібною кривою, що має максимум при концентрації поліаміну 1 мМ, і характеризується фазами активації (концентрація поліаміну – до 1 мМ) та інгібування (концентрація поліаміну > 1 мМ) (рис. 3.9, крива 1).

131

Виходячи з уявлення про існування двох центрів зв'язування сперміну на мембрані МХ, була розроблена кінетична модель його дії на транспорт іонів Са у цих субклітинних структурах ГМ матки.

У випадку Mg²⁺,ATP-залежної кальцієвої помпи CP тестується лише фаза деякого інгібування транспортного процесу (концентрація поліаміну – 0,1 – 10 мМ) (рис, 3.9, крива 2). У порівняльному ж аспекті при використанні одного і того ж самого діапазону концентрації сперміну його модулюючий вплив на транспорт Ca²⁺ у MX виражений значно більш суттєво (спостерігається фаза активації), ніж у CP, при цьому значення уявних констант інгібування I_{0,5} практично однакові - 5,2<u>+</u>0,6 та 5,7<u>+</u>0,7 мМ відповідно.



Puc<mark>.</mark> 3.9. Залежність акумуляції іонів Са у мітохондріях (1) та саркоплазматичному ретикулумі (2) клітин міометрія від концентрації сперміну (M<u>+</u>m; n = 5).

Таким чином, об'єктом регуляторної дії сперміну (при концентрації < 1 мМ) в міоцитах матки є, переважно, кальцієвий уніпортер МХ, а не

кальцієва помпа СР. Показано, що іони Mg (концентрація до 5 мМ) ефективно стимулюють активність Ca²⁺-транспортних систем мітохондрій та саркоплазматичного ретикулума.

3.10. Визначення рівня іонізованого Са в ізольованих мітохондріях міометрія за допомогою флуоресцентного зонда fluo 3-AM

вивченні трансмембранного обміну іонів Са в MX При ΜИ використовували ізотопну техніку (⁴⁵Ca²⁺). Втім цілком очевидно, що радіоіндикаторна техніка давала можливість тестувати кількість так званого "загального" Са у мітохондріальному матриксі (тобто сукупно іонізованого та преципітованого). Оскільки функціонально активним є саме іонізований кальцій (Ca²⁺), важливо було відпрацювати методи його селективного визначення. Ізольовані МХ міометрія навантажували fluo 3-АМ (2 мкМ) при 37 С протягом 30 хв. і досліджували за допомогою методу проточної цитометрії. Як видно з наведених на рис. 3.10 результатів, додавання 100 мкМ Ca²⁺ до середовища інкубації, яке містило МХ міометрія, приводило до збільшення інтенсивності флуоресценції зонда. Внесення до інкубаційного середовища аліквоти (5 мкМ) кальцієвого іонофору A23187 разом з 1 мМ EGTA супроводжувалось зниженням інтенсивності флуоресценції барвника.

У подальших експериментах було показано, що інтенсивність флуоресценції fluo-3 збільшувалась за умов зростання концентрації Ca²⁺ в інкубаційному середовищі. Попередня інкубація МХ з 1 мкМ протонофором СССР унеможливлювала індуковане іонами Ca збільшення інтенсивності флуоресценції зонда (середовище інкубації містило 2 мМ К-фосфат).

133



Рис. 3.10. Са²⁺-індуковане зміщення піку інтенсивності флуоресценції зонда fluo 3 у середовищі інкубації, яке містило мітохондрії міометрія: 1 – у відсутності Са²⁺; 2 – після внесення 100 мкМ Са²⁺; 3 – після внесення 1 мкМ А23187 + 1 мМ ЕGTA. Метод проточної цитометрії.

Таким чином, доведено можливість використання проточного цитометра та флуоресцентного зонда для тестування змін іонізованого Са у фракції мітохондрій міометрія.

3.11. Визначення мембранного потенціалу мітохондрій міометрія за допомогою флуоресцентних зондів TMRM та MTG

Мембранний потенціал ізольованих МХ міометрія $\Delta \psi$ тестували з використанням флуоресцентного зонда TMRM (tetramethylrhodamine methyl ester, λ_{збуд.}= 488 нм, λ_{фл.}= 590 нм) у концентрації 100 мкМ. Зонд протягом 3 хв. Чутливість зонда TMRM завантажували ДО змін потенціалу ∆ψ МХ мембранного оцінювали за **YMOB** додавання

протонофору, зокрема, СССР (carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone), та олігоміцину. Протонофор СССР у концентрації 1 мкМ виступає фактором дисипації електрохімічного потенціалу внутрішньої мембрани MX. Олігоміцин інгібує надходження протонів до матриксу MX по каналу F₀, що веде до гіперполяризації мембрани [49]. В наших експериментах було показано, що додавання олігоміцину (1 мкг/мл) призводить до збільшення, а внесення протонофору СССР (1 мкМ) – до зменшення інтенсивності флуоресцентного сигналу відносно контролю.

Мембранний потенціал МХ на моделі інтактних міоцитів тестували з використанням конфокального лазерного скануючого мікроскопа LSM 510 Meta Carl Zeiss та двох потенціал-чутливих зондів TMRM та MTG. MTG накопичується у поляризованих МХ, ковалентно зв'язується з білками мембран і не виходить з цих органел за умов деполяризації. TMRM також накопичується у поляризованих МХ, проте деполяризації мембран МХ супроводжувалась виходом цього зонда, що реєструється за зниженням інтенсивності флуоресценції барвника. Як видно з рис, 3.11.1, в інтактних міоцитах матки реєструється як флуоресцентний сигнал MTG («зелений» сигнал), так і TMRM («червоний» сигнал). Інкубація клітин з 1 мкМ протонофором СССР приводить до гасіння флуоресценції TMRM, що свідчить про деполяризацію мембран MX міометрія (рис. 3.11.2).



Рис. 3.11. Тестування мембранного потенціалу мітохондрій міометрія з використанням конфокальної мікроскопії та флуоресцентних зондів ТМRM та МТG. Верхня панель — сукупна флуоресценція зондів у клітині; нижня панель — реєстрація відносного рівня інтенсивності флуоресценції зондів вздовж червоної лінії на верхній панелі. 1 — контроль, 2 — після внесення до інкубаційного середовища 1 мкМ СССР.

Отже, обрані нами методи дозволяють реєструвати зміни мембранного потенціалу ∆ψ мітохондрій з використанням відповідних флуоресцентних барвників, як у ізольованих МХ, так і в інтактних міоцитах міометрія.

3.12. Вплив антагоністів кальмодуліну на рівень іонізованого Са та мембранний потенціал мітохондрій міометрія

Добре відомо, що Ca²⁺-зв'язуючий білок кальмодулін (CaM) є первинним внутрішньоклітинним "сенсором" іонів Ca і посередником їхніх внутрішньоклітинних ефектів [25]. В літературі обговорюється питання про

можливість регуляції активності Ca²⁺ уніпортеру МХ комплексом "CaM-Ca²⁺" [26]. На користь такого припущення свідчить, зокрема, добре відомий Ca²⁺пригнічувальний ефект рутенієвого червоного на активність уніпортеру МХ, адже доведено, що рутенієвий червоний інгібує зв'язування Ca²⁺ з CaM [50]. Тому слід було очікувати, що антагоністи CaM впливатимуть на систему акумуляції іонів Са в МХ. З метою підтвердження чи спростування цього припущення ми дослідили вплив антагоністів СаМ кальмідазоліуму та трифлуоперазину, на рівень іонізованого Са в МХ за умов моделювання функціонування Ca²⁺-уніпортеру. У порівнянні з іншими антагоністами СаМ кальмідазоліум є одним з найбільш афінних [51]. Як 10 мкМ кальмідазоліуму або виявилося, внесення 100 мкМ трифлуоперазину у середовище інкубації призводило ДО ПОВНОГО гальмування акумуляції іонів Са у МХ (рис. 3.12). Отже, ці дані свідчили на користь можливої регуляції активності Ca²⁺-уніпортеру МХ за участі CaM.



Puc. 3.12 Вплив антагоністів кальмодуліну на рівень іонізованого Са у мітохондріях міометрія.

Момент часу, у який додавали Са²⁺ іонофор А23187 (5 мкМ) разом з EGTA (1 мМ), позначений стрілкою. 1 — контроль; 2 — 10 мкМ кальмідозоліум; 3 – 100 мкМ трифлуоперазин. Флуоресцентний зонд – fluo-3 AM (2 мкМ). Метод проточної цитометрії.

З іншого боку, активність Ca²⁺ уніпортеру МХ залежить також від поляризації мітохондріальної мембрани [4, 21]. Тому важливо було з'ясувати, чи не викликають антагоністи CaM дисипації мембранного потенціалу мітохондрій. З'ясувалося, що внесення 10 мкМ кальмідазоліуму та 100 мкМ трифлуоперазину у середовище інкубації призводило до дисипації мембранного потенціалу відносно контролю (рис. 3.13).





Момент часу, у який додавали протонофор СССР (1 мкМ), позначений стрілкою. 1— контроль; 2— 10 мкМ кальмідазоліум; 3— 100 мкМ трифлуоперазин. Флуоресцентний зонд— ТМRМ (100 нМ).

Отже, є підстави припустити, що гальмування акумуляції іонів Са у МХ міометрія під дією антагоністів СаМ відбувається шляхом дисипації мембранного потенціалу.

3.13. Са²⁺-індуковані зміни мембранного потенціалу мітохондрій міометрія

Раніше, використовуючи ізотопну техніку (⁴⁵Ca²⁺), ми показали, що накопичення іонів Ca²⁺ у МХ міометрія відбувається тільки за умов наявності у середовищі інкубації АТР та Mq²⁺ [29, 52, 53]. Добре відомо, що надходження іонів Ca²⁺ до МХ забезпечується функціонуванням Ca²⁺уніпортеру, активність якого залежить, перш за все, від поляризації мітохондріальної мембрани градієнта та величини катіона, який транспортується [21]. Отже, виникало питання: чому за відсутності АТР та Mg²⁺ у середовищі інкубації не відбувається накопичення Ca²⁺ в мітохондріях? Відповідь на це питання ми спробували одержати, досліджуючи рівень поляризації мембран МХ із використанням потенціалчутливого флуоресцентного зонда TMRM. Було показано, що внесення аліквоти Ca²⁺ (кінцева концентрація - 100 мкМ) у середовище інкубації, що не містило АТР та Mg²⁺, призводило до деполяризації мітохондріальної мембрани порівняно з контролем. Відомо, що зі зростанням швидкості надходження Ca²⁺ до МХ збільшується і швидкість його виходу з цих субклітинних структур [54]. Останній у МХ міометрія забезпечується за рахунок Ca²⁺-H⁺ обміну, тобто вивільнення іонів Ca буде супроводжуватись зростанням концентрації протонів у матриксі, що і приведе ДО деполяризації мембрани. За умов початкової присутності в середовищі інкубації MqCl₂ (3 мМ) і АТР (3 мМ), додавання Ca²⁺ (100 мкМ) не призводило до деполяризації мітохондріальної мембрани (рис. 3.14).



Рис. 3.14. Кінетика змін мембранного потенціалу мітохондрій міометрія. Наведено типові кінетичні криві. 1 – у стандартному середовищі інкубації (контроль), 2 – при додаванні Са²⁺ (100 мкМ), 3 – у стандартному середовищі інкубації, що містило Mg²⁺ (3 мМ) і АТР (3 мМ), при додаванні Са²⁺ (100 мкМ). У випадках кривих 1 та 3 протонофор СССР додавали на 10 хв. інкубації (зазначено стрілкою). Флуоресцентний зонд – ТМRМ (100 нМ). Метод проточної цитометрії.

Таким чином, за відсутності у середовищі інкубації АТР та Mg²⁺ додавання іонів Са призводить до швидкої деполяризації мембран МХ, що веде до інгібування активності потенціал-залежного Ca²⁺ уніпортеру МХ і, як результат, гальмується акумуляція катіона у матриксі органел.

На основі одержаних результатів ми запропонували узагальнюючу схему, на якій представлені фактори регуляції активності транспортних систем, що контролюють концентрацію іонів Са у клітинах міометрія (рис. 3.15). Збільшення концентрації Са²⁺ у клітинах міометрія забезпечується, головним чином, функціонуванням потенціал-керованих Са²⁺ каналів ПМ. З іншого боку, вплив пептидних гормонів (зокрема, окситоцину) на клітини міометрія стимулює вивільнення катіона з СР крізь IP₃-керовані Ca²⁺ канали та додаткове надходження іонів Са за участі депо-керованих каналів ПМ. Функціонування Ca²⁺-H⁺ обмінника МХ також сприяє зростанню концентрації катіона у цитоплазмі. Системи, що забезпечують зниження рівня вільного Ca у клітинах - кальцієві помпи ПМ та CP, Ca²⁺ уніпортер МХ та Na⁺-Ca²⁺ обмінник ПМ. Активність Ca²⁺ помпи ПМ (що контролює релаксацію ГМ матки) залежить від поляризації мембрани, синергічно збільшується за наявності градієнта іонів Na та сАМР-залежного фосфорилювання протеїнів цієї мембрани. Активність Ca²⁺ помпи CP та Ca²⁺-уніпортеру МХ регулюється іонами Мд. Активність Ca²⁺ уніпортеру МХ активується сперміном у концентрації до 1 мМ та пригнічується при збільшенні концентрації до 10 мМ, активність Ca²⁺-помпи CP мало чутлива до зміни концентрації сперміну (0 – 10 мМ). Антагоністи кальмодуліну блокують функціонування Ca²⁺ уніпортеру МХ та знижують рівень поляризації мітохондріальної мембрани.



Рис. 3.15. Узагальнююча схема, яка віддзеркалює фактори регуляції активності транспортних систем, що контролюють концентрацію іонів Са у клітинах міометрія. Тут: 1 – потенціал-керовані Са²⁺ канали плазматичної мембрани, 2 – депо-керовані Са²⁺ канали плазматичної мембрани, 3 – IP₃-керовані Са²⁺ канали саркоплазматичного ретикулума, 4 – Ca²⁺-H⁺ обмінник мітохондрій, 5 – Ca²⁺ помпа плазматичної мембрани, 6 – Ca²⁺ помпа саркоплазматичного ретикулума, 7 – Ca²⁺ уніпортер мітохондрій, 8 – Na⁺-Ca²⁺ обмінник плазматичної мембрани.

Ми вважаємо, що результати, описані в даній главі, є перспективними для подальшого розуміння іонних, молекулярних та мембранних механізмів електро- та фармакомеханічного спряження в міоцитах матки за патологічних станів її скорочувальної активності. З урахуванням вивчених нами механізмів регуляції Ca²⁺-транспортуючих систем міометрія, вони можуть бути значущими для створення нових фармакологічних сполук, здатних нормалізувати скорочувальну функцію матки у випадку її порушень.

ГЛАВА 4. ОКСИТОЦИН ЯК МОДУЛЯТОР СИСТЕМ ТРАНСПОРТУ ЮНІВ Са В КЛІТИНАХ МІОМЕТРІЯ

4.1. Міометрій та окситоцин

Як вже відзначалося вище, іонам кальцію (Ca²⁺) належить фундаментальне значення у регуляції найважливіших біохімічних та фізіологічних процесів (активація ензимів, внутрішньоклітинна сигналізація, контроль проникності біологічних мембран, стимуляція скорочення м'язів, зсідання крові, міжклітинна взаємодія, запліднення, секреція, ріст тощо) [1-3].

Результати біохімічних, біофізичних та електрофізіологічних досліджень, безсумнівно, вказують на те, що Ca²⁺ є регулятором процесу "скорочення-розслаблення" усіх типів м'язів, зокрема, ГМ [3, 4-12]. Тому з'ясування біохімічних механізмів електрота фармакомеханічного спряження на молекулярному, мембранному та клітинному рівнях і, зокрема, ролі Ca²⁺-транспортуючих систем у його забезпеченні, є важливим із фундаментальної точки зору. З іншого боку, дослідження закономірностей регуляції активності Ca²⁺-транспортуючих систем ГМ фізіологічно гормонами активними речовинами, ідентифікація та функціональної ролі контролі внутрішньоклітинного ЦИХ систем V кальцієвого гомеостазу відкривають перспективи розробки ефективних засобів спрямованої фармакологічної корекції зазначених систем за умов порушення трансмембранного обміну іонів Са у ГМК в разі небезпечних патологій – гіпоксії, гіпертонічної хвороби, атонії кишечника, слабкості пологової діяльності тощо [1, 3, 4, 12-15].

Матка займає особливе місце серед інших гладеньком'язових органів, що обумовлене, зокрема, специфічністю функції, яку вона виконує в організмі, а також своєрідністю регуляції скоротливої активності міометрія. Міоцити матки – це виключно складна тензоелектрохімічна рецепторна система, скоротлива активність якої контролюється статевими гормонами та гормонами гіпофіза, а також медіаторами, іонами і механічним розтягуванням [3, 12, 13, 16-19]. Фундаментальне значення в забезпеченні внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу в ГМ належить системам пасивного та активного транспорту Ca²⁺. Встановлено,також, що суттєві порушення скоротливої функції матки мають місце при зловживанні алкоголю [20].

Окситоцин (ОТ) – пептидний гормон (октапептид) задньої частки гіпофіза. Механізм дії ОТ на скоротливу активність ГМ матки був і залишається предметом досліджень учених багатьох лабораторій світу. Відомо, що дія ОТ призводить до підвищення концентрації Ca²⁺ у цитоплазмі ГМК матки. Вважали, що таке підвищення концентрації Ca²⁺ може відбуватися за рахунок збільшення надходження катіона з позаклітинного простору через кальцієві канали та/або вивільнення його з 21-24]. He внутрішньоклітинних депо [3, 19, виключали. ШО OT ліпідний матрикс безпосередньо може впливати на мембран та збільшувати кальцієву провідність останніх [25]. Однак нагальними є такі питання: ідентифікація на молекулярному рівні каналів ємніснооперованого входу іонів Са у міоцити, які забезпечують додаткове надходження Ca²⁺ з позаклітинного простору до цитоплазми за умов впливу на міометрій ОТ; - дослідження закономірностей функціонування та регуляції ОТ цих каналів; - вивчення біохімічних механізмів, що лежать в основі збільшення скорочувальної активності матки у відповідь на ОТ, зокрема, дослідження його ефектів на системи активного транспорту іонів Са; - з'ясування біохімічних закономірностей дії ОТ на накопичення іонів кальцію у внутрішньоклітинних структурах міометрія за умов створення різних етанолзалежних моделей.

Отже, ми спрямували наші зусилля на з'ясування біохімічних механізмів дії ОТ на внутрішньоклітинний гомеостаз Ca²⁺ у міометрії.

144
При цьому мова йшла за вирішення наступних проблем. 1.Визначити рівень експресії TrpC mRNA та білків у ГМ матки. 2.Дослідити біохімічні механізми регуляції ОТ каналів ємнісно-оперованого входу іонів Са в клітини міометрія. 3.Вивчити дію ОТ на системи активного Mg²⁺,ATPзалежного транспорту іонів Са в мембранних структурах ГМ матки. 4.З'ясувати біохімічні закономірності дії ОТ на накопичення іонів Са у внутрішньоклітинних структурах міометрія за умов створення різних етанолзалежних моделей у щурів.

Об'єктом дослідження у дослідах слугували системи пасивного та активного транспорту Ca²⁺ у міометрії жінок та експериментальних тварин – свиней та щурів.

Лаконічно акцентуємо увагу на методичних прийомах, що були задіяні нами при виконанні відповідних досліджень.

Суспензію клітин міометрія вагітних жінок одержували шляхом колагеназної обробки тканини; клітинну лінію РНМ1-41 створювали з використанням аденовіруса за методом [26].

Вимірювання внутрішньоклітинної концентрації кальцію проводили за допомогою установки, яка складається з оптичного інвертованого мікроскопу (Nikon TMS) (Японія) із вмонтованою експериментальною камерою та системою аплікації, ССD камерою, джерела світла, перемикача фільтрів із фільтрами (340 та 380 нм), комп'ютерної системи запису, обробки та збереження даних. У цих дослідах використовували Ca²⁺чутливий індикатор Fura-2AM.

Надекспресію hTrpC3 у клітинах лінії РНМ1-41 проводили з використанням рекомбінантного аденовірусу за методом [27].

mRNA одержували із клітин лінії PHM1-41 а також із міометрія жінок за допомогою спеціальної системи FastTrack 2,0 Kit (Invitrogen).

Полімеразна ланцюгова реакція проводилась у середовищі інкубації об'ємом 50 мкл, 100 пмоль/мл праймерів, 1,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ суміші

дезоксинуклеозидтрифосфатів, 10 U ДНК-полімерази за методом, який описано [28].

Вестерн блот аналіз здійснювали згідно стандартного протоколу. Детекцію білків проводили за допомогою системи ECL Plus. Імунореактивні смужки сканували та кількісно визначали за допомогою приладу Storm 860 (Amersham Biosciences) [28].

Фракцію ПМ міометрія одержували диференційним центрифугуванням з використанням сахарозного градієнта за методом [29].

Реєстрацію енергозалежного транспорту Ca²⁺-у везикулах ПМ міометрія свиней визначали за умов використання розчину радіоактивного $(^{45}Ca^{2+})$ кальцію [30]. Радіоактивність фільтрів вимірювали на сцинтиляційному спектрометрі SL-4000 (Франція). Кінетичні параметри Ca²⁺ транспорту розраховували енергозалежного за допомогою розробленого у відділі методу [4].

Дослідження пасивного транспорту Ca²⁺ у везикулах сарколеми міометрія свиней проводили за наступною схемою: везикули попередньо навантажували ⁴⁵Ca²⁺ протягом 30 хв. у відповідному середовищі, потім вихід Ca²⁺ ініціювали 50-кратним (ізотонічним щодо одновалентних катіонів) розведенням аліквоти везикул. Через певні проміжки часу процес зупиняли за допомогою фільтрування під вакуумом із використанням мембранних фільтрів. Радіоактивність фільтрів вимірювали за допомогою сцинтиляційного лічильника [31].

Фракцію МХ одержували із міометрія свиней за допомогою диференційного центрифугування, що було описано [32].

Реєстрацію обміну Ca²⁺ у фракції МХ проводили із використанням радіоактивного кальцію (⁴⁵Ca²⁺) [33].

Суспензію міоцитів матки невагітних щурів, естрогенізованих за добу до забору тканини, одержували методом ензиматичної дезагрегації тканини [34].

146

Транспорт Ca²⁺ у МХ та СР матки невагітних щурів досліджували на суспензії міоцитів, що були оброблені 0,01 % розчином дигітоніну (із метою збільшення неспецифічної проникності ПМ). Mg²⁺,ATP-залежну акумуляцію Ca²⁺ в СР та МХ визначали за допомогою вищеописаного ізотопного методу із використанням специфічних блокаторів транспортних процесів [35].

Експериментальне моделювання гострого, підгострого та хронічного введення етанолу в організм тварин проводили згідно рекомендацій, наведених у літературі [36-40]. Модель I (контроль). Використовували статевозрілих щурів. Модель II (підгостре введення етанолу). Статевозрілим тваринам протягом 8-ми діб внутрішньочеревно вводили 20 %-вий розчин етанолу в дозі 1 мл на 100 г маси тіла на добу (1,63 г абсолютного алкоголю на 1 кг маси тіла). Контролем були тварини, яким таким же чином вводили фізіологічний розчин у тому ж об'ємі. Модель III (гостре введення етанолу). Статевозрілим тваринам одноразово внутрішньочеревно вводили 40 %-вий розчин етанолу в дозі 1 мл на 100 г маси тіла (3,3 г абсолютного алкоголю на 1 кг маси тіла). Модель IV (хронічне споживання етанолу). Статевозрілі тварини протягом 11 місяців вживали 15 %-вий водний розчин етанолу в умовах примусової заміни води розчином спирту. При цьому не спостерігали водної депривації, тобто щури споживали достатню середньодобову кількість води.

Кінетичний аналіз біохімічних процесів проводили, базуючись на рекомендаціях, наведених раніше [41].

Статистичний аналіз проводили за допомогою визначення коефіцієнту Стьюдента, статистично достовірною різницею вважали значення для якого P<0,05.

Експериментальні дані обробляли загальноприйнятими методами варіаційної статистики [42].

147

При реєстрації і аналізі змін концентрації іонів Ca у клітинах використовували комп'ютерну програму InCyt2 (Intracellular Imaging Inc. США).

Питання біоетики. Частина роботи, яка пов'язана з використанням клітин міометрія вагітних жінок, була виконана в період наукового відрядження автора глави до Сполучених Штатів Америки (лабораторія факультету біохімії та молекулярної біології медичного університету м. Хьюстон, штат Техас, США; лабораторія факультету природничих наук університету м. Форт-Коллінз, штат Колорадо, США). Перед виконанням наукових досліджень автором були складені відповідні іспити та одержано сертифікат для роботи з біологічними матеріалами людини.

4.2. З'ясування рівня експресії ТгрС білків у ГМ матки

4.2.1. Встановлення зв'язку між дією окситоцину та активністю TrpC каналів у гладеньком'язових клітинах матки

У багатьох клітинах, включаючи клітини ΓM. спустошення внутрішньоклітинних кальцієвих пулів спряжене з активацією входу Ca²⁺ до клітини 3 позаклітинного простору. Таке явище одержало назви "capacitative cation entry" (ССЕ), або ємнісно-оперований вхід катіону [43-48].

Перш за все ми встановили функціональну активність ємніснооперованого входу Ca²⁺ у клітинах лінії РНМ1-41, що була одержана з міометрія вагітних жінок. Як показано на рис. 4.1., A – C, додавання до середовища 1 мМ Ca²⁺ не впливало на рівень внутрішньоклітинної концентрації Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i). По-перше, це вказує на непошкодженість ПМ клітин, по-друге, що функціональна активність Ca²⁺-помпи ПМ цілком дозволяє підтримувати стаціонарний базальний рівень кальцію в міоцитах матки. Після заміни Ca²⁺-вмісного буфера на Ca²⁺-невмісний до тих самих клітин додавали TG (100 нМ) – селективний інгібітор Ca²⁺-помпи CP, що призводило до звільнення Ca²⁺ із внутрішньоклітинного пула та збільшення внутрішньоклітинної концентрації цього катіона. Поступово концентрація Ca²⁺ у клітинах практично поверталась до свого базального рівня, але повторне додавання в середовище 1 мМ Ca²⁺ призводило до входження цього катіона до клітин. Подібний вхід Ca²⁺ спостерігався, якщо в середовище інкубації клітин додавали ОТ (100 нМ) (рис. 4.1., D – F). Як у випадку використання TG, клітини не реагували на попереднє введення 1 мМ Ca²⁺ до середовища інкубації та його видалення, але чітко відповідали вивільненням катіона зі CP після дії OT, та додатковим входом Ca²⁺ після додавання катіона (1 мМ) у позаклітинне середовище.

Таким чином, було доведено присутність ємнісно-оперованого входу Ca²⁺ у клітинах міометрія після спустошення CP у відповідь на дію ОТ та TG.

4.2.2. Експресія hTrpC mRNA у міометрії вагітних жінок та в клітинній лінії PHM1-41.

Полімеразна ланцюгова реакція, SDS-електрофорез та сіквенс одержаних продуктів були використані для виявлення експресії специфічних TrpC mRNA у міометрії вагітних жінок та в клітинній лінії PHM1-41. На рис. 4.2 продемонстровано, що hTrpC1, hTrpC3, hTrpC4, hTrpC6, hTrpC7 mRNA присутні як у міометрії вагітних жінок, так і у клітинах PHM1-41. Лінії 1 та 7 демонструють продукти, що специфічні для hTrpC1, а лінії 2 та 8 його сплайсові варіанти. Лінії 3 та 9 вміщують продукти ПЛР, що ідентичні до hTrp3; лінії 4 та 10 – до hTrpC4.



Рис. 4.1. Ефект тапсигаргіну (TG) (100 нМ) та окситоцину (OT) (100 нМ) на вхід Ca²⁺ до клітин РНМ1-41. А, В, D, та E — зміни [Ca²⁺]_i у двох індивідуальних клітинах; C, F — усереднені зміни [Ca²⁺]_i у 25 клітинах.



Рис. 4.2. Електрофореграма фрагментів TrpC mRNA. mRNA hTrpC1 (лінії 1 та 7), сплайсові варіанти hTrpC1 (лінії 2 та 8), hTrpC3 (лінії 3 та 9), hTrpC4 (лінії 4 та 10), hTrpC6 (лінії 5 та 11), hTrpC7 (лінії 6 та 12), що присутні як у міометрії вагітних жінок, так і в лінії клітин PHM1-41.

Відповідно, лінії 5 та 11 і 6 та 12 – продукти до hTrpC6, hTrpC7 (99% ідентичності по сіквенсу). Слід відмітити, що ми не знайшли

продуктів, що ідентичні hTrpC2. Це підтверджує той факт, що hTrpC2 у людини є псевдо геном.

Таким чином, у міометрії було продемонстровано присутність hTrpC1, hTrpC3, hTrpC4, hTrpC6, hTrpC7 mRNA та деякі їхні сплайсові варіанти.

4.2.3. Експресія hTrpC білків у міометрії вагітних жінок та в клітинній лінії PHM1-41

Імуноблот аналіз із використанням поліклональних антитіл показав присутність білків hTrpC1 із молекулярною масою (м.м.) 95 kDa як у жіночому міометрії, так і в клітинній лінії PHM1-41 (рис. 4.3.А). Також були встановлені білки hTrpC3 із м.м. 105 kDa (рис. 4.3.В). Білки hTrpC3 детектували й у клітинах COS-M6, куди їх надекспресували. Білки для hTrpC4 мали м.м. 110 kDa, що співпадало з розміром білків, які продемонстровані для клітин COS-M6, куди їх надекспресували (рис. 4.3.С). М.м. 130 kDa мали білки hTrpC6, вони були показані тільки в мембранах клітин жіночого міометрія (рис. 4.3.D).



Рис. 4.3. Результати вестерн-блот аналізу hTrpC білків у мікросомальній фракції ГМ міометрія вагітних жінок та клітин лінії PHM1-41. А. експресія hTrpC1 білків (м.м. 95 kDa) у міометрії жінок (1) та клітинах PHM1-41 (2); В. експресія hTrpC3 білків (м.м. 105 kDa) у міометрії жінок (1), 151

клітинах РНМ1-41 (2) та надекспресія hTrpC3 білків у клітинах COS-M6 (3); С. експресія hTrpC4 білків (м.м. 110 kDa) у міометрії жінок (1), клітинах РНМ1-41 (2) та надекспресія hTrpC4 білків у клітинах COS-M6 (3); D. експресія hTrpC6 білків (м.м. 130 kDa) у міометрії жінок (1) та клітинах РНМ1-41 (2).

Таким чином, встановлено, що в клітинах РНМ1-41, а також у клітинах міометрія жінок експресовані hTrpC1, hTrpC3, hTrpC4 та hTrpC6 білки.

Отже, у результаті наших досліджень було показано, що в клітинах міометрія ОТ та TG викликають додатковий вхід іонів Ca до цитоплазми після спустошення внутрішньоклітинного депо – CP. Клітини міометрія експресують TrpC mRNA та TrpC білки, з яких складаються канали ємніснооперованого входу Ca²⁺. Тобто, ми вперше виявили присутність у клітинах міометрія структур, що забезпечують додатковий вхід іонів Ca у відповідь на спустошення CP.

4.3. Біохімічні механізми регуляції окситоцином каналів ємніснооперованого входу іонів Са в клітини міометрія

4.3.1. Надекспресія hTrpC білків змінює властивості входу іонів кальцію в клітинах РНМ1-41 після спустошення саркоплазматичного ретикулума

Імуноблот мембранних препаратів контрольних клітин РНМ1-41 та клітин із надекспресією hTrpC3, демонстрував значне збільшення експресії hTrpC3 білку (рис. 4.4.А). Базальний рівень [Ca²⁺]_і в eGFP-інфікованих контрольних РНМ1-41 клітинах майже не відрізнявся від такого у випадку hTrpC3-інфікованих клітин (121±6 нМ та 138±9 нМ відповідно, n=8). eGFP використовували як маркер, флуоресценція якого допомагала селекціонувати hTrpC3-інфіковані клітини. У відсутності стимулу, що викликає ємнісно-оперований вхід катіона, додавання 1 мМ Ca²⁺ у середовище інкубації не привносило значних змін у [Ca²⁺], (133±5 нМ та 160±14 нМ відповідно). Дві популяції клітин, що експресували eGFP окремо та eGFP та hTrpC3 разом, відповідали однаковими змінами [Ca²⁺], за умов використання TG (рис. 4.4.В). Вхід іонів Ca за умов їхнього повторного додавання був значно більший у клітинах, які експресували eGFP та hTrpC3 разом, у порівнянні із клітинами, що експресували тільки eGFP (493±25 нМ та 295±16 нМ відповідно, n=4, P<0,05) (рис. 4.4).



Рис. 4.4. Збільшення експресії hTrpC3 у порівнянні з контрольними мембранними препаратами. А – імуноблот контрольних та клітин, куди надекспресували hTrpC3, відповідно; В – збільшення входу катіона після дії тапсигаргіну (TG) (100 нМ) у клітини, які експресували eGFP та hTrpC3 разом у порівнянні із клітинами, що експресували тільки eGFP (усереднені зміни [Ca²⁺]_i в 40 клітинах, n=4).

eGFP. Клітини, ЩО експресували тільки та клітини, які експресували eGFP разом з hTrpC3, відповідали на дію ОТ (100 нМ) [Ca²⁺]_i у відсутності катіона в приблизно однаковими змінами В позаклітинному середовищі (максимальне збільшення до 550±60 нМ та 578±50 нМ відповідно), але рівень іонізованого Са в клітинах значно відрізнявся за умов наступного додавання катіона в зовнішньоклітинне середовище (201±26 та 319±42 нМ відповідно, n=8, P<0,05) (рис. 4.5).

Таким чином, надекспресія hTrpC3 у клітини лінії PHM1-41 значно збільшувала вхід Ca²⁺ до клітин як у випадку дії TG, так і за умов дії OT.



Рис. 4.5. Збільшення входу Ca²⁺ в клітини РНМ1-41 після дії тапсигаргіну (TG) (100нМ) та окситоцину (ОТ) (100 нМ). Контроль — клітини, що експресували тільки eGFP у порівнянні із клітинами, які експресували eGFP та hTrpC3 разом (493±25 нМ та 295±16 нМ відповідно, n=4, P < 0,05).

4.3.2. Вхід Ca²⁺ до клітин міометрія, що індукується аналогом діацилгліцеролу – OAG

Якщо hTrpC3/6/7 білки надекспресуються у клітинах, вони здатні активуватись діацилгліцеролом [49-50]. Оскільки PHM1-41 клітини експресують mRNA усіх трьох hTrpC та експресують hTrpC3 та hTrpC6 білки [28, 51], то вони мають відповідати на дію діацилгліцеролу, якщо ці білки функціонально активні. Ми встановили, що клітини PHM1-41 відповідали на дію проникливого до клітин аналога діацилгліцеролу – OAG (100 мкМ) швидкою зміною в [Ca²⁺]_i. Відповіддю на дію OAG були осциляції [Ca²⁺]_i (рис. 6.А), які з часом зникали, що пов'язано, можливо, з метаболічними перетвореннями OAG. Інгібітори ємнісно-оперованого входу Ca²⁺ – SKF 96365 (0,1 мкМ) та Gd³⁺ (10 мкМ), блокували OAG-

стимульовані зміни [Ca²⁺]_і (рис. 4.6.В). Ефекти ОАG ми не спостерігали в середовищі інкубації, що не містило Ca²⁺. Цей факт вказує, по-перше, на важливість присутності позаклітинного Ca²⁺ для прояву ефектів ОАG. Подруге, що ендогенні hTrpC канали в клітинах жіночого міометрія активуються під дією ОАG.

Ми також дослідили індукований ОАG вхід Ca²⁺ у клітини PHM1-41, куди надекспресували hTrpC3. Контрольні клітини, які експресували тільки eGFP, відповідали на дію OAG (100 нM) у спосіб, що не відрізнявся від такого в неінфікованих клітинах. Відповідь на дію OAG варіювала між клітинами, тому для коректної оцінки впливу надекспресії на індуковані зміни [Ca²⁺]_і обчислювали середню площу цих змін (тобто площу під кальцієвими транзієнтами) за фіксований час – 10 хв, та відображали, як зміни у відносних одиницях. Надекспресія hTrpC3 у клітинах PHM1-41 збільшувала OAG-стимульовану відповідь з 9,0±0,4 (n=5) у клітинах, що експресували тільки eGFP, до 15,0±1,0 (n= 6) у клітинах з eGFP+ hTrpC3 (P<0,05) (рис. 4.7).



Рис. 4.6. Дія ОАG (100 мкМ) на клітини лінії РНМ1-41. А – додавання DMSO до середовища інкубації клітин не впливало на зміни концентрації ioнiв Ca в клітинах. DMSO використовували для приготування розчину OAG (зміни [Ca²⁺]_i в індивідуальних клітинах). В – блокування SKF 96365 (0,1 мкМ) та Gd³⁺ (10 мкМ) відповіді клітин РНМ1-41 на дію OAG (усереднені зміни [Ca²⁺]_i в 35 клітинах, n=5-7).



Рис. 4.7. Вплив надекспресії hTrpC3 на вхід іонів Са після дії OAG (100 мкМ) у клітини PHM1-41. (n= 6, P<0,05).

4.3.3. Вивільнення Ca²⁺ із саркоплазматичного ретикулума клітин міометрія та інгібування протеїнкінази С не впливає на ефекти OAG

Додавання ОАG (100 мкМ) призводило до виникнення осциляцій [Ca²⁺]_і в клітинах за умов використання Ca²⁺-вмісного середовища (рис. 4.8.А). Літературні дані свідчать, що осциляції [Ca²⁺]_і можуть бути пов'язані з циклом вивільнення та реакумуляції катіона у СР [52, 53]. З метою тестування такої можливості ми інкубували клітини жіночого міометрія з TG – селективним інгібітором Ca²⁺-помпи CP, дія якого призводить до спустошення цього пулу. За умов відсутності позаклітинного Ca²⁺ додавання в середовище ОАG (100 мкМ), за присутності TG, не приводило до виникнення Ca²⁺-осциляцій доти, доки ми не додали до розчину інкубації 1 мМ Ca²⁺ (рис. 4.8.В). Відсотковий розподіл ОАG-індукованих осциляцій був подібний до того, що спостерігався в присутності та відсутності TG. 3 іншого боку, діацилгліцерол має здатність активувати протеїнкіназу С (ПКС). Для того, щоб встановити роль ПКС у виникненні ОАG-індукованих осциляцій [Ca²⁺]_i у клітинах РНМ1-41, ми дослідили ефекти цілого ряду інгібіторів ПКС [54, 55]. ОАG-індуковані осциляції [Ca²⁺]_i не інгібувались за умов попередньої інкубації (15-45 хв.) із широким спектром інгібіторів ПКС: стауроспорином (staurosporine) (1 мкМ, інгібування більшості ізоформ ПКС, калфостіном С (calphostin C) (100нМ), хелеритрин хлоридом (chelerytrine chloride) (5 мкМ), Gö 6976 (1 мкМ, інгібітор Ca²⁺-залежної ПКС α та β_1), Ro 32-0432 (1 мкМ, інгібітор ПКС α , β_1 , β_{II} та ε), Gö6983 (1 мкМ) (інгібітор ПКС α , β , γ , δ та ζ), бізіндолілмалеімідом I (bisindolylmaleimide I) (0,5 мкМ, високоселективний інгібітор ПКС α , β_1 , β_{II} , γ , δ та ε), або за умов комбінації декількох інгібіторів (рис. 4.9.).

Таким чином, ми показали, що ПКС не задіяна в активації TrpC каналів та виникненні осциляцій [Ca²⁺]_і в клітинах PHM1-41.



Рис. 4.8. Вплив тапсигаргіну на вивільнення Са²⁺ із СР клітин РНМ1-41. **А** – індукція входу катіона до клітин за умов додавання 1 мМ розчину Са²⁺ до омиваючого середовища та виникнення осциляцій після додавання

ОАС (100 мкМ) у індивідуальних клітинах. **В** – вплив тапсигаргіну (100 нМ) та ОАС (100 мкМ) за умов відсутності позаклітинного Ca²⁺. Виникнення осциляцій після додавання 1 мМ Ca²⁺ у індивідуальних клітинах РНМ1-41.



Рис. 4.9. Вплив інгібітору активності РК С стауроспорину на здатність ОАG (100 мкМ) провокувати виникнення осциляцій [Ca²⁺]_i в індивідуальних клітинах РНМ1-41 (на рисунку представлено типові відповіді на дію ОАG за умов використання одного з інгібіторів, оскільки результати впливу інших інгібіторів ПК С на здатність ОАG викликати осциляції подібні).

Отже, нами було встановлено, що в міометрії жінок та в клітинній лінії РНМ1-41 експресуються канали, що активуються синтетичним аналогом діацилгліцеролу – OAG. Осциляції концентрації Ca²⁺, що виникають під дією OAG, не залежать від спустошення CP, але потребують присутності позаклітинного Ca²⁺. Активація TrpC каналів синтетичним аналогом діацилгліцеролу, вірогідно, не опосередковується дією ПКС.

4.4. Вивчення дії окситоцину на системи активного Mg²⁺,ATPзалежного транспорту іонів Са в мембранних структурах гладенького м'язу матки

4.4.1. Вплив окситоцину на транспорт Ca²⁺ у фракції везикул сарколеми міометрія

Експерименти по вивченню пасивного переносу Ca²⁺ у везикулах міометрія свиней проводили з використанням ізотопної техніки (⁴⁵Ca²⁺) за умов рівності концентрацій Na⁺ (150 мМ) та К⁺ (100 мМ) у середині та ззовні мембранних пухирців, тобто за ізотонічних умов. У разі пасивного вивільнення Ca²⁺ з везикул, які попередньо були навантажені цим катіоном дифузійного ході процесу (рівноважна концентрація 1 мΜ). V спостерігається повільна кінетика дифузійного процесу: значення характеристичного часу виходу Ca²⁺ (період напіввиходу) субстрату переносу в ізотонічне номінально безкальцієве середовище (розведення мембранного препарату 1:50) становить 2-3 хвилини (рис. 4.10, крива I). Цей вихід суттєво стимулюється в присутності Ca²⁺-іонофору A23187 (0,1 мкМ) (рис. 4.10, крива 4). Внесення ОТ до середовища інкубації (10⁻⁶ М) не стимулювало пасивного виходу Ca²⁺ із везикул сарколеми (час інкубації 15 хвилин) (рис. 4.10, криві 2,3). Таким чином, ОТ, як такий, не впливає на базальну проникність ПМ клітин міометрія (принаймні в концентрації 100 нМ).



Рис. 4.10. Пасивний транспорт Ca²⁺ у везикулах сарколеми міометрія. 1. контроль; 2. ОТ (10⁻⁷ М) у середовищі інкубації; 3. ОТ (10⁻⁷ М) у середовищі інкубації та в середовищі навантаження везикул Ca²⁺; 4. A23187 (10⁻⁷ М) у середовищі інкубації. Наведено типові графіки.

Раніше було показано, що у ПМ клітин міометрія є кальцієва помпа, що має високу спорідненість до субстрату переносу (К_{са}=0,3-0,6 мкМ) та забезпечує активний Mg²⁺,ATP-залежний викид Ca²⁺ з міоцитів до міжклітинного простору [7, 31, 33]. Виявилося, що попередня інкубація препаратів смужок матки свиней протягом 15 хвилин у розчині (37 °C), що вміщував ОТ 10⁻⁷ М, 1 мМ MnCl₂, 250 мМ сахарозу та 20 мМ трис-HCI (рН 7,4), з наступною гомогенізацією тканини в середовищі такого ж складу, що не вміщувало пептидний гормон, призводило до зниження Mg²⁺,ATPзалежного накопичення Ca²⁺ у фракції везикул сарколеми, яку було одержано з цих препаратів (у цих дослідах використовували ізотопну техніку – ⁴⁵Ca²⁺). Компонент Mg²⁺,АТР-залежного транспорту, шо пригнічувався ОТ, становив 20-30 % від рівня контрольного накопичення Са²⁺ (рис. 4.11, крива 3). При цьому значення початкової швидкості накопичення Ca²⁺ v_0 зменшувалось від 4,8±0,7 до 3,4±0,5 нмоль Ca²⁺/1 мг білка за 1 хв., а максимальна кількість накопиченого Ca²⁺ (P max) не змінювалася, і складала 59,8±4,9 та 63,0±7,8 нмоль Са²⁺/1 мг білка за 1 хв., відповідно (M±m; n=10).



Рис. 4.11. Вплив окситоцину на Mg²⁺, ATP-залежний транспорт у фракції везикул сарколеми міометрія. 1 та 2 середовище попередньої інкубації смужок міометрія не містило та містило окситоцин (10⁻⁷ M) відповідно; 3. компонент енергозалежного транспорту Ca²⁺, що інгібується окситоцином, розраховувався як різниця між кривими 1 та 2. Наведено типові графіки.

У незалежних дослідах, виконаних на препаратах високоочищеної Ca²⁺,Mg²⁺,ATP-ази, солюбілізованої із ПМ клітин міометрія, було продемонстровано, що ОТ (100 нМ), внесений у середовище інкубації, не впливав на активність зазначеного ферменту.

Таким чином, наші результати (рис. 4.10, 4.11), а також результати, що були одержані іншими авторами [56], свідчать про те, що ОТ (100 нМ), не впливаючи на пасивне вивільнення Ca²⁺ з везикул ПМ клітин міометрія, частково (на 20-30 %) пригнічує Mg²⁺,ATP-залежну акумуляцію Ca²⁺ у них за умов, що забезпечують взаємодію пептида з відповідними рецепторами на поверхні ГМК – при внесенні гормону у розчини для попередньої інкубації інтактних смужок ГМ або гомогенізації тканини.

4.4.2. Суспензія клітин міометрія як модель для вивчення Mg²⁺,ATPзалежного накопичення Ca²⁺ у саркоплазматичному ретикулумі міоцитів

При вивченні властивостей Са²⁺-помп внутрішньоклітинних мембранних структур, одержала розповсюдження така експериментальна модель, як суспензія клітин, які мають порушену бар'єрну функцію ПМ (внаслідок обробки суспензії детергентами, зокрема, дигітоніном) [57].

Ми дослідили вплив дигітоніну (у діапазоні 0-0,2 мг/мл) на нечутливе до дії рутенієвого червоного (10 мкМ) включення Ca²⁺ до ГМК матки щурів зі стандартного середовища інкубації, яке містило Mg²⁺ (3 мМ), АТР (3 мМ) та оксалат калію (10 мМ) (рис. 4.12).

Крива залежності акумуляції іонів Са в присутності оксалату від концентрації дигітоніну мала куполоподібний вигляд (рис. 4.12, крива 1). У детергенту в стандартному інкубаційному відсутності середовиші акумуляція Ca²⁺ не перевищувала 70 пмоль Ca²⁺/10⁶ клітин за 10 хвилин. Підвищення концентрації дигітоніну до 0,08 мг/мл індукувало ріст акумуляції Ca²⁺ у міоцитах. Подальше збільшення концентрації детергенту до 0,2 мг/мл викликало зниження кількості акумульованого Ca²⁺ (рис. 4.12, крива 1). Незалежно від концентрації дигітоніну V інкубаційному середовищі високоефективний селективний інгібітор Mg²⁺,ATP-залежної кальцієвої помпи СР терпеновий лактон TG [58,59] у концентрації 50 нМ повністю пригнічував нечутливу до рутенієвого червоного акумуляцію Ca²⁺ у міоцитах (рис. 4.12, графік 2).

З іншого боку, нами було продемонстровано, що акумуляція іонів Са в оброблених дигітоніном міоцитах, що є резистентною до дії TG (50 нМ) та унеможливлюється рутенієвим червоним (10 мкМ) чи азидом натрію (5 мМ), є, безперечно, віддзеркаленням функціонування Ca²⁺-уніпортеру MX. Таким чином, було розроблено експериментальну модель, яка дозволяє надійно тестувати Mg²⁺,ATP-залежне накопичення Ca²⁺ у CP клітин міометрія.



[дигітонін], мг/мл

Рис. 4.12. Вплив дигітоніну на нечутливу до дії рутенієвого червоного (10 мкМ) акумуляцію Ca²⁺ у CP клітин міометрія. Середовище інкубації містило: ATP (3 мМ), Mg²⁺ (3 мМ), оксалат (10 мМ). 1. у відсутності тапсигаргіну; 2. + 50 нМ тапсигаргін. Наведено типові графіки.

4.4.3 Чутливість кальцієвої помпи саркоплазматичного ретикулума міометрія до дії окситоцину

Попередня обробка інтактних міоцитів розчином окситоцину (100 нМ) протягом 5 хвилин до внесення дигітоніну та АТР у Mg²⁺- та оксалатвмісне середовище призводила до зниження нечутливої до дії рутенієвого червоного Mg²⁺,ATP-залежної акумуляції Ca²⁺ у клітинах міометрія щурів (рис. 13, крива 2) відносно контрольного рівня (рис. 4.13, крива 1). Інгібуючий ефект ОТ (в середньому 25-30 %, M±m; n=7) на акумуляцію Ca²⁺ у міоцитах, що були оброблені дигітоніном, спостерігався й за умов попередньої обробки (5 хв.) інтактних ГМК розчином октапептидом (100 нМ) з наступною відмивкою. Тд повністю інгібував Mg²⁺,ATP-залежну акумуляцію Ca²⁺ у CP клітин міометрія (рис. 4.13, графік 3).



Рис. 4.13. Вплив окситоцину на кінетику акумуляції Са²⁺ у СР клітин міометрія. Середовище інкубації: дигітонін (0,1 мг/мл), АТР (3 мМ), Mg²⁺ (3 мМ), рутенієвий червоний (10 мкМ) та оксалат калію (10 мМ). 1. без попередньої інкубації клітин з окситоцином (контроль); 2. попередня інкубація клітин з окситоцином (100 нМ); 3. +50 нМ тапсигаргін без попередньої інкубації клітин з окситоцином або з такою. Наведено типові графіки.

Отже, одержані результати вказують на те, що стимулятор скорочення матки ОТ частково інгібує як Mg²⁺,ATP-залежну кальцієву помпу ПМ, так і кальцієву помпу СР клітин міометрія. Такий механізм, як ми вважаємо, може лежати в основі своєрідного позитивного зворотного зв'язку, спрямованого на пролонговану підтримку підвищеної концентрації іонів Са в міоцитах матки при дії ОТ.

4.5. З'ясування біохімічні закономірності дії окситоцину на накопичення іонів Са у внутрішньоклітинних структурах міометрія за умов створення різних етанолзалежних моделей у щурів

З літературних джерел відомо, що за умов хронічного надходження етанолу в організм відбуваються структурно-функціональні зміни 164 внутрішньоклітинних Ca²⁺-депо. Так, на прикладі серцевого м'яза продемонстровано, що за умов довготривалого вживання етанолу збільшується надходження Ca²⁺ у клітини, порушуються структурнофункціональні властивості МХ [60]. У випадку скелетних м'язів при хронічному вживанні етанолу спостерігаються морфологічні зміни СР [61]. Модифікація внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу, а також морфологічні зміни у випадку МХ та ретикулума можуть бути важливим етапом у розвитку патологічних процесів при хронічному алкоголізмі [60, 62, 63]. З метою дослідження впливу алкоголю на ОТ-чутливе накопичення Ca²⁺ у внутрішньоклітинних мембранних структурах міометрія було вивчено вплив підгострого, гострого та хронічного вживання етанолу щурами (моделі II, III та IV відповідно) на активність Mg²⁺,ATP-залежної Са²⁺-помпи СР та електрофоретичної Са²⁺-акумулюючої системи МХ міоцитів матки.

Було продемонстровано, що у випадку всіх моделей мало місце зниження початкової швидкості акумуляції іонів Са v_0 у СР відносно контролю. Попередня обробка суспензії клітин міометрія розчином ОТ (100 нМ) до внесення в середовище інкубації фактора пермеабілізації ПМ дигітоніну, призводила до часткового інгібування Mg²⁺,ATP-залежної акумуляції Ca²⁺ в СР не лише у випадку контролю (модель I), але й у випадку моделей підгострого (модель II) та гострого (модель III) введення етанолу. Дійсно як у випадку контролю, так і у випадку моделей II та III, попередня обробка суспензії клітин міометрія розчином ОТ призводила до зниження v_0 Mg²⁺,ATP-залежної акумуляції Ca²⁺ у СР у середньому в 1,7-1,9 разів. У випадку ж моделі IV гальмівний ефект окситоцину на v_0 практично не спостерігався (рис. 4.14).

Отже, у випадку хронічного споживання етанолу (модель IV) має місце втрата чутливості Mg²⁺,ATP-залежної кальцієвої помпи CP до інгібуючої дії окситоцину. Було також продемонстровано, що за умов хронічного споживання етанолу (модель IV) відбувається й суттєве зменшення чутливої до дії рутенієвого червоного, але резистентної до дії TG, акумуляції іонів Ca у MX міометрія (з 3091 ± 227 пмоль Ca²⁺/10⁶ клітин/5 хвилин у контролі до 314 ± 49 пмоль Ca²⁺/10⁶ клітин/5 хвилин за умов хронічного споживання етанолу, M±m; n=4-6).

Можливо, що втрата чутливості Ca²⁺-помпи CP міометрія до гальмівної дії OT в умовах хронічного споживання етанолу є компенсаторною реакцією, що запобігає збільшенню концентрації Ca²⁺ у міоцитах матки на фоні суттєвого зниження Ca²⁺-акумулюючої функції ретикулума та MX.



Рис. 4.14. Вплив попередньої обробки суспензії клітин міометрія розчином окситоцину (100 нМ) на початкову швидкість v₀ Mg²⁺,ATP-залежної акумуляції Ca²⁺ CP у випадку моделей I - IV (M±m; n=4-6). 1 та 2 – у відсутності та в умовах попередньої обробки суспензії міоцитів розчином пептидного гормону, відповідно; */ - відмінності між величинами початкових швидкостей акумуляції катіона v₀ вірогідні (P<0,05) відносно контролю (модель I).

На основі результатів, що були одержані нами, а також із використанням даних інших лабораторій, ми пропонуємо такий узагальнений біохімічний механізм впливу ОТ на внутрішньоклітинний кальцієвий гомеостаз у міометрії (рис. 4.15). 1. ОТ зв'язується з відповідним рецептором на мембрані клітини, що викликає, по-перше, вхід іонів Са з позаклітинного простору через потенціалкеровані кальцієві канали; по-друге, індукує процес, пов'язаний з активацією фосфоліпази С та появою інозитол-1,4,5-трисфосфату (IP₃) та діацилгліцеролу. 2. IP₃, у свою чергу, зв'язується з відповідним рецептором на поверхні СР, що стимулює вивільнення Ca²⁺ із цього внутрішньоклітинного депо. 3. Спустошення СР активує ТгрС канали, які розташовані на поверхні ПМ, та викликає додатковий вхід Ca²⁺ із позаклітинного простору (власні дані). Такий масований вхід Ca²⁺ до клітини призводить до скорочення ГМ матки. 4. Свій внесок у механізм дії ОТ вносить і другий продукт реакції, що каталізує фосфоліпаза С – діацилгліцерол, який самостійно, без посередників впливає на активність TrpC каналів (власні дані). 5. Збільшення концентрації вільного Са в цитоплазмі веде до збільшення такої в матриксі МХ. 6. Одночасно пептидний гормон частково інгібує кальцієві помпи ПМ та СР (власні дані), що, у свою чергу, призводить до зменшення викиду катіона до позаклітинного простору за допомогою Ca²⁺помпи ПМ та зворотної реакумуляції в СР. Отже, часткове інгібування ОТ активності кальцієвих помп ПМ та СР повинне сприяти подовженню часу існування підвищеної концентрації вільного кальцію в клітинах міометрія, що, безперечно, має велике значення для нормального функціонування матки в період пологів та післяпологовий період. Що ж стосується втрати чутливості Ca²⁺-помпи CP міометрія до гальмівної дії OT в умовах хронічного споживання етанолу (власні дані), то можливо, що такий ефект ОТ запобігає збільшенню концентрації Ca²⁺ у міоцитах матки на фоні суттєвого зниження Ca²⁺-акумулюючої функції ретикулума та МХ.

Вищенаведені експериментальні результати щодо змін у енергозалежному накопиченні іонів Са у внутрішньоклітинних мембранних структурах (МХ, СР) міометрія та втрати чутливості Са²⁺-помпи СР до інгібуючої дії утеротоніка ОТ за умов хронічного споживання етанолу є перспективними для подальшого тлумачення біохімічних аспектів дії алкоголю на електро- та фармакомеханічне спряження в матці. Ми вважаємо, що експериментальні моделі, що були використані (суспензія міоцитів матки, пермеабілізованих дигітоніном, культура тканин міометрія) є корисними для проведення скринінгу нових фармакологічних засобів – регуляторів скоротливої функції матки.

> позаклітинний простір [Ca²⁺]_e ~ 10⁻³ М



 $[Ca^{2+}]_i < 10^{-7} M$

Puc. 4.15. Узагальнений біохімічний механізм дії утеротонічного пептидного гормону окситоцину на гомеостаз іонів Са в клітинах міометрія (VOC – потенціалкеровані канали; Trp канали. шо активуються спустошенням саркоплазматичного ретикулума; ПМ – плазматична мембрана; ПМ помпа – кальцієва помпа плазматичної мембрани; СР – саркоплазматичний ретикулум; СР помпа – кальцієва помпа саркоплазматичного ретикулума; МХ – мітохондрії; МХ уніпортер – кальцієвий уніпортер мітохондрій; ОТ – окситоцин; ОТR – рецептор G-білок: PLC окситоцину: Ga фосфоліпаза PIP_{2} _ _ C: фосфатидилінозитолдифосфат; IP₃ – інозитолтрисфосфат; DAG – діацилгліцерол; IP₃R – рецептор інозитолтрисфосфату; GDP, GTP – гуанозиндифосфат та гуанозинтрифосфат відповідно).

Інгібуючий ефект окситоцину Активуючий ефект окситоцину

Безперечно, з'ясування закономірностей та механізму утеротонічної дії оборотних ефекторів, що здатні селективно модулювати активність енергозалежних Ca²⁺-транспортуючих систем, має велике практичне значення. Так, зокрема, у незалежних дослідах нами було знайдено, що утеротонік сигетин (дікалієва сіль мезо-3,4-ді(n-сульфо-феніл)-гексану) інгібував Mg²⁺,ATP-залежний транспорт Ca²⁺ через ПМ міоцитів матки. Ми також знайшли, що калікс[4]арен C-91 у концентрації 100 мкМ здатний стимулювати (в 1,7 разів) накопичення Ca²⁺ у МХ міометрія, практично не впливаючи на Mg²⁺,ATP-залежну кальцієву помпу CP. Вищезазначені результати, разом із даними щодо ефектів окситоцину, є перспективними для подальшого вивчення іонних та мембранних механізмів дії вказаних речовин – регуляторів скоротливої функції міометрія.

Отже, з використанням методів біохімії та молекулярної біології нами були проведені комплексні дослідження механізмів дії утеротонічного пептидного гормону ОТ на Ca²⁺-транспортуючі системи міометрія. Було показано, що клітинна лінія РНМ1-41 та клітини міометрія жінок експресують mRNA hTrpC1, hTrpC3, hTrpC4, hTrpC6, hTrpC7 та деякі сплайсові форми mRNA hTrpC1 та hTrpC4. Встановлено, що в ГМ матки жінок експресуються hTrpC білки, які приймають участь у регуляції концентрації вільного кальцію в клітинах міометрія. Доведено, що ОТ та TG викликають вхід іонів Са до клітин міометрія через hTrpC канали. Показано, що зміни в експресії hTrpC білків призводять до змін параметрів кальцієвих сигналів у клітинах ГМ. Нами також було встановлено, що hTrpC канали ПМ ГМК матки жінок не є селективними до іонів Са та активуються синтетичним аналогом діацилгліцеролу (OAG). Активація hTrpC каналів діацилгліцеролом не опосередковується ПКС. Було проаналізовано характер внутрішньоклітинних осциляцій концентрації іонів Са, ЩО

виникають у відповідь на дію синтетичного аналогу діацилгліцеролу в клітинах культури міометрія жінок та в клітинній лінії РНМ1-41. Ми знайшли, що до виникнення внутрішньоклітинних осциляцій концентрації іонів Са, за умов дії синтетичного аналогу діацилгліцеролу, має відношення тільки позаклітинний Ca²⁺. Було доведено, що ОТ частково гальмує транспортну активність Mg²⁺, ATP-залежних кальцієвих помп ПМ та CP міометрія. Показано, що за умов хронічного споживання етанолу самками щурів відбувається зменшення акумуляції іонів Са як у МХ, так і у CP міометрія та гальмування початкової швидкості цього процесу. При цьому втрачається чутливість Mg²⁺, ATP-залежної кальцієвої помпи CP до гальмівної дії ОТ. I, нарешті, нами було запропоновано концептуальну узагальнюючу схему біохімічного механізму регуляції окситоцином транспорту Ca²⁺ у міометрії.

Ми вважаємо, що у теоретичному відношенні одержані результати мають значення для розуміння біохімічних основ дії утеротонічного пептидного гормону ОТ на трансмембранний обмін іонів Са в міометрії, з'ясування іонних, молекулярних та мембранних механізмів фармакомеханічного спряження в ГМ. Доказ того, що hTrpC білки задіяні в регуляції концентрації іонізованого Са в міоцитах матки, сприяє тлумаченню ролі систем пасивного транспорту Ca²⁺, що локалізовані в ПМ, у забезпеченні внутрішньоклітинної кальцієвої сигналізації в міометрії. Дані щодо неселективності hTrpC каналів до іонів Са та їхньої активації під дією діацилгліцеролу, чутливості активності Mg²⁺, ATP-залежних кальцієвих помп ПМ та СР до інгібуючої дії ОТ, надають нову інформацію щодо закономірностей метаболічної регуляції систем пасивного й активного транспорту Ca²⁺, їхньої участі в контролі скоротливої функції матки. У практичному відношенні ідентифікація та з'ясування ролі TrpC каналів може бути підґрунтям для створення фармакологічних агентів, здатних функцію селективно впливати на скоротливу матки. Одержані експериментальні дані щодо порушення енергозалежного накопичення

170

іонів Са в МХ та СР міометрія й втрати чутливості Mg²⁺,ATP-залежної кальцієвої помпи ретикулума до інгібуючої дії ОТ за умов хронічного споживання етанолу, є важливими для тлумачення біохімічних аспектів дії алкоголю на гомеостаз Ca²⁺ в міоцитах матки, її скоротливу функцію. Відпрацьовані експериментальні біохімічні моделі (суспензія міоцитів матки, що пермеабілізовані дигітоніном; культура клітин міометрія) є корисними для подальшого скринінгу та вивчення механізму дії нових фармакологічних засобів – регуляторів скоротливої функції ГМ матки.

ГЛАВА 5. ОКСИД АЗОТУ ЯК МОДУЛЯТОР СИСТЕМ ТРАНСПОРТУ ЮНІВ Са В КЛІТИНАХ МІОМЕТРІЯ

5.1. ВИВЧЕННЯ ІОННИХ, МОЛЕКУЛЯРНИХ ТА МЕМБРАННИХ МЕХАНІЗМІВ ДІЇ ОКСИДУ АЗОТУ НА Са²⁺-ТРАНСПОРТУВАЛЬНІ СИСТЕМИ – ВАЖЛИВА ПРОБЛЕМА БІОХІМІЇ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ

У зв'язку із інтенсивним дослідженням значення оксиду азоту (NO) та його похідних (активні форми азоту) в механізмах розслаблення ГМ [1], розпочалось також вивчення ролі NO в регуляції скоротливої активності міометрія. Дослідження останніх років дозволяють висунити аргументоване припущення стосовно значення NO в процесах, які попереджають контрактильну відповідь на розтягнення стінок матки в процесі росту ембріону та зменшують чутливість міометрія до утероконстрикторних агентів. місце за вагітності в умовах підвищеного рівня ШО має прогестерону в тканинах матки (прогестеронова блокада) [2-4]. Як продукція NO, так і чутливість до нього, знижуються наприкінці вагітності і передують початку пологової активності [3-7]. Джерелами NO в матці можуть слугувати її ендометріальна тканина та ендотелій судин. Ідентифіковані нервові закінчення, які містять нейрональну NO-синтазу і забезпечують нітрергічну інервацію матки [8-10]. NO може продукуватись також плацентою і трофобластами в період ранньої вагітності [9, 11].

Донори оксиду азоту викликають релаксацію міометрія як невагітних жінок, так і тих, які мають різні строки вагітності [12, 13]. Відповідне зниження контрактильної здатності ГМК матки показано також і для окремих видів тварин, у тому числі для щурів та приматів в різні періоди функціональної активності органу [14-20]. В клінічних дослідженнях продемонстровано, що донор NO нітрогліцерин зменшує частоту передчасних пологів [21]. Водночас, біохімічні механізми, за якими NO контролює скоротливу функцію міометрія, на сьогодні остаточно не з'ясовані.

Фізіологічна активність міоцитів залежить, передусім, від концентрації Са²⁺ в міоплазмі і ефективності функціонування скоротливих білків. В клітинах ГМ основними шляхами регуляції контрактильної функції з боку NO можуть бути його вплив на мембранні транспортувальні системи, які контролюють Ca²⁺-гомеостаз, та модуляція активності протеїнів, що забезпечують роботу скоротливого апарату [22].

В клітинах різних типів ГМ м'язів релаксуючій ефект NO пов'язаний із зростанням вмісту циклічного гуанозин-3',5'-монофосфату (сGMP) в міоплазмі [1, 23, 24]. Збільшення вмісту циклічного нуклеотиду за дії NO виявлено в експериментах, проведених на міометрії жінок та щурів у різні періоди вагітності [12, 15, 16, 18, 19]. Втім, значення сGMP поставлено під сумнів в роботах, проведених на міометрії невагітних і вагітних жінок, приматів, щурів, мурчаків [12, 13, 17, 18]. Продемонстровано, що донори NO викликають релаксацію механічної напруги незалежно від присутності інгібіторів розчинної гуанілатциклази [17]. Отже, хоча за дії NO і спостерігається зростання вмісту циклічного нуклеотиду в міоплазмі, останнє не є необхідною і достатньою умовою для фізіологічної відповіді. Альтернативним механізмом дії NO в ГМ, зокрема в міометрії, може бути безпосередня хімічна модифікація іонних каналів та помп, яка веде до зміни ЇХНЬОЇ активності і може здійснюватись високореакційними нітрозилюючими похідними NO, зокрема катіоном нітрозонію (NO⁺), діоксидом азоту (NO₂), нітроксил-аніоном (NO⁻) тощо [3, 25-27]. Зазначені редокс-форми NO утворюються при застосуванні таких широковживаних нітросполук, як нітропрусид та нітрит натрію, відповідно донора та попередника оксиду азоту [25, 27].

Зростання концентрації Са²⁺ в міоплазмі є першою і основною умовою розвитку скорочення. Другою умовою є утворення комплексу Са²⁺ з кальмодуліном із подальшою активацією скоротливого апарату [22, 28, 29]. У відповідності до цього, системи підтримання Са²⁺-гомеостазу, поряд із

173

кальмодуліном, потенційно цілком можуть бути основними мішенями дії NO як міорелаксуючого фактору.

Отже, здатність оксиду азоту розслабляти міометрій зумовлює інтерес до використання донорів і попередників NO в акушерськогінекологічній практиці, водночас недостатня інформація стосовно Ca²⁺залежних біохімічних механізмів його дії на ГМ матки гальмує процес створення і використання ефективних токолітичних фармпрепаратів. Тому дослідження іонних, молекулярних та мембранних механізмів дії оксиду азоту на Ca²⁺-транспортувальні системи міоцитів матки являє значний інтерес як в теоретичному, так і практичному аспектах. Біохімічні закономірності регуляції Ca²⁺-гомеостазу клітин міометрія активними формами азоту та шляхи їхнього утворення в матці вивчені недостатньо. Зокрема, залишаються майже не з'ясованими питання щодо: шляхів біосинтезу NO в тканинах матки; впливу активних форм азоту на системи пасивного та енергозалежного транспорту Ca²⁺, що локалізовані на рівні ПМ, СР та МХ; механізмів модуляції NO трансмембранного потенціалу на плазмалемі внутрішній мітохондріальній мембрані; та ефективності зв'язування Ca²⁺ з кальмодуліном за дії NO. Вирішення цих питань є необхідною умовою спрямованого пошуку утерорелаксуючих агентів, створених на основі донорів та попередників оксиду азоту.

5.2. Зміни вмісту оксиду азоту в ендометрії за дії специфічних речовин-регуляторів скоротливої активності матки

Аналіз даних літератури дозволяє розглядати ендометрій матки у якості важливого джерела NO, який здатний контролювати контрактильну функцію нижче розташованого міометрія [9, 10].

174



Рис. 5.1. Вплив 10 нМ естрону (світлі стовпчики), прогестерону (темні стовпчики) (а) та 10 нМ ОТ (б) на продукування оксиду азоту стромальними клітинами ендометрія в позаклітинне середовище. * - позначено статистично достовірні зміни (р≤0,05), n=5; крива (б) — результат типового досліду.

Проведеними нами дослідженнями [30] встановлено, що прогестерон (1 нМ) та ацетилхолін (10 нМ, 1 мкМ), але не естрон (1 нМ), який продукується плацентою [31] і тому використаний нами для порівняння, стимулюють утворення NO стромальними клітинами ендометрія протягом короткотривалої дії (15-30 с). За відносно тривалого впливу (1-3 год) прогестерону, але не естрону, спостерігається посилення синтезу NO в позаклітинне середовище, що характерне для паракринних регуляторів (рис. 5.1, а).

Функціональний антагоніст прогестерону утероконстрикторний пептид ОТ пригнічував базальну продукцію NO ендометрієм (рис. 5.1, б), але цей ефект не спостерігався за присутності еквімолярної концентрації прогестерону.

В дослідах з ацетилхоліном також зафіксовано відносно тривале (спостереження протягом 1 год) посилення продукції NO в позаклітинне середовище, в середньому в 1,5 рази [32]. Наведені факти свідчать на користь того, що ендометрій може бути джерелом активних форм азоту, біосинтез яких регулюється гормонами та ацетилхоліном.

5.3. Дослідження показників пасивного та енергозалежного транспорту Ca²⁺ плазмалеми міометрія за дії NO

Міометрій є об'єктом впливу активних форм азоту – паракринних регуляторів, що продукуються ендометрієм. Тому досліджували дію нітросполук (нітропрусиду натрію, нітриту натрію) на системи пасивного і енергозалежного транспорта Ca²⁺ в ПМ клітин міометрія.

Встановлено залежне від концентрації та часу (в межах 5 хв) зростання проникності везикульованих препаратів сарколеми до Ca²⁺ під впливом нітросполук, зокрема нітриту натрію (SN), рис. 5.2, а [33].



а

б

Рис. 5.2. Вплив SN на пасивний транспорт Ca²⁺ в везикульованій сарколемі міометрія: (а) – концентраційна залежність (результат типового досліду); (б) – в умовах хімічної модифікації поверхні мембрани: дициклогексилкарбодіїмідом мΜ 1 мΜ стовпчик 1, 1 _ тринітробензолсульфоновою стовпчик 1 кислотою _ 2. мΜ дитіотреїтолом – стовпчик 3; за 100 % прийнятий рівень акумуляції катіона під впливом модифікаторів, n=5.

Обробка мембрани специфічними модифікаторами її поверхні, а саме дициклогексилкарбодіїмідом (реагентом карбоксильні на групи), тринітробензолсульфоновою кислотою (реагент аміногрупи) на та дитіотреїтолом (взаємодіє із тіольними групами), продемонструвала важливість аміно- та карбоксильних груп в реалізації ефекту SN. В умовах використання вищезазначених специфічних реагентів стимулювальний ефект SN або не спостерігається, або змінюється на інгібіторний (рис. 5.2, б) [34].

Нітропрусид натрію, SNP (0,1 мМ) та SN (10 нМ - 0,1 мМ) пригнічують активність транспортувальної Ca²⁺,Mg²⁺-ATPaзи сарколеми (питома активність ензиму складає 35±3 нмоль P_i/мг протеїну за хв, n=22). Досліджувані речовини чинять специфічний вплив на мембрану, оскільки Ca²⁺-незалежна Mg²⁺-ATPaзa (її питома активність складає 278±25 нмоль P_i/мг протеїну за хв, n=23) виявилась абсолютно резистентною до їхньої дії (рис. 5.3, а).



Рис. 5.3. Вплив нітросполук на Ca²⁺,Mg²⁺-АТРазну активність фракції сарколеми міометрія: (а) – порівняльний ефект SNP на Ca²⁺,Mg²⁺-АТРазну (стовпчик 1) та Mg²⁺-АТРазну реакції (стовпчик 2); (б) – дія SNP та SN у присутності 1 мМ дитіотреїтола (ДТТ), n=7-8. За 100 % прийнято значення ензиматичної активності за відсутності діючих речовин в середовищі.

За відносно високих концентрацій SN (0,1 мМ) спостерігається активація ензиму, виражена ЩО здатна забезпечити ефективне транспортування катіону проти концентраційного градієнту з клітини для Са²⁺-перевантаження захисти від в умовах виникнення загрози нітрозативного стресу.

В основі інгібувального впливу на досліджувану активність лежить модифікація функціонально-важливих тіольних, карбокси- та аміногруп ензиму. Зокрема, інгібування Ca²⁺,Mg²⁺-ATPaзи не спостерігається за присутності дитіотреїтолу (рис. 5.3, б). [35]



Рис. 5.4. Дія 0,1 мМ SNP (стовпчик 1) та 10 нМ SN (стовпчик 2) на величину питомого накопичення Ca²⁺ міоцитами матки в умовах калієвої деполяризації. За 100 % прийнято рівень акумуляції за деполяризації, n=5.

Транспорт Ca²⁺ в міоцити, стимульований калієвою деполяризацією (ізотонічна заміна 40 мМ NaCl на KCl в робочому середовищі), який інгібується 1 мМ кадмієм та 1 мкМ ніфедипіном, суттєво посилювався SNP та SN (рис. 5.4).

Таким чином, в міометрії NO здатний підвищувати проникність сарколеми до Ca²⁺ і стимулювати транспорт цього катіону у міоцити в умовах активації потенціал-керованих Ca²⁺-каналів. Зазначені мембранні та іонні ефекти можуть зумовлювати короткотривале збільшення концентрації катіону в субсарколемному регіоні, що призведе до активації Ca²⁺-залежних К⁺-каналів із послідуючим зростанням поляризації плазмалеми та зниженням рівня збудливості міоцитів.

5.4. Біохімічні механізми поляризації плазматичної мембрани міоцитів матки під впливом оксиду азоту

рівня Для перевірки останнього припущення вивчали зміни поляризації ПМ міоцитів за дії нітросполук із застосуванням методу цитофлуориметрії потенціал-чутливого протокової та зонду 3,3'-дигексилокарбоцианіну $(DiOC_6(3))$ карбоцианінового ряду y експериментально підібраній концентрації 100 нМ [36].

Встановлено, що в умовах штучної деполяризації МХ 5 мМ азидом натрію, SNP та SN викликають виражене зростання трансмембранного потенціала плазмалеми лише за фізіологічних концентрацій позаклітинного Ca²⁺ (1,26 мМ). За низьких концентрацій Ca²⁺ (0,03 мМ) або при хелатуванні катіона 1 мМ ЕГТО поляризуючий ефект нітросполук слабко виражений (рис. 5.5).



Рис. 5.5. Зміни трансплазмалемного електричного потенціала міоцитів за дії 0,1 мМ нітросполук: а — SNP, б — SN; крива 1 — 1 мМ ЕГТО, крива 2 — 0,03 мМ Ca²⁺, крива 3 — 1,26 мМ Ca²⁺, n=6.

У присутності інгібітора дигідропіридин-чутливих Ca²⁺-каналів нітрендипіну поляризуюча дія NO не була помітною (рис. 5.6).

Застосування блокаторів К⁺-каналів тетраетиламонію та 4-амінопіридину викликало деполяризацію ПМ, на фоні якої зростання трансмембранного потенціала за дії нітросполук майже не спостерігалось (рис. 5.6).



Рис. 5.6. Зміни поляризації плазмалеми міоцитів матки під дією специфічного блокатора дигідропіридинчутливих Са²⁺-каналів нітрендипіну та інгібітора К⁺-провідності - тетраетиламонію (TEA), а також SNP та SN (0,1 мМ). Для усунення впливу МХ клітини передінкубовані 5 хв з 5 мМ азидом натрію, n=5.

Важливим напрямком сGMP-незалежної дії активних форм азоту в різних клітинах, зокрема ГМ, є пряма стимуляція К⁺-каналів ПМ [37, 38].

Нами показана можливість використання методу протокової цитофлуориметрії для дослідження формування та змін К⁺-дифузійного квазістаціонарного мембранного потенціалу на везикульованій сарколемі міометрія за присутності валіноміцину (0,5 мкМ) із використанням $DiOC_6(3)$ [39]. інтенсивність флуоресценції при Максимальну реєстрували концентрації зонда 5 мкМ та вмісті протеїну 150 мкг/мл суспензії везикульованих препаратів сарколеми. Величина трансмембранного потенціала відповідає розрахованій за рівнянням Нернста (рис. 5.7).

Аналіз експериментальних даних (рис. 5.8) дає підстави припустити, що SN, але не SNP, поляризує мембрану за відсутності валіноміцину та призводить до дисипації раніше наведеного потенціала, що може бути пояснене збільшенням проникності мембрани до К⁺ за дії досліджуваних сполук.


Рис. 5.7. Вплив різних концентрацій позавезикулярного K^+ ([K^+]_e) на флуоресцентну відповідь DiOC₆(3): **1**- розраховане за рівнянням Нернста значення $\Delta \varphi$ при 23 ⁰C; **2** – везикули типу [K^+]_i/[K^+]_e+[Ch⁺]_e, де [Ch⁺]_e – концентрація холіну у позавезикулярному середовищі, [K^+]_i - концентрація внутрішньовезикулярного K^+ (300 мМ). Коефіціент кореляції г становив 0,98±0,03, n=5.

Одержані результати свідчать, що NO викликає Ca²⁺-залежну поляризацію ПM клітин міометрія, яка обумовлена активацією її К⁺проникності. Поряд з цим існує також Ca²⁺-незалежна компонента зростання трансмембранного потенціала. Обидва процеси здатні призвести до гіперполяризації мембрани і відповідного зниження рівня збудливості міоцитів.



Рис. 5.8. Зміни К⁺-дифузійного потенціала на везикулах ПМ в умовах дії SN та SNP (50 мкМ), Val - валіноміцин. За відносну одиницю прийнято

зміни флуоресценції при відсутності градієнту іонів калію ([K^+]_i = [K^+]_e = 300 мМ, $\Delta \phi$ = 0 мВ). * - зміни відносно контролю ($\Delta \phi$ = -27,8 мВ, 300 мМ [K^+]_e+200 мМ [Ch^+]_e) вірогідні, р<u><</u>0,05.

5.5. Вплив нітросполук на Na⁺,К⁺-АТР<mark>а</mark>зу та дослідження процесів, які регулюють транспорт потенціалутворюючих іонів в плазматичній мембрані міоцитів

Додатковими чинниками, за якими NO здатний впливати на рівень поляризації ПМ, є модуляція активності Na⁺,K⁺-ATP<mark>a</mark>зи та процесів, функціонально пов'язаних із транспортом потенціалутворюючих іонів (зміни вмісту циклічних нуклеотидів, pH міоплазми тощо).

Фізіологічно значущий вплив NO на активність Na⁺,K⁺-ATPaзи в клітинах ГМ здійснюється шляхом активації розчинної гуанілатциклази і зростання рівня cGMP [40]. Нами показано [41], що в міометрії рівень cGMP не змінюється під впливом прогестерону, але зростає за відносно тривалої обробки суспензії міоцитів SNP (рис. 5.9, а). Продемонстровано (рис. 5.9, б), що SNP та SN суттєво підвищують активність уабаїн-чутливої Na⁺,K⁺-ATPaзи в пост'ядерній фракції міометрія, причому використаний з метою порівняння cGMP також стимулює ензим. За присутності інгібітора розчинної гуанілатциклази метиленового синього активуючого впливу досліджуваних сполук не спостерігається [42].

Отже, оксид азоту стимулює Na⁺,K⁺-ATP<mark>a</mark>зу за сGMP-залежним механізмом, що дозволяє як підтримувати градієнти потенціалутворюючих іонів на ПМ, так і сприяє її гіперполяризації.

Окремі підтипи Ca²⁺-залежних К⁺-каналів ПМ клітин ГМ стимулюються шляхом ПК А – залежного фосфорилювання [38, 43]. Нами показано, що вміст сАМР в міоцитах матки складає 10,4±0,7 пмоль/мг протеїну (n=4). Інкубація клітин з 0,1 мМ форсколіном протягом 10 хв призводила до збільшення вмісту сАМР в 3,4 раза, що свідчить про наявність в міометрії щурів аденілатциклазної активності. Встановлено, що 0,1 мМ SNP, але не прогестерон, підвищував вміст сАМР в міоцитах впродовж 1 год [44]. Ці дані свідчать про можливість реалізації релаксуючого ефекту NO на міометрій за сАМР/ПК А – опосередкованими механізмами.



Рис. 5.9. (а): Рівень сGMP в суспензії міоцитів матки: (1) – контрольний в нестимульованих міоцитах; (2) – при обробці 10 нМ прогестероном протягом 1 год; (3) – інкубація за цих умов з 0,1 мМ SNP. (б): Вплив нітросполук, сGMP та метиленового синього на Na⁺, K⁺-ATPaзy у пост'ядерній фракції м'язової тканини матки, n=5, * - зміни

АТР<mark>а</mark>зу у пост'ядерній фракції м'язової тканини матки, n=5, * - змін достовірні відносно контролю, р ≤ 0,05.

Са²⁺-залежні К⁺-канали ПМ активуються залуженням середовища [45]. Нами продемонстровано зростання рН міоплазми клітин міометрія за дії нітросполук (рис. 5.10, а) [46].



Рис. 5.10. Зміни рН міоплазми та транспорту Н⁺ в плазмалемі під впливом нітросполук.

(а): pH міоплазми, виміряне із використанням флуоресцентного зонда BCECF-AM: (1) – контрольна величина pH_i в неактивованих міоцитах; (2) – за стимуляції 0,1 мМ карбахолом; (3) – додавання 0,1 мМ SNP; (4) – 10 нМ SN; pH_o 7,5, t 25 °C. * - зміни достовірні відносно дослідів з карбахолом, $p \le 0,05$, n=5.

(б): Вплив 10 мкМ SNP (2) та 1 мкМ SN (3) на накопичення ¹⁴Сметиламіну (¹⁴С-МА) у везикульованій фракції сарколеми міометрія за умови pH_i 6,0/pH_o 7,5; (1) — контроль. * - зміни достовірні відносно контролю, p≤0,05, n=5.

На моделі везикульованих фрагментів сарколеми із використанням ∆рН-індикатора слабкої основи ¹⁴С-метиламіну за умови створення штучного трансмембранного ∆рН показано також збільшення проникності мембрани до іонів водню (рис. 5.10, б). Зниження накопичення ¹⁴Сметиламіну у везикулах свідчить про посилення дисипації ∆рН [47]. Стимуляція транспорту протонів за їхнім концентраційним градієнтом сприяє підвищенню порога збудливості клітин міометрія та протидіє деполяризуючим впливам. Функціональне значення оксиду азоту як агента, що гальмує процес збудження міоцитів, доводять наступні результати. Передінкубація клітин з SNP або SN не впливає на початковий деполяризуючий вплив ізотонічної заміни NaCl на KCl, але розвиток висококалієвої деполяризації у часі ефективно пригнічується нітросполуками (рис. 5.11). Зазначений ефект можна пояснити активацією К⁺-провідності мембрани поряд із сGMPзалежною стимуляцією Na⁺,K⁺-ATP-ази.



Рис. 5.11. Вплив передінкубації міоцитів матки протягом 15 хв із нітросполуками (0,1 мМ SNP та SN) на розвиток у часі висококалієвої деполяризації, n=5.

Отже, гіперполяризація ПМ ГМК матки за дії NO досягається шляхом зростання її проникності до іонів К та Н, чому може сприяти збільшення вмісту циклічних нуклеотидів в міометрії та активація уабаїн-чутливої Na⁺,K⁺-ATP<mark>a</mark>зи. Зростання трансмембранного потенціалу міоцитів є Ca²⁺залежним процесом.

Таким чином, NO викликає поляризацію плазмалеми клітин міометрія у стані функціонального спокою, що спроможне протидіяти подальшим деполяризуючим впливам. Поряд з цим, NO гальмує розвитку деполяризації у динамиці. Обмежене у часі і просторі підвищення концентрації іонів Са в субплазмалемному регіоні клітин ГМ є основним чинником регуляції Са²⁺залежних біохімічних процесів в ПМ, зокрема транспорту іонів. Водночас процеси локального зростання концентрації Са²⁺ в міоплазмі спроможні викликати генералізований ріст рівня катіона в клітині (Са²⁺-транзієнт) і запуск механізмів скорочення. Протидіяти цьому здатні Са²⁺ транспортувальні системи внутрішньоклітинних депо катіону, а саме СР і МХ [48-51].

5.6. Дія оксиду азоту на пасивний і енергозалежний транспорт Са²⁺ в саркоплазматичному ретикулумі та депо-кероване надходження іонів Са в міоцити

Вплив нітросполук на транспорт Ca²⁺ в ретикулумі пермеабілізованих міоцитів матки. Нами була досліджена дія SNP та SN на енергозалежний і пасивний транспорт Ca²⁺ в CP із використанням пермеабілізованих дигітоніном (0,1 мг/мл) міоцитів (рис. 5.12 та 5.13).



Рис. 5.12. Енергозалежна акумуляція Ca²⁺ CP пермеабілізованих міоцитів за присутності 10 мМ азиду натрію та SNP (а) або SN (б) у зростаючій концентрації, n=5.

Процедура пермеабілізації міоцитів розроблена [52] задля зростання неспецифічної проникності сарколеми до діючих речовин, що дозволяє працювати із інтактними внутрішньоклітинними компартментами.



Рис. 5.13. Вплив SNP (a) та SN (б) на пасивний транспорт Ca²⁺ з CP пермеабілізованих міоцитів матки щурів. Попередня акумуляція Ca²⁺ здійснювалась в енергозалежному процесі за присутності азиду натрію (10 мМ). По осі ординат — кількість Ca²⁺, яка залишилась у внутрішньоклітинному пулі на 1 хв пасивного звільнення, * - зміни достовірні відносно контролю, $p \le 0,05$, n = 5.

Встановлено, що SNP та SN стимулювали ATP-залежне включення Ca²⁺ в ретикулум (рис. 5.12). Центральним етапом спряження між збудженням плазмалеми та розвитком скорочення (електро(фармако)механічне спряження) в клітинах ГМ є Ca²⁺-індуковане вивільнення Ca²⁺ з CP, опосередковане RyR [49-51]. В міометрії SNP та SN призводять до пригнічення пасивного вивільнення Ca²⁺, активованого екзогенним катіоном (рис. 5.13) [53].

Дія оксиду азоту на депо-керований вхід іонів Са в міоцити та ацетилхолінестеразну активність сарколеми. Основним біохімічним механізмом зростання [Ca²⁺]_і та розвитку констрикції за дії агоністів, які активують фосфоліпазу C, а саме OT та ацетилхоліну, є IP₃ - залежне спустошення саркоплазматичного пула міоцитів з подальшою стимуляцією депо-керованого транспорта Ca²⁺ [54, 55]. Згідно з вищенаведеними результатами, цьому процесу здатний протидіяти NO, оскільки він сприяє перезаповненню ретикулярного пула катіона. В наших дослідженнях експозиція клітин до інгібітора Ca²⁺,Mg²⁺-ATPaзи CP 1 мкМ TG супроводжується стимуляцією депо-керованого входу Ca²⁺ у міоцити, який пригнічується низькими концентраціями лантану (1 мкМ), але є нечутливим до 1 мкМ ніфедипіну. Транспорт Ca²⁺ в цій експериментальній моделі інгібується на 50 % 0,1 мМ SNP.

SNP та SN стимулюють ацетилхолінестеразну активність сарколеми міометрія (початкова швидкість ензиматичного гідролізу ацетилтіохолінброміду становить 4,52±0,35 мкмоль тіохолінброміду/мг протеїну за хв) в 1,8 та 1,4 рази відповідно. Тому NO здатний посилювати розщеплення ацетилхоліну і зменшувати відповідну генерацію IP₃, що може протидіяти ацетилхолін-індукованому зростанню концентрації іонів Са в міоплазмі.

Отже, оксид азоту інгібує ключовий біохімічний механізм електро(фармако)-механічного спряження в клітинах міометрія, водночас надходження катіону крізь ПМ під впливом NO компенсується стимуляцією Ca²⁺,Mg²⁺-ATPaзи CP. Оксид азоту також здатний пригнічувати депокерований транспорт Ca²⁺ в міоцити.

5.7. Мітохондрії як можливе джерело оксиду азоту

Джерела біосинтезу NO в міоцитах матки майже не вивчено, а їхня ідентифікація залишається проблематичною, що пов'язане із коротким часом існування і високою реакційною здатністю NO.

Присутність Ca²⁺-залежної ізоформи NO-синтази в MX (mtNOS) була доведена імуногістохімічними методами в окремих тканинах. NO може регулювати активність електрон-транспортувального ланцюга MX, зворотньо пригнічуючи цитохром с-оксидазу, контролювати та мітохондріальне pH. З іншого боку, надлишкова продукція NO на фоні посилення утворення супероксид-аніона в МХ супроводжується генерацією пероксинітрита, пошкодженням компонентів дихального ланцюга, деполяризацією мембрани MX і розвитком апоптозу. Отже, як життя, так і загибель МХ і клітини в цілому, значною мірою залежать від рівня продукції NO [56]. Це вказує на важливість ідентифікації біосинтезу NO в MX.

Використання сучасного флуоресцентного зонда DAF-FM (diaminofluorescein-FM) дозволяє безпосередньо швидко і надійно зареєструвати продукцію NO за низьких концентрацій оксиду азоту (2-5 нМ) в клітинах, а метод лазерної конфокальної мікроскопії — візуалізувати його утворення та, із використанням специфічних щодо MX зондів, довести зв'язок біосинтезу NO саме із цими органелами [56, 57].

Таким чином, метою наших досліджень було продемонструвати можливість синтезу NO MX міоцитів матки із використанням NO-чутливого флуоресцентного барвника DAF, селективного щодо MX маркеру MitoTracker Orange CM-H₂TMRos та методу лазерної скануючої конфокальної мікроскопії.

В експериментах використовували активну кислотну форму DAF (DAF-FM), яка безпосередньо взаємодіє з NO за присутності O₂, в результаті чого утворюється триазоло-флуоресцеїнове похідне (DAF-FM-T), яке має більший квантовий вихід флуоресценції [57]. Хоча DAF-FM є мембранопроникним барвником, який може потрапляти до клітини шляхом дифузії, ефективність надходження його до міоплазми збільшували шляхом пермеабілізації ПМ 0,1 % дигітоніном. Обробка клітин детергентом суттєво зменшувала внесок NO, який продукується асоційованими із плазмалемою NO-синтазами, у флуоресцентний сигнал. З іншого боку, посилюється надходження барвника до МХ. Проведеними дослідженнями встановлено, ЩО В міоцитах матки спостерігається зелений флуоресцентний сигнал після передінкубації з DAF, що свідчить про

189

продукцію NO (рис. 5.14). Аутофлуоресценція базальну клітин В досліджуваній області за відсутності DAF не спостерігалась. Висока чутливість використаного нами барвника дозволила зареєструвати базальний рівень NO міоцитах. ЩО формується внаслідок В функціонування конститутивних форм NO-синтаз.



Рис. 5.14. Візуалізація окремих ділянок утворення NO різної інтенсивності в міоциті із використанням флуоресцентного барвника DAF-FM (зелене забарвлення). Для ідентифікації локалізації ядра використаний Hoechst 33342 (синє забарвлення).

Флуоресцентний зонд розподілявся в міоплазмі клітини, окреслюючи її контури та формуючи гетерогенні забарвлені ділянки та тяжі (рис. 5.14). Використання для реєстрації оксиду азоту DAF-системи забезпечує достатню роздільну здатність, яка дозволяє локалізувати джерела NO в міоплазмі, зокрема MX. Внаслідок дифузії, NO-позитивно забарвлені ділянки спостерігаються також частково в ядерній області і, іноді, поза клітинами.

Інкубація міоцитів із 0,1 мМ SNP призводила до суттєвого зростання (майже у 3 рази) флуоресцентного сигналу. Інкубація клітин із зростаючими концентраціями (0,1 та 0,2 мМ) N-нітро-L-аргініна - інгібітора Ca²⁺-залежних ізоформ NO-синтаз - супроводжувалась дозозалежним зниженням інтенсивності флуоресценції DAF в середньому на 20 % (0,1 мМ інгібітору) та 40 % (0,2 мМ інгібітору). Ці результати свідчать про специфічність відповіді DAF щодо NO. Оскільки флуоресцентний зонд взаємодіє саме з NO, він не тестує утворення широкого спектру метаболітів азоту та кисню, а саме NO₂⁻, NO₃⁻, ONOO⁻, 'O₂⁻, H₂O₂ тощо [56]. Є вагомі підстави вважати, що DAF є оптимальним NO-чутливим флуоресцентним барвником для детекції оксиду азоту в клітинах.

Продемонстровано колокалізацію специфічного щодо МХ зонда MitoTracker Orange CM-H₂TMRos, який накопичується лише в енергізованих органелах, та NO-чутливого барвника DAF (рис. 5.15).



Рис. 5.15. Порівняння профілю розподілу в міоцитах флуоресцентних зондів, специфічних щодо MX (MitoTracker Orange CM- H_2 TMRos, бура крива, канал 1), оксиду азоту (DAF-FM, зелена крива, канал 2) та ядра (Hoechst 33342, синя крива, канал 3).

Комп'ютерний аналіз довільно обраного поза ядром клітинного зрізу показав тотожний розподіл обох флуоресцентних барвників. Продукція NO

в МХ міоцитів може свідчити на користь участі оксиду азоту в таких процесах як мітохондріальне дихання, транспорт Ca²⁺, апоптоз тощо.

Біосинтез NO в клітинах пов'язаний не лише з МХ: конститутивні NOсинтази асоційовані з ПМ, CP і іншими внутрішньоклітинними структурами. Синтезований ними NO може дифундувати до МХ і навпаки. Втім, одержані дані свідчать на користь зв'язку продукції NO в міоцитах матки також і з MX. Безперечно, необхідні подальші дослідження, спрямовані на з'ясування субклітинного розподілу NO-флуоресцентного сигналу в міоцитах.

Отже, використовуючи селективний щодо NO флуоресцентний зонд DAF та специфічний маркер на функціонально-активні MX MitoTracker Orange CM-H₂TMRos, ми продемонстрували наявність NO в MX ГМК матки із застосуванням лазерної конфокальної мікроскопії.

5.8. Вплив оксиду азоту на основні Са²⁺-транспортувальні системи мітохондрій та поляризацію внутрішньої мітохондріальної мембрани

Оскільки МХ відіграють суттєву роль в підтриманні Са²⁺-гомеостазу і здатні термінувати Са²⁺-сигнал в клітинах ГМ [58-60], ми дослідили вплив NO на їхні Са²⁺-транспортувальні системи та рівень поляризації. Останній показник відображає загальний функціональний стан МХ [59].

продемонстрована стимуляція під Нами впливом нітросполук енергозалежного накопичення Ca²⁺ ізольованими МХ, яке здійснюється за присутності комплексу MgATP²⁻ та сукцинату (рис. 5.16). Цей ефект Ca²⁺-уніпортеру зі активності пов'язаний зростанням внутрішньої мітохондріальної мембрани (унеможливлюється за присутності рутенієвого червоного та протонофору СССР) і не залежить від функціонування циклоспорин-чутливої МТР (рис. 5.16).



Рис. 5.16. Вплив модифікаторів трансмембранного обміну Са²⁺ в МХ міометрія на енергозалежний транспорт катіона в умовах активуючого впливу SNP; СССР - carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone, RuR – рутенієвий червоний, Csp - циклоспорин, * - зміни достовірні відносно контролю, # - відносно дії 100 мкМ SNP, р≤0,05. Зміни концентрації Са²⁺ в матриксі МХ вимірювали з використанням Са²⁺-чутливого флуоресцентного зонду Fluo-4 AM.

Основним шляхом вивільнення акумульованого органелами Ca²⁺ з МХ в міометрії є Ca²⁺-H⁺-обмінник, який, згідно наших результатів, є нечутливим до інгібітора Ca²⁺-Na⁺-обмінника 0,1 мМ тетрафенілфосфонію, але ефективно пригнічується моноклональними антитілами проти протеїну LETM1 (leucine-zipper-EF hand-containing transmembrane region), який його репрезентує [61, 62] (рис. 5.17).



Рис. 5.17. Вплив комерційного моноклонального антитіла проти Ca²⁺-H⁺обмінника МХ (Anti-LETM1) на ∆рН-залежний транспорт Ca²⁺ з матриксу

ізольованих МХ міометрія щурів (на 100 мкг протеїну МХ – 2,5 мкг антитіла). Стандартне середовище інкубації (рН 6,5). Результати типового експеримента. Зміни концентрації Са²⁺ в матриксі МХ вимірювали з використанням Са²⁺-чутливого флуоресцентного зонду Fluo-4 AM.

Показана нами відсутність ефекту нітросполук на Ca²⁺-H⁺-обмінник МХ вказує на неможливість стимуляції NO транспорту катіону з органел в міоплазму.

Отже, одним із проявів функціональної активності МХ, як і СР, може бути компенсація надходження Ca²⁺ крізь сарколему клітин міометрія за дії оксиду азоту.

5.9. Вплив нітросполук на поляризацію мембрани мітохондрій

Дані літератури свідчать про можливу протекторну роль NO по відношенню до MX [63, 64], що спонукало нас до вивчення впливу нітросполук на трансмембранний потенціал їхньої внутрішньої мембрани.

Із використанням лазерної конфокальної мікроскопії та потенціалчутливого флуоресцентного зонда DiOC₆(3) продемонстрована подібна присарколемна і навколоядерна локалізація цього барвника та специфічного мітохондріального маркеру MitoTracker Orange в інтактних міоцитах (рис. 5.18, а). При одночасному застосуванні двох барвників спостерігається їхня колокалізація, що доводять результати по майже ідентичному профілю розподілу відповідних флуоресцентних зондів (рис. 5.18, б). Одержані дані дають підставу вважати, що накопичення DiOC₆(3) в клітині значною мірою пов'язане із MX [65].

Подальшими дослідженнями доведена тотожна субклітинна локалізація флуоресцентних зондів 9-аміноакридину (10 мкМ), який взаємодіє із мембранами за наявності на них градієнту протонів, та 10нонілакридиноранжу (1 мкМ), що реагує із кардіоліпіном МХ. Також демонструється тотожний розподіл 9-аміноакридину та DiOC₆(3) в міоцитах. Отже, в клітинах присутні енергізовані МХ, які зв'язують DiOC₆(3) [65].



Рис. 5.18. (а): Розподіл флуоресцентних зондів в міоциті матки: зелений – 0,5 мкМ $DiOC_6(3)$, червоний – 0,2 мкМ MitoTracker Orange CM-H₂TMRos, третя зйомка - накладання обох зображень; фіолетовий – 50 мкМ Hoechst 33342.

(б): Порівняння профілю розподілу флуоресцентних зондів, специфічних щодо МХ (MitoTracker Orange CM- H_2 TMRos, бура крива, канал 1), мембранного потенціалу (DiOC₆(3), зелена крива, канал 2) та ядра (Hoechst 33342, синя крива, канал 3).

Наступним етапом було показати можливість використання лазерної конфокальної мікроскопії та зонду DiOC₆(3) для вивчення впливу низькомолекулярних ефекторів на поляризацію мембрани МХ в інтактних міоцитах матки. Візуалізація обробленої азидом натрію (4 мМ) клітини протягом 5 хв демонструє суттєве зниження інтенсивності флуоресценції 195

барвника [65], яке пояснюється деполяризуючим впливом на МХ внаслідок інгібування IV комплексу дихального ланцюга [59].

У разі застосування моделі пермеабілізованих дигітоніном (0,1%) міоцитів ефект азиду натрію був вищим навіть у суттєво меншій концентрації (рис. 5.19). МХ пермеабілізованих клітин адекватно реагували також на додавання протонофору СССР (10 мкМ). Таким чином, доведена можливість використання цієї моделі для вивчення рівня поляризації внутрішньої мембрани МХ.



Рис. 5.19. Зникнення флуоресценції DiOC₆(3) в пермеабілізованих дигітоніном міоцитах протягом 2 хв при додаванні 1 мМ азиду натрію.

Нами встановлено, що SNP призводив до зниження флуоресценції DiOC₆(3), відмічений ефект був відносно помірним і сягав 17% за 5хвилинної дії SNP (рис. 5.20).



Рис. 5.20. Зменшення інтенсивності флуоресценції $DiOC_6(3)$ в контролі протягом 5 хв та за дії 0,1 мМ SNP, * - p<0,05, для аналізу використано 10 клітин.

В порівняльних дослідженнях SN у зазначеній концентрації не чинив ефекту на флуоресценцію. Аналогічні якісні і кількісні результати були отримані нами при роботі на пермеабілізованих міоцитах. Отже, принаймні окремі нітросполуки здатні знижувати поляризацію МХ міометрія, причому ефект може бути пов'язаний із їхнім безпосереднім впливом на органели. Одержаний результат був якісно підтверджений нами із використанням методу протокової цитофлуориметрії [65].

Зменшення трансмембранного потенціалу МХ за дії NO може відображати процес зворотнього пригнічення функціонування електронтранспортувального ланцюга, що здатне захищати органели від надмірної генерації активних форм кисню [59, 63, 64].

5.10. Зв'язування Ca²⁺ з кальмодуліном за присутності оксиду азоту

Центральним етапом ініціації Ca²⁺-залежної скоротливої активності в клітинах ГМ є зв'язування Ca²⁺ з CaM [66].



Рис. 5.21. Мас-спектрограма препарату СаМ.

Дані мас-спектрометрії показали, що виділений нами із мозку бика препарат CaM є достатньо очищеним (рис. 5.21). Через високу консервативність протеїну [67] його джерелом в подальших дослідженнях був саме цей орган.

Встановлено, що нітросполуки пригнічують зв'язування Ca²⁺ з CaM. Зокрема, наші розрахунки показали, що 1 нМ SN знижував граничну кількість місць зв'язування іонів Ca на молекулі CaM від 0,01 нмоль Ca²⁺/мг протеїну в контролі до 0,006 нмоль Ca²⁺/мг протеїну за присутності нітросполуки [68]. Це явище in vivo може призвести до зменшення контрактильної активності клітин ГМ.

Можливість модуляції іон-транспортувальних систем міоцитів оксидом азоту передбачає здатність нітросполук впливати на такий інтегральний параметр клітин, як їхня морфологія. За даними фотонної кореляційної спектроскопії SNP та SN суттєво збільшують об'єм міоцитів у суспензії (тестується за гідродинамічним діаметром) (рис. 5.22).



Рис. 5.22. Зміни характеристичних розмірів міоцитів за дії 0,1 мМ нітросполук; М±т, n = 5.

Останнє спостереження важливе для з'ясування клітинних механізмів скоротливої активності тканини і, зокрема, міорелаксуючої здатності нітросполук.

Грунтуючись на комплексних дослідженнях щодо регуляції нітросполуками основних Ca²⁺-транспортувальних систем міометрія та відповідно до зв'язування Ca²⁺ з CaM ми запропоновали узагальнюючу схему дії NO (рис. 5.23).

NO стимулює дигідропіридин-чутливу пасивну проникність ПМ до Ca²⁺, що забезпечує активацію Ca²⁺-залежних K⁺-каналів і гіперполяризацію плазмалеми. Сприяють зростанню трансмембранного потенціалу за дії NO також активація Ca²⁺-незалежних K⁺-каналів, посилення транспорту H⁺ з міоцитів за концентраційним градієнтом та сGMP-опосередкована стимуляція Na⁺,K⁺-ATPaзи.

NO сприяє енергозалежній акумуляції Ca²⁺, який надходить із позаклітинного середовища, в CP та MX.

Поряд з цим, депо-керований транспорт Ca²⁺ у міоцити здатний пригнічуватись NO, який також сприяє розщепленню ацетилхоліну

відповідною естеразою сарколеми, що, в принципі, може зменшувати генерацію IP₃ в міоплазмі і протидіяти виснаженню ретикулярного пулу катіона.



Рис. 5.23. Схема дії оксиду азоту на критичні етапи процесу електро(фармако)-механічного спряження та системи підтримання Ca²⁺-гомеостазу в міоцитах матки (ПМ – плазматична мембрана, CP – саркоплазматичний ретикулум, МХ – мітохондрії, SERCA – кальцієва помпа саркоплазматичного ретикулума, VOCC – потенціалкеровані (воротні) кальцієві канали, SOCC – депо-керовані кальцієві канали, К_{Ca} – Ca²⁺-залежні калієві канали, K - калієві канали, RyR – канал ріанодинового рецептора або ріанодинчутливий канал, MCU – Ca²⁺-уніпортер MX, PKC – протеїнкіназа C, PLC – фосфоліпаза C, PIP₂ – фосфатидилінозитол-4,5-дифосфат, IP₃ – інозитол-1,4,5-трисфосфат, DAG – діацилгліцерол, CICR – кальційіндуковане вивільнення кальцію).

Оксид азоту пригнічує електро(фармако)-механічне спряження в міометрії, гальмуючи Ca²⁺-індуковане вивільнення Ca²⁺ із CP та знижуючи Ca²⁺-зв'язувальну здатність CaM.

Отже, згідно результатів наших досліджень, прогестерон стимулює утворення NO ендометрієм, що може протидіяти утероконстрикторним факторам за вищезазначеними біохімічними механізмами.

ЗАКЛЮЧНИЙ РОЗДІЛ

Саме тому, що Ca²⁺ є важливим внутрішньоклітинним неорганічним месенджером, який бере участь у фармакомеханічному спряженні в ГМК, вивчення біохімічних систем та механізмів, які регулюють його концентрацію у міоплазмі, заслуговують на особливу увагу.

Одним з таких механізмів є активний Mg²⁺,ATP-залежний транспорт іонів Са із клітини, що забезпечується Ca²⁺,Mg²⁺-ATPазою (кальцієвою помпою) ПМ, яка є суттєво важливою для підтримання гомеостазу Ca²⁺ у ГМК. Її функції є досить різноманітними - від контролю базальної цитоплазматичної концентрації Ca²⁺ до регуляції активності протеїнів, що залучені у Ca²⁺-залежні сигнальні каскади, і часто-густо залежать від ізоформи або навіть від форми альтернативного сплайсингу. Тому питання регуляції активності та пошук препаратів, які б дозволяли цілеспрямовано змінювати активність Ca²⁺-помпи ПМ, є актуальним в контексті сучасних біохімічних досліджень механізмів електро- та фармакомеханічного спряження збудження і скорочення ГМ.

Як можна було бачити вище, в монографії узагальнено дані літератури і результати власних досліджень щодо властивостей Ca²⁺помпи ПМ міоцитів ГМ, розглянуто структурну організацію, кінетичні властивості та молекулярну біологію цієї транспортної системи. Важливим, з точку зору функціонування клітини, є питання прецизійної регуляції активності Ca²⁺-помпи ПМ. Тому були висвітлені різноманітні фактори регуляції активності Ca²⁺-помпи ПМ ГМК: як ендогенні, так і екзогенні, біотичні та абіотичні чинники. Особливу увагу при цьому ми намагалися приділити літературним даним та власним результатам щодо розробки та пошуку селективного низькомолекулярного інгібітора Ca²⁺-помпи ПМ, який дозволив би більш прискіпливо вивчати її функціональну роль у контролі кальцієвого гомеостазу в ГМК. Як випливає з наших досліджень, на цю роль цілком може претендувати один з циклічних олігомерів фенолів – калікс[4]арен С-90.

Нами було доведено, із використанням модельної системи «К⁺валіноміцин – везикули ПМ», що Mg²⁺,ATP-залежна кальцієва помпа сарколеми міометрія є потенціал-чутливою. Показано, що сумісне функціонування кальцієвої помпи та катіонного антипортеру ПМ повністю перешкоджає дисипації вихідного (із везикул ПМ) кальцієвого градієнта. Функціональне значення виявленого синергічного ефекту потребує свого подальшого тлумачення. Було встановлено також, що кальцієва помпа ПМ безпосередньо контролює релаксацію карбахолової контрактури міометрія.

Окрім властивостей та особливостей регуляції активності Mg²⁺,ATPзалежної кальцієвої помпи ПМ ГМК матки, у монографії були висвітлені деякі питання щодо закономірностей регуляції трансмембранного обміну іонів Са в МХ міометрія.

Так, було доведено, зокрема, що поліамін спермін, у концентрації до 1 мМ, стимулює акумуляцію іонів Са в МХ міометрія, проте збільшення концентрації поліаміну до 10 мМ веде до гальмування накопичення цього катіона у зазначених субклітинних структурах. Як виявилося, іони Са (100 мкМ) викликають деполяризацію мітохондріальної мембрани за умов відсутності АТР та Mg²⁺ у середовищі інкубації. Втім, іони Mg, у концентрації 7 мM, викликають гіперполяризацію мітохондріальної мембрани. Проте наявність у середовищі інкубації іонів Мд (за відсутності АТР) не запобігає деполяризуючому впливу іонів Са. Антагоністи кальмодуліну - кальмідазоліум (10 мкМ) та трифлуоперазин (100 мкМ), акумуляцію іонів Са у МХ та викликають дисипацію гальмують мембранного потенціалу цих субклітинних структур. Цей факт свідчить на користь важливої ролі кальмодуліну у контролі трансмембранного обміну іонів Са в міоцитах матки. На підставі результатів, що були одержані, Ca²⁺узагальнюючу регуляції активності запропоновано схему

транспортуючих систем, що контролюють концентрацію іонів Са у клітинах міометрія.

Важливе питання, яке ми намагалися висвітлити в монографії, стосується молекулярних та мембранних механізмів дії утеротонічного пептидного гормону окситоцину (ОТ) на гомеостаз іонів Са в міоцитах матки та активність систем пасивного та активного транспорту цього катіона, локалізованих у субклітинних структурах міометрія.

У наших дослідженнях, виконаних в лабораторіях США, було продемонстровано, що у міометрії щурів експресовані TrpC1, TrpC2, TrpC4, TrpC5, TrpC6 та TrpC7 на рівні mRNA, а у міометрії жінок – ті ж форми, TrpC2 TrpC3. проте замість представлено Вагітність шурів супроводжувалась зниженням експресії TrpC5 та 6 mRNA. Пологи у жінок мають місце на тлі зниженням експресії TrpC4 mRNA. Були ідентифіковані механізми активації ОТ та TG входу іонів Са до цитоплазми клітин міометрія. Такий вхід іонів Са з позаклітинного простору одержав назву вхід або ємнісно-оперований катіона, такий, який активується внутрішньоклітинних кальцієвих 3a спустошенням пулів. умов використання полімеразної ланцюгової реакції нами вперше було показано, що клітини міометрія невагітних жінок та клітинна лінія РНМ1-41 з міометрія вагітних жінок експресують mRNA hTrpC1, hTrpC3, hTrpC4, hTrpC6, hTrpC7 та деякі сплайсові форми hTrpC4 та hTrpC1. Були встановлені біохімічні механізми регуляції активності hTrpC каналів. що надекспресія hTrpC3 у клітинах PHM1-41 Показано, викликає збільшення входу іонів Са з позаклітинного простору за умов дії ОТ та TG. Синтетичний аналог діацилгліцеролу ОАС спричинював виникнення Ca²⁺осциляцій в клітинах міометрія. Інгібітори протеїнкінази С не впливали на здатність ОАС викликати осциляції концентрації Са²⁺. Нами було зроблено висновок, що дія синтетичного аналога діацилгліцеролу ОАС у клітинах міометрія не опосередковується активацією протеїнкінази С.

Результати експериментів, ЩО були виконані фракції на везикульованих фрагментів ПМ, показали, що ОТ не впливав на базальну кальцієву проникність цієї мембрани. Вдалося продемонструвати, що пептидний гормон частково інгібував Mg²⁺,ATP-залежне накопичення Ca²⁺ у фракції ПМ. ОТ також частково гальмував активність кальцієвої помпи СР клітин матки. Отже, варто вважати, що ОТ-чутливе гальмування Mg²⁺, ATPзалежних кальцієвих помп ПМ та СР є важливою складовою у загальному механізмі утеротонічної дії зазначеного пептидного гормону. Як виявилося, споживання етанолу хронічне щурами призводило ДО суттєвого гальмування акумуляції іонів Са у МХ та СР міометрія. У випадку хронічного вживання 15 % розчину етанолу щурами, на відміну від контролю, підгострого та гострого введення етанолу в організм, втрачалась чутливість кальцієвої помпи СР клітин міометрія до інгібуючої дії окситоцину. Нами було запропоновано концептуальну схему біохімічних механізмів дії ОТ на кальцієвий гомеостаз у міоцитах матки.

У своїх дослідженнях ми також намагалися з'ясувати біохімічні та фізико-хімічні механізми дії оксиду азоту на Ca²⁺-транспортувальні системи міометрія.

Було встановлено, що оксид азоту стимулює дигідропіридин-чутливий транспорт Ca²⁺ в міоцити. Це зумовлює активацію Ca²⁺-залежних К⁺-каналів і гіперполяризацію ПМ. Сприяють зростанню трансмембранного потенціалу за дії NO також активація пасивного транспорту H⁺ з міоцитів та сGMPопосередкована стимуляція Na⁺,K⁺-ATPaзи. NO посилює енергозалежну акумуляцію Ca²⁺, який надходить із позаклітинного середовища, в CP та MX. Поряд з цим, депо-керований транспорт Ca²⁺ у міоцити пригнічується NO. Виявилося, що оксид азоту гальмує електро(фармако)-механічне спряження в міометрії, інгібуючи Ca²⁺-індуковане вивільнення Ca²⁺ із CP та знижуючи Ca²⁺-зв'язувальну здатність кальмодуліну. Нами, на підставі одержаних даних, було запропоновано концептуальну модель біохімічних механізмів дії оксиду азоту в міометрії.

Отже, ми вважаємо, що експериментальні результати, що наведені у цій монографії, цілком відповідають на біофізикохімічному рівні формату функціонування ГМК тлумачення ЯК складної рецепторної тензоелектрохімічної якої системи, для притаманні (щодо внутрішньоклітинного Ca²⁺ гомеостазу) такі властивості, як неадитивність, нелінійність, синергістичність, кооперативність, наявність мережі «позитивних» та «негативних» зворотних зв'язків.

Література до глави 1

1. Burdyga T., Richard J. P. Chapter 86 – Calcium Homeostasis and Signaling in Smooth Muscle. Joseph Hill. Boston/ Waltham, 2012. – P. 1155–1171.

 Pande J., Grover A.K. Plasma membrane calcium pumps in smooth muscle: from fictional molecules to novel inhibitors // Can. J. Physiol. Pharmacol. – 2005. – 83. – P. 743–754.

3. 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. – 42, N 4–5. – P. 447–466.

4. Ng L.C., Gurney A.M. Store-operated channels mediate Ca^{2+} influx and contraction in rat pulmonary artery // Circ. Res. – 2001. – 89. – P. 923–929.

5. Strehler E.E., Adelaida G.F., Penniston J.T., Caride A.J. Plasma membrane Ca²⁺-pumps: structural diversity as basis for functional versatility // Biochem Soc Trans. – 2007. – 35, Pt 5. – P. 919–922.

6. Matthew A., Shmygol A., Wray S. Ca²⁺ entry, efflux and release in smooth muscle // Biol. Res. – 2004. – 37, N 4. – P. 617–624.

7. Oloizia B., Paul R.J. Ca²⁺ Clearance and contractility in vascular smooth muscle: Evidence from gene-altered murine models // Journal of Molecular and Cellular Cardiology. – 2008. – 45, N 3. –P. 347–362.

8. Floyd R., Wray S. Calcium transporters and signalling in smooth muscles // Cell Calcium. – 2007. – 42, N 4–5. – P. 467–476.

 Carafoli E. Mitochondrial Calcium Transport: Historical Aspects / Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition), Editors-in-Chief: William
 J. Lennarz and M. Daniel Lane, Waltham. – 2013. – P. 118–126.

10. Shmigol A., Eisner D.A., Wray S. Carboxyeosin decreases the rate of decay of the $[Ca^{2+}]_i$ transient in uterine smooth muscle cells isolated from pregnant rats // Pflugers Arch. –1998. – 437. – P. 158-160.

207

11. Carafoli E. Biogenesis: plasma membrane calcium ATPase: 15 years of work on the purified enzyme // FASEB J. –1994. – 13. –P. 993-1002.

12. Strehler E.E., Zacharias D.A. Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps // Physiol Rev. – 2001. – 81, N 1. – P. 21-50.

13. Pande J., Mallhi K.K., Grover A.K. Role of third extracellular domen of plasma membrane $Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP$ based on novel inhibitor caloxin 3A1 // Cell Calcium. – 2005. – 37, N 3. – P. 245–250.

14. Olson S., Wang M.G., Carafoli E., Strehler E.E., McBride O.W. Localization of two genes encoding plasma membrane Ca^{2+} transporting ATPases to human chromosomes 1q25–32 and 12q21–23 // Genomics – 1991. – 9. – P. 629–641.

15. Wang M.G., Yi H., Hilfiker H., Carafoli E., Strehler E.E., McBride O.W. Localization of two genes encoding plasma membrane Ca^{2+} ATPases isoform 2 (ATP2B2) and 3 (ATP2B3) to human chromosomes $3p26 \rightarrow p25$ and Xq28, respectively // Cytogenet Cell Genet. – 1994. – 67. – P. 41–45.

16. Kuzmin I., Stackhouse T., Latif F., Duh F.M., Geil L., Gnarra J., Yao M., Li H., Tory K., Le Paslier D., Chumakov I., Cohen D., Chinault A.C., Linehan W.M., Lerman M.I., Zbar B. One-megabase yeast artificial chromosome and 400-kilobase cosmid-phage contigs containing the von Hippel-Lindau tumor suppressor and Ca²⁺-transporting adenosine triphosphatase isoform 2 genes // Cancer Res. – 1994. – 54. – P. 2486–2491.

17. Burk S.E., Shull G.E. Structure of the rat plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isoform 3 gene and characterization of alternative splicing and transcription products // J. Biol. Chem. – 1992. – 267. –P. 19683–19690.

18. Hilfiker H., Strehler-Page M.A., Stauffer T.P., Carafoli E., Strehler E.E. Structure of the gene encoding the human plasma membrane calcium pump isoform 1 // J. Biol. Chem. – 1993. – 268. – P. 19717–19725.

19. Krebs J. The influence of calcium signaling on the regulation of alternative splicing // Biochimica et Biophysica Acta. – 2009. – 1793, № 6. – P. 979 – 984.

20. Linde C.I., Di Leva F., Domi T., Tosatto S.C., Brini M., Carafoli E. Inhibitory interaction of the 14-3-3 proteins with ubiquitous (PMCA1) and tissue-specific (PMCA3) isoforms of the plasma membrane Ca^{2+} pump // Cell Calcium. – 2008. –43, N 6. – P. 550–61.

21. Enyedi A., Verma A.K., Heim R., Adamo H.P., Filoteo A.G., Strehler E.E., Penniston J.T. The Ca²⁺ affinity of the plasma membrane Ca²⁺- pump is controlled by alternative splicing // J. Biol. Chem. – 1994. – 269, N 1. – P. 41-43.

22. Caride A.J., Elwess N.L., Verma A.K., Filoteo A.G., Enyedi A., Bajzer Z., Penniston J.T. The rate of activation by calmodulin of isoform 4 of the plasma membrane Ca^{2+} -pump is slow and is changed by alternative splicing // J. Biol. Chem. –1999. – 274, N 49. – P. 35227-32.

23. Caride A.J., Penheiter A.R., Filoteo A.G., Bajzer Z., Enyedi A., Penniston J.T. The plasma membrane calcium pump displays memory of past calcium spikes. Differences between isoforms 2b and 4b / J. Biol. Chem. –2001. – 276, N 43. – P. 39797-804.

24. Костерин С.А. Транспорт кальция в гладких мышцах.- К.: Наук. думка, 1990. – 216с.

25. Любаковская Л.А., Слинченко Н.Н., Бурчинская Н.Ф., Курский М.Д. Каталитические свойства очищенной Ca²⁺,Mg²⁺-ATPaзы сарколемы миометрия // Биохимия. – 1990. – 55, № 7. – С. 1237–1243.

26. Слинченко Н.Н., Любаковская Л.А., Курский М.Д., Сопель Л.В. Выделение и очистка Ca²⁺,Mg²⁺-ATPазы плазматических мембран миометрия // Укр. биохим. журн. – 1990. – 62, № 3. – С. 60–65.

27. 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 С-90 на Ca²⁺,Mg²⁺-ATPазну активність плазматичної мембрани та на концентрацію Ca²⁺ в незбуджених клітинах міометрія // Укр. біохім. журн. – 2013. – 85, № 4. – С. 20–29.

28. Wuytack F., De Schutter G., Casteels R. Partial purification of Ca^{2+} ,Mg²⁺-dependent ATPase from pig smooth muscle and reconstitution of the ATP-dependent Ca²⁺-transport system // Biochem. J. – 1981. – 198, N 2. – P. 265–271.

29. Veklich T.O., Shkrabak A.A., Slinchenko N.N., Mazur I.I., Rodik R.V., Boyko V.I., Kalchenko V.I., Kosterin S.O. Calix[4]arene C-90 selectively inhibits Ca^{2+} ,Mg²⁺-ATPase of myometrium cell plasma membrane // Biochemistry (M). – 2014. – 79, N 5. – P. 417-424.

30. 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 Mg²⁺-залежні АТР-гідролазні ферментативні системи гладеньком`язових клітин матки // Укр. біохім. журн. – 2007. – 79, № 3. – С. 44–54.

31. Курский М.Д., Слинченко Н.Н., Любаковская Л.А. Реконструкция очищенной Ca²⁺, Mg²⁺-ATPaзы сарколемы миометрия в липосомы и ее каталитические свойства // Укр. биохим. журн. – 1990. – 62, № 3. – С. 66–71.

32. Капля А.А., Костерин С.А., Курский М.Д. АТФазная активность и акумуляция кальция во фракции плазматических мембран миометрия крольчих в состоянии функционального покоя и при беременности / Биохимия. – 1982. – 47, № 9. – С. 1499–1503.

33. 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 Ca²⁺,Mg²⁺-ATPaзи плазматичної мембрани гладеньком`язових клітин // Укр. біохім. журн. – 2014. – 86, № 5. – С. 37–46.

34. Векліч Т.О., Шкрабак О.А., Мазур Ю.Ю. Дослідження впливу каліксарену С-90 на активність Ca²⁺,Mg²⁺-АТРази плазматичної мембрани гладеньком`язових клітин // Тезисы докладов Научно-практической

конференции "Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения". Новый Свет, Крым, Украина. – 2013. – 2. – С. 325–326.

35. Костерин С.А., Браткова Н.Ф., Курский М.Д., Зимина В.П. Свойства системы АТР-зависимого транспорта Ca²⁺ во фракции плазматических мембран клеток миометрия // Биохимия. – 1983. – 48, № 2. – С. 244–253.

36. Костерин С.А., Слинченко Н.Н., Гергалова Г.Л. Энергетические характеристики АТР-гидролазной реакции, катализируемой солюбилизированной Ca²⁺,Mg²⁺-ATРазой плазматической мембраны гладкомышечных клеток // Биохимия. – 1994. – 59, № 6. – С. 889–904.

37. Popescu L.M., Foril C.P., Hinescu M., Pănoiu C., Cinteză M., Gherasim L. Nitroglycerin stimulates the sarcolemmal Ca²⁺-extrusion ATPase of coronary smooth muscle cells // Biochemm Pharmacol. – 1985. – 34, N 10. – P. 1857-1860.

38. Слінченко Н.М., Черниш І.Г., Костерін С.О. Використання очищеної Ca²⁺,Mg²⁺-ATPaзи плазматичної мембрани клітин міометрія для порівняльної оцінки ефективності дії інгібіторів енергозалежного транспортування іонів кальцію // Укр. біохім. журн. – 2003. – 75, № 2. – С. 33–38.

39. Yatime L., Buch-Pedersen M.J.,Musgaard M., Morth J.P., Winther A.L., Pedersen B.P., Olesen C., Andersen J.P., Vilsen B., Schiott B., Palmgren M.G., Moller J.V., Nissen P., Fedosova N. P-type ATPases as drug targets: Tools for medicine and science // Biochimica et Biophysica Acta. – 2009. – 1787. – P. 207–220.

40. Naderali E.K., Buttell N., Taggart M.J., Bullock A.J., Eisner D.A., Wray S. The role of the sarcolemmal Ca²⁺-ATPase in the pH transients associated with contraction in rat smooth muscle // J. Physiol. Lond. S. – 1997. – 505. – P. 329–336.

211

41. Furukawa K., Tawada Y., Shigekawa M. Protein kinase C activation stimulates plasma membrane Ca^{2+} -pump in cultured vascular smooth muscle cells // J. Biol. Chem. – 1989. – 264. – P. 4844–4849.

42. Triphan J., Aumuller G., Brandenburger T., Wilhelm B. Localization and regulation of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in bovine spermatozoa // European Journal of Cell Biology. – 2007. – 86. – P. 265–273.

43. 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 the plasma membrane calcium pump // J. Biol. Chem. – 2003. – 278. – P. 35798–35804.

44. Krebs. Calcium: A Matter of Life or Death. - Elsevier. The plasma membrane calcium pump. Ortega C., Ortolano S., Carafoli E. – 2009. – P. 179– 197.

45. Gutierrez-Martin Y., Martin-Romero F. J., Henao F., Gutierrez-Merino C. Syptosomal plasma membrane Ca^{2+} pump activity inhibition by repetitive micromolar ONOO-pulses // Free Radical Biology & Medicine. – 2002. – 32, N. 1. – P. 46–55.

46. Monteith G. R., Wanigasekara Y., Roufogalis B. D. The plasma membrane calcium pump, its role and regulation: new complexities and possibilities // J. Pharmacol. Toxicol. Methods. – 1998. – 40. – P. 183–190.

47. Oliveira V. H., Nascimento K. S. O., Freire M. M., Moreira O. C., Scofano H. M., Barrabin H., Mignaco J. A. Mechanism of modulation of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase by arachidonic acid // Prostagland. Lipid Mediators. – 2008. – 87. – P. 47–53.

48. Monteith G. R., Roufogalis B. D. The plasma membrane calcium pump a physiological perspective on its regulation // Cell Calcium. – 1995. – 18. – P. 459-470.

49. Cartwright E.J., Oceandy D., Austin C., Neyses L. Ca^{2+} signalling in cardiovascular disease: the role of the plasma membrane calcium pumps // Science China. – 2011. – 54, Ne8. – p. 691 – 698.

50. Ishida Y., Paul R.J. Ca^{2+} clearance in smooth muscle: lessons from gene-altered mice // J. Smooth Muscle Res. – 2005. –41, N 5. – P. 235-45.

51. Gomez-Pinilla P.J., Pozo M.J., Akemishi B., Matsuda T., Camello P.J. Ca²⁺ extrusion in aged smooth muscle cells // Biochemical Pharmacology. – 2007. – 74, N 6. – P. 860–869.

52. Liu L., Ishida Y., Okunade G., Shull G.E., Paul R.J. Role of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in contraction-relaxation processes of the bladder: evidence from PMCA gene-ablated mice // Am. J. Physiol Cell Physiol. – 2006. – 290, N 4. – P. C1239–47.

53. Pritchard T.J., Bowman P.S, Jefferson A., Tosun M., Lynch R.M., Paul J.P. Na⁺-K⁺-ATPase and Ca²⁺ clearance proteins in smooth muscle: a functional unit // Am J Physiol Heart Circ Physiol. – 2010. – 299, № 2. - P. 548 – 556.

54. Liu L., Ishida Y., Okunade G., Pyne-Geithman G.J., Shull G.E., Paul R.J. Distinct roles of PMCA isoforms in Ca²⁺ homeostasis of bladder smooth muscle: evidence from PMCA gene-ablated mice // Am. J. Physiol Cell Physiol. –2007. –292, N 1. – P. C423–431.

55. Okunade G.W., Miller M.L., Pyne G.J., Sutliff R.L., O'Connor K.T., Neumann J.C., Andringa A., Miller D.A., Prasad V., Doetschman T., Paul R.J., Shull G.E. Targeted ablation of plasma membrane Ca²⁺-ATPase (PMCA) 1 and 4 indicates a major housekeeping function for PMCA1 and a critical role in hyperactivated sperm motility and male fertility for PMCA4. // J. Biol Chem. – 2004. – 279, N 32. – P. 33742-50.

56. Usachev Y.M., DeMarco S.J., Campbell C., Strehler E.E., Thayer S.A. Bradykinin and ATP accelerate Ca^{2+} efflux from rat sensory neurons via protein kinase C and the plasma membrane Ca^{2+} pump isoform 4 // Neuron. – 2002. – 33. – P. 113–122.

57. Noble D., Herchuelz A. Role of Na/Ca exchange and the plasma membrane Ca²⁺-ATPase in cell function // EMBO reports. – 2007. – 8, Nº 3. – P. 228 – 232.

58. Prasad V., Okunade G.W., Miller M.L., Shull G.E. Phenotypes of SERCA and PMCA knockout mice // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2004. – 322. – P. 1192–1203.

59. Chen Y.F., Cao J., Zhong J.N., Chen X., Cheng M., Yang J., Gao Y.D. Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase regulates Ca^{2+} signaling and the proliferation of airway smooth muscle cells // Eur J Pharmacol. – 2014. – 740. – P. 733–741.

60. Abramowitz J., Aydemir-Koksoy A., Helgason T., Jemelka S., Odebunmi T., Seidel C.L., Allen J.C. Expression of plasma membrane calcium ATPases in phenotypically distinct canine vascular smooth muscle cells // J. Mol. Cell. Cardiol. – 2000. – 32, N 5. – P. 777-789.

61. Pande J., Mallhi K.K., Grover A.K. A novel plasma membrane Ca²⁺pump inhibitior: caloxin 1A1 // Eur. J. Pharmacol. – 2005. – 508, N 1–3. – P. 1–
6.

62. Armesilla A.L., Williams J.C., Buch M.H., Pickard A., Emerson M., Cartwright E.J., Oceandy D., Vos M.D., Gillies S., Clark G.J., Neyses L. Novel functional interaction between the plasma membrane Ca²⁺-pump 4b and the proapoptotic tumor suppressor Ras-associated factor 1 (RASSF1) // J. Biol. Chem. – 2004. – 279, N 30. – P. 31318-31328.

63. Sasamura S., Furukawa K., Shiratori M., Motomura S., Ohizumi Y. Antisense-inhibition of plasma membrane Ca²⁺ pump induces apoptosis in vascular smooth muscle cells // Jpn J Pharmacol. – 2002 – 90, N 2. – P. 164-72.

64. Schuh K., Uldrijan S., Gambaryan S., Roethlein N., Neyses L. Interaction of the plasma membrane Ca^{2+} pump 4b/CI with the Ca^{2+} /calmodulin-dependent membrane-associated kinase CASK // J Biol Chem. – 2003. –278, N 11. – P. 9778-83.

65. Schuh K., Uldrijan S., Telkamp M., Röthlein N., Neyses L. The plasmamembrane calmodulin–dependent calcium pump a major regulator of nitric oxide synthase I // J Cell Biol. –2001. – 155, N 2. – P. 201-5.

66. Hammes A., Oberdorf-Maass S., Rother T., Nething K., Gollnick F., Linz K.W., Meyer R., Hu K., Han H., Gaudron P., Ertl G., Hoffmann S., Ganten U., Vetter R., Schuh K., Benkwitz C., Zimmer H.G., Neyses L. Overexpression of the sarcolemmal calcium pump in the myocardium of transgenic rats // Circ Res. – 1998. – 83, N 9. – P. 877-88.

67. Strehler E.E. Plasma membrane calcium ATPase proteins as novel regulators of signal transduction pathways // World J Biol Chem. – 2010. – 1, № 6. – P. 201 – 208.

68. Kosterin S.O. Kinetics and energetics of Mg^{2+} , ATP-dependent Ca²⁺ transport in the plasma membrane of smooth muscle cells // Neurophysiology. – 2003. – 35, N 3/4. – P. 215–228.

69. Leva F.D., Domi T., Fedrizzi L., Lim D., Carafoli E. The plasma membrane Ca²⁺-ATPase of animal cells: Structure, function and regulation // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2008. – 476, N $^{\circ}$ 1. – P. 65 – 74.

70. Zhang J., Xiao P., Zhang X. Phosphatidylserine externalization in caveolae inhibits Ca^{2+} efflux through plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in ECV304 // Cell Calcium. – 2009. – 45. – P.177–184.

71. Pang Y., Zhu H., Wu P., Chen J. The characterization of plasma membrane Ca²⁺-ATPase in rich sphingomyelin-cholesterol domains // FEBS Lett. – 2005. – 579, N 11. – P. 2397-403.

72. Brini M., Carafoli E. Calcium pump in health and desease // Physiol. Rev. – 2009. –89. – P. 1341-1378.

73. Giacomello M., Mario A., Scarlatti C., Primerano S., Carafoli E. Plasma membrane calcium ATPase and related disorders // Internat. J. Biochem & Cell Biol. – 2012. – 45, N 3. – P. 753–762.

74. Schuh K., Quaschning T., Knauer S., Hu K., Kocak S., Roethlein N., Neyses L. Regulation of vascular tone in animals overexpressing the sarcolemmal calcium pump. – J Biol Chem. – 2003. – 278, N 42. – P. 41246-52. 75. DeMarco S.J., Strehler E.E. Plasma membrane Ca²⁺-atpase isoforms 2b and 4b interact promiscuously and selectively with members of the membrane-associated guanylate kinase family of PDZ (PSD95/Dlg/ZO-1) domain-containing proteins // J. Biol. Chem. – 2001. – 276, N 24. – P. 21594-600.

76. Kim E., DeMarco S.J., Marfatia S.M., Chishti A.H., Sheng M., Strehler E.E. Plasma Membrane Ca²⁺ ATPase Isoform 4b Binds to Membrane associated Guanylate Kinase (MAGUK) Proteins via Their PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) Domains // J. Biol. Chem. – 1998. – 273, N3. – P. 1591–5.

77. DeMarco S.J., Chicka M.C., Strehler E.E. Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase Isoform 2b Interacts Preferentially with Na⁺/H⁺ Exchanger Regulatory Factor 2 in Apical Plasma Membranes // The Journal of Biological Chemistry. – 2002. – 277. – P. 10506-10511.

78. Goellner G.M., DeMarco S.J., Strehler E.E. Characterization of PISP, a novel single-PDZ protein that binds to all plasma membrane Ca^{2+} -ATPase b-splice variants // Ann. N. Y. Acad Sci. –2003. – 986. – P.461-71.

79. Pászty K., Antalffy G., Penheiter A.R., Homolya L., Padányi R., Iliás A., Filoteo A.G., Penniston J.T., Enyedi A. The caspase-3 cleavage product of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase 4b is activated and appropriately targeted // Biochem J. – 2005. – 391, Pt 3. – P. 687-92.

80. Бабич Л.Г., Фомин В.П., Костерин С.А. Влияние мембранного потенциала на Mg²⁺-ATP-зависимый транспорт Ca²⁺ через сарколемму гладкой мышцы // Биохимия. – 1990. – 55, № 10. – С.1890–1901.

81. Thomas R.C. The plasma membrane calcium ATPase (PMCA) of neurones is electroneutral and exchanges 2 H⁺ for each Ca²⁺ or Ba²⁺ ion extruded // J. Physiol. – 2009. – 587. – P. 315–327.

82. Thomas R.G. The $Ca^{2+}:H^+$ coupling ratio of the plasma membrane calcium ATPase in neurones is little sensitive to changes in external or internal pH // Cell Calcium. – 2011. – 49. – P. 357–364.
83. Дубицький Л.О. Волканич Л.С. Interaction of metal cations with Ca²⁺-transport sites of the plasma membrane Ca²⁺ pump of secretory cells of gastric glands // УБЖ. – 2003. – 75, № 2. – С. 39-46.

84. Carafoli E., Fedrizzi L., Domi T., Di Leva F., Brini M. Chapter 132 – Calcium Pumps. Handbook of Cell Signaling (Second Edition), Ralph A. Bradshaw and Edward A. Dennis, San Diego. – 2010. – P. 57-61.

85. Joshi N.B., Shamoo A.E. Binding of Eu^{3+} to cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ,Mg²⁺-ATPase - laser excited Eu^{3+} spectroscopic studies // Biophys. J. – 1987. – 51, N 2. – P. 185–191.

86. Gangola P., Shamoo A.E. Characterization of Ca²⁺,Mg²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum by laser-excited europium luminescence // Eur. J. Biochem. – 1987. – 162, N 2. – P. 357–363.

87. Visser G.J., Peters P.H., Theuvenet A.P. Cadmium ion is a noncompetitive inhibitor of red cell Ca⁽²⁺⁾-ATPase activity// Biochim. Biophys. Acta -1993. – 1152. – P. 26–34.

88. Verbost P.M., Flik G., Pang P.K.T., Lock R.A.C., Wendelaar Bonga S.E. Cadmium inhibition of the erythrocyte Ca²⁺ pump: a molecular interpretation// J. Biol. Chem. – 1989. – 264. – P. 5613–5615.

89. Toledo-Maciel A., Goncalves-Gomes S., Castex M., Vieyra A. Progressive Inactivation of Plasma Membrane $(Ca^{2+},Mg^{2+})ATPase$ by Cd^{2+} in the Absence of ATP and Reversible Inhibition during Catalysis // Biochemistry. – 1998. – 37, Nº44 15261– 15265.

90. Пестов Н.Б., Дмитриев Р.И., Шахпаронов М.И. Регуляция Ca²⁺ АТРазы плазматических мембран // Успехи биологической химии. – 2003. –
 43. – С. 99–138.

91. Selvam R., Ganesan K., Raju N., Gangadharanc A.C., Manohard B.M., Puvanakrishnan R. Low frequency and low intensity pulsed electromagnetic field exerts its antiinflammatory effect through restoration of plasma membrane calcium ATPase activity // Life Sciences. – 2007. – 80. – P. 2403–2410.

92. Mandai M., Das S., Chakraborti T., Chakraborti S. Matrix metalloprotease 2-mediated activation of $Ca(^{2+})$ -ATPase by superoxide radical $(O^{2^{*-}})$ in plasma membrane of bovine pulmonary vascular smooth muscle // Indian J Biochem Biophys. – 2002. – 39, Nº 6. – P. 390 – 396.

93. Костерін С.О. Кінетичні та енергетичні аспекти впливу діелектричної проникності середовища інкубації на каталітичну та транспортну активність Mg²⁺,ATP-залежної кальцієвої помпи плазматичної мембрани // УБЖ. – 2000. – 72, № 4 – С. 44 – 60.

94. Sepulveda M.R., Mata A.M. The interaction of ethanol with reconstituted synaptosomal plasma membrane Ca²⁺-ATPase // Biochimica et Biophysica Acta. – 2004. – 1665. – P. 75–80.

95. Бабич Л.Г, Шлыков С.Г., Борисова Л.А. Слинченко Н.Н., Браткова Н.Ф., Костерин С.А. Влияние этанола на активность энергозависимых Ca²⁺-транспортирующих систем клеток миометрия // УБЖ – 2000. – 72, № 1. – С. 32 – 41.

96. Carafoli E. The Ca²⁺-pump of the plasma membrane // J. Biol. Chem. – 1992. – 267, N 4. – P. 2115–2118.

97. Wang T., Tsai L.-I., Solaro J., Angela O., Gende G., Schwartz A. Effects of potassium on vanadate inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase from dog cardiac and rabbit skeletal muscle// Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1979. – 91, N 1. – P. 356-361.

98. Barrabin H., Garrahan P.J., Rega A.F. Vanadate inhibition of the Ca2+-ATPase from human red cell membranes // Biochim. Biophys. Acta. – 1980. – 600, N 3. – P. 796-804.

99. Федірко Н.В., Манько В.В., Клевець М.Ю. Вплив парахлормеркурібензоату та дитіотреітолу на вміст Са2+ у тканині слинних залоз та секрецію ними загального білка // Фізіологічний журнал. – 2001. – 47, № 3. – С. 35 – 41.

100. Chaudhary J., Walia M., Matharu J., Escher E., Grover A.K. Caloxin: a novel plasma membrane Ca²⁺-pump inhibitior // Am. J. Physiol. – 2001. – 280, N 4. – P. C1027–C1030.

101. Holmes M.E., Chaudhary J., Grover A.K. Mechanism of action of the novel plasma membrane Ca^{2+} -pump inhibitior caloxin // Cell Calcium. – 2003. – 33, N 4. – P. 241–245.

102. Gatto C., Milanick M.A. Inhibition of the red blood cell calcium pump by eosin and other fluorescein analogues // Amer. J. Physiol. – 1993. – 264, N
6. – P. 1577–1586.

103. Gatto C., Hale C.C., Xu W., Milanick M.A. Eosin, a potent inhibitor of the plasma membrane Ca pump, does not inhibit the cardiac Na-Ca exchanger // Biochemistry. – 1995. –34, N 3. – P. 965–972.

104. Слинченко Н.Н., Браткова Н.Ф., Костерин С.А., Зимина В.П., Черныш И.Г. Влияние эозина Үна каталитическую и функциональную активность Mg²⁺-ATP-зависимого кальциевого насоса плазматической мембраны гладкомышечных клеток // Биохимия. – 1998. – 63, вып. 6. – С. 812–819.

105. Введение в биомембранологию / Под. ред. Болдырева А.А. М.: Изд-во МГУ. – 1990. – 280 с.

106. Berridge M.I. Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers // Biochem. J. – 1984. – 220. – P. 345-360.

107. Cortijo J., Villagrasa V., Marti-Cabrera M., Villar V. The spasmogenic effects of vanadate in human isolated bronchus // Brit. J. Pharmacol. – 1997. – 121, N 7. – P. 1339-1349.

108. 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 Са²⁺-транспортирующих систем на кальциевые насосы гладкомышечной клетки // Укр. биохим. журн. – 1996. – 68, № 6. – С. 50–61. 109. Szewczyk M.M., Pande J., Akolkar G., Grover A.K. Caloxin 1b3: a novel plasma membrane Ca^{2+} -pump isoform 1 selective inhibitor that increases cytosolic Ca^{2+} in endothelial cells // Cell Calcium. – 2010. – 48, N 6. – P. 352-357.

110. 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 // Toxicol. Sci. – 2005. – 83, N 1. – P. 149–154.

111. Родік Р.В. Застосування каліксаренів для трансфекції ДНК у клітини // Укр. біохім. журн. – 2012. – 84, № 5. – С. 5-15.

112. Кальченко В.І., Родік Р.В., Бойко В.І. Каліксарени. Перспективи медико-біологічного застосування // Журнал органічної та фармацевтичної хімії. – 2005. – 3, № 4. – С. 13-29.

113. Coleman A.W., Jebors S., Cecillon S. Toxicity and biodistribution of para-sulfonato-calix[4]arene in mice// New. J. Chem. – 2008. – 32. – P. 780-782.

114. Lalor R., Baillie-Johnsos H., Redshew C., Matthnews S.E., Mueller
A. Cellular uptake of a fluorescent calix[4]arene derivative // J. Am. Chem. Soc.
2008. – 130, N 10. – P. 2892–2893.

115. Paclet M-H., Rousseau C.F., Yannick C., Morel F., Coleman A.W. An absence of non-specific immune response towards para-sulphonato-calix[n]arenes // Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry. – 2006. –55, N 3-4. – P. 353-357.

116. Т.О. Векліч, О.А. Шкрабак, С.О. Черенок, В.І. Кальченко, С.О. Костерін. Порівняльне дослідження впливу калікс[4]арену С-99 та його аналогів на Na⁺,K⁺-ATP-азну активність у плазматичній мембрані міоцитів матки // Укр. біохім. журн. - 2012. - Т. 84, № 6. - С. 49-57.

117. Komisarenko S.V., Kosterin S.O., Lugovskoy E.V., Kalchenko V.I. Calixarene methylene bisphosphonic acids as promising effectors of biochemical processes // Укр. біохім. журн. – 2013. – 85, № 6. – С. 106–128.

118. Векліч Т.О., Шкрабак О.А., Родік Р.В., Кальченко В.І., Костерін С.О. Каліксарен С-107 збільшує спорідненість Na⁺,K⁺-ATP-ази плазматичної мембрани гладеньком`язових клітин до уабаїну // Укр. біохім. журн. - 2011. - 83, № 1. - С. 38–44.

119. Векліч Т., Шкрабак О., Мазур Ю. Активність Ca²⁺,Mg²⁺-ATРази плазматичної мембрани гладеньком`язових клітин селективно пригнічується калікс[4]ареном С-90 // Вісник Львівського університету. - 2014. - вип. 68. - С. 337-347.

120. Caroni P., Zurini M., Clark A., Carafoli E. Further characterization and reconstitution of the purified Ca2+-pumping ATPase of heart sarcolemma // J. Biol. Chem. – 1983. – 258, N 12. – P. 7305–7310.

121. Furukawa R.-J., Nakamura H. Characterization of the Ca^{2+} ,Mg²⁺-ATPase purified by calmodulin-affinity chromatography from bovine aortic smooth muscle // J. Biochem. – 1984. – 96, N 5. – P.1343–1350.

122. Enyedi A., Minami J., Caride A.J., Penniston J.T. Characteristics of the Ca²⁺ pump and Ca²⁺-ATPase in plasma membrane of rat myometrium // Biochem. J. – 1988. – 252, N 1. – P. 215–220.

123. Falchetto R., Vorherr T., Brunner J., Carafoli E. The plasma membrane Ca^{2+} pump contains a site that interacts with its calmodulin-binding domain // J. Biol. Chem. – 1991. –266. – P. 2930–2936.

124. Denninga E. J., Beckstein O. Influence of lipids on protein-mediated transmembrane transport // Chemistry and Physics of Lipids. – 2013. – 165, N
6. – P. 638-647.

125. Enyedi A., Flura M., Sarkadi B., Gardos G., Carafoli E. The maximal velocity and the calcium affinity of the red cell calcium pump may be regulated independently // J. Biol. Chem. – 1987. – 13, N. 263. – P. 6425–6430.

126. Felix C. F., Oliveira V. H., Moreira O. C., Mignaco J. A., Barrabin H., Scofano H. M. Inhibition of plasma membrane Ca²⁺-ATPase by heparin is modulated by potassium // Internation. J. Biochem. Cell Biol. – 2007. – 39. – P. 586–596.

127. Tang D., Dean W.L., Borchman D., Paterson C.A. The influence of membrane lipid structure on plasma membrane Ca²⁺-ATPase activity // Cell Calcium. – 2006. – 39, N 3. – P. 209–216.

128. Davies S.S., Guo L. Lipid peroxidation generates biologically active phospholipids including oxidatively N-modified phospholipids // Chemistry and Physics of Lipids. – 2014. – 181. – P. 1-33.

129. Гулая Н.М., Бабич Л.Г., Шлыков С.Г., Маргитич В.М., Говсеева Н.Н, Климашевский В.М., Костерин С.А. Влияние Nпальмитоилэтаноламина на энергозависимый транспорт Ca²⁺ в везикулах сарколемы миометрия и их фосфолипидный состав // Укр. биохим. журн. – 1997. – 69, № 4–5. – С. 64–73.

130. Fukuda T., Ogurusu T., Furukawa K., Shigekawa M. Protein kinase C-dependent phosphorylation of sarcolemmal Ca²⁺-ATPase isolated from bovine aortic smooth muscle // Biochemistry (Tokyo). – 1990. – 108. – P. 629–634.

131. Kuo T.H., Wang K.K., Carlock L., Diglio C., Tsang W. Phorbol ester induces both the gene expression and phosphorylation of the plasma membrane Ca^{2+} -pump // J. Biol. Chem. – 1991. – 266. – P. 2520–2525.

132. Qu Y., Torchia J., Sen A. K. Protein kinase C mediated activation and phosphorylation of Ca²⁺-pump in cardiac sarcolemma // Can. J. Physiol. Pharmacol. – 1992. – 9, N. 70. – P. 1230–1235.

133. Wright L.C., Chen S., Roufogalis B.D. Regulation of the activity and phosphorylation of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase by protein kinase C in intact human erythrocytes // Arch. Biochem. Biophys. – 1993. – 306. – P. 277–284.

134. Krebs J., Guerini D. The calcium pump of plasma membranes Biomembranes // A Multi-Volume Treatise. – 1996. – 5. – P. 101–131.

135. Карбовська Л.С., Горенко З.А., Лисай І.П., Бабан В.М., Весельский С.П. Вплив окситоцину на рівень жовчоутворення і хімічний склад жовчі у щурів // Фізика живого. – 2010. – 18, № 2. – С. 70–74. 136. Степанковская Г. К., Шинлова О. П., Фомин В.П., Костерин С.А., Яроцкий Н.Е. Влияние окситоцина и сигеритина на транспорт Ca²⁺ во фракции плазматических мембран клеток миометрия // УБЖ. – 1989. – 61, № 5. – С. 109–112.

137. Шинлова О.П., Фомин В.П., Костерин С.А. Влияние окситоцина на кальциевый насос сарколеммы миометрия // УБЖ. – 1987. – 59, № 2. – С. 75 – 79.

138. Moccia F., Berra-Romani R., Tanzi F. Update on vascular endothelial Ca²⁺ signalling: A tale of ion channels, pumps and transporters // World J Biol Chem. – 2012. – 3, № 7. – P. 127 – 158.

139. Guerini D., Pan B., Carafoli E. Expression, purification, and characterization of isoform 1 of the plasma membrane Ca^{2+} pump: focus on calpain sensitivity // J. Biol. Chem. – 2003. – 278, N 40. – P. 38141–38148.

140. Pászty K., Verma A.K., Padányi R., Filoteo A.G., Penniston J.T., Enyedi A. Plasma Membrane Ca²⁺ATPase Isoform 4b Is Cleaved and Activated by Caspase-3 during the Early Phase of Apoptosis // The Journal of Biological Chemistry. – 2002. – 277. – P. 6822-6829.

141. Dick I.M., Glendenning J.L.P., Prince R.L. Estrogen and androgen regulation of plasma membrane calcium pump activity in immortalized distal tubule kidney cells // Molecular and Cellular Endocrinology. – 2003. – 212, Nº1-2. – P. 11 – 18.

142. Vanagas L., Rossi R.C., Caride A.J, Filoteo A.G., Strehler E.E., Rossi J.P. Plasma membrane calcium pump activity is affected by the membrane protein concentration. Evidence for the involvement of the actin cytoskeleton // Biochim Biophys Acta. – 2007. – 1768, Nº6. – P. 1641 – 1649.

143. Monesterolo N.E., Amaiden M.R., Campetelli A.N., Santander V.S., Arce C.A., Pié J., Casale C.H. Regulation of plasma membrane Ca²⁺-ATPase activity by acetylated tubulin: influence of the lipid environment // Biochimica et Biophysica Acta. – 2012. – 1818, Nº3. – P. 601 – 608. 144. Lock J.T., Sinkins W.G., Schilling W.P. Effect of protein S-glutathionylation on Ca²⁺ homeostasis in cultured aortic endothelial cells // Am J Physiol Heart Circ Physiol. – 2011. – 300, Nº 2. – P. 493 – 506.

145. Ritchie M.F., Zhou Y., Soboloff J. Transcriptional mechanisms regulating Ca²⁺ homeostasis // Cell Calcium. – 2011. – 49, N $^{\circ}$ 5. – P. 314 – 321.

146. Strehler E.E. Plasma membrane calcium ATPases as novel candidates for therapeutic agent development // J Pharm Pharm Sci. – 2013. – 16, № 2. – P. 190 – 206.

147. Gros R., Afroze T., You X.-M., Kabir G., Wert R., Kalair W., Hoque A.E., Mungrue I.N., Husain M. Plasma membrane calcium ATPase overexpression in arterial smooth muscle increases vasomotor responsiveness and blood pressure // Circulation Research. – 2003. – 93, № 7. – P. 614 – 621.

148. Шлыков С.Г., Слинченко Н.Н., Бурдыга Ф.В., Костерин С.А. Утеротоническое действие сигетина и его влияние на Mg²⁺,АТР-зависимый транспорт и стационарный обмен Ca²⁺ через сарколему миометрия // УБЖ. – 1993. – 65, № 3. – С. 57–65.

149. Зварич Е.И. Кальциевая АТРаза плазматической мембраны. Структура и функции // Биол. мембраны. – 1991. – 8, № 6. – С. 565–584.

Література до глави 2

1. Duchen M. R. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology // Mol. Aspects Med. – 2004. – 4. – P. 365-451.

2. Dedkova E. N., Blatter L. A. Mitochondrial Ca^{2+} and the heart // Cell Calcium. – 2008. – 44, N 1. – P. 77-91.

3. Hoppe U.C. Mitochondrial calcium channels // FEBS Lett. – 2010. – 584, N10. – P. 1975-1981.

4. Santo-Domingo J., Demaurex N. Calcium uptake mechanisms of mitochondria // Biochim. Biophys. Acta – 2010. – 1797. – P. 907-912.

5. Gunter K.K., Gunter T.E. Transport of calcium by mitochondria // J. Bioenerg. Biomembr. – 1994. – 26. – P. 471-485.

6. Padua R.A., Baron K.T., Thyagarajan C.C., Thayer S.A. Reduced Ca²⁺ uptake by mitochondria in pyruvate dehydrogenase-deficient human diploid fibroblasts // Am. J. Physiol. – 1998. – 274, N3. – P. C615-C622.

7. Contreras L., Drago I., Zampese E., Pozzan T. Mitochondria: The calcium connection // Biochim. Biophys. Acta – 2010. – 1797. – P. 607-618.

8. Griffiths E.J. Mitochondrial calcium transport in the heart: physiological and pathological roles // J. Mol. Cell. Cardiol. – 2009. – 46, N6. – P. 789-803.

9. Griffiths E. J., Balaska D., Cheng W. H.Y. The ups and downs of mitochondrial calcium signalling in the heart // Biochimica et Biophysica Acta. – 2010. – 1797. – P. 856-864.

10. Calì T., Ottolini D., Brini M. Mitochondrial Ca^{2+} as a key regulator of mitochondrial activities // Adv. Exp. Med. Biol. – 2012. – 942. – P.53-73.

11. Gincel D., Zaid H., Shoshan-Barmatz V. Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function // Biochem. J. – 2001. – 358. – P. 147-155.

12. Szabadkai G., Duchen M.R. Mitochondria: the hub of cellular Ca²⁺ signaling // Physiology (Bethesda). – 2008. – 23. – P. 84-94.

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. – 31, N3. – P. 227-285.

14. Rizzuto R., Marchi S., Bonora M., Aguiari P., Bononi A., De Stefani D., Giorgi C., Leo S., Rimessi A., Siviero R., Zecchini E., Pinton P. Ca²⁺ transfer from the ER to mitochondria: When, how and why // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – 1787, N11. – P. 1342-1351.

15. Spät A., Szanda G., Csordás G., Hajnóczky G. High- and low-calcium-dependent mechanisms of mitochondrial calcium signalling // Cell Calcium. – 2008. – 44, N1. – P. 51-63.

16. Carafoli E. The fateful encounter of mitochondria with calcium: How did it happen? // Biochim. Biophys. Acta – 2010. – 1797. – P. 595–606.

17. Saotome M., Katoh H., Satoh H., Nagasaka S., Yoshihara S., Terada H., Hayashi H. Mitochondrial membrane potential modulates regulation of mitochondrial Ca²⁺ in rat ventricular myocytes *//* Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2005. – 288, N 4. – P. H1820-H1828.

18. Kim B., Matsuoka S. Cytoplasmic Na⁺-dependent modulation of mitochondrial Ca²⁺ via electrogenic mitochondrial Na⁺–Ca²⁺ exchange // J. Physiol. – 2008. – 586. – P. 1683-1697.

19. Smets I., Caplanusi A., Despa S., Molnar Z., Radu M., Vande Ven M., Ameloot M., Steels P. Ca^{2+} uptake in mitochondria occurs via the reverse action of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger inmetabolically inhibitedMDCK cells // Am. J. Physiol. Renal Physiol. – 2004. – 286. – P. F784-794.

20. Missiaen L., Wuytack F., Raeymaekers L., De Smedt H., Droogmans G., Declerck I., Casteels R. Ca^{2+} extrusion across plasma membrane and Ca^{2+} uptake by intracellular stores // Pharmac. Ther. – 1991. – 50, N 2. – P.191-232.

21. Gunter T.E., Pfeiffer D.R. Mechanisms by which mitochondria transport calcium // Am. J. Physiol. – 1990. – 28. – P. C755-C786.

22. Костерин С. А., Бурдыга Ф. В. Транспорт и внутриклеточный гомеостаз Ca²⁺ в миометрии // Успехи современной биологии – 1993. – 113, № 4, – С. 485-506.

23. Бабич Л.Г., Шлыков С.Г., Борисова Л.А., Костерин С.А. Энергозависимый транспорт Ca²⁺ во внутриклеточных структурах гладкой мышцы // Биохимия. – 1994. – 59, № 8. – С. 1218-1229.

24. Костерин С. А. Транспорт кальция в гладких мышцах / Киев: Наук. думка, 1990. – 216 с.

25. Batra S. Uptake and energy-dependent extrusion of calcium in the rat uterus // Acta Physiol. Scand. – 1982. – 114, N 3. – P. 447-452.

26. Carafoli E. Intracellular calcium regulation, with special attention to the role of the plasma membrane calcium pump // J. Cardiovasc. Pharmac. – 1988. – 12. – P. S77-S84.

27. Palade P., Dettbarn C., Brunder D., Stein P., Hals G. Pharmacology of calcium release from sarcoplasmic reticulum // J. Bioenerg. Biomembr. – 1989. – 21, N2. – P. 295-320.

28. Wingrove D.E., Gunter T.E. Kinetics of mitochondrial calcium transport. II.A kinetic description of the sodium-dependent calcium efflux mechanism of liver mitochondria and inhibition by ruthenium red and tetraphenylphosphonium // J. Biol. Chem. – 1986. – 261. – P. 15166-15171.

29. Akerman K.E.O. Effect of Mg^{2+} and spermine on the kinetics of Ca^{2+} transport in rat-liver mitochondria // J. Bioenerg. Biomembr. – 1977 – 9. – P. 65-72.

30. Tassani V., Campagnolo M., Toninello A., Siliprandi D. The contribution of endogenous polyamines to the permeability transition of rat liver mitochondria // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1996. – 226, N3. – P. 850-854.

31. Бабич Л.Г., Борисова Л.А., Шлыков С.Г., Титус О.В., Костерин С.А. Влияние ионов Mg и спермина на АТР-зависимый транспорт Ca²⁺ во внутриклеточных структурах миометрия. І. Сравнительное изучение аккумуляции Ca²⁺ в митохондриях и саркоплазматическом ретикулуме. Укр. біохім. журн. – 2004. – 76, №5. – С. 52-60.

32. Бабич Л.Г., Борисова Л.А., Шлыков С.Г., Титус О.В., Костерин С.А. Влияние ионов Mg и спермина на АТР–зависимый транспорт Ca²⁺ во внутриклеточных структурах миометрия. II. Сравнительное изучение действия спермина, ионов Mg и циклоспорина A на транспорт Ca²⁺ в митохондриях // Укр. біохім. журн. – 2004. – 76, №6. – С. 55–62.

33. Aziz S. M., Olson J. W., Gillespie M. N. Multiple polyamine transport pathways in cultured pulmonary artery smooth muscle cells: regulation by hypoxia // Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. – 1994. – 10, N 2. – P. 160-166.

34. Loser C. Polyamines in human and animal milk // Br. J. Nutr. – 2000. – 84, N 1. – P. S55-S58.

35. Fernandez A. I., Cantabrana B., Sanchez M., Hidalgo A. Extracellular and intracellular effects of polyamines on smooth muscle contractions // Life Sci. – 1995. – 57, N 9. – P. 855-861.

36. Lukyanenko V., Chikando A., Lederer W.J. Mitochondria in cardiomyocyte Ca²⁺ signaling // Int. J. Biochem. Cell Biol. – 2009. – 41, N 10. – P. 1957-1971.

37. Buntinas L., Gunter K. K., Sparagna G. C., Gunter T. E. The rapid mode of calcium uptake into heart mitochondria (RaM): comparison to RaM in liver mitochondria // Biochim. Biophys. Acta. – 2001. – 1504, N 2-3. – P. 248-261.

38. Gunter T.E., Sheu S.S. Characteristics and possible functions of mitochondrial $Ca^{(2+)}$ transport mechanisms // Biochim Biophys Acta. – 2009. – 1787, N11. – P. 1291-1308.

39. Altschafl B.A., Beutner G., Sharma V.K., Sheu S.S., Valdivia H.H. The mitochondrial ryanodine receptor in rat heart: a pharmaco-kinetic profile // Biochim. Biophys. Acta – 2007. – 1768, N 7. – P. 1784-1795.

40. Beutner G., Sharma V.K., Giovannucci D.R., Yule D.I., Sheu S.S. Identification of a ryanodine receptor in rat heart mitochondria // J. Biol. Chem. – 2001. – 276, N 24. – P. 21482-21488.

41. Beutner G., Sharma V.K., Lin L., Ryu S.Y., Dirksen R.T., Sheu S.S. Type 1 ryanodine receptor in cardiac mitochondria: transducer of excitationmetabolism coupling // Biochim. Biophys. Acta – 2005. – 1717, N 1. – P. 1-10.

42. Бабич Л.Г., Шлыков С.Г., Кандаурова Н.В., Костерин С.А. Трансмембранный обмен Ca²⁺ в деполяризованных митохондриях миометрия крыс // Укр. біохім. журн. – 2011. – 83, №6. – С.56-62.

43. Nicholls D.G. Mitochondria and calcium signaling // Cell Calcium. – 2005. – 38, №3-4. – P. 311-317.

44. Murphy E., Eisner D.A. Regulation of intracellular and mitochondrial sodium in health and disease // Circ. Res. – 2009. – 104, N3. – P. 292-303.

45. Despa S., Islam M. A., Pogwizd S. M., Bers D. M. Intracellular [Na⁺] and Na⁺ pump rate in rat and rabbit ventricular myocytes // J. Physiol. – 2002. – 539. – P. 133-143.

46. Nicholls D.G., Akerman K. Mitochndrial calcium transport // Biochim. Biophys. Acta. – 1982. – 683. – P. 57-88.

47. Pozzan T., Rizzuto R., Volpe P., Meldolesi J. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores // Physiol. Rev. – 1994. – 74, N3. – P. 595-636.

48. Bernardi P., Vassanelli S, Veronese P, Colonna R, Szabó I, Zoratti M. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations // J. Biol. Chem. – 1992. – 267, N 5. – P. 2934-2939.

49. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death // Biochem. J. - 1999. - 341, Pt 2. - P. 233-249.

50. Leung A.W., Halestrap A.P. Recent progress in elucidating the molecular mechanism of the mitochondrial permeability transition pore // Biochim. Biophys. Acta. – 2008. – 1777. – P. 946-952.

51. Starkov A.A.The molecular identity of the mitochondrial Ca^{2+} sequestration system // FEBS J. – 2010. – 277, N18. – P. 3652-3563.

52. Rizzuto R., Pozzan T. Microdomains of intracellular Ca²⁺: molecular determinants and functional consequences // Physiol. Rev. – 2006. – 86. – P. 369-408.

53. Gunter T.E., Gunter K.K., Sheu S.S., Gavin C.E. Mitochondrial calcium transport: physiologocal and pathological relevance // Am. J. Physiol. – 1994. – 267, N 2. – P. C313-C339.

54. Hansford R.G. Physiological role of mitochondrial Ca²⁺ transport // J. Bioenerg. Biomembr. – 1994. – 26. – P. 495-508.

55. Satrústegui J., Pardo B., Del Arco A. Mitochondrial transporters as novel targets for intracellular calcium signaling // Physiol. Rev. – 2007. – 87, N1. – P. 29-67.

56. Yamamoto H., Van Breemen C. Ca²⁺ compartments in saponinskinned cultured vascular smooth muscle cells // J. Gen. Physiol. – 1986. – 87. – P. 369-389.

57. Griffiths E. J., Rutter G. A. Mitochondrial calcium as a key regulator of mitochondrial ATP production in mammalian cells // Biochim. Biophys. Acta. – 2009 – 1787, N11. – P. 1324-1333.

58. McCormack J.G., Halestrap A.P., Denton R.M. Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism // Physiol. Rev. – 1990.
70. – P. 391-495.

59. Rizzuto R., Simpson A.W.M., Brini M., Pozzan T. Rapid changes of mitochondrial Ca²⁺ revealed by specifically targeted recombinant aequorin // Nature – 1992. – 358. – P. 325-327.

60. Rizzuto R., Brini M., Murgia M., Pozzan T. Microdomains of high Ca^{2+} close to IP₃-sensitive Ca^{2+} channels that are sensed by neighbouring mitochondria // Science – 1993. – 262. – P. 744-747.

61. Великопольська О.Ю., Манько Б.О., Манько В.В.
Ендоплазматично-мітохондріальна Са²⁺-функціональна одиниця:
залежність дихання секреторних клітин від активності ріанодин- та ІФ₃-чутливих Са²⁺-каналів // Укр. біохім. журн. – 2012. – 84, № 5. – С. 76–88.

62. Vance J.E. MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: Lipids and beyond // Biochim Biophys Acta. 2013 Dec 6. pii: S1388-1981(13)00265-5. doi: 10.1016/j.bbalip.2013.11.014

63. Marchi S., Patergnani S., Pinton P. The endoplasmic reticulummitochondria connection: One touch, multiple functions. Biochim Biophys Acta.
2014. – 1837, N 4. – P. 461-469.

64. Walsh C., Barrow S., Voronina S., Chvanov M., Petersen O.H., Tepikin A. Modulation of calcium signalling by mitochondria // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – 1787, N11. – P. 1374-1382.

65. Poburko D., Santo-Domingo J., Demaurex N. Dynamic regulation of the mitochondrial proton gradient during cytosolic calcium elevations // J. Biol. Chem. – 2011. – 286, N13. – P. 11672-11684.

66. Wu X., Bers D.M. Free and bound intracellular calmodulin measurements in cardiac myocytes // Cell Calcium. – 2007. – 41, N4. – P. 353-364.

67. Means A.R., VanBerkum M.F., Bagchi I., Lu K.P., Rasmussen C.D. Regulatory functions of calmodulin.// Pharmacol. Ther. – 1991. – 50, N 2 – P. 255–270.

68. Vogel H.J. The Merck Frosst Award Lecture 1994. Calmodulin: a versatile calcium mediator protein // Biochem. Cell Biol. –1994. – 72, N 9-10. – P.357–376.

69. James P., Vorherr T., Carafoli E. Calmodulin-binding domains: just two faced or multi-faceted? // Trends Biochem. Sci. – 1995. – 20, N 1. – P. 38-42.

70. Maier L.S., Bers D.M. Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond // J. Mol. Cell Cardiol. – 2002. – 34, N 8. – P.919-939.

71. Moreau B., Nelson C., Parekh A.B. Biphasic regulation of mitochondrial Ca^{2+} uptake by cytosolic Ca^{2+} concentration // Curr. Biol. – 2006. – 16, N16. – P.1672-1677.

72. Бабіч Л.Г., Шликов С.Г., Наумова Н.В., Костерін С.О. Використання методу протокової цитометрії для визначення вмісту Ca²⁺ у мітохондріях та впливу на нього антагоністів кальмодуліну // Укр. біохім. журн. – 2008 – 80, N4. – C.51-58.

73. Шликов С.Г., Бабіч Л.Г., Євтушенко М.Є., Карахім С.О., Костерін С.О. Модуляція мембранного потенціалу мітохондрій антагоністами кальмодуліну // Ukr. Biochem. J. – 2014. – 86, N 1. – P. 29-41.

74. Divakaruni A.S., Brand M.D. The regulation and physiology of mitochondrial proton leak.// Physiology (Bethesda). – 2011. – 26, N 3. – P.192-205.

75. Scatena R. Mitochondria and drugs // Adv. Exp. Med. Biol. – 2012. – 942. – P. 329-346.

76. Thompson C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease // Science – 1995. – 267. – P. 1456-1462.

77. Skulachev V.P. Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis // Apoptosis. – 2006. – 11, N 4. – P. 473-485.

78. Giovannini C., Matarrese P., Scazzocchio B., Sanchez M., Masella R., Malorni W. Mitochondria hyperpolarization is an early event in oxidized lowdensity lipoprotein-induced apoptosis in Caco-2 intestinal cells // FEBS Lett. – 2002. – 523, N 1-3. – P. 200-206.

79. Sommer S.P., Sommer S., Sinha B., Wiedemann J., Otto C., Aleksic I., Schimmer C., Leyh R.G. Ischemia-reperfusion injury-induced pulmonary mitochondrial damage // J. Heart. Lung Transplant. – 2011. – 30, N 7. – P. 811-818.

80. Gutsche C. D. Calixarenes Revisited. / The Royal Society of Chemistry: Cambridge. 1998.

81. Gutshe C.D., Igbal M. p-tert-Butyl calix[4]arene // Org. Synth. – 1990. - 68. – P. 234–236.

82. Rodic R.V., Boyko V.I., Kalchenko V.I. Calixarenes in bio-medical researches // Curr. Med. Chem. – 2009. – 16, N 13. – P. 1630–1655.

83. Klyachina M.A., Boyko V.I., Yakovenko A.V., Babich L.G., Shlykov S.G., Kosterin S.O., Khilya V.P., Kalchenko V.I. Calix[4]arene N-Chalconeamides: Synthesis and Influence on Mg²⁺,ATP-Dependent Ca²⁺

Accumulation in the Smooth Muscle Subcellular Structures // J. Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry. – 2008. – 60. – P. 131–137.

84. Бабич Л.Г. Шлыков С.Г., Бойко В.И., Клячина М.А., Костерин С.А. Каликс[4]аренхалконамиды С-136 и С-137 гиперполяризуют мембрану митохондрий миометрия. Биоорганическая химия. – 2013. – 39, № 6. – С.728-735.

Література до глави 3

1. Guibert C., Ducret T., Savineau J.P. Expression and physiological roles of TRP channels in smooth muscle cells // Adv. Exp. Med. Biol. – 2011. V. 704. – P. 687-706.

2. Berridge M. J. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms // J. Physiol. – 2008. – V. 586. – P. 5047–5061.

3. Kim H.R., Appel S., Vetterkind S., Gangopadhyay S.S., Morgan K.G. Smooth muscle signalling pathways in health and disease // J. Cell. Mol. Med. – 2008. – V. 12. – P. 2165-2180.

4. Костерин С. А. Транспорт кальция в гладких мышцах /– Киев: Наук. думка, 1990. – 216 с.

5. Hutchings G., Williams O., Cretoiu D., Ciontea S.M. Myometrial interstitial cells and the coordination of myometrial contractility // J. Cell. Mol. Med. -2009. -V.13, N10. -P.4268-4282.

6. Shmygol A., Blanks A.M., Bru-Mercier G., Gullam J.E., Thornton S. Control of uterine Ca^{2+} by membrane voltage: toward understanding the excitation-contraction coupling in human myometrium // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2007. – V. 1101. – P. 97-109.

 Шликов С. Г. Окситоцин та його роль у контролі внутрішньоклітинного рівня іонів Са // Укр. біохім. журн. – 2010. – Т. 82, № 2. – С. 5-14.

8. Wray S. Uterine contraction and physiological mechanisms of modulation // Am. J. Physiol. – 1993. – V. 264, N1. – P. C1-C18.

9. Schaub M. C., Heizmann C. W. Calcium, troponin, calmodulin, S100 proteins: From myocardial basics to new therapeutic strategies / M. C. Schaub // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2008. – V. 369. – P. 247-264.

10. Cheng H. , Lederer W. J. Calcium sparks // Physiol. Rev. – 2008. – V. 88, N 4. – P. 1491-1545.

 Santo-Domingo J., Demaurex N. Calcium uptake mechanisms of mitochondria / Santo-Domingo J// Biochim. Biophys. Acta – 2010. – V. 1797. – P. 907-912.

12. Iino M. Spatiotemporal dynamics of Ca²⁺ signaling and its physiological roles // Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci. – 2010. – V. 86, N 3. – P. 244-256.

13. Aguilar H. N., Mitchell B.F. Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility / H. N. Aguilar. // Hum. Reprod. Update – 2010. – V. 16, N 6. – P. 725-744.

14. Rizzuto R., S. Marchi, M. Bonora, et al. Ca^{2+} transfer from the ER to mitochondria: When, how and why // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – V. 1787, N11. – P. 1342-1351.

15. Thorneloe K.S., Nelson M.T. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility // Can. J. Physiol. Pharmacol. – 2005. – V. 83. – P. 215-242.

16. Wray S., Burdyga T., Noble K. Calcium signalling in smooth muscle // Cell Calcium – 2005. – V. 38. – P. 397-407.

17. Floyd R., Wray S. Calcium transporters and signalling in smooth muscles // Cell Calcium – 2007 – V. 42. – P. 467-476.

18. Guibert C., Ducret T., Savineau J.P. Voltage-independent calcium influx in smooth muscle // Prog. Biophys. Mol. Biol. – 2008. – V. 98. – P. 10–23.

19. Бурчинская Н. Ф., Шлыков С. Г., Костерин С. А. Активный Na⁺зависимый транспорт Ca²⁺ во фракции везикул сарколеммы гладкой мышцы // Биохимия. 1990, т.55,N 3, с.541-548. 20. Костюк П. Г. Кальций и клеточная возбудимость – М.: Наука, 1986. – 255с.

21. Duchen M. R. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology // Mol. Aspects Med. – 2004. – V. 4. – P. 365-451.

22. Aziz S. M., Olson J. W., Gillespie M. N. Multiple polyamine transport pathways in cultured pulmonary artery smooth muscle cells: regulation by hypoxia // Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. – 1994. – V. 10, N 2. – P. 160- 166.

23. Loser C. Polyamines in human and animal milk // Br. J. Nutr. –2000. – V. 84, N1. – P. S55-S58.

24. Fernandez A. I., Cantabrana B., Sanchez M., Hidalgo A. Extracellular and intracellular effects of polyamines on smooth muscle contractions // Life Sci. – 1995. – V. 57, N 9. – P. 855-861.

25. Wu X., Bers D.M. Free and bound intracellular calmodulin measurements in cardiac myocytes / X. Wu // Cell Calcium. – 2007. – V. 41, N4. – P. 353-364.

26. Moreau B., Nelson C., Parekh A.B. Biphasic regulation of mitochondrial Ca^{2+} uptake by cytosolic Ca^{2+} concentration // Curr. Biol. – 2006. –V. 16, N16. – P. 1672-1677.

27. Кондратюк Т. П., Быченок С. Ф., Прищепа Л. А., Бабич Л. Г., Курский М. Д., Осипенко А. А. Выделение и характеристика фракции плазматических мембран миометрия свиньи // Укр. биохим. журн. – 1986. – Т. 58, № 4. – С. 50-58.

28. Mollard P., Mironneau J., Amedee T., Mironneau C. Electrophysiological characterization of single pregnant rat myometrial cells in short-term primary culture // Am. J. Physiol: Cell Physiology. – 1986. – V. 19, N1. – P.C47-C54.

29. Костерин С.А., Браткова Н. Ф., Курский М. Д. Роль сарколеммы и митохондрий в обеспечении кальциевого контроля расслабления миометрия // Биохимия – 1985. – Т. 50, № 8. – С.1350-1361.

30. Курский М.Д., Кондратюк Т. П., Осипенко А. А. Эндогенное фосфорилирование фрагментов саркоплазматического ретикулума быстрых скелетных мышц кролика // Биохимия. – 1982. – Т.47, №1. –С. 34-42.

31. Laemmly U.R. Cleavage of structural proteins during rhe assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – V. 227. – P.680-685.

32. Костерин С. А., Бурчинская Н. Ф. Метод определения кинетических характеристик Ca²⁺-транспортирующих систем субклеточных структур гладких мышщ // Укр. биохим. журн. – 1987. – Т. 59, № 2. – С. 66-69.

33. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики– М.: Мир, 1979. – 280 с.

34. Sanborn B.M. Hormones and calcium: mechanisms controlling uterine smooth muscle contractile activity. The Litchfield Lecture // Exp. Physiol. – 2001. – V. 86. – P. 223-237.

35. Anwer Kh., Sanborn B. M. Changes in intracellular free calcium in isolated myometrial cells: role of extracellular and intracellular calcium and possible involvement of guanine nucleotide-sensitive protein // Endocrinology. – 1989. – V. 124. – P.17-23.

36. Sanborn B.M., Yue C., Wang W., Dodge K.L. G protein signalling pathways in myometrium // Rev. Reprod. – 1998. –V. 3. – P. 196-205.

37. Burghardt R. C., Barhoumi R., Sanborn B.M., Andersen J. Oxytocininduced Ca²⁺ responses in human myometrial cells // Biol. Reprod. – 1999. – V. 60. – P. 777-782.

38. McFadzean I., Gibson A. The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle // Br. J. Pharmacol. -2002. - V. 135. - P. 1-13.

39. Minke B., Cook B. TRP channel proteins and signal transduction / B. Minke // Physiol. Rev. – 2002. – V. 82. – P.429-472.

40. Merritt J.E., Armstrong W.P., Benham C.D. et al. SK&F 96365, a novel inhibitor of receptor-mediated calcium entry // Biochem. J. – 1990. – V. 27. – P. 515-522.

41. Boulay G., Zhu X., Peyton M. et al. Cloning and expression of a novel mammalian homolog of Drosophila transient receptor potential (Trp) involved in calcium entry secondary to activation of receptors coupled by the Gq class of G protein // J. Biol. Chem. – 1997. – V. 272. – P. 26972-26980.

42. Flemming R., Xu S., Beech D. Pharmacological profile of storeoperated channels in cerebral arteriolar smooth muscle cells // Br. J. Pharmacol. – 2003. – V. 139. – P. 955-965.

43. Бурдыга Ф. В., Бабич Л. Г., Таран Т. Т., Костерин С. А. Кальциевый насос сарколеммы контролирует расслабление гладкой мышцы // Биофизика – 1994. – Т. 39, № 2. – С. 365-371.

44. Osa T. Effects of magnesium and temperature during the recovery process from the potassium contracture of the pregnant rat myometrium // Jpn. J. Physiol. – 1975. – V. 25, N2. – P.185-199.

45. Fiskum G. Intracellular levels and distribution of Ca²⁺ in digitoninpermeabilized cells // Cell Calcium. – 1985. – V. 6, N 1-2. – P. 25-37.

46. Tassani V., Campagnolo M., Toninello A., Siliprandi D. The contribution of endogenous polyamines to the permeability transition of rat liver mitochondria // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1996. – V. 226, N3. – P. 850-854.

47. Tica V.I., Tica A.A., Carling V., Banica O.S. Magnesium ion inhibits spontaneous and induced contractions of isolated uterine muscle // Gynecol. Endocrinol. – 2007. – V. 23, N7. – P. 368-372.

48. Smith C.D. and Snyder R. Modulation of inositol phospholipid metabolism by polyamines // Biochem. J. – 1988. – V. 256. – P.125-130.

49. 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. – V. 50, N2. – P. 98-115.

50. Sasaki T., Naka M., Nakamura F., Tanaka T. Ruthenium red inhibits the binding of calcium to calmodulin required for enzyme activation // J. Biol. Chem. – 1992. – V. 267, N30. – P. 21518-21523.

51. Gietzen K. Pharmacological regulation of the activity of calmodulin. P.405-423. / In: Intracellular calcium regulation. Edit by H.Bader, K.Gietzen, J.Rosenthal, R.Rudel, H.U.Wolf/ Manchester University Press 1986. – 480 P.

52. Бабич Л. Г., Борисова Л. А., Шлыков С. Г., Титус О. В., Костерин С. А. Влияние ионов Mg и спермина на АТР–зависимый транспорт Ca²⁺ во внутриклеточных структурах миометрия. І. Сравнительное изучение аккумуляции Ca²⁺ в митохондриях и саркоплазматическом ретикулуме // Укр. біохім. журн. – 2004. – Т. 76, № 5. – С. 52-61.

53. Бабич Л.Г., Борисова Л. А., Шлыков С. Г., Титус О. В., Костерин С. А. Влияние ионов Mg и спермина на АТР–зависимый транспорт Ca²⁺ во внутриклеточных структурах миометрия. II. Сравнительное изучение действия спермина, ионов Mg и циклоспорина A на транспорт Ca²⁺ в митохондриях // Укр. біохім. журн. – 2004. – Т. 76, № 6. – С. 55–63.

54. Nicholls D.G. Mitochondria and calcium signaling // Cell Calcium. – 2005. – V. 38, №3-4. – P. 311-317.

Література до глави 4

1. Костюк П.Г., Костюк О.П., Лук'янець О.О. Іони кальцію у функції мозку – від фізіології до патології. – К.: Наук. Думка, 2005. – 199с.

Rizzuto R., Pozzan T. Microdomains of intracellular Ca²⁺: molecular determinants and functional consequences // Phisiol. Rev. – 2006. – V.86, – P. 369-408.

 Sanborn B.M. Hormonal signaling and signal pathway crosstalk in the control of myometrial calcium dynamics // Semin. Cell Dev. Biol. – 2007. – V. 18,N 3. – P. 305-314. 4. Костерин С.А. Транспорт кальция в гладких мышцах. – К.: Наук. думка. – 1990. – С. 1-215.

5. Шуба М.Ф., Гокина Н.И., Гуровская А.В. Механизмы возбуждения и сокращения гладких мышц мозговых сосудов. К.: Наукова думка, 1991. – 168 с.

Walsh M.P. Regulation of vascular smooth muscle tone // Can. J.
 Physiol. Pharmacol. – 1994. – V. 72. – P. 919-936.

 Kosterin S.A., Burdyga Th.V., Fomin V.P., Grover A.K. Mechanisms of Ca²⁺ 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.

 Sanborn B.M., Anwer K., Wen Y., Stefani E., Toro L., Singh S.P. Modification of Ca2+ regulatory systems. In: R.E.Garfield and T.N.Tabb, editor. Control of Uterine Contractility. Boca Raton, FL: CRC Press; – 1994. – P. 105-128.

9. Horowitz A., Menice C.B., Laporte R., Morgan K.G. Mechanisms of smooth muscle contraction // Physiol. Rev. – 1996. – V. 76, N4. – P. 967-1003.

10. Meiss R.A. Mechanics of smooth muscle contraction//Cellular aspects of smooth muscle function/ Ed. Kao C.Y., Carsten M.E. -Cambridge, University Press, 1997. – P. 169-208.

Thornbury K.D. Tonic and phasic activity in smooth muscle // Ir.J.
 Med. Sci. – 1999. – V. 168, N 3. – P. 201-207.

12. Young R.C. Myocytes, Myometrium, and Uterine Contractions // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 2007. – V. 1101, – P. 72-84.

13. Wray S., Shmygol A. Role of the calcium store in uterine contractility
// Seminars in Cell & Developmental Biology. – 2007. – V. 18, – P. 315-320.

Kristian T., Siesjo B.K. Calcium - related damage in ischemia // Life
 Sci. – 1996. – V. 59, N 5-6. – P. 357-367.

15. Ng C.L., Kyle B. D., Lennox A. R., Shen X-M., Hatton W. J., Hume J. R. Cell culture alters Ca²⁺ entry pathways activated by store-depletion or

hypoxia in canine pulmonary arterial smooth muscle cells // Am. J.Physiol. Cell. Physiol. – 2008. – V.294, – P. 313-323.

16. Остин Л., Шорт Р. Гормональная регуляция размножения у млекопитающих. – М.:Мир, 1987. – 305 с.

17. Szal S.E., Repke J.T., Seely E.W., Graves S.W., Parker C.A.,
Morgan K.G. [Ca²⁺]_i signaling in pregnant human myometrium // Am. J. Physiol.
– 1994. – V.267, N 1. – P. E77-E87.

18. Sanborn B.M., Ku Chun-Ying , Shlykov S.G., Babich L.G. Molecular signalling through G-protein-coupled receptors and the control of intracellular calcium in myometrium // J Soc. Gynecol. Invest. – 2005. – N.12. – P. 479- 486.

19. Garfield R. E., Maner W. L. Physiology and electrical activity of uterine contractions // Seminars in Cell & Developmental Biology. – 2007. – V.18, – P. 289-295.

20. Фридман Л.С., Флеминг Н.Ф., Робертс Д.Г., Хайман С.Е. Наркология. – М.: БИНОМ-Невский Диалект, 1998. – 318 с.

21. Anwer K., Sanborn B.M. Changes in intracellular free calcium in isolated myometrial cells: role of extracellular and intracellular calcium and possible involvement of gu anine nucleotide-sensitive proteins // Endocrinology. – 1989. – V. 124, – P. 17-23.

22. Tasaka A., Masuto N., Miyake A., Tanizawa O. Direct measurement of intracellular free calcium in cultired human puerperal myometrial cells stimulated by oxytocin : effect of extracellular calcium and calcium channel blockers // Obstet. Gynecol. – 1991. – V. 77, N 1. – P. 101-106.

23. Sanborn B.M., Dodge K., Monga M., Qian A., Wang W., Yue C. Molecular mechanisms regulating the effects of oxytocin on myometrial intracellular calcium // Adv. Exp. Med. Biol. – 1998. – V. 449. – P. 277-286.

24. Wray S., Shmygol A. Role of the calcium store in uterine contractility // Seminars in Cell & Developmental Biology. – 2007. – V. 18. – P. 315-320. 25. Рыбальченко В.К. «Липидная» гипотеза связывания окситоцина плазматической мембраной гладкомышечных клеток // Докл. АН СССР. – 1990. – Т.314, № 4. – С. 984-987.

26. Monga M., Ku C.Y., Dodge K., Sanborn B.M. Oxytocin-stimulated responses in a pregnant human immortalized myometrial cell line // Biol. Reprod. – 1996. – V. 55, – P. 427-432.

27. He TC., Zhou S., da Costa LT., Yu J., Kinzler KW., Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses // Proc.Natl.Acad. Sci. USA. – 1998. – V.95. – P. 2509-2514.

28. Yang M., Gupta A., Shlykov S.G., Corrigan R., Tsujimoto S., Sanborn B.M. Multiple Trp isoforms implicated in capacitative calcium entry are expressed in human pregnant myometrium and myometrial cells // Biol. Reprod. -2002 - V. 67, -P. 988-994.

29. Кондратюк Т.П., Быченок С.Ф., Прищепа Л.А., Бабич Л.Г., Курский М.Д., Осипенко А.А. Выделение и характеристика фракции плазматических мембран миометрия свиньи // Укр.биохим. журн. – 1986, – Т.58, №4, – С.50-56.

30. Бабич Л.Г., Шлыков С.Г., Борисова С.А., Костерин С.А. Энергозависимый транспорт Ca²⁺ во внутриклеточных структурах гладкой мышцы // Биохимия. – 1994. – Т. 59, N 8. – С.1218-1229.

31. Костерин С.А., Курский М.Д., Зимина В.П. Вклад систем Mg²⁺,ATP- и Na⁺- зависимого транспорта Ca²⁺ в регуляцию его концентрации в клетках миометрия // Биохимия. – 1984. – Т. 49, № 1. – С. 12-19.

32. Костерин С.А., Курский М.Д., Браткова Н.Ф. Влияние двухвалентных металлов - стимуляторов сократительной активности матки на Mg²⁺,ATP-зависимый транспорт Ca²⁺ во фракции сарколеммы миометрия // Вопр. мед. химии. – 1985. – Т. 31, № 2. – С. 97-102.

33. Костерин С.А., Браткова Н.Ф., Курский М.Д. Роль сарколеммы и митохондрий в обеспечении кальциевого контролю расслабления миометрия // Биохимия. – 1985. – Т. 50, № 8. – С. 1350-1361.

34. Mollard P., Mironneau J., Amedee T., Mironneau C. Electrophysiological characterization of single pregnant rat myometrial cells in short-term primary culture // Am. J. Physiol. – 1986. – V. 250, N 1. – P. C47-C54.

35. 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 Ca²⁺- транспортирующих систем на кальциевые насосы гладкомышечной клетки // Укр. биохим. журн. – 1996. – Т. 68, № 61. – С. 50-61.

36. Буров Ю.В., Ведерникова Н.Н. Нейрохимия и фармакология алкоголизма. М.: Медицина, 1985. – 237 с.

37. Попова Н.Н., Глебов В.С. Экспериментальный алкоголизм // Патогенез, клиника, терапия алкоголизма и алкогольных психозов: Сборник науч. трудов. – М. :Московский НИИ психиатрии, 1986. – С. 133-137.

38. Гулый М.Ф., Стогний Н.А., Силонова Н.В., Шевцова Н.Ф., Солодова Е.В. Корреляция формиатом метаболических нарушений при алкогольной интоксикации // Укр. биохим. журн. – 1990. – Т. 62, № 3. – С.107-111.

39. Люк Э., Ягер М. Консерванты в пищевой промышленности. Свойства и применение. СПб: ГИОРД, 1998. – 256 с.

40. Бардина Л.Р., Сатановская В.И., Пронько П.С., Кузьмич А.Б. Активность ферментов метаболизма этанола и ацетальдегида у крыс с различной изначальной чувствительностью к алкоголю // Укр. биохим. журн. – 1997. – Т. 69, № 1. – С. 94-99.

41. Костерин С.А., Бурчинская Н.Ф. Метод определения кинетических характеристик Ca²⁺- транспортирующих систем субклеточных

структур гладких мышц // Укр. биохим. журн. – 1987. – Т. 59, № 2. – С. 66-69.

42. Кокунин В.А. Статистическая обработка данных при малом числе опытов // Укр. биохим. журн. – 1975. – Т. 47, № 6. – С. 776-791.

43. Putney JW Jr. A model for receptor-regulated calcium entry // Cell Calcium. – 1986. – V.7, N1. – P. 1-12.

44. Birnbaumer L., Boulay G., Brown D., Jiang M., Dietrich A., Mikoshiba K., Zhu X., Qin N. Mechanism of capacitative Ca^{2+} entry (CCE): interaction between IP₃ receptor and TRP links the internal calcium storage compartment to plasma membrane CCE channels // Recent Prog Horm Res. – 2000. – V. 55, – P. 127-161.

45. Montell C., Birnbaumer L., Flockerzi V. The TRP channels, a remarkably functional family // Cell. – 2002. – V. 108, – P. 595-598.

46. Zitt C., Halaszovich C.R., Luckhoff A. The TRP family of cation channels: probing and advancing the concepts on receptor-activated calcium entry // Prog Neurobiol. – 2002. – V. 66, – P. 243–264.

47. Minke B., Cook B. TRP channel proteins and signal transduction // Physiol. Rev. – 2002. – V. 82, – P. 429–472.

48. Vennekens R., Voets T., Bindels R.J., Droogmans G., Nilius B.
Current understanding of mammalian TRP homologues // Cell Calcium. – 2002.
– V. 31, – P. 253-264.

49. Hofmann T., Obukhov A.G., Schaefer M., Harteneck C., Gudermann T., Schultz G. Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol // Nature. – 1999. – V. 397, – P. 259-263.

50. Okada T., Inoue R., Yamazaki K., Maeda A., Kurosaki T., Yamakuni T., Tanaka I., Shimizu S., Ikenaka K., Imoto K., Mori Y. Molecular and functional characterization of a novel mouse transient receptor potential protein homologue TRP7 // J. Biol. Chem. – 1999. – V. 274, – P. 27359-27370.

51. Shlykov S.G., Yang M., Alcorn J.L., Sanborn B.M. Capacitative cation entry in human myometrial cells and augmentation by hTrpC3 overexpression // Biol. Reprod. – 2003. – V. 69, – P. 647-655.

52. Berridge M.J., A. Galione, Cytosolic calcium oscillators // FASEB J. – 1988. – V. 2, – P. 3074-3082.

53. Missiaen L., Van Acker K., Parys J.B., De Smedt H., Van Baelen K., Weidema A.F., Vanoevelen J., Raeymaekers L., Renders J., Callewaert G., Rizzuto R., Wuytack F. Baseline cytosolic Ca²⁺ oscillations derived from a nonendoplasmic reticulum Ca²⁺ store // J. Biol. Chem. – 2001. – V. 276, – P. 39161-39170.

54. Eude I., Paris B., Cabrol D., Ferre F., Breuiller-Fouche M. Selective protein kinase C isoforms are involved in endothelin-1-induced human uterine contraction at the end of pregnancy // Biol. Reprod. – 2000. – V. 63, – P. 1567-1573.

55. Hurd W.W., Fomin V.P., Natarajan V., Brown H.L., Bigsby R.M., Singh D.M. Expression of protein kinase C isozymes in nonpregnant and pregnant human myometrium // Am. J. Obstet. Gynecol. – 2000. – V. 183, – P. 1525-1531.

56. Enyedi A., Brandt J., Minami J. and Penniston J.T. Oxytocin regulates plasma membrane Ca²⁺ transport in rat myometrium // Biochem.J. – 1989. – V. 261, N 1. – P. 23-28.

57. Fiskum G. Intracellular levels and distribution of Ca²⁺ in digitonin - permeabilized cells // Cell Calcium. – 1985. – V.6, N 1-2. – P.25-37.

58. Lytton J., Westlin M., Hanley M.R. Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase family of calcium pumps // J.Biol.Chem. – 1991. – V. 266, N 26. – P. 17067-17071.

59. Sagara Y., Inesi G. Inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ transport ATPase by thapsigargin at subnanomolar concentrations // J.Biol.Chem. – 1991. – V. 266, N 21. – P. 13503-13506.

60. Сударикова Ю.В., Бакеева Л.Е., Цыпленкова В.Г. Ультраструктура митохондриального ретикулума кардиомиоцитов человека при алкогольной кардиомиопатии // Биохимия – 1997. – Т. 62, № 9. – С. 1155- 1170.

61. Baruah J.K., Washington M., Kinder D. Ethanol induced skeletal muscle degeneration - role of calcium // Exp. Patol. – 1988. – V. 33. – P. 207-212.

62. Montgomery R.I., Coleman W.B., Elbe K.S., Cunningham C.C. Ethanol-elicited alterations in the oligomycin sensitivity and structural stability of the mitochondrial $F_0.F_1$ ATPase // J. Biol. Chem. – 1987. – V. 262, N 27. – P. 13285-13289.

63. Lieber C.S. Medical disorders of alcoholism // N. Engl. J. Med. – 1995. – V. 333, N 16. – P.1058-1065.

Література до глави 5

1. Bryan N.S., Bian K., Murad F. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development // Front. Biosc. – 2009. – V. 14. – P. 1-18.

2. Sladek M.S., Magness R.R., Conrad K.P. Nitric oxide and pregnancy // Am. J. Physiol. – 1997. – V. 272, N 2. – P. R441-R463.

 Buxton I.L.O. Regulation of uterine function: a biochemical conundrum in the regulation of smooth muscle relaxation // Mol. Pharm. – 2004. – V. 65, N
 6. – P. 1051-1059.

4. Buxton I.L.O. The regulation of uterine relaxation // Sem. Cell Dev. Biol. – 2007. – V. 18, N 3. – P. 340-347.

5. Ekerhovd E., Brannstrom M., Delbro D. et al. Nitric oxide mediated inhibition of contractile activity in the human uterine cervix // Mol. Hum. Reprod. – 1998. – V. 4, N 9. – P. 915-920.

6. 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. - V. 15. - P. 333-337.

7. Bao S., Rai J., Schreiber J. Expression of nitric oxide synthase isoforms in human pregnant myometrium at term // J. Soc. Gynecol. Investig. – 2002. – V. 9, N 6. – P. 351-356.

8. Papka R.E., MeNell D.L., Thompson D. Nitric oxide nerves in the uterus are parasympathetic, sensory, and contain neuropeptides // Cell Tissue Res. - 1995. - V. 279. - P. 339–349.

9. Norman J.E., Cameron I.T. Nitric oxide in the human uterus // Rev. Reprod. - 1996. - V.1, N 1. - P. 61–68.

10. Cameron I.T., Campbell S. Nitric oxide in the endometrium // Hum. Reprod. Update. - 1998. - V. 4, N 5. - P. 565–569.

11. Ramsay B., Sooranna S.R., Johnson M.R. Nitric oxide synthase activities in human myometrium and villous trofhoblast throught pregnancy // Obstet. Gynecol. - 1996. - V. 37, N 2. - P. 249–253.

12. Bradley K.K., Buxton I.L., Barber J.E. et al. Nitric oxide relaxes human myometrium by a cGMP-independent mechanism // Am. J. Physiol. – 1998. – V. 275, N 6. – P. C1668-C1673.

13. Buxton I.L., Kaiser R.A., Malmquist N.A. et al. NO-induced relaxation of labouring and non-labouring human myometrium is not mediated by cyclic GMP // Br. J. Pharmacol. – 2001. – V. 134, N 1. – P. 206-214.

14. Buhimschi I., Yallampalli C., Dong Y.L. et al. Involvement of a nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in control of human uterine contractility during pregnancy // Am. J. Obstet. Gynecol. – 1995. – V. 172, N 5. – P. 1577-1584.

15. Izumi H., Garfield R.E. Relaxant effects of nitric oxide and cyclic GMP on pregnant rat uterine longitudinal smooth muscle // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. – 1995. – V. 60, N 2. – P. 171-180.

16. Syal A.S., Vedernikov Y.P., Chwalisz K. et al. Both soluble guanylate cyclase and particulate guanylate cyclase regulate myometrial contractility // Am. J. Obstet. Gynecol. – 1998. – V. 179, N 1. – P. 111-116.

17. Kuenzli K.A., Buxton I.L., Bradley M.E. Nitric oxide regulation of monkey myometrial contractility // Br. J. Pharmacol. – 1998. – V. 124, N 1. – P. 63-68.

18. Hennan J.K., Diamond J. Evidence that spontaneous contractile activity in the rat myometrium is not inhibited by NO-mediated increases in tissue levels of cyclic GMP // Br. J. Pharmacol. – 1998. – V. 123, N 5. – P. 959-967.

19. Vedernikov Y.P., Syal A.S., Okawa T. et al. The role of cyclic nucleotides in the spontaneous contractility and responsiveness to nitric oxide of the rat uterus at midgestation and term // Am. J. Obstet. Gynecol. – 2000. – V. 182, N 3. – P. 612-619.

20. Okawa T., Vedernikov Y.P., Saade G.R. et al. Effect of nitric oxide on contractions of uterine and cervical tissues from pregnant rats // Gynecol. Endocrinol. – 2004. – V. 18, N 4. – P. 186-193.

21. Kuenzli K.A., Bradley M.E., Buxton I.L. Cyclic GMP-independent effects of nitric oxide on guinea-pig uterine contractility // Br. J. Pharmacol. – 1996. – V. 119, N 4. – P. 737-743.

22. Aguilar H.N., Mitchell B.F. Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility // Hum. Reprod. – 2010. – V. 16, N 6. – P. 725-744.

23. Hampl V., Herget J. Role of nitric oxide in the pathogenesis of chronic pulmonary hypertension // Physiol. Rev. – 2000. – V. 80, N 4. – P. 1337-1372.

24. Duckitt K., Thornton S. Nitric oxide donors for the treatment of preterm labour // Cochrane Database Syst. Rew. – 2002. - CD002860.

25. Pucovsky V., Gordienko D.V., Bolton T.B. Effect of nitric oxide donors and noradrenaline on Ca^{2+} release sites and global intracellular Ca^{2+} in

myocytes from guinea-pig small mesenteric arteries // J. Physiol. – 2002. – V. 539, N 1. – P. 25-39.

26. 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. – V. 12, N 5. – P. 657-673.

27. Степуро И.И., Опарин А.Ю., Степуро В.И. и др. Окисление тиамина под действием диоксида азота, генерируемого ферриформами миоглобина и гемоглобина в присутствии нитрита и пероксида водорода // Биохимия. – 2012. - Т. 77, вып. 1. – С. 53-57.

28. Zima A.V., Blatter L.A. Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters // Cardiovascular Res. – 2006. – V. 71, N 2. – P. 310-321.

29. Takashima S. Phosphorylation of myosin regulatory light chain by myosin light chain kinase, and muscle contraction // Circ. J. – 2009. – V. 73, N 2. – P. 208-213.

30. Данилович Ю.В. Вплив стероїдних гормонів і окситоцину на утворення NO і H₂O₂ в ендометрії // Укр. біохім. журн. - 2004. - Т. 76, №1 - С. 88-96.

31. Тимошенко Л.В., Коханевич Е.В., Травянко Г.Д. Практическая гинекология. К.: Здоров'я, 1988. - 320 с.

32. Данилович Ю.В., Тугай В.А. Утворення NO та H₂O₂ у стромальних клітинах ендометрія за дії ацетилхоліну // Укр. біохім. журн. - 2001. - Т. 73, №2. - С. 110-115.

33. Данилович Ю.В. Вплив нітрит-аніонів на транспортування Ca²⁺ крізь сарколему міометрія // Укр. біохім. журн. - 2003. - Т. 75, №4. - С. 57-63.

34. Данилович Ю.В. Транспорт Ca²⁺ в сарколемі міометрія в умовах її хімічної модифікації // Укр. біохім. журн. - 2002. - Т. 74, №3. - С. 58-64.

35. Данилович Г.В., Данилович Ю.В. Вплив окислів азоту і пероксиду водня на Ca²⁺,Mg²⁺-ATP-азну та Mg²⁺-ATP-азну активності у фракції сарколеми міометрія // Укр. біохім. журн. - 2007. - Т. 79, №2 - С. 31-38. 36. Данилович Г.В., Данилович Ю.В., Горчєв В.Ф. Порівняльне дослідження методами спектрофлуориметрії та протокової цитометрії поляризації плазматичної і внутрішньої мітохондрільної мебран гладеньком'язових клітин із використанням потенціалчутливого зонда DiOC₆(3) // Укр. біохім. журн. - 2011. - Т. 83, №3 - С. 99-105.

37. Bolotina V.M., Najibis S., Palacino I.I. et al. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle // Nature. - 1994. - V. 368, N 6474. - P. 850–853.

38. Brainard A.M., Korovkina V.P., England S.K. Potassium channels and uterine function // Semin. Cell. Dev. Biol. – 2007. – V. 18, N 3. – P. 332-339.

39. Данилович Г.В., Данилович Ю.В., Горчєв В.Ф. Реєстрація К⁺рівноважного потенціалу на плазматичній мембрані клітин міометрія і вивчення його модуляції NO_x та H₂O₂ методом протокової цитометрії // Укр. біохім. журн. - 2010. - Т. 82, №1 - С. 52-61.

40. Акопова О.В., Харламова О.М., Коцюруба А.В. Вплив оксиду азоту на Na⁺,К⁺-АТФазу в тканині аорти щурів // Фізіол. журн. – 2009. – Т. 55, №1. – С. 27-35.

41. Данилович Ю.В., Тугай В.А. Вплив активних метаболітів азота та кисню на рівень сGMP в міоцитах матки // Укр. біохім. журн. - 2006. - Т. 78, №1 - С. 102-106.

42. Данилович Ю.В., Данилович Г.В., Коломієць О.В. Ефекти нітропрусиду та нітриту натрію на уабаїнчутливу Na⁺,K⁺-ATP-азну активність гладенького м'яза матки // Укр. біохім. журн. - 2010. - Т. 82, №6 - С. 33-41.

43. Taylor H.J., Chaytor A.T., Edwards D.H. et al. Gap junction-dependent increases in smooth muscle cAMP underpin the EDHF phenomenon in rabbit arteries // Biochem. Biophys. Res. Com. – 2001. - V. 283, N 3. – P. 583-589.

44. Данилович Ю.В. Активні метаболіти азоту і кисню змінюють рівень сАМР в міоцитах матки, оброблених прогестероном та ацетилхоліном // Укр. біохім. журн. - 2005. - Т. 77, №4 - С. 47-51.

45. Church J., Baxter K.A., McLarnon J.G. pH modulation of Ca²⁺ responses and a Ca²⁺-dependent K⁺ channel in cultured rat hippocampal neurons // J. Physiol. – 1998. – V. 511, N 1. – P. 119-132.

46. Данилович Ю.В., Тугай В.А. Вплив активних метаболітів азота та кисню на величину pH міоплазми клітин міометрія // Фізіол. Журн. - 2005. – Т. 51, №3 – С. 38-41.

47. Тугай В.А. Регуляторная роль протона в мембранных процессах мышечной клетки. - К.: Наук. Думка, 1993. - 118 с.

48. Костерин С.А., Бурдыга Ф.В. Транспорт и внутриклеточный гомеостаз Ca²⁺ в миометрии // Успехи совр. биол. – 1993. – Т. 113, вып. 4. – С. 485-506.

49. Sanders K.M. Invited review: mechanisms of calcium handling in smooth muscles // J. Appl. Physiol. – 2001. – V. 91, N 3. – P. 1438-1449.

50. Matthew A., Shmygol A., Wray S. Ca^{2+} entry, efflux and release in smooth muscle // Biol. Res. – 2004. – V. 37, N 4. – P. 617-624.

51. Berridge M.J. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms // J. Physiol. – 2008. – V. 586, Pt. 21. – P. 5047-5061.

52. Бабич Л.Г., Шлыков С.Г., Борисова Л.А. и др. Энергозависимый транспорт Ca²⁺ во внутриклеточных структурах гладкой мышцы // Биохимия. – 1994. – Т. 59, вып. 8. – С. 1218-1229.

53. Danylovych Iu.V. Action of nitrogen oxides and hydrogen peroxide on Ca^{2+} transport in sarcoplasmic reticulum of permeabilized myocytes of utera // Int. J. Physiol. Pathophysiol. – 2010. – V. 1, I. 4. – P. 357-365.

54. Noble K., Matthew A., Burdyga T. et al. A review of recent insights into the role of the sarcoplasmic reticulum and Ca entry in uterine smooth muscle // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. – 2009. – V. 144, S 1. – P. S11-S19.

55. Шликов С.Г. Окситоцин та його роль у контролі внутрішньоклітинного рівня іонів кальцію в міометрії // Укр. біохім. журн. – 2010. – Т. 82, №2. – С. 5-17. 56. Lopes-Figueroa M.O., Caamano C., Morano M.I. et al. Direct evidence of nitric oxide presence within mitochondria // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2000. – V. 272. – P. 129-133.

57. Nakatsubo N., Kojima H., Kikuchi K. et al. Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diaminofluoresceins // FEBS Letters. - 1998. - V. 427. – P. 263-266.

58. Kosterin S.A., Burdyga Th.V., Fomin V.P. et al. // Mechanism of Ca²⁺transport in myometrium // Control of Uterine Contractility. (Ed. R. E. Garfield, T. N. Tabb). – London, Tokyo.: CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, 1994. – P. 129-153.

59. Костюк П.Г., Костюк О.П., Лук'янець О.О. Внутрішньоклітинна кальцієва сигналізація: структура і функції. К.: Наук. думка, 2010. – 175 с.

60. Crosdas G., Varnai P., Golenar T. Calcium transport across the inner mitochondrial membrane: molecular mechanisms and pharmacology // Mol. Cel. Endocrin. – 2012. – V. 353. – P. 109-113.

61. Jiang D., Zhao L., Clapham D.E. Genome-wide RNAi screen identifies Letm1 as a mitochondrial Ca^{2+}/H^{+} antiporter // Science. – 2009. – V. 326. – P. 144-147.

62. 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 Ca²⁺ uptake pathways // J. Biol. Chem. – 2012. – V. 286, N 32. – P. 28444-28455.

63. Davidson S.M., Duchen M.R. Effects of NO on mitochondrial function in cardiomyocytes: pathophysiological relevance // Cardiovasc. Res. – 2006. – V. 71, N 1. – P. 10-21.

64. Guilivi C., Kato K., Cooper C.E. Nitric oxide regulation of mitochondrial oxygen consumtion I: cellular physiology // Am. J. Physiol. – 2006. – V. 291, N 6. – P. C1225-C1231.

65. Данилович Ю.В., Данилович Г.В., Коломієць О.В. і інш. Дослідження впливу нітрозактивних сполук на поляризацію внутрішньої мембрани мітохондрій в міоцитах матки щурів із використанням потенціалчутливого флуоресцентного зонда DiOC₆(3) // Укр. біохім. журн. – 2014. – Т. 86, №1. – С. 42-55.

66. Takashima S. Phosphorylation of myosin regulatory light chain by myosin light chain kinase, and muscle contraction // Circ. J. – 2009. – V. 73, N 2. – P. 208-213.

67. Орлов С.Н. Кальмодулин / С. Н. Орлов // Итоги науки и техники. ВИНИТИ АН СССР "Общие проблемы физико-химической биологии". -1987. - Т. 8. – 212 с.

68. Данилович Ю.В., Тугай В.А. Регуляція Са²⁺-зв'язувальних властивостей кальмодуліну нітрит-аніоном та пероксидом водню // Укр. біохім. журн. - 2003. – Т. 75, №1. – С. 59-64.