

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
Інститут високих технологій

Завідувач кафедри молекулярної
біотехнології та біоінформатики
к.б.н., доц. Нипорко О. Ю.
Протокол №____ засідання кафедри
від “____” травня 2020 р.

**ДЖЕРЕЛА І ЗАКОНОМІРНОСТІ СИНТЕЗУ ОКСИДУ АЗОТУ В
КЛІТИНАХ ГЛАДЕНЬКОГО М'ЯЗУ МАТКИ**

Дипломна магістерська робота
студентки 2 курсу денної форми навчання
за спеціальністю 162 Біотехнології та
біоінженерія
Богач Тетяни Володимирівни

Науковий керівник від кафедри:
к. б. н. **Цимбалюк О.В.**

Робота виконана у відділі біохімії м'язів
Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України
під керівництвом к.б.н. Г.В. Данилович

Оцінка захисту роботи

Київ – 2020 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АФК	– активні форми кисню
ГМК	– гладеньком'язові клітини
ЕГТА	– етиленглікольтетраоцтова кислота
ЕТЛ	– електрон-транспортний ланцюг
ВН ₄	– (tetrahydrobiopterin) – тетрагідробіоптерин
СсОХ	– (cytochrome c oxidase) – цитохром с оксидаза
сGMP	– (cyclic guanosine monophosphate) – 3,5-циклічний гуанозинмонофосат
DNIC	– (dinitrosyl iron complexes) – динітрозильні залізосірчані комплекси
CaM	– (calmodulin) – кальмдулін
NA	– (N ^G -nitro-L-arginine) – N ^G -нітро-L-аргінін
SNP	– (sodium nitroprusside) – нітропрусид натрію
SN	– (sodium nitrite) – нітрит натрія

ЗМІСТ

ВСТУП	4
РОЗДІЛ I. Огляд літератури	7
1.1. Метаболізм оксиду азоту	7
1.2. Ізоформи NO-синтаз	10
1.3. Ідентифікація та біохімічні властивості mtNOS	17
1.4. Функціональна роль NO в мітохондріях.....	21
1.5. Антагоністи кальмодуліну	25
РОЗДІЛ II. Матеріали та методи досліджень	30
2.1. Отримання суспензії міоцитів	30
2.2. Виділення фракції мітохондрій міометрія з матки щурів.....	31
2.3. Метод лазерної конфокальної мікроскопії	32
2.4. Метод протокової цитофлуориметрії.....	33
2.5. Метод спектрофлуориметрії	34
РОЗДІЛ III. Результати досліджень та їхнє обговорення	35
3.1 Джерела біосинтезу оксиду азоту в міоцитах матки щурів	35
3.2. Каталітичні властивості NO-синтазної реакції в ізольованих мітохондріях міометрія.....	41
3.3. Вплив антагоністів кальмодуліна на NO-синтазну реакцію в мітохондріях	44
3.4. Вивчення впливу синтезу NO на функціональну активність електрон- транспортного ланцюга за аутофлуоресценцією NADH та FAD.....	47
ВИСНОВКИ	51
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	52

ВСТУП

Оксид азоту (NO) є універсальною месенджерною і регуляторною молекулою, що впливає на перебіг численних клітинних процесів, зокрема регулює транскрипцію генів і трансляцію мРНК, зумовлює та модулює посттрансляційні модифікації протеїнів S-нітрозилюванням, має цитостатичні та цитотоксичні властивості. Біосинтез оксиду азоту забезпечується родиною NO-синтаз (NOS): Ca^{2+} -залежними конститутивними нейрональною та ендотеліальною, та Ca^{2+} -незалежною індукцибельною.

Важливим проявом біологічної активності NO є контроль скоротливої функції гладеньких м'язів, що зумовлює нормальну роботу внутрішніх органів, зокрема сечостатевої системи. Потужним джерелом NO в міометрії, виходячи з аналізу інформації стосовно інших тканин, можуть слугувати мітохондрії. За допомогою імуногістохімічних методів було доведена наявність конститутивної Ca^{2+} -залежної NO-синтази в мітохондріях. В той же час в літературі відсутні відомості щодо каталітичних і кінетичних властивостей NO-синтази мітохондрій гладеньком'язових клітин матки та фізико-хімічних механізмів, за якими NO контролює їх скоротливу активність.

Оксиду азоту належить провідна роль в регуляції функціональної активності мітохондрій, які, з одного боку, містять системи власного біосинтезу NO, а з іншого – є ефективною мішенню дії активних форм азоту. NO може виконувати декілька ключових функцій в мітохондріях: інгібувати або індукувати біогенез органел, контролювати дихання (через вплив на комплекси електрон-транспортного ланцюгу) та окисне фосфорилування; змінювати $\Delta\psi$ на внутрішньої мітохондріальної мембрани, регулювати активність систем транспорту Ca^{2+} , впливати на функціонування пори перехідної провідності (PTP).

NO регулює гомеостаз Ca^{2+} в мітохондріях і, відповідно, Ca^{2+} -залежні процеси в них, активуючи основні метаболічні ензими, споживання кисню,

інтенсивність окисного фосфорилування тощо. В той же час іони Ca у комплексі з кальмодуліном активують синтез NO Ca²⁺-залежними NOS, у тому числі і мітохондріальною NOS. Це вказує на те, що їх функціональна активність може модулюватися антагоністами кальмодуліну.

З'ясування ролі мітохондрій та оксиду азоту в регуляції Ca²⁺-гомеостазу в гладеньком'язових клітинах міометрія і, відповідно, їх скоротливої здатності, визначає **актуальність** та важливість дослідження біосинтезу оксиду азоту в інтактних мітохондріях міоцитів матки та каталітичних властивостей NO-синтазної реакції. Одержані результати можуть стати основою для пошуку селективних екзогенних модуляторів біоенергетичних процесів, біосинтезу NO та транспорту Ca²⁺ в мітохондріях, що є важливою умовою створення фармпрепаратів, здатних ефективно регулювати активність внутрішніх органів, зокрема контрактильну здатність матки.

Використання в дослідженнях сучасного NO-чутливий флюоресцентний зонд DAF-FM, який дозволяє реєструвати утворення оксиду азоту в інтактних клітинах за низьких (нмоль/л) його концентрацій, та методу протокової цитометрії, котрий забезпечує реєстрацію змін флюоресцентного сигналу в поодиноких мітохондріях, дозволяє реєструвати утворення оксиду азоту безпосередньо в органелі та вивчати зміни цього процесу під впливом різних модуляторів активності NOS.

Отже, **метою** роботи вивчення каталітичних властивостей реакції синтезу NO та його вплив на функціональну активність ізольованих мітохондрій матки щура.

Відповідно до мети було поставлено наступні **задачі**:

1. Ідентифікувати джерела утворення NO в міоцитах матки щура;
2. Дослідити каталітичні властивості реакції синтезу NO в ізольованих мітохондріях гладеньком'язових клітин міометрія;

3. Вивчити дію NO на функціонування електрон-транспортного ланцюга в ізольованих мітохондріях гладеньком'язових клітин міометрія.

Ключові слова: СИНТЕЗ, ОКСИД АЗОТУ, ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВІ КЛІТИНИ, МІОМЕТРІЯ.

РОЗДІЛ І

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Метаболізм NO

Серед небагатьох відомих ендогенних газоподібних сигнальних молекул, які регулюють і модулюють велику кількість фізіологічних і біохімічних процесів в організмі важливу роль відіграє оксид (II) азоту. NO являється структурно простим, низькомолекулярним, високо ліпофільним та надзвичайно реактивно здатним вільним радикалом, що може виступати як в ролі окиснювача, так і в ролі відновника [5].

За фізичними властивостями монооксид азоту – це відносно стабільний прозорий газ, що належить до групи газотрансмітерів, і може існувати у клітині у трьох хімічно активних формах, що здатні переходити одна в одну. Серед них виділяють нітрозоній катіон (NO^+), нітроксил аніон (NO^-) і вільний радикал (NO^*), що має неспарений електрон, завдяки якому володіє найбільшою хімічною активністю, що втричі перевищує активність кисню [8].

Короткий період напіврозпаду NO, що триває від 0,5 до 30 с, разом із його високою здатністю вступати у хімічні реакції скорочує біодоступність цього газу у часі і просторі [5]. Це обмеження дифузії передбачає специфічність дії NO в окремих клітинних компартментах завдяки солокалізації протеїнів-мішеней з джерелами NO в мультипротеїновий комплекс сигналом. Для того, щоб в організмі існував постійний пул оксиду (II) азоту, NO також перебуває у складі NO вмісних сполук, які слугують місцем зберігання біоактивної молекули. Такими відносно стабільними формами існування оксиду азоту в клітині вважаються динітрозильні заліzosірчасті комплекси (DNIC), в утворенні яких беруть участь два компоненти: тіолові групи білків або низькомолекулярних тіолів і негемове залізо. Ці NO-вмісні комплекси, що утворюються в макрофагах і

ендотеліальних клітинах, є основним депо NO в організмі [8]. На відміну від вільного оксиду (II) азоту, який може переміщуватися лише на невеликі відстані, поки не буде окиснений, DNIC мають здатність пересуватися кровообігом до віддалених тканин, постачаючи до них NO [1].

Існує два різні шляхи синтезу еукаріотичними клітинами оксиду (II) азоту: неферментативний, або відновлювальний, та ферментативний, або окислювальний, шляхи. Ферментативний синтез NO здійснюється родиною білків із загальною назвою NO-синтази. Оксид азоту продукується NO-синтазою шляхом перетворення L-аргініну (з азоту іміногрупи (=NH) амінокислоти) в L-цитрулін і NO, при цьому цей процес є O₂-залежним [8]. Швидкість NOS-залежного синтезу NO в клітинах залежить від кількості й активності ферментів NOS, а також концентрації L-аргініну всередині клітин [10].

Неферментативний синтез NO в клітинах протікає, в більшій мірі, в умовах гіпоксії, тобто в умовах низького рівня кисню, при пониженій активності NO-синтаз і виконує в першу чергу вазодилаторну роль [9].

В основі неферментативного шляху синтезу оксиду азоту лежить відновлення неорганічних нітратів і нітритів для продукування організмом ендогенного NO. Він утворюється з цих молекул або їх стабільних метаболітів за допомогою ферментів нітрит- і нітратредуктаз. Цей шлях має назву нітрат-нітрит-NO шляху, який полягає у послідовному відновленні харчових нітратів і нітритів, які організм отримує з рослинною їжею.

Оксид азоту є ключовим вторинним посередником в організмах хребетних і відіграє важливу роль у міжклітинній та внутрішньоклітинній передачі сигналу і, як наслідок, у безлічі біологічних процесів [54]. NO виконує сигнальну функцію за допомогою трьох механізмів: (1) - *активація розчинної гуанілатциклази (рГЦ) шляхом зв'язування з її гемовою групою* (при цьому формується Fe²⁺-нітрозильний комплекс), що веде до утворення cGMP, який, в свою чергу, стимулює протеїнкіназу G; для активації рГЦ необхідна концентрація NO знаходиться в межах 80-250 нМ [55, 56, 57, 58];

(2) - *S*-нітрозилювання: активні форми азоту – NO^+ , NO^- , N_2O_3 , NO_2 – оборотно нітрозилюють тільні групи цистеїнів протеїнів-мішеней; існує точка зору, що в серцево-судинній системі більшість ефектів NO опосередкується саме через *S*-нітрозилювання і є cGMP-незалежними [55, 56, 59, 57-60]; (3) утворення пероксинітриту (ONOO^-), передусім внаслідок дифузійно-контрольованої реакції між NO та супероксид-аніоном (O_2^-) з наступним нітруванням залишків тирозину і триптофану у протеїнах, що веде до залучення у процес передачі сигналу мітоген-активованих протеїнових кіназ, ізоформ протеїнкінази C, транскрипційного фактора NF- κB тощо [55, 56, 60, 61]. Більшість NO ефектів опосередковуються cGMP-незалежним *S*-нітрозилюванням ($\text{NO}/\text{pГЦ}/\text{cGMP}/\text{PKG}$ напрямок), термінація сигналу в яому забезпечується родиною фосфодіестераз (PDE 5, 6, 9) [50].

Результат дії NO на біохімічні процеси визначається його концентрацією. У великих (мікромолярних) концентраціях NO і його похідні стають цитотоксичними, здійснюючи пошкоджуючий вплив на організм, наприклад запускаючи патологічні зміни, що призводять до апоптозу. Захисні функції цієї молекули виникають за піко- та наномолярних концентрацій. Оксид азоту впливає на перебіг численних клітинних процесів. Залежно від концентрації він регулює транскрипцію генів та трансляцію мРНК (зв'язуючись із залізо-вмісними елементами), зумовлює та модулює посттрансляційні модифікації протеїнів (нітрозилювання, ADP-рибозилування), має цитостатичні та цитотоксичні властивості [15]. *S*-нітрозилювання функціонально-важливих цистеїнових залишків транспортних протеїнів призводить до гальмування роботи потенціал-залежних Ca^{2+} -каналів і активації Ca^{2+} -залежних K^+ -каналів плазматичної мембрани поряд із стимуляцією $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФаз плазмолемі та ендо/саркоплазматичного ретикулуму в ряді об'єктів, включаючи гладеньком'язову тканину внутрішніх органів та судин, і забезпечує зниження концентрації Ca^{2+} в цитоплазмі [18].

NO є ключовим елементом в багатьох фізіологічних процесах: регулює тонус і проникність кровоносних судин, знижує агрегацію формених елементів крові і їх адгезію до судинної стінки, бере участь у функціонуванні нервової, ендокринної, імунної систем [12, 14, 17].

Отже, NO, як ключовий вторинний посередник важливих біологічних процесів, є об'єктом низки досліджень, спрямованих на вивчення його властивостей та впливу на біологічні системи.

1.2. Ізоформи NOS

У тваринних організмах дослідженими є три ізоформи синтази оксиду азоту: ендотеліальна (eNOS), індукцйбельна (iNOS) та нейрональна (nNOS) NO-синтази. nNOS і eNOS експресуються конститутивно і різко збільшують свою активність у відповідь на зростання концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} . Натомість активація iNOS, яка є Ca^{2+} -незалежною синтазою, здійснюється на рівні транскрипції після індукції прозапальними цитокінами, бактеріальними ліпополісахаридами, γ -опроміненням [5].

nNOS експресується в центральних та периферичних нейронах, а також в епітеліальних клітинах легень, скелетному м'язі, тканинах матки, шлунку, нирок, підшлункової залози [11]. Унікальною для цієї ізоформи є наявність PDZ-домена [13]. З ним зв'язується Ca^{2+} -транспортувальна АТРаза плазматичної мембрани (ізоформа 4b, яка міститься в гладеньком'язових клітинах) і виступає негативним регулятором синтезу NO. В N-кінцевій ділянці nNOS виявлено сайт зв'язування для протеїна PIN, який інгібує ензим, спричинюючи його мономеризацію. Він також пригнічує NAD(P)H-оксидазну активність всіх трьох ізоформ. До найголовніших функцій nNOS належить модуляція пластичності синапсів в ЦНС, центральна регуляція кров'яного тиску, тонусу гладеньких м'язів внутрішніх органів, зокрема шляхом генерації NO в нітрегічних нервових закінченнях, контроль за кровопостачанням волокон скелетного м'язу [24, 35, 36].

eNOS локалізована в кавеолах м'язових клітин, але знайдена також в апараті Гольджі та зовнішній мітохондріальній мембрані в ендотеліоцитах, тканинах легень та трахеї, кардіоміоцитах, тромбоцитах, нейронах мозку, синцитіо-трофобластах та епітеліальних клітинах нирки [12]. Активність eNOS інгібується взаємодією з структурно-організуючим компонентом кавеол протеїном кавеоліном, що стерично блокує взаємодію з кальмодуліном. Взаємодія з попередньо фосфорильованим за тирозином Hsp 90, фосфорилування за залишком Ser-1177, дефосфорилування Thr-495 проте стимулює синтазу до зв'язування $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ [16]. Солокалізація катіонного транспортера L-аргініна (CAT1), eNOS та кавеоліну-1 в ендотеліоцитах сприяє доступу субстрату до eNOS та оптимізує біосинтез NO [19].

iNOS вперше виявлена в макрофагах, ідентифікована також в лімфоцитах, нейтрофілах, еозинофілах [13]. iNOS генерує NO в великих кількостях (мкмоль/л NO), що чинить цитотоксичну дію на мікроорганізми та пухлинні клітини [12, 16]. Завдяки високому афінітету NO до протеїн-зв'язаного заліза, він ефективно взаємодіє із залізо-сірчаними кластерами комплексів електронно-транспортного ланцюга мітохондрій, цис-аконітазою та рибонуклеотид-редуктазою, інгібуючи ці ключові ензими біоенергетики та проліферації в клітинах-мішенях [16, 22]. Продукований макрофагами в надвисоких концентраціях оксид азоту спричинює також одноланцюгові розриви та фрагментацію ДНК [24].

Компартменталізацію в клітині різних ізоформ NO-синтаз та особливості дії оксиду азоту в різних компартментах можна розглянути на прикладі кардіоміоцитів [19]. В кардіоміоцитах, продукований eNOS та pNOS, NO взаємодіє з кавеолами та саркоплазматичним ретикуломом. Ca^{2+} -залежна продукція NO відбувається завдяки колокалізації eNOS з β -адренергічними рецепторами та Ca^{2+} -каналами саркоплазматичного ретикулуму. Таке розташування eNOS дозволяє NO захищати кардіоміоцити від кальцієвого перенавантаження, пригнічуючи активність Ca^{2+} -каналів L-

типу в кавеолах, інгібувати β -адренергічну стимуляцію та інотропні ефекти катехоламінів [20]. nNOS, що також знаходиться в саркоплазматичному ретикулумі, стимулює актин-міозинову взаємодію і регулює циклічну скорочувальну діяльність міокарда, адже генерований цією ізоформою NO активує канали вивільнення Ca^{2+} з ретикулуму [21]. За дії прозапальних цитокінів ендотеліальні клітини активно експресують iNOS. Протягом імунної відповіді на стрес або за патофізіологічних умов, таких як ішемія-реперфузія, сепсис, серцева недостатність, продукований локалізованою в міоплазмі iNOS NO також стимулює вивільнення Ca^{2+} з саркоплазматичного ретикулуму через ріанодин-чутливі канали [22].

Крім специфічної просторової локалізації різних ізоформ NOS в клітинах, важливе значення має також *феномен спрямованого і регульованого транспорту NO* в судинній стінці – так звані “міоендотеліальні щілинні переходи (myoendothelial gap junction)”. Оксид азоту, синтезуючись eNOS в ендотелії, дифундує до гладеньком’язового синцитію через міоендотеліальний сполучний «коридор», активуючи рГЦ в міоцитах та нітрозилуюючи протеїни-мішені. [28, 29, 33]. Дифузія NO лімітується солокалізованими в «коридорі» eNOS, рГЦ та іншими протеїнами, що знижує інтенсивність дії активних форм кисню як його скавенжерів. Іншою важливою структурою, локалізованою в міоендотеліальному сполученні, є хеміканали конексинової природи: Cx37, Cx40 та Cx43 [15]. Їх регуляція відбувається двома механізмами: 1) закриття при денітрозилуванні S-нітрозоглутатіон редуктазою, яка активується іонами Ca, зростання концентрації яких в ендотеліальних клітинах спричинює інозитол 1,4,5-трисфосфата (IP_3); 2) відкриття при S-нітрозилуванні оксидом азоту. Поряд з цим зазначені механізми забезпечують Ca^{2+} -залежний синтез NO в ендотелії у відповідь на стимуляцію $\alpha 1$ -адренорецепторів в гладеньком’язових клітинах [22].

Незважаючи на те, що в окремих випадках кожна ізоформа демонструє дещо відмінні структурні особливості, які відповідають її специфічній

функції *in vivo*, всі ізоформи NOS характеризуються високою гомологією. NOS представляє собою димер, що складається з двох ідентичних мономерів, які у свою чергу розділені на два головні домени: С-кінцевий редуктазний і N-кінцевий оксигеназний, де знаходяться зв'язувальні з кофакторами ділянки, необхідні для нормального функціонування ензиму. Так С-кінцевий редуктазний домен з'єднаний з FMN, FAD і NADPH, а N-кінцевий оксигеназний – з гемом і BH_4 [16] (рис. 1). В залежності від ізоформи ферменту, між доменами може знаходитися Ca^{2+} - і CaM-зв'язуючі домени у разі конститутивних NOS, або тільки CaM-зв'язуючий домен у разі iNOS [15]. Ці з'єднувальні ланки мають регуляторну функцію, адже активність NO-синтаз залежить від концентрації Ca^{2+} і CaM у клітині. Ензими не активні за концентрації Ca^{2+} близько 100 нМ; nNOS та eNOS стимулюються за підвищення рівня внутрішньоклітинного Ca^{2+} : напівмаксимальна активність спостерігається при 200-400 нМ, максимальна - біля 500 нМ Ca^{2+} [20, 21]. Зазначена особливість конститутивних ізоформ може бути також пов'язана із функціонуванням аутоінгібувальної послідовності, яка знаходиться в їхній FMN-зв'язувальній ділянці, але не знайдена в iNOS. nNOS та eNOS містять 40-50 амінокислот в FMN-субдомени, які складають аутоінгібіторну петлю, що блокує взаємодію з кальмодуліном за низьких концентрацій Ca^{2+} та інгібує переніс електронів від FMN на гем за відсутності Ca^{2+} /CaM [13, 48].

Незважаючи на те, що домени окремо один від одного активно функціонують і є різними каталітичними одиницями, утворення NO можливе тільки у разі їх об'єднання, адже вони містять взаємопов'язані компоненти, що беруть участь у послідовних етапах окиснення L-аргініну. Також всі NO-синтази містять цинк-тіолатний кластер, який виконує структурну функцію [15].

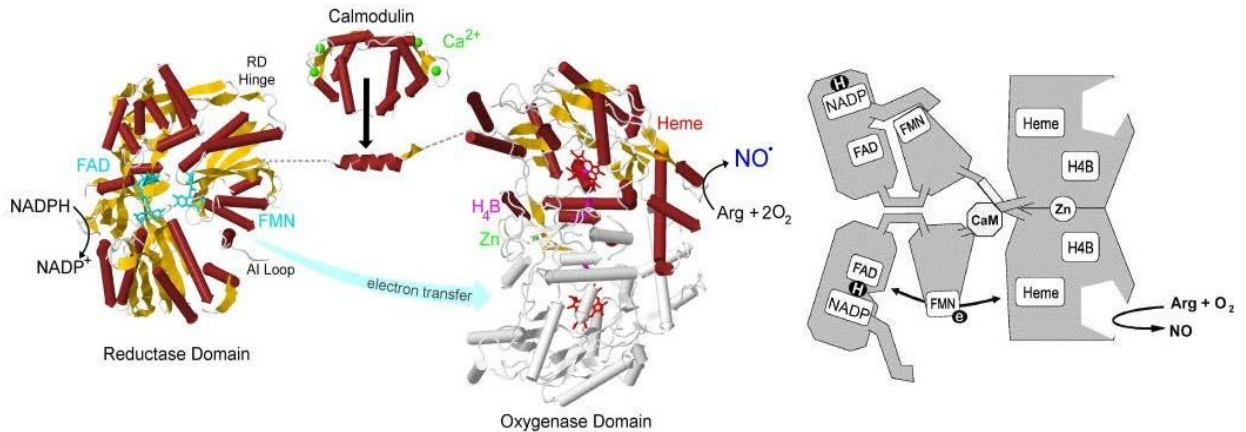


Рис. 1.1. Структура доменів NOS димеру з кофакторами та сайтами зв'язування субстрату [13]

Гем грає суттєву роль у димеризації ферменту, тобто утворення активного димеру, без формування якого утворення продуктів синтезу неможлива. Наявність гему потребують усі ізоформи NO-синтаз. Гемова простетична група є важливою також для взаємодії між редуктазним та оксигеназним доменами.

До гем-вмісного домену фермента поруч з активним центром приєднується NH_4 . Конститутивні ізоформи димеризуються за відсутності NH_4 , в той час як iNOS потребує його наявності. Асоціація NOS в активний димер включає взаємодію з NH_4 , що допомагає утворенню своєрідного "карману", який містить сайти зв'язування для гема та L-аргініна [37]. Безпосередня близькість NH_4 до гема вказує на його роль в переносі електронів в оксигеназному домені, що забезпечує оптимальний для окиснення L-аргініна редокс-стан заліза гемової простетичної групи. Коли доступність NH_4 стає обмеженою, перенос електрона від флавінів стає не спряженим з окисненням L-аргініна, комплекс $-\text{Fe}^{2+}-\text{O}-\text{O}^-$ гема дисоціює, і в оксигеназному домені продукується супероксид-аніон [26, 28].

Також, всі ізоформи NOS містять Zn-цистеїновий кластер (Zn-Cys₄), який забезпечує стабілізацію димера, його звільнення перетворює активний ензим в мономер з втратою каталітичної активності [18].

Механізм функціонування NOS подібний до механізму дії цитохрому P450 [23] (рис. 2). Коли спорідненість CaM до сайтів зв'язування синтази зростає, електрон від NADPH у редуктазному домені переміщується до оксигеназного домену, а саме до гему і BH_4 , через FAD і FMN. Іон заліза, який знаходиться у гемі, спочатку перебуває у високоспіновому стані. Цей іон відновлюється до Fe^{2+} , який здатний взаємодіяти з O_2 з утворенням проміжного продукту Fe^{3+} -супероксид-аніону. Атом водню від BH_4 відновлює супероксид-аніон спочатку до пероксиду, а потім до гідропероксиду. Подальше протонування викликає незворотній розрив зв'язку кисень-кисень з утворенням комплексу Fe^{4+} -катіонного радикалу гема і білку (P^+) [24]. Цей комплекс гідроксильє L-аргінін з утворенням N-гідрокси-L-аргініну і повертає гем у вихідний стан. Приєднання другої молекули O_2 до гему на другій стадії реакції, що каталізується NOS, перетворює N-гідрокси-L-аргінін у L-цитрулін з відщепленням радикалу NO^\cdot . Отже, субстратами всіх ізоформ синтаз є L-аргінін та O_2 , а продуктами - L-цитрулін і NO^\cdot , що утворюються з азоту іміногрупи ($=\text{NH}$) амінокислоти L-аргініну. Окрім цього також відбувається окиснення NADPH з утворенням NADP^+ [16].

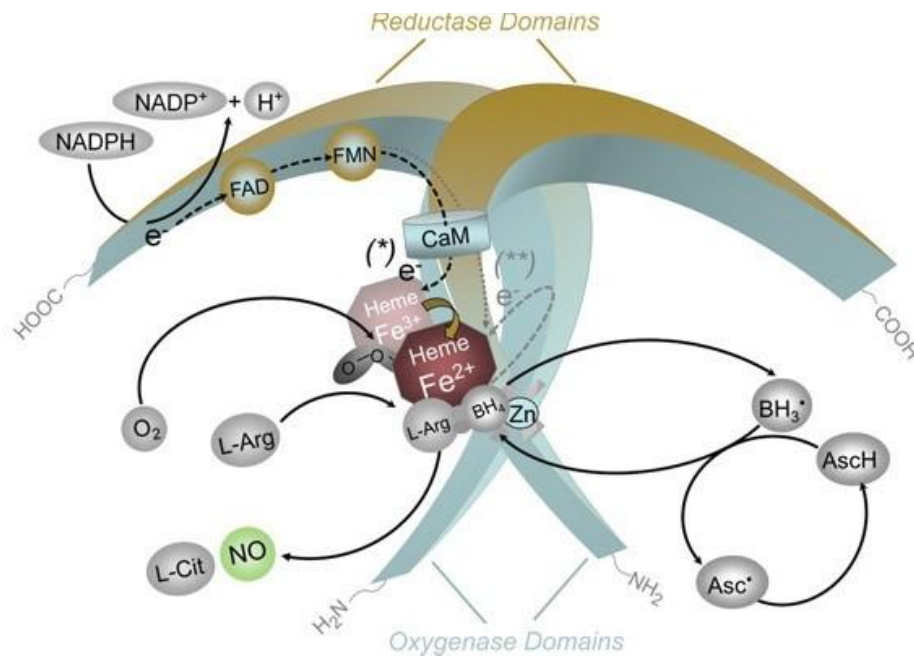


Рис. 1.2. Схема окисно-відновлювальних реакцій в NOS [11]

Концентрація L-аргініну в матриксі мітохондрій відповідає 150-310 мкМ і значно вища за величину K_m для L-аргініна (5 мкМ для мітохондрій печінки, 35 мкМ - кардіоміоцитів). Не зважаючи на присутність внутрішньоклітинного L-аргініну в концентраціях, які передбачають підтримання максимальної активності NOS, в умовах надлишку позаклітинного L-аргініну синтез NO посилюється. Даний феномен отримав назву "аргініновий парадокс" [34]. Причину зазначеному феномену шукають у факті конкуренції за субстрат аргінази, а також суттєвому зростанні вмісту ендогенних інгібіторів NOS (асиметричного диметиларгініну, передусім) у ряді захворювань [35]. В клітинах ссавців ідентифіковано два типи аргіназ: аргіназа I, локалізована в цитоплазмі, і аргіназа II, що є мітохондріальним ферментом. Проміжний продукт синтезу NO N^G -гідрокси-L-аргінін є конкурентним оборотним інгібітором аргінази. Спорідненість аргінази до L-аргініна на три порядки нижча ($K_m = 1-5$ мМ) ніж для NOS ($K_m = 2-20$ мкМ), але максимальна активність (V_{max}) в 1000 разів вища для аргінази, ніж для NOS [6, 17, 24]. Ендотеліальні клітини експресують аргіназу, яка може

конкурувати з eNOS за L-аргінін, і у разі її високої активності змусити eNOS до субстратного “голодування” [8].

nNOS та eNOS здатні утворювати не тільки NO, але й $\cdot\text{O}_2^-$ та ONOO $^-$. За низьких концентрацій або відсутності L-аргініна, а тому за відсутністю спряження між транспортом електронів в ензимі та окисненням гуанідинової групи L-аргініна, конститутивні NOS, насамперед nNOS, також каталізують одноелектронне відновлення кисню з утворенням $\cdot\text{O}_2^-$ та H_2O_2 . За насичуючих концентрацій L-аргініна та субнасичуючих NH_4 одночасно продукується NO в NH_4 -вмісній та $\cdot\text{O}_2^-$ в NH_4 -вільній субодиницях. Ці дві сполуки утворюють ONOO $^-$, вміст якого буде також визначатися рівнем відновленого глутатіона та активністю супероксидисмутази [5, 10].

Враховуючи центральну роль мітохондрій в забезпеченні функціонування клітини, значна увага в сучасній літературі приділяється проблемі взаємозв’язку NO – мітохондрії. Мітохондрії є первинними клітинними мішенями NO, значна кількість процесів яких контролюється саме ним. Але було ідентифіковано, що самі мітохондрії можуть продукувати NO, за що відповідає мітохондрійна NOS (mtNOS), структура та властивості яких розглянуті у наступному розділі.

1.3. Ідентифікація та біохімічні властивості mtNOS

Біохімія і молекулярна фізіологія мітохондрій, яка об’єднує процеси споживання кисню, окисного фосфорилування, катаболізма ліпідів, біосинтеза гему, підтримання гомеостазу Ca^{2+} , продукції активних форм кисню та апоптозу, значною мірою контролюється оксидом азоту [36, 37, 45]. Протягом останніх десятиліть для з’ясування взаємозв’язку NO – мітохондрії було зроблено та отримано багато важливих досліджень і результатів, серед яких:

1) вперше продемонстровано власну продукцію NO мітохондріями та існування функціонально-активної мітохондріальної mtNOS в мітохондріях

печінки щурів; показано характерні для NOS властивості, зокрема ензим за присутності L-аргініна утворював NO та L-цитрулін та був Ca^{2+} -залежним. Аналоги L-аргініна, N^G -monomethyl-L-arginine (L-NMMA) та N^G -nitro-L-arginine (L-NA), інгібували ензим; виявлено взаємозалежність між функціональним станом мітохондрій та активністю ферменту, а саме в інтактних енергізованих сукцинатом мітохондріях ензим був конститутивно активним, залежав від інтенсивності мітохондрійного дихання та знаходився під контролем мембранного потенціалу [49];

2) проведено дослідження на очищених препаратах мітохондрій (інтактні, пермеабілізовані органели, субмітохондріальні частки) і неочищеній фракції mtNOS печінки щура та визначено уявну K_m за L-аргініном, яка становила 5-7 мкМ, що близьке до такої для nNOS; виявлено, що найбільша активність ензиму притаманна внутрішній мітохондрійній мембрані та зроблено припущення, що ендогенно синтезований NO може впливати на енергетику органел, споживання O_2 та утворення вільних радикалів кисню [45, 55].

3) аналіз амінокислотного складу mtNOS виявив, що будова протеїна відповідає первинній послідовності nNOS [59]; доведена тотожність mtNOS та саме nNOS щодо інгібування ензиматичної активності: відносно специфічний блокатор nNOS (4S)-N-(4-amino-5[aminoethyl]aminopentyl)-N'-nitroguanidine, а також антагоніст кальмодуліна сполука W-7 гальмували утворення NO в мітохондріях кардіоміоцитів, в той час як інгібітори eNOS - 1-N5-(1-iminoethyl)ornithine (1-NIO) та iNOS - N-(3-aminomethyl)benzylacetamide, 2HCl (сполука 1400W) виявилися неефективними [26].

4) розраховано, що внутрішньомітохондріальна концентрація NADPH (1,04-1,78 мМ) та L-аргініна (150-310 мкМ) значно перевищують відповідне для mtNOS значення K_{NADPH} (0,1–1 мкМ) та K_m для L-аргініна, та (5 мкМ для мітохондрій печінки і 35 мкМ – кардіоміоцитів); таким чином, зроблено

висновок, що концентрації L-аргініна, та NADPH не є швидкість-лімітуючими факторами синтезу NO в мітохондріях [52, 54, 64].

5) визначена K_m за O_2 для mtNOS кардіоміоцитів, що складає 40 мкМ, показавши, що за фізіологічних умов, коли концентрація O_2 знаходиться в межах 5-20 мкМ, активність mtNOS не досягає максимальних значень [57, 58, 61]; виявлено, що за нестачі L-аргініна або BNH_4 в умовах стимулювання акумуляції Ca^{2+} органелами утворення NO було значно меншим, але водночас спостерігався ріст продукції активних форм кисню [26].

б) на пермеабілізованих дигітоніном міоцитах шлуночка серця, використовуючи NO-чутливий флуоресцентний зонд DAF-2 (4,5-діамінофлуоресцеїн діацетат) та специфічний щодо мітохондрій барвник MitoTracker Red CMXRos, показано, що за присутності L-аргініна і зростанні концентрації Ca^{2+} в цитоплазмі, спостерігається дозозалежне збільшення продукції NO в мітохондріях; колапс мембранного потенціала за присутності протонатора FCCP, блокування Ca^{2+} -уніпортера внутрішньої мембрани мітохондрій сполукою Ru360, застосування інгібіторів електронно-транспортного ланцюга ротенона або антимицина А в комбінації з олігоміцином призводило до гальмування синтезу NO в мітохондріях [26].

7) на сьогодні мітохондріальна локалізація NOS надійно показана в різних органах та тканинах ссавців: печінці, серці, мозку, скелетному м'язі, нирках, діафрагмі, тимусі [26, 50, 67, 69].

Отже, експериментальні дані вказують на те, що mtNOS постійно експресується в мітохондріях, є мембранозв'язаним ензимом і за біохімічними властивостями схожа на конститутивну nNOS.

Структура та регуляція mtNOS. Ензим є сплайс-варіантом повноланцюгової nNOS α , відмінним від вже ідентифікованих, з молекулярною масою 144 кДа. Має дві посттрансляційні модифікації: міристилювання в N-кінцевому регіоні по Thr або Ser та фосфорилування C-кінця ензима по залишку Ser-1412, що регулює активність ензиму [35, 38, 47]. Міристилювання mtNOS є необхідним для спрямування ензиму в мітохондрії

або заякорення його в мембрану. Розміщення mtNOS саме у внутрішній мітохондріальній мембрані доводиться її колокалізацією з мітохондріальними маркерами (сукцинатдегідрогеназа, цитохром с-оксидаза). Методами імуно-електронної мікроскопії та імунопреципітації показана взаємодія mtNOS через PDZ-домен з субодиницею V_a цитохром с-оксидази, яка є залежною від Ca^{2+} . Інші дослідження виявили, що і білки комплексу I електронно-транспортного ланцюга імунопреципітують з внутрішньомітохондріальною NOS [42, 56, 59]. Активність mtNOS максимальна за оптимальної роботи електронно-транспортного ланцюга, зокрема комплексу I, який послуговує джерелом електронів для функціонування ензиму; інактивація комплексу I обмежує активність mtNOS [18, 35, 42].

Вплив метаболічного стану мітохондрій на швидкість утворення NO.

Діюча концепція метаболічних станів мітохондрій та дихального контролю базуються на швидкості поглинання O_2 ізольованими органелами. Висока швидкість поглинання O_2 та продукції ATP спостерігається у випадку додавання субстратів дихання та ADP в метаболічному стані 3. Відсутність ADP обумовлює низьку швидкість поглинання O_2 , ATP не синтезується, а внутрішня мітохондріальна мембрана гіперполяризована (метаболічний стан 4) [50]. При переході зі стану 4 до стану 3 синтез NO в мітохондріях гальмується майже на 60 %. Вивільнення NO експоненціально залежить від величини електричного потенціалу внутрішньої мембрани. Агенти, що зменшують або руйнують мембранний потенціал (роз'єднувачі та протонофори), знижують синтез NO, в той час як додавання олігоміцина, який гіперполяризує внутрішню мітохондрійну мембрану, приводить до генерації максимальних кількостей NO. Таким чином, можна говорити про регуляцію активності mtNOS мембранним потенціалом в межах його фізіологічних значень [49, 53].

1.4. Функціональна роль NO в мітохондріях

Оксиду азоту належить ключова роль в регуляції функціональної активності мітохондрій, які, з одного боку, містять системи власного біосинтезу NO, а з іншого – є ефективною мішенню дії активних форм азоту. На сьогодні з'ясовано, що NO модулює енергетичні, метаболічні і транспортні процеси в мітохондріях, зокрема відповідає за інгібування або індукцію біогенезу, контроль дихання та окисного фосфорилування; $\Delta\psi$ внутрішньої мітохондріальної мембрани, та активність систем транспорту Ca^{2+} , функціонування пори перехідної провідності (PTP) тощо. [34, 49, 57, 66]. Більш того, NO контролює експресію кількох ензимів циклу Кребса [69]. Стаціонарна концентрація NO в матриці мітохондрій знаходиться в наномолярному діапазоні, в той час як інтактні органели здатні продукувати NO в значно вищих мікромольних концентраціях. Це вказує на те, що значна частина утвореного оксиду азота реагує з мітохондріальними мішенями: $\cdot\text{O}_2^-$, гемові та тіольні групи протеїнів [25, 44].

Споживання кисню та регуляція електронно-транспортного ланцюга. Колокалізація mtNOS з I (NADH-дегідрогеназа) та VI (CcOX) комплексами дихального ланцюга сприяє тому, що оксид азоту у фізіологічних, тобто наномольних, концентраціях оборотно зв'язується та пригнічує активність комплексів електронно-транспортного ланцюга, які мають різну чутливість до нього. 0,5-1 мкМ NO селективно і зворотно інгібує активність NADH-дегідрогенази шляхом S-нітрозилювання тіольних залишків [45]. Саме вона постачає mtNOS електронами для перебігу синтезу NO, тож інактивація комплексу I знижує активність mtNOS [44]. Комплекс II, зважаючи на вміст залізо-сірчаних центрів, також здатний бути потенційною мішенню NO. Гальмування транспорту електронів між цитохромами b та c1 в III комплексі дихального ланцюга 0,3-0,5 мкМ NO відбувається при його взаємодії з Fe-S-центрами [46]. Найбільш чутливим до дії NO є термінальний акцептор електронів мітохондрійного транспортувального ланцюга - CcOX. NO

утворює нітрозильні комплекси с гемом а3 цитохрома і атомом міді Cu_B в активному центрі $CcOX$, результатом чого є тимчасове зниження мітохондрійного дихання з частковою деполаризацією мітохондрійної мембрани, що може мати протекторний ефект, знижуючи інтенсивність генерації активних форм кисню [8]. Ендогенно синтезований NO, знижуючи активність цитохром с-оксидази, зменшує споживання кисню, що дозволяє оптимально функціонувати клітинним ензимам з низькою спорідненістю до O_2 [47].

Зміни інтенсивності окисного фосфорилування за дії NO виступають важливим фактором регуляції споживання O_2 між клітинами в стінках великих судин та в тканинах на різних відстанях від капілярів. Клітини, що знаходяться близько до кровотоку, більше постачаються L-аргініном та O_2 , які, в свою чергу, стимулюють mtNOS та продукцію NO. Оксид азоту обмежує споживання O_2 добре окисгенованими клітинами, змушуючи O_2 дифундувати до більш віддалених від кровотоку ділянок [57, 78]. Синтез АТФ мітохондріями регулюється системою NO/cGMP [50, 70].

Оксид азоту за високих концентрацій на фоні посилення утворення супероксид-аніона в мітохондріях супроводжується генерацією значних кількостей пероксинітрита та веде до таких шкідливих наслідків, як незворотне інгібування дихального ланцюга, посилена продукція активних форм кисню, деполаризація мітохондріальної мембрани, вивільнення цитохрому с в цитозоль (пов'язане або з втратою мембранного потенціалу мітохондріями, або за рахунок нітрозилування залишку тирозину цитохрома с), нітрозилування ряду мітохондрійних протеїнів [64, 69, 73]. Описані патологічні явища, що мають назву мітохондрійної дисфункції, призводять до колапсу біоенергетики мітохондрій, розвитку апоптозу та ендотеліальної дисфункції [49, 72]. Посилена генерація супероксид-аніона та пероксинітрита спричинює окиснення BH_4 , що перетворює mtNOS з NO-генеруючого на супероксид-продукуючий ензим. Це веде до подальшого порушення нормального функціонування електрон-транспортного ланцюга та

нітрування пероксинітритом залишків тирозина його компонентів, що і відіграє ключову роль в апоптозі [76, 77].

Високий вміст активних форм азоту та кисню, що спостерігається при конкуренції NO з O₂ за металопротеїни мітохондрій в умовах запалення та зростання експресії iNOS, призводить до NO-залежної гіпоксії (нітроксії) [70, 71, 76].

Гомеостаз Ca²⁺ в мітохондріях як об'єкт регуляторного впливу NO. NO – ключова ланка підтримання оптимальної концентрації іонів Ca як в міоплазмі, так і мітохондрійному матриксі, а тому оптимальної роботи Ca²⁺-транспортувальних систем внутрішньої мітохондрійної мембрани, що забезпечує як власне Ca²⁺-гомеостаз клітини, так і функціональну активність Ca²⁺-залежних процесів в мітохондріях, таких як, наприклад, нормальне функціонування комплексів електрон-транспортного ланцюга та метаболічних процесів в матриксі.

Мітохондрії, залежно від їх локалізації в клітині, знаходяться від впливом різних концентрацій Ca²⁺. В умовах високих (десятки мкМ) концентрацій Ca²⁺ перебувають ті, що розташовані поблизу мікродоменів ендоплазматичного ретикулула, адже вони містять IP₃-активовані або ріанодин-чутливі Ca²⁺-канали. Вони здатні ефективно акумулювати цей катіон наразі потреби, зокрема масованого вивільнення Ca²⁺ з саркоплазматичного ретикулула м'язових клітин за збудження. Ізоформа I ріанодинового рецептора солокалізована з внутрішньою мітохондріальною мембраною, що може бути з одним з механізмів інтеграції ретикулярних і мітохондріальних Ca²⁺-пулів [80, 83, 84]. NO мітохондрійного та екзогенного походження здатний змінювати ефективність акумуляції Ca²⁺ мітохондріями, а отже і модулювати Ca²⁺-залежні транспортувальні системи.

Іони Ca регулюють активність ряду дегідрогеназ: піруватдегідрогеназу, NAD-залежні ізоцитрат- та 2-оксоглутарат дегідрогенази, α-кетоглутаратдегідрогеназу [66, 69], і, звичайно, mtNOS [25, 26]. Посилення роботи mtNOS приводить до зменшення поглинання кисню, в той час як

стимулювання активності Ca^{2+} -залежних дегідрогеназ веде до протилежної дії [56, 68]. Активація дегідрогеназ та mtNOS досягається при різних концентраціях Ca^{2+} : для перших вона нижча 0,2 мкМ, для останньої – 1 мкМ [46, 59]. NO забезпечує негативний зворотній зв'язок в обміні Ca^{2+} : підвищення рівня кальцію активує Ca^{2+} -залежну mtNOS, результатом цього є зростання рівня NO, що інгібує комплекси ЕТЛ, знижуючи при цьому потенціал внутрішньої мітохондрійної мембрани і в подальшому лімітуючи поглинання Ca^{2+} [48]. Поглинання Ca^{2+} та стимуляція mtNOS може підвищувати утворення ONOO-, який, в свою чергу, ініціює вивільнення Ca^{2+} та цитохрома c з матриксу з наступним зниженням активності mtNOS [49], що призводить до розвитку апоптозу [50].

Показано, що NO може або запобігати або сприяти відкриттю РТР [73]. Це залежить одночасно від концентрації NO та інтенсивності генерації $\cdot\text{O}_2^-$ в мітохондріях. Відкриття пори гальмується за фізіологічного рівня NO з константою напівінгібування біля 10 нМ [55]. Високі концентрації NO збільшують чуливість РТР до таких факторів відкриття як підвищена концентрація Ca^{2+} в матриксі, низький рівень АТР та посилення продукції $\cdot\text{O}_2^-$. Відкриття пори спричинює різку деполяризацію, виснаження пулу АТР, апоптичну, а в окремих випадках і некротичну загибель клітини. З огляду на це, mtNOS відіграє важливу роль в регуляції активності РТР [61, 64, 72]. В експериментах проведених на аорті та міокарді щурів в умовах введення тваринам нітрогліцерину показано, що підвищення Ca^{2+} -ємності мітохондрій зумовлено саме інгібуванням пори перехідної провідності оксидом азоту [67, 70].

NO, Ca^{2+} та мітохондріальний рух. Мітохондрії мають більшу рухливість за концентрації цитозольного Ca^{2+} біля або менше 100 нМ в стані спокою клітини. При зростанні рівня Ca^{2+} інтенсивність руху падає. Ca^{2+} -індуковане гальмування рухливості мітохондрій відбувається на фоні посилення акумуляції катіону матриксом, активації біоенергетичних процесів

та стимуляції ендогенної генерації NO і в подальшому супроводжується зниженням поглинання кисню і інтенсивності окисного фосфорилування.

Таким чином, синтезований mtNOS NO функціонує як об'єднувальний молекулярний перемикач для запуску або гальмування низки мітохондрійних процесів, що зумовлює взаємозалежну пряму або опосередковану зміну функціональної активності їх субміхондрійних компонентів.

1.5. Антагоністи кальмодуліну

Мітохондрії відіграють фундаментальну роль у контролюванні внутрішньоклітинних процесів, особливо у забезпеченні кальцієвих сигнальних шляхів. Ca^{2+} – це універсальний регуляторний іон, модуляція цитоплазматичної концентрації якого є дуже важливою. Ca^{2+} реалізує свою дію оборотно утворюючи комплекси з протеїнами, передусім з кальмодуліном [86].

Кальмодулін – багатофункціональний проміжний кальцій-зв'язуючий білок, що експресується у всіх еукаріотичних клітинах. Зв'язавшись з Ca^{2+} , кальмодулін діє як елемент шляху передачі кальцієвого сигналу, модифікуючи його взаємодію з різними цільовими білками, такими як протеїнкінази, протеїнфосфатаза, фосфодіестерази, ферменти м'язової рухливості. Концентрація кальмодуліну в клітині варіює в межах 5-10 мкМ і становить близько половини концентрації всіх CaM-зв'язуючих білків [85].

CaM являє собою білок з 148 амінокислот, що має чотири «EF-hands» - мотиви зв'язування з Ca^{2+} – у двох глобулярних N- та C-доменах. Спорідненість EF-hands C-домену до Ca^{2+} приблизно на порядок більше, ніж у N частині [88]. Після зв'язування з іонами Ca, кальмодулін набуває відкриту конформацію, що дає йому більш високу спорідненість до протеїнів-мішеней [87]. У цій конформації стають відкритими гідрофобні поверхні, які в свою чергу можуть зв'язуватися з амфіфільними регіонами протеїнів-мішеней.

Спроби з'ясувати механізм дії та функції CaM призвели до широкого використання його антагоністів, а саме трифлюоперазину (TFP), сполуки типу фенотіазину, та похідного антимікотичного миконазолу, кальмідозоліуму (CAL) (рис. 3) [89]. Антагоністи кальмодуліну – це, як правило, молекули з гідрофобними та позитивно зарядженими групами, які або займають гідрофобні кишені на CaM, перешкоджаючи їх взаємодії з амфіфільними ділянками протеїнів-мішеней, або взаємодіють із самими мішенями ензиму, перешкоджаючи їх взаємодії, тобто антагоністи не завжди є специфічними саме до CaM [90]. TFP і CAL зазвичай використовуються в дослідженнях на гладенько-мязовій тканині.

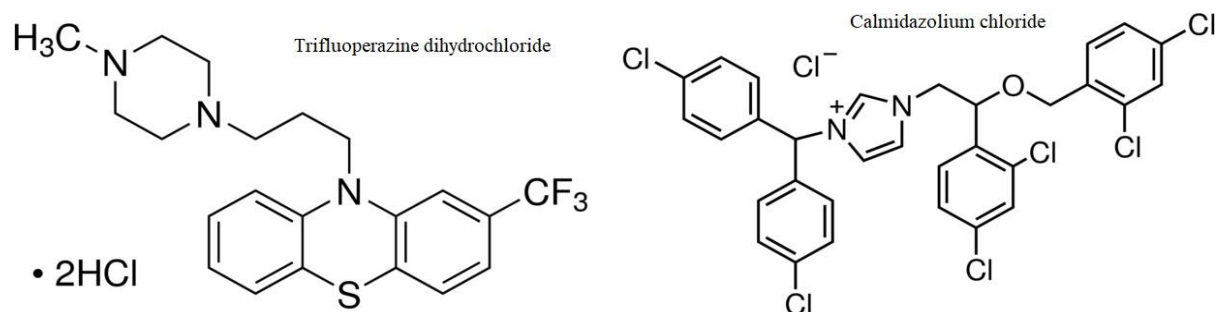


Рис. 1.3. Структурні формули трифлюоперазину та кальмідазоліуму.

TFP зв'язується з CaM краще, ніж з іншими білками. Показано, що його взаємодія з CaM відбувається між II і III Ca-зв'язуючими доменами CaM, які віддалені від центрів приєднання Ca²⁺. За низьких концентрацій TFP (1 μM), зв'язування антагоністу являється Ca²⁺-залежним та підсилюється в 100 разів при 0,1 mM Ca²⁺ завдяки тому, що 2 молекули TFP приєднуються до високоафінних сайтів CaM. При збільшенні концентрації TFP до 100 μM, зв'язування стає Ca²⁺-незалежним через наявність великої кількості сайтів зв'язування з низькою спорідненістю [91].

Кальмодулін відіграє важливу роль у скороченні гладенької мускулатури. Для активації скорочення та взаємодії актину з міозином необхідне фосфорилування голівки легкого ланцюга міозину, яке здійснюється кіназою легкого ланцюга міозину (MLCKase). MLCKase

активується виключно кальмодуліном, зв'язаним з кальцієм, роблячи скорочення гладкої мускулатури є Ca^{2+} -залежним процесом [88]. У гладкій мускулатурі кальмодулін регулює MLCKase – кіназу легкого ланцюга міозину, і тим самим фосфорилування міозину, а також модулює взаємодію актин-міозин, діючи на кальдесмон. TFP і CAL інгібують фосфорилування міозину за різними механізмами: TFP взаємодіє з вільним CaM, запобігаючи утворенню активних комплексів CaM-MLCKase, та з міозином, запобігаючи його фосфорилуванню; CAL інгібує комплекс CaM-MLCKase, при чому він не дисоціює. CAL інгібує фосфорилування більш ефективно через набагато більшу спорідненість CaM до CAL, ніж до TFP. У системі CaM-MLCKase-CAL інгібування відбувається за концентрацій у 10-20 разів нижчих, ніж для TFP [87].

Інший шлях впливу CaM на скорочення міоцитів – через контролювання транспорту Ca^{2+} у клітині, зокрема у саркоплазматичному ретикулумі. Ріанодиновий рецептор саркоплазматичного ретикулуму інгібується комплексом $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, що забезпечує регулювання загальних рівнів іонів Ca в клітині [90]. Відповідно, антагоністи кальмодуліну можуть знімати інгібування каналів, модулюючи зміни концентрації Ca^{2+} у клітині.

Важиве значення CaM відіграє у cGMP-залежному сигналінгу, маючи здатність активувати NOS та фосфодіестеразу (PDE1). Всі ізоформи NO-синтази зв'язуються і активуються CaM, а утворення NO є $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -залежним процесом. Рецептор оксиду азоту, розчинна гуанілілциклаза (sGC), активується вторинним месенджером, 3'-5' циклічним монофосфатом гуанозину (cGMP). $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ активує фосфодіестеразу (PDE1) - фермент, який гідролізує як cGMP, так і 3'-5' циклічний аденозиновий монофосфат (cAMP). Цей подвійний ефект може призвести до пригнічення накопичення cGMP в клітинах, стимульованих до вивільнення NO. І навпаки, показано, що cGMP модулює сигналізацію Ca^{2+} , головним чином за рахунок фосфорилування cGMP-залежною протеїнкіназою деяких каналів і помп, що відповідаються за перенесення Ca^{2+} . Відповідно, антагоністи також здатні

модулювати процеси цього сигнального шляху: вони перешкоджають CaM-залежному інгібуванню фосфоліпази A₂, відкриваючи потенціал-залежні і незалежні Ca²⁺-канали в деяких клітинах: Ca²⁺ напряду інгібує sGC і навпаки, cGMP модулює Ca²⁺-сигнал через фосфорилування кіназою cGMP-залежних каналів, помп, які забезпечують Ca²⁺-сигналінг. CAL діє вибірково на субстратно-ферментний комплекс як неконкурентний інгібітор sGC. Конформаційна зміна активного сайту, відповідального за зв'язування із субстрату, дозволяє зв'язати CAL, що знижує швидкість каталізу. Інгібування є незворотним, що може пояснюватися порушенням білкової структури або дуже міцним зв'язуванням CAL з sGC [88].

Комплекс Ca²⁺/CaM активує низку ферментів та іонно-транспортувальних протеїнів, деякі з яких містять «EF-hand» мотив безпосередньо у своїй структурі. Було встановлено, що деякі канали та транспортери мітохондрій містять цей мотив у своїй структурі або активуються зв'язуванням із комплексом Ca²⁺/CaM. Перш за все, це стосується кальцієвого мітохондрійного уніпортера, який забезпечує основний шлях поглинання Ca²⁺, K⁺/H⁺/Ca²⁺-обмінників, транспортерів глутамата та аспартата та інших [86]. Показано стимулювання Ca²⁺-уніпортеру мітохондрій комплексом Ca²⁺/CaM, не опосередковане CaM кіназою II.

У структурі Ca²⁺-залежних мітохондрійних переносників, зокрема транспортерів АТР–Mg/Pi, також є ділянки, які гомологічні кальмодуліну [90]. Отже, зв'язування з ними антагоністів кальмодуліну гальмує активність зазначених транспортерів, а отже опосередковано впливає на величину мембранного потенціалу мітохондрій і, відповідно, на функціонування Ca²⁺-уніпортеру. Показано, що антагоністи кальмодуліну викликають деполяризацію мітохондрійних мембрани та підвищення концентрації Ca²⁺ у матриксі мітохондрій та цитоплазмі клітин [90]. Іони Ca в матриксі утворюють комплекси з фосфатом, утворення та дисоціація яких залежить від рН мітохондрійного матриксу. Закислення матриксу, що відбувається при

деполяризації, призводить до дисоціації цих комплексів, отже, до збільшення концентрації вільного Ca. Також, сайти зв'язування Ca²⁺ «EF-hand» є частиною системи, що забезпечує метаболізм катіону в мітохондріях. Тому вивільнення катіону може відбуватися не тільки з комплексів Ca²⁺-фосфатів, але і з інших сайтів зв'язування. У разі введення CAL в середовище інкубації та утворення градієнта концентрації Ca²⁺, спрямованого всередину мітохондрій, відбувається значне збільшення неспецифічної проникності мітохондрійної мембрани, що призводить до різкого збільшення концентрації іонізованого кальцію в матриксі органел [86].

Отже, антагоністи кальмодуліну TFP і CAL, який є ключовим білком-посередником важливих сигнальних шляхів клітини, і, зокрема, мітохондрій – можуть виступати модуляторами низки процесів у клітині та субклітинних компонентах.

РОЗДІЛ II

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Суспензію ГМК та фракцію ізольованих мітохондрій отримували з матки невагітних щурів. Наркотизацію тварин викликали інгаляцією діетилового ефіру, після чого вони підлягали декапітації. При цьому дотримувались усіх вимог щодо роботи з лабораторними тваринами згідно Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), Закону України № 3447 IV “Про захист тварин від жорстокого поводження”.

2.1. Отримання суспензії міоцитів

Суспензію ГМК матки невагітних щурів одержували із використанням колагенази і соєвого інгібітору трипсину за допомогою методу Молларда [77], який використовували в деякій модифікації.

Після видалення матки її звільняли від жиру і сполучної тканини та переносили в розчин Хенкса (розчин А) наступного складу, (мМ): NaCl - 136,9; KCl - 5,36; KH_2PO_4 - 0,44; NaHCO_3 - 0,26; Na_2HPO_4 - 0,26; CaCl_2 - 1,26; MgCl_2 - 0,4; MgSO_4 - 0,4; глюкоза - 5,5; HEPES (pH, 7,4; 37 °C) - 10 [78]. Потім тканину подрібнювали ножицями на невеликі шматочки (середній розмір – 2 на 2 мм) і відмивали від крові та високих концентрацій іонів Ca (3 рази по 5 хв) в 5 мл розчину Б (розчин Хенкса вищеприведеного складу, який не містить MgCl_2 і MgSO_4 та містить CaCl_2 в концентрації 0,03 мМ). Після цього шматочки тканини інкубували протягом 20 хв (37°C, режим постійного перемішування) у 2 мл середовища дисоціації тканини, яке являє собою розчин колагенази типу IA (0,1 %), бичачого сироваткового альбуміна (0,1 %) і соєвого інгібітору трипсину (0,01 %), що був приготований на розчині Б. Через 20 хв середовище дисоціації тканини відбирали, а тканину переносили в вільний від ензиматичного препарату розчин Б. Для прискорення дисоціації

клітин тканинний препарат 15-20 разів обережно піпетували за допомогою скляної піпетки на протязі 1-2 хв. Розчин Б, який містить дисоційовані клітини, відбирали, а тканинний препарат знову переносили в нову порцію середовища дисоціації клітин, що містить колагеназу, бичачий сироватковий альбумін та соєвий інгібітор трипсину. Цю процедуру повторювали 5-6 разів. Дві перші порції розчину Б, що використовувався для піпетування (не містив колагенази та соєвого інгібітору трипсину і містив дисоційовані клітини), відкидали, в зв'язку з тим, що вони містили фрагменти тканини і пошкоджені клітини. Остані 3-4 порції збирали, об'єднували і центрифугували 10 хв при 80 g. Отриманий осад клітин промивали розчином Б і знову центрифугували у вказаному вище режимі. Одержану суспензію міоцитів зберігали в розчині Б [78].

2.2. Виділення фракції мітохондрій міомерія з матки щурів

Препарат ізольованих МХ одержували із міомерія невагітних щурів за допомогою методу диференційного центрифугування. Після виділення матки і очищення її від жирової та сполучної тканини, м'язевий препарат вміщували у 0,9 % розчин NaCl. Препарат подрібнювали ножицями на шматочки розміром приблизно 2x2 мм, які переносили у робочий розчин з температурою 4 °С наступного складу (мМ): HEPES (рН = 7,4) - 10; цукроза - 250; EGTA - 1. Тканину гомогенізували за допомогою гомогенізатору типу «Політрон» 3 рази по 20 с із охолодженням на льоду протягом 1 хв, співвідношення тканина: робочий розчин складало 1:9. Гомогенат центрифугували протягом 15 хв при 1 тис. g за температури 4 °С. Супернатант збирали та центрифугували протягом 15 хв при 12 тис. g за температури 4 °С. Осад ресуспендували у робочому розчині і знову центрифугували протягом 15 хв при 12 тис. g за температури 4 °С. Одержану фракцію ізольованих мітохондрій впродовж експерименту зберігали на льоду. Визначали вміст протеїну у фракції МХ за стандартним методом

Bradford M. M. Середнє значення цього вмісту складало 2 мг/мл, а в пробі – 50 мкг/мл [79].

2.3. Метод лазерної конфокальної мікроскопії

Просторовий розподіл флуоресцентних барвників у клітині досліджували на лазерному скануючому конфокальному мікроскопі LSM 510 META (“Carl Zeiss”, Німеччина) із використанням іммобілізованих на полі-L-лізині міоцитів. Процедуру іммобілізації клітин для конфокальних зйомок, відмивання неприкріплених міоцитів і всі експериментальні процедури проводили в фізіологічному середовищі Хенкса складу (мМ): NaCl – 136,9; KCl - 5,36; KH_2PO_4 - 0,44; NaHCO_3 - 0,26; Na_2HPO_4 - 0,26; CaCl_2 - 0,03; глюкоза – 5,5; Hepes (pH, 7,4, 37 °C) – 10 [78]. З метою пермеабілізації міоцитів в середовищі був присутній дигітонін у кінцевій концентрації 0,01 %.

Для візуалізації мітохондрій був залучений флуоресцентний барвник MitoTracker Orange CM-H₂TMRos у концентрації 200 нМ, а для візуалізації ядер клітин – 50 мкМ Hoechst 33342 [78]. Навантаження іммобілізованих міоцитів NO-чутливим флуоресцентним зондом DAF-FM ($\text{C}_{21}\text{H}_{14}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_5$, 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorescein, diamino fluorescein-FM) в концентрації 10 мкМ відбувалося протягом 15 хв при температурі 24 °C.

Експерименти на конфокальному мікроскопі проводили у режимі Multi Track. Флуоресценцію Hoechst 33342 збуджували за допомогою лазера на довжині хвилі 405 нм, а для реєстрації сигналу використовували світлофільтр BP 420-480. Для збудження флуоресценції MitoTracker Orange CM-H₂TMRos використовували лазер з довжиною хвилі 543 нм, а флуоресценцію реєстрували в діапазоні 560-615 нм (світлофільтр BP 560-615). Збудження флуоресценції DAF-FM здійснювали на довжині хвилі 488 нм, а її реєстрацію – в діапазоні 505-530 нм (світлофільтр BP 505-530) [78]. Вивчення кінетики розподілу флуоресцентних барвників у клітині проводили у режимі Time

Series, а для кількісного аналізу застосовували функцію ROI (Region Of Interest), яка дозволяє отримувати графік залежності інтенсивності флуоресценції від часу, усереднену по виділеній області.

2.4. Метод протокової цитофлуориметрії

Відносні значення вмісту NO та АФК в матриксі мітохондрій, навантажених зондами, реєстрували на протоковому цитометрі COULTER EPICS XL™ (Beckman Coulter, США), що обладнаний аргоновим лазером ($\lambda_{зб.} = 488$ нм, $\lambda_{фл} = 515$ nm (F11 канал)) із програмним забезпеченням SYSTEM II™ Software (Beckman Coulter, США). Використовували робочий протокол аналізу зразків, який був створений для характеристики фракції ізольованих мітохондрій міометрія. Події для аналізу обирали введенням логічного обмеження за показниками бічного та прямого світлорозсіювання (SS та FS). Аналіз проб припиняли за умови реєстрації 10000 подій у межах виділеної ділянки.

Дослідження NO-синтазної активності в ізольованих мітохондріях. Утворення оксиду азоту в мітохондріях міометрія досліджували із використанням NO-чутливого флуоресцентного барвника DAF-FM.

Склад середовища інкубації (2 мл): 20 мМ HEPES (рН 7,4, 25°C), 2 мМ калій-фосфатний буфер (рН 7,4, 25°C), 125 мМ KCl, 25 мМ NaCl, 10 мкМ NADPH, 10 мкМ NH_4 , 50 мкМ L-аргінін, 100 мкМ Ca^{2+} , 0,5 мкМ DAF-FM. Вміст протеїну в мітохондріальній фракції складав 15-20 мкг. Реакцію ініціювали внесенням аліквоти (40 мкл) L-аргінін- Ca^{2+} . Час інкубації 30 хв.

Дослідження утворення активних форм кисню (АФК) в ізольованих мітохондріях. Утворення АФК в ізольованих мітохондріях вивчали за допомогою флуоресцентного зонду DCF-DA.

Навантаження МХ АФК-чутливим флуоресцентним зондом DCF-DA у концентрації 25 мкМ проводили у середовищі, яке містило 10 мМ HEPES (рН 7,4; 37°C), 250 мМ цукрозу, 0,1 % бичачий сироватковий альбумін протягом

30 хв при кімнатній температурі 25°C. Для покращення процесу навантаження змішували барвник із Pluronic F-127 (0,02 %).

Склад середовища інкубації (2 мл): 20 мМ HEPES (pH 7,4, 25°C), 2 мМ калій-фосфатний буфер (pH 7,4, 25°C), 125 мМ KCl, 25 мМ NaCl. Вміст протеїну в мітохондріальній фракції складав 15-20 мкг. Реакцію ініціювали внесенням аліквоти 20 мкл 5 мМ піруват і 5 мМ сукцинат.

Значення флуоресцентної відповіді наводили у відносних одиницях як $(F-F_0)/F_0$, де F_0 – початковий рівень флуоресценції, F – флуоресцентний сигнал через 30 хв.

2.5. Метод спектрофлуориметрії

Реєстрація флуоресценції NADH та FAD в мітохондріях: реєстрацію відносних значень рівня власної флуоресценції NADH та FAD в матриці мітохондрій міометрія досліджували із використанням флуориметричного методу на спектрофлуориметрі Quanta Master 40 РТІ (Канада) із програмним забезпеченням FelixGX 4.1.0.3096.

Склад середовища інкубації (2 мл): 20 мМ HEPES (pH 7,4, 37°C), 2 мМ калій-фосфатний буфер (pH 7,4, 37°C), 120 мМ KCl, 5 мМ піруват, 5 мМ сукцинат, аліквота (100 мкл) мітохондріальної фракції містила 100 мкг білку.

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

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

РОЗДІЛ III

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Джерела біосинтезу оксиду азоту в міоцитах матки щурів

Оксид азоту (NO) є універсальною сигнальною і регуляторною молекулою в клітинах. Важливим проявом біологічної активності оксиду азоту є контроль скоротливої функції гладеньких м'язів, що, значною мірою, зумовлює нормальну роботу внутрішніх органів, зокрема сечостатевої системи [92]. Як продукція NO, так і чутливість до нього знижуються наприкінці вагітності і передують початку пологової активності [93]. Донори оксиду азоту викликають релаксацію міометрія як невагітних жінок, так і тих, що мають різні строки вагітності. Відповідне зниження контрактильної здатності гладеньком'язових клітин матки показано також і у випадку окремих видів тварин, в тому числі для щурів та приматів, в різні періоди функціональної активності органу [94]. Здатність NO розслабляти міометрій зумовлює інтерес до вивчення закономірностей його утворення в міоцитах матки. Втім невідомим залишаються субклітинні джерела оксиду азоту в міометрії. Важливим джерелом NO в гладеньком'язових клітинах матки, з огляду на інші тканини, можуть слугувати мітохондрії. В свою чергу, мітохондрії відіграють важливу роль в процесах Ca^{2+} -сигналізації та Ca^{2+} -залежного контролю скорочення гладеньких м'язів [95]. Протягом останніх двадцяти років було з'ясовано, що NO регулює енергетичні, метаболічні і транспортні процеси в мітохондріях [96]. Результати сучасних досліджень вказують на те, що NO – важлива ланка підтримання оптимальної концентрації іонів Ca як в міоплазмі, так і в мітохондріальному матриксі [97].

Використання сучасного флуоресцентного зонда DAF-FM дозволяє безпосередньо швидко і надійно зареєструвати продукцію NO за низьких концентрацій оксиду азоту (2-5 нМ) в інтактних клітинах, а метод лазерної конфокальної мікроскопії – візуалізувати його утворення та, із

використанням специфічних інгібіторів ензимів та хімічних модифікаторів субклітинних мембранних структур, довести зв'язок біосинтезу NO із певними клітинними компартментами [98]. Біосинтез NO в міоцитах може бути пов'язаний не лише з мітохондріями: конститутивні NOS асоційовані з плазматичною мембраною, саркоплазматичним ретикуломом і іншими внутрішньоклітинними структурами [96].

Таким чином, першим етапом досліджень була ідентифікація джерел синтезу оксиду азоту в клітинах гладенького м'яза матки.

Обробка міоцитів дигітоніном у концентрації 0,01 %, за якої детергент не впливає на функціонування внутрішньоклітинних Ca^{2+} -транспортувальних систем, але викликає зростання неспецифічної проникності саме плазматичної мембрани [90], призводила до зростання флуоресценції DAF-FM і відповідного посилення продукції NO клітинами (рис. 1).

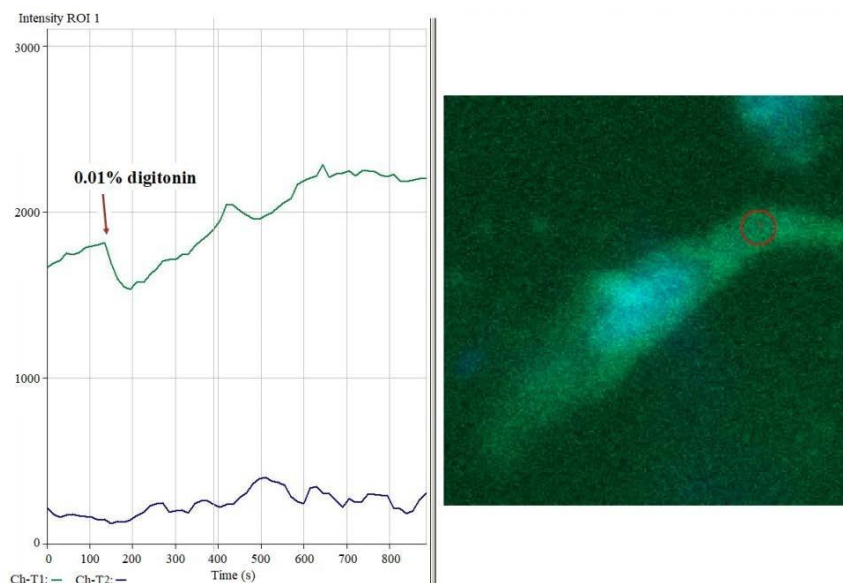


Рис. 3.1. Вплив 0,01 % дигітоніну на продукцію оксиду азоту в міоцитах матки. Дані лазерної конфокальної мікроскопії. Для кількісного аналізу результатів використана функція ROI (region of interests). 10 мкМ DAF-FM (NO), зелена крива, канал 1; 50 мкМ Hoechst 33342 (ядро), синя крива, канал 2.

Дигітонін взаємодіє з холестеролом плазматичної мембрани, утворюючи міцели та везикули, що порушує ліпідний бішар і мембрана стає більш проникною для іонів та субстратів [99]. Останнє призводить до

руйнування кавеол і можливого відокремлення eNOS від кавеоліну – потужного інгібітора ензиму [100]. Зазначені події є поясненням посилення синтезу NO міоцитами і свідченням того, що плазматична мембрана поряд з мітохондріями є важливим джерелом оксиду азоту в клітинах міометрія.

Застосування 1 мМ метил- β -циклодекстрину (M β CD), циклічного олігосахариду, який утворює комплекси з холестеролом і використовується як фармакологічний агент для видалення холестерола з мембран [96], та дигітоніну в надвисоких концентраціях (0,1 %), за яких порушується інтактність субклітинних структур [93], призводило до зниження флуоресцентного сигналу від DAF-FM в межах 50 % від контрольного рівня (рис. 2). Ці дані свідчать на користь синтезу NO, асоційованого з мембранами плазматичною та субклітинних структур.

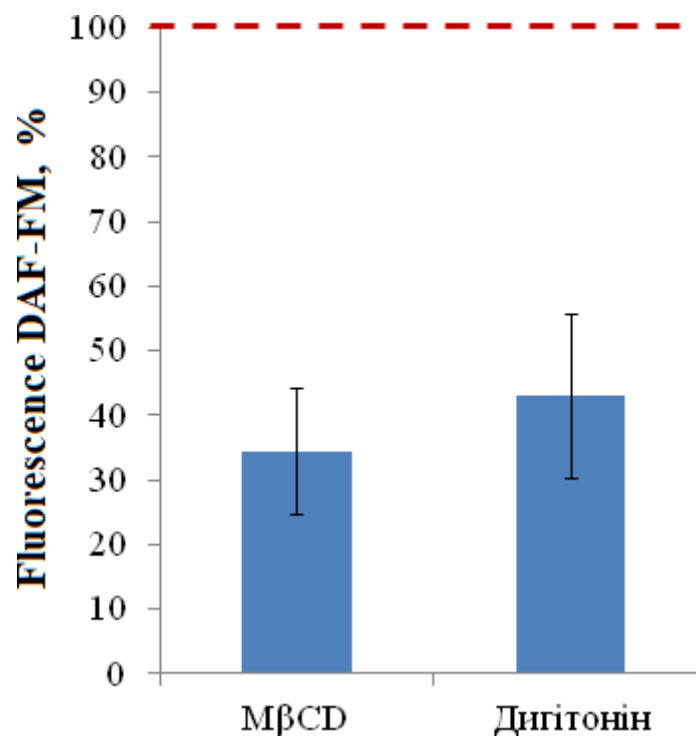


Рис. 3.2. Дія детергентів у високих концентраціях (1 мМ M β CD та 0,1 % дигітоніну) на біосинтез оксиду азоту в клітинах міометрія; за 100 % прийнято синтез NO за відсутності детергентів. Дані лазерної конфокальної мікроскопії. Для кількісного аналізу використано 5-6 клітин з різних незалежних дослідів, $M \pm m$.

Відомо, що найбільш збагачена холестерином плазматична мембрана, певна його кількість міститься також і у внутрішній мембрані мітохондрій та мембрані ендоплазматичного ретикулула. Можливо, «жорстка» дехолестеринізація субклітинних мембран має наслідком їхнє значне руйнування і відповідне пригнічення активності мембрано-асоційованих ензимів, зокрема і NOS.

Високоафінний інгібітор SERCA – тапсигаргін – в наномолярних концентраціях призводить до спустошення пулу іонів Са в саркоплазматичному ретикулумі [94]. В наших дослідженнях 1 мкМ тапсигаргін не призводив до суттєвих змін у флуоресценції DAF-FM (рис. 3). Лише збільшення концентрації тапсигаргіна до 3 мкМ призводило до зниження флуоресценції NO-чутливого DAF-FM. Таким чином можна припустити, що в міоцитах матки активність NO-синтази, асоційованої з саркоплазматичним ретикулумом, також має місце.

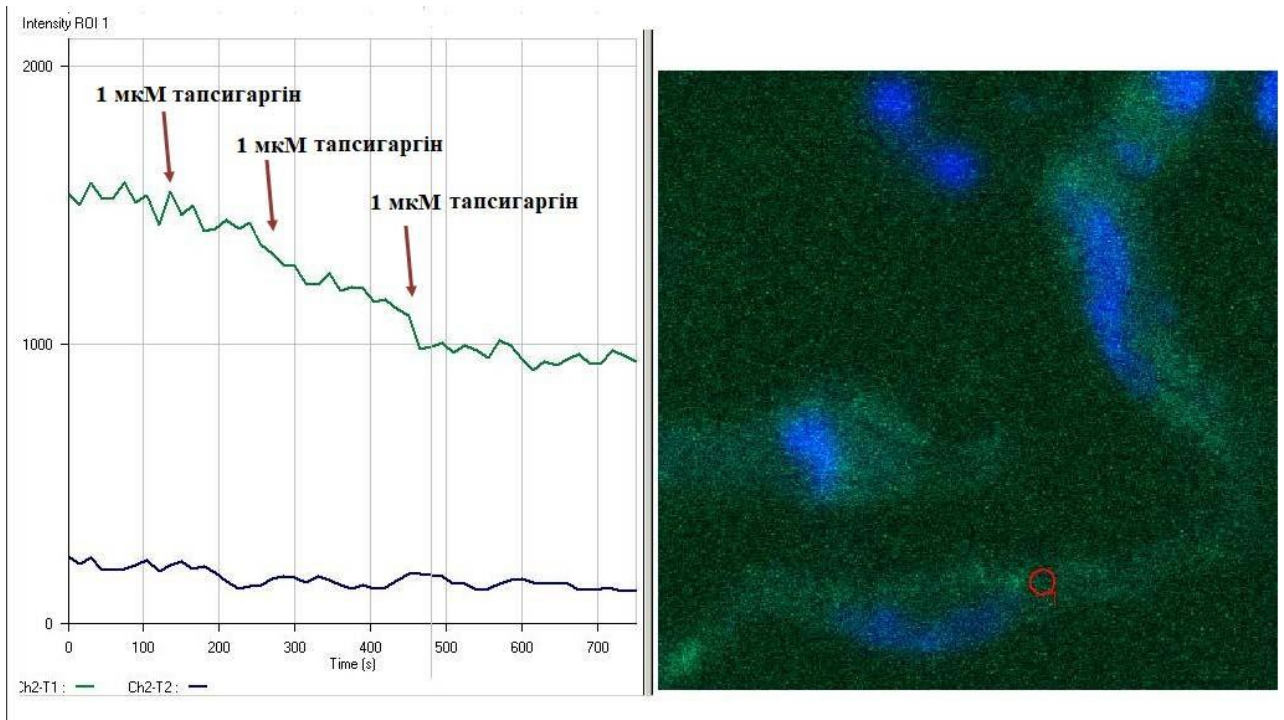


Рис. 3.3. *Зміни інтенсивності флуоресценції DAF-FM в міоциті в умовах зростання концентрації тапсигаргіну в середовищі. Результат лазерної конфокальної мікроскопії. Для кількісного аналізу результатів використана*

функція ROI (region of interests). DAF-FM (NO), зелена крива, канал 1; Hoechst 33342 (ядро), синя крива, канал 2.

Було продемонстровано (рис. 4), що в умовах пермеабілізації плазматичної мембрани 0,01% дигітоніном, що мало наслідком зростання продукції NO в міоцитах, додавання ротенона та антиміцину – інгібіторів I та III комплексів дихального ланцюга відповідно – призводило до зниження флуоресценції DAF-FM, і відповідно синтезу оксиду азоту. Даний результат демонструє взаємозв'язок синтезу NO з мітохондріями, який безпосередньо залежить від функціональної активності комплексів електрон-транспортного ланцюга.

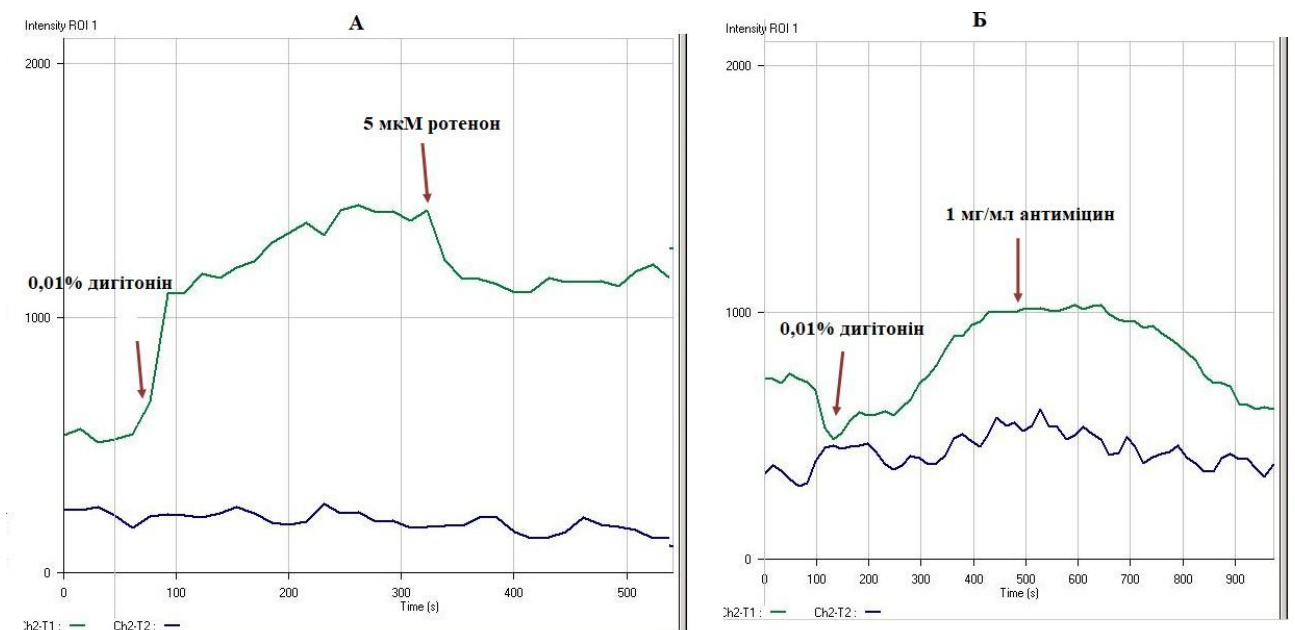


Рис. 3.4. Зміни інтенсивності флуоресценції DAF-FM в міоциті в умовах пермеабілізації плазматичної мембрани дигітоніном та дії інгібіторів I та III комплексів дихального ланцюга мітохондрій. Результат лазерної конфокальної мікроскопії. Для кількісного аналізу результатів використана функція ROI (region of interests). DAF-FM (NO), зелена крива, канал 1; Hoechst 33342 (ядро), синя крива, канал 2.

Крім того продемонстровано солокалізацію специфічного щодо мітохондрій зонда MitoTracker Orange CM-H₂TMRos, який накопичується лише в енергізованих органелах [Bukman 2001], та NO-чутливого барвника DAF (рис. 5).

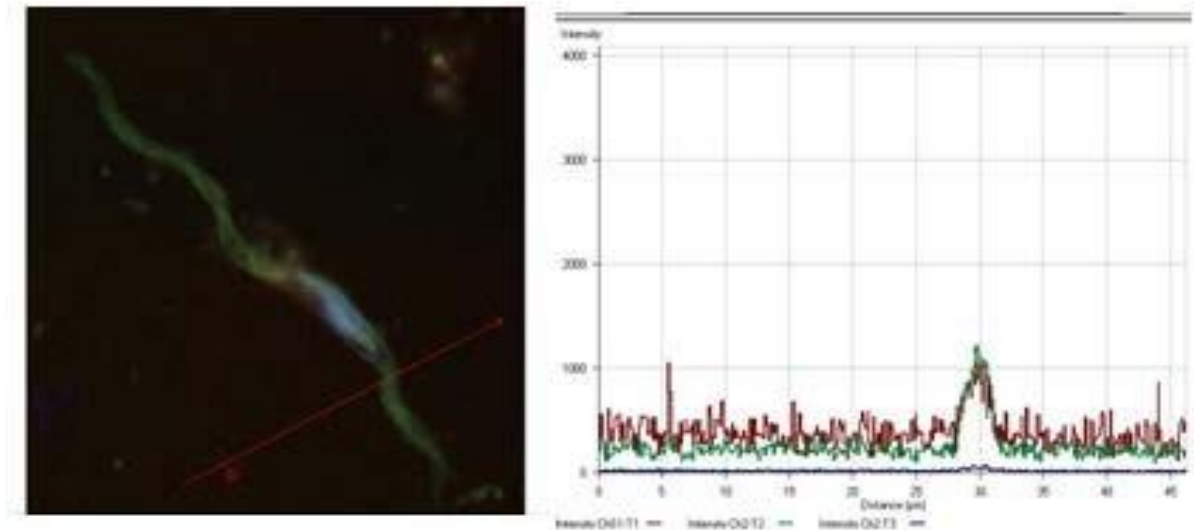


Рис. 3.5. Солокалізація флуоресцентних зондів DAF-FM та MitoTracker Orange CM-H₂TMRos в міозиті. Представлено результати тотожного розподілу барвників довільного оптичного зрізу клітин: червоний колір – MitoTracker Orange CM-H₂TMRos (200 нМ), зелений – DAF-FM (10 мкМ), синій – специфічний щодо ядра барвник Hoechst 33342 (50 нМ).

Комп'ютерний аналіз довільно обраного поза ядром клітинного зрізу показав тотожний розподіл обох флуоресцентних барвників (рис. 5).

Таким чином, джерелами оксиду азоту в клітинах гладенького м'язу матки можуть виступати NOS, асоційовані з плазматичною мембраною та саркоплазматичним ретикулумом. Також потужним джерелом синтезу NO є мітохондрії, ефективність якого залежить від функціональної активності комплексів електрон-транспортного ланцюга.

3.2. Каталітичні властивості NO-синтазної реакції в ізольованих мітохондріях міометрія

Попередні дослідження продемонстрували, що ізольовані мітохондрії гладеньком'язових клітин матки здатні до біосинтезу NO, який посилюється в присутності екзогенних субстрату L-аргініну, Ca^{2+} та кофакторів NADPH й тетрагідробіоптерина (BH_4). Розраховано константи активації за Ca^{2+} ($K_{\text{Ca}} = 44,4 \pm 14,5$ мкМ) та для L-аргініну ($K_{\text{арг}} = 28,9 \pm 9,1$ мкМ). Також показано, що ефективність Ca^{2+} , L-аргінін-стимульованого синтезу NO в ізольованих мітохондріях суттєво залежить від рівня енергізації внутрішньої мембрани органел.

Широковживаний інгібітор конститутивних NO-синтаз N^{G} -нітро-L-аргінін у мікромольних концентраціях гальмував синтез NO в мітохондріях міометрія в середньому на 50 % (рис.6). Відомий блокатор транспорту Ca^{2+} у внутрішній мембрані мітохондрій рутенієвий червоний RuR (10 мкМ) суттєво пригнічував продукцію NO мітохондріями за наявності в інкубаційному середовищі 100 мкМ Ca^{2+} на 40 % (рис. 6). Одержаний результат є підтвердженням того, що синтез NO в мітохондріях забезпечується ізоформою конститутивної NOS та є Ca^{2+} -залежним процесом.

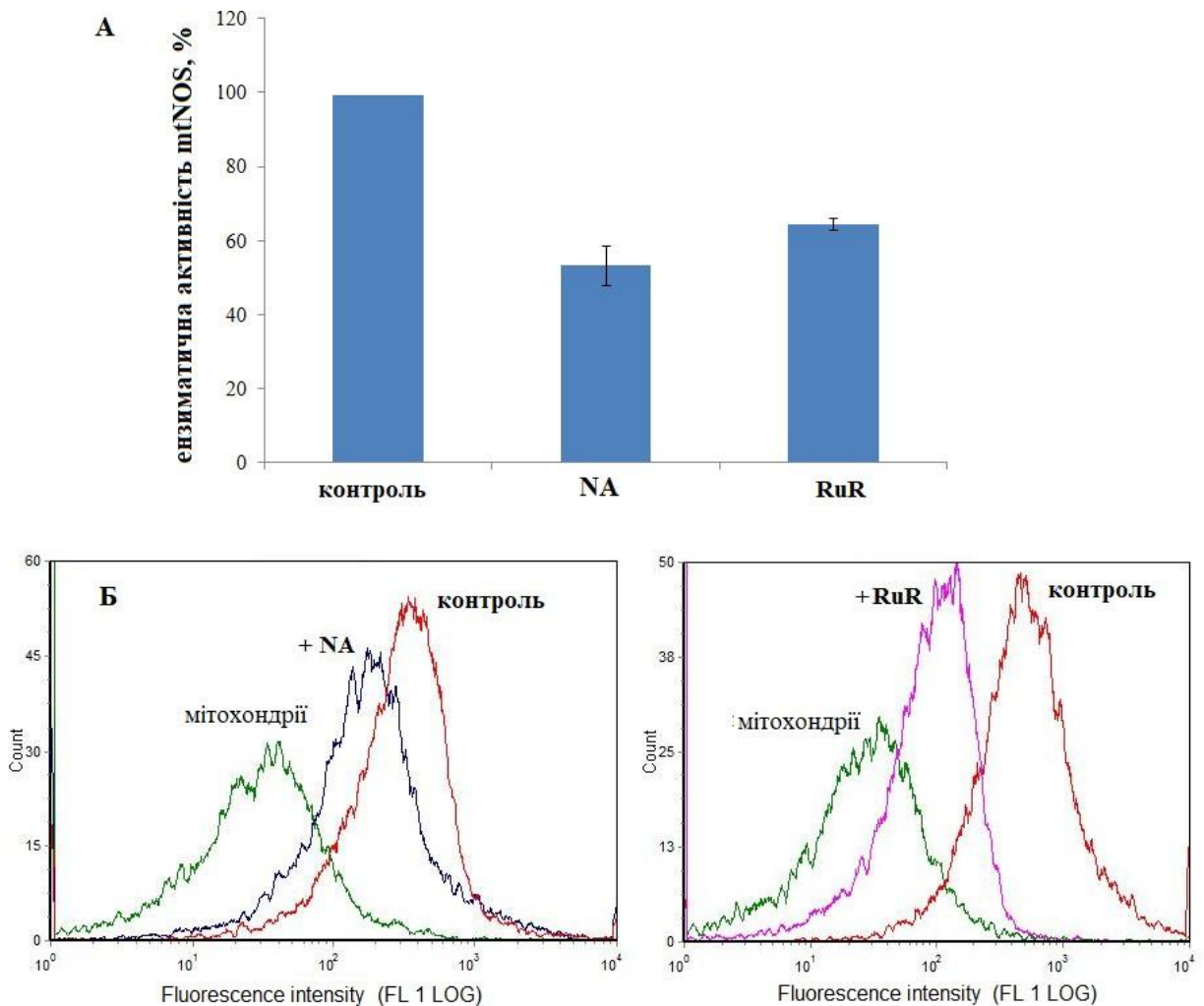


Рис. 3.6. А - Зміни інтенсивності флуоресценції DAF-FM в мітохондріях за присутності 25 мкМ N^G -нітро-L-аргініна (NA) та 10 мкМ рутенієвого червоного (RuR). $M \pm m$, $n=5$. Б - Зміщення піків інтенсивності флуоресценції в умовах дії NA та RuR: “мітохондрії” – положення піку в “0” момент часу, “контроль” – положення піку через 30 хв. Дані типового експерименту.

Відомо, що Mg^{2+} широко використовують як токолітичний агент для пригнічення скорочення міометрія під час вагітності: він пригнічує спонтанні міометріальні скорочення, а також інгібує окситоциніндуковані скорочення міометрія. Концентрація Mg^{2+} 5–10 мМ є фармакологічною.

Було показано, іони Mg в концентрації 1-10 мМ концентраційно-залежно гальмують біосинтез NO в мітохондріях (рис. 7, А, крива 2). В той

же час за відсутності іонів Ca інгібувальний ефект Mg^{2+} не спостерігали (рис. 7, А, крива 1).

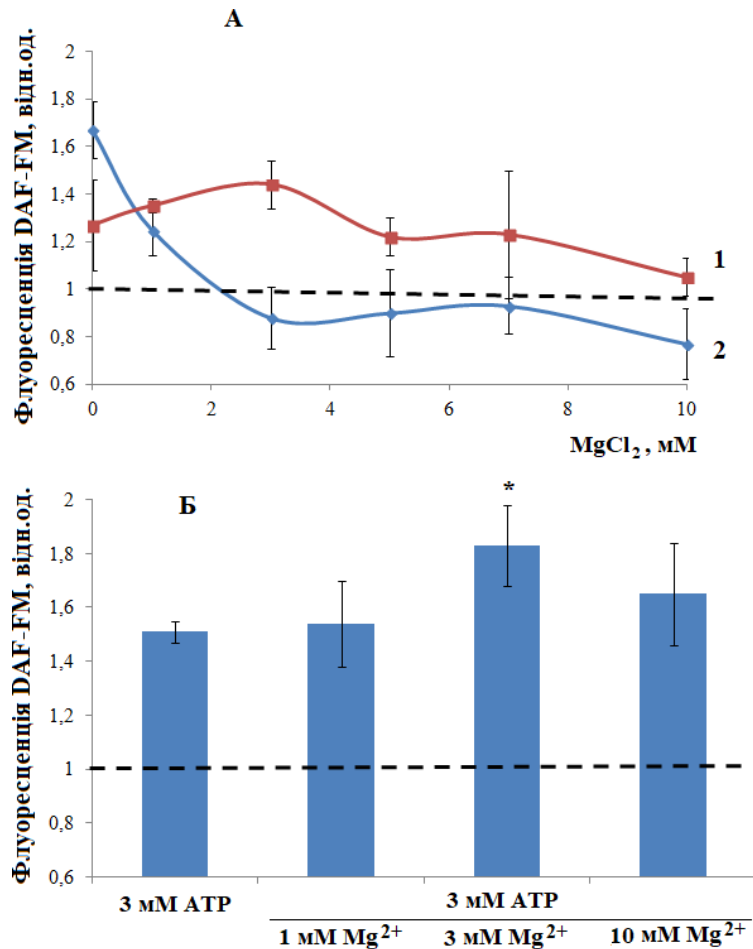


Рис. 3.7. Вплив іонів Mg на синтез оксиду азоту в ізольованих мітохондріях міомерія. А - 1 – за наявності в середовищі 50 мкМ L-аргініну, 2 – за наявності 50 мкМ L-аргініну та 100 мкМ Ca^{2+} ; Б – в середовищі присутній 3 мМ АТР. $M \pm t$, $n=5$. ; * - зміни вірогідні ($p \leq 0,05$) відносно дії 3 мМ АТР. За “1” прийнято ендogenousний (за відсутності L-аргініну та Ca^{2+} в середовищі) синтез NO в мітохондріях.

На відміну від мітохондрій деяких інших типів клітин, в міомерії вони не здатні накопичувати Ca^{2+} за відсутності АТР, який потрібний для реверсної роботи АТР-синтази та забезпечення рушійної сили (формування електрохімічного градієнта протонів, Δp) входу Ca^{2+} . Тому наявність Mg^{2+} також є необхідною для цього процесу. Константа активації за цим катіоном

(K_{Mg}) сягає 1,7-4,27 ммоль/л, значення оптимальної концентрації Mg^{2+} становить 5-10 ммоль/л; за 10 ммоль/л і вище іони Mg блокують накопичення Ca^{2+} мітохондріями [42].

Подальші дослідження показали, що за присутності в середовищі 3 мМ АТР інгібувальний ефект Mg^{2+} знімається (рис. 7, Б). Даний результат можна пояснити утворенням комплексу $MgATP^{2-}$, який є субстратом для запуску H^+ -АТРази в режимі гідролізу АТР, що супроводжується активацією входу Ca^{2+} в мітохондрії та стимулюванням активності mtNOS.

Отже, одержані результати переконливо свідчать, що біосинтез оксиду азоту у мітохондріях міоцитів матки реалізується саме NOS. Показано, що синтез NO є Ca^{2+} -залежним та пригнічується концентраційно-залежно Mg^{2+} , лише за умови присутності Ca^{2+} та відсутності АТР.

3.3. Вплив антагоністів кальмодуліна на NO-синтазну реакцію в мітохондріях

Реалізація сигнальних і регуляторних функцій Ca^{2+} в клітині часто опосередковується специфічним кальцій-зв'язувальним протеїном кальмодуліном. Показано стимулювання Ca^{2+} -уніпортеру мітохондрій комплексом Ca^{2+}/CaM , неопосередковане CaM кіназою II [97]. Є дані, що в структурі переносників метаболітів, нуклеотидів та кофакторів через внутрішню мітохондріальну мембрану, зокрема транспортеру АТР-Mg/ P_i , присутні ділянки гомологічні кальмодуліну [94]. Також на інтактних міоцитах та фракції ізольованих мітохондрій міометрія невагітних щурів показано, що антагоністи кальмодуліну – кальмідазоліум (10 мкМ) та трифлюоперазин (100 мкМ) деполаризують внутрішню мітохондріальну мембрану, але спричинюють зростання рівня іонізованого Ca як в цитоплазмі, так і в матриксі мітохондрій [86].

Наші дослідження показали, що кальмідазоліум (0,1-10 мкМ) та трифлюоперазин (10-100 мкМ) концентраційно-залежно інгібують синтез оксиду азоту в мітохондріях міомерія (рис. 8).

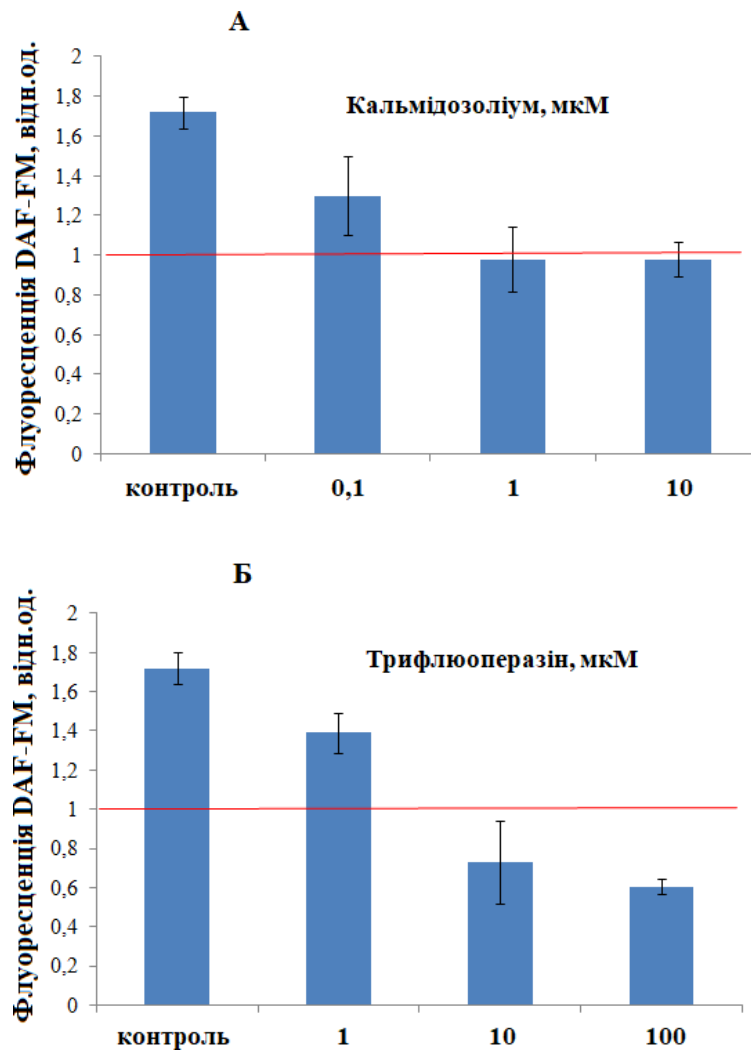


Рис. 3.8. Дія антагоністів кальмодуліна на продукцію оксиду азота в ізольованих мітохондріях міомерія. $M \pm m$, $n=5$. За "1" прийнято ендогенний (за відсутності L-аргініну та Ca^{2+} в середовищі) синтез NO в мітохондріях

В даному випадку інгібувальний вплив антагоністів кальмодуліну на синтез NO в мітохондріях ми можемо пояснити як прямою їх дією на ензим, так і опосередкованою, через блокування Ca^{2+} -уніпортера.

Конститутивні NO-синтази, в тому числі й мітохондрійна, функціонально активні лише у формі димера, який стабілізується

комплексом Ca^{2+} -кальмодулін. Поряд з цим зв'язування кальмодуліну контролює транспорт електронів від редуктазного на оксигеназний домен, а також в редуктазному домені NO-синтаз. Порушення транспорту електронів та спряження між субодинамиціями в цих ензимах призводить до зростання генерації АФК. Тому подальші дослідження було спрямовано на ефекти антагоністів кальмодуліна на утворення АФК в ізольованих мітохондріях міометрія.

Кальмідозоліум в концентрації 10 мкМ в 5 разів посилював генерацію АФК порівняно з контролем в досліджуваних субклітинних структурах (рис. 9). В той же час 100 мкМ трифлюоперазін (ТФП) навпаки знижував інтенсивність продукції АФК в мітохондріях.

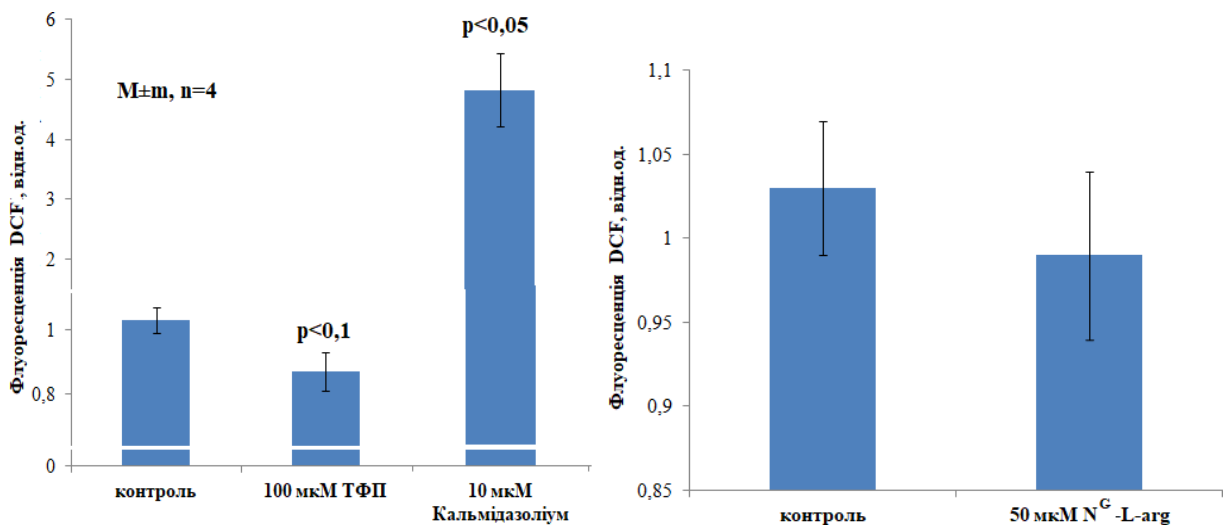


Рис. 3.9. Утворення активних форм кисню (за DCF-флуоресценцією) в присутності антагоністів кальмодуліна (ліва панель) та інгібітора NOS – N^G-нітро-L-аргініна (права панель). За “1” прийнято значення флуоресценції перед внесенням діючих речовин

Отже, антагоністи кальмодуліна, а саме кальмідозоліум, можливо, шляхом пригнічення кальмодулін-залежного транспорту електронів в мітохондрійній NO-синтазі спричинює переключення її NO-синтазної активності на оксидазну і відповідне посилення генерації зазначеним ензимом активних форм кисню. А власне інгібування активності

мітохондрійної NO-синтази (за дії інгібітора 50 мкМ N^G-нітро-L-аргініна) не приводить до посилення генерації АФК.

3.4. Вивчення впливу синтезу NO на функціональну активність електрон-транспортного ланцюга за аутофлуоресценцією NADH та FAD

Попередні дослідження продемонстрували, що біосинтез оксиду азоту в мітохондріях суттєво залежить їхнього метаболічного стану, а саме від рівня енергізації внутрішньої мітохондрійної мембрани та функціональної активності комплексів ЕТЛ. В той же час, оксид азоту, що синтезується mtNOS може регулювати активність електрон-транспортного ланцюга мітохондрій, зворотною концентраційно-залежно пригнічуючи комплекси ЕТЛ, та контролювати рН матриксу мітохондрій. Надлишкова продукція NO на фоні посилення утворення супероксид-аніона в мітохондріях супроводжується генерацією пероксинітриа, пошкодженням компонентів дихального ланцюга, деполяризацією мітохондрій і розвитком апоптозу [62, 63, 64].

З огляду на вищезазначене, наступним етапом роботи було дослідження впливу донора (нітропрурид натрія, SNP) та попередника (нітрит натрія, SN) оксиду азоту, а також Ca²⁺, L-аргінін-стимульованого синтезу NO на функціональну активність комплексів ЕТЛ.

Первинними переносниками електронів при окислювальному фосфорилуванні є коензими NADH (нікотинамідаденіндинуклеотид) та FADH₂ (флавінаденіндинуклеотид). NADH є домінантною компонентою клітинної аутофлуоресценції, а його окислена форма NAD⁺ не флуоресціює. FADH₂, у свою чергу, не володіє власною флуоресценцією, втім FAD володіє цією властивістю. Це дозволяє “візуалізувати” редокс-стан зазначених нуклеотидів з використанням оптичних методів без застосування флуоресцентних зондів. Коливання інтенсивності дихання мітохондрій

віддзеркалюються у змінах редокс-стану цих сполук, тому співвідношення окисненої та відновленої форм NADH та FADH₂ виступає показником біоенергетики мітохондрій.

За нормального функціонування ЕТЛ мітохондрій флуоресценція NADH з часом знижується за присутності субстратів дихання, що свідчить на користь зростання вмісту окисненої форми NAD⁺ за функціонування NADH-убіхінон оксидоредуктази або комплексу I. Поряд з цим, вміст FADH₂ падає, і, відповідно, збільшується флуоресценція від FAD, що відображає роботу сукцинат-дегідрогеназного комплексу або комплексу II ЕТЛ (рис. 10, контроль).

Ми дослідили зміни флуоресценції NADH та FAD за додавання 0,1 мМ SNP та SN. Нітросполуки викликали достовірне зниження флуоресценції NADH порівняно з контролем, що свідчить на перевагу окисненої форми піридинового нуклеотида. Також нітросполуки викликали інгібування окиснення FADH₂, з тенденцією до відновлення з часом. Даний результат свідчить про інгібування сукцинат-дегідрогеназного комплексу (рис. 10).

Отже, зниження рівня NADH та FAD за дії нітросполук скоріше за все пов'язане з гальмуванням II комплексу ланцюга переносу електронів в мітохондріальній мембрані, а також із зменшенням активності ензимів циклу трикарбонових кислот.

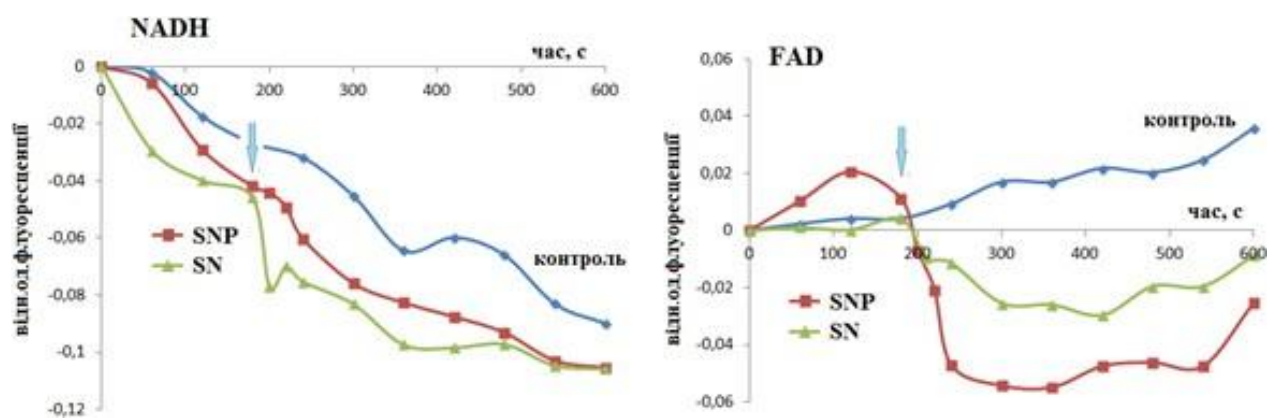


Рис. 3.10. Вплив 0,1 мМ SNP та SN на флуоресценцію NADH та FAD в ізольованих МХ міоцитів матки. Дані типового експерименту

Аналогічно до дії донорів оксиду азоту активація NO-синтазної реакції L-аргініном та Ca^{2+} в ізольованих мітохондріях стимулює окиснення NADH та знижує інтенсивність окиснення FADH_2 в електрон-транспортному ланцюзі (рис. 11).

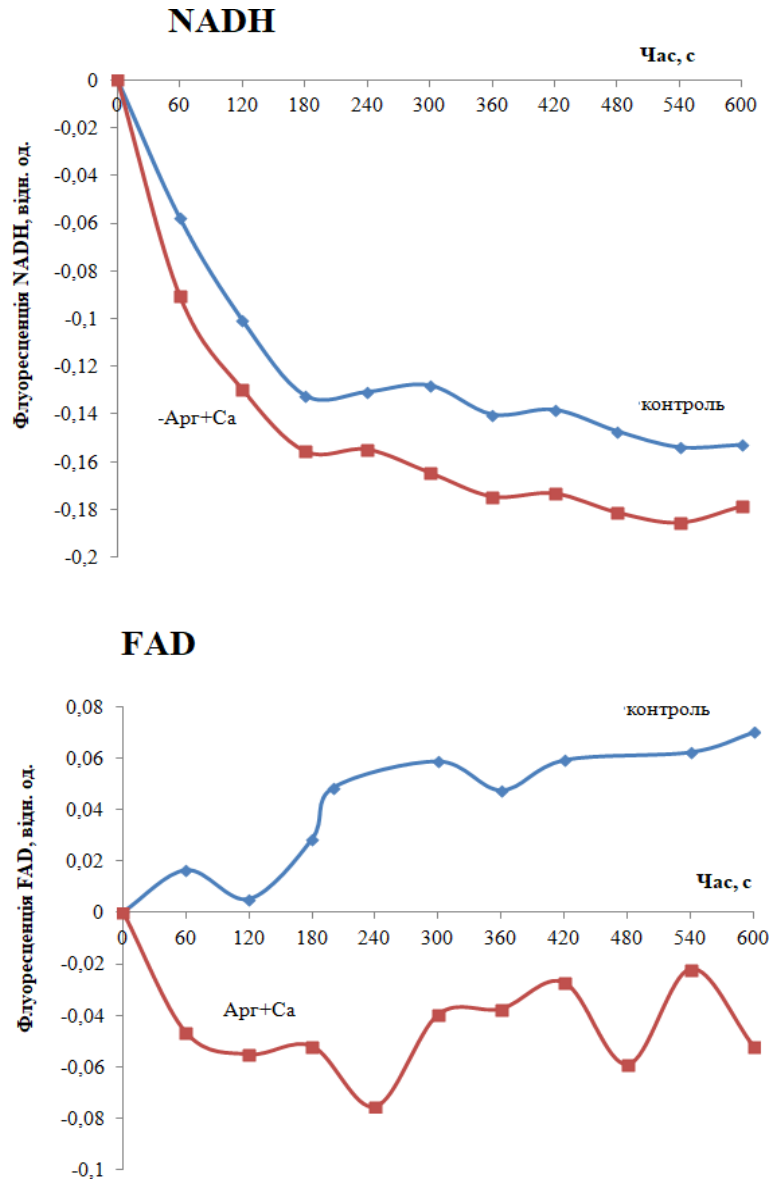


Рис. 3.11. Зміни флуоресценції NADH та FAD в електрон-транспортному ланцюзі ізольованих мітохондрій в присутності 50 мкМ L-аргініну та 100 мкМ Ca^{2+} .

Одержані результати свідчать на користь того, що оксид азоту (екзогенно внесений у формах донора/попередника, або Ca^{2+} , L-аргінін-

стимульований синтез) може спричинювати помірне зниження потенціалу на внутрішній мітохондріальній мембрані. Даний ефект може бути протидією Ca^{2+} -перенавантаженню мітохондрій.

Таким чином, оксид азоту модулює функціонування окремих комплексів електрон-транспортного ланцюга. Внесення нітропрусиду або нітриту натрія, а також у разі активації NO-синтазної реакції в мітохондріях відбувається посилення окиснення NADH та зниження інтенсивності окиснення FADH_2 .

ВИСНОВКИ

1. Продемонстровано, що джерелами NO в гладеньком'язових клітинах матки можуть NO-синтази, асоційовані з плазматичною мембраною, саркоплазматичним ретикулумом та мітохондріями. Ефективність синтезу NO в мітохондріях залежить від функціонування комплексів електрон-транспортного ланцюга.
2. Біосинтез оксиду азоту в ізольованих мітохондріях міометрія ефективно (на 40-50 %) пригнічується інгібітором конститутивних NOS N^G-нітро-L-аргініном та блокатором Ca²⁺-уніпортера рутенієвим червоним.
3. Іони Mg концентраційно-залежно (1-10 мМ) пригнічують біосинтез NO в мітохондріях лише за умови присутності в середовищі 100 мкМ Ca²⁺ та відсутності АТФ.
4. Активність мітохондрійної NO-синтази концентраційно-залежно пригнічується антагоністами кальмодуліна - 0,1-10 мкМ кальмідазоліумом та 1-100 мкМ трифлюоперазином. Кальмідазоліум спричинює посилення генерації активних форм кисню в ізольованих мітохондріях.
5. Оксид азоту модулює функціонування окремих комплексів електрон-транспортного ланцюга. Внесення нітропрусиду або нітриту натрія, а також у разі активації NO-синтазної реакції в мітохондріях відбувається посилення окиснення NADH та зниження інтенсивності окиснення FADH₂.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Bryan N. S. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development/ N.S. Bryan, K. Bian, F. Murad // Front Biosci (Landmark Ed) – 2009. – Vol.14. – P. 1-18.
2. Danylovich Iu. V. Nitric oxide as the regulator of intracellular homeostasis in the uterus myocytes / Iu.V. Danylovich // Ukr Biokhim Zh. – 2012. Vol. 84 № 3. – P. 5–25.
3. Direct evidence of nitric oxide presence within mitochondria / M. O. López-Figueroa [et al.]. // Biochem Biophys Res Commun. – 2000. – Vol. 272, № 1. – P. 33-129.
4. Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diaminofluoresceins / N. Nakatsubo // FEBS Lett. – 1998. – Vol. 427, № 2. – P. 263-266.
5. Nitric oxide and mitochondria in metabolic syndrome / L. Litvinova [et al.]. // Front Physiol. – 2015. – Vol. 6, № 20. – P. 1-8.
6. Gupta K. J. New insights into the mitochondrial nitric oxide production pathways / K. J. Gupta, A. U. Igamberdiev, W. M. Kaiser // Plant Signaling & Behavior. – 2010. – Vol. 5, №8. – P. 999-1001.
7. Levine A. B. Characterization of the Role of Nitric Oxide and Its Clinical Applications / A. B. Levine, D. Punahaole, T. B. Levine // Cardiology - 2012. – Vol. 122. – P. 55–68.
8. Осипов А. Н. Биологическая роль нитрозильных комплексов гемопротеинов / А. Н. Осипов, Г. Г. Борисенко, Ю. А. Владимиров // Успехи биологической химии – 2007. - Т. 47. - С. 259–292.
9. Малахов В. А. Проблема оксида азота в неврологии / В. А. Малахов [та ін.]. // Изд-во СумГПУ им. А.С. Макаренка - 2009. - С. 242.
10. Alderton W. K. Nitric oxide synthase: structure, function and inhibition / W. K. Alderton, C. E. Cooper, R. G. Knowles // Biochem J. - 2001. - Vol. 357. – P. 593-615.

11. Förstermann U. Nitric oxide synthases: regulation and function / U. Förstermann, W. C. Sessa // *Eur Heart J.* – 2012. – Vol. 33 № 7. – P. 829–837.
12. Duran W.N. The NO cascade, eNOS location, and microvascular permeability / W.N. Duran, J.W. Breslin, F.A. Sanchez // *Cardiovasc Res.* – 2010. – Vol. 87. – P. 254–261.
13. Forstermann U. Nitric Oxide Synthase Isozymes. Characterization, Purification, Molecular Cloning, and Functions / U. Forstermann [et al.]. // *Hypertension* – 1994. – Vol. 23, №6 (Part 2). – P.1121-1131.
14. Haynes V. Mitochondrial Nitric-oxide Synthase: Role in Pathophysiology / V. Haynes [et al.]. // *Life* – 2003. – Vol. 55, № 10–11. – P. 599-603.
15. Andrew P. J. Enzymatic function of nitric oxide synthases / P. J. Andrew, B. Mayer // *Cardiovascular Research.* – 1999. – Vol. 43. P. 521–531.
16. Wendy K. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition / K. Wendy [et al.]. // *Biochem. J.* – 2001. – P. 357, 593–615.
17. Rodriguez-Crespo I. Endothelial nitric-oxide synthase. Expression in *Escherichia coli*, spectroscopic characterization, and role of tetrahydrobiopterin in dimer formation / I. Rodriguez-Crespo, N.C. Gerber, P.R. Ortiz de Montellano // *J Biol Chem.* - 1996. – Vol. 27, № 19. – P. 11462–11467.
18. Chreifi G. Communication between the zinc and tetrahydrobiopterin binding sites in nitric oxide synthase / G.Chreifi [et al.]. // *Biochemistry* – 2014. – Vol. 53, №25. – P. 4216-4223.
19. Brown G.C. Nitric oxide and mitochondrial respiration in the heart / G.C. Brown, V. Borutaite // *Cardiovasc Res.* – 2007. – Vol. 75, №2. - P. 283-90.
20. Данилович Г.В. Біосинтез оксиду азоту в клітинах з L-аргініну. Особливості утворення та функціональна роль NO в мітохондріях / Г.В. Данилович, Т.В. Богач, Ю.В. Данилович // *Ukr.Biochem.J.* – 2018. – Vol. 90, № 1. – P. 3-24.

21. Kone B.C. Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide / B.C. Kone [et al.]. // *Am. J. Physiol. Renal Physio.* – 2003. – Vol. 285. – P.178-190.
22. Ghimire K. Nitric oxide: what's new to NO / K. Ghimire [et al.]. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2017. – Vol. 312. – P.254-262.
23. Sono M. Heme-containing oxygenases / M. Sono [et al.]. // *Chem. Rev.* – 1996. – P. 2841–2887.
24. Werner E.R. Tetrahydrobiopterin and nitric oxide: mechanistic and pharmacological aspects / E.R. Werner [et al.]. // *Exp. Biol. Med.* – 2003. – Vol. 228. – P. 1291 –1302.
25. Gachhui R. Neuronal nitric-oxide synthase interaction with calmodulin-troponin C chimeras / R. Gachhui [et al.]. // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273. – P. 5451-5454.
26. Abu-Soud H. M. Calmodulin controls neuronal nitric-oxide synthase by a dual mechanism. Activation of intra- and interdomain electron transfer / H. M. Abu-Soud, L. L. Yoho, D. J. Stuehr // *J. Biol. Chem.* – 1994. – Vol. 269. – P. 32047-32050.
27. Changjian F. Mechanism of Nitric Oxide Synthase Regulation: ElectronTransfer and Interdomain Interactions / F. Changjian // *Coord. Chem. Rev. Author manuscript.* – 2012. – Vol. 256, № 3-4. – P.393-411.
28. Assreuy J. Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide / J. Assreuy [et al.]. // *J. Pharmacol.* – 1993. – Vol. 108. – P.833-837.
29. Yasuko I. Phosphorylation of eNOS initiates excessive NO production in early phases of portal hypertension / I. Yasuko [et al.]. // *AJP-Heart Circ. Physiol.* – 2002. – Vol. 282. – P. 2084-2090.
30. Koji O. Neuronal Nitric Oxide Synthase at Ser847 by CaM-KII in the Hippocampus of Rat Brain After Transient Forebrain Ischemia / O. Koji [et al.]. // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.* – 2002. – Vol. 22. – P. 1098-1106.

31. Song T. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase I inhibits neuronal nitric-oxide synthase activity through serine 741 phosphorylation / T. Song [et al.]. // FEBS Lett. – 2004. – Vol. 570, №1-3. – P. 133-137.
32. Tyryshkin A. Src Kinase-mediated Phosphorylation Stabilizes Inducible Nitric-oxide Synthase in Normal Cells and Cancer Cells / Tyryshkin A. [et al.]. // J. Biol. Chem. – 2010. – Vol. 285, №1. – P. 784-792.
33. Bayraktutan U. Free radicals, diabetes and endothelial dysfunction / U. Bayraktutan // Diabetes Obes. Metab. – 2002. – Vol. 4. – P. 224–238.
34. Elms S. Insights into the arginine paradox: evidence against the importance of subcellular location of arginase and eNOS / S. Elms et al.]. // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2013. – Vol. 305, №5. – P. 651-666.
35. Durante W. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function / W. Durante, F.K. Johnson, R.A. Johnson // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. – 2007. – Vol. 34, № 9. – P. 906-911.
36. Litvinova L. Nitric oxide and mitochondria in metabolic syndrome / Atochin DN, Fattakhov N, Vasilenko M, Zatolokin P, Kirienkova E. // Front Physiol. – 2015. – Vol. 6. – P. 20.
37. Leite A.C. Mitochondria generated nitric oxide protects against permeability transition via formation of membrane protein S-nitrosothiols Oliveira H.C, Utino F.L, Garcia R., Alberici L.C., Fernandes M.P., Castilho R.F. // Biochim Biophys Acta. – 2010. – Vol. 1797(6-7). – P. 1210-1216.
38. Jan V. Arginine-Based Inhibitors of Nitric Oxide Synthases Therapeutic Potential and Challenges / V. Jan [et al.]. // Mediators of Inflammation. - 2012. – Vol. 2012. – 22 p.
39. Nitric Oxide, Third Edition: Biology and Pathobiology / Edited by L.J. Ignarro, B. Freeman. – Academic Press, Elsevier Inc., 2017. – 412 p.
40. Ghafourifar P. Nitric oxide synthase activity in mitochondria / P. Ghafourifar, Ch. Richter // FEBS Letters. – 1997. – Vol. 418. – P. 291-296.

41. Leite A.C. Mitochondria generated nitric oxide protects against permeability transition via formation of membrane protein S-nitrosothiols / A.C. Leite [et al.]. // *Biochim Biophys Acta*. – 2010. – Vol. 1797, № 6-7. – P.1210-1216.
42. Manzo-Ávalos S. Regulation of the rate of synthesis of nitric oxide by Mg^{2+} and hypoxia. Studies in rat heart mitochondria / S. Manzo-Ávalos [et al.]. // *Amino Acids*. – 2002. – Vol. 22. – P. 381-383.
43. Ghafourifar P. Mitochondrial nitric oxide synthase / P. Ghafourifar, E. Cadenas // *TRENDS of Pharmacol Scie*. – 2005. – Vol. 26, №4. – P. 190-195.
44. Parihar M. S. Association of mitochondrial nitric oxide synthase activity with respiratory chain complex I / M. S. Parihar [et al.]. // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. – 2008. – Vol.1, № 366. – P. 23–28.
45. Carreras M.C. Mitochondrial nitric oxide in the signaling of cell integrated responses / M.C. Carreras, J.J. Poderoso // *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. – 2007. – Vol. 292. – P.1569-1580.
46. Poderoso J.J. The reaction of nitric oxide with ubiquinol: kinetic properties and biological significance / J.J. Poderoso [et al.]. // *Free Radic. Biol. Med*. – 1999. – Vol. 26. – P. 925-935.
47. Valdez L.B. Functional activity of mitochondrial nitric oxide synthase / L.B. Valdez, T. Zaobornyj, A. Boveris // *Methods Enzymol*. – 2005. – Vol. 396. – P. 444-455.
48. Dedkova E.N. Modulation of mitochondrial Ca^{2+} by nitric oxide in cultured bovine vascular endothelial cells / E.N. Dedkova, L.A. Blatter // *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. – 2005. – Vol. 289. – P. 836–C845.
49. Bringold U. Peroxynitrite formed by mitochondrial NO synthase promotes mitochondrial Ca^{2+} release / U. Bringold, P. Ghafourifar, C. Richter // *Free Radic. Biol. Med*. – 2000. – Vol. 29. – P. 343-348.
50. Ghafourifar P. Mitochondrial Nitric-oxide Synthase Stimulation Causes Cytochrome c Release from Isolated Mitochondria / P. Ghafourifar [et al.]. // *J. Biol. Chem*. – 1999. – Vol. 274, №44. – P. 31185-31188.

51. Danylovyh G. Biosynthesis and possible physiological role of nitric oxide in smooth muscle mitochondria / G. Danylovyh, T. Bohach, O. Kolomiets, Yu. Danylovyh // Current problems of biochemistry and cell biology: the 4th international scientific conference materials, 5-6 october 2017. – Dnipro, 2017. – P. 87-88.
52. Chance B. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state / B. Chance, G.R. Williams // J. Biol. Chem. – 1955. – Vol. 217. – P. 409–427.
53. Valdez L.B. Functional activity of mitochondrial nitric oxide synthase / L.B. Valdez, T. Zaobornyj, A. Boveris // Methods Enzymol. – 2005. – Vol. 396. – P. 444–455.
54. Habib S. Biochemistry of nitric oxide / S. Habib, A. Ali // J. Clin. Biochem. – 2011. – Vol. 26. – P. 3–17.
55. Treuer A.V. Nitric oxide synthases, S-nitrosylation and cardiovascular health: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities / A.V. Treuer, D.R. Gonzalez // Mol. Med. Reports. – 2015. – Vol. 11. – P. 1555-1565.
56. Levine A.B. Characterization of the Role of Nitric Oxide and Its Clinical Applications / A.B. Levine, D. Punahaole, T.B. Levine // Cardiology. – 2012. – Vol. 122. – P. 55-68.
57. Duran W.N. The NO cascade, eNOS location, and microvascular permeability / W.N. Duran, J.W. Breslin, F.A. Sanchez // Cardiovasc. Res. – 2010. – Vol. 87. – P. 254-261.
58. Kleschyov A.L. The NO-heme signaling hypothesis / A.L. Kleschyov // Free Radic. Biol. Med. – 2017. – Vol. 112. – P. 544-552.
59. Buxton I.L. Regulation of Uterine Function: a Biochemical Conundrum in the Regulation of Smooth Muscle Relaxation / I.L. Buxton // Mol Pharmacol. – 2004. – Vol. 65, №5. – P. 1051-1059.
60. Leite A.C. Mitochondria generated nitric oxide protects against permeability transition via formation of membrane protein S-nitrosothiols / A.C. Leite [et al.]. // Biochim. Biophys. Acta.- 2010. – Vol. 797. – P. 1210-1216.

61. Davidson S.M. Effects of NO on mitochondrial function in cardiomyocytes: Pathophysiological relevance / S.M. Davidson, M.R. Duchon // *Cardiovasc Res.* – 2006. – Vol. 71. – P. 10-21.
62. Boveris A. Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide / M. Reivich, R. Coburn, S. Lahiri, B. Chance (Eds.) // *Tissue hypoxia and ischemia.* – 1977. – P. 67- 82
63. Giulivi C. Nitric oxide regulation of mitochondrial oxygen consumption I: cellular physiology / Kato K., Cooper C.E. // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2006. – Vol. 291(6). – P. 1225-1231.
64. Shiva S. Nitrite: A Physiological Store of Nitric Oxide and Modulator of Mitochondrial Function / Shiva S. // *Redox Biol.* – 2013. – Vol. 1(1). – P. 40-44.
65. Buxton IL. Regulation of uterine function: a biochemical conundrum in the regulation of smooth muscle relaxation // *Mol Pharmacol.* – 2004. – Vol.65(5). – P. 1051-1059.
66. Litvinova L. Nitric oxide and mitochondria in metabolic syndrome / Atochin DN, Fattakhov N, Vasilenko M, Zatolokin P, Kirienkova E. // *Front Physiol.* – 2015. – Vol. 6. – P.20.
67. Piantadosi C.A. Redox regulation of mitochondrial biogenesis / Piantadosi C.A., Suliman H.B. // *Free Radic Biol Med.* – 2012. – Vol. 53(11). – P. 2043-2053.
68. Brown G.C. Nitric oxide and mitochondrial respiration in the heart / Brown GC, Borutaite V. // *Cardiovasc Res.* – 2007. – Vol. 75(2). – P.283-290.
69. Nisoli E. Nitric oxide and mitochondrial biogenesis / Nisoli E, Carruba M.O. // *J Cell Sci.* – 2006. – Vol. 119(Pt 14). – P.2855-2862.
70. Lee J.E. Nitric oxide scavenging causes remodeling of the endoplasmic reticulum, Golgi apparatus and mitochondria in pulmonary arterial endothelial cells / Lee J.E., Yuan H., Liang F.X., Sehgal P.B. // *Nitric Oxide.* – 2013. – Vol. 33. – P.64-73.

71. Carreras M.C. Mitochondrial nitric oxide in the signaling of cell integrated responses / Carreras M.C., Poderoso J.J. // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2007. – Vol. 292(5). – P.1569-1580.
72. Ghafourifar P. Nitric oxide synthase activity in mitochondria / Ghafourifar P., Richter C. // *FEBS Lett.* – 1997. – Vol. 418(3). – P.291-296.
73. Valdez L.B. Mitochondrial metabolic states and membrane potential modulate mtNOS activity / Valdez L.B., Zaobornyj T., Boveris A. // *Biochim Biophys Acta.* – 2006. – Vol.1757(3). – P.166-172.
74. Giulivi C. Functional implications of nitric oxide produced by mitochondria in mitochondrial metabolism / Giulivi C. // *Biochem J.* – 1998. – Vol. 332(Pt 3). – P.673-679.
75. Valdez L.B. Functional activity of mitochondrial nitric oxide synthase / Valdez LB, Zaobornyj T, Boveris A. // *Methods Enzymol.* – 2005. – Vol. 396. – P. 444-455.
76. Danylovych G. Biosynthesis and possible physiological role of nitric oxide in smooth muscle mitochondria / Danylovych G, Bohach T, Kolomiets O, Danylovych Yu. // *Current problems of biochemistry and cell biology: the 4th international scientific conference materials.* – 5-6 October 2017, Dnipro, Ukraine/ ad. Ushakova GA. Dnipro: Lira, 2017.
77. Mollard P. Electrophysiological characterization of single pregnant rat myometrial cells in short-term primary culture / P. Mollard [et al.]. // *Am. J. Physiol.* – 1986. – Vol. 250. – P. 47-54.
78. Данилович Ю.В. Трансмембранний обмін Ca^{2+} в мітохондріях міометрія за дії оксиду азоту та каліксаренів / Г.В. Данилович, О.В. Коломієць [та ін.]. // *Укр. біохім. журн.* – 2014. – 86, №1. – С. 42-55.
79. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 7, № 72. – P. 54-248.
80. Кандаурова Н. В., Чуніхін О. Ю., Бабіч Л. Г. та ін. // *Укр. біохім. журн.* – 2010. – 82, № 6. –С. 52–57.

81. Kojima H. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: Diaminofluoresceins / H. Kojima [et al.]. // *Anal. Chem.* – 1998. – Vol. 70, № 13. – P. 2446-2453.
82. Бабич Л.Г. Энергозависимый транспорт Ca^{2+} во внутриклеточных структурах гладкой мышцы / Л.Г. Бабич, С.Г. Шлыков, Л.А. Борисова // *Биохимия.* – 1994. – 69, вып. 8. – С. 1218-1229.
83. Lopez-Figueroa M.O. Mitochondrial nitric oxide synthase: current concepts and controversies / M.O. Lopez-Figueroa [et al.]. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2000. – Vol. 272. – P. 129-133.
84. Vitecek J. Arginine-Based Inhibitors of Nitric Oxide Synthase: Therapeutic Potential and Challenges / J. Vitecek, A. Lojek, G. Valacci // *Mediators Inflamm.* – 2012. – P. 22.
85. Stevens F.C. Calmodulin: an introduction. / F.C. Stevens // *Can. J. Biochem. Cell Biol.* – 1983. – 61 (8): 906–10.
86. Juan Zoua, Mani Salariana, YanyiChen Gap Junction Regulation by Calmodulin. / Juan Zoua // *FEBS Letters.* – Volume 588, Issue 8, 17 April 2014. – P. 1430-1438.
87. Camillo Peracchia Chemical gating of gap junction channels Roles of calcium, pH and calmodulin. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes.* - Volume 1662, Issues 1–2, 23 March 2004, P. 61-80
88. Sobieszek A. Calmodulin antagonist action in smooth-muscle myosin phosphorylation. Different mechanisms for trifluoperazine and calmidazolium inhibition. // *Biochem J.* 1989 Aug 15; 262(1): 215–223.
89. James L.R., Griffiths C.H., Garthwaite J., Bellamy T.C. Inhibition of nitric oxide-activated guanylyl cyclase by calmodulin antagonists. // *Br J Pharmacol.* 2009 Nov;158(6):1454-64.
90. Babich LG, Shlykov SG, Kushnarova AM, Kosterin SO. $\text{Ca}^{(2+)}$ -dependent regulation of the $\text{Ca}^{(2+)}$ concentration in the myometrium mitochondria. I. Trifluoperazine effects on mitochondria membranes polarization and $[\text{Ca}^{(2+)}]_m$. // *Ukr Biochem J.* 2016 Jul-Aug;88(4):5-11.

91. Roufogalis B.D., Minocherhomjee A.M., Al-Jobore A. Pharmacological antagonism of calmodulin. / B.D. Piantadosi, [et al.]. // *Can J Biochem Cell Biol.* – 1983. – Aug;61(8) - P.927-33.
92. Ashfaq Ahmad Role of Nitric Oxide in the Cardiovascular and Renal Systems / Ashfaq Ahmad, Sara K. Dempsey, Zdravka Daneva, Maleeha Azam [et al.]. // *Int J Mol Sci.* – 2018. – Vol. 19(9). – P. 2605.
93. Regulation of uterine function: a biochemical conundrum in the regulation of smooth muscle relaxation / IL. Buxton // *Mol Pharmacol.* – 2004. – Vol. 65(5). – P. 1051-9.
94. Wetzka B. Effects of nitric oxide donors on the contractility and prostaglandin synthesis of myometrial strips from pregnant and non-pregnant women / Wetzka B., Schäfer W.R., Stehmans A., Zahradnik H.P. // *Gynecol Endocrinol.* – 2001. – Vol. 15(1). – P. 34-42.
95. Yamamura H. Local Ca^{2+} coupling between mitochondria and sarcoplasmic reticulum following depolarization in guinea pig urinary bladder smooth muscle cells. / Yamamura H., Kawasaki K., Inagaki S. [et al.]. / *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2018. – Vol. 314(1). – P. 88-98.
96. Zaobornyj T. Strategic localization of heart mitochondrial NOS: a review of the evidence / Zaobornyj T., Ghafourifar P. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2012. – Vol. 303(11) – P. 1283-93.
97. Dedkova E.N. Measuring mitochondrial function in intact cardiac myocytes / Dedkova E.N., Blatter L.A. // *J Mol Cell Cardiol.* – 2012. – Vol. 52(1). – P. 48-61.
98. Kojima H. Direct evidence of NO production in rat hippocampus and cortex using a new fluorescent indicator: DAF-2 DA / Kojima H., Nakatsubo N., Kikuchi K., [et al.]. // *Neuroreport.* – Vol. 9(15). – P. 3345-8.
99. Fiskum G. Intracellular levels and distribution of Ca^{2+} in digitonin-permeabilized cells / Fiskum G. // *Cell Calcium.* – 1985. – Vol. 6(1-2). - C. 25-37.

100. Durán W.N. The NO cascade, eNOS location, and microvascular permeability / Durán W.N., Breslin J.W., Sánchez F.A. // Cardiovasc Res. – 2010. – Vol. 87(2). – P. 254-61.