

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри супрамолекулярної хімії
д.х.н., професор Ігор Володимирович Комаров
Протокол №____ засідання кафедри
Від «__» _____ 2021 року

**ОСОБЛИВОСТІ Ca^{2+} -ЗАЛЕЖНОГО СИНТЕЗУ ОКСИДУ АЗОТУ В
МІТОХОНДРІЯХ ГЛАДЕНЬКОГО М'ЯЗУ МАТКИ**

Кваліфікаційна робота магістра
студентки 6 курсу
Інституту високих технологій
спеціальності 102 «Хімія»
Освітня програма «Хемоінформатика»
Гурської Віри Тарасівни

Науковий керівник:
к.б.н., старший науковий співробітник
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
Данилович Ганна Вікторівна

Оцінка захисту роботи

Київ – 2021р.

АНОТАЦІЯ

Гурська В.Т. Особливості Ca^{2+} -залежного синтезу оксиду азоту в мітохондріях гладенького м'язу матки.

Кваліфікаційна робота магістра за спеціальністю хемоінформатика. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Інститут високих технологій, кафедра супрамолекулярної хімії. – Київ, 2021.

Науковий керівник: доктор біологічних наук Данилович Г. В., старший науковий співробітник відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України.

У роботі досліджено залежність синтезу NO від K^{+} -проникності та активності систем Ca^{2+} -обміну у мітохондріях гладеньком'язових клітин матки щурів. Встановлено, що активність mtNOS суттєво залежить від концентрації екзогенного K^{+} та пригнічується в присутності інгібіторів K^{+} -каналів, а також блокаторів Ca^{2+} -уніпортера та H^{+} - Ca^{2+} -обмінника. На основі структурних даних протеїну LETM1 побудовано модель H^{+} - Ca^{2+} -обмінника та проведено симуляцію молекулярної динаміки білка в мембрані.

Ключові слова: мітохондрії, оксид азоту, NOS, калієві канали, H^{+} - Ca^{2+} -обмінник, гладенький м'яз.

SUMMARY

Hurska V.T. Features of Ca^{2+} -dependent nitric oxide synthesis in the uterine smooth muscle mitochondria.

Qualifying work of the master on a speciality chemoinformatics. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Institute of High Technologies, Department of Supramolecular Chemistry. – Kyiv, 2021.

Research supervisor: Doctor of Biological Sciences H.V. Danylovyh, Senior Research Scientist of the Department of Muscle Biochemistry at at Palladin Institute of Biochemistry of NAS of Ukraine.

The dependence of NO synthesis on K^{+} -permeability and activity of Ca^{2+} -exchange systems in uterine smooth muscle mitochondria was investigated. It was found that the activity of mtNOS significantly depends on the concentration of exogenous potassium and is inhibited in the presence of inhibitors of K^{+} -channels, as well as blockers of Ca^{2+} -uniporter and H^{+} - Ca^{2+} -exchanger. Based on the structural data of the LETM1 protein, a model of the H^{+} - Ca^{2+} -exchanger was constructed and the molecular dynamics of the protein in the membrane was simulated.

Key words: mitochondria, nitric oxide, NOS, potassium channels, H^{+} - Ca^{2+} -exchanger, smooth muscle.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	5
ВСТУП	6
РОЗДІЛ I. Огляд літератури	8
1.1. Властивості мітохондрій та їх роль у підтриманні гомеостазу клітини	8
1.2. Функціонування NO у процесі клітинного сигналіngu. NO-синтаза та її ізоформи.....	14
1.3. Будова K ⁺ -каналів та їх роль у збудливості гладенько-м'язових клітин.....	17
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. Флуоресцентний зонд DAF-FM.....	31
2.4. Метод лазерної конфокальної мікроскопії.....	32
2.5. Метод протокової цитофлуориметрії.....	33
2.6. Статистичний аналіз.....	34
2.7. Моделювання та молекулярна динаміка.....	34
РОЗДІЛ III. Результати досліджень та їхнє обговорення	36
3.1. Доведення солокалізації синтезу оксиду азоту з мітохондріями в міоцитах матки.....	36
3.2. Визначення оксиду азоту в ізольованих мітохондріях із використанням флуоресцентного зонда DAF-FM та методу протокової цитометрії.....	37
3.3. Роль K ⁺ -проникності у функціонуванні NOS в ізольованих МХ міометрія.....	39
3.4. Вплив модуляторів Ca ²⁺ -обміну в МХ міометрія на активність mtNOS	41
3.5. Моделювання H ⁺ -Ca ²⁺ -обмінника.....	44
ВИСНОВКИ	49
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	50

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ГМК – гладеньком'язові клітини

ПМ – плазматична мембрана

МХ – мітохондрії

ВММ – внутрішня мембрана мітохондрій

ЗММ – зовнішня мембрана мітохондрій

ЕТЛ – електронно-транспортний ланцюг

PKG – cGMP-dependent protein kinase, cGMP-залежна протеїнкіназа

VDAC – voltage dependent anion channel, потенціал-залежний аніонний канал

MCU – mitochondrial calcium uniporter, мітохондріальний кальцієвий уніпортер

mRyR – mitochondrial ryanodine receptor, мітохондріальний ріанодиновий рецептор

mPTP – mitochondrial permeability transition pore, мітохондріальна пора перехідної провідності

K_{АТР} – ATP-sensitive potassium channels, АТР-чутливі K⁺-канали

BK_{Ca} – large conductance calcium-activated big potassium channels, Ca²⁺-активовані K⁺-канали високої провідності

K_V – voltage-gated potassium channel, потенціал залежні K⁺-канали

2P – two-pore domain, двопородоменні K⁺-канали

АФК – активні форми кисню

NO – оксид азоту(II)

cGMP – cyclic guanosine monophosphate, циклічний 3',5'-гуанозинмонофосфат

sGC – soluble guanylylcyclase, розчинна гуанілатциклаза

EGTA – ethylene glycol-bis(beta-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid, етиленглікольтетраоцтова кислота

BH₄ – (6R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin, (6R)-5,6,7,8-тетрагідробіоптерин

TEA – tetraethylammonium, тетраетиламоній

4-AP – 4-aminopyridine, 4-амінопіридин

ВСТУП

Наразі доведено регуляторна роль оксиду азоту (NO) в молекулярних, біохімічних та фізіологічних процесах мітохондрій (MX), а саме поглиннанні кисню, окисного фосфорилування, катаболізму ліпідів, біосинтезі гему, підтримці Ca^{2+} -гомеостазу, утворенню активних форм кисню, апоптозу тощо. Внутрішня мембрана мітохондрій (ВММ) має високий вміст транспортних систем, ензимів, що здатні безпосередньо підлягати регуляторному впливу NO шляхом S-нітрозилування або за участі сигнального шляху NO/cGMP/PKG. За наномолярних концентрацій NO регулює гомеостаз Ca^{2+} в MX, контролює рН матриксу, обмежує процеси дихання та окисного фосфорилування. За надлишкових його концентрацій генеруються високореактивні радикали (активні форми азоту та кисню), які призводять до розвитку мітохондрійної дисфункції та запуску апоптозу/некрозу.

Дедалі більше досліджень підтверджують мітохондріальну локалізацію NOS (mtNOS) в різних тканинах, яка постійно експресується в органелах, є мембранозв'язаним протеїном, а за структурою та біохімічними властивостями являє собою нейрональну ізоформу конститутивних NO-синтаз.

Іони K^+ відіграють провідну роль у молекулярній фізіології мітохондрій. Зокрема, транспорт K^+ у ВММ регулює утворення активних форм кисню (АФК) та забезпечує осморегуляцію. Активація K^+ -каналів у ВММ спричинює вхід K^+ у матрикс за електрохімічним градієнтом, регулюючи мембранний потенціал на ВММ та системи обміну Ca^{2+} .

Існує кореляція між змінами об'єму органел та такими явищами, як генерація АФК, поляризація внутрішньої мембрани, здатність до апоптозу тощо. Тому припускається тісний зв'язок між функціонуванням систем обміну K^+ , Ca^{2+} та інтенсивністю синтезу NO. Таким чином, встановлення взаємозв'язку між активністю систем, що забезпечують транспорт K^+ у ВММ та підтримують Ca^{2+} -гомеостаз у MX, та біосинтезом оксиду азоту є актуальним питанням. В подальшому це дасть можливість впливати на молекулярно-фізіологічні механізми захисту від мітохондріальних дисфункцій та прогнозувати їх наслідки.

Отже, *метою* роботи було дослідження залежності синтезу NO від K^+ -проникності та активності систем Ca^{2+} -обміну у мітохондріях гладеньком'язових клітин матки щурів.

Відповідно до мети було поставлено наступні *задачі*:

1. Встановити можливість утворення оксиду азоту у мітохондріях міоцитів та підібрати оптимальні умови його синтезу в ізольованих органелах.
2. Дослідити залежність ензиматичної активності mtNOS від K^+ -проникності в ізольованих мітохондріях.
3. З'ясувати вплив модуляторів Ca^{2+} -транспортувальних систем мітохондрій на активність mtNOS.
4. Створити модель структури H^+ - Ca^{2+} -обмінника та провести молекулярну динаміку.

РОЗДІЛ I

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1. Властивості мітохондрій та їх роль у підтриманні гомеостазу клітини

1.1 Функції мітохондрій в клітині

В клітинах МХ виконують широкий спектр функцій: біоенергетика (окисне фосфорилування, синтез АТФ), місце перебігу універсальних метаболічних процесів (енергетичний метаболізм, частина реакцій циклу сечовини, джерело активних форм кисню, регуляція апоптозу/некрозу, цілий ряд спеціалізованих (синтез стероїдних гормонів), підтримання внутрішньоклітинного Ca^{2+} -гомеостазу (є високоємнісним Ca^{2+} -депо, здатні термінувати Ca^{2+} -сигнал та підтримувати низьку фізіологічно-значущу концентрацію цього катіона в цитозолі, захищаючи клітини від Ca^{2+} -перевантаження). Також органели беруть безпосередню участь у регуляції диференціації, росту клітин та клітинного циклу. Участь МХ у цих клітинних процесах значною мірою залежить від продукції АТФ та АФК, що утворюються під час окисного фосфорилування [1].

МХ є невід'ємною частиною нормального клітинного функціонування, оскільки вони відповідають за продукування енергії в еукаріотів, включаючи синтез фосфоліпідів, гему, гомеостаз кальцію, активацію апоптозу та загибель клітини [2, 3].

МХ зберегли власний геном, що відображає бактеріальне еволюційне походження, і в той час як більшість білків МХ кодуються ядерними генами, кілька дихальних білків і мітохондріальних тРНК кодуються геномом МХ [4].

В наслідок функціонування електронно-транспортного ланцюга (ЕТЛ) на ВММ створюється трансмембранний потенціал та протонний градієнт, який забезпечує окисне фосфорилування та синтез АТФ, обмін іонів, зокрема Ca^{2+} , транспорт амінокислот тощо [5].

Йони Ca^{2+} регулюють ензими циклу трикарбонових кислот, активуючи піруватдегідрогеназу (перший компонент піруватдегідрогеназного комплексу, що утворює ацетил-КоА), ізоцитратдегідрогеназу та α -

кетоглутаратдегідрогеназу, які каталізують третю та четверту стадії циклу відповідно. Активація цих ферментів результує збільшенням утворення відновних еквівалентів, що використовуються в ЕТЛ [6].

Біоенергетична дисфункція МХ часто фатальна для клітинного функціонування, зокрема в м'язових та нервових клітинах. В мозку, серці та м'язах тривале нефізіологічне збільшене накопичення Ca^{2+} , особливо в поєднанні з оксидативним стресом, може призвести до патологічних змін – відкриття мітохондріальної пори перехідної провідності (mPTP) та індукції некрозу. З іншого боку, ключові білки, що вивільняються з матриксу та внутрішньої мембрани, ініціюють апоптоз. Отже, МХ є ключовим гравцем у забезпеченні життя або загибелі клітини, а порушення їх функціонування все частіше асоціюється із захворюваннями [7].

1.2. Мембранний потенціал та структури, що підтримують йонний гомеостаз

МХ, ключові біоенергетичні органели, складаються із зовнішньої мітохондрійної мембрани (ЗММ), ВММ, міжмембранного простору, матриксу. Білкові комплекси, що здійснюють окисне фосфорилування, знаходяться на ВММ, тоді як в матриксі відбуваються метаболічні процеси: цикл лимонної кислоти та бета-окислення жирних кислот. Пасивний рух іонів через мембрани зумовлюється електрохімічним градієнтом ($\Delta\mu$), який складається з двох складових: 1) електричної, тобто різниці напруг між двома сторонами мембрани ($\Delta\Psi$); та 2) хімічної, тобто різниці між концентраціями іонів (протонів) з двох сторін (ΔpH) [8, 9]. Разом з протонним градієнтом (ΔpH) $\Delta\Psi$ формує трансмембранний потенціал іонів водню, який використовується для синтезу АТР. В енергізованих МХ мембранна різниця потенціалів ($\Delta\Psi$), що утворюється внаслідок дихання (поток протонів з матриксу) є основною складовою $\Delta\mu$ через ВММ для будь-якого іона. В нормальних умовах вважається, що значення $\Delta\mu$ знаходиться в діапазоні 160–200 мВ (від'ємне з боку матриксу) [10].

1.2.1. Потенціал-залежний аніонний канал (VDAC)

Потенціал-залежні аніонні канали, або мітохондріальні порини, є класом поринових іонних каналів, розташованих на ЗММ [11,12]. VDAC може утворювати олігомери [13].

Цей основний білок ЗММ еукаріотів, VDAC, утворює канал для дифузії малих гідрофільних молекул: АТР, АDP, P_i, Ca²⁺, K⁺, Na⁺. Канал має провідність близько 4 nS за відкритого стану (аніон-селективний), а при мембранному потенціалі вище +30 мВ або нижче -30 мВ приймає напівзакриту конформацію з провідністю 2 nS (катіон-селективний) [14].

VDAC відіграє ключову роль у регуляції метаболічного та енергетичного потоку через ЗММ. Він бере участь у транспорті АТР, АDP, пірувату, малату та інших метаболітів і, таким чином, широко взаємодіє з ферментами метаболічних шляхів [12]. Встановлено, що АТР-залежні цитозольні ферменти гексокіназа, глюкокіназа та гліцеринкіназа, а також мітохондріальна креатинкіназа зв'язуються з VDAC. Це передбачає їх взаємодію з АТР, що виділяється з МХ. Зокрема, передбачається, що зв'язування гексокінази відіграє ключову роль у зв'язуванні гліколізу з окисним фосфорилуванням [15]. Крім того, VDAC є важливим регулятором транспорту Ca²⁺ до МХ та з них. Оскільки Ca²⁺ є кофактором для метаболічних ферментів, таких як піруватдегідрогеназа та ізоцитратдегідрогеназа, то проникність каналу VDAC до Ca²⁺ впливає на енергетичну продукцію та гомеостаз [16]. Різні внутрішньо- та зовнішньоклітинні фактори можуть регулювати VDAC. Фосфорилування VDAC (наприклад, JNK3, протеїнкіназою А, Ser-Thr кіназами GSK3β) викликає закриття каналу та подальшу загибель клітини [17]. Молекулярні шляхи апоптозу через вивільнення Cyt C з МХ будуть описані нижче.

1.2.2. Мітохондріальний кальцієвий уніпортер (MCU)

MCU - це трансмембранний протеїн, який дозволяє надходити іонам Ca з цитозоллю клітини в МХ. MCU має дуже низьку спорідненість до Ca²⁺, тому концентрація цитозольного Ca²⁺ повинна бути приблизно 5-10 мкМ для його активації. МХ тісно пов'язані з ендоплазматичним ретикуломом (ЕПР), який також є депо Ca²⁺. Наприклад інозитол-1,4,5-трифосфат (IP₃) активує IP₃-

рецептори, що спричинює вивільнення Ca^{2+} з ЕПР та створює локальну високу концентрацію Ca^{2+} між ЕПР та МХ, створюючи умови для захоплення кальцію уніпортером. [18]. Активатором MCU є кемпферол [19], а інгібіторами – сполуки на основі рутенію [20].

Його активність регулюється протеїнами MICU1 та MICU2, які разом з MCU, було доведено, складають комплекс мітохондріального кальцієвого уніпортеру [21]. Показано, що при вилученні як MICU1, так і MICU2 відбувається зниження концентрації Ca^{2+} (адже уніпортер функціонує); однак, якщо вилучити тільки MICU1, то MICU2 всеодно проявляє свою активність, регулюючи активність MCU [18].

Система швидкого захоплення Ca^{2+} (RaM) функціонує для створення короткої, високої концентрації вільного Ca^{2+} всередині МХ, яка може активувати внутрішньомітохондріальні метаболічні реакції при відносно невеликій кількості поглинання Ca^{2+} [22]. Надходження іонів Ca^{2+} за механізмом RaM відбувається щонайменше у 300 разів швидше, ніж крізь уніпортер [23, 24]. Інактивується ця система за рахунок зв'язування Ca^{2+} із зовнішніми сайтами зв'язування. RaM блокується роз'єднувачами окисного фосфорилування, RuR і активується фізіологічними концентраціями сперміну та АТР у мілімолярних концентраціях [24].

1.2.3. Мітохондріальний ріанодиновий рецептор (mRyR)

mRyR – канал, який здійснює швидке захоплення Ca^{2+} з високою провідністю та відносно низькою селективністю. Максимальний вхід Ca^{2+} відбувається при його концентрацій 10-40 мкмоль/л, але при концентрації катіона 50 мкмоль/л канал пригнічується, що може захищати МХ від Ca^{2+} -перевантаження та відкривання mPTP. У серцевому м'язі активація mRyR може бути основою Ca^{2+} -індукованої генерації АТР, яка потрібна для скорочення [25, 26].

За реверсії електрохімічного градієнта або кальцієвому перевантаженні активація цих структур може призводити до вивільнення Ca^{2+} із МХ, у такому разі опосередковане ними звільнення катіона також може відігравати протекторну щодо МХ роль [27-29]. Мітохондріальний RyR був

ідентифікований як скелетно-м'язова ізоформа ріанодинового рецептора. Він відрізняється від ріанодинового рецептора ЕПР чутливістю до кофеїну, Mg^{2+} та рутенієвого червоного (RuR). mRuR інгібуються ріанодином, Mg^{2+} та RuR, активуються імператоксином з отрути скорпіона [26].

1.2.4. Мітохондріальна пора перехідної провідності (mPTP)

mPTP - це трансмембранний білок, що розташовується на ВММ. Зазвичай закрита, ця велика білкова пора відкривається при дії певних стимулів: накопичення у мітохондріальному матриксі Ca^{2+} , зменшення аденінових нуклеотидів, підвищена концентрація фосфатів або окисним стресом. Відкриття пори пов'язується з апоптозом [30].

Індукція mPTP, яка збільшує проникність мітохондріальної мембрани, призводить до подальшої її деполяризації, тобто зниження $\Delta\psi$. Коли $\Delta\psi$ зменшується, протони та інші молекули можуть вільно перетікати через ЗММ [31, 32]. Втрата $\Delta\psi$ перешкоджає синтезу АТР, оскільки МХ повинні мати електрохімічний градієнт, щоб забезпечити рушійну силу для його генерації.

При пошкодженні клітин внаслідок патологічних станів, наприклад нейродегенеративні захворювання, відкриття mPTP може значно зменшити вироблення АТР і може призвести до того, що АТР-синтаза починає гідролізувати, а не генерувати АТР [33]. Це викликає дефіцит енергії в клітині, саме тоді, коли їй найбільше потрібен АТР для нормального функціонування іонних насосів та обмінників.

Відкриття mPTP супроводжується виходом Ca^{2+} з МХ, що спричинює стрес, активуючи Ca^{2+} -залежні протеази, такі як кальпаїн [34].

Відкритий стан mPTP дозволяє молекулам антиоксидантів, таким як глутатіон, виходити з МХ, зменшуючи здатність органел нейтралізувати АФК, в результаті чого концентрація останніх зростає. До того ж, втрата компонентів ЕТЛ, як Сут С, що також дифундує крізь відкриту mPTP, може призвести до виходу електронів з ланцюга [35].

mPTP призводить до того, що МХ стають проникними для молекул, менших за 1,5 кДа, які, потрапляючи всередину, набирають з собою воду (ефект сольватації), збільшуючи осмолярне навантаження для органели. Така ситуація

може призвести до набухання МХ і до розриву зовнішньої мембрани з вивільненням Cyt C [36, 37].

Відомим блокатором mPTP є імунодепресант циклоспорин А (CsA) [38].

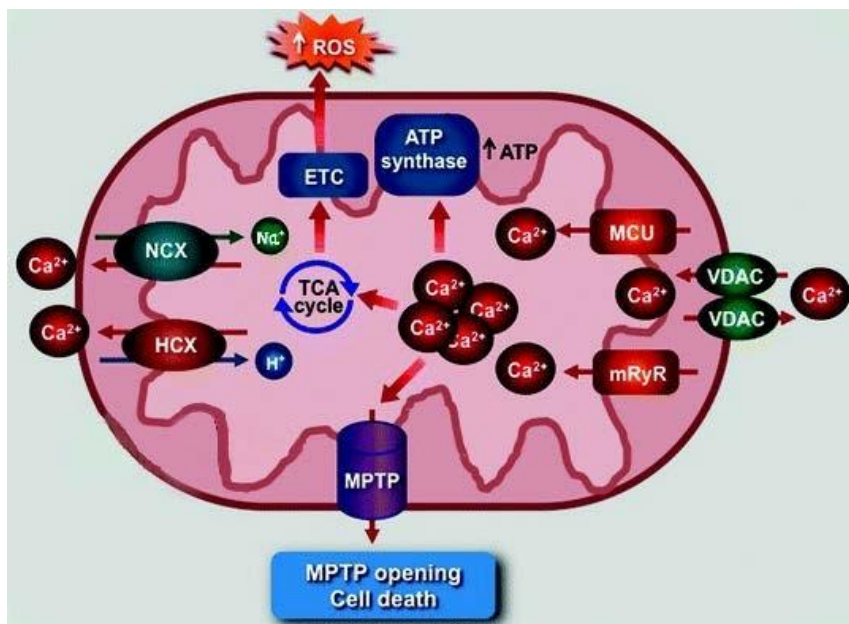


Рис. 1.2. Схематичне зображення структур, що беруть участь в кальцієвому, іонному гомеостазі МХ а також їх взаємозв'язок з біоенергетичним функціонуванням МХ. NCX – $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник, HCX - $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник, ETC – ЕТЛ, ROS – АФК, TCA – цикл трикарбонових кислот. Адаптовано з [39].

1.3. Активні форми кисню та апоптоз

Низький рівень продукування АФК необхідний для підтримки наступних фізіологічних функцій: проліферація, клітинний захист, передача сигналу та експресія генів [40]. Якщо за нормальних фізіологічних умов концентрація АФК підтримується на низькому рівні, то у ракових клітинах здатність елімінувати АФК є пониженою, оскільки АФК беруть участь в індукції проліферації раку, міграції та метастазуванні [41].

Окислюючи залишки цистеїну, АФК стимулюють активацію mPTP, що спричинює зменшення мембранного потенціалу МХ та вивільнення Cyt C через mPTP та VDAC, остаточно індукуючи активацію власного апоптотичного каскаду [40-44].

При запуску апоптозу в першу чергу з МХ вивільняється Cyt C, Smac/DIABLO, Апоптоsis Inducing Factor (AIF) та сери нова протеаза HtrA2/Omi [45, 46]. Ці протеїни активують каспаз-залежний апоптотичний шлях: Cyt C зв'язується і активує Araf-1 та procaspase-9, утворюючи «апоптосому» [47].

Вивільнення мітохондрійного Cyt C до цитозолу є одним із ключових елементів у процесі апоптозу. Cyt C входить до складу дихального ланцюга, що пояснює зв'язок біоенергетичного обміну та апоптозу. Встановлено, що вивільнення мітохондріального Cyt C може індукуватися відкриттям VDAC.

Контроль та регуляція мітохондрійного шляху апоптозу відбувається за участю протеїнів родини Bcl-2 [46, 48]. Протеїни родини Bcl-2 локалізуються на ЗММ, де вони структурно зв'язані з проапоптотичними білками Bax та Bad. Частина з них транслокується до МХ за дії апоптогенних чинників. Надмірна експресія Bcl-2 або Bcl-xL блокує виділення Cyt C та зупиняє процес апоптозу [49]. У той самий час надмірна експресія Bax, проапоптотичного білка, сприяє вивільненню Cyt C [50].

На пізніших стадіях апоптозу, коли клітина «приймає рішення» померати, з МХ вивільнюються проапоптотичні білки, ендонуклеаза G та каспаз-залежна дезоксирибонуклеаза. Ці білки транспортуються до ядра та викликають фрагментацію ДНК та конденсацію периферійного ядерного хроматину [51].

Відомо, що NO активно бере участь у модуляції метаболічних процесів та функціонування МХ, здатний інгібувати ЕТЛ, рівень генерації АТР, бере участь в редокс-сигналінгу, здатний продукувати високоактивні радикали, спричиняючи нітрозативний стрес. Зважаючи на це, надалі детальніше розглядатиметься вплив NO на мітохондріальні процеси та особливості продукування цієї сигнальної молекули [52].

2. Функціонування NO у процесі клітинного сигналінгу. NO-синтаза та її ізоформи

2.1. Функції NO в клітині

NO – газоподібна незаряджена молекула, що здатна легко дифундувати та є високоліпофільною. За допомогою цих властивостей NO може досягти мішеней на достатніх відстанях від місця, де він синтезується [53, 54]. NO є майже універсальним вторинним месенджером та регулятором численних

клітинних процесів. Його синтез може регулюватися змінами у функціонуванні NO-синтаз (NOS) на рівні транскрипції, трансляції, посттрансляційних ковалентних модифікацій, білок-білкових та білок-ліпідних взаємодій, а також шляхом зміни доступності кофакторів та субстрату [55].

Сигналізація NO здійснюється за трьома основними механізмами:

1) активація розчинної гуанілатциклази (sGC) здійснюється через зв'язування з її гемовою групою, що призводить до утворення cGMP, який, у свою чергу, стимулює протеїнкіназу G (PKG) (необхідна концентрація NO для активації sGC, варіює в межах 80-250 нМ) [56-58];

2) S-нітрозилювання: активні форми азоту - NO^+ , NO^- , N_2O_3 , NO_2 оборотно нітрозилюють тіолові групи залишків цистеїну таргетних протеїнів-мішеней [56-60];

3) утворення пероксинітриду (ONOO^-), головним чином за рахунок реакції між NO та супероксидним аніоном ($\bullet\text{O}^{2-}$) з подальшим нітруванням залишків тирозину та триптофану в білках, що призводить до взаємодії мітоген-активованих протеїнкіназ, ізоформ PKC, фактору транскрипції NF- κB та ін., в процесі сигналіngu [56, 57, 60, 61].

NO продукується ендогенно ферментом NOS, який каталізує перетворення L-аргініну в L-цитрулін [52]. Існує три ізоформи NOS: нейронна NOS (nNOS), ендотеліальна NOS (eNOS) та індукцйбельна NOS (iNOS) [57]. nNOS та eNOS є конститутивними та активуються Ca^{2+} , тоді як iNOS активується лише після індукції прозапальними цитокінами, бактеріальними ліпополісахаридами, γ -опроміненням, а її активність не залежить від внутрішньоклітинного Ca^{2+} . Конститутивні ізоформи генерують низькі концентрації NO з короткою тривалістю, тоді як iNOS синтезує більшу кількість NO протягом триваліших періодів. Ці відмінності визначають тип ефекту, який буде в подальшому викликаний NO [57].

Оксид азоту впливає на перебіг численних клітинних процесів. Залежно від концентрації, він регулює транскрипцію генів та трансляцію мРНК (шляхом зміни активності факторів транскрипції), зумовлює та модулює посттрансляційні модифікації білків (такі як нітрозилювання, ADP-

рибозилування), має цитостатичні та цитотоксичні властивості [62]. В ряді тканин, зокрема в гладеньких м'язах внутрішніх органів та судин, інгібування потенціал-залежних Ca^{2+} -каналів (VDCC), активація Ca^{2+} -залежних калієвих каналів ПМ, а також стимуляція Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаз ПМ та ЕПР здійснюється шляхом S-нітрозилування функціональних залишків цистеїну цих транспортних білків. В результаті забезпечується зниження концентрації Ca^{2+} у цитоплазмі [57, 60, 62, 63].

2.2. Функції NO в мітохондріях

Наразі остаточно доведена локалізація NOS у МХ. Наявність Ca^{2+} -залежної ізоформи NO-синтази в МХ (mtNOS) була доведена імуногістохімічними методами для окремих тканин [56, 64, 65].

Встановлено, що mtNOS є сплайс-варіантом нейрональної nNOS з молекулярною масою 144 кДа та має PDZ-домен на N-кінці (послідовність з 220 а.к.). PDZ-домен забезпечує взаємодію цього ензиму з I та IV комплексами дихального ланцюга. Активність mtNOS регулюється шляхом фосфорилування Ser на C-кінці [66]. Вважають, що mtNOS розташовується у ВММ [67, 68]. Ендогенне утворення NO МХ залежить від їх метаболічного стану, електричного потенціалу на ВММ та є Ca^{2+} -залежним процесом.

В МХ NO може виконувати кілька ключових функцій: інгібування або індукування біогенезу, контроль дихання та окисного фосфорилування; NO впливає на $\Delta\psi$ ВММ та регулює активність транспортних систем Ca^{2+} , функціонування mPTP тощо [69-72]. Крім того, NO контролює експресію кількох ферментів циклу трикарбонових кислот [73]. Ключовою роллю mtNOS може бути регуляція процесів синтезу АТФ. Мітохондріальний NO бере участь у механізмах, які лежать в основі визначення стратегії виживання або смерті клітини [74, 75].

На сьогодні встановлено, що NO модулює енергетичні, метаболічні та транспортні процеси в МХ. ВММ є ефективною мішенню нітросполук, оскільки локалізовані в них ферменти містять високий вміст тіолових залишків, залізо-сірчаних центрів, гемових груп, а сама мембрана є місцем утворення

супероксид-аніона [70, 76, 77]. Оксид азоту здатний регулювати активність ЕТЛ МХ, оборотно пригнічуючи Сyt С-оксидазу, та регулює значення рН матриксу МХ [70, 72, 76]. За низьких (наномолярних) концентрацій NO обмежує інтенсивність дихання та окисного фосфорилування [56, 67, 78]. NO регулює кальцієвий гомеостаз в МХ і, відповідно, Ca^{2+} -залежні процеси, в першу чергу активність низки дегідрогеназ [6]. Система NO/cGMP регулює синтез АТР МХ [56, 64].

Підвищений синтез NO на фоні посилення утворення супероксид-аніонів у МХ супроводжується утворенням значних кількостей пероксинітриду, пошкодженням компонентів ЕТЛ, незворотною деполяризацією органел та розвитком дисфункції МХ, що можуть бути причиною апоптозу [56, 61, 79]. Реакція між NO та $\bullet\text{O}_2$ знижує біодоступність та фізіологічну активність оксиду азоту в МХ. Пероксинітрид спричиняє окислювальні пошкодження, нітрування та S-нітрозилювання біомолекул - білків [6, 61], ліпідів, ДНК [79, 80], незворотної інактивації Mn^{2+} -вмісної супероксиддисмутази [81], матричної аконітази [82] та зменшує вміст відновленого глутатіону [60]. Нітрозативний стрес, індукований ONOO^- , призводить до незворотніх пошкоджень ДНК з подальшою активацією фактора транскрипції p53 та полі-ADP-рибозополімерази [80, 83]. Наведені приклади показують, що як нормальне функціонування, так і загибель клітин значною мірою залежать від рівня вироблення NO та інтенсивності генерації АФК саме в МХ [56, 67, 72, 84].

Зважаючи на взаємозв'язок оксиду азоту з K^+ -каналами, що описується нижче, подальше буде доцільним детально розглянути будову, властивості та особливості функціонування K^+ -каналів у клітинах та субклітинних структурах.

3. Будова K^+ -каналів та їх роль у збудливості гладеньком'язових клітин

K^+ -канали - це мембранні протеїни, які забезпечують швидкий та селективний потік іонів K^+ через клітинну мембрану з цитозолу в позаклітинний простір чи клітинні компартменти, наприклад МХ, і таким чином забезпечують електричні сигнали в клітинах. Сукупність K^+ -каналів у відкритому стані дозволяє K^+ витікати з клітини за електрохімічним градієнтом,

тим самим зменшуючи мембранний потенціал, повертаючи його до стану спокою [85].

Структурним елементом, що відповідає за високу селективність каналу, є послідовність із п'яти амінокислот. Ця висококонсервативна ділянка, TVGYG, утворює найвужчу частину каналу, також відому як селективний фільтр. Карбонільні та гідроксильні групи обернені в середину заповненої водою порожнини, забезпечують чотири сайти зв'язування для іонів K^+ [85, 86].

Умови активації K^+ -каналів визначають їх особливості функціонування, проте спільним результатом всіх типів є реполяризація мембрани та одночасне зменшення потенціал-залежного входу Ca^{2+} , що в сукупності спричинює розслаблення м'язової тканини [87]. Блокування цих каналів спричинює уповільнення, затримку реполяризації, що призводить до збільшення тривалості потенціалу дії та періоду рефрактерності [88].

Методом SAR (structure-activity relationship) було встановлено сім груп синтетичних агентів, що відрізнялися комбінаціями хімічних та фармакологічних характеристик і проявляли активність, відкриваючи K^+ -канали плазмалеми, перш за все у гладеньких м'язах [89].

3.1. Типи K-каналів

Калієві канали мають трансмембранні спіралі, що пронизують ліпідний бішар. Надалі розглядатимуться типи каналів, що підпадають під класифікацію на основі трьох класів: потенціалзалежні (K_v), вхідного випрямлення (K_{ir}) і двопородоменні (2P) канали [85].

3.1.1. Потенціалзалежні K^+ -канали (K_v)

Потенціалзалежні K^+ -канали відіграють вирішальну роль у поверненні деполяризованої клітини в стан спокою у відповідь на потенціал дії. K_v -канали є тетрамерами, кожен мономер якого складається з двох структурно- та функціонально- незалежних доменів: йонформуючого та так званого сенсорного доменів. Пору йонної провідності складається з чотирьох субодиниць, розташованих симетрично навколо каналу. Домени сенсора напруги розташовані по периферії каналу і кожен складається з чотирьох трансмембранних сегментів (S1-S4). Активація каналу відбувається наступним

чином: у відповідь на деполяризацію сенсор потенціалу – трансмембранний домен, багатий залишками аргініну та лізину – зазнає конформаційних змін, які призводять до відкриття каналу [90], внаслідок цього мембрана реполяризується. Kv зменшують збудливість клітин, що було зокрема показано на кардіоміоцитах і ГМК [91, 92].

α -Субодиниці протеїну утворюють власне пору провідності. На основі гомологічної послідовності гідрофобних трансмембранних доменів, альфа-субодиниці Kv групуються в 12 класів. Вони позначаються як Kv α 1-12 [93]. Зокрема тип Kv1.3, що кодується геном KCNA3, належить до підродина shaker-споріднених каналів.

Kv1.3, як і інші Kv-канали, характеризується різноманітною субклітинною локалізацією – у ПМ, ВММ (mitoKv1.3) [94, 95], в ядерній мембрані [96] та в апараті Гольджі [97] - що визначає особливості її функціонування.

MitoKv1.3 кодується тим самим геном, що і ПМ Kv1.3, тому зі структурної точки зору ніяких відмінностей щодо ПМ не виявлено, однак з функціонально різняться: mitoKv1.3 активний при надзвичайно негативному мітохондріальному мембранному потенціалі спокою (-180, -200 мВ) [94] і дозволяє надходженню K⁺ через ВММ у матрикс, на відміну від ПМ Kv1.3, який відкривається у відповідь на деполяризацію ПМ та опосередковує витік іонів K⁺ з цитоплазми у позаклітинний простір.

Недавні експериментальні дані встановили, що інгібування каналів mitoKv1.3 викликає транз'єнтну гіперполяризацію ВММ, яка впливає на окисно-відновний стан I та III комплексів дихального ланцюга, що супроводжуються посиленою генерацією супероксид-аніону [1].

Біофізичні властивості mitoKv1.3 досліджуються в основному за фармакологічною відповіддю каналів Kv1.3 на дію відомих інгібіторів. Блокатори Kv1.3 можна розділити на дві категорії: I) ПМ непроникні, такі як тетраетиламоній (TEA), 4-амінопіридин (4-AP), бензамід, маргатоксин (MgTx), харібдотоксин (ChTx) та стиходактила токсин (ShK); II) ПМ-проникний, як

псоралени та їх похідні (Psora-4, PAP-1) [98, 99]. Тільки другий клас здатний перетинати ПМ і блокувати mitoKv1.3.

MitoKv1.3 сприяє регулюванню об'єму матриксу МХ, інтенсивності дихального ланцюга, мембранного потенціалу МХ ($\Delta\psi$), синтезу АФК та редокс-сигналіngu. Іншими словами, цей тип каналів підтримує функціональну активність МХ та енергетичний гомеостаз [1].

3.1.2. АТР-залежні K^+ -канали (K_{ATP})

K_{ATP} належать до K^+ -каналів вхідного випрямлення. Вони спряжують мембранний потенціал з енергетичним станом клітини.

У нормальних умовах метаболізму клітини, коли рівень АТР високий, K_{ATP} перебувають у закритому стані, а активуються при критичному зниженні рівня АТР (наприклад, за умови зниженого рівня кисню) [100].

В той час, коли інші калієві канали (Ca^{2+} -залежні, двопородоменні та потенціалзалежні) за умов ішемії та метаболічного інгібування блокуються [101-103], K_{ATP} за таких умов здатні забезпечувати гіперполяризацію мембрани, скорочення тривалості потенціалу дії, зменшення кальцієвого перевантаження в цитозолі, розслаблення м'яза та збереження енергетичних запасів клітини, що запобігає неминучій загибелі клітини [104].

K_{ATP} є гетерооктамером, що утворюється каналоутворюючою ($Kir6.x$) та регуляторною (SUR, sulfonyl urea receptor) субодиницями, які об'єднуються в комплекс зі стехіометрією 4:4 [100, 104, 105]. Регуляторні SUR-субодиниці містять сайти зв'язування активаторів та блокаторів K_{ATP} .

K_{ATP} притаманне оборотне блокування за присутності АТР у мілімолярних концентраціях [105]. Усі відомі блокатори K_{ATP} -каналів є похідними сульфонілсечовини [100]. Їх дія, як і дія активаторів, опосередковується взаємодією із регуляторною SUR-субодиницею [106, 107], сплайс-варіанти якої проявляють різну чутливість до нуклеотидів, фармакологічних блокаторів та активаторів, зумовлену амінокислотною послідовністю С-кінцевої ділянки [108].

Ряд чинників та їх комбінацій здатні модулювати активність K_{ATP} , наприклад: цитозольні ферменти креатинкіназа, лактатдегідрогеназа,

аденілаткіназа [109-111], фосфорилування протеїнкіназами (PK) (зокрема у ГМК) [112], мембранні фосфоліпіди (особливо фосфатидилінозитол-4,5-бісфосфатом, PIP2), що потужно стимулює активність каналу [113] та зменшує чутливість до інгібіторів [114].

Мітохондріальний K_{ATP} (mito K_{ATP}). Оскільки будова mito K_{ATP} остаточно не встановлена і активно ведуться дискусії, то для точного встановлення наявності цього каналу мають свідчити наступні виявлені фармакологічні властивості:

(1) Канал має блокуватися Mg^{2+} -АТР [115-117], 5-гідроксидекановою кислотою (5-HD) - відомим блокатором мітохондріальних каналів [116-118], глібенкамідом (похідним сульфонілсечовини – відомим блокатором SUR-субодиниці) [115, 117, 119];

(2) Інгібований Mg^{2+} -АТР канал має активуватися діазоксидом ("відкривачем" калієвих каналів) [117, 120];

(3) Блокатор плазмалемальних K_{ATP} серця - HMR1098 не повинен впливати на активність каналу [116, 121].

Деякі речовини, що діють на mito K_{ATP} , проявляють додатковий ефект на ізольованих МХ. Наприклад діазоксид інгібує мітохондріальну сукцинатдегідрогеназу [122], впливає на мембранний потенціал ВММ [123], утворення АФК [124] та mPTP [125], індукує роз'єднання окисного фосфорилування [126, 127]. Деякі подібні ефекти спостерігалися і при дії пінацидилу, що активує K^+ -канали [126]. Глібенкламід також здатний до роз'єднання окисного фосфорилування МХ за високих концентрацій [128], а також стимулює відкриття mPTP [129].

Активність mito K_{ATP} регулює утворення АФК: за гіпоксії (оксидативному стресі) зменшується їх значна генерація, а за нормоксії - рівень АФК помірно збільшується [130].

Mito K_{ATP} беруть участь в регуляції об'єму МХ [130, 131]. Вхід іонів K^+ через mito K_{ATP} та спряжене з ним накопичення P_i , призводять до осмотичного входу води в матрикс МХ. Внаслідок збільшення об'єму матриксу активується H^+ - K^+ -антипортер [132], який викидає надлишок K^+ в цитозоль, встановлює новий рівноважний об'єм матриксу та запобігає пошкодженню ЗММ через

надмірне розтягнення. Помірне набухання МХ у разі активації $\text{mitoK}_{\text{АТР}}$ призводить до відновлення роботи ЕТЛ та, як наслідок, продукування АТР [133].

3.1.3. Ca^{2+} -активовані K^+ -канали високої провідності (BK_{Ca})

У людини Ca^{2+} -активовані K^+ -канали поділяються на три підтипи: високої ВК (100-300 pS), середньої ІК (25-100 pS), і малої СК (2-25 pS) провідності [134].

Ca^{2+} -активовані K^+ -канали високої провідності (BK_{Ca}) - це потенціал-залежні канали, що активуються як Ca^{2+} , так і у разі деполяризації мембрани [135, 136]. Вони мають тетрамерну структуру, яка складається з трансмембранного домену, потенціал-чутливого домену, пороутворюючого домену та цитоплазматичного С-кінцевого домену. Їх функція полягає у реполяризації мембрани, дозволяючи K^+ виходити з цитоплазми у відповідь на деполяризацію або збільшення рівня Ca^{2+} .

Структурно BK_{Ca} -канали є гомологічними до потенціалзалежних та ліганд-керованих каналів – тож мають сенсор напруги, пору, утворену трансмембранним доменом, та цитозольний домен, що зв'язує внутрішньоклітинний Ca^{2+} та Mg^{2+} [137]. Кожний мономер пороутворюючої α -субодиниці є продуктом гену KCNMA1 (відомого як Slo1). Субодиниця Slo1 має три основні структурні домени, кожен з чітко вираженою функцією: потенціал-чутливий домен (VSD) (містить залишок аргініну Arg213), цитозольний домен (реагує на зміни концентрації Ca^{2+}) і пороутворюючий домен (PGD) (відкривається і закривається для регулювання проникнення K^+). β -Субодиниці є регуляторними. Зокрема одна з чотирьох ($\beta 1$) експресується у гладеньких м'язах [137]. Цитозольні домени містять два високоафінні сайти зв'язування Ca^{2+} : один у RCK1 домені, а інший в RCK2 домені, що містить ряд залишків аспарагінової кислоти (Asp) [137]. Фосфорилування РКС зменшує ймовірність відкритого стану каналу [138].

BK_{Ca} -канали у судинній системі модулюються за допомогою природних сполук, таких як ангіотензин II, високий рівень глюкози або арахідоновою

кислотою та її метаболітами [139], збільшенням внутрішньоклітинного cGMP, вінпоцетином [140].

Мітохондріальний $ВК_{Ca}$ ($mitoBK_{Ca}$). Було показано, що субстрати ЕТЛ (NADH, сукцинат та малат/глутамат) та донори електронів (аскорбат) інгібують $mitoBK_{Ca}$ [141]. Цей ефект був заблокований специфічними інгібіторами комплексів ЕТЛ - ротеноном, антимицином А та KCN. Продемонстровано взаємодію Сут С оксидази (IV комплекс ЕТЛ) з $\beta 1$ -субодиницею $mitoBK_{Ca}$, що вказує на структурну та функціональну взаємодію каналу з дихальним ланцюгом МХ [141]. Також спостерігалася редокс-регуляція каналу $mitoK_{ATP}$ в кардіоміоцитах [142]. Проведене дослідження в умовах гіпоксії припускає функціональний зв'язок між $mitoBK_{Ca}$ та mPTP: активний стан $mitoBK_{Ca}$ спричиняє закриття конформацію mPTP [143]. Активація калієвих каналів може призвести до зниження транспорту Ca^{2+} через MCU [144]. Отже, зменшення активності каналу мітохондрійними субстратами може підтримувати активацію mPTP, що призведе до загибелі клітин.

Нещодавня ідентифікація генів, що кодують $mitoK_{ATP}$ [145] та $mitoBK_{Ca}$ [146, 147], дає можливість охарактеризувати їх роль у редокс-сигналінгу МХ.

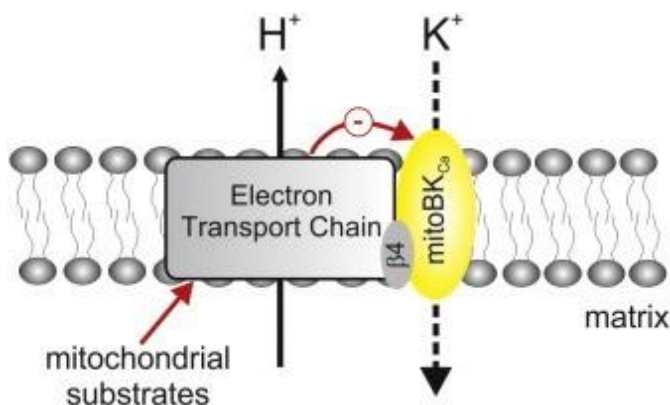


Рис. 3.1.3. Схематичне зображення регулювання мітохондріального Ca^{2+} -залежного калієвого каналу ($mitoBK_{Ca}$) електронно-транспортним ланцюгом. Субстрат-індукована активність дихального ланцюга призводить до зниження ймовірності відкритого стану $mitoBK_{Ca}$ [148].

Було встановлено, що в енергізованих сукцинатом МХ, де спостерігалось підвищене утворення АФК у I комплексі ЕТЛ, стимуляція $mitoBK_{Ca}$ 30 мкМ речовиною NS1619 призводить до інтенсивного зниження швидкості утворення H_2O_2 [149].

3.1.4. Двопородоменні калієві канали (2P)

2P є найбільш широко представленим типом, який відрізняється тим, що кожна каналотворююча субодиниця у своїй структурі містить два трансмембранних сегменти, які формують селективний фільтр каналу [90, 150]. Представники цього типу є нечутливими до таких відомих блокаторів, як 4-AP, TEA, Cs⁺, Ba²⁺, але виявляють диференційну чутливість до різних факторів, таких як рН, жирних кислот та анестетиків, гіпоксії та розтягнення [91]. Результатом їхньої активності є гіперполяризація ПМ та підтримання потенціалу спокою клітини [150]. До 2P належать шість родин K⁺-каналів: TWIK, TREK, TASK, THIK, TALK та TRESK [151].

TASK-3 (TWIK-related Acid-Sensitive K⁺-channel-3; ген KCNK9) ПМ характеризується малою провідністю 18 pS [152]. Було досліджено, що у присутності 2 mM Mg²⁺ в позаклітинному просторі, одноканальна унітарна провідність становила 27 та 17 pS при -60 та +60 мВ відповідно [153]. Канал є максимально активним при рН 7,4 і інгібується при значенні рН 6,7 [151]. Цинк у концентрації 100 мкМ вибірково блокує TASK-3 попри TASK-1 у фізіологічних умовах, але менш ефективний при кислому рН та високій позаклітинній концентрації K⁺ [154]. Крім того, TASK-3 чутливий до інших двовалентних катіонів [155] і до RuR (IC₅₀ 0,7 мкМ) [156]. TASK-3, що знаходиться в ПМ, відіграє важливу роль у регуляції апоптозу та в пухлинному генезі [157,158].

Методами імунохімічної та молекулярної біології TASK-3 був ідентифікований зокрема в МХ клітин меланоми та кератиноцитів [159]. Нокдаун TASK-3 клітинної лінії меланоми відображав змінений розмір, вміст ДНК та морфологію. Крім того, знижена експресія TASK-3 призвела до порушення мітохондріальної функції [160].

Локалізація у МХ функціонально-активного TASK-3 нещодавно була підтверджена з використанням імунофлуоресценції та patch-clamp на мітопластах, отриманих із клітинної лінії HaCaT людини [161]. Провідність каналу становила 83 pS при позитивних напругах і 12 pS при негативних

напругах в 150 мМ КСІ, а активність була потенціал-залежною з збільшенням ймовірності відкритого каналу (P_o) при позитивних потенціалах. Лідокаїн (1 мМ) і кисле рН (6,2), які, як відомо, модулюють TASK-3 ПМ, повністю блокують активність каналу TASK-3 МХ.

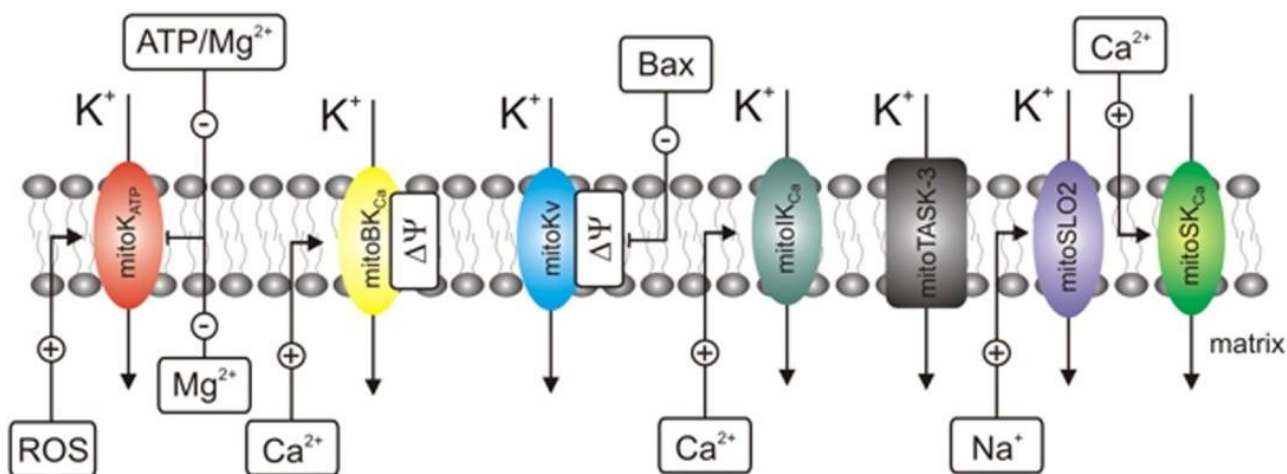


Рис. 3.1. Мітохондріальні калієві канали та деякі модулятори. Зліва: АТФ-залежний K^+ -канал, Ca^{2+} -активований K^+ -канал високої провідності, потенціалзалежний K^+ -канал, Ca^{2+} -активований K^+ -канал середньої провідності, двопородоменний K^+ -канал TASK-3, високопровідний Na^+ -активований K^+ -канал, Ca^{2+} -активований K^+ -канал низької провідності [148].

Оксид азоту є ключовою сигнальною молекулою васкулярної системи, яка сприяє розслабленню гладеньком'язових клітин судин, стимулюючи активність розчинної гуанілатциклази, утворенням сGMP з наступною активацією сGMP-залежної протеїнкінази (PK G), що сприяє модифікаціям певних внутрішньоклітинних процесів, зокрема активацію K^+ -каналів [162].

3.2. Вплив NO на K^+ -канали

Добре відомо, що активатори каналів міто K_{ATP} , такі як діазоксид, деполаризують мембрану МХ [163]. Для клітин нейронів було продемонстровано, що за дії діазоксиду зростає фосфорилування nNOS по Ser1417 (сайт активації), та зменшується фосфорилування nNOS по Ser847 (сайт інгібування), що сприяє посилення синтезу NO [164]. Ці дослідження доводять функціональний зв'язок між мітохондріальними K^+ -каналами та NO.

Вимірюючи окисно-відновний потенціал МХ та використовуючи його як індекс відкриття каналу міто K_{ATP} у вентрикулярних міоцитах, було показано, що NO може активувати канали міто K_{ATP} [165]. Донор NO S-нітрозо-N-ацетил-

DL-пеніциламін (SNAP) активував $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$, не стимулюючи сарколемальні K_{ATP} -канали, оскільки його ефекти спеціально блокували 5-гідроксидеканоатом (5-HD) та NO скавенджерами. Оскільки багато ефектів NO опосередковуються cGMP-залежним шляхом, важливо було встановити, чи NO-індукована активація $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ опосередковується cGMP. Негативні результати такого експерименту свідчать про те, що $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ безпосередньо активується NO. Цікаво, що при активації відкриття калієвих каналів діазоксидом, канали $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ виявилися більш сприйнятливими до потенціюючих ефектів NO, ніж закриті канали [165]. Однозначні докази прямої активації $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ NO здійснювались шляхом реконструкції $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -каналів серця у ліпідні бішари [166], після чого канали $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ активувались екзогенними донорами NO.

Активація каналу NO інгібується блокаторами $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ 5-HD або глібенкламідом [166]. Методом patch-clamp також підтверджується, що NO інгібує $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ в клітинах Т-лімфоцитів людини [167]. Доведено, що активація через NO, опосередковується його взаємодією з залишками NBD1 (nucleotide-binding domain 1) регуляторної субодиниці $\text{SUR1K}_{\text{ATP}}$ [168].

З іншого боку, NO може також регулювати $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -канали через sGC/cGMP/PKG-опосередковані шляхи [169]. Наприклад, в інших дослідженнях, проведених у трансфікованих клітинах HEK293 та в кардіоміоцитах, екзогенний вплив донора NO NOC-18 призвело до збільшення активності субодиниць Kir6.2/SUR2A, яке скасовувалось під впливом селективного інгібітора PKG, KT5823 [170]. Цей sGC-залежний механізм, ймовірно, може брати участь у регуляції мітохондріальних VKCa -каналів в кардіоміоцитах [171].

Дослідження [172] вказують на те, що NO та його донори можуть безпосередньо стимулювати активність VKCa у клітинах, що відіграє важливу функціональну роль у NO-індукованому розслабленні ГМК артерій. Припускається, що механізм регуляції функціонування VKCa у ГМК відбувається через взаємодію NO з тіоловими групами протеїну. Ця модуляція, ймовірно, залежить від кількості реакційно-здатних залишків тіолу, окисно-відновного (редокс) стану клітини та кількості ендogenous NO [173-175].

Основними молекулами, які беруть участь у редокс-сигналінгу є АФК, такі як супероксиданіон, пероксид водню, гідроксил-радикал, NO та пероксинітрит [176].

3.3. Роль K^+ -каналів в гладеньком'язових клітинах матки

Регуляція функцій міометрія протягом вагітності, пологів та народження є в центрі досліджень репродуктивних наук. На відміну від інших гладеньких м'язів, міометрій знаходиться в значному ступені під контролем гормонів. Потенціал спокою ПМ міоцитів матки знаходиться в межах -35 - -80 мВ в залежності від функціонального стану і забезпечується перерозподілом Na^+ , K^+ , Cl^- і Ca^{2+} в міоплазмі та позаклітинному середовищі. У підтриманні потенціалу спокою на ПМ провідна роль VK_{Ca} , які лімітують збудження шляхом посилення виходу іонів K (мають провідність близько 200 pS) з клітини за підвищення локальної концентрації Ca^{2+} (мкМ) в субсарколемних ділянках цитозолу, спричиненого деполяризацією чи дією агоністів. Інгібування K^+ -каналів призводить до деполяризації та активації потенціалзалежних Ca^{2+} -каналів [177-179].

Калієві канали складають групу протеїнів, які суттєво сприяють розслабленню матки під час вагітності, адже витік іонів K^+ з клітини призводить до реполяризації мембрани [180].

K_{ATP} . Збільшення експресії K_{ATP} -каналів в міоцитах матки під час вагітності [181] дає підстави припустити, що цей канал регулює скоротливість міометрія. Надекспресія субодиниць K_{ATP} Kir.6.1 та SUR2B сприяє пригніченню окситоцин-індукованих скорочень у вагітних на пізніх стадіях щурів [182]. Подібним чином, в матці людини канали K_{ATP} , що складаються переважно з субодиниць Kir6.1 та SUR2B, більше експресуються у невагітному міометрії порівняно з пізньою вагітністю [183]. Ці висновки свідчать про те, що у людини зниження активності каналів K_{ATP} може сприяти підвищенню збудливості матки та стимуляції пологових скорочень під час вагітності. Пінацидил, що відкриває K_{ATP} -канали, інгібує окситоцин-індуковані скорочення вагітного міометрія на пізніх стадіях, але не під час пологів [184].

ВК_{Ca}. Молекулярні та клітинні дослідження з'ясували, що диференціальна регуляція каналів ВК_{Ca} під час вагітності зумовлена різними механізмами, включаючи альтернативний сплайсинг, взаємодію з допоміжними β -субодиницями, посттрансляційну модифікацію. Сплайсинг ВК_{Ca} транскрипту призводить до функціонально різних ізоформ, які відрізняються чутливістю до кальцію та потенціалу [185], гормонів [186, 187] та здатністю до фосфорилування [188]. Наприклад, мембранозв'язана PKG активує канали ВК_{Ca} у міометрії, тим самим сприяє його розслабленню під час вагітності [189].

NO також опосередковує розслаблення матки під час вагітності шляхом активації ВК_{Ca}, і цей ефект залежить від стадії вагітності. NO був менш ефективним індуктором розслаблення матки на пізніших стадіях вагітності, порівняно з ранніми стадіями [190]. У міоцитах періоду вагітності імовірність відкритого стану ВК_{Ca} зростає у відповідь на дію донорів NO [191]. Наразі невідомо, чи NO-активація ВК_{Ca} міометрія відбувається шляхом прямої взаємодії та/або непрямой активації через cGMP-залежні шляхи [191, 192].

SK. Ca²⁺-активовані канали низької провідності пов'язані з кальмодуліном, який опосередковує відкриття каналів через зв'язування кальцію [193].

При надмірній експресії ізоформи 3 SK (SK3), спостерігався фенотип зі зменшеною пологовою здатністю, можливо, через неефективні скорочення гладеньких м'язів [194]. У невагітному та вагітному міометрії людини апамін, інгібітор каналів SK, зменшував NO-індуковане розслаблення [195, 196].

Kv інтенсивно експресуються в ГМК матки. У відповідь на деполяризацію, витік K⁺ через ці канали індукує реполяризацію ПМ ГМК до значень потенціалу спокою. Таким чином, Kv канали беруть участь у підтриманні мембранного потенціалу спокою в міозитах, забезпечуючи розслаблення матки перед пологами [197].

2P подібно до каналів K_{ATP} та Kv можуть підтримувати мембранний потенціал спокою в клітинах міометрія. У міометрії під час вагітності [198] були виявлені ізоформи 1, 4 та 5 родини TASK та ізоформа 1 родини TREK, однак їх роль під час вагітності повністю не встановлена.

Вище нами були розглянуті відомості про будову різних типів K^+ -каналів, їх субклітинну локалізацію та роль у розслабленні ГМК (в тому числі матки), а також вплив сигнальної молекули NO на ці структури. Проте досі залишається не з'ясованою залежність функціонування NOS від K^+ -проникності та механізми, через які опосередковується зворотній зв'язок структур, що підтримують K^+ -гомеостаз на синтез оксиду азоту, зокрема в гладеньких м'язах матки, чому і були присвячені наші наступні дослідження.

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 [199], 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 [200]. Потім тканину подрібнювали ножицями на невеликі шматочки (середній розмір – 2 на 2 мм) і відмивали від крові та високих концентрацій іонів Ca^{2+} (3 рази по 5 хв) в 5 мл розчину Б (розчин Хенкса вищевказаного 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 у вільний від ензиматичного препарату розчин Б. Для прискорення дисоціації клітин тканинний препарат 15-20 разів обережно піпетували за допомогою скляної піпетки протягом 1-2 хв. Розчин Б, що 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, у 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 [200].

2.2. Виділення фракції мітохондрій міометрія з матки щурів

Препарат ізольованих МХ одержували із міометрія невагітних щурів за допомогою методу диференційного центрифугування. Після виділення матки і очищення її від жирової та сполучної тканини, м'язовий препарат поміщали 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 (pH = 7,4) - 10; цукроза - 250; EGTA - 1. Тканину гомогенізували за допомогою гомогенізатору Heidolph Silent Crusher M (Німеччина) 3 рази по 20 с із охолодженням на льоду протягом 1 хв, співвідношення тканина: робочий розчин складало 1:10. 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 [201].

2.3. Флуоресцентний зонд DAF-FM

DAF-FM DA (4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein Diacetate) – це флуоресцентний зонд, що є мембранопроникним, використовується для детекції утворення NO за низьких концентрацій у клітинах.

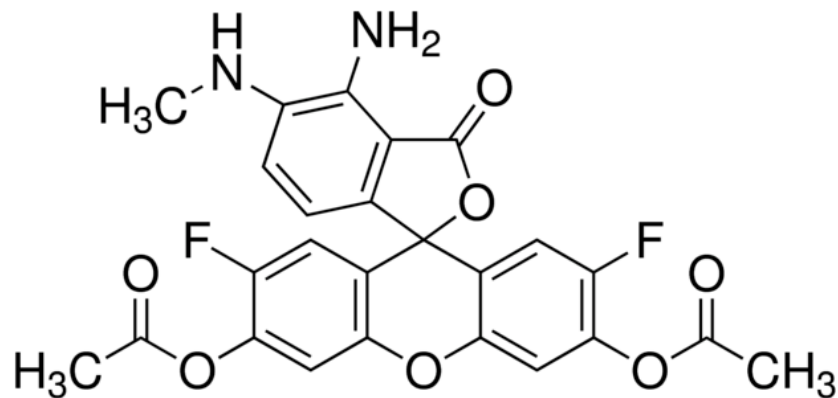


Рис. 2.3.1. Структурна формула зонду DAF-FMDA

Довжини хвиль збудження та флуоресценції становлять $\sim 495/515$ нм відповідно. Безпосередньо діацильна форма зонду не здатна флуоресцювати, поки не гідролізується внутрішньоклітинними естеразами, прореагує з NO та утворить бензотріазольну форму зонду, яка у свою чергу втрачає здатність до проникнення крізь мембрану.

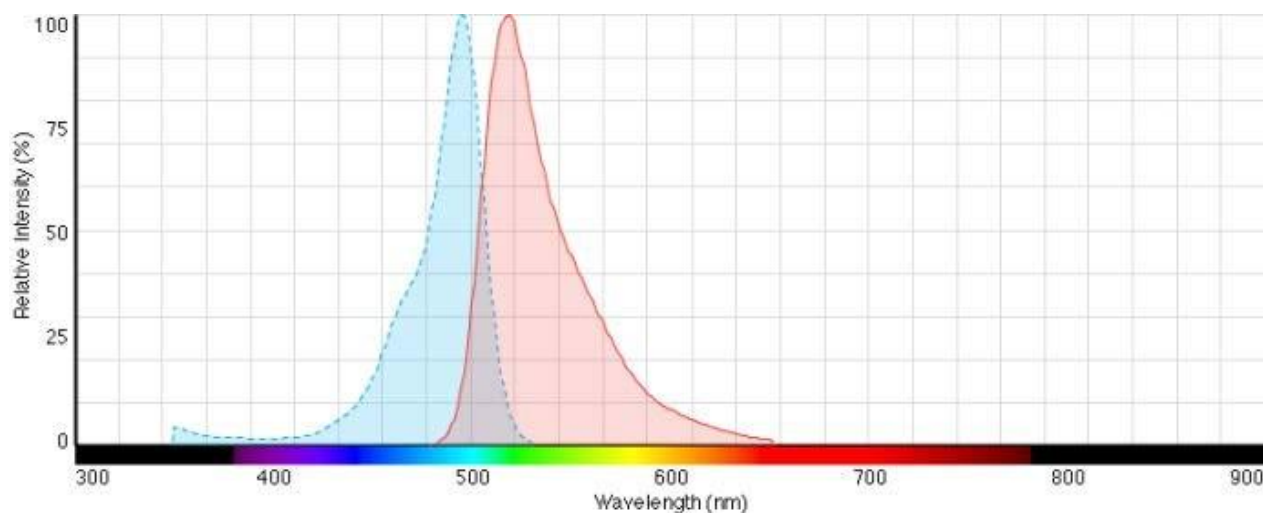


Рис. 2.3.2. Спектр флуоресценції зонду DAF-FMDA. Відносна інтенсивність (%), довжина хвилі (нм)

2.4. 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; Нерес (рН, 7,4, 37 °С) – 10 [200].

Для візуалізації МХ був залучений флуоресцентний барвник MitoTracker Orange CM-H₂TMRos у концентрації 200 нМ, а для візуалізації ядер клітин – 50 мкМ Hoechst 33342 [200]. Навантаження іммобілізованих міоцитів NO-чутливим флуоресцентним зондом DAF-FM в концентрації 10 мкМ відбувалося протягом 15 хв при температурі 24 °С.

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) [200]. 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.

2.5. Метод протокової цитофлуориметрії

Дослідження активності NO-синтази в ізолюваних мітохондріях. Утворення NO у МХ міомерія досліджували із використанням NO-чутливого флуоресцентного барвника DAF-FM та методу протокової цитофлуориметрії. Відносні значення вмісту NO у матриці МХ, навантажених DAF-FM, реєструвалина протоковому цитометрі COULTER EPICS XLTM (“Beckman Coulter”, США) з аргонним лазером ($\lambda_{\text{зб.}} = 488$ нм, $\lambda_{\text{фл.}} = 515$ нм, канал F11); програмне забезпечення SYSTEM ITM Software. Використовували робочий протокол аналізу зразків, який був створений для характеристики фракції ізолюваних МХ міомерія. 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.

Навантаження МХ зондом DAF-FM-DA у концентрації 5 мкМ проводили в середовищі, яке містило 10 мМ HEPES (рН 7,4, 25 °С), 250 мМ цукрози, 0,1 % бичачого сироваткового альбуміну, 0,02 % Pluronic F-127 (для покращення процесу навантаження) протягом 30 хв при 25 °С. Склад робочого (реакційного) середовища при визначенні NO-синтазної активності (об'єм 2 мл, мМ): HEPES – 20 (рН 7,4, 25 °С), K⁺-фосфатний буфер – 2 (рН 7,4, 25 °С), KCl – 125, NaCl – 25, піруват – 5, сукцинат – 5, L-аргінін – 0,05, Ca²⁺ – 0,1, NADPH – 0,01, тетрагідробіоптерин (BH₄) – 0,01. Вміст протеїну у мітохондріальній фракції складав 15-20 мкг в 50 мкл. Реакцію ініціювали внесенням аліквоти 20 мкл L-аргінін і Ca²⁺. Час інкубації – 30 хв.

Утворення NO виражали у відносних одиницях флуоресценції DAF-FM як $(F-F_0)/F_0$, де F₀ – початковий рівень флуоресценції, F – флуоресцентний сигнал на 30 хв.

2.6. Статистичний аналіз

Статистичний аналіз отриманих даних проводили із використанням стандартного метода, застосовуючи t-критерій Стьюдента. За достовірні приймалися результати, в яких значення рівня значимості p<0,05. Розрахунки проводили за допомогою стандартного програмного забезпечення MS Office Excel.

2.7. Моделювання та молекулярна динаміка

Структура 3SKQ організму *Saccharomyces cerevisiae* з бази даних RCSB PDB не містила мутацій, була отримана методом рентгеноструктурного аналізу, роздільна здатність становила 2.10 Å, містила один ланцюг довжиною 249 амінокислотних залишків [202]. Структура MDM38_YEAST під кодом Q08179 бази даних UniProt містила один ланцюг довжиною 573 амінокислотних залишків, позиції посилення на структуру 3SKQ PDB припадали на залишки 160-408.

Функціональний аналіз послідовності протеїну MDM38 шляхом класифікації його по сімействах, прогнозування доменів та важливих сайтів проводився інтегрованим ресурсом InterProScan EMBL-EBI.

Прогнозування структури проводилось на сайті Robetta Bakerlab [221]. Послідовність було поділено на дві частини 1-410 та 160-573 та запущено у наступних режимах: TR only (TrRefineRosetta deep learning method), AB only (Ab Initio), Predict domains, комбінований – з виходом 5 моделей для кожного режиму. Відбір проводився на основі взаєморозташування N- та C-кінців послідовностей та оцінки похибки позицій амінокислот.

Накладання та вирівнювання послідовностей вибраних моделей проводилось з використанням програми Swiss PDB Viewer, відрізання повторення доменів проводилось по амінокислоті з найменшим значенням RMSD (Å), що становило 0.240 для ASP393 (ланцюг моделі 1) та відповідно ASP234 (ланцюг моделі 2).

Вбудування створеної моделі в сконструйований біліпідний шар мембрани проводився за допомогою програми для моделювання та симуляції багаточастинкових систем CHARMM-GUI Membrane Builder. Концентрація йонів KCl становила 0.15 M, модель води TIP3P. До складу мембрани входили наступні ліпіди: холестерол (Chol), 1-пальмітоїл-2-олеоїл-sn-гліцери-3-фосфоетаноламін (POPE) та пальмітоїлсфінгомієлін (PSM) у відповідному співвідношенні 22,3:19:13,5 у верхньому шарі та 21:19:13,5 у нижньому [222, 223].

Мінімізація системи, врівноваження в ізобарно-ізотермічному NPT ансамблі з подальшим обрахунком молекулярної динаміки проводився у програмі GROMACSv.5.1.1 на основі вихідних даних, отриманих з CHARMM-GUI Membrane Builder у силовому полі CHARMM36m. Час врівноваження в залежності від етапу сягав від 0,05 до 0.125 нс. Тривалість моделювання становила 20 нс.

РОЗДІЛ III

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Доведення солокалізації синтезу оксиду азоту з мітохондріями в міоцитах матки

З використанням методу лазерної скануючої конфокальної мікроскопії та NO-чутливого флуоресцентного барвника DAF-FM нами була продемонстрована можливість синтезу NO в міоцитах матки. Флуоресцентний зонд DAF-FM здатний реєструвати NO за низьких концентрацій у клітині (2-5 нМ). Використаний зонд мало чутливий до дії лазерного променя. За наявності O₂ активна форма барвника безпосередньо взаємодіє з NO і перетворюється в триазоло-флуоресцеїнове похідне, яке має більший квантовий вихід [203, 204].

Проведеними дослідженнями встановлено (рис. 3.1 (2)), що в міоцитах матки спостерігається зелений флуоресцентний сигнал після передінкубації з DAF-FM, що свідчить про продукцію NO в клітинах. Також продемонстровано солокалізацію специфічного щодо MX зонда MitoTracker Orange CM-H₂TMRos (рис. 3.1. (1)), який накопичується лише в енергізованих органелах [205], та NO-чутливого барвника DAF (рис. 3.1. (4)).

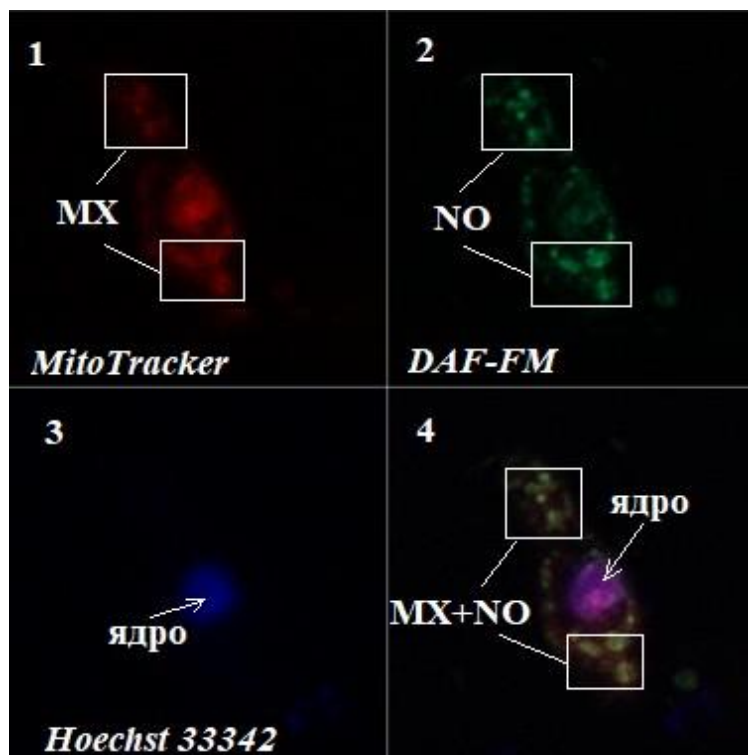


Рис. 3.1. Розподіл флуоресцентних зондів у міоциті: 1 – MitoTrackerOrangeCM-H₂TMROS (200 нМ, червоний колір), 2 – DAF-FM (10 мкМ, зелений колір), 3 – Hoechst 33342 (50 мкМ, синій колір), 4 – солокалізація флуоресцентних зондів MitoTracker та DAF-FM. Прямокутниками виділені ділянки солокалізації. Результат типового експерименту, n=5. Метод конфокальної мікроскопії.

Отже, з використанням методу лазерної конфокальної мікроскопії та методології солокалізації флуоресцентних зондів, мітохондрійного барвника MitoTracker Orange та NO-чутливого DAF-FM, доведено, що MX міомерія можуть бути джерелом синтезу оксиду азоту.

За даними літератури синтез оксиду азоту у MX забезпечується мітохондріальною NO-синтазою, тому наступним етапом досліджень було підбір оптимальних умов для реакції біосинтезу NO на моделі ізольованих органел.

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

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

За умов енергізації ізольованих MX (наявність 5 мМ сукцинату та пірувату в середовищі) спостерігається “базальний” синтез NO за відсутності екзогенних кофакторів та субстратів реакції (рис. 3.2.). Послідовне внесення до інкубаційного середовища 1 мкМ L-аргініну та 100 мкМ Ca²⁺ приводило до достовірного (p<0,05) посилення біосинтезу оксиду азоту відносно контрольних значень. Додавання екзогенного Ca²⁺ мало наслідком суттєве зростання (p<0,05) утворення NO відносно дослідів за його відсутності. Додавання 10 мкМ

NADPH також приводило до зростання NO-синтазної активності. Водночас внесення до реакційного середовища NH_4 не стимулювало NO-синтазну активність МХ (рис. 3.2.). Можливо, ці результати пояснюються достатньо високим рівнем енергізації МХ в проведених умовах дослідження (наявність у середовищі сукцинату та пірувату як субстратів дихання) на фоні функціонального sprzęження mtNOS із дихальним ланцюгом [56, 67, 206]. Тим не менше дані свідчать, що у МХ кардіоміоцитів продукція NO зменшувалась за нестачі NH_4 або L-аргініна [207]. Зважаючи на цитовані дані, наявність NH_4 в реакційному середовищі є необхідною для активності NO-синтази. Що й було враховано нами в подальших експериментах.

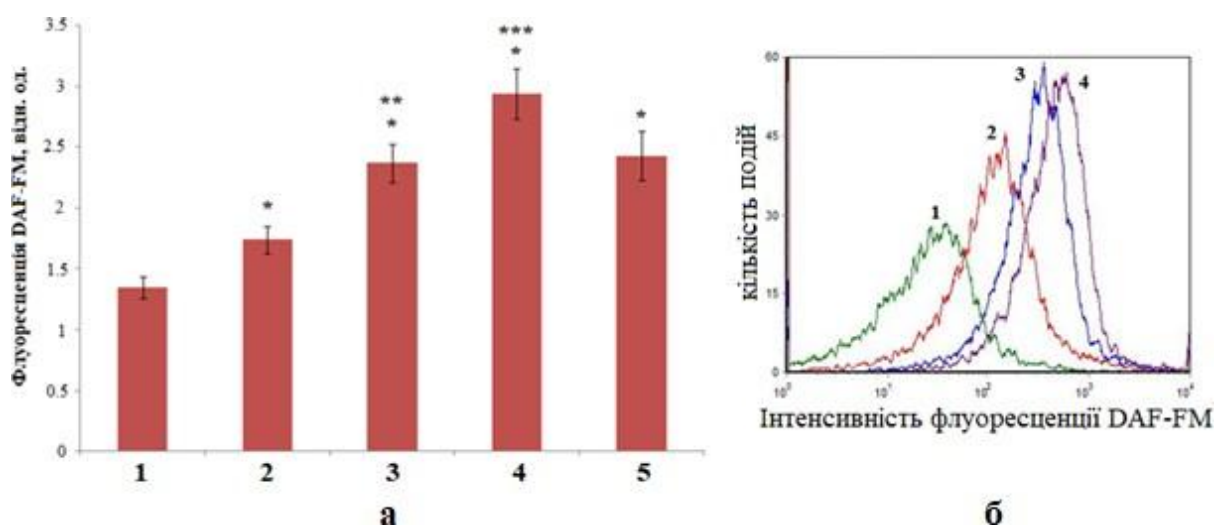


Рис. 3.2. Залежність активності mtNOS від наявності субстрату та кофакторів у середовищі інкубації (а); б – зміщення піків інтенсивності флуоресценції за умов різного складу середовища інкубації: 1 – контроль, 2 – 100 мкМ L-аргінін, 3 – L-аргінін і 100 мкМ Ca^{2+} , 4 – L-аргінін, Ca^{2+} і 10 мкМ NADPH, 5 – L-аргінін, Ca^{2+} , NADPH і 10 мкМ NH_4 .

* $P < 0,05$ відносно контролю, ** $P < 0,05$ відносно наявності L-аргініну, *** $P = 0,05$ відносно наявності L-аргініну і Ca^{2+} ; $M \pm m$, $n = 7$ (а)

Дослідження впливу різних концентрацій L-аргініна та Ca^{2+} на синтез NO в МХ виявило, що оптимальними для функціональної активності mtNOS в ізольованих МХ є концентрації L-аргініна в межах 50 мкМ та Ca^{2+} - 100 мкМ (графічні дані не наведено).

Отже, для надійного тестування біосинтезу NO МХ ГМК матки в складі реакційного середовища мають бути присутні L-аргінін, Ca^{2+} , NADPH та NH_4 .

3.3. Роль K^+ -проникності у функціонуванні NOS в ізольованих МХ міометрія

Відомо, що зміни об'єму матриксу МХ грають важливу роль у різноманітних процесах, що відбуваються в цих структурах, зокрема на рівень продукції АТР та роботу ЕТЛ. Також існує кореляція між зміною геометрії цих органел та наступними процесами: генерація АФК, поляризованість ВММ, каскад апоптичних реакцій та інші [208, 209]. Зважаючи на те, що в зазначених процесах беруть участь також структури K^+ -обміну (наприклад, $mitoK_{ATP}$, $ВК_{Ca}$, K_v), то можна припустити, що їх функціонування спряжене з роботою NOS, осмосигналінгом та біоенергетикою МХ.

Тому надалі ми вивчали ефекти зміни екзогенної концентрації K^+ на синтез NO в ізольованих МХ.

При концентрації екзогенного K^+ , близької до фізіологічної у цитозолі, а саме 125 мМ KCl, спостерігається максимальна активність mtNOS, значення якої було надалі прийняте за 100%. При послідовній ізотонічній заміні хлориду калію на холіну хлорид в реакційному середовищі, а, відповідно і зниження екзогенної концентрації K^+ до 100, 75, 50, 25, 0 (мМ) призводило до поступового, концентраційно-залежного зниження NO-синтазної активності МХ. За умови повної відсутності K^+ в середовищі інкубації активність ензиму знижувалась до 30 % від максимальної початкової (рис. 3.3.). Одержані результати переконливо свідчать про важливість K^+ у функціонуванні mtNOS МХ.

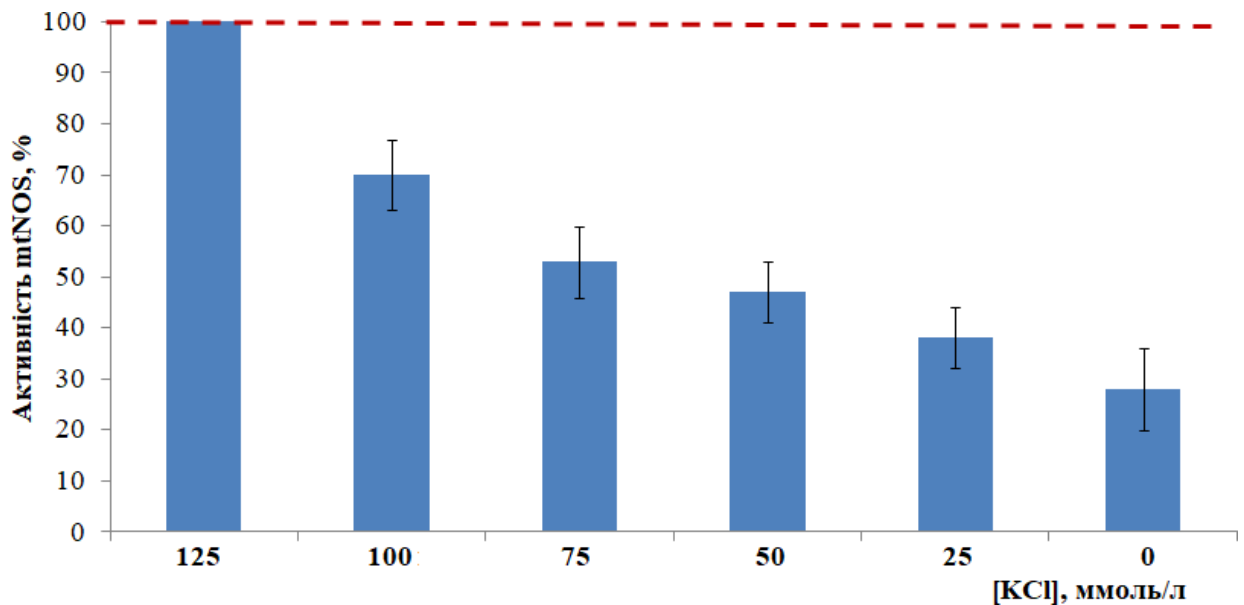


Рис. 3.3. Зміни активності mtNOS за умов ізотонічної заміни в реакційному середовищі хлориду калію на холіну хлорид. За 100% прийнята ферментативна активність за фізіологічної концентрації K^+ . $M \pm m$, $n=7$.

В роботі [210] продемонстровано із застосуванням інгібіторів K^+ -каналів важливу роль цих структур в регуляції осмосигналіngu (процесах набухання) МХ міометрія. Тому подальші дослідження ми спрямували на з'ясування можливого впливу K^+ -проникності на активність mtNOS.

В дослідженнях були використані інгібітори потенціалзалежних K^+ -каналів – тетраетиламоній та 4-амінопіридин, селективний до K_{ATP} інгібітор глібенкламід та до Ca^{2+} -активованих K^+ -каналів харібдотоксин. Всі зазначені інгібітори призводили до суттєвого зниження активності NO-синтази до приблизно 50, 25, 30, 29 (%) відповідно (рис.3.4.).

Отже, активність mtNOS суттєво залежить (або пов'язана) з функціонуванням K^+ -каналів різних типів, що підтримують K^+ -гомеостаз в МХ, зокрема від K_{ATP} , Ca^{2+} -активованих та потенціалзалежних K^+ -каналів.

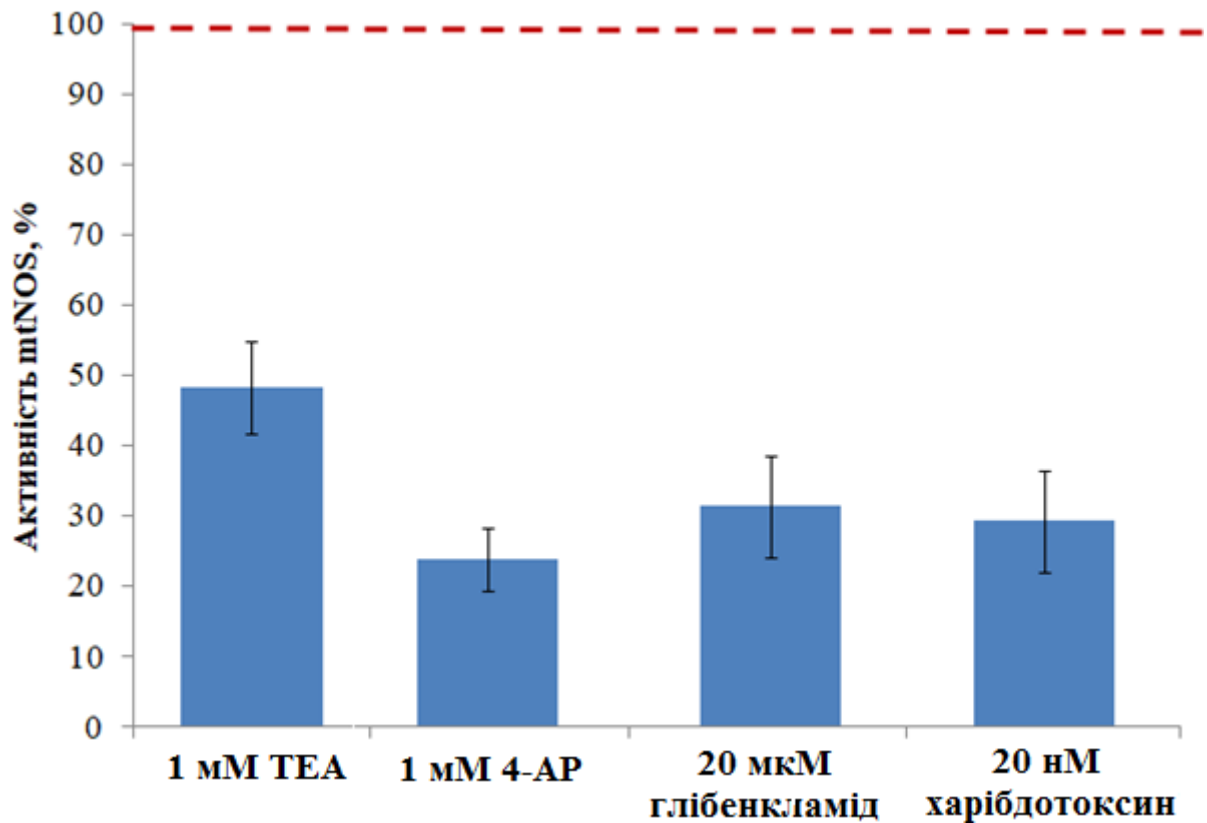


Рис. 3.4. Вплив інгібіторів K^+ -каналів: тетраетиламонію (TEA), 4-амінопіридину (4-AP), глібенкламід та харібдотоксину на активність mtNOS. За 100 % прийнята ферментативна активність за відсутності інгібіторів, $M \pm m$, $n=7$.

3.4. Вплив модуляторів Ca^{2+} -обміну в МХ міомерія на активність mtNOS

Раніше було показано, що блокатори різних підтипів K^+ -каналів ВММ здатні пригнічувати набухання МХ, що було спричинене іонами Ca^{2+} у високих (мілімолярних) концентраціях. Це свідчить про зв'язок K^+ -проникності ВММ та активності Ca^{2+} -транспортувальних систем у МХ міомерія [210].

За даними літератури біосинтез NO забезпечується конститутивною Ca^{2+} -залежною ізоформою NOS, можливо nNOS [211]. Наші дослідження продемонстрували, що широковживаний інгібітор конститутивних NO-синтаз N^G -нітро-L-аргінін (NA) та інгібітор nNOS 2-амінопіридин (2-AP) [212-214] ефективно гальмували синтез NO в МХ міомерія (рис. 3.5). Напівмаксимальний гальмівний ефект мав місце за концентрацій ~ 25 мкМ NA та 100 мкМ 2-AP.

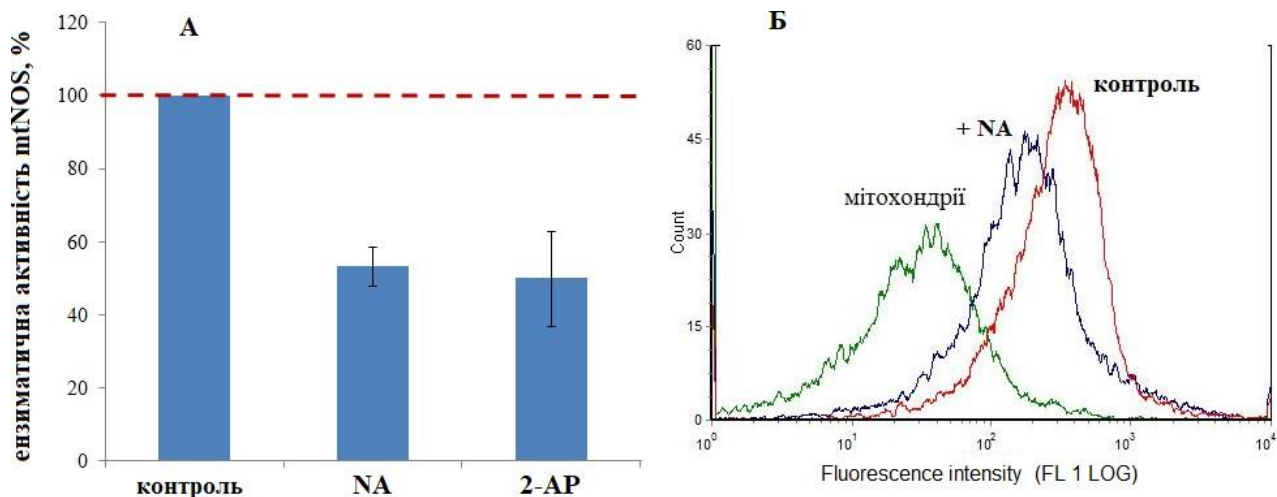


Рис. 3.5. Вплив інгібіторів 25 мкМ N^G -нітро-L-аргініна (NA) та 100 мкМ 2-амінопіридина (2-AP) на активність mtNOS. $M \pm m$, $n=5$ (А). Б - Зміщення піків інтенсивності флуоресценції DAF-FM за дії NA: “мітохондрії” – положення піку в “0” момент часу, “контроль” – положення піку через 30 хв. Дані типового експерименту

Цей результат підтверджує, що синтез NO в МХ міомерія забезпечує функціонування конститутивної NOS, активність якої має суттєво залежати від інтенсивності надходження іонів Ca^{2+} у матрикс МХ, а отже від активності систем обміну катіона у ВММ. Також можна припустити, що одним з механізмів дії іонів калію на синтез NO в МХ може бути вплив на гомеостаз Ca^{2+} матриксу.

Вхід іонів Ca^{2+} у МХ забезпечується за рахунок функціонування електрофоретичного Ca^{2+} -уніпортеру, чутливого до RuR [206, 215, 216]. Вихід Ca^{2+} з матриксу забезпечують H^+ - Ca^{2+} -обмінник, який представлений у МХ міомерія протеїном LETM1 [217], та циклоспорин-чутлива mPTP [218].

Нами продемонстровано, що за присутності блокатора транспорту Ca^{2+} у ВММ 10 мкМ RuR продукція NO у МХ суттєво пригнічувалась за наявності в інкубаційному середовищі 100 мкМ Ca^{2+} (рис. 3.6.).

H^+ - Ca^{2+} -обмінник МХ міомерія функціонує із стехіометрією 1:1, тобто є електрогенним, але за певних умов може функціонувати в реверсному режимі, тобто режимі акумуляції іонів Ca^{2+} у матриксі. Цей ефект пояснюється ймовірно аналогічно H^+ - Na^+ -обміннику, який також здатний функціонувати в обох напрямках, що визначається трансмембранним йонним градієнтом [224]. Його активація супроводжується зниженням концентрації Ca^{2+} в матриксі з

одночасним закисненням останнього, активується за фізіологічних значень рН, регулюється кальмодуліном. Втім його активність резистентна до дії NO [219]. Наші дослідження продемонстрували, що в присутності моноклональних антитіл до LETM1, які пригнічують активність H^+ - Ca^{2+} -обмінника [219], активність mtNOS суттєво знижується (рис. 3.6.).

Отримані результати свідчать на користь тісного зв'язку між системами транспорту (обміну) Ca^{2+} та синтезом оксиду азоту в МХ.

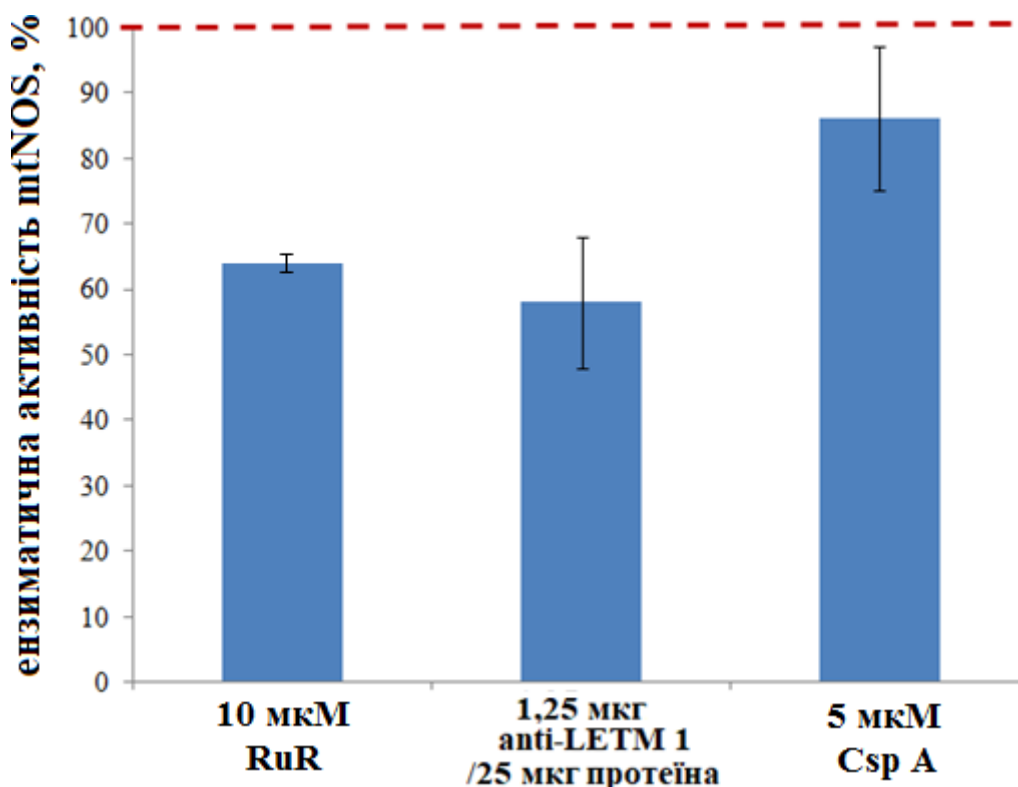


Рис. 3.6. Вплив модуляторів систем Ca^{2+} -обміну в мітохондріях (рутенієвого червоного (RuR), антитіл до протеїну LETM1 та циклоспоринолу (CspA) на активність mtNOS. За 100% прийнята ферментативна активність при відсутності інгібіторів, $M \pm m$, $n=7$.

Також в цій серії досліджень продемонстровано, що блокування mPTP циклоспорином А (Csp A) не приводило до суттєвих змін в активності mtNOS. Таким чином, mPTP не відіграє вагому роль у Ca^{2+} -залежному біосинтезі NO. Втім, як було раніше було продемонстровано [210], NO виявляє протекторну щодо МХ функцію та протидіє їх набуханню, що узгоджується з даними щодо пригнічення оксидом азоту відкриття mPTP шляхом S-нітрозилування її структурних компонентів [60].

Нами припускається, що можливим механізмом ролі іонів K^+ у біосинтезі NO у MX може здійснюватися через вплив на структури, що підтримують Ca^{2+} -гомеостаз. Це ґрунтується на факті, що раніше LETM1 був описаний як протеїн, який здійснює H^+ - K^+ -обмін у BMM [217, 220], що свідчить про тісну функціональну та структурну пов'язаність H^+ - Ca^{2+} - та H^+ - K^+ -обміну, і, як наслідок, вагомий вплив позамітохондрійного K^+ у регуляції концентрації Ca^{2+} у матриксі MX та Ca^{2+} -залежного біосинтезу NO. Тому наступним етапом було створення та перевірка моделі структури H^+ - Ca^{2+} -обмінника MX на основі відомостей про LETM1.

3.5. Моделювання H^+ - Ca^{2+} -обмінника

Зважаючи на те, що в базі RCSB PDB для LETM1 існує тільки одна кристалографічна структура (під кодом доступу 3SKQ), був проведений пошук у базі UniProt і знайдено єдину структуру (код доступу MDM38), що має перехресне посилання на будову 3SKQ.

Деякі цікаві нюанси підштовхнули нас до рішення моделювати будову H^+ - Ca^{2+} -обмінника на основі знайдених структур, зокрема: під час виділення протеїну та дослідження рентгеноструктурним аналізом до складу лігандів 3SKQ кокрystalізувались йони K^+ , а в базі даних UniProt за даними TCDB (Transporter Classification Database) MDM38 класифіковано до родини H^+ - K^+ - та H^+ - Ca^{2+} -обмінників BMM.

Амінокислотна послідовність MDM38 нами була поділена на дві частини, кожна з яких включала область перекривання із кристалічними даними 3SKQ та з використанням ресурсу Robetta Bakerlab отримані прогнозовані структури для кожної послідовності. На основі протилежного взаєморозташування N- та C-кінців та наявності подібної будови мембранного домену, а також оцінки похибки позиції амінокислот було відібрано дві моделі (для ланцюга 1 – модель №2 методу *ab initio only*, для ланцюга 2 – модель №2 комбінованого методу) (рис. 3.7. (А)) та в подальшому накладені в точці найменшого RMSD (Å), що становило 0.240 для ASP393 (ланцюг моделі 1) та відповідно ASP234 (ланцюг моделі 2) (рис. 3.7. (Б,В)).

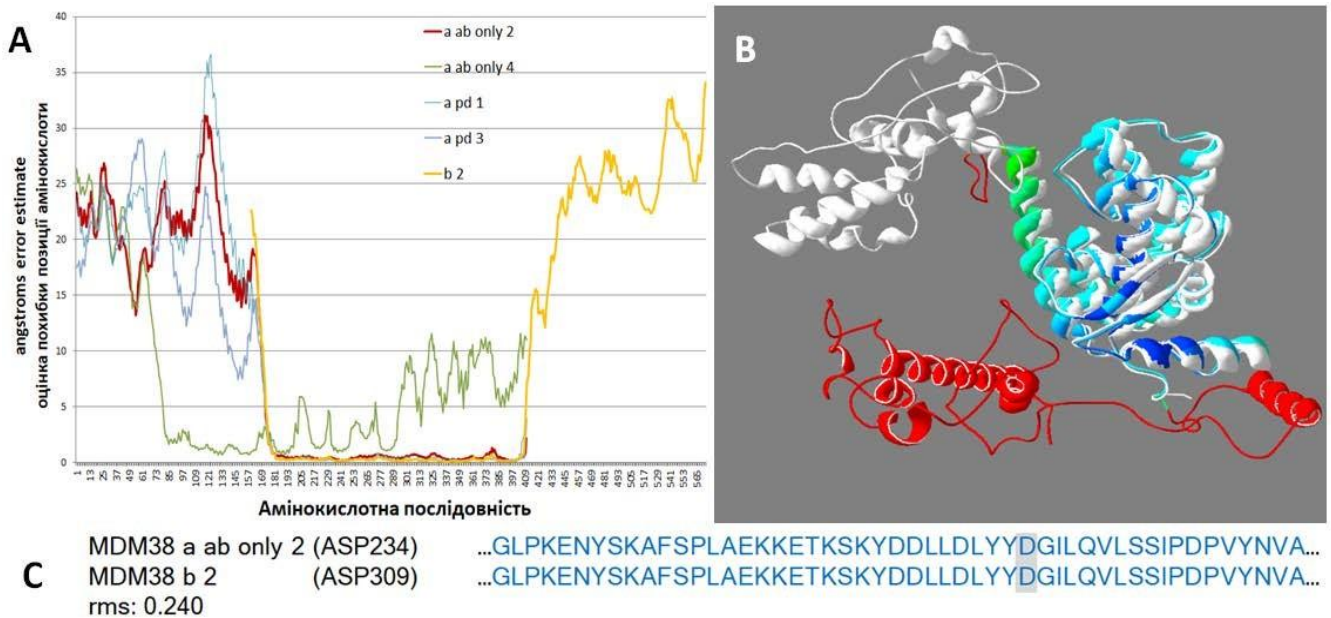


Рис. 3.7. Створення моделі H^+ - Ca^{2+} -обмінника: А – Порівняльні дані оцінки похибки позицій амінокислот (angstroms error estimate) різних моделей прогнозування структур для ланцюгів 1 (а) та 2 (б) з використанням комбінованого режиму, *ab initio only* (ab only) та *predict domains* (pd). Ресурс *Robetta Bakerlab*. В – Модель накладання ланцюгів 1(білий) та 2(кольоровий), забарвлення на основі значень *RMSD* вирівнювання. Програма *Swiss PDB Viewer*. С – Дані *RMSD* внаслідок вирівнювання послідовностей.

Відомо, що покращення технологій та силових полів для молекулярної динаміки дозволили імітувати поведінку мембранних білків, а моделювання мембранних білків може бути використане в різних цілях: як підтверджуючий доказ експериментальних результатів, для з'ясування білкових механізмів, перевірки кристалічних структур білка та взаємодій білок-мембрана [225, 226]. Зокрема, підтверджена доцільність та ефективність симуляції динаміки білків програмою GROMACS [227].

Тому наступним етапом моделювання H^+ - Ca^{2+} -обмінника було вбудування його в біліпідний шар мембрани (рис. 3.8.) та проведення молекулярної динаміки в силовому полі CHARMM36m на основі вихідних файлів, отриманих попередньою підготовкою в програмі CHARMM-GUI Membrane Builder [228]. Концентрація йонів KCl становила 0.15 М, модель води TIP3P. До складу мембрани входили наступні ліпіди: холестерол (Chol), 1-пальмітоїл-2-олеоїл-sn-гліцери-3-фосфоетаноламін (POPE) та пальмітоїлсфінгомелін (PSM). Тривалість динаміки становила 20 нс.

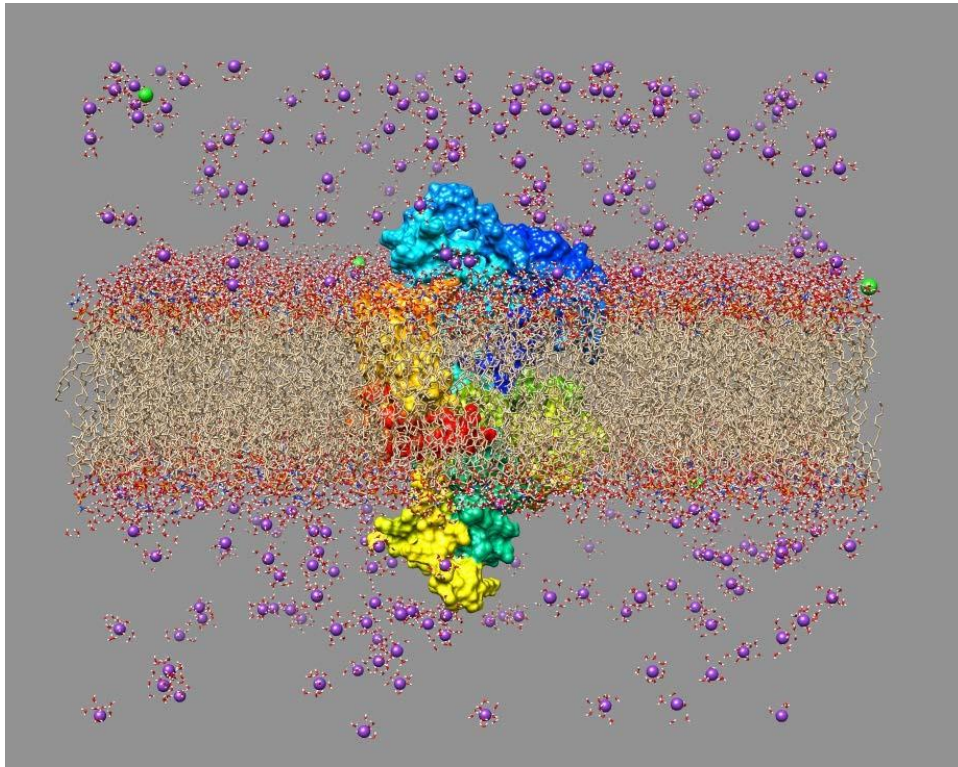


Рис. 3.8. Модель вбудованого білка в біліпідний шар мембрани. Програма для візуалізації - UCSF Chimera 1.15

Дані потенційної (рис. 3.9. А) та повної енергії (графічні дані не наведено) вказують на те, що протягом певного часу система виходить на рівень плато, що свідчить про її стабільність та є підтвердженням можливості існування такої моделі в мембрані.

В процесі динаміки спостерігається вигідна енергетика взаємодії H^+ - Ca^{2+} -обмінника з модельованим середовищем. Водночас після періоду релаксації (що становив приблизно 2 нс як для невалентних внутрішньобілкових взаємодій, так і для взаємодій білок-оточення) енергія білка також стабілізувалась (рис. 3.9. В).

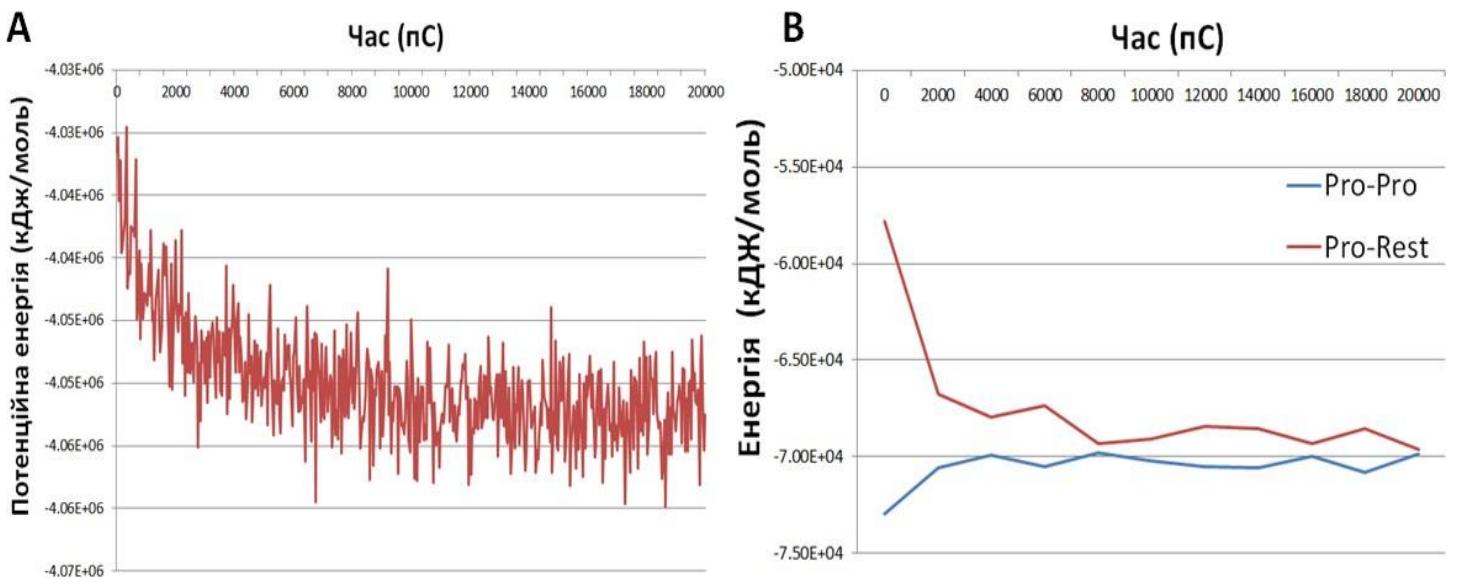


Рис.3.9. Зміна енергії системи в процесі обрахунку молекулярної динаміки. А – Потенційна енергія всієї системи протягом 20 нс, В – енергія невалентних взаємодій між системами, де Pro-Pro – внутрішні білок-білкові взаємодії, Pro-Rest – зовнішні взаємодії білка з середовищем.

Під час візуального огляду змін, що відбулися із H^+ - Ca^{2+} -обмінником, можна зробити висновок, що N-кінець та C-кінець зблизились (рис. 3.10. В), тим самим глибше занурившись в мембрану. Цьому відповідають і дані середньоквадратичних змін в атомах основного амінокислотного ланцюга (mainchain) (рис. 3.10. А). В той час на обох графічних даних спостерігається стабільне положення домену, що відповідає LETM1.

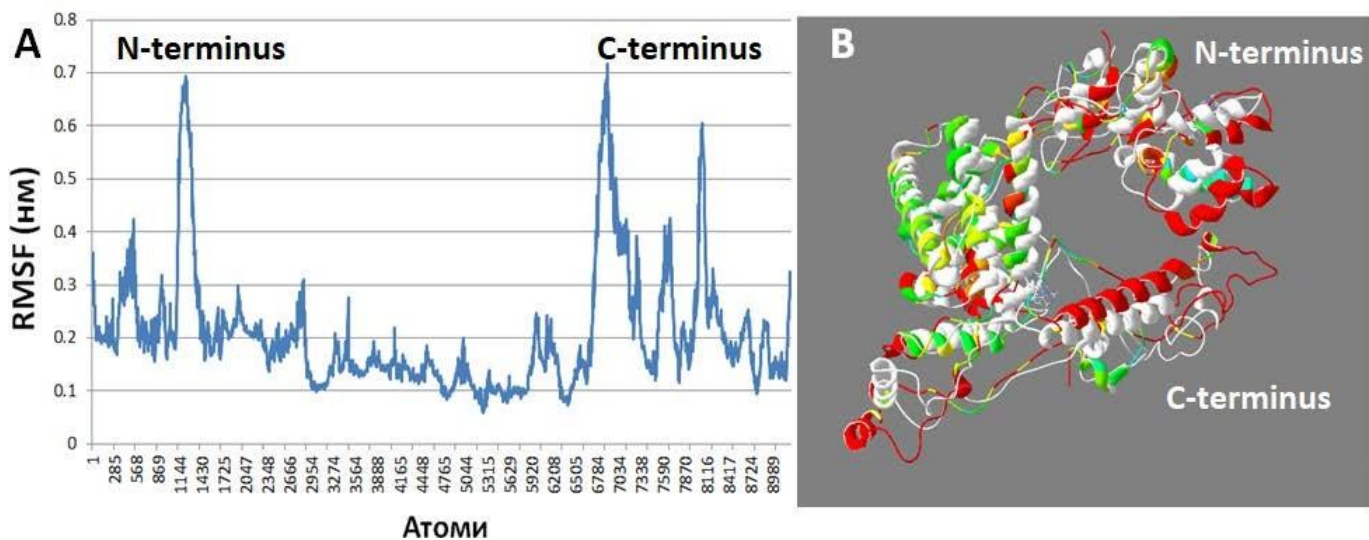


Рис. 3.10. А – Дані середньоквадратичних значень флуктуацій (RMSF) для атомів основного ланцюга білка в результаті динаміки, В – візуалізація накладання початкової моделі (білий) та структури після обрахунку молекулярної динаміки (кольоровий).

Якщо забарвити вандерваальсову поверхню елементів вторинної структури на предмет гідрофобності, спостерігається експонування відносно великої площі гідروفільних залишків назовні, тим не менше в процесі динаміки досліджувана модель обмінника залишається зв'язаною з мембраною, компактизується, а енергія зменшується та зрештою виходить на плато.

Отже, ще раз підтверджується своєрідна неоднозначність в уявленні про те, яким механізмом забезпечується функціонування H^+ - Ca^{2+} -обмінника, що має впливати із його будови. Тому незамінним у визначенні достовірних фактів про цю структуру залишається експериментальне встановлення його будови.

Таким чином, нами було вперше побудовано модель H^+ - Ca^{2+} -обмінника в мембранному бішарі на основі кристалографічної структури домена LETM1 та передбачених доменів, а також проведено симуляцію молекулярної динаміки й тим самим підтверджено енергетичну стабільність системи в наближеному до фізіологічних умов середовищі.

ВИСНОВКИ

1. З використанням методу лазерної конфокальної мікроскопії та методології солокалізації флуоресцентних зондів (мітохондрійного барвника MitoTracker Orange та NO-чутливого DAF-FM) доведено, що мітохондрії в гладеньком'язових клітинах матки можуть бути джерелом синтезу оксиду азоту.

2. Для надійного тестування біосинтезу NO в ізольованих мітохондріях у складі реакційного середовища мають бути присутні L-аргінін, Ca^{2+} , NADPH та NH_4 .

3. Активність mtNOS суттєво залежить від концентрації екзогенного K^+ в середовищі інкубації та пригнічується в присутності інгібіторів K^+ -каналів тетраетиламонія, 4-амінопіридина, глібенкламіда та харібдотоксина.

4. Активність mtNOS пригнічується інгібіторами конститутивних Ca^{2+} -залежних NO-синтаз - N^{G} -нітро-L-аргініном та 2-амінопіридином.

5. В присутності блокатора Ca^{2+} -уніпортера рутенієвого червоного та антитіл до протеїну LETM1, який репрезентує H^+ - Ca^{2+} -обмінник, інтенсивність синтезу NO знижується.

6. Створена на основі структури LETM1 модель H^+ - Ca^{2+} -обмінника стабільна в ліпідному бішарі та енергетично вигідна в реконструйованих умовах.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Checchetto V, Prosdocimi E, Leanza L. Mitochondrial Kv1.3: a New Target in Cancer Biology? *Cell Physiol Biochem*. 2019;53(S1):52-62. doi: 10.33594/000000195
2. Duchen MR. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol*. 2000 Nov 15;529 Pt 1(Pt 1):57-68. doi: 10.1111/j.1469-7793.2000.00057.x
3. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*. 1999 Feb 4;397(6718):441-6. doi: 10.1038/17135
4. Andersson SG, Zomorodipour A, Andersson JO, Sicheritz-Pontén T, Alsmark UC. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature*. 1998 Nov 12;396(6707):133-40. doi: 10.1038/24094
5. Ryan MT, Hoogenraad NJ. Mitochondrial-nuclear communications. *Annu Rev Biochem*. 2007;76:701-22. doi: 10.1146/annurev.biochem.76.052305.091720
6. Traaseth N, Elfering S, Solien J, Haynes V, Giulivi C. Role of calcium signaling in the activation of mitochondrial nitric oxide synthase and citric acid cycle. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Jul 23;1658(1-2):64-71. doi: 10.1016/j.bbabbio.2004.04.015
7. Schapira AH. Mitochondrial diseases. *Lancet*. 2012 May 12;379(9828):1825-34. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61305-6
8. Azzone GF, Petronilli V, Zoratti M. 'Cross-talk' between redox- and ATP-driven H⁺ pumps. *Biochem Soc Trans*. 1984 Jun;12(3):414-6. doi: 10.1042/bst0120414
9. Nicholls D. *Bioenergetics 4th Edition*. ISBN: 9780123884251
10. Szabo I, Zoratti M. Mitochondrial channels: ion fluxes and more. *Physiol Rev*. 2014 Apr;94(2):519-608. doi: 10.1152/physrev.00021.2013

11. Hoogenboom BW, Suda K, Engel A, Fotiadis D. The supramolecular assemblies of voltage-dependent anion channels in the native membrane. *J Mol Biol.* 2007 Jul 6;370(2):246-55. doi: 10.1016/j.jmb.2007.04.073
12. Blachly-Dyson E, Forte M. VDAC channels. *IUBMB Life.* 2001 Sep-Nov;52(3-5):113-8. doi: 10.1080/15216540152845902
13. Malia TJ, Wagner G. NMR structural investigation of the mitochondrial outer membrane protein VDAC and its interaction with antiapoptotic Bcl-xL. *Biochemistry.* 2007 Jan 16;46(2):514-25. doi: 10.1021/bi061577h
14. Hiller S, Abramson J, Mannella C, Wagner G, Zeth K. The 3D structures of VDAC represent a native conformation. *Trends Biochem Sci.* 2010 Sep;35(9):514-21. doi: 10.1016/j.tibs.2010.03.005
15. Colombini M, Blachly-Dyson E, Forte M. VDAC, a channel in the outer mitochondrial membrane. *Ion Channels.* 1996;4:169-202. doi: 10.1007/978-1-4899-1775-1_5
16. Shoshan-Barmatz V, Gincel D. The voltage-dependent anion channel: characterization, modulation, and role in mitochondrial function in cell life and death. *Cell Biochem Biophys.* 2003;39(3):279-92. doi: 10.1385/CBB:39:3:279
17. Gupta R, Ghosh S. Phosphorylation of voltage-dependent anion channel by c-Jun N-terminal Kinase-3 leads to closure of the channel. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Mar 27;459(1):100-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.077
18. Marchi S, Pinton P. The mitochondrial calcium uniporter complex: molecular components, structure and physiopathological implications. *The Journal of Physiology.* 592 (5): 829–39. 2014. doi:10.1113/jphysiol.2013.268235
19. Bermont F, Hermant A, Benninga R, Chabert C. Targeting Mitochondrial Calcium Uptake with the Natural Flavonol Kaempferol, to Promote Metabolism/Secretion Coupling in Pancreatic β -cells. *Nutrients.* 2020 Feb 19;12(2):538. doi: 10.3390/nu12020538
20. Nathan SR, Wilson JJ. Synthesis and Evaluation of a Ruthenium-based Mitochondrial Calcium Uptake Inhibitor. *J Vis Exp.* 2017 Oct 26;(128):56527. doi: 10.3791/56527

21. Liu JC, Parks RJ, Liu J, Stares J, Rovira II, Murphy E, Finkel T. The In Vivo Biology of the Mitochondrial Calcium Uniporter. *Adv Exp Med Biol.* 2017;982:49-63. doi: 10.1007/978-3-319-55330-6_3
22. Buntinas L, Gunter KK, Sparagna GC, Gunter TE. The rapid mode of calcium uptake into heart mitochondria (RaM): comparison to RaM in liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 2001 Apr 2;1504(2-3):248-61. doi: 10.1016/s0005-2728(00)00254-1
23. Rizzuto R, Marchi S, Bonora M, Aguiari P, Bononi A, De Stefani D. Ca(2+) transfer from the ER to mitochondria: when, how and why. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Nov;1787(11):1342-51. doi: 10.1016/j.bbabi.2009.03.015
24. Cali T, Ottolini D, Brini M. Mitochondrial Ca(2+) as a key regulator of mitochondrial activities. *Adv Exp Med Biol.* 2012;942:53-73. doi: 10.1007/978-94-007-2869-1_3
25. Hoppe UC. Mitochondrial calcium channels. *FEBS Lett.* 2010 May 17;584(10):1975-81. doi: 10.1016/j.febslet.2010.04.017
26. Ryu SY, Beutner G, Dirksen RT, Kinnally KW, Sheu SS. Mitochondrial ryanodine receptors and other mitochondrial Ca²⁺ permeable channels. *FEBS Lett.* 2010 May 17;584(10):1948-55. doi: 10.1016/j.febslet.2010.01.032
27. Santo-Domingo J, Wiederkehr A, De Marchi U. Modulation of the matrix redox signaling by mitochondrial Ca(2+). *World J Biol Chem.* 2015 Nov 26;6(4):310-23. doi: 10.4331/wjbc.v6.i4.310
28. Feissner RF, Skalska J, Gaum WE, Sheu SS. Crosstalk signaling between mitochondrial Ca²⁺ and ROS. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2009 Jan 1;14:1197-218. doi: 10.2741/3303
29. Pan S, Ryu SY, Sheu SS. Distinctive characteristics and functions of multiple mitochondrial Ca²⁺ influx mechanisms. *Sci China Life Sci.* 2011 Aug;54(8):763-9. doi: 10.1007/s11427-011-4203-9
30. William E, Stansfield MD, Monte S. The Pathophysiology of Cardiac Hypertrophy and Heart Failure. *Cellular and Molecular Pathobiology of Cardiovascular Disease*, 2014

31. Schinder AF, Olson EC, Spitzer NC, Montal M. Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. *J Neurosci*. 1996 Oct 1;16(19):6125-33. doi: 10.1523/JNEUROSCI.16-19-06125.1996
32. White RJ, Reynolds IJ. Mitochondrial depolarization in glutamate-stimulated neurons: an early signal specific to excitotoxin exposure. *J Neurosci*. 1996 Sep 15;16(18):5688-97. doi: 10.1523/JNEUROSCI.16-18-05688
33. Stavrovskaya IG, Kristal BS. The powerhouse takes control of the cell: is the mitochondrial permeability transition a viable therapeutic target against neuronal dysfunction and death? *Free Radic Biol Med*. 2005 Mar 15;38(6):687-97. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.11.032
34. Samantaray S, Knaryan VH, Shields DC, Cox AA, Haque A, Banik NL. Inhibition of Calpain Activation Protects MPTP-Induced Nigral and Spinal Cord Neurodegeneration, Reduces Inflammation, and Improves Gait Dynamics in Mice. *Mol Neurobiol*. 2015 Oct;52(2):1054-66. doi: 10.1007/s12035-015-9255-6
35. Luetjens, C. M.; Bui, N. T.; Sengpiel, B.; Münstermann, G.; Poppe, M.; Krohn, A. J.; Bauerbach, E.; Kriegstein, J.; Prehn, J. H. (2000). "Delayed mitochondrial dysfunction in excitotoxic neuron death: Cytochrome c release and a secondary increase in superoxide production". *The Journal of Neuroscience*. 20 (15): 5715–5723. doi:10.1523/JNEUROSCI.20-15-05715.2000. PMC 6772544. PMID 10908611
36. Rottenberg H, Hoek JB. The Mitochondrial Permeability Transition: Nexus of Aging, Disease and Longevity. *Cells*. 2021 Jan 6;10(1):79. doi: 10.3390/cells10010079
37. Büki A, Okonkwo DO, Wang KK, Povlishock JT. Cytochrome c release and caspase activation in traumatic axonal injury. *J Neurosci*. 2000 Apr 15;20(8):2825-34. doi: 10.1523/JNEUROSCI.20-08-02825.2000
38. Chinopoulos C, Starkov AA, Fiskum G. Cyclosporin A-insensitive permeability transition in brain mitochondria: inhibition by 2-aminoethoxydiphenyl borate. *J Biol Chem*. 2003 Jul 25;278(30):27382-9. doi: 10.1074/jbc.M303808200.

39. Marín-García J. (2013) Mitochondrial Structure, Composition, and Dynamics. In: Mitochondria and Their Role in Cardiovascular Disease. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4599-9_3
40. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002 Jan;82(1):47-95. doi: 10.1152/physrev.00018.2001
41. Sabharwal SS, Schumacker PT. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nat Rev Cancer.* 2014 Nov;14(11):709-21. doi: 10.1038/nrc3803.
42. Szabó I, Bock J, Grassmé H, Soddemann M, Wilker B, Lang F, Zoratti M, Gulbins E. Mitochondrial potassium channel Kv1.3 mediates Bax-induced apoptosis in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Sep 30;105(39):14861-6. doi: 10.1073/pnas.0804236105.
43. Bachmann M, Costa R, Peruzzo R, Prosdocimi E, Checchetto V, Leanza L. Targeting Mitochondrial Ion Channels to Fight Cancer. *Int J Mol Sci.* 2018 Jul 15;19(7):2060. doi: 10.3390/ijms19072060.
44. Gulbins E, Sassi N, Grassmè H, Zoratti M, Szabò I. Role of Kv1.3 mitochondrial potassium channel in apoptotic signalling in lymphocytes. *BiochimBiophys Acta.* 2010 Jun-Jul;1797(6-7):1251-9. doi: 10.1016/j.bbabi.2010.01.018
45. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* 2000 Jul 7;102(1):33-42. doi: 10.1016/s0092-8674(00)00008-8.
46. van Loo G, Saelens X, van Gurp M, MacFarlane M, Martin SJ, Vandenabeele P. The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ.* 2002 Oct;9(10):1031-42. doi: 10.1038/sj.cdd.4401088
47. Chinnaiyan AM. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia.* 1999 Apr;1(1):5-15. doi: 10.1038/sj.neo.7900003
48. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer.* 2002 Sep;2(9):647-56. doi: 10.1038/nrc883

49. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*. 1997 Feb 21;275(5303):1132-6. doi: 10.1126/science.275.5303.1132.
50. Cosulich SC, Worrall V, Hedge PJ, Green S, Clarke PR. Regulation of apoptosis by BH3 domains in a cell-free system. *Curr Biol*. 1997 Dec 1;7(12):913-20. doi: 10.1016/s0960-9822(06)00410-6
51. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*. 2001 Mar 29;410(6828):549-54. doi: 10.1038/35069004.
52. Tengan CH, Moraes CT. NO control of mitochondrial function in normal and transformed cells. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*. 2017 Aug;1858(8):573-581. doi: 10.1016/j.bbabi.2017.02.009.
53. Toledo JC Jr, Augusto O. Connecting the chemical and biological properties of nitric oxide. *Chem Res Toxicol*. 2012 May 21;25(5):975-89. doi: 10.1021/tx300042g
54. Dudzinski DM, Igarashi J, Greif D, Michel T. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2006;46:235-76. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121844
55. Haynes V, Elfering S, Traaseth N, Giulivi C. Mitochondrial nitric-oxide synthase: enzyme expression, characterization, and regulation. *J Bioenerg Biomembr*. 2004 Aug;36(4):341-6. doi: 10.1023/B:JOB.0000041765.27145.08
56. Levine AB, Punhaole D, Levine TB. Characterization of the role of nitric oxide and its clinical applications. *Cardiology*. 2012;122(1):55-68. doi: 10.1159/000338150
57. Treuer AV, Gonzalez DR. Nitric oxide synthases, S-nitrosylation and cardiovascular health: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Mol Med Rep*. 2015 Mar;11(3):1555-65. doi: 10.3892/mmr.2014.2968
58. Durán WN, Breslin JW, Sánchez FA. The NO cascade, eNOS location, and microvascular permeability. *Cardiovasc Res*. 2010 Jul 15;87(2):254-61. doi: 10.1093/cvr/cvq139

59. Buxton IL. Regulation of uterine function: a biochemical conundrum in the regulation of smooth muscle relaxation. *Mol Pharmacol*. 2004 May;65(5):1051-9. doi: 10.1124/mol.65.5.1051
60. Leite AC, Oliveira HC, Utino FL, Garcia R, Alberici LC. Mitochondria generated nitric oxide protects against permeability transition via formation of membrane protein S-nitrosothiols. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Jun-Jul;1797(6-7):1210-6. doi: 10.1016/j.bbabi.2010.01.034
61. Davidson SM, Duchon MR. Effects of NO on mitochondrial function in cardiomyocytes: Pathophysiological relevance. *Cardiovasc Res*. 2006 Jul 1;71(1):10-21. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.01.019
62. Mutchler SM, Straub AC. Compartmentalized nitric oxide signaling in the resistance vasculature. *Nitric Oxide*. 2015 Sep 15;49:8-15. doi: 10.1016/j.niox.2015.05.003
63. Kovalyov IV, Baskakov MB, Kapilevich LV, Medvedev MA. Role of nitric oxide in the regulation of electrical and contractive activity of unstriated muscles. *Bull Sibir Med*. 2004; 1: 7-26. (In Russian)
64. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012 Apr;33(7):829-37, 837a-837d. doi: 10.1093/eurheartj/ehr304
65. Haynes V, Elfering SL, Squires RJ, Traaseth N, Solien J, Ettl A, Giulivi C. Mitochondrial nitric-oxide synthase: role in pathophysiology. *IUBMB Life*. 2003 Oct-Nov;55(10-11):599-603. doi: 10.1080/15216540310001628681
66. Komeima K, Hayashi Y, Naito Y, Watanabe Y. Inhibition of neuronal nitric-oxide synthase by calcium/ calmodulin-dependent protein kinase IIalpha through Ser847 phosphorylation in NG108-15 neuronal cells. *J Biol Chem*. 2000 Sep 8;275(36):28139-43. doi: 10.1074/jbc.M003198200
67. Zaobornyj T, Ghafourifar P. Strategic localization of heart mitochondrial NOS: a review of the evidence. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012 Dec 1;303(11):H1283-93. doi: 10.1152/ajpheart.00674.2011
68. Elfering SL, Sarkela TM, Giulivi C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*. 2002 Oct 11;277(41):38079-86. doi: 10.1074/jbc.M205256200

69. Nisoli E, Carruba MO. Nitric oxide and mitochondrial biogenesis. *J Cell Sci.* 2006 Jul 15;119(Pt 14):2855-62. doi: 10.1242/jcs.03062
70. Giulivi C, Kato K, Cooper CE. Nitric oxide regulation of mitochondrial oxygen consumption I: cellular physiology. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006 Dec;291(6):C1225-31. doi: 10.1152/ajpcell.00307.2006
71. Tengan CH, Rodrigues GS, Godinho RO. Nitric oxide in skeletal muscle: role on mitochondrial biogenesis and function. *Int J Mol Sci.* 2012 Dec 14;13(12):17160-84. doi: 10.3390/ijms131217160
72. Piantadosi CA, Suliman HB. Redox regulation of mitochondrial biogenesis. *Free Radic Biol Med.* 2012 Dec 1;53(11):2043-53. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.014
73. Christopherson KS, Hillier BJ, Lim WA, Bredt DS. PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. *J Biol Chem.* 1999 Sep 24;274(39):27467-73. doi: 10.1074/jbc.274.39.27467
74. Carreras MC, Poderoso JJ. Mitochondrial nitric oxide in the signaling of cell integrated responses. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007 May;292(5):C1569-80. doi: 10.1152/ajpcell.00248.2006
75. Ghafourifar P, Cadenas E. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci.* 2005 Apr;26(4):190-5. doi: 10.1016/j.tips.2005.02.005
76. Ghimire K, Altmann HM, Straub AC, Isenberg JS. Nitric oxide: what's new to NO? *Am J Physiol Cell Physiol.* 2017 Mar 1;312(3):C254-C262. doi: 10.1152/ajpcell.00315.2016
77. Boveris A. Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide. *Adv Exp Med Biol.* 1977;78:67-82. doi: 10.1007/978-1-4615-9035-4_5
78. Brown GC, Borutaite V. Nitric oxide and mitochondrial respiration in the heart. *Cardiovasc Res.* 2007 Jul 15;75(2):283-90. doi: 10.1016/j.cardiores.2007.03.022
79. Litvinova L, Atochin DN, Fattakhov N, Vasilenko M, Zatolokin P, Kirienkova E. Nitric oxide and mitochondria in metabolic syndrome. *Front Physiol.* 2015 Feb 17;6:20. doi: 10.3389/fphys.2015.00020

80. Salem MM, Shalhaf M, Gibbons NC, Chavan B. Enhanced DNA binding capacity on up-regulated epidermal wild-type p53 in vitiligo by H₂O₂-mediated oxidation: a possible repair mechanism for DNA damage. *FASEB J*. 2009 Nov;23(11):3790-807. doi: 10.1096/fj.09-132621
81. Demicheli V, Moreno DM, Jara GE, Lima A, Carballal S, Ríos N. Mechanism of the Reaction of Human Manganese Superoxide Dismutase with Peroxynitrite: Nitration of Critical Tyrosine 34. *Biochemistry*. 2016 Jun 21;55(24):3403-17. doi: 10.1021/acs.biochem.6b00045
82. Tórtora V, Quijano C, Freeman B, Radi R, Castro L. Mitochondrial aconitase reaction with nitric oxide, S-nitrosoglutathione, and peroxynitrite: mechanisms and relative contributions to aconitase inactivation. *Free Radic Biol Med*. 2007 Apr 1;42(7):1075-88. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.007
83. Gong L, Liu FQ, Wang J, Wang XP, Hou XG, Sun Y. Hyperglycemia induces apoptosis of pancreatic islet endothelial cells via reactive nitrogen species-mediated Jun N-terminal kinase activation. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Jun;1813(6):1211-9. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.03.011
84. Radi R, Cassina A, Hodara R. Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. *Biol Chem*. 2002 Mar-Apr;383(3-4):401-9. doi: 10.1515/BC.2002.044
85. Kuang Q, Purhonen P, Hebert H. Structure of potassium channels. *Cell Mol Life Sci*. 2015 Oct;72(19):3677-93. doi: 10.1007/s00018-015-1948-5.
86. MacKinnon R. Potassium channels. *FEBS Lett*. 2003 Nov 27;555(1):62-5. doi: 10.1016/s0014-5793(03)01104-9.
87. Vadziuk OB. ATP-sensitive K(+) -channels in muscle cells: features and physiological role. *Ukr Biochem J*. 2014 May-Jun;86(3):5-22.
88. Stephanova DI, Mileva K. Different effects of blocked potassium channels on action potentials, accommodation, adaptation and anode break excitation in human motor and sensory myelinated nerve fibres: computer simulations. *Biol Cybern*. 2000 Aug;83(2):161-7. doi: 10.1007/s004220000151

89. Edwards G, Weston AH. Structure-activity relationships of K⁺ channel openers. *Trends Pharmacol Sci.* 1990 Oct;11(10):417-22. doi: 10.1016/0165-6147(90)90149-3
90. Shieh CC, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev.* 2000 Dec;52(4):557-94
91. Tamargo J, Caballero R, Gómez R, Valenzuela C, Delpón E. Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res.* 2004 Apr 1;62(1):9-33. doi: 10.1016/j.cardiores.2003.12.026
92. Straub SV, Nelson MT. A spoonful of sugar helps the KV channel activity go down. *J Physiol.* 2006 Sep 15;575(Pt 3):691. doi: 10.1113/jphysiol.2006.118091
93. Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev.* 2005 Dec;57(4):473-508. doi: 10.1124/pr.57.4.10
94. Szabò I, Bock J, Jekle A, Soddemann M, Adams C, Lang F, Zoratti M, Gulbins E. A novel potassium channel in lymphocyte mitochondria. *J Biol Chem.* 2005 Apr 1;280(13):12790-8. doi: 10.1074/jbc.M413548200
95. Zoratti M, De Marchi U, Gulbins E, Szabò I. Novel channels of the inner mitochondrial membrane. *Biochim Biophys Acta.* 2009 May;1787(5):351-63. doi: 10.1016/j.bbabi.2008.11.015
96. Jang SH, Kang KS, Ryu PD, Lee SY. Kv1.3 voltage-gated K(+) channel subunit as a potential diagnostic marker and therapeutic target for breast cancer. *BMB Rep.* 2009 Aug 31;42(8):535-9. doi: 10.5483/bmbrep.2009.42.8.535
97. Zhu J, Yan J, Thornhill WB. The Kv1.3 potassium channel is localized to the cis-Golgi and Kv1.6 is localized to the endoplasmic reticulum in rat astrocytes. *FEBS J.* 2014 Aug;281(15):3433-45. doi: 10.1111/febs.12871
98. Prosdocimi E, Checchetto V, Leanza L. Targeting the Mitochondrial Potassium Channel Kv1.3 to Kill Cancer Cells: Drugs, Strategies, and New Perspectives. *SLAS Discov.* 2019 Oct;24(9):882-892. doi: 10.1177/2472555219864894

99. Ren YR, Pan F, Parvez S, Fleig A, Chong CR, Xu J, Dang Y, Zhang J, Jiang H, Penner R, Liu JO. Clofazimine inhibits human Kv1.3 potassium channel by perturbing calcium oscillation in T lymphocytes. *PLoS One*. 2008;3(12):e4009. doi: 10.1371/journal.pone.0004009
100. Yokoshiki H, Sunagawa M, Seki T, Sperelakis N. ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*. 1998 Jan;274(1):C25-37. doi: 10.1152/ajpcell.1998.274.1.C25
101. Dick GM, Tune JD. Role of potassium channels in coronary vasodilation. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2010 Jan;235(1):10-22. doi: 10.1258/ebm.2009.009201. PMID: 20404014.
102. Wan E, Kushner JS, Zakharov S, Nui XW, Chudasama N, Kelly C, Waase M, Doshi D, Liu G, Iwata S, Shiomi T, Katchman A, D'Armiento J, Homma S, Marx SO. Reduced vascular smooth muscle BK channel current underlies heart failure-induced vasoconstriction in mice. *FASEB J*. 2013 May;27(5):1859-67. doi: 10.1096/fj.12-223511
103. Patel AJ, Honoré E. Molecular physiology of oxygen-sensitive potassium channels. *Eur Respir J*. 2001 Jul;18(1):221-7. doi: 10.1183/09031936.01.00204001
104. Farzaneh T, Tinker A. Differences in the mechanism of metabolic regulation of ATP-sensitive K⁺ channels containing Kir6.1 and Kir6.2 subunits. *Cardiovasc Res*. 2008 Sep 1;79(4):621-31. doi: 10.1093/cvr/cvn138
105. Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev*. 2010 Jan;90(1):291-366. doi: 10.1152/physrev.00021.2009
106. Tucker SJ, Gribble FM, Zhao C, Trapp S, Ashcroft FM. Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K⁺ channels in the absence of the sulphonylurea receptor. *Nature*. 1997 May 8;387(6629):179-83. doi: 10.1038/387179a0
107. Hambrock A, Kayar T, Stumpp D, Osswald H. Effect of two amino acids in TM17 of Sulphonylurea receptor SUR1 on the binding of ATP-sensitive K⁺ channel modulators. *Diabetes*. 2004 Dec;53 Suppl 3:S128-34. doi: 10.2337/diabetes.53.suppl_3.s128

108. Teramoto N. Physiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels in smooth muscle. *J Physiol*. 2006 May 1;572(Pt 3):617-24. doi: 10.1113/jphysiol.2006.105973
109. Crawford RM, Ranki HJ, Botting CH, Budas GR, Jovanovic A. Creatine kinase is physically associated with the cardiac ATP-sensitive K⁺ channel in vivo. *FASEB J*. 2002 Jan;16(1):102-4. doi: 10.1096/fj.01-0466fje
110. Crawford RM, Budas GR, Jovanović S, Ranki HJ, Wilson TJ, Davies AM, Jovanović A. M-LDH serves as a sarcolemmal K(ATP) channel subunit essential for cell protection against ischemia. *EMBO J*. 2002 Aug 1;21(15):3936-48. doi: 10.1093/emboj/cdf388
111. Carrasco AJ, Dzeja PP, Alekseev AE, Pucar D, Zingman LV, Abraham MR, Hodgson D, Bienengraeber M, Puceat M, Janssen E, Wieringa B, Terzic A. Adenylate kinase phosphotransfer communicates cellular energetic signals to ATP-sensitive potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jun 19;98(13):7623-8. doi: 10.1073/pnas.121038198
112. Shi Y, Wu Z, Cui N, Shi W, Yang Y, Zhang X, Rojas A, Ha BT, Jiang C. PKA phosphorylation of SUR2B subunit underscores vascular KATP channel activation by beta-adrenergic receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007 Sep;293(3):R1205-14. doi: 10.1152/ajpregu.00337.2007
113. Xie LH, John SA, Ribalet B, Weiss JN. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) regulation of strong inward rectifier Kir2.1 channels: multilevel positive cooperativity. *J Physiol*. 2008 Apr 1;586(7):1833-48. doi: 10.1113/jphysiol.2007.147868
114. Enkvetchakul D, Nichols CG. Gating mechanism of KATP channels: function fits form. *J Gen Physiol*. 2003 Nov;122(5):471-80. doi: 10.1085/jgp.200308878
115. Paucek P, Mironova G, Mahdi F, Beavis AD, Woldegiorgis G, Garlid KD. Reconstitution and partial purification of the glibenclamide-sensitive, ATP-dependent K⁺ channel from rat liver and beef heart mitochondria. *J Biol Chem*. 1992 Dec 25;267(36):26062-9.
116. Zhang DX, Chen YF, Campbell WB, Zou AP, Gross GJ, Li PL. Characteristics and superoxide-induced activation of reconstituted myocardial mitochondrial

- ATP-sensitive potassium channels. *Circ Res.* 2001 Dec 7;89(12):1177-83. doi: 10.1161/hh2401.101752
117. Jabůrek M, Yarov-Yarovoy V, Paucek P, Garlid KD. State-dependent inhibition of the mitochondrial KATP channel by glyburide and 5-hydroxydecanoate. *J Biol Chem.* 1998 May 29;273(22):13578-82
118. Nakae Y, Kwok WM, Bosnjak ZJ, Jiang MT. Isoflurane activates rat mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels reconstituted in lipid bilayers. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003 May;284(5):H1865-71. doi: 10.1152/ajpheart.01031.2002
119. Inoue I, Nagase H, Kishi K, Higuti T. ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature.* 1991 Jul 18;352(6332):244-7. doi: 10.1038/352244a0
120. Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Sun X, Schindler PA. The mitochondrial KATP channel as a receptor for potassium channel openers. *J Biol Chem.* 1996 Apr 12;271(15):8796-9. doi: 10.1074/jbc.271.15.8796
121. Sato T, Sasaki N, Seharaseyon J, O'Rourke B, Marbán E. Selective pharmacological agents implicate mitochondrial but not sarcolemmal K(ATP) channels in ischemic cardioprotection. *Circulation.* 2000 May 23;101(20):2418-23. doi: 10.1161/01.cir.101.20.2418
122. Grimmsmann T, Rustenbeck I. Direct effects of diazoxide on mitochondria in pancreatic B-cells and on isolated liver mitochondria. *Br J Pharmacol.* 1998 Mar;123(5):781-8. doi: 10.1038/sj.bjp.0701663
123. Lawrence CL, Billups B, Rodrigo GC, Standen NB. The KATP channel opener diazoxide protects cardiac myocytes during metabolic inhibition without causing mitochondrial depolarization or flavoprotein oxidation. *Br J Pharmacol.* 2001 Oct;134(3):535-42. doi: 10.1038/sj.bjp.0704289
124. Katoh H, Nishigaki N, Hayashi H. Diazoxide opens the mitochondrial permeability transition pore and alters Ca²⁺ transients in rat ventricular myocytes. *Circulation.* 2002 Jun 4;105(22):2666-71. doi: 10.1161/01.cir.0000016831.41648.04

125. Nagy K, Kis B, Rajapakse NC, Bari F, Busija DW. Diazoxide preconditioning protects against neuronal cell death by attenuation of oxidative stress upon glutamate stimulation. *J Neurosci Res.* 2004 Jun 1;76(5):697-704. doi: 10.1002/jnr.20120
126. Kowaltowski AJ, Seetharaman S, Paucek P, Garlid KD. Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K(+) channel of heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001 Feb;280(2):H649-57. doi: 10.1152/ajpheart.2001.280.2.H649
127. Holmuhamedov EL, Jahangir A, Oberlin A, Komarov A, Colombini M, Terzic A. Potassium channel openers are uncoupling protonophores: implication in cardioprotection. *FEBS Lett.* 2004 Jun 18;568(1-3):167-70. doi: 10.1016/j.febslet.2004.05.031
128. Szewczyk A, Czyz A, Nałecz MJ. ATP-regulated potassium channel blocker, glibenclamide, uncouples mitochondria. *Pol J Pharmacol.* 1997 Jan-Feb;49(1):49-52
129. Skalska J, Debska G, Kunz WS, Szewczyk A. Antidiabetic sulphonylureas activate mitochondrial permeability transition in rat skeletal muscle. *Br J Pharmacol.* 2005 Jul;145(6):785-91. doi: 10.1038/sj.bjp.0706214
130. Facundo HT, de Paula JG, Kowaltowski AJ. Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels are redox-sensitive pathways that control reactive oxygen species production. *Free Radic Biol Med.* 2007 Apr 1;42(7):1039-48. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.001
131. Costa AD, Quinlan CL, Andrukhiv A, West IC, Jabůrek M, Garlid KD. The direct physiological effects of mitoK(ATP) opening on heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006 Jan;290(1):H406-15. doi: 10.1152/ajpheart.00794.2005
132. Garlid KD, Halestrap AP. The mitochondrial K(ATP) channel--fact or fiction? *J Mol Cell Cardiol.* 2012 Mar;52(3):578-83. doi: 10.1016/j.yjmcc.2011.12.011
133. Garlid KD, Paucek P. Mitochondrial potassium transport: the K(+) cycle. *Biochim Biophys Acta.* 2003 Sep 30;1606(1-3):23-41. doi: 10.1016/s0005-2728(03)00108-7

134. Weaver AK, Bomben VC, Sontheimer H. Expression and function of calcium-activated potassium channels in human glioma cells. *Glia*. 2006 Aug 15;54(3):223-33. doi: 10.1002/glia.20364
135. Miller C. An overview of the potassium channel family. *Genome Biol*. 2000;1(4):REVIEWS0004. doi: 10.1186/gb-2000-1-4-reviews0004
136. Yuan P, Leonetti MD, Pico AR, Hsiung Y, MacKinnon R. Structure of the human BK channel Ca²⁺-activation apparatus at 3.0 Å resolution. *Science*. 2010 Jul 9;329(5988):182-6. doi: 10.1126/science.1190414
137. Lee US, Cui J. BK channel activation: structural and functional insights. *Trends Neurosci*. 2010 Sep;33(9):415-23. doi: 10.1016/j.tins.2010.06.004
138. Hristov KL, Smith AC, Parajuli SP, Malysz J, Petkov GV. Large-conductance voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ channel regulation by protein kinase C in guinea pig urinary bladder smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2014 Mar 1;306(5):C460-70. doi: 10.1152/ajpcell.00325.2013
139. Hermann A, Sitdikova GF, Weiger TM. Oxidative Stress and Maxi Calcium-Activated Potassium (BK) Channels. *Biomolecules*. 2015 Aug 17;5(3):1870-911. doi: 10.3390/biom5031870
140. Wu SN. Large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels: physiological role and pharmacology. *Curr Med Chem*. 2003 Apr;10(8):649-61. doi: 10.2174/0929867033457863
141. Bednarczyk P, Wieckowski MR, Broszkiewicz M, Skowronek K, Siemen D, Szewczyk A. Putative Structural and Functional Coupling of the Mitochondrial BKCa Channel to the Respiratory Chain. *PLoS One*. 2013 Jun 27;8(6):e68125. doi: 10.1371/journal.pone.0068125
142. Queliconi BB, Wojtovich AP, Nadtochiy SM, Kowaltowski AJ, Brookes PS. Redox regulation of the mitochondrial K(ATP) channel in cardioprotection. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Jul;1813(7):1309-15. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.11.005
143. Cheng Y, Gu XQ, Bednarczyk P, Wiedemann FR, Haddad GG, Siemen D. Hypoxia increases activity of the BK-channel in the inner mitochondrial

- membrane and reduces activity of the permeability transition pore. *Cell Physiol Biochem.* 2008;22(1-4):127-36. doi: 10.1159/000149790
144. Raffaello A, De Stefani D, Rizzuto R. The mitochondrial Ca(2+) uniporter. *Cell Calcium.* 2012 Jul;52(1):16-21. doi: 10.1016/j.ceca.2012.04.006
145. Foster DB, Ho AS, Rucker J, Garlid AO, Chen L, Sidor A, Garlid KD, O'Rourke B. Mitochondrial ROMK channel is a molecular component of mitoK(ATP). *Circ Res.* 2012 Aug 3;111(4):446-54. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.266445
146. Soltysinska E, Bentzen BH, Barthmes M, Hattel H, Thrush AB, Harper ME. KCNMA1 encoded cardiac BK channels afford protection against ischemia-reperfusion injury. *PLoS One.* 2014 Jul 29;9(7):e103402. doi: 10.1371/journal.pone.0103402
147. Singh H, Lu R, Bopassa JC, Meredith AL, Stefani E, Toro L. MitoBK(Ca) is encoded by the *Kcnma1* gene, and a splicing sequence defines its mitochondrial location. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Jun 25;110(26):10836-41. doi: 10.1073/pnas.1302028110
148. Laskowski M, Augustynek B, Kulawiak B, Koprowski P, Bednarczyk P, Jarmuszkiewicz W, Szewczyk A. What do we not know about mitochondrial potassium channels? *Biochim Biophys Acta.* 2016 Aug;1857(8):1247-1257. doi: 10.1016/j.bbabi.2016.03.007
149. Heinen A, Aldakkak M, Stowe DF, Rhodes SS, Riess ML, Varadarajan SG, Camara AK. Reverse electron flow-induced ROS production is attenuated by activation of mitochondrial Ca²⁺-sensitive K⁺ channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007 Sep;293(3):H1400-7. doi: 10.1152/ajpheart.00198.2007
150. Шуба Я. М. Основи молекулярної фізіології іонних каналів. – К.: Наукова думка, 2010. – 446 с. ISBN 978-966-00-1042-0
151. Enyedi P, Czirják G. Molecular background of leak K⁺ currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol Rev.* 2010 Apr;90(2):559-605. doi: 10.1152/physrev.00029.2009
152. Ashmole I, Vavoulis DV, Stansfeld PJ, Mehta PR, Feng JF, Sutcliffe MJ, Stanfield PR. The response of the tandem pore potassium channel TASK-3

- (K(2P)9.1) to voltage: gating at the cytoplasmic mouth. *J Physiol.* 2009 Oct 15;587(Pt 20):4769-83. doi: 10.1113/jphysiol.2009.175430. Epub 2009 Aug 24
153. Kim Y, Bang H, Kim D. TASK-3, a new member of the tandem pore K(+) channel family. *J Biol Chem.* 2000 Mar 31;275(13):9340-7. doi: 10.1074/jbc.275.13.9340
154. Clarke CE, Veale EL, Wyse K, Vandenberg JI, Mathie A. The M1P1 loop of TASK3 K2P channels apposes the selectivity filter and influences channel function. *J Biol Chem.* 2008 Jun 20;283(25):16985-92. doi: 10.1074/jbc.M801368200
155. Musset B, Meuth SG, Liu GX, Derst C, Wegner S, Pape HC, Budde T, Preisig-Müller R, Daut J. Effects of divalent cations and spermine on the K⁺ channel TASK-3 and on the outward current in thalamic neurons. *J Physiol.* 2006 May 1;572(Pt 3):639-57. doi: 10.1113/jphysiol.2006.106898
156. Czirják G, Enyedi P. Ruthenium red inhibits TASK-3 potassium channel by interconnecting glutamate 70 of the two subunits. *Mol Pharmacol.* 2003 Mar;63(3):646-52. doi: 10.1124/mol.63.3.646
157. Patel AJ, Lazdunski M. The 2P-domain K⁺ channels: role in apoptosis and tumorigenesis. *Pflugers Arch.* 2004 Jun;448(3):261-73. doi: 10.1007/s00424-004-1255-8
158. Pei L, Wisner O, Slavin A, Mu D, Powers S, Jan LY, Hoey T. Oncogenic potential of TASK3 (Kcnk9) depends on K⁺ channel function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jun 24;100(13):7803-7. doi: 10.1073/pnas.1232448100
159. Rusznák Z, Bakondi G, Kosztka L, Pocsai K, Dienes B, Fodor J, Telek A, Gönczi M, Szucs G, Csernoch L. Mitochondrial expression of the two-pore domain TASK-3 channels in malignantly transformed and non-malignant human cells. *Virchows Arch.* 2008 Apr;452(4):415-26. doi: 10.1007/s00428-007-0545-x
160. Kosztka L, Rusznák Z, Nagy D, Nagy Z, Fodor J, Szucs G. Inhibition of TASK-3 (KCNK9) channel biosynthesis changes cell morphology and decreases both DNA content and mitochondrial function of melanoma cells maintained in cell culture. *Melanoma Res.* 2011 Aug;21(4):308-22. doi: 10.1097/CMR.0b013e3283462713

161. Toczyłowska-Mamińska R, Olszewska A, Laskowski M, Bednarczyk P, Skowronek K, Szewczyk A. Potassium channel in the mitochondria of human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2014 Mar;134(3):764-772. doi: 10.1038/jid.2013.422
162. Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature.* 1994 Apr 28;368(6474):850-3. doi: 10.1038/368850a0
163. Holmuhamedov EL, Wang L, Terzic A. ATP-sensitive K⁺ channel openers prevent Ca²⁺ overload in rat cardiac mitochondria. *J Physiol.* 1999 Sep 1;519 Pt 2(Pt 2):347-60. doi: 10.1111/j.1469-7793.1999.0347m.x.
164. Katakam PV, Dutta S, Sure VN, Grovenburg SM, Gordon AO. Depolarization of mitochondria in neurons promotes activation of nitric oxide synthase and generation of nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2016 May 1;310(9):H1097-106. doi: 10.1152/ajpheart.00759.2015
165. Sasaki N, Sato T, Ohler A, O'Rourke B, Marbán E. Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels by nitric oxide. *Circulation.* 2000 Feb 1;101(4):439-45. doi: 10.1161/01.cir.101.4.439
166. Ljubkovic M, Shi Y, Cheng Q, Bosnjak Z, Jiang MT. Cardiac mitochondrial ATP-sensitive potassium channel is activated by nitric oxide in vitro. *FEBS Lett.* 2007 Sep 4;581(22):4255-9. doi: 10.1016/j.febslet.2007.07.071
167. Dahlem YA, Horn TF, Buntinas L, Gonoï T, Wolf G, Siemen D. The human mitochondrial KATP channel is modulated by calcium and nitric oxide: a patch-clamp approach. *Biochim Biophys Acta.* 2004 May 12;1656(1):46-56. doi: 10.1016/j.bbabi.2004.01.003
168. Kawano T, Zoga V, Kimura M, Liang MY, Wu HE, Gemes G. Nitric oxide activates ATP-sensitive potassium channels in mammalian sensory neurons: action by direct S-nitrosylation. *Mol Pain.* 2009 Mar 14;5:12. doi: 10.1186/1744-8069-5-12
169. Sánchez-Duarte, Trujillo X, Huerta, Ortiz-Mesina, Cortés-Rojo. Mitochondrial KATP channels in skeletal muscle: are protein kinases C and G, and nitric oxide synthase involved in the fatigue process?. *Open Access Animal Physiology.*

2012;4:21-28

<https://doi.org/10.2147/OAAP.S34818>

170. Zhang DM, Chai Y, Erickson JR, Brown JH, Bers DM, Lin YF. Intracellular signalling mechanism responsible for modulation of sarcolemmal ATP-sensitive potassium channels by nitric oxide in ventricular cardiomyocytes. *J Physiol*. 2014 Mar 1;592(5):971-90. doi: 10.1113/jphysiol.2013.264697
171. Frankenreiter S, Bednarczyk P, Kniess A, Bork NI, Straubinger J, Koprowski P. cGMP-Elevating Compounds and Ischemic Conditioning Provide Cardioprotection Against Ischemia and Reperfusion Injury via Cardiomyocyte-Specific BK Channels. *Circulation*. 2017 Dec 12;136(24):2337-2355. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.028723
172. Mistry DK, Garland CJ. Nitric oxide (NO)-induced activation of large conductance Ca²⁺-dependent K⁺ channels (BK(Ca)) in smooth muscle cells isolated from the rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol*. 1998 Jul;124(6):1131-40. doi: 10.1038/sj.bjp.0701940
173. Lang RJ, Harvey JR, Mulholland EL. Sodium (2-sulfonatoethyl) methanethiosulfonate prevents S-nitroso-L-cysteine activation of Ca²⁺-activated K⁺ (BKCa) channels in myocytes of the guinea-pig taenia caeca. *Br J Pharmacol*. 2003 Jul;139(6):1153-63. doi: 10.1038/sj.bjp.0705349
174. Simon DI, Mullins ME, Jia L, Gaston B, Singel DJ, Stamler JS. Polynitrosylated proteins: characterization, bioactivity, and functional consequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 May 14;93(10):4736-41. doi: 10.1073/pnas.93.10.4736
175. Gaston B. Nitric oxide and thiol groups. *Biochim Biophys Acta*. 1999 May 5;1411(2-3):323-33. doi: 10.1016/s0005-2728(99)00023-7
176. Lee MY, Griendling KK. Redox signaling, vascular function, and hypertension. *Antioxid Redox Signal*. 2008 Jun;10(6):1045-59. doi: 10.1089/ars.2007.1986
177. Lorca RA, Prabakaran M, England SK. Functional insights into modulation of BKCa channel activity to alter myometrial contractility. *Front Physiol*. 2014 Jul 31;5:289. doi: 10.3389/fphys.2014.00289

178. Smith RC, McClure MC, Smith MA, Abel PW, Bradley ME. The role of voltage-gated potassium channels in the regulation of mouse uterine contractility. *Reprod Biol Endocrinol*. 2007 Nov 2;5:41. doi: 10.1186/1477-7827-5-41
179. Wray S, Prendergast C. The Myometrium: From Excitation to Contractions and Labour. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1124:233-263. doi: 10.1007/978-981-13-5895-1_10
180. Brainard AM, Korovkina VP, England SK. Potassium channels and uterine function. *Semin Cell Dev Biol*. 2007 Jun;18(3):332-9. doi: 10.1016/j.semcdb.2007.05.008. Epub 2007 May 24
181. Wang R. Interaction of Hydrogen Sulfide and Adenosine Triphosphate-Sensitive Potassium Channels in Vascular Smooth Muscle Cells. In: Wang R. (eds) *Signal Transduction and the Gasotransmitters*. Humana Press, Totowa, NJ 2004. doi:10.1007/978-1-59259-806-9_21
182. Sawada K, Morishige K, Hashimoto K, Tasaka K, Kurachi H, Murata Y, Kurachi Y. Gestational change of K⁺ channel opener effect is correlated with the expression of uterine KATP channel subunits. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2005 Sep 1;122(1):49-56
183. Curley M, Cairns MT, Friel AM, McMeel OM, Morrison JJ, Smith TJ. Expression of mRNA transcripts for ATP-sensitive potassium channels in human myometrium. *Mol Hum Reprod*. 2002 Oct;8(10):941-5. doi: 10.1093/molehr/8.10.941
184. Longo M, Jain V, Vedernikov YP, Hankins GD, Garfield RE, Saade GR. Effects of L-type Ca(2⁺)-channel blockade, K(+)(ATP)-channel opening and nitric oxide on human uterine contractility in relation to gestational age and labour. *Mol Hum Reprod*. 2003 Mar;9(3):159-64. doi: 10.1093/molehr/gag023
185. Korovkina VP, Fergus DJ, Holdiman AJ, England SK. Characterization of a novel 132-bp exon of the human maxi-K channel. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001 Jul;281(1):C361-7. doi: 10.1152/ajpcell.2001.281.1.C361
186. Holdiman AJ, Fergus DJ, England SK. 17beta-Estradiol upregulates distinct maxi-K channel transcripts in mouse uterus. *Mol Cell Endocrinol*. 2002 Jun 28;192(1-2):1-6. doi: 10.1016/s0303-7207(02)00136-3

187. Saito M, Nelson C, Salkoff L, Lingle CJ. A cysteine-rich domain defined by a novel exon in a slo variant in rat adrenal chromaffin cells and PC12 cells. *J Biol Chem*. 1997 May 2;272(18):11710-7. doi: 10.1074/jbc.272.18.11710
188. Pérez G, Toro L. Differential modulation of large-conductance KCa channels by PKA in pregnant and nonpregnant myometrium. *Am J Physiol*. 1994 May;266(5 Pt 1):C1459-63. doi: 10.1152/ajpcell.1994.266.5.C1459
189. Zhou XB, Wang GX, Ruth P, Hüneke B, Korth M. BK(Ca) channel activation by membrane-associated cGMP kinase may contribute to uterine quiescence in pregnancy. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000 Dec;279(6):C1751-9. doi: 10.1152/ajpcell.2000.279.6.C1751
190. Okawa T, Vedernikov YP, Saade GR, Longo M, Olson GL, Chwalisz K, Garfield RE. Roles of potassium channels and nitric oxide in modulation of uterine contractions in rat pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1999 Sep;181(3):649-55. doi: 10.1016/s0002-9378(99)70508-9
191. Shimano M, Nakaya Y, Fukui R, Kamada M, Hamada Y, Maeda K, Aono T. Activation of Ca²⁺-activated K⁺ channels in human myometrium by nitric oxide. *Gynecol Obstet Invest*. 2000;49(4):249-54. doi: 10.1159/000010254
192. Schiemann WP, Westfall DP, Buxton IL. Smooth muscle adenosine A1 receptors couple to disparate effectors by distinct G proteins in pregnant myometrium. *Am J Physiol*. 1991 Jul;261(1 Pt 1):E141-50. doi: 10.1152/ajpendo.1991.261.1.E141
193. Xia XM, Fakler B, Rivard A, Wayman G, Johnson-Pais T, Keen JE, Ishii T, Hirschberg B, Bond CT, Lutsenko S, Maylie J, Adelman JP. Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature*. 1998 Oct 1;395(6701):503-7. doi: 10.1038/26758
194. Bond CT, Sprengel R, Bissonnette JM, Kaufmann WA, Pribnow D, Neelands T, Storck T, Baetscher M, Jerecic J, Maylie J, Knaus HG, Seeburg PH, Adelman JP. Respiration and parturition affected by conditional overexpression of the Ca²⁺-activated K⁺ channel subunit, SK3. *Science*. 2000 Sep 15;289(5486):1942-6. doi: 10.1126/science.289.5486.1942

195. Modzelewska B, Kostrzewska A, Sipowicz M, Kleszczewski T, Batra S. Apamin inhibits NO-induced relaxation of the spontaneous contractile activity of the myometrium from non-pregnant women. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003 Feb 5;1:8. doi: 10.1186/1477-7827-1-8
196. Modzelewska B, Kleszczewski T, Kostrzewska A. The effect of a selective inhibition of potassium channels on the relaxation induced by nitric oxide in the human pregnant myometrium. *Cell Mol Biol Lett*. 2003;8(1):69-75
197. Lundgren DW, Moore JJ, Chang SM, Collins PL, Chang AS. Gestational changes in the uterine expression of an inwardly rectifying K⁺ channel, ROMK. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1997 Oct;216(1):57-64. doi: 10.3181/00379727-216-44156
198. Bai X, Bugg GJ, Greenwood SL, Glazier JD, Sibley CP, Baker PN, Taggart MJ, Fyfe GK. Expression of TASK and TREK, two-pore domain K⁺ channels, in human myometrium. *Reproduction*. 2005 Apr;129(4):525-30. doi: 10.1530/rep.1.00442
199. Mollard P, Mironneau J, Amedee T, Mironneau C. Electrophysiological characterization of single pregnant rat myometrial cells in short-term primary culture. *Am J Physiol*. 1986 Jan;250(1 Pt 1):C47-54. doi: 10.1152/ajpcell.1986.250.1.C47
200. Данилович Ю.В., Г.В. Данилович, О.В. Коломієць. Трансмембранний обмін Ca²⁺ в мітохондріях міометрія за дії оксиду азоту та каліксаренів Укр. біохім. журн. – 2014. – 86, №1. – С. 42-55.
201. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54. doi: 10.1006/abio.1976.9999
202. Lupo D, Vollmer C, Deckers M, Mick DU, Tews I, Sinning I, Rehling P. Mdm38 is a 14-3-3-like receptor and associates with the protein synthesis machinery at the inner mitochondrial membrane. *Traffic*. 2011 Oct;12(10):1457-66. doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01239.x
203. Nakatsubo N, Kojima H, Kikuchi K, Nagoshi H, Hirata Y, Maeda D. Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new

- fluorescence indicators: diaminofluoresceins. *FEBS Lett.* 1998 May 8;427(2):263-6. doi: 10.1016/s0014-5793(98)00440-2
204. Li H, Wan A. Fluorescent probes for real-time measurement of nitric oxide in living cells. *Analyst.* 2015 Nov 7;140(21):7129-41. doi: 10.1039/c5an01628b
205. Buckman JF, Hernández H, Kress GJ, Votyakova TV, Pal S, Reynolds IJ. MitoTracker labeling in primary neuronal and astrocytic cultures: influence of mitochondrial membrane potential and oxidants. *J Neurosci Methods.* 2001 Jan 15;104(2):165-76. doi: 10.1016/s0165-0270(00)00340-x
206. Franco MC, Antico Arciuch VG, Peralta JG, Galli S, Levisman D, López LM. Hypothyroid phenotype is contributed by mitochondrial complex I inactivation due to translocated neuronal nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 2006 Feb 24;281(8):4779-86. doi: 10.1074/jbc.M512080200
207. Dedkova EN, Blatter LA. Characteristics and function of cardiac mitochondrial nitric oxide synthase. *J Physiol.* 2009 Feb 15;587(Pt 4):851-72. doi: 10.1113/jphysiol.2008.165423.
208. Kaasik A, Safiulina D, Zharkovsky A, Veksler V. Regulation of mitochondrial matrix volume. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007 Jan;292(1):C157-63. doi: 10.1152/ajpcell.00272.2006
209. Nowikovsky K, Schweyen RJ, Bernardi P. Pathophysiology of mitochondrial volume homeostasis: potassium transport and permeability transition. *Biochim Biophys Acta.* 2009 May;1787(5):345-50. doi: 10.1016/j.bbabi.2008.10.006
210. Danylovyh YV, Chunikhin AY, Danylovyh GV, Kolomiets OV. The use of the Petri net method in the simulation modeling of mitochondrial swelling. *Ukr Biochem J.* 2016 Jul-Aug;88(4):66-74. doi: 10.15407/ubj88.04.066
211. Kanai AJ, Pearce LL, Clemens PR, Birder LA, VanBibber MM, Choi SY. Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Nov 20;98(24):14126-31. doi: 10.1073/pnas.241380298
212. Hagmann WK, Caldwell CG, Chen P, Durette PL, Esser CK, Lanza TJ. Substituted 2-aminopyridines as inhibitors of nitric oxide synthases. *Bioorg Med Chem Lett.* 2000 Sep 4;10(17):1975-8. doi: 10.1016/s0960-894x(00)00389-9

213. Lawton GR, Ralay Ranaivo H, Chico LK, Ji H, Xue F, Martásek P. Analogues of 2-aminopyridine-based selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase with increased bioavailability. *Bioorg Med Chem*. 2009 Mar 15;17(6):2371-80. doi: 10.1016/j.bmc.2009.02.017
214. Kang S, Li H, Tang W, Martásek P, Roman LJ, 2-Aminopyridines with a Truncated Side Chain To Improve Human Neuronal Nitric Oxide Synthase Inhibitory Potency and Selectivity. *J Med Chem*. 2015. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00573
215. Kannurpatti SS, Biswal BB. Mitochondrial Ca²⁺ uniporter blockers influence activation-induced CBF response in the rat somatosensory cortex. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2008 Apr;28(4):772-85. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600574
216. Fernando V, Zheng X, Walia Y, Sharma V, Letson J, Furuta S. S-Nitrosylation: An Emerging Paradigm of Redox Signaling. *Antioxidants (Basel)*. 2019 Sep 17;8(9):404. doi: 10.3390/antiox8090404
217. Shao J, Fu Z, Ji Y, Guan X, Guo S, Ding Z, Yang X, Cong Y, Shen Y. Leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1 (LETM1) forms a Ca²⁺/H⁺ antiporter. *Sci Rep*. 2016 Sep 27;6:34174. doi: 10.1038/srep34174
218. Hansson MJ, Månsson R, Mattiasson G, Ohlsson J, Karlsson J, Keep MF. Brain-derived respiring mitochondria exhibit homogeneous, complete and cyclosporin-sensitive permeability transition. *J Neurochem*. 2004 May;89(3):715-29. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02400.x
219. Kolomiets' OV, Danylovyh IuV, Danylovyh HV, Kosterin SO. [Ca²⁺/H(+)-exchange in myometrium mitochondria]. *Ukr Biochem J*. 2014 May-Jun;86(3):41-8. Ukrainian. doi: 10.15407/ubj86.03.041
220. Nowikovsky K, Froschauer EM, Zsurka G, Samaj J, Reipert S, Kolisek M, Wiesenberger G, Schweyen RJ. The LETM1/YOL027 gene family encodes a factor of the mitochondrial K⁺ homeostasis with a potential role in the Wolf-Hirschhorn syndrome. *J Biol Chem*. 2004 Jul 16;279(29):30307-15. doi: 10.1074/jbc.M403607200

221. Kim DE, Chivian D, Baker D. Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic Acids Res.* 2004 Jul 1;32(Web Server issue):W526-31. doi: 10.1093/nar/gkh468
222. Saeedimazine M, Montanino A, Kleiven S, Villa A. Role of lipid composition on the structural and mechanical features of axonal membranes: a molecular simulation study. *Sci Rep.* 2019 May 29;9(1):8000. doi: 10.1038/s41598-019-44318-9
223. Saito H, Shinoda W. Cholesterol effect on water permeability through DPPC and PSM lipid bilayers: a molecular dynamics study. *J Phys Chem B.* 2011 Dec 29;115(51):15241-50. doi: 10.1021/jp201611p
224. Pedersen SF, Counillon L. The SLC9A-C Mammalian Na⁺/H⁺ Exchanger Family: Molecules, Mechanisms, and Physiology. *Physiol Rev.* 2019 Oct 1;99(4):2015-2113. doi: 10.1152/physrev.00028.2018
225. Goossens K, De Winter H. Molecular Dynamics Simulations of Membrane Proteins: An Overview. *J Chem Inf Model.* 2018 Nov 26;58(11):2193-2202. doi: 10.1021/acs.jcim.8b00639. Epub 2018 Oct 24. PMID: 30336018.
226. Salsbury FR Jr. Molecular dynamics simulations of protein dynamics and their relevance to drug discovery. *Curr Opin Pharmacol.* 2010;10(6):738-744. doi:10.1016/j.coph.2010.09.016
227. Pronk S, Páll S, Schulz R, Larsson P, Bjelkmar P, Apostolov R, Shirts MR. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics.* 2013 Apr 1;29(7):845-54. doi: 10.1093/bioinformatics/btt055
228. Jo S, Cheng X, Lee J, Kim S, Park SJ, Patel DS, Beaven. CHARMM-GUI 10 years for biomolecular modeling and simulation. *J Comput Chem.* 2017 Jun 5;38(15):1114-1124. doi: 10.1002/jcc.24660