

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики

доц. Нипорко Олексій Юрійович

Протокол № _____ засідання кафедри

від “ _____ ” _____ 20__ р.

**ПРОДУКТИ ОКИСНОГО ТА НЕОКИСНОГО МЕТАБОЛІЗМУ
L-АРГІНІНУ ЯК МОЖЛИВІ РЕГУЛЯТОРИ ТРАНСПОРТУ Ca^{2+}
В МІТОХОНДРІЯХ МІОМЕТРІЯ**

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра

студента спеціальності

091 Біологія

ОП «Біологія (високі технології)»

Павлюка Максима Романовича

Науковий керівник від кафедри

д.б.н. **Данилович Юрій Володимирович**

Робота виконана у відділі біохімії м'язів

Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

під керівництвом д.б.н. **Данилович Ганни Вікторівни**

Оцінка захисту роботи

Київ – 2024 р.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	4
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	9
1.1 Окисний метаболізм L-аргініну	9
1.2. Неокисний метаболізм L-аргініну	16
1.3 Роль поліамінів в організмі людини	19
1.4 Системи транспортування Ca ²⁺	22
1.4.1 Системи входу Ca ²⁺	22
1.4.2 Системи виходу Ca ²⁺	24
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	26
2.1 Тварини	26
2.2 Виділення фракції ізольованих мітохондрій	26
2.3 Дослідження вмісту іонізованого Ca ²⁺ в ізольованих мітохондріях ...	27
2.4 Вивчення синтезу оксиду азоту в ізольованих мітохондрія	27
2.5 Визначення утворення активних форм кисню в ізольованих мітохондріях	28
2.6 Вивчення змін мембранного потенціалу мітохондрій	29
2.7 Оцінка змін гідродинамічного діаметру мітохондрій	29
2.8 Розрахунок кінетичних параметрів	30
2.9 Методи статистичного аналізу	30
2.10 Реактиви	31
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	32
3.1 Вивчення ефектів L-аргініну та донорів NO на енергозалежну аккумуляцію Ca ²⁺ в мітохондріях міометрію	32
3.2 Дослідження ефектів L-аргініну та Ca ²⁺ на електричний потенціал внутрішньої мітохондрійної мембрани та генерацію активних форм кисню	35
3.3 Вивчення ефектів сперміну на аккумуляцію Ca ²⁺ в ізольованих мітохондріях	39
3.4 Дослідження ефектів сперміну на синтез NO ізольованими	

мітохондріями	42
ВИСНОВКИ	45
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	46

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

NO – оксид азоту;

NOS – синтаза оксиду азоту;

OAT – орнітинамінотрансфераза;

ODC – орнітиндекарбоксилаза;

AT – аргінінгліцинамідинтрансфераза;

ADC – аргініндекарбоксилаза;

AGMase – уреогідролаза;

sGC – гуанілатциклаза;

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота;

РНК – рибонуклеїнова кислота;

АТР – аденозинтрифосфат;

NADH/NAD⁺ - нікотинамідаденіндинуклеотид;

FADH₂ – флавінаденіндинуклеотид;

СССР – карбонілціанід-*m*-хлорфенілгідрозон;

NA – N(гамма)-нітро-L-аргініну;

L-NAME – N(гамма)-нітро-L-аргінін метилового ефіру;

SN - спермін NONOat;

SNP – нітрупрусид натрію;

SNAP – S-нітритозо-N-ацетил-DL-пеніциламін;

C-PTIO – 2-(4-карбоксифеніл)-4,4,5,5-тетраметилімідазолін-1-оксил-3-оксид калієва сіль, 2-(4-карбоксифеніл)-4,5-дигідро-4,4,5,5-тетраметил-1H-імідазол-1-ілокси-3-оксид калієва сіль;

BH₄ – тетрагідробіоптерин.

АНОТАЦІЯ

Павлюк М.Р. Продукти окисного та неокисного метаболізму L-аргініну як можливі регулятори транспорту Ca^{2+} в мітохондріях міометрія. – Випускна кваліфікаційна робота бакалавра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Біологія (високі технології)».

Мітохондрії відіграють вирішальну роль у підтриманні гомеостазу Ca^{2+} у клітинах. Зважаючи на важливу регуляторну роль продуктів окисного та неокисного метаболізму L-аргініну, важливо з'ясувати їхній вплив на транспорт Ca^{2+} у мітохондріях гладеньких м'язів.

Експерименти проводили на міоцитах матки щурів та ізольованих мітохондріях. Можливість синтезу NO мітохондріями продемонстровано методами спектрофлуориметрії з використанням NO-чутливого флуоресцентного зонда DAF-FM. За допомогою флуоресцентного зонда Fluo-4 AM показано, що 50 мкМ L-аргініну стимулює енергозалежне накопичення Ca^{2+} в мітохондріях. Аналогічний ефект спостерігався при використанні донорів оксиду азоту 100 мкМ SNP, SNAP та безпосередньо нітриту натрію (SN). Стимулюючий ефект усувався в присутності поглинача NO C-PTIO. Оксид азоту знижує електричний потенціал мітохондрій, не викликаючи їх набухання. Стимулюючий вплив сперміну на накопичення мітохондріями Ca^{2+} пов'язаний з посиленням синтезу NO, що було продемонстровано за використання C-PTIO, інгібіторів NO-синтази (100 мкМ NA та L-NAME), а також за прямого моніторингу синтезу NO флуоресцентним зондом DAF-FM.

Зроблено висновок про потенційний регуляторний вплив продукту окисного метаболізму L-аргініну - NO на транспорт Ca^{2+} в мітохондріях міометрія, а також відповідний вплив продукту неокисного метаболізму - сперміну шляхом збільшення синтезу NO в цих субклітинних структурах.

Ключові слова: L-аргінін, оксид азоту, спермін, кальцій, гладкі м'язи, міометрій.

ВСТУП

За конститутивного синтезу оксид азоту діє як універсальна сигнальна молекула, регулюючи роботу серцево-судинної, репродуктивної, ендокринної, імунної і інших фізіологічних систем. Окисний катаболізм L-аргініну супроводжується окисненням гуанідинової групи цієї амінокислоти NO-синтазами (NOS) і призводить до генерування L-цитруліну та NO, який в подальшому перетворюється в водних аерованих розчинах у нітрити та нітрати. Нітрати переважно виводяться з організму, а нітрити володіють як власною біологічною активністю, так і утворюють оксид азоту. Наразі нітрит-аніони розглядають в якості важливих попередників оксиду азоту та його депонувальною формою в організмі [1].

Різноманітні захворювання, зокрема серцево-судинні патології, нейродегенеративні процеси, дисфункція шлунково-кишкового тракту та репродуктивної системи, супроводжуються переключенням окисного метаболізму L-аргініну на неокисний, пов'язаний зі зростанням активності аргінази. Опоередкований аргіназами катаболізм L-аргініну має наслідком утворення L-орнітину і сечовини. Аргіназа конкурує за субстрат з NOS, а продукти подальшого метаболізму L-аргініну, можливо, здатні впливати на синтез NO. Співвідношення між роботою ізоформ NOS та аргіназ забезпечує у клітинах певний фізіологічний пул L-аргініну, а також генерацію активних форм азоту та поліамінів, які регулюють функціональну активність клітин[2].

Скоротлива активність гладеньких м'язів лежить в основі функціонування внутрішніх органів, зокрема матки. Такі розлади як гіпертонія, дисфункція шлунково-кишкового тракту, органів дихання, сечостатевої системи безпосередньо пов'язані з порушенням регуляції скорочення[3]. В розвинутих країнах передчасні пологи і зрив вагітності обумовлюють до 80% неонатальної смертності, яка не пов'язана із вродженими вадами розвитку. Водночас, інформація стосовно регуляції контрактильної функції гладенького м'яза

матки (міометрія) є відносно обмежена.

Зміни концентрації Ca^{2+} в міоплазмі лежать в основі контролю скоротливої активності гладеньких м'язів, а Ca^{2+} -транспортувальні системи субклітинних структур, зокрема мітохондрій, є мішенню дії речовин, які впливають на контрактильну функцію міоцитів [4]. Чільне місце посідає значення мітохондрій в підтриманні внутрішньоклітинного Ca^{2+} -гомеостаза, адже вони є високоємнісним Ca^{2+} -депо, здатні термінувати Ca^{2+} -сигнал, а також підтримувати низьку фізіологічно-значущу концентрацію цього катіона в цитозолі, захищаючи клітини від Ca^{2+} -перевантаження [5]. Водночас біологічна активність мітохондрій має Ca^{2+} -залежний характер: зростання концентрації Ca^{2+} в матриксі активує піруватдегідрогеназний комплекс, ензими циклу трикарбонових кислот та синтез АТФ, а перевантаження органел катіоном індукує клітинну загибель [6]. Важливим регулятором енергетичних, метаболічних і транспортних процесів в мітохондріях поряд з іонами Са виступає оксид азоту [7].

Результати сучасних досліджень підтверджують роль NO як важливої ланки підтримання оптимальної концентрації іонів Са як в міоплазмі, так і мітохондрійному матриксі [8]. Аналіз наукової літератури дозволяє висунути аргументоване припущення щодо важливого значення оксиду азоту в процесах, які гальмують контрактильну відповідь міометрія [9]. Біохімічні механізми, за якими оксид азоту контролює скоротливу функцію матки, залишаються мало дослідженими.

З іншого боку, здійснюється вивчення можливої регуляторної дії продуктів неокисного метаболізму L-аргініну на транспорт Ca^{2+} у внутрішній мітохондрійній мембрані. Існують експериментальні дані щодо впливу поліамінів, передусім сперміну, на енергозалежну акумуляцію Ca^{2+} мітохондріями [10]. Напрочуд важливим є проведення досліджень спрямованих на з'ясування ролі як продуктів окисного обміну L-аргініну (оксиду азоту, нітрит-аніонів), так і неокисного (сечовини, поліамінів) на Ca^{2+} -гомеостаз міто-

хондрій гладенького м'язу. Необхідним є також вивчення можливого впливу кінцевого продукту неокисного перетворення L-аргініну – сперміну на синтез оксиду азоту мітохондріями. Вирішення цих задач покращить розуміння взаємозв'язку двох шляхів метаболізму L-аргініну, а також буде сприяти пошуку токолітиків – донорів, попередників та модуляторів синтезу оксиду азоту, що є важливим для покращення функціонування жіночої репродуктивної системи.

Отже, *метою* роботи було дослідити вплив метаболітів окисного та неокисного метаболізму L-аргініну на енергозалежну акумуляцію Ca^{2+} в ізольованих мітохондріях міометрія.

Відповідно до мети було поставлено наступні *задачі*:

1. Вивчити ефекти L-аргініну та донорів оксиду азоту на енергозалежну акумуляцію Ca^{2+} в ізольованих мітохондріях.
2. З'ясувати вплив L-аргініну та Ca^{2+} на електричний потенціал внутрішньої мітохондрійної мембрани та генерацію активних форм кисню.
3. Встановити закономірності дії сперміну на акумуляцію Ca^{2+} в ізольованих мітохондріях.
4. Дослідити ефекти сперміну на синтез NO ізольованими мітохондріями.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Окисний метаболізм L-аргініну

Аргінін (δ -гуанідин- α -аміновалеріанова кислота) — основна α -амінокислота, L-форма якої входить до 20 амінокислот, що кодуються генетичним кодом (кодони ЦГА, ЦГУ, ЦГГ, ЦГЦ, АГА та АГГ в мРНК) і становлять основу білків.

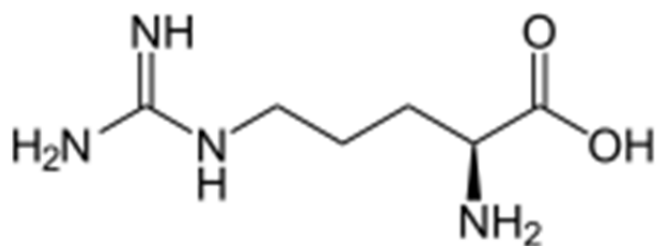


Рис. 1.1 – Хімічна будова аргініну

Для людини аргінін є напівнезамінною амінокислотою, тобто біохімічні шляхи для її біосинтезу існують, проте в певні періоди життя, зокрема інтенсивного росту та розвитку, а також під час деяких захворювань вони не можуть забезпечувати достатньої кількості цієї сполуки, через що вона повинна потрапляти в організм із їжею.

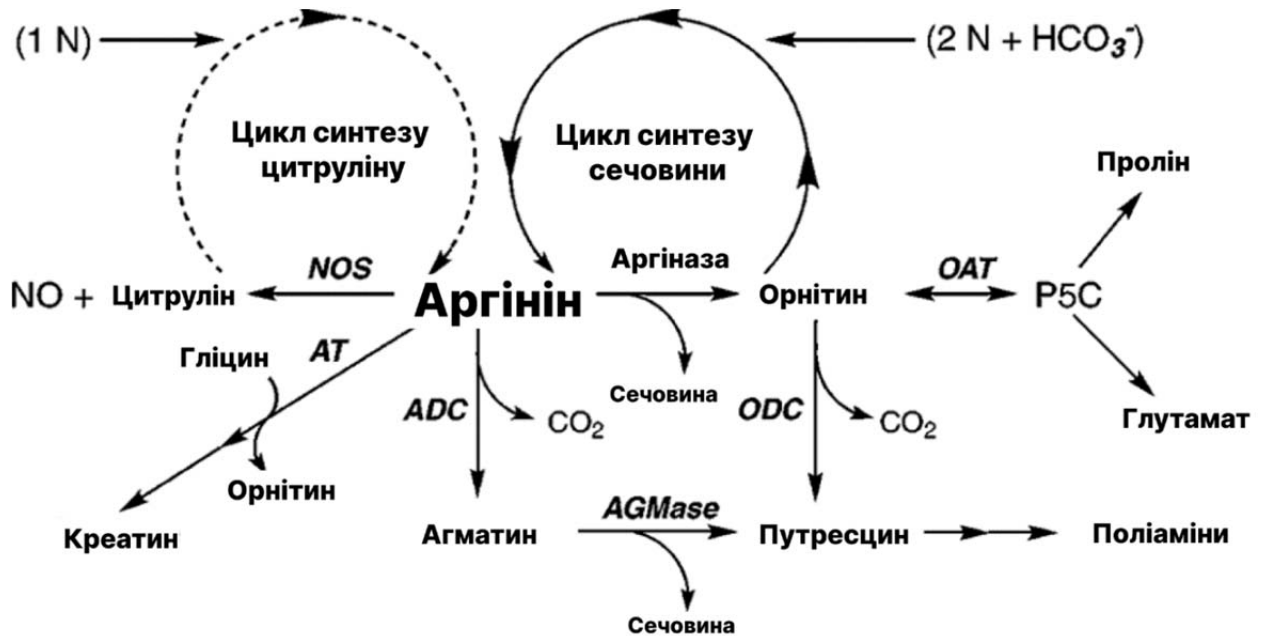


Рис. 1.2 – Шляхи метаболізму L-аргініну.

NOS - синтаза оксиду азоту; *OAT* - орнітинамінотрансфераза; *ODC* - орнітин-декарбоксілаза; *AT* - аргінін-гліцинамідинтрансфераза; *ADC* - аргініндекарбоксілаза; *AGMase* - уреогідролаза.

Існує два шляхи метаболізму L-аргініну: окисний, що відбувається за участі *NOS* з утворенням оксиду азоту (NO) і цитруліну, та неокисний, що відбувається за участі аргінази з утворенням орнітину та сечовини, й подальшого синтезу поліамінів.

Метаболізм L-аргініну з утворенням NO в клітині забезпечує сімейство ізоформ NO-синтази (*NOS*), які за участю NADPH, як джерела електронів і присутності O₂, здійснюють п'ятиелектронне двостадійне окислення гіанідинової групи L-аргініну з утворенням NO та L-цитруліну [11].

Оксид азоту є структурно простою низькомолекулярною амфифільною молекулою вільного радикала. У біосистемах NO має відносно короткий час існування (до 5 с в залежності від мікрооточення) і може мігрувати на короткі відстані від місць генерації, що визначається швидкістю окиснення [11]. Це обмеження дифузії передбачає специфічність ефекту NO в окремих ком-

партментах клітини внаслідок спільної локалізації цільових білків з джерелами NO в мультибілковому комплексі сигналосом.

NO є майже універсальною молекулою-месенджером і регулятором. Передача сигналів NO здійснюється за трьома основними механізмами: (1) активація розчинної гуанілатциклази (sGC) шляхом зв'язування з її гемовою групою (таким чином утворюючи Fe²⁺-нітрозильний комплекс), що призводить до утворення циклічний гуанозинмонофосфат, який, у свою чергу, стимулює білок кіназу G; концентрація NO, необхідна для активації циклогуанілат кінази (цГК), знаходиться в межах 80-250 нМ [11, 12]; (2) S-нітрозилювання: активні форми азоту – NO⁺, NO⁻, N₂ O₃, NO₂ оборотно нітрозилюють тіолові групи цистеїнів цільових білків; існує точка зору, що в серцево-судинній системі більшість ефектів NO опосередковуються саме S-нітрозилюванням і є цГМФ-незалежними [11, 13]; (3) утворення пероксинітриту (ONOO⁻), головним чином через реакцію, контрольовану дифузією, між NO та супероксид-аніоном (• O₂⁻) з подальшим нітруванням залишків тирозину та триптофану в білках, що призводить до залучення мітоген-активованих протеїнкіназ, ізоформи протеїнкінази C, транскрипційного фактору NF-κB тощо, у процесі сигналізації [11, 13, 14]. Мішені NO включають надзвичайно широкий спектр білків, включаючи основні метаболічні ферменти та фактори транскрипції [11, 15]. Термінація сигналу направлення NO/sGC/cGMP/PKG, який є ключовим для реалізації функціональної активності оксиду азоту, забезпечується родиною фосфодіестераз (ФДЕ 5, 6, 9) [16].

Ізоформи NO-синтази. Фермент NOS існує у формі димера, побудованого з двох ідентичних субодиниць, які структурно та функціонально розділені на два основні домени: С-кінцевий домен редуктази та N-кінцевий оксигеназний домен. Домен редуктази має високу гомологію з цитохром-редуктазою P450 і містить сайти зв'язування для NADPH, FAD і FMN (для однієї молекули кожного); оксигеназний домен взаємодіє з простетичною ге-

мовою групою, кофактором BH_4 (6 (^)-5,6,7,8-тетрагідробіоптерином) і субстратом L-аргініном. Між цими двома структурами є кальмодулінзв'язуючий домен (рис. 1.3) [17].

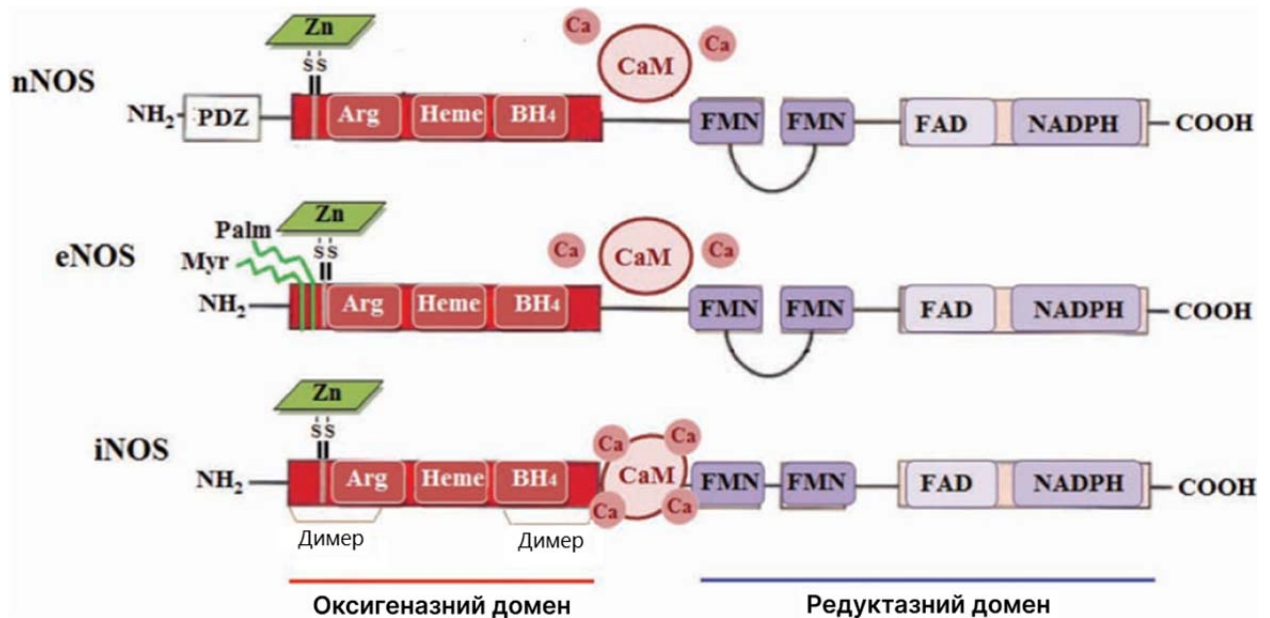


Рис. 1.3 – Доменна структура nNOS, eNOS та iNOS людини. Автогальмівна петля в областях FMN nNOS та eNOS показані

Існує 3 ізоформи NOS, які відрізняються структурою та функціями. Ендотеліальна NOS (eNOS/NOS III, субодиниця з вагою 134 кДа) і нейрональна NOS (nNOS/NOS I, канонічна субодиниця з вагою 160 кДа) конститутивно експресуються Ca^{2+} -залежними ферментами; є докази того, що eNOS також може активуватися при низьких концентраціях Ca^{2+} у середовищі. Індукцибельна NOS (iNOS/NOS II, субодиниця з масою 130 кДа) експресується в більшості клітин лише після індукції прозапальними цитокінами, бактеріальними ліпополісахаридами, γ -опроміненням, і її активність не залежить від міжклітинного Ca^{2+} (активується при нефізіологічно низька концентрація катіонів близько 40 нМ), оскільки кальмодулін міцно зв'язаний у відповідному місці завдяки специфічній амінокислотній послідовності останнього [18].

Відомо, що мітохондрії є основними клітинними мішенями для NO. Безсумнівно, що біохімія та молекулярна фізіологія мітохондрій, які поєдну-

ють процеси споживання кисню, окисного фосфорилування, катаболізму ліпідів, біосинтезу гему, підтримки гомеостазу Ca^{2+} , продукції активних форм кисню та апоптозу, значною мірою контролюються оксидом азоту.

В мітохондріях постійно експресується NOS, яка є мембранозв'язаним ферментом і його біохімічні властивості нагадують конститутивну NOS, зокрема нейрональну ізоформу.

nNOS експресується в центральних і периферичних нейронах, а також в епітеліальних клітинах легень, у скелетних м'язах, тканинах матки, шлунка, нирок, підшлункової залози [19]. Фермент висококонсервативний, 93% амінокислотного складу в тканинах щурів і людини ідентичні [18]. Існує кілька варіантів сплайсингу nNOS: nNOS α , nNOS β , nNOS γ , nNOS μ , nNOS-2 [20]. nNOS α і nNOS μ , які є найбільш поширеними в тканинах, містять домен PDZ на N-кінці (послідовність із 220 амінокислотних залишків), який може безпосередньо взаємодіяти з PDZ-мотивами інших білків, що визначає субклітинну локалізацію та активність ферменту. Наявність домену PDZ є унікальною для ізоформ nNOS. У кардіоміоцитах і скелетних м'язах експресується сплайс-варіант nNOS μ . Ця форма ферменту включає унікальну (34 амінокислоти) вставку між кальмодуліном і FMN-зв'язуючими сайтами [21].

В даний час достовірно показано мітохондріальну локалізацію NOS в різних органах і тканинах ссавців: печінці, серці, мозку, нирках, скелетних м'язах діафрагми, міометрію і тимусі [20].

Ідентифікація та біохімічні властивості mtNOS. Є докази того, що енергізовані мітохондрії здатні продукувати NO за відсутності NADPH, L-аргініну та екзогенного Ca^{2+} в інкубаційному середовищі. Внутрішньомітохондріальна концентрація NADPH становить 1,04-1,78 мМ, що значно перевищує відповідне значення K_{NADPH} для mtNOS (0,1-1 мкМ) [22]. Концентрація L-аргініну в мітохондріальному матриксі відповідає 150-310 мкМ і значно перевищує K_m для L-аргініну (5 мкМ для мітохондрій печінки [23], 35 мкМ – для кардіоміоцитів). Таким чином, концентрації L-аргініну, Ca^{2+} і NADPH не

є лімітуючими факторами синтезу NO в мітохондріях [24-26]. Відсутність L-аргініну в матриксі та відповідне зниження активності mtNOS може бути наслідком підвищення активності аргінази II у мітохондріях, яка конкурує з ферментом за субстрат [27]. У внутрішній мембрані мітохондрій ідентифіковано транспортер основної амінокислоти (SLC25A29), який функціонує як уніпортер і забезпечує доступ L-аргініну до мітохондріальної аргінази II та NOS ($K_m = 0,42$ мМ) [28].

У дослідженнях пермеабілізованих дигітоніном міоцитів шлуночка серця з використанням NO-чутливого флуоресцентного зонда DAF-2 (4,5-diaminofluorescein diacetate) і специфічного для мітохондрій барвника MitoTracker Red CMXRos E. Dedkova і L. Blatter показали, що у присутності L-аргініну та збільшення концентрації Ca^{2+} у цитоплазмі відбувається дозозалежне підвищення продукції NO в мітохондріях. Зниження мембранного потенціалу за присутності протонופору CCCP, блокування Ca^{2+} -уніпортера внутрішньої мітохондріальної мембрани Ru360, застосування ротенону або антимицину А – інгібіторів ланцюга транспорту електронів у комбінації з олігоміцином в інгібуванні синтезу NO в мітохондріях [29].

Уявна K_m для O_2 mtNOS кардіоміоцитів становить 40 мкМ. Так, у фізіологічних умовах, коли концентрація O_2 знаходиться в межах 5-20 мкМ, активність mtNOS не досягає максимальних значень [30].

За нестачі L-аргініну або NH_4 в умовах стимуляції накопичення Ca^{2+} органелами утворення NO було значно нижчим, але водночас спостерігалось підвищення продукції активних форм кисню [29].

Печінкова mtNOS, солюбілізована і очищена методом афінної хроматографії, фермент синтезував 250-350 нмоль NO/хв/мг білка, K_m для L-аргініну становив 3 мкМ, фермент інгібувався L-NMMA. Детальний аналіз амінокислотного складу mtNOS показав, що структура білка відповідає первинній послідовності nNOS [31].

Ідентичність mtNOS та nNOS також підтверджує результати щодо пригнічення ферментативної активності: відносно специфічний блокатор nNOS (4S)-N-(4-аміно-5[аміноетил]амінопентил)-N'-нітрогуанідин і антагоніст кальмодуліну W-7 пригнічували утворення NO в мітохондріях кардіоміоцитів, а інгібітори eNOS – 1-N5-(1-іміноетил)орнітин (1-NIO) та iNOS – N-(3-амінометил)бензилацетамідин, 2HCl (1400 Вт) були неефективними [29].

Структура та регуляція mtNOS. Фермент є сплайс-варіантом повноланцюгової nNOS α , відмінною від уже ідентифікованої, з молекулярною масою 144 кДа. Він має дві посттрансляційні модифікації: N-кінцеве міристилювання Thr або Ser і C-кінцеве фосфорилування залишку Ser-1412 [32]. Імуноколокалізація mtNOS мітохондріальними маркерами (сукцинатдегідрогеназа, цитохром-с-оксидаза) додатково посилює докази його розміщення саме у внутрішній мітохондріальній мембрані. Міристилювання mtNOS необхідне для направлення ферменту в мітохондрії або для закріплення його на мембрані. Фосфорилування C-кінцевого залишку Ser регулює активність mtNOS [33].

Методи імуноелектронної мікроскопії та методи імунопреципітації показують взаємодію mtNOS через домен PDZ із субодиницею V_a цитохром-с-оксидази, яка залежить від Ca²⁺. Інші дослідження показали, що білки комплексу I ланцюга транспортування електронів імунопреципітують з внутрішньомітохондріальним NOS [34].

Активність mtNOS максимальна під час оптимальної роботи електротранспортного ланцюга, а саме комплексу I, який є джерелом електронів для функціонування ферменту; інактивація комплексу I обмежує активність mtNOS [35].

Функціональна роль NO в мітохондріях. Стаціонарна концентрація NO в мітохондріальному матриксі вимірюється за допомогою мікросенсорної технології в наномолярному діапазоні, тоді як інтактні органели здатні виробляти NO при значно вищих мікромольних концентраціях. Це свідчить про

те, що значна частина утвореного оксиду азоту реагує з мітохондріальними мішенями: $\bullet O^{2-}$, гемом і тіоловими групами білка [26].

У мітохондріях оксид азоту може виконувати кілька ключових функцій: інгібування або індукція біогенезу, контроль дихання та окисного фосфорилування; NO впливає на $\Delta\psi$ внутрішньої мітохондріальної мембрани, регулює активність Ca^{2+} транспортних систем, функціонування пори проникності (PTP) тощо [33, 36]. Крім того, NO контролює експресію кількох ферментів циклу Кребса [37]. Ключовою роллю mtNOS може бути регуляція процесів синтезу АТФ у клітині. Мітохондріальний NO бере участь у механізмах, які лежать в основі визначення стратегії виживання чи загибелі клітин [34].

У низьких фізіологічних концентраціях (наномолярних) NO регулює ефективність окисного фосфорилування та впливає на рН матриці [26]. При нормальному парціальному тиску кисню NO зменшує поглинання O^2 у мітохондріях і пригнічує мітохондріальне дихання в різних тканинах. Оксид азоту оборотно зв'язується та пригнічує активність комплексів електронно-транспортного ланцюга, комплекс IV вважається найбільш чутливою мішенню [38]. Ендогенно синтезований NO, знижуючи активність цитохром-с-оксидази, зменшує споживання кисню, що дозволяє оптимально функціонувати клітинним ферментам з низькою спорідненістю до O^2 . На фізіологічному рівні O^2 дихання мітохондрій у стані 3 більш чутливе до екзогенного NO, ніж у стані 4 [39].

1.2. Неокисний метаболізм L-аргініну

Аргіназа - це марганецевмісний фермент, який каталізує кінцевий етап циклу утилізації токсичного аміаку шляхом перетворення L-аргініну в L-орнітин і сечовину [40]. Більшість тварин, які метаболізують надлишок азоту у вигляді сечовини, також експресують аргіназу 1 (A1), і вона локалізована в

цитозолі. У деяких хребетних тварин А1 експресується в печінці, еритроцитах і специфічних популяціях імунних клітин, тоді як А2 високо експресується в нирках, а також в деяких інших тканинах, включаючи мозок і сітківку ока. Обидві ізоформи можуть бути індуковані різними умовами.

А1 у людини складається з 322 амінокислот [41], а А2 - з 354 [42]. Кожна ізоформа кодується окремим геном, і обидва гени розташовані на різних хромосомах. Кристалографічний аналіз з високою роздільною здатністю показав, що А1 і А2 майже ідентичні за структурою. Обидва складаються з трьох ідентичних субодиниць. Зв'язування іонів марганцю на дні щілини має важливе значення для активності ферменту.

Дослідження експресії аргінази показали, що внутрішньоклітинні сигнальні події, які призводять до підвищення експресії/активності аргінази, включають активацію Rho-кінази, протеїнкінази, активованої мітогеном, та протеїнкінази А; вироблення численних цитокінів [таких як інтерлейкін (IL)-13, IL-4, IL-6, IL-8 та фактор некрозу пухлин (TNF)- α]; утворення активних форм кисню та азоту, а також гіпоксія [43]. До транскрипційних факторів, що регулюють експресію А1, належать сигнальний трансдуктор і активатор транскрипції (STAT)-6/STAT-3, фактор транскрипції foxhead box (Fox)O4, гіпоксія-індукований фактор (HIF)-1, ССААТ/енхансер-зв'язуючий білок (С/ЕВР) β , та активуючий фактор транскрипції (ATF)-2 [44], тоді як фактори транскрипції для А2 включають позаклітинну сигнально-регульовану кіназу (ERK)5/білок, що зв'язує елемент відповіді цАМФ (CREB), HIF-2 та інтерфероновий регуляторний фактор (IRF)-3 [45]. Також повідомлялося про епігенетичний контроль експресії А2 через зміну активності гістондеацетилази 2 [46].

Активність аргінази має дві основні фізіологічні функції: 1) детоксикація аміаку в циклі сечовини і 2) виробництво орнітину, необхідного для синтезу проліну і поліамінів 1.4. [40]. Пролін виробляється за допомогою орнітин-амінотрансферази (OAT) [45] і необхідний для утворення колагену. Поліаміни утворюються завдяки активності орнітиндекарбоксилази (ODC), за якою слідують спермідин- та спермінсинтетази. Поліаміни також можуть утворюватися з агматину під дією аргініндекарбоксилази (ADC).

1.3 Роль поліамінів в організмі людини

Перетворення аргініну в орнітин та сечовину за допомогою аргінази ініціює пізнішу фазу репарації запальної відповіді. Орнітин перетворюється на пропроліферативні поліаміни за допомогою орнітиндекарбоксилази (ODC) і на пролін, що входить до складу позаклітинного матриксу, за допомогою орнітин-амінотрансферази (OAT). На противагу цитостатичним ефектам NO, поліаміни мають пропроліферативні ефекти.

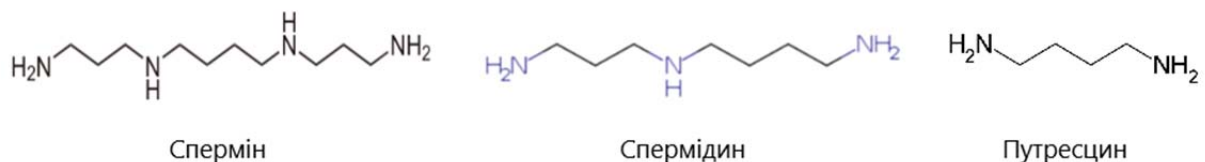


Рис. 1.5 – Структурні формули основних поліамінів

Поліаміни (путресцин, спермідин і спермін) - це невеликі катіонні молекули, необхідні для росту і гомеостазу клітин. ODC, один з найбільш високо регульованих еукаріотичних ферментів, є першим і лімітуючим ферментом біосинтезу, який метаболізує орнітин до путресцину, першого поліаміну. Надмірна експресія ODC призводить до трансформації клітин NIH/3T3 [48], посилює розвиток пухлин [49] та інвазивність і значно підвищена практично

у всіх пухлинах тварин [50]. Поступове збільшення активності ODC, що корелює з прогресуванням від нормальної слизової оболонки товстої кишки до аденокарциноми, вказує на роль ODC у багатоетапному канцерогенезі [51]. ODC є протоонкогеном. І навпаки, виснаження внутрішньоклітинних поліамінів пригнічує клітинний поділ. Крім того, дефіцит аргініну, але не орнітину, індукує компенсаторний транспорт поліамінів [52]. Це спостереження підтверджує положення про те, що аргінін лежить в основі синтезу поліамінів, а також генерації NO. Виробництво орнітину та його метаболізм до поліамінів є основним елементом фази репарації.

Гомеостаз поліамінів підтримується в залежності від типу клітини та тканини, де внутрішньоклітинні рівні поліамінів жорстко регулюються складними механізмами зворотного зв'язку [53, 54], які включають (1) транспорт; (2) контроль транскрипції ODC, AMD1 та SSAT1; поліамін-залежний контроль обороту мРНК ODC та SSAT1; (3) SPD-залежний контроль ініціації трансляції ODC та SSAT; (4) поліамін-залежний рибосомний зсув рамки, що дозволяє синтезувати спеціальний інгібітор ODC-антиферменту (OAZ1), який спрямовує протеасомну деструкцію ODC і контролює транспорт поліамінів [55]; (5) поліамін-залежний контроль транскрипції інгібітора ODC-антиферменту-приманки (AZIN), який пригнічує активність антиферменту [56,57]; (6) контроль активності ферментів за допомогою зворотного зв'язку (напр. індукція активності AMD1 після інгібування ODC [58]); і (7) поліаміновий контроль убіквітин-незалежного/NQO1-залежного протеасомного руйнування ODC [59], який має один з найкоротших періодів напіврозпаду серед усіх білків у клітині [60]. Крім того, окремі ферменти на шляху біосинтезу поліамінів також реагують на широкі регулятори фізіології, де існує циркадний контроль експресії *Odc*, *Srm* та *Amd1*, а також рівнів поліамінів у добовому режимі з піковими рівнями вночі (~16 годин за часом), тоді як катаболізм поліамінів виявляється відносно постійним протягом циклів дня і ночі.

Рівні поліамінів в нормі підтримуються у вузьких фізіологічних межах, а порушеного метаболізму поліамінів достатньо, щоб спровокувати різні патології, включаючи рак, неврологічні дефекти та старіння [61,62]. Наприклад, підвищені рівні поліамінів та ферментів біосинтезу поліамінів ODC і AMD1 часто асоціюються з гіперпроліферативними фенотипами і надмірно експресуються при багатьох типах раку.

Активація катаболізму поліамінів сприяє старінню [63] та пошкодженню тканин у відповідь на травму, що спостерігається при різних патологічних станах, які призводять до пошкодження клітин [64,65]. Нарешті, загальний рівень поліамінів знижується з віком [66], а добавки поліамінів, особливо SPD, як було показано, продовжують тривалість життя в декількох модельних організмах, включаючи дріжджі, що проростають (*S. cerevisiae*), дрозофілу, нематоду (*C. elegans*), імунні клітини людини [67] та мишей [68], що свідчить про сприятливий вплив добавок поліамінів на здоров'я людини.

1.4 Системи транспортування Ca^{2+}

1.4.1 Системи входу Ca^{2+}

Транспорт Ca^{2+} через внутрішню мітохондріальну мембрану забезпечується функціонуванням низки каналів та обмінників, властивості та, подекуди, структура яких описані нижче.

Ca^{2+} -уніпортер. Мітохондріальний Ca^{2+} -уніпортер забезпечує швидке і масоване надходження катіону до матриксу, функціонуючи при мікромольних концентраціях Ca^{2+} [69]. За своїми електрофізіологічними характеристиками уніпортер являє собою, найімовірніше, Ca^{2+} -селективний іонний канал вхідного випрямлення, що транспортує іони Ca за електрофоретичним механізмом внаслідок наявності трансмембранного електричного потенціалу на внутрішній мембрані мітохондрій[70].

У електрофізіологічних дослідженнях встановлено, що в 99 % ймовірність відкритого стану Ca^{2+} -уніпортера спостерігається при потенціалі – 200 мВ та зменшується до 11 % при – 80 мВ. Ca^{2+} -уніпортер мітохондрій деяких тканин має низьку спорідненість до іонів Ca ($K_{0,5} \leq 200$ мкмоль/л), активується за концентрації катіона, що перевищує 200 нмоль/л, а насичення за Ca^{2+} досягається при 200 мкмоль/л[71].

Показано, що при деполяризації внутрішньої мітохондріальної мембрани Ca^{2+} -уніпортер може працювати у реверсному режимі, забезпечуючи вихід Ca^{2+} із матриксу [72].

RaM. Наприкінці 1980-х років з експериментів з використанням флуоресцентних індикаторів Ca^{2+} , стало зрозуміло, що Ca^{2+} -сигналізація в клітинному цитозолі відбувається не через зміну стаціонарного рівня внутрішньоклітинного $[\text{Ca}^{2+}]$ ($[\text{Ca}^{2+}]_c$), а через транзиторні зміни $[\text{Ca}^{2+}]_c$.

Це було перевірено в серії експериментів, описаних Sparagna та ін. Як показують попередні дані, Ca^{2+} -уніпортер не переносив Ca^{2+} при концентра-

ції останнього нижче 200 нМ. Виходячи з результатів експерименту, це можна пояснити лише одним можливим способом - це швидкий нетто-транспорт [73].

Таке швидке чисте поглинання було названо швидким режимом поглинання (англ. rapid mode of uptake, RaM). Експерименти встановили багато характеристик RaM у мітохондріях печінки та серця [73,74], а також деякі його характеристики в мітохондріях мозку [75]. Поглинання Ca^{2+} через RaM виявило значну схожість у мітохондріях печінки та серця, але також і суттєві відмінності. Як у мітохондріях печінки, так і в мітохондріях серця було виявлено, що зв'язування Ca^{2+} із зовнішнім сайтом зв'язування при $[\text{Ca}^{2+}]$ вище 140-160 нМ пригнічувало подальше поглинання через механізм RaM після короткого періоду швидкого поглинання [73,76].

Ще однією характеристикою RaM, яка спостерігається в даних щодо мітохондрійного поглинання Ca^{2+} в клітинах, є поглинання мітохондріями при низькому рівні цитозольного $[\text{Ca}^{2+}]$. Як обговорювалося вище, уніпортер не транспортує Ca^{2+} при концентраціях нижче порогової в діапазоні 200-250 нМ, тоді як RaM може транспортувати Ca^{2+} в цьому діапазоні концентрацій. Декілька лабораторій опублікували докази мітохондріального поглинання Ca^{2+} , коли позамітохондріальна концентрація Ca^{2+} становила близько 200 нМ [77]. Крім того, в деяких випадках було показано, що активація продукції NADH слідує за цим поглинанням з низьких цитозольних концентрацій Ca^{2+} [78]. Очевидно, що мітохондрії не обов'язково повинні знаходитись у мікродоменах, щоб спостерігати мітохондріальне поглинання Ca^{2+} та активацію етапів фосфорилування АТФ [79].

RyR. Виявлення рецептора ріанодину (RyR) у внутрішній мембрані мітохондрій клітин серцевого м'яза є потенційним третім механізмом мітохондріального імпорту Ca^{2+} [80].

Під час проведення досліджень, він також показав дзвоноподібну Ca^{2+} -залежність зв'язування $[\text{}^3\text{H}]$ ріанодину з половинною концентрацією активації

приблизно 2 мкМ, піком при 40 мкМ та інактивацією при вищих концентраціях Ca^{2+} . Дзвоноподібна залежність зв'язування [^3H]ріанодину від концентрації Ca^{2+} свідчить про те, що за концентрацій нижче та вище мкМ mRyR активується. Однак за вищих концентрацій (> 50 мкМ), діапазонів $[\text{Ca}^{2+}]$, які сприяють активації уніпортеру Ca^{2+} , mRyR інактивується. Концентрація Ca^{2+} в мікродоменах між ER/SR і мітохондріями може коливатися від менш ніж 1 мкМ до 100 мкМ під час цитозольних Ca^{2+} транзентів. У нижній половині цього діапазону $[\text{Ca}^{2+}]$ (< 50 мкМ) mRyR буде активований, тоді як у верхній половині цього діапазону ($[\text{Ca}^{2+}] > 50$ мкМ) mRyR буде інактивований. Таким чином, mRyR здатний поглинати Ca^{2+} з перехідних процесів у мікродоменах більш ефективно, ніж мітохондріальний Ca^{2+} -уніпортер[80].

1.4.2 Системи виходу Ca^{2+}

У мітохондріях виявлено як Na^+ -залежний, так і Na^+ -незалежний механізм виходу кальцію. Хоча Na^+ -незалежний механізм є домінуючим у мітохондріях печінки та нирок [81], вони також містять деяку кількість протеїнів Na^+ -залежного виходу. Аналогічно, в мітохондріях серця і мозку домінує Na^+ -залежний механізм [82], проте в цих органелах також спостерігається деякий Na^+ -незалежний вихід Ca^{2+} . У ранніх роботах, присвячених мітохондріальному транспорту Ca^{2+} , вважалося, що акумуляція є активним процесом, а вихід - пасивним [83].

Na⁺-залежний вихід. Ca^{2+} - Na^+ -обмінник є основним механізмом виходу Ca^{2+} у мітохондріях мозку, серця, скелетних м'язів та багатьох інших типів мітохондрій [84]. Це білок-антипортер, який виводить кальцій з мітохондрій. Він використовує енергію, яка зберігається в електрохімічному градієнті натрію (Na^+), дозволяючи Na^+ текти вниз по градієнту через мембрану мітохондрій в обмін на зустрічний транспорт іонів кальцію (Ca^{2+}).

Обмінник має низьку афінність з Ca^{2+} , але може швидко транспортувати іони, транспортуючи до п'яти тисяч іонів Ca^{2+} за секунду [85]. Тому він потребує великих концентрацій Ca^{2+} , щоб бути ефективним, але є корисним для позбавлення клітини від великої кількості Ca^{2+} за короткий час.

Na⁺-незалежний вихід. H^+ - Ca^{2+} -обмінник транспортує Ca^{2+} із мітохондрій, використовуючи енергію градієнта H^+ , але може також працювати в реверсному режимі, забезпечуючи накопичення Ca^{2+} в мітохондріях за його низьких цитозольних концентрацій (< 1 мкмоль/л) [86]. Показано, що у ліпосомах з вбудованим H^+ - Ca^{2+} -обмінник закиснення середовища інкубації викликає вивільнення Ca^{2+} , тоді як його залуження супроводжується накопиченням катіона [86].

Механізм Na^+ -незалежного виходу інгібується Sr^{2+} , Mn^{2+} , низькими рівнями роз'єднувачів, таких як СССР, CN- і дуже високими рівнями рутенієвого червоного [87].

Подальше вивчення впливу дії продуктів метаболізму L-аргініну на транспорт іонів Ca в мітохондріях покращить розуміння процесів скорочення міометрія.

РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Тварини

В експериментах були використані статевозрілі невагітні щури лінії «Вістар» віком близько 2 місяців, маса тіла яких становила біля 200 г, маса матки 300-700 мг. Тварин витримували у камері, насиченій парами хлороформу для введення у стан наркозу, після чого декапітували. Усі дії з тваринами були проведенні згідно з Законом України № 3447 IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» та Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та наукових цілей [88].

2.2 Виділення фракції ізольованих мітохондрій

Фракцію ізольованих мітохондрій отримували з гладеньком'язових клітин матки щурів за допомогою методу диференційного центрифугування [89]. Матку після ізолювання від жирової та сполучної тканини поміщали у розчин 0.9% NaCl. Далі тканину на льоду подрібнювали ножицями на маленькі шматочки близько 2×2 мм та переносили у охолоджений розчин наступного складу: 250 мМ цукроза, 10 мМ HEPES (pH = 7,4), 1 мМ EGTA, 1 мг/мл бичачого сироваткового альбуміну (BSA); співвідношення тканини до робочого розчину складало 1:9. Тканину матки гомогенізували на льоду за допомогою гомогенізатору SilentCrusher M (Heidolph Instruments, Німеччина) 3 рази по 20 секунд із перервою в 1 хвилину зі швидкістю 17500 об/хв. Надалі гомогенат фільтрували та центрифугували протягом 15 хвилин при 1000 g за температури 4°C. Надосадову відбирали та центрифугували 15 хвилин при 12000 g за температури 4°C. Одержаний осад (преципітат) складався з мітохондрій міоцитів міометрія. Надалі його ресуспендували у розчині наступ-

ного складу: 250 мМ цукроза, 10 мМ HEPES (pH = 7,4), 1 мг/мл БСА у співвідношенні 100 мг тканини на 100 мл буферного розчину.

Після процедури навантаження флуоресцентними зондами суспензію мітохондрій розводили у буферному розчині (250 мМ цукроза, 10 мМ HEPES (pH = 7,4), 1 мг/мл БСА) у співвідношенні 1:10 та повторно центрифугували 15 хвилин при 12000 g за температури 4°C. Осад знову ресуспендували у буфері вказаного складу. Фракцію ізольованих мітохондрій впродовж експерименту зберігали на льоду.

Вміст білку у фракції мітохондрій визначали методом Бредфорд за реакцією з реактивом Coomassie Brilliant Blue G-250 [90]. Середнє значення вмісту білку в мітохондрійній фракції у всіх експериментах складало 1-2 мг/мл.

2.3 Дослідження вмісту іонізованого Ca^{2+} в ізольованих мітохондріях

Навантаження мітохондрій флуоресцентним зондом Fluo-4 AM, чутливим до Ca^{2+} ($\lambda_{\text{ex}} = 490$ нм, $\lambda_{\text{fl}} = 525$ нм) у концентрації 2 мкМ, проводили в середовищі: 10 мМ HEPES (pH 7,4, 25 °C), 250 мМ цукроза, 1 мг/мл БСА, 0,02% Pluronic F-127 протягом 30 хвилин при 25 °C.

Дослідження змін вмісту іонізованого кальцію в матриксі мітохондрій проводили на спектрофлуориметрі Quanta Master 40 РТІ (Канада) з програмним забезпеченням FelixGX 4.1.0.3096. Процес акумуляції Ca^{2+} відбувався в середовищі (2 мл) наступного складу: 20 мМ HEPES (pH 7,4, 37 °C), 2 мМ K^+ -фосфатний буфер (pH 7.4, 37 °C), 250 мМ цукроза, 3 мМ MgCl_2 , 3мМ АТР, 5 мМ сукцинат натрію. Процес акумуляції ініціювали внесенням аліквоти (20 мкл) Ca^{2+} , кінцева концентрація якого становила 0.08 мМ. Вміст білку мітохондріальної фракції 25 мкг.

2.4 Вивчення синтезу оксиду азоту в ізольованих мітохондріях

Навантаження мітохондрій NO-чутливим флуоресцентним зондом DAF-FM-DA ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{fl}} = 525 \text{ нм}$) в концентрації 5 мкМ проводили в середовищі: 10 мМ HEPES (pH 7,4, 25 °C), 250 мМ цукроза, 1 мг/мл БСА, 0,02% Pluronic F-127 протягом 30 хвилин при 25 °C.

Дослідження синтезу оксиду азоту мітохондріями проводили методом спектрофлуориметрії (на спектрофлуориметрі Quanta Master 40 РТІ). Склад інкубаційного середовища (2 мл): 20 мМ HEPES (pH 7,4, 37 °C), 2 мМ K^+ -фосфатний буфер (pH 7.4, 37 °C), 125 мМ KCl, 25 мМ NaCl, 5 мМ піруват натрія, 5 мМ сукцинат натрія, 0.01 мМ NADPH, 0.01 мМ тетрагідробіоптерин (BH_4), 0.05 мМ L-аргінін, 0.1 мМ Ca^{2+} . Час інкубації реакції синтезу NO становив 15 хвилин. Вміст білку мітохондріальної фракції 15-20 мкг.

2.5 Визначення утворення активних форм кисню в ізольованих мітохондріях

Формування активних форм кисню (АФК) (зміни у флуоресценції DCF) у ізольованих мітохондріях досліджували за допомогою методу протокової цитометрії на цитометрі COULTER EPICS XLTM (Beckman Coulter, США) з аргоновим лазером ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ нм}$), програмне забезпечення SYSTEM1TM (BeckmanCoulter, США), $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{fl}} = 515 \text{ нм}$ (F11 channel). Навантаження мітохондрій флуоресцентним зондом 25 мкМ DCF-DA (2',7'-дихлордигідрофлуоресцеїн діацетат) проводилося в середовищі, що містить 10 мМ HEPES (pH 7,4, 25 °C), 250 мМ цукроза, 1 мг/мл БСА, 0,02% Pluronic F-127 протягом 30 хвилин при 25 °C.

Інкубаційне середовище (2 мл) мало наступний склад: 20 мМ HEPES (pH 7,4, 20 °C), 2 мМ K^+ -фосфатний буфер (pH 7,4, 20 °C), 125 мМ KCl, 25 мМ NaCl, 5 мМ піруват натрія, 5 мМ сукцинат натрія. Реакцію ініціювали додаванням аліквоти (20 мкл) 5 мМ пірувату + 5 мМ сукцинату. Вміст білка у фракції мітохондрій становив 20-25 мкг.

2.6 Вивчення змін мембранного потенціалу мітохондрій

Зміни електричного потенціалу мітохондрій реєстрували згідно змін інтенсивності флуоресценції потенціал-чутливого зонда карбоксиціанінового ряду JC-1 [91]. Зміни флуоресцентній 1 мкМ JC-1 досліджували методом спектрофлуориметрії на спектрофлуориметрі Quanta Master 40 РТІ: $\lambda_{\text{ex}} = 488$ нм, $\lambda_{\text{fl}} = 535$ нм (мономер), $\lambda_{\text{fl}} = 595$ нм (J-агрегат). Флуоресцентний зонд вносили безпосередньо в інкубаційне середовище наступного складу: 20 мМ HEPES (рН 7,4, 20 °С), 2 мМ K^+ -фосфатний буфер (рН 7,4, 20 °С), 125 мМ KCl, 25 мМ NaCl, 5 мМ піруват натрія, 5 мМ сукцинат натрія. Вміст білка у фракції мітохондрій становив 25 мкг.

2.7 Оцінка змін гідродинамічного діаметру мітохондрій

Функція розподілу гідродинамічного діаметра мітохондрій була визначена за допомогою метода лазерної кореляційної спектроскопії [92]. Використовували прилад ZetaSizer-3 (Malvern Instruments, Велика Британія) з комп'ютерним корелятором типу Multi8 7032 се, оснащений гелій-неоновим лазером LGH-111 з довжиною хвилі 633 нм і потужністю 25 мВт. Реєстрація розсіяного лазерного випромінювання від суспензії мітохондрій проводилася протягом 10 хвилин з інтервалом 1 хвилину при температурі 24 °С під кутом розсіювання 90°. Автокореляційну функцію обробляли за допомогою стандартної комп'ютерної програми PCS-Sizemodev 1.61.

Інкубаційне середовище (2 мл) для умов синтезу NO мало наступний склад: 20 мМ HEPES (рН 7,4, 25 °С), 2 мМ K^+ -фосфатний буфер (рН 7.4, 25 °С), 125 мМ KCl, 25 мМ NaCl, 5 мМ піруват натрія, 5 мМ сукцинат натрія.

Середовище інкубації для дослідження ефектів нітросполук було такого складу: 20 мМ НЕРЕС (рН 7,4, 25 °С), 2 мМ К⁺-фосфатний буфер (рН 7.4, 25 °С), 250 мМ цукроза, 3 мМ MgCl₂, 3мМ АТФ, 5 мМ сукцинат натрію.

Вміст білка у фракції мітохондрій становив 50 мкг.

2.8 Розрахунок кінетичних параметрів

В роботі були розраховані кінетичні параметри транспортного процесу – початкова швидкість акумуляції Ca²⁺ (V₀) та час напівмаксимальної акумуляції Ca²⁺ (τ_{1/2}). Для розрахунків бралось до уваги те, що зростання флуоресценції Ca²⁺-чутливого зонду Fluo-4, навантаженого в мітохондрії, адекватно відображає зростання концентрації Ca²⁺ в матриксі органел.

Початкову швидкість енергозалежної акумуляції Ca²⁺ (V₀) та характеристичний час напівмаксимальної акумуляції катіона (τ_{1/2}) розраховували за формулами:

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

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

k (с⁻¹) – константа швидкості входу Ca²⁺, яку знаходили з лінійної залежності зміни флуоресценції Fluo-4 від часу в координатах {ln ((F_{max}-F₀)/(F_{max}-F)); t}, де F₀ – початкова флуоресценція, F – флуоресценція за відповідні проміжки часу, F_{max} – стаціонарний рівень флуоресценції, який досягається з часом як наслідок входу певної кількості іонів Ca в матрикс.

2.9 Методи статистичного аналізу

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили з використанням пакета стандартних програм Microsoft Excel, застосовуючи загальновідомі методи і t-критерій Стьюдента.

2.10 Реактиви

В дослідженнях використано наступні реактиви: HEPES, sucrose, sodium succinate, sodium pyruvate, bovine serum albumin, poly-L-lysine, ATP, Pluronic F-127, CaCl₂, carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazine (CCCP), DAF-FM/DAF-FM-DA, NADPH, tetrahydrobiopterin (BH₄), N^o-nitro-L-arginine (NA), N^o-nitro-L-arginine methyl ester (NAME), S-Nitroso-N-acetyl-DL-penicillamin (SNAP), spermine, carboxy-PTIO (Sigma, USA); L-arginine, sodium nitrite, alimethicin (Sigma-Aldrich, USA); JC-1, DCF-DA, Sodium nitroprusside dehydrate (SNP) (Fluka, Switzerland); Fluo-4 AM (Molecular Probe, USA). Інші реактиви вітчизняного виробництва.

Розчини готували на бідистильованій воді, яка мала питому електропровідність не більше 2,0 мкСм/см. Електропровідність води реєстрували за допомогою кондуктометра ОК-102/1 (Угорщина).

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Вивчення ефектів L-аргініну та донорів NO на енергозалежну акумуляцію Ca^{2+} в мітохондріях міомерію

Ізольовані мітохондрії міомерію ефективно акумулюють іони Ca^{2+} в номінальній концентрації 80 мкМ з реакційного середовища, яке містить 5 мМ сукцинату та 3 мМ MgATP^{2-} . За даних умов (в присутності 3 мМ MgATP^{2-}) концентрація вільного іонізованого кальцію в середовищі його акумуляції реально становить 45 мкМ, що відповідає його локальній концентрації в межах контактів мітохондрії-саркоплазматичний ретикулум та мітохондрії-плазмалема [93,94,95]. Комплекс MgATP^{2-} необхідний для реверсної роботи АТФ-синтази та забезпечення додаткової рушійної сили для входу Ca^{2+} (формування електрохімічного градієнту протонів, Δp). Зазначена концентрація вільного Ca^{2+} приблизно відповідає значенню константи активації за Ca^{2+} для мітохондрійної NO-синтази, яка для об'єкту наших досліджень складає 44 мкМ [96].

Внесення 0,05 мМ L-аргініна та кофакторів (0,01 мМ NADPH та BH_4) призводить до стимулювання енергозалежної акумуляції Ca^{2+} в матрикс мітохондрій (рис. 3.1). У присутності скавенджера NO 0,1 мМ C-PTIO ефект L-аргініну на акумуляцію Ca^{2+} мітохондріями не спостерігається, що доводить його зв'язок саме з генерацією NO за участі mtNOS.

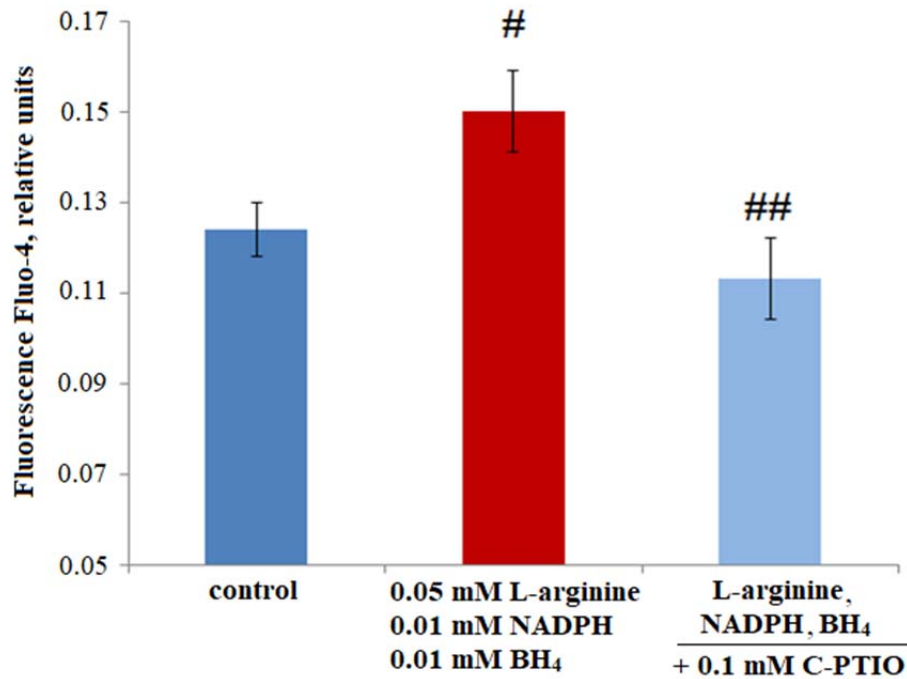


Рис. 3.1 – Вплив L-аргініну за присутності екзогенних кофакторів NO-синтази та C-PTIO на акумуляцію Ca^{2+} (0.08 mM) в мітохондріях. # - $P < 0.01$ порівняно з контролем, ## - $P < 0,01$ порівняно з ефектом L-аргініну. Дані представлені як середнє значення \pm SE, $n=6$.

В подальшому ми використали нітросполуки, зокрема донори та попередник оксиду азоту, для з'ясування впливу NO на акумуляцію Ca^{2+} мітохондріями. Відомо, що біологічна активність оксиду азоту безпосередньо пов'язана з такими сполуками як власне молекула NO, катіон нітронію (NO^+) та аніон нітроксилу (NO^-). Наводяться докази того, що широкоживані донори NO, а саме нітрупрусид натрію (SNP) та S-нітрозно-N-ацетил-DL-пеніциламін (SNAP) продукують в розчинах NO^+ , який виявляє властивості потужного нітрозилуючого агенту [97,98]. В експериментах був застосований також попередник оксиду азоту нітрит натрію (SN), який здатний продукувати NO та його редокс-похідні за присутності гемових груп та залізо-сірчаних комплексів, на які багаті мітохондрії [99]. Використані нітросполуки в концентрації 0,1 mM суттєво стимулюють акумуляцію Ca^{2+} мітохондріями (рис. 3.2). Цей ефект повністю знімався за наявності в інкубаційному середовищі C-PTIO, що є доказом його зв'язку саме з оксидом

азоту. В попередніх дослідженнях нами було продемонстровано, що ефекти нітросполук на транспорт Ca^{2+} в ізольованих мітохондріях міометрія чутливі до протонифора СССР, інгібітора Ca^{2+} -уніпортера рутенієвого червоного і нечутливі до блокатора пори перехідної провідності циклоспорину, отже пов'язані із впливом саме на уніпортер [100]. Слід відмітити, що в контролі за відсутності нітросполук С-РТІО дещо знижує акумуляцію Ca^{2+} мітохондріями (рис. 3.2), що пояснюється ендогенною продукцією ними NO. Таким чином, наведені результати свідчать, що саме оксид азоту як продукт окисного метаболізму L-аргініну мітохондріями стимулює енергозалежну акумуляцію Ca^{2+} в цих субклітинних структурах.

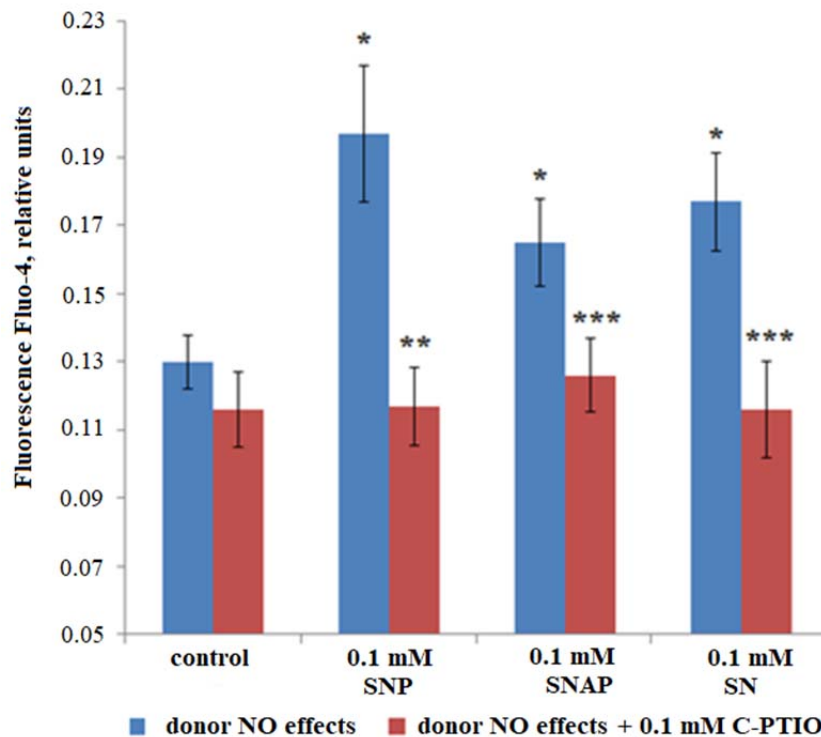


Рис. 3.2 – Вплив донорів (SNP, SNAP) і попередника (SN) оксиду азоту, а також С-РТІО на акумуляцію Ca^{2+} в мітохондріях.

* - $P < 0.05$ порівняно з контролем, ** - $P < 0.01$ порівняно з ефектом SNP, *** - $P < 0.05$ порівняно з ефектами SNAP або SN. Дані представлені як середнє значення \pm SE, $n=6$.

Втім, ми не можемо також виключити можливість безпосередніх ефектів L-аргініну, а також L-орнітину і сечовини, продуктів подальшого метаболізму орнітину, на енергозалежну акумуляцію Ca^{2+} мітохондріями.

3.2 Дослідження ефектів L-аргініну та Ca^{2+} на електричний потенціал внутрішньої мітохондрійної мембрани та генерацію активних форм кисню

Електричний потенціал внутрішньої мембрани – інтегральний показник функціональної активності мітохондрій. Від його величини залежать робота Ca^{2+} -транспортувальних систем та відкриття пори перехідної провідності [93,101]. Гіперполяризація внутрішньої мітохондрійної мембрани має негативні наслідки, що проявляються в змінах морфології мітохондрій, супроводжується Ca^{2+} -перевантаженням та гіперпродукцією активних форм кисню. Зростання потенціалу на внутрішній мітохондрійній мембрані призводить до посиленої генерації супероксид-аніона в дихальному ланцюзі [102]. Причинами цього явища можуть бути зворотний транспорт електронів за участі комплексу I, а також гальмування переносу електронів в цитохромній системі, що призводить до накопичення убісеміхінону. Саме тому помірна дисипація електрохімічного градієнту протонів за участі роз'єднувальних протеїнів мітохондрій та жирних кислот розглядається як захисна реакція, спрямована на попередження гіперпродукції активних форм кисню [103].

У присутності субстратів дихання (5 мМ сукцинату та пірувату) спостерігаємо певний рівень поляризації мітохондрійної мембрани, який у відносних одиницях флуоресценції JC-1 (595/535) дорівнює "1". Внесення протонофора CCCP (10 мкМ) призводить до потужної деполяризації мітохондрійної мембрани (рис.3.3, синя крива).

Стимулювання ендогенного синтезу оксиду азоту внесенням до мітохондрій L-аргініну (0,05 мМ) та Ca^{2+} (0,1 мМ) призводить до помірного зниження електричного потенціалу на внутрішній мітохондрійній мембрані

(рис. 3.3, червона крива). Цей ефект може бути зумовлений кількома причинами. По-перше, гальмуванням оксидом азоту роботи дихального ланцюга [104]. По-друге, початковим посиленням транспорту Ca^{2+} крізь мембрану.

За присутності в середовищі субстратів дихання та MgATP^{2-} спостерігається додаткова енергізація мітохондрій і зростання електричного заряду на внутрішній мітохондрійній мембрані (рис. 3.3, зелена крива). Зниження електричного потенціалу на внутрішній мітохондрійній мембрані в умовах енергозалежного транспорту Ca^{2+} (0,08 мМ) дійсно реєструється в наших експериментах (рис. 3.3) та може бути наслідком масованого надходження позитивно заряджених катіонів до матриксу і, вірогідно, є обмежувальним чинником подальшого накопичення катіону. Втім, деполаризуючий ефект надходження іонів Ca^{2+} в умовних одиницях наближається до такого ефекту в умовах синтезу оксиду азоту (рис. 3.3, Б). Надалі Ca^{2+} -залежне стимулювання активності комплексів електрон-транспортного ланцюга [94], вірогідно, буде супроводжуватися відновленням рівня поляризації мембрани. Зростання концентрації іонів Ca^{2+} в мітохондріях супроводжується стимуляцією Ca^{2+} -залежного синтезу ними NO [105]. Отже, транспорт Ca^{2+} , зміни мембранного потенціалу та синтез NO в мітохондріях є взаємокерованими процесами.

Зниження електричного потенціалу за дії NO може захищати мітохондрії від гіперполяризації, надлишкового транспорту Ca^{2+} в матрикс та гіперпродукції активних форм кисню.

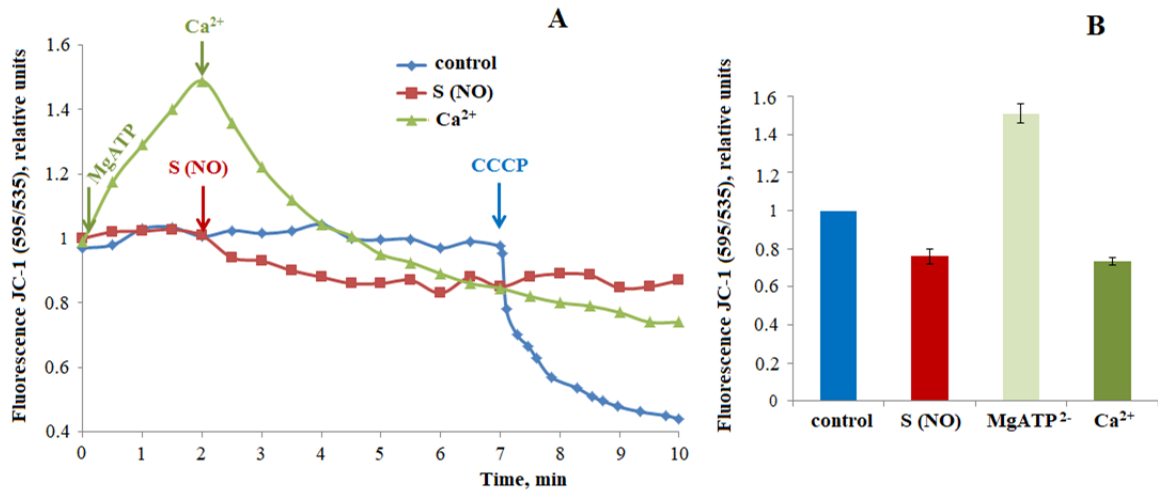


Рис. 3.3 – Зміни електричного потенціалу внутрішньої мітохондрійної мембрани в умовах активації синтезу оксиду азоту (внесення субстратів і кофакторів NOS, S(NO): 0.05mM L-аргініну, 0.1 mM Ca²⁺, 0.01 mM NADPH, 0.01 mM NH₄) та енергозалежної акумуляції 0.08 mM Ca²⁺ мітохондріями за присутності 3 mM MgATP²⁻. А – результат типового дослідження, В – статистична обробка результатів. Дані є середніми±SE, n=4. За “1” прийнято значення потенціалу за присутності в середовищі 5 mM сукцинату та пірувату. Повна деполаризація мембрани за додавання 0.01 mM CCCP

Конститутивні NO-синтази за певних умов володіють оксидазною активністю і генерують O₂^{•-}/H₂O₂ [106]. Ця властивість особливо важлива у випадку мітохондрій як джерела активних форм кисню в клітині, а також значення гіперпродукції цих сполук в механізмах розвитку мітохондрійної дисфункції [103]. Слід також взяти до уваги можливу структурно-функціональну єдність mtNOS з комплексами дихального ланцюга – основними джерелами активних форм кисню [107].

Продемонстровано, що внесення до середовища ізольованих мітохондрій субстрату та кофакторів NO-синтази не призводило до достовірного посилення DCF-флуоресценції, яка відображає інтенсивність генерації активних форм кисню та пероксинітриту (рис. 3.4).

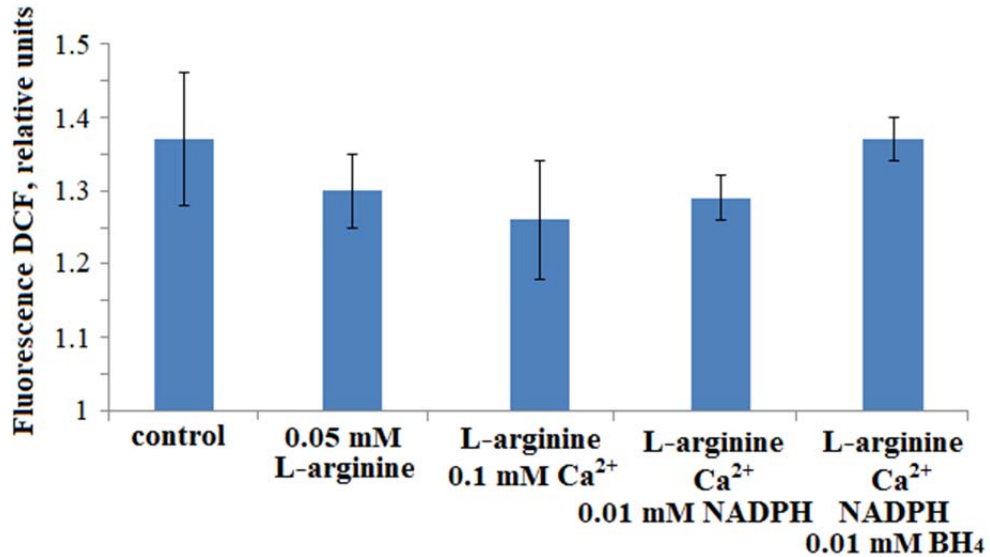


Рис. 3.4 – Синтез активних форм кисню мітохондріями за умови послідовного внесення L-аргініна та кофакторів NOS, Дані є середніми \pm SE, n=4.

Важливе значення для функціонування мітохондрій та підтримання їхньої цілісності є регулювання об'єму матриксу, що, в свою чергу, впливає на інтенсивність дихання та рівень продукування АТФ. Зміни геометрії мітохондрій корелюють із змінами генерації активних форм кисню та поляризації внутрішньої мітохондрійної мембрани. Набухання мітохондрій є не лише кінцевою стадією їхньої дисфункції, але й відіграє ключову роль в біохімічних механізмах ушкодження клітини [108]. Досить інформативним та ефективним у випадку характеризування за розміром сферично-подібних частинок у розчинах є метод лазерної кореляційної спектроскопії. Метод є високочутливим (реєструються зміни об'єму вже починаючи з 0,1 %, а діаметр частинок, які підлягають аналізу, – від 0,001 до 20 мкм), потребує незначної кількості експериментального матеріалу і унеможливорює артефакти, пов'язані з малими розмірами субклітинних частинок.

Створення умов для посилення синтезу NO мітохондріями за додавання L-аргініну та Ca²⁺ не призводило до зростання їхнього об'єму (рис. 3.5, А). За присутності каналоформера аламетицина, який, формуючи пори у внутрішній мітохондрійній мембрані, призводить до порушення осмотичного балансу між матриксом та оточуючим середовищем, спостерігали суттєве зрос-

тання гідродинамічного діаметру органел (рис. 3.5, Б). Порівняно з дією каналоформеру, нітросполуки SNP та SN у концентраціях 0,1 мМ не змінювали на цей параметр (рис. 3.5, Б). Таким чином, ендогенно синтезований NO та нітросполуки у досліджуваних концентраціях хоча і призводять до зниження електричного потенціалу, але не спричиняють видимої дисфункції мітохондрій.

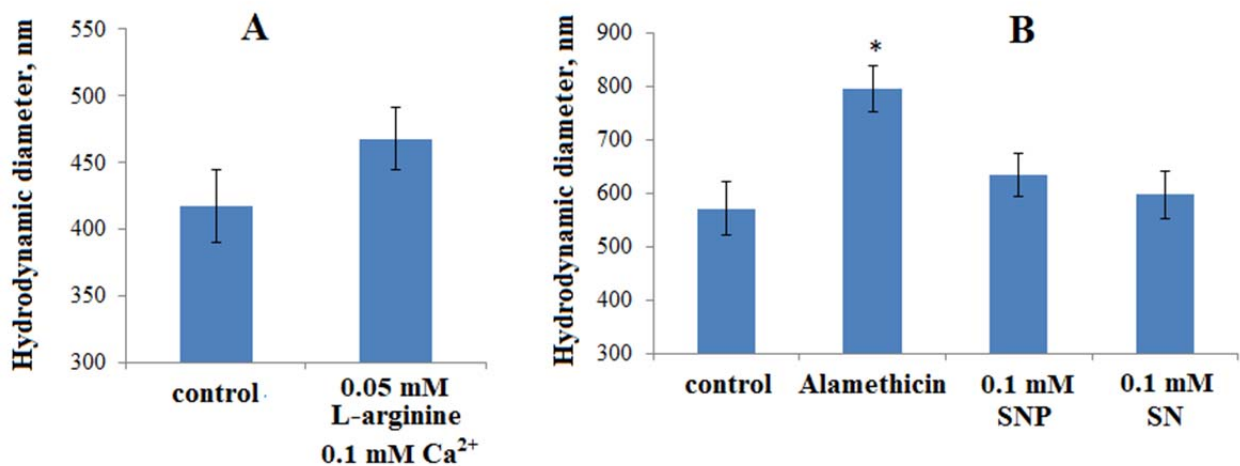


Рис. 3.5 – Зміни гідродинамічного діаметру мітохондрій за активації синтезу NO (L-аргініна та Ca²⁺) (A) та впливу SNP та SN (B). * - P < 0,05 порівняно з контролем. Дані представлені як середнє значення ± SE, n=5. Аламетицин (каналоформер) – 7,5 мкг/мл.

3.3 Вивчення ефектів сперміну на акумуляцію Ca²⁺ в ізольованих мітохондріях

В реакціях неокисного метаболізму L-аргінін гідролітично розщеплюється аргіназою до L-орнітину і сечовини [109]. У ссавців ідентифіковано дві ізоформи ензиму: аргіназа I і аргіназа II. Аргіназа II типу – ензим мітохондрійної локалізації, який виявлено у різних типах клітин [109]. Сечовина наразі розглядається в якості можливого регулятора ряду фізіологічних функцій [110].

В наших дослідженнях сечовина у фізіологічних для клітин концентраціях (20 мМ) не впливала на акумуляцію Ca²⁺ мітохондріями міометрія (рис. 3.6).

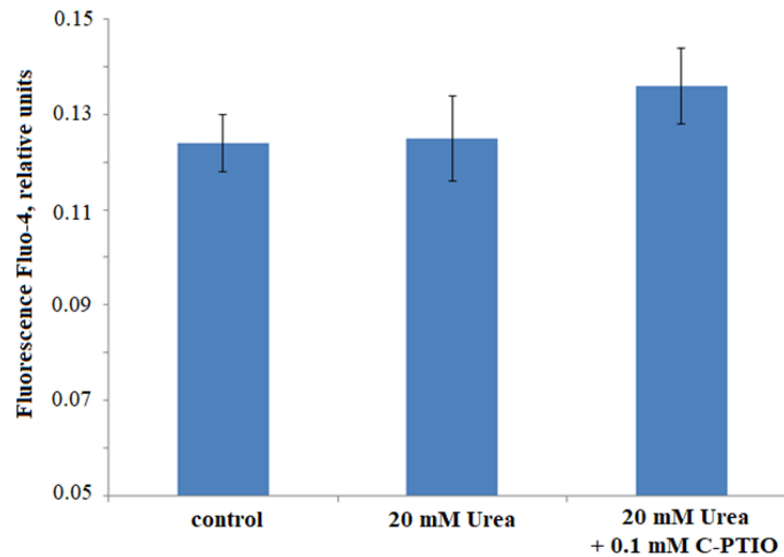


Рис. 3.6 – Транспорт Ca^{2+} в мітохондрії за присутності сечовини. Дані є середніми \pm SE, $n=4$.

За дії орнітиндекарбоксилази утворюється путресцин, який надалі метаболізує в спермідин (N-ацетиспермідин) та спермін [109]. Вміст сперміну збільшується в тканинах матки жінок за вагітності. Спермін концентраційно-залежно (10^{-6} - 10^{-2} М) знижує спонтанні скорочення як вагітної, так і невагітної матки [111]. Вміст цього поліаміну в клітині знаходиться в межах 25-460 мкМ. Спермін може впливати на здатність мітохондрій акумулювати Ca^{2+} і, відповідно, концентрацію цього катіону як в матриксі, так і в міоплазмі.

Продемонстровано, що стимуляція транспорту Ca^{2+} в мітохондрії має місце лише за відносно низьких фізіологічно-значущих концентрацій сперміну (0,1 мМ), тоді як за подальшого росту концентрації до 0,5 та 1 мМ ефект не відрізнявся від контрольного (рис. 3.7, А). Таким чином, ефекти сперміну виявились високою мірою залежними від концентрації самого поліаміну. Це, можливо, обумовлено екрануванням полікатіоном негативного заряду з внутрішнього боку мітохондрійної мембрани – рушійної сили акумуляції Ca^{2+} мітохондріями. Вважається, що спермін може бути алостеричним регулятором мітохондрійного Ca^{2+} -уніпортера, знижуючи K_m по Ca^{2+} . Він знімає інгібува-

льний вплив рутенієвого червоного на акумуляцію Ca^{2+} , що передбачає безпосередню дію цього поліаміну на уніпортер [10]. Встановлено, що спермін в концентрації 0,1 мМ сприяє накопиченню Ca^{2+} мітохондріями міомеріа, підвищуючи початкову швидкість транспортного процесу та акумулювальну здатність цих субклітинних структур (рис. 3.7, А, В).

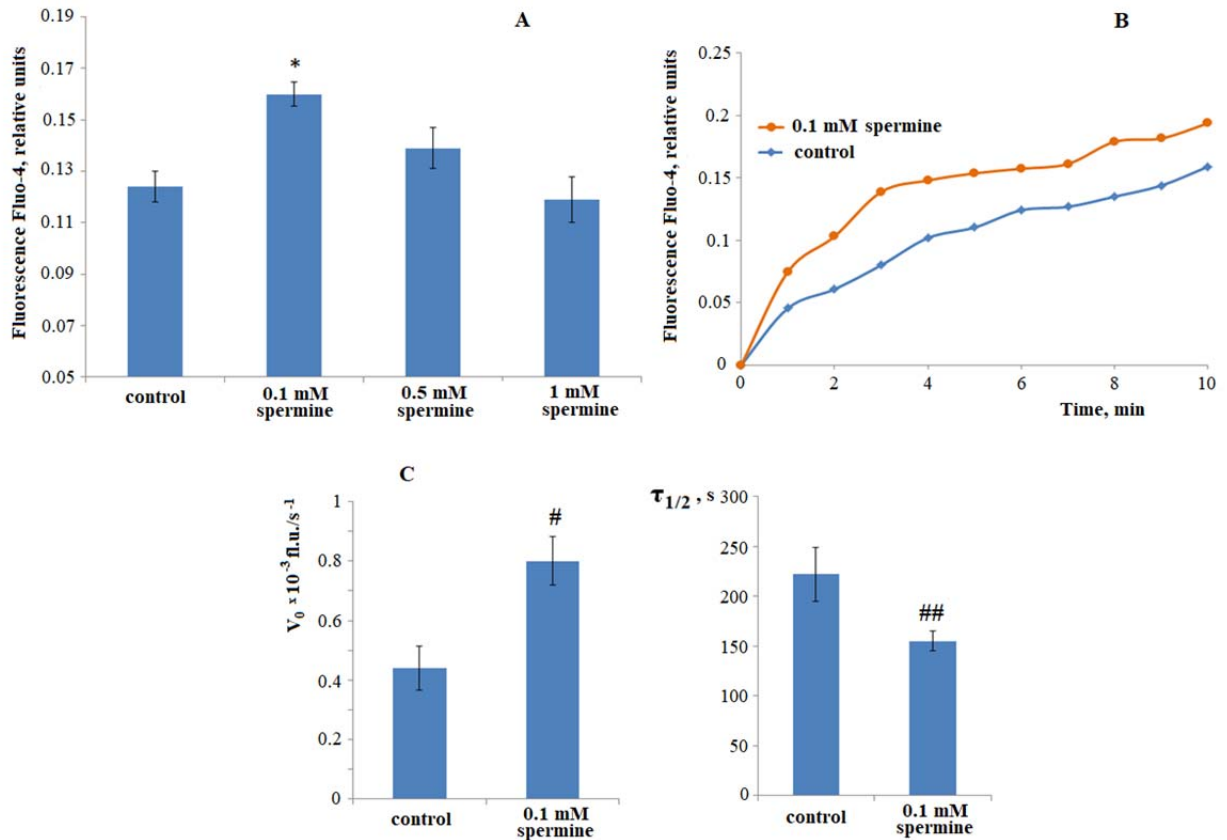


Рис. 3.7 – Енергозалежний транспорт Ca^{2+} в мітохондрії за присутності сперміну у зростаючій концентрації (А), часова залежність активувального впливу 0,1 мМ сперміну (В) та зміни початкової швидкості і періоду напівнакопичення Ca^{2+} за дії 0,1 мМ сперміну (В). А - * $P < 0.001$ порівняно з контролем, С - # $P < 0.01$ порівняно з контролем, ## $P < 0.05$ порівняно з контролем.

Дані представлені як середнє значення \pm SE, $n=7$.

Присутність в середовищі скавенджера оксиду азоту 2-(4-карбоксифеніл)-4,4,5,5-тетраметилімідазолін-1-оксил-3-оксид калієва сіль, 2-(4-карбоксифеніл)-4,5-дигідро-4,4,5,5-тетраметил-1Н-імідазол-1-ілокси-3-оксид калієва сіль (С-РТЮ) повністю невілювало стимулювальний ефект 0,1

мМ сперміну на акумуляцію Ca^{2+} мітохондріями (рис. 3.8, А). Ці результати свідчать про опосередкований утворенням NO ефект поліаміну на транспортний процес. Раніше було продемонстровано, що інгібітор NO-синтаз 0,1 мМ N^{G} -нітро-L-аргінін (NA) ефективно пригнічує утворення оксиду азоту в мітохондріях [112]. Ці результати узгоджуються з уявленням про функціонування у внутрішній мітохондрійній мембрані сплайс-варіанта нейрональної ізоформи NOS [8]. Нами продемонстровано, що у присутності інгібіторів NO-синтаз 0.1 мМ NA та його метилового ефіру (L-NAME) [113] стимулювальний ефект 0,1 мМ сперміну на енергозалежне накопичення Ca^{2+} мітохондріями повністю пригнічується (рис. 3.8, Б). Одержані дані можуть свідчити на користь того, що спермін у використаній концентрації посилює синтез оксиду азоту mtNOS, який в свою чергу є чинником підвищення акумуляції іонів Ca мітохондріями.

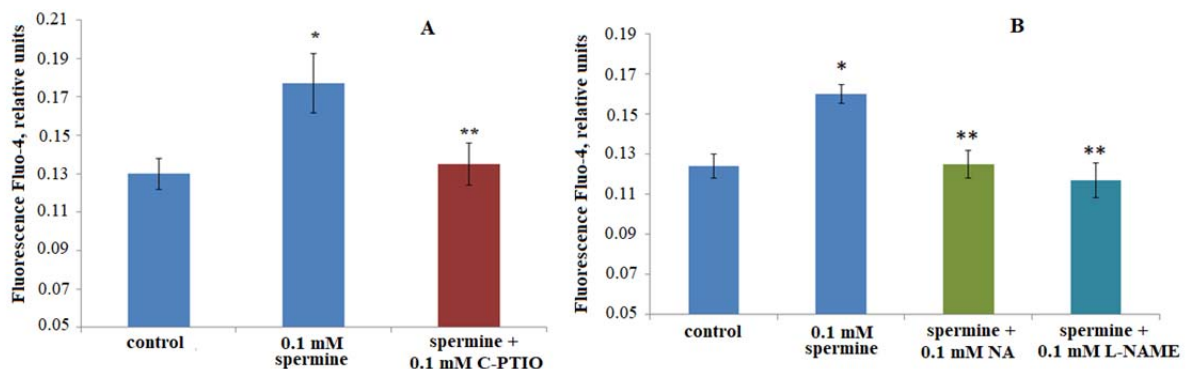


Рис. 3.8 – Енергозалежний транспорт Ca^{2+} в мітохондрії за присутності сперміну та С-РТІО (А), а також інгібіторів синтезу NO (В).

А - * $P < 0.05$ порівняно з контролем, ** $P = 0.05$ порівняно з впливом сперміну. Дані представлені як середнє значення \pm SE, $n = 6$;

В - * $P < 0.001$ порівняно з контролем, ** $P < 0.001$ порівняно з впливом сперміну. Дані є середнім значенням \pm SE, $n = 7$.

3.4 Дослідження ефектів сперміну на синтез NO ізольованими мітохондріями

Спермін у оптимальній щодо стимулювання Ca^{2+} -уніпортера концентрації 0,1 мМ достовірно посилює синтез оксиду азоту в ізольованих мітохондріях міометрія. Цей синтез пригнічується інгібіторами NO-синтаз NA та L-NAME, отже пов'язаний із посиленням активності mtNOS (Рис. 3.10). Окрім того, спермін у концентраціях, в яких він не впливає на енергозалежну акумуляцію Ca^{2+} мітохондріями, стимулює утворення ними NO. До того ж за цих більш високих концентрацій ефект є вищим і також виявляється чутливим до дії інгібіторів NOS (Рис. 3.9). Вочевидь, у випадку впливу сперміну у відносно високих концентраціях на енергозалежний транспорт Ca^{2+} в мітохондрії має місце два взаємоневилючі ефекти: екранування полікатіоном негативного заряду внутрішньої мембрани та стимуляція синтезу NO. У підсумку, за цих концентрацій ефект сперміну на Ca^{2+} -уніпортер в нашому варіанті постановки експерименту не проявляється.

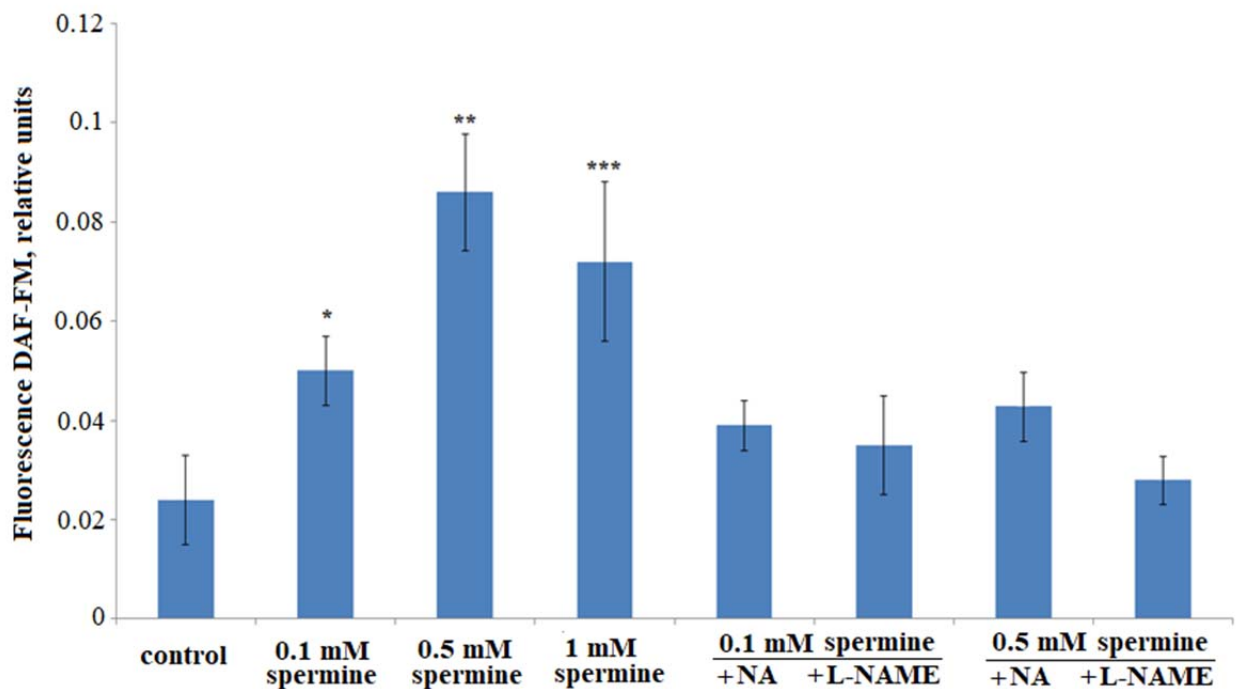


Рис. 3.9 – Синтез NO в контролі, за дії сперміну у зростаючій концентрації та інгібіторів конститутивних NO-синтаз 0.1 мМ NA or L-NAME.

* $P=0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,05$ порівняно з контролем. Дані представлені як середнє значення \pm SE, $n=5$;

Таким чином, результати проведених досліджень свідчать, що один з кінцевих продуктів неокисного метаболізму L-аргініну спермін здатний стимулювати синтез NO мітохондріями та залежне від NO функціонування Ca^{2+} -уніпортера. Відомо, що однією з патогенетичних ланок при різних захворюваннях є зміни функціональної активності аргінази та NOS [109]. У пацієнтів з онкопроцесом різного генезу, реактивним артритом, еректильною дисфункцією відбувається різке зростання активності аргінази на фоні зниження функціонування ендотеліної ізоформи NOS та значного підвищення індукцибельної NOS в периферійних тканинах та клітинах крові [109]. Ці дані свідчать про домінування неокисного шляху метаболізму L-аргініну над окисним за ряду патологічних станів. Зареєстрована в наших експериментах можливість зв'язку між метаболітами неокисного та окисного обміну L-аргініну і транспортом Ca^{2+} в мітохондріях дозволяє розглядати його як один з можливих механізмів, спрямованих на подолання патологічних процесів на рівні мітохондрій. Цілком ймовірно, що посилення аргіназної активності в мітохондріях призведе до зростання синтезу поліамінів, нормалізації процесу окисного метаболізму L-аргініну і відповідного зростання біодоступності NO.

ВИСНОВКИ

1. Продемонстровано, що в присутності 0,05 мМ L-аргініну та донорів оксиду азоту (0,1 мМ SNP, SNAP, SN) спостерігається стимулювання енергозалежної акумуляції Ca^{2+} ізольованими мітохондріями, опосередковане дією саме NO.
2. Стимулювання синтезу оксиду азоту в присутності L-аргініну та кофакторів спричинює помірне зниження електричного потенціалу на внутрішній мітохондрійній мембрані. Енергозалежна акумуляція Ca^{2+} (за наявності 3 мМ MgATP^{2-}) супроводжується також деполяризацією мембрани мітохондрій. Втім, даний ефект не викликає зростання утворення активних форм кисню мітохондріями та їхнього набухання.
3. Спермін в концентрації 0,1 мМ стимулює акумуляцію Ca^{2+} в мітохондрії, підвищуючи початкову швидкість транспортного процесу.
4. З'ясовано, що стимулювальний вплив сперміну на акумуляцію Ca^{2+} опосередкований саме дією NO: у присутності скавенджера оксиду азоту C-PTIO та інгібіторів NO-синтаз ефект не спостерігався.
5. Спермін в концентраціях 0,1-1 мМ стимулював активність мітохондрійної NO-синтази.
6. Одержані результати дозволяють передбачити функціональний зв'язок між продуктами окисного та неокисного метаболізмом L-аргініну і транспортом Ca^{2+} в мітохондріях міомерія.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Gantner, B. N., LaFond, K. M., & Bonini, M. G. (2020). Nitric oxide in cellular adaptation and disease. *Redox Biology*, 34, 101550. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101550>
2. Morris, S. M. (2009). Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases. *British Journal of Pharmacology*, 157(6), 922–930. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00278.x>
3. Ulrich, C., Quilici, D. R., Schlauch, K. A., & Buxton, I. L. O. (2013). The human uterine smooth muscle S-nitrosoproteome fingerprint in pregnancy, labor, and preterm labor. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 305(8), C803–C816. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00198.2013>
4. Wray, S., & Prendergast, C. (2019). The Myometrium: From Excitation to Contractions and Labour. In *Advances in experimental medicine and biology* (pp. 233–263). https://doi.org/10.1007/978-981-13-5895-1_10
5. Wang, C. H., & Wei, Y. H. (2017). Role of mitochondrial dysfunction and dysregulation of Ca²⁺ homeostasis in the pathophysiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Journal of Biomedical Science*, 24(1). <https://doi.org/10.1186/s12929-017-0375-3>
6. Matuz-Mares, D., González-Andrade, M., Araiza-Villanueva, M. G., Vilchis-Landeros, M. M., & Vázquez-Meza, H. (2022). Mitochondrial Calcium: Effects of Its Imbalance in Disease. *Antioxidants*, 11(5), 801. <https://doi.org/10.3390/antiox11050801>

7. Ghafourifar, P., & Cadenas, E. (2005). Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends in Pharmacological Sciences*, 26(4), 190–195.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.02.005>
8. Giulivi, C., Kato, K., & Cooper, C. E. (2006). Nitric oxide regulation of mitochondrial oxygen consumption I: cellular physiology. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 291(6), C1225–C1231.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00307.2006>
9. Bernal, A. L. (2007). The regulation of uterine relaxation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 18(3), 340–347.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2007.05.002>
10. Salvi, M., & Toninello, A. (2004). Effects of polyamines on mitochondrial Ca²⁺ transport. *Biochimica Et Biophysica Acta. Biomembranes*, 1661(2), 113–124.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2003.12.005>
11. Danylovyh, H. V., & Danylovyh, Y. V. (2021). Biochemical and molecular-physiological aspects of the nitric oxide action in the utera. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 93(6), 5–30.
<https://doi.org/10.15407/ubj93.06.005>
12. Kleschyov, A. L. (2017). The NO-heme signaling hypothesis. *Free Radical Biology & Medicine*, 112, 544–552.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.08.025>
13. Levine, A. B., Punahaole, D., & Levine, T. B. (2012). Characterization of the Role of Nitric Oxide and Its Clinical Applications. *Cardiology*, 122(1), 55–68.
<https://doi.org/10.1159/000338150>
14. Leite, A. C. R., Oliveira, H. C. F., Utino, F. L., Garcia, R., Alberici, L. C., Fernandes, M. P., Castilho, R. F., & Vercesi, A. E. (2010). Mitochondria generated nitric oxide protects against permeability transition via formation of membrane protein S-nitrosothiols. *Biochimica Et Biophysica Acta. Bio-*

- energetics, 1797(6–7), 1210–1216.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2010.01.034>
15. Forstermann, U., & Sessa, W. C. (2011). Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*, 33(7), 829–837.
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>
16. Ghimire, K., Altmann, H. M., Straub, A. C., & Isenberg, J. S. (2017). Nitric oxide: what's new to NO? *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 312(3), C254–C262.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00315.2016>
17. Daff, S. (2010). NO synthase: Structures and mechanisms. *Nitric Oxide*, 23(1), 1–11.
<https://doi.org/10.1016/j.niox.2010.03.001>
18. Forstermann, U., & Sessa, W. C. (2011b). Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*, 33(7), 829–837.
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>
19. Zhao, Y., Vanhoutte, P. M., & Leung, S. W. (2015). Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *Journal of Pharmacological Sciences*, 129(2), 83–94.
<https://doi.org/10.1016/j.jphs.2015.09.002>
20. Haynes, V., Elfering, S. L., Squires, R. J., Traaseth, N., Solien, J., Ettl, A., & Giulivi, C. (2003). Mitochondrial Nitric oxide Synthase: Role in Pathophysiology. *IUBMB Life*, 55(10–11), 599–603.
<https://doi.org/10.1080/15216540310001628681>
21. Roux-Biejat, P., Coazzoli, M., Marrazzo, P., Zecchini, S., Di Renzo, I., Prata, C., Napoli, A., Moscheni, C., Giovarelli, M., Barbalace, M. C., Catalani, E., Bassi, M. T., De Palma, C., Cervia, D., Malaguti, M., Hrelia, S., Clementi, E., & Perrotta, C. (2021). Acid Sphingomyelinase Controls Early Phases of Skeletal Muscle Regeneration by Shaping the Macrophage Phenotype. *Cells*, 10(11), 3028.
<https://doi.org/10.3390/cells10113028>

22. Ghafourifar, P., & Richter, C. (1997). Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Letters*, 418(3), 291–296.
[https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(97\)01397-5](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(97)01397-5)
23. Giulivi, C., Poderoso, J. J., & Boveris, A. (1998). Production of Nitric Oxide by Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry/the Journal of Biological Chemistry*, 273(18), 11038–11043.
<https://doi.org/10.1074/jbc.273.18.11038>
24. Porcelli, V., Fiermonte, G., Longo, A., & Palmieri, F. (2014). The Human Gene SLC25A29, of Solute Carrier Family 25, Encodes a Mitochondrial Transporter of Basic Amino Acids. *Journal of Biological Chemistry/the Journal of Biological Chemistry*, 289(19), 13374–13384.
<https://doi.org/10.1074/jbc.m114.547448>
25. Giulivi, C. (1998). Functional implications of nitric oxide produced by mitochondria in mitochondrial metabolism. *Biochemical Journal*, 332(3), 673–679. <https://doi.org/10.1042/bj3320673>
26. Zaobornyj, T., & Ghafourifar, P. (2012). Strategic localization of heart mitochondrial NOS: a review of the evidence. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 303(11), H1283–H1293.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00674.2011>
27. Morris, S. M. (2009b). Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases. *British Journal of Pharmacology*, 157(6), 922–930. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00278.x>
28. Di Noia, M. A., Todisco, S., Cirigliano, A., Rinaldi, T., Agrimi, G., Iacobazzi, V., & Palmieri, F. (2014). The Human SLC25A33 and SLC25A36 Genes of Solute Carrier Family 25 Encode Two Mitochondrial Pyrimidine Nucleotide Transporters. *Journal of Biological Chemistry/ the Journal of Biological Chemistry*, 289(48), 33137–33148.
<https://doi.org/10.1074/jbc.m114.610808>

29. Dedkova, E. N., & Blatter, L. A. (2009). Characteristics and function of cardiac mitochondrial nitric oxide synthase. *Journal of Physiology*, 587(4), 851–872.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.165423>
30. Franco, M. C., Arciuch, V. G. A., Peralta, J. G., Galli, S., Levisman, D., López, L. M., Romorini, L., Poderoso, J. J., & Carreras, M. C. (2006). Hypothyroid Phenotype Is Contributed by Mitochondrial Complex I Inactivation Due to Translocated Neuronal Nitric-oxide Synthase. *Journal of Biological Chemistry/the Journal of Biological Chemistry*, 281(8), 4779–4786.
<https://doi.org/10.1074/jbc.m512080200>
31. Tatoyan, A., & Giulivi, C. (1998). Purification and Characterization of a Nitric-oxide Synthase from Rat Liver Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry/the Journal of Biological Chemistry*, 273(18), 11044–11048.
<https://doi.org/10.1074/jbc.273.18.11044>
32. Litvinova, L., Atochin, D. N., Fattakhov, N., Vasilenko, M., Zatolokin, P., & Kirienkova, E. (2015). Nitric oxide and mitochondria in metabolic syndrome. *Frontiers in Physiology*, 6.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00020>
33. Tengan, C. H., Rodrigues, G. S., & Godinho, R. O. (2012). Nitric Oxide in Skeletal Muscle: Role on Mitochondrial Biogenesis and Function. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(12), 17160–17184.
<https://doi.org/10.3390/ijms131217160>
34. Ghafourifar, P., & Cadenas, E. (2005b). Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends in Pharmacological Sciences*, 26(4), 190–195.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.02.005>
35. Parihar, M. S., Nazarewicz, R. R., Kincaid, E., Bringold, U., & Ghafourifar, P. (2008). Association of mitochondrial nitric oxide synthase activity with respiratory chain complex I. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 366(1), 23–28.

- <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.11.056>
36. Piantadosi, C. A., & Suliman, H. B. (2012). Redox regulation of mitochondrial biogenesis. *Free Radical Biology & Medicine*, 53(11), 2043–2053. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.014>
37. Howard, E. E., Pasiakos, S. M., Blesso, C. N., Fussell, M. A., & Rodriguez, N. R. (2020). Divergent Roles of Inflammation in Skeletal Muscle Recovery From Injury. *Frontiers in Physiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00087>
38. Davidson, S., & Duchon, M. (2006). Effects of NO on mitochondrial function in cardiomyocytes: Pathophysiological relevance. *Cardiovascular Research*, 71(1), 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.01.019>
39. Valdez, L. B., Zaobornyj, T., & Boveris, A. (2005). Functional Activity of Mitochondrial Nitric Oxide Synthase. In *Methods in enzymology on CD-ROM/Methods in enzymology* (pp. 444–455). [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(05\)96037-0](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(05)96037-0)
40. Wu, G., & Morris, S. M. (1998). Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochemical Journal*, 336(1), 1–17. <https://doi.org/10.1042/bj3360001>
41. Dizikes, G. J., Grody, W. W., Kern, R. M., & Cederbaum, S. D. (1986). Isolation of human liver arginase cDNA and demonstration of nonhomology between the two human arginase genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 141(1), 53–59. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(86\)80333-3](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(86)80333-3)
42. Gotoh T, Sonoki T, Nagasaki A, Terada K, Takiguchi M, Mori M. Molecular cloning of cDNA for nonhepatic mitochondrial arginase (arginase II) and comparison of its induction with nitric oxide synthase in a murine macrophage-like cell line. *FEBS Lett* 395: 119 –122, 1996. [https://doi:10.1016/0014-5793\(96\)01015-0](https://doi:10.1016/0014-5793(96)01015-0).

43. Chandra S, Romero MJ, Shatanawi A, Alkilany AM, Caldwell RB, Caldwell RW. Oxidative species increase arginase activity in endothelial cells through the RhoA/Rho kinase pathway. *Br J Pharmacol* 165: 506–519, 2012.
<https://doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01584>
44. Wang L, Bhatta A, Toque HA, Rojas M, Yao L, Xu Z, Patel C, Caldwell RB, Caldwell RW. Arginase inhibition enhances angiogenesis in endothelial cells exposed to hypoxia. *Microvasc Res* 98: 1–8, 2015.
<https://doi:10.1016/j.mvr.2014.11.002>.
45. Krotova K, Patel JM, Block ER, Zharikov S. Hypoxic upregulation of arginase II in human lung endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 299: C1541–C1548, 2010.
<https://doi:10.1152/ajpcell.00068.2010>.
46. Pandey D, Sikka G, Bergman Y, Kim JH, Ryoo S, Romer L, Berkowitz D. Transcriptional regulation of endothelial arginase 2 by histone deacetylase 2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34: 1556–1566, 2014.
<https://doi:10.1161/ATVBAHA.114.303685>
47. Pegg, A. E. (2014). The function of spermine. *IUBMB Life*, 66(1), 8–18.
<https://doi.org/10.1002/iub.1237>
48. Auvinen, M., Laine, A., Paasinen-Sohns, A., Kangas, A., Kangas, L., Saksela, O., Andersson, L. C., & Hölttä, E. (1997). Human ornithine decarboxylase-overproducing NIH3T3 cells induce rapidly growing, highly vascularized tumors in nude mice. *PubMed*, 57(14), 3016–3025.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9230217>
49. Wei, G., Hobbs, C. A., DeFeo, K., Hayes, C. S., & Gilmour, S. K. (2007). Polyamine-mediated regulation of protein acetylation in murine skin and tumors. *Molecular Carcinogenesis*, 46(8), 611–617.
<https://doi.org/10.1002/mc.20350>

50. Scalabrino, G., & Ferioli, M. E. (1981). Polyamines in Mammalian Tumors Part I. In *Advances in cancer research* (pp. 151–268). [https://doi.org/10.1016/s0065-230x\(08\)60911-2](https://doi.org/10.1016/s0065-230x(08)60911-2)
51. Porter, C. W., McManis, J., Casero, R. A., & Bergeron, R. J. (1987). Relative abilities of bis(ethyl) derivatives of putrescine, spermidine, and spermine to regulate polyamine biosynthesis and inhibit L1210 leukemia cell growth. *PubMed*, 47(11), 2821–2825. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3567905>
52. Satriano, J. (2004). Arginine pathways and the inflammatory response: Interregulation of nitric oxide and polyamines: Review article. *Amino Acids*, 26(4). <https://doi.org/10.1007/s00726-004-0078-4>
53. Pegg, A. E. (2009). Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB Life*, 61(9), 880–894. <https://doi.org/10.1002/iub.230>
54. Miller-Fleming, L., Olin-Sandoval, V., Campbell, K., & Ralser, M. (2015). Remaining Mysteries of Molecular Biology: The Role of Polyamines in the Cell. *Journal of Molecular Biology/Journal of Molecular Biology*, 427(21), 3389–3406. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.06.020>
55. Matsufuji, S., Matsufuji, T., Miyazaki, Y., Murakami, Y., Atkins, J. F., Gesteland, R. F., & Hayashi, S. (1995). Autoregulatory frameshifting in decoding mammalian ornithine decarboxylase antizyme. *Cell*, 80(1), 51–60. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90450-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90450-6)
56. Kitani, T., & Fujisawa, H. (1989). Purification and characterization of antizyme inhibitor of ornithine decarboxylase from rat liver. *Biochimica Et Biophysica Acta. G, General Subjects/Biochimica Et Biophysica Acta. General Subjects (Online)*, 991(1), 44–49. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(89\)90026-3](https://doi.org/10.1016/0304-4165(89)90026-3)

57. Murakami, Y., Matsufuji, S., Nishiyama, M., & Hayashi, S. (1989). Properties and fluctuations in vivo of rat liver antizyme inhibitor. *Biochemical Journal*, 259(3), 839–845.
<https://doi.org/10.1042/bj2590839>
58. Shantz, L. M., Holm, I., Jänne, O. A., & Pegg, A. E. (1992). Regulation of S-adenosylmethionine decarboxylase activity by alterations in the intracellular polyamine content. *Biochemical Journal*, 288(2), 511–518.
<https://doi.org/10.1042/bj2880511>
59. Asher, G., Bercovich, Z., Tsvetkov, P., Shaul, Y., & Kahana, C. (2005). 20S Proteasomal Degradation of Ornithine Decarboxylase Is Regulated by NQO1. *Molecular Cell*, 17(5), 645–655.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.01.020>
60. Iwami, K., Wang, J. Y., Jain, R., McCormack, S., & Johnson, L. R. (1990b). Intestinal ornithine decarboxylase: half-life and regulation by putrescine. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology/American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 258(2), G308–G315.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.1990.258.2.g308>
61. Madeo, F., Eisenberg, T., Pietrocola, F., & Kroemer, G. (2018). Spermidine in health and disease. *Science*, 359(6374).
<https://doi.org/10.1126/science.aan2788>
62. Gerner, E. W., & Meyskens, F. L. (2009). Combination Chemoprevention for Colon Cancer Targeting Polyamine Synthesis and Inflammation. *Clinical Cancer Research*, 15(3), 758–761.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-08-2235>
63. Minois, N., Carmona-Gutierrez, D., & Madeo, F. (2011). Polyamines in aging and disease. *Aging*, 3(8), 716–732.
<https://doi.org/10.18632/aging.100361>

64. Cerrada-Gimenez, M., Pietilä, M., Loimas, S., Pirinen, E., Hyvönen, M. T., Keinänen, T. A., Jänne, J., & Alhonen, L. (2010). Continuous oxidative stress due to activation of polyamine catabolism accelerates aging and protects against hepatotoxic insults. *Transgenic Research*, 20(2), 387–396. <https://doi.org/10.1007/s11248-010-9422-5>
65. Stewart, T. M., Dunston, T. T., Woster, P. M., & Casero, R. A. (2018). Polyamine catabolism and oxidative damage. *Journal of Biological Chemistry/the Journal of Biological Chemistry*, 293(48), 18736–18745. <https://doi.org/10.1074/jbc.tm118.003337>
66. Nishimura, K., Shiina, R., Kashiwagi, K., & Igarashi, K. (2006). Decrease in Polyamines with Aging and Their Ingestion from Food and Drink. *Journal of Biochemistry/the Journal of Biochemistry*, 139(1), 81–90. <https://doi.org/10.1093/jb/mvj003>
67. Eisenberg, T., Knauer, H., Schauer, A., Büttner, S., Ruckenstuhl, C., Carmona-Gutierrez, D., Ring, J., Schroeder, S., Magnes, C., Antonacci, L., Fussi, H., Deszcz, L., Hartl, R., Schraml, E., Criollo, A., Megalou, E., Weiskopf, D., Laun, P., Heeren, G., . . . Madeo, F. (2009). Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nature Cell Biology*, 11(11), 1305–1314. <https://doi.org/10.1038/ncb1975>
68. Eisenberg, T., Abdellatif, M., Schroeder, S., Primessnig, U., Stekovic, S., Pendl, T., Harger, A., Schipke, J., Zimmermann, A., Schmidt, A., Tong, M., Ruckenstuhl, C., Dammbrueck, C., Gross, A. S., Herbst, V., Magnes, C., Trausinger, G., Narath, S., Meinitzer, A., . . . Madeo, F. (2016). Cardioprotection and lifespan extension by the natural polyamine spermidine. *Nature Medicine*, 22(12), 1428–1438. <https://doi.org/10.1038/nm.4222>

69. Gunter, T. E., & Pfeiffer, D. R. (1990). Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 258(5), C755–C786. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1990.258.5.c755>
70. Carafoli, E. (1965). Active accumulation of Sr^{2+} by rat-liver mitochondria III. Stimulation of respiration by Sr^{2+} and its stoichiometry. *Biochimica Et Biophysica Acta. G, General Subjects/Biochimica Et Biophysica Acta. General Subjects (Online)*, 97(1), 107–117. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(65\)90274-6](https://doi.org/10.1016/0304-4165(65)90274-6)
71. Moreau, B., Nelson, C., & Parekh, A. B. (2006). Biphasic Regulation of Mitochondrial Ca^{2+} Uptake by Cytosolic Ca^{2+} Concentration. *CB/Current Biology*, 16(16), 1672–1677. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.06.059>
72. Putney, J. W., & Thomas, A. P. (2006). Calcium Signaling: Double Duty for Calcium at the Mitochondrial Uniporter. *CB/Current Biology*, 16(18), R812–R815. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.08.040>
73. Sparagna, G., Gunter, K., & Gunter, T. (1994). A System for Producing and Monitoring in Vitro Calcium Pulses Similar to Those Observed in Vivo. *Analytical Biochemistry*, 219(1), 96–103. <https://doi.org/10.1006/abio.1994.1236>
74. Sparagna, G. C., Gunter, K. K., Sheu, S. S., & Gunter, T. E. (1995). Mitochondrial Calcium Uptake from Physiological-type Pulses of Calcium. *Journal of Biological Chemistry/the Journal of Biological Chemistry*, 270(46), 27510–27515. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.46.27510>
75. Gunter, T., Buntinas, L., Sparagna, G., Eliseev, R., & Gunter, K. (2000). Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. *Cell Calcium*, 28(5–6), 285–296. <https://doi.org/10.1054/ceca.2000.0168>

76. Buntinas, L., Gunter, K. K., Sparagna, G. C., & Gunter, T. E. (2001). The rapid mode of calcium uptake into heart mitochondria (RaM): comparison to RaM in liver mitochondria. *Biochimica Et Biophysica Acta. Bioenergetics*, 1504(2–3), 248–261.
[https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(00\)00254-1](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(00)00254-1)
77. Colegrove, S. L., Albrecht, M. A., & Friel, D. D. (2000). Quantitative Analysis of Mitochondrial Ca²⁺ Uptake and Release Pathways in Sympathetic Neurons. *the Journal of General Physiology/ the Journal of General Physiology*, 115(3), 371–388.
<https://doi.org/10.1085/jgp.115.3.371>
78. Várnai, P., Petheö, G. L., Makara, J. K., & Spät, A. (1998). Electrophysiological study on the high K⁺ sensitivity of rat glomerulosa cells. *Pflügers Archiv Für Die Gesamte Physiologie Des Menschen Und Der Tiere/Pflügers Archiv*, 435(3), 429–431.
<https://doi.org/10.1007/s004240050534>
79. Spät, A., Szanda, G., Csordas, G., & Hajnoczky, G. (2008). High- and low-calcium-dependent mechanisms of mitochondrial calcium signalling. *Cell Calcium*, 44(1), 51–63.
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2007.11.015>
80. Beutner, G., Sharma, V. K., Lin, L., Ryu, S. Y., Dirksen, R. T., & Sheu, S. S. (2005). Type 1 ryanodine receptor in cardiac mitochondria: Transducer of excitation–metabolism coupling. *Biochimica Et Biophysica Acta. Biomembranes*, 1717(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.09.016>
81. Zhang, X., Tomar, N., Kandel, S. M., Audi, S. H., Cowley, A. W., & Dash, R. K. (2021). Substrate- and Calcium-Dependent Differential Regulation of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation and Energy Production in the Heart and Kidney. *Cells*, 11(1), 131.
<https://doi.org/10.3390/cells11010131>

82. Crompton, M., Künzi, M., & Carafoli, E. (1977). The Calcium-Induced and Sodium-Induced Effluxes of Calcium from Heart Mitochondria. *European Journal of Biochemistry*, 79(2), 549–558.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1977.tb11839.x>
83. Tomar, D., & Elrod, J. W. (2020). Metabolite regulation of the mitochondrial calcium uniporter channel. *Cell Calcium*, 92, 102288.
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2020.102288>
84. Gunter, T. E., & Sheu, S. S. (2009). Characteristics and possible functions of mitochondrial Ca²⁺ transport mechanisms. *Biochimica Et Biophysica Acta. Bioenergetics*, 1787(11), 1291–1308.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2008.12.011>
85. Hayat, L., & Crompton, M. (1985). Ca²⁺-dependent inhibition by trifluoperazine of the Na⁺-Ca²⁺ carrier in mitoplasts derived from heart mitochondria. *FEBS Letters*, 182(2), 281–286.
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(85\)80316-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(85)80316-1)
86. Zorova, L. D., Popkov, V. A., Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Pevzner, I. B., Jankauskas, S. S., Babenko, V. A., Zorov, S. D., Balakireva, A. V., Juhaszova, M., Sollott, S. J., & Zorov, D. B. (2018). Mitochondrial membrane potential. *Analytical Biochemistry*, 552, 50–59.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.009>
87. Gunter, T. E., & Gunter, K. K. (2001b). Uptake of Calcium by Mitochondria: Transport and Possible Function. *IUBMB Life*, 52(3–5), 197–204.
<https://doi.org/10.1080/15216540152846000>
88. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes Off. J. L, 222 (1999), pp. 0031-0037
89. Danylovyh, Y. V., Kolomiets, O. V., Danylovyh, G. V., & Kosterin, S. O. (2015). Nitric Oxide as Possible Regulator of Energy-Dependent Ca²⁺

- Transport in Mitochondria of Uterine Smooth Muscle. *International Journal of Physiology and Pathophysiology*, 6(2), 91–98.
<https://doi.org/10.1615/intjphyspathophys.v6.i2.10>
90. Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254.
<https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
91. Sivandzade, F., Bhalerao, A., & Cucullo, L. (2019). Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe. *Bio-protocol*, 9(1).
<https://doi.org/10.21769/bioprotoc.3128>
92. Particle Size Measurements. (2009). In *Particle technology series*.
<https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9016-5>
93. Rossi, A., Pizzo, P., & Filadi, R. (2019b). Calcium, mitochondria and cell metabolism: A functional triangle in bioenergetics. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Cell Research*, 1866(7), 1068–1078.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.10.016>
94. Alevriadou, B. R., Patel, A., Noble, M., Ghosh, S., Gohil, V. M., Stathopoulos, P. B., & Madesh, M. (2021). Molecular nature and physiological role of the mitochondrial calcium uniporter channel. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 320(4), C465–C482.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00502.2020>
95. Yamamura, H., Kawasaki, K., Inagaki, S., Suzuki, Y., & Imaizumi, Y. (2018). Local Ca²⁺ coupling between mitochondria and sarcoplasmic reticulum following depolarization in guinea pig urinary bladder smooth muscle cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 314(1), C88–C98.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00208.2017>

96. Danylovyh, H. V., Danylovyh, Y. V., Gulina, M. O., Bohach, T. V., & Kosterin, S. O. (2019). NO-synthase activity in mitochondria of uterus smooth muscle: identification and biochemical properties. *General Physiology and Biophysics*, 38(01), 39–50.
https://doi.org/10.4149/gpb_2018034
97. Pucovský, V., Gordienko, D. V., & Bolton, T. B. (2002). Effect of nitric oxide donors and noradrenaline on Ca²⁺ release sites and global intracellular Ca²⁺ in myocytes from guinea pig small mesenteric arteries. *Journal of Physiology*, 539(1), 25–39.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2001.012978>
98. Tichenor, S. D., Malmquist, N. A., & Buxton, I. L. (2003). Dissociation of cGMP accumulation and relaxation in myometrial smooth muscle: effects of S-nitroso-N-acetylpenicillamine and 3-morpholinosyndonimine. *Cellular Signalling*, 15(8), 763–772.
[https://doi.org/10.1016/s0898-6568\(03\)00006-8](https://doi.org/10.1016/s0898-6568(03)00006-8)
99. Singh, N., & Bhatla, S. C. (2017). Signaling through reactive oxygen and nitrogen species is differentially modulated in sunflower seedling root and cotyledon in response to various nitric oxide donors and scavengers. *Plant Signaling & Behavior/Plant Signalling & Behavior*, 12(9), e1365214.
<https://doi.org/10.1080/15592324.2017.1365214>
100. Danylovyh, Y. V., Kolomiets, O. V., Danylovyh, G. V., & Kosterin, S. O. (2015b). Nitric Oxide as Possible Regulator of Energy-Dependent Ca²⁺ Transport in Mitochondria of Uterine Smooth Muscle. *International Journal of Physiology and Pathophysiology*, 6(2), 91–98.
<https://doi.org/10.1615/intjphyspathophys.v6.i2.10>
101. Zorova, L. D., Popkov, V. A., Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Pevzner, I. B., Jankauskas, S. S., Babenko, V. A., Zorov, S. D., Balakireva, A. V., Juhaszova, M., Sollott, S. J., & Zorov, D. B. (2018b). Mitochondrial

- membrane potential. *Analytical Biochemistry*, 552, 50–59.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.009>
102. Kaasik, A., Safiulina, D., Zharkovsky, A., & Veksler, V. (2007). Regulation of mitochondrial matrix volume. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 292(1), C157–C163.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00272.2006>
103. Matuz-Mares, D., González-Andrade, M., Araiza-Villanueva, M. G., Vilchis-Landeros, M. M., & Vázquez-Meza, H. (2022b). Mitochondrial Calcium: Effects of Its Imbalance in Disease. *Antioxidants*, 11(5), 801.
<https://doi.org/10.3390/antiox11050801>
104. Shiva, S. (2010). Mitochondria as metabolizers and targets of nitrite. *Nitric Oxide*, 22(2), 64–74.
<https://doi.org/10.1016/j.niox.2009.09.002>
105. Traaseth, N., Elfering, S., Solien, J., Haynes, V., & Giulivi, C. (2004). Role of calcium signaling in the activation of mitochondrial nitric oxide synthase and citric acid cycle. *Biochimica Et Biophysica Acta. Bioenergetics*, 1658(1–2), 64–71.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2004.04.015>
106. Forte, M., Conti, V., Damato, A., Ambrosio, M., Puca, A. A., Sciarretta, S., Frati, G., Vecchione, C., & Carrizzo, A. (2016). Targeting Nitric Oxide with Natural Derived Compounds as a Therapeutic Strategy in Vascular Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1–20.
<https://doi.org/10.1155/2016/7364138>
107. Levine, A. B., Punahaole, D., & Levine, T. B. (2012b). Characterization of the Role of Nitric Oxide and Its Clinical Applications. *Cardiology*, 122(1), 55–68.
<https://doi.org/10.1159/000338150>
108. Nowikovsky, K., Schweyen, R. J., & Bernardi, P. (2009). Pathophysiology of mitochondrial volume homeostasis: Potassium transport

- and permeability transition. *Biochimica Et Biophysica Acta. Bioenergetics*, 1787(5), 345–350.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2008.10.006>
109. Caldwell, R. B., Toque, H. A., Narayanan, S. P., & Caldwell, R. W. (2015). Arginase: an old enzyme with new tricks. *Trends in Pharmacological Sciences*, 36(6), 395–405. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.03.006>
110. Wang, H., Ran, J., & Jiang, T. (2014). Urea. In *Sub-cellular biochemistry/Subcellular biochemistry* (pp. 7–29).
https://doi.org/10.1007/978-94-017-9343-8_2
111. Wang, H., Ran, J., & Jiang, T. (2014). Urea. In *Sub-cellular biochemistry/Subcellular biochemistry* (pp. 7–29).
https://doi.org/10.1007/978-94-017-9343-8_2
112. Danylovyh, H. V., Danylovyh, Y. V., Gulina, M. O., Bohach, T. V., & Kosterin, S. O. (2019b). NO-synthase activity in mitochondria of uterus smooth muscle: identification and biochemical properties. *General Physiology and Biophysics*, 38(01), 39–50.
https://doi.org/10.4149/gpb_2018034
113. Alderton, W. K., Cooper, C. E., & Knowles, R. G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*, 357(3), 593.
<https://doi.org/10.1042/0264-6021:3570593>