

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики

доцент Нипорко Олексій Юрійович

Протокол №____ засідання кафедри

від “____” _____ 2022 р.

**Механокінетика скорочувальної активності міометрія щурів за
модуляції АТФ-чутливих K^+ -каналів плазматичної мембрани і
мітохондрій**

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра

студента напряму підготовки

091 «Біологія»

ОП «Біологія (високі технології)»

Фархутдінова Дмитра Руслановича

Науковий керівник від кафедри

д.б.н., доцент

Цимбалюк Ольга Володимирівна

Оцінка захисту роботи

РЕФЕРАТ

Фархутдінов Д.Р. Механокінетика скорочувальної активності міометрія щурів за модуляції АТФ-чутливих K^+ -каналів плазматичної мембрани і мітохондрій. – Випускна кваліфікаційна робота бакалавра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Біологія (високі технології)»

У даній роботі проведено розрахунок механокінетики спонтанних скорочень міометрія за модуляції (блокування та активації) $K_{\text{АТР}}$ -каналів плазматичної мембрани, а також за блокування міто $K_{\text{АТР}}$ -каналів. Встановлено, що блокування $K_{\text{АТР}}$ -каналів плазматичної мембрани глібенкламідом спричиняє пригнічення амплітуди, зниження частоти і механокінетичних параметрів спонтанних скорочень міометрія, що підтверджує внесок $K_{\text{АТР}}$ -каналів плазматичної мембрани у підтримання збудливості міометрія невагітних щурів. Активування $K_{\text{АТР}}$ -каналів плазматичної мембрани діазоксидом спричиняє зниження амплітуди та зміну окремих механокінетичних параметрів спонтанних скорочень міометрія за рахунок посилення K^+ -провідності та гіперполяризації плазматичної мембрани міоцитів. Блокування міто $K_{\text{АТР}}$ -каналів сполукою 5-НД спричиняє пригнічення амплітуди та модуляцію окремих механокінетичних параметрів спонтанних скорочень. Отже, $K_{\text{АТР}}$ -канали і міто $K_{\text{АТР}}$ -канали залучені у підтримання збудливості міометрія невагітних щурів.

Ключові слова: $K_{\text{АТР}}$ -канал, міто $K_{\text{АТР}}$ -канал, міометрій, глібенкламід, діазоксид, 5-НД, механокінетика.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	6
ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1	9
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	9
1.1. АТФ-чутливі K^+ -канали в мітохондрії	9
1.2. $K_{\text{АТФ}}$ -канал мітохондрії гладеньких м'язів матки щура	9
1.3. Основні властивості $K_{\text{АТФ}}$ каналів та його субодиниць	11
1.3.1. Субодиниця виду $K_{\text{IR}} 6.1$ та $K_{\text{IR}} 6.2$	11
1.3.2. Субодиниця виду SUR.....	11
1.4. Вплив певних засобів, які відкривають калієві канали міометрія щура	15
1.5. Регуляція експресії генів $K_{\text{АТФ}}$ каналу	14
1.6. АТФ-чутливі K^+ -канали в ролі функціонального захисту від серцево- судинних захворювань	Ошибка! Закладка не определена.
РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТ, МЕТОДИ ТА МАТЕРІАЛИ ДОСЛІДЖЕННЯ	17
2.1 Реєстрація спонтанних скорочень міометрія	17
2.2 Комплексний механокінетичний аналіз спонтанних скорочень.....	19
2.3. Статичний аналіз експериментальних даних	20
РОЗДІЛ 3	21
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	21
3.1. Механокінетика спонтанних скорочень міометрія за блокування $K_{\text{АТР}}$ - каналів плазматичної мембрани	21
3.2 Механокінетика спонтанних скорочень міометрія за активації $K_{\text{АТР}}$ - каналів плазматичної мембрани	28
3.3. Механокінетика спонтанних скорочень міометрія за блокування міто $K_{\text{АТР}}$ -каналів.....	28

ВИСНОВКИ.....	4
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	37
	38

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

5-HD – 5-гідроксидеканоат

ADP – аденозиндифосфат

АТР – аденозинтрифосфат

ТСА – цикл трикарбонових кислот (Цикл Кребса)

АФК – активні форми кисню

ГМ – гладенькі м'язи

ГМК – гладком'язова клітина

ДМСО - диметилсульфоксид

$K_{\text{АТР}}$ -канал – АТФ-чутливий калієвий канал плазматичної мембрани

міто $K_{\text{АТР}}$ -канал – мітохондрійний АТФ-чутливий калієвий канал

ПМ – плазматична мембрана

ВСТУП

У збудливих тканинах K^+ -провідні іонні канали відіграють надзвичайно важливу роль, фактично визначаючи рівень збудливості плазматичної мембрани їх клітин. Ця група іонних каналів має найбільше молекулярне і структурне різноманіття, а також дуже варіативні способи регуляції і біофізичні властивості. Так, у плазматичних мембранах гладеньком'язових клітин експресуються потенціалкеровані K^+ -канали (K_V), K^+ -канали вхідного випрямлення (K_{ir}), Ca^{2+} -активовані K^+ -канали великої (BK_{Ca}) і малої (SK_{Ca}) провідності, двопорові K^+ -канали витoku, механочутливі K^+ -канали та АТР-чутливі K^+ -канали [1, 2]. Цікаво, що внутрішній ядерній мембрані присутні K^+ -канали, а у внутрішній мембрані мітохондрій локалізуються АТР-чутливі K^+ -переносники (міто $K_{АТР}$ -канали) [3, 4].

Серед вісцеральних ГМ міометрій виконує унікальну роль, забезпечуючи тривалі зміни тонічної активності матки під час вагітності і пологів [5]. Дослідженнями останніх років доведено, що у міоцитах матки експресуються як $K_{АТР}$ -канали вхідного випрямлення, так і міто $K_{АТР}$ -канали [4, 6]. $K_{АТР}$ -канали плазматичної мембрани активуються зниженням (та інгібуються підвищенням) внутрішньоклітинної концентрації АТР та/або підвищенням рівня АDP [1]. Обидва типи $K_{АТР}$ -каналів надзвичайно важливі для регуляції функціональної активності тканини міометрія, особливо для підтримання незбудженого стану міоцитів у динаміці вагітності [7, 8]. $K_{АТР}$ -канали плазматичної мембрани фактично опосередковують дію нейротрансмітерів: у випадку гальмівних трансмітерів має місце активація цих каналів та загальний токолітичний ефект [9], за дії збуджувальних трансмітерів спостерігається пригнічення провідності $K_{АТР}$ -каналів та деполяризація ГМК [10].

Окремо варто виділити міто $K_{АТР}$ -канали. Їх функціями є регуляція біоенергетичного стану мітохондрій – інтенсивність мітохондрійного

дихання і потенціал внутрішньої мітохондрійної мембрани. Також ці канали регулюють швидкість утворення активних форм кисню та проявляють цитопротекторну дію за патологічних умов, зокрема, за дії прооксидантних факторів і високих концентрації іонів Ca^{2+} .

Оскільки натепер відсутня інформація щодо участі $\text{K}_{\text{АТР}}$ -каналів у регуляції механокінетики спонтанних скорочень ГМ матки, тому *метою даної роботи* було здійснити повний механокінетичний аналіз (з розрахунком силових (F_{max} , F_{C} та F_{R}), часових (τ_0 , τ_{C} і τ_{R}), імпульсних (I_{max} , I_{C} та I_{R}) та швидкісних параметрів (V_{C} і V_{R})) спонтанних скорочень міометрія щурів за блокування АТР-чутливих K^+ -каналів ПМ і мітохондрій (глібенкламідом та 5-гідроксидеканоатом, відповідно), а також у випадку активації АТР-чутливих K^+ -каналів (діазоксидом).

Для досягнення мети при виконанні роботи були виконані наступні завдання:

1. Дослідити спонтанну скорочувальну активність міометрія та провести повний механокінетичний аналіз окремих скорочень за блокування за АТР-чутливих K^+ -каналів ПМ.
2. Проаналізувати спонтанну скорочувальну активність міометрія за активації за АТР-чутливих K^+ -каналів ПМ.
3. Вивчити спонтанну скорочувальну активність міометрія та провести повний механокінетичний аналіз окремих скорочень за блокування за АТР-чутливих K^+ -каналів мітохондрій.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. АТФ-чутливі K^+ -канали в мітохондрії

Мітохондрії синтезують хімічну енергію для ендоерганічних реакцій у вигляді АТФ. Вони повинні відповідати потребам клітинної енергії, але механізми, що пов'язують роботу органел з АТФ рівнями погано вивчені. Тобто, ідентифікуємо білковий комплекс, який є локалізований у мітохондріях і він, відповідно, опосередковує АТФ-залежні калієві струми, які називаються міто $K_{\text{АТФ}}$. Також можна показати їх аналоги на плазматичній мембрані, міто $K_{\text{АТФ}}$ -канали, складаються з пороутворюючих (МІТОК) і АТФ-зв'язуючої субодиниці (MITOSUR). Розведення МІТОК *in vitro* разом з MITOSUR підсумовує основні властивості міто $K_{\text{АТФ}}$. [11] У той час як спрацьовує надмірне вираження МІТОК відбувається різке набухання органел, його генетична абляція викликає нестабільність мітохондріальної мембрани, потенціал розширення внутрішньокристалічного простору та зниження окисного фосфорилування. Не менш важливо, що втрата мітоку пригнічує кардіопротекцію, викликану діазоксидом. Дані вказують на те, що канали міто $K_{\text{АТФ}}$ реагують на клітинні відповіді енергетичного статусу, регулюючи обсяг і функцію органел. [12, 13]

1.2. $K_{\text{АТФ}}$ -канал мітохондрії гладеньких м'язів матки щура

АТФ-чутливий K^+ -канал у мітохондріях гладеньких м'язів матки щурів існує і надає різноманітний вплив на функціонування мітохондрій – регулює набряк матриксу, вироблення АФК та зміни потенціалу внутрішньої мембрани, який може бути відповіддю мітохондрій на потреби клітин при різних метаболічних проблемах, і може відігравати важливу роль у фізіології

гладеньких м'язів вцілому. Опишемо зміни внутрішнього мембранного потенціалу та покажем на графіках. [14]

Цей процес аналізували за допомогою TMRM 50 нМ в ізольованих мітохондріях матки щурів. (Рис. 1.1) Поляризація мітохондріальної внутрішньої мембрани в стандартному інкубаційному середовищі з сукцинатом. Додавання або КЦМГ* 2,5 мкМ (1) або CaCl₂ 100 мкМ (2) (підписаний стрілкою) викликав повну деполяризацію в пов'язаних мітохондріях; 3-КЦМГ* 2,5 мкМ додавали за 0 с вимірювання перед додаванням мітохондріальної суспензії; (Рис. 1.2) ефектори мітоКАТФ змінюють поляризацію мітохондрій мембрани. (1) Поляризація мітохондріальної мембрани в стандартному інкубаційному середовищі. АТФ 200 мкМ окремо (2) або разом з діазоксиду 50 мкМ (3), додавали в інкубаційне середовище перед додаванням аликвоти мітохондріальної суспензії. В кінці до кожного додали КЦМГ* 2,5 мкМ для забезпечення повної деполяризації (підписаний стрілкою). Кожна крива є репрезентативною щонайменше для трьох незалежних експериментів. [15, 16]

*КЦМГ – англійською мовою на графіку позначено як «СССР» - Carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone

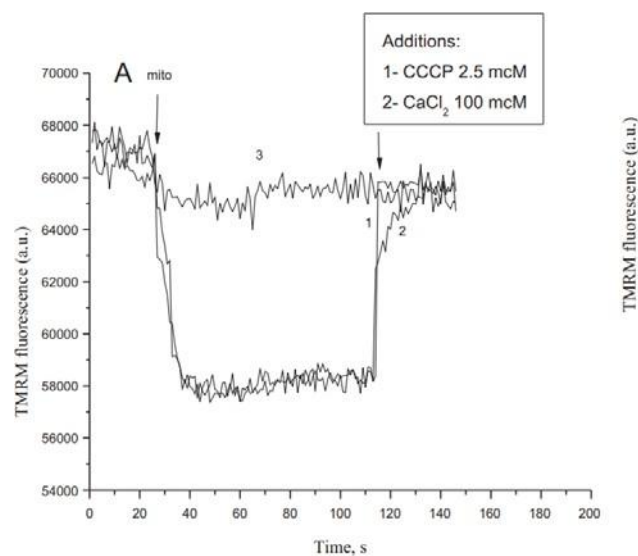


Рис. 1.1

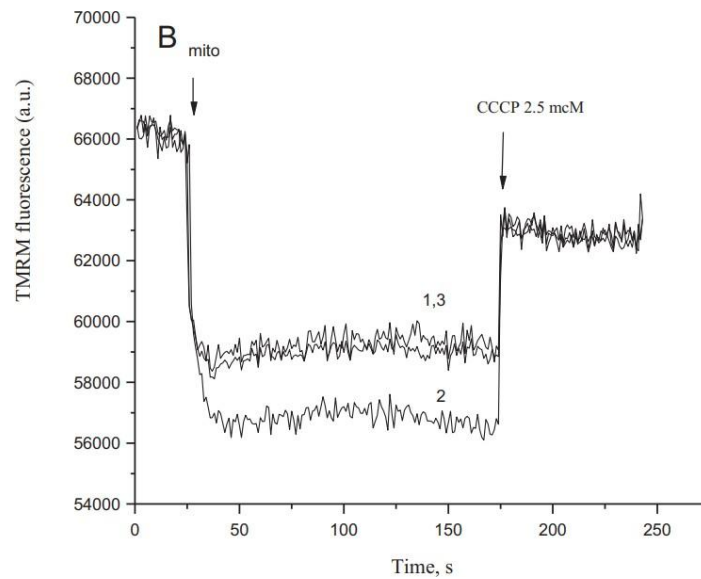


Рис. 1.2

1.3. Основні властивості $K_{ATФ}$ каналів та його субодиниць

$K_{ATФ}$ -канали присутні у ПМ та внутрішніх мембранах кардіоміоцитів, скелетних і гладеньком'язових клітинах, а також забезпечують унікальний зворотний зв'язок між метаболізмом м'язових клітин та електричну активність. При цьому вони можуть відігравати важливу роль у контролі скоротливості, особливо коли порушується енергетика клітин, захищаючи тканини від кальціюперевантаження і пошкодження волокна, але ціною цього захисту може бути посилення аритмічної активності. [17]

$K_{ATФ}$ канали мають у своєму складі вісім білкових субодиниць (октамер) у вигляді комплексів пороутворюючих субодиниць K_{IR6} типу α - калієвий канал випрямляча всередину, та рецептор сульфонілсечовини SUR субодиниць, які мають у своєму складі два трансмембранні прольоти і утворюють пору каналу, диференціальна збірка $K_{ATФ}$ -каналів у різних тканинах викликає специфічну для тканин фізіологічну та фармакологічну

регуляцію, а отже, і специфічний для тканин фармакологічний контроль скоротливості. [18]

1.3.1 Субодиниця виду K_{IR} 6.1 та K_{IR} 6.2

Субодиниця K_{IR6} типу α : $K_{IR6.1}$ і $K_{IR6.2}$ є типовими білками внутрішнього випрямного каналу, який складається з двох трансмембранних спіральних доменів, TM1 і TM2, і цитоплазматичних N- і C-кінці (Рис 1.3)[14]. Дві трансмембранні спіралі і поровий домен $K_{IR6.1}$ і $K_{IR6.2}$ мають значну структурну схожість із сегментом мембрани S5-S6, що утворює пори, керованих напругою K^+ -каналів. Обидві субодиниці K_{IR} містять висококонсервовану послідовність залишків, - так звану послідовність (TVGY/FG), що надає K^+ -селективність і зустрічається у всій родині каналів K^+ . У той же час, загальна структура пор передбачена як для $K_{IR6.1}$, так і для $K_{IR6.2}$, ці субодиниці демонструють провідності ~ 35 і ~ 80 пСм.[19, 20]

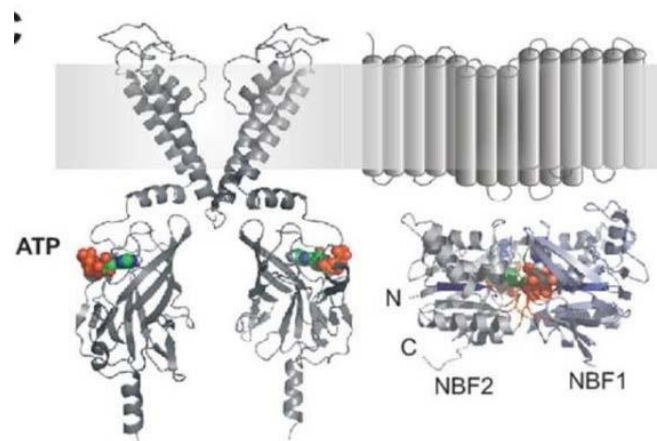


Рис. 1.3 Моделювання субодиниці *KIR 6.1* на основі інших прокаріотичних та еукаріотичних білків

1.3.2 Субодиниця виду SUR

Субодиниця SUR має чотири рецептори сульфонілсечовини (виду SUR1, SUR2A, SUR2B), також відомі як – АТФ – зв'язувальні касетні

транспортери (транспортери ABC). Ці субодиниці у своєму складі містять три додаткові трансмембранні домени, а також два нуклеотидно-зв'язуючих домени на цитоплазматичній стороні. Основна їхня функція - регуляція калієвого каналу, яке має суттєво важливе значення в ролі датчика метаболічного стану. Можна зазначити, що субодиниці SUR є досить чутливими до сульфонілсечовини, MgATP (магнію солі АТФ) та деяких інших фармакологічних каналів.[21]

Субодиниця SUR — за відсутності Mg^{2+} , нуклеотиди пригнічують активність K_{ATP} -каналу, але за наявності Mg^{2+} і АТФ, і АДФ стимулюють активність каналу через взаємодію з субодиницею SUR. Об'єднуюча структурна особливість з усіма білками транспортерами ABC є цитоплазматичні нуклеотид-зв'язуючі складки, NBF1 і NBF2, що складаються з нуклеотид-зв'язуючих мотивів Уокера А і Уокера В та інших консервативних послідовностей (Рис. 1.4)[22]

Домени NBF містять сайти зв'язування нуклеотидів Mg^{2+} -аденозину, які служать для стимуляції функції K_{ATP} . У надсімействі ABC — трансмембранні домени (TMD1,2), кожен з яких складається з 6 трансмембранних спіралей, зазвичай здійснюють трансмембранну транспортну функцію.[23] Однак SUR1 і SUR2 нетипові, оскільки така транспортна функція не була ідентифікована, і ці субодиниці містять додатковий трансмембранний домен на N-кінці, TMD0, який приєднується до TMD1 за допомогою цитоплазматичної лінкера L0 (Рис. 1.5).[24]

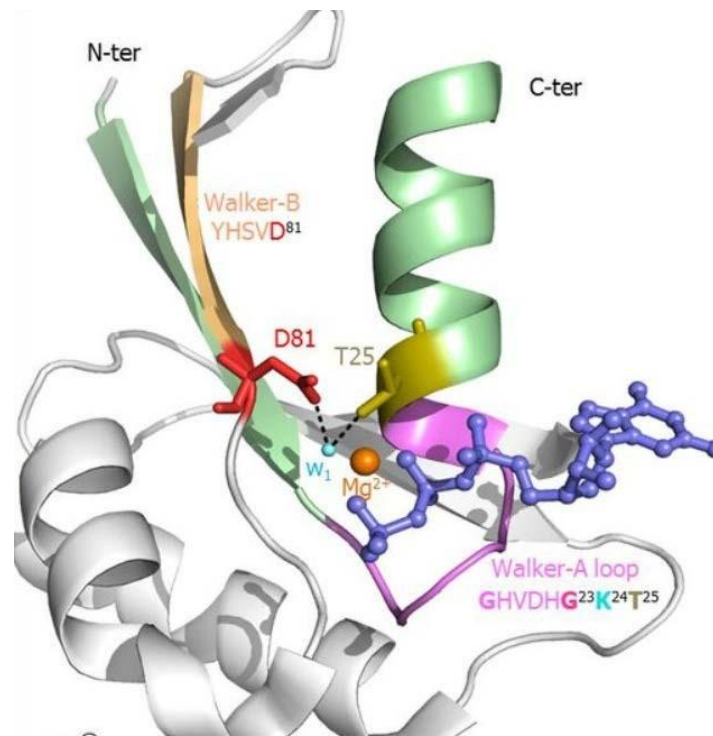


Рис.1.4. Петля *Walker-A* і мотив *Walker-B*

в білках, що зв'язують нуклеотиди.

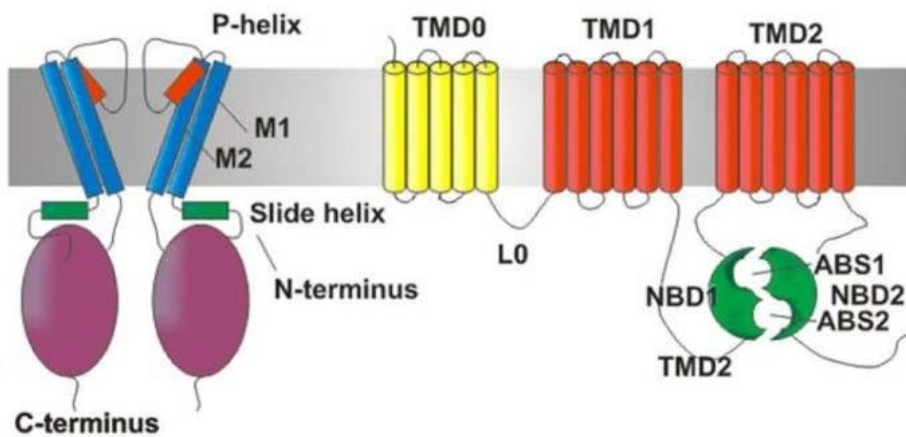


Рис.1.5. Трансмібранна транспортна функція доменів виду *TMD*

1.4. Вплив певних засобів, які відкривають калієві канали міометрія щура

Деякі засоби, що відкривають K^+ -канали, є релаксантами матки як *in vitro*, так і *in vivo*. Антагонізм кромакаліму, RP 49356 і пінацидилу у низьких концентраціях глібенкламіду свідчить про те, що їх дія може включати АТФ-чутливий K^+ -канал. Високі концентрації пінацидилу (10 і 100 пМ) і кромакаліму (100 пМ) можуть надавати додаткову дію на матку. Низька ефективність міноксидилу сульфату та його нечутливість до глібенкламіду в ізольованій матці свідчить про те, що механізм її дії може відрізнятися від механізму дії інших засобів, що відкривають K^+ -канали. [25, 26]

1.5. Регуляція експресії генів K_{ATP} каналу

SUR1 і $K_{IR6.2}$ гени локалізуються в CHR11P15.1, а гени $K_{IR6.1}$ і SUR2 відповідно розташовуються в CHR12P12.1. $K_{IR6.1}$ і $K_{IR6.2}$ гени кодують пороутворюючі субодиниці K_{ATP} каналу, також субодиниці SUR кодуються SUR1 гена або селективного сплайсингу SUR2 ген (SUR2A та SUR2B). Транскрипції генів можуть піддаватися змінам, і цей процес безпосередньо пов'язаний зі змінами в метаболічному середовищі. Високий рівень глюкози, наприклад, спричиняє значне зниження рівня мРНК *kir6.2* – ефект, який можна скасувати за рахунок зниження концентрації глюкози. [27]

Запропонований механізм для K_{ATP} -каналу реакція на гіпоксію і ішемію. Низький внутрішньоклітинний рівень кисню зменшує швидкість метаболізму, уповільнюючи Цикл ТСА в мітохондріях. Неможливо ефективно переносити електрони, коефіцієнт внутрішньоклітинних $NAD^+ / NADH$ зменшується, активуючи фосфотидилінозитол-3-кіназа і позаклітинні регульовані сигналом кінази. Це, в свою чергу, підвищує

регуляцію c-jun транскрипції, створюючи білок, який зв'язується з SUR2 промоутером. Одне з важливих причин зв'язку між клітинним оксидативним стресом і підвищенням K_{ATP} виробництва, полягає в тому, що загальна транспортна функція калію прямо пропорційна мембранній концентрації цих каналів. Наприклад у разі діабету, K_{ATP} канали не можуть виконувати нормальну функцію, а помітна чутливість до м'якої серцевої ішемії та гіпоксії виникає внаслідок нездатності клітин адаптуватися до несприятливих окисних умов.[28]

1.6 K_{ATP} -чутливі калієві канали в ролі функціонального захисту від серцево – судинних захворювань

Канали K_{ATP} інгібуються збільшенням внутрішньоклітинної концентрації АТФ і стимулюються збільшенням внутрішньоклітинної концентрації $Mg \cdot ADP$. Активация K_{ATP} -каналів зменшує ішемію/реперфузійне ураження, захищає кардіоміоцити від серцевої недостатності та зменшує частоту аритмій. K_{ATP} -канали беруть участь у різних сигнальних шляхах, і їхня участь у захисних процесах регулюється ендогенними сигнальними молекулами, такими як оксид азоту та сірководень. K_{ATP} -канали можуть виступати в якості нової мішені ліків для боротьби з серцево-судинними захворюваннями при розробці споріднених ліків у майбутньому.[24]

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТ, МЕТОДИ ТА МАТЕРІАЛИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Реєстрація спонтанних скорочень міометрія

Експерименти проводили на самицях щурів лінії Wistar (середня вага тварин становила 200-250 г). Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно з Міжнародною конвенцією роботи з тваринами та Законом України „Про захист тварин від жорстокого поводження”. Умертвіння тварин здійснювали дислокацією шийних хребців в умовах ефірного наркозу.

Тензометричні досліди проводили на препаратах поздовжніх гладеньких м'язів рогів матки зі збереженим ендометрієм. М'язові смужки (середній розмір - 2 x 10 мм) вміщували в робочу камеру (об'єм 2 мл) з проточним розчином Кребса (швидкість протікання - 5 мл/хв.), термостатовану при 37 °С. Препарату надавали пасивний натяг на рівні 10 мН і залишали на 1 годину до стабільної відтворюваності спонтанних скорочень. Скорочувальну активність досліджували в ізометричному режимі за допомогою ємнісного датчика сили. Сигнали реєстрували, використовуючи аналого-цифровий перетворювач та персональний комп'ютер (Рис. 2.1).

В дослідах використовували розчин Кребса (мМ): 20,4 NaCl; 5,9 KCl; 15,5 NaHCO₃; 1,2 NaH₂PO₄; 1,2 MgCl₂; 2,5 CaCl₂; 11,5 глюкоза; рН розчину становив 7,4.

Скорочення індукували аплікацією утеротонічного гормону окситоцину (0,1 МО, «Гедеон Ріхтер», Угорщина). У експериментах використовували активатор АТР-чутливих K⁺-каналів плазматичної мембрани діазоксид (застосовані концентрації 50, 100, 150 і 200 мкМ; виробництво «Sigma», США) та блокатор цих каналів глібенкламід (застосовані концентрації 1, 2, 4, 6, 8 та 10 μМ; виробництво «Sigma», США), а також блокатор АТР-чутливих K⁺ каналів

мітохондрій 5-гідроксидеканоат (5-HD, застосовані концентрації 50, 100, 150 і 200 μM ; виробництво «Sigma», США).

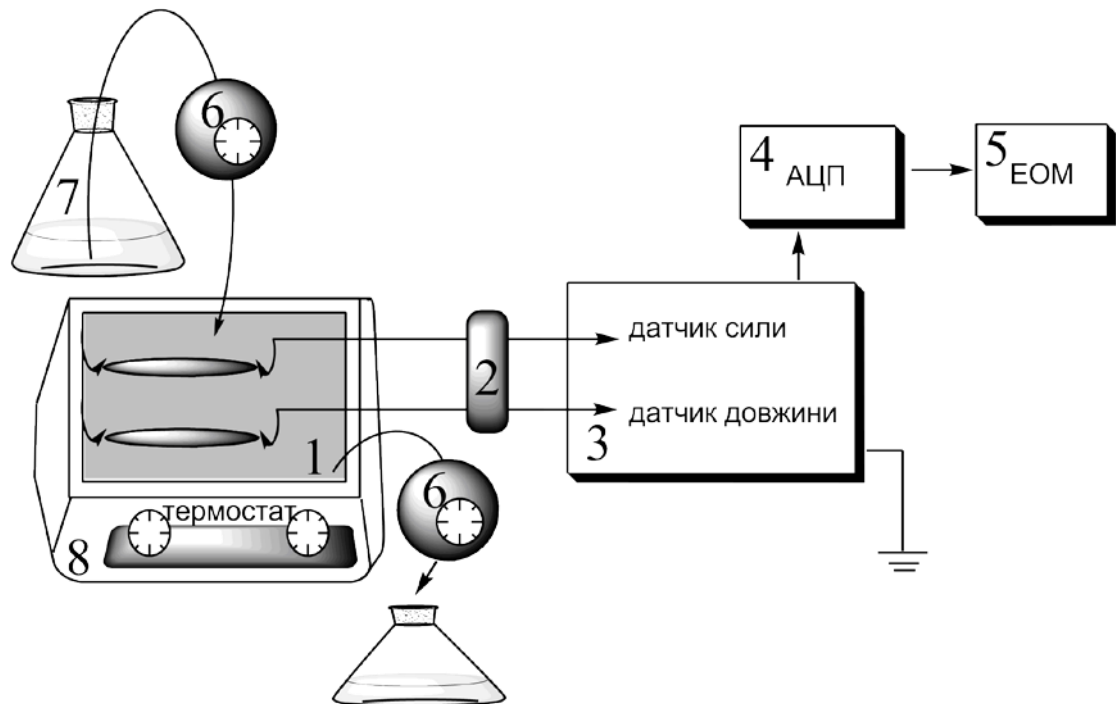


Рис. 2.1. Блок-схема устаткування для реєстрації скорочувальної активності м'язових препаратів: 1 - робоча камера з м'язовими препаратами, яка має постійний (5 мл/хв) протік фізіологічного розчину Кребса; 2 – датчики для реєстрації функціонування препаратів: ємнісний датчик сили (за ізометричної реєстрації) і датчик укорочення-розслаблення (за ізотонічної реєстрації); 3 – підсилювач; 4 – АЦП; 5 – комп'ютер; 6 – система перистальтичних насосів для руху розчинів; 7 – робочі розчини; 8 – термостат, який підтримує постійну температуру розчину в робочій камері (37 °C).

Стокові розчини діазоксиду і глібенкламіду готували, попередньо розчиняючи речовини в органічному розчиннику диметилсульфоксиді (ДМСО), та вносили в розчин Кребса так, щоб остаточною аліквота ДМСО становила 0,1% від загального об'єму розчину Кребса. Усі інші скорочення, зокрема і контрольні, досліджували в розчинах, які містили 0,1% ДМСО. Стоковий

розчин 5-гідроксидеканоату готували, попередньо розчиняючи цю речовину у дистильованій воді.

Неселективне блокування АТР-чутливих K^+ -каналів здійснювали передінкубацією (упродовж 20 хв) ГМ препаратів з глібенкламідом, а їх активацію – діазоксидом. Блокування АТР-чутливих K^+ -каналів мембран мітохондрій спричиняли попередньою інкубацією (упродовж 20 хв) ГМ з 5-HD.

2.2 Комплексний механокінетичний аналіз спонтанних скорочень

Вивчення механокінетики процесу скорочення-розслаблення м'язових препаратів (повний механокінетичний аналіз) здійснювали згідно з методом [29]. Фазою скорочення вважали фрагмент скоротливої відповіді від початку зміни сили до її максимального значення (F_{max} , амплітуди фазного скорочення). Фаза розслаблення починалась від максимуму фазного скорочення і тривала до зниження сили до базального рівня.

Лінеаризацію окремих циклів скорочення-розслаблення здійснювали у координатах $\ln \frac{F_R}{F_C} + \Delta t$ тут позначення:

f і t – миттєві значення сили та часу на рівні скоротливого циклу (тут C - позначення фази скорочення, R – позначення фази розслаблення),

- F_C – показник сили в точці перегину фази скорочення (тут ϵ максимальна швидкість V_C) і йому відповідає час τ_C ,

- F_R – показник сили в точці перегину фази розслаблення (тут ϵ максимальна швидкість V_R) і йому відповідає час τ_R ,

- Δt – постійний довільно обраний інтервал часу.

Із графіків лінеаризації визначали характеристичні константи k і n , які чисельно становили:

$$n = \frac{c_0}{c_R - c_0} = \frac{c_0}{c_0 - c_C}$$

$$k = \frac{c_0}{(c_R - c_0)^2} = \frac{c_0}{(c_0 - c_C)^2}$$

Потім характеристичні константи k і n підставляли у формули для розрахунку механокінетичних параметрів циклу скорочення-розслаблення:

- часові (τ_0 , τ_C і τ_R) – миттєві значення часу у точках перегину частин скорочувальної відповіді на рівні фаз скорочення і розслаблення відповідно,

- силові (F_{max} , F_C та F_R) – тут F_C та F_R значення сили f у точках перегину фаз скорочення і розслаблення відповідно:

$$F_C = F_{max} \cdot \left(\frac{k\sqrt{n}}{n} - n \cdot e^{\sqrt{n}} \right)$$

$$F_R = F_{max} \cdot \left(\frac{k\sqrt{n}}{n} \cdot e^{-\sqrt{n}} \right),$$

- швидкісні (V_C і V_R) – максимальні швидкості фаз скорочення та розслаблення відповідно:

$$V_C = k \cdot F_{max} \cdot \left(\frac{k\sqrt{n}}{n} \right)^{n-1} \cdot \frac{e^{\sqrt{n}}}{\sqrt{n}}$$

$$V_R = -k \cdot F_{max} \cdot \left(\frac{k\sqrt{n}}{n} \right)^{n-1} \cdot \frac{e^{-\sqrt{n}}}{\sqrt{n}},$$

- імпульсні (I_{max} , I_C та I_R) – імпульси сили на рівні F_{max} , F_C та F_R відповідно:

$$I_{max} = F_{max} \cdot r_0 = F_{max} \cdot \frac{n}{k}$$

$$I = F_{C \max} \cdot \left(\frac{n+1}{n} \right)^k \cdot e^{\sqrt{n}}$$

$$I = F_{R \max} \cdot \left(\frac{n+1}{n} \right)^k \cdot e^{-\sqrt{n}}$$

2.3. Статистичний аналіз експериментальних даних

Дані тензометричних досліджень обробляли методами варіаційної статистики із застосуванням програм Excel та Origin 2018.

Перевірку вибірок на їх приналежність до нормально розподілених генеральних сукупностей здійснювали тестом Шапіро-Уїлка. Визначення достовірних відмінностей між середніми здійснювали за використанням t-критерія Стьюдента. У всіх випадках достовірними вважали результати за умови значення ймовірності p , менше 5% ($p < 0.05$).

Аналіз достовірності апроксимації даних лінійною функцією здійснювали із застосуванням F-критерію; для лінеаризованих графіків коефіцієнти детермінації (R^2) були не нижчими за 0,98.

Дані усереднені як середнє \pm стандартна похибка середнього, n – кількість повторень дослідів.

РОЗДІЛ 3

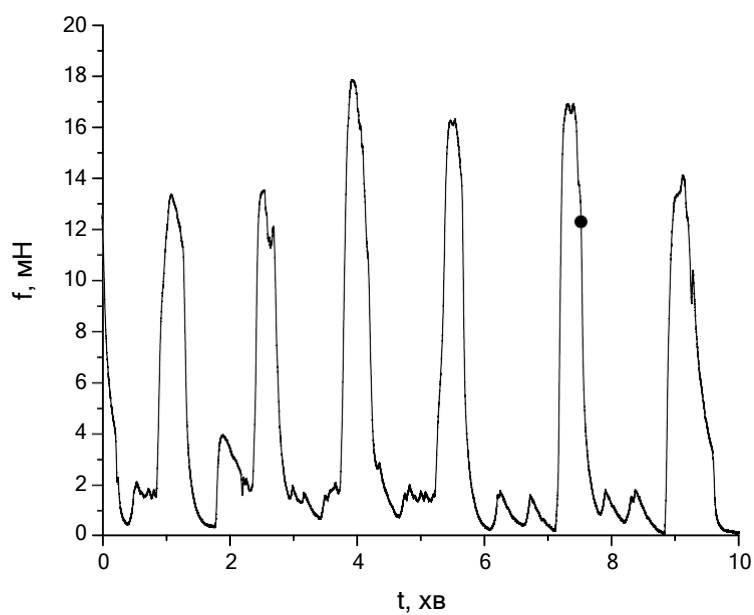
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Механокінетика спонтанних скорочень міометрія за блокування $K_{\text{АТР}}$ -каналів плазматичної мембрани

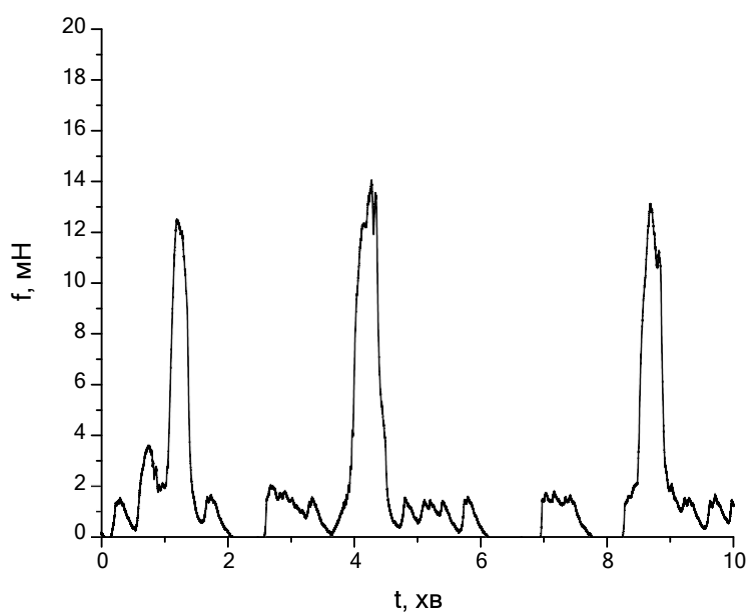
У тканині фазних гладеньких м'язів K^+ -канали відіграють надзвичайно важливу роль, регулюючи мембранний потенціал міоцитів, а тому і тонус та скорочувальну активність [30]. Головними представниками K^+ -каналів у гладеньких м'язах матки є потенціалкеровані K^+ -канали (K_V), Ca^{2+} -активовані K^+ -канали (BK_{Ca} і SK_{Ca}) та АТР-чутливі K^+ -канали [31]. Натепер добре вивчено ефекти блокаторів каналів K_V , BK_{Ca} і SK_{Ca} на спонтанну скорочувальну активність міометрія щурів за різних функціональних станів (невагітний і різні терміни вагітності) [32]. Також відомі регуляторні властивості АТР-чутливих K^+ -каналів на скорочувальну активність міометрія щурів, індуковану утеротонічним гормоном окситоцином [33]. Втім, натепер відсутня інформація щодо участі цих каналів у регуляції механокінетики спонтанних скорочень, тому метою даної роботи було здійснити повний механокінетичний аналіз спонтанних скорочень міометрія щурів за умов блокування і активації АТР-чутливих K^+ -каналів ПМ (глібенкламідом та діазоксидом, відповідно).

На першому етапі досліджень було досліджено спонтанну скорочувальну активність міометрія на тлі кумулятивного збільшення концентрацій блокатора $K_{\text{АТР}}$ -каналів глібенкламїду (1, 2, 4, 6, 8 та 10 μM); аналіз окремих спонтанних скорочень здійснювали через 20 хв від початку дії кожної концентрації речовини. Виявлено, що глібенкламід на усьому діапазоні досліджених концентрацій спричиняє дозо-залежне пригнічення амплітуди спонтанних скорочень (Рис. 3.1), яке на тлі найвищої застосованої концентрації досягало у середньому 51,3 % щодо контролю, прийнятого за

100 % ($n=6$, $p<0,001$). Також за даних умов суттєво знижувалася частота скорочень.



А



Б

Рис. 3.1. Спонтанна скорочувальна активність міометрія щурів у контролі (А) та в умовах 20-хвилинної попередньої інкубації з блокатором $K_{\text{АТР}}$ -каналів плазматичної мембрани глібенкламідом (6 μM) (Б). Наведено типові механограми.

Надалі було здійснено повний механокінетичний аналіз окремих спонтанних скорочень, зареєстрованих на тлі глібенкламіду. Відповідно до методу [29] розраховано силові (F_{\max} , F_C та F_R), часові (τ_0 , τ_C і τ_R), імпульсні (I_{\max} , I_C та I_R) та швидкісні параметри (V_C і V_R).

Встановлено, що глібенкламід спричиняє зниження окремих силових параметрів (Рис. 3.2). Так, хоча усі застосовані концентрації цього блокатора $K_{\text{АТР}}$ -каналів достовірно зменшували F_{\max} , пригнічення F_C було характерним лише за дії його в концентраціях 8 і 10 μM . У випадку параметра F_R було зареєстровано його зменшення на усьому діапазоні використаних концентрацій глібенкламіду, але дозова залежність була фактично відсутня.

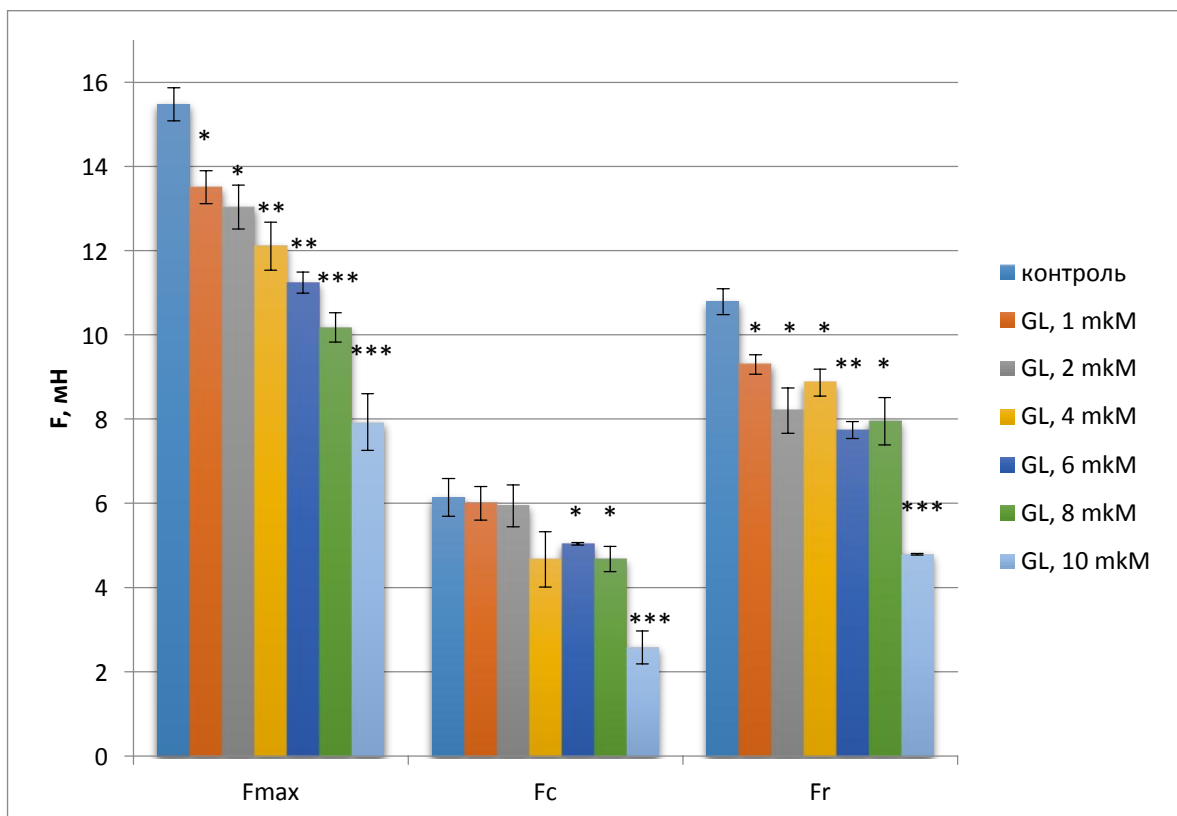


Рис. 3.2. Силові параметри спонтанної скорочувальної активності міометрія щурів у контролі та в умовах попередньої інкубації з блокатором $K_{\text{АТР}}$ -каналів плазматичної мембрани глібенкламідом (1, 2, 4, 6, 8 і 10 μM). За 100% прийнято відповідні показники спонтанної активності в контролі (n=6, * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$ та *** - $p < 0.001$ – різниця достовірна щодо контролю).

У випадку часових параметрів спонтанних скорочень міометрія (τ_0 , τ_C і τ_R), ми спостерігали їх достовірне зменшення на тлі найвищої дослідженої концентрації глібенкламідом ($10 \mu\text{M}$). Що стосується показника характеристичного часу максимальної сили спонтанних скорочень τ_0 , то на тлі ($1-8 \mu\text{M}$) блокатора він був на контрольному рівні; у випадку значень часу, у які мають місце точки перегину на рівні фази скорочення і розслаблення м'язу (відповідно τ_C і τ_R), то в обох випадках достовірне їх зменшення спостерігалось лише за присутності високих концентрацій глібенкламідом тлі (8 і $10 \mu\text{M}$) (Рис. 3.3).

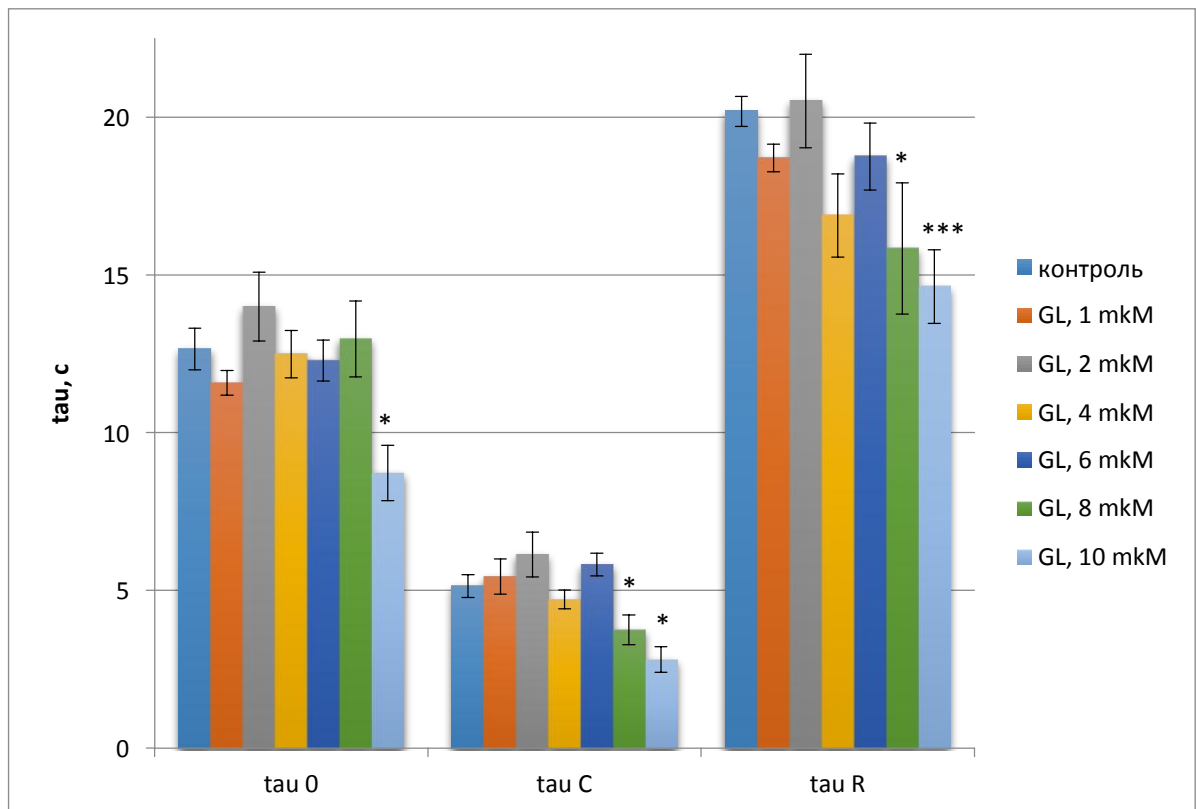


Рис. 3.3. Часові параметри спонтанної скорочувальної активності міометрія щурів у контролі та в умовах попередньої інкубації з блокатором K_{ATP} -каналів плазматичної мембрани глібенкламідом ($1, 2, 4, 6, 8$ і $10 \mu\text{M}$). За 100% прийнято відповідні показники спонтанної активності в контролі ($n=6$, * - $p<0.05$ та *** - $p<0.001$ – різниця достовірна щодо контролю).

Безпосередньо від значень сили (f) і часу (t), зокрема і в точках перегину механограм, залежать показники швидкості і імпульсу сили, тому нами надалі було розраховано силові параметри (V_C і V_R). Встановлено, максимальна швидкість фази скорочення V_C суттєво і дозозалежно знижується за присутності у омиваючому гладеньком'язові препарати розчині глібенкламід у концентраціях 2-10 μM . Також не виявляє дозової залежності максимальна швидкість фази розслаблення V_R ; вона достовірно зменшується на тлі 8 і 10 μM глібенкламід (Рис. 3.4).

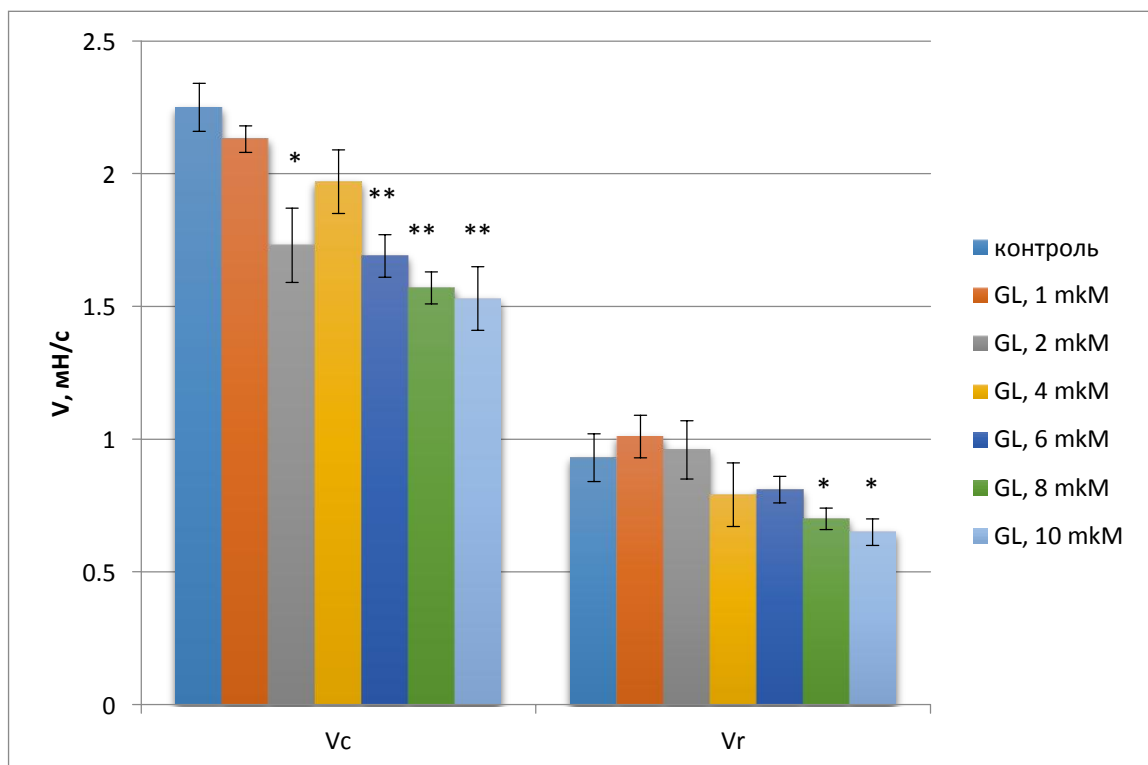


Рис. 3.4. Швидкісні параметри спонтанної скорочувальної активності міометрія щурів у контролі та в умовах попередньої інкубації з блокатором K_{ATP} -каналів плазматичної мембрани глібенкламідом (1, 2, 4, 6, 8 і 10 μM). За 100% прийнято відповідні показники спонтанної активності в контролі ($n=6$, * - $p<0.05$ та ** - $p<0.01$ – різниця достовірна щодо контролю).

Найбільш суттєві зміни серед розрахованих механокінетичних параметрів спостерігалися щодо імпульсних (I_{max} , I_C та I_R) параметрів

скорочувальних реакцій міометрія (Рис. 3.5). Так, за присутності 10 μM глібенкламідом для амплітуди скорочень цей показник у середньому складав 30,3 % щодо контролю ($n=6$, $p<0,001$); у випадку I_C та I_R відносні значення відповідно становили 23,0 % та 32,2 % ($n=6$, $p<0,001$ в обох випадках).

Достовірні зміни I_{max} спостерігалися за дії 4-10 μM глібенкламідом, а у випадку імпульсу сили в точках перегину I_C та I_R , - за усіх використаних концентрацій цього блокатора.

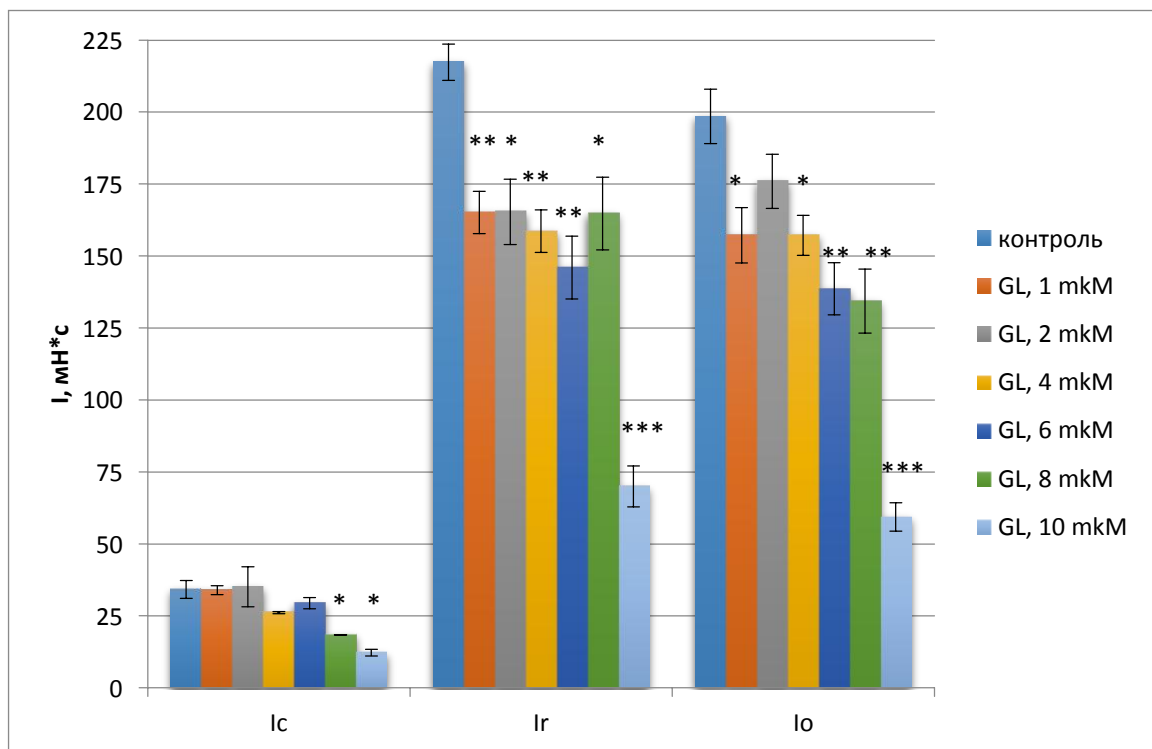


Рис. 3.5. Імпульсні параметри спонтанної скорочувальної активності міометрія щурів у контролі та в умовах попередньої інкубації з блокатором K_{ATP} -каналів плазматичної мембрани глібенкламідом (1, 2, 4, 6, 8 і 10 μM). За 100% прийнято відповідні показники спонтанної активності в контролі ($n=6$, * - $p<0.05$, ** - $p<0.01$ та *** - $p<0.001$ – різниця достовірна щодо контролю).

Отримані нами результати щодо пригнічення скорочувальної активності міометрія щурів глібенкламідом узгоджуються з даними інших дослідників [32-35].

Аналізуючи отримані нами результати, можна передбачити, механізми, за якими блокування K_{ATP} -каналів ПМ глібенкламідом спричиняє пригнічення амплітуди, зниження частоти і модуляцію механокінетичних параметрів спонтанних скорочень міометрія. У випадку, коли K^+ -канали конститутивно відкриті, їх блокування повинно спричинити підвищення мембранного потенціалу ПМ (деполяризацію). Деполяризація ПМ може активувати потенціалкеровані іонні канали, зокрема і Ca^{2+} -канали, втім у цьому випадку ми повинні були б реєструвати активацію спонтанної скорочувальної активності, але спостерігаємо протилежний ефект. Дійсно, як свідчать дані Yoshitake K et al. [33], аплікування глібенкламіду до ГП препаратів аорти супроводжується зниженням внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} та пригніченням викликаних гіперкалієвим розчином скорочень. Також дослідженнями Villar A і колег [32, 34, 35] показано, що блокатори K_{ATP} -каналів ПМ похідні сульфанілсечовини (тол бутамід і глібенкламід) знижують до деякої міри спонтанні та відчутно пригнічують викликані різними шляхами спряження скорочення міометрія (окситоцином, ацетилхоліном, гіперкалієвим розчином); також ці ефекти супроводжуються зменшенням концентрації іонізованого Ca в цитоплазмі міоцитів. Обидві наукові групи [32-35] з огляду на результати додаткових експериментів, сходяться на думці, що зазначені ефекти обумовлені посиленням секвестрування іонів Ca^{2+} до внутрішньоклітинних депо.

Серед розрахованих нами параметрів про процеси енергозалежного зниження цитозольної концентрації Ca^{2+} вказує швидкість фази розслаблення. У даному випадку хоча абсолютні значення V_R суттєво і дозо залежно зменшувалися (Рис. 3.4), причому це зниження було більш стрімким, ніж у випадку амплітуди F_{max} (Рис. 3.2), нормування V_R на F_{max} виявляє дозо незалежне достовірне збільшення відносної швидкості розслаблення у середньому до 121,2% щодо контролю. У той же час, нормована максимальна швидкість фази скорочення достовірно змінювалась лише за максимальної

використаної концентрації глібенкламіду 10 μM (тож, ймовірно, що загалом енергонезалежні процеси зростання цитозольної концентрації Ca^{2+} не чутливі до дії цієї сполуки).

Таким чином, ми можемо передбачити, що у за блокування $\text{K}_{\text{АТР}}$ -каналів ПМ глібенкламідом пригнічення спонтанних скорочень міометрія пов'язане з активацією процесів енергозалежного зниження концентрації іонів Ca^{2+} в цитозолі гладеньком'язових клітин.

3.2. Механокінетика спонтанних скорочень міометрія за активації $\text{K}_{\text{АТР}}$ -каналів плазматичної мембрани

На тлі активатора АТР $\text{K}_{\text{АТР}}$ -каналів діазоксиду (застосовані концентрації 50, 100, 150 і 200 μM) спостерігалось зниження амплітуди спонтанних скорочень міометрія (Рис. 3.6), причому концентрації понад 100 μM спричиняли повне пригнічення спонтанної скорочувальної активності. Тож подальший аналіз механокінетики спонтанних скорочень здійснювали для модуляцій міометрія діазоксидом у концентраціях 50 і 100 μM .

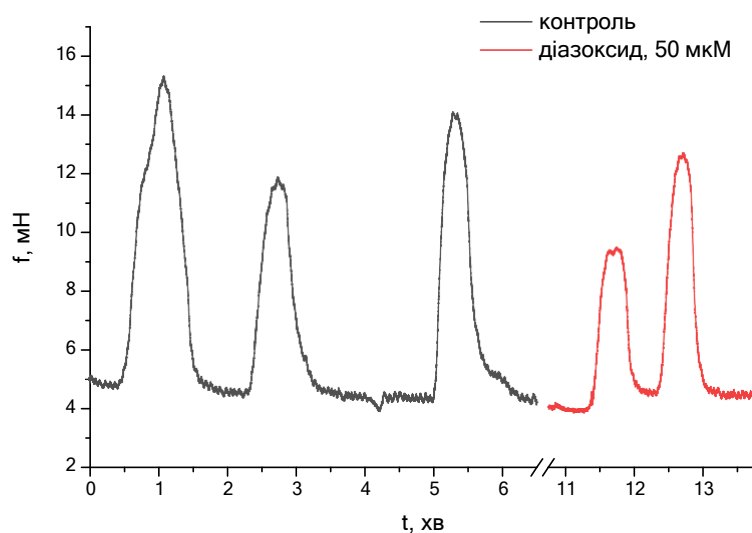


Рис. 3.6. Спонтанна скорочувальна активність міометрія шурів у контролі та в умовах 20-хвилинної попередньої інкубації з активатором $\text{K}_{\text{АТР}}$ -каналів плазматичної мембрани діазоксидом (50 μM). Наведено типові механограми.

На тлі діазоксиду спостерігалось значне зниження силових параметрів (F_{\max} , F_C та F_R), спонтанних скорочень (Рис. 3.7). Фактично, в однаковій мірі спостерігалось пригнічення F_{\max} і F_C , тоді як показник сили, за якої має місце максимальна швидкість фази розслаблення змінювався лише за дії 100 μM .

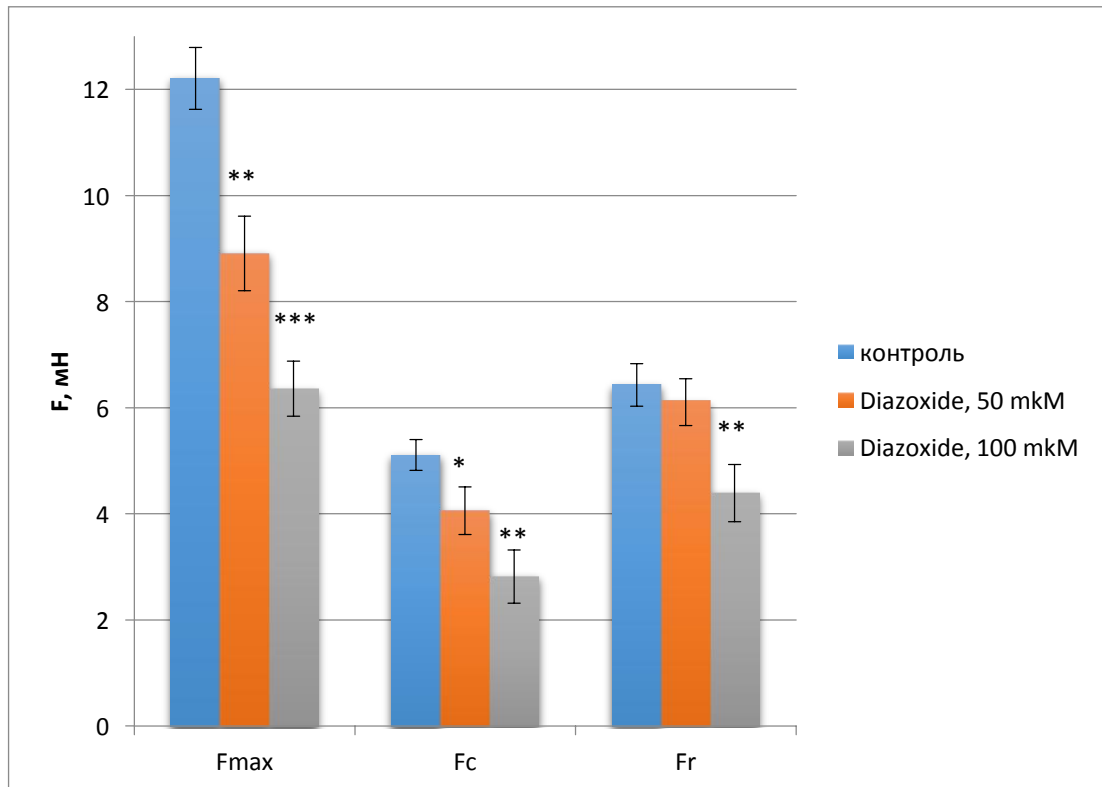


Рис. 3.7. Силові параметри спонтанної скорочувальної активності міометрія щурів у контролі та в умовах попередньої інкубації з активатором $K_{\text{АТР}}$ -каналів плазматичної мембрани діазоксидом (50 та 100 μM). За 100% прийнято відповідні показники спонтанної активності в контролі ($n=6$, * - $p<0.05$, ** - $p<0.01$ та *** - $p<0.001$ – різниця достовірна щодо контролю).

На тлі активації $K_{\text{АТР}}$ -каналів діазоксидом спостерігались лише зміни окремих часових параметрів, які характеризують амплітуду і фазу розслаблення (τ_0 і τ_R), тоді як характеристичний час фази скорочення τ_C залишався на контрольному рівні (Рис. 3.8).

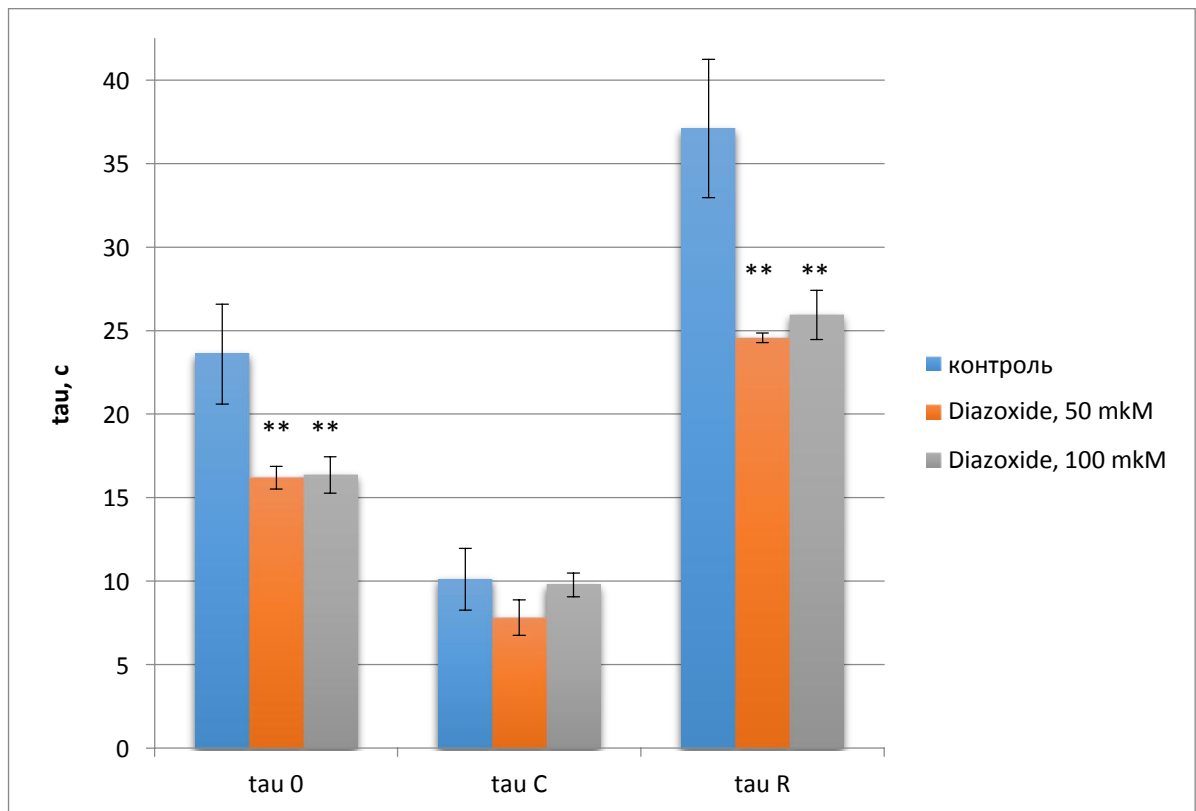


Рис. 3.8. Часові параметри спонтанної скорочувальної активності міометрія щурів у контролі та в умовах попередньої інкубації з активатором K_{ATP} -каналів плазматичної мембрани діазоксидом (50 та 100 μM). За 100% прийнято відповідні показники спонтанної активності в контролі ($n=6$, ** - $p < 0.01$ – різниця достовірна щодо контролю).

Також за дії діазоксиду спостерігалось зменшення значень імпульсних параметрів амплітуди (I_{\max}) та фази розслаблення (I_R), тоді як відповідні імпульсні параметри фази скорочення був на рівні контролю (Рис. 3.9 А).

Швидкісні параметри спонтанних скорочень міометрія за дії діазоксиду не мали достовірних відмінностей щодо контрольних показників (Рис. 3.9 Б).

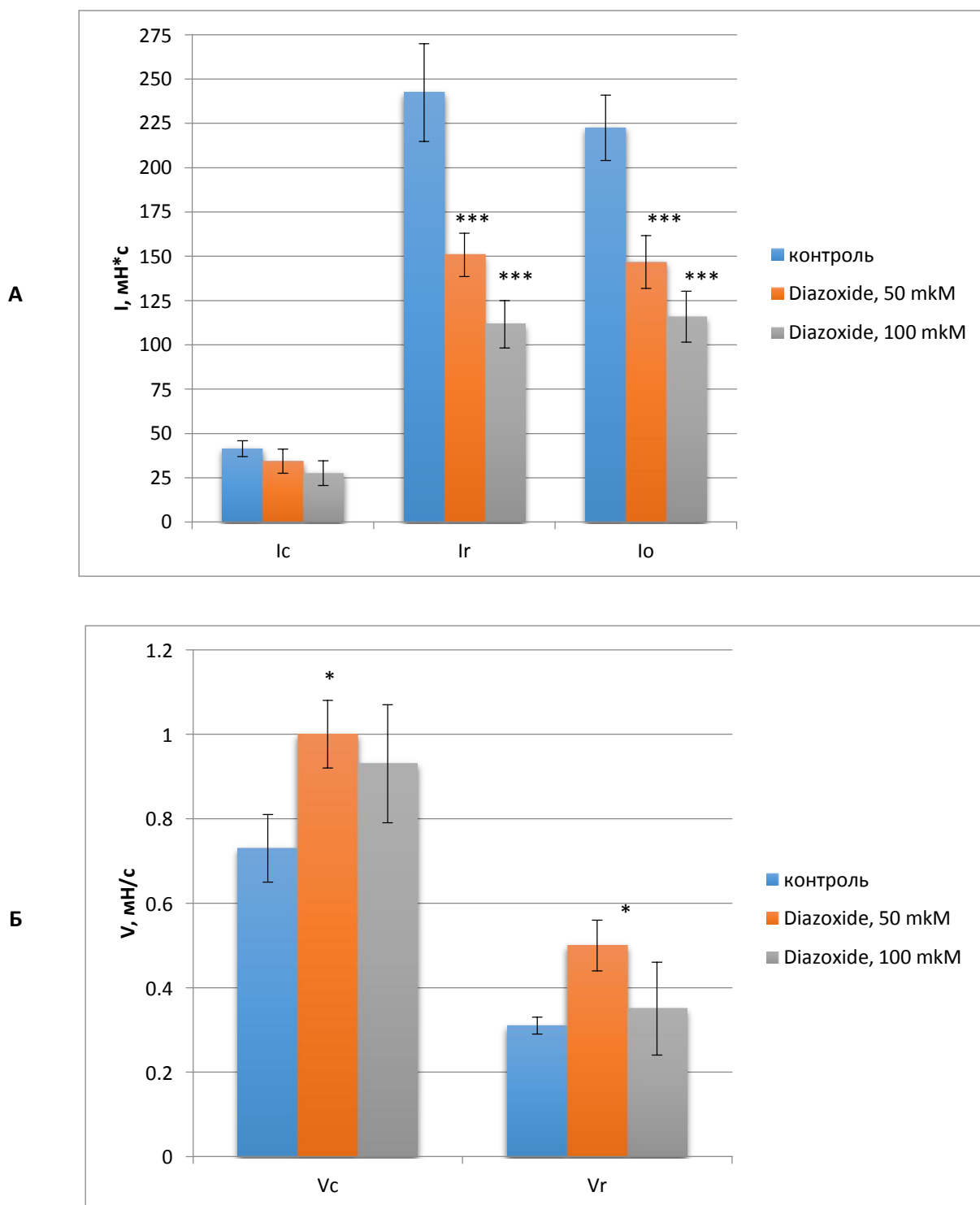


Рис. 3.9. Імпульсні (А) та швидкісні (Б) параметри спонтанних скорочень міометрія щурів у контролі та в умовах попередньої інкубації з активатором K_{ATP} -каналів плазматичної мембрани діазоксидом (50 та 100 μM). За 100% прийнято відповідні показники спонтанної активності в контролі ($n=6$, * - $p<0.05$, *** - $p<0.001$ – різниця достовірна щодо контролю).

Ми можемо передбачити молекулярні механізми, які лежать в основі змін спонтанних скорочень міометрія при активації $K_{\text{АТР}}$ -каналів плазматичної мембрани. Загалом, активація K^+ -каналів призводить до гіперполяризації ПМ (мембранний потенціал зсувається до величини, близької до рівноважного калієвого потенціалу) та розслаблення міоцитів, зокрема і міометрія [36-39]. У випадку $K_{\text{АТР}}$ -каналів їх експресія суттєво зростає під час вагітності, а препарати-активатори використовуються при гіпертонусі матки для попередження передчасних пологів [36, 38, 39]. Тому саме зі змінами мембранного потенціалу міоцитів, ймовірно, пов'язане пригнічення амплітуди спонтанних скорочень міометрія щурів за дії діазоксиду. Також варто підкреслити, що на тлі цієї сполуки ми спостерігаємо подібні ефекти на механокінетичні параметри фаз скорочення та розслаблення, що свідчить про неспецифічний вплив діазоксиду на Ca^{2+} -транспортні системи міоцитів.

3.3. Механокінетика спонтанних скорочень міометрія за блокування мито $K_{\text{АТР}}$ -каналів

Блокування $K_{\text{АТР}}$ -каналів внутрішньої мітохондріальної мембрани 5-ND (200 μM) супроводжувалося пригніченням спонтанних скорочень міометрія щурів (Рис. 3.10).

Також за даних умов спостерігались суттєві перебудови кінетики окремих циклів скорочення-розслаблення: фаза скорочення суттєво пришвидшувалась, тоді як фаза розслаблення значно уповільнювалась. Так, за дії 5-ND часові параметри склали: τ_C – у середньому 52,5 % ($n=6$, $p<0,01$) та τ_R – у середньому 127,1 % щодо відповідних контрольних показників ($n=6$, $p<0,05$) (Рис. 3.11 А). В цих точках скорочувальних відповідей силові параметри, відповідно склали у середньому: F_C 43,2% ($n=6$, $p<0,01$) та F_R 62,5 % ($n=6$, $p<0,001$) (Рис. 3.11 Б).

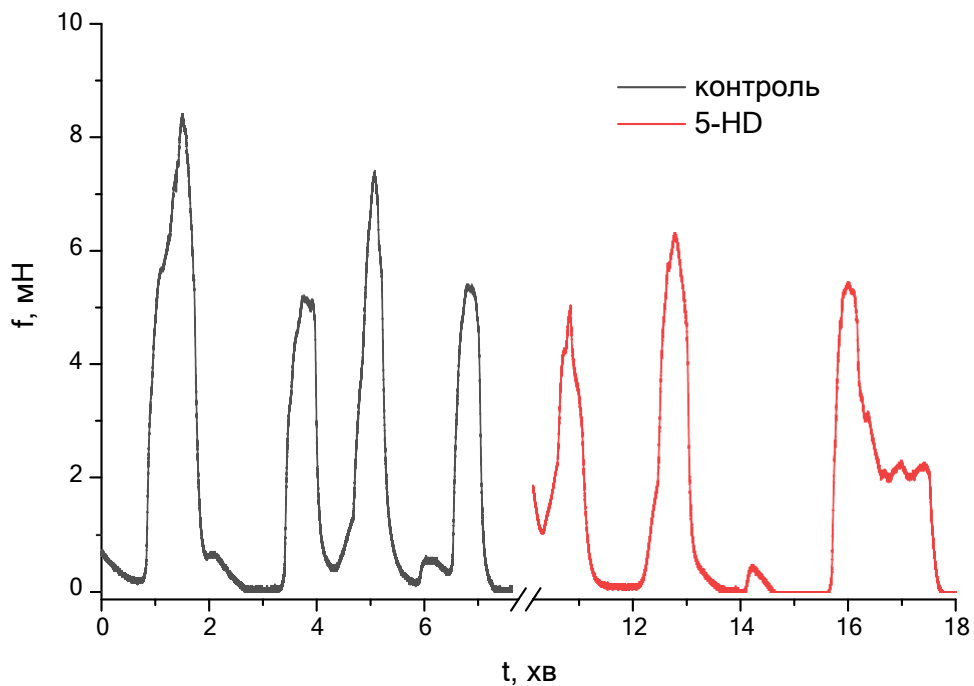


Рис. 3.10. Спонтанна скорочувальна активність міометрія щурів у контролі та в умовах 20-хвилинної попередньої інкубації з блокатором $K_{\text{АТР}}$ -каналів мітохондрій 5-HD (200 μM). Наведено типові механограми.

Також на тлі 5-HD (200 μM) спостерігалось достовірне зниження показника максимальної швидкості на рівні фази скорочення (у середньому до 45,8 % щодо контролю, $n=6$, $p<0,001$), тоді як максимальна швидкість фази розслаблення не мала значущих відмінностей порівняно з відповідним параметром у контролі (Рис. 3.12 А). При нормуванні показників швидкостей на амплітуду маємо рівень пригнічення швидкості скорочення близько 75 % щодо контролю, тоді як швидкість розслаблення залишається на рівні контрольної.

У випадку імпульсних параметрів спостерігаються суттєво нижчі показники імпульсів амплітуди (I_{max}) та максимальної швидкості фази розслаблення (I_{R}) (відповідно, 47,1 % та 50,0 % щодо контрольних значень, $n=6$, $p<0,001$), тоді як імпульс максимальної швидкості фази скорочення (I_{C}) складає у середньому 62,8 % щодо контролю ($n=6$, $p<0,001$) (Рис. 3.12 Б).

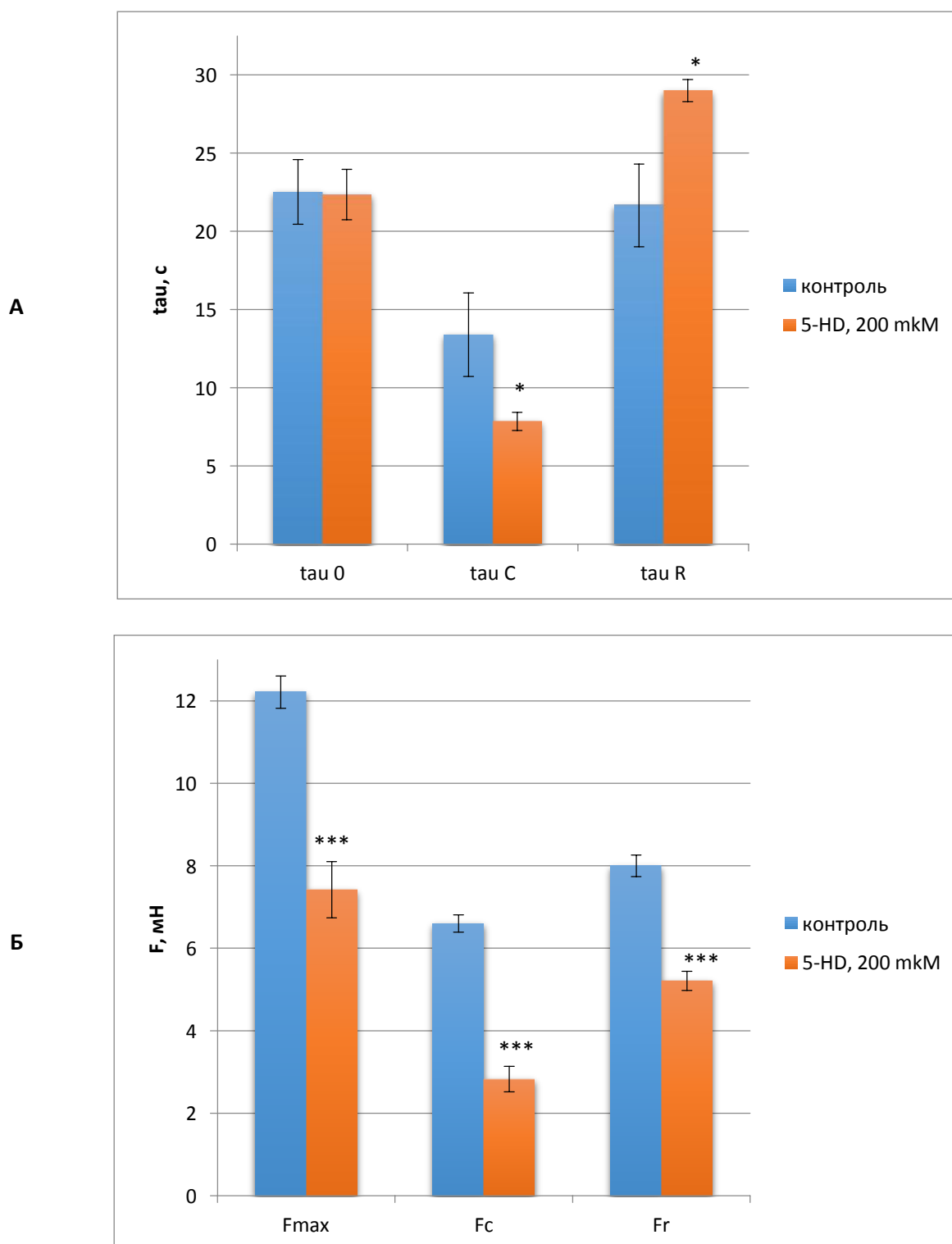


Рис. 3.11. Часові (А) та силові (Б) параметри спонтанних скорочень міометрія щурів у контролі та в умовах попередньої інкубації з блокатором мітоК_{АТР}-каналів 5-HD (200 μ M). За 100% прийнято відповідні показники спонтанної активності в контролі (n=6, * - p<0.05, *** - p<0.001 – різниця достовірна щодо контролю).

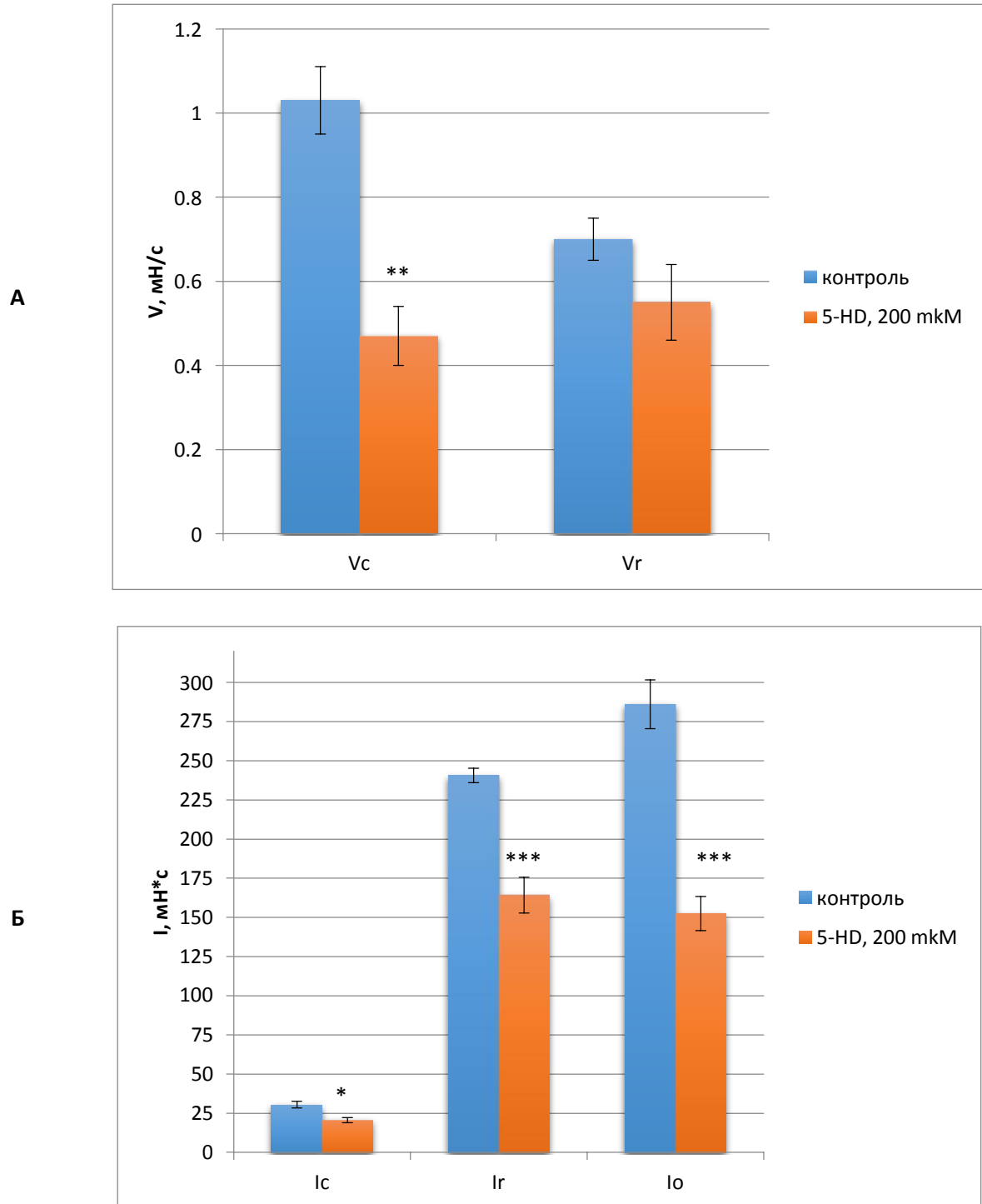


Рис. 3.12. Швидкісні (А) та імпульсні (Б) параметри спонтанних скорочень міометрія щурів у контролі та в умовах попередньої інкубації з блокатором мітоК_{АТР}-каналів 5-HD (200 μ M). За 100% прийнято відповідні показники спонтанної активності в контролі (n=6, * - p<0.05, *** - p<0.001 – різниця достовірна щодо контролю).

Можемо співставити ефекти блокаторів $K_{\text{АТР}}$ -каналів плазматичної і внутрішньої мітохондріальної мембран. Загалом ці дві сполуки спричиняють пригнічення скорочувальної функції міометрія та досить схожим чином змінюють механокінетичні параметри окремих спонтанних скорочень. Втім суттєва різниця між ефектами глібенкламіду та 5-НД спостерігається щодо τ_R – у випадку блокування міто $K_{\text{АТР}}$ -каналів цей показник суттєво зростає. Також цікаво, що на тлі 5-НД як параметр V_R так і його нормований аналог (нормована на амплітуду максимальну швидкість фази розслаблення), не мали достовірних відмінностей щодо контролю, тож, ймовірно, міто $K_{\text{АТР}}$ -канали, на відміну від $K_{\text{АТР}}$ -каналів плазматичної мембрани, не модулюють процеси екструзії іонів Ca^{2+} з цитозолу.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що блокування $K_{\text{АТР}}$ -каналів плазматичної мембрани глібенкламідом спричиняє пригнічення амплітуди, зниження частоти і механокінетичних параметрів спонтанних скорочень міометрія, що підтверджує внесок $K_{\text{АТР}}$ -каналів плазматичної мембрани у підтримання збудливості міометрія невагітних щурів. Оскільки на тлі глібенкламїду спостерігається дозозалежне достовірне збільшення нормованої максимальної швидкості розслаблення, ймовірно, що за блокування $K_{\text{АТР}}$ -каналів відбувається пригнічення активація процесів енергозалежного зниження концентрації іонів Ca^{2+} в цитозолі гладеньком'язових клітин.
2. Показано, що активування $K_{\text{АТР}}$ -каналів плазматичної мембрани діазоксидом спричиняє зниження амплітуди та зміну окремих механокінетичних параметрів спонтанних скорочень міометрія. Оскільки на тлі цієї сполуки спостерігаються подібні ефекти на механокінетичні параметри фаз скорочення та розслаблення, ймовірно, що діазоксид реалізує свої ефекти за рахунок посилення K^+ -провідності та гіперполяризації плазматичної мембрани міоцитів, та не має специфічного впливу на Ca^{2+} -транспортувальні системи міоцитів.
3. Виявлено пригнічення амплітуди та модуляцію окремих механокінетичних параметрів спонтанних скорочень за дії блокатора міто $K_{\text{АТР}}$ -каналів сполукою 5-ND, тож ці канали роблять внесок у підтримання збудливості міометрія невагітних щурів. Оскільки пригнічення провідності міто $K_{\text{АТР}}$ -каналів, на відміну від $K_{\text{АТР}}$ -каналів плазматичної мембрани, не спричинило змін кінетики фази розслаблення спонтанних скорочень, ці канали не залучені у регуляцію процесів екструзії іонів Ca^{2+} з цитозолу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Teramoto N. Physiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels in smooth muscle. *J Physiol.* 2006 May 1;572(Pt 3):617-24. doi: 10.1113/jphysiol.2006.105973. PMID: 16484295; PMCID: PMC1779997.
2. Tatalović N, Vidonja Uzelac T, Orešćanin Dušić Z, Nikolić-Kokić A, Bresjanac M, Blagojević D. Ibogaine-Mediated ROS/Antioxidant Elevation in Isolated Rat Uterus Is β -Adrenergic Receptors and K_{ATP} Channels Mediated. *Antioxidants (Basel).* 2021 Nov 9;10(11):1792. doi: 10.3390/antiox10111792. PMID: 34829663; PMCID: PMC8615200.
3. Hu H, Ding Y, Wang Y, Geng S, Liu J, He J, Lu Y, Li X, Yuan M, Zhu S, Zhao S. MitoK_{ATP} channels promote the proliferation of hypoxic human pulmonary artery smooth muscle cells via the ROS/HIF/miR-210/ISCU signaling pathway. *Exp Ther Med.* 2017 Dec;14(6):6105-6112. doi: 10.3892/etm.2017.5322. Epub 2017 Oct 17. PMID: 29285165; PMCID: PMC5740798.
4. Vadzyuk OB, Kosterin SO. Mitochondria from rat uterine smooth muscle possess ATP-sensitive potassium channel. *Saudi J Biol Sci.* 2018 Mar;25(3):551-557. doi: 10.1016/j.sjbs.2016.01.045. Epub 2016 Feb 6. PMID: 29686518; PMCID: PMC5910642.
5. Brainard AM, Korovkina VP, England SK. Potassium channels and uterine function. *Semin Cell Dev Biol.* 2007 Jun;18(3):332-9. doi: 10.1016/j.semcd.2007.05.008. Epub 2007 May 24. PMID: 17596977; PMCID: PMC2012947.
6. Vadzyuk OB, Kosterin SA. Activation of glybenclamide-sensitive mitochondrial swelling under induction of cyclosporin of A-sensitive mitochondrial pore. *Ukr Biochem J.* 2014 Jul-Aug;86(4):51-60. doi: 10.15407/ubj86.04.051. PMID: 25509183.

7. Khan RN, Matharoo-Ball B, Arulkumaran S, Ashford ML. Potassium channels in the human myometrium. *Exp Physiol*. 2001 Mar;86(2):255-64. doi: 10.1113/eph8602181. PMID: 11429642.
8. Wray S, Arrowsmith S. Uterine Excitability and Ion Channels and Their Changes with Gestation and Hormonal Environment. *Annu Rev Physiol*. 2021 Feb 10;83:331-357. doi: 10.1146/annurev-physiol-032420-035509. Epub 2020 Nov 6. PMID: 33158376.
9. Lovasz N, Koncz A, Domokos D, Gaspar R, Falkay G. ATP-sensitive potassium channels modulate in vitro tocolytic effects of β_2 -adrenergic receptor agonists on uterine muscle rings in rats in early but not in late pregnancy. *Croat Med J*. 2015 Apr;56(2):114-8. doi: 10.3325/cmj.2015.56.114. PMID: 25891870; PMCID: PMC4410172.
10. Quayle JM, Nelson MT, Standen NB. ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol Rev*. 1997;77:1165–1232.
11. Angela Paggio, Vanessa Checchetto, Antonio Campo. Identification of an ATP-sensitive potassium channel in mitochondria. *Nature*. 2019 Aug 1; 572(7771): 609–613. doi: 10.1038/s41586-019-1498-3. PMID: 31435016, PMCID: PMC6726485
12. P Paucek, G Mironova, F Mahdi. Reconstitution and partial purification of the glibenclamide-sensitive, ATP-dependent K⁺ channel from rat liver and beef heart mitochondria. PMID: 1464617
13. Szabo I, Zoratti M. Mitochondrial channels: ion fluxes and more. PMID: 24692355, doi: 10.1152/physrev.00021.2013
14. Thomas P. Flagg, Decha Enkvetchakul, Joseph C. Koster. Muscle K_{ATP} Channels: Recent Insights to Energy Sensing and Myoprotection. *Physiol Rev*. 2010 Jul; 90(3): 799–829. doi: 10.1152/physrev.00027.2009. PMID: 20664073

15. Olga B. Vadzyuk, Serhiy O. Kosterin. Mitochondria from rat uterine smooth muscle possess ATP-sensitive potassium channel. *Saudi J Biol Sci.* 2018 Mar; 25(3): 551–557. doi: 10.1016/j.sjbs.2016.01.045. PMID: 29686518
16. Garg V., Hu K. Protein kinase C isoform-dependent modulation of ATP-sensitive K^+ channels in mitochondrial inner membrane. DOI: 10.1152/ajpheart.01035.2006. PMID: 17351068
17. A Noma. ATP-regulated K^+ channels in cardiac muscle. *Nature.* 1983 Sep 8-14;305(5930):147-8. doi: 10.1038/305147a0. PMID: 6310409
18. Takashi Miki, Masashi Suzuki, Tadao Shibasaki. Mouse model of Prinzmetal angina by disruption of the inward rectifier Kir6.1. *Nat Med.* 2002 May;8(5):466-72. doi: 10.1038/nm0502-466. PMID: 11984590
19. Barrett-Jolley R, McPherson GA. Characterization of K(ATP) channels in intact mammalian skeletal muscle fibres. *Br J Pharmacol.* 1998; 123:1103–1110. doi: 10.1038/sj.bjp.0701727. PMID: 9559893. PMCID: PMC1565277
20. Antcliff JF, Haider S, Proks P, Sansom MS, Ashcroft FM. Functional analysis of a structural model of the ATP-binding site of the KATP channel Kir6.2 subunit. *EMBO J.* 2005 Jan 26;24(2):229-39. doi: 10.1038/sj.emboj.7600487. PMID: 15650751
21. Ashfield R, Gribble FM, Ashcroft SJ, Ashcroft FM. Identification of the high-affinity tolbutamide site on the SUR1 subunit of the K(ATP) channel. *Diabetes.* 1999; 48:1341–1347. doi: 10.2337/diabetes.48.6.1341. PMID: 10342826
22. Hien-Anh Nguyen. Discovery of a new bacterial protein kinase family : functioning mechanism and cellular role of YdiB, an archetype from *Bacillus subtilis*. [researchgate.net/publication/281533045](https://www.researchgate.net/publication/281533045). May 2012. University of Illinois at Chicago

23. M J Fath and R Kolter. ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol Rev.* 1993 Dec; 57(4): 995–1017. doi: 10.1128/mr.57.4.995-1017.1993. PMID: 8302219
24. Peng Ye, Yan-Rong Zhu, Yue Gu, Dai-M in Zhang , and Shao-Liang Chen. Functional protection against cardiac diseases depends on ATP-sensitive potassium channels. *J Cell Mol Med.* 2018 Dec; 22(12): 5801–5806. doi: 10.1111/jcmm.13893. PMID: 30596400
25. Chen Xu, Xingji You, Lu Gao. Expression of ATP-sensitive potassium channels in human pregnant myometrium. *Reprod Biol Endocrinol.* 2011; 9: 35. doi: 10.1186/1477-7827-9-35. PMID: 21418633
26. Teramoto N. Physiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels in smooth muscle. *J Physiol.* 2006;572(Pt 3):617–624. doi: 10.1113/jphysiol.2006.105973. PMID: 16484295
27. W Moritz , C A Leech, J Ferrer, J F Habener. Regulated expression of adenosine triphosphate-sensitive potassium channel subunits in pancreatic beta-cells. *Endocrinology.* 2001 Jan;142(1):129-38. doi: 10.1210/endo.142.1.7885. PMID: 11145575
28. K M Lawrence, A Chanalaris, T Scarabelli. K(ATP) channel gene expression is induced by urocortin and mediates its cardioprotective effect. *Circulation* 2002 Sep 17;106(12):1556-62. doi: 10.1161/01.cir.0000028424.02525.ae. PMID: 12234964
29. Kosterin S, Tsymbalyuk O, and Holden O, “Multiparameter analysis of mechanokinetics of the contractile response of smooth muscles,” *Series on Biomechanics*, vol. 35, no. 1, pp. 14–30, Apr. 2021
30. Aaronson PI, Sarwar U, Gin S, Rockenbauch U, Connolly M, Tillet A, Watson S, Liu B, Tribe RM. A role for voltage-gated, but not Ca²⁺-activated, K⁺ channels

in regulating spontaneous contractile activity in myometrium from virgin and pregnant rats. *Br J Pharmacol.* 2006;147:815–824.

31. Lorca RA, Prabakaran M, England SK. Functional insights into modulation of BKCa channel activity to alter myometrial contractility. *Front Physiol.* 2014;31:1–12.

32. Villar A, D'Ocon MP, Anselmi E. Relaxant effects of sulfonylureas on induced contractions of rat uterine smooth muscle: role of intracellular calcium. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1986 Feb;279(2):248-57. PMID: 3083796.

33. Yoshitake K, Hirano K, Kanaide H. Effects of glibenclamide on cytosolic calcium concentrations and on contraction of the rabbit aorta. *Br J Pharmacol.* 1991 Jan;102(1):113-8. doi: 10.1111/j.1476-5381.1991.tb12141.x. PMID: 1904292; PMCID: PMC1917894

34. Villar A, Ivora MD, D'Ocon MP, Anselmi E. Effects of sulphonylureas on spontaneous motility and induced contractions in rat isolated uterus. *J Pharm Pharmacol.* 1986 Oct;38(10):778-80. doi: 10.1111/j.2042-7158.1986.tb04493.x. PMID: 2879004.

35. D'Ocón MP, Anselmi E, Villar A. Intervención del Ca intracelular en la acción relajante ejercida por las sulfonilureas sobre la musculatura lisa uterina [Role of intracellular Ca in the relaxant action exerted by sulfonylureas on uterine smooth muscle]. *Arch Farmacol Toxicol.* 1986 Aug-Dec;12(2-3):119-24. Spanish. PMID: 3619499.

36. Sawada K, Morishige K, Hashimoto K, Tasaka K, Kurachi H, Murata Y, Kurachi Y. Gestational change of K⁺ channel opener effect is correlated with the expression of uterine KATP channel subunits. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005 Sep 1;122(1):49-56. doi: 10.1016/j.ejogrb.2004.11.026. PMID: 16154039.

37. Morrison JJ, Ashford ML, Khan RN, Smith SK. The effects of potassium channel openers on isolated pregnant human myometrium before and after the onset of labor: potential for tocolysis. *Am J Obstet Gynecol* 1993;169:1277–85.
38. Piper I, Minshall E, Downing SJ, Hollingsworth M, Sadraei H. Effects of several potassium channel openers and glibenclamide on the uterus of the rat. *Br J Pharmacol* 1990;101:901–7
39. Cheuk JM, Hollingsworth M, Hughes SJ, Piper IT, Maresh MJ. Inhibition of contractions of the isolated human myometrium by potassium channel openers. *Am J Obstet Gynecol* 1993;168:953–60