

ОГЛЯДИ

УДК 577.352.5

ОКСИД АЗОТУ ЯК РЕГУЛЯТОР ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОГО КАЛЬЦІЄВОГО ГОМЕОСТАЗУ В МІОЦИТАХ МАТКИ

Ю. В. ДАНИЛОВИЧ

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: danylovych@biochem.kiev.ua

Проаналізовано літературні дані щодо механізмів і регуляції пасивного та активного транспорту Ca^{2+} в міомерії. Особливу увагу приділено cGMP-залежним та незалежним шляхам дії оксиду азоту (NO) або його похідних на внутрішньоклітинний Ca^{2+} -гомеостаз гладенького м'яза матки та її скоротливу активність. У порівняльному аспекті наведені відомості стосовно впливу NO на Ca^{2+} -транспортувальні системи інших типів гладеньких м'язів. На основі власних експериментальних результатів та даних літератури запропоновано схему дії NO в міомерії, згідно з якою NO або його похідні спричинюють Ca^{2+} -залежну поляризацію сарколеми. Як свідчать наші результати, в основі цього ефекту може лежати зростання проникності сарколеми для Ca^{2+} за дії NO або його похідних та стимуляція, принаймні початкова, пасивного транспорту катіона у міоцити крізь дигідропіридинчутливі канали. Додатковими факторами, які сприяють поляризації мембрани, можуть бути посилення транспорту протонів із міоцитів та стимуляція Na^+, K^+ -АТФ-ази. Діючи на саркоплазматичний ретикулум, нітрозактивні сполуки посилюють енергозалежне включення кальцію в цей компартмент та пригнічують Ca^{2+} -індуковане вивільнення катіона. Останні ефекти здатні забезпечити компенсацію NO-індукованого надходження Ca^{2+} в міоцити та пригнічувати електромеханічне спряження на етапі вивільнення Ca^{2+} з ретикулума. Похідні NO також інгібують ключову ланку запуску контрактильного акту в гладенькому м'язі – формування комплексу Ca^{2+} -кальмодулін.

Ключові слова: оксид азоту, кальцій, гладенькі м'язи, міомерії, електромеханічне спряження.

Гладеньким м'язам належить першочергова роль у підтриманні нормального функціонування організму в зв'язку із забезпеченням скоротливої активності внутрішніх органів [1, 2]. Оскільки однією з головних причин смертності в країнах Європи і Північної Америки є серцево-судинні захворювання [3], значну увагу дослідників спрямовано на вивчення біохімії і фізіології кардіоваскулярної системи організму. Проблеми, пов'язані із функціонуванням кишково-шлункового і уrogenітального трактів

вирішуються значно менш інтенсивно. Очевидним наслідком цієї диспропорції є те, що інформація стосовно механізмів і регуляції скоротливої активності гладенького м'яза матки (міомерія) є відносно обмежена [4–6]. У розвинутих країнах передчасні пологи і зрив вагітності обумовлюють до 80% неонатальної смертності, яка не пов'язана із вродженими вадами розвитку [7, 8]. В Україні частота передчасних пологів складає за різними підрахунками від 12 до 46% [9]. Отже, пошук нових препаратів токолітичної дії, тобто речо-

Список умовних скорочень: NO – монооксид азоту; NO^+ – катіон нітрозонію; NO_x – окисли азоту; NPS – нітропрурид натрію; NS ($NaNO_2$) – нітрит натрію; SNAP – S-нітрозно-N-ацетилпенциламін; SIN-1 – 3-морфолінсиндонімін; ГМК – гладеньком'язові клітини; ПМ – плазматична мембрана; СР – саркоплазматичний ретикулум; МХ – мітохондрії; РМСА – кальцієва помпа плазматичної мембрани; SERCA – кальцієва помпа саркоплазматичного ретикулума; NCX – Na^+/Ca^{2+} -обмінник; CICR – calcium induced calcium release, Ca^{2+} -індуковане вивільнення Ca^{2+} ; STOCs – spontaneous transient outward currents; SOCCs – store-operated Ca channels; TRP – transient receptor potential; STIM 1 – stromal interaction molecule 1; Orai 1 – calcium release-activated calcium channel protein 1; PKA – протеїнкіназа А; PKC – протеїнкіназа С; PKG – протеїнкіназа G; PLC – фосфоліпаза С; DAG – діацилгліцерол; IP_3 – інозитол-1,4,5-трифосфат.

вин, які знижують скоротливу активність матки, є вкрай необхідним. Природно, головною умовою цього є докладне вивчення біохімічних механізмів контролю скоротливої активності матки, де вирішальна роль належить іонам кальцію [6].

У зв'язку з тим, що на початку 90-х рр. ХХ ст. було остаточно встановлено домінуюче значення оксиду азоту (NO) в механізмах розслаблення гладеньких м'язів [11], окремі наукові колективи почали вивчати роль NO в регуляції контрактильної активності міометрія. Останні дослідження дозволяють висунути припущення стосовно значення NO в процесах, які попереджають контрактильну відповідь на розтягування стінок матки під час росту ембріона та зменшення чутливості міометрія до утероконстрикторних агентів (за підвищеного рівня прогестерону в тканинах матки). У спеціальній медичній літературі це явище одержало назву прогестеронова блокада [4, 5, 12, 13]. Як продукування NO, так і чутливість до нього знижуються наприкінці вагітності і передують початку пологової активності [4, 5, 14–16]. Донори NO спричиняють релаксацію міометрія як невагітних жінок, так і жінок із різними строками вагітності [17–20]. Відповідне зниження контрактильної здатності гладеньком'язових клітин (ГМК) матки продемонстровано також і для різних видів тварин, у тому числі для шурів та приматів, у різні періоди функціональної активності органа [21–27]. У клінічних дослідженнях продемонстровано, що донор NO – нітрогліцерин – зменшує частоту передчасних пологів [28]. Водночас механізми, за якими NO контролює скоротливу активність міометрія на сьогодні остаточно нез'ясовано. В ГМК судин домінуючим шляхом релаксуючої дії є класичний ланцюг, що призводить до зниження концентрації Ca^{2+} в міоплазмі: активація розчинної гуанілатциклази – зростання вмісту cGMP у клітині – активація протеїнкінази G (PKG) – фосфорилування ефекторних протеїнів, що забезпечує зниження надходження Ca^{2+} в міоплазму і стимулює виведення катіона з клітини та акумуляцію його у внутрішньоклітинних депо [11, 29, 30]. Результати як ранніх, так і пізніших досліджень демонструють залежність ефектів NO в міометрії від зростання рівня cGMP. Роль циклічного нуклеотиду виявлено в експериментах, проведених на міометрії жінок та шурів у різні періоди вагітності [20, 22–25]. Втім, у значній частині робіт ставиться під сумнів класичний механізм реалізації біохімічної активності NO в цій тканині. Зокрема, про-

демонстровано, що NO зумовлює релаксацію міометрія незалежно від cGMP. Значення cGMP поставлено під сумнів у роботах, проведених на міометрії невагітних і вагітних жінок [17–19], приматів [26], шурів [21], мурчаків (морських свинок) [27]. У дослідах на мурчачих донори NO спричиняють релаксацію незалежно від присутності інгібітора розчинної гуанілатциклази – метиленового синього [27]. До того ж необхідна для розслаблення концентрація проникного аналогу cGMP була дуже високою. У міометрії жінок та приматів взагалі не виявлено релаксації за дії аналогів cGMP [17, 26]. Отже, хоча за дії донорів NO і спостерігається зростання вмісту циклічного нуклеотиду в міоплазмі, останнє не є необхідною умовою для фізіологічної відповіді. Альтернативним механізмом дії NO в гладеньких м'язах, зокрема міометрії, може бути безпосередня хімічна модифікація іонних каналів та pomp [4, 31–33], яка веде до зміни їхньої активності і може здійснюватись зокрема таким високореакційноздатним нітрозилуючим похідним NO як катіон нітрозонію (NO^+). Як cGMP-залежні механізми, так і шляхи, зв'язані з прямою модуляцією активності іонтранспортувальних структур лежать в основі регуляції концентрації Ca^{2+} в міоплазмі, зміни якої забезпечують електро(фармако)механічне спряження в гладеньких м'язах [1–2].

Отже, метою роботи було проаналізувати сучасні відомості стосовно функціонування кальційтранспортувальних систем у гладеньких м'язах, передусім міометрія, із залученням власних експериментальних даних та запропонувати можливі шляхи регуляції Ca^{2+} -гомеостазу в гладенькому м'язі матки NO. Значну увагу приділено cGMP-залежним та cGMP-незалежним механізмам дії NO.

Загальна характеристика Ca^{2+} -транспортувальних шляхів у гладеньком'язових клітинах. В основі процесу зростання концентрації іонів кальцію в міоплазмі лежить його пасивний транспорт за концентраційним градієнтом із поза- та внутрішньоклітинних пулів внаслідок взаємоузгодженого функціонування каналних структур сарколеми (плазматичної мембрани, ПМ), саркоплазматичного ретикулума (СР) і, можливо, мітохондрій (МХ) [6, 10, 34–38]. Сьогодні накопичено достатню кількість експериментальних даних, які свідчать про складну часову і просторову картину передачі Ca^{2+} -сигналу (Ca^{2+} -осциляції, Ca^{2+} -хвилі). Результати досліджень із використанням конфокальної мікроскопії та Ca^{2+} -чутливих флуоресцентних

зондів дають підстави говорити про значні локальні зміни концентрації Ca^{2+} в міоплазмі, які можуть забезпечити компартменталізацію Ca^{2+} -залежних подій у клітині (див., наприклад, [33, 36, 39]).

У разі електромеханічного спряження зміни мембранного потенціалу (деполяризація) приводять до активації потенціалзалежних Ca^{2+} -каналів (в різних типах м'язів представлені їхні L- або T-типи). Кальцій, який увійшов у міоплазму за градієнтом концентрації, є причиною так званого « Ca^{2+} -індукованого вивільнення Ca^{2+} » (CICR, calcium induced calcium release) через канали р'анодинового рецептора (чутливі до алколоїду р'анодину). Це вивільнення відбувається в межах локальних регіонів СР, переважно розміщених біля сарколеми, і візуалізується в експериментах із використанням флуоресцентних зондів у вигляді «спарків». Вивільнення іонів Ca^{2+} із периферичних ділянок ретикулума ініціює появу транссарколемних струмів калієвої та хлорної природи (STOCs, spontaneous transient outward currents). У деяких ГМК зокрема, судин, локальні зростання концентрації Ca^{2+} вздовж СР утворюють Ca^{2+} -хвилю [10, 31, 33, 35, 36, 39–41].

За дії на міоцити ацетилхоліну, окситоцину, факторів росту (фармакомеханічне спряження) пасивний транспорт Ca^{2+} з СР індукується IP_3 (інозитол-1,4,5-трифосфатом), який утворюється внаслідок гідролізу фосфатидилінозитол-4,5-дифосфату фосфоліпазою С (PLC, задіяні β - або γ -ізоформи залежно від характеру стимуляції). Вивільнення Ca^{2+} крізь канали р'анодинового і IP_3 -рецепторів – взаємозалежні процеси, крім того вихід катіона з СР регулює його транспорт у сарколемі [36, 40–44]. Зростання рівня IP_3 знижує концентрацію Ca^{2+} в люмені СР, що ініціює так званий «пулкерований» вхід катіона в міоплазму [45–47].

Стимуляція агоністами ГМК включає в себе дві фази: швидке зростання концентрації Ca^{2+} в міоплазмі з наступним фосфорилуванням легких ланцюгів міозину та фазою підтримання скорочення, що спостерігається на тлі зниженої концентрації катіона. Зростання концентрації катіона в міоплазмі приводить до утворення його комплексу зі специфічним рецепторним протеїном – кальмодуліном. У подальшому комплекс Ca^{2+} –кальмодулін активує кіназу легких ланцюгів міозину. Ця кіназа безпосередньо фосфорилує регуляторні легкі ланцюги (маса ≈ 20 кДа), наслідком чого є взаємодія важких ланцюгів з актином із по-

дальшим запуском стрикції. Зворотній процес дефосфорилування здійснює фосфатаза легких ланцюгів міозину [6, 48, 49]. Процес дефосфорилування додатково регулюється Rho-кіназою, яка пригнічує фосфатазну активність шляхом фосфорилування ензиму за залишками тирозину. Зазначений процес може ініціюватись агоністами, рецептори яких спряжені з малим G-протеїном RhoA [50, 51]. Останнє зумовлює додаткову активацію актин-міозинової машини, що лежить в основі явища кальцієвої сенситизації – розвитку скорочення більшого, ніж це зумовлено відповідним підвищенням концентрації Ca^{2+} в міоплазмі.

Зниження концентрації Ca^{2+} в міоплазмі обумовлене процесами енергозалежного транспорту катіона, де задіяні іонні помпи та обмінники ПМ, СР і МХ [6, 10, 34–37, 52]. Сарколема містить Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азу (PMCA) та $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник (NCX) – переносник, який працює за рахунок енергії градієнта Na^+ . На рівні СР локалізована ще одна транспортна Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-аза (SERCA-помпа) [10, 34, 35, 44]. В МХ розташований Ca^{2+} -уніпортер, який транспортує Ca^{2+} в матрикс за електрофоретичним механізмом [52–54]. Зазначені системи працюють взаємоузгоджено, зокрема вивільнення катіона з ретикулума може бути компенсоване його накопиченням у МХ, а транспорт катіона в МХ може регулювати функціонування Ca^{2+} -каналів сарколеми і СР. Наприклад, посилення акумуляції Ca^{2+} в МХ може стимулювати його вивільнення через канали IP_3 -рецептора СР [36, 54, 55]. Вищезазначені Ca^{2+} -транспортувальні системи гладеньких м'язів зазначено на схемі (рис. 1).

Отже, зростання концентрації Ca^{2+} в міоплазмі є першою і основною умовою розвитку констрикції. Другою умовою є утворення комплексу Ca^{2+} –кальмодулін із подальшою активацією контрактильного апарату. Відповідно до цього системи підтримання Ca^{2+} -гомеостазу разом із протеїнами, які контролюють взаємодію актину з міозином, мають бути основними мішенями дії NO як міорелаксуючого фактора. На рівні сарколеми NO може знижувати провідність Ca^{2+} -каналів або стимулювати PMCA та NCX. Не менш важливим є вірогідна активація K^+ -каналів, яка супроводжується гіперполяризацією мембрани з відповідним інгібуванням транспорту Ca^{2+} через потенціалкеровані канали. У СР NO може знижувати ефективність вивільнення катіона через канали р'анодинового та IP_3 -рецепторів, а також стимулювати роботу SERCA-помпи. Вплив на МХ, окрім безпосередньої зміни їхньої Ca^{2+} -акумуляуючої

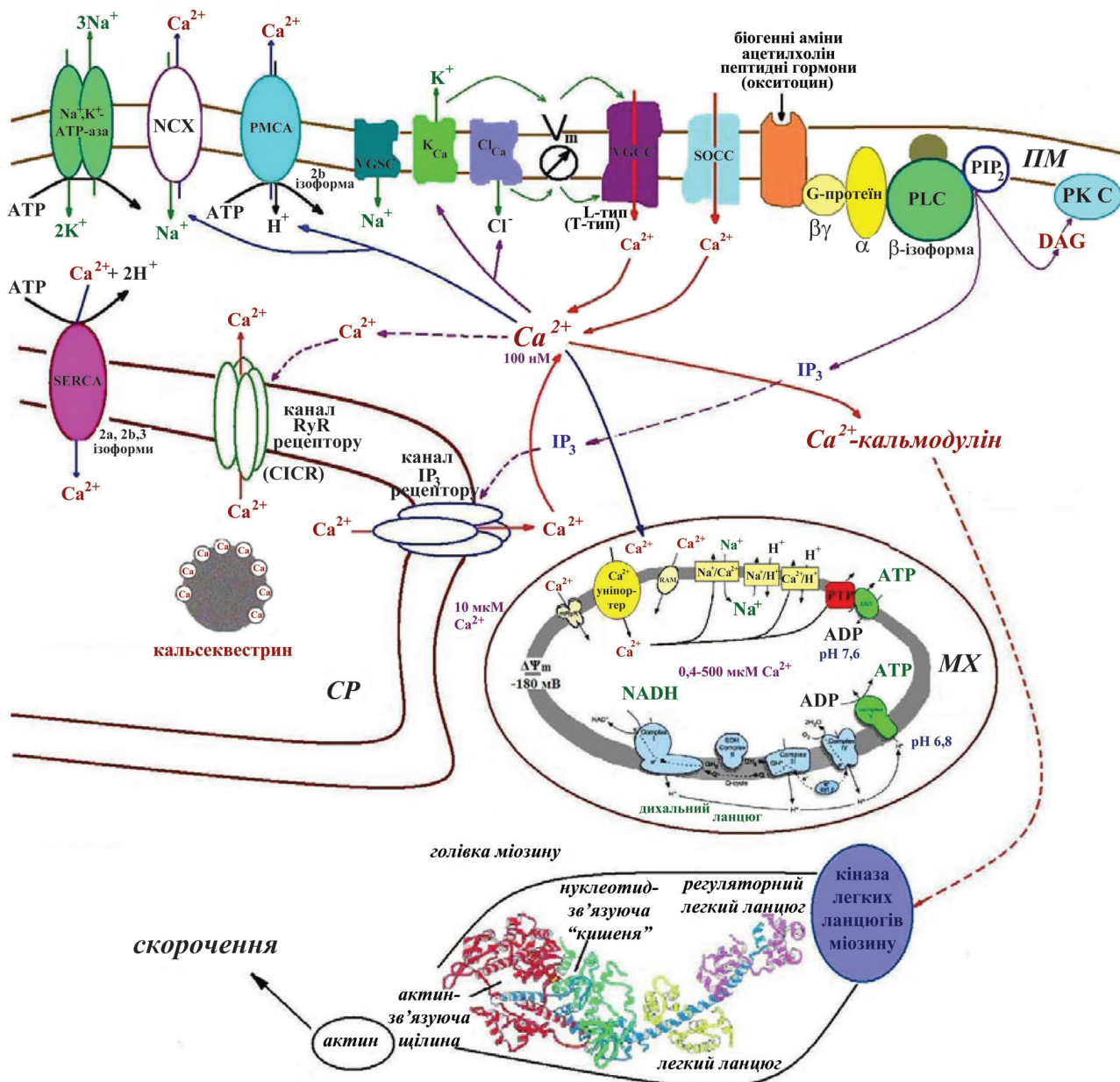


Рис. 1. *PMCA* – кальцієва помпа плазматичної мембрани, *SERCA* – кальцієва помпа саркоплазматичного ретикулула, *VGCC* – потенціалкеровані (воротні) кальцієві канали, *SOCC* – депокеровані кальцієві канали, *VGSC* – потенціалкеровані (воротні) натрієві канали, *PKC* – протеїнкіназа С, *PLC* – фосфоліпаза С, *PIP₂* – фосфатидилінозитол-4,5-дифосфат, *IP₃* – інозитом-1,4,5-трисфосфат, *DAG* – діацилгліцерол, *K_{Ca}* – Ca^{2+} -залежні калієві канали, K^+ -калієві канали, Cl_{Ca} – Ca^{2+} -залежні хлорні канали, *CICR* – кальційіндуковане вивільнення кальцію, *NCX* – Na^+/Ca^{2+} -обмінник. Вказані ізоформи протеїнів характерні для міометрії

здатності, обумовить модулювання енергетичного забезпечення міоцитів, а отже і функціонування всіх АТФ-залежних транспортувальних систем. Нарешті, доцільно припустити вплив NO на процес утворення комплексу Ca^{2+} –кальмодулін, пригнічення активності кінази та стимуляцію фосфатази

легких ланцюгів міозину. Відповідно до наведених міркувань нижче ми акцентуємо увагу на ролі NO в підтриманні Ca^{2+} -гомеостазу гладеньких м'язів, передусім міометрія, в зв'язку з їхньою функціональною активністю.

Системи потенціалкерованого пасивного транспорту Ca^{2+} в сарколемі та дія на них

NO. Потенціал спокою клітин міометрія становить від -35 до -80 мВ і сягає більш негативних значень під час вагітності [56]. Збудливість міоцитів матки, як й інших електрозбудливих тканин, забезпечується каналопосередкованим рухом іонів Ca^{2+} , Na^+ , Cl^- із позаклітинного середовища в міоплазму за градієнтом концентрації і протилежно спрямованим транспортом K^+ [6, 56]. Ключову роль у забезпеченні потенціалу спокою відіграють Ca^{2+} -залежні K^+ -канали [57, 58]. На відміну від інших ГМК у міометрії істотну роль у виникненні і розповсюдженні потенціалу дії відіграють не лише кальцієві, але і натрієві канали, експресія і функціональна активність яких зареєстровані як у жіночому міометрії, так і в шурів у різні функціональні періоди [59, 60]. Домінуючим типом потенціалкерованих Ca^{2+} -каналів у міометрії є дигідропіридинчутливі канали L-типу, які відкриваються за досягнення рівня деполяризації приблизно -40 мВ та обумовлюють тривале і масоване надходження катіона в міоцити, що забезпечує виконання ним месенджерної функції [10, 56]. Передбачається, що саме ці структури забезпечують міогенну контрактильну активність матки. У міометрії представлені також ізоформи і сплайс-варіанти каналів T-типу, які активуються у разі негативних потенціалів, характеризуються прискореною кінетикою і виявляють порівняно вищу провідність, ніж канали L-типу [61, 62]. Припускають, що початкова деполяризація обумовлює активацію T-каналів, що забезпечує зміну потенціалу, достатню для відкриття L-каналів [6].

Механізми, які можуть забезпечити тривале зниження концентрації Ca^{2+} в міоплазмі за дії NO або його похідних не завжди зводяться до безпосереднього блокування надходження катіона в міоцити, вивільнення його із внутрішньоклітинних пулів або стимуляції енергозалежних Ca^{2+} -транспортувальних систем. В ГМК матки мурчаків донори NO зумовлювали початкове зростання концентрації Ca^{2+} в міоплазмі [63]. Цей ефект пояснюється авторами стимуляцією звільнення катіона із CP [4, 63]. В експериментах, проведених на міометрії шурів, нами демонструвалася стимуляція пасивного транспорту Ca^{2+} в міоцити за дії нітриту (NS) та нітропрусиду натрію (NPS) в умовах калієвої деполяризації [64] (рис. 2). Останнє спостереження узгоджується із фактом зростання проникності сарколеми для катіона під впливом нітрозактивних сполук [65]. У зазначених дослідженнях діючою речовиною може

виступати не сам NO, а його редокс-форми, насамперед NO^+ , оскільки використані як донори SNAP (S-нітрузо-N-ацетилпеніциламін) [63] та NPS [64] здатні продукувати катіон нітрозонію [33, 63], водночас інший донор SIN-1 (3-морфоліносиндонімін), який продукує саме NO, не спричинював зростання концентрації Ca^{2+} і не зумовлював релаксацію, хоча і приводив до підвищення рівня cGMP в міоцитах [63]. Подібну дію донорів NO продемонстровано також у дослідях, проведених на ГМК повітроносних шляхів [66]. Цікаво, що зростання проникності сарколеми до Ca^{2+} та стимуляція його транспорту в міоцити спостерігається також і за дії NS [64, 65]. Нітрит-аніони продукують NO переважно в кислому середовищі, але здатні утворювати NO та його редокс-похідні також і у присутності гемових груп та залізо-сірчаних комплексів [67]. Передбачається, що наслідком підвищення концентрації катіона, насамперед в субсарколемному регіоні, є активація Ca^{2+} -залежних K^+ -каналів, відповідне зниження рівня деполяризації ПМ і зменшення провідності потенціалкерованих Ca^{2+} -каналів, передусім L-типу [4]. Ще одним можливим шляхом підвищення концентрації Ca^{2+} в міоплазмі є посилення транспорту катіона із CP внаслідок зростання рівня cADP-рибози за дії NO. Цей ендогенний активатор вивільнення Ca^{2+} синтезується за участю ADP-рибозилциклази, ензиму асоційованого із кавеолами клітин міометрія і здатного до стимуляції S-нітрозилуванням. Припускають, що векторне вивільнення Ca^{2+} з CP у напрямку сарколеми є необхідною умовою зниження збудливості і скорочення міометрія [10]. Взагалі важко уявити, що у фізіологічних умовах будь-який ендогенний фактор релаксації ГМК призводить до тотального, незворотного і тривалого зниження концентрації Ca^{2+} в міоплазмі. Це знаходиться у протиріччі з добре відомою залежністю ключових ферментів основних метаболічних шляхів від Ca^{2+} . Наведені міркування особливо стосуються міометрія, який значний час протягом вагітності виявляє знижену здатність до констрикції. Логічніше припустити, що за цих умов мають місце тривалі процеси зменшення збудливості сарколеми, десенситизації протеїнів контрактильного апарату, зміни активності або експресії асоційованих із ними регуляторних кіназ/фосфатаз тощо. Стосовно регуляції міорелаксантами, зокрема NO, процесів Ca^{2+} -сигналізації необхідно припустити складнішу і динамічнішу картину, аніж про-

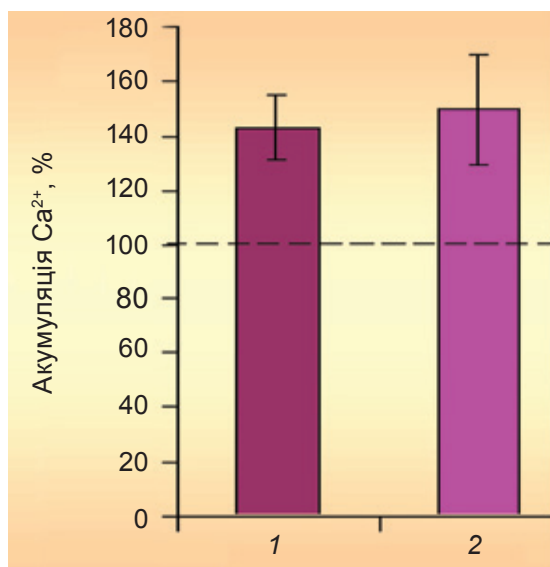


Рис. 2. Дія 0,1 мМ NPS (стовпчик 1) та 10 нМ NS (стовпчик 2) на активований K^+ -деполяризацією вхід Ca^{2+} в міоцити матки щурів. За 100% прийнято рівень акумуляції $^{45}Ca^{2+}$ клітинами за додавання 40 мМ KCl. Транспортний процес зупинили через 30 с ($M \pm m$, $n = 5$)

сте збільшення—зменшення загального рівня іонів кальцію в цитоплазмі, яка би включала тісний функціональний взаємозв'язок між транспортними системами ПМ, СР і МХ, а також допускала можливість просторового і в часі обмеженого підвищення концентрації Ca^{2+} в міоплазмі.

На відміну від матки в серцево-судинній системі роль NO в регуляції проникності ПМ для іонів Ca^{2+} досліджується інтенсивніше (див., наприклад, оглядові роботи [31, 32, 68]). Оксид азоту чинить подвійну дію на Ca^{2+} -канали L-типу в кардіоміоцитах правого шлуночка тхора [69]. cGMP-залежний ефект, який відтворюється із використанням 8-Br-cGMP (аналог cGMP, який не зазнає гідролізу), виявився інгібіторним, тоді як безпосередній вплив NO або його похідних на каналні структури веде до їхньої активації. Слід зазначити, що в цитованій роботі [69] стимулюючий ефект досягався в разі застосування нітрозотіолів, які здатні продукувати NO^+ . Причому їх дія не залежала від функціонування Ca^{2+} -транспортувальних систем СР, активації кіназ, інгібування фосфатаз та змін рівня cGMP. Біохімічним механізмом активації Ca^{2+} -каналів може бути їхнє S-нітрозилювання, оскільки протектор тіольних залишків дитіотреїтол перешкодив активації [69]. S-нітрозилювання α -субодиниці каналів

пов'язують з ішемічним прекодиціюванням і розглядають як протекторний механізм щодо реперфузійного пошкодження, однак гіпернітрозилювання призводить до виникнення фібриляції та аритмії передсердя [32]. Протилежні результати одержані в експресійній системі клітин ембріональної нирки людини (НЕК293). Продемонстровано, що S-нітрозотіоли cGMP-незалежним чином інгібували Ca^{2+} -струм крізь субодиниці Ca^{2+} -каналів L-типу кардіоміоцитів [70]. В серцевому, як і в гладенькому м'язі, ендотеліальна NO-синтаза (3 типу) розташована в кавеолах сарколеми, що забезпечує її локалізацію в безпосередній близькості із Ca^{2+} -каналами [71]. У ГМК артерій мозку потенціалзалежні кальцієві канали ПМ блокуються NPS значно ефективніше, ніж аргініном (субстратом NO-синтази). За дії NPS посилюються K_{Ca} -струми, що є причиною гіперполяризації ПМ. Обидва ефекти відтворюються під впливом 8-Br-cGMP [72]. Нітрозоглутатіон в експресійній системі НЕК293 ефективно пригнічував провідність Ca^{2+} -каналів ГМК L-типу, причому автори припускають, що в основі цього ефекту лежить нітрозилювання сульфгідрильних груп, важливих для функціонування каналів [73].

Дані про вплив NO на Ca^{2+} -канали ПМ нем'язових тканин також суперечливі. Показано, що NPS пригнічував транзйентну і стаціонарну компоненти вископорогового кальцієвого струму в нейронах черевного ганглія птахів [74]. L-Аргінін виявляв аналогічний ефект на цій самій моделі, який усувався блокаторами NO-синтази. З іншого боку, в нейронах кори головного мозку мишей NO індукує вхід Ca^{2+} крізь канали L- і P-типу, але інгібує канали N-типу [75]. NPS і SNAP збільшують амплітуду Ca^{2+} -струму в нейронах шийного ганглія щурів [76]. На ізольованих хромафінних клітинах надниркових залоз бика показано, що L-аргінін і NPS незначно підвищують вхід Ca^{2+} у клітину, причому відомі блокатори Ca^{2+} -струму верапаміл і дилтіазем не впливають на цей процес. Інгібування NO-синтази знімає ефект L-аргініну, водночас вхід Ca^{2+} , індукований ацетилхоліном, підсилюється NPS [77].

Таким чином, в міометрії NO або його похідні здатні підвищувати пасивну проникність сарколеми для Ca^{2+} і стимулювати його транспорт у міоцити, що може приводити до принаймні початкового зростання концентрації катіона в міоплазмі субсарколемного регіону. Подібні результати спостерігались також в окремих дослідженнях, проведених на кардіоміоцитах та нервовій тканині.

Пасивний транспорт Ca^{2+} із саркоплазматичного ретикулула гладеньком'язових клітин та його зміни під впливом NO. Тригерний вхід Ca^{2+} з позаклітинного середовища або дія специфічних агоністів міометрія, рецептори яких спряжені із PLC β через систему гетеротримерних G-протеїнів, призводить до вивільнення акумульованого в СР катіона. СР ГМК матки займає $\approx 6\%$ загального клітинного об'єму і являє собою неперервну систему мембранних тубул і цистерн. Розрізняють ділянки СР, локалізовані в субсарколемному регіоні в тісному контакті із ПМ і ті, які розташовані поблизу ядра [78, 79]. Згідно з «буферною» моделлю інтеграції Ca^{2+} -пулів у ГМК, ділянки периферичного ретикулула акумулюють катіон, який надходить із позаклітинного середовища одночасно, як вже згадувалося нами раніше, забезпечуючи його «векторний» транспорт до ПМ. Водночас ділянки СР, розташовані в глибині міоцита, забезпечують надходження Ca^{2+} до контрактильного апарату [80]. Окрім того, передбачається наявність локальних ділянок кластеризованих ріанодинових та IP_3 -рецепторів, які виконують специфічну сигнальну роль [81]. Подібна функціональна відмінність різних регіонів ретикулула передбачається і для клітин міометрія [78, 79]. Об'єм СР зростає під час вагітності, що переконливо свідчить про його фізіологічну значущість [78].

У міометрії знайдено і працюють принаймні в досліджах *in vitro* всі Ca^{2+} -транспортувальні системи, характерні для ГМК, хоча і відмічаються певні специфічні особливості. Домінуюче значення для розвитку Ca^{2+} -сигналу в ГМК матки відіграє IP_3 -залежне вивільнення Ca^{2+} [6, 82]. У міометрії знайдено три відомі ізоформи каналів IP_3 -рецептора [83]. Зокрема, окситоцин спричинює гідроліз фосфоінозитидів в ГМК жіночої матки шляхом активації $\text{G}\alpha_q$ та $\text{G}\alpha_{11}$ субодиниць гетеротримерних G-протеїнів з подальшим утворенням IP_3 і вивільненням Ca^{2+} із СР [84]. Значення другого вторинного месенджера — діацилгліцеролу (ДАГ) — в міометрії достеменно нез'ясовано, хоча передбачається, що він забезпечує інтерналізацію і деградацію рецепторів окситоцину, а також знижує рівень транскрипції їхньої мРНК. Існує думка, що останні функції зумовлюються ДАГ-залежною активацією класичних та нових ізоформ РКС [6, 85].

Можливість експресії і функціональна активність каналів ріанодинового рецептора в міометрії також доведено [86–88]. Більше

того, візуалізація СР із використанням лазерної конфокальної мікроскопії в міометрії здійснюється за допомогою флуоресцентних похідних ріанодину [79, 82]. У свавців ідентифіковано 3 гени, які кодують скелетну (1), серцеву (2) та мозкову (3) ізоформи ріанодинового рецептора, для всіх ізоформ характерний альтернативний сплайсинг. Ріанодиновий рецептор — канал з кількома рівнями провідності для Ca^{2+} , здатний активуватися Ca^{2+} , сADP-рибозою (фізіологічні активатори), кофеїном та місцевими анестетиками. У більшості ГМК присутній Ca^{2+} -канал, за характеристиками подібний 1- та 2-й ізоформам. Мозкова ізоформа зв'язує ріанодин, але не активується кофеїном. Серцева ізоформа чутливіша (порівняно зі скелетною) до активаторної дії Ca^{2+} у низьких концентраціях, але менш чутлива до інгібуючої дії Ca^{2+} у високих концентраціях, Mg^{2+} та рутенієвого червоного, виявляє більшу спорідненість до ріанодину [41, 44]. Всі три ізоформи ріанодинового рецептора ідентифіковані в міометрії [86–88]. З іншого боку, характерною особливістю міометрія є відсутність кофеїнової контрактури (скоротливої активності, зумовленої аплікацією кофеїну), що доведено численними фізіологічними дослідженнями [37, 44, 82]. У низці робіт демонструється також, що кофеїн нездатний стимулювати вивільнення Ca^{2+} із внутрішньоклітинних пулів у міометрії людини та щурів [37, 44]. Аплікація кофеїну до нативних ГМК може спричинювати зниження концентрації Ca^{2+} в міоплазмі, що можна пояснити інгібіторною дією кофеїну на фосфодієстеразу циклічних нуклеотидів; відповідне зростання рівня сGMP і сAMP буде стимулювати акумуляцію Ca^{2+} в СР і енергозалежний транспорт катіона РМСА [89]. Одночасно з цим, існує масив протилежних даних. Зокрема, в хімічно скінованих міоцитах із матки вагітних жінок, кофеїн стимулював пасивне вивільнення Ca^{2+} [90]. Аналіз мРНК у смужках міометрія вагітних щурів демонструє наявність усіх трьох ізоформ ріанодинового рецептора в міоцитах, але переважає мозкова ізоформа [87, 91]. Подальші дослідження змін концентрації Ca^{2+} в міоплазмі з використанням флуоресцентних зондів виявили існування чутливих до ріанодину/кофеїну пулів СР у 30% досліджених міоцитів [87]. Автори [91] припустили наявність варіантів альтернативного сплайсингу мозкової ізоформи, яка є чутливою до кофеїну. В іншій роботі [86] доведено наявність лише мозкової ізоформи в матці невагітних щурів. Активація цієї

ізоформи кофеїном і відповідне зростання концентрації Ca^{2+} у міоплазмі стає можливим в умовах попереднього навантаження СР катіоном. На думку дослідників [86], альтернативним поясненням чутливості СР до кофеїну в цьому разі є експресія 1- та 2-ї ізоформ ріанодинового рецептора. У жіночому міометрії мозкова ізоформа виявилась постійно експресованою, тоді як 2-а ізоформа експресувалась за умови вагітності. В останньому разі кофеїн спричинював вивільнення попередньо акумульованого Ca^{2+} із СР [88]. Автори цієї роботи пояснюють посилення експресії 2-ї ізоформи зростанням рівня цитокінів і ростових факторів у матці, а також відповідних рецепторів на міоцитах, в першу чергу, трансформуючого ростового фактора β , що є наслідком специфічного гормонального статусу за вагітності. Нарешті наводяться докази того, що в міометрії миші експресується не функціональний сплайс-варіант мозкової ізоформи, який до того ж здатний інгібувати 2-у ізоформу [92]. У дослідях, проведених нами на суспензії пермеабілізованих клітин міометрія естрогенізованих невагітних шурів, було продемонстровано, що пасивне вивільнення Ca^{2+} із СР, попередньо акумульованого в енергозалежному процесі, активувалося ріанодиноом, лідокаїном, низькими концентраціями іонів кальцію і пригнічувалося іонами магнію та Ca^{2+} у високих концентраціях [93].

Питання стосовно ідентифікації спаркової активності та встановлення феномену Ca^{2+} -хвиль у міометрії залишаються відкритими. Хоча в культурі міоцитів жіночої матки демонструються Ca^{2+} -хвилі, опосередковані функціональною активністю СР (CICR або/і IP_3 -індуковане вивільнення Ca^{2+}) [94], в міометрії як вагітних, так і невагітних шурів [95] та мишей [86] спарки не спостерігались. Водночас в окремих експериментах спостерігались STOCs [79]. Одним із можливих пояснень невдалих експериментів із виявлення спаркової активності може бути недостатня кластеризація Ca^{2+} -каналів ріанодинового рецептора [79]. Отже, хоча структури, які забезпечують Ca^{2+} -індуковане вивільнення Ca^{2+} в міометрії присутні, і сама можливість цього явища продемонстрована в дослідях *in vitro*, його фізіологічне значення остаточно нез'ясоване. У зв'язку з цим зазначимо, що в дослідях, проведених на суспензії свіжовиділених пермеабілізованих міоцитів невагітних шурів нами показано, що NPS та NS пригнічували Ca^{2+} -залежне вивільнення Ca^{2+} із СР [96]. В роботах інших авторів демонструється,

що нітрозилування сульфгідрильних груп ріанодинового рецептора NO можливе в серцевому і скелетному м'язах, а напрямок впливу (активація чи інгібування) значною мірою залежить від концентрації донорів NO [32]. В експериментах, проведених на інтактних міоцитах артерій мурчаків показано, що NPS інгібував норадреналінактивоване зростання концентрації Ca^{2+} в міоплазмі, причому ефект був незалежним від cGMP і супроводжувався зниженням спаркової активності [33]. В ГМК трахеї свині NO також пригнічує вивільнення Ca^{2+} із СР через канали ріанодинового рецептора [97]. Наведені результати не підтверджують гіпотезу про те, що в ГМК судин, повітроносних шляхів і, можливо, матки [4, 63, 67, 98] NO або його похідні стимулюють вивільнення Ca^{2+} із СР, приводячи до активації Ca^{2+} -залежних K^+ -каналів. Роль NO, як ми припускаємо, може полягати у пригніченні біохімічних процесів спряження між входом Ca^{2+} із позаклітинного середовища і його вивільненням із СР. Отже, хоча експериментально доведено можливість зростання проникності та посилення пасивного транспорту Ca^{2+} в сарколемі міометрія за дії NO [64, 65], це, вірогідно, не спричинить вивільнення Ca^{2+} з СР.

Пулкерований транспорт Ca^{2+} крізь сарколему. Можливість його регуляції нітрозактивними сполуками. Використання агентів, які спустошують Ca^{2+} -пул СР або шляхом інгібування SERCA-помпи (тапсигаргін, циклопіазонієва кислота), або стимуляцією пасивного транспорту катіона із СР через збільшення цитозольного рівня IP_3 (окситоцин), спричинює зростання концентрації Ca^{2+} в міоплазмі клітин міометрія і відповідно розвиток скорочення [47, 82]. Було доведено, що це зростання обумовлене транспортом Ca^{2+} з позаклітинного середовища крізь так звані SOCCs-канали (store-operated Ca channels), які, як припускають, утворені протеїнами родини TRP (transient receptor potential) [82, 99, 100]. Втім є докази того, що пулкерований транспорт Ca^{2+} обумовлений функціонуванням двох протеїнових структур: STIM 1 (stromal interection molecule 1) та Orai 1 (calcium release-activated calcium channel protein 1), перший з яких є Ca^{2+} -зв'язувальним протеїном – сенсором спустошення СР люмену, а другий формує, власне, каналну структуру [31, 82]. Зазначені протеїни знайдено в ГМК повітроносних шляхів [101] та міометрії вагітних жінок [102]. Вірогідно, що між обома структурами існує морфологічний зв'язок [31]. Продемонстрована частково видоспецифічна експресія різних

TRP (TRP 1–7) в міометрії жінки та ГМК матки шурів [82, 99]. Фізіологічне значення пулкерowanego Ca²⁺ входу може посилюватися наприкінці вагітності. Наводяться докази того, що в цей період зростає експресія окремих ізоформ TRP та зростає роль SOCCs [82]. Саме цей варіант Ca²⁺-сигналіngu, вірогідно, обумовлює дію окситоцину в міометрії шурів на пізній стадії вагітності, водночас у невагітних тварин домінує шлях, опосередкований потенціалкерowanymi Ca²⁺-каналами [82]. Інтерлейкін-1β, вміст якого в тканинах матки зростає наприкінці вагітності, підвищує експресію TRP 3 в міометрії жінок та посилює пулкерований Ca²⁺-транспорт [103]. На цьому самому об'єкті показано, що механічне розтягування ГМК стимулює синтез TRP 3 і відповідне надходження Ca²⁺ в міоцити [104].

У зв'язку з можливим функціональним значенням пулкерowanego Ca²⁺-входу в механізмах запуску скоротливої активності міометрія під час пологів важливим є дослідження ролі NO в цьому процесі. На моделі суспезії свіжовиділених міоцитів матки шурів нами продемонстровано, що пасивний транспорт Ca²⁺ із позаклітинного середовища в міоплазму, індукований додаванням тапсигаргину, ефективно пригнічується мікромолярними концентраціями лантану, але є нечутливим до ніфедипіну, що дозволяє ідентифікувати його як такий, що обумовлений пулкерowanymi Ca²⁺-каналами. Досліджуваний транспортний процес пригнічується NPS [64]. Оскільки використаний донор NO, як зазначалося, стимулює транспорт Ca²⁺ в умовах калієвої деполяризації, припускаємо, що напрямок впливу NO залежить від конкретних механізмів надходження Ca²⁺ в міоцити. У дослідях, проведених на препаратах ГМК аорти кроля, миші та бичачої легеневої артерії продемонстровано, що NO здатний спричинювати релаксацію шляхом інгібування пулкерowanego входу Ca²⁺ через сGMP-незалежну стимуляцію SERCA-помпи і відповідне блокування процесу спустошення CP-пулу спричиненого агоністами, які стимулюють фосфоліпазу C (PLC) [105, 106]. В ГМК судин клітинної лінії A7r5 демонструється інгібування тапсигаргініндукованого транспорту Ca²⁺ під дією NO, але передбачається, що воно здійснюється за сGMP/PKG-залежним механізмом [107]. Показано, що NPS пригнічує неселективний пулактивований катіонний струм в відхідниково-кутрикових ГМК миші, причому ефект також виявився сGMP-залежним [108]. Шляхом сGMP-залежної активації транспортування Ca²⁺ в

CP NO також інгібує ємнісний Ca²⁺-вхід у клітинах судинного ендотелію [109]. Цікавим є факт стимуляції NS пулкерowanego Ca²⁺-входу в міометрії [64]. Останнє підтверджує думку про те, що різні похідні NO можуть виявляти відмінну функціональну активність. Це має неабияке значення в ситуації, яка сприяє генерації широкого спектра сполук із різним ступенем окислення азоту, наприклад, в умовах нітрозативного/оксидативного стресів.

Згідно з нашими експериментальними результатами [64, 65] напрямок впливу NO або його похідних на пасивний транспорт Ca²⁺ в клітини міометрія залежить від того, яким чином ініціювалось надходження катіона в міоцити (калієва деполяризація, обробка тапсигаргінном). Можна зробити припущення про залежність дії NO від функціонального стану самої тканини, що забезпечує релаксацію за різними, хоча і зв'язаними із Ca²⁺-сигналіngом механізмами.

Енергозалежний транспорт Ca²⁺ на рівні плазматичної мембрани і його зміни за дії донорів NO. Необхідною умовою розслаблення гладенького м'яза матки є зниження концентрації Ca²⁺ в міоплазмі. Як було зазначено, це досягається через функціонування систем енергозалежного транспорту, локалізованих переважно на рівні ПМ та CP. Потужні системи енергозалежного транспорту катіона зосереджені на рівні сарколеми і в ГМК, зокрема міометрії, представлені РМСА та NCX [110]. РМСА застосовує енергію гідролізу однієї молекули АТР для забезпечення транспортування Ca²⁺ із міоплазми проти градієнта концентрації. Одночасно транспортується в протилежному напрямку один іон водню, що дозволяє розглядати РМСА як електрогенну систему [34, 52, 111]. Функціонування помпи забезпечує компенсацію пасивного транспорту Ca²⁺ в міоцити в спокої та зниження концентрації катіона в міоплазмі після м'язового скорочення [112, 113]. В експериментальних роботах, проведених на міометрії шурів, наводяться докази того, що до 70% Ca²⁺ після транз'єнтного зростання його концентрації в міоплазмі виводиться із клітини за участю РМСА [114]. Електрогенність РМСА може бути додатковим фактором забезпечення потенціалу спокою на ПМ, а транспорт Н⁺ із позаклітинного середовища сприяє створенню локальних субсарколемних ділянок зі зниженим рН [6]. Загальнорозповсюдженими є 1- та 4-а ізоформи РМСА, тоді як для міометрія характерна 2b-ізоформа [6, 110]. РМСА як АТР-аза Р-типу включає в себе характерні цитоплазматичні

ділянки, а саме поліпептидну петлю, яка забезпечує транслокацію Ca^{2+} та містить фосфоліпідчутливий домен, і велику петлю, що має сайти формування проміжного фосфорильованого інтермедіату та для зв'язування АТФ. Унікальною особливістю ензиму, яка відрізняє його від SERCA-помпи, є наявність карбокситермінального цитозольного домену, який містить ділянки регуляторного фосфорилування та кальмодулінзв'язувальний мотив. Останній за відсутності кальмодуліну автоінгібує PMCA через взаємодію із обома цитоплазматичними петлями [114]. Активність помпи тестується в сарколемі міомерія свиней та корів. Її кінетичні та каталітичні характеристики подібні тим, які мають місце в інших гладеньких м'язах [34, 115–118]. Роль тіольних залишків у функціонуванні PMCA, які б були потенційною мішенню сGMP-незалежної дії NO, очевидна з дослідів, проведених з SH-реагентом *n*-хлормеркурібензоатом, який ефективно і необоротно пригнічує ензиматичну активність [118]. Експресія PMCA зростає наприкінці вагітності, що вказує на значення помпи в забезпеченні механізмів пологової активності [119].

NO або його похідні ефективно пригнічують АТФ-азну активність PMCA у фракції сарколеми міомерія свині [120]. Цей ефект був зареєстрований нами за дії 10^{-4} М NPS та 10^{-8} – 10^{-5} М NS і, вочевидь, обумовлювався безпосереднім (сGMP-незалежним) впливом на ензим. Всупереч цьому відносно високі концентрації NS (мілімолярні) спричинювали майже дворазове збільшення ензиматичної активності [120]. Відповідні дані стосовно інших об'єктів вкрай обмежені. У дослідях, проведених на культурі ендотеліальних клітин судин бика, виявлено пригнічення роботи помпи за дії NPS [109]. Зазначений ефект автори пов'язують із підвищенням рівня сGMP. Це припущення суперечить даним, згідно з якими сGMP-залежне фосфорилування стимулює PMCA [121]. Демонструється також необоротне пригнічення помпи пероксинітритом у синапсах мозку щурів [122]. В основі прямого впливу NO на PMCA міомерія може лежати хімічна модифікація функціонально важливих тіольних залишків, оскільки у присутності протекуючого їх агента дитіотреїтолу інгібіторний вплив майже повністю зникає [120] (рис. 3).

Пригнічення PMCA NO або його похідними разом із зростанням проникності сарколеми для Ca^{2+} в ГМК матки за фізіологічних умов здатні спричинювати збільшення концентрації Ca^{2+} в субплазма-

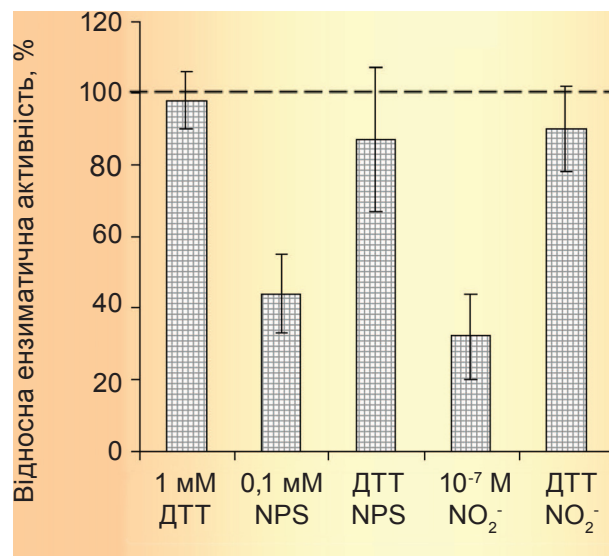


Рис. 3. Інгібіторні ефекти нітрозактивних сполук на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азну активність сарколеми міомерія свині в контролі та у присутності дитіотреїтолу ($M \pm m$, $n = 7-8$)

лемному регіоні міоплазми, що може в подальшому активувати Ca^{2+} -залежні процеси, зокрема, транспорт моновалентних катіонів. Але, як свідчать результати наших досліджень [120], за відносно високих концентрацій нітрозактивних сполук (наприклад, у разі використання NS в концентрації, вищій за 10^{-5} М) PMCA може ефективно транспортувати катіон проти концентраційного градієнта, що захистить міоцити від Ca^{2+} -перевантаження.

Хоча результати окремих експериментів свідчать, що в міомерії після транз'єнту до 30% Ca^{2+} виводиться із клітини за механізмом, пов'язаним із функціонуванням NCX [110, 114], дані щодо особливостей цього обмінника в ГМК матки доволі обмежені. У дослідях, проведених на везикульованій фракції сарколеми продемонстровано, що градієнт Na^+ впливає на транспорт Ca^{2+} , причому Na^+ -залежний транспорт Ca^{2+} характеризується оборотністю і насичуваністю субстратами переносу. На відміну від ГМК інших органів NCX міоцитів матки працює в електронейтральному режимі [34]. Втім, за результатами кінетичних експериментів його потужність поступається тій, яку знайдено в інших об'єктах [34]. Подальші дослідження, спрямовані на з'ясування властивостей та ролі NCX у міомерії, а також можливої регуляції цієї транспортної системи NO, є доволі перспективними принаймні з двох причин. Припускають, що в ГМК матки існує функціональний

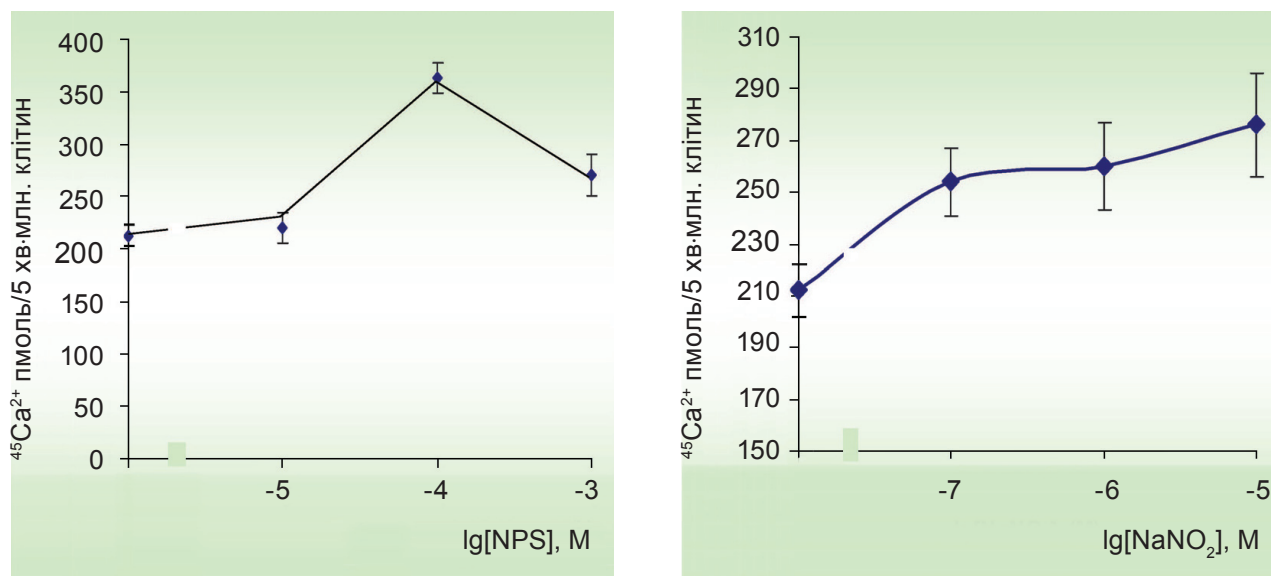


Рис. 4. Енергозалежна акумуляція Ca^{2+} пермеабілізованими міоцитами матки щурів (0,1 мг/мл дигітоніну) у присутності NPS та NS ($M \pm m$, $n = 5$)

зв'язок між периферичним CP і NCX, а саме Ca^{2+} , який вивільнюється із CP, може транспортуватися за межі клітини завдяки роботі обмінника [110]. Окрім того, для ГМК судин наводяться докази можливого sprzęження між окремими видами TRP-каналів, зокрема пул-некерованими, та роботою NCX [31].

Роль SERCA-помпи в механізмах підтримання Ca^{2+} -гомеостазу та модуляція донорами NO енергозалежного транспорту катіона в ретикулум. Енергозалежний транспорт Ca^{2+} в люмен CP здійснюється завдяки функціонуванню SERCA-помпи, яка також належить до родини АТФ-аз Р-типу [123–125]. Гідроліз однієї молекули АТФ sprzęжений з акумуляцією двох іонів Са, що супроводжується котранспортом двох протонів і вказує на можливу електрогенність процесу [44, 111]. Принциповою відмінністю структури SERCA від РМСА є відсутність карбокситермінального кальмодулінзв'язувального мотиву і, водночас, наявність спеціального низькомолекулярного регуляторного протеїну фосфоламбану, який в дефосфорильованій формі зменшує уявну спорідненість до Ca^{2+} та інгібує АТФ-азну активність [44, 82, 123]. У міометрії нокаутних за фосфоламбаном мишей спостерігається дещо зменшена за амплітудою спонтанна скоротлива активність, водночас скорочення набувають більшої тривалості та частоти, що може бути пояснене змінами іонної проникності сарколеми [82]. У міометрії експресуються SERCA 2a, SERCA 2b (серцеві) та SERCA 3 (характерна для епітеліоцитів) ізоформи ен-

зиму [82, 123]. Показано, що експресія помпи 2-го типу зростає за вагітності в ГМК матки людини та щурів, причому синтез ензиму посилюється під впливом естрогенів [82, 119, 123, 126]. Із використанням специфічних Ca^{2+} -зондів демонструється зростання концентрації катіона в ретикулярному люмені в умовах висококалієвої деполяризації та дії агоністів, що вказує на здатність CP забезпечувати зниження концентрації Ca^{2+} в міоплазмі після спричиненого цими агентами Ca^{2+} -транз'єнту. Поряд з цим, зміни вмісту катіона в люмені в процесі фазної контрактильної активності міогенної природи зареєструвати не вдалося [82, 127]. Регуляція роботи SERCA-помпи фосфоламбаном залежить від процесів фосфорилування–дефосфорилування останнього [44, 82]. Протеїн перебуває в динамічній рівновазі між моно- і пентамерними формами, причому саме перша зв'язується із SERCA та інгібує її активність [44, 82]. Фосфорилування з подальшою дисоціацією фосфоламбану здійснюється РКА (протеїнкіназою А), РКС, кальмодулінзалежною кіназою II та PKG [82, 123, 128–130]. Отже, регуляторний вплив на помпу можуть чинити агенти, які підвищують рівень cGMP у міоплазмі, передусім NO [129, 130]. Поряд з цим, наявність у складі SERCA функціонально важливих тільних залишків [31, 32, 131] забезпечує можливість безпосереднього впливу NO (або його похідних) на ензим шляхом їх нітрозилування. В дослідях, проведених нами на суспензії пермеабілізованих міоцитів матки щурів (рис. 4), донори NO сти-

мулювали енергозалежну акумуляцію Ca^{2+} в СР [96]. В ГМК судин NO стимулює SERCA шляхом нітрозилування залишку цистеїну-674 [105, 106, 131, 132]. Пероксинітрит, роль якого зростає в умовах нітрозативного/оксидативного стресу, також спричинював активацію помпи шляхом прямої хімічної модифікації цього залишку [133]. Проте пероксинітрит здатний і до пригнічення роботи транспортної системи через нітрозилування за залишками тирозину [134]. Деякі автори заперечують значення S-нітрозилування в можливій регуляції помпи NO [32]. У клітинах ендотелію судин активація SERCA реалізується через cGMP-залежний механізм [109]. У ГМК судин і кишково-шлункового тракту NO стимулює фосфорилування фосфоламбану за механізмами, пов'язаними із PKG та кальмодулінзалежною протеїнкіназою II [129, 130].

Здатність оксиду азоту посилювати енергозалежний транспорт Ca^{2+} в СР клітин міометрія може мати значення в механізмах компенсації пасивного надходження Ca^{2+} в міоплазму із позаклітинного середовища, яке стимулюється нітрозактивними сполуками.

Характеристика K^+ -каналів як можливого об'єкта регуляції NO. У міометрії людини та тварин ідентифіковані кілька підтипів K^+ -каналів, зокрема Ca^{2+} -залежні високої та низької провідності, АТР-залежні, потенціалзалежні (які є чутливими до кальцію), а також деякі інші [57, 58, 135–137]. Речовини, які сприяють відкриттю K^+ -каналів зумовлюють гіперполяризацію ПМ і знижують збудливість клітин, спричинюючи зміщення мембранного потенціалу від його порогових значень, необхідних для активації іонтранспортувальних систем. Під час вагітності у людини і шурів спостерігається зсув потенціалу на плазмолемі клітин міометрія в бік позитивніших величин, що може бути зумовлене активацією K^+ -каналів струмів [57, 135]. Основним механізмом, за яким NO в багатьох випадках спричинює релаксацію гладеньких м'язів є cGMP-залежна або незалежна активація K^+ -каналів [4, 57, 138]. В легеневій артерії шурів та бичачій коронарній артерії NO стимулює відповідно Ca^{2+} -залежні та потенціалзалежні K^+ -канали; NO активує АТР-залежні K^+ -канали в мезентеріальній артерії кролів, а також Ca^{2+} -залежні K^+ -канали в легеневій артерії мурчаків та каротидній артерії кролів [139–142].

У міометрії невагітних шурів Ca^{2+} -залежні K^+ -канали високої провідності здатні забезпечити більше ніж 30% реполяризуючого K^+ -

струму, водночас функціональне значення їх знижується в пізні строки вагітності [57]. Важливо, що Ca^{2+} -канали L-типу розташовані разом із Ca^{2+} -залежними K^+ -каналами високої провідності в ділянках кавеол [143]. Зниження рівня холестеролу в мембранних рафтах призводить до зменшення активності цього типу K^+ -каналів, зростання концентрації Ca^{2+} в міоплазмі та посилення контрактильної активності [144]. Із початком пологової активності Ca^{2+} -чутливість зазначених структур втрачається [58], а експресія знижується [145]. NO здатний забезпечувати релаксацію ГМК матки шляхом активації цих каналів, зокрема спостерігали зростання їхньої провідності в міоцитах вагітних жінок за дії донорів NO [146]. Але чутливість до NO залежить від функціонального періоду і в досліджах на щурах є вираженішою в середині терміну вагітності, ніж наприкінці [138]. Існує точка зору, що активація Ca^{2+} -залежних K^+ -каналів високої провідності залежить не від зростання їх експресії, а від фосфорилування, насамперед спричиненого PKG та PKA [57]. Слід зазначити, що в досліджах на міометрії невагітних шурів нами продемонстровано зростання рівня як cGMP, так і cAMP у присутності донорів NO [147, 148]. Отже, можливість регуляторного впливу протеїнкіназ є вірогідною. Специфіка цього механізму з функціональної точки зору може обумовлюватись тим, що гуанілатциклаза експресується протягом всієї вагітності, тоді як синтез аденілатциклази посилюється в кінці 2-го – на початку 3-го триместрів [57]. Водночас відмічається також можливість безпосереднього впливу NO на Ca^{2+} -залежні K^+ -канали високої провідності, зокрема шляхом їх S-нітрозилування [138, 146].

Інші типи K^+ -каналів також можуть виступати об'єктом впливу оксиду азоту або його похідних. Існують докази того, що Ca^{2+} -залежні K^+ -канали низької провідності відіграють суттєву роль у підтриманні клітин міометрія вагітних шурів у стані низької збудливості, а рівень їх експресії перед пологами знижується [4, 57, 137]. У деяких дослідженнях зазначені структури виявились чутливими до дії NO. Зокрема, релаксація міометрія як невагітних, так і вагітних жінок, спричинена NO, була чутлива до специфічного інгібітора Ca^{2+} -залежних K^+ -каналів – апаміну [149]. У міометрії шурів на пізніх строках вагітності демонструється релаксація, обумовлена активацією АТР-чутливих K^+ -каналів у відповідь на стимуляцію як аденілат-, так і гуанілатциклази [150]. З іншого боку, NO спричинює розслаблення

матки невагітних жінок за механізмами, які не пов'язані зі зростанням вмісту cGMP [151].

Якщо NO або його похідні підвищують проникність сарколеми міометрія до Ca^{2+} , здатні стимулювати надходження катіона в клітини та інгібувати PMCA, вони можуть збільшувати принаймні на короткий час концентрацію катіона в субплазмалемному регіоні міоплазми. Відповідно до цього нітрозактивні сполуки, вірогідно, здійснюють реполяризувальний вплив на ПМ та знижують рівень збудливості міоцитів шляхом активації чутливих до кальцію K^+ -каналів. Дійсно, в наших дослідках, проведених на суспензії міоцитів матки невагітних щурів, демонструється поляризація сарколеми за дії NPS та NS, причому цей ефект залежав від присутності іонів Ca в середовищі інкубації (рис. 5), [152]. В умовах деполіаризуючої дії інгібіторів K^+ -каналів тетраетиламонію та 4-амінопіридину (рис. 6), а також у присутності дигідропіридинів (рис. 7) донори NO не спричиняють помітну поляризацію сарколеми. Зростання K^+ -проникності мембрани в умовах спокою розглядається як важливий фактор підтримання відносної незбудливості міометрія під час вагітності [58].

Можлива також активація й інших типів K^+ -каналів за дії NO, оскільки поляризація везикульованих препаратів сарколеми із

міометрія невагітних свиней спостерігається в наших експериментах під впливом його донорів за відсутності в середовищі Ca^{2+} [153]. Очевидно, що в останньому випадку ефекти були cGMP-незалежними.

У той же час поляризацію сарколеми за дії NO можна досягти і опосередковано. Зокрема, нами демонструється cGMP-залежна активація під впливом донорів NO Na^+ , K^+ -АТФ-ази ПМ міометрія [154] – ключового ензиму, який забезпечує існування і підтримання градієнта потенціалутворюючих іонів на мембрані. З іншого боку, зазначені сполуки в наших дослідженнях стимулювали транспортування протонів у сарколемі та забезпечували зростання рН міоплазми [155]. Транспортування H^+ може забезпечити додаткову поляризацію ПМ або компенсувати вплив деполіаризуючих агентів, водночас залуження середовища є активатором K^+ -канальної провідності.

Наведені тут результати досліджень переконливо свідчать про важливу роль активації K^+ -каналів у біохімічних проявах дії NO. Однак їх cGMP-залежність/незалежність, а також можливість опосередкованого впливу на рівень поляризації сарколеми належить до важливих питань, які потребують подальших досліджень.

Кальцій-транспортувальні системи мітохондрій. У доступній нам літературі відсутні

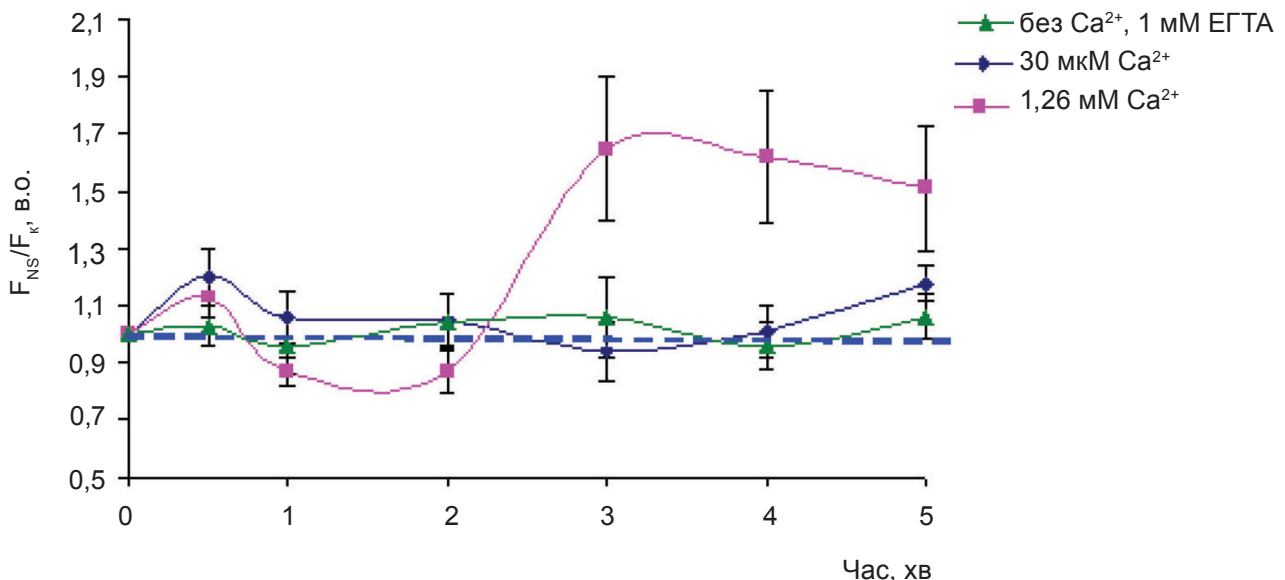


Рис. 5. Поляризація сарколеми клітин міометрія щурів у присутності 10^{-4} М NS та 1,26 мМ Ca^{2+} . Для усунення впливу мітохондрій клітини передінкубовані 5 хв з 5 мМ азидом натрію. F_K – флуоресцентний сигнал у контролі за відсутності NS, F_{NS} – флуоресценція у присутності NS, в.о. – відносні одиниці ($M \pm m$, $n = 6$). Тут і на рис. 6, 7 для оцінювання змін поляризації мембрани використовували флуоресцентний зонд $\text{DiOC}_6(3)$ як описано в роботі [152]

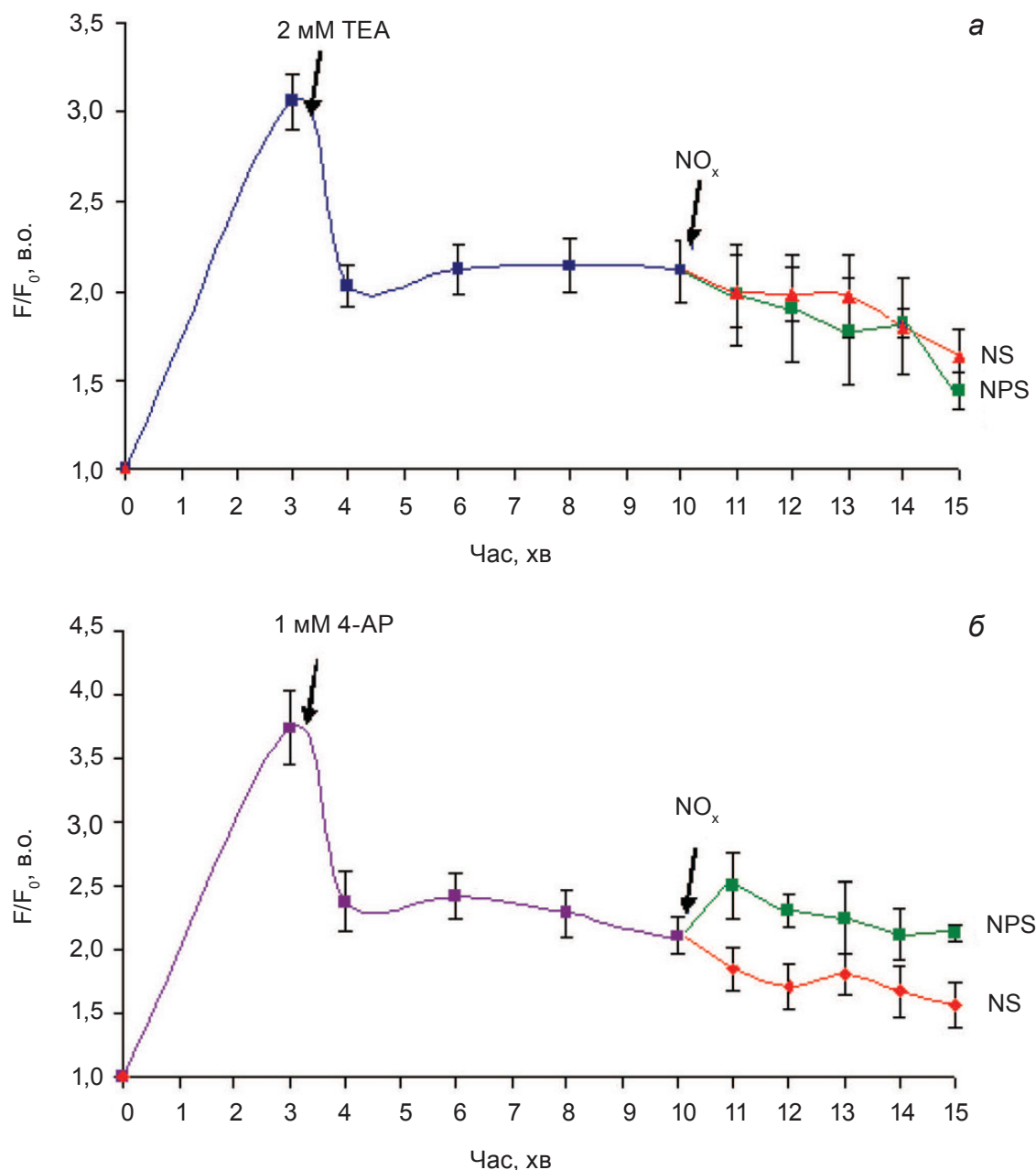


Рис. 6. Зміни поляризації сарколеми міоцитів матки щурів за дії блокаторів K^+ -провідності тетраетиламонію і 4-амінопіридину (TEA та 4-AP відповідно а та б), NPS та NS, 10^{-4} М. Для усунення впливу мітохондрій клітини передінкубовані 5 хв з 5 мМ азидом натрію. F – флуоресцентна відповідь на дію досліджуваних речовин, F_0 – автофлуоресценція клітин, в.о. – відносні одиниці ($M \pm m$, $n = 5$)

відомості стосовно впливу NO на рівень поляризації внутрішньої мембрани та функціонування Ca^{2+} -транспортувальних систем МХ міомерія. У той самий час останні можуть відігравати неабияку роль у підтриманні Ca^{2+} -гомеостазу ГМК матки, зокрема, забезпечуючи енергозалежну акумуляцію катіона із міоплазми після транзйенту, та, з іншого боку,

підтримуючи концентрацію Ca^{2+} в матриксі на низькому фізіологічному рівні, який здатний забезпечити оптимальну роботу ензимів МХ [34, 53, 156]. Перша з цих функцій обумовлена роботою уніпортеру МХ, а друга – електронейтральним Ca^{2+}/H^+ -обмінником. В умовах перевантаження матриксу кальцієм вихід катіона в цитозоль можна досягати за-

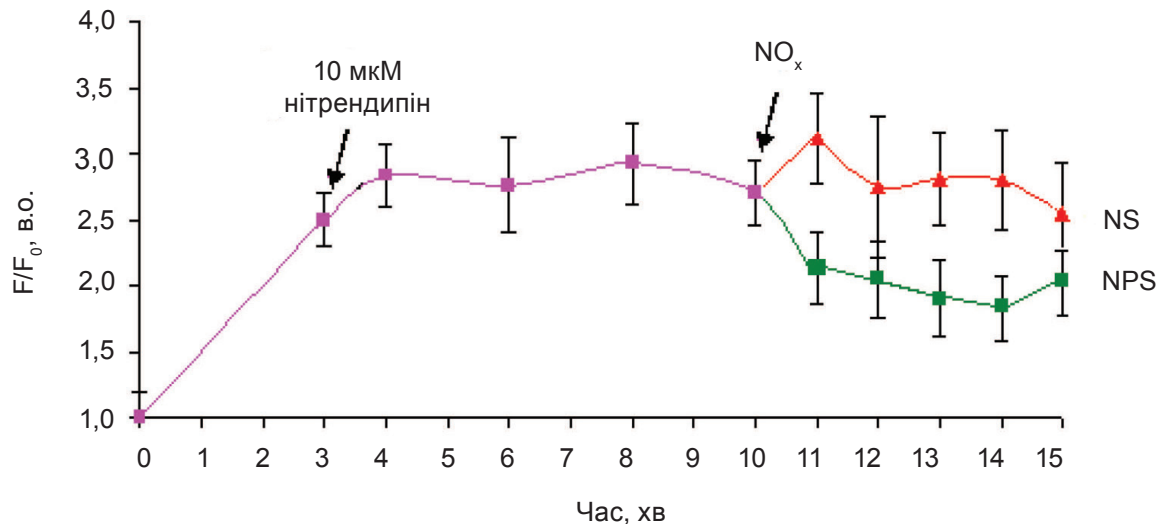


Рис. 7. Рівень поляризації сарколеми міоцитів матки щурів за впливу специфічного блокатора дигідропіридинчутливих Ca^{2+} -каналів — нітрендипіну, NPS та NS. Концентрація нітрозактивних сполук — 10^{-4} М. Для усунення ефекту мітохондрій клітини передінкубовані 5 хв з 5 мМ азидом натрію. F — флуоресцентна відповідь на дію досліджуваних речовин, F_0 — автофлуоресценція клітин, в.о. — відносні одиниці ($M \pm t$, $n = 5$)

вдяки активації циклоспоринчутливої пори МХ [34, 53, 156, 157]. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник, характерний для МХ електрозбудливих тканин, у міометрії та інших ГМК не ідентифікований [34, 156]. МХ міометрія нездатні накопичувати Ca^{2+} за відсутності АТР, характеризуються низькою спорідненістю до катіона (відповідна константа досягає 25 мкМ) із одночасною високою акумулюючою здатністю (накопичують до 1 мкмоль Ca^{2+} /мг протеїну) і значною максимальною швидкістю транспортування (до 600 нмоль Ca^{2+} /1 хв · мг протеїну) [34, 156, 158]. Ефективними інгібіторами акумуляції Ca^{2+} в МХ міометрія є агенти, які запобігають формуванню або руйнують градієнт H^+ на внутрішній мембрані, а саме інгібітори електронно-транспортного ланцюга та протонופори, а також рутенієвий червоний [34, 156, 158]. Існує точка зору, що МХ здатні забезпечити зниження концентрації Ca^{2+} в міоплазмі, яке необхідне для розслаблення за фізіологічно значимий час, а також захищають від цитотоксичних ефектів катіона у разі його надлишкового надходження з позаклітинного середовища [34, 53, 160].

NO , взаємодіючи із компонентами електронно-транспортного ланцюга МХ, здатний пригнічувати окисне фосфорилування. Передумовою ефективної взаємодії NO із МХ є наявність в них значної кількості його молекулярних мішеней, насамперед залізо-сірчаних центрів та гемових груп. Зо-

крема, інгібування цитохром c -оксидази є оборотним за фізіологічних концентрацій NO і необоротним за його гіперпродукції [161]. Надмірна кількість NO , особливо на фоні посилення утворення супероксиданіона в МХ, є потужним пошкоджуючим агентом, який спричинює колапс мембранного потенціалу МХ і призводить до вивільнення в цитозоль апоптотичних факторів, передусім внаслідок дії пероксинітриду. Водночас NO , вірогідно, може виступати також і фізіологічним регулятором МХ, зокрема модулюючи споживання O_2 [30, 161].

У зв'язку з високою потужністю системи акумуляції катіонів кальцію МХ і можливістю NO оборотно впливати на компоненти електронно-транспортного ланцюга, а отже і енергетику МХ, дослідження дії NO та його похідних на поляризацію внутрішньої мембрани МХ та транспортування Ca^{2+} в цьому компартменті є перспективними для з'ясування ролі нітрозактивних сполук у функціонуванні міометрія.

NO як можливий регулятор контрактильного апарату міометрія. Відомо, що ключовим етапом запуску скорочення ГМК є утворення комплексу Ca^{2+} —кальмодулін. Розвиток констрикції залежить від активації цим комплексом кінази легких ланцюгів міозину із подальшим їх фосфорилуванням. Нами продемонстровано, що NS (10^{-8} М) знижує зв'язування Ca^{2+} із високоочищеним пре-

паратом кальмодуліну з мозку бика більше ніж у два рази [162]. Зважаючи на високу консервативність досліджуваного протеїну, одержані результати свідчать про здатність нітрозактивних сполук впливати на процеси комплексоутворення Ca^{2+} із кальмодуліном у гладенькому м'язі. Водночас наводяться докази того, що в міометрії NO або його редокс-форми активують PKG, ініціюючи взаємодію останньої з фосфатазою легких ланцюгів міозину, що призводить до дефосфорилування регуляторних ланцюгів і зниження констрикції [4]. Важливо, що зростання рівня cGMP в ГМК матки може бути пов'язане зі стимуляцією не розчинної, а мембранозв'язаної форми гуанілатциклази. Активатор останньої – урогуанілін – знижував окситоциніндуковане скорочення міометрія [4, 163].

Встановлено, що окситоцин регулює чутливість контрактильного апарату міометрія, блокуючи Rho-кіназний механізм, наслідком чого є пригнічення контрактильної активності [164, 165]. Оскільки Ca^{2+} -кальмодулін залучений до активації Rho-кінази [51], NO може пригнічувати і цей шлях активації скоротливого апарату. Для підтвердження останнього припущення необхідні подальші дослідження.

Існують й інші шляхи регуляції функціональної активності міометрія за допомогою NO. Зокрема, експресія диметиларгінін диметиламіногідролази – ензиму, який забезпечує гідроліз ендogenousного інгібітора NO-синтази, зростає в середні строки вагітності і знижується перед початком пологів, причому спостерігаються відповідні зміни рівня cGMP у міометрії [166].

Очевидно, що пошук та вивчення нових шляхів і механізмів регуляції NO та його похідними Ca^{2+} -гомеостазу і контрактильної функції міометрія є доволі перспективним із урахуванням функціональної специфіки тканини і особливостей Ca^{2+} -сигналіngu в ній.

Отже, на основі аналізу даних літератури і власних експериментальних результатів з вивчення іонних, молекулярних і мембранних механізмів дії NO на внутрішньоклітинний Ca^{2+} -гомеостаз міометрія, можна запропонувати гіпотетичну модель реалізації функціональної активності NO або його похідних. Діючи на рівні ПМ, нітрозактивні сполуки підвищують її проникність для Ca^{2+} шляхом стимуляції потенціалкероаних Ca^{2+} -каналів та пригнічення активності РМСА. Наслідком цього може бути початкове зростання концентрації Ca^{2+} в субплазмалемному регіоні міоплазми з подальшою активацією

Ca^{2+} -залежних K^+ -каналів та зниженням рівня збудливості сарколеми. Додатковими факторами, які сприяють поляризації мембрани, можуть виступати посилення кризь неї транспортування протонів та стимуляція Na^+ , K^+ -АТР-ази, що спричинюються NO.

За дії NO зростає енергозалежна акумуляція Ca^{2+} СР та зменшується його пасивне вивільнення з цього компартмента, що може забезпечити компенсацію активованого NO надходження Ca^{2+} в міоцити та знизити ефективність Ca^{2+} -індукованого вивільнення катіона.

Похідні NO інгібують ключову ланку запуску контрактильного акту в гладенькому м'язі – формування комплексу Ca^{2+} -кальмодулін.

Зазначену схему необхідно в майбутньому підтвердити експериментально, передусім із застосуванням методики одночасної реєстрації змін вмісту вільного Ca^{2+} в міоплазмі, СР та МХ разом із проведенням тензометричних досліджень.

Автор висловлює подяку: к.б.н. Г. В. Данилович, асп. О. В. Коломієць за допомогу у проведенні експериментів; чл.-кор., проф. С. О. Костеріну – за плідне обговорення одержаних результатів, зауваження та рекомендації; Г. В. Данилович за дизайн рисунка 1.

ОКСИД АЗОТА КАК РЕГУЛЯТОР ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ГОМЕОСТАЗА В МИОЦИТАХ МАТКИ

Ю. В. Данилович

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев;
e-mail: danylovych@biochem.kiev.ua

Проанализированы литературные данные по механизмам и регуляции пассивного и активного транспорта Ca^{2+} в миометрии. Особое внимание уделено цГМФ-зависимым и независимым путям действия оксида азота или его производных на внутриклеточный Ca^{2+} -гомеостаз гладкой мышцы матки и ее сократительную активность. В сравнительном аспекте приведены сведения по влиянию оксида азота на Ca^{2+} -транспортные системы других типов гладких мышц. На основании собственных экспериментальных результатов и данных литературы предложена схема действия NO в миометрии, по которой оксид азота, либо его производные, вызывают Ca^{2+} -зависимую поляризацию сарколеммы. В соответствии с

нашими результатами, в основе этого эффекта может лежать повышение проницаемости сарколеммы к Ca^{2+} под действием NO или его производных и стимуляция, по крайней мере начальная, пассивного транспорта катиона в миоциты опосредованного дигидропиридин-чувствительными каналами. Дополнительными факторами, которые способствуют поляризации мембраны, могут выступать усиление транспорта протонов из миоцитов и стимуляция Na^+ , K^+ -АТФазы. Действуя на саркоплазматический ретикулум, нитрозактивные соединения активируют энергозависимое включение кальция в этот компартмент и угнетают Ca^{2+} -индуцированное освобождение катиона. Последние эффекты способны обеспечить компенсацию NO-индуцированного усиления поступления Ca^{2+} в миоциты и угнетать электро-механическое сопряжение на этапе освобождения Ca^{2+} из ретикулума. Производные NO также ингибируют ключевое звено запуска контрактного акта в гладкой мышце – формирование комплекса Ca^{2+} -кальмодулин.

Ключевые слова: оксид азота, кальций, гладкие мышцы, миометрий, электро-механическое сопряжение.

NITRIC OXIDE AS THE REGULATOR OF INTRACELLULAR HOMEOSTASIS IN THE UTERUS MYOCYTES

Yu. V. Danylovych

Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences, Kyiv, Ukraine;
e-mail: danylovych@biochem.kiev.ua

S u m m a r y

The published data on the mechanisms and regulation of active and passive Ca^{2+} transport in the myometrium have been analyzed. Particular attention is paid to the cGMP-dependent and independent pathways of action of nitric oxide or its derivatives on intracellular Ca^{2+} homeostasis of uterine smooth muscle and its contractile activity. Information on the effect of nitric oxide on Ca^{2+} -transport systems of other types of smooth muscles is provided in a comparative aspect. Based on own experimental results and literature data a scheme of NO action in the myometrium is suggested in which nitric oxide or its derivatives cause Ca^{2+} -dependent polarization of the sarcolemma. In accordance with our results, this effect may be based on the increase of sarcolemma Ca^{2+} permeability under the influence of NO or its derivatives

and the stimulation of at least the initial passive transport of the cation in the myocytes mediated by dihydropyridine-sensitive channels. Additional factors that contribute to the polarization of the membrane are the increase of protons transport from the muscle cells and stimulation of Na^+ , K^+ -ATPase. Acting on the sarcoplasmic reticulum, nitrosactive compounds activate the inclusion of calcium in this compartment and inhibit Ca^{2+} -induced release of the cation. The latter effects are able to provide compensation for NO-induced Ca^{2+} increase in myocytes and suppress the electro-mechanical coupling at Ca^{2+} release from the reticulum. NO-derivates also inhibit a key link in the smooth muscle contractile act – the formation of the Ca^{2+} -calmodulin complex.

Key words: nitric oxide, calcium, smooth muscle, myometrium, electro-mechanical coupling.

1. *Biochemistry of smooth muscle contraction*. Ed. Michael Barany. – Acad. Press, San Diego, California, 1996. – 418 p.
2. *Физиология человека*. Под ред. Р. Шмидта и Г. Тевса. Пер. с англ. – 3-е изд. – М.: Мир, 2005. – 1. – 323 с.
3. *Смертность населения (сборник статей)*. М.: Макс Пресс, 2007. – 332 с.
4. *Buxton I. L. O.* // *Mol. Pharm.* – 2004. – **65**, N 6. – P. 1051–1059.
5. *Bernal A. L.* // *Sem. Cell Dev. Biol.* – 2007. – **18**, N 3. – P. 34–347.
6. *Aguilar H. N., Mitchell B. F.* // *Hum. Reprod.* – 2010. – **16**, N 6. – P. 725–744.
7. *Keirse M. J.* // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 1995. – **173**, N 2. – P. 618–628.
8. *Золотухін М. С., Дабіжжа Л. П., Мацінін О. М.* // *Збірник наукових праць «Невіношування вагітності»*. – Київ, 2007. – С. 145–148.
9. *Камінський В. В., Жук С. І.* // *Жіночий лікар*. – 2008. – № 6. – С. 3.
10. *Matthew A., Shmygol A., Wray S.* // *Biol. Res.* – 2004. – **37**, N 4. – P. 617–624.
11. *Bryan N. S., Bian K., Murad F.* // *Front. Biosc.* – 2009. – **14**. – P. 1–18.
12. *Sladek M. S., Magness R. R., Conrad K. P.* // *Am. J. Physiol.* – 1997. – **272**, N 2. – P. R. 441–463.
13. *Данилович Ю. В.* // *Укр. біохім. журн.* – 2001. – **73**, № 3. – С. 5–20.
14. *Tiboni G. M., Giampietro F., Lamonaca D.* // *In Vivo*. – 2001. – **15**. – P. 333–337.
15. *Ekerhovd E., Brannstrom M., Delbro D., Norstrom A.* // *Mol. Hum. Reprod.* – 1998. – **4**, N 9. – P. 915–920.

16. Bao S., Rai J., Schreiber J. // J. Soc. Gynecol. Investig. – 2002. – 9, N 6. – P. 351–356.
17. Hoffman P., Stanke-Labesque F., Fanchin R. et al. // Hum. Reprod. – 2003. – 18, N 1. – P. 148–151.
18. Buxton I. L., Kaiser R. A., Malmquist N. A., Tichenor S. // Br. J. Pharmacol. – 2001. – 134, N 1. – P. 206–214.
19. Bradley K. K., Buxton I. L., Barber J. E. et al. // Am. J. Physiol. – 1998. – 275, N 6. – P. C. 1668–1673.
20. Buhimschi I., Yallampalli C., Dong Y. L., Garfield R. E. // Am. J. Obstet. Gynecol. – 1995. – 172, N 5. – P. 1577–1584.
21. Hennan J. K., Diamond J. // Br. J. Pharmacol. – 1998. – 123, N 5. – P. 959–967.
22. Izumi H., Garfield R. E. // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. – 1995. – 60, N 2. – P. 171–180.
23. Syal A. S., Vedernikov Y. P., Chwalisz K. et al. // Am. J. Obstet. Gynecol. – 1998. – 179, N 1. – P. 111–116.
24. Vedernikov Y. P., Syal A. S., Okawa T. et al. // Ibid. – 2000. – 182, N 3. – P. 612–619.
25. Okawa T., Vedernikov Y. P., Saade G. R., Garfield R. E. // Gynecol. Endocrinol. – 2004. – 18, N 4. – P. 186–193.
26. Kuenzli K. A., Buxton I. L., Bradley M. E. // Br. J. Pharmacol. – 1998. – 124, N 1. – P. 63–68.
27. Kuenzli K. A., Bradley M. E., Buxton I. L. // Ibid. – 1996. – 119, N 4. – P. 737–743.
28. Duckitt K., Thornton S. // Cochrane Database Syst. Rev. – 2002. – CD002860.
29. Hampl V., Herget J. // Physiol. Rev. – 2000. – 80, N 4. – P. 1337–1372.
30. Реймов В. П. // Усп. совр. биол. – 1995. – 35, № 2. – С. 189–228.
31. Trebak M., Ginnan R., Singer H. A., Jourdeuil D. // Antioxid. Redox Signal. – 2010. – 12, N 5. – P. 657–673.
32. Zima A. V., Blatter L. A. // Cardiovasc. Res. – 2006. – 71, N 2. – P. 310–321.
33. Pucovsky V., Gordienko D. V., Bolton T. B. // J. Physiol. – 2002. – 539, N 1. – P. 25–39.
34. Костерин С. А. Транспорт кальция в гладких мышцах. – К.: Наук. думка, 1990. – 216 с.
35. Sanders K. M. // J. Appl. Physiol. – 2001. – 91, N 3. – P. 1438–1449.
36. Chalmers S., Olson M. L., MacMillan D. et al. // Cell Calcium. – 2007. – 42, N 4–5. – P. 447–466.
37. Wray S., Kupittayanant S., Shmygol A. et al. // Exp. Physiol. – 2001. – 86, N 2. – P. 239–246.
38. Corbett E. F., Michalak M. // TIBS. – 2000. – 25, N 7. – P. 307–311.
39. Johnson J. D., Chang J. P. // Biochem. Cell Biol. – 2000. – 78, N 3. – P. 217–240.
40. Berridge M. J. // J. Physiol. – 2008. – 586, Pt. 21. – P. 5047–5061.
41. Рубцов А. М. // Биохимия. – 2001. – 66, вып. 10. – С. 1401–1414.
42. Taylor S. J., Chae H. Z., Rhee S. G., Exton J. H. // Nature. – 1991. – 6318. – P. 516–518.
43. Flynn E. R. M., Bradley K. N., Muir T. C., McCarron J. G. // J. Biol. Chem. – 2001. – 276, N 39. – P. 36411–36418.
44. Laporte R., Hui A., Laher I. // Pharmacol. Rev. – 2004. – 56, N 4. – P. 439–513.
45. Venkatachalam K., van Rossum D. B., Patterson R. L. et al. // Nat. Cell Biol. – 2002. – 4, N 11. – E. 263–272.
46. Parekh A. B., Putney J. W. Jr. // Physiol. Rev. – 2005. – 85, N 2. – P. 757–810.
47. Шликов С. Г. // Укр. біохім. журн. – 2010. – 82, № 2. – С. 5–17.
48. Takashima S. // Circ. J. – 2009. – 73, N 2. – P. 208–213.
49. Kamm K. E., Stull J. T. // J. Biol. Chem. – 2001. – 276, N 7. – P. 4527–4530.
50. Noda M., Yasuda-Fukazawa C., Moriishi K. et al. // FEBS Lett. – 1995. – 367, N 3. – P. 246–250.
51. Brozovich F. V. // Circ. Res. – 2003. – 93, N 6. – P. 481–483.
52. Бабіч Л. Г. // Укр. біохім. журн. – 1999. – 71, № 5. – С. 10–22.
53. Костюк П. Г., Костюк О. П., Лук'янець О. О. Внутрішньоклітинна кальцієва сигналізація: структура і функції. – К.: Наук. думка, 2010. – 175 с.
54. Vallot O., Combettes L., Lompre A.-M. // Biochem. J. – 2001. – 357, Pt. 2. – P. 363–371.
55. Szado T., Kuo K. H., Bernard-Helary K. et al. // FASEB J. – 2003. – 17, N 1 – P. 28–37.
56. Sanborn B. M. // J. Soc. Gynecol. Investig. – 2000. – 7, N 1. – P. 4–11.
57. Brainard A. M., Korovkina V. P., England S. K. // Semin. Cell. Dev. Biol. – 2007. – 18, N 3. – P. 332–339.
58. Khan R. N., Matharoo-Ball B., Arulkumaran S., Ashford M., L., J. // Exp. Physiol. – 2001. – 86, N 2. – P. 255–264.
59. Yoshino M., Wang S. Y., Kao C. Y. // J. Gen. Physiol. – 1997. – 110, N 5. – P. 565–577.
60. Seda M., Pinto F. M., Wray S. et al. // Biol. Reprod. – 2007. – 77, N 5. – P. 855–863.
61. Ohkubo T., Inoue Y., Kawarabayashi T., Kitamura K. // Cell Physiol. Biochem. – 2005. – 16, N 4–6. – P. 245–254.
62. Blanks A. M., Zhao Z. H., Shmygol A. et al. // J. Physiol. – 2007. – 581, Pt. 3. – P. 915–926.
63. Tichenor S. D., Malmquist N. A., Buxton I. L. O. // Cell. Signal. – 2003. – 15, N 8. – P. 763–772.

64. Данилович Ю. В. // Бук. мед. вісн. – 2005. – 9, № 2. – С. 78–79.
65. Данилович Ю. В. // Укр. біохім. журн. – 2003. – 75, № 4. – С. 57–63.
66. Jensen F. B. // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – 1787, N 7. – P. 841–848.
67. Janssen L. J., Premji M., Lu-Chao H. W. et al. // Am. J. Physiol. – 2000. – 278, N 5. – P. L. 899–905.
68. Lima B., Forrester M. T., Hess D. T., Stamler J. S. // Circ. Res. – 2010. – 106, N 4. – P. 633–646.
69. Campbell D. L., Stamler J. S., Strauss H. C. // J. Gen. Physiol. – 1996. – 108, N 4. – P. 277–293.
70. Hu H., Chiamvimonvat N., Yamagishi T., Marban E. // Circ. Res. – 1997. – 81, N 5. – P. 742–752.
71. Barouch L. A., Harrison R. W., Skaf M. W. et al. // Nature. – 2002. – 416. – P. 337–339.
72. Tewari K., Simard J. M. // Pflugers Arch. – 1997. – 433, N 3. – P. 304–311.
73. Poteser M., Romanin C., Schreibmayer W. et al. // J. Biol. Chem. – 2001. – 276, N 18 – P. 14797–14803.
74. Khurana G., Benett M. R. // Br. J. Pharmacol. – 1993. – 109, N 2. – P. 480–485.
75. Ohkuma S., Katsura M., Hibino I. // Mol. Brain. Res. – 1998. – 54, N 1. – P. 133–140.
76. Chen C., Schofield G. G. // J. Physiol. – 1995. – 482, Pt. 3. – P. 521–531.
77. Uchiyama Y., Morita K., Kitayama S. et al. // Jpn. J. Pharmacol. – 1994. – 65, N 1. – P. 73–77.
78. Shmygol A., Wray S. // Cell Calcium. – 2004. – 35, N 6. – P. 501–508.
79. Noble K., Zhang J., Wray S. // J. Physiol. – 2006. – 570, N 1. – P. 29–35.
80. van Breemen C., Lukeman S., Leijten P. et al. // J. Cardiovasc. Pharmacol. – 1986. – 8. – P. S. 111–116.
81. Golovina V. A., Blaustein M. P. // Science. – 1997. – 275, N 5306. – P. 1643–1648.
82. Noble K., Matthew A., Burdyga T., Wray S. // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. – 2009. – 144, S 1. – P. S. 11–19.
83. Morgan J. M., De Smedt H., Gillespie J. I. // Pflugers Arch. – 1996. – 431, N 5. – P. 697–705.
84. Phaneuf S., Europe-Finner G. N., Varney M. et al. // J. Endocrinol. – 1993. – 136, N 3. – P. 497–509.
85. Devost D., Carrier M. E., Zigg H. H. // Endocrinology. – 2008. – 149, N 1. – P. 131–138.
86. Mironneau J., Macrez N., Morel J. L. et al. // J. Physiol. – 2002. – 538, N 3. – P. 707–716.
87. Martin C., Hyvelin J.-M., Chapman K. E. et al. // Am. J. Physiol. – 1999. – 277, N 2. – P. C. 243–252.
88. Awad S. S., Lamb H. K., Morgan J. M. et al. // Biochem. J. – 1997. – 322, Pt. 3. – P. 777–783.
89. Krall J.F., Morin A. // J. Cell Physiol. – 1986. – 129, N 2. – P. 250–256.
90. Izumi H., Garfield R. E., Morishita F. // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. – 1994. – 56, N 1. – P. 55–62.
91. Martin C., Chapman K. E., Thornton S. // Biochim. Biophys. Acta. – 1999. – 1451, N 2–3. – P. 343–352.
92. Dabertrand F., Fritz N., Mironneau J. et al. // Am. J. Physiol. – 2007. – 293, N 3. – P. C. 848–854.
93. Данилович Ю. В. // Фізіол. журн. – 2007. – 53, № 1. – С. 55–61.
94. Young R. C. // Novartis Found Symp. – 2002. – 246. – P. 174–182.
95. Burdyga T., Wray S., Noble K. // Ann. NY Acad. Sci. – 2007. – 1101. – P. 85–96.
96. Данилович Ю. В. // Фізіол. журн. – 2010. – 56, № 1. – С. 72–78.
97. Kannan M. S., Prakash Y. S., Johnson D. E., Sieck G. C. // Am. J. Physiol. – 1997. – 272, N 1. – P. L. 1–7.
98. Mandala M., Heppner T. J., Boney A. D., Nelson M. T. // Nitric Oxide. – 2007. – 16, N 1. – P. 104–109.
99. Babich L. G., Ku C. Y., Young H. W. et al. // Biol. Reprod. – 2004. – 70, N 4. – P. 919–924.
100. Shlykov S. G., Yang M., Alcorn J. L., Sanborn B. M. // Ibid. – 2003. – 69, N 2. – P. 647–655.
101. Peel S. E., Liu B., Hall I. P. // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. – 2008. – 36, N 6. – P. 744–749.
102. Sanborn B. M. // Semin. Cell Dev. Biol. – 2007. – 18, N 3. – P. 305–314.
103. Tribe R. M., Moriarty P., Dalrymple A. et al. // Biol. Reprod. – 2003. – 68, N 5. – P. 1842–1849.
104. Dalrymple A., Mahn K., Poston L. et al. // Mol. Hum. Reprod. – 2007. – 13, N 3. – P. 171–179.
105. Cohen R. A., Weisbrod R. M., Gericke M. et al. // Circ. Res. – 1999. – 84, N 2 – P. 210–219.
106. Mingone C. J., Gupte S. A., Iesaki T., Wolin M. S. // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. – 2003. – 285, N 2. – P. L. 296–304.
107. Taylor C. W., Moneer Z. // Biol. Res. – 2004. – 37, N 4. – P. 641–645.
108. Wayman C. P., McFadzean I., Gibson A., Tucker J. F. // Br. J. Pharmacol. – 1996. – 118, N 8. – P. 2001–2008.
109. Dedkova E. N., Blatter L. A. // J. Physiol. – 2002. – 539, N 1. – P. 77–91.
110. Floyd R., Wray S. // Cell Calcium. – 2007. – 42, N 4–5. – P. 467–476.

111. Lee A. G., East J. M. // *Biochem. J.* – 2001. – **356**, N3. – P. 665–683.
112. Костерин С. А., Бурдыга Ф. В. // *Успехи совр. биол.* – 1993. – **113**, № 4. – С. 485–506.
113. Kosterin S. O. // *Neurophysiology.* – 2003. – **35**, N 3–4. – P. 215–228.
114. Sarafoli E., Brini M. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 2000. – **4**, N 2. – P. 152–161.
115. Любаковская Л. А., Слинченко Н. Н., Бурчинская Н. Ф., Курский М. Д. // *Биохимия.* – 1990. – **55**, вып. 7. – С. 1237–1243.
116. Слинченко Н. Н., Любаковская Л. А., Курский М. Д., Сопель Л. В. // *Укр. биохим. журн.* – 1990. – **62**, № 3. – С. 60–65.
117. Holmes M. E., Chaundhary J., Grover A. K. // *Cell Calcium.* – **33**, N 4. – P. 241–245.
118. Костерин С. А., Браткова Н. Ф., Бабич Л. Г. и др. // *Укр. биохим. журн.* – 1996. – **68**, № 6. – С. 50–61.
119. Tribe R. M., Moriarty P., Poston L. // *Biol. Reprod.* – 2000. – **63**, N 3. – P. 748–755.
120. Данилович Г. В., Данилович Ю. В. // *Укр. біохім. журн.* – 2007. – **79**, № 2. – С. 30–37.
121. Chen J., Wang Y., Nakajima T. // *J. Biol. Chem.* – 2000. – **275**, N 37. – P. 28739–28749.
122. Gutierrez-Martin Y., Martin-Romero F. J., Henafo F., Gutierrez-Merino C. // *Free Radic. Biol. Med.* – 2002. – **32**, N 1. – P. 46–55.
123. Wray S., Burdyga T. // *Physiol. Rev.* – 2010. – **90**, N 1. – P. 113–178.
124. Бабич Л. Г., Шлыков С. Г., Борисова Л. А., Костерин С. А. // *Биохимия.* – 1994. – **59**, вып. 8. – С. 1218–1229.
125. Бабич Л. Г., Шлыков С. Г., Струтинская Н. А., Костерин С. А. // *Укр. біохім. журн.* – 1999. – **71**, №2. – С. 20–27.
126. Liu C. G., Xu X., Huang J. J. et al. // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 2007. – **34**, N 10. – P. 998–1004.
127. Shmygol A., Wray S. // *Cell Calcium.* – 2005. – **37**, N 3. – P. 215–223.
128. Mattiazzi A., Mundina-Weilenmann C., Vittone L., Said M. // *Mol. Cell Biochem.* – 2005. – **263**, N 1–2. – P. 131–136.
129. Kim M., Perrino B. A. // *Am. J. Physiol.* – 2007. – **292**, N 4. – P. G. 1045–1054.
130. Karczewski P., Hendrichske T., Wolf W. P. et al. // *J. Cell Biochem.* – 1998. – **70**, N 1. – P. 49–59.
131. Ying J., Tong X., Pimentel D. R. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2007. – **27**, N 4. – P. 783–790.
132. Adachi T., Matsui R., Weisbrod R. M. // *Circulation.* – 2001. – **104**, N 9. – P. 1040–1045.
133. Adachi T., Weisbrod R. M., Pimentel D. R. et al. // *Nat. Med.* – 2004. – **10**, N 11. – P. 1200–1207.
134. Kobayashi T., Taguchi K., Takenouchi Y. // *Free Radic. Biol. Med.* – 2007. – **43**, N 3. – P. 431–440.
135. Smith R. C., McClure M. C., Smith M. A. et al. // *Reprod. Biol. Endocrinol.* – 2007. – **5**. – P. 41–52.
136. Khan R. N., Smith S. K., Morrison J. J., Ashford M. L. J. // *Am. J. Physiol.* – 1997. – **273**, N 42. – P. C. 1721–1731.
137. Noble K., Floyd R., Shmygol A. et al. // *Cell Calcium.* – 2010. – **47**, N 1. – P. 47–54.
138. Okawa T., Vedernikov Y. P., Saade G. R. et al. // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 1999. – **181**, N 3. – P. 649–655.
139. Zhao Y. J., Wang J., Rubin L. J., Yuan H. J. // *Am. J. Physiol.* – 1997. – **272**, N 2. – P. H. 904–912.
140. Bialecki R. A., Stinson-Fisher C. // *Ibid.* – 1995. – **268**, N 1. – P. L. 152–159.
141. Najibi S., Cohen R. A. // *Ibid.* – **269**, N 3. – P. H. 805–811.
142. Murphy M. E., Brayden J. E. // *J. Physiol.* – 1995. – **486**, Pt. 1. – P. 47–58.
143. Chanrachakul B. // *J. Med. Assoc. Thai.* – 2006. – **89**, N 4. – P. 178–183.
144. Shmygol A., Noble K., Wray S. // *J. Physiol.* – 2007. – **581**, N 2. – P. 445–456.
145. Chanrachakul B., Matharoo-Ball B., Turner A. et al. // *Reprod.* – 2003. – **126**, N 1. – P. 43–48.
146. Shimano M., Nakaya Y., Fukui R. et al. // *Gynecol. Obstet. Invest.* – 2000. – **49**, N 4. – P. 249–254.
147. Данилович Ю. В., Тугай В. А. // *Укр. біохім. журн.* – 2006. – **78**, № 1. – С. 102–106.
148. Данилович Ю. В. // *Там само.* – 2005. – **77**, № 4. – С. 124–128.
149. Modzelewska B., Kostrzewska A., Sipowicz M. et al. // *Reprod. Biol. Endocrinol.* – 2003. – **1**. – P. 1–8.
150. Okawa T., Longo M., Vedernikov Y. P. et al. // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2000. – **182**, N 4. – P. 913–918.
151. Modzelewska B., Sipowicz M. A., Saavedra J. E. et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1998. – **253**, N 3. – P. 653–657.
152. Данилович Г. В., Данилович Ю. В., Горчев В. Ф. // *Укр. біохім. журн.* – 2011. – **83**, № 3. – С. 99–105.
153. Данилович Г. В., Данилович Ю. В., Горчев В. Ф. // *Там само.* – 2010. – **82**, № 1. – С. 52–61.
154. Данилович Ю. В., Данилович Г. В., Коломієць О. В. // *Там само.* – № 6. – С. 33–41.

155. Данилович Ю. В., Тугай В. А. // Фізіол. журн. – 2005. – **51**, № 3. – С. 52–56.
156. Kosterin S. A., Burdyga Th. V., Fomin V. P., Grover A. K. / Control of Uterine Contractility. – Eds. R. E. Garfield, T. N. Tabb. – CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, 1994. – P. 129–153.
157. Манько В. Системи транспортування Ca²⁺ у секреторних клітинах екзокринних залоз. – Львів: Львівський національний університет імені Івана Франка, 2011. – 271 с.
158. Костерин С. А., Браткова Н. Ф., Курский М. Д. // Биохимия. – 1985. – **50**, вып. 8. – С. 1350–1361.
159. Курский М. Д., Костерин С. А., Бурчинская Н. Ф., Шлыков С. Г. // Укр. биохим. журн. – 1987. – **59**, № 3. – С. 35–39.
160. Веклич Т. О. Транспорт Ca²⁺ в мітохондріях гладеньком'язових клітин. – Автореф. Дис. канд. біол. наук. – 2003. – 20 с.
161. Бурлака А. П., Сидорик Є. П. Радикальні форми кисню та оксиду азоту при пухлинному процесі. – К.: Наук. думка, 2006. – 227 с.
162. Данилович Ю. В., Тугай В. А. // Укр. біохім. журн. – 2003. – **75**, № 1. – С. 59–64.
163. Buxton I. L., Milton D., Barnett S. D., Tichenor S. D. // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2010. – **335**, N 1. – P. 256–263.
164. Deng J. T., Van Lierop J. E., Sutherland C., Walsh M. P. // J. Biol. Chem. – 2001. – **276**, N 19. – P. 16365–16373.
165. Woodcock N. A., Taylor C. W., Thornton S. // Am. J. Obstet. Gynecol. – 2004. – **190**, N 1. – P. 222–228.
166. Ito E., Obayashi S., Nagai A. et al. // Mol. Hum. Reprod. – 2009. – **15**, N 8. – P. 507–512.

Отримано 30.11.2011