

Ю. В. Данилович

Можлива роль аміаку як паракринного регулятора в тканинах матки

Исследовали возможность образования аммиака (NH_3) в эндометрии матки и его влияние на обмен Ca^{2+} и H^+ в плазматической мембране клеток миометрия. Выделение стромальных клеток эндометрия и суспензии интактных миоцитов проводили с использованием маток свиней и крыс, пользуясь традиционными методиками. Установлено, что в суспензии стромальных клеток эндометрия тестируется относительно высокая АМФ-дезаминазная (аденозинмонофосфат-аминогидролазная, КФ 3.5.4.6.) активность – (53 ± 2) мкмоль инозинмонофосфата \cdot ч⁻¹ \cdot мг⁻¹ белка. Показаны также продукция аммиака и его выход во внеклеточное пространство, которые достоверно усиливаются в присутствии 1 мкмоль/л ацетилхолина и интенсивно угнетаются 0,1 ммоль/л F, неспецифическим ингибитором АМФ-дезаминазы. Это дает возможность предположить роль АМФ-дезаминазы в образовании NH_3 стромальными клетками эндометрия и его выход во внеклеточное пространство при стимуляции ацетилхолином. Добавление раствора аммиака (4 ммоль/л) к суспензии миоцитов сопровождается значительным повышением рН во внеклеточном и внутриклеточном пространстве, причем последнее угнетается блокаторами пассивного транспорта H^+ через мембрану 0,1 ммоль/л 4-аминопиридином и тетраэтиламмонием. Можно предположить, что добавление раствора аммиака приводит к увеличению градиента протонов на мембране миоцитов и усилению трансмембранного выхода H^+ из цитоплазмы. Продемонстрирована также возможность стимуляции 4 ммоль/л NH_4^+ ацетилхолин-активируемого пассивного транспорта Ca^{2+} в миоциты, угнетаемого 1 ммоль/л Ca^{2+} и 1 ммоль/л нифедипином. Повышение концентрации Ca^{2+} в цитозоле в данных условиях интенсивно угнетается протонофором (0,04%-м 2,4-динитрофенолом) и эффективно усиливается ингибитором Na^+-H^+ -обменника в плазмалемме 0,1 ммоль/л амилоридом. Вероятно, происходит усиление лигандактированного пассивного транспорта Ca^{2+} рассеиванием трансмембранного градиента протонов, который существует на плазматической мембране миоцитов за счет протекания цитозольных окислительных процессов и может увеличиваться вследствие образования аммиака в эндометрии. Роль диффундирующего из эндометрия NH_3 в регуляции функциональной активности матки требует дальнейших исследований, однако уже на этом этапе можно предположить, что молекулы NH_3 (или NH_4^+) могут выполнять роль паракринного регулятора в системе эндометрий – миометрий.

ВСТУП

Проблема фізіологічної ролі активних метаболітів азоту та кисню, а саме оксиду азоту (NO), пероксиду водню, аміаку вирішується протягом тривалого часу. Результати досліджень останніх років дозволяють розглядати NO та його стабільні похідні, в першу чергу, нітрит-аніони, (NO_2^-) як сильнодіючі утерорелаксанти [2, 21, 36, 38].

Важливим метаболітом азотистого обміну виступає аміак (NH_3), який утворюється в тканинах в основному внаслідок АМФ-аміногідролазної реакції [15, 19, 22, 24, 25, 31–33, 35]. Цикл хімічних перетворень, який включає в себе NO, його стабільні похідні та аміак отримав назву «цикл оксиду азоту». В літературі дискутується питання про роль NH_3 у механізмах електромеханічного спряження в скелетному м'язі [9, 13]. Дуже

© Ю. В. Данилович

мало відомостей відносно утворення та фізіологічного значення NH_3 у матці.

Функціонування міометрія матки (гладеньком'язового синцитія) необхідно розглядати в тісному зв'язку з ендометріальною тканиною. Остання розташована шаром над міометрієм і є гістологічно неоднорідним утворенням. Вона складається з поверхневого і залозистого епітелію, стромальних клітин, пронизана нервовими та кровоносними закінченнями. Важливими в функціональному відношенні елементами ендометрія виступають його стромальні клітини [17, 37]. Проводяться численні дослідження ролі ендометрія в менструальному циклі, заплідненні та розвитку плода [4; 12, 17, 37]. На основі літературних даних ендометрій можна розглядати як тканину, що приймає, розпізнає різноманітні “зовнішні” подразники та трансформує їх у вигляді утворених вторинних месенджерів і (ауто-) паракринних регуляторів, які здатні контролювати роботу як самого ендометрія, так і тканин, що його оточують. Роль ендометрія в продукції NH_3 та регуляції функціональної активності міометрія практично не досліджена.

Аміак легко дифундує в клітинах і тканинах [13]. Утворюючись в ендометрії, він може надходити до міометріального синцитія та безпосередньо впливати як на плазматичну мембрану міоцитів, так і на ключові цитозольні ефекторні системи. Це зумовлює інтерес до вивчення молекулярних механізмів регуляції зазначеною сполукою перших етапів активації міоцитів, а саме входу Ca^{2+} з позаклітинного середовища і подальшого розвитку кальційзалежних процесів у цитозолі. На основі електрофізіологічних, біохімічних і біофізичних підходів нині сформоване уявлення про те, що вхід Ca^{2+} в міоплазму з позаклітинного середовища при збудженні міоцитів супроводжується виходом H^+ з цитозолу за градієнтом концентрації, який створюється внаслідок проходження цитозольних окисних процесів. В результаті цього короткотривале залуження цитоплазми призводить

до стимуляції вивільнення Ca^{2+} з саркоплазматичного ретикулума, посилення утворення комплексу кальцій – кальмодулін і активації кінази легких ланцюгів міозину, що ініціює контрактильний акт [1, 6–8, 10, 11, 18, 26, 28]. Ці дані дозволяють розглядати H^+ як вторинний месенджер і потужний регулятор кальцієвого гомеостазу в клітині. Показано існування взаємозв'язаного обміну Ca^{2+} і H^+ на рівні плазматичної мембрани міоцитів матки [5].

Тісний контакт ендометрія з міометріальною тканиною передбачає, що утворення NH_3 в ендометрії внаслідок дезамінування аденозинмонофосфату може призвести до суттєвого короткотривалого підвищення рН як у самому ендометрії, так і в просторі навколо міоцитів. Останнє припущення ґрунтується на дуже високій проникності NH_3 крізь плазмолему та здатності до ефективної міжклітинної дифузії [13]. Зміни рН у позаклітинному просторі міоцитів можуть виступати фізіологічним регулятором кальцієвого гомеостазу [9, 13]. Іншими словами, можна припустити, що NH_3 впливає як на транспорт H^+ , так і Ca^{2+} в плазматичній мембрані.

Передбачається, що неабияку роль відіграє ацетилхолін у регуляції активності матки. Зокрема, продемонстрована значна продукція його плацентою та нервовими закінченнями, які пронизують ендометрій [37]. Ацетилхолін розглядається також як один з найважливіших регуляторів іонного транспорту у плазмолемі клітин міометрія.

Мета цієї роботи — вивчити можливість утворення NH_3 стромальними клітинами ендометрія за умов стимуляції ацетилхоліном і дослідити вплив NH_3 на пасивний H^+ - і Ca^{2+} -транспорт у плазматичній мембрані міоцитів матки.

МЕТОДИКА

Виділення стромальних клітин ендометрія. В досліді використовували матки невагітних свиней віком до десяти місяців. Ендо-

метріальну тканину відокремлювали від міометрію за допомогою скальпеля. Для виділення стромальних клітин ендометрія використовували описану методику [37] в незначній модифікації. Життєздатність клітин одержаного препарату визначали за допомогою забарвлення трипановим синім. Кількість живих клітин, яку обчислювали за допомогою камери Горяєва, становила в середньому 85–90 % від усього числа клітин у фільтраті.

Визначення АМФ-дезаміназної активності в суспензії стромальних клітин ендометрія. Визначення АМФ-дезаміназної активності проводили в середовищі, що мало наступний склад (в моль/л): АМФ – 6, КСІ – 1,5, Нерес-трис-буфер – 25, рН 7,4, до якого додавали клітини (40–60 мкг білка). Для перфорації та солюбілізації клітин використовували тритон Х-100 у зростаючих концентраціях. Контролем були досліди без додавання детергента. Реакційне середовище інкубували 3 хв при 30 °С. Реакцію зупиняли додаванням трихлороцтової кислоти (10 %), 0,5 мл цього середовища доводили водою до 25 мл і колориметрували на спектрофотометрі при довжині хвилі 265 нм. Підрахунки проводили з використанням коефіцієнта молярної екстинкції, який становив 6,2 [9].

Визначення NH_3 . Для визначення NH_3 в надосадовій рідині (центрифугували клітинну суспензію 10 хв при 100 g) використовували 1,7 ммоль/л тринітробензолсульфонової кислоти (ТНБС), яка специфічно взаємодіючи з вільними аміногрупами, утворює забарвлені сполуки в лужному середовищі [3, 13].

Калібрувальну криву будували з використанням $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в боратному буфері. Після 25 хв інкубації з ТНБС при 37 °С реакцію зупиняли додаванням 0,1 моль/л NaH_2PO_4 з 1,5 моль/л Na_2SO_3 . У дослідах замість сульфату амонію брали аліквоту надосадової рідини. Спектрофотометричні вимірювання проводили при довжині хвилі 420 нм щодо суміші реактивів.

Виділення суспензії інтактних міоцитів з міометрія щурів. Суспензію гладеньком'язових клітин матки невагітних щурів, естрогенізованих за 16 год до забору тканини, одержували з використанням колагенази і соєвого інгібітора трипсину за допомогою методу Молларда та співавт. [14]. В 1 мл отриманої клітинної суспензії містилося в середньому $6,58 \cdot 10^6$ міоцитів; кількість життєздатних клітин – 90–95 % від загальної кількості клітин (визначали при фарбуванні клітинного препарату трипановим синім).

Визначення концентрації цитозольного Ca^{2+} з використанням флуоресцентного зонда $fura-2\text{AM}$. Використовували стандартну процедуру навантаження зондом та реєстрації сигналу, яка була розроблена саме для міоцитів матки [14]. Оскільки використовували однохвильовий режим вимірювання, застосування цього методу дозволяє отримувати лише уявну концентрацію катіона в цитоплазмі клітин міометрія. Збуджували та реєстрували флуоресцентний сигнал на флуориметрі „Hitachi-240” за таких умов: λ збудження=340 нм (ширина щілини 2 нм), λ флуоресценції=500 нм (ширина щілини 4 нм); отримували величину сигналу F в умовних одиницях. По закінченні вимірів клітини руйнували 0,1%-м детергентом, величина сигналу за цих умов – Fmax. Додавали в кювету для вимірювань 0,5 ммоль/л MnCl_2 та отримували величину сигналу — Fmin. Розрахунок уявної концентрації вільного цитозольного кальцію проводили за формулою: $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d [F - F_{\text{min}}] / [F_{\text{max}} - F]$, де $K_d=224$ нмоль/л [14, 20]. Флуоресценцію залишків позаклітинного зонда, яка становить 15–20 % від загальної флуоресценції зонда, оцінювали, додаючи розчин 50 мкмоль/л MnCl_2 до аліквоти навантажених клітин.

Визначення внутрішньоклітинного рН (pH_i) міоцитів з використанням флуоресцентного зонда BCECF-AM. Процедура навантаження зондом відповідала вищевказаній з незначними модифікаціями. Режим

вимірювання був таким: λ збудження=506 нм (ширина щілини 3 нм), λ флуоресценції=530 нм (ширина щілини 10 нм) [14, 27]. Калібрування сигналу флуоресценції проводили на початку кожного експерименту з використанням протонифору 2,4-динітрофенолу (0,05%); рН позаклітинного середовища (рН_o) HEPES-трис-буфером на рівні 6,0–7,25. За таких умов рН внутрішньо- та позаклітинного середовища врівноважується і можна калібрувати сигнал у координатах „значення розрахованого рН — величина умовного сигналу”. За умов використання режиму однохвильової флуориметрії розраховані нами значення рН_i не є абсолютними, а лише уявними.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Підхід до вирішення першої експериментальної задачі потребує доказу наявності високої активності АМФ-дезамінази в стромальних клітинах ендометрія. Методика визначення АМФ-дезамінази в клітинах зумовлюється цитоплазматичною локалізацією фермента та його тісним контактом з філаментами та мембранними структурами [9, 13]. Коректне визначення потребує використання детергентної техніки та високої дезінтегруючої концентрації хлориду калію [9, 13]. Нами встановлено, що за наявності 1,5 моль/л хлориду калію при зростаючій концентрації тритона X-100 спостерігається підвищення АМФ-дезаміназної активності в суспензії стромальних клітин ендометрія з тенденцією до гіперболічної залежності. Максимальна активність при застосуванні 0,2 % тритона X-100 становить 53 ± 2 (мкмоль інозинмотофосфату \cdot год⁻¹ \cdot мг⁻¹ білка). Це значення відносно високе і відповідає знайденому в інших тканинах, зокрема м'язовій [9, 31, 32], нервовій [15, 19, 22, 24, 25] а також в еритроцитах [33].

З іншого боку, суспензія стромальних клітин ендометрія має здатність як до базального продукування NH_3 в позаклітинне

середовище (23 ± 6) нмоль $\text{NH}_3 \cdot \text{год}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка, так і до ацетилхолінстимульованого (рис. 1). В останньому випадку цей процес суттєво пригнічується іонами фтору до рівня нижчого за контрольний. Цей факт свідчить на користь ферментзалежного біосинтезу NH_3 . F^- розглядають також як інгібітор АМФ-дезамінази, що зв'язують з пригніченням фторидом зворотного фосфорилування – дефосфорилування фермента [15, 19, 22, 24-25]. Грунтуючись на наших результатах, можна припустити роль АМФ-дезамінази в продукуванні NH_3 стромальними клітинами в позаклітинне середовище при стимуляції ацетилхоліном.

Відомо, що аміак легко проникає крізь мембрану і тому може суттєво змінювати рН цитоплазми міоцитів [9, 13, 34]. Дійсно, додавання розчину амонію до суспензії

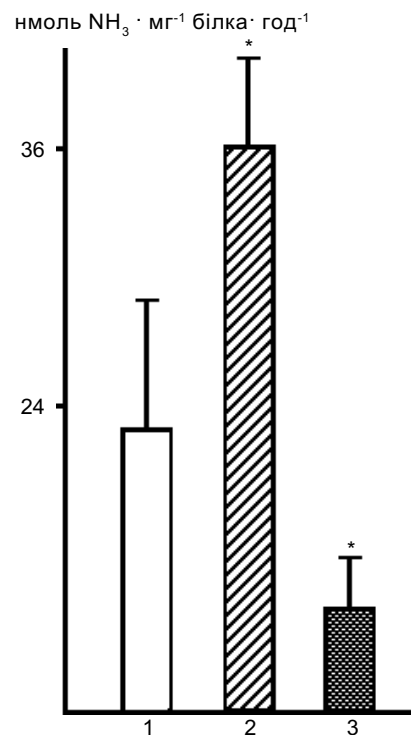


Рис. 1. Базальна продукція аміаку стромальними клітинами ендометрія в позаклітинне середовище (1) та при стимуляції клітин 1 мкмоль/л ацетилхоліном (2), а також пригнічення цих процесів F^- 0,1 ммоль/л (3). Концентрація позаклітинного Ca^{2+} 1 ммоль/л.

* $P < 0,05$ порівняно з контролем ($n=5$)

міоцитів супроводжується значним збільшенням pH_i приблизно від 6,7 в контролі до 8,1 (рис. 2). Одержані значення pH_i міоцитів, відповідно до використаного нами режиму вимірювання, є умовними величинами. Для порівняння, значення pH_i клітин у спокої, розраховане за рівнянням Нернста становить 6,4, а для м'язів судин – $7,1 \pm 0,1$ при $pH_o = 7,4$ та $37^\circ C$, у разі зниження температури pH_i стає більш низьким [16]. Залуження цитоплазми частково пригнічується інгібіторами каналного H^+ -транспорту [29] (4-амінопіридином і тетраетиламонієм). Ці дані свідчать, що додавання розчину амонію до суспензії міоцитів і відповідне залуження позаклітинного простору супроводжується посиленням трансмембранного виходу H^+ з цитоплазми, а значить, як можна припустити, створюються умови для збільшення значення ΔpH на плазмолемі при додаванні аміаку до суспензії міоцитів. На основі експериментальних даних можна висунути припущення, що вихід H^+ з цитоплазми при залуженні позаклітинного простору здійснюється як через канали, так і по неканальним механізмам,

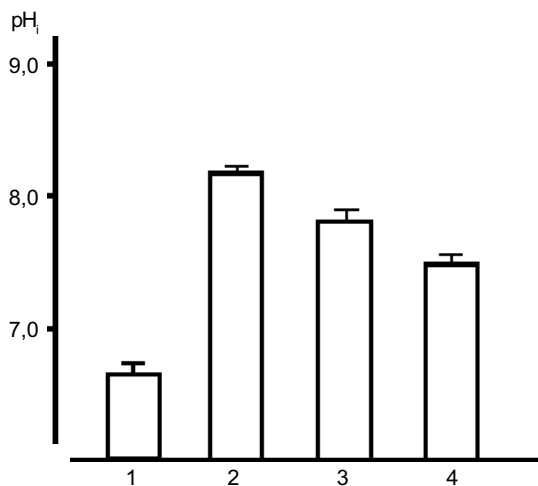


Рис. 2. Уявне значення pH_i цитоплазми міоцитів, виміряне з використанням флуоресцентного зонда ВСЕСФ-АМ в однохвильовому режимі: 1 – базальне значення pH_i міоцитів; 2 – за умови додавання 4 ммоль/л розчину амонію до суспензії клітин; 3 – за дії 0,1 ммоль/л 4-амінопіридину; 4 – за дії 0,1 ммоль/л тетраетиламонію ($t=25^\circ C$, $pH_o = 7,4$; $n=5$)

оскільки підвищення pH_i лише частково пригнічується інгібіторами водневих каналів. Швидкість цих процесів, набагато вища, ніж проникнення нейтрального аміаку в клітину, тому що провідність плазмалеми для H^+ становить близько 10^{-1} См/с, а для нейтрального аміаку — $2,6 \cdot 10^{-4}$ См/с (для заряджених катіонів амонію мембрана взагалі слабко проникна) [13, 34].

Попередніми дослідженнями [5] ми намагалися розкрити механізми раніше зареєстрованого стимулювального впливу трансмембранного градієнта протонів на пасивну кальцієву проникність плазмолемі міомерія. В їх основі, як ми припускаємо, лежать конформаційні зміни мембрани і, зокрема, зміни властивостей карбоксильних груп, які беруть безпосередню участь у рецепції і трансмембранному переносі Ca^{2+} . Можна висунути гіпотезу, що трансмембранний градієнт протонів і, відповідно, вихід H^+ з цитоплазми міоцитів збільшуються при залуженні позаклітинного середовища NH_3 , що стимулює надходження Ca^{2+} у міоцити. Для її підтвердження ми провели наступну серію досліджень.

Для вирішення поставленого питання ми обрали модельний процес лігандактивованого входу Ca^{2+} в міоцити за градієнтом концентрації. З результатів, представлених на рис. 3, бачимо, що ацетилхолін (0,1 ммоль/л) призводив до суттєвого підвищення вмісту вільного цитозольного Ca^{2+} в міоцитах від 147 нмоль/л ± 18 нмоль/л в контролі (базальний рівень Ca^{2+}) до 319 нмоль/л ± 93 нмоль/л за дії агоніста. Розрахована концентрація Ca^{2+} в цитозолі описаним вище методом є уявною величиною, але відповідає значенням, які отримані за використання *fura-2AM* у двоххвильовому режимі на інших клітинних об'єктах [1]. Ацетилхолініндуковане підвищення концентрації цитозольного Ca^{2+} повністю пригнічувалося блокаторами кальцієвої провідності L-типу [1, 6–8, 10, 11, 18, 26, 28] як неорганічної (1 ммоль/л Cd^{2+}), так і

органічної природи (1 нмоль/л ніфедипіну). Попередньо одержані результати свідчать на користь того, що стимуляція міоцитів агоністом в нашій моделі призводить до входу Ca^{2+} в цитозоль за градієнтом концентрації з позаклітинного середовища, що відповідає уявленню про існування в плазмолемі клітин міометрія кальцієвих каналів L-типу, причому додавання ацетилхоліну викликає деполаризацію посиленням неселективної катіонної проникності плазмолемі, а це призводить до активації кальцієвих каналів L-типу [7]. У цьому варіанті постановки експерименту встановлено, що залуження позаклітинного середовища розчином амонію призводило до посилення ацетилхолініндукованого входу Ca^{2+} в міоцити (див. рис. 3). Цей процес пригнічувався Cd^{2+} та ніфедипіном, що свідчить про посилення входу Ca^{2+} , опосередкованого кальцієвими каналами. Теоретично можливі такі пояснення цього явища: депротону-

вання зовнішньої (внутрішньої) частини кальцієвих каналів або/і модуляція градієнтом протонів кальцієвого транспорту. Не відкидаючи першого варіанта пояснення, на користь другого свідчать наступні експериментальні результати. По-перше, введення протонифора призводить до дуже інтенсивного зниження зазначеного ефекту, навіть нижче базальної концентрації Ca^{2+} . Це говорить про значення трансмембранного ΔpH не лише в механізмах амоній-стимульованого входу Ca^{2+} , але й в підтриманні базальної концентрації Ca^{2+} в міоцитах. Нагадаємо, що у стані спокою $\text{pH}_i < \text{pH}_o$, оскільки в нашому експерименті $\text{pH}_o \sim 7,4$ (розчин Хенкса), а уявне значення $\text{pH}_i \sim 6,7-6,75$. По-друге, специфічний інгібітор $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ -обмінника амілорид [13, 23, 30] суттєво підвищував стимульоване залуження посилення входу Ca^{2+} в міоцити, що можна пояснити лише пригніченням натрійзалежної компоненти транспорту H^+ .

Таким чином, аналіз наших результатів свідчить на користь можливості регуляції лігандактивованого пасивного транспорту Ca^{2+} розсіюванням трансмембранного градієнта протонів. Останній існує на плазмолемі міоцитів і може збільшуватися внаслідок продукування аміаку ендометрієм.

Роль дифундуючого з ендометрію аміаку в регуляції функціональної активності матки потребує подальшого дослідження, але вже на цьому етапі нам здається можливим припустити, що молекули NH_3 (чи NH_4^+) здатні відігравати роль паракринного регулятора в системі ендометрій – міометрій по аналогії з NO (NO_2^-) чи O_2^- (H_2O_2).

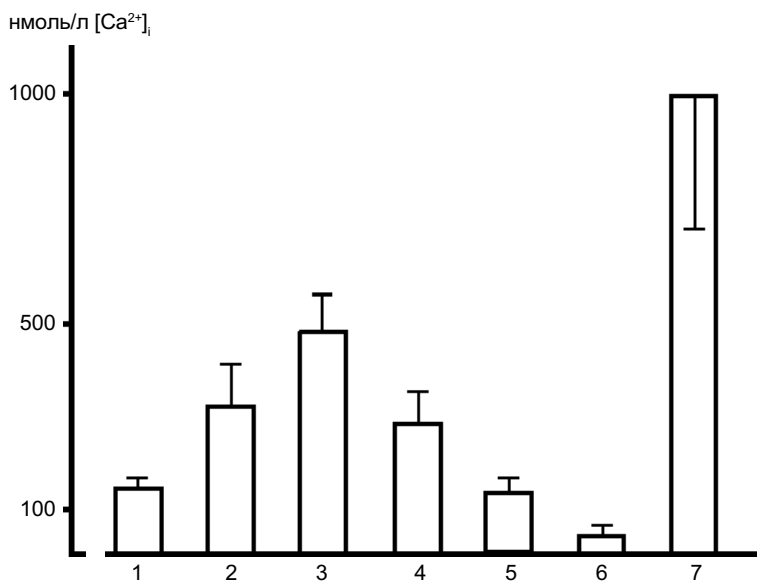


Рис. 3. Уявна концентрація цитозольного Ca^{2+} виміряна з використанням флуоресцентного зонда *fura-2*AM в однохвильовому режимі за таких умов: 1 – базальний рівень в клітинах без стимуляції; 2 – при дії 0,1 ммоль/л ацетилхоліну; 3 – активація 0,1 ммоль/л ацетилхоліном та 4 ммоль/л розчином амонію; 4 – інгібування останнього процесу 1 ммоль/л Cd^{2+} ; 5 – 1 нмоль/л ніфедипіном; 6 – 0,04% 2,4-динітрофенолом; 7 – додавання 0,1 ммоль/л амілориду за умови активації ацетилхоліном і розчином амонію ($t=25^\circ\text{C}$, pH_o 7.4; $n=5$)

Iu. V. Danylovych

POSSIBLE ROLE OF AMMONIUM IN PARACRINE REGULATIONS OF UTERUS FUNCTIONS

An opportunity of formation of ammonia (NH_3) in utera endometrium and its influence on exchange of Ca^{2+} and H^+ in plasmalemma of myometrium was investigated. Dissociation of endometrium stroma cells and myocytes suspension was carried from utera of pigs and rats in accordance with the traditional techniques. In suspension of stroma cells a rather high AMP-deaminase activity (53 ± 2 mmol IMP/hour on 1 mg of protein) was determined. It was demonstrated that ammonia release in extracellular space (measured by the changes of colouring of trinitrobenzolsulfonate acid) was significantly amplified by 1 mM acetylcholine and decreased by 0,1 mM fluoride ions, nonspecific AMP-deaminase inhibitor. It enables to assume a role of AMP-deaminase in formation of NH_3 by endometrium stroma cells and its release into extracellular space during acetylcholine stimulation. The addition of ammonia (4mM) to suspension of myocytes is accompanied by significant increase in pH (measured by the change in BCECF fluorescence) in extracellular and intracellular space, and the last parameter is inhibited by the blockers of passive H^+ transport across the membrane: 0,1 mM 4-aminopyridine and tetraethylammonium. It is possible that addition of ammonia-containing solution results in increase in proton gradient on myocyte membrane and in amplification of H^+ efflux. The opportunity of stimulation of acetylcholine-activated passive Ca^{2+} transport in myocytes by 4 mM NH_4^+ that was suppressed by 1 mM cadmium and 1 nM nifedipine was also shown using fluorescent probe FURA-2AM. The increase in Ca^{2+} concentration in cytoplasm in the given conditions is intensively oppressed by protonophore (0,04 % 2,4-dinitrophenol) and is effectively amplified by Na^+/H^+ -exchange inhibitor 0,1 mM amiloride. It is possible to assume an amplification of ligand-activated passive Ca^{2+} transport caused by dispersion of transmembrane proton gradient which exists on plasmalemma and can be increased by ammonia formation in endometrium. The role of diffused from endometrium NH_3 in regulation of utera functional activity requires further investigation, however already at this stage it is possible to assume, that NH_3 molecules (or ion NH_4^+) can carry out a role of paracrine regulator in the system endometrium-myometrium.

Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Авдонин П.В., Ткачук В.А. Рецепторы и внутриклеточный кальций. – М.: Наука, 1994. – 216 с.
2. Волин М. С., Дэвидсон К. А., Камински П. М. и др. Механизмы передачи сигнала оксидант–оксид азота в сосудистой ткани // Биохимия. – 1998. – **63**, № 7. – С. 958–965.
3. Вульфийус Е. А., Коваленко В. А. Холинорецепторы // Итоги науки и техники. ВИНТИ. – 1978. – **8**. – 206 с.
4. Данилович Ю. В. Вплив фізіологічно значущих подразників на $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обмін плазматичної мембрани міометрія // Укр. біохім. журн. – 2001. – **73**, №1. – С. 48–53.
5. Данилович Ю. В. Взаимосвязь образования NO и H_2O_2 и их роль в регуляции ионного гомеостаза клеток (обзор) // Там само. – 2001. – **73**, №3. – С.5–20.
6. Зима В.Л., Дячок О.М. Клеточные кальциевые сигналы: природа, регистрация и количественная оценка // Там само. – 2000. – **72**, №2. – С.5–8.
7. Костерин С.А. Транспорт кальция в гладких мышцах. – К.: Наук. думка, 1990. – 216 с.
8. Костюк П.Г. Кальций и внутриклеточная сигнализация. – М.: Наука, 1986. – 255 с.
9. Курский М. Д., Нечипоренко З. Ю., Тугай В. А. Освобождение Ca^{2+} из фрагментированного саркоплазматического ретикулума при дезаминировании AMP // Биохимия. – 1979. **44**, №10. – С. 1877–1883.
10. Кухарь В. П., Луйк А. И., Могилович С. Е. Химия биорегуляторных процессов. – К.: Наук. думка. 1991. – 368 с.
11. Рубцов А. М., Батрукова М. А. Кальциевые каналы (рианодиновые рецепторы) саркоплазматического ретикулума: структура и свойства (обзор) // Биохимия. – 1998. – **69**, №9. – С. 1091–1105.
12. Тимошенко Л. В., Коханевич Е. В., Травянюк Г. Д. Практическая гинекология. К.: Здоров'я. – 1988. – 320 с.
13. Тугай В. А. Регуляторная роль протона в мембранных процессах мышечной клетки. – К.: Наук. думка. – 1993. – 118 с.
14. Шинлова О. П. Транспорт Ca^{2+} в суспензии миоцитов и во фракции везикул сарколеммы миометрия : Автореф. дис. ...канд. биол. наук. – К.: 1992. – 22 с.
15. Abe M., Higuchi I., Morisaki H. et al. Myoadenylate deaminase deficiency with progressive muscle weakness and atrophy caused by new missense mutations in AMPD1 gene: case report in a Japanese patient // Neuromuscul. Disord. – 2000. **10**, №7. – P. 472–477.
16. Austin C., Wray S. Extracellular pH signals affect rat vascular tone by rapid transduction into intracellular pH changes // J. Physiol. – 1993. №466. – P. 1–8.
17. Bani D., Vaccari M. C., Nistri S. Relaxin up-regulates the nitric oxide biosynthetic pathway in the mouse uterus: involvement in the inhibition of myometrial contractility // Endocrinology. – 1999. – **140**, №10. – P. 4434–4441.
18. Corbett E. F., Michalak M. Calcium, a signaling molecule in the endoplasmic reticulum? // TIBS. – 2000. – **25**. – P. 307–311.
19. De Ruiter C.J., May A.M., van Engelen B.G. et al. Muscle function during repetitive moderate-intensity muscle contractions in myoadenylate deaminase-deficient Dutch subjects // Clin Sci (London). – 2002. – **102**, №5. – P. 531–539.

20. Gryniewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties // *J. Biol. Chem.* – 1985. – **260**, №6. – P. 3440–3450
21. Gruber W. F., Tchugguel W., Huber I. C. Progesteron and nitric oxide systems // *Zentralbl Gynakol.* 1997. – **119**, №2. – P 12–16.
22. Haas A.L., Sabina R.L. N-terminal extensions of the human AMPD2 polypeptide influence ATP regulation of isoform L // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2003. – **305**, №2. – P. 421–427
23. Haggerty I.G., Cragoe E.S., Slayman Ir.C.W., Adelberg E.A. Na^+/H^+ exchanger activity in the pig kidney epithelial cell line, LLC-PK1: inhibition by amiloride and its derivatives // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 1985. – **127**, №3. – P.759–767.
24. Hellsten Y., Richter E. A., Kiens B., Bangsbo J. AMP deamination and purine exchange in human skeletal muscle during and after intense exercise // *J. Physiol.* – 1999. – **520**, Pt 3. – P. 909–920.
25. Hohl A. M., Hohl C. M. Isolation and regulation of piglet cardiac AMP deaminase // *Mol. Cell Biochem.* – 1999. – **201**, №1–2. – P. 151–158.
26. Hill J. T., Daniel L., Wallace J. I. Calmodulin-peptide interactions: apocalmodulin binding to the myosin light chain kinase target-site // *Biochemistry.* – 2000. – №39. – P. 7284–7290.
27. Intracellular probes and reagents for pH, Ca^{2+} and heavy metals. Biological technical information. – Nwr York: Amer. Hoecnst corp. 1987. – 21 p.
28. Kuriyama H., Kitamura K., Itoh Y. Physiological features of visceral smooth muscle cells, with special reference to receptors and ion channels // *Physiol. Rev.* – 1998. – **78**, №3. – P.811–920.
29. Lukacs G. L., Kapus A., Nanda A. Proton conductance of the plasma membrane: properties, regulation, and functional role // *Amer. J. Physiol.* – 1993. – **265**, №1. C. 3–14.
30. Maly K., Strese K., Kampf S. Critical role of protein kinase Ca and calcium in growth factor induced activation of the Na^+/H^+ exchanger // *FEBS Let.* – 2002. – **521**. – P. 200–204.
31. Meyer-Klaucke W., Moir A.J., Ranieri-Raggi M. et al. Characterization of the zinc-binding site of the histidine-proline-rich glycoprotein associated with rabbit skeletal muscle AMP deaminase // *J. Biol. Chem.* – 2003. – **278**, №5. – P. 3176–3184.
32. Nagel-Starczynowska G., Nowak G., Kaletha K. Purification and properties of AMP-deaminase from human uterine smooth muscle // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1991. – **1073**, №3. – P. 470–473.
33. Schrier S. L. Humane erythrocyte membrane enzymes // *Blood.* – 1977. – **50**. – P. 227–237.
34. Schwartz J., Tripolone M. Characteris tscs of NH_4^+ and NH_3 transport across the isolated turtle urinary bladder // *Amer. J. Physiol.* – 1983. – **275**, №2. – P. 210–216.
35. Serratrice G. Muscular intolerance of exercise. Current data // *Presse Med.* – 1998. – **27**, №33. – P. 1683–1686.
36. Sladek S. M., Magness R. R., Conrad K. P. Nitric oxide and pregnancy // *Amer. J. Physiol.* – 1997. – **272**, №41. – P. 441–463.
37. The primate endometrium / Ed. Bulleti C., Gurrpide E. – New York: Acad. Sc. – 1991. – Vol. 622. – 499 p.
38. Yallampalli C., Dong Y.L., Cangula P.R., Fang L. Role and regulation of nitric oxide in the uterus during pregnancy and parturition // *J. Soc. Gynecol. Investig.* – 1998. – **5**, №2. – P. 58–67.

Ин-т біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ

Матеріал надійшов до редакції 27.02.2004