

Роль іонів калію у біосинтезі оксиду азоту в мітохондріях гладенького м'яза

Ю.В. Данилович, Г.В. Данилович, С.О. Костерін

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

Досліджено NO-синтазну активність (mtNOS) у мітохондріях гладенького м'яза матки щурів. Із застосуванням методу лазерної конфокальної мікроскопії та специфічних флуоресцентних зондів (MitoTracker Orange та DAF-FM) підтверджена мітохондріальна локалізація синтезу NO в міоцитах. На моделі ізольованих мітохондрій міометрія із застосуванням NO-чутливого флуоресцентного зонда DAF-FM та методу протокової цитометрії встановлено, що біосинтез оксиду азоту пригнічується на 50 % блокаторм конститутивних NO-синтаз 2-амінопіридином (100 мкмоль/л) та моноклональними антитілами (2,5 мкг anti-Letm1/50 мкг протеїну) до H^+ - Ca^{2+} -обмінника (протеїну Letm1), але нечутливий до інгібітора пори перехідної провідності циклоспорино А (5 мкмоль/л). Зниження концентрації іонів калію в реакційному середовищі та застосування інгібіторів різних типів калієвих каналів суттєво пригнічувало NO-синтазну реакцію, що дає змогу припустити важливе значення калієвої проникності внутрішньої мітохондріальної мембрани в регуляції активності mtNOS. Ключові слова: оксид азоту; мітохондрії; калієві канали; mtNOS; гладенькі м'язи.

ВСТУП

Функціональна активність мітохондрій, яка включає процеси споживання кисню, окисного фосфорилування, катаболізму ліпідів, біосинтезу гемму, підтримання гомеостазу Ca^{2+} , продукції активних форм кисню (АФК), апоптозу тощо значною мірою залежить від оксиду азоту. З'ясовано, що NO регулює енергетичні, метаболічні і транспортні процеси в мітохондріях [1]. Внутрішня мембрана останніх – ефективна мішень дії нітросполук, оскільки у складі локалізованих у ній ензимів високим є вміст тіольних залишків, залізо-сірчаних центрів, гемових груп, а в самій мембрані утворюється супероксид-аніон [2]. У разі низьких наномолярних концентрацій оксид азоту регулює гомеостаз Ca^{2+} в мітохондріях і, відповідно, Ca^{2+} -залежні процеси, модулює активність електронно-транспортного ланцюга, зворотно пригнічуючи цитохром с-оксидазу, контролює рН матрикса, обмежує інтенсивність дихання та окисного фосфорилування [1, 3, 4]. Надлиш-

© Ю.В. Данилович, Г.В. Данилович, С.О. Костерін

кова продукція NO на фоні посилення утворення супероксид-аніона в мітохондріях супроводжується генерацією значних кількостей пероксинітриду, пошкодженням компонентів електронно-транспортного ланцюга, незворотною деполяризацією органел і розвитком мітохондріальної дисфункції, яка може бути причиною апоптозу [5–7]. Наведені приклади свідчать, що як нормальне функціонування, так і загибель клітини значною мірою залежать від рівня продукції NO та інтенсивності генерації АФК саме в мітохондріях.

Наразі мітохондріальна локалізація NO-синтази (mtNOS) показана в різних органах та тканинах ссавців [2–4, 6]. Експериментальні дані вказують на те, що mtNOS постійно експресується в мітохондріях, є мембранозв'язаним ензимом і за біохімічними властивостями нагадує конститутивні NOS, зокрема нейрональну ізоформу [7]. У наших попередніх дослідженнях доведена можливість утворення оксиду азоту в мітохондріях клітин гладенького м'яза матки щурів. Встановлено, що синтез оксиду азоту в мітохондріях залежить

від ступеня їхньої енергізації та концентрації Ca^{2+} , пригнічується антагоністами кальмодуліну та інгібітором конститутивних NO-синтаз N^{G} -нітро-L-аргініном [8].

Іони калію відіграють провідну роль у молекулярній фізіології мітохондрій. Зокрема, транспорт K^{+} у внутрішній мітохондріальній мембрані регулює утворення АФК та забезпечує осморегуляцію. Існують відомості про функціонування різних підтипів K^{+} -каналів у внутрішній мітохондріальній мембрані: АТФ-чутливих (міто $\text{K}_{\text{АТФ}}$), потенціалкеро-ваних, Ca^{2+} -активованих (високої, низької та проміжної провідностей), рН-чутливих, двопорових (TASK 3) тощо [9, 10]. За фізіологічних умов (нормоксії) стимуляція міто $\text{K}_{\text{АТФ}}$ призводить до посилення генерації АФК як сигнальних молекул, що супроводжується зниженням електричного потенціалу на внутрішній мітохондріальній мембрані, помірним роз'єднанням окиснення та фосфорилування з наступним зменшенням генерації АФК. Часткова деполаризація мітохондрій захищає від Ca^{2+} -перевантаження та наступного відкривання пори перехідної провідності. Цей механізм може мати важливе значення для запобігання мітохондріальної дисфункції за умов ішемії–реперфузії та відповідного розвитку оксидативного стресу [9]. Активация K^{+} -каналів призводить до стимуляції транспорту K^{+} у матрикс, посилення роботи аніонних каналів, накопичення Cl^{-} у мітохондріях. Ці іонні процеси зумовлюють рух води в органели, спричинений порушенням осмотичної рівноваги, і їхнє набухання. Протидіє зазначеним явищам робота H^{+} - K^{+} -обмінника. За мітохондріальної дисфункції відбувається незворотна деполаризація внутрішньої мітохондріальної мембрани, відкривання пори перехідної провідності і процес набухання стає неконтрольованим [9, 11–13]. Існують докази того, що NO протидіє зазначеним процесам, маючи протекторну щодо мітохондрій функцію [14, 15].

Для тестування утворення оксиду азоту часто застосовують сучасний і надійний

NO-чутливий флуоресцентний зонд DAF-FM. Зазначений барвник дає змогу зареєструвати наявність NO за низьких концентрацій у клітинах і субклітинних структурах та відносно стійкий до дії лазерного променя. DAF-FM безпосередньо взаємодіє з NO за наявності O_2 , внаслідок чого утворюється триазоло-флуоресцеїнове похідне [8].

Метою нашої роботи було дослідження закономірностей біосинтезу NO мітохондріями міометрія, зокрема, залежності цього процесу від концентрації іонів калію в поза-мітохондріальному середовищі.

МЕТОДИКА

У досліді використовували статевозрілих невагітних нелінійних щурів віком 2 міс, середньою масою тіла 200 г, масою матки 350–600 мг. Тварин вводили в стан наркозу витримуванням у камері, збагаченій парами хлороформу, після чого декапітували. Усі маніпуляції з тваринами були проведені відповідно до Закону України № 3447 IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» та Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та наукових цілей (Страсбург, 1986).

Міоцити виділяли з матки щурів із застосуванням колагенази та соєвого інгібітора трипсину за методом Молларда [16]. Імобілізацію клітин для конфокальних зйомок, відмивання неприкріплених об'єктів і всі експериментальні дослідження з міоцитами проводили в фізіологічному середовищі Хенкса.

Просторовий розподіл флуоресцентних барвників у клітинах досліджували на лазерному скануючому конфокальному мікроскопі LSM 510 META (“Carl Zeiss”, Німеччина) із використанням іммобілізованих на полі-L-лізині міоцитів. Для візуалізації мітохондрій був залучений флуоресцентний барвник MitoTracker Orange CM-H₂TMRos у концентрації 200 нмоль/л, а для візуалізації ядра клітини – 50 мкмоль/л Hoechst 33342.

Навантаження іммобілізованих міоцитів NO-чутливим флуоресцентним зондом DAF-FM у концентрації 10 мкмоль/л відбувалося протягом 15 хв при 24 °C як описано нами раніше [8]. Експерименти на конфокальному мікроскопі проводили у режимі Multi Track. Флуоресценцію Hoechst 33342 збуджували за допомогою лазера на довжині хвилі 405 нм, а для реєстрації сигналу використовували світлофільтр BP 420–480. Для збудження флуоресценції MitoTracker Orange CM-H₂TMRos застосовували лазер з довжиною хвилі 543 нм, а флуоресценцію реєстрували в діапазоні 560–615 нм (світлофільтр BP 560–615). Збудження флуоресценції DAF-FM здійснювали на довжині хвилі 495 нм, а її реєстрацію – в діапазоні 505–530 нм (світлофільтр BP 505–530).

Препарат ізольованих мітохондрій одержували з міометрія щурів за допомогою стандартного підходу із застосуванням диференційного центрифугування [17]. Вміст протеїну у фракції визначали методом Bradford за його реакцією з реактивом кумасі G-250.

Навантаження мітохондрій NO-чутливим флуоресцентним зондом DAF-FM-DA (diaminofluorescein-FM-diacetate) у концентрації 5 мкмоль/л проводили в середовищі, яке містило 10 ммоль/л HEPES (pH 7,4, 25 °C), 250 ммоль/л цукрози, 0,1% бичачого сироваткового альбуміну, 0,02% Pluronic F-127 (для покращення процесу навантаження) протягом 30 хв при 25 °C. Склад робочого (реакційного) середовища при визначенні NO-синтазної активності (об'єм 2 мл, ммоль/л): HEPES – 20 (pH 7,4, 25 °C), K⁺-фосфатний буфер – 2 (pH 7,4, 25 °C), KCl – 125, NaCl – 25, піруват – 5, сукцинат – 5, L-аргінін – 0,05, Ca²⁺ – 0,1, НАДФН – 0,01, тетрагідробіоптерин (BH₄) – 0,01. Вміст протеїну в мітохондріальній фракції становив 15–20 мкг в 50 мкл. Реакцію ініціювали внесенням аліквоти 20 мкл L-аргініну і Ca²⁺. Час інкубації – 30 хв. Виміри проводили із застосуванням протокового цитометра COULTER EPICS XL™ («Beckman Coulter», США) з аргоновим лазером ($\lambda_{36} = 488$ нм, $\lambda_{фл} = 515$ нм; канал F11).

Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали загальноприйнятими методами. Вірогідність різниці середнього арифметичного визначали за критерієм t Стьюдента. Розрахунки проводили за допомогою стандартного програмного забезпечення MS Office Excell.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На початку цього дослідження ми підтвердили можливість утворення оксиду азоту в мітохондріях клітин гладенького м'яза матки з застосуванням лазерної конфокальної мікроскопії. Продемонстрована колокалізація DAF-FM та специфічного щодо мітохондрій флуоресцентного барвника MitoTracker Orange в свіжовиділених міоцитах матки (рис. 1).

Для коректного оцінювання біосинтезу NO мітохондріями в суспензії доцільно застосувати метод протокової цитометрії. Цей підхід дає змогу аналізувати флуоресцентний сигнал саме від мітохондріальних частинок, а також забезпечує оптимальне співвідношення сигнал/шум. Мітохондрії в робочому середовищі, яке містило субстрати дихання, а саме 5 ммоль/л пірувату і сукцинату, та сбалансований іонний склад мали здатність до ендогенної продукції NO (рис. 2, контроль). Послідовне внесення до інкубаційного середовища 1 мкмоль/л L-аргініну та 100 мкмоль/л Ca²⁺ призводило до достовірного посилення біосинтезу оксиду азоту відносно контрольних значень. Додавання 10 мкмоль/л НАДФН також спричинювало подальше зростання NO-синтазної активності. Водночас внесення до реакційного середовища BH₄ не стимулювало активність mtNOS.

Діючі концентрації речовин використовували з урахуванням даних подібних експериментів на інших об'єктах [2, 3, 18]. Слід відзначити, що ізольовані мітохондрії мають базальну NO-синтазну активність за відсутності кофакторів та субстрату, що свідчить про наявність необхідних реакційних

компонентів у матриксі в достатній кількості та енергізований стан мітохондрій у середовищі із піруватом та сукцинатом. Відомо, що енергізовані мітохондрії серця синтезують NO навіть за відсутності екзогенного Ca^{2+} через достатню для прояву ензиматичної активності концентрацію катіона в матриксі [3]. Незалежний від позамітохондріального Ca^{2+} біосинтез NO спостерігається і в наших експериментах. Втім додавання до мітохондрій кардіоміоцитів мишей та щурів іонів Са призводило до посилення продукції NO, а відомі інгібітори транспорту Ca^{2+} екстрамітохондріальні Mg^{2+} та рутенієвий червоний її пригнічували [3]. Біосинтез оксиду азоту мітохондріями міометрія також залежить від концентрації екзогенного Ca^{2+} (див. рис. 2). Хоча внесення до інкубаційного середовища основного джерела електронів у позамітохондріальних NOS НАДФН мало наслідком подальше зростання продукції NO, додавання кофактора і дисоціюючого переносника елек-

тронів BH_4 не спричинювало вірогідної різниці у біосинтезі NO. Можливо, ці результати пояснюються достатньою енергізацією мітохондрій в умовах наших дослідів (наявність у середовищі сукцинату та пірувату як субстратів дихання) на фоні функціонального спряження mtNOS із дихальним ланцюгом [3, 5, 19]. У мітохондріях кардіоміоцитів продукція АФК збільшувалась, а NO – зменшувалась за нестачі L-аргініну або BH_4 [18]. Отже, згідно з цитованими даними, наявність останнього в інкубаційному середовищі є обов'язковою умовою коректного тестування NO-синтазної активності. Це враховувалося нами в подальших дослідях. Через достатню кількість кальмодуліну та флавінових нуклеотидів в мітохондріях, ці кофактори додатково не вносили в середовище інкубації. Отже, для надійного тестування біосинтезу NO в мітохондріях міометрія в складі реакційного середовища необхідним є наявність L-аргініну, Ca^{2+} , НАДФН та BH_4 .

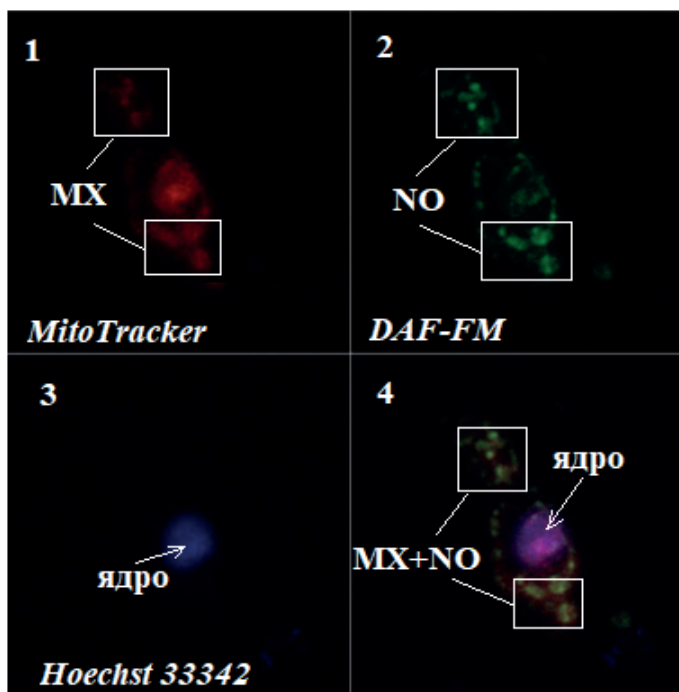


Рис. 1. Розподіл флуоресцентних зондів у міоциті: 1 – MitoTracker Orange CM-H2TMROS (200 нмоль/л), 2 – DAF-FM (10 мкмоль/л), 3 – Hoechst 33342 (50 мкмоль/л), 4 – колокалізація флуоресцентних зондів MitoTracker та DAF-FM. Прямокутниками виділені ділянки колокалізації. MX – мітохондрії

У разі внесення до реакційного середовища відомого інгібітора конститутивних NOS 2-амінопіридину спостерігали ефективно пригнічення активності mtNOS (рис. 3). Напівмаксимальний гальмівний ефект був при концентрації 100 мкмоль/л. Цей факт свідчить, що mtNOS відноситься до конститутивного типу NO і, можливо, є сплайс-варіантом нейрональної ізоформи, оскільки 2-амінопіридин розглядається як відносно специфічний інгібітор саме цього мітохондріального ензиму [20].

Значення іонів Ca- та Ca²⁺-транспортувальних систем внутрішньої мітохондріальної мембрани у функціонуванні mtNOS доводять досліді з моноклональними антитілами до протеїну LETM1. У разі мітохондрій гладенького м'язу матки детально вивчені властивості двох систем, які забезпечують Ca²⁺-гомеостаз матриксу: Ca²⁺-уніпортер і H⁺-Ca²⁺-обмінник [21, 22]. Останній, як продемонстровано в наших попередніх дослідженнях [22], репрезентований протеїном LETM1, здійснюється в стехіометрії 1:1, активуються за фізіологічних значень рН і працює в зворотному режимі. За умов пригнічення цієї транспортувальної системи

моноклональними антитілами (див. рис. 3) біосинтез оксиду азоту мітохондріями суттєво пригнічується. Водночас mtNOS виявилася майже резистентною до дії циклоспорину А (див. рис. 3). Тобто циклоспоринчутлива пора перехідної провідності не відіграє суттєву роль у Ca²⁺-залежному біосинтезі NO за умов нашого експерименту. У разі ізольованих мітохондрій кардіоміоцитів іони Ca в концентрації 100 мкмоль/л викликали набухання органел [23]. Втім у нашому експерименті, тобто при посиленій генерації оксиду азоту, NO виявляє протекторну щодо мітохондрій функцію і протидіє набуханням [14]. Це узгоджується з даними щодо пригнічення оксидом азоту пори перехідної провідності [15].

Максимальна активність mtNOS спостерігається при концентраціях екзогенного калію, що близькі до фізіологічних у цитозолі, а саме 125 ммоль/л. Послідовна ізотонічна заміна в реакційному середовищі хлориду калію на холіну хлорид і відповідне зниження екзогенної концентрації катіона до 100–75–50–25–0 ммоль/л призводила до суттєвого зниження NO-синтазної здатності мітохондрій. За відсутності K⁺ в інкубаційному середовищі enzymатична активність

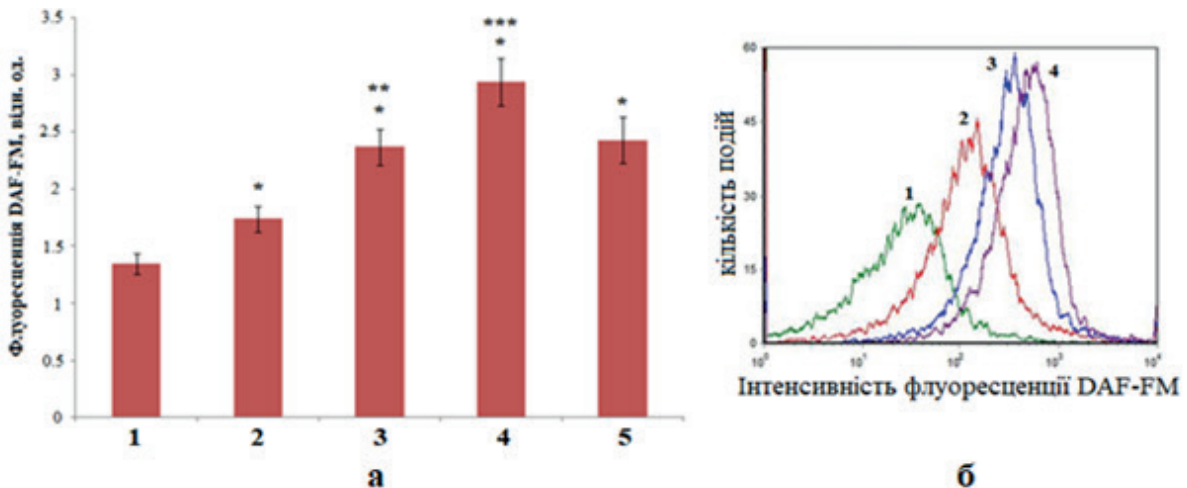


Рис. 2. Залежність активності мітохондріальної NO-синтази від наявності субстрату та кофакторів у середовищі інкубації (а); б – зміщення піків інтенсивності флуоресценції за умов різного складу середовища інкубації: 1 – контроль, 2 – 1 мкмоль/л L-аргінін, 3 – L-аргінін і 100 мкмоль/л Ca²⁺, 4 – L-аргінін, Ca²⁺ і 10 мкмоль/л НАДФН, 5 – L-аргінін, Ca²⁺, НАДФН і 10 мкмоль/л ВН₄. *P < 0,05 відносно контролю, **P < 0,05 відносно наявності L-аргініну, ***P = 0,05 відносно наявності L-аргініну і Ca²⁺ (n = 7)

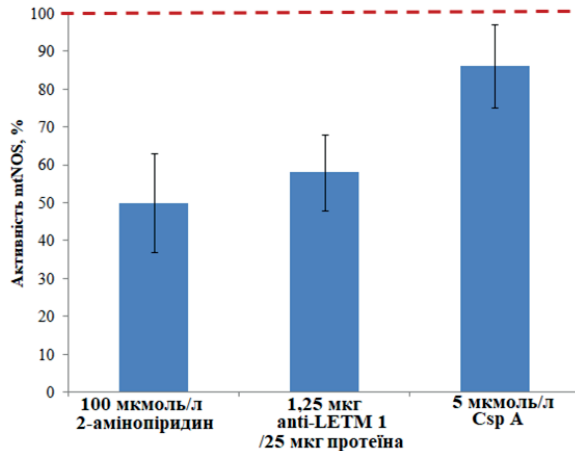


Рис. 3. Вплив інгібіторів конститутивних NO-синтаз (2-амінопіридину) та систем Ca^{2+} -обміну в мітохондріях (антитіл до LETM 1 та циклоспорину А, Csp A) на активність mtNOS. За 100% прийнята ензиматична активність за відсутності інгібіторів ($n = 7$)

знижується на 70% (рис. 4).

Ці результати переконливо свідчать про першочергове значення іонів калію в функціонуванні mtNOS. У попередніх наших дослідженнях показано, що спричинене гіперкальцієвим розчином набування мітохондрій суттєво пригнічується блокаторами різних підтипів K^+ -каналів внутрішньої мембрани, що свідчить про їх можливу функціональну активність у разі мітохондрій міометрія [14]. У цитованій праці ми використали малоспецифічні інгібітори K^+ -проникності тетраетиламоній та 4-амінопіридин (істотно пригнічують активність потенціалкеро-ваних K^+ -каналів), а також більш селективні інгібітори, зокрема, міто K_{ATP} (глібенкламід) та Ca^{2+} -залежних K^+ -каналів (харібдотоксин). Усі зазначені сполуки призводили до ефективного гальмування NO-синтазної здатності мітохондрій (рис. 5), що доводить суттєву роль K^+ -проникності у функціонуванні mtNOS.

Ми припускаємо, що одним з механізмів дії іонів калію на біосинтез NO у мітохондріях може бути вплив на Ca^{2+} -гомеостаз матриксу. Річ у тому, що спочатку LETM1 був описаний як протеїн, що забезпечує

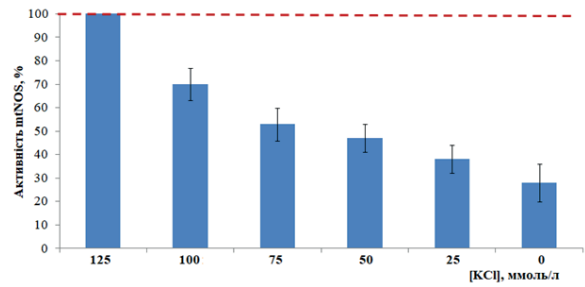


Рис. 4. Зміни активності mtNOS за умов ізотонічної заміни в реакційному середовищі хлориду калію на холіну хлорид ($n = 7$)

H^+ - K^+ -обмін у внутрішній мітохондріальній мембрані [24]. Це свідчить про тісний функціональний і структурний взаємозв'язок H^+ - Ca^{2+} - та H^+ - K^+ -обміну, а, отже, і істотне значення позамітохондріального K^+ у регуляції мітохондріальної концентрації Ca^{2+} та Ca^{2+} -залежного біосинтезу NO. З іншого боку, регулювання об'єму матриксу має важливе значення для функціонування мітохондрій. Зокрема, він впливає на інтенсивність дихання та продукування АТФ. Існує кореляція між змінами геометрії органел та такими явищами, як генерація АФК, поляризація внутрішньої мітохондріальної мембрани, здатність до апоптозу тощо. В цьому сенсі можна припустити зв'язок між функціонуванням міто K_{ATP} та H^+ - K^+ -обмінника, яке залежить від концентрації K^+ , об'ємом міто-

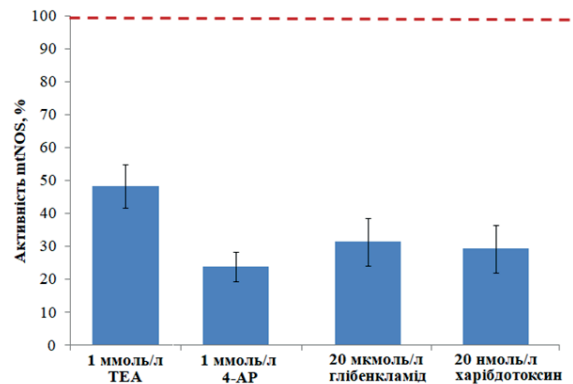


Рис. 5. Вплив інгібіторів K^+ -каналів тетраетиламонію (ТЕА), 4-амінопіридину (4-АР), глібенкламїду та харібдотоксину на активність mtNOS. За 100% прийнята ензиматична активність без інгібіторів ($n = 7$)

хондрій (осмосигналінгом), інтенсивністю синтезу NO. Зміни в біосинтезі оксиду азоту, в свою чергу, будуть впливати як на активність K^+ -каналів (це надійно показано на плазматичній мембрані), так і на осморегуляцію. Стимуляція міто K_{ATP} оксидом азоту безпосередньо нітрозилуванням або через систему NO/cGMP/PKG є встановленим і добре описаним фактом [25]. Припускають, що за цим механізмом може реалізовуватися протекторна щодо мітохондрій функція оксиду азоту, зокрема при ішемії–реперфузії міокарда [26]. Важливість з'ясування молекулярно-фізіологічних механізмів захисту від мітохондріальної дисфункції буде спрямовувати наші подальші дослідження на вивчення взаємозв'язку системи NO та K^+ -проникності в мітохондріях.

ВИСНОВКИ

Таким чином, у мітохондріях гладенького м'яза матки відбувається NO-синтазна реакція, яка пригнічується інгібітором конститутивних NO-синтаз 2-амінопіридином, моноклональними антитілами до H^+ - Ca^{2+} -обмінника (протеїну LETM1) та нечутлива до блокування пори перехідної проникності циклоспорином А. Ця ензиматична система суттєво залежить від концентрації K^+ у реакційному середовищі, а синтез оксиду азоту пригнічується при застосуванні інгібіторів K^+ -каналів внутрішньої мітохондріальної мембрани. Одержані результати дають змогу припустити, що іони калію здійснюють регуляцію mtNOS, можливо впливаючи на концентрацію Ca^{2+} в матриксі або через механізми осмосигналінгу.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.

**Ю.В. Данилович, А.В. Данилович,
С.А. Костерин**

РОЛЬ ИОНОВ КАЛИЯ В БИОСИНТЕЗЕ ОКСИДА АЗОТА В МИТОХОНДРИЯХ ГЛАДКОЙ МЫШЦЫ

Исследована NO-синтазная активность (mtNOS) в митохондриях гладкой мышцы матки крысы. Методом лазерной конфокальной микроскопии с использованием специфических флуоресцентных зондов (MitoTracker Orange и DAF-FM) доказана митохондриальная локализация синтеза NO в миоцитах. На модели изолированных митохондрий миомерия с использованием NO-чувствительного флуоресцентного зонда DAF-FM и метода проточной цитометрии продемонстрировано, что биосинтез оксида азота снижается на 50% в присутствии блокатора конститутивных NO-синтаз 2-аминопиридина (100 мкмоль/л) и моноклональных антител (2,5 мкг anti-Letm1/50 мкг протеина) к H^+ - Ca^{2+} -обменнику (протеина Letm1), но не чувствителен к ингибитору поры переходной проводимости циклоспорино А (5 мкмоль/л). Снижение концентрации ионов калия в среде инкубации и присутствие ингибиторов калиевых каналов разного типа значительно ингибирует NO-синтазную реакцию, что позволяет допустить важное значение калиевой проницаемости внутренней мембраны митохондрий в регуляции активности mtNOS.

Ключевые слова: оксид азота; митохондрии; калиевые каналы; mtNOS; гладкие мышцы.

Yu.V. Danylovych, H.V. Danylovych, S.O. Kosterin

ROLE OF POTASSIUM IONS IN NITRIC OXIDE BIOSYNTHESIS BY SMOOTH MUSCLE MITOCHONDRIA

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

The NO-synthase activity (mtNOS) in mitochondria of uterine smooth muscle was studied. The mitochondrial localization of NO synthesis in myocytes was proved using laser confocal microscopy method and specific fluorescent probes MitoTracker Orange (specific to mitochondria) and DAF-FM (NO-sensitive fluorescent probe). It was demonstrated using flow cytometry that nitric oxide biosynthesis in isolated mitochondria decreased in the presence of a constitutive NO-synthase blocker 2-aminopyridine (100 μ mol/l, 50% inhibition) and monoclonal antibodies (2.5 μ g anti-Letm1/50 μ g protein) against the H^+ - Ca^{2+} -exchanger (Letm1 protein), but was not sensitive to the mitochondrial permeability transition pore inhibitor cyclosporin A (5 μ mol/l). A decrease of potassium ions concentration in the incubation medium and the presence of various types of potassium channel inhibitors significantly inhibited the NO-synthase reaction. We have concluded that potassium permeability of the inner mitochondrial membrane plays important role in the regulation of mtNOS activity.

Key words: nitric oxide; mitochondria; potassium channels; mtNOS; smooth muscle.

REFERENCES

1. Fernando V, Zheng X, Walia Y, Sharma V, Letson J, Furuta S S-Nitrosylation: An emerging paradigm of redox signaling. *Antioxidants*. 2019;8:404.
2. Giulivi C. Mitochondria as generators and targets of nitric oxide. *Novartis Found Symp*. 2007;287:92-104.
3. Zaubornyj T, Ghafourifar P. Strategic localization of heart mitochondrial NOS: a review of the evidence. *Am J Physiol: Heart Circ Physiol*. 2012;303(11):H1283-93.
4. Traaseth N, Elfering S, Solien J, Haynes V, Giulivi C. Role of calcium signaling in activation of mitochondrial nitric oxide synthase and citric acid cycle. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1658(1-2):64-71.
5. Levine AB, Punihaole D, Levine TB. Characterization of the role of nitric oxide and its clinical applications. *Cardiology*. 2012;122:55-68.
6. Davidson SM, Duchon MR. Effects of NO on mitochondrial function in cardiomyocytes: pathophysiological relevance. *Cardiovascul Res*. 2006;71(1):10-21.
7. Litvinova L, Atochin DN, Fattakhov N, Vasilenko M, Zatokin P, Kirienkova E. Nitric oxide and mitochondria in metabolic syndrome. *Front Physiol*. 2015;6:20.
8. Danylovyh HV, Danylovyh Yu V, Bohach TV, Hurska VT, Kosterin SO. Sources and regularity of nitric oxide synthesis in uterus smooth muscle cells. *Ukr Biochem J*. 2019;91(4):33-40. [Ukrainian].
9. Vadziuk OB. ATP-sensitive K^{+} -channels in muscle cells: features and physiological role. *Ukr Biochem J*. 2014;86(3):5-22. [Ukrainian].
10. Szabo I, Zoratti M. Mitochondrial channels: ion fluxes and more. *Physiol Rev*. 2014;94(2):519-608.
11. Kaasik A, Safulina D, Zharkovsky A, Veksler V. Regulation of mitochondrial matrix volume. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;292:C157-C63.
12. Nowikovski K, Schweyen RJ, Bernardi P. Pathophysiology of mitochondrial volume homeostasis: potassium transport and permeability transition. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1787(5):345-50.
13. Strutyn'ska NA, Strutyn'skyi RB, Chorna SV, Semenykhina OM, Mys'LA, Moibenko OO, Sahach VF. New fluorine-containing openers of ATP-sensitive potassium channels flokalin and tioflokalin inhibit calcium-induced mitochondrial pore opening in rat hearts. *Fiziol Zh*. 2013;59(6):3-11. [Ukrainian].
14. Danylovyh Yu V, Chunikhin AY, Danylovyh GV, Kolomiets OV. The use of the Petri net method in the simulation modeling of mitochondrial swelling. *Ukr Biochem J*. 2016;88(4):66-74. [Ukrainian].
15. Leite ACR, Oliveira HCF, Utino FL, Garcia R, Alberici LC, Fernandes MP, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria generated nitric oxide protects against permeability transition via formation of membrane protein S-nitrosothiols. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1797(6-7):1210-16.
16. Mollard P, Mironneau J, Amedee T, et al. Electrophysiological characterization of single pregnant rat myometrial cells in short-term primary culture. *Am J Physiol Cell Physiol*. 1986;250(1):C47-C54.
17. Kosterin S.A, Bratkova NF, Kurskii MD. The role of sarcolemma and mitochondria in calcium-dependent control of myometrium relaxation. *Biochemistry*. 1985;50(8):1350-61. [Russian].
18. Dedkova EN, Blatter LA. Characteristics and function of cardiac mitochondrial nitric oxide synthase. *J Physiol*. 2009; 587(Part 4):851-72.
19. Franco MC, Antico Arciuch VG, Peralta JG, Galli S, Levisman D, Lopez LM, Romorini L, Poderoso JJ, Carreras MC. Hypothyroid phenotype is contributed by mitochondrial complex I inactivation due to translocated neuronal nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*. 2006; 281(8): 4779-86.
20. Lawton GR, Ranaivo HR, Chico LK, Ji H, Xue F, Martásek P, Roman LJ, Watterson DM, Silverman RB. Analogues of 2-aminopyridine-based selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase with increased bioavailability. *Bioorg Med Chem*. 2009;17(6):2371-80.
21. Kolomiets OV, Danylovyh YuV, Danylovyh GV, Kosterin SO. Ca^{2+} accumulation study in isolated smooth muscle mitochondria using Fluo-4 AM. *Ukr Biokhim Zh*. 2013;85(4):30-9. [Ukrainian].
22. Kolomiets OV, Danylovyh YuV, Danylovyh GV. H^{+} - Ca^{2+} exchanger in the myometrium mitochondria: Modulation by exogenous and endogenous compounds. *Int J Phys Pathophys*. 2015;6(4):287-97.
23. Strutyn'ska NA, Semenykhina OM, Chorna SV, Vavilova HL, Sahach VF. Hydrogen sulfide inhibits Ca^{2+} -induced mitochondrial permeability transition pore opening in adult and old rat heart. *Fiziol Zh*. 2011;57(6):3-14. [Ukrainian].
24. Shao J, Fu Z, Ji Y, Guan X, Guo S, Ding Z, Yang X, Cong Y, Shen Y. Leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1 (LETM1) forms a Ca^{2+}/H^{+} antiporter. *Sci Rep*. 2016;6:341-74.
25. Walewska A, Szewczyk A, Koproński P. Gas signaling molecules and mitochondrial potassium channels. *Int J Mol Sci*. 2018;19(10):3227.
26. Bai Y, Murakami MH, Iwasa M, Sumi S, Yamada Y, Ushikoshi H, Aoyama T, Nishigaki K, Takemura G, Uno B, Minatoguchi S. Cilostazol protects the heart against ischemia reperfusion injury in a rabbit model of myocardial infarction: focus on adenosine, nitric oxide and mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 201;38(10):658-65.

Матеріал надійшов до редакції 06.11.2020