ОГЛЯДИ

УДК 577.352.4

Mg^{2+},АТР-ЗАЛЕЖНА КАЛЬЦІЄВА ПОМПА ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВИХ КЛІТИН. II. РЕГУЛЯЦІЯ АКТИВНОСТІ

Т. О. ВЕКЛІЧ, Ю. Ю. МАЗУР, С. О. КОСТЕРІН

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: veklich@biochem.kiev.ua, yuliya.vorona@gmail.com

Ca^{2+}-помпа плазматичної мембрани є одним із ключових протеїнів, які беруть участь у процесах обміну іонів Ca в гладеньком'язових клітинах. Її функції є досить різноманітними: від контролю базальної цитоплазматичної концентрації Ca^{2+} – до регуляції протеїнів, що залучені у Ca^{2+}-залежні сигнальні каскади, і часто залежать від ізоформи або навіть від форми альтернативного сплайсингу вказаного вище протеїну. Зважаючи на досить різноматні функції та властивості Ca^{2+}-помпи плазматичної мембрани, які детально було розглянуто в першій частині нашого огляду (Ukr. Biochem. J., 2015, 87, № 1), важливим, з точки зору функціонування клітини, є прецизійна регуляція її активності. Тому друга частина огляду присвячена саме висвітленню різноматніх факторів регуляції активності Ca^{2+}-помпи плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин: як ендогенних, так і екзогенних, біотичних та абіотичних чинників. Особлива увага приділяється даним літератури та власним результатам, пов'язаним із розробкою та пошуком селективного інгібітора Ca^{2+}-помпи плазматичної мембрани, який дозволив би прискіпливіше вивчати її функціональні особливості в гладеньком'язових клітинах.

Ключові слова: Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРаза, плазматична мембрана, гладеньком'язові клітини, міометрій, калікс[4]арени.

У першій частині нашого огляду (*Ukr. Biochem. J.*, 2015, 87, № 1) було розглянуто структурні особливості Ca^{2+}-помпи плазматичної мембрани (ПМ), молекулярну біологію цього протеїну, кінетичні властивості та функції, які Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРаза виконує в гладеньком'язових клітинах. Питанням, яке заслуговує особливої уваги, є регуляція активності Ca^{2+}-помпи ПМ, оскільки це є системою складних зворотних та взаємозалежних шляхів. Наприклад, активність цієї помпи змінюється в залежності від цитоплазматичного Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_c$) завдяки Ca^{2+}-зв'язувальному протеїну – кальмодуліну. Оскільки зазначений протеїн є трансмембранним, на його активність опосередковано чи безпосередньо значною мірою впливає мембранний потенціал і мембранне оточення: якісний та кількісний вміст ліпідів, стан їх окислення; фактори, що впливають на стан мембрани, такі як вільні радикали, органічні розчинники також змінюють функціонування Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази. Крім того, активність помпи залежить від впливу великої кількості сполук: простагландинів, пептидних та стероїдних гормонів, внутрішньоклітинних факторів, компонентів різноманітних сигнальних шляхів.

Зважаючи на складну регуляцію та багатогранну роль Ca^{2+}-помпи ПМ у функціонуванні гладеньком'язових клітин, відкритим лишається питання щодо ролі помпи у формуванні патологічних станів гладенького м'яза (ГМ), у фармакології та корекції скоротливих дисфункцій. У цьому аспекті важливим є пошук та розробка нетоксичного селективного інгібітора Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази ПМ для широкого використання в практичній медицині. Натепер такими інгібіторами можуть бути калоксини

та калікс[4]арени – речовини пептидної природи та циклічні олігомери фенолів відповідно, недоліки та переваги яких детальніше розглянуто в цьому огляді.

1. Регуляція та модифікація активності Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин

Виконуючи в клітинах роль регуляторної системи концентрації іонів Ca, Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРаза ПМ сама є мішенню для великої кількості регуляторів. Її активність та спорідненість до Ca^{2+} можуть значною мірою модулюватися фізико-хімічними та багатьма протеїновими і непротеїновими факторами – кальмодуліном, кислими фосфоліпідами ПМ, двовалентними іонами, cAMP-залежною протеїнкіназою А (ПКА) та протеїнкіназою С (ПКС), процесом обмеженого протеолізу тощо.

1.1. Фізико-хімічні фактори, що впливають на активність кальцієвої помпи

1.1.1. Мембранний потенціал

У дослідах на фракції везикул ПМ міометрія показано, що електричний потенціал, створений за допомогою градієнта K^+ (система «K^+-валіноміцин»), стимулює енергозалежне (тобто спричинене активністю Mg^{2+},АТР-залежної Ca^{2+}-помпи ПМ) перенесення Ca^{2+}. Електричний потенціал у діапазоні від 0 до -80 мВ впливав на початкову швидкість акумуляції Ca^{2+}, але не на максимальну кількість накопиченого Ca^{2+}. Тобто від'ємний потенціал активував Ca^{2+}-помпу ПМ гладеньком'язових клітин (ГМК). При цьому мало місце збільшення числа обертів ензиму, але не змінювалася спорідненість до субстрату переносу. Можна припустити, що залежність активності Ca^{2+}-помпи ПМ від електричного потенціалу має значення для реалізації дії медіаторів і фізіологічно активних речовин, які деполяризують сарколему [1, 2].

1.1.2. Концентрація протонів

Активність помпи зростає під час деполяризації, що призводить до підвищення pH позаклітинного простору [3]. При цьому функціонування помпи залежить від pH, оскільки транспорт Ca^{2+} потребує контртранспортування протону, тому в разі підвищення зовнішньоклітинного pH (до pH 8,8) [4] за одночасного закислення внутрішньоклітинного середовища [5] відбувається практично повне інгібування транспортування Ca^{2+}. Ефект інгібування Ca^{2+}-помпи за підвищення pH можна пояснити відсутністю доступних H^+ у позаклітинному середовищі [5]. Таким чином, регуляція помпи відбувається за типом зворотного зв'язку [6].

Було показано залежність співвідношення Ca^{2+} : H^+ від зовнішньоклітинного pH у разі функціонування помпи ПМ. В еритроцитах воно змінювалося від 1 : 2 (pH 6,5) до 1 : 0 (pH 8,0). У ГМ за зовнішньоклітинного pH 6,5 співвідношення Ca^{2+} : H^+ було 1 : 3, а у разі pH 8,2 – 1 : 1. Інакше кажучи, чим більше протонів доступно в позаклітинному просторі, тим більше їх буде закачуватися до клітини. Хоча деякі автори висловлюють думку, що зміни у співвідношенні Ca^{2+} : H^+ швидше є похибкою вимірювання або пов'язані зі зміною активності помпи [5].

1.1.3. Іони металів

Досить багато іонів важких металів є потенційними неспецифічними інгібіторами Ca^{2+}-помпи ПМ (таблиця). Величина $I_{0,5}$ залежить від іонного радіусу, ентальпії гідратації, константи стабільності комплексу іона з оксигенвмісними біолігандами. На ізольованій Ca^{2+}-помпі ПМ зі шлунку мурчаків було досліджено вплив металів на зазначену помпу, $I_{0,5}$ (мМ) змінюється таким чином: Ba^{2+} (0,336) < Sr^{2+} (0,251) < Mn^{2+}(0,099) < Co^{2+} (0,029) < Cd^{2+} (0,016) [7].

Залежно від температури та концентрації La^{3+} (має радіус близький до радіусу Ca^{2+}) також неспецифічно інгібує викид Ca^{2+}-помпою ПМ [8, 9]. Причому його дія є досить незвичною, оскільки серед інших помп Р-типу La^{3+} тільки у разі Ca^{2+}-помпи ПМ блокує конформаційний перехід фосфорилованої проміжної сполуки від E_1-P до E_2-P стану. Це дозволяє ідентифікувати La^{3+}-чутливу Ca^{2+}-помпу в ПМ, в якій міститься багато інших помп Р-типу [10].

Eu^{3+} – представник лантаноїдів, також дуже близький за іонним радіусом до Ca^{2+}. Він здатний електростатично взаємодіяти з тими самими ділянками протеїну, що й Ca^{2+} (переважно з атомами кисню карбоксильних та гідроксильних груп). Тому лантаноїди здатні заміщати Ca^{2+} у Ca^{2+}-зв'язувальних ділянках протеїнів. Вста-

новлено, що Eu^{3+} гальмує Ca^{2+}-АТРазу саркоплазматичного ретикулума (СР) міоцитів серця [11], скелетних м'язів, Ca^{2+}-транспортувальну активність АТРази ПМ клітин міометрія [12]. За концентрації вказаного іону $5 \cdot 10^{-5}$ М інгібування досягало майже 100%, коефіцієнт інгібування ($I_{0,5}$) Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази ПМ клітин міометрія іонами Eu становив 8,7 ± 2,7 мкМ [1]. Гальмування активності Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази ПМ може бути обумовлене декількома факторами: по-перше, Eu^{3+} може зв'язуватись із Ca^{2+}-зв'язувальними ділянками високої спорідненості, важливими для функціонування ензиму; по-друге, Eu^{3+}, подібно до Mg^{2+}, може зв'язуватись з β- та γ-фосфатами АТР, при цьому іони європію зв'язуються з АТР з більшим афінітетом, ніж Mg^{2+} (константи зв'язування різняться більше ніж на порядок [11]).

Цікавими є результати вивчення інгібування Ca^{2+}-помпи ПМ Cd^{2+}, який є дуже ефективним неспецифічним інгібітором ($I_{0,5}$ = 2 нМ); хоча природа інгібування є предметом дискусій: механізм інтерпретується як неконкурентний з Ca^{2+} [13], або ж як конкурентний [14]. У разі використання інтактних клітин ефект Cd^{2+} доволі слабкий ($I_{0,5}$ 1,5 мМ при pH 7,2 і 0,35 мМ при pH 8,1) [15], отже, іони Cd здатні пригнічувати Ca^{2+}-помпу ПМ, діючи тільки з боку цитоплазми [16].

Також виявлено інгібіторний вплив іонів інших металів на Ca^{2+}-помпу ПМ. Іони Ni^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+} пригнічують АТРазну активність Ca^{2+}-помпи ПМ конкурентно з Ca^{2+} [16]. Доведено також інгібування Ca^{2+}-помпи ПМ солями свинцю [16].

1.1.4. Інші фактори (вільні радикали, електромагнітні поля, органічні розчинники)

In vivo на активність помпи впливають вільні радикали, що відбувається як через безпосередній вплив на Ca^{2+}-помпу ПМ, так і через окислення жирних кислот, які входять до складу мембрани. Наприклад, Ca^{2+}-помпа ПМ еритроцитів інгібується активованими нейтрофілами внаслідок пошкодження вільними радикалами. Аналогічно в альвеолярних макрофагах *t*-бутил гідропероксидкерований оксидативний стрес спричинює підвищення концентрації цитоплазматичного Ca^{2+}, що асоційовано з інгібуванням Ca^{2+}-помпи ПМ [17]. Ca^{2+}-помпа також чутлива до пероксинітриту ($ONOO^-$). Так, радикали в хронічних мікромолярних дозах призводять до утворення похідного нітротирозину Ca^{2+}-помпи ПМ, що знижує термостабільність та незворотно інгібує функціонування помпи на 75%: зменшується V_{max}, майже у 2 рази збільшується K_{Ca} (з 0,11 ± 0,01 мкМ до 0,18 ± 0,01 мкМ) та у 5 разів збільшується K_{MgATP} (від 49 ± 5 до 231 ± 15 мкМ); у результаті $[Ca^{2+}]_c$ зростає до 400 нМ [18]. Окрім того, оксидативний стрес та антиоксидантні системи захисту призводять до пероксидного окислення ліпідів, що зменшує активність Ca^{2+}-помпи ПМ [19]. Натомість супероксидний радикал (O^{2*-}) підвищує активність Ca^{2+}-помпи ПМ ГМК судин бичачих легень [20].

Є результати, за якими низькочастотне електромагнітне поле стабілізує мембрану, що сприятливо впливає на Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРазну активність [19].

Органічні розчинники характеризуються різним значенням діелектричної проникності, яка впливає на функціонування Ca^{2+}-помпи ПМ. Так, зростання величини діелектричної проникності середовища інкубації повинно підсилювати притягування протилежно і відштовхування однойменно заряджених іонів. Під час цього буде полегшуватися взаємодія Mg^{2+} з ATP^{4-}, що призведе до збільшення концентрації істинного субстрату АТР-гідролазної ензиматичної реакції – хелатного комплексу $MgATP^{2-}$, а також полегшення зв'язування аніонного субстрату $MgATP^{2-}$ із позитивно зарядженим активним центром Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази та преципітації катіонів Ca, які акумулюються у внутрішньовезикулярному об'ємі із фосфат-аніонами. Натомість зниження діелектричної проникності середовища зменшує відштовхування внаслідок електростатичних взаємодій між позитивно зарядженим активним центром ензиму і продуктом АТР-гідролазної реакції – аніонним хелатним комплексом MgATP. Доведено, що зменшення показника діелектричної проникності на одиницю призводить до зниження активності Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази ПМ ГМК матки на 10–15%. Зниження діелектричної проникності від 73,05 до 68,8 спричиняло зменшення максимальної швидкості гідролізу АТР у два рази та збільшення K_m у 2,8 раза. Таким чином, каталітична ефективність Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази за гідролізом АТР загалом зменшувалась у 5–6 разів. Отже, електростатичні

іон–іонні взаємодії між активним центром ензиму та продуктами реакції мають важливе значення у забезпеченні АТР-гідролазної реакції [21].

Органічні розчинники (діоксан, ацетон, етанол, ДМСО) у концентрації до 10% інгібують активність Ca^{2+}-помпи ПМ ГМК матки, при цьому за константою напівінгібування ($I_{0,5}$) їх можна розташувати у такий ряд (від найефективнішого до найменш ефективного): діоксан > ацетон = етанол > ДМСО. Зазначено, що зниження початкової максимальної активності Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази, хоча і залежало від хімічної природи органічних розчинників, але лімітувалося величиною діелектричної проникності середовища інкубації [21].

Етанол впливає на активність Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази дозозалежно. У низьких концентраціях зазначений розчинник стимулював активність реконструйованої Ca^{2+}-помпи ПМ. Причому найефективнішу стимуляцію (до 74% від максимальної активності Ca^{2+}-помпи ПМ) було досягнуто з використанням 5%-го етанолу [22]. Транспортну активність солюбілізованого ензиму найбільш ефективно (на 20%) стимулював етанол у концентрації 2% [23]. Припускається, що під час активації відбувається безпосередня взаємодія етанолу з молекулою протеїну, оскільки активаційний ефект залежить як від конформаційного стану Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази, так і від якісного вмісту ліпідів (з фосфатидилхоліном активаційний ефект кращий, ніж з фосфатидилсерином), до того ж у нативної конформації активація вища, ніж у обробленої трипсином чи у присутності кальмодуліну [22]. Механізм активації може включати відкриття автоінгібіторного домену (рис. 1), оскільки етанол взаємодіє з Ca^{2+}-помпою ПМ у її автоінгібіторному домені (рис. 1, (2)) біля кальмодулінзв'язувального домену (рис. 1, (1)). Натомість етанол, за використання у високих концентраціях, може порушувати гідрофобні контакти та водневі зв'язки у структурі молекули, знижувати полярність середовища інкубації та величину діелектричної проникності [23]. Концентрації етанолу вище 5% інгібують помпу, що може відбуватися внаслідок порушення структури ліпідного бішару [22], а саме пероксидного впливу етанолу на мембранні ліпіди, поверхневі властивості та базальну Ca^{2+}-проникність ПМ. Окрім того, не слід виключати зниження діелектричної проникності середовища (цей ефект описано вище) та зменшення концентрації H_2O, що є одним із компонентів АТР-гідролазної реакції [23]. Таким чином, інтоксикація етанолом впливає на активність Ca^{2+}-помпи ПМ, що змінює внутрішньоклітинний гомеостаз Ca^{2+}.

1.2. Низькомолекулярні ефектори

Останнім часом особлива увага приділяється пошуку низькомолекулярних сполук, які б дозволяли специфічно змінювати (в основному знижувати) активність Ca^{2+}-помпи ПМ. Давно відомими є неспецифічні інгібітори Ca^{2+}-помпи ПМ, тобто ті, які впливають також і на активність інших мембранозв'язаних АТРаз. Такими інгібіторами є еозин (тетрабромофлуоресцеїн), ортованадат, *n*-хлормеркурібензоат, а також перелічені вище іони важких металів (передусім – La^{3+}, Eu^{3+}, Cd^{2+}). Проводиться скринінг препаратів,

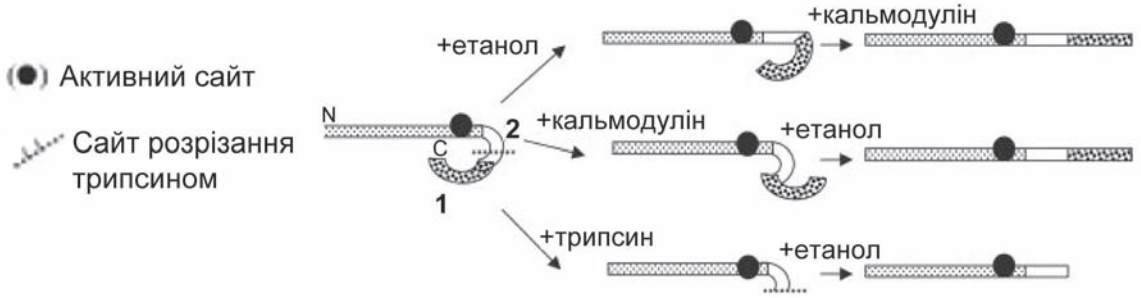

Рис. 1. Модель взаємодії етанолу з очищеною Ca^{2+}-помпою ПМ, реконструйованою в фосфатидилсерин або фосфатидилхолін: (1) – кальмодулінзв'язувальний сайт, (2) – сайт взаємодії з етанолом (адаптовано з [22])

які селективно змінюють активність Ca^{2+}-помпи ПМ, що дозволило б ізольовано вивчати внесок зазначеної помпи в загальний обмін Ca^{2+} у клітині, та роль у формуванні різноманітних патологій. На сьогодні існує два напрями у розробці специфічних інгібіторів: на основі пептидних сполук – калоксинів та циклічних олігомерів фенолів – каліксаренів. Узагальнену інформацію щодо відомих інгібіторів Ca^{2+}-помпи ПМ наведено в таблиці.

1.2.1. Неспецифічні інгібітори

Еозин Y (тетрабромофлуоресцеїн) – найпотужніший з відомих неспецифічних інгібіторів Ca^{2+}-помпи ПМ: його константи інгібуванням ($I_{0,5}$) для помп кардіоміоцитів та еритроцитів становлять 1,00 та 0,04 мкМ відповідно [6, 35–37]. Відомо, що еозин Y, оборотно гальмуючи Ca^{2+}-помпу ПМ, навіть у концентраціях 20–100 мкМ не впливає на іншу Ca^{2+}-транспортувальну систему ПМ – Na^{+}-Ca^{2+} обмінник [37, 38]. Отже, на рівні ПМ цей інгібітор селективно (щодо Na^{+}/Ca^{2+}-обмінника) інгібує Ca^{2+}-помпу. Значення уявної константи інгібування еозином Y ($I_{0,5}$) для Ca^{2+}-помпи ПМ міоцитів матки становить 1 мкМ [25]. Проте у нього є один вагомий недолік: низька проникність до інтактних клітин, а це є необхідним для впливу на Ca^{2+}-помпу ПМ, оскільки приєднання до ензиму відбувається до АТР-зв'язувальної ділянки, яка знаходиться з цитоплазматичного боку [17]. Тому часто використовується проникний сукцимідиловий естер – карбоксиеозин, що дозволяє блокувати Ca^{2+}-помпу в інтактних клітинах [17].

Класичним неспецифічним інгібітором катіонтранспортувальних АТРаз Р-типу є ортованадат [26, 39, 40]. Ця сполука гальмує Ca^{2+}-помпи СР та ПМ, але чутливість цих систем до нього відрізняється [8, 26, 27]. Припускають, що ванадат (п'ятивалентний стеричний аналог фосфату) пригнічує активність АТРази, зв'язуючись з аспарагіновою кислотою, яка бере участь в утворенні проміжного фосфоризованого продукту Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази [26]. Ортованадат блокує гідроліз АТР в активному центрі і знижує спорідненість ензиму до АТР у АТР-регуляторній ділянці [25, 28]. У результаті цей інгібітор уможливлює кристалізацію транспортної АТРази і стабілізує її у E_2-конформації [39, 41]. Ортованадат натрію в концентрації 0,1–100 мкМ неспецифічно інгібує активність Ca^{2+}-помпи ПМ на 95% відносно контрольного рівня, $I_{0,5}$ дорівнює 4,7 мкМ [25]. У ГМ ортованадат стимулює звільнення Ca^{2+} із внутрішньоклітинних депо [42].

Основними неспецифічними необоротними інгібіторами транспортної Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази ПМ є *n*-хлормеркурібензоат (значення $I_{0,5}$ дорівнює 3,2 мкМ, повне інгібування помпи відбувається за концентрації 10^{-5} М) та іони La ($I_{0,5}$ дорівнює 1 мкМ).

Із *Grevillea striata* було одержано синтетичний аналог стріатолу, що є біс-фенольною сполукою, яка інгібує РМСА-залежний викид Ca^{2+} з інтактних еритроцитів та ГМК аорти. Але його селективність є дозозалежною, а на ефективність дії значною мірою впливає якісний склад мембрани [17].

Зважаючи на те, що специфічний інгібітор для Ca^{2+}-помпи ПМ відсутній, у дослідженнях по встановленню активності вищезазначеної АТРази, використовують специфічні інгібітори інших Ca^{2+}-транспортувальних систем, що дозволяє визначати залишкову, нечутливу до дії цих інгібіторів, АТР-гідролазну або Ca^{2+}-транспортувальну активність Ca^{2+}-помпи ПМ. Так, терпеновий лактон тапсигаргін – селективний інгібітор Ca^{2+}-помпи СР ($I_{0,5}$ ~ 1–10 нМ), використаний в інтервалі концентрацій від 5 до 100 нМ, зменшує активність очищеної транспортної Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази, солюбілізованої із ПМ клітин міометрія, лише на 10% відносно контрольного значення. Також циклопіазонієва кислота, використана в діапазоні концентрації від 0,05 до 1 мкМ, – інший селективний інгібітор Ca^{2+}-помпи СР ($I_{0,5}$ ~ 1 мкМ), абсолютно не впливає на активність очищеної транспортної Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази, солюбілізованої із ПМ клітин міометрія, але у разі збільшення концентрації інгібітора від 1 до 10 мкМ ця активність зменшується на 20% відносно контрольного рівня [43]. Рутенієвий червоний в концентраціях, які повністю гальмують Ca^{2+}-помпу СР та енергозалежне транспортування Ca^{2+} в мітохондріях, на Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРазу ПМ ГМК практично не впливає. 10 мМ азид натрію, який використовують для повного блокування транспортування Ca^{2+} у мітохондріях, спричиняє незначне інгібування (до 14%) активності Ca^{2+}-транспортувальної АТРази ПМ [25].

Таким чином, перелічені сполуки можна використовувати для опосередкованого вста-

Інгібітори активності Ca^{2+}-помпи плазматичної мембрани

Речовина	$I_{0,5}$, мкМ	Гіпотетичний механізм дії	Коментарі	Посилання
Неспецифічні інгібітори				
La^{3+}	1	Стабілізує утворення проміжної фосфорилованої сполуки, уповільнює перехід від E_1-P до E_2-P стану	Специфічний вплив на Ca^{2+}-помпу ПМ дозволяє ідентифікувати цю помпу в мембрані, серед інших помп P-типу	[64, 10]
Eu^{3+}	8,7	1. Зв'язується із Ca^{2+}-зв'язувальними ділянками високої спорідненості. 2. Подібно до Mg^{2+} зв'язується з β- та γ-фосфатними залишками ATP зі значно більшою спорідненістю, ніж Mg^{2+}		[1, 11]
Cd^{2+}	0,002	Є ефективним антагоністом Ca^{2+}	Інгібуюча дія спостерігається тільки з боку цитоплазми	[16]
Еозин Y	1	Приєднується до ATP-зв'язувальної ділянки помпи	Має низьку проникність до інтактних клітин. Існує аналог карбоксиеозин, який може проникати у клітини	[25, 17]
Ортованадат	4,7	Зв'язується з аспарагіновою кислотою, яка бере участь в утворенні проміжного фосфоризованого продукту Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPази. Блокує гідроліз ATP в активному центрі і знижує спорідненість ензиму до ATP у ATP-регуляторній ділянці	Гальмує також кальцієву помпу CP	[8, 25–28]
n-Хлормеркурібензоат	3,2	Приєднується до SH-груп протеїну, що призводить до інгібіторного ефекту	Впливає на активність Ca^{2+}-помпи CP та Na^+/Ca^{2+}-обмінника	[29]
Специфічні інгібітори				
Калоксин 1A1	100	Зв'язується з першим зовнішньоклітинним доменом Ca^{2+}-помпи, стабілізує Ca^{2+}-залежне утворення ацилфосфату		[30]
Калоксин 2A1	0,4	Селективно зв'язується з другим зовнішньоклітинним доменом Ca^{2+}-помпи.	Його інгібування є неконкурентним по відношенню до Ca^{2+}, ATP, кальмодуліну.	[31, 32]
Калікс[4] арен C-90	20,2	Інгібувальна дія пов'язана з кооперативним впливом чотирьох просторово-орієнтованих сульфоніламідинових груп	У концентрації 20 мкМ збільшує концентрацію Ca^{2+} у ГМК. Його інгібування є неконкурентним по відношенню до Ca^{2+}, Mg^{2+}, ATP	[33, 34]

новлення активності Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази ПМ, оскільки специфічний інгібітор на сьогодні невідомий.

1.2.2. Специфічні інгібітори на основі пептидів

Для пошуку селективного інгібітора для Ca^{2+}-помпи ПМ було використано пептиди завдяки їхній здатності специфічно розпізнавати окремі ділянки на поверхні протеїнів. Таким чином, знайдено пептиди, які мімікрували дію автокаталітичного домену, але їх використання було обмеженим у разі інтактних клітин, оскільки приєднання таких пептидів до Ca^{2+}-помпи ПМ відбувається з боку цитоплазми [44]. Отже, подібний тип інгібіторів не набув широкого використання.

У літературі з'явилися повідомлення про використання специфічних інгібіторів Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази ПМ – синтетичних пептидів класу калоксинів 1А1, 2А1 та 3А1, які зв'язуються з першим, другим та третім зовнішньоклітинними доменами ензиму відповідно [30, 45–47]. Калоксини приєднуються до позаклітинного домену помпи та можуть використовуватися для інгібування Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази ПМ в інтактних клітинних системах [48]. Калоксин 1А1, зв'язуючись із першим зовнішньоклітинним доменом, стабілізує Ca^{2+}-залежне утворення ацилфосфату (140 кДа). Константа інгібування $I_{0,5}$ дорівнює 100 мкМ. Цей калоксин також незначною мірою інгібує Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРазу СР [30]. Найбільший інтерес викликає пептидний інгібітор калоксин 2А1, який селективно зв'язується з другим зовнішньоклітинним доменом Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази ПМ, амінокислотна послідовність якого є подібною для різних ізоформ Ca^{2+}-помпи ПМ. Калоксин 2А1 інгібує Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРазу ($I_{0,5}$ = 0,4 ± 0,1 мкМ), не впливаючи на Mg^{2+}-АТРазу, Na^{+},K^{+}-АТРазу ПМ та на Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРазу СР. Його інгібування є неконкурентним по відношенню до Ca^{2+}, АТР, кальмодуліну. Також він інгібує утворення ацилфосфату, таким чином впливаючи на конформаційні переходи протягом реакційного циклу Ca^{2+}-помпи [31, 32]. Використання калоксинів обмежує висока K_i для 2А1, водночас підвищення спорідненості призводить до втрати селективності [30].

1.2.3. Специфічні інгібітори на основі каліксаренів

Важливо зазначити, що можливість охарактеризувати роль Ca^{2+}-помпи ПМ у фізіології ГМ значно покращиться з перспективами використання її селективного фармакологічного інгібітора [46]. Втім, щоб обійти використання інгібіторів, залучаються генетичні підходи knock-out, knock-in та conditional targeting для Ca^{2+}-помпи ПМ [6]. Такі результати щодо функцій Ca^{2+}-помпи ПМ у клітинах або органах не можуть інтерпретуватися напряму, оскільки зміна експресії Ca^{2+}-помпи ПМ може спричинити зміну експресії інших систем, які контролюють концентрацію Ca^{2+} в клітині або виконують подібні до Ca^{2+}-помпи сигнальні функції. На жаль, електрофізіологічно не можна визначити обіг Ca^{2+}, який здійснюється Ca^{2+}-помпою ПМ, через низьку швидкість обертів помпи [49]. Тому одним із перших завдань у дослідженні функціональної активності Ca^{2+}-помпи ПМ стоїть розробка специфічного та високоафінного інгібітора.

В останні роки все більша увага з боку біохіміків, молекулярних та клітинних біологів приділяється таким малотоксичним супрамолекулярним сполукам, як циклічні олігомери фенолів – каліксарени [50–54]. Так, зазначені сполуки (принаймні деякі з них) демонструють мембранотропну дію, добре проникають крізь ПМ, а також слугують ефекторами (інгібіторами та активаторами) ензиматичних, рецепторних та транспортних мембранозв'язаних протеїнів, пригнічують адгезію клітин, виявляють антитромботичну дію, гальмують процеси пухлинного росту тощо [53–57].

Було показано, що калікс[4]арен С-90 (5,11,17,23-тетра(трифтор)метил(фенілсульфоніліміно)-метиламіно-25,26, 27,28-тетрапропоксі-калікс[4]арен) (100 мкМ) селективно пригнічує активність Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази як у фракції ПМ міоцитів матки (на 75% відносно контрольного значення), так і у разі з препаратом очищеної солюбілізованої Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази (на 70% відносно контрольного значення). При цьому він практично не впливає на ензиматичну активність Na^{+},K^{+}-АТРази і «базальної» Mg^{2+}-АТРази ПМ міоцитів матки (рис. 2) [33, 34]. Величина коефіцієнта інгібування $I_{0,5}$ становить

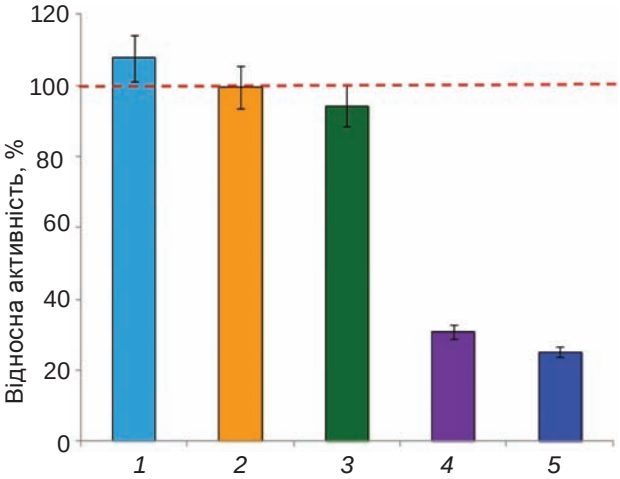

Рис. 2. Порівняльне дослідження впливу калікс[4]арену С-90 (100 мкМ) на АТР-гідролазну активність в ПМ клітин міометрія свиней (M ± m, n = 5) [34]: 1 – Mg^{2+}-АТРаза; 2 – Ca^{2+}-АТРаза; 3 – Na^{+},K^{+}-АТРаза; 4 – Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРаза (солюбілізована); 5 – Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРаза

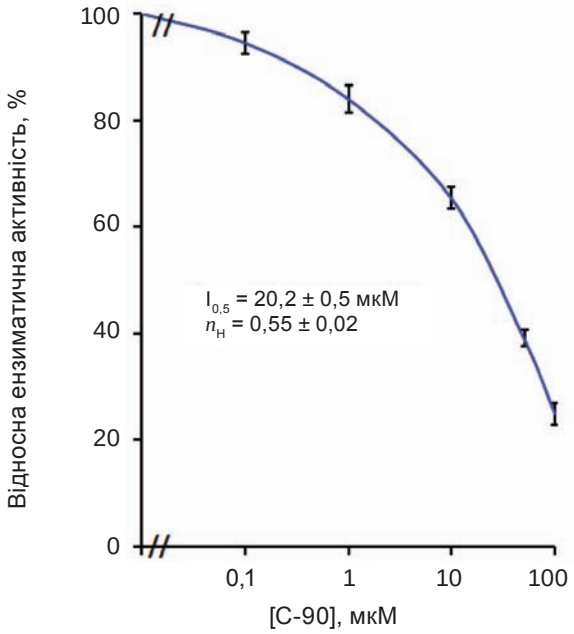

Рис. 3. Концентраційна залежність інгібуючої дії калікс[4]арену С-90 на ензиматичну активність Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази у ПМ клітин міометрія (M ± m, n = 5) [34]. За 100% прийнято значення ензиматичної активності за відсутності калікс[4]арену С-90 в середовищі інкубації

20,2 мкМ, значення коефіцієнта Хілла n_H – 0,55 (рис. 3) [33, 58, 59].

Також було продемонстровано, що «каліксаренова чаша» – калікс[4]арен С-150 (25,27-дипропоксикалікс[4]арен) та модельний сульфоніламідин – сполука М-1 (N-(4-етоксифеніл)-N′-(фенілсульфоніл)-трифторометилацетімідоамід), яка функціоналізує цю «чашу» по верхньому вінцю, незначно (на 12–13%) знижували Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРазну активність [33, 34, 58], що свідчить на користь того, що інгібувальна дія калікс[4]арену С-90 на Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРазну активність, передусім, пов'язана саме з кооперативним впливом чотирьох просторово-орієнтованих на калікс[4] ареновій платформі сульфоніламідинових груп, а не з дією тетрафенольного макроциклу як такого чи з дією окремої фармакофорної групи.

Отже, калікс[4]арен С-90 на рівні ПМ є селективним і достатньо афінним інгібітором Ca^{2+}-помпи ПМ. Суттєво, що з використанням лазерної конфокальної мікроскопії та Ca^{2+}-чутливого флуоресцентного зонда fluo-4 AM було доведено, що за дії калікс[4]арену С-90 (20 мкМ) збільшується $[Ca^{2+}]_c$. В незалежних дослідах було продемонстровано, що за дії цієї сполуки загальмовується термінація внутрішньоклітинного Ca^{2+}-сигналу, індукованого утеротоніком окситоцином (клітини міометрія) (Л. Г. Бабіч, С. Г. Шликов), а також знижується швидкість релаксації і механічної напруги у разі спонтанної активності міометрія (О. В. Цимбалюк).

1.3. Метаболічна регуляція

1.3.1. Кальмодулін

Позитивним модулятором Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази ПМ є кальмодулін. Перші відомості про регуляцію Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази ПМ кальмодуліном отримано на початку 70-х років Бондом та Клау [60]. Показано, що для переведення ензиму з менш активної форми А в активнішу форму В необхідно додавати до виділених мембран не лише Ca^{2+} для моделювання реакції накопичення іонів Ca^{2+}, а також внутрішньоклітинний вміст, який, напевно, містить «фактор активації». Пізніше цей фактор було виділено, охарактеризовано та названо кальмодуліном. Взаємодія Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази з кальмодуліном призводить до підвищення спорідненості ензиму до Ca^{2+}, кальмодулін також підвищує швидкість гідролізу АТР та транспорту катіонів [35, 48, 61]. Так, для Ca^{2+}-помпи ПМ міометрія щурів встановлено, що кальмодулін удвічі збільшує мак-

симальну швидкість транспортувального процесу у везикулах ПМ та на порядок підвищує спорідненість цієї системи до Ca^{2+} [62].

За низької концентрації Ca^{2+}-помпа перебуває у стані автоінгібування, оскільки її COOH-термінальний регіон, локалізований на 40 залишків нижче останнього трансмембранного домену, перешкоджає функціонуванню каталітичного циклу. Якщо концентрація Ca^{2+} зростає, утворюється комплекс «Ca^{2+}–кальмодулін», який приєднується до автоінгібіторного домену Ca^{2+}-помпи ПМ, звільняє її від інгібування та відновлює її активність [63]. Було виявлено, що Ca^{2+}-помпа ПМ має дві ділянки зв'язування з кальмодуліном: у С-термінальному хвості довжиною 25 залишків та біля фосфоліпідзв'язувального домену в другій цитозольній петлі, локалізованій між сайтами фосфорилювання та зв'язування АТР – 537-544 залишки для ізоформи Ca^{2+}-помпи ПМ 4 (рис. 4) [62]. Кристалографічні дослідження ензиму в стані автоінгібування вказують, що COOH-термінальний регуляторний домен запобігає доступу субстрату та зв'язуванню АТР за відсутності комплексу Ca^{2+}-кальмодуліну [63]. Оскільки кальмодулін має високу Ca^{2+}-афінність, імовірно, він насичується Ca^{2+} навіть за низької концентрації Ca^{2+} в клітині, тобто у стані спокою. Таким чином, кальмодулін може взаємодіяти з кальмодулінзв'язувальним доменом, підтримуючи Ca^{2+}-помпу в достатній активності навіть за низької концентрації $[Ca^{2+}]_c$ [35].

Ізоформи Ca^{2+}-помпи ПМ мають певні особливості в регуляції кальмодуліном: у них різна базальна активність, різна афінність до кальмодуліну, швидкість активації та інактивації у відповідь на приєднання та дисоціацію кальмодуліну [8] (див. першу частину огляду, Ukr. Biochem. J., 2015, 87, № 1).

1.3.2. Ліпідне оточення

Стимуляція Ca^{2+}-помпи ПМ відбувається під впливом кислих фосфоліпідів та поліненасичених жирних кислот. Кислі фосфоліпіди, такі як: фосфатидилсерин, фосфатидилінозитол, фосфатидна кислота, кардіоліпін, – збільшують афінність помпи до Ca^{2+}, швидкість транспорту, кооперативність щодо Ca^{2+}. Важливо, що концентрація ліпідів *in vivo* у мембрані достатня для напівмаксимальної активації помпи. До того ж кислі фосфоліпіди є більш ефективними активаторами помпи, ніж кальмодулін [8], що сформувало припущення, за яким кальмодулін та кислі фосфоліпіди активують Ca^{2+}-АТРазу за різними механізмами

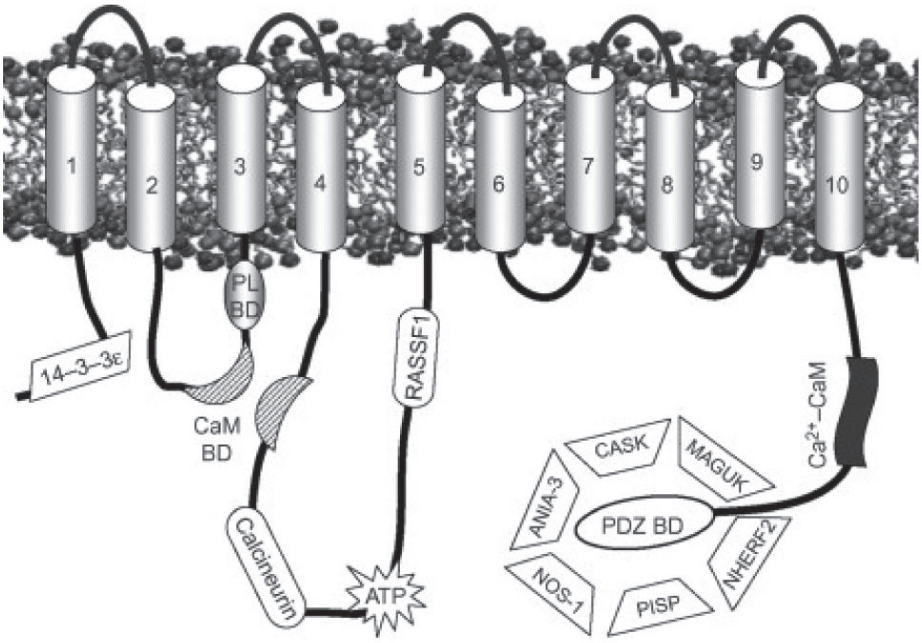

Рис. 4. Загальне розміщення регуляторних доменів Ca^{2+}-помпи ПМ для метаболічних сполук (адаптовано з [10])

із залученням відмінних зв'язуючих сайтів [64, 65]. Робота з протеолітичними фрагментами Ca^{2+}-помпи ПМ та із синтетичними пептидами дозволила відкрити два окремих фосфоліпідзв'язувальних домени у помпі: один є кальмодулінзв'язуючим доменом, а інший – розташований у цитозольній петлі між 2 та 3 трансмембранним доменом та містить 40 основних амінокислот [35, 48, 66]. Істотна стимуляція активності Ca^{2+}-помпи ПМ фосфоліпідами відбувається завдяки зміні конформації кальмодулінзв'язувального домену [35, 64], що ймовірно підвищує доступність кальмодуліну для зв'язування з послідовністю Ca^{2+}-помпи ПМ. Також у АТРаз Р-типу відбуваються значні конформаційні зміни під час переходу від E_1 до E_2 стану, і ліпідне оточення може впливати на транспорт Ca^{2+} завдяки впливу на конформаційні перебудови [64].

Активація кислими фосфоліпідами має значення для функціонування Ca^{2+}-помпи ПМ *in vivo*, оскільки вони є одним із компонентів мембранного оточення помпи [48]. Саме завдяки ліпідному оточенню помпа є перманентно активованою. В експериментах із реконструйованою Ca^{2+}-помпою ПМ було показано, що фосфоліпіди мембрани забезпечують 50% максимальної швидкості Ca^{2+}-помпи ПМ [35, 48, 67]. Причому різні фосфоліпіди мають різне значення в умовах *in vivo*. Так, концентрація фосфатидилсерину та подібних до нього кислих фосфоліпідів у ПМ незмінна для кожного окремого типу клітин, натомість концентрація фосфатидилінозитолу та його фосфорилованих продуктів ($PIP_{1,2}$) у мембрані змінюється під впливом регуляторних систем клітини, що робить їх імовірнішими модуляторами активності Ca^{2+}-помпи ПМ [35]. Загалом, поміж перелічених сполук фосфатидилінозитол-4,5-бісфосфат є найефективнішим стимулятором помпи [8, 30]. Таким чином, PIP_2 важливий для збереження активності Ca^{2+}-помпи ПМ у клітинах у стані спокою, коли концентрація вільного Ca^{2+} є низькою та стимуляція кальмудуліном є мінімальною [8, 30, 66]. Варто зазначити, що концентрація $PIP_{1,2}$ залежить від Ca^{2+}-споріднених сигнальних процесів, тому можливий зворотний цикл регуляції Ca^{2+}-помпи ПМ [48].

Важливими компонентами ПМ є сфінгомієлін та холестерол, які, як і Ca^{2+}-помпа, переважно знаходяться в ліпідних рафтах. Вміст зазначених сполук у мембрані обернено пропорційно корелює з активністю Ca^{2+}-помпи ПМ [68].

Іншими ефективними стимуляторами та невід'ємними компонентами мембран є жирні кислоти. Загалом, насичені жирні кислоти не впливають на активність помпи, а у разі ненасичених жирних кислот важливим є співвідношення між кількістю подвійних зв'язків, довжиною аліфатичного ланцюга та впорядкованістю ацильних залишків, оскільки у повністю впорядкованому оточенні ацильних залишків Ca^{2+}-помпа ПМ сильніше асоціюється з фосфатидилсерином, ніж з фосфатидилхоліном, а в невпорядкованому оточенні – навпаки [69]. Серед жирних кислот найвираженіший вплив на Ca^{2+}-помпу ПМ має арахідонова кислота (C20:4). Помічена кореляція між внутрішньоклітинним рівнем Ca^{2+} та вмістом арахідонової кислоти в ПМ: підвищення концентрації останньої одразу ж спричиняє збільшення рівня внутрішньоклітинного Ca^{2+}, що може відбуватися через стимуляцію зазначеною кислотою виходу Ca^{2+} із внутрішньоклітинних депо. Вплив на Ca^{2+}-помпу ПМ арахідонової кислоти є концентраційнозалежним. За її концентрації 5 мкМ відбувається максимальна активація Ca^{2+}-помпи ПМ: хоча спорідненість до Ca^{2+} практично не змінюється, але прискорюється етап дефосфорилування ензиму (перехід з E_2 в E_1 конформацію). Такий ефект також спостерігається за дії олеїнової та ліноленової кислоти. Але за підвищення концентрації до 50 мкМ арахідонова кислота виявляє інгібіторний вплив на активність помпи, що, можливо, пов'язано з неспецифічним та нефізіологічним впливом жирних кислот із довгим ланцюгом на АТРазу Р-типу: зменшується спорідненість до Ca^{2+} та зменшується стабільність фосфоензиму. Також існує припущення, що за цих обставин відбувається роз'єднання гідролізу АТР та транспорту Ca^{2+}. Сайти приєднання арахідонової кислоти локалізовані внутрішньоклітинно незалежно від кальмодулінзв'язувального домену та сайтів приєднання кислих фосфоліпідів [70]. Продукти пероксидного окислення ліпідів негативно впливають на активність Ca^{2+}-помпи ПМ, N-гліцерований фосфоетанол зменшує спорідненість помпи до фосфоліпідів мембрани та її термостабільність [7], також 4-OH-2,3-транс-ноненаль інгібує активність Ca^{2+}-помпи

ПМ. Такий механізм інгібування активності Ca^{2+}-помпи може мати місце, наприклад, за серцево-судинних захворювань [17].

Оскільки на активність Ca^{2+}-помпи ПМ впливає склад та композиція ліпідів мембрани, то зміни в ліпідній композиції у зв'язку зі старінням або захворюванням можуть впливати на функціонування помпи і відповідно на $[Ca^{2+}]_c$.

1.3.3. Спермін

Полікатіон спермін належить до ендогенних поліамінів, які виконують важливу роль у регуляції процесів росту та диференціації клітин. Регуляторну роль спермін відіграє у функціонуванні такого репродуктивного органу, як матка, оскільки під час розвитку вагітності в матці підвищується вміст поліамінів. Ці показники досягають максимуму всередині вагітності і знижуються з наближенням пологів [25].

Вплив поліаміну сперміну на активність очищеної Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази ПМ є двофазним: за концентрації поліаміну 0,1–0,5 мМ спостерігається тенденція до активації ензиму (~ 10%), подальше підвищення його концентрації призводить до зниження активності. Коефіцієнт інгібування становить 5,5 ± 0,3 мМ (n = 4). Спермін, зв'язуючись із кислими фосфоліпідами, може зменшувати необхідну для їх активації кількість в оточенні Ca^{2+}-помпи ПМ і в такий спосіб знижувати її активність. Можливість такого зв'язування доведено експериментально [25]. Інгібіторний ефект полікатіонів також включає взаємодію з негативно зарядженими групами амінокислот на петлях ензиму, орієнтованих у цитозоль, утворення між ними містків та блокування доступу субстрату [8].

1.3.4. Мінорні ліпіди

Сполуки ряду N-ацилетаноламінів легко вбудовуються у ПМ та зумовлюють зміни її ліпідного складу. Наприклад, N-пальмітоїлетаноламін модифікував фосфоліпідний склад ПМ: зростав відсотковий вміст фосфатидінозитолу (на 20,2%), що активує функціонуваня помпи, та лізофосфатидилхоліну (у 2,7 раза). Оскільки на солюбілізованій формі Ca^{2+}-помпи активуючого впливу N-пальмітоїлетаноламін не мав, логічно припустити, що активуючий ефект пов'язаний з впливом на ліпідний склад ПМ і, можливо, є важливою ланкою у механізмі скорочення/розслаблення міометрія. Завдяки цьому N-пальмітоїлетаноламін знижує амплітуду та тривалість спонтанних скорочень смужок міометрія [72].

1.3.5. Фосфорилування

Кіназакероване фосфорилування також впливає на активність Ca^{2+}-помпи ПМ [4]. Це вперше було показано на помпі з мембрани сарколеми серця та пов'язано з ПКА [35]. Вважається, що саме ПКА є основним протеїном, який фосфорилює Ca^{2+}-помпу ПМ, сайт фосфорилування знаходиться на сериновому залишку між COOH-кінцем та кальмодулінзв'язувальним доменом [66]. Але такий шлях активації властивий лише для ізоформ Ca^{2+}-помпи 1 [66], оскільки лише Ca^{2+}-помпа 1b містить залишок Ser, описаний вище [8]. Фосфорилування призводить до зменшення K_{Ca} до 1 мкМ [35], також спостерігається підвищення максимальної швидкості процесу у 2 рази. Стимуляція кальмодуліном та ПКА не є адитивною [8], що свідчить про єдиний механізм активації та спільні центри взаємодії кальмодуліну і ПКА.

cGMP-залежна ПК також підвищує максимальну швидкість та спорідненість помпи до Ca^{2+}. Хоча невідомо, чи відбувається це безпосередньо завдяки фосфорилуванню помпи [8], або через фосфорилування протеїну з Мм 240 кДа [66].

Фосфорилування протеїнкіназою С (ПКС) є більш складним процесом, оскільки може як активувати, так і інгібувати активність Ca^{2+}-помпи ПМ. Фосфорилування помпи зазначеною кіназою описано кількома авторами [49, 73–78]. ПКС підвищує значення V_{max}, хоча менш ефективно, ніж ПКА. Фосфорилування Ca^{2+}-помпи ПМ ПКС відбувається за треоніновими і сериновими залишками, які знаходяться в COOH-кінці, нижче кальмодулінзв'язувального домену [35]. Значно рідше відбувається фосфорилування в інших ділянках С-кінця, один з таких – треонін у кальмодулінзв'язувальному домені, і фосфорилування в такому разі аналогічне дії кальмодуліну, оскільки звільняє помпу від автоінгібування. Важливо, що ефект від фосфорилування ПКС є ізоформзалежним. У разі Ca^{2+}-помпи 2a, сайт фосфорилування ПКС 3a знаходиться тільки в кальмодулінзв'язувальному домені, що перешкоджає зв'язуванню кальмодуліну та інгібується активація помпи, і, як наслідок, фос-

форилована ПКС Ca^{2+}-помпа постійно має низьку активність [8], тоді як на відміну від випадку з Ca^{2+}-помпою 4a фосфорилування не впливає на базальну стимуляцію кальмодуліном [49]. У той же час активація помпи під впливом ПКС спостерігається в ендотеліальних клітинах та деяких клітинних лініях, наприклад, Ca^{2+}-помпа 4b в нейронах, оскільки ПКС фосфорилює зазначену ізоформу нижче від сайту приєднання кальмодуліну [49]. Таким чином, патерн експресії помпи визначає ефект від фосфорилування та вплив на викид Ca^{2+}. Сайти фосфорилування є ізоформспецифічними та альтернативний сплайсинг первинного транскрипту змінює їх розташування та наявність [49], що визначає їх відповідь на фосфорилування.

Цікавим є вплив кальмодуліну на фосфориловану Ca^{2+}-помпу ПМ. У деяких випадках після фосфорилування приєднання кальмодуліну ще більше стимулює помпу. Послідовність підвищення V_{max} кальмодуліном можна розташувати таким чином: ПКС-фосфорилований ензим > ПКА-фосфорилований ензим > нативний ензим. Окрім того, фосфорилування впливає на швидкість зв'язування кальмодуліну: фосфорилування ПКА зменшує цей показник, а ПКС – збільшує. Але присутність кальмодуліну на ензимі до фосфорилування запобігає дії як ПКА, так і ПКС, оскільки зменшує кількість сайтів, доступних кіназам. Таким чином, ПКА та ПКС можуть виконуватии різну функціональну роль у процесі фосфорилування.

Дефосфорилування Ca^{2+}-помпи ПМ дещо менш описано і показано тільки на очищеному ензимі *in vitro* (нейрональна тканина, фосфатази PP1 та PP2A). У будь-якому разі дефосфорилування є механізмом, необхідним для підтримання гомеостазу Ca^{2+} за надмірної активації помпи.

1.3.6. Простагландини

Простагландини – гормоноподібні регуляторні молекули, похідні арахідонової та інших поліненасичених жирних кислот, які досить широко використовуються у медичній практиці. Механізм дії простагландинів, що призводить до стимуляції скорочень міометрія, майже недосліджений, але існує думка, що однією з причин стимуляції скоротливої активності ГМ матки під впливом цих сполук може бути підвищення концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} внаслідок інгібування простагландинами Ca^{2+}-помпи ПМ.

Щоб перевірити це припущення проведено дослідження на очищеній Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРазі ПМ, які показали, що простагландини E_2 та $F_{2\alpha}$ в широкому діапазоні концентрацій (10^{-8}–10^{-4} М) абсолютно не впливають на її активність [79]. Поряд з цим, було продемонстровано, що ці ж простагландини гальмують Ca^{2+}-помпу ПМ міометрія вагітних жінок [80]. Такі дані очевидно пояснюються тим, що простагландини впливають на активність Ca^{2+}-транспортної АТРази ПМ не безпосередньо, а через рецептор та системи, що забезпечують спряження останнього з Ca^{2+}-транспортувальним ензимом.

1.3.7. Пептидні гормони

Окситоцин – пептидний нейрогормон, який впливає на різні функціональні системи організму людини і тварин. Він складається з 9 амінокислотних залишків, синтезується в супраоптичних та паравентрикулярних ядрах гіпоталамуса, накопичується в задній долі гіпофіза, звідки секретується в кров. Введення окситоцину спричинює скорочення міоепітеліальних клітин молочних залоз та ГМ матки, а останнє стимулює пологову активність. Окситоцинові рецептори розміщені на поверхні ПМ клітин-мішеней і належать до родопсинподібних рецепторів GPCR-родини. Дія окситоцину пов'язана з активацією Ca^{2+}-каналів ПМ та викидом Ca^{2+} з СР, а також з інгібуванням активності Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази ПМ та СР. За використання концентрацій окситоцину 10^{-7} М активність помпи повністю не пригнічується [81–83].

Брадикініни – больові пептиди, які утворюються в місці ушкодження тканин та запалення. Вони, як, наприклад, і АТР, активують метаботропні рецептори (P2Y1 або B2) в нейронах. Стимуляція метаботропних рецепторів також призводить до активації фосфоліпази С, утворення діацилгліцеролу та IP_3. Оскільки Ca^{2+}-помпа ПМ стимулюється ПКС і брадикініни підвищують вихід Ca^{2+} із клітин [49], то, ймовірно, що цей викид відбувається завдяки активації Ca^{2+}-помпи ПМ.

Рецептори ендотеліну спряжені з Ca^{2+}-помпою ПМ та фосфоліпазою С через різні G протеїни, у тому числі Gs та Gq. Ендотелін інгібує активність Ca^{2+}-помпи ПМ, що призво-

дить до зростання $[Ca^{2+}]_c$, та контролює гомеостаз Ca^{2+} у клітині [84]. Окрім того, контроль Ca^{2+}-помпи ПМ здійснюється через G-протеїн паратиреоїдним гормоном, вазопресином та глюкагоном [66].

1.3.8. Інші фактори

На додаток до регуляції кальмодуліном на С-термінальний регіон Ca^{2+}-помпи ПМ впливає незворотний активатор кальпаїн та протеїн PDZ (Postsynaptic density protein) (рис. 4) [35]. Селективний протеоліз ізольованої помпи кальпаїном призводить до від'єднання кальмодулінзв'язувального домену, залишаючи 124 кДа фрагмент із Ca^{2+}-залежною активністю [66]. Найчутливішою до такого типу регуляції є Ca^{2+}-помпа 1 [85]. Ця взаємодія може бути корисною для локальної організації Ca^{2+}-сигнальних доменів у ПМ або в умовах патологічного перенасичення Ca^{2+}, що вимагає підвищення експорту Ca^{2+}[48], та для заякорювання Ca^{2+}-регуляторних комплексів у цитоскелет [35]. Ca^{2+}-помпа також активується димеризацією через взаємодію двох кальмодулінзв'язувальних доменів [66]. За такого приєднання (якщо воно можливе) кальмодулін не спричиняє подальшої активації помпи. Також була відкрита димеризація/олігомеризація помпи у разі активації кальмодуліном та її високої локальної концентрації (це може відбуватися в кавеолах), але в цьому разі вплив на функціональну активність помпи не був показаний.

На С-термінальному «хвості» вище кальмодулінзв'язувального домену помпи виявлена консенсусна послідовність для розрізання каспазою-3. Після розрізання утворюється 120 кДа протеїн, який є конститутивно активним, оскільки автоінгібіторний домен видалено [86]. Оскільки каспази активуються під час апоптозу повна активація помпи може забезпечувати додаткову регуляцію $[Ca^{2+}]_c$ у зв'язку з тим, що під час апоптозу рівень Ca^{2+} значно зростає.

NH_2-термінальний цитозольний регіон Ca^{2+}-помпи має низький рівень гомології між ізоформами, тому часто використовується для пошуку специфічних взаємодій. Наприклад, загальнопоширений малий кислий протеїн, який регулює передачу сигналів, внутрішньоклітинний метаболізм, транскрипцію і апоптоз – 14.3.3 (рис. 4) – пригнічує активність Ca^{2+}-помпи ПМ. Характерно, що взаємодія є ізоформспецифічною. Так, Ca^{2+}-помпи 4, 3 та 1 взаємодіють із протеїном 14-3-3ε і лише Ca^{2+}-помпа 3 взаємодіє з 14-3-3ζ [87].

Нарешті, Ca^{2+}-помпа ПМ інгібується глюкозою, що свідчить про те, що помпа бере участь у контролі гомеостазу Ca^{2+} у β-клітинах [48].

Гепарин, глікозамінглікан, який має антикоагуляційні властивості, інгібує як гідроліз АТР, так і транспортування Ca^{2+}-помпою, приєднуючись до вказаного транспортувального протеїну в E_2 конформації, антагоністом у цьому процесі є K^+. $I_{0,5}$ гепарину практично не залежить від присутності кальмодуліну ($I_{0,5}$ = 0,47 ± 0,26 мкг/мл за наявності кальмодуліну, $I_{0,5}$ = 0,20 ± 0,04 за відсутності). Інші сульфовані глікозамінглікани також інгібують Ca^{2+}-помпу ПМ: фукозильований хондроїтинсульфат має значення $I_{0,5}$, близьке до такого у разі гепарину ($I_{0,5}$ = 0,2 мкг/мл), хондроїтинсульфат із нижчим вмістом сульфатів також інгібує активність Ca^{2+}-помпи, але $I_{0,5}$ підвищується у 1000 разів. Припускається, що сульфовані полісахариди фізіологічно підвищують $[Ca^{2+}]_c$ у стані спокою, блокуючи Ca^{2+}-помпу [67].

Показано, що стероїдні гормони також змінюють активність Ca^{2+}-помпи ПМ. Так, 17β-естрадіол та дигідротестостерон у концентраціях 10^{-10} та 10^{-11} М відповідно у 1,5 раза стимулювали активність помпи в ниркових дистальних трубочках, подальше збільшення концентрації естрадіолу не збільшувало активність. Окрім того, 17α-естрадіол не мав помітного впливу на активність зазначеної помпи [88]. Описані ефекти, швидше за все, відбуваються опосередковано через активність ПКС, яку активує естрадіол та яка фосфорилує та активує Ca^{2+}-помпу ПМ.

АТРазна активність Ca^{2+}-помпи ПМ залежить від концентрації протеїнів у мембрані: її активність зростає в 1,5–5 разів за зменшення концентрації протеїнів у мембрані від 50 до 1 мкг/мл. Існує гіпотеза, що зміна активності пов'язана зі взаємодією із протеїнами цитоскелета, в першу чергу актину [89]. Інший протеїн цитоскелета – ацетильований тубулін – також змінює активність Ca^{2+}-помпи ПМ, але ефект залежить від концентрації та оточення: в оточенні кислих ліпідів тубулін завжди активує помпу, а нейтральних ліпідів – до 50 мкг/мл тубуліну також активує, тоді як за більшої концентрації –

інгібує (при 300 мкг/мл АТРазна активність знижується на 80%) [90].

Існує припущення, що у ГМ судин Ca^{2+}-помпа ПМ може підлягати S-глутатіонілюванню, оскільки діамід підвищував $[Ca^{2+}]_c$, а також синхронні осциляції Ca^{2+} за умов інгібування фосфоліпази С та IP_3 рецептора [91].

Очевидно, що кількісний вміст Ca^{2+}-помпи у ПМ буде впливати на швидкість зменшення $[Ca^{2+}]_c$ після збудження клітини, а також на $[Ca^{2+}]_c$ у стані спокою. Тому на етапі транскрипції регуляція Ca^{2+}-сигналів відіграє важливу роль, але вона не є достатньо дослідженою. У В-лімфоцитах та β-клітинах панкреатичної залози показано, що транскрипційний фактор *c-myc* репресує експресію Ca^{2+}-помпи ПМ 4 та Ca^{2+}-помпи ПМ 1,2 відповідно. Найімовірніше подібний механізм регуляції характерний і для інших клітин. У клітинах епітелію нирок, остеобластах, клітинах дванадцятипалої кишки вітамін D_3 індукував експресію Ca^{2+}-помпи ПМ 1, індукція в клітинах дванадцятипалої кишки також спостерігалася під впливом синтетичних протизапальних стероїдів [92]. Беручи до уваги, що зміна експресії Ca^{2+}-помпи ПМ відбувається за багатьох захворювань (діабет, пухлини, остеопороз) дослідження регуляції транскрипції гена цієї помпи потребує більшої уваги.

2. Mg^{2+},АТР-залежна кальцієва помпа ПМ та патології скоротливої функції ГМ

Дослідження, виконані на ізольованих клітинах та тканинах свідчать, що дисфункція Ca^{2+}-помпи ПМ пов'язана з багатьма захворюваннями, такими як діабет, остеопороз, гіпертензія, рак, нейродегенеративні захворювання. Це дозволяє припустити, що Ca^{2+}-помпа ПМ відіграє центральну роль у формуванні патологій, хоча у більшості випадків зміна експресії/активності швидше є наслідком, а не причиною хвороби [93, 94]. Більшість з того, що відомо про патофізіологічні функції Ca^{2+}-помпи ПМ, одержано з експериментів на генетично модифікованих мишах. Наприклад, нокаутовані за геном Ca^{2+}-помпи ПМ 1 миші вмирають протягом раннього ембріонального розвитку, за геном Ca^{2+}-помпи ПМ 2 – мають атаксію та глухоту; видалення Ca^{2+}-помпи ПМ 4 призводить до знерухомлення сперматозоїдів та подальшої стерильності, змін функціонування тромбоцитів та їх агрегації [95], але основним є те, що у нуль-мутантів спостерігаються зміни скоротливої активності та схильність до апоптозу у ГМ [24]. Відомо, що поліморфізм нуклеотидів у гені Ca^{2+}-помпи ПМ 1 має чітку кореляцію з варіаціями кровоносного тиску, гіпертензії та ризиком серцево-судинних захворювань [93]. Суперекспресія Ca^{2+}-помпи 4 посилює міогенну відповідь та підвищує чутливість до вазоконстрикторів, що супроводжується значним зростанням кров'яного тиску, хоча змін $[Ca^{2+}]_c$ не спостерігається [94]. Таким чином, зміна функціональної активності Ca^{2+}-помпи ПМ є підґрунтям формування судинних патофізіологічних процесів.

Гетерозиготні за геном Ca^{2+}-помпи ПМ 1 миші порівняно з диким типом мали підвищену силу скоротливої відповіді ГМ сечового міхура (на 150–190%) на K^+-залежну деполяризацію та збільшення концентрації $[Ca^{2+}]_c$ (130–180%) під час стимуляції як карбахолом, так і K^+ [4].

Хоча у серцевому м'язі Ca^{2+}-помпа ПМ не має значного внеску в підтриманні сталої концентрації Ca^{2+}, оскільки основна роль належить електрогенному Na^+/Ca^{2+}-обміннику ПМ та Ca^{2+}-помпі СР, але саме в серцевому м'язі Ca^{2+}-помпа ПМ має значення для регуляції сигнальних шляхів, пов'язаних зі зміною $[Ca^{2+}]_c$. Так, порушення функціонування Ca^{2+}-помпи ПМ 4 призводить до гіпертрофії серця, що опосередковано регуляцією кальциневрин/NFAT сигнального шляху. Також руйнування комплексу між Ca^{2+}-помпою ПМ 4, nNOS, α1-синтропіном та потенціалкерованими натрієвими каналами (Nav1.5) асоційовано із синдромом подовженого періоду QT, оскільки порушується негативна регуляція Ca^{2+}-помпою ПМ активності nNOS [93, 95, 96].

3. Кальцієва помпа ПМ та фармакологія ГМ

Сигетин (сіль мезо-3,4-ді(n-сульфофенил)–гексану) – це лікарський препарат, який у свій час знайшов застосування в акушерській практиці для стимуляції пологової активності і підсилення скорочення міометрія. Показано, що механізм його дії пов'язаний, перш за все, з активацією електрокерованих Ca^{2+}-каналів, по яким Ca^{2+} входить всередину міоцита. Але, поряд з тим, сигетин (5 мМ) інгібує Mg^{2+},АТР-залежний викид Ca^{2+} з клітин, причому ступінь

інгібування активного транспорту Ca^{2+} вищий, ніж у випадку окситоцина [82]. Під впливом зазначеної сполуки відбувається зменшення V_0 (нмоль Ca^{2+} за 1 хв на 1 мг протеїну) Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази з 2,5 ± 0,6 до 0,8 ± 0,2 (n = 4) та зменшення ензиматичної активності на 80 та 30% у разі солюбілізованої та реконструйованої в ліпосоми Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази відповідно [97]. Також Ca^{2+}-помпа ПМ пригнічується інгаляційними анестетиками типу галотану, закисом азоту і ксеноном [16]. Один еквівалент мінімальної ефективної дози галотану інгібує активність Ca^{2+}-помпи ПМ синаптосом щурів на 30%, а ксенону і закису азоту – на 20%. Важливо, що аналогічна дія на Ca^{2+}-помпу СР і Na^{+},K^{+}-АТРазу ПМ не спостерігалась. Місцеві анестетики (дибукаїн та лідокаїн) також інгібують активність Ca^{2+}-помпи ПМ синаптичних мембран за неконкурентним механізмом щодо субстрату [16].

Нейролептики фенотіазинового ряду пригнічують активацію Ca^{2+}-помпи ПМ не тільки кальмодуліном, але і кислими фосфоліпідами, і обмеженим протеолізом [16]. Тому дійшли висновку, що фенотіазіни неспецифічно зв'язуються і з ліпідами, і безпосередньо з Ca^{2+}-помпою ПМ.

Втім, як вже відзначалося, за оцінки ролі Ca^{2+}-помпи ПМ в підтриманні Ca^{2+}-гомеостазу в міоцитах та функціонуванні ГМ проблематичним є низький рівень експресії генів зазначеної помпи та відсутність специфічних інгібіторів [8, 98].

4. Узагальнення

Безперечно ми маємо розглядати ГМК як складну рецепторну тензоелектрохімічну систему, для якої (щодо внутрішньоклітинного Ca^{2+} гомеостазу) притаманні такі властивості, як: неадитивність, нелінійність, синергічність, кооперативність, наявність мережі «позитивних» та «негативних» зворотних зв'язків, феномен градієнта спорідненості до Ca^{2+} (на рівні різних енергозалежних Ca^{2+}-транспортувальних систем).

Отже, зважаючи на те, що Ca^{2+} є важливим внутрішньоклітинним неорганічним месенджером, який бере участь у фармакомеханічному спряженні в ГМК, біохімічні системи та механізми, які підтримують або регулюють його концентрацію в цитоплазмі, заслуговують на особливу увагу. Одним із таких важливих механізмів є контроль гомеостазу Ca^{2+} у гладеньком'язових клітинах Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРазою ПМ. Ca^{2+}-помпи ПМ, як й інші помпи Р-типу, складаються з 10 трансмембранних доменів та трьох цитоплазматичних петель. Основна відмінність Ca^{2+}-помпи ПМ від такої у разі СР полягає в наявності СООН-хвоста, що містить послідовності приєднання до кальмодуліну, характеризується відповіддю на кислі фосфоліпіди, має сайти фосфорилування та PDZ домен. Процес перенесення Ca^{2+} крізь мембрану ПМ подібний до такого у Ca^{2+}-помпи СР: це 4-етапна схема, в якій відбувається зміна спорідненості помпи до Ca^{2+} вніслідок зміни конформації та гідролізу АТР. У геномі ген Ca^{2+}-помпи ПМ представлений 4 ізоформами, які до того ж підлягають подальшому альтернативному сплайсингу. Важливим є факт, що сплайс-ізоформи характеризуються різною спорідненістю до Ca^{2+} та до модуляторів активності помпи (наприклад, кальмодуліну, фосфорилування) та їхній патерн розташування є унікальним для багатьох типів тканин та клітин. Таким чином, сплайс-ізоформи можуть виконувати різні функції: підтримання базальної концентрації Ca^{2+} у цитоплазмі, релаксація м'язової напруги, зміна сили м'язового скорочення завдяки закисленню внутрішньоклітинного середовища, регуляція проліферативної активності, апоптозу, а також Ca^{2+}-помпи ПМ є одним із компонентів сигнальних систем, оскільки регулюють активність таких протеїнів як nNOS, кальциневрину, особливо в кавеолах, де концентрація помпи в ПМ підвищена.

Ca^{2+}-помпи ПМ регулюються як багатьма природними чинниками, наприклад, такими фізико-хімічними факторами, як: мембранний потенціал, pH, вільні радикали, так і внутрішньоклітинними метаболітами: кальмодуліном, кислими фосфоліпідами, жирними кислотами, протеїнкіназами різних типів; також відбувається регуляція за допомогою гормонів: простагландинів, окситоцину, брадикінінів, вазопресину, глюкагону, стероїдних гормонів. Показано, що деякі захворювання серцево-судинної системи пов'язані з генетичними дефектами Ca^{2+}-помпи ПМ. Але, не зважаючи на широкопланову інформацію, одержану на сьогодні, на жаль, не існує специфічного, афінного, низькомолекулярного інгібітора

Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази ПМ. Використання такого інгібітора дозволило б повною мірою охарактеризувати роль помпи ПМ у гладеньком'язових клітинах у підтриманні концентрації Ca^{2+} або її участі у формуванні сигнальних каскадів та взаємодії із сигнальними протеїнами, а також роль у формуванні патологічних станів. Ми вважаємо, що подальше вдосконалення структурної організації калікс[4]арену С-90 є перспективним для створення низькомолекулярного інгібітора нового («супрамолекулярного» покоління) Mg^{2+},АТР-залежної Ca^{2+}-помпи ПМ. Такі інгібітори стануть перспективними фармакологічними сполуками.

Mg^{2+},АТР-ЗАВИСИМЫЙ КАЛЬЦИЕВЫЙ НАСОС ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК. II. РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ

Т. А. Веклич, Ю. Ю. Мазур, С. А. Костерин

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев;
e-mail: veklich@biochem.kiev.ua,
yuliya.vorona@gmail.com

Ca^{2+}-насос плазматической мембраны один из ключевых протеинов, которые принимают участие в процесах обмена ионов Са в гладкомышечных клетках. Ее функции достаточно разнообразны: от контроля базальной цитоплазматической концентрации Ca^{2+} – до регуляции протеинов, вовлеченных в Ca^{2+}-зависимые сигнальные каскады, и часто зависят от изоформы или даже от формы альтернативного сплайсинга. Несмотря на довольно разнообразные функции и свойства Ca^{2+}-насоса плазматической мембраны, которые детально были рассмотрены в первой части цикла нашего обзора (*Ukr. Biochem. J.* 2015, 87, № 1), важной, с точки зрения функционирования клетки, есть прецизионная регуляция ее активности. В этом обзоре рассмотрены разнообразные факторы регуляции активности Ca^{2+}-насоса плазматической мембраны гладкомышечных клеток: как эндогенных, так и экзогенных, биотических и абиотических факторов. Особенное внимание уделяется данным литературы, собственным результатам, связанным с разработкой и поиском селективного ингибитора Ca^{2+}-насоса плазматической мембраны, который позволил бы более подробно изучить ее функциональные особенности в гладкомышечных клетках.

Ключевые слова: Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРаза, плазматическая мембрана, гладкомышечные клетки, миометрий, каликс[4]арены.

Mg^{2+},ATP-DEPENDENT PLASMA MEMBRANE CALCIUM PUMP OF SMOOTH MUSCLE CELLS. II. REGULATION OF ACTIVITY

T. O. Veklich, Iu. Iu. Mazur, S. O. Kosterin

Palladin Institute of Biochemistry, National
Academy of Science of Ukraine, Kyiv;
e-mail: veklich@biochem.kiev.ua,
yuliya.vorona@gmail.com

Plasma membrane Ca^{2+}-pump is one of key proteins, which takes part in Ca^{2+} exchange in smooth muscle cells. It has a lot of diverse functions from control of basal cytoplasmal Ca^{2+} concentration to regulation of proteins involved in Ca^{2+}-dependent signal pathway. Ca^{2+} pump function is often dependent on the isoform or even form of alternative splicing. Allowing for a variety of Ca^{2+}-pump functions and properties, which were reviewed in detail in the first part of our review article cycle (*Ukr. Biochem. J.*, 2015; 87(1)), the precise control of the mentioned pump activity is very important for cell functioning. The other part of this article is dedicated to different regulation factors of smooth muscle plasma membrane Ca^{2+}-pump activity: endogenous and exogenous, biotic and abiotic factors. Special attention is given to literature data and own results about design and the search of selective plasma membrane Ca^{2+}-pump inhibitor which would allow examining its functioning in smooth muscle cells more meticulously.

Key words: PMCA, plasma membrane, smooth muscle cell, miometrium, calix[4]arene.

References

1. Kosterin S. O. Calcium transport in smooth muscles. Science opinion, 1990; 216 p. (In Russian).
2. Babich L. G., Fomin V. P., Kosterin S. O. Influence of membrane potential on Mg^{2+}-ATP-dependent smooth muscle sarcolemal Ca^{2+} transport. *Biochemistry* (M). 1990;55(10):1890-1901.

3. Thomas R. C. The plasma membrane calcium ATPase (PMCA) of neurones is electroneutral and exchanges 2 H^+ for each Ca^{2+} or Ba^{2+} ion extruded. *J. Physiol.* 2009;587:315-327.
4. Liu L., Ishida Y., Okunade G., Pyne-Geithman G. J., Shull G. E., Paul R. J. Distinct roles of PMCA isoforms in Ca^{2+} homeostasis of bladder smooth muscle: evidence from PMCA gene-ablated mice. *Am. J. Physiol Cell Physiol.* 2007;292(1):C423-431.
5. Thomas R. G. The Ca^{2+}:H^+ coupling ratio of the plasma membrane calcium ATPase in neurones is little sensitive to changes in external or internal pH. *Cell Calcium.* 2011;49:357-364.
6. Floyd R., Wray S. Calcium transporters and signalling in smooth muscles. *Cell Calcium.* 2007;42(4-5):467-476.
7. Dubitsky L. O., Vovkanych L. S. Interaction of metal cations with Ca^{2+}-transport sites of the plasma membrane Ca^{2+} pump of secretory cells of gastric glands. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2003;75(2):39-46. (In Ukrainian).
8. Pande J., Grover A. K. Plasma membrane calcium pumps in smooth muscle: from fictional molecules to novel inhibitors. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2005;83:743-754.
9. Gomez-Pinilla P. J., Pozo M. J., Akemishi B., Matsuda T., Camello P. J. Ca^{2+} extrusion in aged smooth muscle cells. *Biochem. Pharmacol.* 2007;74(6):860-869.
10. Carafoli E., Fedrizzi L., Domi T., Di Leva F., Brini M. Chapter 132 – Calcium Pumps. Handbook of Cell Signaling (Second Edition), Ralph A. Bradshaw and Edward A. Dennis, San Diego. 2010. P. 57-61.
11. Joshi N. B., Shamoo A. E. Binding of Eu^{3+} to cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPase - laser excited Eu^{3+} spectroscopic studies. *Biophys. J.* 1987;51(2):185-191.
12. Gangola P., Shamoo A. E. Characterization of Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPase of sarcoplasmic reticulum by laser-excited europium luminescence. *Eur. J. Biochem.* 1987;162(2):357-363.
13. Visser G. J., Peters P. H., Theuvenet A. P. Cadmium ion is a non-competitive inhibitor of red cell $Ca^{(2+)}$-ATPase activity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1993;1152:26-34.
14. Verbost P. M., Flik G., Pang P. K. T., Lock R. A. C., Wendelaar Bonga S. E. Cadmium inhibition of the erythrocyte Ca^{2+} pump: a molecular interpretation. *J. Biol. Chem.* 1989;264:5613-5615.
15. Toledo-Maciel A., Goncalves-Gomes S., Castex M., Vieyra A. Progressive Inactivation of Plasma Membrane (Ca^{2+},Mg^{2+})ATPase by Cd^{2+} in the Absence of ATP and Reversible Inhibition during Catalysis. *Biochemistry.* 1998;37(44):15261-15265.
16. Pestov N. B., Dmitriev R. I., Shahparonov M. I. Plasma membrane Ca^{2+}-ATPase regulation. *Uspekhi Biologicheskoi Khimii*. 2003;43:99-138. (In Russian).
17. Monteith G. R., Wanigasekara Y., Roufogalis B. D. The plasma membrane calcium pump, its role and regulation: new complexities and possibilities. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 1998;40:183-190.
18. Gutierrez-Martin Y., Martin-Romero F. J., Henao F., Gutierrez-Merino C. Syptosomal plasma membrane Ca^{2+} pump activity inhibition by repetitive micromolar ONOO-pulses. *Free Radic. Biol. Med.* 2002;32(1):46-55.
19. Selvam R., Ganesan K., Raju N., Gangadharanc A. C., Manohard B. M., Puvanakrishnan R. Low frequency and low intensity pulsed electromagnetic field exerts its antiinflammatory effect through restoration of plasma membrane calcium ATPase activity. *Life Sciences.* 2007;80:2403-2410.
20. Mandai M., Das S., Chakraborti T., Chakraborti S. Matrix metalloprotease 2-mediated activation of $Ca^{(2+)}$-ATPase by superoxide radical (O^{2*-}) in plasma membrane of bovine pulmonary vascular smooth muscle. *Indian J. Biochem. Biophys.* 2002;39(6):390-396.
21. Kosterin S. O. The kinetic and energetic aspects of the effect of incubation medium dielectric permeability on the catalytic and transporting activity of the Mg^{2+},ATP-dependent Ca^{2+} pump plasma membranes. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2000;72(4-5):44-60. (In Ukrainian).
22. Sepulveda M. R., Mata A. M. The interaction of ethanol with reconstituted synaptosomal plasma membrane Ca^{2+}-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004;1665:75-80.
23. Babich L. G., Shlykov S. G., Borisova L. A., Slinchenko N. M., Bratkova N. F., Kosterin S. O. Effect of ethanol on ativity of energy-dependent Ca^{2+}-transporting systems of myometrium cell. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2000;72(1):32-41. (In Ukrainian).
24. Leva F. D., Domi T., Fedrizzi L., Lim D., Carafoli E. The plasma membrane Ca^{2+}-

ATPase of animal cells: Structure, function and regulation. *Arch. Biochem. Biophys.* 2008;476(1):65-74.
25. Slinchenko N. M., Chernysh I. G., Kosterin S. O. Utilization of purified myometrium cell plasma membrane Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPase for comparative estimation of efficacy of energy-dependent Ca^{2+}-transport inhibitors. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2003;75(2):33-38. (In Ukrainian).
26. Carafoli E. The Ca^{2+}-pump of the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 1992;267(4):2115-2118.
27. Wang T., Tsai L.-I., Solaro J., Angela O., Gende G., Schwartz A. Effects of potassium on vanadate inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase from dog cardiac and rabbit skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1979;91(1):356-361.
28. Barrabin H., Garrahan P. J., Rega A. F. Vanadate inhibition of the Ca^{2+}-ATPase from human red cell membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1980;600(3):796-804.
29. Fedirko N. V., Manko V. V., Klevets M. Yu. Influence of p-chlormercuribenzoate and dithiothreitol on the Ca^{2+} content in the salivary glands and thear protein secretion. *Fiziologichnyi Zhurn.* 2001;47(3):35-41. (In Ukrainian).
30. Pande J., Mallhi K. K., Grover A. K. A novel plasma membrane Ca^{2+}-pump inhibitior: caloxin 1A1. *Eur. J. Pharmacol.* 2005;508(1-3):1-6.
31. Chaudhary J., Walia M., Matharu J., Escher E., Grover A. K. Caloxin: a novel plasma membrane Ca^{2+}-pump inhibitior. *Am. J. Physiol.* 2001;280(4):C1027-C1030.
32. Holmes M. E., Chaudhary J., Grover A. K. Mechanism of action of the novel plasma membrane Ca^{2+}-pump inhibitior caloxin. *Cell Calcium.* 2003;33(4):241-245.
33. Veklich T. O., Shkrabak A. A., Mazur Yu. Yu., Rodik R. V., Boyko V. I., Kalchenko V. I., Kosterin S. O. Kinetic regularities of calixarene C-90 action on the myometrial plasma membrane Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPase activity and on Ca^{2+} concentration in unexcited cells of the myometrium. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2013;85(4):20-29. (In Ukrainian).
34. Veklich T. O., Shkrabak A. A., Slinchenko N. N., Mazur I. I., Rodik R. V., Boyko V. I., Kalchenko V. I., Kosterin S. O. Calix[4]arene C-90 selectively inhibits Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPase of myometrium cell plasma membrane. *Biochemistry* (M). 2014;79(5):417-424.
35. Ortega C., Ortolano S., Carafoli E. The plasma membrane calcium pump. In: Calcium: a matter of life or death. Edited by Krebs J., Michalak M. New York: Springer, 2007;41:179-197.
36. Gatto C., Milanick M.A. Inhibition of the red blood cell calcium pump by eosin and other fluorescein analogues. *Am. J. Physiol.* 1993;264(6):1577-1586.
37. Gatto C., Hale C. C., Xu W., Milanick M. A. Eosin, a potent inhibitor of the plasma membrane Ca pump, does not inhibit the cardiac Na-Ca exchanger. *Biochemistry.* 1995;34(3):965-972.
38. Slinchenko N. M., Bratkova N. F., Kosterin S. O., Zimina V. P., Chernysh I. G. Influence of eosin Y on katalitical and functional activity of Mg^{2+}-ATPdependent plasma membrane calcium pump of smooth muscle cells. *Biochemistry* (M). 1998;63(6):812-819.
39. Introduction to biomembranology. Edited by Boldyreva A. A. M.: Published by MSU. 1990; 280 p.
40. Berridge M. I. Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem. J.* 1984;220:345-360.
41. Cortijo J., Villagrasa V., Marti-Cabrera M., Villar V. The spasmogenic effects of vanadate in human isolated bronchus. *Brit. J. Pharmacol.* 1997;121(7):1339-1349.
42. Kosterin S. O., Bratkova N. F., Babich L. G., Shinlova O. P., Slinchenko N. M., Shlykov S. G., Zimina V. P., Rovenets N. A., Veklich T. O. Effect of inhibitors of energy-dependent Ca^{2+}-transporting systems on calcium pumps of a smooth-muscle cell. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 1996;68(6):50-61. (In Ukrainian).
43. Szewczyk M. M., Pande J., Akolkar G., Grover A. K. Caloxin 1b3: a novel plasma membrane Ca^{2+}-pump isoform 1 selective inhibitor that increases cytosolic Ca^{2+} in endothelial cells. *Cell Calcium.* 2010;48(6):352-357.
44. Yatime L., Buch-Pedersen M. J.,Musgaard M., Morth J. P., Winther A. L., Pedersen B. P., Olesen C., Andersen J. P., Vilsen B., Schiott B., Palmgren M. G., Moller J. V., Nissen P., Fedosova N. P-type ATPases as drug targets: Tools for medicine and science. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009;1787:207-220.
45. Pande J., Mallhi K. K., Grover A. K. Role of third extracellular domen of plasma membrane Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATPase based on novel inhibitor caloxin 3A1. *Cell Calcium.* 2005;37(3):245-250.

46. Chen H. H., Lin Y. R., Peng Q. G., Chan M. H. Effects of trichloroethylene and perchloroethylene on muscle contractile responses and epithelial prostaglandin release and acetylcholinesterase activity in swine trachea. *Toxicol. Sci.* 2005;83(1):149-154.
47. Rodik R. V. Application of calixarenes for DNA transfection in cells. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2012;84(5):5-15. (In Ukrainian).
48. Brini M., Carafoli E. Calcium pump in health and desease. *Physiol. Rev.* 2009;89:1341-1378.
49. Usachev Y. M., DeMarco S., Campbell C., Strehler E. E., Thayer S. A. Bradykinin and ATP accelerate Ca^{2+} efflux from rat sensory neurons via protein kinase C and the plasma membrane Ca^{2+} pump isoform 4. *Neuron.* 2002;33:113-122.
50. Kalchenko V. I., Rodik R. V., Boyko V. I. Calixarenes with bio-medical potential. *J. Org. Pharm. Chem. 2005;3(4):13-29.* (In Ukrainian).
51. Coleman A. W., Jebors S., Cecillon S. Toxicity and biodistribution of para-sulfonato-calix[4]-arene in mice. *New. J. Chem.* 2008;32:780-782.
52. Lalor R., Baillie-Johnsos H., Redshew C., Matthnews S. E., Mueller A. Cellular uptake of a fluorescent calix[4]arene derivative. *J. Am. Chem. Soc.* 2008;130(10):2892-2893.
53. Paclet M.-H., Rousseau C. F., Yannick C., Morel F., Coleman A. W. An absence of non-specific immune response towards para-sulphonato-calix[n]arenes. *J. Inclus. Phenom. Macrocycl. Chem.* 2006;55(3-4):353-357.
54. Veklich T. O., Shkrabak A. A., Cherenok S. O., Kalchenko V. I., Kosterin S. O. Comparative investigation of effects of calix[4]arene C-99 and its analogs on Na^+,K^+-ATPase activity of uterus myocite plasma membrane. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2012;84(6):49-57. (In Ukrainian).
55. Komisarenko S. V., Kosterin S. O., Lugovskoy E. V., Kalchenko V. I. Calixarene methylene bisphosphonic acids as promising effectors of biochemical processes. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2013;85(6):106-128. (In Ukrainian).
56. Veklich T. O., Shkrabak A. A., Rodik R. V., Kalchenko V. I., Kosterin S. O. The calixarene C-107 increase the affinity of the Na^+,K^+-ATPase activity in plasmatic membrane of smooth muscle cells to the ouabain. Ukr. Biokhim. Zhurn. 2011;83(1):38-44. (In Ukrainian).
57. Veklich T., Shkrabak A., Mazur I. I. Plasma membrane Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPase activity is selectively suppressed by calix[4]arene C-90. *Visnyk of L'viv University.* 2014;68:337-347. (In Ukrainian).
58. Veklich T. O., Shkrabak A. A., Mazur I. I. The effect of calixarene C-90 on Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPase activity of smooth muscle cell plasma membrane. Abstracts of the Scientific-practical conference "Biologically active substances: basic and applied questions of production and application." Novuy Svit, Crimea, Ukraine. 2013;2:325-326.
59. Caroni P., Zurini M., Clark A., Carafoli E. Further characterization and reconstitution of the purified Ca^{2+}-pumping ATPase of heart sarcolemma. *J. Biol. Chem.* 1983;258(12):7305-7310.
60. Furukawa R.-J., Nakamura H. Characterization of the Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPase purified by calmodulin-affinity chromatography from bovine aortic smooth muscle. *J. Biochem.* 1984;96(5):1343-1350.
61. Enyedi A., Minami J., Caride A. J., Penniston J. T. Characteristics of the Ca^{2+} pump and Ca^{2+}-ATPase in plasma membrane of rat myometrium. *Biochem. J.* 1988;252(1):215-220.
62. Falchetto R., Vorherr T., Brunner J., Carafoli E. The plasma membrane Ca^{2+} pump contains a site that interacts with its calmodulin-binding domain. *J. Biol. Chem.* 1991;266:2930-2936.
63. Strehler E. E., Zacharias D. A. Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiol Rev.* 2001;81(1):21-50.
64. Denninga E. J., Beckstein O. Influence of lipids on protein-mediated transmembrane transport. *Chem. Phys. Lipids.* 2013;165(6):638-647.
65. Enyedi A., Flura M., Sarkadi B., Gardos G., Carafoli E. The maximal velocity and the calcium affinity of the red cell calcium pump may be regulated independently. *J. Biol. Chem.* 1987;13(263):6425-6430.
66. Monteith G. R., Roufogalis B. D. The plasma membrane calcium pump a physiological perspective on its regulation. *Cell Calcium.* 1995;18:459-470.
67. Felix C. F., Oliveira V. H., Moreira O. C., Mignaco J. A., Barrabin H., Scofano H. M. Inhibition of plasma membrane Ca^{2+}-ATPase by heparin is modulated by potassium. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2007;39:586-596.
68. Pang Y., Zhu H., Wu P., Chen J. The characterization of plasma membrane Ca^{2+}-

ATPase in rich sphingomyelin-cholesterol domains. *FEBS Lett.* 2005;579(11):2397-403.
69. Tang D., Dean W. L., Borchman D., Paterson C. A. The influence of membrane lipid structure on plasma membrane Ca^{2+}-ATPase activity. *Cell Calcium*. 2006;39(3):209-216.
70. Oliveira V. H., Nascimento K. S. O., Freire M. M., Moreira O. C., Scofano H. M., Barrabin H., Mignaco J. A. Mechanism of modulation of the plasma membrane Ca^{2+}-ATPase by arachidonic acid. *Prostagland. Other Lipid Mediators.* 2008;87:47-53.
71. Davies S. S., Guo L. Lipid peroxidation generates biologically active phospholipids including oxidatively N-modified phospholipids. *Chem. Phys. Lipids.* 2014;181:1-33.
72. Gulaya N. M., Govseeva N. N., Klimashevsky V. M., Shinlova O. P., Slinchenko N. M., Margitich V. M., Kosterin S. A. Effect of N-palmitoylethanolamine on energy-dependent transport of Ca^{2+} in vesicules of myometrium salcolemma and their phospholipid composition. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 1997;69(5-6):64-74. (In Ukrainian).
73. Furukawa K., Tawada Y., Shigekawa M. Protein kinase C activation stimulates plasma membrane Ca^{2+}-pump in cultured vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 1989;264:4844-4849.
74. Fukuda T., Ogurusu T., Furukawa K., Shigekawa M. Protein kinase C-dependent phosphorylation of sarcolemmal Ca^{2+}-ATPase isolated from bovine aortic smooth muscle. *Biochemistry* (Tokyo). 1990;108:629-634.
75. Kuo T. H., Wang K. K.., Carlock L., Diglio C., Tsang W. Phorbol ester induces both the gene expression and phosphorylation of the plasma membrane Ca^{2+}-pump. *J. Biol. Chem.* 1991;266:2520-2525.
76. Qu Y., Torchia J., Sen A. K. Protein kinase C mediated activation and phosphorylation of Ca^{2+}-pump in cardiac sarcolemma. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1992;9(70):1230-1235.
77. Wright L. C., Chen S., Roufogalis B. D. Regulation of the activity and phosphorylation of the plasma membrane Ca^{2+}-ATPase by protein kinase C in intact human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 1993;306:277-284.
78. Krebs J., Guerini D. The calcium pump of plasma membranes Biomembranes. *A Multi-Volume Treatise.* 1996;5:101-131.
79. Lyubakovska L. A., Slinchenko N. M., Burchynska N. F., Kurskij M. D. Catalitic properties of purified Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPase of myometrium sarcolem. *Biochemistry* (M). 1990;55(7):1237-1243.
80. Popescu L. M., Foril C. P., Hinescu M., Pănoiu C., Cinteză M., Gherasim L. Nitroglycerin stimulates the sarcolemmal Ca^{2+}-extrusion ATPase of coronary smooth muscle cells. *Biochem. Pharmacol.* 1985;34(10):1857-1860.
81. Karbovska L., Gorenko Z., Lysai I., Baban V., Veselsky S. The influence of oxytocin on the bile formation and chemical composition of the bile in rats. *Physics Alive.* 2010;18(2):70-74. (In Ukrainian).
82. Stepankovskaya G. K., Shinlova O. P., Fomin V. P., Kosterin S. A., Yarotsky N. E. Effect of oxytocin and sigetin on Ca^{2+} transport in the fraction of plasma membrane cells in myometrium. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 1989;61(5):109-112. (In Ukrainian).
83. Shinlova O. P., Fomin V. P., Kosterin S. A. Influence of oxytocin on salcolemal calcium pump of myometrium. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 1987;59(2):75-79. (In Ukrainian).
84. Moccia F., Berra-Romani R., Tanzi F. Update on vascular endothelial Ca^{2+} signalling: A tale of ion channels, pumps and transporters. *World J. Biol. Chem.* 2012;3(7):127-158.
85. Guerini D., Pan B., Carafoli E. Expression, purification, and characterization of isoform 1 of the plasma membrane Ca^{2+} pump: focus on calpain sensitivity. *J. Biol. Chem.* 2003;278(40):38141-38148.
86. Pászty K., Verma A. K., Padányi R., Filoteo A. G., Penniston J. T., Enyedi A. Plasma Membrane Ca^{2+}-ATPase Isoform 4b Is Cleaved and Activated by Caspase-3 during the Early Phase of Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2002;277:6822-6829.
87. Linde C. I., Di Leva F., Domi T., Tosatto S. C., Brini M., Carafoli E. Inhibitory interaction of the 14-3-3 proteins with ubiquitous (PMCA1) and tissue-specific (PMCA3) isoforms of the plasma membrane Ca^{2+} pump. *Cell Calcium.* 2008;43(6):550-561.
88. Dick I. M., Glendenning J. L. P., Prince R. L. Estrogen and androgen regulation of plasma membrane calcium pump activity in immortalized distal tubule kidney cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2003;212(1-2):11-18.
89. Vanagas L., Rossi R. C., Caride A. J, Filoteo A. G., Strehler E. E., Rossi J. P. Plasma

membrane calcium pump activity is affected by the membrane protein concentration. Evidence for the involvement of the actin cytoskeleton. *Biochim. Biophys. Acta*. 2007;1768(6):1641-1649.

90. Monesterolo N. E., Amaiden M. R., Campetelli A. N., Santander V. S., Arce C. A., Pié J., Casale C. H. Regulation of plasma membrane Ca^{2+}-ATPase activity by acetylated tubulin: influence of the lipid environment. *Biochim. Biophys. Acta*. 2012;1818(3):601-608.
91. Lock J. T., Sinkins W. G., Schilling W. P. Effect of protein S-glutathionylation on Ca^{2+} homeostasis in cultured aortic endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2011;300(2):493-506.
92. Ritchie M. F., Zhou Y., Soboloff J. Transcriptional mechanisms regulating Ca^{2+} homeostasis. *Cell Calcium*. 2011;49(5):314-321.
93. Strehler E. E. Plasma membrane calcium ATPases as novel candidates for therapeutic agent development. *J. Pharm. Pharm. Sci*. 2013;16(2):190-206.
94. Gros R., Afroze T., You X.-M., Kabir G., Wert R., Kalair W., Hoque A. E., Mungrue I. N., Husain M. Plasma membrane calcium ATPase overexpression in arterial smooth muscle increases vasomotor responsiveness and blood pressure. *Circul. Res.* 2003;93(7):614-621.
95. Cartwright E. J., Oceandy D., Austin C., Neyses L. Ca^{2+} signalling in cardiovascular disease: the role of the plasma membrane calcium pumps. *Sci. China.* 2011;54(8):691-698.
96. Noble D., Herchuelz A. Role of Na/Ca exchange and the plasma membrane Ca^{2+}-ATPase in cell function. *EMBO Reports.* 2007;8(3):228-232.
97. Shlykov S. G., Slinchenko N. M., Burdyga F. V., Kosterin S. A. Uterotonic action of sigetin and its effect on the Mg^{2+}, ATP-dependent transport and stationary exchange of Ca^{2+} through myometrial sarcolemma. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 1993;65(3):57-65. (In Ukrainian).
98. Zvarych E. I. Plasma membrane calcium ATPase. Structure and function. *Biol. Membrane.* 1991;8(6):565-584. (In Russian).

Отримано 08.09.2014