

## Про можливу участь мітохондрій у регуляції скоротливої активності гладенького м'яза

Т. Л. Давидовська, О. В. Цимбалюк, М. С. Мірошніченко,  
Ю. І. Прилуцький, С. О. Костерін<sup>1</sup>

Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
Вул. Володимирська, 64, Київ, 01033, Україна

<sup>1</sup> Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України  
Вул. Леонтовича, 9, Київ, 01033, Україна

---

*Запропоновано математичну модель  $Ca^{2+}$ -залежного контролю скоротливої активності гладенького м'яза, яка ґрунтується на сучасних уявленнях стосовно молекулярних механізмів функціонування мембраноз'язаних та енергозалежних  $Ca^{2+}$ -транспортуючих систем, що локалізовані в плазматичній мембрані, мітохондріях та саркоплазматичному ретикулумі. Чисельно відтворено фази скорочення та розслаблення м'яза, які одночасно реалізуються в часі, детально проаналізовано участь мітохондрій у  $Ca^{2+}$ -залежному контролі скоротливого процесу та уточнено значення деяких біохімічних констант, що характеризують кінетику транспорту кальцію в гладеньком'язовій клітині.*

---

$Ca^{2+}$ -залежний контроль скоротливої активності гладеньком'язових клітин (ГМК) визначається внутрішньоклітинною концентрацією катіонів ( $[Ca^{2+}]_i$ ). Літературні дані свідчать про те, що одним із шляхів збільшення  $[Ca^{2+}]_i$  в ГМК є їхнє надходження через потенціалкеровані кальцієві канали плазматичної мембрани [1] внаслідок, наприклад, взаємодії мускаринових рецепторів з агоністом або деполяризації, викликані гіперкалієвим розчином [2].

Дискусійним до останнього часу залишається питання про участь мітохондрій в механізмах регуляції  $[Ca^{2+}]_i$  ГМК судин та шлунково-кишкового тракту. Одні автори вважають, що це можливо, але за умов патологічного стану цих клітин [3]. Разом з тим у низці досліджень показано важливу роль мітохондрій функціонально нормальних ГМК при фізіологічних умовах як у збільшенні, так і в зменшенні рівня  $[Ca^{2+}]_i$  шляхом  $Mg^{2+}$ , АТР-залежного видалення цих катіонів з міоплазми [4, 5]. Вихід  $Ca^{2+}$  з мітохондрій залежить в рівній мірі від присутності кальмодулін-залежної протеїнкінази П

[6] і від кількості  $Ca^{2+}$  у саркоплазматичному ретикулумі (СР) [7]. У літературі [8] розглядається можливість перерозподілу  $Ca^{2+}$  між мітохондріями, СР та міоплазмою як необхідної ланки в механізмі регуляції внутрішньоклітинної концентрації цих катіонів у ГМК, однак на цей час вона залишається лише гіпотезою.

Відомо [1, 4, 5, 9, 10], що зниження  $[Ca^{2+}]_i$  активованих міоцитів до базального рівня та відповідно релаксація ГМК можуть відбуватися за участі  $Mg^{2+}$ , АТР-залежної кальцієвої помпи плазматичної мембрани, системи  $Na^+—Ca^{2+}$  обміну (деякі ГМК). У стаціонарному стані має місце так званий базальний, скомпенсований  $Mg^{2+}$ , АТР-залежною кальцієвою помпою вхід  $Ca^{2+}$  у ГМК через плазматичну мембрану, що забезпечує довготривале підтримання величини  $[Ca^{2+}]_i$  на рівні  $10^{-7}—10^{-8}$  М [1].

Мета даної роботи полягала в створенні математичної моделі регуляції  $[Ca^{2+}]_i$  в ГМК і відповідно скоротливої активності гладенького м'яза (ГМ), яка ґрунтується на припущенні, що сила скорочення ГМ пропорційна концентрації комплексу іонів  $Ca^{2+}$  з регуляторним білком кальмодуліном [10], і дає змогу кількісно оцінити внески енергозалежно-

© Т. Л. ДАВИДОВСЬКА, О. В. ЦИМБАЛЮК,  
М. С. МИРОШНИЧЕНКО, Ю. І. ПРИЛУЦЬКИЙ,  
С. О. КОСТЕРІН, 2001

го транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  через плазматичні мембрани, мембрани мітохондрій та СР у контроль внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу та скоротливої активності.

Базуючись на сучасних уявленнях стосовно молекулярних механізмів функціонування мембранозв'язаних енергозалежних  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортуючих систем [1, 4, 5, 10, 11], кінетичне рівняння для концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  всередині ГМК ( $m_i$ ) можна записати так:

$$\frac{dm_i}{dt} = \left\{ B(m_e - m_i)\Theta(t) - \frac{V_{\max,1}m_i}{K_{M,1} + m_i} \right\} - \frac{V_{\max,2}m_i}{K_{M,2} + m_i} - \frac{V_{\max,3}m_i}{K_{M,3} + m_i} \quad (1)$$

де перший складник (у фігурних дужках) визначає транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  через плазматичну мембрану:  $B$ ,  $V_{\max,1}$  та  $K_{M,1}$  — відповідно константа швидкості надходження іонів  $\text{Ca}$  у міоцити через кальцієві канали, максимальна швидкість транспорту іонів  $\text{Ca}^{2+}$  з міоцитів за рахунок функціонування кальцієвої помпи плазматичної мембрани та константа Міхаеліса (стосовно іонів  $\text{Ca}$ ) для даного процесу (його кінетика підпорядковується рівнянню Міхаеліса-Ментен);  $m_e$  — концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  в позаклітинному просторі;  $\Theta(t)$  — функція, яка моделює  $\text{Ca}^{2+}$ -перехід через кальцієві канали плазматичної мембрани. Ця функція задовольняє наступному рівнянню з урахуванням процесу  $\text{Ca}^{2+}$ -залежної інактивації цих каналів:

$$\frac{d\Theta}{dt} = k_{-1}(1 - \Theta) - k_1 m_i \Theta, \quad (2)$$

у якому  $k_1$  та  $k_{-1}$  — константи швидкостей зв'язування та десорбції іонів  $\text{Ca}$  з цитоплазматичного боку клітини у випадку  $\text{Ca}^{2+}$ -залежного інактиваційного процесу. У початковий момент часу  $\Theta(0) = 1$ .

Другий складник у рівнянні (1) моделює електрофоретичну акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях, що в кінетичному відношенні підпорядковується рівнянню Міхаеліса-Ментен. Тут  $V_{\max,2}$  та  $K_{M,2}$  — максимальна швидкість акумуляції іонів  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондріях та константа Міхаеліса (стосовно іонів  $\text{Ca}$ ) для даного процесу відповідно.

Третій складник у рівнянні (1) моделює  $\text{Mg}^{2+}$ , АТР-залежну акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  у СР, що в кінетичному відношенні також підпорядковується рівнянню Міхаеліса-Ментен. Тут  $V_{\max,3}$  та  $K_{M,3} = K_{M,1}$  — максимальна швидкість акумуляції іонів  $\text{Ca}$  у СР та константа Міхаеліса (стосовно іонів  $\text{Ca}$ ) для даного процесу відповідно.

«Базові» значення констант, що фігурують у

рівняннях (1), (2), були такими [10]:  $m_e = 10^{-3}$  М,  $B = 10^{-3}$  с $^{-1}$ ,  $V_{\max,1} = 7 \cdot 10^{-8}$  Мс $^{-1}$ ,  $K_{M,1} = 3 \cdot 10^{-7}$  М,  $V_{\max,2} = 2,33 \cdot 10^{-8}$  Мс $^{-1}$ ,  $K_{M,2} = 3 \cdot 10^{-6}$  М,  $V_{\max,3} = 1,3 \cdot 10^{-8}$  Мс $^{-1}$ ,  $k_1 = 2,2 \cdot 10^6$  М $^{-1}$ с $^{-1}$  та  $k_{-1} = 0,6$  с $^{-1}$ . При розрахунках для порівняння парціальних внесків другого (мітохондрії) та третього (СР) складників у рівняння (1) зручно вважати  $V_{\max,3} = \beta V_{\max,2}$ , де  $\beta$  — деякий коефіцієнт, що не має розмірності ( $0 < \beta < 1$ ). Перепишемо рівняння (1) у такому вигляді:

$$\frac{dm_i}{dt} = \left\{ B(m_e - m_i)\Theta(t) - \frac{V_{\max,1}m_i}{K_{M,1} + m_i} \right\} - \frac{V_{\max,2}m_i}{K_{M,2} + m_i} - \frac{\beta V_{\max,2}m_i}{K_{M,1} + m_i} \quad (1^*)$$

Припускаючи, що сила скорочення ГМ ( $f$ ) пропорційна концентрації комплексу іонів  $\text{Ca}$  із регуляторним білком кальмодуліном ( $\omega$ ), можна записати

$$f(t) = D\omega(t), \quad (3)$$

де  $D$  — константа пропорційності (відповідає максимальній величині м'язової напруги за умов повного насичення кальмодуліну іонами  $\text{Ca}$ ), і

$$\frac{d\omega}{dt} = k_2 m_i (1 - \omega) - k_{-2} \omega. \quad (4)$$

Тут  $k_2$  та  $k_{-2}$  — константи швидкостей зв'язування та розпаду комплексу  $\text{Ca}^{2+}$  — кальмодулін відповідно. У початковий момент часу  $\omega(0) = 1$ . Типові значення цих параметрів становлять [10]:  $k_2 = 1,5 \cdot 10^6$  М $^{-1}$ с $^{-1}$  та  $k_{-2} = 0,5$  с $^{-1}$ .

Систему нелінійних диференціальних рівнянь (1\*), (2), (4) розв'язували чисельно з використанням пакету «Математика» і поетапно, враховуючи послідовно перший (плазматична мембрана), другий (мітохондрії) і третій (СР) складники в рівнянні (1\*) та беручи до уваги такі експериментальні факти [1—3, 10, 11]:

1) за умов збудження ГМ має місце підвищення концентрації всередині ГМК до максимальної величини  $m_{i,\max} < 1$  мкМ;

2) наростання концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  триває близько  $t_{\max} \leq 0,05$  с, після чого її значення різко зменшується до початкової величини  $m_i(0) = 0,1$  мкМ за час  $t \leq 0,5$  с;

3) фаза скорочення ГМ триває  $t_{\max} \geq 1$  с, після чого наступає фаза розслаблення, яка може тривати  $t \geq 60$  с.

Однак при вищенаведених кінетичних параметрах моделі нам не вдалося не те що кількісно, а навіть якісно описати транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  у ГМК. Тому ми змушені були замінити значення пара-

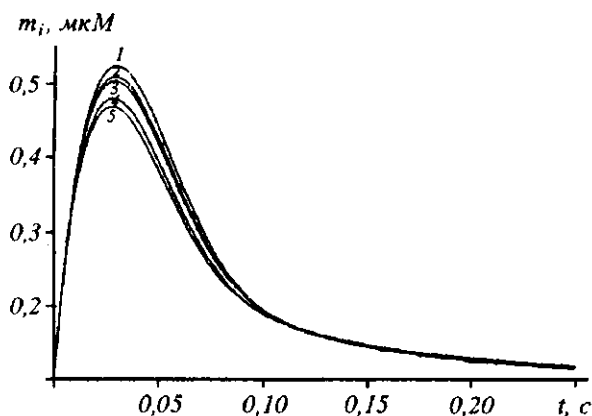


Рис. 1. Розрахована концентраційна залежність  $\text{Ca}^{2+}$  у гладеньком'язових клітинах як функція часу  $m_i(t)$  при послідовному врахуванні таких складників у рівнянні (1\*): 1 — плазматичні мембрани; 2 — плазматичні мембрани + мітохондрії; 3 — плазматичні мембрани + мітохондрії + СР при  $\beta = 0,1$ ; 4 — плазматичні мембрани + мітохондрії + СР при  $\beta = 0,5$ ; 5 — плазматичні мембрани + мітохондрії + СР при  $\beta = 0,7$

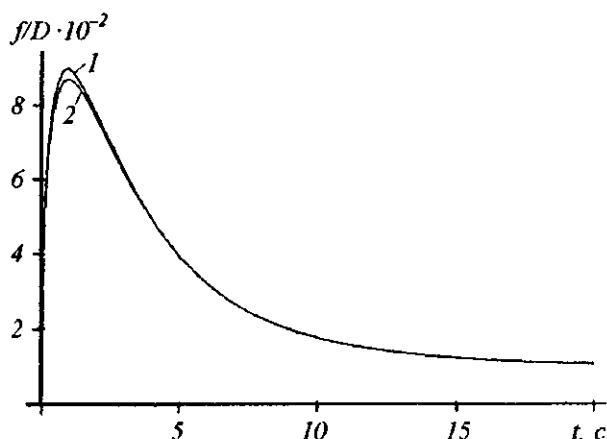


Рис. 2. Розрахована сила скорочення гладеньких м'язів (на одиницю амплітуди) як функція часу при послідовному врахуванні таких складників у рівнянні (1\*): 1 — плазматичні мембрани + мітохондрії; 2 — плазматичні мембрани + мітохондрії + СР при  $\beta = 0,7$

метрів моделі, зберігаючи значення відповідних констант Міхаеліса, які є «паспортними» кінетичними характеристиками  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортуючих систем. При цьому прагнули задіяти якнайменшу кількість констант. У результаті отримано оптимальні значення для таких кінетичних параметрів:  $B_{\text{opt}} = 6 \cdot 10^{-2} \text{ c}^{-1}$ ,  $V_{\text{max},1 \text{ opt}} = 7 \cdot 10^{-5} \text{ Mc}^{-1}$ ,  $V_{\text{max},2 \text{ opt}} = 7 \cdot 10^{-6} \text{ Mc}^{-1}$ ,  $k_{1, \text{opt}} = 2,5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  і  $k_{-1, \text{opt}} = 1 \text{ c}^{-1}$ .

Результати розрахунків наведено на рис. 1. Як можна бачити, вплив другого (мітохондрії) та третього (СР) складників у рівнянні (1\*) зводиться до зменшення амплітуди концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  всередині ГМК  $m_{i, \text{max}}$  і часу досягнення амплітудного значення сили  $t_{\text{max}}$ . Варіюючи значення константи  $\beta$ , ми встановили межі її зміни, поза якими поведінка функції  $m_i(t)$  є або не цілком адекватною передбачуваній (згідно з вищенаведеними експериментальними фактами), або не чутливою взагалі до цієї величини ( $0,1 \leq \beta \leq 0,7$ ). Як випливає з рис. 1, із зростанням  $\beta$  зростає внесок третього (СР) складника у рівнянні (1\*), який описує акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  у СР.

Навпаки, при малих значеннях  $\beta$  його внесок є незначним (%) порівняно з внеском другого складника, що моделює акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондріях. Це опосередковано дозволяє припустити, що за певних фізико-хімічних умов (наприклад, присутності в міоплазмі ГМК (аорта) блокатора мітохондрій FCCP або цианіду в комбінації з

олігоміцином В) може відбуватися перерозподіл іонів  $\text{Ca}^{2+}$  між мітохондріями та СР [7—9].

Розв'язуючи рівняння (4), нам вдалося якісно описати лише фазу скорочення ГМ. Цікавим виявився той факт, що фазу розслаблення ГМ вдається змоделювати, суттєво змінюючи (зменшуючи на 1—4 порядки) величину єдиного параметра моделі  $k_{-1}$  у рівнянні (2) (при фіксованих інших оптимальних параметрах). Відзначимо також, що зменшення значення константи  $k_{-2}$  в рівнянні (4) призводить до зростання амплітуди сили скорочення ГМ і часу досягнення амплітудного значення сили  $t_{\text{max}}$ . Результати розрахунків наведено на рис. 2. При цьому вважалося, що  $k_{-1} = 10^{-3} \text{ c}^{-1}$  [10]. Як видно, врахування спочатку другого (мітохондрії), а потім третього (СР) складників у рівнянні (1\*) призводить до падіння амплітуди  $f/D = \omega_{\text{max}}$  і збільшення часу досягнення амплітудного значення сили  $t_{\text{max}}$ .

Підсумовуючи отримані результати, можна зробити такі основні висновки:

1) в межах кінетичних рівнянь (1\*), (2), які описують транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  через плазматичні мембрани та акумуляцію іонів  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондріях і СР, вдалося кількісно відтворити часову залежність концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у ГМК. Проаналізовано внески кожного з цих процесів. Є підстави вважати, що за певних фізико-хімічних умов роль мітохондрій в регуляції внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  може бути домінуючою порівняно з СР;

2) базуючись на тому факті, що сила скорочення — розслаблення ГМ пропорційна концентрації комплексу  $\text{Ca}^{2+}$  з регуляторним білком кальмодуліном, у межах запропонованої математичної моделі вдалося якісно відтворити механокінетичну залежність  $f/D = \omega(t)$ ;

3) уточнено значення біохімічних параметрів  $V_{\max,1} = 7 \cdot 10^{-5} \text{ Мс}^{-1}$  і  $V_{\max,2} = 7 \cdot 10^{-6} \text{ Мс}^{-1}$ , що входять як феноменологічні параметри в кінетичне рівняння (1\*).

Отримані дані, на наш погляд, можуть викликати практичний інтерес у дослідників для їхньої подальшої перевірки.

*T. L. Davidovskaya, O. V. Tsimbalyuk, M. S. Miroshnichenko, Yu. I. Prylutskiy, S. A. Kosterin*

On the role of mitochondria in the regulation of contractile activity in smooth muscle

#### Summary

*The mathematical model of the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent control of smooth muscle contracting activity is proposed. It is based on the modern ideas relative to the molecular mechanisms of the functioning of the membrane-associated and energy-dependent  $\text{Ca}^{2+}$ -transportation systems, localized in the plasmatic membrane, mitochondria and sarcoplasmic reticulum. The phases of contraction and relaxation of muscle, realized simultaneously, are numerically calculated. A role of mitochondria in the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent control of contraction is analyzed in detail. The values of some biochemical constants, which characterize the kinetics of the calcium transport into the smooth muscle cell are defined more precisely.*

*T. L. Давидовская, О. В. Цимбалюк, Н. С. Мирошниченко, Ю. И. Прилуцкий, С. А. Костерин*

О возможном участии митохондрий в регуляции сократительной активности гладкой мышцы

#### Резюме

*Предложена математическая модель  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого контроля сократительной активности гладкой мышцы, которая основывается на современных представлениях относительно молекулярных механизмов функционирования мембраносвязанных и энергозависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортирующих систем, локализованных в плазматической мембране, митохондриях и саркоплазматическом ретикулуме. Численно воспроизведены фазы сокращения и расслабления мышцы, которые реализуют-*

*ся во времени, детально проанализирована роль митохондрий в  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимом контроле сократительного процесса и уточнено значения некоторых биохимических констант, характеризующих кинетику транспорта кальция в гладкомышечной клетке.*

#### ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Kurijama H., Kitamura K., Itoh T., Inoue R. Physiological features of visceral smooth muscle cells, with special reference to receptors and ion channels // *Physiol. Rev.*—1998.—78, N 3.—P. 811—920.
2. Жолос О. В. Мембранні та внутрішньоклітинні механізми М-холінергічної активації гладеньком'язових клітин тонкого кишечнику: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук.—Київ, 1999.—32 с.
3. Somlyo A. P., Himpens B. Cell calcium and its regulation in smooth muscle // *FASEB J.*—1989.—3, N 8.—P. 2266—2276.
4. Yamamoto H., Van Breemen C. Calcium compartments in saponin-skinned cultural vascular smooth muscle cells // *J. Gen. Physiol.*—1986.—87, N 3.—P. 369—390.
5. Gurney A. M., Drummond R. M., Fay F. S. Calcium signaling in sarcoplasmic reticulum cytoplasm and mitochondria during activation of rabbit aorta myocytes // *Cell Calcium.*—2000.—27, N 6.—P. 339—351.
6. Mc Geown J. G., Mc Carron J. G., Drummond R. M., Fay F. S. Calcium-calmodulin-dependent mechanisms accelerate calcium decay in gastric myocytes from *Bufo marinus* // *J. Physiol.*—1998.—506, pt 1.—P. 95—107.
7. Drummond R. M., Mix T. C., Fuft R. A., Walsh J. V., Fay F. S. Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis during  $\text{Ca}^{2+}$  influx and  $\text{Ca}^{2+}$  release in gastric myocytes from *Bufo marinus* // *J. Physiol.*—2000.—522, pt 3.—P. 375—390.
8. Ychas F., Jouaville L. S., Sidash S. S., Mazat J. P., Holmuhamedov E. L. Mitochondrial calcium sparging: a transduction mechanism based on calcium-induced permeability transition in cell calcium signaling // *FEBS Letts.*—1994.—348, N 2.—P. 211—215.
9. Bolton T. B., Prestwich S. A., Zholos A. V., Gordienko D. V. Excitation-contraction coupled in gastrointestinal and other smooth muscles // *Annu. Rev. Physiol.*—1999.—61.—P. 85—115.
10. Костерин С. А. Транспорт кальция в гладких мышцах.— Киев: Наук. думка, 1990.—216 с.
11. Kosterin S. A., Burdyga Th. V., Fomin V. P., Grover A. K. Control of Uterine Contractility / Eds R. E. Garfield, T. N. Tabb.—Boca Raton: CRC press, 1994.—P. 129—153.

УДК 577.3

Надійшла до редакції 10.07.2000