Міністерство освіти і науки України

Національний університет «Києво-Могилянська академія»

Факультет природничих наук

Кафедра лабораторної діагностики біологічних систем

Магістерська робота
освітній ступінь - магістр

на тему **«ХАЛКОНОВМІСНІ КАЛІКС[4]АРЕНИ - ПЕРСПЕКТИВНІ ЕФЕКТОРИ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ МІТОХОНДРІЙ ГЛАДЕНЬКОГО М'ЯЗУ»**

Виконала: студентка 2-го року навчання
Спеціальності 091 Біологія
Освітньо-наукової програми Лабораторна діагностика біологічних систем
Святненко Марина Дмитрівна

Керівники:
Данилович Г.В.,
доктор біологічних наук,
с. н.с. відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України;
Антонюк Н.Г.,
кандидат хімічних наук,
доцент кафедри хімії НаУКМА

Рецензент: Цимбалюк О.В.

Магістерська робота захищена
з оцінкою _____

Секретар ЕК Пахаренко М. В.

«____» _____ 20__ року

Київ – 2023

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

МХ	–	мітохондрії
ВММ	–	внутрішня мембрана мітохондрій
АФК	–	активні форми кисню
ЕТЛ	–	електронно-транспортний ланцюг
ПМ	–	плазматична мембрана
ГДД	–	гідродинамічний діаметр
АТР	–	аденозинтрифосфат (**a**denosine **t**ri**p**hosphate, ATP)
NADH	–	нікотинамідаденіндинуклеотид (**n**icotinamide **a**denine **d**inucleotide, NADH)
$FADH_2$	–	флавінаденіндинуклеотид (**f**lavin **a**denine **d**inucleotide, FAD)
NO	–	оксид азоту (**N**itric **o**xide, NO**)**
NOS	–	NO-синтаза (**N**itric **o**xide **s**ynthase, NOS)
mtNOS	–	мітохондрійна NO-синтаза (**mi**t**o**chondrial **N**itric **o**xide **s**ynthase, mtNOS
LETM1	–	протеїн, що репрезентує H^+-Ca^{2+}-обмінник в мітохондріях (**l**eucine zipper, **E**F-hand containing **t**rans**m**embrane protein **1)**
CCCP	–	карбоніл ціанід 3-хлорофенілгідразон (**c**arbonyl **c**yanide *m*-**c**hloro**p**henyl hydrazone, CCCP)
MICU	–	протеїн (**mi**tochondrial **C**alcium **u**ptake)
MCU	–	протеїн (**m**itochondrial **C**alcium **u**niporter)

ВСТУП

На разі доведено, що високоємнісним Ca^{2+}-депо в клітині виступають мітохондрії (МХ). Зміни цитозольної концентрації Ca^{2+} лежать в основі контролю скоротливої активності гладеньких м'язів, зокрема міометрію [1]. МХ беруть участь у термінуванні Ca^{2+}-сигналу та підтримують низьку фізіологічну концентрацію цього катіона в цитозолі (близько 100 нМ), захищаючи клітини від Ca^{2+}-перевантаження [2, 3]. Біологічна активність МХ має Ca^{2+}-залежний характер: зростання концентрації Ca^{2+} в матриксі МХ активує ензими циклу трикарбонових кислот та синтез АТР [4], перевантаження матриксу катіоном індукує клітинну загибель [5]. Дезорганізація роботи Ca^{2+}-транспортувальних систем, локалізованих в мембранах МХ, може призводити до порушення Ca^{2+}-гомеостазу клітин та, як наслідок, до клітинної патології.

У МХ міометрія доведено функціонування двох систем транспорту Ca^{2+}, локалізованих у внутрішній мембрані МХ (ВММ): Ca^{2+}-уніпортеру – електрофоретичної низькоафінної і високоємнісної системи акумуляції іонів Са та H^{+}-Ca^{2+}-обмінника [6, 7]. Руйнація узгодженого функціонування цих двох структур може призвести до явища Ca^{2+}-перевантаження матриксу, гіперполяризації, порушення Ca^{2+}-залежного метаболізму активних форм азоту/кисню та їхньої гіперпродукції [8, 9].

Електрохімічний потенціал на ВММ є регулятором активності Ca^{2+}-уніпортера, АТР-синтази та пори перехідної проникності. А потужність роботи дихального ланцюга залежить від величини електрохімічного потенціалу [10]. Генерацію потенціалу на ВММ забезпечують комплекси I – IV. Коензими нікотинамідаденіндинуклеотид (NADH) та флавінаденіндинуклеотид ($FADH_2$) відіграють роль первинних переносників електронів при окисному фосфорилюванні. Їхнє окислення у мітохондрійному

електронно-транспортному ланцюзі (ЕТЛ) спричиняє транслокацію протонів, яка проходить через комплекси I, III, IV з матриксу у міжмембранний простір, а швидкість синтезу АТР контролює протонний градієнт. Порушення дихання МХ відображається в змінах редокс-стану NADH та $FADH_2$ [11, 12].

Потужним джерелом оксиду азоту (NO) в клітині також виступають МХ. З'ясовано, що синтез NO в МХ є Ca^{2+}-залежним процесом [13]. Оксид азоту регулює енергетичні, метаболічні і транспортні процеси в них. ВММ, як і ензими матриксу, є ефективними мішенями дії нітросполук через високий вміст у них тіольних залишків, залізо-сірчаних центрів, гемових груп та наявність супероксид-аніону. Зокрема доведено, що NO або його похідні взаємодіють з I та III комплексами дихального ланцюга, гальмуючи їхнє функціонування [14, 15]. Загалом оксид азоту у фізіологічних концентраціях (наномолярних) розглядають як протекторну молекулу, яка здатна захищати органели від дисфункції, спричиненої гіперполяризацією ВММ, надлишковою продукцією активних форм кисню (АФК) й окисним стресом [14-16].

Іони Са відіграють першочергову роль для функціонування МХ, зокрема їхньої біоенергетики і біосинтезу NO. Тому пошук таких нетоксичних та екзогенних сполук, які мали б потенціал ефективно впливати на Ca^{2+}-транспортувальні та Ca^{2+}-залежні процеси цих субклітинних структур, є актуальним. Останні роки значна увага приділяється циклічним олігомерам фенолів (або ризорцинів) – каліксаренам [17]. Калікс[4]арени мають противірусну, антитромботичну та антибактеріальну дію, є інгібіторами ензимів, окремі представники доволі специфічні щодо модуляції іон-транспортувальних систем [17] плазматичної мембрани (ПМ) та МХ [18, 19]. Встановлено, що калікс[4]арени модулюють контрактильну активність міометрія [20-22]. Перевагою калікс[4]аренів як можливих інструментів біохімічних досліджень є їхня нетоксичність і дешевизна синтезу. Не виключено, що за невисоких (мікромолярних) концентрацій окремі групи

калікс[4]аренів здатні діяти на функціональну активність ЕТЛ, поляризацію мітохондрійної мембрани, обмін іонів Са та біосинтез NO в МХ.

Продемонстровано, що калікс[4]арени, як доволі гідрофобні сполуки, здатні проникати в клітини і взаємодіяти з мітохондріями [23]. Введення на нижній вінець калікс[4]аренів біологічно активних (біорелевантних) халконових угруповань може обумовлювати ефективну взаємодію з мембранними структурами і можливість впливу на мембрано-асоційовані транспортні, енергетичні і метаболічні процеси [24].

Експериментальна частина роботи виконувалась у відділі біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна Національної академії наук України.

Метою роботи було вивчення впливу халконовмісних калікс[4]аренів на біоенергетичні, транспортні та метаболічні процеси в мітохондріях гладенького м’язу. Відповідно до мети були поставлені наступні ***завдання***:

1. Дослідити вплив вибраних халконовмісних калікс[4]аренів на інтенсивність окисленння NADH та $FADH_2$ в ізольованих мітохондріях.
2. З’ясувати ефекти вибраних халконовмісних калікс[4]аренів на генерацію активних форм кисню в ізольованих мітохондріях.
3. Вивчити, яким чином вибрані халконовмісні калікс[4]арени можуть впливати на трансмембранний обмін іонів Са в ізольованих мітохондріях і проаналізувати залежність можливих ефектів від хімічної структури макроциклів.
4. Визначити ефекти вибраних халконовмісних калікс[4]аренів на синтез оксиду азоту ізольованими мітохондріями.

РОЗДІЛ 1
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Мітохондрійна біоенергетика

Мітохондрії відіграють центральну роль в енергетичному забезпеченні клітинного метаболізму (синтез АТР, ß-окислення жирних кислот, цикл сечовини, синтез стероїдних гормонів), перемиканні шляхів загибелі клітини (апоптоз/некроз), термінації Ca^{2+}-сигналу. Потенціал на ВММ є фундаментальною характеристикою МХ та відображає їхню функціональну активність [25]. Ацетил – СоА утворюється в МХ з пірувату, в ході ß-окислення жирних кислот метаболіт вступає в цикл Кребса, що супроводжується утворенням трьох молекул NADH, молекули $FADH_2$ та молекули АТР [25, 26]. Аденінові нуклеотиди NADH та $FADH_2$ відіграють роль первинних переносників електронів в процесі окисного фосфорилювання. В ході окисного фосфорилювання за участі ЕТЛ електрони від коензимів NADH та $FADH_2$ переходять на молекулярний кисень. При цьому вивільняється енергія, яка використовується для переносу протонів з мітохондрійного матрикса в міжмембранний простір. Цей перенос реалізується у місцях спряження окислення та фосфорилювання комплексами дихального ланцюга I, III та IV. Завдяки створенню градієнту pH на ВММ формується трансмембранний електрохімічний потенціал ΔΨ, внутрішня сторона мембрани має негативний заряд (-150/-180 мВ) [27]. Показано, що зміни редокс-стану NADH та $FADH_2$ можуть слугувати маркерами функціональної активності МХ [12].

1.2. Транспорт іонів Са в мітохондріях

Іони Са приймають важливу участь у підтриманні різних функціональних процесів у гладеньком'язових клітинах. Ca^{2+} виступає

внутрішньоклітинним месенджером, який регулює різноманітні процеси: транскрипції, проліферації, секреції тощо [28, 29]. Зміни концентрації Ca^{2+} у матриксі МХ модулюють синтез АТР (через Ca^{2+}-залежність α-кетоглутарат- та ізоцитрат-дегідрогеназ циклу Кребса, а також піруватдегідрогеназного комплексу), впливає на зміни вмісту цитозольного Ca^{2+}, сприяє апоптозу [29, 30].

Транспорт іонів Са у МХ здійснюється через структури зовнішньої мембрани МХ та ВММ. Зовнішня мембрана є проникною для молекул до 5 кДа. Вхід Ca^{2+} через зовнішню мітохондрійну мембрану забезпечує активність потенціалзалежного аніонного каналу (VDAC) [31, 32]. ВММ має меншу проникність та містить спеціалізовані транспортні білки, які й забезпечують транспорт іонів в матрикс МХ і навпаки [34]. Одним із каналів, через який іони Са надходять до матриксу, є мітохондрійний Ca^{2+}-уніпортер.

Ca^{2+}-уніпортер ВММ є мультипротеїновим комплексом [34]. Основним елементом комплексу, який утворює пору, є протеїн Mitochondrial calcium uniporter (MCU) (40 кДа). Цей білок утворює олігомери на ВММ і взаємодіє з іншими регуляторними протеїнами уніпортеру. MCU містить у своєму складі два домени типу «coiled-coil» та два інших трансмембранних домени, з'єднані один з одним короткою петлею [28, 34]. Кардіоліпін, специфічний для ВММ фосфоліпід, приймає важливу участь у підтриманні функціонування MCU. Відсутність кардіоліпіну може призводити до зниження експресії MCU та погіршення проникності іонів Са через комплекс [35].

До Ca^{2+}-уніпортеру також входить ряд регуляторних білків. Одними із них є білки mitochondrial Calcium uptake (MICU) (~45-55 кДа). Вони містяться у міжмембранному просторі і мають у структурі «EF-hand» мотиви, які регулюють зв'язування з Ca^{2+} [33]. MICU1 є регуляторним білком, що контролює аккумуляцію Ca^{2+} уніпортером [32]. Протеїни MICU2 і MICU3 паралогами MICU1. MICU2 здебільшого експресується у вісцеральних органах, MICU3 – у нервових тканинах. Ці два білки утворюють

гетеродимери, що зв'язуються із MCU через MICU1, та регуюють його активність. Субодиниці гетеродимерів поєднані між собою S-S зв'язком. За умови високої концентрації цитозольного Ca^{2+} MICU1 є активатором MCU, а за низької концентрації цитозольного Ca^{2+} MICU2 стає інгібітором MCU. MICU1 може утворювати гетеродимери з MICU2 та MICU3, в той час як MICU3 формує гетеродимери лише з MICU1 [36, 37]. До комплексу Ca^{2+}-уніпортера входить також протеїн EMRE (10 кДа), який містить один трансмембранний домен й один С-термінальний аспартат-вмісний домен. N-кінець білка виступає сенсором змін Ca^{2+} у матриксі МХ. EMRE є ключовою субодиницею для забезпечення взаємодії MICU1 з MCU [32, 38]. Мембранний білок MCUR1 (~35 кДа) також є важливим для утворення комплексу Ca^{2+}-уніпортера; він регулює необхідну для індукції мітохондріальної пори перехідної проникності концентрацію Ca^{2+}; складається з двох трансмембранних доменів, N- та С-кінці білка знаходяться в міжмембранному просторі [33].

Мітохондрійний ріанодиновий рецептор (mRyR) є альтернативною системою транспорту Ca^{2+} через ВММ. mRyR володіє високою провідністю та низькою селективністю по відношенню до Ca^{2+}. При концентрації Ca^{2+} 10-40 мкмоль/л катіон ефективно транспортується через mRyR [29].

Швидкий мітохондрійний вхід Ca^{2+} (RaM) – спосіб транспорту Ca^{2+} через ВММ, набагато швидший за Ca^{2+}-уніпортер. Завдяки специфічному перенесенню Ca^{2+}, RaM працює короткотривало, проте його структурні та функціональні властивості не досліджені достеменно [29, 39].

Вхід Ca^{2+} в МХ має компенсуватися системами виводу даного катіону з матриксу органел в цитозоль. $Na^+/Ca^{2+}/Li^+$-обмінник володіє такою властивістю.

$Na^+/Ca^{2+}/Li^+$ обмінник (NCLX) (60 кДа) каталізує обмін через ВММ систем Ca^{2+}/ Na^+ та Li^+/Ca^{2+}. До його складу входять два трансмембранні домени α1 та α2, що мають у своєму складі сайти зв'язування та обміну іонів

[32, 33, 38]. Стехіометрія перенесення іонів в NCLX є питанням дискусійним. Продемонстрована стехіометрія переносу іонів: 1 Ca^{2+} на 3 Na^{+}, або 1 Ca^{2+} та 2 Na^{+} [32, 38].

Окрім Na^{+}-залежного шляху виходу іонів Са з МХ, доведена наявність Na^{+}-незалежного виходу Ca^{2+}, а саме H^{+}-залежного виходу Ca^{2+}.

Структурною одиницею ***H^{+}/Ca^{2+}-обмінника*** ВММ є протеїн Leucine zipper EF hand-containing transmembrane protein 1 (LETM1) (83,4 кДа), який містить короткий гідрофобний N-кінець, два трансмембранні домени, також домен «leucine zipper», два «EF-hand» мотиви, від двох до чотирьох доменів типу «coiled-coil» та С-кінець, розташований всередині матриксу. Висунуто припущення про те, що LETM1 є Ca^{2+}/H^{+} антипортером в МХ [40]. У дослідженнях, проведених на клітинній лінії HEK293 було показано, що LETM1 опосередковано впливає на вхід Ca^{2+} в матрикс, за умови низьких концентрацій іонів Са. Запропоновано такі версії стехіометрії для виходу Ca^{2+} з МХ за фізіологічних умов: $2H^{+}$ на $1Ca^{2+}$, $3H^{+}$ на $1Ca^{2+}$ та стехіометрію $1H^{+}$ на $1Ca^{2+}$ для входу в матрикс іонів Са [32]. Завдяки даним, отриманим методом електронної мікроскопії висунуто припущення, що LETM1 утворює гексамерний pH-чутливий конформер, який має здатність функціонувати як обмінник [39, 40].

Дослідження, що проводилися на клітинній лінії HEK293 показали, що Na^{+}-незалежний вихід Ca^{2+} залежить від присутності мітохондрійного білку MICS1 (Morphology and cristae structure 1), а не LETM1 [41].

Мітохондрійна пора перехідної проникності також виступає одним з механізмів вивільнення Ca^{2+} з МХ. ЇЇ активує тривале накопичення у МХ надмірної кількості іонів Са. Через пору перехідної проникності проникають молекули масою до 1,5 кДа [31]. Висунуто теорію про наявність супрамолекулярного комплексу, який містить у своєму складі VDAC, циклофілін D (CypD), транслокатор аденінових нуклеотидів (ANT), завдяки якому відбувається опосередкований вихід Ca^{2+} з МХ. Також вважається, що

ця пора може структурно зв’язуватись з димерами АТР-синтази, що структурують пору каналу, або функціонувати самостійно [29-31, 39].

1.3. Функціонування мітохондрійної NO-синтази та роль NO

NO – проста низькомолекулярна амфіфільна вільнорадикальна молекула, яка в біосистемах має відносно короткий час існування (до 5 с залежно від мікрооточення), може мігрувати на невеликі відстані від місць своєї генерації, що визначається швидкістю її окиснення [42, 43]. Синтез NO забезпечується функціонуванням NO-синтаз (NOS), які каталізують перетворення L-аргініну в L-цитрулін в присутності кисню.

Регуляція активності NOS відбувається на рівні транскрипції, трансляції, посттрансляційних ковалентних модифікацій, білок-білкових та білок-ліпідних взаємодій, а також шляхом зміни доступності кофакторів та субстрату [44]. В клітині оксид азоту впливає на перебіг численних процесів. В залежності від концентрації NO може регулювати генну транскрипцію та трансляцію мРНК (через зміну активності транскрипційних факторів), обумовлює та модулює посттрансляційні білкові модифікації (наприклад, нітрозилювання та аденозиндифосфат-рибозилювання), володіє цитостатичними та цитотоксичними властивостями [45].

В ряді тканин, зокрема в гладеньких м'язах внутрішніх органів та судин, інгібування потенціал-залежних Ca^{2+}-каналів (VDCC), активацію Ca^{2+}-залежних калієвих каналів ПМ, стимуляцію Ca^{2+}, Mg^{2+}-АТРаз ПМ та ендоплазматичного ретикулуму, яка здійснюється шляхом S-нітрозилювання функціональних залишків цистеїну цих транспортних білків, що призводить до зниження концентрації Ca^{2+} у цитоплазмі [45-47].

Сигналювання NO здійснюється за трьома основними механізмами:

1) активація розчинної гуанілатциклази (sGC) через зв’язування NO з її гемовою групою, що призводить до утворення циклічного гуанозину-3’,5’-монофосфату (cGMP), який, у свою чергу, стимулює протеїнкіназу

G (PKG) (необхідна концентрація NO для активації sGC, варіює в межах 80-250 нМ) [15, 46];

2) нітрування залишків тирозину та триптофану в білках пероксинітритом ($ONOO^-$), який утворюється внаслідок реакції між NO та супероксидним аніоном ($•O^{2-}$). Нітрування призводить до взаємодії мітоген-активованих протеїнкіназ, фактору транскрипції NF-κB та інших в процесі сигналінгу [15, 46, 47].
3) S-нітрозилювання: активні форми азоту - NO^+, NO^-, N_2O_3, NO_2 здійснюють оборотне нітрозилювання тіолових груп залишків цистеїну протеїнів-мішеней [15, 46- 47];

Існує три ізоформи NOS: нейронна NOS (nNOS), ендотеліальна NOS (eNOS) та індуцибельна NOS (iNOS). nNOS та eNOS є конститутивними та активуються Ca^{2+}, тоді як iNOS активується лише після індукції прозапальними цитокінами, бактеріальними ліпополісахаридами, γ-опроміненням, а її активність не залежить від внутрішньоклітинного Ca^{2+}. Конститутивні ізоформи генерують низькі концентрації NO з короткою тривалістю, тоді як iNOS синтезує більшу кількість NO протягом триваліших періодів. Ці відмінності визначають тип ефекту, який буде в подальшому викликаний NO [46]. У МХ доведена імуногістохімічними методами для окремих тканин наявність Ca^{2+}-залежної ізоформи NO-синтази (mtNOS) [15].

Встановлено, що mtNOS є сплайс-варіантом нейрональної nNOS з молекулярною масою 144 кДа та має PDZ-домен на N-кінці (послідовність з 220 а.к.). PDZ-домен забезпечує взаємодію цього ензиму з I та IV комплексами дихального ланцюга. Активність mtNOS регулюється шляхом фосфорилювання Ser на С-кінці. Вважають, що mtNOS розташовується у ВММ та асоційована з I комплексом ЕТЛ [48]. Ендогенне утворення NO є Ca^{2+}-залежним процесом, залежить від метаболічного стану МХ, електричного потенціалу на ВММ.

У МХ оксид азоту виконує кілька ключових функцій: регуляція біогенезу, контроль дихання та окисного фосфорилювання; NO впливає на Δψ ВММ та регулює активність транспортних систем Ca^{2+}, функціонування пори перехідної провідності тощо [49]. Крім того, NO контролює експресію кількох ферментів циклу трикарбонових кислот. Ключовою роллю mtNOS може бути регуляція процесів синтезу АТР [9].

Оксид азоту здатний регулювати активність ЕТЛ МХ, оборотно пригнічуючи Cyt C-оксидазу, та регулює значення pH матриксу МХ [50]. За низьких (наномолярних) концентрацій NO обмежує інтенсивність дихання та окисного фосфорилювання [15]. NO регулює кальцієвий гомеостаз в МХ і, відповідно, Ca^{2+}-залежні процеси, в першу чергу активність низки дегідрогеназ [51]. Система NO/cGMP регулює синтез АТР МХ [15].

Підвищений синтез NO на фоні посилення утворення супероксид-аніонів у МХ супроводжується утворенням значних кількостей пероксинітриту, пошкодженням компонентів ЕТЛ, незворотною деполяризацією органел та розвитком дисфункції МХ, що можуть бути причиною апоптозу (рис. 1.1.) [15, 49].

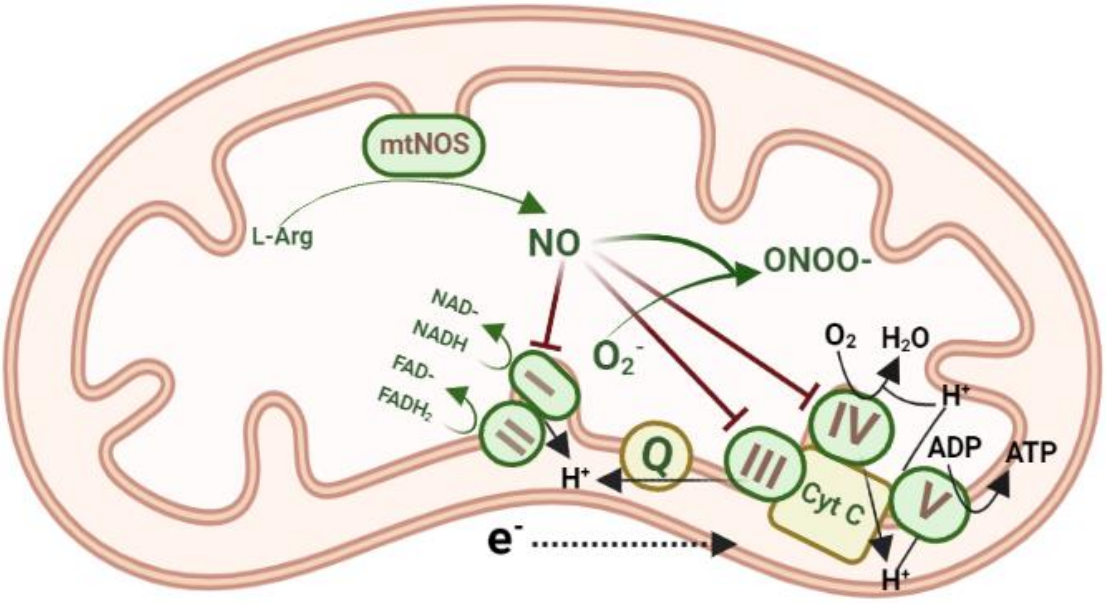

Рис. 1.1. Вплив оксиду азоту на деякі параметри функціонування мітохондрій (адаптовано з [49])

Реакція між NO та $\bullet O_2$ знижує біодоступноість та фізіологічну активність оксиду азоту в МХ. Пероксинітрит спричиняє окислювальні пошкодження, нітрування та S-нітрозилювання біомолекул - білків [51], ліпідів, ДНК, незворотної інактивації Mn^{2+}-вмісної супероксиддисмутази, матричної аконітази та зменшує вміст відновленого глутатіону [15]. Нітрозативний стрес, індукований ($ONOO^-$), призводить до незворотніх пошкоджень ДНК з подальшою активацією фактора транскрипції p53 та полі-ADP-рибозополімерази. Наведені приклади показують, що як нормальне функціонування, так і загибель клітин значною мірою залежать від рівня вироблення NO та інтенсивності генерації АФК саме в МХ [15, 49].

1.4. Загальна характеристика калікс[4]аренів

Каліксарени належать до сімейства олігомерних макроциклів. За структурою вони є фенольними одиницями, що зв’язуються між собою -CH2-містками в орто-положенні. Вони мають чашоподібну будову, утворюються завдяки циклоконденсації пара-заміщених фенолів з формальдегідом у присутності каталізаторів: лугів або кислот [52-54].

Структура каліксаренів включає три ключові елементи: верхній вінець, гідрофобну чашу, утворену ароматичними сполуками, і нижній вінець. Кількість фенольних одиниць у каліксаренах може варіюватися від 4 до 20, але найбільш дослідженими є каліксарени, до складу яких входить від 4 до 8 аренових замісників, завдяки вдосконаленим методам їхнього синтезу та високому вихідному рівню продуктів реакції (рис. 1.2.). У назві калікс[]аренів закладається кількість фенольних утворень у їхній структурі - калікс[4]арени містять 4 феноли у будові гідрофобної чаші [52-55]. Калікс[4]арени можуть мати кілька різних конформерів, включаючи конус, частковий конус, 1,2-альтернат і 1,3-альтернат. У конформації конуса всі фенольні групи –OH утворюють міцні водневі зв’язки, які стабілізують структуру (рис. 1.3.) [56].

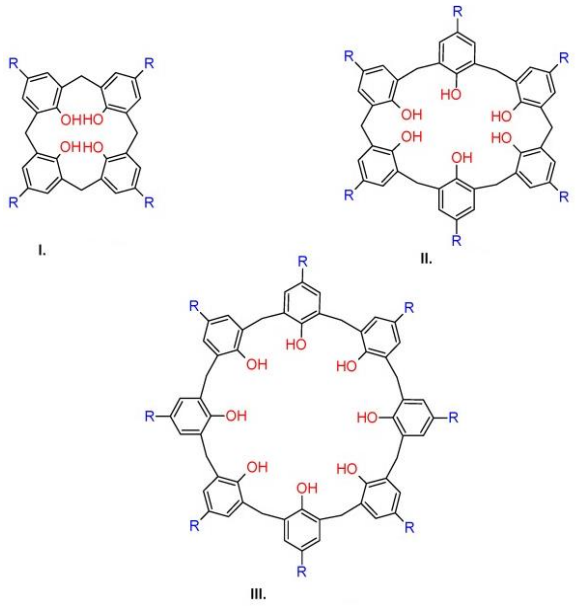

Рис. 1.2. Структура каліксаренів: I - калікс[4]арени, II - калікс[6]арени, III - калікс[8]арени [56].

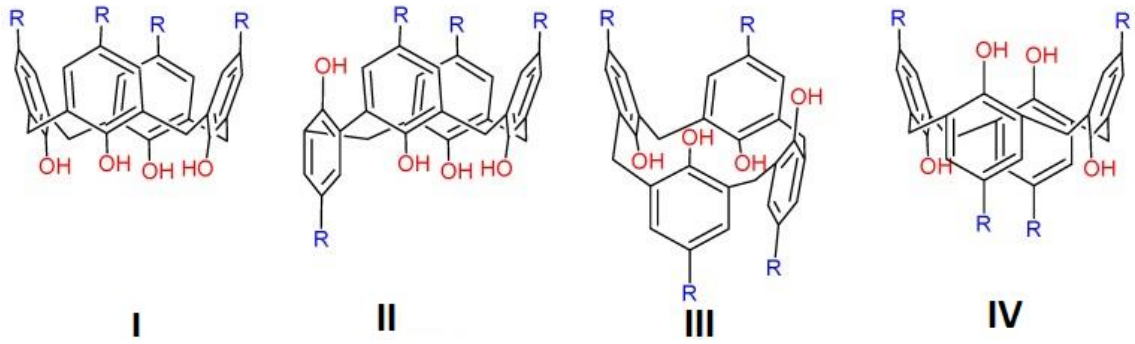

Рис. 1.3. Конформації каліксаренів: I - конус, II - частковий конус, III - 1,2-альтернат, IV - 1,3-альтернат [56].

Порівняно з іншими макроциклами, каліксарени мають кілька переваг, таких як можливість функціоналізувати верхній та нижній вінець чаші (шляхом приєднання замісників різних функціональних груп), наявність гідрофобної чаші та неполярної порожнини всередині неї, спеціалізований сайт зв'язування іонів, формування супрамолекулярних комплексів та багатий потенціал для подальшого використання в біологічних та медичних науках [57].

Каліксарени відрізняються важливістю в наукових дослідженнях, оскільки вони здатні розпізнавати і розміщувати ендогенні молекули в своїй порожнині, формуючи утворення типу «гість-господар» через множину нековалентних взаємодій, які включають водневі зв'язки, катіон- та аніон-π взаємодії, Ван-дер-Ваальсові сили та π-π стекінг [52]. Ступінь цих зв’язків залежить від конформації каліксарена [56].

Завдяки своїй специфічній структурі калікс[4]арени можуть піддаватися багаточисленним хімічним модифікаціям для отримання аналогів та похідних із потрібними для певної цілі характеристиками [58].

В даний час активно вивчаються гетерокалікс[4]арени, в яких ароматичні кільця сполучаються гетероатомами, а не -CH2- містками. До цих калікс[4]аренів належать тіакалікс[4]арени (містять сульфур), сульфінілкалікс[4]арени (містять сульфати), сульфонілкалікс[4]арени (містять сульфонільні групи), азакалікс[4]арени (нітроген-вмісні сполуки), оксакалікс[4]арени (містять оксиген-вмісні сполуки), тощо [53, 59].

Сульфур-вмісні тіакалікс[4]арени (атоми сульфуру заміщують метиленові містки) є одними з найбільш досліджених сполук завдяки своїм властивостям. Вони здатні утворювати супрамолекулярні комплекси з органічними сполуками і мають гарну біологічну активність. Окрім того, вони є трохи більшими за розміром макроциклами, ніж калікс[4]арени. З'ясовано, що відстань між сусідніми атомами сульфуру тіакалікс[4]аренів і сусідніми атомами карбону метиленових містків калікс[4]аренів становить 5,53 Å та 5,06 Å відповідно, а відстань між протилежними лінкерними атомами - 7,82 Å та 7,08 Å відповідно [52, 60]. Окиснення тіакалікс[4]аренів до сульфініл- та сульфонілкалікс[4]аренів призводить до формування супрамолекулярних утворень з різними стереохімічними та фізико-хімічними властивостями [61].

1.5. Роль халконових калікс[4]аренів як модуляторів функціональної активності мітохондрій

Калікс[4]арени - перспективні макроцикли, які використовуються та мають потенціал для використання в різних галузях. Вони можуть бути використані як сенсори для виявлення органічних та біомолекул, збільшувати розчинність лікарських речовин, які використовуються в таргетній терапії, а також формувати супрамолекулярні комплекси [52, 57].

Останні роки науковці цікавляться вивченням впливу калікс[4]аренів на процеси, що відбуваються в органелах клітин, зокрема в МХ. Дослідження показують, що калікс[4]арени можуть бути ефективними модуляторами біоенергетичних та Ca^{2+}-транспортних процесів в МХ [54, 62-65].

Наприклад, такі калікс[4]арени, як С-99 та С-97 проявилися як інгібітори мітохондрійного Ca^{2+}-уніпортера та стимулятори H^+/Ca^{2+}-обмінника. С-97 та С-99 у концентрації 100 мкМ пригнічують енергозалежне накопичення іонів Са ізольованими МХ [63]. Крім того, дослідження показали помірне інгібування мітохондрійної NO-синтази [54].

Калікс[4]арен С-956 є ефективним інгібітором мітохондрійного H^+/Ca^{2+}-обмінника та стимулятором мітохондрійної NO-синтази (рис. 1.4.). Досліди із ізольованими мітохондріями показали, що С-956 ефективно інгібує ΔpH-залежний вихід Ca^{2+}, що призводить до транзієнтної поляризації ВММ. Також цей калікс[4]арен інгібує окиснення NADH та $FADH_2$, що може свідчити про його вплив на I та II комплекси дихального ланцюга [19, 66].

При концентрації 100 мкМ калікс[4]арен С-91 стимулює Mg^{2+}/ATP-залежну акумуляцію Ca^{2+} в МХ міометрія [19].

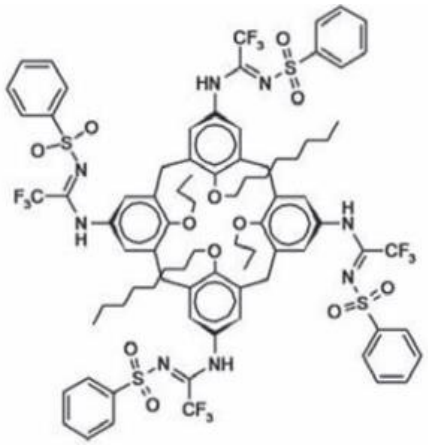

Рис. 1.4. Структура калікс[4]арену С-956 [67].

Калікс[4]арени, що містять на нижньому вінці макроциклу халкони – ароматичні кетони, представники класу флавоноїдів (рис. 1.5.) – викликають зростання поляризації ВММ міометрія (С-136 та С-137, які містять по 2 халконових замісники), за їх присутності зростає концентрація іонізованого Са в матриксі та стимулюється його енергозалежна акумуляція (більш ефективним виявився С-138 з 1 халконовим замісником) [67-68].

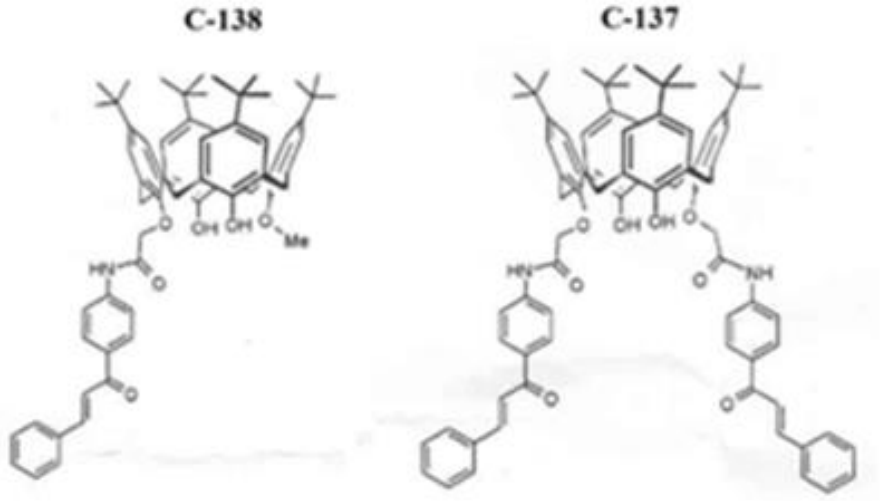

Рис. 1.5. Структурні формули халконовмісних калікс[4]аренів С-138 та С-137

Досліджено, що калікс[4]арени С-1012, С-1021 та С-1023 впливають на зменшення показнику гідродинамічного діаметру мітохондрій, тоді як С-1011

стимулює збільшення цього показника [68]. При відсутності ендогенного АТР у середовищі інкубації мітохондрійний гідродинамічний діаметр збільшується як за наявності С-1011, так і за наявності С-1012. Такі дані можуть свідчити про вплив складу інкубаційного середовища на показник гідродинамічного діаметру МХ [69].

На моделі пермеабілізованих міоцитів було продемонстровано, що халконовмісні калікс[4]арени С-1012, С-1021 та С-1024 підвищують рівень поляризації мітохондрійної мембрани [68].

Отже, супрамолекулярні макроцикли калікс[4]арени, які є малотоксичними та володіють широким спектром біологічної активності, є перспективними для використання їх як модуляторів біоенергетичних, Ca^{2+}-залежних, в тому числі синтезі NO, та Ca^{2+}-обмінних процесів в клітинах, зокрема гладенького м’яза матки.

РОЗДІЛ 2
ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкт дослідження

Об'єктом дослідження виступав вплив халконовмісних калікс[4]аренів на функціональну активність мітохондрії гладенькоміязових клітин міометрія щурів. Предметом дослідження були біоенергетичні, транспортні та метаболічні процеси в мітохондріях.

В дослідах використовувались статевозрілі невагітні нелінійні самиці щурів з віварію Інституту біохімії НАН України. Вік щурів (25 особин) складав приблизно 2 місяці, середня маса становила 200 г, маса матки коливалася в межах 350-700 мг.

2.2. Матеріали та обладнання

У роботі було використано такі реактиви та матеріали:

- неорганічні сполуки: АТР, мінеральні солі (Україна);
- органічні сполуки: N'-2-гідроксиетилпіперазин-N'-2-етансульфонова кислота (Hepes), бичачий сироватковий альбумін, сукцинат натрію, піруват натрію, етиленгліколь-біс-(β-аміноетиловий ефір)-N,N,N',N'-тетраоцтової кислоти (EGTA), цукроза ("Sigma", США), циклоспорин А, протонофор карбоніл ціанід 3-хлорофенілгідразон (CCCP), нуклеотид NADPH;
- детергент Pluronic F-127 («Invitrogen») – використовувався з метою покращення перебігу навантаження фракції зондами;
- флуоресцентні зонди: потенціалочутливий JC-1 "(Sigma"), DCF-DA – чутливий до АФК ("Fluka"), Ca^{2+}-чутливий зонд Fluo-4 AM ("Sigma"), pH-чутливий BCECF-AM ("Sigma"), NO-чутливий DAF-FM-DA («Invitrogen»);

- халконовмісні калікс[4]арени С-138, С-1012, С-1021, С-1023, С-1024, С1011.

Для приготування розчинів використовували бідистильовану воду (питома електропровідність не перевищувала 1,5 мкСм/см). Реєстрацію електропровідності води здійснювали з використанням кондуктометра ОК-102/1 (Угорщина).

В роботі було використано наступне обладнання та методи.

Для реалізації досліджень флуоресцентними методами використовували такі прилади: спектрофлуориметр Quanta Master 40 PTI (Канада), програмне забезпечення FelixGX 4.1.0.3096; протоковий цитофлуориметр COULTER EPICS XL™ (Beckman Coulter, США), оснащений аргоновим лазером ($\lambda_{зб.}$ = 488 нм), програмне забезпечення SYSTEM II™ Software.

2.3. Виділення фракцій мітохондрій міометрія щурів

Джерелом фракції ізольованих мітохондрій стали матки невагітних самиць щурів. Тварин вводили в стан наркозу шляхом витримування у камері, збагаченій парами хлороформу, після чого тварин декапітували. Робота із тваринами здійснювалась згідно із Законом України № 3447 IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» та Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та наукових цілей (Страсбург, 1986).

Для одержання препарату ізольованих мітохондрій із міометрія використовували метод диференційного центрифугування [70]. Після виділення матку вміщували у 0,9% розчин NaCl. Препарат очищали від залишків сполучної та жирової тканини, зважували та подрібнювали ножицями, після чого переносили у робочий розчин №1 з температурою 4°С такого складу: 10 мМ HEPES (pH 7,4), 250 мМ цукроза, 1 мМ EGTA. Тканину гомогенізували за допомогою гомогенізатору “Heidolph Silent Crusher M” в трикратному повторенні за наступною схемою: 20 с гомогенізації (швидкість

оберту леза 17-18 м/с) чергувались з охолодженням на льоду протягом 1 хв. Препарат ізольованих мітохондрій отримували методом диференційного центрифугування (центрифуга типу “РС”) за наступною схемою:

1) центрифугування гомогенату протягом 15 хв (температура 4°С) при 1 тис. g;
2) центрифугування виділеного супернатанту протягом 15 хв (температура 4°С) при 12 тис. g;
3) ресуспендування осаду у робочому розчині №1 (розрахунок об’єму розчину здійснювали відповідно до ваги виділеної матки, співвідношення 1:50);
4) центрифугування розчиненого у робочому розчині №1 осаду протягом 15 хв (температура 4°С) при 12 тис. g;
5) ресуспендування осаду у робочому розчині №2 (температура 4°С) наступного складу: 10 мМ HEPES (pH 7.4), 250 мМ цукрози.

Для додаткової механічної очистки від залишків тканин отриману фракцію пропускали через нейлоновий фільтр. З метою попередження окиснення ліпідів до фракції додавали 1 мг бичачого сироваткового альбуміну (має адсорбуючі властивості та попереджає окиснення ліпідів, що може руйнувати мембрани мітохондрій). Одержану фракцію ізольованих мітохондрій зберігали на льоду впродовж експерименту .

Білковий вміст у мітохондрійній фракції визначався за стандартним методом Бредфорда. Колориметричний метод, заснований на утворенні забарвленого у синій колір комплекс фарбника Coomassie Brilliant Blue G-250 з білком (а саме аргініном та гідрофобними амінокислотними залишками) з максимумом поглинання 595 нм. Для цього 100 мг розчину Coomassie Brilliant Blue G-250 розчиняли в 50 мл 95% етанолу і змішували з 100 мл 85% H_3PO_4. Об’єм суміші доводили до 200 мл бідистильованою водою та фільтрували (при цьому концентрація протеїну складала від 0,2 до 1,5 мг/мл в робочому буфері). Для побудови калібрувального графіку брали 200 мкг альбуміну, попередньо

розчиненого в 2 мл бідистильованої води (100 мкг в 1 мл), та робили послідовні розведення від 100 мкг/мл до 6,25 мкг/мл (до 1 мл проби додавали 1 мл Coomassie Brilliant Blue G-250, розведеного в 1 мл бідистильованої води).

Середній вміст протеїну складав 2 мг/мл, у пробі – 50 мкг/мл.

2.4. Реєстрація флуоресценції NADH та FAD в мітохондріях із використанням методу спектрофлуориметрії.

Відносні значення рівнів аутофлуоресценції NADH та FAD в матриксі мітохондрій міометрія реєстрували із використанням спектрофлюориметра. Дослідження проводили в середовищі наступного складу (об'єм 2 мл): 20 мМ Hepes (pH 7,4, 37°C), 2 мМ K/Pi буфер (pH 7,4, 37°C), 120 мМ KCl, 5 мМ піруват, 5 мМ сукцинат, аліквота (50 мкл) мітохондріальної фракції містила 50 мкг білку.

Флуоресцентний сигнал від NADH реєстрували при $\lambda_{зб.}$ = 350 нм, $\lambda_{фл.}$ = 450 нм, від FAD – $\lambda_{зб.}$ = 450 нм, $\lambda_{фл.}$ = 533 нм.

2.5. Процедура навантаження мітохондрій флуоресцентним зондом DCF-DA

Навантаження мітохондрій чутливим до активних форм кисню флуоресцентним зондом DCF-DA (концентрація 25 мкМ) відбувалось протягом 30 хв при кімнатній температурі 25°C у середовищі наступного складу: 10 мМ HEPES (pH 7,4; 37°C), 250 мМ цукроза, 0,1% бичачий сироватковий альбумін. З метою покращення процесу навантаження зонд змішували із детергентом Pluronic F-127 (0,02%).

2.6. Вивчення утворення активних форм кисню за допомогою флуоресцентного зонду DCF-DA та методу протокової цитометрії

Утворення активних форм кисню в ізольованих мітохондріях вивчали із використанням методу протокової цитофлуориметрії ($\lambda_{зб.}$ = 488 нм, $\lambda_{фл}$ = 515

нм (Fl1 канал)). Середовище інкубації містило: 20 мМ Hepes (pH 7,4, 25 °C), 2 мМ K/Pi буфер (pH 7,4, 25 °C), 125 мМ KCl, 25 мМ NaCl. Реакцію ініціювали внесенням аліквоти 20 мкл розчину складу: 5 мМ піруват, 5 мМ сукцинат.

2.7. Процедура навантаження мітохондрій флуоресцентним зондом Fluo-4 AM

Навантаження мітохондрій Ca^{2+}-чутливим флуоресцентним зондом Fluo-4 AM (концентрація 2 мкМ) відбувалось протягом 30 хв при температурі 37°C у середовищі складу: 10 мМ HEPES (pH 7,4; 37°C), 250 мМ цукроза, 0,1% бичачий сироватковий альбумін. З метою покращення процесу навантаження зонд змішували із детергентом Pluronic F-127 (0,02%).

2.8. Дослідження змін вмісту іонізованого Ca в ізольованих мітохондріях із використанням методу спектрофлуориметрії

Реєстрацію відносних значень рівня іонів Ca в матриксі мітохондрій міометрія, навантажених Fluo-4 AM здійснювали спектрофлуориметричним методом за таких довжин хвиль: $\lambda_{зб.}$ = 495 нм, $\lambda_{фл.}$ = 520 нм.

Енергозалежна акумуляція Ca^{2+} мітохондріями здійснювалась у середовищі наступного складу (об'єм 2 мл): 20 мМ HEPES (pH 7,4, 37 °C), 250 мМ цукроза, 2 мМ K/Pi буфер (pH 7,4, 37 °C), 3 мМ $MgCl_2$, 3 мМ ATP, 5 мМ сукцинат натрію. Реакцію ініціювали внесенням розчину Ca^{2+} у концентрації 80 мкМ.

У випадку дослідження ΔpH-індукованого вивільнення іонів Ca з мітохондрій попередня енергозалежна акумуляція Ca^{2+} здійснювалась протягом 5 хв. Далі аліквоту суспензії (100 мкл) розводили у середовищі вивільнення Ca^{2+} (об'єм 2 мл) наступного складу: 20 мМ HEPES (pH 6,5-7,5; 37 °C), 2 мМ K/Pi буфер (pH 6,5-7,5; 37 °C), 250 мМ цукроза, 5 мМ сукцинат натрію, 5 мкМ циклоспорин А.

2.9. Навантаження мітохондрій pH-чутливим зондом BCECF-AM

Навантаження мітохондрій pH-чутливим зондом BCECF-AM (концентрація 5 мкМ) проводили у середовищі наступного складу: 10 мМ HEPES (pH 7,4, 37°C), 250 мМ цукроза, 0,1% бичачий сироватковий альбумін та 0,02% PluronicF-127, протягом 20 хв при температурі 25°C. Зонд, який не акумулювався в матриксі, відокремлювали від мітохондрій шляхом переосадження при 12 тис. g протягом 15 хв. Ресуспендували і зберігали мітохондрії у вищеописаному середовищі.

2.10. Дослідження змін pH матриксу в ізольованих мітохондріях із використанням методу спектрофлуориметрії

Реєстрацію флуоресценції BCECF-AM в мітохондріях ($\lambda_{зб}$ = 510 нм, $\lambda_{фл}$ = 535 нм) здійснювали з використанням спектрофлуориметра. Середовище інкубації мало наступний склад: 20 мМ HEPES (pH 6,0-8,0, 37°C), 2 мМ K/Pi буфер (pH 6,0-8,0, 37°C), 250 мМ цукроза, 5 мМ сукцинат натрію, 5 мкМ циклоспорин А.

2.11. Навантаження мітохондрій NO-чутливим флуоресцентним зондом DAF-FM-DA

Навантаження мітохондрій зондом DAF-FM-DA (концентрація 5 мкМ) здійснювалось у середовищі наступного складу: 10 мМ HEPES (pH 7,4, 25 °C), 250 мМ цукроза, 0,1 % бичачий сироватковий альбумін, 0,02 % Pluronic F-127 протягом 30 хв при температурі 25 °C.

2.12. Дослідження синтезу оксиду азоту методом протокової цитометрії

Склад середовища при визначенні NO-синтазної активності (2 мл): 20 мМ HEPES (pH 7,4, 25 ^{0}C), 2 мМ K/Pi буфер (pH 7,4, 25 ^{0}C), 125 мМ KCl, 25 мМ NaCl, 5 мМ піруват, 5 мМ сукцинат, 0,05 мМ L-аргінін, 0,1 мМ Ca^{2+}, 0,01

мМ NADPH, 0,01 мМ тетрагідробіоптерин. З метою ініціювання реакції вносили аліквоту 20 мкл розчину L-аргініну з Ca^{2+}. Час інкубації становив 30 хв. Реєстрація результатів відбувалась за допомогою протокового цитометра ($\lambda_{зб}$ = 488 нм, $\lambda_{фл}$ = 515 нм (канал Fl1)).

2.13. Реєстрація флуоресцентного сигналу потенціалочутливого зонду JC-1 у фракції ізольованих мітохондрій міометрію

Для дослідження змін потенціалу ВММ методом спектрофлюориметрії використовували потенціалочутливий зонд JC-1 (1 мкМ). Сигнал реєструвався за наступних умов: λзб. = 490 нм, λфл. = 502 нм для мономера зонду і λзб. = 490 нм, λфл. = 600 нм - для димера (J-агрегату). Відносне значення одиниць флуоресценції 600/502 відображає зміни мембранного потенціалу мітохондрій.

Експеримент проводили в інкубаційному середовищі складу (об'єм 2 мл, 37°C): 200 мМ Hepes (pH 7,4), 20 мМ K/Pi буфер (pH 7,4), 2,5 М цукроза; ініціювання реакції аліквотою 20 мкл – 5 мМ сукцинат натрію, 5мМ піруват натрію. Вміст протеїну в мітохондрійній фракції складав 50 мкг.

2.14. Розрахунок кінетичних параметрів

Початкову швидкість енергозалежної акумуляції Ca^{2+} (V_0) та характеристичний час напівмаксимальної акумуляції катіона ($\tau_{1/2}$) розраховували за формулами:

$$\tau_{1/2} = \frac{ln2}{k} \quad (1)$$

$$V_0 = k\left(\frac{F_{max}-F_0}{F_0}\right), \quad (2)$$

де k (c^{-1}) – константа швидкості входу Ca^{2+}, яку знаходимо з лінійної залежності зміни флуоресценції Fluo-4 від часу в координатах {ln ((F_{max}-F_0)/(F_{max}-F)); t}, де F_0 – початкова флуоресценція, F – флуоресценція за

відповідні проміжки часу, F_{max} – стаціонарний рівень флуоресценції, який досягається з часом як наслідок входу певної кількості іонів Са в матрикс. Даний метод розрахунку ґрунтується на уявленні, що збільшення флуоресценції Ca^{2+}-чутливого зонду Fluo-4 AM, яким було навантажено мітохондрії, адекватно відображає зміни концентрації іонізованого Са в матриксі.

2.15. Синтез халконовмісних калікс[4]аренів

Вибрані калікс[4]арени були синтезовані у відділі макроциклічних сполук Інституту органічної хімії Національної академії наук України під керівництвом академіка В.І. Кальченка. Чистота препаратів калікс[4]аренів була перевірена методом ЯМР-спектроскопії в Інституті органічної хімії НАН України.

В дослідженнях використано наступні сполуки:

С-138 (5,11,17,23-Тетра-*трет*-бутил-25,27-дигідрокси-26-метокси-28-[(4'-бензиліденацетофеноніл) амінокарбонілметокси] калікс[4]арен;

С-1012 (5,11,17,23-Тетра-*трет*-бутил-25,26-дипропокси-27,28-біс[(4'-бензиліденацетофеноніл)амінокарбонілметокси]калікс[4]арен);

С-1021 (5,11,17,23-Тетра-*трет*-бутил-25,27-дипропокси-26,28-біс[(4'-(4''-нітробензиліден)ацетофеноніл)амінокарбонілметокси]калікс[4]арен);

С-1023 (5,11,17,23-Тетра-*трет*-бутил-25-гідрокси-26,27,28-три[(4'-бензиліденацетофеноніл)амінокарбонілметокси]калікс[4]арен);

С-1024 (5,11,17,23-Тетра-*трет*-бутил-25-пропокси-26,27,28-три[(4'-бензиліденацетофеноніл)амінокарбонілметокси]калікс[4]арен);

С-1011 (5,11,17,23-Тетра-*трет*-бутил-25,26,27,28-тетра[(4'-бензиліденацетофеноніл)амінокарбоніл-метокси]калікс[4]арен).

Калікс[4]арени розчиняли в диметилформаміді (DMFA) та вносили аліквоту 10 мкл безпосередньо до середовища інкубації. Кінцева концентрація DMFA в середовищі складала 0,5%, оскільки саме у такій концентрації в

контролі DMFA не демонстрував вплив на досліджувані параметри. В дослідах використовували халконовмісні калікс[4]арени в концентрації 10 мкМ. Зі збільшенням концентрації спостерігалось помутніння розчинів. При вивченні впливу калікс[4]аренів на енергозалежну акумуляцію Ca^{2+} мітохондрії були преінкубовані з досліджуваними сполуками протягом 3 хв.

2.16. Статистична обробка результатів та обчислення

Для виконання статистичної обробки отриманих даних використовували пакет стандартних програм Microsoft Office (Excel). Аналіз здійснювали із застосуванням t-критерію Стьюдента. Статистична обробка одержаних результатів проводилась за допомогою стандартних методів статистичного аналізу.

РОЗДІЛ 3
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Характеристика халконовмісних калікс[4]аренів

Чистота препаратів халконовмісних калікс[4]аренів була підтверджена за допомогою спектроскопії ядерного магнітного резонансу в Інституті органічної хімії НАН України. Молекули досліджуваних сполук (рис. 3.1.) складаються з так званої калікс[4]аренової чаші, до нижнього вінця якої приєднано різну кількість гідрофобних халконових замісників. Використані сполуки містили від одного (С-138) до двох (С-1012, С-1021), трьох (С-1023, С-1024) та чотирьох (С-1011) халконових замісників. Окрім них до структури даних калікс[4]аренів також входять гідрофобні групи: трет-бутил (t-Bu), окси-Ме, 1-пропіл та 2-пропіл (OPr) та гідрофільні ОН-групи. Сполука С-1021 також містить електронно-акцепторну полярну NO_2^- -групу.

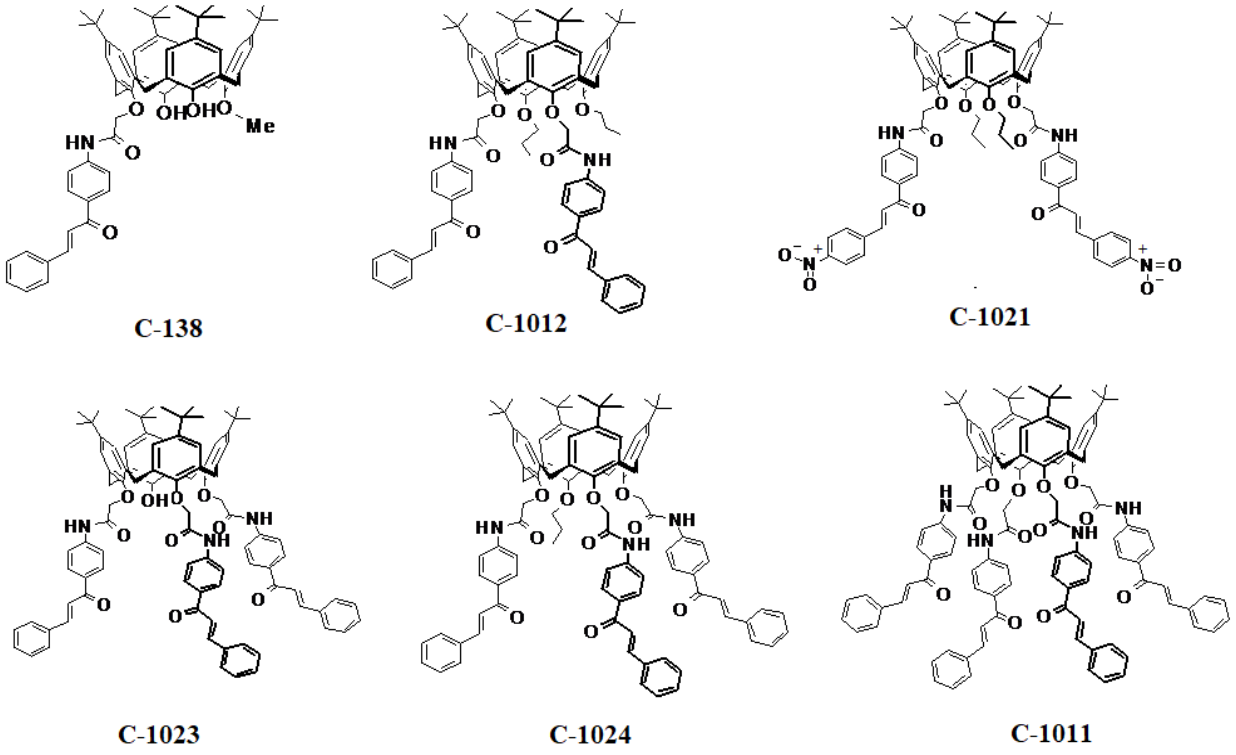

Рис. 3.1. Структурні формули вибраних халконовмісних калікс[4]аренів

Ефективність впливу халконовмісних калікс[4]аренів на біохімічні параметри ізольованих МХ визначається їхніми фізико-хімічними властивостями, а саме залежить від кількості та природи халконових угруповань й замісників у калікс[4]ареновій чаші. Інтенсивність біохімічних ефектів залежить від ефективності взаємодії сполуки з ВММ. Ця ефективність зумовлюється ступенем гідрофобності сполуки. Висунуто припущення, що більша гідрофобність та менша полярність калікс[4]аренової сполуки може зумовити ефективнішу взаємодію з мітохондрійною мембраною, більш значущий вплив на компоненти ЕТЛ та локалізовані в мембрані Ca^{2+}-транспортувальні системи.

На першому етапі досліджень було виявлено ефекти зазначених калікс[4]аренів на окислення $NADH/FADH_2$ в ізольованих МХ міометрія.

3.2. Вплив халконовмісних калікс[4]аренів на окислення $NADH/FADH_2$ в ізольованих мітохондріях

На фракції ізольованих МХ продемонстровано можливість аналізу функціональної активності ЕТЛ, використовуючи власну флуоресценцію коензимів NADH та FAD [71]. За постійної концентрації досліджуваних нуклеотидів в МХ динаміка змін їхньої аутофлуоресценції відображає окисно-відновний стан коензимів, що відображає активність відповідних комплексів ЕТЛ. Спостерігається реципрокність змін флуоресценції аденінових инуклеотидів за нормального функціонування ЕТЛ МХ: флуоресценція від NADH падає, від FAD – зростає. Даний підхід можна використати для оцінки впливу ефекторів – вибраних халконовмісних калікс[4]аренів – на функціонування ЕТЛ.

Проведеними дослідженнями встановлено, що вибрані халконовмісні калікс[4]арени з різною інтенсивністю пригнічують окислення ендогенного NADH в МХ, знижуючи флуоресцентну відповідь відновленої форми коензиму відносно контролю (рис. 3.2.). Такий ефект свідчить про інгібіторний

вплив на функціонування ЕТЛ, можливо, шляхом гальмування його *I*-го комплексу.

Даний ефект частково залежав від кількості халконових замісників. За наявності в структурі молекули одного замісника реєструвався помірний інгібуючий ефект на зміни інтенсивності флуоресценції нуклеотиду, тоді як збільшення кількості замісників до двох, трьох та чотирьох супроводжувалось суттєвою гальмівною дією, яка вже не залежала від кількості замісників. Можна припустити, що інтенсивність впливу на флуоресценцію NADH визначається не тільки кількістю халконових залишків, а також природою функціональних груп (t-Bu, OMe, OPr, OH, NO_2), наявних в даних сполуках.

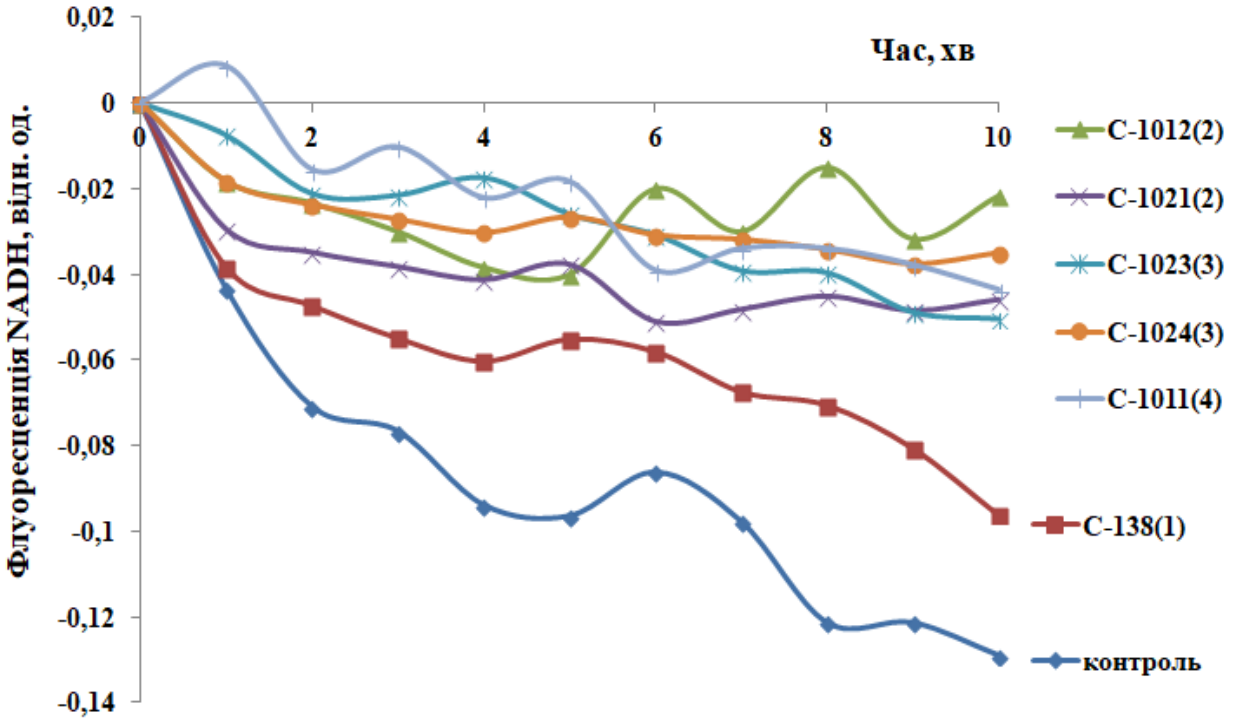

Рис. 3.2. Вплив халконовмісних калікс[4]аренів на інтенсивність окислення NADH в ізольованих мітохондріях. Тут і на наступних рисунках у дужках вказано відповідну кількість халконових замісників

Зниження флуоресцентної відповіді ендогенного мітохондрійного FAD за впливу досліджуваних сполук (рис. 3.3.) відносно величини контрольного сигналу в наших дослідженнях свідчить про зменшення інтенсивності

окислення цього нуклеотиду і, відповідно, гальмування роботи ЕТЛ, вірогідно, шляхом пригнічення функціонування *II* дихального комплексу. Залежності ефекту від хімічної природи калікс[4]аренів в цих дослідженнях не виявлено.

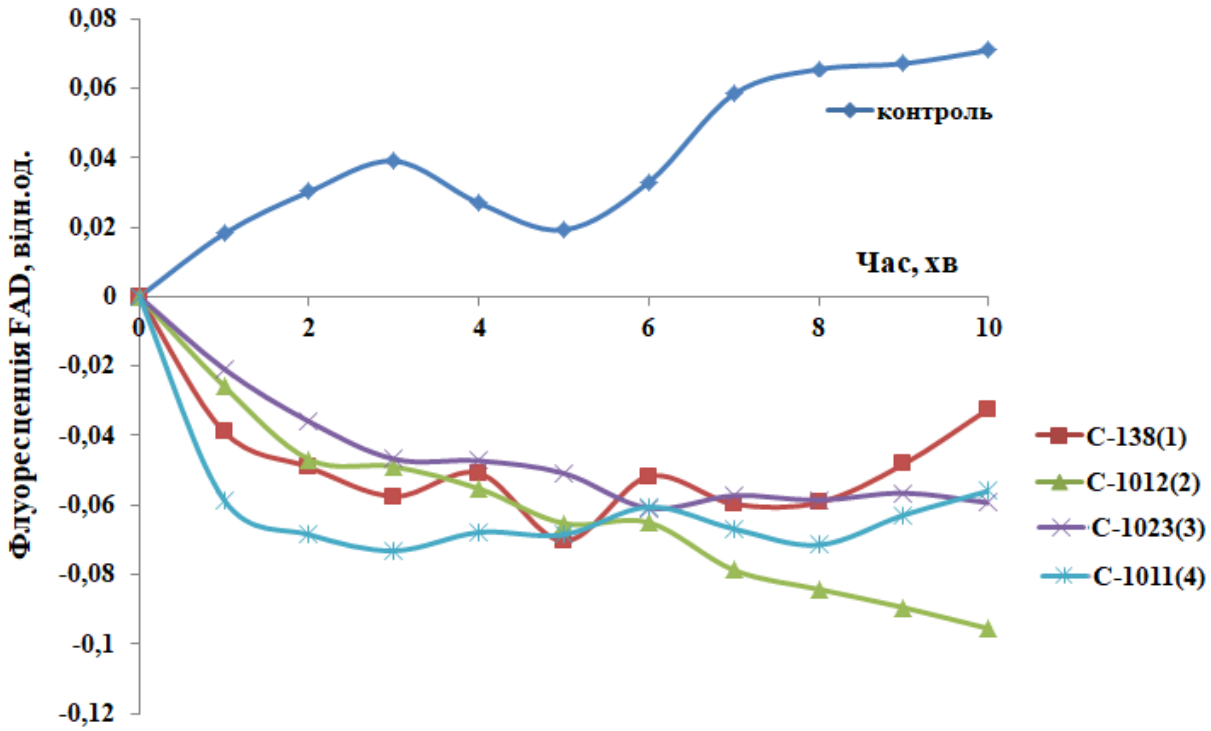

Рис. 3.3. Вплив халконовмісних калікс[4]аренів на інтенсивність окислення $FADH_2$ в ізольованих мітохондріях

Інгібування окремих комплексів дихального ланцюга МХ може призводити до посилення генерації активних форм кисню (АФК). Тому наступним етапом було з'ясування ефектів вибраних калікс[4]аренів на зміни флуоресценції чутливого до АФК зонду DCF.

3.3. Вплив халконовмісних калікс[4]аренів на генерацію активних форм кисню в ізольованих мітохондріях

Присутність в середовищі інкубації халконовмісних калікс[4]аренів призводила до зростання DCF-флуоресценції відносно контрольних значень (рис. 3.4). Інтенсивність цього ефекту корелювала з кількістю халконових замісників в досліджуваних сполуках. Спостерігалась тенденція до зростання

флуоресцентної відповіді зі збільшенням кількості гідрофобних залишків. Втім, ефекти калікс[4]аренів, що містили два та три халконові залишки на DCF-флуоресценцію були майже подібними, що можна пояснити наявністю у структурах молекул додаткових хімічних груп різної полярності.

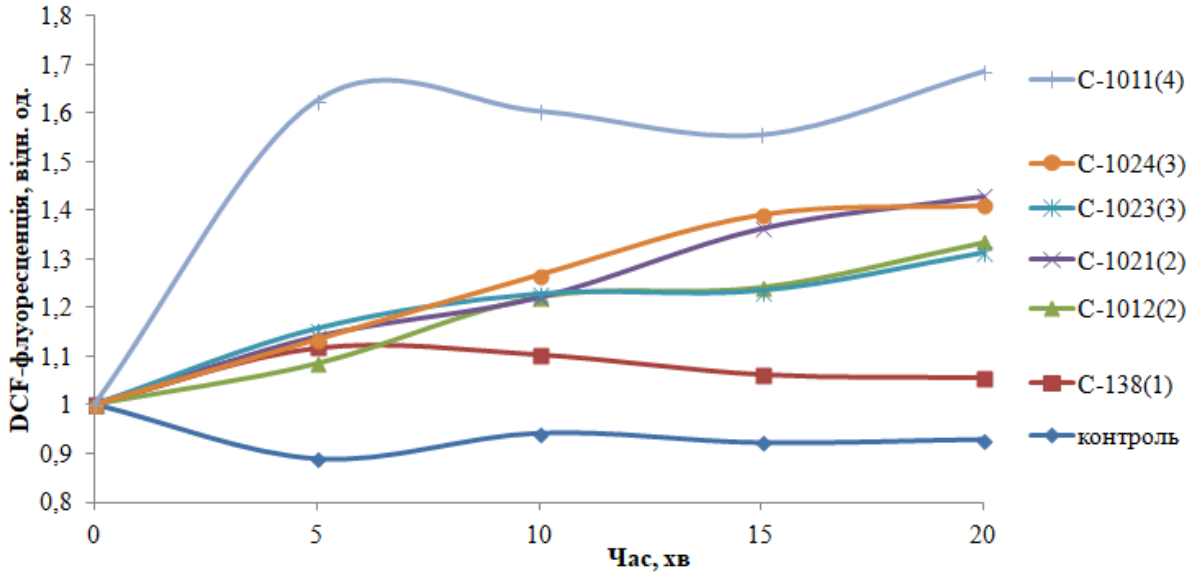

Рис. 3.4. Вплив халконових калікс[4]аренів на утворення активних форм кисню в ізольованих мітохондріях

Таким чином, можна зробити висновок, що ефекти досліджуваних калікс[4]аренів на функціональну активність ЕТЛ визначаються кількістю халконових залишків у структурі калікс[4]арену та супроводжується гальмуванням активності його комплексів, наслідком чого є активніша генерація АФК.

3.4. Вплив халконовмісних калікс[4]аренів на поляризацію внутрішньої мембрани мітохондрій

Посилення генерації АФК обгрунтовано можна пояснити блокуванням активності *II* комплексу та частковим гальмуванням функціонування *I* комплексу ЕТЛ. Продемонстровані ефекти можуть призвести до деполяризації ВММ.

В наших дослідженнях показано, що внесення в середовище інкубації субстратів I та II комплексів 5 мМ сукцинату та пірувату супроводжується зростанням потенціалочутливого зонду JC-1 (рис. 3.5) і відповідає стану енергізації МХ, а внесення протонофору CCCP супроводжується різким падінням флуоресценції та відповідає стану повної деполяризації ВММ.

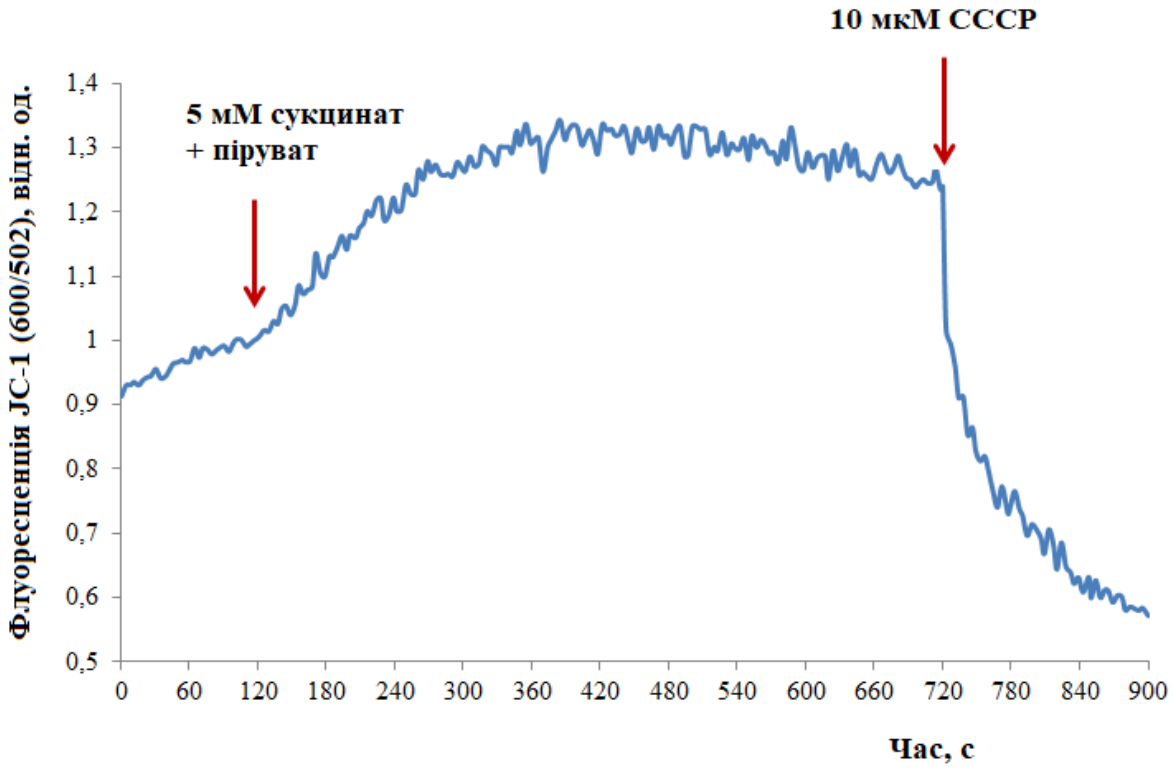

Рис. 3.5. Зміни поляризації мембрани ізольованих мітохондрій за внесення субстратів дихання (5 мМ сукцинат та піруват) та протонофору CCCP (10 мкМ)

Далі нами продемонстровані ефекти досліджуваних калікс[4]аренів на зміни поляризації мембрани енергізованих МХ (рис. 3.6.)

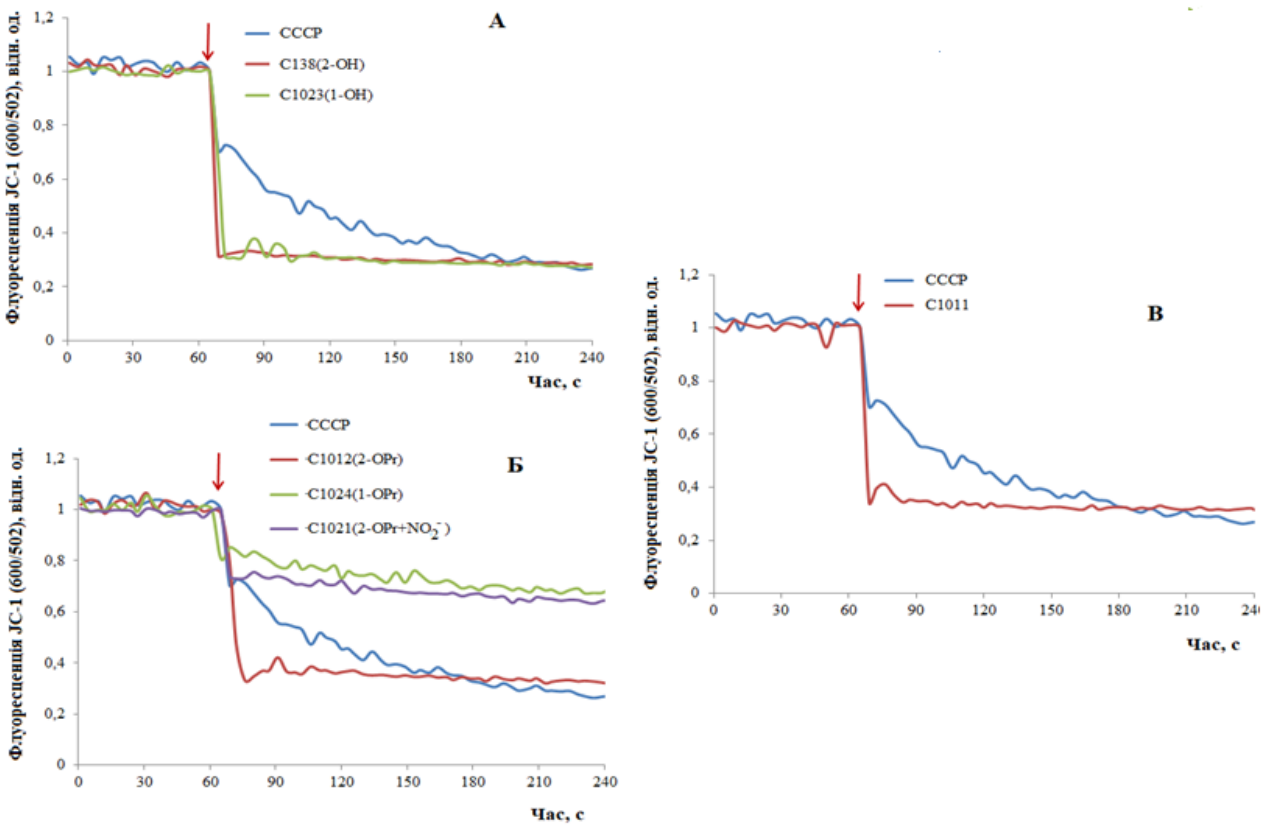

Рис. 3.6. Зміни поляризації мембрани енергізованих мітохондрій за присутності халконовмісних калікс[4]аренів. За “1” прийнято відн.од. флуоресценції JC-1 в момент внесення ефекторів.

Оскільки СССР є протонофором, його ефект щодо деполяризації мембрани прийнято вважати максимальним. На фоні його ефекту халконовмісні калікс[4]арени С-1021 (містить у складі 2 халконових замісники) та С-1024 (3) продемонстрували незначний ефект на мембранний потенціал. Відсутність їхнього впливу на потенціал можна пояснити особливостями їхньої будови, оскільки С-1021 містить у своєму складі нуклеофільну NO_2-групу, а С-1024 - лише одну гідрофобну 1-OPr групу.

Водночас, калікс[4]арени С-1012 (2) та С-1011 (4) показали практично однаковий ефект, наближений до ефекту СССР. Калікс[4]арен С-1012 містить 2 гідрофобні 2-OPr групи, а С-1011 має 4 гідрофобні халконові залишки на

нижньому вінці чаші, тому, вірогідно, володіє найбільш гідрофобними властивостями з усіх обраних калікс[4]аренів.

Цікавий ефект продемонстрували калікс[4]арени С-138 (1) та С-1023 (3). Обидві сполуки містять гідрофільні ОН-групи, але при цьому демонструють максимально наближений до СССР ефект. В попередніх дослідженнях було показано, що калікс[4]арен С-99, функціоналізований гідроксиметилфосфоновою кислотою у дистальних положеннях володіє властивостями селективного іонного (Cl, K^+ and Na^+) переносника [77]. Аналогічно, можна припустити, що С-138 та С-1011 є протонофорами і переносять атоми Н через мембрану, спричиняючи стрімку деполяризацію.

Нормальне функціонування ЕТЛ лежить в основі мітохондрійної біоенергетики, а створений внаслідок його роботи електрохімічний градієнт протонів та негативний потенціал (близько -180 мВ) на ВММ є основними факторами контролю локалізованих в ній транспортних систем. Одним з головних регуляторів активності ЕТЛ та метаболізму МХ в цілому є зміни концентрації іонів Са в матриксі, яка підтримується функціонуванням Ca^{2+}-транспортувальних систем [72]. Дослідженню впливу вибраних калікс[4]аренів на трансмембранний обмін іонів Са присвячений наступний етап нашої роботи.

3.5. Вплив халконовмісних калікс[4]аренів на системи трансмембранного обміну Ca^{2+} в ізольованих мітохондріях

На ВММ міометрію ідентифіковано дві системи трансмембранного обміну Ca^{2+}, а саме енергозалежної акумуляції іонів Са (Ca^{2+}-уніпортер) та H^+-Ca^{2+} - обмінник [73]. За надходження сукцинату та АТР з позамітохондрійного середовища ізольовані МХ можуть акумулювати Ca^{2+}. Зміни інтенсивності флуоресцентної відповіді Ca^{2+}-чутливого зонду Fluo-4 AM відображають здатність енергізованих МХ накопичувати та ефективно утримувати іони Са (рис. 3.7.).

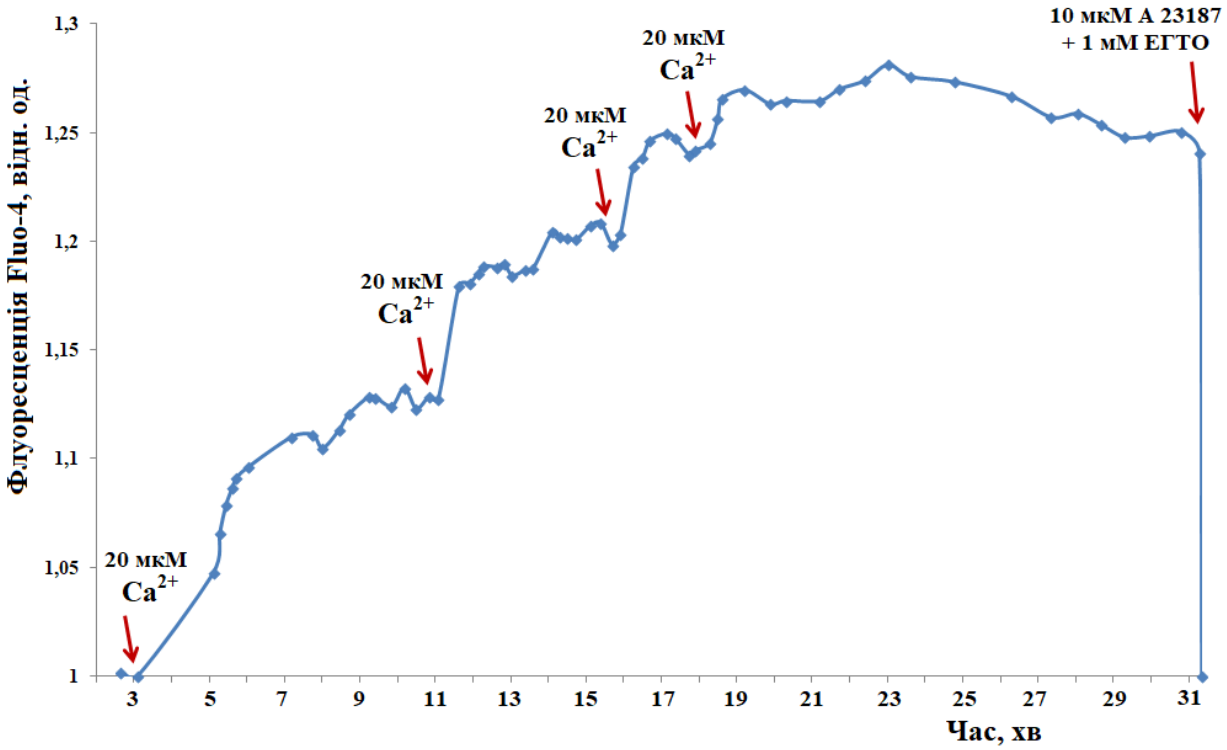

Рис. 3.7. Оцінка енергозалежної акумуляції Ca^{2+} в ізольованих мітохондріях за змінами інтенсивності флуоресценції Fluo-4 AM

Додавання зростаючих концентрацій цього катіону призводить до збільшення флуоресцентного сигналу з його наступним виходом на платовий рівень, зі зростанням концентрацій катіону інтенсивність відповіді знижується через обмежену Ca^{2+}-ємність. Додавання Ca^{2+}-іонофора А-23187 (10 мкМ), а отже збільшення неспецифічної проникності мітохондрійної мембрани, має наслідком швидке вивільнення акумульованого Ca^{2+} в середовище, що містить хелатор Ca^{2+} 1 мМ ЕГТО. Поряд з енергозалежним накопиченням Ca^{2+} в МХ реєструється активність H^{+}-Ca^{2+}-обмінника. МХ мали змогу вивільняти попередньо акумульований в енергозалежному процесі Ca^{2+} за умови закислення позамітохондрійного середовища (рис. 3.8 А), згідно із даними про зниження флуоресценції Fluo-4 AM при зміні pH від 7,5 до 6,5 (ΔpH-залежне вивільнення Ca^{2+}). Паралельно відбувається закислення матриксу мітохондрії, про що свідчить зниження флуоресценції pH-чутливого зонду BCECF, яким було попередньо навантажено мітохондрії (рис. 3.8, Б).

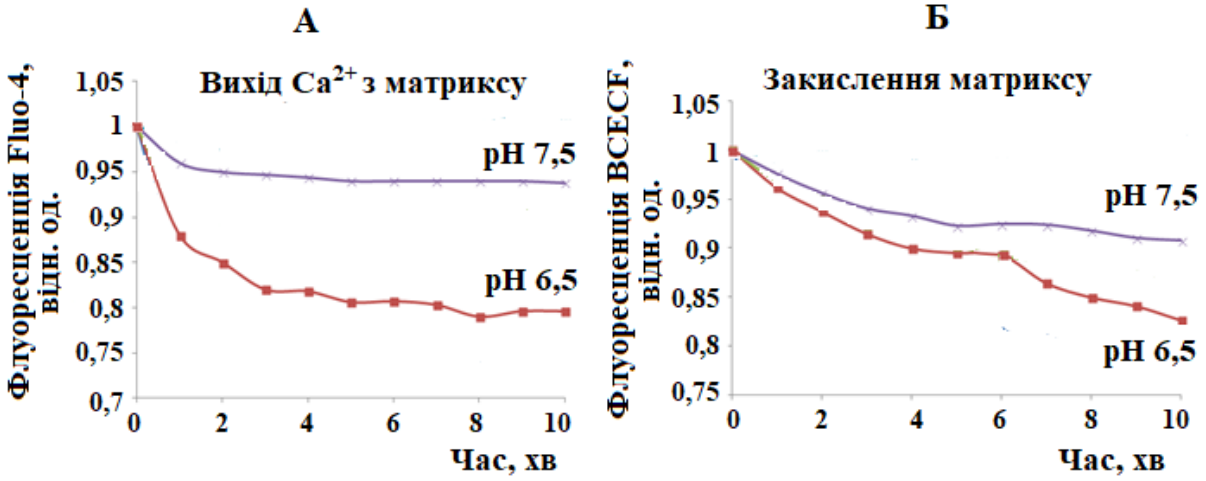

Рис. 3.8. Одночасні зміни концентрації Ca^{2+} (А) та H^{+} (Б) в матриксі мітохондрій за умови функціонування H^{+}-Ca^{2+}- обмінника

Досліджувані халконовмісні калікс[4]арени уповільнювали енергозалежну акумуляцію Ca^{2+} (рис. 3.9, А) та функціонування H^{+}-Ca^{2+} - обмінника (рис. 3.9, Б) в МХ.

При зростанні кількості халконових замісників від одного до двох ефективність гальмівної дії суттєво зростала. Втім, наявність полярних електроноакцепторних функціональних NO_2-груп у халконових залишках калікс[4]арену С-1021 мало наслідком послаблення взаємодії з внутрішньою мітохондрійною мембраною і відповідне зниження ефективності впливу відносно калікс[4]арену С-1012, в структурі якого немає NO_2-груп, хоча вони обидва містять однакову кількість халконових залишків у своїй структурі. Подальше зростання кількості замісників на нижньому вінцю калікс[4]аренової чаші вже не мало суттєвого впливу на інгібувальну здатність. Порівняння гальмівної дії калікс[4]аренів з трьома халконовими залишками (С-1023 та С-1024) свідчить про залежність ефективності впливу від природи замісників в самій чаші. Сполука С-1023, яка містить гідрофільну фенольну ОН-групу, володіє меншою ефективністю гальмівної дії, ніж сполука С-1024, яка містить у своєму складі гідрофобну групу OPr.

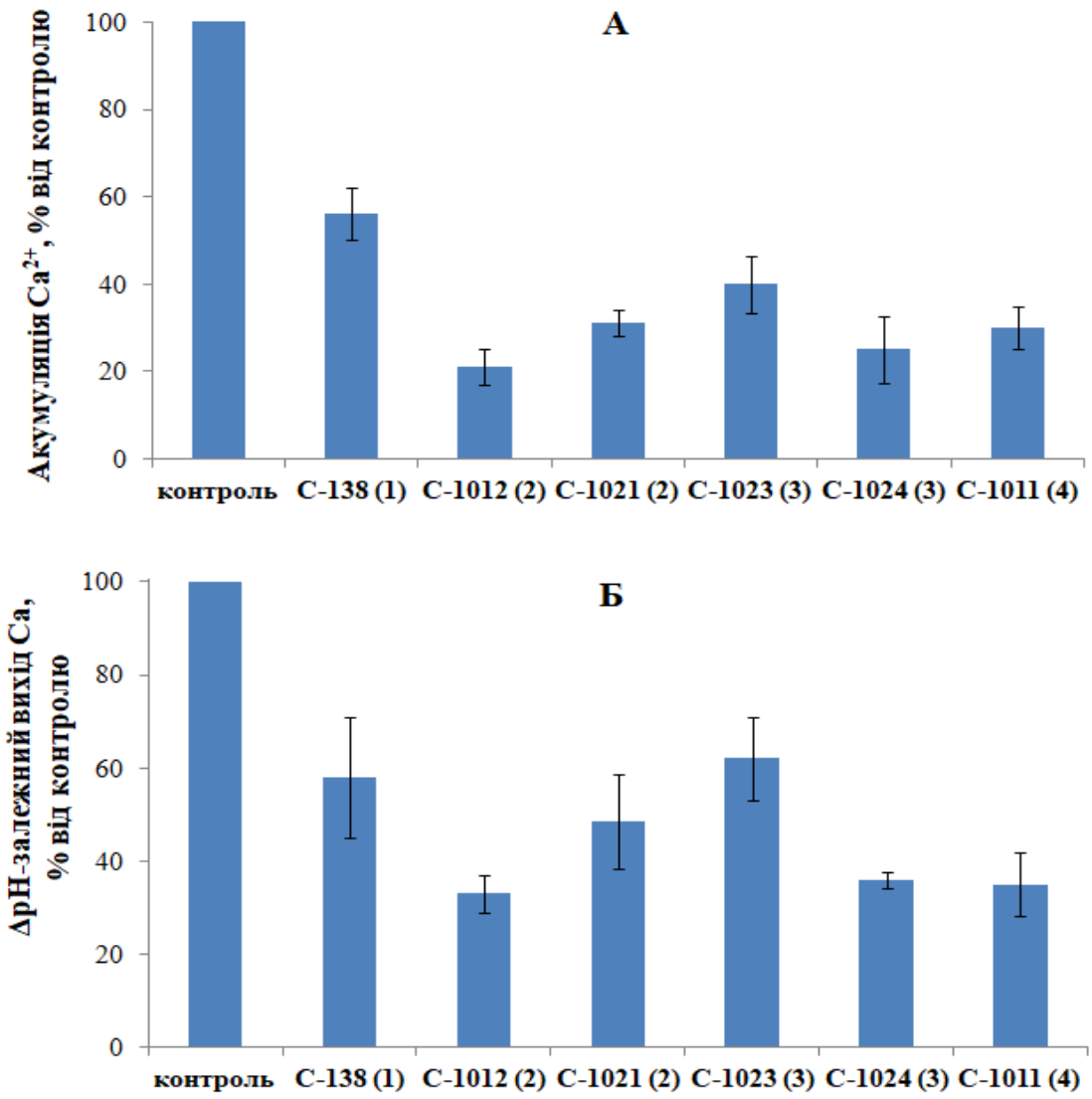

Рис. 3.9. Вплив халконових калікс[4]аренів на обмін Ca^{2+} в ізольованих мітохондріях. Енергозалежна акумуляція (А), ΔpH-залежний вихід Ca^{2+} (Б). За 100 % прийнято зміни флуоресцентного сигналу від Fluo-4 за відсутності калікс[4]аренів

Аналіз змін флуоресцентної відповіді Fluo-4 з часом, яка відображає динаміку енергозалежної акумуляції Ca^{2+}, демонструє досягнення рівноважного стану транспортного процесу з виходом кривої на плато (рис. 3.10. А). Це дозволяє використати відповідні координати (рис. 3.10. Б) для розрахунків основних кінетичних параметрів транспортного процесу:

початкової швидкості акумуляції Ca^{2+} (V_o) та часу напівмаксимальної акумуляції Ca^{2+} (характеристичний час, $\tau_{1/2}$).

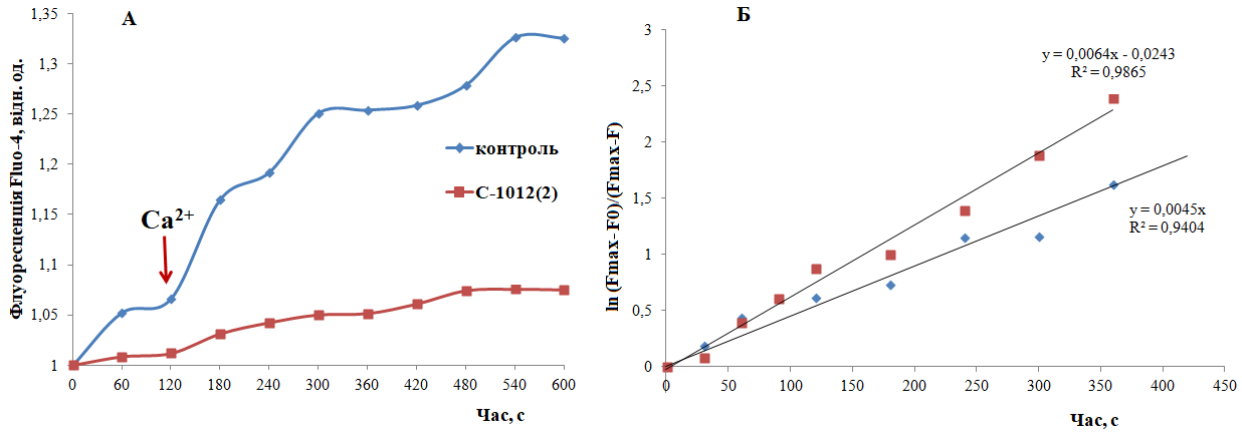

Рис. 3.10. Енергозалежна акумуляція Ca^{2+} мітохондріями в контролі та у присутності калікс[4]арена С-1012. Стрілочкою вказано момент внесення 80 мкМ Ca^{2+} до мітохондрій (А). Лінеаризація одержаних даних для розрахунку основних кінетичних параметрів транспортного процесу (Б)

Аналіз змін параметра V_o за дії калікс[4]аренів (рис. 3.11. А) показав її відповідність залежності інгібувального впливу від кількості халконових замісників та природи функціональних груп (рис. 3.9, А). Водночас, достовірне зниження характеристичного часу акумуляції Ca^{2+} мітохондріями (рис. 3.11. Б) спостерігалося лише за впливу калікс[4]аренів С-1021 (містить два халконові замісники) та С-1011 (містить чотири халконові замісники).

Зменшення досліджуваного параметру може свідчити про те, що на фоні інгібування вибраними калікс[4]аренами енергозалежної акумуляції Ca^{2+} відбувається збільшення проникності ВММ до катіону. Калікс[4]арен С-1011 володіє найбільш гідрофобними властивостями з усіх досліджуваних у даній роботі сполук. Він ефективно взаємодіє з ліпідними компонентами мітохондрійної мембрани, тому здатен суттєво впливати на її проникність до Ca^{2+}. Хоча негативні заряди С-1021 повинні заважати взаємодії з ВММ. Ще

одним поясненням зниження параметру $\tau_{1/2}$ в даному випадку може виступати безпосередня взаємодія з Ca^{2+}-транспортними білками.

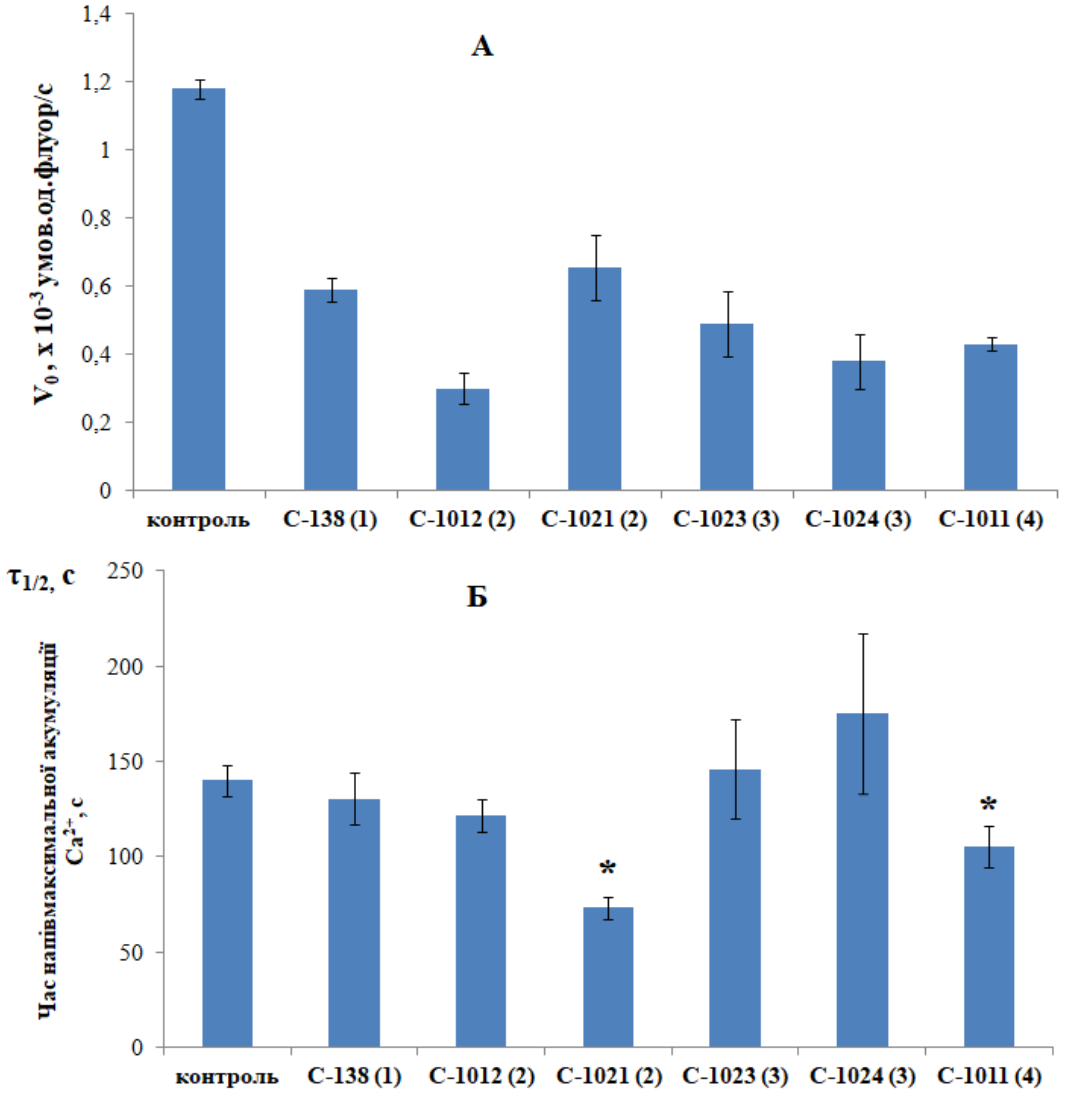

Рис. 3.11. Зміни основних кінетичних параметрів енергозалежної акумуляції Ca^{2+} мітохондріями в контролі та у присутності халконових калікс[4]аренів. А - початкова швидкість V_0 транспортного процесу; всі зміни достовірні відносно контролю, $P<0,05$. Б - характеристичний час транспортного процесу $\tau_{1/2}$; * - зміни достовірні відносно контролю, $P<0,05$

В ізольованих МХ міометрія продемонстровано наявність NO-синтазної активності, яка є важливим ендогенним джерелом NO в гладенькому м’язі

матки [75]. Хоча локалізація мітохондрійної NO-синтази ще дискутується, припускають зв'язок саме з внутрішньою мембраною органел [75-76]. Попередні дослідження продемонстрували, що синтез оксиду азоту в МХ активується Ca^{2+} та залежить від ступеня їхньої енергізації [74]. Тому надалі ми дослідили ефекти халконовмісних калікс[4]аренів на активність NO-синтази в ізольованих МХ за оптимальних умов протікання реакції – у присутності 50 мкМ L-аргініна, 100 мкМ Ca^{2+}, 10 мкМ NADPH та 10 мкМ BH_4.

3.6. Вплив халконовмісних калікс[4]аренів на активність мітохондрійної NO-синтази в ізольованих мітохондріях

Виявлено, що вибрані калікс[4]арени пригнічують в середньому на 10-35% утворення оксиду азоту МХ (рис. 3.12). Причому зі зростанням кількості халконових залишків у досліджуваних сполуках ступінь інгібування знижується.

Отже, цей показник є обернено пропорційним до гідрофобної властивості калікс[4]аренів, і зростає зі збільшенням кількості халконових замісників. Вочевидь, гальмівний вплив не пов'язаний безпосередньо ні з ефектами халконовмісних калікс[4]аренів на ЕТЛ МХ, ні з їхньою дією на транспортувальні властивості Ca^{2+} у внутрішній мембрані. Вірогідніше за все, продемонстровані ефекти асоційовані з певною функціонально-важливою частиною мітохондрійної NO-синтази, що експонована у міжмембранний простір, а не з взаємодією із ліпідною компонентою внутрішньої мембрани. Раніше було продемонстровано, що інгібітори Ca^{2+}-транспорту пригнічують синтез NO в МХ. Можна зробити висновок, що продемонстровані результати опосередковано вказують на вірогідність того, що мітохондрійна NO-синтаза може бути інтегральним ензимом по відношенню до ВММ.

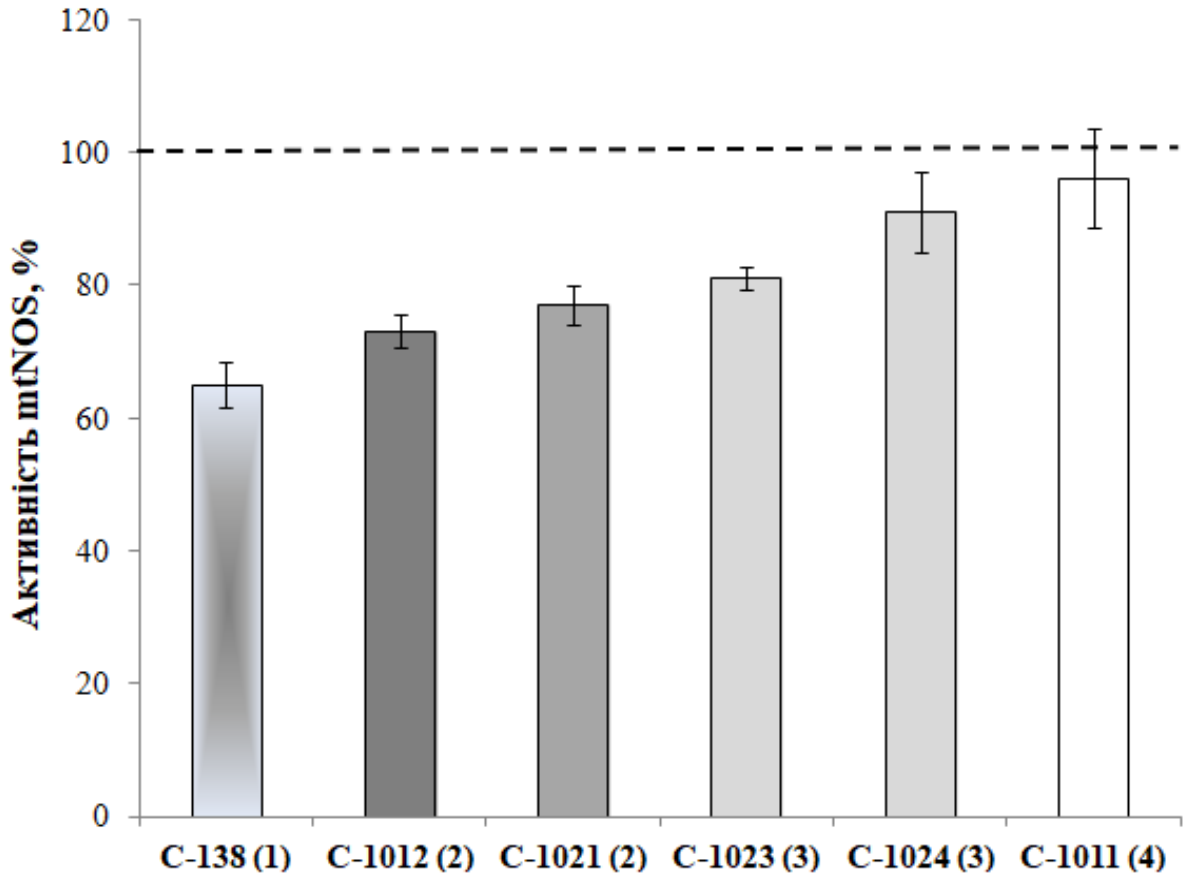

Рис. 3.12. Вплив халконовмісних калікс[4]аренів на активність мітохондрійної NO-синтази

Проведені дослідження свідчать про перспективність застосування халконових калікс[4]аренів як інструментів в дослідженнях біохімічних процесів, що асоційовані з субклітинними мембранами, а також важливість подальших студій, спрямованих на з’ясування зв’язку між їхньою структурою та біологічними ефектами. Ці дослідження можуть призвести до синтезу селективних інгібіторів/активаторів клітинних процесів.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Адекватне функціонування гладеньком'язевої системи є запорукою успішності багатьох фізіологічних процесів. В тому числі, під час вагітності і пологів дуже важливим є забезпечення нормальної контрактильної функції м'язів матки, і МХ є ключовою ланкою в цьому процесі. Саме тому важливим є пошук та дослідження сполук-кандидатів, які могли б забезпечити потрібний вплив на внутрішньомітохондрійні процеси для уникнення та коригування мітохондрійної дисфункції. Транспорт іонів Са забезпечує скоротливу функцію гладеньких м'язів. МХ виступають Ca^{2+}-акумулюючими системами клітини, тому пошук ефекторів, що здатні впливати на функціонування електронно-транспортного ланцюга внутрішньої мітохондрійної мембрани та активність Ca^{2+}-транспортувальних систем в ній є нагальним питанням біохімічної мембранології.

В роботі досліджували вибрані сполуки халконовмісних калікс[4]аренів: С-138, С-1012, С-1021, С-1023, С-1024, С-1011. Було проведено дослідження щодо їхнього потенційного впливу на основні параметри, що забезпечують нормальне функціонування мітохондрій, а саме: ступінь окислення аденінових нуклеотидів, зміна мембранного потенціалу МХ, функціонування систем трансмембранного обміну Ca^{2+} та роботи мітохондрійної NO-синтази.

Встановлено, що вибрані калікс[4]арени пригнічує окислення NADH, при чому ефект збільшувався по мірі збільшення кількості халконових залишків у структурі сполук. В той же час, вибрані сполуки пригнічували окислення FAD, проте наразі взаємозв'язку між інтенсивністю даних ефектів та структурою калікс[4]аренів не виявлено. Ймовірно, вони блокують роботу I та II дихальних комплексів ЕТЛ, що ініціює посилену генерацію АФК. Даний ефект також був продемонстрований, при чому інтенсивність впливу збільшувалась із збільшенням кількості халконових залишків у сполуці. Більшість вибраних сполук сприяють деполяризації ВВМ, проте механізми такого впливу наразі

пояснити складно через специфічну будову калікс[4]аренів та потребу в додаткових дослідженнях.

Також встановлено, що вибрані калікс[4]арени пригнічували енергозалежну акумуляцію та ΔpH - залежне вивільнення іонів Са, тобто демонстрували вплив на Ca^{2+}-транспортувальні системи - уніпортер та H^+-Ca^{2+}-обмінник. У зв'язку із тим, що синтез оксиду азоту напряму пов'язане із транспортом іонів Са, було досліджено вплив обраних сполук на мітохондрійну NO-синтазу. Результати показали обернено пропорційну залежність ефекту калікс[4]арену від кількості його халконових замісників.

Загальну схему досліджуваних процесів у МХ та вплив калікс[4]аренів на них продемострovано на рис. 4.1.

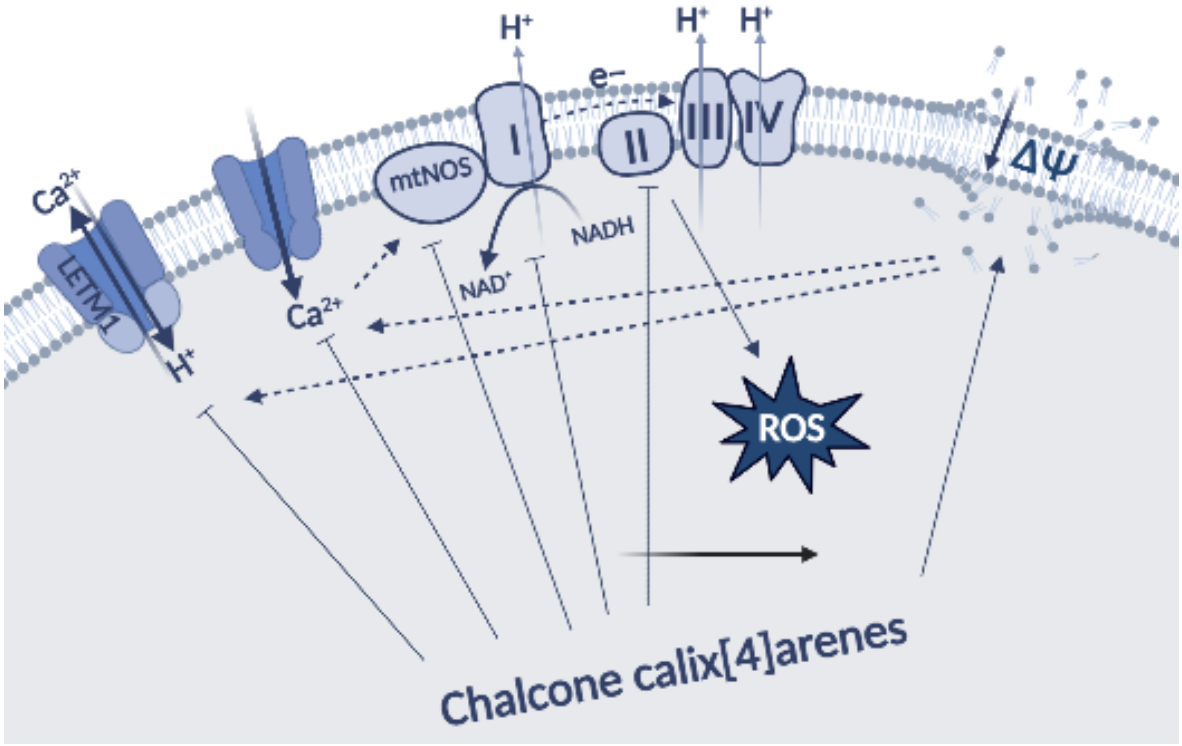

Рис. 4.1. Вплив вибраних халконовмісних калікс[4]аренів на деякі транспортні, метаболічні та енергетичні процеси у мітохондріях

ВИСНОВКИ

В ході виконання кваліфікаційної магістерської роботи були виконані всі поставлені завдання і сформульовано наступні висновки:

1. Халконовмісні калікс[4]арени гальмують окислення NADH та $FADH_2$ в електронно-транспортному ланцюзі.
2. Халконовмісні калікс[4]арени суттєво посилюють генерацію активних форм оксигену в мітохондріях; ефект залежить від кількості халконових залишків в структурі калікс[4]арена.
3. Халконовмісні калікс[4]арени інгібують системи обміну іонів Са у внутрішній мітохондрійній мембрані. Найбільш ефективно діє С-1012, який пригнічує енергозалежну акумуляцію іонів Са до 20%, а ΔpH-залежний вихід Ca^{2+} – до 30%.
4. Синтез оксиду азоту мітохондріями пригнічується халконовмісними калікс[4]аренами, які містять від 1 до 3 халконових залишків, на 10-35%.
5. Біологічні ефекти вибраних калікс[4]аренів залежали від природи та кількості халконових замісників на нижньому вінцю калікс[4]аренової чаші, а також від природи інших замісників в молекулі.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Wray S, Prendergast C. The Myometrium: From Excitation to Contractions and Labour. Adv Exp Med Biol. 2019;1124:233-263.
2. Бабич ЛГ, Шлыков СГ, Борисова ЛА, Костерин СА. Энергозависимый транспорт Ca^{2+} во внутриклеточных структурах гладкой мышцы. Биохимия. 1994;9(8):1218 – 1229.
3. Takeuchi A, Kim B, Matsuoka S. The destiny of Ca2+ released by mitochondria. J Physiol Sci. 2015;65(1):11–24
4. Gellerich FN, Gizatullina Z, Trumbeckaite S, Nguyen HP, Pallas T, Arandarcikaite O, et al. The regulation of OXPHOS by extramitochondrial calcium. Biochim Biophys Acta - Bioenerg. 2010;1797(6–7):1018–27.
5. Anderson AJ, Jackson TD,Stroud DA, Stojanovski D. Mitochondria—hubs for regulating cellular biochemistry:emerging concepts and networks. Open Biol. 2019; 9:190126.
6. Векліч ТО, Костерін С.О., Шинлова О.П. Катіонна специфічність системи акумуляції Ca^{2+} в мітохондріях клітин міометрія. Укр. біохім. журн. 2002;74(1): 42-48.
7. Костерин С. А. Транспорт кальция в гладких мышцах. Киев: Наук. Думка, 1990. 216 с.
8. Kuznetsov AV, Javadov S, Hagenbuchner J, Ausserlechner MJ.. Mitochondrial Involvement in the Molecular Mechanisms of Ischemia-Reperfusion Injury in the Heart. Recent Research Advances in Biology Vol. 8, Chapter 6: 64-87.
9. Ghafourifar P, Cadenas E. Mitochondrial nitric oxide synthase. Trends in Pharmacological Sciences. 2005; 26(4): 190-195.
10. Santo-Domingo J, Demaurex N. Calcium uptake mechanisms of mitochondria. Biochim Biochimica et Biophysica Acta. 2010;1797(6-7): 907-912.

11. Wang HW, Wei YH, Guo HW. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) fluorescence for detection of cell death. Anti-cancer agents in medicinal chemistry. 2009; 9(9):1012-1017.
12. Heikal AA. Intracellular coenzymes as natural biomarkers for metabolic activities and mitochondrial anomalies. Biomarker in Medicine. 2010;4(2):241-63.
13. Danylovych H.V., Danylovych Yu.V., Bohach T.V., Hurska V.T., Kosterin S.O. Sources and regularity of nitric oxide synthesis in uterus smooth muscle cells. Ukr. Biochem. J. 2019; 91(4): 33-40.
14. Piantadosi CA, Suliman HB. Redox Regulation of Mitochondrial Biogenesis. Free Radic Biol Med. 2012; 53(11): 2043–2053.
15. Levine AB, Punihaole D, Levine TB. Characterization of the role of nitric oxide and its clinical applications. Cardiology. 2012;122**:**55-68.
16. Sanchez–Padilla J, Guzman JN, Ilijic E, Kondapalli J, Galtieri DJ, Yang B, Schieber S, Oertel W, Wokosin D, Schumacker PT, Surmeier DJ. Mitochondrial oxidant stress in locus coeruleus is regulated by activity and nitric oxide synthase. Nat Neurosci. 2014; 17(6): 832–840.
17. Костерін С.О.,Кальченко В.І., Векліч Т.О., Бабіч Л.Г., Шликов С.Г. Каліксарени як модулятори АТР-гідролазних систем гладенькоm'язових клітин. Київ: Наукова думка, 2019. 256 с.
18. Perret F, Lazar AN, Coleman AW. Biochemistry of the para-sulfonato-calix[n]arenes. Chem. Commun. 2006;23: 2425–2438.
19. Шликов СГ, Бабіч ЛГ, Слінченко НМ, Родік РВ, Бойко ВІ, Кальченко ВІ, Костерін СО. Каліксарен С-91 стимулює акумуляцію іонів Са в мітохондріях міометрія. Укр. біохім. журн. 2007;79(4): 28-33.
20. Цимбалюк ОВ, Онуфрийчук ОВ, Векліч ТО, Черенок СО, Кальченко ВІ, Мірошниченко МС, Костерін СО. Порівняльне дослідження впливу оуабаїну і каліксарен біс-гідроксиметилфосфонової кислоти на

активність Na^+, K^+-АТРази та механокінетику процесу «скорочення-розслаблення» гладенького м’язу. Фізика живого. 2006;14(1): 53-72.

21. Цимбалюк ОВ, Родік РВ, Кальченко ВІ, Костерін СО. Механокінетичні параметри скоротливої активності гладеньких м’язів caecum щура за умов хронічної дії каліксарену С107 in vivo. Фізика живого. 2010;18(1):47-51.
22. Цимбалюк ОВ., Костерін СО. Вплив каліксарену С-90 на скоротливу активність гладеньких м’язів міометрія щурів. Біологічні студії. 2013;7(3):5-20.
23. Danylovych H.V., Danylovych Yu.V., Rodik R.V., Hurska V.T., Kalchenko V.I., Kosterin S.O. Calix[4]arenes modulate Ca^{2+}-dependent processes smooth muscle cell mitochondria. Chem. Res. J. 2019; 4(6):109-122.
24. Данилович Ю. В., Данилович Г. В., Святненко М. Д., Єсипенко О. А., Кальченко В. І., Костерін С. О. Халконовмісні калікс[4]арени як перспективні ефектори функціональної активности мітохондрій гладенького м’язу. *Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології*. 2022. Т. 20, № 1. С. 263–278.
25. Jonckheere AI, Smeitink JAM, Rodenburg RJT. Mitochondrial ATP synthase: Architecture, function and pathology. J Inherit Metab Dis. 2012;35(2):211–25.
26. Riess ML, Camara AKS, Kevin LG, An J, Stowe DF. Reduced reactive O2 species formation and preserved mitochondrial NADH and [Ca2+] levels during short-term 17°C ischemia in intact hearts. Cardiovasc Res. 2004;61(3):580–90.
27. Ying W. NAD+/NADH and NADP+/NADPH in cellular functions and cell death: Regulation and biological consequences. Antioxidants Redox Signal. 2008;10(2):179–206.

28. Kamer K. J., Mootha V. K. The molecular era of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2015. Vol. 16, No. 9. P. 545–553.
29. Xu Z, Zhang D, He X, Huang Y, Shao H. Transport of Calcium Ions into Mitochondria. Curr Genomics. 2016 Jun;17(3):215-9.
30. Carvalho E. J., Stathopulos P. B., Madesh M. Regulation of Ca^{2+} echanges and signaling in mitochondria. *Current Opinion in Physiology*. 2020. Vol. 17. P. 197–206.
31. Romero-Garcia S., Prado-Garcia H. Mitochondrial calcium: transport and modulation of cellular processes in homeostasis and cancer (review). *International Journal of Oncology*. 2019. Vol. 54, No. 4. P. 1155–1167.
32. Tanwar J., Singh J. B., Motiani R. K. Molecular machinery regulating mitochondrial calcium levels: the nuts and bolts of mitochondrial calcium dynamics. *Mitochondrion*. 2021. Vol. 57. P. 9–22.
33. Murphy E., Steenbergen C. Regulation of mitochondrial Ca^{2+} uptake. *Annual Review of Physiology*. 2020. Vol. 83. P. 107–126.
34. Yoast RE, Emrich SM, Zhang X, Xin P, Arige V, Pathak T, Benson JC, Johnson MT, Abdelnaby AE, Lakomski N, Hempel N, Han JM, Dupont G, Yule DI, Sneyd J, Trebak M. The Mitochondrial Ca2+ uniporter is a central regulator of interorganellar Ca2+ transfer and NFAT activation. J Biol Chem. 2021 Oct;297(4):101174.
35. Ghosh S, Basu Ball W, Madaris TR, Srikantan S, Madesh M, Mootha VK, Gohil VM. An essential role for cardiolipin in the stability and function of the mitochondrial calcium uniporter. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020 Jul 14;117(28):16383-16390.
36. Patron M, Granatiero V, Espino J, Rizzuto R, De Stefani D. MICU3 is a tissue-specific enhancer of mitochondrial calcium uptake. Cell Death Differ. 2019 Jan;26(1):179-195.

37. Wu W, Shen Q, Lei Z, Qiu Z, Li D, Pei H, Zheng J, Jia Z. The crystal structure of MICU2 provides insight into Ca2+ binding and MICU1-MICU2 heterodimer formation. EMBO Rep. 2019 Sep;20(9):e47488.
38. Alevriadou BR, Patel A, Noble M, Ghosh S, Gohil VM, Stathopulos PB, Madesh M. Molecular nature and physiological role of the mitochondrial calcium uniporter channel. Am J Physiol Cell Physiol. 2021 Apr 1;320(4):C465-C482.
39. Коломієць О. В. та ін. Шляхи та механізми трансмембранного обміну Ca^{2+} в мітохондріях. *Фізіологічний журнал*. 2017. Т. 63, № 4. С. 87–104.
40. Li Y, Tran Q, Shrestha R, Piao L, Park S, Park J, Park J. LETM1 is required for mitochondrial homeostasis and cellular viability (Review). Mol Med Rep. 2019 May;19(5):3367-3375.
41. Austin S, Mekis R, Mohammed SEM, Scalise M, Wang WA, Galluccio M, Pfeiffer C, Borovec T, Parapatics K, Vitko D, Dinhopl N, Demaurex N, Bennett KL, Indiveri C, Nowikovsky K. TMBIM5 is the Ca2+ /H+ antiporter of mammalian mitochondria. EMBO Rep. 2022 Dec 6;23(12):e54978.
42. Toledo JC Jr, Augusto O. Connecting the chemical and biological properties of nitric oxide. Chem Res Toxicol. 2012 May 21;25(5):975-89.
43. Dudzinski DM, Igarashi J, Greif D, Michel T. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2006;46:235-76.
44. Haynes V, Elfering S, Traaseth N, Giulivi C. Mitochondrial nitric-oxide synthase: enzyme expression, characterization, and regulation. J Bioenerg Biomembr. 2004 Aug;36(4):341-6.
45. Mutchler SM, Straub AC. Compartmentalized nitric oxide signaling in the resistance vasculature. Nitric Oxide. 2015 Sep 15;49:8-15.
46. Treuer AV, Gonzalez DR. Nitric oxide synthases, S-nitrosylation and cardiovascular health: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. Mol Med Rep. 2015 Mar;11(3):1555-65.

47. Leite AC, Oliveira HC, Utino FL, Garcia R, Alberici LC. Mitochondria generated nitric oxide protects against permeability transition via formation of membrane protein S-nitrosothiols. Biochim Biophys Acta. 2010 Jun-Jul;1797(6-7):1210-6.
48. Elfering SL, Sarkela TM, Giulivi C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. J Biol Chem. 2002 Oct 11;277(41):38079-86.
49. Tengan CH, Rodrigues GS, Godinho RO. Nitric oxide in skeletal muscle: role on mitochondrial biogenesis and function. Int J Mol Sci. 2012 Dec 14;13(12):17160-84.
50. Ghimire K, Altmann HM, Straub AC, Isenberg JS. Nitric oxide: what's new to NO? Am J Physiol Cell Physiol. 2017 Mar 1;312(3):C254-C262
51. Traaseth N, Elfering S, Solien J, Haynes V, Giulivi C. Role of calcium signaling in the activation of mitochondrial nitric oxide synthase and citric acid cycle. Biochim Biophys Acta. 2004 Jul 23;1658(1-2):64-71.
52. Ortolan, A. O., Østrøm, I., Caramori, G. F., Parreira, R. L. T., Muñoz-Castro, A., & Bickelhaupt, F. M. (2018). Anion Recognition by Organometallic Calixarenes: Analysis from Relativistic DFT Calculations. Organometallics, 37(13), 2167–2176.
53. Morohashi, N., Narumi, F., Iki, N., Hattori, T., & Miyano, S. (2006). *Thiacalixarenes. Chemical Reviews,* 106(12), 5291–5316.
54. Данилович Г. В. Біосинтез та регуляторна роль оксиду азоту в мітохондріях гладенького м’яза: дис. … д-ра біол. наук: 03.00.04 / Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна. Київ, 2021. 309 с.
55. Pan Y.-C., Hu X.-Y., Guo D.-S. Biomedical applications of calixarenes: state-of-the-art and perspectives. *Angewandte Chemie International Edition*. 2021. Vol. 60, No. 6. P. 2768–2794
56. Español ES, Villamil MM. Calixarenes: Generalities and Their Role in Improving the Solubility, Biocompatibility, Stability, Bioavailability,

Detection, and Transport of Biomolecules. Biomolecules. 2019 Mar 5;9(3):90.

57. Бевза О.В., Лабинцева Р. Д., Черенок С. О., Кальченко В.І., Костерін С.О. Комп'ютерне моделювання взаємодії калікс[4]арену С-99 із субфрагментом-1 міозину міометрія // Укр. біохім. журн. — 2010. — Т. 82, № 2. — С. 85-93. — Бібліогр.: 31 назв. — укр.
58. Gao J., Guo D.-S. Supramolecular medicine of diverse calixarene derivatives. *Handbook of Macrocyclic Supramolecular Assembly* / ed.: Y. Liu, Y. Chen, H. Y. Zhang. Singapore: Springer, 2019. P. 1–30.
59. Sulfonyl-bridged calix[4]arene as an inhibitor of protein tyrosine phosphatases / V. M. Buldenko et al. *French-Ukrainian Journal of Chemistry*. 2017. Vol. 5, No.2. P. 144–151
60. Kharchenko, S. G., Drapailo, A. B., Kalchenko, O. I., Yampolska, G. D., Shishkina, S. V., Shishkin, O. V., & Kalchenko, V. I. (2013). *Thia- and Sulfonyl-Calix[4]Arene Methylphosphonous Acids: Synthesis, Structure, and Amino Acids Binding. Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements, 188(1-3),* 243–248.
61. Iki N., Miyano S. Can thiacalixarene surpass calixarene? *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 2001. Vol. 41. P. 99–105.
62. Мінцер О. П., Потяженко М. М., Невойт Г. В. Мітохондріальна дисфункція у загальному континуумі неінфекційних захворювань із позиції системної медицини. Частина І. Огляд літератури і результати теоретичного дослідження. *Український медичний часопис*. 2022. Т. 147, № 1. С. 1–8.
63. Данилович Ю.В. та ін. Дія калікс[4]аренів на транспорт Ca^{2+}, електричний потенціял та активність електрон-транспортувального ланцюга в мітохондріях гладенького м'язу / *Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології*. 2017. Т. 15, № 2. С. 365–371.

64. Danylovych HV, Danylovych YV, Rodik RV, Kalchenko VI, Chunikhin AJ. CALIX[4]ARENES AS MODULATORS OF ENERGY-DEPENDENT CA2+_ACCUMULATION AND FUNCTIONING OF THE ELECTRON TRANSPORT CHAIN IN SMOOTH MUSCLE MITOCHONDRIA. Fiziol Zh (1994). 2016;62(5):27-36.
65. Danylovych, Yurii V., Hanna V. Danylovych, Oksana V. Kolomiets, Marina D. Sviatnenko, Sergiy O. Kosterin. "Biochemical properties of H+-Ca2+-exchanger in the myometrium mitochondria." Current Research in Physiology, vol. 5, 2022, pp. 369-380.
66. Danylovych H. V. et al.Calix[4]arene C-956 is effective inhibitor of H^+-Ca^{2+}-exchanger in smooth muscle mitochondria / *Ukrainian Biochemical Journal*. 2018. Vol. 90, No. 1. P. 25–31.
67. Veklich TO, Skrabak OA, Nikonishyna YuV, Rodik RV, Kalchenko VI, Kosterin SO. Calix[4]arene C-956 selectively inhibits plasma membrane Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPase in myometrial cells. Ukr. Biochem. J. 2018; 90(5): 34-42
68. Shlykov S. G. et al. Calix[4]arene chalcone amides effects on myometrium mitochondria / *Ukrainian Biochemical Journal*. 2019. Vol. 91, No. 3. P. 46–55.
69. Shlykov S. G. et al. Calix[4]arene chalcone amides as effectors of mitochondria membrane polarization / *Nanosistemi, Nanomateriali, Nanotehnologii*. 2020. Vol. 18, No. 3. P. 473–485.
70. Костерин СА, Браткова НФ, Курский МД. Роль сарколеммы и митохондрий в обеспечении кальциевого контроля расслабления миометрия. Биохимия. 1985;50(8):1350 – 1361.
71. Danylovych H.V. Evaluation of functioning of mitochondrial electron transport chain with NADH and FAD autofluorescence. Ukr. Biochem. J. 2016; 88(1): 31-43.

72. Santo-Domingo J, Wiederkehr A, De Marchi U. Modulation of the matrix redox signaling by mitochondrial Ca^{2+}. World J Biol Chem. 2015;6(4):310-23

73. Векліч ТО, Костерін С.О., Шинлова О.П. Катіонна специфічність системи акумуляції Ca^{2+} в мітохондріях клітин міометрія. Укр. біохім. журн. 2002;74(1): 42-48.

74. Danylovych H.V., Danylovych Yu.V., Gulina M.O., Bohach T.V., Kosterin S.O. NO-synthase activity in the mitochondria of the uterus smooth muscle: identification and biochemical properties. Gen. Physiol. Biohys. 2019; 38(1): 39-50.

75. Elfering SL, Sarkela ThM, Giulivi C. Biochemistry of Mitochondrial Nitric-oxide Synthase. J Biol Chem. 2002; 277(41): 38079–38086.

76. Haynes V, Elfering S, Traaseth N, Giulivi C. Mitochondrial Nitric-Oxide Synthase: Enzyme Expression, Characterization, and Regulation. J Bioenerg Biomembr. 2004; 36(4): 341-6.

77. Shatursky, O. Y., Kasatkina, L. A., Rodik, R. V., Cherenok, S. O., Shkrabak, A. A., Veklich, T. O., … Kalchenko, V. I. (2014). *Anion carrier formation by calix[4]arene-bis-hydroxymethylphosphonic acid in bilayer membranes. Org. Biomol. Chem., 12(48), 9811–9821.*