

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики
доц. Олексій Юрійович Нипорко
Протокол № ____ засідання кафедри
від “ ____ ” _____ 2023 р.

**ТІАКАЛІКС[4]АРЕН С-1193 – ЕФЕКТИВНИЙ МОДУЛЯТОР
БІОЕНЕРГЕТИЧНИХ ТА Ca^{2+} -ТРАНСПОРТУВАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ У
МІТОХОНДРІЯХ**

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра
студента спеціальності
091 Біологія

ОП «Біологія (високі технології)»
Піменова Іллі Миколайовича

Науковий керівник від кафедри
професор кафедри молекулярної
біотехнології та біоінформатики
д.б.н. **Костерін Сергій Олексійович**

Робота виконана у відділі біохімії м'язів
Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України
під керівництвом д.б.н. **Г. В. Данилович**

Оцінка захисту роботи

Київ – 2023 р.

АНОТАЦІЯ

Піменов І. М. Тіакалікс[4]арен С-1193 – ефективний модулятор біоенергетичних та Ca^{2+} -транспортувальних процесів у мітохондріях. – Випускна кваліфікаційна робота бакалавра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Біологія (високі технології)».

У роботі здійснено дослідження впливу тіакалікс[4]арену С-1193 на біоенергетичні та Ca^{2+} -транспортувальні процеси у мітохондріях міоцитів матки щурів. Продемонстровано, що сірковмісний калікс[4]арен С-1193 змінює активність транспорту Ca^{2+} , ефективно пригнічує синтез NO та має виражений модулюючий вплив на функціонування електронно-транспортного ланцюга мітохондрій міомеріа. Гальмування використаним калікс[4]ареном утворення активних форм кисню в мітохондріях та відсутність їх набухання вказує на те, що досліджувані процеси не призводять до розвитку мітохондрійної дисфункції. Отримані результати вказують на перспективність сполуки С-1193 для її подальших біохімічних досліджень як регулятора біоенергетичних та транспортувальних процесів у мітохондріях гладенького м'язу матки для запобігання/корекції розвитку мітохондрійної дисфункції.

Ключові слова: тіакалікс[4]арен С-1193; Ca^{2+} ; оксид азоту; АФК; NADH; мітохондрія; міомерій.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	5
ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	8
1.1. Загальна характеристика калікс[4]аренів.....	8
1.2. Калікс[4]арени в біології, супрамолекулярній хімії та медицині... 12	12
1.3. Роль калікс[4]аренів як модуляторів функціональної активності мітохондрій	19
1.4. Структурно-функціональна організація мітохондрій.....	22
1.5. Дихальний ланцюг мітохондрій.....	24
1.6. Мітохондрійна генерація активних форм кисню	27
1.7. Транспорт іонів Ca ²⁺ в мітохондріях	29
РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	34
2.1. Виділення фракції мітохондрій міометрія	34
2.2. Реєстрація флуоресценції NADH та FAD в мітохондріях	35
2.3. Дослідження утворення активних форм кисню в мітохондріях з використанням флуоресцентного зонду DCF-DA.....	36
2.4. Дослідження біосинтезу оксиду азоту в ізольованих мітохондріях міометрія з використанням флуоресцентного зонду DAF-FM	37
2.5. Дослідження акумуляції іонів Ca ²⁺ та ΔpH-залежного виходу катіону у фракції мітохондрій з використанням флуоресцентного зонду Fluo-4 AM	38
2.6. Визначення функції розподілу гідродинамічного діаметру ізольованих мітохондрій з використанням методу лазерної кореляційної спектроскопії.....	39
2.7. Вивчення впливу калікс[4]арену на транспортні та енергетичні процеси в ізольованих мітохондріях	40

2.8. Статистична обробка результатів досліджень.....	40
РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ	42
3.1. Дослідження змін флуоресценції NADH та FAD в мітохондріях під дією калікс[4]арену C-1193	43
3.2. Генерація активних форм кисню в мітохондріях у присутності калікс[4]арену C-1193	47
3.3. Вплив калікс[4]арену C-1193 на системи обміну іонів Ca ²⁺ у фракції мітохондрій	49
3.4. Біосинтез оксиду азоту в ізольованих мітохондріях у присутності калікс[4]арену C-1193	51
ВИСНОВКИ.....	54
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	55

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ВММ – внутрішня мітохондрійна мембрана

ЗММ – зовнішня мітохондрійна мембрана

ЕТЛ – електронно-транспортний ланцюг

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активні форми кисню

NO – оксид азоту

NADH – нікотинамідаденіндинуклеотид (відновлена форма)

FADH₂ – флавінаденіндинуклеотид (відновлена форма)

KoQ – коензим Q, або убіхінон (окиснена форма)

KoQH₂ – коензим Q, або убіхінон (відновлена форма)

мтДНК – мітохондрійна ДНК

MCU – мітохондрійний кальцієвий уніпортер

MICU – регуляторний протеїн комплексу Ca²⁺ уніпортера, який має три ізоформи (MICU1, MICU2 і MICU3)

EMRE – Ca²⁺-сенсорний регуляторний протеїн, субодиниця комплексу Ca²⁺ уніпортера

LETM1 – leucine zipper EF hand-containing transmembrane protein 1, один із запропонованих Ca²⁺/H⁺ обмінників в мітохондріях

VDAC – потенціалзалежний аніонний канал, який має три ізоформи (VDAC1, VDAC2, VDAC3)

ВСТУП

Мітохондрії як енергетичні станції клітини завжди привертали увагу дослідників своїми властивостями. Із становленням науково-технічного прогресу, а також удосконаленням методів дослідження клітини, стало очевидним, що ці органели відіграють вирішальну роль у життєдіяльності клітин і, отже, всього організму.

Серед основних функцій мітохондрій – синтез аденозинтрифосфату (АТФ), який тісно пов'язаний з діяльністю електронно-транспортного ланцюга (ЕТЛ). ЕТЛ фасилітує перенесення електронів і протонів через різні протеїнові комплекси і коферменти, зрештою досягаючи молекулярного кисню. Цей процес генерує електрохімічний потенціал на внутрішній мітохондрійній мембрані [1, 2]. Значна участь мітохондрій у підтримці клітинного кальцієвого гомеостазу і регуляції передачі сигналів Ca^{2+} була добре встановлена [3]. Зміни цитозольних концентрацій Ca^{2+} визначають контроль скоротливої активності гладеньких м'язів, зокрема міометрія. Субклітинні структури, зокрема мітохондрії, охоплюють системи транспорту Ca^{2+} , які служать мішенями для речовин, здатних модулювати скоротливу функцію міоцитів [4].

Належне функціонування електронно-транспортного ланцюга і ефективний обмін іонів Ca^{2+} мітохондріями є вирішальними для забезпечення нормального функціонування клітин. Отже, пошук екзогенних речовин, здатних регулювати функціональну активність мітохондрій, сьогодні набуває значної актуальності.

Перспективними в цьому напрямку виявились каліксарени – циклічні олігомери фенолів. Наразі відомо про численні (гетеро)калікс[4]арени із прикладним застосуванням у біології, хімії та медицині. Калікс[4]арени володіють противірусною, антитромботичною, антибактеріальною дією [5, 6]. Багато калікс[4]аренів здатні виступати інгібіторами ензимів [6]. Доведено, що

окремі калікс[4]арени специфічно впливають на катіон-транспортвальні системи субклітинних структур, у тому числі, мітохондрій гладеньких м'язів [7-10].

Не виключено, що за невисоких (мікромольних) концентрацій окремі групи калікс[4]аренів здатні діяти на функціональну активність електронно-транспортного ланцюга, поляризацію мітохондрійної мембрани, обмін іонів Ca^{2+} та інші процеси в мітохондріях гладенького м'язу. Перевагою калікс[4]аренів як можливих інструментів біохімічних досліджень є їхня нетоксичність і дешевизна синтезу.

Тому, *метою* роботи було дослідити вплив тіакалікс[4]арену С-1193 на біоенергетичні та Ca^{2+} -транспортвальні процеси в мітохондріях міоцитів матки.

Відповідно до мети було поставлено наступні *завдання*:

1. Дослідити функціонування електронно-транспортного ланцюга за змінами флуоресценції NADH та FAD у присутності тіакалікс[4]арену С-1193 у фракції ізольованих мітохондрій.
2. Визначити вплив тіакалікс[4]арену С-1193 на генерацію активних форм кисню в мітохондріях.
3. З'ясувати ефекти тіакалікс[4]арену С-1193 на акумуляцію іонів Ca^{2+} в ізольованих мітохондріях.
4. Дослідити вплив тіакалікс[4]арену С-1193 на синтез оксиду азоту в мітохондріях міоцитів.

РОЗДІЛ І

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика калікс[4]аренів

Каліксарени – це родина макроциклічних олігомерів, що складаються із фенольних одиниць, з'єднаних між собою метиленовими містками в орто положенні [11]. Вони є продуктами циклічної конденсації пара-заміщених фенолів з формальдегідом під дією лугів або кислот як каталізаторів (рис. 1.1) [12, 13].

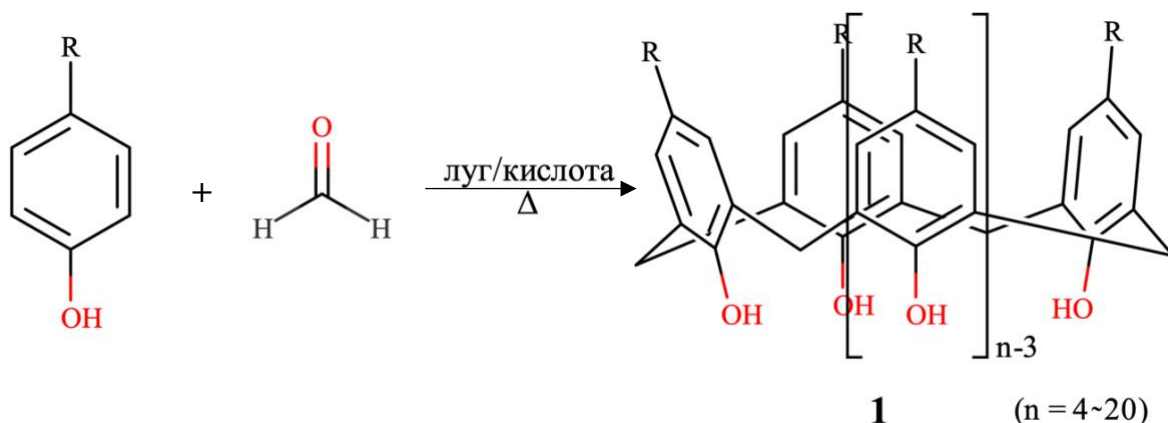


Рисунок 1.1 – Реакція конденсації пара-заміщених фенолів з формальдегідом

У будові каліксаренів можна виділити три основні елементи: верхнє вінце, гідрофобну чашу, утворену ароматичними фрагментами, та нижнє вінце (рис. 1.2) [5].

Каліксарени можуть містити від 4 до 20 фенольних одиниць. Найбільш вивченими залишаються каліксарени, що містять 4-8 аренових залишків через постійне вдосконалення методів синтезу та хороший вихід продуктів реакцій. У каліксаренів розрізняють чотири конформації: конус, напівконус, 1,2-альтернат та 1,3-альтернат (рис. 1.3) [5, 11-14].

іонів, утворення супрамолекулярних комплексів та широкі перспективи подальшого застосування в науках про життя та медицині [14, 15].

Каліксарени є важливими макроциклами для досліджень через те, що вони можуть розпізнавати та розміщувати у своїй порожнині гостьові молекули та утворювати комплекси типу «гість-господар» завдяки різноманітним нековалентним взаємодіям, серед яких можна виділити водневі зв'язки, катіон-π взаємодії, аніон-π взаємодії, сили Ван дер Ваальса та π-π стекінг [11, 16]. Сила таких взаємодій також залежить від конформації, у якій знаходиться каліксарен [17].

Будова калікс[4]аренів дозволяє здійснювати різноманітні хімічні модифікації окремих їх елементів для отримання похідних сполук із потрібними властивостями. Такі модифікації, зокрема, можуть стосуватися пара-положень ароматичних кілець (електрофільне ароматичне заміщення), гідроксильних груп (реакції алкілування та ацилювання), метиленових містків та фенольних залишків [18].

Активно досліджуються зараз гетерокалікс[4]арени, тобто калікс[4]арени, у яких ароматичні кільця з'єднані між собою не метиленовими містками, а гетероатомами. Серед таких калікс[4]аренів розрізняють тіакалікс[4]арени (атоми S, рис. 1.4, 2), сульфінілкалікс[4]арени (SO, рис. 1.4, 3), сульфонілкалікс[4]арени (SO₂, рис. 1.4, 4), азакалікс[4]арени (атоми N, рис. 1.4, 5), оксакалікс[4]арени (атоми O, рис. 1.4, 6) та інші [12, 14, 19-21].

Напевно найбільш дослідженими і найбільш цікавими за рахунок своїх властивостей є тіакалікс[4]арени, що містять атоми сульфуру замість метиленових лінкерів [22].

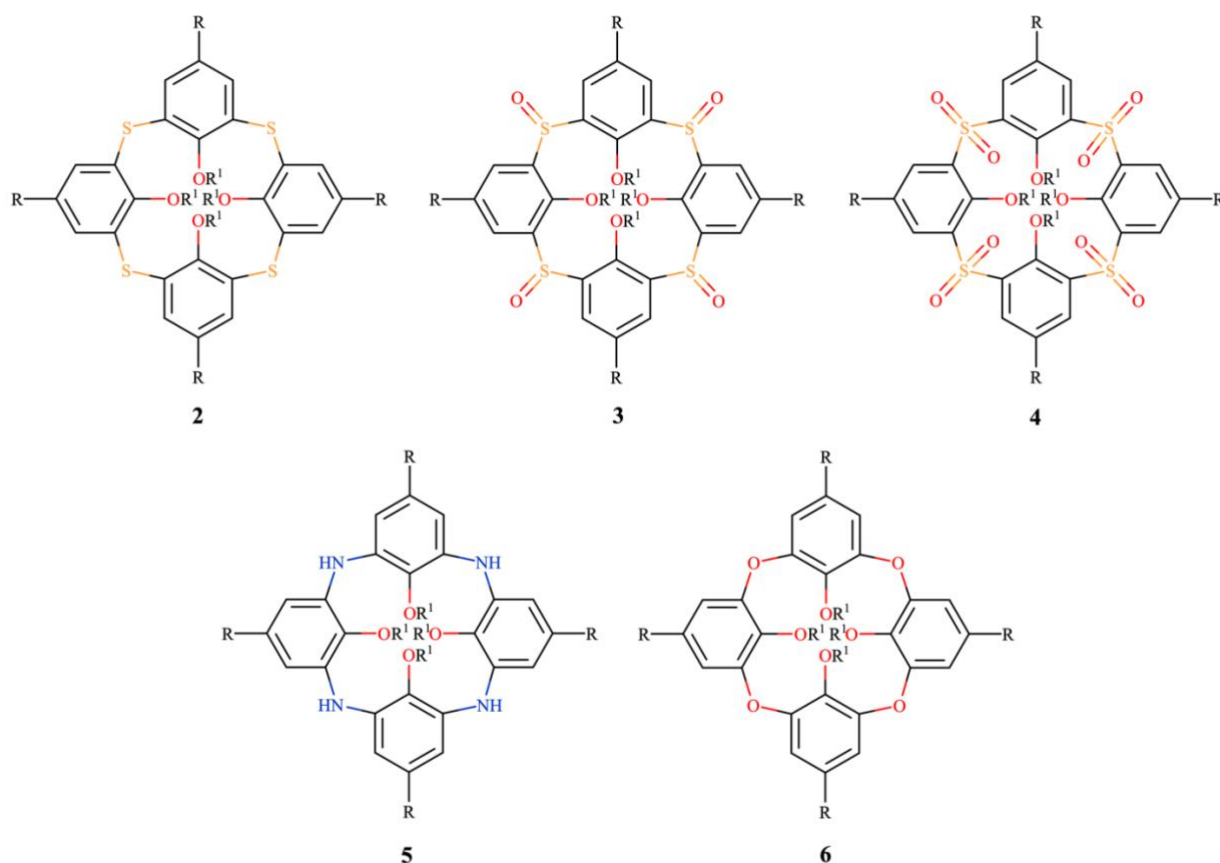


Рисунок 1.4 – Загальні структурні формули тіакалікс[4]аренів (2), сульфінілкалікс[4]аренів (3), сульфонілкалікс[4]аренів (4), азакалікс[4]аренів (5), оксакалікс[4]аренів (6)

Кристалграфічні дослідження показують, що тіакалікс[4]арени у розчині та у твердому стані схильні приймати конформацію «конус» [19].

Тіакалікс[4]арени здатні формувати супрамолекулярні комплекси з органічними молекулами або біомолекулами та демонструють хорошу біологічну активність [22]. Вони є дещо більшими макроциклами у порівнянні з калікс[4]аренами. Так, було показано, що відстань між сусідніми атомами сульфуру тіакалікс[4]аренів та сусідніми атомами карбону метиленових містків калікс[4]аренів становить 5,53 Å та 5,06 Å відповідно. Відстань між протилежними лінкерними атомами становить 7,82 Å та 7,08 Å відповідно [12, 22]. Можливе окиснення тіакалікс[4]аренів до сульфінілкалікс[4]аренів та сульфонілкалікс[4]аренів призводить до утворення супрамолекулярних сполук із різними властивостями та стереохімічними можливостями [23].

1.2. Калікс[4]арени в біології, супрамолекулярній хімії та медицині

Каліксарени – третє покоління макроциклічних супрамолекулярних суб'єктів (після краун-етерів та циклодекстринів), які пропонують необмежені можливості з отримання нових надмолекулярних властивостей для виконання різноманітних поставлених задач [5, 18].

Завдяки можливості функціоналізації каліксаренів великою кількістю різних хімічних груп були проведені дослідження з можливостями використання цих сполук у біології, супрамолекулярній хімії, медицині тощо [5].

Як супрамолекулярні суб'єкти, каліксарени здатні формувати комплекси типу «гість-господар» із рядом сполук, зокрема з протеїнами, антигельмінтними препаратами, пестицидами, стероїдними гормонами, тестореном, лектинами, альдітолами, антибактеріальними препаратами, сахаридами, нуклеотидами [19-21].

Окрім формування супрамолекулярних комплексів та можливості розпізнавання ряду хімічних сполук, були встановлені властивості каліксаренів як необхідних елементів для формування різних супрамолекулярних архітектур, таких як, наприклад, везикули, нановолокна, міцели, трубки, капсули, супрамолекулярні полімери, наночастинки, катенани, ротаксани тощо [5, 17].

Практичне застосування каліксаренів також полягає у тому, що ці сполуки виявляють антивірусну, антитромботичну, антибактеріальну, антикоагуляційну, протипухлинну та антитуберкульозну активність [19].

Для оцінки перспектив використання каліксаренів і калікс[4]аренів зокрема, дослідникам спочатку необхідно було визначити, чи є ці макроциклічні сполуки придатними для використання з клітинами, тобто чи не є вони цитотоксичними.

Так, похідні калікс[4]аренів, *p*-сульфонатокалікс[4]арени були вивчені на предмет цитотоксичності. Дослідження *in vivo* показали, що *p*-сульфонатокалікс[4]арен (рис. 1.5, 7) був нетоксичним при дозуванні до 100 мг/кг [5]. Ця ж сполука також не проявляла гемолітичних ефектів за концентрацій до 200 мМ та не індукувала активацію нейтрофілів при високих концентраціях [5, 18]. Інша група вчених вивчала цитотоксичність цієї ж сполуки в аналізах інгібування росту *in vitro* в клітинних лініях раку яєчників людини A2780 і A2780cis. Досліди показали, що *p*-сульфонатокалікс[4]арен (рис. 1.5, 7) не є цитотоксичним при концентраціях до 1,5 мМ [20].

Було показано, що низка *p*-фосфонових кислот калікс[4]аренів із алкільними групами різної довжини або гідроксильними групами практично не виявляла цитотоксичність у PC12 клітинах щурів при концентраціях до 1 мг/мл [22].

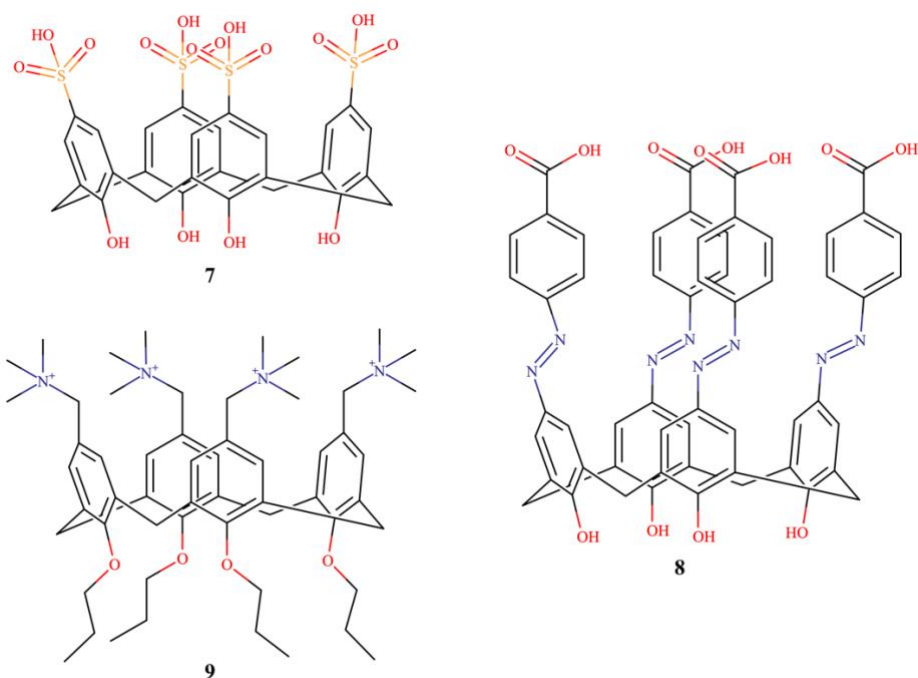


Рисунок 1.5 – Структурні формули похідних калікс[4]аренів, що використовувалися у досліді з визначення цитотоксичності

Карбоксил-модифікований азокалікс[4]арен (рис. 1.5, 8) мав незначну цитотоксичність у A549 клітинах за концентрації 50 мкМ [21]. Амфифільний тетраалкіламоній-модифікований калікс[4]арен (рис. 1.5, 9) не виявляв

цитотоксичність по відношенню до RAW 264.7 клітин макрофагів мишей при концентраціях до 200 мкМ. Цей калікс[4]арен не виявляв гемолітичної активності щодо червоних кров'яних клітин кроля за концентрацій до 100 мкМ [5]. Флуоресцентна проба, отримана на основі амінокалікс[4]арену, показала цитотоксичність на рівні натрій-фосфатного буферу проти клітин яєчників китайського хом'яка та HL-60 клітин [17].

Цитотоксичність, за деяких випадків, навпаки може бути корисною характеристикою хімічної сполуки, особливо коли вона використовується у протипухлинній терапії. Модифіковані калікс[4]арени можуть бути цитотоксичними, що дозволяє розглядати їх як потенційні сполуки для інгібування процесів росту пухлин та ангиогенезу [5]. Гуанідин-модифіковані тіакалікс[4]арени у конформації «1,3-альтернат» (рис. 1.6, 10, 11) були простестовані на клітинних лініях нирки мавпи, нирки сайгака та L-клітин миші ($IC_{50} \sim 1$ мкМ) [18].

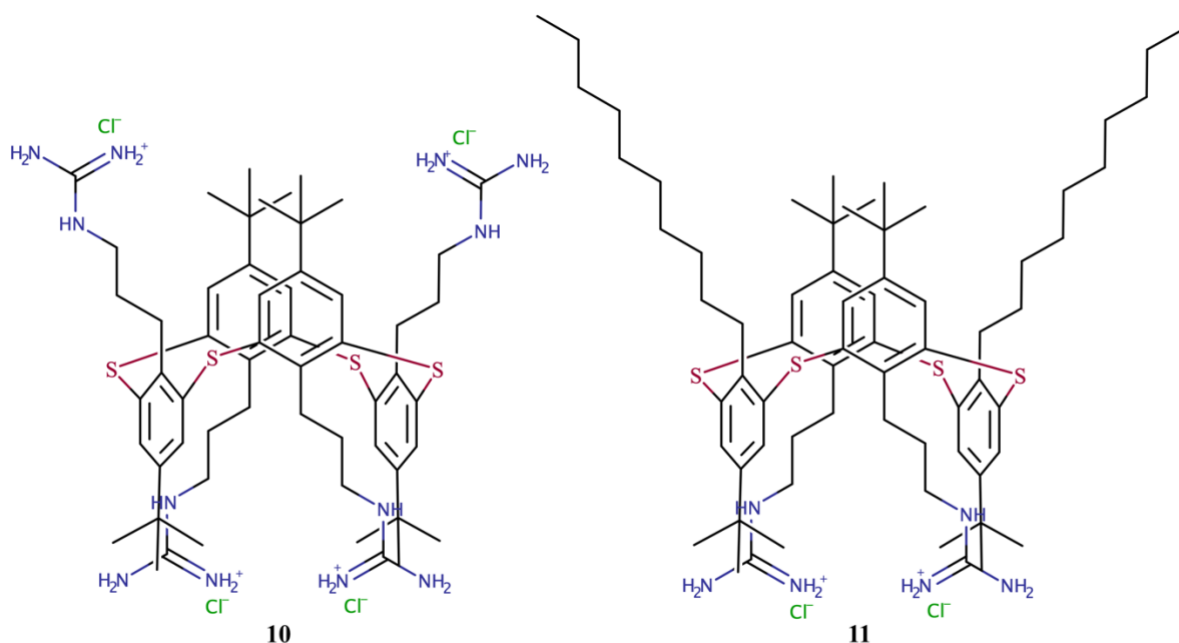


Рисунок 1.6 – Структурні формули гуанін-модифікованих тіакалікс[4]аренів

Похідні калікс[4]аренів були розроблені як проби для детекції специфічних іонів. Так, наприклад, було створено селективний флуоресцентний сенсор для іонів F^- шляхом модифікації калікс[4]арену на

нижньому вінці флуоресцентною міткою 4-нітробензофуразаном (рис. 1.7, 12). У досліджах проба не проявляла селективності щодо 16 інших іонів як у розчині, так і у живих клітинах. У тетрагідрофурані цей модифікований калікс[4]арен самозбирається у тривимірні листоподібні агрегати. При обробці іонами F^- ці агрегати набувають сферичної форми [19].

Інша група вчених розробила схему синтезу модифікованого калікс[4]арену з флуоресцентними властивостями для селективної детекції іонів Au^{3+} щодо ряду інших іонів (рис. 1.7, 13). При взаємодії проби з іонами Au^{3+} було показане зменшення флуоресцентного сигналу у 59 разів [20].

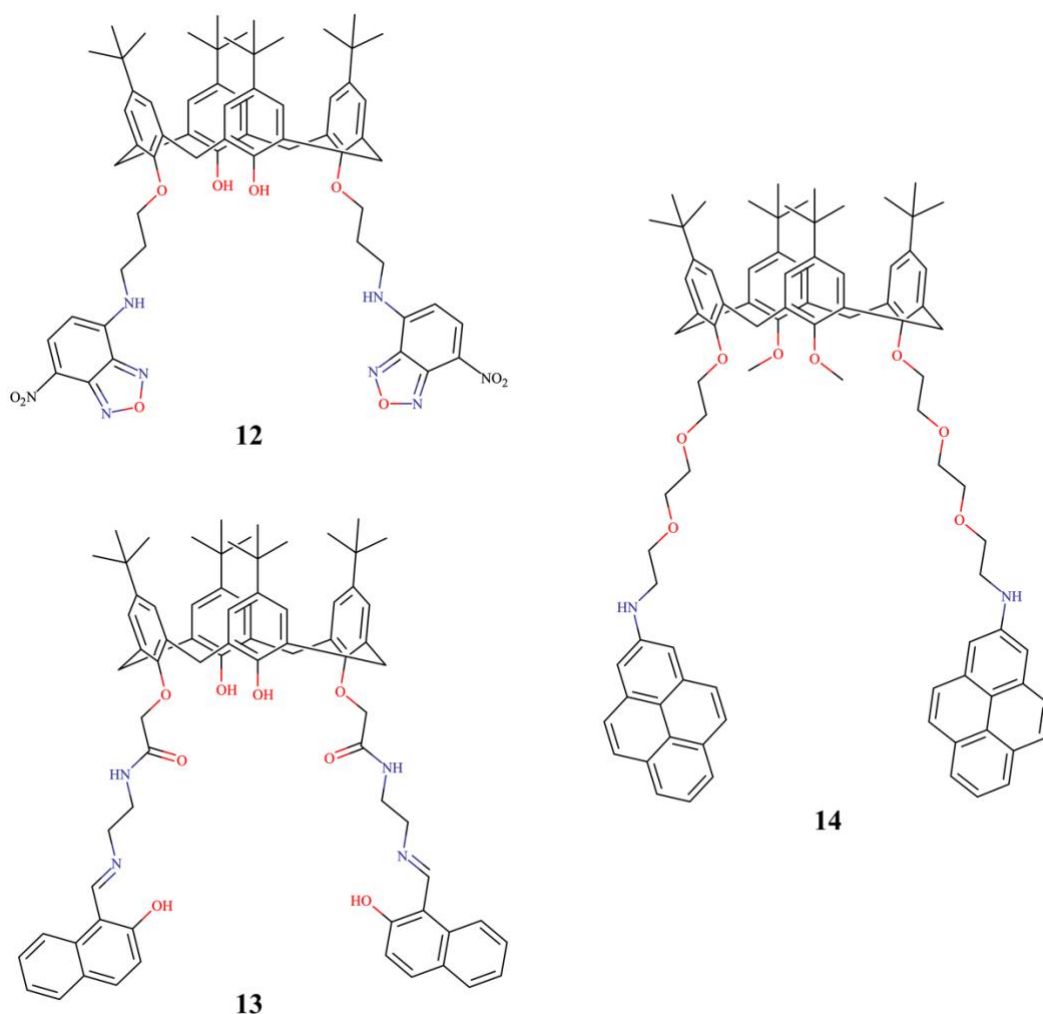


Рисунок 1.7 – Похідні калікс[4]аренів, які використовуються для детекції іонів та амінокислот

Похідні калікс[4]аренів також можуть використовуватися як системи для розпізнавання амінокислот. Так, отриманий флуороіонофор (рис. 1.7, 14)

реагував на наявність в розчині триптофану та гістидину. При додаванні до розчину триптофану спостерігали посилення флуоресцентної відповіді, тоді як при додаванні гістидину – гасіння флуоресценції [5].

Було встановлено, що калікс[4]арентетра-бісметиленбісфосфонова кислота С-192 (рис. 1.9) є специфічним інгібітором процесу полімеризації фібрину та зсідання крові. Такі дані стверджують про можливість синтезу таких похідних калікс[4]аренів для подальшого використання у якості антитромботичних препаратів [19].

Антивірусна активність калікс[4]аренів також була вивчена, зокрема, активність проти вірусу імунодефіциту людини. Модифіковані калікс[4]арени були синтезовані і протестовані на клітинних лініях МТ4 (штам HIV-1 ШВ), СЕМ-SS (штам HIV-1 LAI), РВМС (штам HIV-1 Val). Досліди показали, що макроцикли не виявляли цитотоксичності за концентрацій до 100 мкМ, а сполука з найвищою антивірусною активністю (рис. 1.8, 15) мала значення IC_{50} 1,6 мкМ, 2,2 мкМ, 1,5 мкМ щодо трьох протестованих штамів ВІЛ-1 [150А]. β -дикетопохідні калікс[4]аренів були показані як потенційні інгібітори інтегрази ВІЛ-1 зі значеннями IC_{50} 5,9-21,2 мкМ [5].

Модифіковані калікс[4]арени можуть проявляти антибактеріальну активність. Так, один із досліджуваних калікс[4]аренів (рис. 1.8, 16) проявив хорошу активність проти метицилін-резистентних штамів *Staphylococcus aureus* (МІК = 0,250 мкг/мл, 1,012 мкг/мл, 0,925 мкг/мл, 1,225 мкг/мл та 1,635 мкг/мл) [19].

Калікс[4]арени також були досліджені на предмет протипухлинної активності. Похідні калікс[4]аренів можуть бути потужними антиангіогенними агентами, які інгібують ріст пухлин, як, наприклад, сполука 0118 (рис. 1.8) [18]. Похідна сполуки 0118 (рис. 1.8, 17) виявляє у 4 рази ефективніше інгібування росту ендотеліальних клітин пупкової вени людини (HUVEC) та МА148 клітин карциноми яєчника, що свідчить про потенційне застосування такого калікс[4]арена у антиангіогенній таргетній терапії раку [18].

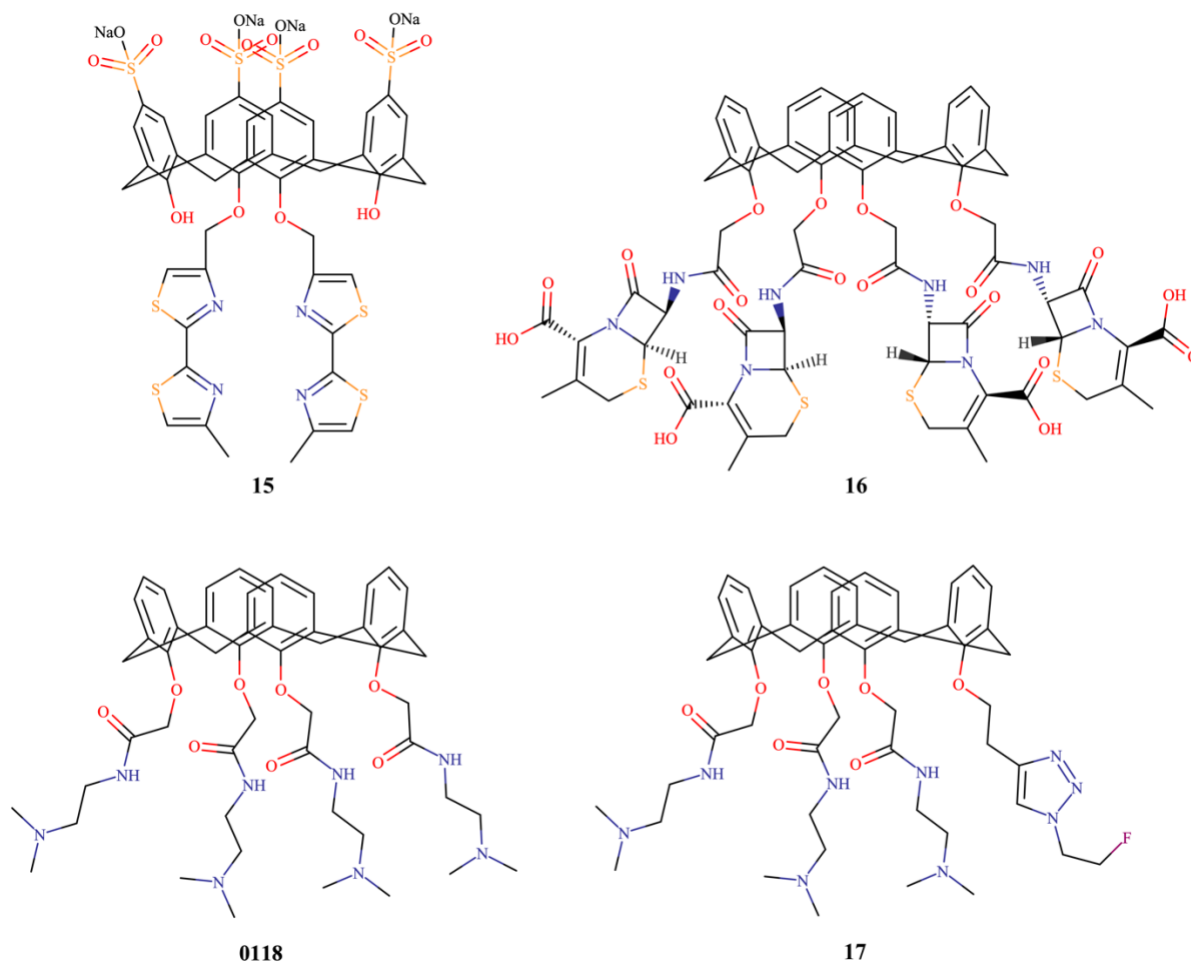


Рисунок 1.8 – Калікс[4]арени, що проявляють антивірусну, антибактеріальну та протипухлинну активність

Калікс[4]арени, функціоналізовані одним або двома фрагментами метиленбісфосфонової кислоти, мають інгібувальну дію щодо лужної фосфатази кишківника телят. Калікс[4]арен із двома фрагментами метиленбісфосфонової кислоти виявився ефективнішим інгібітором лужної фосфатази у порівнянні з калікс[4]ареном, що містив один фрагмент метиленбісфосфонової кислоти [22]. У той же час, калікс[4]арени із фрагментами метиленбісфосфонової та гідроксиметиленбісфосфонової кислот є специфічними інгібіторами тирозинової фосфатази людини 1В [22].

Калікс[4]арени С-97 (5-біс(дигідроксифосфорил)метил-26,28-дигідрокси-25,27-дипропоксикалікс[4]арен), С-99 (5,17-біс(дигідроксифосфонілметилол)-26,28-дигідрокси-25,27-

дипропоксикалікс[4]арен) та С-107 (5,17-ди(фосфоно-2-піридилметил)аміно-11,23-ди-трет-бутил-26,28-дигідрокси-25,27-дипропоксика-лікс[4]арен) (рис. 1.9) були показані як інгібітори ензиматичної активності Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани. Усі ці калікс[4]арени пригнічували активність Na^+, K^+ -АТРази дозозалежно [9]. Окрім того, калікс[4]арени С-97 та С-107 на 98-99% інгібували активність Na^+, K^+ -АТРази суспензії сперматозоїдів чоловіків.

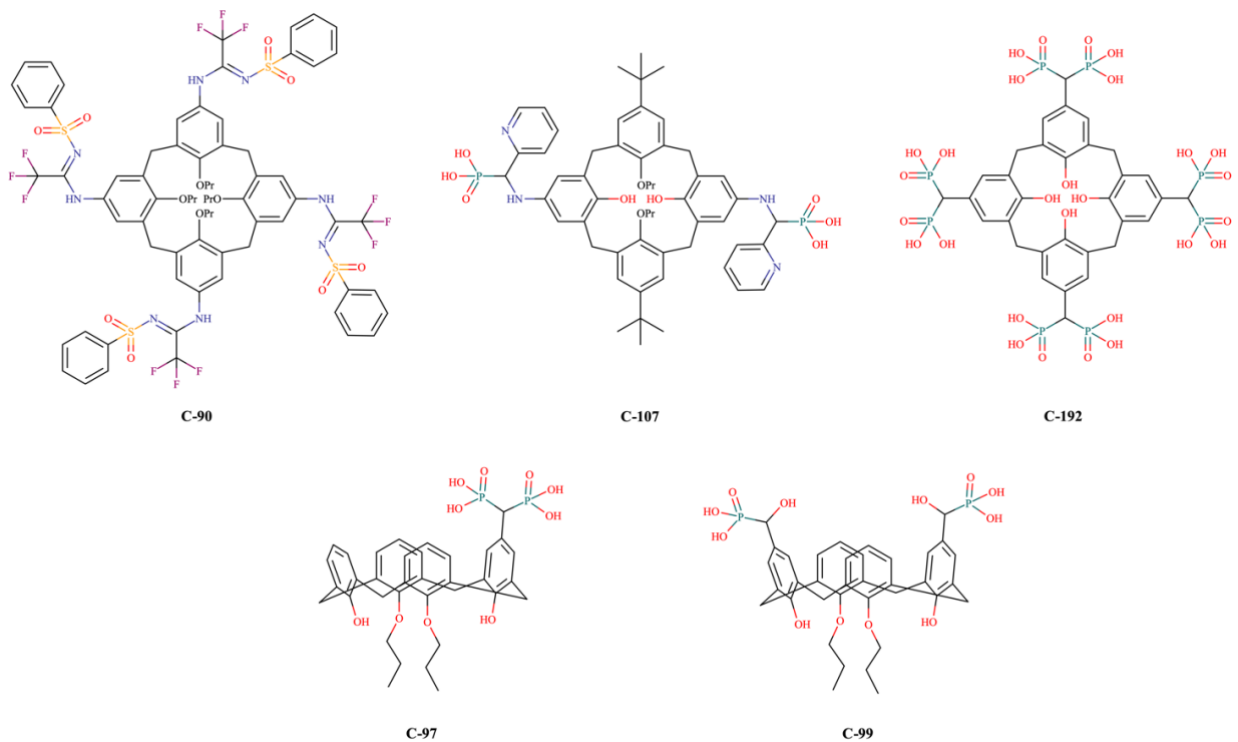


Рисунок 1.9 – Структурні формули калікс[4]аренів з дослідженими інгібувальними властивостями

Калікс[4]арен С-90 (5,11,17,23-тетра(трифторометил(фенілсульфоніл-іміно)-метиламіно)-25,26,27,28-тетрапропоксикалікс[4]арен) (рис. 1.9) збільшує концентрацію Ca^{2+} у незбуджених міоцитах міометрія. Разом з тим, було показано, що він є повним неконкурентним інгібітором $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани і також зменшує гідродинамічний діаметр міоцитів міометрія [8].

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

Калікс[4]арени є перспективними макроциклами для використання у різних галузях. Ці сполуки можуть слугувати сенсорами для детекції органічних та біомолекул, вони можуть підвищувати розчинність препаратів, які використовуються у таргетній терапії, утворювати супрамолекулярні комплекси тощо [11, 14-16, 18, 19].

Увагу дослідників останні два десятиліття також привертає визначення того, яким чином калікс[4]арени можуть впливати на процеси, що відбуваються на рівні органел клітин. Однією з таких органел є мітохондрія. Досліди показують, що калікс[4]арени можуть виступати ефективними модуляторами біоенергетичних та Ca^{2+} -транспортувальних процесів у мітохондріях [9, 10, 13, 24-26]. Так, наприклад, калікс[4]арени С-97 та С-99 (рис. 1.9) були показані як інгібітори Ca^{2+} уніпортера мітохондрій та стимулятори $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника. За концентрації 100 нМ С-97 та С-99 пригнічують енергозалежну акумуляцію Ca^{2+} ізольованими мітохондріями [9].

Калікс[4]арен С-956 (рис. 1.10) – ефективний інгібітор $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника та стимулятор мітохондрійної NO-синтази. Він ефективно пригнічує ΔpH -залежний вихід Ca^{2+} у фракції ізольованих мітохондрій. За рахунок цього виникає транзйентна поляризація ВММ. Крім того, даний калікс[4]арен продемонстрував гальмування окиснення NADH та FADH_2 в ЕТЛ [25, 26].

Калікс[4]арен С-91 (рис. 1.10) за концентрації 100 мкМ стимулює Mg^{2+} , АТФ-залежну акумуляцію іонів Ca^{2+} в мітохондріях міомерія [26].

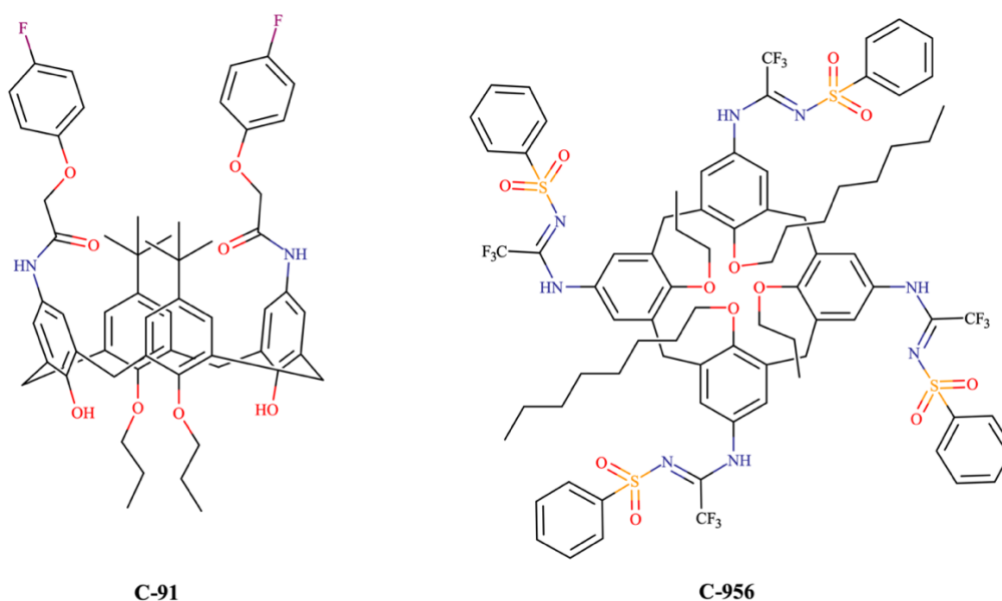


Рисунок 1.10 – Структурні формули калікс[4]аренів C-91 та C-956

Халконвмісні калікс[4]арени (калікс[4]аренхалконаміди) C-138 (рис. 1.11), C-137 (рис. 1.11), C-1023 (рис. 1.12) та C-1011 (рис. 1.12) змінюють поляризацію мітохондрійної мембрани та гальмують окиснення NADH та FADH₂ в ЕТЛ за концентрації 10 мкМ. Серед них, калікс[4]арени C-1023 та C-1011 збільшують утворення активних форм кисню в мітохондріях [27].

Це може свідчити про можливу інтенсифікацію окисних процесів та зниження інтенсивності окисного фосфорилування, опосередкованого активними формами кисню [27].

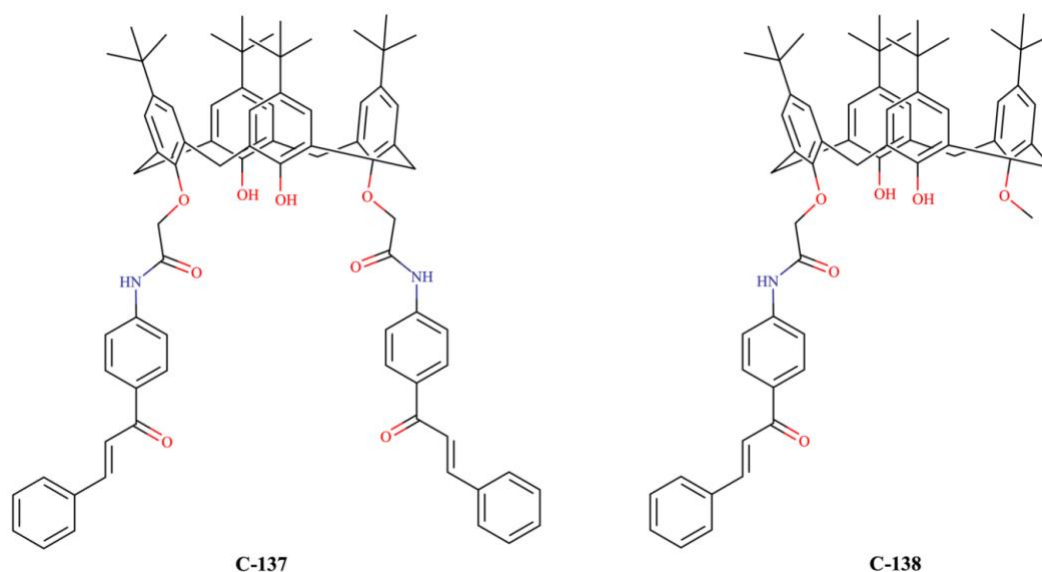


Рисунок 1.11 – Структурні формули халконвмісних калікс[4]аренів

Було показано, що калікс[4]аренхалконаміди C-1012, C-1021 та C-1023 (рис. 1.12) зменшують гідродинамічний діаметр мітохондрій, а макроцикл C-1011 збільшує гідродинамічний діаметр мітохондрій [28]. За відсутності АТФ у середовищі інкубації гідродинамічний діаметр мітохондрій збільшувався як за присутності C-1011, так і за присутності C-1012, що свідчить про наявний вплив складу середовища інкубації на значення гідродинамічного діаметру мітохондрій [29].

Калікс[4]аренхалконаміди C-1012, C-1021 та C-1024 підвищували рівень поляризації мітохондрійної мембрани [28].

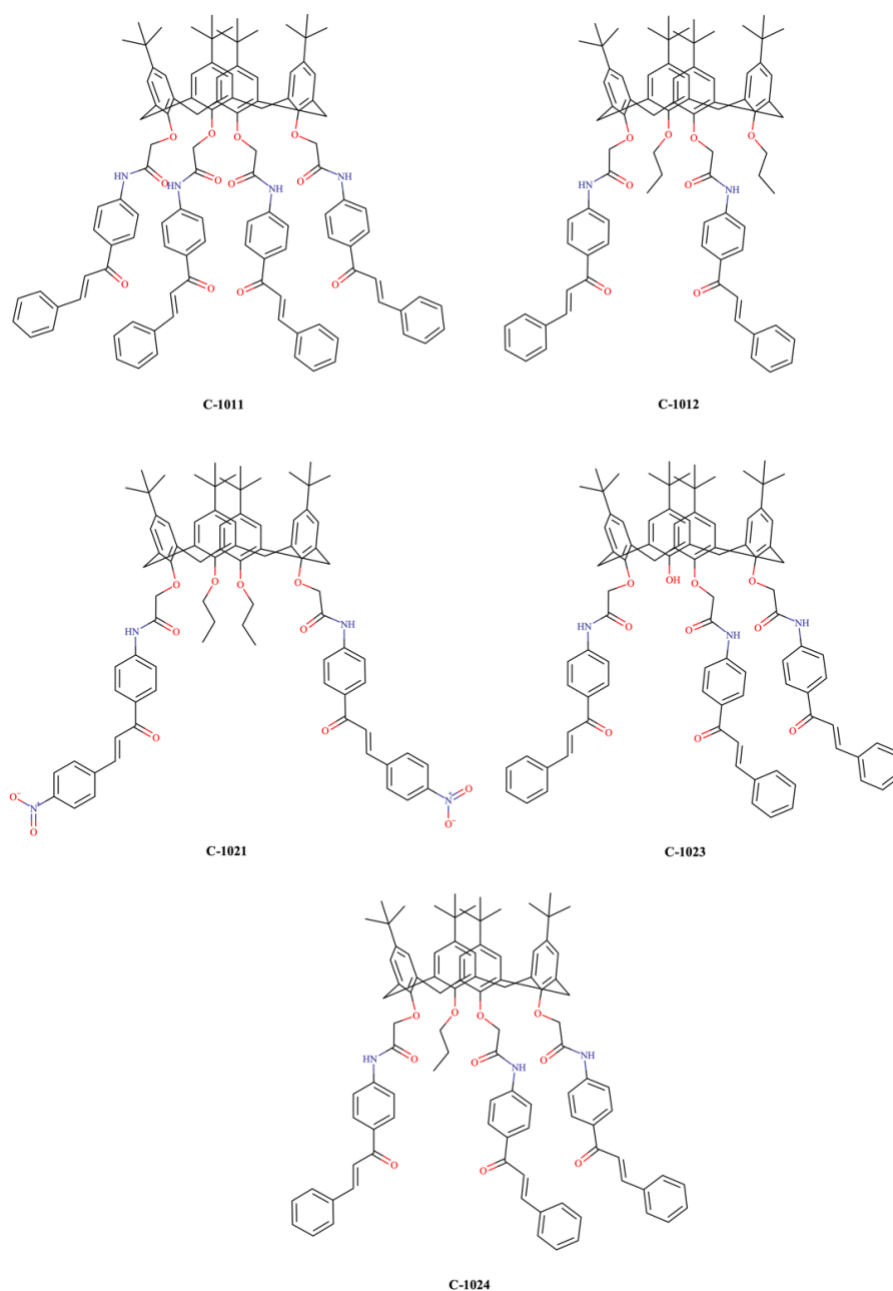


Рисунок 1.12 – Структурні формули калікс[4]аренхалконамідів.

Отже, супрамолекулярні макроцикли калікс[4]арени, які є малотоксичними та володіють широким спектром біологічної активності, є перспективними для використання їх як модуляторів Ca^{2+} -залежних біоенергетичних процесів в гладеньком'язових клітинах, зокрема, міометрія.

1.4. Структурно-функціональна організація мітохондрій

Мітохондрії – двомембранні напівавтономні органели, притаманні усім еукаріотичним клітинам [1, 24]. Досить поширеним, але неповним, є загальне уявлення про те, що мітохондрії – це «енергетичні станції клітини». Дослідження останніх десятиліть показали і довели, що, хоч мітохондрії і задіяні в процесах вироблення АТФ, але вони також є важливими для підтримання окисно-відновного потенціалу клітин та буферної ємності іонів в цитоплазмі клітин. Ці органели беруть участь у різноманітних сигнальних процесах, що відбуваються у клітинах, проліферації та диференціюванні клітин, імунній відповіді організму [24, 30-32].

Мітохондрії є органелами кількість і розміри яких в клітині можуть варіюватися залежно від функціональної активності клітини. Середній розмір мітохондрій – 0,5-1 мкм, але в гепатоцитах і фібробластах вони можуть сягати 3-4 мкм і більше в довжину та ~1 мкм в діаметрі [30, 32]. Одна еукаріотична клітина може містити в середньому від 1 до 1500 мітохондрій, але це також залежить від типу клітин і можливі суттєві відмінності.

Мітохондрії можуть бути сферичними (гепатоцити), паличкоподібними (міоцити гладеньких м'язів кровоносних судин), тубулярними (ендотеліоцити, відростки нейронів у білій речовині мозку), овоїдними (міоцити скелетних м'язів, гепатоцити) тощо [30, 31, 33].

Подвійна мембрана мітохондрій ділить їх на чотири добре виражених компартменти: зовнішню мембрану, міжмембранний простір, внутрішню мембрану та матрикс [1, 31, 34].

Зовнішня мітохондрійна мембрана (ЗММ) містить ряд поринів (наприклад, потенціалзалежні аніонні канали (VDAC)), які дозволяють здійснювати вільну дифузію молекул розміром до 5000 Да через мембрану в міжмембранний простір [30, 34].

Міжмембранний простір, у свою чергу, містить протеїни, які відіграють важливу роль в енергетичних процесах всередині мітохондрій та механізмах загибелі клітин. Міжмембранний простір мітохондрій містить 51 протеїн у *Saccharomyces cerevisiae* та 53 протеїни у людини, усі з яких заковані у ядерному геномі [35]. Ширина міжмембранного простору варіюється в середньому від 10 до 60 нм [30, 32, 35].

Внутрішня мітохондрійна мембрана (ВММ) є високопроникною із великою кількістю транспортних протеїнів для перенесення через неї різноманітних іонів та молекул. ВММ вигинається у матрикс, утворюючи кристи. Саме на кристах знаходиться більша частина комплексів дихального ланцюга мітохондрій та димерів АТФ синтази. Співвідношення протеїни:ліпіди у ВММ є не таким, як у більшості мембран, і становить близько 75:25. ВММ близько на 20% складається із фосфоліпиду кардіоліпіну, який характерний лише для неї і бере участь у процесах збірки та підтримання функціонування декількох інтегральних мембранних протеїнів [1, 30, 31].

Матрикс містить більшість ензимів, що каталізують реакції циклу трикарбонових кислот. Мітохондрії є напівавтономними органелами клітини через те, що вони мають свій геном, який кодує невелику частину генів, необхідних для їх функціонування. Мітохондрійна ДНК (мтДНК) ссавців, що знаходиться у матриксі, являє собою дволанцюгову кільцеву молекулу розміром ~16,6 тисяч пар основ. У клітинах ссавців мітохондрії містять від 100 до 10 000 копій мтДНК [1, 34, 36]. мтДНК кодує всього 37 генів, з яких 24 кодують РНК (2 рРНК – 12S і 16S, 22 тРНК), а 13 – поліпептиди електронно-транспортного, або дихального, ланцюга (ЕТЛ). Загальна кількість мітохондрійних протеїнів становить ~1000-1500. Це означає, що 99% мітохондрійних протеїнів заковані ядерним геномом і після синтезу в

цитозолі транспортуються всередину мітохондрій [8, 34, 36]. У матриксі також відбуваються реакції біосинтезу пуринових нуклеотидів, амінокислот, глюкози, гему, сечовини, жирних кислот та холестеролу [31, 37].

1.5. Дихальний ланцюг мітохондрій

Мітохондрії є мультифункціональними органелами еукаріотичних клітин. Попри усі досліджені на даний момент функції та можливості мітохондрій у клітині та організмі в цілому, основною їхньою функцією є продукування АТФ (аденозинтрифосфату) – органічної сполуки, яку називають енергетичною сполукою через наявність двох макроергічних (фосфорних ангідридних) зв'язків.

Саме тому вивченню енергетичної функції мітохондрій і досі приділяється багато уваги. Синтез АТФ здійснюється ензимом АТФ-синтазою. Варто зауважити, що цей процес спряжений із процесом перенесення електронів через ЕТЛ [1, 30-34, 38].

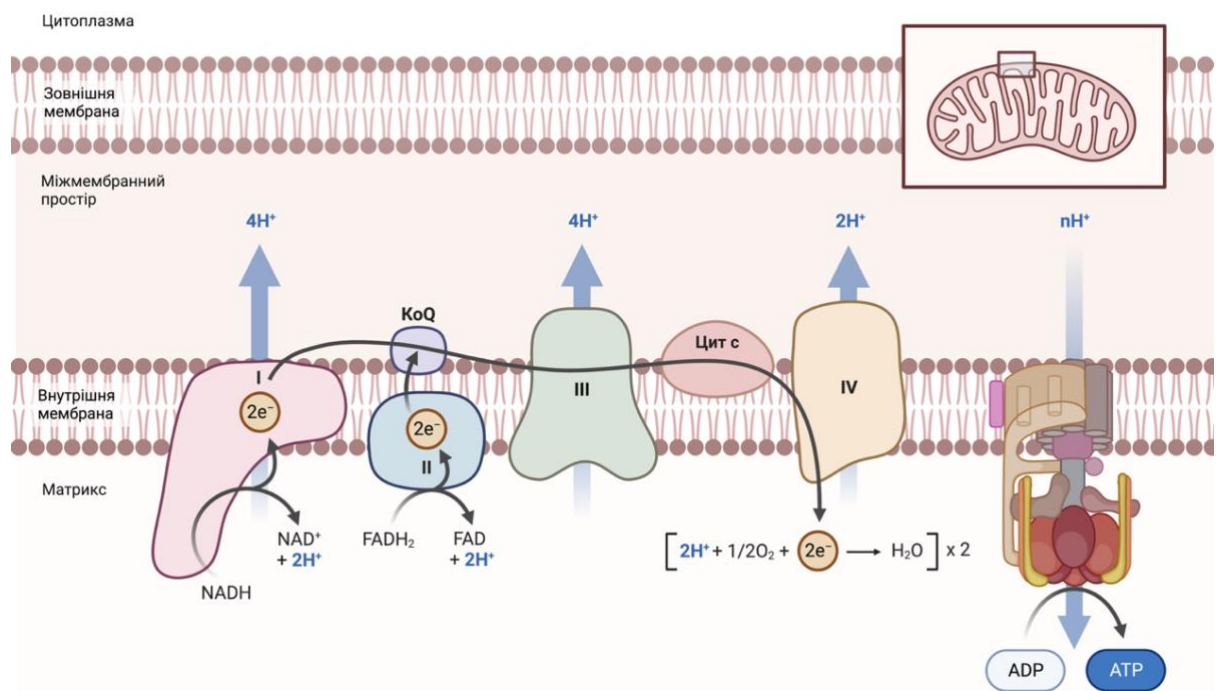


Рисунок 1.13 – Схема будови дихального (електронно-транспортного) ланцюга мітохондрії. Адаптовано з BioRender.com (2023)

ЕТЛ отримує електрони з NADH і $FADH_2$ та переносить їх через серію мультипротеїнових дихальних комплексів до молекулярного кисню, створюючи електрохімічний градієнт, який використовується АТФ-синтазою для синтезу АТФ (рис. 1.13) [30, 31, 38].

ЕТЛ знаходиться на кристах мітохондрій і складається з 4 мультипротеїнових комплексів (рис. 1.14). У літературі також інколи зустрічається твердження, що АТФ-синтаза – це V комплекс ЕТЛ. Окрім, ЕТЛ складають два переносники електронів – коензим Q, або убіхінон, (КоQ) та цитохром с. Убіхінон – це низькомолекулярний ліпід із довгим гідрофобним хвостом та полярною голівкою. Цитохром с є невеликим протеїном, що містить ковалентно приєднану гемову простетичну групу [2, 30, 38].

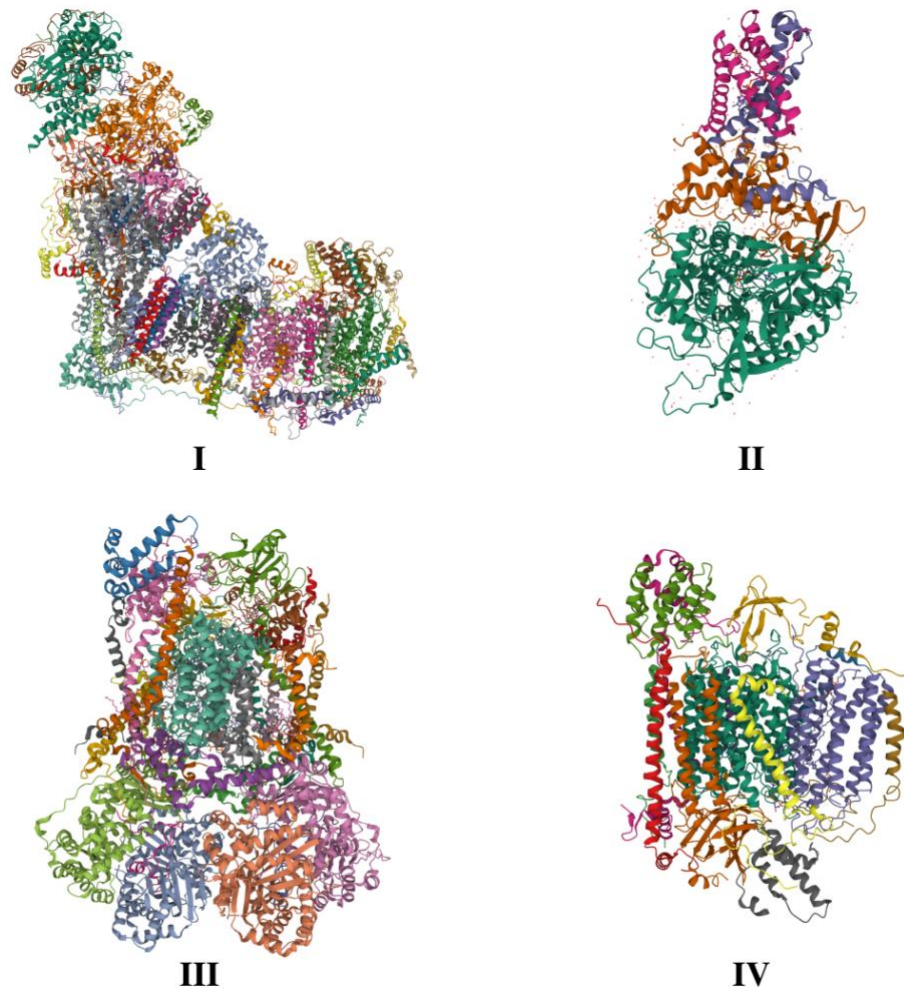
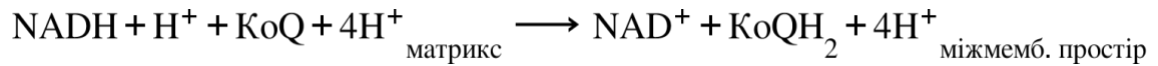


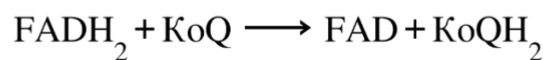
Рисунок 1.14 – Структури мультипротеїнових комплексів дихального ланцюга мітохондрій (I: PDB 5XTD, *Homo sapiens*; II: PDB 1ZOY, *Sus domesticus*; III: PDB 5XTE, *Homo sapiens*; IV: PDB 5Z62, *Homo sapiens*)

Комплекс I (NADH-убіхінон оксидоредуктаза)



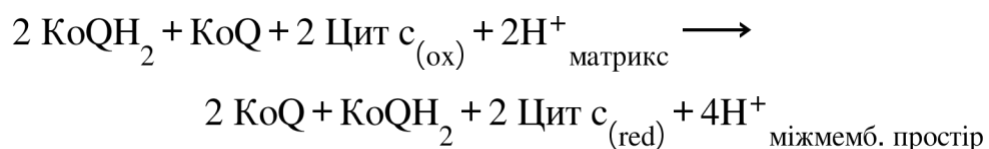
Комплекс I (рис. 1.14) передає електрони від NADH до убіхінону. Цей комплекс складається із 45 субодиниць загальною молекулярною вагою ~1000 кДа. Серед цих 45 субодиниць 7 кодуються мтДНК [1, 2]. Комплекс I ЕТЛ має L-подібну форму. Гідрофобна сторона комплексу занурена у ВММ, а гідрофільна сторона, що містить каталітичні центри, виступає в матрикс. Кофакторами, які задіяні у транспортуванні електронів у комплексі I, виступають флавінмононуклеотид (FMN) та вісім залізо-сірчаних (Fe-S) кластерів [1, 2, 39]. На два електрони у комплексі I чотири протони викачуються у міжмембранний простір мітохондрій.

Комплекс II (сукцинат-убіхінон оксидоредуктаза)



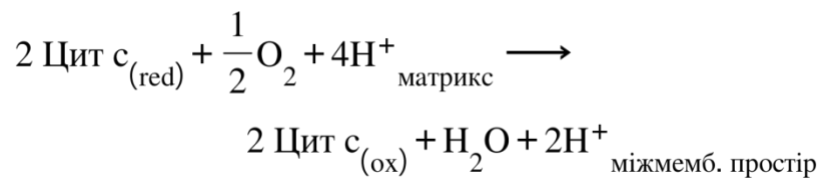
Комплекс II (рис. 1.14) ЕТЛ тісно пов'язаний із циклом трикарбонових кислот, реакції якого проходять у матриксі мітохондрій. Так, комплекс II передає електрони від сукцинату (проміжної сполуки циклу трикарбонових кислот, ЦТК) до убіхінону. Сукцинат-убіхінон оксидоредуктаза складається з 4 субодиниць, жодна з яких не кодується мтДНК, загальною молекулярною вагою ~140 кДа [1, 2, 38]. Комплекс II містить такі простетичні групи як флавінаденіндинуклеотид (FAD), гем В та три Fe-S кластери. Сукцинат-убіхінон оксидоредуктаза не вивільняє протони при транспорті електронів і не бере участі у генерації електрохімічного градієнту через ВММ [39].

Комплекс III (убіхінон-цитохром c оксидоредуктаза)



Комплекс III (рис. 1.14) переносить електрони від CoQH_2 до цитохрому c. Цей комплекс існує як симетричний димер. Кожен з мономерів складається з 11 субодиниць, одна з яких кодується мтДНК, молекулярною вагою ~ 245 кДа [2, 31, 38]. У якості простетичних груп комплекс III містить два геми B, один гем C та Fe-S кластер. При транспорті двох електронів убіхінон-цитохром c оксидоредуктаза викачує 4 протони у міжмембранний простір [1, 2].

Комплекс IV (цитохром c оксидаза)



Комплекс IV (рис. 1.14) переносить електрони від цитохрому c до молекулярного кисню, який відновлюється і утворює воду. Цитохром c оксидаза складається з 14 субодиниць, 3 з яких кодуються мтДНК, загальною молекулярною вагою ~ 217 кДа. Кодовані мтДНК протеїни COX1, COX2 і COX3 формують каталітичний кор ензиму [38, 39]. Як простетичні групи комплекс IV містить іони купруму та два геми A, які містяться лише у цитохром c оксидазі. Внаслідок перенесення електронів 2 протони викачується в міжмембранний простір мітохондрій [2, 39].

1.6. Мітохондрійна генерація активних форм кисню

Активні форми кисню (АФК) – це група малих молекул, яка включає вільні радикали та нерадикальні молекули [40, 41]. Серед вільних радикалів розрізняють супероксид аніон-радикал ($\bullet\text{O}_2^-$), гідроксил-радикал ($\bullet\text{OH}$), гідропероксил-радикал ($\bullet\text{OH}_2$), пероксид ($\bullet\text{O}_2^{-2}$), пероксил-радикал ($\text{RO}_2\bullet$), алкоксил-радикал ($\text{RO}\bullet$). До нерадикальних АФК відносять пероксид водню (H_2O_2), синглетний кисень ($^1\text{O}_2$), гіпохлорит аніон (ClO^-), озон (O_3) та пероксинітрит аніон (ONOO^-) [40, 42].

У клітині АФК утворюються в цитоплазмі, мітохондріях, клітинній мембрані, пероксисомах, ендоплазматичному ретикулумі [43]. На мітохондрії припадає близько 90% продукування АФК у клітині [44].

АФК є шкідливими для організму, але останні десятиліття все більше досліджень показують, що за малих концентрацій вони можуть бути регуляторними молекулами, які беруть участь у сигнальних процесах як в мітохондріях, так і поза ними [2, 42]. До фізіологічних процесів, в яких задіяні АФК, відносять проліферацію, клітинну диференціацію, автофагію, активацію імунної відповіді та механізми старіння [42-44].

Шкідливість АФК виявляється в тому, що вони асоційовані з такими патологіями та хворобами, як атеросклероз [44, 45], гіпертензія [46], кардіоміопатія [47], рак [48, 49], діабет [50, 51], хвороба Альцгеймера [51, 52], хвороба Паркінсона [53, 54], шизофренія [55], ВІЛ-1 інфекція [56], неалкогольна жирова хвороба печінки [57] тощо.

У комплексі I ЕТЛ АФК можуть генеруватися в місцях знаходження ФМН та сайту зв'язування убіхінону. Окрім, АФК утворюються в комплексі I завдяки процесу зворотного транспорту електронів від CoQH_2 до NAD^+ . Цей комплекс сприяє утворенню АФК у мітохондрійному матриксі [44].

Комплекс II є менш ефективним в утворенні АФК у порівнянні з комплексами I та III ЕТЛ. АФК, у тому числі, супероксид аніон-радикал, утворюються в місці, де FAD зв'язується з активним центром ензиму. АФК далі вивільняються у матрикс мітохондрій через розташування флавопротеїну на ВММ зі сторони матриксу [43].

Комплекс III містить внутрішній та зовнішній пули убіхінону, які орієнтовані в матрикс та міжмембранний простір відповідно. Супероксид аніон-радикал генерується в комплексі III внаслідок автоокиснення убісеміхінону, проміжної сполуки CoQ циклу. Убісеміхінон є прямим донором електронів, здатним відновлювати O_2 до $\bullet\text{O}_2^-$ [2, 44].

Іншими мітохондрійними джерелами АФК є піруват дегідрогеназа, 2-оксоглутарат дегідрогеназа, проліндегідрогеназа та дигідрооротат дегідрогеназа [40, 41].

1.7. Транспорт іонів Ca^{2+} в мітохондріях

Іони Ca^{2+} відіграють важливу роль у підтриманні різноманітних функціональних процесів у клітині. Ca^{2+} є важливим внутрішньоклітинним месенджером, що відповідає за процеси секреції, проліферації, транскрипції, навчання і пам'яті тощо [58, 59]. Накопичення Ca^{2+} у мітохондріях модулює процеси синтезу АТФ, впливає на динаміку вмісту цитозольного Ca^{2+} , індукуює процеси клітинної загибелі [59, 60].

Транспорт іонів Ca^{2+} у мітохондріях здійснюється через ЗММ і ВММ (рис. 1.15). Різноманітні протеїни, що знаходяться на цих мембранах, регулюють вхід і вихід іонів Ca^{2+} .

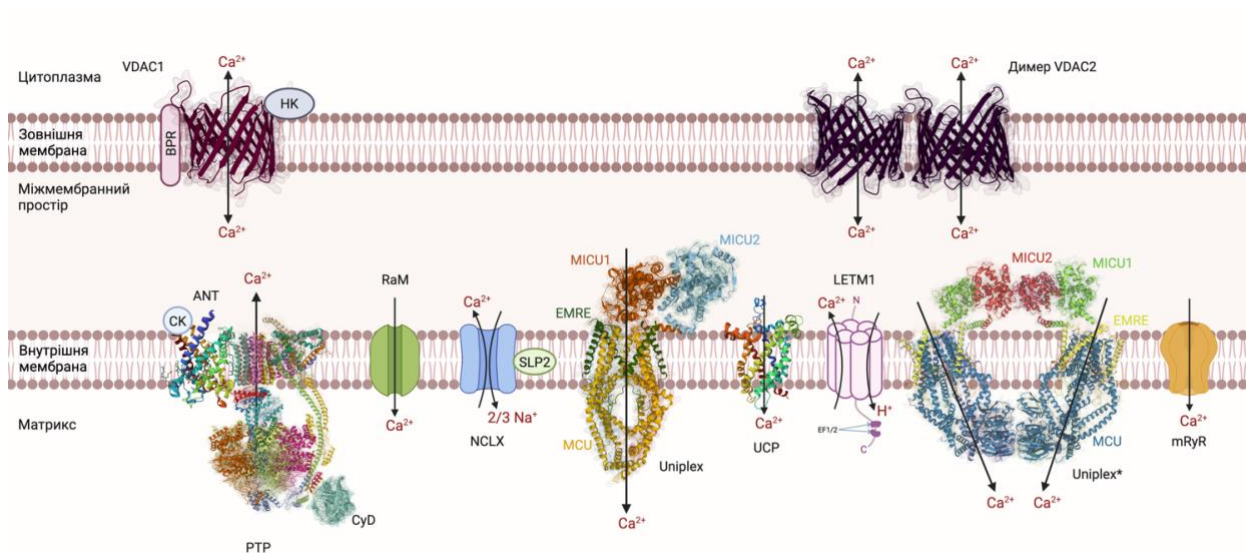


Рисунок 1.15 – Схема транспорту іонів Ca^{2+} в мітохондрії (створено на основі [50, 54, 55] із використанням баз RCSB PDB та UniProtKB)

(VDAC1 – PDB 2JK4; VDAC2 – PDB 4BUM; PTP – мітохондрійна пора перехідної проникності, димер АТФ-синтази: PDB 7AJB; Uniplex* – мультипротеїновий димерний комплекс Ca^{2+} уніпортера (PDB 6K7Y; MCU – блакитний, EMRE – лимонний, MICU1 –

салатовий, MICU2 – червоний); Uniplex – мультипротеїновий комплекс Ca^{2+} уніпортера (PDB 6WDN; MCU – жовтий, EMRE – зелений, MICU1 – оранжевий, MICU2 – світло-блакитний); CyD – циклофілін D: PDB 3QYU; LETM1 – показана одна із запропонованих мембранних топологій; MICS1 – UniProtKB Q9H3K2; RaM – система швидкого кальцієвого входу (rapid mode uptake); mRyR – мітохондрійний ріанодиновий рецептор; СК – креатинкіназа; ANT – транслокатор аденінових нуклеотидів; НК – гексокіназа; BPR – бензодіазепіновий рецептор; UCP – роз’єднувальні протеїни; SLP2 – стоматинподібний протеїн 2). Створено у BioRender.com (2023)

ЗММ є проникною для молекул до 5000 Да. Дифузія іонів Ca^{2+} через ЗММ є можливою завдяки наявності VDAC. Ці канали забезпечують вільне проникнення Ca^{2+} з цитозолу в міжмембранний простір мітохондрій [3]. Існує три ізоформи VDAC: VDAC1, VDAC2, VDAC3. Усі вони повсюдно експресовані в клітинах, але специфічне співвідношення між ними визначається типом досліджуваної тканини [61].

ВММ не має такої проникності, як ЗММ, і через це вона має більше спеціалізованих транспортних протеїнів, які забезпечують транспорт іонів з міжмембранного простору в матрикс і навпаки [61, 62].

Одним із каналів, через який іони Ca^{2+} проникають у мітохондрійний матрикс, є мітохондрійний Ca^{2+} уніпортер. Дослідження цього уніпортера показали, що він є мультипротеїновим комплексом, будова якого може дещо відрізнятися від наукової праці до наукової праці [63].

Основним пороутворювальним елементом комплексу є протеїн MCU. Він формує олігомери на ВММ і взаємодіє з іншими регуляторними протеїнами комплексу. MCU має масу 40 кДа і складається з двох доменів «coiled-coil» та двох трансмембранних доменів, з’єднаних між собою короткою петлею, що розташована в напрямку міжмембранного простору [58, 63]. На дріжджових модельних системах показано, що фосфоліпід кардіоліпін, специфічний для ВММ, відіграє важливу роль у підтриманні стабільності та активності MCU. Відсутність кардіоліпіну призводила до пониження експресії MCU та гіршого проникнення іонів Ca^{2+} через уніпортер [64].

Ca^{2+} уніпортер містить у своєму складі також низку регуляторних протеїнів. Одними із таких є протеїни MICU. Протеїни MICU масою ~45-55 кДа розташовані у міжмембранному просторі і структурно містять «EF-hand» мотиви, відповідальні за зв'язування з іонами Ca^{2+} [62]. MICU1 – регуляторний протеїн, який, як вважають, відповідальний за контроль накопичення іонів Ca^{2+} уніпортером [61]. MICU2 і MICU3 – паралоги MICU1. MICU2 широко експресований у вісцеральних органах, а MICU3 – в нервових тканинах. MICU1 та MICU2 формують гетеродимери, які пов'язані з MCU через MICU1, та відповідають за активність MCU. У гетеродимерах субодиниці з'єднані між собою дисульфідним зв'язком. MICU1 активує MCU за високих концентрацій іонів Ca^{2+} у цитозолі, у той час як MICU2 інгібує діяльність MCU, коли концентрація Ca^{2+} є низькою. MICU1 формує гетеродимери і з MICU2, і з MICU3, а MICU3 – лише з MICU1 [65, 66].

Ще однією субодиницею Ca^{2+} уніпортера є протеїн EMRE масою 10 кДа. Він містить один трансмембранний домен та один С-термінальний домен, багатий на залишки аспартату. N-кінець EMRE знаходиться у матриці і виступає сенсором матричного Ca^{2+} . EMRE – необхідна субодиниця для підтримання взаємодії MICU1 з MCU. EMRE взаємодіє з MICU1 своїм С-кінцем, а з MCU – N-кінцем (завдяки мотиву GXXXG), формуючи водневі зв'язки [61, 67].

MCUR1 – мембранний протеїн масою ~35 кДа, який є важливим для збірки комплексу Ca^{2+} уніпортера і регулює концентрацію Ca^{2+} , необхідну для індукції мітохондрійної пори перехідної проникності. Він складається з двох трансмембранних доменів. N- та С-кінці MCUR1 локалізовані в міжмембранному просторі [62].

Альтернативним способом транспорту іонів Ca^{2+} через ВММ є мітохондрійний ріанодиновий рецептор (mRyR). mRyR демонструє високу провідність та низьку селективність щодо іонів Ca^{2+} . Ефективний транспорт Ca^{2+} через mRyR відбувається за концентрацій 10-40 мкмоль/л [59].

Швидкий мітохондрійний кальцієвий вхід (RaM) – ще один шлях транспорту іонів Ca^{2+} через ВММ, який є у 1000 разів швидшим за MCU. Через специфіку перенесення іонів Ca^{2+} , RaM функціонує протягом короткого періоду часу. Особливості будови чи функціонування RaM досі залишаються невідомими [59, 68].

Як транспортування Ca^{2+} в мітохондрію, важливим є і транспорт Ca^{2+} з мітохондрійного матриксу в міжмембранний простір і в цитозоль. Одним із трансмембранних протеїнів, які виконують цю функцію, є $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{Li}^+$ обмінник (NCLX). Цей обмінник масою 60 кДа каталізує $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ та $\text{Li}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмін через ВММ. Він складається з двох трансмембранних доменів $\alpha 1$ та $\alpha 2$, які містять сайти зв'язування та обміну іонів [61, 62, 67]. Стехіометрія перенесення іонів в NCLX є питанням, думки щодо якого розходяться серед дослідників. Одні вважають, що здійснюється обмін 1 іона Ca^{2+} на 3 іони Na^+ , інші ж дотримуються думки про перенесення 1 іона Ca^{2+} та 2 іонів Na^+ [61, 67].

Окрім Na^+ -залежного способу виходу іонів Ca^{2+} з мітохондрій, давно відомо про наявність Na^+ -незалежного виходу Ca^{2+} . Однак, дискусія щодо посередників такого виходу іонів та їх функціональних особливостей до цих пір залишається відкритою.

LETM1 (Leucine zipper EF hand-containing transmembrane protein 1) – протеїн, який на думку деяких, бере участь у виході Ca^{2+} з мітохондрій. Він являє собою протеїн масою 83,4 кДа із коротким гідрофобним N-кінцем, шістьма трансмембранними доменами, доменом «leucine zipper», двома «EF-hand» мотивами, двома-чотирма доменами «coiled-coil» та C-кінцем, що знаходиться у матриксі. Внаслідок ряду проведених експериментів було висунуто думку, що LETM1 є $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ антипортером у мітохондріях [69]. У досліджах на клітинній лінії НЕК293 також було продемонстровано, що за низьких концентрацій мітохондрійного Ca^{2+} LETM1 може опосередковувати вхід іонів Ca^{2+} в мітохондрійний матрикс. За фізіологічних умов запропоновано два варіанти стехіометрії для виходу Ca^{2+} з мітохондрії: $2\text{H}^+:1\text{Ca}^{2+}$ та $3\text{H}^+:1\text{Ca}^{2+}$ та стехіометрію $1\text{H}^+:1\text{Ca}^{2+}$ для входу іонів Ca^{2+} в

матрикс [61]. Дані електронної мікроскопії припускають, що LETM1 формує гексамерний рН-чутливий конформер, що може функціонувати як обмінник [68, 69].

Нещодавно були проведені дослідження, які показали, що Na^+ -незалежний вихід Ca^{2+} потребує наявності мітохондрійного протеїну MICS1 (Morphology and cristae structure 1), а не LETM1 [70, 71]. Тому, необхідні подальші дослідження для встановлення протеїнів, необхідних для такого способу виходу Ca^{2+} з мітохондрій.

Ще одним механізмом вивільнення іонів Ca^{2+} з мітохондрій є мітохондрійна пора перехідної проникності (mPTP). Вона активується за патофізіологічних умов, коли в мітохондрії накопичується надмірна кількість іонів Ca^{2+} протягом тривалого періоду. mPTP знаходиться на ВММ і, коли активована, дозволяє проникати через неї молекулам масою до 1500 Да [3]. Було висунуто припущення щодо наявності супрамолекулярного комплексу, який складається з VDAC, циклофіліну D (CypD), транслокатору аденінових нуклеотидів (ANT) та інших протеїнів, і який опосередковує вихід іонів Ca^{2+} з мітохондрій. Інші дослідники припустили, що mPTP може бути структурно пов'язана з димерами АТФ-синтази, які формують пору каналу, або взагалі функціонувати без допомоги інших протеїнів [3, 59, 60, 68].

РОЗДІЛ II

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Для досліджень використовувалися статевозрілі невагітні нелінійні білі щури віком 2 місяці. Середня маса тіла щурів сягала 200 г, а маса матки – 300-600 мг. Наркоз тварин викликали шляхом витримування у камері, збагаченій парами хлороформу, після чого їх декапітували.

При роботі з лабораторними тваринами було дотримано всіх вимог, зазначених у Законі України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» та Європейській конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986).

2.1. Виділення фракції мітохондрій міометрія

Виділення фракції мітохондрій з клітин міометрія проводили згідно з процедурою, описаною раніше [72].

Після видалення матки її очищали від залишків жирової та сполучної тканин і вміщували препарат у 0,9% розчин NaCl. Усі подальші маніпуляції з препаратом матки проводилися на льоду. Препарат подрібнювали ножицями на шматочки розміром приблизно 2x2 мм і переносили у буфер виділення у співвідношенні 1 : 9 при температурі 4°C наступного складу: 10 мМ HEPES (pH = 7,4), 250 мМ цукроза, 1 мМ EGTA, 1 мг/мл бичачого сироваткового альбуміну (БСА).

Тканину міометрія гомогенізували за допомогою гомогенізатору Heidolph SilentCrusher M (Heidolph Instruments, Німеччина) тричі по 20 секунд із охолодженням на льоду протягом 1 хв після кожного циклу гомогенізації.

Отриманий гомогенат переносили у центрифужну пробірку і центрифугували протягом 15 хвилин при 1000 g та температурі 4°C. По

завершенню циклу, відбирали супернатант та центрифугували протягом 15 хвилин при 12000 g та температурі 4°C. Отриманий осад ресуспендували у буфері виділення. Після цього знову центрифугували протягом 15 хвилин при 12000 g та температурі 4°C.

Одержану фракцію ізольованих мітохондрій ресуспендували у робочому буфері складу: 10 мМ HEPES (pH = 7,4), 250 мМ цукроза, 1 мг/мл БСА у співвідношенні 100 мг тканини : 100 мл буфера. Фракцію ізольованих мітохондрій впродовж експерименту зберігали на льоду.

Вміст протеїну у фракції мітохондрій визначали стандартним методом М. Bradford за його реакцією з реактивом Coomassie Brilliant Blue G-250 [73]. Середнє значення вмісту протеїну складало 2 мг/мл.

2.2. Реєстрація флуоресценції NADH та FAD в мітохондріях

Для реєстрації флуоресценції NADH та FAD в мітохондріях використовували спектрофлуориметр РТІ QuantaMaster™ 40 (Photon Technology International, Канада), що обладнаний ксеноновою лампою, із програмним забезпеченням FelixGX 4.1.0.3096. Флуоресцентний сигнал від NADH реєстрували при $\lambda_{зб} = 350$ нм, $\lambda_{фл} = 450$ нм, FAD – $\lambda_{зб} = 450$ нм, $\lambda_{фл} = 533$ нм.

Дослідження проводили в середовищі наступного складу: 20 мМ HEPES (pH = 7,4, 37°C), 2 мМ K⁺-фосфатний буфер (pH = 7,4, 37°C), 125 мМ KCl, 25 мМ NaCl, 5 мМ піруват натрію, 5 мМ сукцинат натрію. Аліквота (100 мкл) фракції мітохондрій міометрія містила 100 мкг білку.

Відносні одиниці флуоресценції NADH/ FAD розраховували як відношення $\frac{F - F_0}{F_0}$, де F_0 – початковий флуоресцентний сигнал, F – флуоресцентний сигнал за відповідний проміжок часу.

2.3. Дослідження утворення активних форм кисню в мітохондріях з використанням флуоресцентного зонду DCF-DA

DCF-DA ($C_{24}H_{16}Cl_2O_7$, 2',7'-дихлорофлуоресцеїн діацетат) – зонд, що є специфічним до АФК. DCF-DA – це проникний через мембрану зонд, який після проходження через мембрану підлягає деестерифікації ендogenous естеразами.

Навантаження мітохондрій АФК-чутливим флуоресцентним зондом DCF-DA у концентрації 25 мкМ проводили в середовищі наступного складу: 10 мМ HEPES (рН = 7,4, $t = 25^{\circ}C$), 250 мМ цукроза, 0,1% БСА протягом 30 хвилин при температурі $25^{\circ}C$. Для покращення процесу навантаження барвник змішували із Pluronic[®] F-127 (0,02%).

Утворення активних форм кисню в ізольованих мітохондріях вивчали із використанням методу протокової цитофлуориметрії на протоковому цитометрі COULTER EPICS XL[™] (Beckman Coulter, США), що обладнаний аргонним лазером ($\lambda_{зб} = 488$ нм) із використанням програмного забезпечення SYSTEM II[™] (Beckman Coulter, США).

Використовували робочий протокол аналізу зразків для характеристики фракції ізольованих мітохондрій міометрія за флуоресценцією зонду DCF-DA ($\lambda_{зб} = 488$ нм, $\lambda_{фл} = 515$ нм (канал F11)). Події для аналізу обирались шляхом введення логічного обмеження за параметрами бічного та прямого світлорозсіювання (SS та FS) в протокол протокового цитофлуориметру. Аналіз проб припинявся за умови реєстрації 10000 подій в межах виділеної області.

Середовище інкубації, що використовувалося в дослідах, мало наступний склад: 20 мМ HEPES (рН = 7,4, $25^{\circ}C$), 2 мМ K^+ -фосфатний буфер (рН = 7,4, $25^{\circ}C$), 25 мМ KCl, 25 мМ NaCl, 5 мМ піруват натрію, 5 мМ сукцинат натрію.

Вміст протеїну в мітохондрійній фракції складав 15-20 мкг. Реакцію ініціювали внесенням аліквоти 20 мкл 5 мМ пірувату та 5 мМ сукцинату.

2.4. Дослідження біосинтезу оксиду азоту в ізольованих мітохондріях міометрія з використанням флуоресцентного зонду DAF-FM

DAF-FM DA ($C_{25}H_{18}F_2N_2O_7$, 4-аміно-5-метиламіно-2',7'-дифлуорофлуоресцеїн діацетат) — це зонд, який широко використовується для виявлення та кількісного визначення рівнів оксиду азоту (NO) у біологічних системах. DAF-FM, подібно до DCF-DA, має мембранно-проникні властивості, що дозволяє йому легко проходити через клітинні мембрани. Потрапляючи всередину клітини, ендогенні естерази каталізують деацетилювання DAF-FM, що призводить до утворення нефлуоресцентного діацетату DAF-FM. Ця реакція дозволяє DAF-FM спеціально націлюватися та реагувати з NO, у результаті чого утворюється високофлуоресцентна сполука, відома як триазол DAF-FM. Флуоресценція, яку випромінює триазол DAF-FM, пропорційна кількості присутнього NO, забезпечуючи чутливий і надійний засіб візуалізації та кількісного визначення рівнів NO у біологічних зразках.

Утворення активних форм кисню в ізольованих мітохондріях вивчали із використанням методу протокової цитофлуориметрії на протоковому цитометрі COULTER EPICS XL™ (Beckman Coulter, США), що обладнаний аргонним лазером ($\lambda_{зб} = 488$ нм) із використанням програмного забезпечення SYSTEM II™ (Beckman Coulter, США).

Використовували робочий протокол аналізу зразків для характеристики фракції ізольованих мітохондрій міометрія за флуоресценцією зонду DAF-FM ($\lambda_{зб} = 488$ нм, $\lambda_{фл} = 515$ нм (канал F11)). Події для аналізу обирались шляхом введення логічного обмеження за параметрами бічного та прямого світлорозсіювання (SS та FS) в протокол протокового цитофлуориметру. Аналіз проб припинявся за умови реєстрації 10000 подій в межах виділеної області.

Внесення NO-чутливого флуоресцентного зонду DAF-FM у концентрації 0,5 мкМ проводили безпосередньо в середовище інкубації наступного складу: 20 мМ HEPES (pH = 7,4, t = 25°C), 2 мМ K⁺-фосфатний

буфер (pH = 7,4, t = 25°C), 120 mM KCl, 5 mM піруват натрію, 5 mM сукцинат натрію, 0,05 mM L-аргінін, 0,1 mM Ca²⁺, 0,01 mM NADPH, 0,01 mM BH₄.

«Нульовою точкою» приймали одиниці флуоресценції DAF-FM+MX. Реакцію ініціювали внесенням аліквоти 20 мкл L-аргінін+Ca²⁺. Ферментативну реакцію проводили протягом 30 хвилин. Контролем слугувало утворення NO в мітохондріях за відсутності екзогенно доданих L-аргініну та Ca²⁺.

Уявну константу інгібування K_i розраховували в координатах Хілла [74]: $\{-\lg[\frac{F_{max}-F}{F}] : -\lg[C-1193]\}$, де F_{max} – флуоресценція (DAF-FM, відносні одиниці) за відсутності тіакалікс[4]арену, F – флуоресценція при відповідних концентраціях тіакалікс[4]арену. Враховувалися криві з коефіцієнтом кореляції R₂ > 0,9.

2.5. Дослідження акумуляції іонів Ca²⁺ та ΔpH-залежного виходу катіону у фракції мітохондрій з використанням флуоресцентного зонду Fluo-4 AM

Fluo-4 AM (C₅₁H₅₀F₂N₂O₂₃) – Ca²⁺-чутливий флуоресцентний зонд. Цей зонд має високу афінність до іонів Ca²⁺. Константа дисоціації (K_d) для Fluo-4 становить 350 нм, при зв'язуванні Ca²⁺ барвник показує збільшення інтенсивності флуоресценції у 100 разів. Модифікація флуоресцентного зонду Fluo-4 ацетоксиметилловими естерними групами дозволяє йому проникати крізь мембрану, де ендогенні естерази відщеплюють ці функціональні групи, і зонд стає непроникним через мембрану.

Навантаження мітохондрій Ca²⁺-чутливим флуоресцентним зондом Fluo-4 AM у концентрації 2 мкМ проводили у середовищі наступного складу: 10 mM HEPES (pH = 7,4, t = 37°C), 250 mM цукроза, 0,1% БСА, 0,02% Pluronic® F-127 протягом 30 хвилин при температурі 37°C.

Реєстрацію відносних значень рівня Ca^{2+} в матриці мітохондрій міометрія, навантажених Fluo-4 AM ($\lambda_{\text{зб}} = 495$ нм, $\lambda_{\text{фл}} = 520$ нм) досліджували із використанням спектрофлуориметра РТІ QuantaMaster™ 40 (Photon Technology International, Канада) із програмним забезпеченням FelixGX 4.1.0.3096.

Середовище, з якого здійснювалася енергозалежна акумуляція іонів Ca^{2+} у матриці мітохондрій, мало наступний склад: 20 мМ HEPES (рН = 7,4, t = 37°C), 2 мМ K^+ -фосфатний буфер (рН = 7,4, t = 37°C), 250 мМ цукроза, 3 мМ MgCl_2 , 3 мМ АТФ, 5 мМ сукцинат натрію. Концентрація Ca^{2+} становила 80 мкМ. Вміст протеїну у фракції мітохондрій складав 50 мкг.

Дослідження ΔpH -індукованого вивільнення іонів Ca^{2+} з мітохондрій проводили за умови попередньої їх енергозалежної акумуляції протягом 5 хв. Далі аліквоту суспензії (100 мкл) розводили у середовищі вивільнення Ca^{2+} (об'єм 2 мл) наступного складу: 20 мМ HEPES (рН 6,5-7,5; 37 °C), 2 мМ К/Рі буфер (рН 6,5-7,5; 37 °C), 250 мМ цукроза, 5 мМ сукцинат натрію, 5 мкМ циклоспорин А.

2.6. Визначення функції розподілу гідродинамічного діаметру ізольованих мітохондрій з використанням методу лазерної кореляційної спектроскопії

Функцію розподілу гідродинамічного діаметру (характеристичного розміру) мітохондрій визначали методом лазерної кореляційної спектроскопії. Використовували прилад ZetaSizer-3 (Malvern Instruments, Велика Британія) з корелятором Multi 8 Computing Correlator Type 7032 CE, який облаштований гелій-неоновим лазером ЛГН-111 з довжиною хвилі 633 нм і потужністю 25 мВт.

Реєстрацію розсіяного від суспензії мітохондрій лазерного опромінення проводили протягом 10 хв по 1 хв при температурі 24°C під кутом

розсіювання 90° . Автокореляційну функцію обробляли за допомогою стандартної комп'ютерної програми PCS-Size mode v. 1.61.

Середовище інкубації (1 мл) мало наступний склад: 20 мМ Нерес (рН 7,4, 25 °С), 2 мМ калій-фосфатний буфер (рН 7,4, 25 °С), 125 мМ КСl, 25 мМ NaCl, 5 мМ піруват, 5 мМ сукцинат. Вміст протеїну в мітохондрійній фракції складав 50 мкг.

2.7. Вивчення впливу калікс[4]арену на транспортні та енергетичні процеси в ізольованих мітохондріях

Калікс[4]арен С-1193 (рис. 3.1) був синтезований та охарактеризований із використанням методів ЯМР та інфрачервоної спектроскопії у відділі хімії фосфоранів Інституту органічної хімії НАН України під керівництвом академіка НАН України Кальченка В.І.

Тіакалікс[4]арен С-1193 розчиняли в ДМСО та вносили безпосередньо в середовище інкубації. Концентрація розчинника в пробі не перевищувала 0,5%. При проведенні експериментів контролем слугувало внесення аліквоти розчинника до середовища інкубації.

2.8. Статистична обробка результатів досліджень

Статистичну обробку результатів досліджень проводили методами, описаними раніше [76]. Розрахунки проводили за допомогою стандартного програмного забезпечення MS Office Excel.

Середнє арифметичне M обчислювали за формулою: $M = \frac{\sum x_i}{n}$, де \sum

– знак суми, x_i – варіанта, n – кількість варіант.

Середнє квадратичне відхилення σ обчислювали за формулою:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - M)^2}{n - 1}}.$$

Середнє квадратичне відхилення середнього арифметичного m

обчислювали за формулою: $m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - M)^2}{n(n - 1)}}.$

Вірогідність різниці середнього арифметичного за критерієм Стьюдента обчислювали за формулою для рівновеликих варіаційних рядів малих вибірок:

$$t = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}}.$$

За достовірні приймалися результати, в яких значення рівня

значущості $p < 0,05$.

РОЗДІЛ ІІІ

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження біоенергетичних та Ca^{2+} -транспортувальних процесів у мітохондріях є важливим для їх розуміння і пошуку сполук, які пригнічують або ж, навпаки, відновлюють нормальне функціонування цих органел, що відповідають за вироблення енергії та відіграють роль у підтриманні кальцієвого гомеостазу у клітині [1, 24, 30, 33, 34]. Перспективними сполуками для цього є каліксарени, зокрема, добре охарактеризовані калікс[4]арени.

На даний час, наявні дослідження, що стосуються ролі, яку мають похідні цих сполук у процесах, що відбуваються в клітинах [5, 9, 10, 13-15, 17, 18, 20-29]. Калікс[4]арени із гетероатомами у макроциклі замість метиленових містків надають цим сполукам нові властивості, які є перспективними для прикладного використання науковцями.

Калікс[4]арен С-1193 (5,17-біс(дигідроксифосфонілметилол)-26,28-дигідрокси-25,27-дибутокситіакалікс[4]арен) – це тіакалікс[4]арен (фенольні одиниці з'єднані атомами сульфуру) (рис. 3.1).

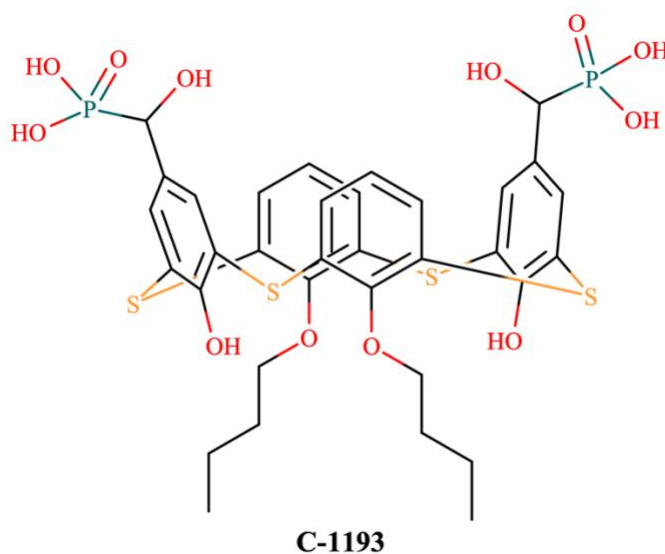


Рисунок 3.1 – Структурна формула тіакалікс[4]арену С-1193 у конформації «конус»

C-1193 є аналогом раніше описаного і дослідженого калікс[4]арену C-99 [9, 15]. Завдяки стеричним і нуклеофільним властивостям сульфуру, тіакалікс[4]арен C-1193 має більший розмір макроциклу, у порівнянні зі своїм попередником (C-99), і вищу реакційну здатність.

3.1. Дослідження змін флуоресценції NADH та FAD в мітохондріях під дією калікс[4]арену C-1193

Експериментальне дослідження клітинного метаболізму є одним із важливих напрямків вивчення регуляції різноманітних клітинних процесів. Як індикатори клітинного метаболізму можуть виступати внутрішньоклітинні кофактори, наприклад, флавопротеїни та піридинові нуклеотиди [75]. Обчислення флуоресцентного сигналу цих кофакторів може дати приблизну оцінку метаболічної активності, так як метаболічний потенціал співпадає із відношенням відновлених та окиснених метаболічних субстратів [75-77].

Нікотинамідаденіндинуклеотид (NAD) та флавінаденіндинуклеотид (FAD) – це піридиновий та флавіновий нуклеотиди відповідно, які є коензимами, здатними переносити електрони від донора до акцептора, і відіграють важливу роль у гліколізі, циклі трикарбонових кислот, кальцієвому гомеостазі та інших метаболічних та біологічних процесах [76-78].

Можливість використання NAD/FAD у дослідженні енергетичних процесів всередині клітини і, зокрема, мітохондрій, пояснюється тим, що відновлена форма NADH, на відміну від окисненої форми NAD^+ , і окиснена форма FAD, на відміну від відновленої форми FADH_2 , аутофлуоресціюють [75, 76, 79]. Це дозволяє не використовувати екзогенні барвники із потенційною цитотоксичністю та неспецифічним зв'язуванням в експериментах *in vivo* та *in vitro* [77].

Зміни редокс-станів аденінових нуклеотидів NADH/FADH₂ виступають показником функціонування електронно-транспортного ланцюга мітохондрій [79].

Для досягнення стану енергізації мітохондрій в середовище інкубації вносили 5 мМ піруват та 5 мМ сукцинат. Флуоресценція NADH з часом знижується за присутності цих субстратів дихання, що свідчить про поступове окислення нуклеотиду і зростання вмісту нефлуоресціюючого NAD⁺. Флуоресцентний сигнал від FAD у мітохондріях з часом зростає завдяки окисленню FADH₂ і зростанню вмісту флуоресціюючого FAD.

Нами встановлено, що калікс[4]арен С-1193 з часом концентраційно-залежно (0,01 - 10 мкМ) гальмував окислення NADH в ізольованих мітохондріях (рис. 3.2) та мав інгібіторний вплив на окислення FADH₂ (рис. 3.3).

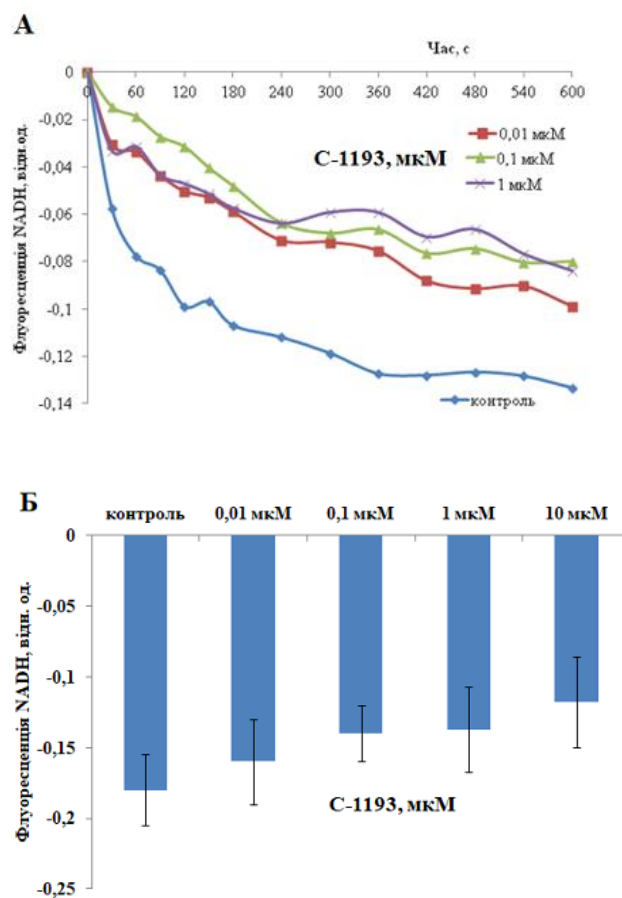


Рисунок 3.2 – Вплив калікс[4]арену С-1193 на окислення NADH в ізольованих мітохондріях. А – результати типового дослідження. Б – результати статистичної обробки, $M \pm m$, $n=4$. Метод спектрофлуориметрії

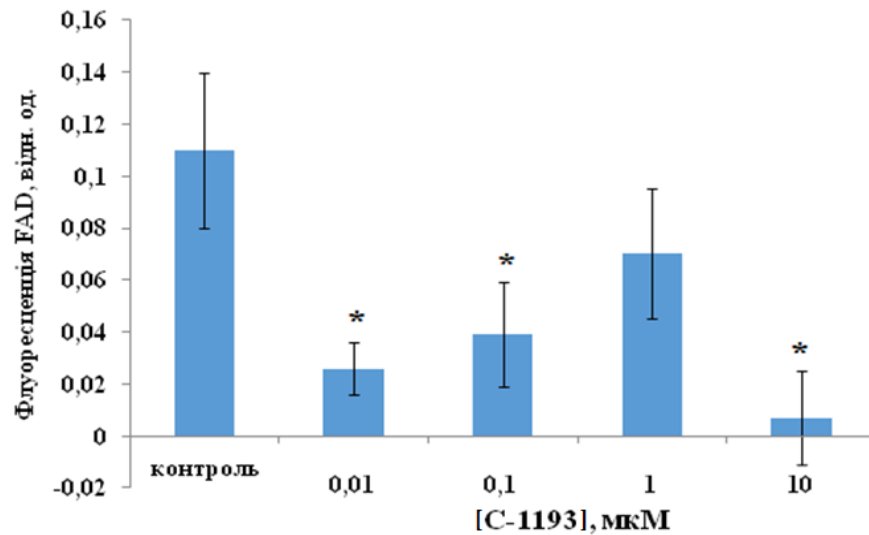


Рисунок 3.3 – Вплив калікс[4]арену C-1193 на окислення FADH₂ в ізольованих мітохондріях. $M \pm m$, $n=5$. * - $p < 0,05$ відносно контролю. Метод спектрофлуориметрії

Цей ефект за умови наших експериментів (номінальна відсутність Ca²⁺ в середовищі реєстрації флуоресцентного сигналу від NADH/FAD) може бути пов'язаний з безпосереднім впливом на електронно-транспортний ланцюг. Найбільш вірогідно, що в основі нього лежить пригнічення функціональної активності I та II комплексів за присутності C-1193. Відсутність вираженої концентраційної залежності ефекту C-1193 на флуоресцентний сигнал від FAD може вказувати на складний характер впливу досліджуваного калікс[4]арену на електронно-транспортний ланцюг.

Зміни у функціонуванні електронно-транспортного ланцюга можуть мати своє відображення у змінах об'єму органел. Наприклад, гіперполяризація внутрішньої мембрани призводить до зменшення об'єму. Ефективним методом вивчення змін розмірів близьких до сферичних частинок в розчинах є лазерна кореляційна спектроскопія. В концентраціях 1 та 10 мкМ калікс[4]арен C-1193 не змінював характеристичних розмірів (гідродинамічного діаметру) мітохондрій, отже не викликав їхнього набухання (рис. 3.4). Слід також відмітити, що C-1193 у використаних в цих

дослідженнях концентраціях в робочих розчинах не викликав помітного міцелоутворення згідно даних лазерної кореляційної спектроскопії.

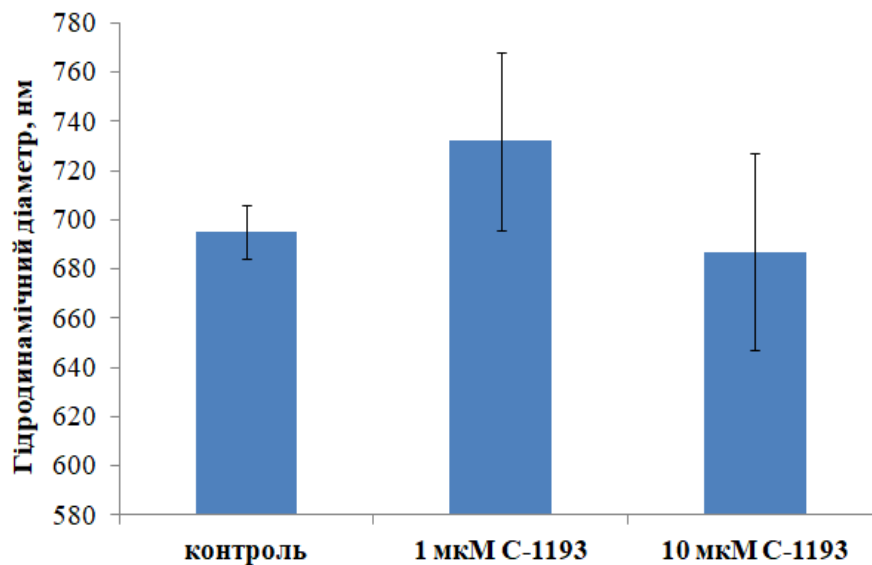


Рисунок 3.4 – Зміни гідродинамічного діаметру ізольованих мітохондрій за дії калікс[4]арену C-1193. $M \pm m$, $n=4$. Метод лазерної кореляційної спектроскопії

Набухання мітохондрій є наслідком порушення осмотичного балансу між матриксом і оточуючим середовищем і часто причиною цього є відкриття пори перехідної провідності. Внаслідок цього відбуваються розриви зовнішньої мітохондрійної мембрани і посилене вивільнення проапоптичних факторів у цитозоль. Таким чином, суттєве набухання мітохондрій є свідченням порушення їхнього функціонування. Наші результати доводять, що калікс[4]арен C-1193 у використаних концентраціях, згідно морфологічних ознак, не викликає мітохондрійної дисфункції.

Мітохондрії розглядаються як джерело активних форм кисню, які володіють за низьких концентрацій сигнальними і регуляторними функціями. Ефективність функціонування електронно-транспортного ланцюга віддзеркалює рівень утворення активних форм кисню в мітохондріях. Водночас посилена генерація активних форм кисню в дихальному ланцюзі призводить до розвитку окисного стресу, наслідком якого є мітохондрійна

дисфункція. Тому наступним етапом досліджень було з'ясування питання чи має місце посилення генерації АФК за дії тіакалікс[4]арена С-1193.

3.2. Генерація активних форм кисню в мітохондріях у присутності калікс[4]арену С-1193

АФК можуть виконувати як регуляторну роль в клітині, так і спричиняти порушення нормального функціонування різноманітних клітинних процесів, таких як продукція АТФ, підтримання Ca^{2+} гомеостазу тощо. Генерація АФК в мітохондріях відбувається переважно у комплексах I і III ЕТЛ [40-43].

Високореактивний гідроксильний радикал спричиняє пошкодження макромолекул в мітохондріях, таких як ліпіди, протеїни та ДНК. Мутації мтДНК та дефекти у будові комплексів I та III ЕТЛ призводять до надмірної генерації $\bullet\text{O}_2^-$ із молекулярного кисню. Супероксид аніон-радикал далі перетворюється на пероксид водню H_2O_2 під дією Mn^{2+} -супероксиддисмутази в матриксі. Пероксид водню, у свою чергу, відновлюється до води за допомогою тіол-дисульфідної системи на основі глутатіону, глутатіонпероксидаз та пероксиредоксинів [43, 44].

Надмірна кількість $\bullet\text{O}_2^-$ відіграє роль у метаболічному оксидативному стресі, геномній нестабільності та порушенні інших процесів всередині клітини. Мутована мтДНК може посилити оксидативний стрес шляхом зниженої експресії важливих для транспорту електронів протеїнів, що призводить до порушення функціонування органели та апоптозу [39, 43].

Через потенційно шкідливі ефекти надмірної генерації АФК в мітохондріях, а саме розвиток мітохондрійної дисфункції та оксидативного стресу клітини, наступні дослідження було спрямовано на визначення ефекту тіакалікс[4]арену С-1193 на продукцію АФК.

У присутності калікс[4]арену С-1193 спостерігається концентраційно-залежне (0,1 – 100 мкМ) зменшення генерації АФК в мітохондріях (рис. 3.5).

Одним з можливих пояснень цього ефекту є зниження інтенсивності транспорту електронів в дихальному ланцюзі через зниження функціональної активності I та II комплексів ЕТЛ.

За концентрації тіакалікс[4]арену С-1193 100 мкМ рівень флуоресценції зонду DCF у відносних одиницях статистично достовірно ($p = 0,05$) сягав значень інтенсивності флуоресценції до внесення субстратів дихання – 5 мМ сукцинату та пірувату (рис. 3.5).

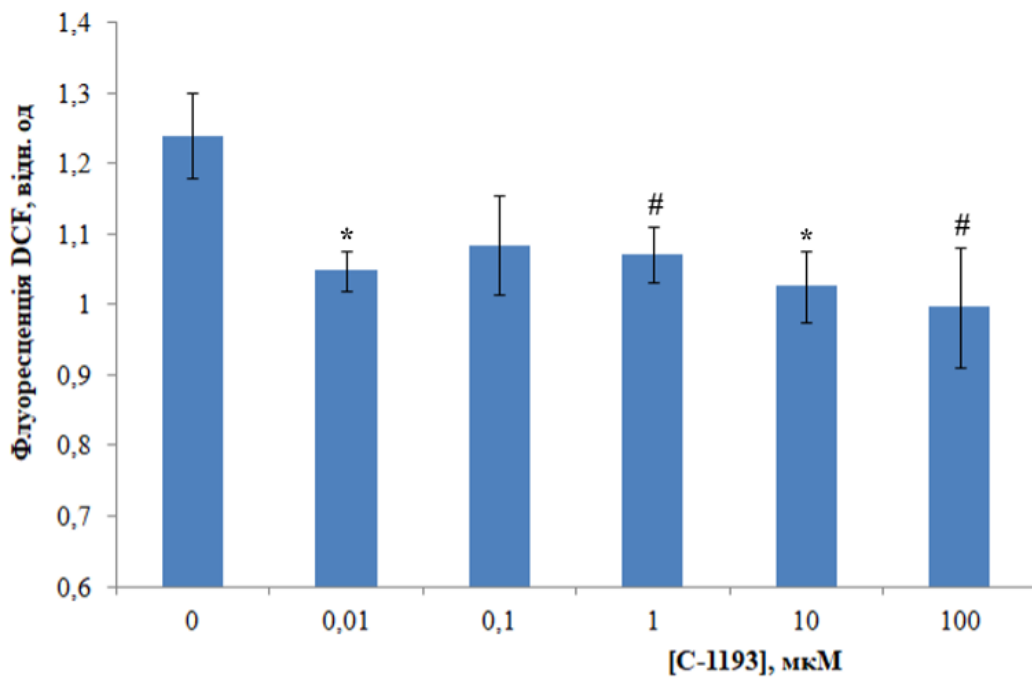


Рисунок 3.5 – Дія калікс[4]арену С-1193 на утворення активних форм кисню в ізольованих мітохондріях. Результат статистичної обробки, $M \pm m$, $n=5$.

* - $p < 0,01$, # - $p = 0,05$. Метод протокової цитометрії

Спроможність мітохондрій накопичувати Ca^{2+} є визначальною для функціонування клітини в цілому, оскільки продукція ними АТФ залежить від концентрації даного катіона в матриксі, що зумовлено специфікою роботи відповідних дегідрогеназ. Разом з цим Ca^{2+} -перевантаження мітохондрій є тригером відкриття пори перехідної проникності і розвитку апоптозу. В той же час, від активності дихального ланцюга та збільшення/зменшення за модулем мембранного потенціалу внутрішньої мембрани мітохондрій залежить ефективність функціонування систем транспорту Ca^{2+} в

мітохондріях [3, 58-62]. Вірогідне пригнічення функціональної активності комплексів дихального ланцюга і, як наслідок, інтенсивності окисного фосфорилування за дії досліджуваного калікс[4]арену може вплинути як на біоенергетику мітохондрій, так і на функціонування Ca^{2+} -транспортувальних систем в їхній внутрішній мембрані [80].

3.3. Вплив калікс[4]арену С-1193 на системи обміну іонів Ca^{2+} у фракції мітохондрій

Порушення функціонування Ca^{2+} -транспортувальних систем, як і у випадку з ЕТЛ і надмірною генерацією АФК, може призвести до розвитку мітохондрійної дисфункції та апоптозу [32, 34, 80]. Більша концентрація іонів Ca^{2+} , у порівнянні з оптимальним її значенням, у матриксі досліджуваних органел призводить до активації дегідрогеназ, наприклад, піруватдегідрогеназного комплексу, ізоцитратдегідрогенази та α -кетоглутаратдегідрогенази, що знаходяться в мітохондріях [81].

Дослідження сполук, які потенційно впливають на акумуляцію іонів Ca^{2+} у мітохондріях, що у свою чергу призводить до змін у роботі ЕТЛ та оптимальної діяльності біоенергетичних процесів в органелі як таких, є надзвичайно важливим, так як ці процеси лежать в основі нормальної життєдіяльності клітини та функціонування внутрішніх органів людини в цілому [80, 82].

Продемонстровано залежне від часу та концентрації (0,01 – 10 мкМ) пригнічення акумуляції Ca^{2+} мітохондріями за присутності калікс[4]арену С-1193 (рис. 3.6). Цей ефект мав місце як у випадку акумуляції Ca^{2+} мітохондріями, функціонування яких залежало лише від наявності субстратів окиснення, так і за умови додаткової енергізації шляхом внесення екзогенного Mg-ATP^{2-} . В останньому випадку реверсне функціонування АТР-синтетази у

напрямку створення градієнту протонів на внутрішній мембрані створює додаткову рушійну силу для енергозалежної акумуляції іонів Ca^{2+} .

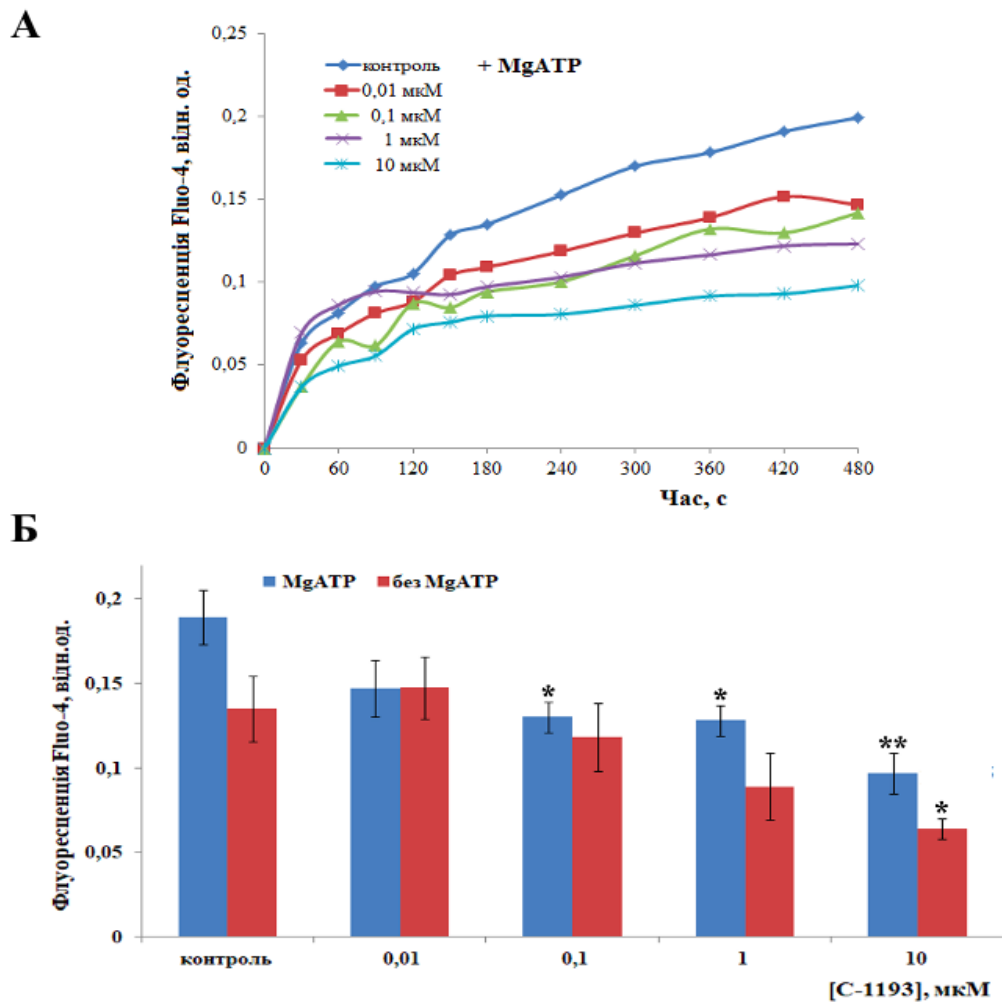


Рисунок 3.6 – Дія калікс[4]арену С-1193 на акумуляцію іонів Ca^{2+} в ізольованих мітохондріях. А – дані типового експерименту. Б – статистична обробка результатів, $M \pm m$, $n=6$. * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$. Метод спектрофлуориметрії

В той же час продемонстровано, що сполука С-1193 достовірно не змінює активність H^+ - Ca^{2+} -обмінника мітохондрій (рис.3.7)

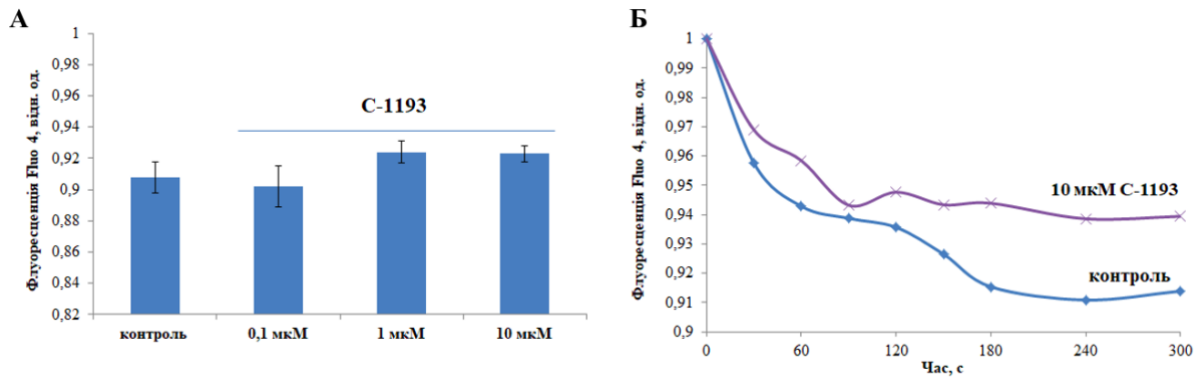


Рисунок 3.7 – А – відсутність ефекту дії калікс[4]арену С-1193 на ΔpH -залежний вихід Ca^{2+} з мітохондрій. Б – результат характерного дослідження.

Метод спектрофлуориметрії

Зниження інтенсивності надходження Ca^{2+} у мітохондрії буде супроводжуватись зменшенням концентрації катіона у матриксі і здатне впливати на інтенсивність перебігу Ca^{2+} -залежних процесів. З іншого боку, Ca^{2+} перевантаження мітохондрій небезпечно і здатне призвести до мітохондрійної дисфункції. В цьому контексті гальмування енергозалежного надходження Ca^{2+} до мітохондрій та відсутність ефекту на функціональну активність H^+ - Ca^{2+} -обмінника може трактуватися як можлива протекторна дія С-1193.

До Ca^{2+} -залежних ензимів мітохондрій відноситься NO-синтаза. Як відомо, оксид азоту (NO) відіграє вирішальну роль у модулюванні біоенергетичних процесів у мітохондріях.

3.4. Біосинтез оксиду азоту в ізольованих мітохондріях у присутності калікс[4]арену С-1193

NO утворюється ферментативною дією синтази оксиду азоту (NOS) на L-аргінін, що призводить до виробництва NO та L-цитруліну. У мітохондріях NO надає різноманітний вплив на біоенергетику, безпосередньо взаємодіючи з ключовими компонентами ЕТЛ і мітохондрійними ферментами. Одним із

значних впливів NO на біоенергетику є його здатність оборотно інгібувати цитохром-с-оксидазу (комплекс IV) в ЕТЛ, тим самим зменшуючи синтез АТФ і погіршуючи дихання. Ця модуляція активності комплексу IV може регулювати споживання кисню, потік електронів і, зрештою, впливати на здатність мітохондрій виробляти енергію [40-42].

Досліджуваний калікс[4]арен дуже ефективно концентраційно-залежно (0,001 – 100 мкМ) інгібував синтез оксиду азоту мітохондріями (рис. 3.8). Розрахована в координатах Хілла константа інгібування становить $5,5 \pm 1,7$ нМ, що робить досліджувану сполуку високоафінним блокатором ендогенної генерації NO. Ефект С-1193 на синтез NO може бути пояснений як інгібуванням надходження Ca^{2+} в матрикс за дії досліджуваного калікс[4]арену, так і безпосереднім впливом на мітохондрійну NO-синтазу, яка асоційована із внутрішньою мітохондрійною мембраною.

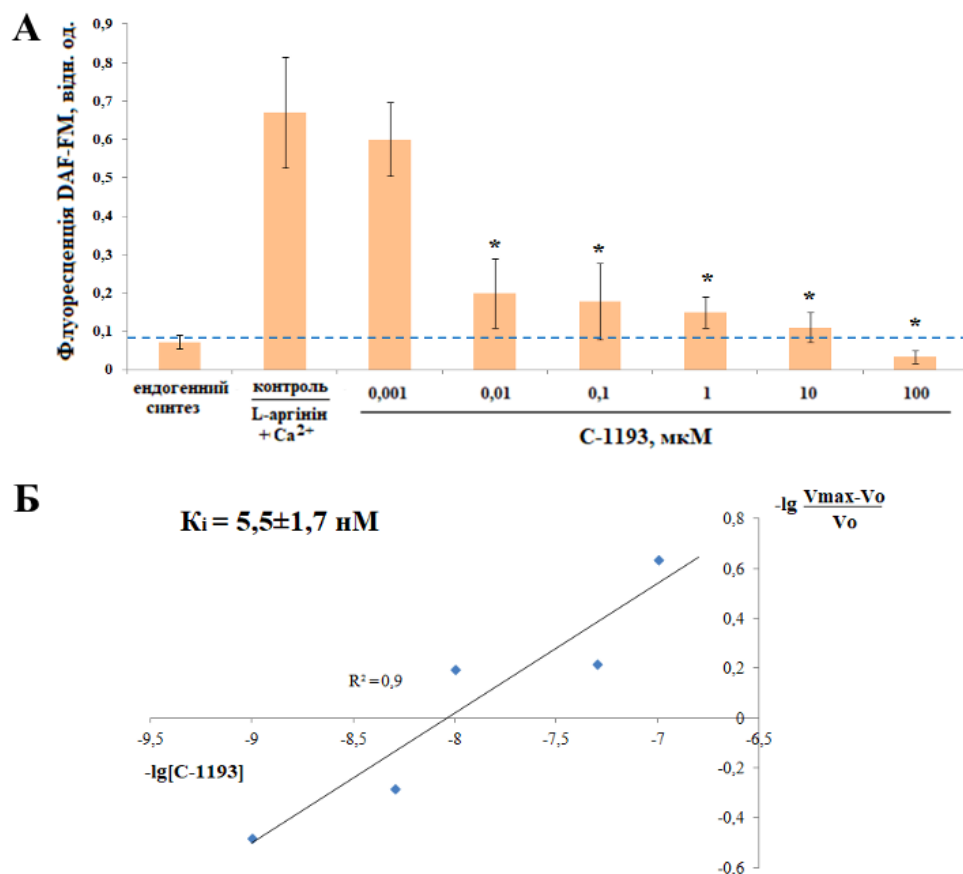


Рисунок 3.8 – А – вплив калікс[4]арену С-1193 на Ca^{2+} -залежний синтез оксиду азоту в мітохондріях. $M \pm m$, $n=7$. * - $p < 0,01$ відносно контролю. Б – приклад розрахунку константи інгібування K_i в координатах Хілла

На разі доведено, що NO, зокрема синтезований ендогенно, регулює функціональну активність мітохондрій [13]. Оксид азоту впливає на роботу електронно-транспортного ланцюга, зворотно пригнічуючи цитохром *c*-оксидазу, та контролює величину рН в матриксі. За низьких наномолярних концентрацій NO обмежує інтенсивність дихання та окисного фосфорилування, що розглядається як адаптивна фізіологічна відповідь [40-42]. NO регулює гомеостаз Ca^{2+} в мітохондріях і, відповідно, Ca^{2+} -залежні процеси. Синтез АТФ мітохондріями регулюється оксидом азоту cGMP-залежним шляхом. Оксид азоту стимулює також біогенез мітохондрій. З іншого боку надлишкова продукція NO на фоні посилення утворення супероксид-аніону в мітохондріях супроводжується генерацією значних кількостей пероксинітриду, пошкодженням компонентів електронно-транспортного ланцюга, незворотною деполаризацією органел і розвитком мітохондрійної дисфункції. Реакція NO з $\text{O}_2^{\cdot-}$ розглядається як важливий фактор зниження біодоступності і фізіологічної активності оксиду азоту в мітохондріях. Пероксинітрид є причиною окисного пошкодження мітохондрійних протеїнів, зокрема незворотної інактивації Mn^{2+} -вмісної супероксиддисмутази, матриксної аконітази [41, 42]. Нітрозативний стрес має наслідком порушення структурно-функціональних властивостей ліпідів, ДНК (нерепаровані розриви та інші пошкодження). Нітрозативний/оксидативний стрес в кінцевому рахунку може призвести до розвитку апоптозу або навіть некрозу. Ось чому ефективно пригнічення синтезу NO з боку досліджуваного калікс[4]арену є передумовою його можливого застосування з метою запобігання розвитку нітрозативного/оксидативного стресу в мітохондріях і відповідної мітохондрійної дисфункції.

ВИСНОВКИ

1. Продемонстровано, що тіакалікс[4]арен С-1193 концентраційно-залежно (0,01-10 мкМ) гальмує окислення NADH та FADH₂ в електронно-транспортному ланцюзі ізольованих мітохондрій.
2. За присутності тіакалікс[4]арену С-1193 спостерігається зменшення генерації активних форм кисню в ізольованих мітохондріях.
3. Тіакалікс[4]арен С-1193 концентраційно-залежно (0,01-10 мкМ) пригнічує енергозалежну акумуляцію іонів Ca²⁺ мітохондріями, не впливаючи на активність H⁺-Ca²⁺-обмінника.
4. Тіакалікс[4]арен С-1193 ефективно інгібує синтез NO мітохондріями. Розраховане значення K_i складає 5,5±1,7 нМ.
5. Тіакалікс[4]арен С-1193 є перспективним для подальших біохімічних досліджень як регулятор біоенергетичних та транспортувальних процесів у мітохондріях гладенького м'язу матки для запобігання/корекції розвитку мітохондрійної дисфункції.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Fontanesi F. Mitochondria: Structure and role in respiration. *eLS*. 2015. P. 1–3.
2. Nolfi-Donagan D., Braganza A., Shiva S. Mitochondrial electron transport chain: oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox Biology*. 2020. Vol. 37, No. 101674.
3. 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.
4. Wray S., Prendergast C. The myometrium: from excitation to contractions and labour. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2019. Vol. 1124. P. 233–263.
5. 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.
6. Perret F., Lazar A. N., Coleman A. W. Biochemistry of the para-sulfonato-calix[n]arenes. *Chemical Communications*. 2006. No. 23. P. 2425–2438.
7. Халкон-вмісні калікс[4]арени – нанорозмірні модулятори поляризації мембран мітохондрій та вмісту йонізованого Ca^{2+} в них / Л. Г. Бабіч та ін. *Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології*. 2017. Т. 15, № 1. С. 193–202.
8. Кінетика інгібіторної дії калікс[4]арену С-90 на активність транспортної Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин / Т. О. Векліч та ін. *Український біохімічний журнал*. 2014. Т. 86, № 5. С. 37–46.
9. Дія калікс[4]аренів на транспорт Ca^{2+} , електричний потенціал та активність електрон-транспортного ланцюга в мітохондріях

- гладенького м'язу / Ю. В. Данилович та ін. *Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології*. 2017. Т. 15, № 2. С. 365–371.
10. Calix[4]arenes as modulators of energy-dependent Ca^{2+} -accumulation and functioning of the electron transport chain in smooth muscle mitochondria / H. V. Danylovych et al. *International Journal of Physiology and Pathophysiology*. 2017. Vol. 8, No. 3. P. 241–251.
 11. Anion recognition by organometallic calixarenes: Analysis relativist DFT calculations / A. O. Ortolon et al. *Organometallics*. 2018. Vol. 37, No. 13. P. 2167–2176.
 12. Thiocalixarenes / N. Morohashi et al. *Chemical Reviews*. 2006. Vol. 106. P. 5291–5316.
 13. Данилович Г. В. Біосинтез та регуляторна роль оксиду азоту в мітохондріях гладенького м'язу: дис. ... д-ра біол. наук: 03.00.04 / Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна. Київ, 2021. 309 с.
 14. Revisiting fluorescent calixarenes: from molecular sensors to smart materials / R. Kumar et al. *Chemical Reviews*. 2019. Vol. 119, No. 16. P. 9657–9721.
 15. Комп'ютерне моделювання взаємодії калікс[4]арену C-99 із субфрагментом 1 міозину міометрія / О. В. Бевза та ін. *Український біохімічний журнал*. 2010. Т. 82, № 2. С. 85–93.
 16. Anion- π weak interactions in a heteroaromatic calixarene receptor. A theoretical investigation / G. Mazzone et al. *Inorganica Chimica Acta*. 2018. Vol. 470. P. 379–384.
 17. Español E. S., Villamil M. M. Calixarenes: generalities and their role in improving the solubility, biocompatibility, stability, bioavailability, detection, and transport of biomolecules. *Biomolecules*. 2019. Vol. 9, No. 3:90.
 18. 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.
 19. Calixarenes and Beyond / ed: P. Neri et al. Switzerland: Springer International Publishing, 2016. 1053 p.

20. 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.
21. Tsue H., Oketani R. Azacalixarene: an ever-growing class in the calixarene family. *Advances in Organic Crystal Chemistry* / ed.: R. Tamura, M. Miyata. Tokyo: Springer, 2015. P. 241–261.
22. Thia and sulfonyl-calix[4]arene methylphosphonous acids: synthesis, structure, and amino acid binding / S. G. Kharchenko et al. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*. 2013. Vol. 188, No. 1-3. P. 243–248.
23. Iki N., Miyano S. Can thiacalixarene surpass calixarene? *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 2001. Vol. 41. P. 99–105.
24. Мінцер О. П., Потяженко М. М., Невоїт Г. В. Мітохондріальна дисфункція у загальному континуумі неінфекційних захворювань із позиції системної медицини. Частина I. Огляд літератури і результати теоретичного дослідження. *Український медичний часопис*. 2022. Т. 147, № 1. С. 1–8.
25. Calix[4]arene C-956 is effective inhibitor of H^+ - Ca^{2+} -exchanger in smooth muscle mitochondria / G. V. Danylovych et al. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2018. Vol. 90, No. 1. P. 25–31.
26. Калікс[4]арен С-91 стимулює акумуляцію іонів Ca^{2+} в мітохондріях міометрія / С. Г. Шликов та ін. *Український біохімічний журнал*. 2007. Т. 79, № 4. С. 28–33.
27. Халконові калікс[4]арени – супрамолекулярні сполуки, які модулюють електронно-транспортний ланцюг мітохондрій гладенького м'язу / Ю. В. Данилович та ін. *Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології*. 2020. Т. 18, № 3. С. 459–464.
28. Calix[4]arene chalcone amides effects on myometrium mitochondria / S.G. Shlykov et al. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2019. Vol. 91, No. 3. P. 46–55.

29. Calix[4]arene chalcone amides as effectors of mitochondria membrane polarization / S. G. Shlykov et al. *Nanosistemi, Nanomateriali, Nanotehnologii*. 2020. Vol. 18, No. 3. P. 473–485.
30. Scheffler I. E. *Mitochondria*. 2nd ed. Hoboken : John Wiley & Sons, Inc., 2008. 493 p.
31. The functional impact of mitochondrial structure across subcellular scales / B. Glancy et al. *Frontiers in Physiology*. 2020. Vol. 11:541040. P. 1–24.
32. Standpoints in mitochondrial dysfunction: Underlying mechanisms in search of therapeutic strategies / A. V. Luis et al. *Mitochondrion*. 2022. Vol. 63. P. 9–22.
33. Merlini E., Coleman M. P., Loreto A. Mitochondrial dysfunction as a trigger of programmed axon death. *Elsevier*. 2022. Vol. 45, No. 1. P. 53–63.
34. Mitochondria – hubs for regulating cellular biochemistry: emerging concepts and networks / A. J. Anderson et al. *Open Biology*. 2019. Vol. 9, No. 8: 190126. DOI: 10.1098/rsob.190126.
35. Edwards R., Eaglesfield R., Tokatlidis K. The mitochondrial intermembrane space: the most constricted mitochondrial sub-compartment with the largest variety of protein import pathways. *Open Biology*. 2021. Vol. 11, No. 3: 210002.
36. Molecular mechanisms of mtDNA-mediated inflammation / A. De Gaetano et al. *Cells*. 2021. Vol. 10, No. 11. P. 2898. DOI: 10.3390/cells10112898.
37. Mitochondrial dysfunction in the development and progression of neurodegenerative diseases / J. Johnson et al. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2021. Vol. 702: 108698. DOI: 10.1016/j.abb.2020.108698.
38. Cogliati S., Cabrera-Alarcon J. L., Enriquez J. A. Regulation and functional role of the electron transport chain supercomplexes. *Biochemical Society Transactions*. 2021. Vol. 49, No. 6. P. 2655–2668.
39. Molecular and supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system: implications for pathology / S. Nesci et al. *Life*. 2021. Vol. 11(3), No. 242.

40. Role of mitochondrial reactive oxygen species in homeostasis regulation / B. Zhang et al. *Redox Report*. 2022. Vol. 27, No. 1. P. 45–52.
41. Antonucci S., Di Lisa P., Kaludercic N. Mitochondrial reactive oxygen species in physiology and disease. *Cell Calcium*. 2021. Vol. 94, No. 102344.
42. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review) / R.-Z. Zhao et al. *International Journal of Molecular Medicine*. 2019. Vol. 44, No. 1. P. 3–15.
43. Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling / S. J. Forrester et al. *Circulation Research*. 2018. Vol. 122, No. 6. P. 877–902.
44. On the clinical pharmacology of reactive oxygen species / A. I. Casas et al. *Pharmacological Reviews*. 2020. Vol. 72, No. 4. P. 801–828.
45. Oxidative stress in atherosclerosis / A. J. Kattoor et al. *Current Atherosclerosis Reports*. 2017. Vol. 19, No. 42.
46. Emerging role of monoamine oxidase as a therapeutic target for cardiovascular disease / S. Deshwal et al. *Current Opinion in Pharmacology*. 2017. Vol. 33. P. 64–69.
47. Kaludercic N., Di Lisa F. Mitochondrial ROS formation in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2020. Vol. 7, No. 12.
48. Akt-mediated phosphorylation of MICU1 regulates mitochondrial Ca^{2+} levels and tumor growth / S. Marchi et al. *The EMBO Journal*. 2019. Vol. 38, No. 2: e99435.
49. Nakamura H., Takada K. Reactive oxygen species in cancer: current findings and future directions. *Cancer Science*. 2021. Vol. 112, No. 10. P. 3945–3952.
50. Rehman K., Akash M. S. H. Mechanism of generation of oxidative stress and pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: how are they interlinked? *Journal of Cellular Biochemistry*. 2017. Vol. 118, No. 11. P. 3577–3585.
51. Oxidative toxicity in diabetes and Alzheimer's disease: mechanisms behind ROS/RNS generation / W. Ahmad et al. *Journal of Biomedical Science*. 2017. Vol. 24, No. 76.

52. Oxidative stress: the core pathogenesis and mechanism of Alzheimer's disease / R. Bai et al. *Ageing Research Reviews*. 2022. Vol. 77, No. 101619.
53. Brain monoamine oxidase B and A in human parkinsonian dopamine deficiency disorders / J. Tong et al. *Brain*. 2017. Vol. 140, No. 9. P. 2460–2474.
54. Control of reactive oxygen species for the prevention of Parkinson's disease: the possible application of flavonoids / T. Y. Kim et al. *Antioxidants*. Vol. 9, No. 7: 583.
55. Nagano T., Mizuno K., Morita K., Nawa H. Pathological implications of oxidative stress in patients and animal models with schizophrenia: the role of epidermal growth factor receptor signaling. *Neurotoxin Modeling of Brain Disorders – Life-long Outcomes in Behavioral Teratology* / ed: R. M. Kostrzewa, T. Archer. Switzerland: Springer International Publishing, 2016. P. 429–446.
56. Relationship of oxidative stress with HIV disease progression in HIV/HCV co-infected and HIV mono-infected adults in Miami / D.-H. Shin et al. *International Journal of Bioscience, Biochemistry, Bioinformatics*. 2012. Vol. 2, No. 3. P. 217–223.
57. Oxidative stress as a critical factor in nonalcoholic fatty liver disease pathogenesis / S. Spahis et al. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2017. Vol. 26, No. 10. P. 519–541.
58. 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.
59. Transport of Calcium ions into mitochondria / Z. Xu et al. *Current Genomics*. 2016. Vol. 17, No. 3. P. 215–219.
60. Carvalho E. J., Stathopoulos P. B., Madesh M. Regulation of Ca²⁺ exchanges and signaling in mitochondria. *Current Opinion in Physiology*. 2020. Vol. 17. P. 197–206.

61. 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.
62. Murphy E., Steenbergen C. Regulation of mitochondrial Ca^{2+} uptake. *Annual Review of Physiology*. 2020. Vol. 83. P. 107–126.
63. The mitochondrial Ca^{2+} uniporter is a central regulator of interorganellar Ca^{2+} transfer and NFAT activation / R. E. Yoast et al. *Journal of Biological Chemistry*. 2021. Vol. 297, No. 4: 101174.
64. An essential role for cardiolipin in the stability and function of the mitochondrial calcium uniporter / S. Ghosh et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020. Vol. 117, No. 28. P. 16383–16390.
65. MICU3 is a tissue-specific enhancer of mitochondrial calcium uptake / M. Patron et al. *Cell Death & Differentiation*. 2019. Vol. 26, No. 1. P. 179–195.
66. The crystal structure of MICU2 provides insight into Ca^{2+} binding and MICU1-MICU2 heterodimer formation / W. Wu et al. *EMBO Reports*. Vol. 20, No. 9.
67. Molecular nature and physiological role of the mitochondrial calcium uniporter channel / B. R. Alevriadou et al. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. 2021. Vol. 320, No. 4. P. C465–C482.
68. Шляхи та механізми трансмембранного обміну Ca^{2+} в мітохондріях / О. В. Коломієць та ін. *Фізіологічний журнал*. 2017. Т. 63, № 4. С. 87–104.
69. LETM1 is required for mitochondrial homeostasis and cellular viability (Review) / Y. Li et al. *Molecular Medicine Reports*. 2019. Vol. 19, No. 5. P. 3367–3375.
70. MICS1 is the $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporter of mammalian mitochondria / S. Austin et al. bioRxiv. 2021. DOI: 10.1101/2021.11.11.468204.
71. Gottschalk B., Madreiter-Sokolowski C. T., Graier W. F. Cristae junction as a fundamental switchboard for mitochondrial ion signaling and bioenergetics. *Cell Calcium*. 2022. Vol. 101, No. 102517.

72. Костерин С. А., Браткова Н. Ф., Курский М. Д. Роль сарколеммы и митохондрий в обеспечении кальциевого контроля расслабления миомерия. *Биохимия*. 1985. Т. 50, № 8. С. 1350–1361.
73. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. Vol. 72, No. 1-2. P. 248–254.
74. Keleti T. Determination of Michaelis-Menten parameters from initial velocity measurements using unstable substrate. *Analytical Biochemistry*. 1986. Vol. 152, No. 1. P. 48–51.
75. Kolenc O. I., Quinn K. P. Evaluating cell metabolism through autofluorescence imaging of NAD(P)H and FAD. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2019. Vol. 30, No. 6. P. 875–889.
76. Recent advances in fluorescent probes for cellular antioxidants: Detection of NADH, hNQO1, H₂S, and other redox biomolecules / S. Y. Park et al. *Coordination Chemistry Reviews*. 2021. Vol. 428, No. 213613.
77. Heikal A. A. Intracellular coenzymes as natural biomarkers for metabolic activities and mitochondrial anomalies. *Biomarkers in Medicine*. 2010. Vol. 4, No. 2. P. 241–263.
78. NADH autofluorescence – a marker on its way to boost bioenergetic research / P. M. Schaefer et al. *Cytometry Part A*. 2019. Vol. 95, No. 1. P. 34–46.
79. Danylovych H. V. Evaluation of functioning of mitochondrial electron transport chain with NADH and FAD autofluorescence. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2016. Vol. 88, No. 1. P. 31–43.
80. Вивчення акумуляції Ca²⁺ в ізольованих мітохондріях гладенького м'яза за допомогою зонда Fluo-4 AM / О. В. Коломієць та ін. *Український біохімічний журнал*. 2013. Т. 85, № 4. С. 30–39.
81. Використання методу протокової цитометрії для визначення вмісту Ca²⁺ в мітохондріях та впливу на нього антагоністів кальмодуліну / Л. Г. Бабіч та ін. *Український біохімічний журнал*. 2008. Т. 80, № 4. С. 51–58.

82. Калікс[4]арени як модулятори енергозалежної акумуляції Ca^{2+} та функціонування електронно-транспортного ланцюга в мітохондріях гладенького м'яза / Г. В. Данилович та ін. *Фізіологічний журнал*. 2016. Т. 62, № 5. С. 27–36.