

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

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики

доц. Нипорко Олексій Юрійович

Протокол №_____ засідання кафедри

від “_____” _____ 2023 р.

**ХАЛКОНОВМІСНІ КАЛІКС[4]АРЕНИ ЯК МОДУЛЯТОРИ
ТРАНСПОРТУ Ca²⁺ ТА ЕЛЕКТРОННО-ТРАНСПОРТНОГО
ЛАНЦЮГА МІТОХОНДРІЙ**

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра

студента спеціальності 091 Біологія

ОП «Нанотехнології в біології»

Гусака Владислава Олександровича

Науковий керівник від кафедри:

професор **Костерін Сергій Олексійович**

Робота виконана у відділі біохімії м'язів

Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України

під керівництвом д. б. н. **Ю. В. Даниловича**

Оцінка захисту роботи

Київ – 2023 р.

АНОТАЦІЯ

Гусак В.О. Халконовмісні калікс[4]арени як модулятори транспорту Ca^{2+} та електронно-транспортного ланцюга мітохондрій. – Випускна кваліфікаційна робота бакалавра за спеціальністю 091 Біологія, ОП «Нанотехнології в біології».

У роботі був проведено дослідження впливу халконовмісних калікс[4]аренів С-1012, С-1024 та С-1011 на активність електронно-транспортного ланцюга мітохондрій, процеси транспорту Ca^{2+} через внутрішню мембрану мітохондрій та генерацію активних форм кисню мітохондрійному матриксі. Встановлено, що досліджувані сполуки пригнічують окиснення NADH та FADH_2 в дихальному ланцюзі, гальмують транспортні процеси пов'язані з іонами Ca^{2+} на внутрішній мембрані мітохондрій та значно збільшують генерацію активних форм кисню в ізольованих мітохондріях гладенького м'яза матки. Сила даних ефектів залежала від кількості халконових угруповань на нижньому вінці чаші калікс[4]арену. Отримані результати можуть бути використані для створення селективних модуляторів транспортних і енергетичних процесів в мітохондріях.

Робота написана на 48 сторінках, включає 8 малюнків та 86 літературних джерел.

Ключові слова: халконовмісні калікс[4]арени, мітохондрії, електронно-транспортний ланцюг, транспорт Ca^{2+} .

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	5
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. Огляд літератури	8
1.1. Історія відкриття каліксаренів та їх номенклатура	8
1.2. Фізичні властивості каліксаренів	8
1.3. Хімічні властивості каліксаренів	9
1.4. Біологічна активність каліксаренів	12
1.5. Структура і функції мітохондрій.....	17
1.6. Вплив калікс[4]аренів на біохімічні процеси в мітохондріях.....	21
РОЗДІЛ 2. Матеріали і методи досліджень.....	25
2.1. Виділення фракції мітохондрій міометрія	26
2.2. Реєстрація флуоресценції NADH та FAD в ізольованих мітохондріях	27
2.3. Дослідження утворення активних форм кисню в мітохондріях з використанням флуоресцентного зонду DCF-DA	27
2.4. Дослідження енергозалежної акумуляції і ΔpH -індукованого вивільнення іонів Ca^{2+} у фракції мітохондрій з використанням флуоресцентного зонду Fluo-4 AM.....	28
2.5. Статистична обробка результатів досліджень.....	30
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення	31
3.1. Вплив досліджуваних калікс[4]аренів на окиснення NADH/FADH ₂ в електронно-транспортному ланцюзі ізольованих мітохондрій..	31
3.2. Ефект досліджуваних калікс[4]аренів на генерацію активних форм кисню в ізольованих мітохондріях	32

3.3. Вплив досліджуваних калікс[4]аренів на енергозалежну акумуляцію Ca ²⁺ в ізольованих мітохондріях.....	32
3.4. Дія халконвмісних калікс[4]аренів на ΔpH-залежний вихід Ca ²⁺ з ізольованих мітохондрій.....	34
ВИСНОВКИ.....	36
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	37

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АТР – (англ. Adenosine triphosphate) аденозинтрифосфат

DCF-DA - 2',7'-дихлорофлуоресцеїн діацетат

FAD – (англ. Flavin adenine dinucleotide) флавінаденіндинуклеотид

NAD – (англ. Nicotinamide adenine dinucleotide)
нікотинамідаденіндинуклеотид

PQ – (англ. Paraquat) паракват

БСА – бичачий сироватковий альбумін

ВСТУП

Калікс[4]арени є поліфенольними макроциклічними сполуками, частина з яких володіє біологічною активністю. З точки зору взаємодії з біологічними системами, одним з характерних впливів калікс[4]аренів є модуляція іон-транспортувальних систем у субклітинних структурах [1]. Також, завдяки своїй гідрофобності, калікс[4]арени можуть проникати в живі клітини, взаємодіючи в них з мітохондріями [2].

Мітохондрії є ключовими органелами, які підтримують життєдіяльність клітини. Із основних біохімічних процесів в цих органелах можна виділити роботу електронно-транспортного ланцюга та Ca^{2+} -транспортувальних систем. Дані системи є критичними для біоенергетики не лише мітохондрій, але й усієї клітини [3].

Одними з перспективних модуляторів мітохондрійних процесів є халконовмісні калікс[4]арени. Було показано, що сполуки цього класу можуть змінювати поляризацію мембрани мітохондрій та концентрацію кальцію в матриксі [4]. Такий вплив обумовлений модифікацією нижнього вінця калікс[4]аренів біологічно активними халконовими замісниками, що дозволяє таким сполукам взаємодіяти з мембранними структурами і асоційованими з ними системи та процеси.

Одними функціональних з показників активності дихального ланцюга мітохондрій є рівні NADH/FAD , та їх зміна в часі, що можуть бути визначені методами спектрофлуометрії. Також важливим індикатором стану мітохондрій є концентрація активних форм кисню, якщо може бути відображенна за допомогою DCF-флуоресценції [5-6].

Таким чином, метою представленої роботи було дослідити вплив вибраних калікс[4]аренів на біоенергетичні процеси і транспорт Ca^{2+} в мітохондріях міомерія.

У відповідності до мети були сформовані наступні задачі:

1. Вивчити дію халконовмісних калікс[4]аренів С-1012, С-1024 та С-1011 з різною кількістю замісників по нижньому вінцю каліксаренової чаші на інтенсивність окиснення NADH та FADH₂ в ізольованих мітохондрій гладенького м'яза матки.
2. Дослідити вплив вибраних калікс[4]аренів на генерацію активних форм кисню в мітохондріях.
3. З'ясувати ефекти зазначених сполук на транспорт Ca²⁺ у внутрішній мембрані мітохондрій.
4. Проаналізувати залежність досліджуваних ефектів від кількості халконових угруповань на нижньому вінці чаші калікс[4]арену.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Історія відкриття каліксаренів та їх номенклатура

У 1872 Адольф вон Байер [7] опублікував перші результати щодо продуктів, отриманих у результаті реакції фенолу з формальдегідом. Проте продукти, які він отримав, залишались, по суті, не охарактеризованими майже 70 років. Пізніше в 1940-их роках, циклічні тетрамерні структури були призначенні Зінке і Циглером [8] до речовин отриманих з основно-індукованої реакції *p*-заміщеного фенолу та формальдегіду та Нідерлем і Фогелем [9] до продуктів реакції резорцину з альдегідами, каталізованої кислотою. Більш недавні роботи Гутшех [10, 11] та Холберга [12] надали уявлення про ці процеси, індуковані основою та кислотою, обидва з яких виявились надзвичайно корисними методами синтезу каліксаренів.

Термін «каліксарен» був обраний для опису форми циклічних тетрамерів, коли вони приймають таку конфігурацію, що зараз називається «конусною». Але зараз цей термін використовується для всіх сполук похідних фенолу і резорцину, навіть якщо конус (англ. Calix) більше не описує їх форму. Щоб розділити різні розміри циклоолігомерів, між «калікс» і «арен» вставляється число в дужках. Щоб показати з якого фенолу продукт походить, *p*-замісник пишеться перед назвою. Таким чином, циклічний тетрамер похідний від *p-tert*-бутилфенолу буде називатись *p-tert*-бутилкалікс[4]арен.

1.2 Фізичні властивості каліксаренів

1.2.1 Температура плавлення

Каліксарени мають незвичайно велику температуру плавлення, яка являє собою особливість фенол- і резорцин-похідних циклоолігомерів. Як

приклад, температура плавлення для *p-tert*-бутилкалікс[4]арену – 342-344 °С, *p-tert*-бутилкалікс[6]арену – 380-381 °С, а для *p-tert*-бутилкалікс[8]арену – 411-412 °С. Сильний вплив на температуру плавлення має замісник у *p*-положенні. Як приклад каліксарени отримані з *p-n*-октил до *p-n*-октадецилфенолу [13] мали температуру плавлення до 110 °С. Також ілюстрацією впливу, тонких структурних відмінностей є робота Бомера та співавторів [14]. Вони підготували калікс[4]арени, що містили метильну, *tert*-бутилову, фенільну, та карбетоксигрупу в *p*-позиції. Температури плавлення, що спостерігались для трьох ізомерів, що несли ці заступники в різних розташуваннях навколо верхнього вінця чашечки, становили 185-190°C, 270°C і 368°C.

Дериватизація калікасернів також впливає на температуру плавлення, загалом знижуючи її. За загальним правилом, циклічний олігомер, незалежно від того, дериватизований він чи ні, плавиться вище, ніж його аналогічний лінійний олігомер.

1.2.2 Розчинність

Іншою особливістю каліксаренів є їх нерозчинність у воді, і дуже низька розчинність в органічних розчинниках. Таким ж чином як *p*-замісники впливають на точки плавлення, вони також можуть значно змінити розчинність сполуки. Ті замісники які знижують температуру плавлення, як правило, підвищують розчинність в органічних розчинниках. Дериватизація також може різко змінити характеристики розчинності каліксаренів, навіть роблячи їх розчинними у воді [15].

1.3 Хімічні властивості каліксаренів

Якщо розглядати каліксарен в конформації конуса, можна розрізнити два вінця (Рис. 1.1): нижній вінець де знаходяться гідроксильні групи, і верхній вінець на протилежній стороні. В центрі знаходиться кільцева система з ароматичних кілець. Крім того верхній вінець більше нижнього.

Молекулярні розміри порожнин варіюються в залежності від кількості ланок ароматичних сполук.

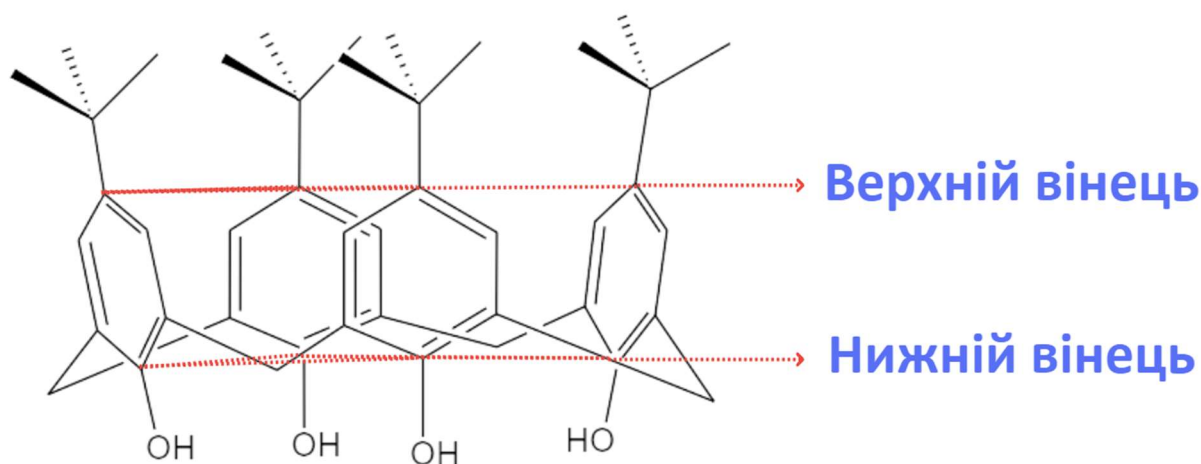


Рис. 1.1 Верхній і нижній вінци калікс[4]аренової чаши

Каліксарени можуть бути функціоналізовані по верхньому або нижньому вінцю, такими групами як: амідні, імінові, сірчисті, алкільні, семікрабазонові, азо-групи. З утворенням великою кількістю сполук різними властивостями впізнавання, селективності, розчинності і ступеню гідрофобності [16]. Останній аспект особливо важливий, оскільки з введенням полярних груп в каліксарени можна сконструювати амфіфільні макроцикли з гідрофільною головою та гідрофобним хвостом, як можуть самозбиратися в міцели, везикули, ліпосоми і інші агрегати, корисні для перенесення ліків [17].

Гідроксильні групи на нижньому вінцю є сайтами для включення інших мотивів за допомогою реакцій з електрофілами, прикладами яких є О-ацилювання і О-алкілювання. Для верхнього вінця були здійснені майже всі можливі звичайні заміни фенолів і фенольних ефірів, наприклад, галогенування, нітрування, сульфування, сульфохлорування та з'єднання з солями діазонію [18]. Метиленові містки можуть бути бромовані *N*-бромосукцимідом, щоб підготувати великий масив метилен-модифікованих похідних [19]. Заміщенні в метиленових містках каліксарени можуть також бути отримані через поетапний синтез [20].

Також можливо замінити карбон в метиленових містках на інші атоми, такі як сульфур і кисень [21]. Контроль за кількістю та положенням введених замісників дозволяє синтезувати велику кількість похідних каліксаренів [18, 22-24]. Тим більше, розглядаючи регульований каркас і контрольовану конформацію можна створити велику молекулярну бібліотеку похідних каліксаренів, як матеріальну базу для біомедичних досліджень.

Також, заглибини в структурі каліксаренів можуть забезпечувати велику кількість нековалентних (гідрофобні, π - π стекинг, катіон- π і CH - π) взаємодій [25], тоді як їх конформації можна зберігати мобільними для використання індукованого пристосування, або точно їх заблокувати в попередньо організованих структурах для більш специфічного зв'язування [26-27]. Каліксарени можуть розпізнавати гостей різного розміру, наприклад, калікс[4]арени підходять для гостей не великих розмірів, тоді як калікс[8]арени для більших. Крім того, впізнавальні властивості каліксаренів залежать значною мірою від приєднаних до них груп. Як приклад, додавання негативно заряджених сульфонатних або карбоксильних груп, забезпечує електростатичний, а також, водневий зв'язок в місцях взаємодії, приводячи до сильної афінності до катіонних гостей [28-30]. Навпаки, каліксарени модифіковані, позитивно, зарядженими одиницями гуанідинію, міцно зв'язують різні органічні та неорганічні аніони [31]. Також, впізнавальні властивості каліксаренів обумовлюються не тільки наявністю порожнин. Модифікація каркасів каліксаренів індивідуальними лігандами для досягнення поданодобібних структур, також грає роль в молекулярному впізнаванні [32]. Таким чином, варіабельність каркасів, конформацій і замісників дозволяє каліксаренам зв'язувати широкий спектр гостей, таких як неорганічні катіони та аніони, органічні катіони та аніони, нейтральні органічні сполуки, біологічні макромолекули[33-38].

1.4 Біологічна активність каліксаренів

1.4.1 Біохімічні та фізіологічні аспекти можливого застосування каліксаренів

Описана в минулих підрозділах здатність каліксаренів зв'язувати широкий спектр молекул, обґрунтовує великий потенціал цих сполук у сфері впливу на біологічні системи. Нижче описані основні варіанти біологічної активності каліксаренів.

Одним з векторів досліджень біологічної активності каліксаренів є їх вплив на АТР-гідролазні системи в якості інгібітора. У одному з численних досліджень, присвячених цій темі, було показано, що калікс[4]арен С-97 інгібує АТРазну активність субфрагмента-1 міозину міометрія, а також спричинює значне зростання гідродинамічного діаметра молекули субфрагмента-1. Це опосередковано свідчить про формування міжмолекулярного комплексу між каліксареном та міозиновою голівкою [39].

Також запатентований метод інгібування L-лізилоксидази парасульфонато-калікс[6]ареном, що є можливим способом лікування загоювання шкіри. Це пов'язано з тим, що цей фермент відповідає за створення ковалентних зв'язків між макромолекулами міжклітинного матриксу. Його надмірне відкладання є одним з факторів фібролітичних захворювань, тому інгібування L-лізилоксидази є потенційним методом лікування таких захворювань. З переліку інгібіторів цього ферменту каліксарени є найменш токсичними. Інгібування ензиму пояснюється авторами патенту взаємодією латеральних ланцюгів основних амінокислот активного центру та сульфонатних груп каліксарену [40].

Іншою особливістю каліксаренів є здатність взаємодіяти з мембранами та утворювати в них канали. Наприклад, було показано, що тетраметокси(тіа)каліксарен може бути використаний як замітник аквапорина для моделювання водного транспорту через мембрану [41].

Крім того, *tert*-бутилкалікс[4]арен, поєднаний з чотирма характеристичними трипептидами калієвих каналів, може модулювати селективний фільтр для іонів K^+ та їх переміщення [42].

Мембранотропні властивості каліксаренів були виявлені на рівні катіонтранспортних систем природних мембран. *p*-Сульфonatoкаліксарени є потужними інгібіторами потенціал-залежних хлорних каналів [43], а тетрасульфonatoкаліксарени спричиняють швидке блокування потенціал-залежних аніонних каналів ендотеліальних клітин при позитивному потенціалі [44].

Також на основі каліксаренів були розроблені сполуки з різними біологічними властивостями, які успішно продемонстровані як і на клітинах, так і на рівні організму. Наприклад, тетраондротин-сульфаткалікс[4]резорциноларен створено як аналог протеогліканів та блокує фібронектин-опосередковану адгезію клітин [45].

Каліксарени також можуть виступати як молекулярна основа штучних ензимів. Наприклад, водорозчинний калікс[4]арен-тетрасульфонат каталізує гідроліз АТФ [46], а метал-вмістні каліксарени здатні каталізувати гідроліз та трансестерифікацію ефірів фосфорних кислот [47].

1.4.2 Токсичність каліксаренів

На даний момент, цитотоксичність, гемолітична та запальна активність, метаболізм, та інші властивості деяких похідних каліксаренів добре дослідженні [28, 48]. Токсичність каліксаренів залежить від доданих груп і в наслідок цього може бути регульована відповідно.

Більшість каліксаренів не є токсичними [27]. Якщо розглядати окремі випадки, *p*-сульфонатокалікс[*n*]арени є розповсюдженим сімейством водорозчинних похідних каліксаренів з численними біомедичними застосуваннями, які тривалий час досліджувались на предмет токсичності. В 2008 році, Коулман та ін. Дослідили *in vivo* токсичність *para*-

сульфонатокалікс[4]арену, і виявили, що він не виявляє токсичності на мишах в дозах до 100 мг/кг [49]. Також, в іншому дослідженні, за допомогою аналізів інгібування росту *in vitro* на клітинах раку яєчників людини ця ж сполука не проявляє цитотоксичності в концентраціях до 1.5 мМ [50]. Іншою перспективною групою каліксаренів є похідні *p*-фосфонової кислоти, які можуть самостійно збиратись в нановолокна та структури схожі на клітинний фосоліпідний бішар. Данлоп та ін. показали що відповідні сполуки які несуть гідроксильну групу, або алкільний ланцюг різної довжини на нижньому вінці, майже не мають токсичності [51]. Автори дослідили вплив цих сполук на життєздатність клітин PC12 щурів, показуючи, що ніякого ефекту не спостерігалось при концентраціях до 1 мг/мл.

Токсичність деяких похідних каліксаренів може бути корисна в окремих випадках. Себті і Гамільтон відзначили значну цитотоксичність похідних калік[4]аренів які можуть інгібувати ріст пухлин і ангіогенез [52]. Віола та ін. показали що калікс[8]арени які несуть N-ацетил-D-глюкозаміну групу, інгібують міграцію та проліферацію клітин гліоми, і, таким чином, є потенційно новим протипухлинним препаратом [53].

Токсичність каліксаренів являє собою двосічний меч. Обидва, токсичні і нетоксичні похідні корисні в залежності від їх використання. Нетоксичні каліксарени можуть бути використанні, наприклад, для поставки ліків. В той час як токсичні каліксарени можуть діяти на уражені тканини. Також є сфери використання каліксаренів, які не ставлять обмежень на токсичність, наприклад *in vitro* сенсорика.

***1.4.3* Можливість застосування каліксаренів в медицині**

Крім того що макроцикли використовуються як допоміжні речовини, вони теж можуть бути використані як самостійно терапевтичні агенти. Тобто макроциклічні молекули, які не несуть ніяких енкапсульованих чи

ковалентно зв'язаних фермацептичних агентів можуть проявляти біомедичну активність. На відміну від прикладів біологічної активності каліксаренів, які були наведені в минулому підрозділі, нижче буде описано саме приклади біоактивності, які мають потенційно терапевтичне застосування.

Повідомлялося, що численні каліксарени виявляють антибактеріальну та/або протигрибкову дію [54]. Велика кількість замісників пояснює різноманітність способів знищення бактерій та грибків, наприклад через дезорганізацію мембрани, пошкодження ДНК, інгібування реплікації ДНК. Також проводились дослідження на наявність антивірусної активності каліксаренів, як приклад, проти вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ). Ренгуф-де-Вен та ін. синтезували дев'ять похідних каліксаренів і вивчали їх анти-ВІЛ властивості та цитотоксичність [55]. Більшість з досліджених сполук мали антивірусні властивості в концентраціях 10-50 мкМ, і не проявляли цитотоксичність в концентраціях до 100 мкМ. Іншим видом протівірусної дії каліксаренів є інгібування ВІЛ регулюючи пов'язані з ним білки. Луо та ін. створили серію базованих на калікс[4]аренах β -дикето похідних, які здатні інгібувати інтегразу ВІЛ з IC_{50} 5,9-21,2 мкМ [56]. Результати молекулярного докінгу дозволяють припустити, що макроциклічні скелети калікс[4]аренів зв'язуються з гідрофобною порожниною в прототиповому активному центрі інтегрази пінистого вірусу.

Каліксарени широко досліджуються як протипухлинні агенти. В основному вони діють як інгібітори синтезу ДНК, антагоністи ангіогенезу, супресори онкогенів і регулятори пухлинних генів супресії [53, 57-58]. Як приклад, Ян та ін. підготували серію полігідроксиаміно похідних каліксаренів, і вивчали їх протипухлинну активність на шести клітинних лініях [59]. Значення IC_{50} деяких похідних варіювалось від 1,6 до 11,3

мкМ. Аналіз клітинного циклу показав зупинку клітинного циклу в SKOV3 на стадії G0/G1.

Похідні каліксаренів потенційно можуть використовуватись для детоксикації. Лю та ін. повідомили, що р-сульфокалік[п]арени потенційно можуть використовуватися для клінічного лікування отруєння віологенами через їх сильну спорідненість з віологенами, прикладом цього є тести на мишах з паракватом (PQ), типовим віологеном [60]. Результати показали що досліджувані сполуки значно зменшили смертність отруєних мишей. Комплексоутворення між каліксаренами і PQ ускладнювало взаємодію останнього з відновниками в клітинах і утворення катіонів-радикалів. Крім того р-сульфокалік[п]арени можуть дезактивувати радикали та зв'язувати іони перехідних металів, пригнічуючи утворення $\text{HO}\cdot$, що говорить про те що вони, можливо, є скавенджерами вільних радикалів. Що ще важливіше, коли макроциклічні сполуки було введено на 1 годину пізніше, ніж PQ, не спостерігалось смертності, оскільки їх біорозподіл в крові досягається швидше, ніж у PQ, що дає пацієнтам час для звернення за медичною допомогою.

Як зазначалося раніше, каліксарени можуть взаємодіяти з багатьма молекулами, включаючи білки, регулюючи їх структуру і функцію. Дослідження пригнічення фібриляції амілоїду, яка пов'язана з широким спектром захворювань (хвороба Альцгеймера хвороба, хвороба Паркінсона, цукровий діабет II типу), можна виділити як перспективну нішу застосування каліксаренів пов'язану з їх можливістю взаємодії з білками. Амілоїдний стан білка - це високо впорядкований агрегат, в якому поліпептидні ланцюги мають фібрилярну структуру. Сан та ін. повідомили, р-сульфокалік[п]арени ефективно затримували фібриляцію амілоїду- β ($\text{A}\beta_{42}$), що є ознакою хвороби Альцгеймера, і знижували цитотоксичність. Ці каліксарени зв'язували $\text{A}\beta_{42}$ з константами асоціації порядку 100 M^{-1} . Найвищу ефективність продемонстрував р-

сульфокалікс[8]арен через те що він має більший і більш гнучкий конус, що приводить до сильнішої взаємодії $A\beta_{42}$ ніж з p-сульфокалікс[4]арену та p-сульфокалікс[6]арену [61].

Отже, каліксарени демонструють широкий спектр біологічної активності, і дослідження в цього напрямку відкривають багато перспектив їх застосування.

1.5 Структура і функції мітохондрій

1.5.1 Будова мітохондрій

Мітохондрії (від грец. mitos — нитка і chondron — зерня) – це паличкоподібні, ниткоподібні, округлі або овальні клітинні органели, які належать до енергогенеративної системи еукаріотичної клітини.

Основні компоненти мітохондрій включають: зовнішню мітохондріальну мембрану, міжмембранний простір, внутрішню мітохондріальну мембрану та матрикс.

Зовнішня мітохондріальна мембрана складається з численних інтегральних білків - поринів, які мають відносно широкий внутрішній канал (приблизно 2-3 нм) і допускають проходження молекул масою до 5000 Да. Великі молекули можуть перетинати зовнішню мембрану лише через активний транспорт.

Міжмембранний простір знаходиться між зовнішньою та внутрішньою мембранами мітохондрій та має ширину приблизно 10-20 нм. Його іонний склад відрізняється незначно від цитоплазми, оскільки зовнішня мембрана мітохондрії проникна для малих молекул та іонів. В той же час білкові компоненти периплазматичного простору та цитоплазми відрізняються, тому що для транспортування великих білків необхідні специфічні сигнальні пептиди [62].

Внутрішня мітохондріальна мембрана містить білки з чотирма видами функцій: 1) білки дихального ланцюга 2) АТР-синтаза 3) специфічні транспортні білки 4) системи імпорту білків [63].

Матрикс – це простір обмежений внутрішньою мембраною. Він містить власний широкий набір ферментів, мітохондріальні рибосоми, тРНК та декілька копій мітохондріальної ДНК. Головні функції ферментів включають окиснення пірувату і жирних кислот, та цикл трикарбонових кислот [64].

1.5.2 Системи трансмембранного обміну Ca^{2+} в мітохондріях

Системи трансмембранного обміну Ca^{2+} в мітохондріях відіграють ключову роль у регуляції мітохондріальної функції та клітинного гомеостазу Ca^{2+} . Основними молекулярними компонентами, що забезпечують транспорт кальцію через мітохондріальну мембрану, є мітохондріальний кальцієвий уніпортер (MCU), мітохондріальний Na^+ - Ca^{2+} - Li^+ обмінник; (NCLX), мітохондріальний H^+ / Ca^{2+} обмінник (LETM1) та вольтаж-залежний аніонний канал (VDAC) [65].

MCU є основним каналом впуску кальцію в мітохондрію, який відповідає за швидкий та ефективний транспорт Ca^{2+} в мітохондріальний матрикс. MCU регулюється рядом білків-супутників, включаючи EMRE, MCUR1, MCUb, MICU1 та MICU2, які формують мітохондріальний кальцієвий комплекс [66-68].

З іншого боку, NCLX є основним механізмом транспорту кальцію з мітохондрій, який забезпечує обмін іонів кальцію на натрій у мітохондріях. NCLX відповідає за повернення Ca^{2+} з мітохондріального матриксу назад у цитозоль клітини, тим самим забезпечуючи гомеостаз Ca^{2+} та запобігаючи кальцієвому перенавантаженню [69].

LETM1 також допомагає виводити кальцій з мітохондрії в обмін на протони. Цей механізм більш повільний, ніж NCLX, він грає допоміжну

роль при боротьбі з тривалими або помірними кальцієвими навантаженнями [70].

Потенціал-залежний аніонний канал (VDAC) є іншим важливим компонентом трансмембранного обміну Ca^{2+} в мітохондріях. VDAC розташований у зовнішній мітохондріальній мембрані та відповідає за транспорт різних метаболітів, нуклеотидів та іонів, включаючи Ca^{2+} , між мітохондрією та цитозолем [71].

Відомо, що мітохондріальний кальцій бере участь у активації декількох ферментів, таких як дегідрогенази, які відіграють ключову роль у метаболічних шляхах [72]. Таким чином, трансмембранний обмін Ca^{2+} між мітохондріями та цитозолем має важливе значення для енергетичного балансу клітини та забезпечення відповідного рівня кальцію для активації різних метаболічних процесів.

Трансмембранний обмін Ca^{2+} також впливає на апоптичні сигнальні шляхи. Зокрема, надмірне надходження кальцію в мітохондрії може призвести до активації каспаз, що спричиняє апоптоз клітин [73]. З цієї причини, системи трансмембранного обміну Ca^{2+} в мітохондріях відіграють важливу роль у визначенні долі клітини та контролі апоптозу.

В цілому, системи трансмембранного обміну Ca^{2+} в мітохондріях відіграють суттєву роль у регуляції клітинного метаболізму, сигналізації та апоптозу. Вони також забезпечують тісний зв'язок між клітинними сигнальними системами та мітохондріями, що дозволяє підлаштовувати активність процесів в мітохондріях відповідно до змін у внутрішньому та зовнішньому середовищі клітини [74].

1.5.3 Дихальний ланцюг мітохондрій і H^+ -АТФ-аза

Внутрішня мембрана мітохондрій містить систему біологічного окислення, яка відповідає за дегідратацію органічних субстратів та послідовне перенесення редуруючих еквівалентів на кисень через ряд

проміжних переносників - електронних та протонних транспортерів. Ця система впорядкована у вигляді електронно-транспортного ланцюга або дихального ланцюга мітохондрій [75].

Дихальний ланцюг включає три білкових комплекси (комплекси I, III і IV), вбудованих у внутрішню мітохондріальну мембрану, і дві рухливі молекули-переносники – убіхінон (кофермент Q) і цитохром с. Сукцинатдегідрогеназа, що належить власне до цитратного циклу, також може розглядатися як комплекс II дихального ланцюга [76].

Комплекс I, також відомий як NADH дегідрогеназа, є першим комплексом в дихальному ланцюзі мітохондрій. Комплекс I каталізує окиснення NADH до NAD⁺ і передачу електронів до убіхінону, перетворюючи його в убіхінол. В результаті цієї реакції, протони переносяться через внутрішню мембрану мітохондрій, створюючи протонний градієнт, який використовується для синтезу АТФ [77].

Комплекс II, відомий як сукцинат-убіхінон оксидоредуктаза або сукцинат дегідрогеназа, являє собою другий комплекс дихального ланцюга мітохондрій. Він бере участь в циклі Кребса, каталізуючи окиснення сукцинату до фумарату, одночасно переносячи електрони на убіхінон. Відмінність комплексу II від інших комплексів полягає в тому, що він не транспортує протони через мембрану [78].

Комплекс III, також називається убіхінон-цитохром с оксидоредуктазою або цитохром bc₁ комплексом, є третім комплексом в електронно-транспортному ланцюзі. Цей комплекс передає електрони від убіхінолу до цитохрому с, одночасно переносячи протони через внутрішню мембрану мітохондрій [79].

Комплекс IV, відомий як цитохром с оксидаза, представляє собою четвертий та останній комплекс дихального ланцюга мітохондрій. Він каталізує перенесення електронів від цитохрому с до молекули кисню, реагуючи з двома протонами для утворення води. Комплекс IV також

переносить протони через внутрішню мембрану мітохондрій, підтримуючи протонний градієнт, необхідний для синтезу АТФ. В результаті цієї послідовності реакцій, споживається кисень, а вода утворюється як кінцевий продукт [80].

Вище перераховані ферменти дихального ланцюга забезпечують окислювальні реакції, за рахунок чого відбувається транслокація протонів (H^+) на зовнішній бік внутрішньої мітохондріальної мембрани. Таким чином протони, накопичуючись на зовнішньому боці мембрани, створюють по обидва боки мембрани різницю електрохімічних потенціалів.

Власне цю різницю потенціалів використовує H^+ -АТРаза для синтезу АТР з АDР і P_i . Синтез АТР здійснюється при транслокації протонів за градієнтом їх електрохімічного потенціалу через АТР-синтазу. В зворотній реакції вона може використовувати гідроліз АТР для генерації електрохімічного трансмембранного потенціалу протонів ($\Delta\mu_{H^+}$), транспортуючи протони через мембрану проти градієнта їх концентрації. АТРаза активність залежить від балансу між рівнем електрохімічного градієнта протонів, який визначає величину вільної енергії транслокації протонів через мембрану за їх градієнтом, та співвідношенням концентрації АТР до АDР + P_i , що визначає величину вільної енергії синтезу АТР [81].

Отже, мітохондрії є перспективним об'єктом дослідження впливу каліксаренів на біологічні системи.

1.6 Вплив калікс[4]аренів на біохімічні процеси в мітохондріях.

На даний момент, мітохондрії є одним з центральних об'єктів дослідження впливу каліксаренів на біологічні процеси. Широкі можливості хімічної модифікації, які надають каліксарени, робить їх перспективними спрямованими ефекторами ензимів. Показано,

модифіковані каліксарени модулюють активність катіон-транспортних АТРаз в гладеньком'язових клітинах матки [1].

Добре дослідженими в плані впливу на функціональні характеристики мітохондрій є калікс[4]арени С-956 та С-90, які є аналогами [1]. Незважаючи на їх хімічну подібність, дані сполуки мають різний вплив на процеси в мітохондріях. Наведемо декілька прикладів зміни характеристик роботи мітохондрій за дії цих сполук. Було показано, що С-90 в концентрації 100 мкМ знижує енергозалежну акумуляцію іонів Ca^{2+} в мітохондріях, в той же час, С-956, відповідної концентрації, не впливає на цей процес. С-956 ефективно блокує ΔpH -залежний вихід Ca^{2+} з ізольованих мітохондрій, хоча С-90 такої активності не проявляє [1].

Наведені вище результати, в сукупності з іншими дослідженнями [82], ще раз підкреслюють виражену специфічність вплив окремих представників калікс[4]аренів на катіон-транспортні системи мітохондрій залежно від їх будови.

Також існують дані стосовно впливу калікс[4]арену С-956 на NO-синтазну активність ізольованих мітохондрій. При концентрації досліджуваної сполуки 50 мкМ, спостерігалось збільшення синтезу NO мітохондрійною NO-синтазою у 2.5 разів. Даний ефект можна пояснити як і безпосереднім впливом С-956 на ензим чи електронно-транспортний ланцюг, так і впливом високої концентрації Ca^{2+} в матриксі, зумовленої гальмуванням ΔpH -залежним вивільненням цього катіону [1].

Наразі відомо, що оксид азоту є ефектором низки процесів в мітохондріях, включаючи регуляція активності комплексів дихального ланцюга [83]. Тому, можна припустити, що модулюючи активність NO-синтази, С-956 впливає на функціонування електронно-транспортного ланцюга.

Розглядаючи вплив інших представників калікс[4]аренів на процеси в мітохондріях, можна згадати сполуки С-97, С-99 та С-107. Досліджено,

що дані речовини викликають транзйентну поляризацію внутрішньої мембрани мітохондрій, але з часом електричний потенціал повертається до контрольних значень. Ще одним ефектом їх впливу є зниження концентрації Ca^{2+} в матриксі через пригнічення енергозалежної акумуляції іонів кальцію. Також, було показано, що С-97 та С-99 здатні стимулювати ΔpH -залежний вихід Ca^{2+} з мітохондрії гладенького м'яза матки. При цьому згаданні калікс[4]арени не спричиняють посилення генерації активних форм кисню, тобто не ініціюють розвиток оксидативного стресу [1].

Також, існують дані про стимуляцію акумуляції іонів Ca^{2+} в мітохондріях клітин міометрія калікс[4]ареном С-91. В той же час калікс[4]арен С-91 не впливає на накопичення Ca^{2+} в саркоплазматичному ретикулумі і не чинить вплив на активність кальцієвих pomp плазматичної мембрани [84].

Халконовмісні калікс[4]арени С-136, С-137, С-138 також мають вплив на акумуляцію іонів Ca^{2+} в матриксі мітохондрій. Загалом спостерігається збільшення накопичення Ca^{2+} , при чому ефект досліджуваних калісаренів зростає при збільшенні Ca^{2+} -акумулюючої активності самих мітохондрій [85].

Ще одним біологічно активним калікс[4]ареном є С-1193. Який за хімічною природою є тіакалікс[4]ареном, і має вищу реакційну здатність через нуклеофільні властивості сірки. Наведений калікс[4]арен пригнічує окиснення NADH та FADH_2 , що може свідчити про прямий вплив на електронно-транспортний ланцюг [1].

Отож, існує ряд калікс[4]аренів, зокрема халконовмісних, які є перспективними регуляторами гомеостазу Ca^{2+} та активності електронно-транспортного ланцюга в мітохондріях. Дослідженню можливого впливу їхніх вибраних представників на ефективність функціонування електронно-транспортного ланцюга, генерацію активних форм кисню та

транспорт Ca^{2+} в мітохондріях міомерія присвячена експериментальна частина роботи.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

В експериментах використовувались статевозрілі нелінійні невагітні білі щури віком 2 місяці. Середня маса тіла щурів і матки сягали 200 г і 300-600 мг відповідно. Для проведення наркозу тварин витримували у збагачені парами хлороформу камері, після чого їх декапітували.

При роботі з лабораторними тваринами було дотримано всіх вимог, які зазначенні 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.

Хаклоновмісні калікс[4]арени були синтезовані та охарактеризовані із використанням методів ЯМР та інфрачервоної спектроскопії у відділі хімії макроциклічних сполук Інституту органічної хімії НАН України під керівництвом академіка НАН України Кальченка В.І.. В дослідженнях використано наступні сполуки (рис. 2.1):

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

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

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

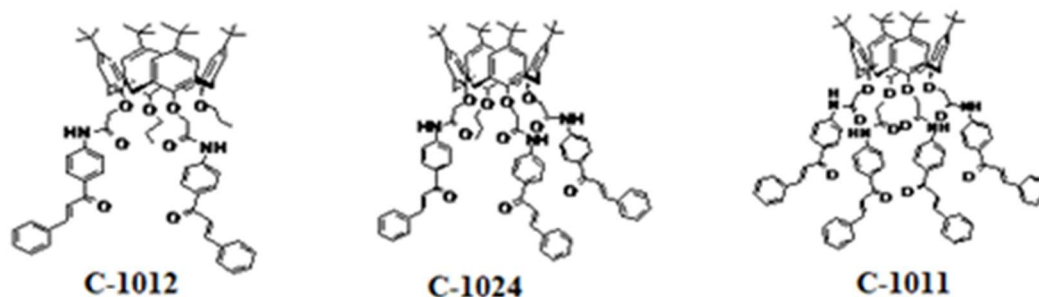


Рис. 2.1. Структурні формули досліджуваних хаклоновмісних калікс[4]аренів

Калікс[4]арени розчиняли в DMFA (диметилформаїд) та вносили аліквоту 10 мкл безпосередньо в середовище інкубації при концентрації розчинника не вище 0,5%. В контролі DMFA у зазначеній концентрації не чинив впливу на досліджувані параметри. Концентрація халконовмісних калікс[4]аренів в дослідах становила 10 мкМ. При вивченні впливу досліджуваних сполук на енергозалежну акумуляцію Ca^{2+} , тривалість преінкубації мітохондрій з ними становила 3 хв.

2.1 Виділення фракції мітохондрій міометрія

Видалену матку щура очищали від залишків жирової та сполучної тканин і вміщували 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). Проводили три цикли гомогенізації по 20 секунд кожен із охолодженням на льоду після кожного циклу.

Гомогенат переносили у центрифужну пробірку і центрифугували при 1000 g та температурі 4°C протягом 15 хв. Після завершення циклу, супернатант відбирали і центрифугували при 12000 g та температурі 4°C протягом 15 хв. Отриманий осад ресуспендували у буфері виділення. Після цього знову центрифугували при 12000 g та температурі 4°C протягом 15 хв.

Отриману 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 до 100 мл буфера.

Вміст протеїну у фракції мітохондрій визначали стандартним методом М. Bradford за його реакцією з реактивом Coomassie Brilliant Blue G-250 [86]. Середнє значення вмісту протеїну складало 2 мг/мл.

2.2 Реєстрація флуоресценції NADH та FAD в ізольованих мітохондріях

Реєстрація флуоресценції NADH/FAD в мітохондріях проводилась за допомогою спекрофлуориметру PFI 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; від FAD - при $\lambda_{зб} = 450$ нм, $\lambda_{фл} = 533$ нм.

Для дослідження використовували середовище 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

Як барвник, специфічний до активних форм кисню використовували проникний через мембрану зонд DCF-DA (2',7'-дихлорофлуоресцеїн діацетат).

Навантаження мітохондрій DCF-DA у концентрації 25 мкМ проводили в середовищі яке містило: 10 мМ HEPES (pH = 7,4, t = 25°C),

250 мМ цукроза, 0,1% БСА, протягом 30 хвилин при температурі 25°C. Для покращення процесу навантаження барвник змішували із Pluronic® F-127 (0,02%).

Утворення активних форм кисню в дослідному зразку, вивчали із використанням методу протокової цитофлуориметрії на протоковому цитометрі COULTER EPICS XL™ (Beckman Coulter, США), що обладнаний аргонним лазером ($\lambda_{36} = 488$ нм) із використанням програмного забезпечення SYSTEM II™ (Beckman Coulter, США).

Для характеристики фракції ізольованих мітохондрій міометрія за флуоресценцією зонду DCF-DA використовували робочий протокол аналізу зразків. 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 досліді, мало наступний склад: 20 мМ HEPES (pH = 7,4, 25°C), 2 мМ K⁺-фосфатний буфер (pH = 7,4, 25°C), 25 мМ KCl, 25 мМ NaCl, 5 мМ піруват натрію, 5 мМ сукцинат натрію.

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

2.4 Дослідження енергозалежної акумуляції і ΔpH-індукованого вивільнення іонів Ca²⁺ у фракції мітохондрій з використанням флуоресцентного зонду Fluo-4 AM

Fluo-4 AM (C51H50F2N2O23) – це Ca²⁺-чутливий флуоресцентний зонд, який має високу афінність до йонів Ca²⁺.

Модифікація Fluo-4 ацетоксиметильними естерними групами дозволяє йому проникати крізь мембрану, де ендогенні естерази

відщеплюють ці функціональні групи, і зонд стає непроникним через мембрану.

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

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

Середовище, з якого здійснювалася енергозалежна акумуляція йонів Ca^{2+} у матриксі мітохондрій, мало наступний склад: 20 мМ HEPES (pH = 7,4, t = 37°C), 2 мМ K^+ -фосфатний буфер (pH = 7,4, t = 37°C), 250 мМ цукроза, 3 мМ MgCl_2 , 3 мМ АТР, 5 мМ сукцинат натрію. Концентрація Ca^{2+} становила 80 мкМ.

При дослідженні ΔpH -індукованого вивільнення йонів Ca^{2+} енергозалежну акумуляцію Ca^{2+} проводили протягом 5 хв, після чого 100 мкл аліквоти суспензії розводили в середовищі вивільнення Ca^{2+} об'ємом 2 мл наступного складу: 20 мМ HEPES (pH = 6,5-7,5, t = 37°C), 2 мМ K^+ -фосфатний буфер (pH = 6,5-7,5, t = 37°C), 250 мМ цукроза, 5 мМ сукцинат натрію, 5мкМ цилкоспорин А.

2.5 Статистична обробка результатів досліджень

Статистичні розрахунки проводили за допомогою програмного забезпечення MS Office Excel.

Середнє арифметичне M обчислювали за формулою: $M = \frac{\sum x_i}{n}$, де 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 від 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: $t = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}}$. За достовірні

приймались результати, в яких значення рівня значущості $P < 0.05$.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Вплив досліджуваних калікс[4]аренів на окиснення $NADH/FADH_2$ в електронно-транспортному ланцюзі ізольованих мітохондрій.

Результати вимірювання флуоресценції $NADH$ показали, що халконовмісні калікс[4]арени С-1012, С-1024 та С-1011 пригнічують окиснення $NADH$ в ізольованих мітохондріях (рис.3.1А), при чому даний ефект не залежить від кількості халконових замісників.

При дослідженні впливу досліджуваних сполук на окиснення $FADH_2$, у експериментах з сполуками С-1012 і С-1011 спостерігалось зменшення флуоресценції FAD порівняно з контролем (рис. 3.1Б). Ці дані можуть свідчити про гальмування окиснення $FADH_2$ в дихальному ланцюзі за дії вибраних калікс[4]аренів. Що, в свою чергу, говорить про пригнічення його роботи. Халконовмісний калікс[4]арен С-1024 не продемонстрував ніякого впливу на флуоресценцію FAD порівняно з контролем.

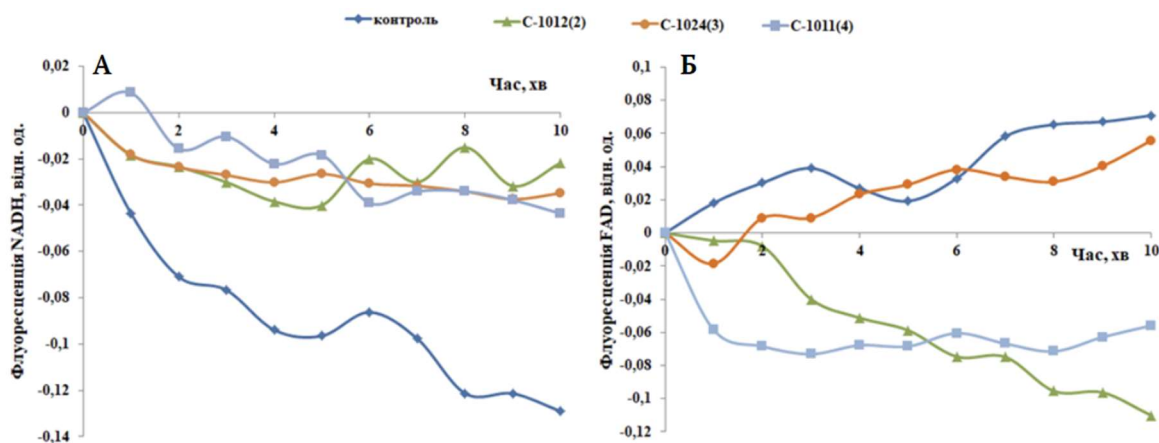


Рис. 3.1 Вплив калікс[4]аренів з халконовими замісниками на інтенсивність окиснення $NADH$ (А) та $FADH_2$ (Б) в ізольованих мітохондріях: результати характерного експерименту. На цьому та наступних рисунках кількість халконових замісників вказана в дужках.

3.2 Ефект досліджуваних калікс[4]аренів на генерацію активних форм кисню в ізольованих мітохондріях

Отримані дані свідчать про підвищення генерації активних форм кисню при дії досліджуваних хаконовмісних калікс[4]аренів порівняно з контролем. Даний ефект може бути наслідком інгібування комплексів електронно-транспортного ланцюга. На наведених графіках результатів досліджень (рис. 3.2), видно, що присутня позитивна кореляція між посиленням утворення активних форм кисню та кількістю хаконовмісних угруповань.

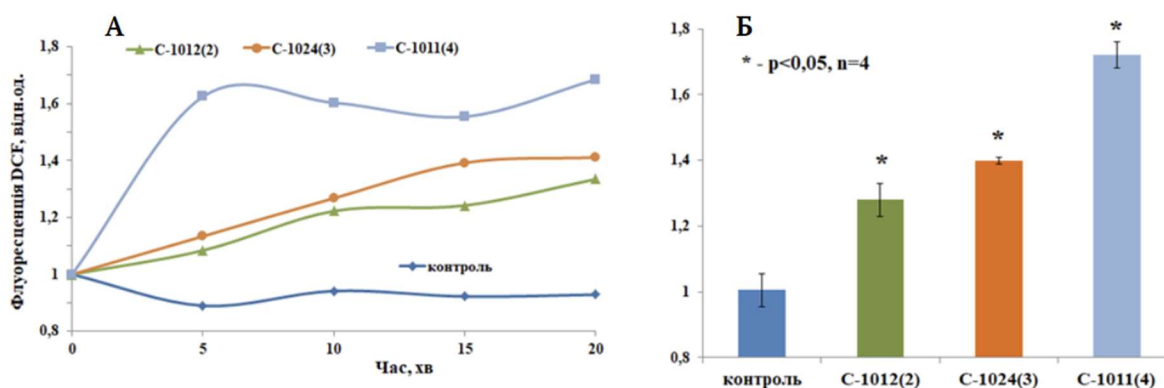


Рис. 3.2 Дія хаконовмісних калікс[4]аренів на утворення активних форм кисню в ізольованих мітохондріях. Дані характерного дослідження (А) та статистична обробка одержаних результатів (Б), $M \pm m$, $n=4$, * - зміни достовірні відносно контролю, $P < 0,05$

3.3 Вплив досліджуваних калікс[4]аренів на енергозалежну акумуляцію Ca^{2+} в ізольованих мітохондріях.

Калікс[4]арени С-1012, С-1024 та С-1011 з однаковою ефективністю гальмують енергозалежну акумуляцію іонів Ca^{2+} в ізольованих мітохондріях (рис. 3.3). Що свідчить про відсутність ефекту кількості хаконовмісних замісників на цей феномен.

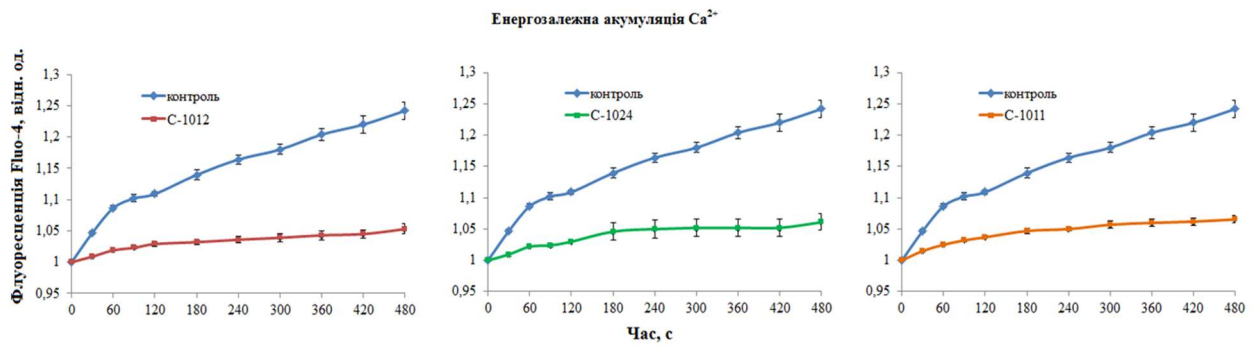


Рис. 3.3 Ефекти халконовмісних калікс[4]аренів на енергозалежну акумуляцію Ca^{2+} в ізольованих мітохондріях, $M \pm t$, $n=4$, всі зміни достовірні відносно контролю, $P < 0,05$

Подальший аналіз динаміки процесу дає змогу помітити зменшення швидкості накопичення Ca^{2+} з часом з подальшим виходом кривої графіку на плато (рис. 3.3, 3.4А). Використовуючи спеціальні координати (рис. 3.4Б), розраховані такі кінетичні параметри транспортного процесу, як початкова швидкість акумуляції Ca^{2+} (V_0) та час напівмаксимальної акумуляції Ca^{2+} ($\tau_{1/2}$).

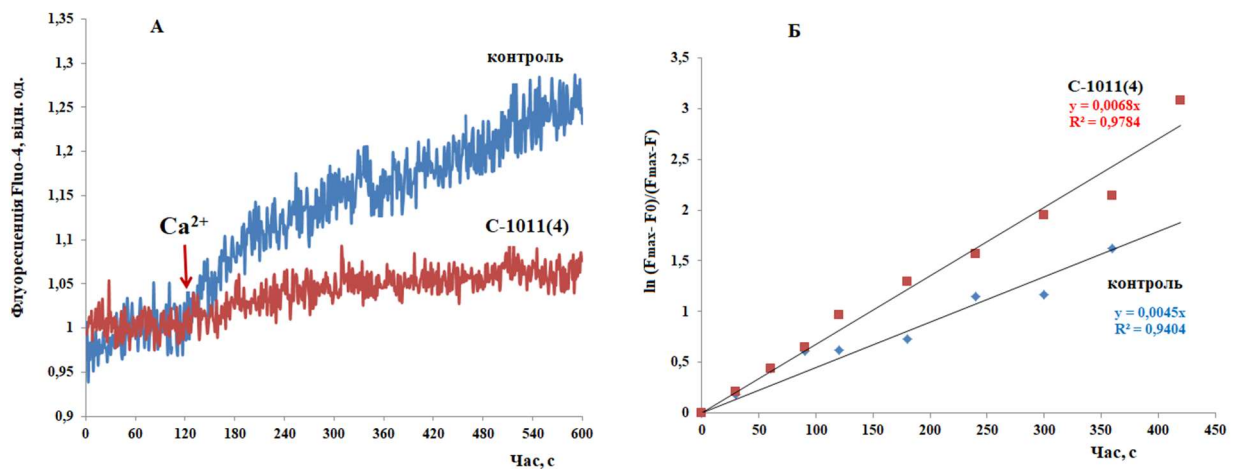


Рис. 3.4 Енергозалежна акумуляція Ca^{2+} мітохондріями в контролі та у присутності калікс[4]арена С-1011 (А). Результат характерного досліджу.

Приклад лінеаризації одержаних даних для розрахунку основних кінетичних параметрів транспортного процесу (Б)

При цьому параметр V_0 за дії калікс[4]аренів (рис. 3.5А) суттєво знижувався відносно контрольних значень. Достовірне зниження $\tau_{1/2}$ (рис. 3.5Б) мало місце лише за дії калікс[4]арену С-1011 з чотирма халконовими замісниками. Зниження аналізованого параметра може вказувати на те, що в контексті гальмування енергозалежного накопичення Ca^{2+} обраними речовинами спостерігається підвищення пропускної здатності внутрішньої мітохондріальної мембрани для катіону. Речовина С-1011 відноситься до найбільш гідрофобних серед досліджених, взаємодіючи з ліпідним бішаром, вона може викликати істотний вплив на її проникність щодо Ca^{2+} .

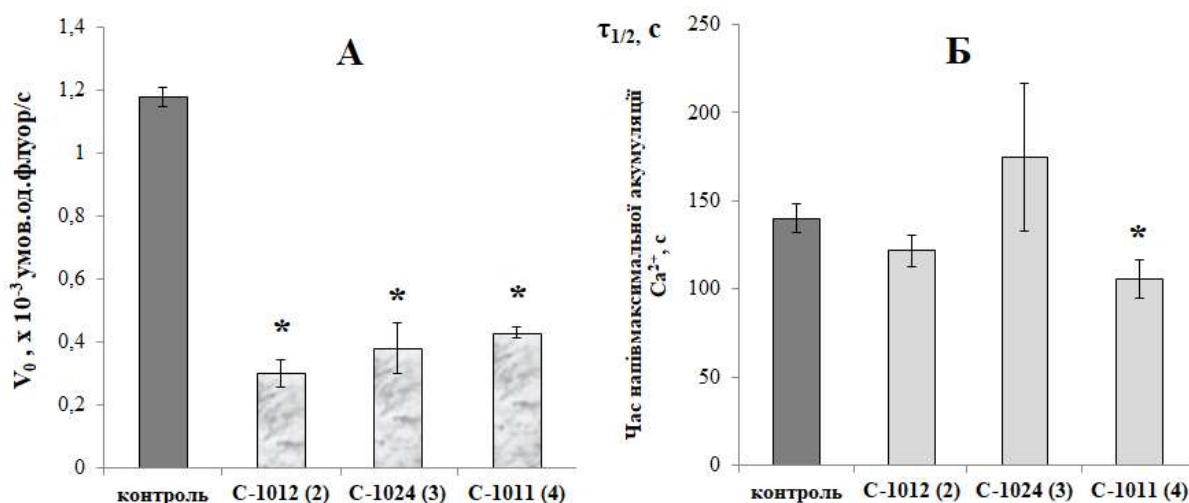


Рис. 3.5 Зміни основних кінетичних параметрів енергозалежної акумуляції Ca^{2+} мітохондріями в контролі та за присутності халконовмісних калікс[4]аренів. А - початкова швидкість V_0 транспортного процесу; $M \pm m$, $n=4$, * - зміни достовірні відносно контролю, $P < 0,05$. Б - характеристичний час транспортного процесу $\tau_{1/2}$; $M \pm m$, $n=4$, * - зміни достовірні відносно контролю, $P < 0,05$

3.4 Дія халконовмісних калікс[4]аренів на $\Delta p\text{H}$ -залежний вихід Ca^{2+} з ізольованих мітохондрій.

ΔpH -залежний вихід Ca^{2+} за присутності досліджуваних калікс[4]аренів суттєво пригнічувався (рис. 3.6). Цей ефект залежав від кількості халконових заміників і ставав більш інтенсивним за їхнього збільшення від 2 до 4. Отже, є можливість стверджувати, що дія досліджуваних сполук на енергозалежну акумуляцію Ca^{2+} та H^+/Ca^{2+} -обмінник в мітохондріях має певну специфіку. У випадку ΔpH -залежного обміну Ca^{2+} інгібіторний ефект чітко залежав від хімічної природи використаних калікс[4]аренів.

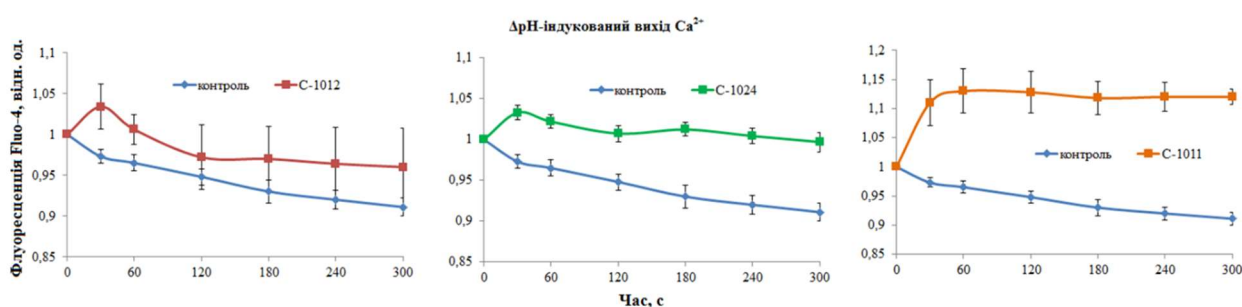


Рис. 3.6 ΔpH -залежний вихід Ca^{2+} з мітохондрій в контролі та за присутності досліджуваних калікс[4]аренів, $M \pm t$, $n=4$, всі зміни у випадку дії C-1024 та C-1011 достовірні відносно контролю, $P < 0,05$

Одержані дані дають підстави припустити, що досліджувані халконвмісні калікс[4]аренів впливають на компоненти електронно-транспортного ланцюга та на мембранні системи транспорту кальцію в мітохондріях. Виявлені зв'язки між кількістю халконових заміників і ефектом калікс[4]аренів на процеси в мітохондріях, створюють підґрунтя для подальших досліджень хімічної природи взаємодії даного класу сполук з компонентами мітохондрій. Даний вектор досліджень є перспективний в плані дизайну селективних модуляторів процесів в мітохондріях.

ВИСНОВКИ

1. Халконовмісні калікс[4]арени С-1012, С-124, та С-1011 пригнічують окиснення NADH та FADH₂ в дихальному ланцюзі ізольованих мітохондрій гладенького м'яза матки.
2. Досліджувані калікс[4]арени значно збільшують генерацію активних форм кисню в мітохондріях.
3. Розглянуті сполуки гальмують транспортні процеси пов'язані з іонами Ca²⁺ на внутрішній мембрані мітохондрій.
4. Продемонстрована залежність сили вищезазначених ефектів від кількості халконових угруповань на нижньому вінці чаші калікс[4]арену.
5. Одержані результати дають підставу проводити подальший скринінг та спрямований синтез халконовмісні калікс[4]аренів з метою створення достатньо афінних і селективних модуляторів транспортних і енергетичних процесів в мітохондріях.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- [1] Костерін С.О., Кальченко В.І., Векліч Т.О., Бабіч Л.Г., Шликов С.Г. “Каліксарени як модулятори АТР-гідролазних систем гладеньком’язових клітин.” Київ: Наукова думка, (2019)
- [2] Danylovych, Hanna V., Danylovych YuV, Roman V. Rodik, Vira T. Hurska, Vitaliy I. Kalchenko, and Sergiy O. Kosterin. "Calix [4] arenes modulate Ca²⁺-dependent processes smooth muscle cell mitochondria." *Chem. Res. J* 4, no. 6 (2019): 109-122.
- [3] Orrenius, S., Cadenas, E., Packer, L. “Mitochondrial signaling in health and disease.” CRC Press, (2012)
- [4] Babich, Lidiya G., Sergiy G. Shlykov, Vyacheslav I. Boyko, Mariia A. Klyachina and S. A. Kosterin. “Calix[4]arenes C-136 and C-137 hyperpolarize myometrium mitochondria membranes.” *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 39 (2013): 649-655.
- [5] Daiber, Andreas. “Redox signaling (cross-talk) from and to mitochondria involves mitochondrial pores and reactive oxygen species.” *Biochimica et biophysica acta* 1797 6-7 (2010): 897-906.
- [6] Staniszewski, K., Said H. Audi, R. Sepehr, Elizabeth R. Jacobs and Mahsa Ranji. “Surface Fluorescence Studies of Tissue Mitochondrial Redox State in Isolated Perfused Rat Lungs.” *Annals of Biomedical Engineering* 41 (2013): 827-836.
- [7] A. Baeyer, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 5 (1872): 1094-1100.
- [8] A. Zinke, E. Ziegler, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* 77 (1944): 264-272.
- [9] Niederl, Joseph B. and H. J. Vogel. “Aldehyde—Resorcinol Condensations1.” *Journal of the American Chemical Society* 62 (1940): 2512-2514.

- [10] Gutsche, C. David, Balram Dhawan, Kwanghyun No and Ramamurthi Muthukrishnan. "Calixarenes. 4. The synthesis, characterization, and properties of the calixarenes from p-tert-butylphenol." *Journal of the American Chemical Society* 103 (1981): 3782-3792.
- [11] Dhawan, Balram, Shou-I Chen and C. David Gutsche. "Calixarenes, 19. Studies of the formation of calixarenes via condensation of p-alkylphenols and formaldehyde†." *Macromolecular Chemistry and Physics* 188 (1987): 921-950.
- [12] Hoegberg, A. G. Sverker. "Two stereoisomeric macrocyclic resorcinol-acetaldehyde condensation products." *Journal of Organic Chemistry* 12 (1980): 4498-4500.
- [13] Asfari, Zouhair and Jacques Vicens. "Preparation of Series of Calix[6]arenes and Calix[8]arenes derived from p-n-alkylphenols." *Tetrahedron Letters* 29 (1988): 2659-2660.
- [14] Boehmer, Volker, Frank Marschollek and Lucia Zetta. "Calix[4]arenes with four differently substituted phenolic units." *Journal of Organic Chemistry* 52 (1987): 3200-3205.
- [15] Arduini, Arturo, Andrea Pochini, Sara Raverberi and Rocco Ungaro. "p-t-Butyl-calix[4]arene tetracarboxylic acid. A water soluble calixarene in a cone structure." *Journal of The Chemical Society, Chemical Communications* (1984): 981-982.
- [16] Ferreira, Juliane F and Izilda A. Bagatin. "A Cr(VI) selective probe based on a quinoline-amide calix[4]arene." *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy* 189 (2018): 44-50.
- [17] Silva, E. Da, Damien Ficheux and Anthony W Coleman. "Anti-thrombotic Activity of Water-soluble Calix[n]arenes." *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry* 52 (2005): 201-206.

- [18] Böhmer, Volker. "Calixarenes, Macrocycles with (Almost) Unlimited Possibilities." *Angewandte Chemie* 34 (1995): 713-745.
- [19] Kogan, Katerina, Norbert Itzhak and Silvio E Biali. "Calix[6]arenes incorporating functionalised substituents at the methylene bridges." *Supramolecular Chemistry* 22 (2010): 704 - 709.
- [20] Bergamaschi, Monica, Franca Bigi, Maurizio Lanfranchi, Raimondo Maggi, Andrea Pastorio, Maria Angela Pellinghelli, Francesco Peri, Cecilia Porta and Giovanni Sartori. "Stepwise Synthesis and Structural Characterization of Calix[4]- and Calix[5]arenes Bearing a Functionalized Arm on the Methylene Bridge." *Tetrahedron* 53 (1997): 13037-13052.
- [21] Kumagai, Hitoshi, Mitsuharu Hasegawa, Setsuko Miyanari, Yoshihiro Sugawa, Yoko Sato, Takashi Hori, Ueda Sanae, Hiroki Kamiyama and Sotaro Miyano. "Facile synthesis of p-tert-butylthiacalix[4]arene by the reaction of p-tert-butylphenol with elemental sulfur in the presence of a base." *Tetrahedron Letters* 38 (1997): 3971-3972.
- [22] Naseer, Muhammad Moazzam, Mukhtiar Ahmed and Shahid Hameed. "Functionalized calix[4]arenes as potential therapeutic agents." *Chemical Biology & Drug Design* 89 (2017): 243-256
- [23] Mokhtari, Bahram and Kobra Pourabdollah. "Applications of calixarene nano-baskets in pharmacology." *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 73 (2011): 1-15.
- [24] Nimse, Satish Balasaheb and Taisun Kim. "Biological applications of functionalized calixarenes." *Chemical Society reviews* 42 1 (2013): 366-86.
- [25] Gutsche, C. David, "Calixarenes" *Accounts of Chemical Research* 16 5 (1983): 161-170.

- [26] Tian, Han-Wen, Yu-Chen Pan and Dong-sheng Guo. "Assembly-enhanced molecular recognition of calix[6]arene." *Supramolecular Chemistry* 30 (2018): 562 - 567.
- [27] Silva, E. Da, Adina N. Lazar and Anthony W Coleman. "Biopharmaceutical applications of calixarenes." *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 14 (2004): 3-20.
- [28] Perret, Florent, Adina N. Lazar and Anthony W Coleman. "Biochemistry of the para-sulfonato-calix[n]arenes." *Chemical communications* 23 (2006): 2425-38.
- [29] Guo, Dong-sheng, Kui Wang and Yu Liu. "Selective binding behaviors of p-sulfonatocalixarenes in aqueous solution." *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 62 (2008): 1-21.
- [30] Liu, Yu, Yu-Hong Ma, Yong Chen, Dong-sheng Guo and Qiang Li. "Molecular recognition thermodynamics of pyridine derivatives by sulfonatocalixarenes at different pH values." *The Journal of organic chemistry* 71 17 (2006): 6468-73.
- [31] Wang, Yu-Ying, Yong Kong, Zhe Zheng, Wen-Chao Geng, Ziwei Zhao, Hongwei Sun and Dong-sheng Guo. "Complexation of a guanidinium-modified calixarene with diverse dyes and investigation of the corresponding photophysical response." *Beilstein Journal of Organic Chemistry* 15 (2019): 1394 - 1406.
- [32] Leray, Isabelle and B. Valeur. "Calixarene-Based Fluorescent Molecular Sensors for Toxic Metals." *European Journal of Inorganic Chemistry* 2009 (2009): 3525-3535.
- [33] Nehra, Anita, Sateesh Bandaru, Deepthi S. Yarramala and Chebrolu Pulla Rao. "Differential Recognition of Anions with Selectivity towards F(-) by a Calix[6]arene-Thiourea Conjugate Investigated by Spectroscopy, Microscopy, and Computational Modeling by DFT." *Chemistry* 22 26 (2016): 8903-14.

- [34] Deska, Malgorzata, Barbara Dondela, Wanda Śliwa and Armii Krajowej. "Selected applications of calixarene derivatives." *Arkivoc* 2015 (2015): 393-416.
- [35] Xu, Zhaochao, Sook Kyung Kim and Juyoung Yoon. "Revisit to imidazolium receptors for the recognition of anions: highlighted research during 2006-2009." *Chemical Society reviews* 39 5 (2010): 1457-66.
- [36] Guo, Dong-sheng, Li-Hua Wang and Yu Liu. "Highly effective binding of methyl viologen dication and its radical cation by p-sulfonatocalix[4,5]arenes." *The Journal of organic chemistry* 72 20 (2007): 7775-8.
- [37] Ghoufi, Aziz, J. P. Morel, Nicole Morel-Desrosiers and Patrice Malfreyt. "MD simulations of the binding of alcohols and diols by a calixarene in water: connections between microscopic and macroscopic properties." *The journal of physical chemistry. B* 109 49 (2005): 23579-87.
- [38] Sansone, Francesco and Alessandro Casnati. "Multivalent glycolcalixarenes for recognition of biological macromolecules: glycolcalyx mimics capable of multitasking." *Chemical Society reviews* 42 11 (2013): 4623-39.
- [39] Komisarenko, S. V., S. O. Kosterin, Eduard V Lugovskoy and Vitaly I. Kalchenko. "Calixarene methylene bisphosphonic acids as promising effectors of biochemical processes." *Ukrainian Biochemical Journal* 85 (2013): 106-128.
- [40] Aubert-Foucher, E.; Coleman, A.W.; Hulmes, D.J.S. "Use of Calix[n]Arenes for Treating Fibrotic Diseases." French Patent, FR60252J, France, (1999).
- [41] Thallapally, Praveen K., Gareth O. Lloyd, Jerry L. Atwood and Leonard J. Barbour. "Diffusion of water in a nonporous hydrophobic crystal." *Angewandte Chemie* 44 25 (2005): 3848-51.

- [42] Mareque Rivas, Juan C., Harald Schwalbe and Stephen J. Lippard. "Interchain hydrogen-bonding interactions may facilitate translocation of K⁺ ions across the potassium channel selectivity filter, as suggested by synthetic modeling chemistry." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (2001): 9478 - 9483.
- [43] Schultz, Bruce D., A. K. Singh, Daniel C Devor and Robert J. Bridges. "Pharmacology of CFTR chloride channel activity." *Physiological reviews* 79 1 Suppl (1999): S109-44.
- [44] Droogmans, Guy, Chantal Maertens, Jean Prenen and Bernd Nilius. "Sulphonic acid derivatives as probes of pore properties of volume-regulated anion channels in endothelial cells." *British Journal of Pharmacology* 128 (1999): 35-40.
- [45] Tomita, Naotoshi, Shinsuke Sando, Takashi Sera and Yasuhiro Aoyama. "Macrocyclic proteoglycan mimics. Potent inhibition of cell adhesion by a bundle of chondroitin sulfate chains assembled on the calix[4]resorcarene platform." *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 14 9 (2004): 2087-90.
- [46] Tian-ming, Yao, Ye Zhi-feng, Wang Li, Gu Jin-ying, Yao Si-de and Shi Xian-fa. "Supramolecular interaction between water-soluble calix[4]arene and ATP--the catalysis of calix[4]arene for hydrolysis of ATP." *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy* 58 14 (2002): 3033-8.
- [47] Кальченко В.І., Родік Р.В., Бойко В.І. "Каліксарени. Перспективи медико-біологічного застосування." *Журнал органічної та фармацевтичної хімії*. 3, 4, (2006): 13 – 29.
- [48] Tauran, Yannick, Anthony W Coleman, Florent Perret and Beomjoon Kim. "Cellular and in vivo biological activities of the calix[n]arenes." *Current Organic Chemistry* 19 (2015): 2250-2270.

- [49] Coleman, Anthony W, Said Jebors, Sébastien Cecillon, Pascal Perret, Dominique Garin, Danièle Marti-Battle and Marcelle Moulin. "Toxicity and biodistribution of para-sulfonato-calix[4]arene in mice." *New Journal of Chemistry* 32 (2008): 780-782.
- [50] Wheate, Nial J., Gráinne M Abbott, Rothwelle J Tate, Carol Jean Clements, RuAngelie Edrada-Ebel and Blair F. Johnston. "Side-on binding of p-sulphonatocalix[4]arene to the dinuclear platinum complex trans- $[\{PtCl(NH_3)_2\}_2\mu\text{-dpzm}]^{2+}$ and its implications for anticancer drug delivery." *Journal of inorganic biochemistry* 103 3 (2009): 448-54.
- [51] Martin, Adam D., Emma Houlihan, Natalie M. Morellini, Paul K. Eggers, Eliza James, Keith A. Stubbs, Alan R Harvey, Melinda Fitzgerald, Colin L. Raston and Sarah A. Dunlop. "Synthesis and Toxicology of p-Phosphonic Acid Calixarenes and O-Alkylated Analogues as Potential Calixarene-Based Phospholipids." *ChemPlusChem* 77 (2012): 308-313.
- [52] Sebti, Saïd M. and Andrew D. Hamilton. "Design of growth factor antagonists with antiangiogenic and antitumor properties." *Oncogene* 19 (2000): 6566-6573.
- [53] Viola, Santa, Sara Merlo, Grazia Maria Letizia Consoli, Filippo Drago, Corrada Geraci and Maria Angela Sortino. "Modulation of C6 Glioma Cell Proliferation by Ureido-Calix[8]arenes." *Pharmacology* 86 (2010): 182 - 188
- [54] Mourer, Maxime, Hugues Massimba Dibama, Patrícia Beltrão Lessa Constant, Mamadou Daffé and Jean-Bernard Regnouf-de-Vains. "Anti-mycobacterial activities of some cationic and anionic calix[4]arene derivatives." *Bioorganic & medicinal chemistry* 20 6 (2012): 2035-41.
- [55] Mourer, Maxime, Nicolas Psychogios, Géraldine Laumond, Anne Marie Aubertin and Jean-Bernard Regnouf-de-Vains. "Synthesis and anti-

- HIV evaluation of water-soluble calixarene-based bithiazolyl podands.” *Bioorganic & medicinal chemistry* 18 1 (2010): 36-45.
- [56] Luo, Zaigang, Yu Zhao, Chaowei Ma, Zhipeng Li, Xuemei Xu, Liming Hu, Nian-Yu Huang and Hong-qiu He. “Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Docking of Calix[4]arene-Based β -Diketo Derivatives as HIV-1 Integrase Inhibitors.” *Archiv der Pharmazie* 348 (2015): 206-13.
- [57] Yousaf, Ali, Shafida Abd. Hamid, Noraslinda M. Bunnori and AA Ishola. “Applications of calixarenes in cancer chemotherapy: facts and perspectives.” *Drug Design, Development and Therapy* 9 (2015): 2831 - 2838.
- [58] Geraci, Corrada, Grazia Maria Letizia Consoli, Giuseppe Granata, Eva Galante, Angelo Palmigiano, Maria S Pappalardo, Salvatore D Di Puma and Angelo Spadaro. “First self-adjuvant multicomponent potential vaccine candidates by tethering of four or eight MUC1 antigenic immunodominant PDTRP units on a calixarene platform: synthesis and biological evaluation.” *Bioconjugate chemistry* 24 10 (2013): 1710-20.
- [59] An, Lin, Lingqin Han, You-guang Zheng, Xian-na Peng, Yunsheng Xue, Xiaoke Gu, Jing Sun and Chaoguo Yan. “Synthesis, X-ray crystal structure and anti-tumor activity of calix[n]arene polyhydroxyamine derivatives.” *European journal of medicinal chemistry* 123 (2016): 21-30.
- [60] Wang, Kui, Dong-sheng Guo, Hong-qing Zhang, Dong Li, Xi-Long Zheng and Yu Liu. “Highly effective binding of viologens by p-sulfonatocalixarenes for the treatment of viologen poisoning.” *Journal of medicinal chemistry* 52 20 (2009): 6402-12.
- [61] Wang, Ziyuan, Shi-Peng Tao, Xiaoyan Dong and Yan Sun. “para-Sulfonatocalix[n]arenes Inhibit Amyloid β -Peptide Fibrillation and Reduce Amyloid Cytotoxicity.” *Chemistry, an Asian journal* 12 3 (2017): 341-346.

- [62] Alberts, Bruce; et. al. *Molecular Biology of the Cell*. (New York: Garland Publishing Inc. 1994)
- [63] Mannella, Carmen A.. “Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae.” *Biochimica et biophysica acta* 1763 5-6 (2006): 542-8.
- [64] Строев Е. А. *Біологічна хімія: Підручник для фрм. Ін-тів* (М.: Вища школа, 1986), 479 с.
- [65] Giorgi, Carlotta, Saverio Marchi and Paolo Pinton. “The machineries, regulation and cellular functions of mitochondrial calcium.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19 (2018): 713-730.
- [66] Baughman, Joshua M., Fabiana Perocchi, Hany S. Girgis, Molly E Plovanich, Casey A. Belcher-Timme, Yasemin Sancak, Xiaoyan Robert Bao, Laura Strittmatter, Olga A Goldberger, Roman Bogorad, Victor E. Koteliansky and Vamsi K. Mootha. “Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter.” *Nature* 476 (2011): 341-345.
- [67] De Stefani, Diego, Anna Raffaello, Enrico Teardo, Ildikó Szabó and Rosario Rizzuto. “A 40 kDa protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter.” *Nature* 476 (2011): 336 - 340.
- [68] Mallilankaraman, Karthik, Patrick J. Doonan, César Cárdenas, Harish C. Chandramoorthy, Marioly Müller, Russell A. Miller, Nicholas E. Hoffman, Rajesh Kumar Gandhirajan, Jordi Molgó, Morris J. Birnbaum, Brad S. Rothberg, Don-On Daniel Mak, J. Kevin Foskett and Muniswamy Madesh. “MICU1 Is an Essential Gatekeeper for MCU-Mediated Mitochondrial Ca²⁺ Uptake that Regulates Cell Survival.” *Cell* 151 (2012): 630-644.
- [69] Palty, Raz, William F. Silverman, Michal Hershfinkel, Teresa Caporale, Stefano Luca Sensi, Julia Parnis, Christiane Nolte, Daniel Fishman, Varda Shoshan-Barmatz, Sharon Herrmann, Daniel

- Khananshvili and Israel Sekler. "NCLX is an essential component of mitochondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (2009): 436 - 441.
- [70] Tsai, Ming-Feng, Dawei Jiang, Linlin Zhao, David E. Clapham and Christopher Miller. "Functional reconstitution of the mitochondrial $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ antiporter Letm1." *The Journal of General Physiology* 143 (2014): 67 - 73.
- [71] Colombini, Marco. "VDAC: The channel at the interface between mitochondria and the cytosol." *Molecular and Cellular Biochemistry* 256-257 (2004): 107-115.
- [72] Denton, Richard M.. "Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions." *Biochimica et biophysica acta* 1787 11 (2009): 1309-16.
- [73] Orrenius, Sten, Boris Zhivotovsky and Pierluigi Nicotera. "Calcium: Regulation of cell death: the calcium–apoptosis link." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4 (2003): 552-565.
- [74] Rizzuto, Rosario, Paolo Pinton, Marisa Brini, Anna Chiesa, Luisa Filippin and Tullio Pozzan. "Mitochondria as biosensors of calcium microdomains." *Cell calcium* 26 5 (1999): 193-9.
- [75] Garret and Grisham *Biochemistry*. University of Virginia. (2016): 687.
- [76] Yang, Jieyeqi, Wenying Chen, Boyang Zhang, Fengli Tian, Zheng Zhou, Xindi Liao, Chen Li, Yi Zhang, Yanyan Han, Yan Wang, Yuzhe Li, Guo-qing Wang and Xiao Li Shen. "Lon in maintaining mitochondrial and endoplasmic reticulum homeostasis." *Archives of Toxicology* 92 (2018): 1913-1923.
- [77] Brandt, Ulrich. "A two-state stabilization-change mechanism for proton-pumping complex I." *Biochimica et biophysica acta* 1807 10 (2011): 1364-9.

- [78] Tomitsuka, Eriko, Hiroko Hirawake, Yu-ichi Goto, Masafumi Taniwaki, Shigeharu. Harada and Kiyoshi Kita. "Direct evidence for two distinct forms of the flavoprotein subunit of human mitochondrial complex II (succinate-ubiquinone reductase)." *Journal of biochemistry* 134 2 (2003): 191-5.
- [79] Ernster, Lars and Gustav Dallner. "Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function." *Biochimica et biophysica acta* 1271 1 (1995): 195-204.
- [80] Fontanesi, Flavia, Ileana C Soto, Darryl M Horn and Antoni Barrientos. "Assembly of mitochondrial cytochrome c-oxidase, a complicated and highly regulated cellular process." *American journal of physiology. Cell physiology* 291 6 (2006): 1129-47.
- [81] Виноградов А.Д. "Мітохондріальна АТР-синтезуюча машина: п'ятнадцять років потому" *Біохімія*. 64, 11, (1999): 1443-1456.
- [82] Лабинцева, Р. Д., Н. М. Слінченко, and Т. О. Векліч. та ін. "Порівняльне дослідження впливу каліксаренів на Mg^{2+} -залежні АТР-гідролазні ферментативні системи гладеньком'язових клітин матки." *Укр. біохім. журнал* 79, no. 3 (2007): 44-54.
- [83] Piantadosi, Claude A. and Hagir B. Suliman. "Redox regulation of mitochondrial biogenesis." *Free radical biology & medicine* 53 11 (2012): 2043-53.
- [84] С. Г. Шликов, Л. Г. Бабіч, Н. М. Слінченко, Р. В. Родік, В. І. Бойко, В. І. Кальченко, С. О. Костерін "Каліксарен С-91 стимулює акумуляцію іонів Са в мітохондріях міометрія" *Укр. біохім. журн.* 79 4 (2007) 28-33
- [85] Л.Г. Бабіч, С.Г. Шликов, А.М. Кушнарьова, О.А. Єсипенко, С.О. Костерін "Халкон-вмісні калікс[4]арени — нанорозмірні модулятори поляризації мембран мітохондрій та вмісту

йонізованого Са в них” Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології
15, 1, (2017): 193-202

- [86] 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* 72 (1976): 248-54.