

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

Завідувач кафедри молекулярної  
біотехнології та біоінформатики  
к.б.н, доц. О. Ю. Нипорко  
Протокол № \_\_\_\_\_ засідання кафедри  
від “ \_\_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 20\_\_ р.

**КАЛІКС[4]АРЕНИ С-715 ТА С-772 ЯК ІНСТРУМЕНТИ ВПЛИВУ НА  
ТРАНСПОРТ  $\text{Ca}^{2+}$  ТА БІОЕНЕРГЕТИКУ МІТОХОНДРІЙ  
ГЛАДЕНЬКОГО М'ЯЗУ МАТКИ ЩУРІВ**

Випускна кваліфікаційна робота магістра  
студента спеціальності 091 Біологія  
ОП «Біоінформатика та структурна біологія»  
**Форися Іллі Сергійовича**

Науковий керівник від кафедри  
професор кафедри молекулярної  
біотехнології та біоінформатики  
д.б.н. **Данилович Юрій Володимирович**

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

Оцінка захисту роботи

---

Київ – 2024 р.

## АНОТАЦІЯ

Форись І.С. Калікс[4]арени С-715 та С-772 як інструменти впливу на транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  та біоенергетику мітохондрій гладенького м'язу матки щурів. – Випускна кваліфікаційна робота магістра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Біоінформатика та структурна біологія».

У роботі досліджується вплив макроциклічних сполук – калікс[4]аренів С-715 (5,17-ди(трифторо)ацетамідо-11,23-ди-*трет*-бутил-26,28-дигідроксі-25,27-дипропоксикалікс[4]арен) та С-772 (5,11-ди(трифторометил (фенілсульфоніліміно)метиламіно-17,23-ди-*трет*-бутил-25,26-дипропокси-27,28-дигідроксикалікс[4]арен) на функціональну активність та біоенергетику ізольованих мітохондрій гладенького м'язу матки щурів. З'ясовано вплив досліджуваних сполук на фундаментальні показники функціонування мітохондрій, такі як гідродинамічний діаметр органел, ефективність роботи  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем та  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних процесів, серед яких, зокрема, функціонування електрон-транспортувального ланцюга та генерація активних форм кисню. По верхньому вінцю макроциклу калікс[4]арен С-715 модифікований двома дистально розміщеними трифторацетамідними групами, в той час як С-772 – двома проксимально розміщеними фенілсульфонілімінними замісниками. В оглядовій частині роботи представлено сучасний стан знань про застосування калікс[4]аренів, а також структурно-функціональні особливості мітохондрій: біоенергетичні процеси, генерацію активних форм кисню та системи транспорту іонів Са через внутрішню мембрану органел.

Встановлено, що калікс[4]арени С-715 і С-772 мають власну флуоресценцію, здатні проникати в міоцити міометрія та взаємодіяти з ізольованими мітохондріями гладенького м'язу матки, помірно збільшуючи гідродинамічний діаметр органел, проте не викликаючи мітохондрійну

дисфункцію. Результати роботи свідчать про те, що досліджувані сполуки зумовлюють гальмування окислення NADH та енергозалежної акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  ізольованими мітохондріями, не впливаючи при цьому на  $\Delta\text{pH}$ -залежний вихід катіону з органел. Ми припускаємо, що вплив сполук на функціональну активність дихального ланцюга може бути пов'язаний з пригніченням активності комплексу I, внаслідок чого також відбувається зниження електрохімічного потенціалу мітохондрійної мембрани, що й супроводжується помірним зростанням гідродинамічного діаметра органел. У той же час, зменшення потенціалу може призводити до зниження акумуляції іонів  $\text{Ca}^{2+}$  матриксом та інтенсивності перебігу  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних процесів в мітохондріях, серед яких, в тому числі, продукція активних форм кисню. Ми показали, що досліджувані калікс[4]арени залежно від концентрації та часу зумовлюють зниження рівня генерації активних форм кисню ізольованими мітохондріями. Це може розглядатися як протекторна дія стосовно органел. Виходячи з попередніх результатів, ми припускаємо, що гальмування окислення NADH у комплексі I електрон-транспортного ланцюга лежить в основі цього ефекту.

Калікс[4]арени C-715 і C-772 у мікромольних концентраціях можуть бути використані як ефективний засіб впливу на структурно-функціональну активність мітохондрій.

**Ключові слова:** калікс[4]арен,  $\text{Ca}^{2+}$ , біоенергетика, мітохондрії, міометрій, активні форми кисню.

## ABSTRACT

Forys I.S. Calix[4]arenes C-715 and C-772 as instruments of influence on  $\text{Ca}^{2+}$  transport and bioenergetics in mitochondria of rat uterine smooth muscle. – Master's degree graduate qualification work in the specialty 091 Biology EP "Bioinformatics and Structural Biology".

The study describes the influence of macrocyclic compounds – calix[4]arenes C-715 (5,17-di(trifluoro)acetamido-11,23-di-*tert*-butyl-26,28-dihydroxy-25,27-dipropoxycalix[4]arene) and C-772 (5,11-di(trifluoromethyl(phenylsulfonylimino)methylamino-17,23-di-*tert*-butyl-25,26-dipropoxy-27,28-dihydroxycalix[4]arene) on functional activity and bioenergetics of isolated mitochondria of rat uterine smooth muscle. The studied compounds' influence on the fundamental mitochondrial functioning indicators was clarified, such as the organelles' hydrodynamic diameter, the  $\text{Ca}^{2+}$ -transport systems efficiency,  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent processes, including the electron transport chain functioning and reactive oxygen species generation. On the upper ring of the macrocycle, calix[4]arene C-715 is modified by two distally placed trifluoroacetamide groups, while C-772 is modified by two proximally placed phenylsulfonylimine substituents. The review part of the work presents the current state of knowledge on the use of calix[4]arenes, as well as the structural and functional mitochondria features: bioenergetic processes, generation of reactive oxygen species, Ca ions transport systems through the inner membrane of organelles.

It was found that calix[4]arenes C-715 and C-772 have their own fluorescence, and are able to permeate into myometrial myocytes and interact with isolated mitochondria of uterine smooth muscle, moderately increasing the organelles' hydrodynamic diameter without causing mitochondrial dysfunction. The work results indicate that the studied compounds slow down the NADH oxidation and the process of energy-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation by isolated mitochondria, without affecting the  $\Delta\text{pH}$ -dependent cation release from the organelles. We assume

that the compounds' effect on the electron transport chain functional activity may be associated with complex I activity inhibition. As a result, a decrease in the mitochondrial membrane electrochemical potential occurs, which is accompanied by the organelles' hydrodynamic diameter moderate increase. At the same time, such decrease in potential can lead to a reduction of Ca ions accumulation by the matrix and the intensity of Ca<sup>2+</sup>-dependent processes in mitochondria, including the production of reactive oxygen species. We showed that the studied calix[4]arenes, depending on concentration and time, reduce the level of reactive oxygen species generation by isolated mitochondria. This can be considered as a protective effect on organelles. Based on previous results, we assume that slowing down of the NADH oxidation in the electron transport chain complex I is the reason for this effect.

Calix[4]arenes C-715 and C-772 in micromolar concentrations can be used as an effective instruments for influencing the structural and functional activity of mitochondria.

**Keywords:** calix[4]arene, Ca<sup>2+</sup>, bioenergetics, mitochondria, myometrium, reactive oxygen species.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	8
ВСТУП .....	10
РОЗДІЛ 1 .....	12
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	12
1.1.1. Калікс[n]арени – синтез, властивості та застосування.....	12
1.1.2. Застосування калікс[n]аренів у біомедицині .....	14
1.1.3. Калікс[4]арени як ефектори біоенергетичних та катіон- транспортувальних процесів у гладеньком’язових клітинах матки.....	15
1.2. Властивості мітохондрій та їх роль у підтриманні іонного гомеостазу клітини.....	20
1.3. Біоенергетичні процеси в мітохондріях .....	23
1.3.1. Цикл трикарбонових кислот .....	23
1.3.2. Електрон-транспортувальний ланцюг .....	24
1.3.4. Активні форми кисню: шляхи утворення, регуляція, функції, ризику	29
1.4. Механізми трансмембранного обміну $Ca^{2+}$ у мітохондріях.....	33
1.4.1. Механізми надходження $Ca^{2+}$ в мітохондрії .....	34
1.4.2. Механізми вивільнення $Ca^{2+}$ з мітохондрій .....	37
1.5. Аспекти регуляції скоротливої активності гладенького м’язу матки .....	39
РОЗДІЛ 2 .....	42
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ .....	42
2.1 Хімічний синтез калікс[4]аренів C-715 та C-772.....	42
2.2 Методи препаративної біохімії.....	44
2.2.1. Виділення суспензії міоцитів з гладенького м’язу матки щурів .....	44
2.2.2. Виділення фракції ізольованих мітохондрій з гладенького м’язу матки щурів.....	46
2.3 Флуоресцентні методи.....	47

2.3.1	Характеристика аутофлуоресценції калікс[4]аренів С-715 та С-772 ....	47
2.3.2	Вивчення змін інтенсивності флуоресценції калікс[4]аренів С-715 та С-772 при взаємодії з міоцитами та ізольованими мітохондріями.....	47
2.3.3.	Дослідження змін аутофлуоресценції NADH в ізольованих мітохондріях ...	48
2.3.4.	Дослідження змін вмісту $\text{Ca}^{2+}$ в ізольованих мітохондріях .....	48
2.3.5.	Дослідження генерації активних форм кисню в ізольованих мітохондріях методом протокової цитометрії .....	49
2.4.	Дослідження змін гідродинамічного діаметра ізольованих мітохондрій із використанням методу лазерної кореляційної спектроскопії .....	50
2.5.	Статистична обробка результатів.....	51
2.6.	Реактиви та матеріали.....	52
РОЗДІЛ 3 .....		53
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ .....		53
3.1.	Спектри збудження та флуоресценції, концентраційно-залежна інтенсивність флуоресценції калікс[4]аренів С-715 та С-772.....	55
3.2.	Дослідження взаємодії калікс[4]аренів С-715 та С-772 з міоцитами та ізольованими мітохондріями міометрія.....	56
3.3.	Дослідження впливу калікс[4]аренів С-715 та С-772 гідродинамічний діаметр ізольованих мітохондрій .....	58
3.4.	Дослідження впливу калікс[4]аренів С-715 та С-772 на процес окислення NADH в ізольованих мітохондріях .....	60
3.5.	Дослідження впливу калікс[4]аренів С-715 та С-772 на $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальні процеси в ізольованих мітохондріях .....	62
3.6.	Дослідження впливу калікс[4]аренів С-715 та С-772 на процеси генерації активних форм кисню в ізольованих мітохондріях.....	64
ВИСНОВКИ.....		68
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....		69

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- АДФ – аденозиндифосфат  
АТФ – аденозинтрифосфат  
АФК – активні форми кисню  
БСА – бичачий сироватковий альбумін  
ВММ – внутрішня мітохондрійна мембрана  
ГМК – гладеньком’язова клітина  
ДМСО – диметилсульфоксид  
ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота  
ЕПР – ендоплазматичний ретикулум  
ЕТЛ – електрон-транспортувальний ланцюг  
ЗММ – зовнішня мітохондрійна мембрана  
ММП – міжмембранний простір  
ПЗ – програмне забезпечення  
ПМ – плазматична мембрана  
РНК – рибонуклеїнова кислота  
СР – саркоплазматичний ретикулум  
ТП – тканинний препарат  
Ф<sub>н</sub> – фосфат неорганічний  
ЦТК – цикл трикарбонових кислот  
CoQ/CoQH<sub>2</sub> – коензим Q<sub>10</sub> (окислена (убіхінон)/відновлена (убіхінол) форма)  
CspA – циклоспорин А  
CypD – циклофілін D  
DCF-DA – dichlorofluorescein diacetate, дихлорофлуоресцеїн діацетат  
FADH<sub>2</sub>/FAD – флавінаденіндинуклеотид (відновлена/окислена форма)

HEPES – 2-[4-(2-гідроксіетил)піперазин-1-іл]етан-1-сульфонова кислота

LETM1 – leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1

MCU – mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uniporter, мітохондрійний кальцієвий уніпортер

mPTP – mitochondrial permeability transition pore, мітохондрійна пора перехідної проникності

mRyR – mitochondrial ryanodine receptor, мітохондрійний ріанодиновий рецептор

NADH/NAD<sup>+</sup> – нікотинамідаденіндинуклеотид (відновлена/окислена форма)

NCLX –  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{Li}^+$ -обмінник

NO – оксид азоту

RaM – "rapide mode", механізм швидкого режиму накопичення  $\text{Ca}^{2+}$

RuR - ruthenium red, рутенієвий червоний

PMCA – plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase;  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФ-аза плазматичної мембрани

VDAC – voltage-dependent anion channel, пороутворюючий напругозалежний аніонний канал

## ВСТУП

Мітохондрії грають першочергову роль в  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналінгу та  $\text{Ca}^{2+}$ -залежному скороченні гладеньких м'язів. Завдяки спроможності накопичувати та вивільняти значну кількість іонів  $\text{Ca}$ , у гладенькому м'язі вони здійснюють функцію високоефективного депо даного катіону. Порушення злагодженого функціонування локалізованих у внутрішній мітохондрійній мембрані (ВММ)  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем вресті призводить до перевантаження матриксу іонами  $\text{Ca}$ , гіперполяризації мембрани, порушення  $\text{Ca}^{2+}$ -залежного метаболізму активних форм кисню (АФК). Викликаний цими процесами оксидативний стрес результується дисфункцією мітохондрій за умови недостатнього функціонування протекторних систем. Дисфункція проявляється у порушенні функціонування електрон-транспортного ланцюга (ЕТЛ), гіпер- або деполіризації ВММ, набуханні мітохондрій тощо [1, 2]. Зазначені явища супроводжують скоротливу дисфункцію гладенького м'язу матки – міометрію, за патологічних станів різного походження, зокрема є однією з основних причин порушення пологової діяльності та викиднів, що становить значну медико-соціальну проблему. У зв'язку із ключовим значенням  $\text{Ca}^{2+}$  для функціонування мітохондрій, зокрема біоенергетичних процесів у них, **актуальним** є пошук нетоксичних екзогенних сполук, здатних ефективно впливати на  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальні системи цих органел.

Останніми роками значна увага медико-біологічних досліджень приділяється макроциклічним сполукам калікс[4]аренам завдяки їхній здатності виступати в якості молекулярних платформ для створення специфічних біологічно активних сполук з заданими властивостями під конкретні мішені [3]. Чимала кількість вітчизняних досліджень демонструє, що калікс[4]арени, модифіковані по верхньому та/або нижньому вінцю макроциклу різноманітними функціональними групами за низьких (нано- та мікромольних) концентрацій

здатні специфічно впливати на функціональну активність клітин міометрію та ізольованих мітохондрій цієї тканини. Додатково, перевагами калікс[4]аренів у даному випадку є достатньо висока афінність, нетоксичність, дешевизна синтезу та можливість відносно легкого отримання похідних з різноманітними замісниками по верхній та/або нижній чаші макроциклу. Так, було встановлено [4, 5], що  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальні системи плазматичної мембрани (ПМ) та саркоплазматичного ретикулума (СР) є малочутливими до дії обраних калікс[4]аренів – С-715 та С-772, що передбачає можливість дослідити їх більш специфічно на предмет впливу на  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальні системи мітохондрій та  $\text{Ca}^{2+}$ -залежні процеси в даних органелах. Важливою характеристикою цих сполук є відсутність великих гідрофобних замісників, які могли б істотно впливати на функціональну активність мембран. Крім того, сполуки є нейтрально заряджені, що передбачає відносну легкість проникнення в клітини та подальшого розподілу у внутрішньоклітинних компартментах.

**Метою** роботи було з'ясувати вплив калікс[4]аренів С-715 та С-772 на транспорт  $\text{Ca}^{2+}$ , активність електрон-транспортувального ланцюга та генерацію активних форм кисню в мітохондріях гладенького м'язу матки. Відповідно, були визначені **завдання** роботи:

1. Вивчити взаємодію калікс[4]аренів С-715 та С-772 з клітинами міометрія та ізольованими мітохондріями.
2. Оцінити ефекти досліджуваних калікс[4]аренів на зміни гідродинамічного діаметру органел.
3. З'ясувати ефекти досліджуваних сполук на аутофлуоресценцію NADH в ізольованих мітохондріях.
4. Дослідити вплив вибраних калікс[4]аренів на транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  в ізольованих мітохондріях.
5. Вивчити дію вибраних сполук на утворення активних форм кисню в ізольованих мітохондріях.

## РОЗДІЛ 1

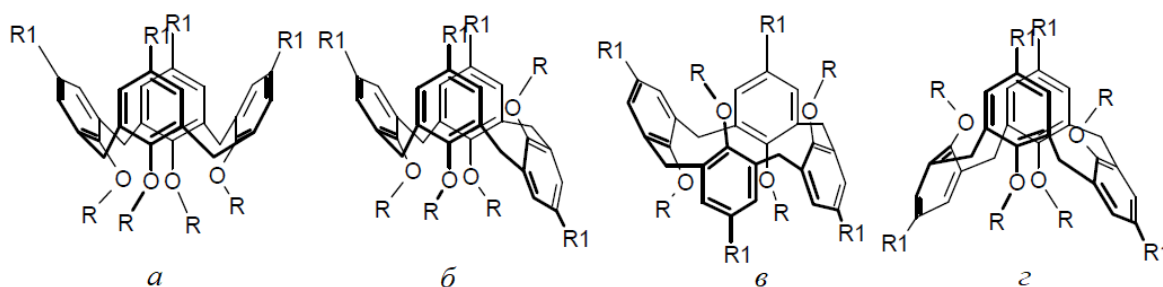
### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1.1. Калікс[n]арени – синтез, властивості та застосування

Калікс[n]арени – макроциклічні сполуки чашоподібної будови, утворені фенольними фрагментами, з'єднаними між собою містковими групами, зазвичай метиленовими ( $\text{CH}_2$ ) або сульфідними (тіакалікс[n]арени), рідше – гетероатомними фрагментами ( $\text{SO}$ ,  $\text{SO}_2$ ,  $\text{Si}(\text{R}_2)$ ,  $\text{N}(\text{R})$ ,  $\text{O}$ ). Можливість модифікувати нижній та/або верхній вінці макроциклу функціональними групами різної природи, а також наявність у таких структурах значних молекулярних порожнин, привернули увагу багатьох дослідників та були визначені як перспективний напрямок супрамолекулярної хімії. Приєднання різноманітних функціональних груп по вінцям макроциклу веде до набуття утвореною макромолекулою нових цінних властивостей, завдяки чому калікс[n]арени активно використовуються, в тому числі, для створення специфічних низькомолекулярних рецепторів з визначеною формою та характеристиками, які можуть ефективно та вибірково розпізнавати та зв'язувати аніони, катіони та нейтральні молекули. Завдяки таким широким можливостям калікс[n]арени активно досліджуються та знаходять своє застосування в галузях природничих наук, матеріалознавстві, медицині тощо [3, 6-8].

Залежно від розташування ароматичних кілець відносно площини макроциклічної платформи, похідні калікс[4]аренів здатні перебувати у чотирьох конформаціях (**рис. 1.1**). Розмір замісників, приєднаних по нижньому вінцю макроциклу, визначає конформацію молекули. У випадку невеликих замісників, молекула може залишатися стереохімічно мобільною за рахунок

обертання ароматичних кілець навколо місткових груп, в той час як об'ємні замісники перешкоджатимуть обертанню, утворюючи жорстку конформацію, визначену при синтезі [9].



**Рис. 1.1** – Конформації похідних калікс[4]арену: *a* – конус, *б* – частковий конус, *в* – 1,2-альтернат, *г* – 1,3-альтернат

Калікс[*n*]арени ( $n = 4, 6, 8$ ) отримують шляхом циклоконденсації *трет*-бутилфенолу з параформом або формальдегідом у присутності NaOH або KOH в якості каталізаторів.  $\text{Na}^+$  або  $\text{K}^+$  виконують функцію темплатів, які визначають розмір утворюваних макроциклів. В якості побічних продуктів також утворюється невеликий відсоток макроциклів з непарним числом ароматичних фрагментів. Видалення *трет*-бутильних залишків відбувається під дією безводного  $\text{AlCl}_3$ , в результаті чого утворюються незаміщені по верхньому вінцю калікс[*n*]арени [10-12]. Використовуючи класичні методи органічного синтезу, отриманий гідроксикалікс[*n*]арен може бути функціоналізований в одну або декілька стадій по верхньому та/або нижньому вінцю макроциклу. Наші замісники визначатимуть фізико-хімічні властивості молекули та її конформаційну поведінку [13].

### 1.1.2. Застосування калікс[n]аренів у біомедицині

Здатність до селективного та активного транспортування, самоорганізації, молекулярне розпізнавання, каталітичні та інші властивості, характерні для високоорганізованих молекул, викликають значний інтерес до калікс[n]аренів, роблячи їх перспективними в якості основи для створення як біологічно активних сполук з заданими властивостями та характеристиками, так і навіть потенційних лікарських засобів [3, 8, 13].

Повідомлялося, що похідні калікс[n]аренів виявляють протівірусну та антибактеріальну властивості [3, 8]. Було продемонстровано ефективність макроциклів у дослідженнях при туберкульозі та інших ураженнях патогенами [14], а також активність проти штамів епідермального *Staphylococcus aureus*, стійких до пеніциліну [15]. Показано, що кон'югати калікс[4]аренів з амфотерицином *B* мають вищу протигрибкову активність та меншу токсичність, ніж вихідний амфотерицин *B* [16]. Була доведена протипухлинна та антиангіогенна активність похідних калікс[n]аренів, зокрема здатність до пригнічення тромбоцитарного фактору росту, який, окрім його нормальних фізіологічних функцій, такі як регуляція клітинної проліферації та загоєння ран, також стимулює проліферацію та міграцію клітин ендотелію, необхідних для росту пухлин [17, 18].

Виявлено, що похідні калікс[n]аренів здатні вилучати ізотопи, такі як, наприклад, паладій, з організму та навколишнього середовища, проте недостатня селективність та висока токсичність макроциклів в цьому випадку вимагає подальших досліджень [19]. На основі похідних калікс[n]аренів було створено рецептори для групового та вибіркового вилучення іонів перехідних, лужних та лужноземельних металів [20]. Показано, що об'єднання макромолекул калікс[4]аренів та гліконаночастинок золота утворює перспективні гліокластери з унікальними фізико-хімічними властивостями та

здатністю долати гістогематичні бар'єри [21]. Була досліджена можливість дитта полімеризації похідних калікс[4]аренів, що відкриває можливості створення молекулярних рецепторів з унікальними конфірмаційними особливостями, а також можливістю селективного зв'язування іонів [22].

Було проведено велику кількість досліджень, які показали ефективний вплив на активність ряду ензимів. Зокрема, антикоагулянтну активність окремих похідних калікс[n]аренів пов'язують з інгібуючим впливом на серинові протеази [23], а калікс[4]арен-фосфонові кислоти показали ефективну взаємодію й модуляцію активності широкого ряду фосфатаз [24, 25]. Також було продемонстровано вплив похідних калікс[4]аренів на інгібування хімотрипсину [26], трансклутамінази [27], холінестерази [28] тощо.

Була досліджена здатність окремих макроциклів впливати на вуглеводний обмін. Продемонстровано, що калікс[4]арени, модифіковані ацил- або сульфонілкарбамідними групами по верхньому вінцю, викликали зниження концентрації глюкози в крові мишей не гірше, ніж референсна сполука глібенкламід, широко використовуваний препарат у терапії цукрового діабету II типу [8, 29-31].

### **1.1.3. Калікс[4]арени як ефектори біоенергетичних та катіон-транспортувальних процесів у гладеньком'язових клітинах матки**

Велика кількість досліджень демонструє, що похідні калікс[4]аренів здатні високоафінно модулювати низку катіон-транспортувальних АТФ-аз в ПМ клітин міометрія, впливати на поляризацію клітин та  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаз [4]. Крім того, калікс[4]арени впливають на  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальну активність мітохондрій пермеабілізованих міоцитів, а також ізольованих мітохондрій та катіон-залежні та біоенергетичні процеси в них, такі як синтез оксиду азоту (NO), активність комплексів ЕТЛ та утворення АФК [32-34].

Так, було охарактеризовано вплив калікс[4]арена С-90 (рис 1.2), що модифікований чотирма сульфоніламідinovими групами по верхньому вінцю, на велику кількість процесів. Було показано, що він:

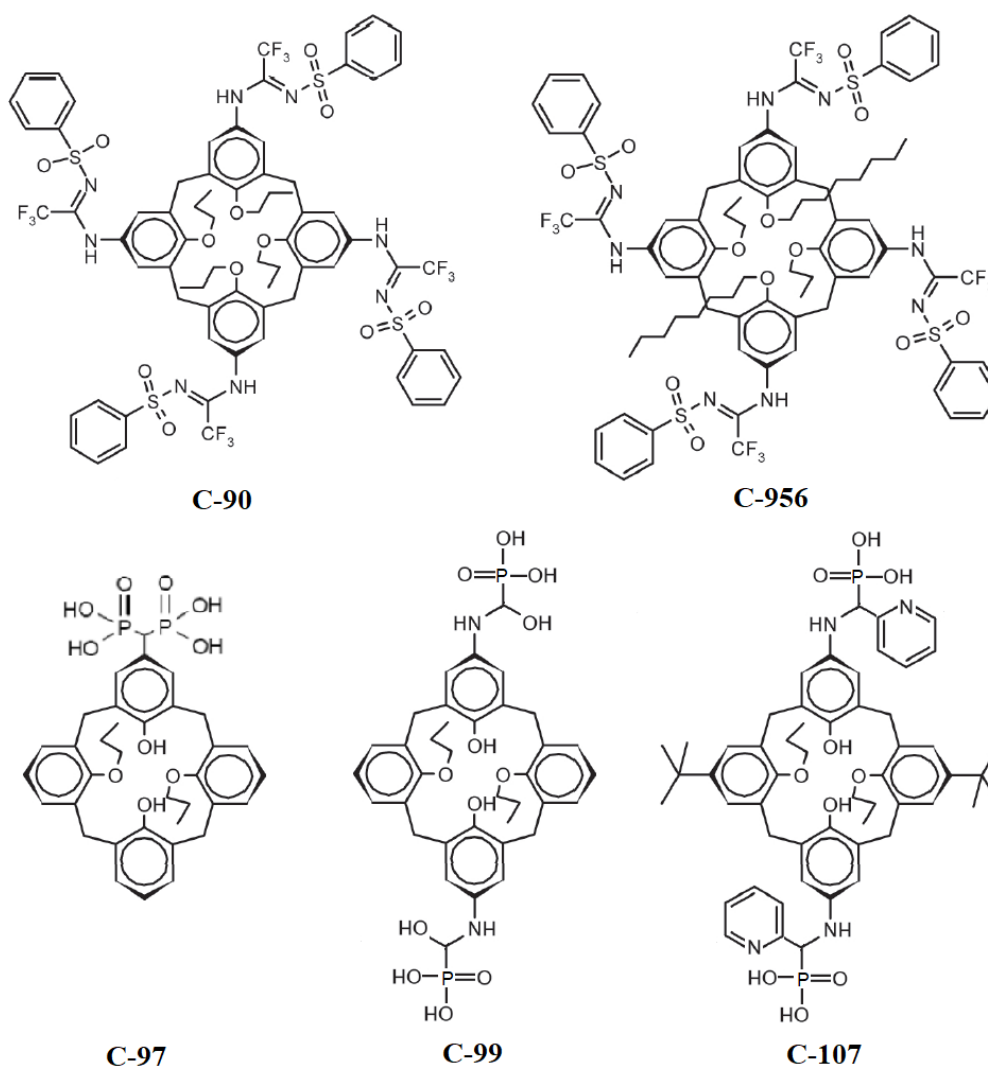
- може збільшувати швидкість скорочень міометрія, ініційованих окситоцином, та змінює його спонтанну скоротливу активність, а також пригнічує процеси вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з міоплазми гладеньком'язових клітин (ГМК) та, ймовірно, пригнічує процеси надходження катіону до клітин із позаклітинного середовища [35-37];
- вбудовується в ПМ ГМК та змінює її рідиннокристалічний стан та/або поверхневий заряд та взаємодіє з трансмембранними доменами  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-ази неконкурентно інгібуючи їх як у ПМ (в тому числі, у не збуджених клітинах міометрія), так і в СР, а також викликає зменшення швидкості гідролізу аденозинтрифосфату (АТФ), зростання  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазмі міоцитів та зменшення їхнього гідродинамічного діаметру [38-41];
- чинить значний активуючий вплив на АТФ-азу актоміозинового комплексу [42].

Калікс[4]арен С-91 посилює енергозалежну акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях у пермеабілізованих міоцитах, не впливаючи при цьому на пасивний вихід катіону з органел та на накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  в СР, а також ефективно знижує активність базальної  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-ази та, подібно до С-90, активує АТФ-азу актоміозинового комплексу [42, 43].

Калікс[4]арени С-97, С-99 та С-107 (рис. 1.2), функціоналізовані по верхньому вінцю фосфоновими кислотами, є високоафінними неконкурентними інгібіторами  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази ПМ міометрія, не впливаючи на її спорідненість до  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  та АТФ, але зменшуючи спорідненість до  $\text{Na}^+$  [44, 45]. У той же час, С-107 значно підвищує спорідненість ензиму до убаїну та активує ферментативну активність міозинової АТФ-ази гладенького м'язу, що

приводить стимуляції його скоротливої активності [46-50]. С-97 та С-99, навпаки, чинять гальмівний вплив на АТФ-гідролазну активність актоміозину та АТФ-азу субфрагмента-1 міозина (С-99) міометрія [50-52]. Також було продемонстровано, що дані калікс[4]арен-фосфонові кислоти спричиняють деполяризацію ПМ міометрія та транзйентну поляризацію ВММ, а також викликають зростання гідродинамічного діаметру міоцитів (С-99 та С-107) та ізольованих мітохондрій. Крім того, усі три сполуки пригнічують енергозалежну акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями, стимулюють  $\Delta\text{pH}$ -залежний вихід катіону з органел (С-97 та С-99), впливають на функціональну активність ЕТЛ, помірно знижують активність мітохондрійної NO-синтази та не спричиняють посилення утворення АФК [34, 53].

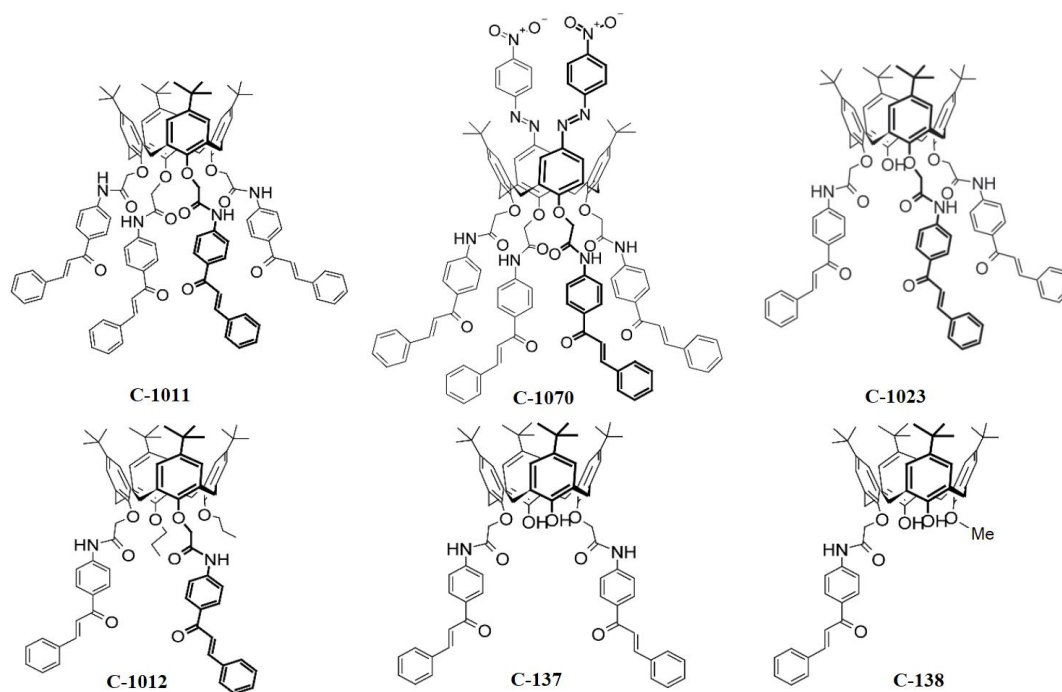
Калікс[4]арен С-956 (рис. 1.2), який, по суті, є структурним аналогом С-90 (відмінність полягає в наявності двох октильних груп по нижньому вінцю замість пропільних, завдяки чому досягається жорстка конформація і унеможливлується обертання фрагментів макроциклу), очікувано продемонстрував суттєвий інгібуючий вплив на активність  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФ-ази ПМ (PMCA – plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase) міометрія, а також зменшував гідродинамічний діаметр міоцитів [54]. На прикладі даного макроциклу вперше ґрунтовно було продемонстровано взаємодію калікс[4]арену з ПМ міоцитів, проникнення в цитоплазму та солокалізацію з мітохондріями. С-956 ефективно інгібує  $\Delta\text{pH}$ -залежне вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з органел, не впливаючи при цьому на процес енергозалежної акумуляції катіона, підвищує активність мітохондрійної NO-синтази, не збільшує рівні генерації АФК та чинить гальмівний вплив на функціональну активність ЕТЛ, пригнічуючи окислення аденінових динуклеотидів, внаслідок чого зменшується поляризація ВММ [33, 55].



**Рис. 1.2** – Структурні формули калікс[4]арен-фенілсульфоніламідинів та калікс[4]арен-фосфонових кислот

Калікс[4]арени C-136, C-137 та C-138, функціоналізовані по нижньому вінцю флавоноїдами халконами, стимулюють акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  в ізольованих мітохондріях міомерія [56]. C-137, C-138, C-1011 та C-1023 (рис. 1.3) гальмують окислення аденінових динуклеотидів в ЕТЛ ізольованих мітохондрій. C-1023 і C-1011, що мають 3 і 4 халконові замісники відповідно, посилюють генерацію АФК в органелах [57]. Було показано, що гідродинамічний діаметр мітохондрій збільшується за інкубації ізольованих органел з халконамід-калікс[4]аренами C-1011 і C-1012 (рис. 1.3), причому чим

більша кількість халконових замісників, тим більші розміри мітохондрій; крім того, наявність АТФ в середовищі зменшує розмір органел. За допомогою сполуки С-1070 (рис. 1.3), аналога С-1011 з двома додатковими азофенільними групами, що флуоресціюють, було доведено факт проникнення халконамід-калікс[4]аренів до міоцитів [58]. У роботі [59] С-1012, С-1021, С-1023 зменшують гідродинамічний діаметр мітохондрій, С-1011 сприяє його збільшенню. Також чотири зазначені сполуки стимулюють акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксі органел. Усі досліджені халконамід-калікс[4]арени демонстрували гіперполяризацію мітохондрійної мембрани, крім С-138, однієї халконамідної групи якого недостатньо для такого ефекту, проте достатньо для значного, порівняно з С-136 та С-137, ефекту на акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  [56, 59, 60].



**Рис. 1.3** – Структурні формули халконамід-калікс[4]аренів

Отже, супрамолекулярні макроцикли калікс[4]арени, які є малотоксичними та володіють широким спектром біологічної активності, є перспективними модуляторами катіон-транспортувальних та біоенергетичних

процесів у ГМК, зокрема можуть впливати на функціональну активність ЕТЛ, поляризацію мембрани мітохондрій, трансмембранний обмін  $\text{Ca}^{2+}$  та утворення АФК в мітохондріях міомерія.

Мітохондрії грають першочергову роль в  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналінгу та  $\text{Ca}^{2+}$ -залежному скороченні гладеньких м'язів. Завдяки спроможності накопичувати та вивільняти значну кількість іонів  $\text{Ca}^{2+}$ , у гладенькому м'язі вони виконують функцію високоефективного депо даного катіону. Порушення злагодженого функціонування локалізованих у ВММ  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем врешті призводить до перевантаження матриксу іонами  $\text{Ca}^{2+}$ , гіперполяризації мембрани, порушення  $\text{Ca}^{2+}$ -залежного метаболізму АФК. Усі ці процеси призводять до розвитку оксидативного стресу та дисфункції мітохондрій, що контрактильну дисфункцію ГМК за патологічних станів.

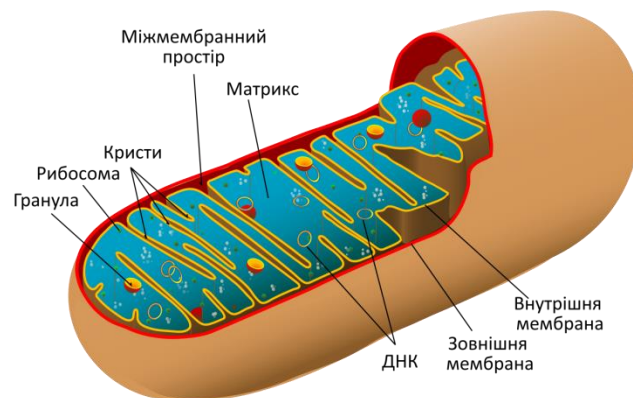
## **1.2. Властивості мітохондрій та їх роль у підтриманні іонного гомеостазу клітини**

Мітохондрії – органели, що містяться в переважній більшості клітин еукаріотів. Мітохондрії можуть бути локалізовані по периферії, навколо ядра, а також поблизу ПМ або ендоплазматичного/саркоплазматичного ретикулуму (ЕПР/СР), що визначає певні функції та особливості кожної органели, в тому числі  $\text{Ca}^{2+}$ -буферну здатність. Домінуюча функція мітохондрій полягає у виробництві АТФ шляхом фосфорилування аденозиндифосфату (АДФ) [61]. До синтезу АТФ залучені цикл трикарбонових кислот (ЦТК) та процеси окисного фосфорилування, які відбуваються в матриксі мітохондрій та у ВММ. Однак мітохондрії також виконують безліч інших функцій, зокрема: депонування іонів  $\text{Ca}^{2+}$  [1], синтез жирних кислот [62], регуляція клітинної проліферації [63] та метаболізму [64], АФК-опосередкований сигналінг [2, 65], кальцієвий сигналінг [1, 66], регуляція мембранного потенціалу [61], апоптичні процеси [1, 66-68],

окремі реакції синтезу гему [69] та стероїдів [70], гормональний [71] та імунний [72] сигналінг тощо.

Мітохондрія містить зовнішню (ЗММ) та внутрішню мембрани, які складаються з подвійних фосфоліпідних шарів та білків [73]. Між мембранами локалізується міжмембранний простір (ММП). ВММ утворює кристи – численні складки для збільшення площі своєї поверхні, а простір усередині ВММ має назву матрикс (**рис. 1.4**).

ЗММ має товщину близько 60-75 Å, містить фосфоліпіди та білки, співвідношення яких подібне до такого у ПМ і становить приблизно 1:1 по масі. Серед великої кількості інтегральних трансмембранних білків – поринів, основним є пороутворюючий напругозалежний аніонний канал (VDAC, voltage-dependent anion channel), який є основним транспортером іонів, метаболітів, нуклеотидів тощо [74, 75]. Більші молекули, зокрема білки, проходять через ЗММ за допомогою активного транспорту шляхом зв'язування сигнальної послідовності N-кінця білка з транслоказаю – великим мультисубодиничним білком-транспортером [76].



**Рис. 1.4** – Схематичне зображення структури мітохондрії

Здатність ЗММ зв'язуватися з мембраною ЕПР у мітохондрійно-ЕПР асоційовану мембрану важлива для кальцієвого сигналінгу та транспорту ліпідів

між зазначеними органелами [77]. Концентрація іонів та інших невеликих молекул у перимітохондрійному (міжмембранному) просторі мітохондрій мало відрізняється від такої в цитозолі завдяки високій проникності ЗММ [73]. Проте білковий склад ММП є відмінним від такого у цитоплазми, оскільки білки вибірково транспортуються завдяки активному транспорту, як вже було згадано.

ВММ містить близько 20% від загальної кількості білку в мітохондріях, крім того, співвідношення білок:фосфоліпід складає близько 3:1 по масі [78]. На відміну від зовнішньої, внутрішня мембрана не містить поринів, тому є майже непроникною з точки зору пасивного транспорту. Непроникність також зумовлена наявністю у складі ВММ важливого багатфункціонального фосфоліпиду кардіоліпіну, завдяки наявності в його структурі чотирьох ланцюгів жирних кислот, що створюють два негативні заряди [73]. Кардіоліпін виконує ряд важливих функцій, зокрема підтримує структурно-функціональну активність комплексів III і IV дихального ланцюга [79] та АТФ-синтази [80], бере участь у процесах апоптозу [81, 82], здатний депонувати протони для підтримки рН в ММП [83] тощо. ВММ утворює численні складки – кристи, завдяки яким збільшується площа поверхні, і, відповідно, ефективність виконання ключової функції мітохондрій, яка відбувається саме у кристах – синтез АТФ.

Матрикс, оточений внутрішньою мембраною, містить близько 2/3 від загальної кількості білків у мітохондріях [73]. Крім широкого спектру метаболітів та ензимів, необхідних для реакцій ЦТК, окисного фосфорилування, окислення пірувату та бета-окислення жирних кислот, в матриксі містяться також мітохондрійні рибосоми, мітохондрійні дезоксирибонуклеїнова (мтДНК) та рибонуклеїнова (РНК) кислоти та мітохондрійна транспортна РНК, а також малі органічні молекули, нуклеотидні кофактори та неорганічні іони [84]. рН у матриксі знаходиться на рівні приблизно 7.8, що є вище, ніж рН ММП, який становить близько 7.0–7.4 [85]. За

підтримку рН та створення електрохімічного градієнта відповідає дихальний ланцюг, що сприяє виробленню АТФ шляхом перекачування протонів. Градієнт також забезпечує контроль концентрації іонів, керованих потенціалом мітохондрійної мембрани, зокрема  $\text{Ca}^{2+}$  [84]. У матриксі міститься власний геном мітохондрій [86].

### **1.3. Біоенергетичні процеси в мітохондріях**

Мітохондрії, часто звані «клітинними електростанціями», відіграють критично важливу роль у виробництві енергії у формі АТФ, яка використовується усією клітиною для забезпечення її життєдіяльності. У згаданих органелах відбувається ряд складних біоенергетичних процесів, які ми детально розглянемо у наступному розділі.

#### **1.3.1. Цикл трикарбонових кислот**

Цикл трикарбонових кислот (цикл Кребса або лимонної кислоти) – ключовий етап аеробного клітинного дихання, місце перетину великої кількості метаболічних процесів. Продуктами одного оберту ЦТК є одна молекула АТФ або гуанозин-5'-трифосфату, яка легко здатна перетворюватися на молекулу АТФ допомогою нуклеозиддифосфаткінази; три молекули відновленого нікотинамідаденіндинуклеотиду ( $\text{NADH}$ ); одна молекула відновленого флавінаденіндинуклеотиду ( $\text{FADH}_2$ ); дві молекули вуглекислого газу. Відновлені форми динуклеотидів є донорами електронів для дихального ланцюга. ЦТК, як вже було згадано, локалізований у матриксі, як і вільно розташовані там ензими реакцій, за винятком сукцинатдегідрогенази, яка знаходиться в ліпідному шарі ВММ [87, 88].

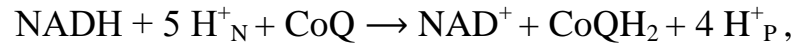
### 1.3.2. Електрон-транспортувальний ланцюг

Окисне фосфорилування – метаболічний шлях, у якому клітини використовують ензими та ензиматичні системи для окислення продуктів розпаду вуглеводів, жирів та білків, забезпечуючи таким чином хімічною енергією виробництво АТФ з АДФ та фосфату неорганічного ( $\text{P}_i$ ). Майже всі аеробні організми здійснюють окисне фосфорилування, в еукаріотів це відбувається всередині мітохондрій [87, 88].

Електрон-транспортувальний або дихальний ланцюг мітохондрій (рис. 1.5) складається з серії ензиматичних білкових комплексів та інших молекул, які за допомогою окисно-відновних реакцій, що відбуваються одночасно, переносять електрони від донорів до акцепторів, а також при цьому поєднують перенос електронів із переносом протонів через ВММ, що приводить до утворення електрохімічного градієнта, який керує процесом синтезу АТФ за допомогою АТФ-синтази [61]. Оскільки ВММ непроникна для протонів ззовні, ті можуть надходити до матриксу лише через спеціалізовані канали, які представляють собою  $F_o$ -ділянку АТФ-синтази. Тому рушійна сила градієнта, що спрямовує протони назад у матрикс є джерелом енергії для синтезу АТФ, сприяючи обертанню  $F_1$ -субодиниці ензиму, рух якої забезпечує генерацію АТФ [89, 90].

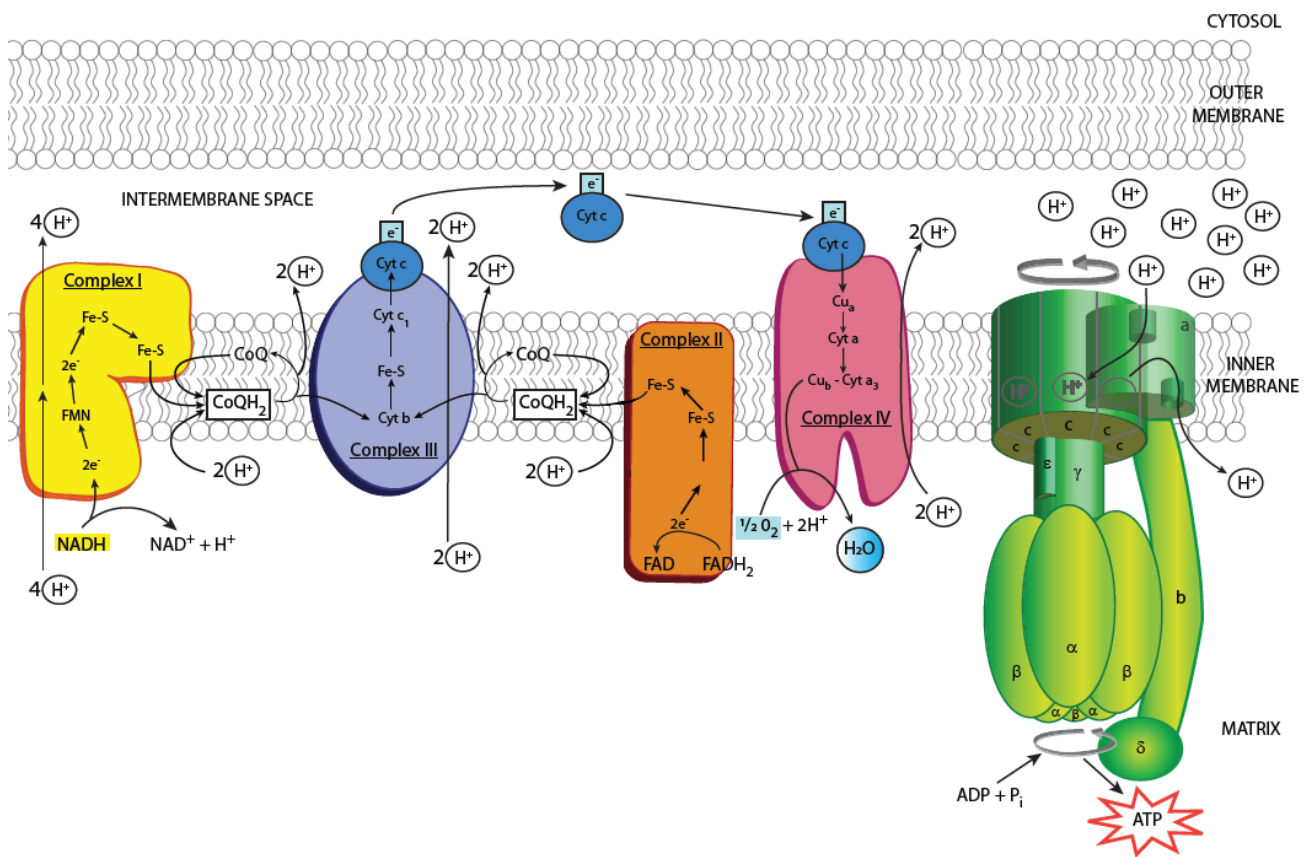
*NADH* – коензим *Q*-оксидоредуктаза (*NADH*-дегідрогеназа) – це комплекс I електрон-транспортувального ланцюга [91]. У ссавців комплекс I – це ензиматичний комплекс масою близько 1000 кілодальтон (кДа), що складається з 42 поліпептидних ланцюгів та двох видів простетичних груп: флавопротеїну з флавінмононуклеотидом і принаймні 6 залізо-сірчаних (Fe-S) кластерів [92]. Комплекс I здійснює 2 спряжені процеси: екзергонічне перенесення гідрид-іону ( $\text{H}^-$ ) з *NADH* і протона з матриксу на убіхінон (*CoQ* –

коензим Q<sub>10</sub>); та ендергонічне перенесення чотирьох протонів у ММП з матриксу:



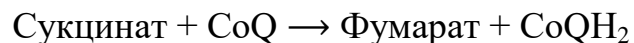
де CoQH<sub>2</sub> – убіхінол (відновлена форма коензиму Q<sub>10</sub>), N – індекс локалізації протонів у негативно зарядженому матриксі, P – індекс локалізації протонів у позитивно зарядженому міжмембранному просторі.

Існує ряд добре досліджених сполук, здатних інгібувати активність комплексу I ЕТЛ, та, як наслідок, всього дихального ланцюга. До їх числа входять, зокрема, міксотіазол, ротенон, амітал, пієридицин А. Механізм їхньої інгібуючої дії полягає в перешкоджанні перенесенню електронів від Fe-S кластерів на CoQ [94, 95].



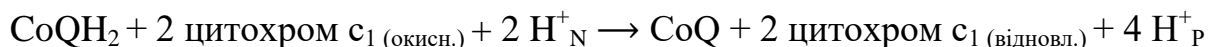
**Рис. 1.5** – Загальна схема будови та процесів електрон-транспортного ланцюга мітохондрій та АТФ-ази (справа). Адаптовано з [93]

*Сукцинат* – коензим *Q*-оксидоредуктаза (сукцинатдегідрогеназа) – комплекс II ЕТЛ та друга точка входу в нього [96]. Унікальність даного комплексу полягає, по-перше, в тому, що це єдиний ензим, який є як частиною циклу Кребса, так і дихального ланцюгу, по-друге, серед ензимів ЦТК – цей є єдиним, що розміщений у ВММ, на відміну від інших, вільно розташованих у матриксі. Комплекс II складається з чотирьох білкових субодиниць і містить 5 простетичних груп двох типів: зв'язаний FAD, Fe-S кластери та гемову групу, яка не бере участі в перенесенні електронів до CoQ, але є важливою для зниження генерації АФК [97, 98]. Білкові субодиниці А і В, що орієнтовані у матрикс, містять 3 Fe-S кластери, FAD і центр зв'язування сукцинату. Субодиниці С і D – інтегральні білки, що містять гем *b* і центр зв'язування убіхінону, який виступає кінцевим акцептором електронів у комплексі. Таким чином, окислюючи сукцинат до фумарату, роль сукцинадегідрогенази полягає у відновленні CoQ:



Однак, на противагу до комплексу I, під час цієї реакції не виділяється достатня кількість енергії для транспортування протонів через ВММ. Гем *b* зменшує «витік» електронів, який може призводити до генерації АФК під час транспортування електронів по дихальному ланцюгу [97, 98]. Такі сполуки, як оксалоацетат та малонат здатні конкурентно інгібувати комплекс II [99].

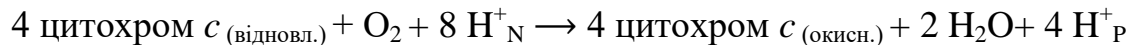
*Коензим Q* – цитохром *c* оксидоредуктаза або комплекс цитохрому *bc*<sub>1</sub> – комплекс III дихального ланцюга, що каталізує екзергонічну реакцію перенесення двох електронів, окиснюючи молекулу убіхінолу та відновлюючи дві молекули цитохрому *c*, та ендергонічну реакцію векторного перенесення протонів з матриксу до ММП, сприяючи утворенню електрохімічного градієнта [100, 101]:



У ссавців даний ензиматичний комплекс є димером, кожен мономер містить 11 білкових субодиниць, Fe-S кластер і 3 цитохроми: цитохром  $c_1$  і цитохроми  $b_{562}$ ,  $b_{566}$ . Основа функціонального комплексу складається з 3 субодиниць: цитохрому  $b$ , що містить два геми  $b_H$  і  $b_L$ , Fe-S протеїну Ріске з 2Fe-2S-центрами, та цитохрому  $c_1$  з одним гемом. Останні два компоненти виступають у ММП і там можуть взаємодіяти з цитохромом  $c$ , який не входить до функціонального комплексу. Комплекс містить два різні центри зв'язування для убіхінону –  $Q_P$  і  $Q_N$ . Димерна структура відіграє певну структурну роль у функціонуванні комплексу: заглиблена поверхня між мономерами формує дві «кишені», кожна з яких містить  $Q_P$ -центр одного та  $Q_N$ -центр іншого мономера. Цитохром  $c$  – розчинний протеїн-переносник електрону, що містить принаймні одну гемову групу та локалізований у міжмембранному просторі, як вже було зазначено. Атоми Fe гемової групи чергують відновлений двовалентний та окислений тривалентний стани, коли переносять електрон [102, 103].

*Цитохром c оксидаза* (цитохромоксидаза) – комплекс IV дихального ланцюга, передає електрони з цитохрому  $c$  на кисень, в результаті чого утворюється вода. Даний ензиматичний комплекс містить 13 субодиниць, 3 з яких становлять осердя комплексу. Субодиниця I містить дві гемові групи –  $a$  та  $a_3$  та іон міді  $Cu_B$ . Гем  $a_3$  та  $Cu_B$  разом утворюють Fe-Cu-центр. Субодиниця II має два іони міді, які разом з -SH-групами двох залишків цистеїну утворюють  $Cu_A$ -центр. Даний двоядерний центр, а також центр зв'язування цитохрому локалізовані у домені, який орієнтований у міжмембранний простір [103, 104]. Хоча точна роль субодиниці III в функціонуванні комплексу на даний момент залишається нез'ясованою, усі три субодиниці кодуються безпосередньо мтДНК та є найбільш консервативними структурами комплексу, що вказує на потенційні невивчені ролі [105]. Рух електронів через комплекс IV здійснюється від цитохрому  $c$  до  $Cu_A$ -центру, далі до гема  $a$ , Fe-Cu-центру і врешті на  $O_2$ .

Для відновлення кисню до води на кожні чотири електрони, що проходять через комплекс IV, поглинається чотири протони з матриксу. За рахунок енергії, що виділяється з екзергонічної реакції, на кожен перенесений електрон комплекс векторно переносить по протону в міжмембранний простір, сприяючи збільшенню електрохімічного потенціалу на додаток до внеску комплексів I та III [106]. Загальне рівняння реакції комплексу IV виглядає наступним чином:



Інгібіторами цитохромоксидази можуть виступати, зокрема, сірководень, ціанід, чадний газ та азид, зв'язуючись з Fe-Cu-центром, запобігаючи відновленню кисню [107].

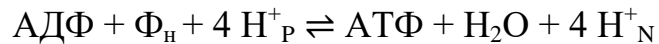
*АТФ-синтаза*, яку також часто називають комплексом V ЕТЛ, є кінцевим ензиматичним комплексом в окисному фосфорилуванні. Як вже було зазначено, даний комплекс використовує енергію електрохімічного градієнта протонів для синтезу АТФ з АДФ і  $\text{F}_\text{H}$ .

Розташована у ВММ, АТФ-синтаза складається з двох ділянок:  $\text{F}_1$  та  $\text{F}_0$  (індекс *o* – від назви антибіотика олігоміцину, який пригнічує активність даної ділянки [108]).  $\text{F}_0$ , маючи у складі переважно гідрофобні області, є інтегральним мембранним протеїном, виступаючи порою для переходу протонів з областей високої концентрації (міжмембранний простір) в області низької концентрації (матрикс), надаючи енергію для синтезу АТФ.

$\text{F}_0$  складається з трьох основних субодиниць *a*, *b* (2), *c*. Субодиниця *c*, розділена на декілька регіонів, утворює роторне кільце; пара субодиниць *b* утворює «ніжку», що надійно фіксує субодиниці  $\alpha$  і  $\beta$  ділянки  $\text{F}_1$ , запобігаючи їхньому обертанню; субодиниця *a* з'єднує «ніжку» *b* з ротором *c* [109]. Ділянка  $\text{F}_1$ , маючи у складі гідрофільну область, здатну гідролізувати АТФ, складається з субодиниць  $\alpha$  (3),  $\beta$  (3),  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ . Субодиниця  $\gamma$  приєднана до роторного кільця – субодиниці *c* ділянки  $\text{F}_0$ , утворюючи таким чином вісь ротора. Кінець

субодиниці  $\gamma$  занурений у сферичний комплекс, утворений трьома  $\alpha$ - та трьома  $\beta$ -субодиницями, розташованими по чергово [110].  $\alpha$ -субодиниці є каталітично неактивними: вони зв'язують АДФ, в той час як  $\beta$ -субодиниці, проходячи через різні конфірмаційні стани, каталізують утворення АТФ [111, 112].

Сумарне рівняння реакції утворення АТФ виглядає наступним чином:



Серед відомих інгібіторів, які використовувалися, в тому числі, для дослідження структури та механізму АТФ-синтази, виділяють, зокрема, згаданий антибіотик олігоміцин, який здатний інгібувати ділянку  $F_o$  шляхом блокування протонного каналу [108]; 1,3-дициклогексилкарбодіімід, який зв'язується з субодиницею  $c$  ділянки  $F_o$ , викликаючи стеричну перешкоду обертанню останньої [113] ті інші [114].

Окисне фосфорилування регулюється залежно від енергетичних потреб клітини. Показниками енергетичного статусу клітини є внутрішньоклітинна концентрація АДФ та коефіцієнт діючих мас системи АТФ-АДФ. АТФ у клітині утворюється з такою ж швидкістю, з якою він витрачається в енергозалежних процесах. Концентрації АТФ та АДФ визначають швидкість перенесення електронів у ЕТЛ за допомогою низки взаємопов'язаних механізмів контролю швидкості клітинного дихання [103].

#### **1.3.4. Активні форми кисню: шляхи утворення, регуляція, функції, ризики**

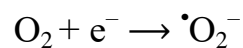
Активні форми кисню – високоактивні молекули, що утворюються з кисню, води та перекису водню ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Основними представниками даної групи є супероксид ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), гідропероксид ( $\cdot\text{OH}_2$ ), гідроксил-радикал ( $\cdot\text{OH}$ ), перекис водню, синглетний кисень ( $^1\text{O}_2$ ), пероксинітрит ( $\text{ONOO}^-$ ) та інші.

АФК постійно виробляються клітинами як продукт їхнього нормального функціонування, адже задіяні у значній кількості регуляторних процесів. За

нормальних фізіологічних умов клітини контролюють рівень АФК, урівноважуючи активність їхньої генерації з активністю ензиматичних антиоксидантних систем. Проте надмірна кількість АФК в клітині спричиняє шкідливі наслідки. Токсичність може виникати як через неконтрольоване виробництво, так і через неефективне усунення АФК антиоксидантними системами [115]. Загалом, шкідливий вплив АФК на клітину полягає у пошкодженні ДНК або РНК, окисленні поліненасичених жирних кислот у ліпідах та амінокислот у білках, а також окислювальній дезактивації специфічних ензимів шляхом окислення кофакторів.

Важлива роль АФК полягає в процесах клітинного сигналінгу та гомеостазу [116, 117], імунної відповіді на бактеріальні та вірусні інфекції [118-121], активації апоптозу Т-клітин [122], а також у процесах пам'яті та навчання [123-125] тощо.

У мітохондріях АФК, здебільшого супероксид радикал, можуть утворюватися в процесі транспортування електронів комплексами дихального ланцюга. Основними джерелами АФК в ЕТЛ є комплекс III та комплекс I. Так, під час перенесення електронів від  $\text{CoQH}_2$  через комплекс III на цитохром  $b_1$  вільний радикал убісеміхінону, який є проміжною сполукою в реакції, може сприяти «витоку» електрона та передавати його на кисень, відновлюючи останній до супероксид-аніон радикалу:



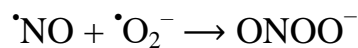
Антиміцин А, який, як вже було згадано, здатний зв'язувати матрикс-орієнтований центр зв'язування убіхінону  $\text{Q}_N$ , може блокувати таким чином Q-цикл, у випадку чого зростає кількість утворення супероксиду. Проте різні інгібітори ЕТЛ мають різний ефект на утворення АФК: обумовлене антиміцином А підвищення виробництва супероксиду комплексом III фактично пригнічується, якщо міксотіазолом блокується Fe-S протеїн Ріске, проте не

повністю, що свідчить про можливу наявність додаткових місць утворення супероксиду в комплексі III [126, 127].

У комплексі I первинним джерелом супероксиду є Fe-S кластерні білки (або N-1 α, або N-2), а також реакція перенесення електрону на убіхінон за механізмом, аналогічним до такого у комплексі III [126]. Комплекс II також бере участь в утворенні АФК, зокрема супероксиду, проте в менших кількостях: було показано, що самоокислення флавіну є джерелом утворення супероксиду [128]. У випадку комплексів I та II, радикал вивільняється лише у матриксі, тоді як комплекс III продукує супероксид також у міжмембранній простір.

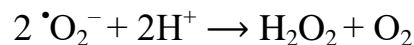
Також АФК у мітохондріях генерується рядом інших ензимів, які не є складовою ЕТЛ: гліцерол-3-фосфат дегідрогеназою 2, дегідрооротат дегідрогеназою, моноамінооксидазою та іншими [126, 129]. Маючи високу реакційну здатність, супероксид може ушкоджувати ензими, ліпідні мембрани та нуклеїнові кислоти, а також перетворюється в інші форми АФК.

При взаємодії супероксид-аніону з оксидом азоту ( $\cdot\text{NO}$ ) утворюється пероксинітрит:



Ця молекула є сильним окиснювачем, що невибірково реагує з нуклеїновими кислотами, ліпідами та білками [130, 131].

Шкідливі ефекти в результаті утворення АФК в мітохондріях значною мірою запобігаються антиоксидантними системами. Так, супероксид ензиматично перетворюється на  $\text{H}_2\text{O}_2$  ензимом супероксиддисмутазою (СОД):

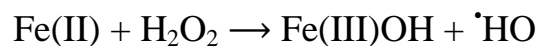


Оскільки супероксид може або відновлювати перехідні метали, які, у свою чергу, можуть реагувати з  $\text{H}_2\text{O}_2$ , утворюючи гідроксил-аніон радикал, або спонтанно реагувати з  $\cdot\text{NO}$  з утворенням пероксинітриту, важливо підтримувати стабільну концентрацію супероксиду на найнижчому можливому рівні. Мітохондрійний матриксі містить особливу форму СОД2 з марганцем в

активному центрі, який перетворює супероксид, що утворюється в матриксі або на внутрішній стороні ВММ, в  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Концентрація супероксиду в міжмембранному просторі контролюється, по-перше, формою СОД1 з міддю і цинком в активному центрі (ця форма також є основною в цитоплазмі); по-друге, наявністю цитохрому *c*, який може бути відновлений супероксидом з утворенням кисню. Відновлений цитохром *c* може переносити електрони до комплексу IV дихального ланцюга [126].

Перекис водню, продукт дисмутації супероксиду і основний попередник  $\cdot\text{OH}$ , здебільшого знешкоджується ензимом глутатіонпероксидазою з утворенням води. Даний ензим містить залишок цистеїну, атом сірки у складі тіольної групи якого заміщений на атом селену. Глутатіонредуктаза каталізує регенерування відновленого глутатіону з окисленої форми, використовуючи електрони, донором яких є НАДФН, утворений в пентозофосфатному циклі або за дії нікотинаміднуклеотидтрансгідрогенази [103].

Реакція Фентона – реакція взаємодії перекису водню з двоховалентним залізом ( $\text{Fe}^{2+}$ ), результатом якої є утворення гідроксил-аніон радикалу:



Саме через цю реакцію пероксид водню вважається токсичним, завдяки легкому утворенню молекул гідроксил-радикала, який швидко та необоротно окислює всі органічні сполуки, включаючи біомакромолекули [132]. Особлива небезпека гідроксил-радикала полягає у тому, що він не може бути елімінований за допомогою ферментативної реакції, на відміну від своїх молекул-попередників, що підтверджує критичну важливість функціонування супероксиддисмутази та глутатіонпероксидази.

Роль мітохондрій в процесах апоптозу добре охарактеризована. Апоптоз – контрольований процес загибелі клітин зі збереженням організмом усіх цінних біомолекулярних компонентів при цьому. Апоптоз може ініціюватися як позаклітинний сигналом, що надходить на рецептор на у ПМ, так і

внутрішньоклітинними причинами. Пошкодження ДНК та окисний стрес, спричинені надмірним зростанням АФК у клітині можуть сприяти підвищенню проникності ЗММ, зумовлюючи вивільнення у цитоплазму цитохрому *c*, який знаходиться у міжмембранному просторі в мітохондріях, який, в свою чергу, активує каспазу 9 – протеолітичний ензим, який запускає каспазний каскад, що стимулює апоптоз [133]. Таким чином, надпродукція АФК може виступати рушійною силою апоптозу, проте у більших кількостях може сприяти і некрозу, формі неконтрольованої загибелі ракових клітин.

Також була показана роль АФК у розвитку цукрового діабету [134, 135], серцево-судинних [136-139], нейродегенеративних [135, 140, 141] та інших захворюваннях.

#### **1.4. Механізми трансмембранного обміну $\text{Ca}^{2+}$ у мітохондріях**

Кальцій – універсальний вторинний катіон-месенджер, який регулює найважливіші функції всіх еукаріотичних клітин, зокрема експресію генів, клітинну проліферацію, регуляцію біоенергетики, скорочення м'язів тощо. Регуляція вільної внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  є важливим механізмом для внутрішньоклітинного сигналіngu та ключовим компонентом у посередництві багатьох клітинних функцій і біохімічних реакцій. Мітохондрії здатні швидко накопичувати і тимчасово зберігати  $\text{Ca}^{2+}$  для подальшого швидкого вивільнення, що робить ці органели важливими депо для  $\text{Ca}^{2+}$ . Внутрішньомітохондрійний  $\text{Ca}^{2+}$  регулює каскад фізіологічних і патофізіологічних процесів у клітинах. Нормальний рівень катіона необхідний для правильного функціонування мітохондрій, тоді як перевантаження  $\text{Ca}^{2+}$  є типовим для широкого спектру мітохондрійних дисфункцій і патофізіологічних процесів. Гомеостаз іонів  $\text{Ca}$  у мітохондріях визначається тонким балансом мітохондрійних систем транспорту катіона як у внутрішній, так і у зовнішній

мітохондрійних мембранах. Системи входу та виходу  $\text{Ca}^{2+}$  можуть виступати каналами, насосами, уні- та антипортерами або  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючими білками, які співпрацюють для підтримки внутрішньомітохондрійного гомеостазу катіона (рис. 1.6). Мітохондрії мають важливе значення для клітинної біоенергетики, не лише генеруючи та накопичуючи енергію у формі АТФ, але й відіграючи важливу роль у передачі  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналів. Поглинання катіона мітохондріями з цитозолу стимулює дихання мітохондрій і виробництво АТФ, регулюючи активність  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних дегідрогеназ у ЦТК, АТФ-синтази та транспортерів метаболітів. Регульоване підвищення рівня  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксі необхідне для регуляції активності  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних ензимів, які послідовно опосередковують метаболічний баланс і функцію ЕТЛ, а також продукування АФК [68].

#### 1.4.1. Механізми надходження $\text{Ca}^{2+}$ в мітохондрії

Вважається, що входження іонів Са в матрикс через ВММ здійснюється за допомогою трьох основних механізмів: мітохондрійного кальцієвого уніпортера (MCU – mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uniporter), механізму так званого «швидкого режиму» (RaM – rapide mode) та механізму, що використовує мітохондрійний ріанодиновий рецептор (mRyR – mitochondrial ryanodine receptor). Крім того, трансмембранний білок LETM1 (leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1), що є основним елементом  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника, також може представляти ще один механізм надходження  $\text{Ca}^{2+}$ , але його роль все ще обговорюється [142-144].

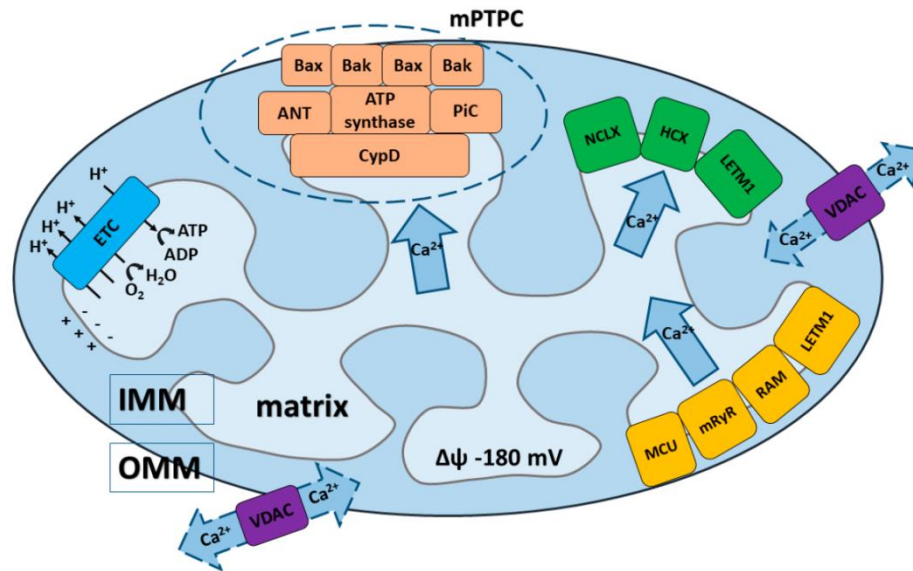
MCU – білковий комплекс ВММ, відповідальний за поглинання  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями, чутливий до рутенієвого червоного (RuR – ruthenium red). На даний момент шлях транспортування  $\text{Ca}^{2+}$  через MCU є найбільш широко охарактеризованим і визнається як основний шлях надходження катіона в мітохондрії. Крім основного білку MCU, до комплексу входять інші складові:

основні трансмембранні компоненти та мембранозв'язані регуляторні субодиниці. До трансмембранних компонентів входять: MCUb – домінантна негативна бета-субодиниця MCU, на 50% гомологічна з основою MCU, проте мають різні профілі експресії в різних тканинах; та EMRE – (essential MCU regulatory element), що формує взаємодію між регуляторними субодиницями та трансмембранними компонентами. До числа регуляторних субодиниць, локалізованих в ММП, входять: MICU1 (mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake protein 1), що вважається центральним для активації комплексу, діючи як кооперативний активатор; MICU2 (паралог MICU1 на 41%, діє як сенсор Ca<sup>2+</sup>, захищаючи мітохондрії від перевантаження катіоном) та MICU3 (паралог MICU1 на 34%) утворюють так звані EF-hand домени (спіраль-петля-спіраль), що зв'язують іони Ca; MCUR1 (MCU regulator 1) – взаємодіє з EMRE та MCU через свої спіральні домени, які стабілізують усі компоненти комплексу MCU [142, 145-148]. SLC25A23 (solute carrier 25A23) був ідентифікований як білок з EF-hand доменами і був запропонований як компонент MCU. Мутації та модифікації EF-hand доменів цього білка зменшують надходження іонів Ca до мітохондрій, однак досі залишається незрозумілим, чи впливає SLC25A23 на MCU безпосередньо чи загалом на біоенергетичні процеси в мітохондрії [149].

Активаторами комплексу MCU можуть виступати поліаміни, флавоноїди, таурин,  $\Phi_n$ ; крім того, було продемонстровано, що, зокрема для гладеньком'язових клітин матки, NO є ефективним стимулятором [150]. Інгібіторами MCU є барвник RuR та його похідне Ru360, аніонні протонифори карбоніл ціанід-*n*-трифторметоксифенілгідрозон (FCCP), карбоніл ціанід-*m*-хлорфенілгідрозон (СССР), 2,4-динітрофенол (ДНФ), амілорид та його похідні, моноциклін, лантаноїди, кардіоактивні препарати та інгібітори ЕТЛ [151].

Механізм швидкого режиму накопичення Ca<sup>2+</sup> (RaM) здатний періодично короткочасно накопичувати катіон у сотні разів швидше порівняно з комплексом MCU. Однак ще не було виявлено жодної молекулярної структури,

відповідальною за цей механізм, тому припускають, що RaM є лише додатковим станом комплексу MCU. RaM активується низькими концентраціями кальцію (50-100 нМ), в той час як MCU активується концентраціями  $\text{Ca}^{2+}$  вище 500 нМ [152]. RuR і в даному випадку виступає інгібітором, в той час як активатором механізму є поліамін спермін [151].



**Рис. 1.6** – Схематичне зображення мітохондрійних  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем [68]

Мітохондрійний ріанодиновий рецептор (mRyR) – високопровідний та низькоселективний механізм поглинання  $\text{Ca}^{2+}$ , виявлений у ВММ ізольованих мітохондрій кардіоміоцитів. Даний механізм може слугувати альтернативним шляхом для накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями, а також регулятором відтоку катіона при перевантаженні ним мітохондрій та при патологічних станах. На відміну від ріанодинових рецепторів, що розміщені в ЕПР/СР, щільність мітохондрійного каналу є в 10-20 разів меншою [153]. mRyR пригнічується RuR,  $\text{Mg}^{2+}$  та ріанодином, активатором може виступати імператоксин з отрути скорпіона [151].

### 1.4.2. Механізми вивільнення $\text{Ca}^{2+}$ з мітохондрій

Для підтримки внутрішньомітохондрійного гомеостазу  $\text{Ca}^{2+}$  за фізіологічних і патологічних умов необхідно підтримувати баланс між надходженням і виходом катіона в/з зазначених органел. Наразі запропоновано 3 основні механізми вивільнення іонів  $\text{Ca}^{2+}$  з мітохондрій:  $\text{Na}^+$ -залежний ( $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{Li}^+$ -обмінник, NCLX);  $\text{Na}^+$ -незалежний ( $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник); мітохондрійна пора перехідної проникності (mPTP – mitochondrial permeability transition pore), яка активується за умов перевантаження матриксу  $\text{Ca}^{2+}$  [68].

NCLX ( $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{Li}^+$ -обмінник) – механізм вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з матриксу мітохондрій за рахунок входження туди іонів  $\text{Na}^+$ . Крім того, дана система може функціонувати також як транспортер  $\text{Li}^+$  замість  $\text{Na}^+$ . Наразі структура NCLX залишається недослідженою, проте припускають, що  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінники ПМ та мітохондрій мають структурну подібність, хоч і відрізняються катіонною селективністю та чутливістю до інгібіторів. Передбачається, що за умов деполяризації мітохондрій  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник може діяти у зворотному режимі, сприяючи надходженню  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондрії [154, 155]. Активується NCLX іонами  $\text{K}^+$  та коротколанцюговими алканолами; інгібується  $\text{RuR}$ , трифлюоперазином, верапамілом, клоназепамом, тетрафенілфосфонієм (специфічний щодо NCLX), а також рядом двовалентних катіонів металів [151].

$\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник забезпечує  $\text{Na}^+$ -незалежний транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  з мітохондрій, використовуючи енергію градієнта  $\text{H}^+$ . Основним елементом, що забезпечує функціонування  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника є протеїн LETM1 – інтегральний білок-транспортер ВММ, який транспортує  $\text{Ca}^{2+}$  з мітохондрій, використовуючи енергію градієнта  $\text{H}^+$ . Проте, LETM1 може також працювати в зворотньому режимі, забезпечуючи накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями, тобто виступати альтернативним до MCU механізмом накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями [144, 156].  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник, на відміну від NCLX, переважає в мітохондріях

незбудливих клітин: печінки, нирок, легень, а також гладеньких м'язів, що представляють особливий інтерес у наших дослідженнях [151].

Щодо електрогенності  $H^+/Ca^{2+}$ -обміну існують різні точки зору, була показана як і стехіометрія 1  $Ca^{2+}$  до 1  $H^+$  та 1  $Ca^{2+}$  до 3  $H^+$ , так електронейтральність зі стехіометрією 1  $Ca^{2+}$  до 2  $H^+$  [151, 157, 158]. Було продемонстровано, що LETM1 відіграє важливу роль в підтримці  $K^+$ -гомеостазу та регуляції об'єму мітохондрій. Такі результати дозволяють припустити, що вказаний протеїн може входити також до комплексу, який функціонує як  $H^+/K^+$ -обмінник з електронейтральною активністю (1  $H^+/1 K^+$ ) [157, 159].

Інгібіторну дію на  $H^+/Ca^{2+}$ -обмінник демонструють протонифори FCCP, CCCP та ДНФ; RuR та Ru360; ціаніди, лантаніди, двовалентні йони Sr, Mn та Mg, а також сполука CGP37157. Було досліджено, що  $H^+/Ca^{2+}$ -обмін у мітохондріях міометрія стимулювався естрогенами, простагландинами та амілоридом [151, 160].

Мітохондрійна пора перехідної проникності (mPTP) вважається основним механізмом вивільнення  $Ca^{2+}$  з мітохондрій за патофізіологічних умов. Очевидно, концентрація  $Ca^{2+}$  є найважливішим регулятором і індуктором відкриття mPTP, зважаючи на його численні непрямі ролі в регуляції та модуляції комплексу. За фізіологічних рівнів  $Ca^{2+}$  може активуватися транзйентне відкриття пори, тоді як при перевантаженні катіоном відбувається тривале незворотне відкриття mPTP з подальшою деполяризацією ВММ, порушенням осмотичного балансу та розривом ЗММ, вивільненням проапоптичних факторів у цитозоль, що результується загибеллю клітини. Транзйентне відкриття mPTP є важливим механізмом вивільнення  $Ca^{2+}$ , що підтверджується результатами багатьох досліджень. Транзйентне відкриття відбувається, коли концентрація  $Ca^{2+}$  в матриксі перевищує транспортвальну здатність NCLX та NCX систем вивільнення, запобігаючи, таким чином,

перевантаженню мітохондрій  $\text{Ca}^{2+}$  та забезпечуючи швидкий вихід катіона [161-166].

Вважається, що mPTP є мультибілковою системою, що пронизує обидві мітохондрійні мембрани. До комплексу входять: циклофілін D (CypD) – стимулює структурні перебудови в білках, відповідальних за формування порового каналу mPTP, запобігаючи mPTP-опосередкованому некрозу [167]; аденін-нуклеотидна транслоказа (ANT) [168]; АТФ-синтаза і носій фосфату неорганічного ( $\text{P}_i$ ) – вважаються основними пороутворюючими компонентами mPTP [169-171]. Припускається, що VDAC може також опосередковувати активність mPTP [172, 173], хоч і не було підтверджено жодної істотної функції цього білка в mPTP-опосередкованій загибелі клітин [166, 174]. Було підтверджено модель mPTP з VDAC на зовнішній мітохондрійній мембрані, ANT на внутрішній та CypD у матриксі [175, 176].

Активація mPTP може бути опосередкована на різних рівнях через регуляцію кіназами, а також посттрансляційну модифікацію CypD [177]. Було показано, що mPTP може стимулюватися  $\text{Ca}^{2+}$  у поєднанні зі збільшенням концентрації АФК і  $\text{F}_n$  і пригнічуватися  $\text{Mg}^{2+}$  та  $\text{Mn}^{2+}$ , відновленими пуриновими нуклеотидами, тіолами, а також інгібіторами CypD, зокрема циклоспорином А (CspA) і сангліферином А [178]. Такі модифікації викликають значне збільшення порогової концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ , необхідної для відкриття пори [179].

### **1.5. Аспекти регуляції скоротливої активності гладенького м'язу матки**

Матка – орган жіночої репродуктивної системи людини та ссавців, який забезпечує ембріональний і внутрішньоутробний розвиток ембріону до народження. Матка має три шари, які разом утворюють стінку матки: ендометрій (епітеліальна тканина), міометрій (гладеньком'язова тканина) та

периметрій (серозна оболонка вісцеральної очеревини). Матку оточує параметріум – шар фіброзної та жирової сполучної тканини, який з'єднує матку з іншими органами малого тазу [180, 181].

Гладеньком'язова клітина являє собою веретеноподібний міоцит із широкою серединою, звуженими кінцями та одним ядром у центрі. У цитоплазмі ГМК відсутні міофібрили, проте завдяки високій кількості актину та міозину клітини мають здатність до скорочення. Оскільки скорочення та розслаблення регулюються вегетативною нервовою системою, діяльність гладеньком'язової тканини не може регулюватися свідомо, тобто є мимовільною та має свої власні механізми регуляції, в тому числі гормональні [182, 183].

Мембранний потенціал спокою гладенької мускулатури матки було зареєстровано між -35 і -80 мВ. Як і в інших клітинах, він підтримується за допомогою  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  помпи, яка створює вищу концентрацію іонів  $\text{Na}$  у позаклітинному просторі, і, відповідно, вищу концентрацію іонів  $\text{K}$  у внутрішньоклітинному просторі. Негативний потенціал створюється внаслідок відкриття більшою мірою  $\text{K}^+$ -каналів. Потенціал спокою зазнає ритмічних коливань, що викликані змінами в розподілі  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  і  $\text{Cl}^-$  між міжклітинним матриксом та міоплазмою, що, в свою чергу, відображає проникність ПМ для кожного з цих іонів [184].

$\text{Mg}^{2+}$ -залежні АТФ-ази, локалізовані у ПМ міоцитів, підтримують внутрішньоклітинний іонний гомеостаз [185]. Так, РМСА використовує енергію розщеплення макроергічних зв'язків АТФ для відкачування іонів  $\text{Ca}^{2+}$  з клітини після скорочення м'язу протилежно до градієнта концентрації між міоплазмою та міжклітинним матриксом. Оптимальна концентрація катіона в міоплазмі також підтримується шляхом пасивного транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  до міоцитів [185, 186].  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -АТФ-аза, виконує функції протилежно спрямованого енергозалежного переносника іонів  $\text{Na}^+$  та  $\text{K}^+$  у співвідношенні 3 до 2, внаслідок чого

підтримуються електрохімічні градієнти, необхідні для нормального функціонування клітини [187]. Також варта згадування високоактивна базальна  $Mg^{2+}$ -АТФ-аза, яка регулює концентрацію протонів ( $H^+$ ) в міоплазмі [185].

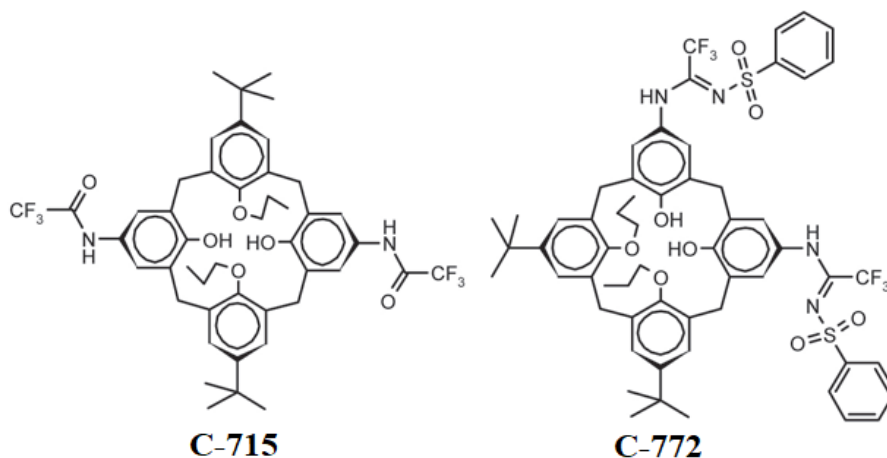
Саме через порушення нормальної скоротливої активності гладенького м'язу матки може виникати ряд патологій гіпо- та гіпертонусу міометрія, наслідком чого можуть бути кровотечі, слабкість пологової діяльності, передчасні пологи, викидні, атонія, дистонія тощо [188, 189]. Проте дані патології можуть бути обумовлені порушеннями у функціонуванні не лише мембранозв'язаних систем транспортування катіонів та інших процесів скоротливого апарату гладенького м'язу матки, а й порушеннями в функціонуванні внутрішньоклітинних органел, здатних депонувати  $Ca^{2+}$  під час скорочення міометрія, зокрема мітохондрій, оскільки збудження гладеньких м'язів матки пов'язано саме зі збільшенням концентрації катіона всередині клітин. Тому пошук фармакологічних сполук, які могли б ефективно впливати на біоенергетичні та  $Ca^{2+}$ -транспортувальні процеси в мітохондріях є важливим та пріоритетним напрямком наших досліджень.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 2.1 Хімічний синтез калікс[4]аренів С-715 та С-772

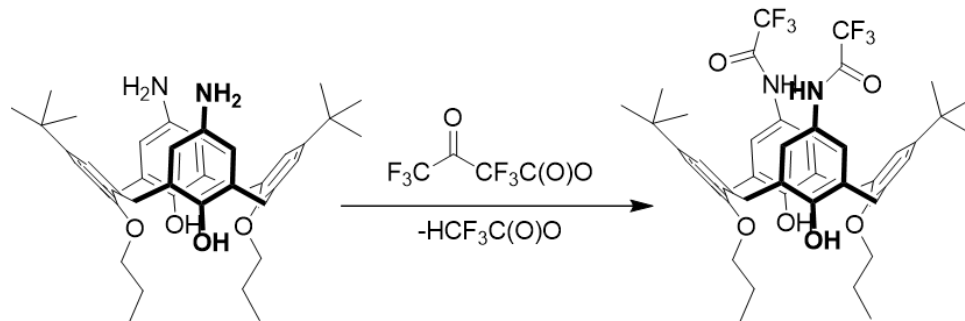
Калікс[4]арени С-715 та С-772 (рис. 2.1) були синтезовані, описані та структурно підтверджені за допомогою методів ядерно-магнітного резонансу та інфрачервоної спектроскопії к. х. н. Родіком Романом Васильовичем, завідувачем лабораторії медико-біологічних досліджень відділу хімії макроциклічних сполук Інституту органічної хімії НАН України. Далі будуть наведені лише кінцеві стадії синтезу досліджуваних сполук з діамінокалікс[4]аренів-попередників.



**Рис. 2.1** Структурні формули калікс[4]аренів С-715 та С-772

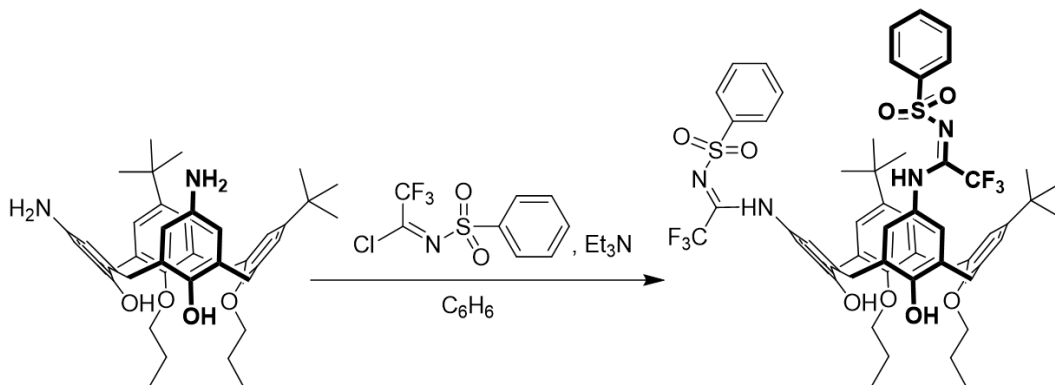
Калікс[4]арен С-715 ( $C_{46}H_{52}F_6N_2O_6$ , 5,17-ди(трифторо)ацетамідо-11,23-ди-*трет*-бутил-26,28-дигідроксі-25,27-дипропоксикалікс[4]арен) синтезували шляхом додавання при перемішуванні до розчину 0.9 мМ діамінокалікс[4]арену в сухому діетиловому етері розчин 2.1 мМ трифтороцтового ангідриду в діетиловому етері протягом 5 хвилин (рис. 2.2). Спостерігали утворення

безбарвного осаду продукту, перемішували реакційну суміш близько 18 годин. Надалі розчинник відганяли у вакуумі, після чого до залишку додавали водний метанол і перемішували 1 годину, продукт відфільтровували та промивали водою, сушили на повітрі. Отримали цільовий продукт у вигляді безбарвної кристалічної речовини з виходом 90%.



**Рис. 2.2** Схема кінцевої стадії синтезу калікс[4]арену С-715

Калікс[4]арен С-772 ( $C_{58}H_{62}F_6N_4O_8S_2$ , 5,11-ди(трифторометил (фенілсульфоніліміно)метиламіно-17,23-ди-*трет*-бутил-25,26-дипропокси-27,28-дигідроксикалікс[4]арен) отримували шляхом додавання при перемішуванні до розчину 2.1 мМ N-сульфонілімідоїлхлориду в сухому бензені розчин 1 мМ діамінокалікс[4]арену та 2 мМ триетиламіну у бензені протягом 15 хвилин (рис. 2.3).



**Рис. 2.3** Схема кінцевої стадії синтезу калікс[4]арену С-772

Реакційну суміш перемішували близько 16 годин при кімнатній температурі. Утворений в результаті реакції осад продукту та солянокислого триетиламіну відфільтровували та промивали бенzenом та сумішшю метанол-вода у співвідношенні 2:1. Надалі продукт сушили 3 години на повітрі та 4 години у вакуумі. Отримали цільовий продукт у вигляді безбарвної кристалічної речовини з виходом 84%.

Калікс[4]арени C-715 та C-772 розчиняли у диметилсульфоксиді (ДМСО) у різних концентраціях та зберігали в замороженому стані в холодильнику. Під час експериментів, вносили аліквоту в кювету з середовищем інкубації перед аналізом проби. Кількісне співвідношення аліквоти розчинника зі сполукою в середовищі становило 0.5% до загального об'єму. Діапазон досліджуваних кінцевих концентрацій калікс[4]аренів складав: 0.1, 1, 10, 20, 30 мкМ. У випадку проведення контрольних проб до середовища вносилася аліквота ДМСО.

## **2.2 Методи препаративної біохімії**

В експериментах були використані статевозрілі невагітні щури лінії «Вістар» віком близько 2 місяців, маса тіла яких становила біля 200 г, маса матки 300-700 мг. Тварин витримували у камері, насиченій парами хлороформу для введення у стан наркозу, після чого декапітували. Усі дії з тваринами були проведенні згідно з Законом України № 3447 IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» та Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та наукових цілей [190].

### **2.2.1. Виділення суспензії міоцитів з гладенького м'язу матки щурів**

Суспензію гладеньком'язових клітин матки щурів одержували за допомогою модифікованого методу Молларда із використанням соєвого

інгібітору трипсину та колагенази ІА [191, 192]. Після одержання матки та її ізолювання від жирової та сполучної тканини, її переносили в розчин Хенкса (розчин А) такого складу: HEPES – 10 мМ (рН = 7.4, 37°C), NaHCO<sub>3</sub> – 0.26 мМ, CaCl<sub>2</sub> – 1.26 мМ, NaCl – 136.9 мМ, глюкоза – 5.5 мМ, KCl – 5.36 мМ, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0.44 мМ, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0.26 мМ, MgCl<sub>2</sub> – 0.4 мМ, MgSO<sub>4</sub> – 0.4 мМ. Далі матку подрібнювали ножицями на маленькі шматочки близько 2×2 мм і відмивали від крові та високих концентрацій іонів Ca<sup>2+</sup> в 5 мл розчину Хенкса (розчин Б, який, на відміну від розчину А, не містить MgSO<sub>4</sub> та MgCl<sub>2</sub>, натомість містить 0.03 мМ CaCl<sub>2</sub>) 3 рази по 5 хвилин. Після цього, при перемішуванні, здійснювали інкубацію тканинного препарату (ТП) протягом 20 хвилин при 37°C у 2 мл середовища дисоціації тканини на основі розчину Б, до складу якого входили також компоненти: 0.1% колагенази типу ІА, 0.1% бичачого сироваткового альбуміну, 0.01% соєвого інгібітора трипсину. Надалі дане середовище дисоціації було відібрано, а ТП перенесено у розчин Б, вільний від ензиматичних складових. З метою прискорення дисоціації клітин, ТП 20-25 разів піпетували за допомогою пробовідбірника протягом 2-3 хвилин. Далі відбирали розчин Б, що містить дисоційовані клітини, а ТП знову повторно переносили в нове середовище дисоціації для інкубації ТП з ензиматичними складовими (див. вище). Загалом цей цикл повторювали 5-6 разів. Дві перші порції піпетованого розчину Б з дисоційованими клітинами надалі не використовували, оскільки передбачається, що вони містять пошкоджені клітини та тканинні фрагменти. Наступні 3-4 порції об'єднували і центрифугували протягом 10 хвилин при 80 g. Отриманий преципітат ресуспендували розчином Б і повторно центрифугували у аналогічному режимі. Після центрифугування преципітат, що складався з міоцитів міометрія, ресуспендували в розчині Б та використовували в експерименті, зберігаючи на льоду.

### 2.2.2. Виділення фракції ізольованих мітохондрій з гладенького м'язу матки щурів

Фракцію ізольованих мітохондрій отримували з ГМК матки щурів за допомогою методу диференційного центрифугування [193]. Після одержання матки та її ізолювання від жирової та сполучної тканини, ТП поміщали у розчин NaCl 0.9%. Далі тканину на льоду подрібнювали ножицями на маленькі шматочки близько 2×2 мм та переносили у охолоджений розчин такого складу: цукроза – 250 мМ, HEPES – 10 мМ (pH = 7.4), EGTA – 1 мМ, 1 мг/мл бичачого сироваткового альбуміну (БСА); співвідношення тканини до робочого розчину складало 1:9. ТП гомогенізували на льоду за допомогою гомогенізатору SilentCrusher M (Heidolph Instruments, Німеччина) 3 рази по 20 секунд із перервою в 1 хвилину зі швидкістю 17500 об/хв. Надалі гомогенат фільтрували та центрифугували протягом 15 хвилин при 1000 g за температури 4°C, після чого відбирали супернатант та центрифугували його 15 хвилин при 12000 g за температури 4°C. Преципітат ресуспендували у розчині такого складу: цукроза – 250 мМ, HEPES – 10 мМ (pH = 7.4), 1 мг/мл БСА; після чого повторно центрифугували 15 хвилин при 12000 g за температури 4°C. Одержаний преципітат, що складався з мітохондрій міоцитів міометрія, ресуспендували в буферному розчині такого складу: цукроза – 250 мМ, HEPES – 10 мМ (pH = 7.4), 1 мг/мл БСА у співвідношенні 100 мг тканини на 100 мл буферного розчину. Фракцію ізольованих мітохондрій впродовж експерименту зберігали на льоду.

Вміст білку у фракції мітохондрій визначали методом Бредфорда за реакцією з реактивом Coomassie Brilliant Blue G-250 [194]. Середнє значення вмісту білку в мітохондрійній фракції у всіх експериментах складало 1-2 мг/мл.

## 2.3 Флуоресцентні методи

В експериментальній роботі був задіяний метод спектрофлуориметрії. Флуоресцентні дослідження проводили з використанням спектрофлуориметра QuantaMaster 40 PTI (Photon Technology International, Канада) з програмним забезпеченням (ПЗ) FelixGX 4.1.0.3096 (Horiba Scientific, Японія), а також протокового цитофлуориметра Coulter<sup>®</sup> EPICS<sup>™</sup> XL<sup>™</sup> (Beckman Coulter, США) з ПЗ System II<sup>™</sup> Software (Beckman Coulter, США).

### 2.3.1 Характеристика аутофлуоресценції калікс[4]аренів C-715 та C-772

Спектри збудження та флуоресценції досліджуваних сполук, а також їхньої концентраційно-залежної інтенсивності флуоресценції вимірювали на приладі QuantaMaster 40 PTI. Робоче середовище (2 мл), до якого вносилися аліквоти калікс[4]аренів (10 мкл) у ДМСО, мало наступний склад: HEPES – 20 мМ (рН = 7.4, 37°C), K<sup>+</sup>-фосфатний буфер – 2 мМ (рН = 7.4, 37°C), KCl – 125 мМ, NaCl – 25 мМ, сукцинат натрію – 5 мМ, піруват натрію – 5 мМ.

### 2.3.2 Вивчення змін інтенсивності флуоресценції калікс[4]аренів C-715 та C-772 при взаємодії з міоцитами та ізольованими мітохондріями

Зміни флуоресценції досліджуваних калікс[4]аренів ( $\lambda_{зб} = 340$  нм,  $\lambda_{фл} = 400$  нм) при взаємодії з міоцитами та ізольованими мітохондріями міометрія визначали на приладі QuantaMaster 40 PTI. Для дослідження взаємодії з міоцитами використовували розчин Хенкса з таким складом: HEPES – 10 мМ (рН = 7.4, 37°C), NaHCO<sub>3</sub> – 0.26 мМ, CaCl<sub>2</sub> – 0.03 мМ, NaCl – 136.9 мМ, KCl – 5.36 мМ, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0.44 мМ, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0.26 мМ, глюкоза – 0.1%. Для дослідження взаємодії з ізольованими мітохондріями використовували

середовище з наступним складом: HEPES – 20 мМ (рН = 7.4, 37°C), K<sup>+</sup>-фосфатний буфер – 2 мМ (рН = 7.4, 37°C), KCl – 125 мМ, NaCl – 25 мМ, сукцинат натрію – 5 мМ, піруват натрію – 5 мМ. Робоче середовище (2 мл) з внесеними аліквотами калікс[4]аренів (10 мкл) інкубували протягом 1 хвилини при 37°C, після чого вносили аліквоту (50 мкл) міоцитів/мітохондрій та реєстрували зміни інтенсивності флуоресценції протягом 4 хвилин.

### **2.3.3. Дослідження змін аутофлуоресценції NADH в ізольованих мітохондріях**

Зміни інтенсивності власної флуоресценції NADH в матриці мітохондрій визначали на приладі QuantaMaster 40 РТІ. Реєстрацію флуоресцентного сигналу здійснювали протягом 10 хвилин. Флуоресцентний сигнал від NADH вимірювали при  $\lambda_{\text{зб}} = 350$  нм,  $\lambda_{\text{фл}} = 450$  нм. Використовували середовище з наступним складом: HEPES – 20 мМ (рН = 7.4, 37°C), K<sup>+</sup>-фосфатний буфер – 2 мМ (рН = 7.4, 37°C), KCl – 125 мМ, NaCl – 25 мМ, сукцинат натрію – 5 мМ, піруват натрію – 5 мМ, аліквота (50 мкл) мітохондрійної фракції, аліквота (10 мкл) калікс[4]арену.

### **2.3.4. Дослідження змін вмісту Ca<sup>2+</sup> в ізольованих мітохондріях**

Навантаження мітохондрій Ca<sup>2+</sup>-чутливим флуоресцентним барвником Fluo-4 AM (C<sub>51</sub>H<sub>50</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>23</sub>) у концентрації 2 мкМ здійснювали протягом 30 хвилин за температури 25°C у середовищі зі складом: HEPES – 10 мМ (рН = 7.4, 37°C), цукроза – 250 мМ, 1 мг/мл БСА. Також додавали 0.02% Pluronic F-127 (C<sub>572</sub>H<sub>1146</sub>O<sub>259</sub>) – сурфактанта, більше відомого як полуксамер 407, який, в даному застосуванні, покращує розчинення барвника у фізіологічному середовищі. Реєстрацію зміни концентрації Ca<sup>2+</sup> в матриці ізольованих

мітохондрій ГМК, навантажених  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливим флуоресцентним зондом Fluo-4 AM ( $\lambda_{\text{зб}} = 495$  нм,  $\lambda_{\text{фл}} = 525$  нм), визначали на приладі QuantaMaster 40 РТІ.

Для дослідження енергозалежної акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  в ізольованих мітохондріях використовували робоче середовище з наступним складом: HEPES – 20 мМ (рН = 7.4, 37°C),  $\text{K}^+$ -фосфатний буфер – 2 мМ (рН = 7.4, 37°C), цукроза – 250 мМ, сукцинат натрію – 5 мМ,  $\text{MgCl}_2$  – 3 мМ, АТФ – 3 мМ, аліквота (50 мкл) мітохондрійної фракції, аліквота (10 мкл) калікс[4]арену. Концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  в середовищі акумуляції не перевищувала 80 мкМ.

У випадку дослідження  $\Delta\text{pH}$ -індукованого виходу  $\text{Ca}^{2+}$  з матриксу мітохондрій попередню енергозалежну акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  здійснювали протягом 5 хвилин при 25°C у пробірці з аліквотою мітохондрійної фракції (50 мкл) та 50 мкл середовища акумуляції (див. вище), після чого дану суспензію (100 мкл) переносили в середовище (1.9 мл) виходу  $\text{Ca}^{2+}$  такого складу: HEPES – 20 мМ (рН = 6.5, 37°C),  $\text{K}^+$ -фосфатний буфер – 2 мМ (рН = 6.5, 37°C), цукроза – 250 мМ, сукцинат натрію – 5 мМ, CsрА – 5 мкМ, аліквота (10 мкл) калікс[4]арену. Концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  в середовищі вивільнення дорівнювала близько 4 мкМ, що є наслідком розведення аліквоти середовища акумуляції катіону, де концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  становила 80 мкМ, в 20 разів.

### **2.3.5. Дослідження генерації активних форм кисню в ізольованих мітохондріях методом протокової цитометрії**

Навантаження мітохондрій АФК-чутливим флуоресцентним барвником DCF-DA (dichlorofluorescein diacetate,  $\text{C}_{24}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{O}_7$ ) у концентрації 25 мкМ здійснювали протягом 30 хвилин за температури 25°C у середовищі зі складом: HEPES – 10 мМ (рН = 7.4, 25°C), цукроза – 250 мМ, 1 мг/мл БСА. Також додавали 0.02% Pluronic F-127. Утворення АФК в ізольованих мітохондріях міометрія вивчали на протоковому цитофлюориметрі Coulter® EPICS™ XL™. За

допомогою приладу можна одночасно вимірювати 6 параметрів: пряме і бокове розсіювання та інтенсивність флуоресценції на 4 довжинах хвиль, використовуючи аргоновий іонний лазер з повітряним охолодженням потужністю 15 мВт, що випромінює на довжині хвилі 488 нм. Температура повітря в приміщенні при проведенні аналізу не перевищувала 20°C.

Було створено протокол аналізу зразків для дослідження фракції ізольованих мітохондрій за флуоресценцією АФК-чутливого зонду DCF-DA. Інтенсивність флуоресценції реєструвалася на одному каналі за  $\lambda_{зб} = 488$  нм,  $\lambda_{фл} = 515$  нм. Протокол було налаштовано таким чином, що за допомогою обмеження за параметрами бічного та прямого світлорозсіювання, події реєструвалися лише у вибраній області. Аналіз проби зупинявся при досягненні 10000 зареєстрованих подій в межах виділеної області, або при досягненні 1 хвилини з початку аналізу.

Для аналізу зразків використовували спеціальні пластикові пробірки розміром 12×75 мм. Робоче середовище мало такий склад: HEPES – 20 мМ (рН = 7.4, 25°C), K<sup>+</sup>-фосфатний буфер – 2 мМ (рН = 7.4, 25°C), KCl – 125 мМ, NaCl – 25 мМ, сукцинат натрію – 5 мМ, піруват натрію – 5 мМ, аліквота (50 мкл) мітохондрійної фракції, аліквота (10 мкл) калікс[4]арену. На початку аналізу проб реакції утворення АФК ініціювали внесенням аліквоти (20 мкл) розчину пірувата натрію з сукцинатом натрія.

#### **2.4. Дослідження змін гідродинамічного діаметра ізольованих мітохондрій із використанням методу лазерної кореляційної спектроскопії**

Зміни гідродинамічного діаметра ізольованих мітохондрій – показника, що інтегрально відображає їхній об'єм, за дії досліджуваних сполук, досліджували методом лазерної (фотонної) кореляційної спектроскопії [195] за допомогою приладу ZetaSizer-3 (Malvern Panalytical, Велика Британія). Прилад

обладнаний корелятором Multi8 Computing Correlator Type 7032 CE з гелій-неоновим лазером ЛГН-111 потужністю 25 мВт та довжиною хвилі 633 нм. Реєстрацію лазерного опромінення, розсіяного суспензією ізольованих мітохондрій здійснювали по 1 хвилині протягом 10 хвилин під кутом розсіювання  $90^\circ$  за температури  $24^\circ\text{C}$ . Автокореляційну функцію обробляли за допомогою ПЗ PCS-Sizemodev 1.61.

Використовували робоче середовище інкубації (1 мл) з таким складом: HEPES – 20 мМ (рН = 7.4,  $25^\circ\text{C}$ ),  $\text{K}^+$ -фосфатний буфер – 2 мМ (рН = 7.4,  $25^\circ\text{C}$ ), KCl – 125 мМ, NaCl – 25 мМ, сукцинат натрію – 5 мМ, піруват натрію – 5 мМ.

## 2.5. Статистична обробка результатів

Статистичну обробку результатів здійснювали загально прийнятими методами для відносно невеликої кількості дослідів [196] за допомогою ПЗ MS Office Excel.

Середнє арифметичне  $M$  визначали за формулою:

$$M = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i = \frac{1}{n} (x_1 + \dots + x_n),$$

де  $x_i$  – змінна,  $n$  – кількість змінних.

Середню квадратичну похибку  $\sigma$  обчислювали за формулою:

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

Середньоквадратичну похибку середнього арифметичного  $m$  обчислювали:

$$m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - M)^2}{n(n - 1)}}$$

Ймовірність різниці середнього арифметичного за критерієм Стьюдента  $t$

розраховували:

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

## 2.6. Реактиви та матеріали

У роботі застосовувалися наступні речовини та реактиви таких виробників: *Sigma-Aldrich*, США: ДМСО, глюкоза, НЕРЕС (2-[4-(2-гідроксіетил)піперазин-1-іл]етан-1-сульфонова кислота), ЕГТА ((2S,2'S)-етиленгліколь-біс(2-аміноетанол)-N,N,N',N'-тетраоцтова кислота), піруват натрія, цукроза, сукцинат натрію, колагеназа ІА, БСА, CaCl<sub>2</sub>, Pluronic F-127. *Invitrogen*, США: Fluo-4 AM. *Fluka*, Швейцарія: АТФ, Coomassie Brilliant Blue G-250, DCF-DA, CspA.

Інші чисті для аналізу або хімічно чисті речовини та матеріали, зокрема солі, кислоти, луги та розчинники і т.д., були виготовлені в Україні та надані відділу Інститутом для спільного використання. Бідистильована вода, яка використовувалася для приготування розчинів, мала електропровідність в межах 1,5 мкСм/см, виміряну кондуктометром ОК-102/1 (Radelkis, Угорщина).

### РОЗДІЛ 3

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Обрані для даного дослідження калікс[4]арени С-715 та С-772 (рис. 2.1) раніше продемонстрували найслабкіший вплив на активність РМСА порівняно з усіма структурними аналогами С-90 (рис. 1.3) [4, 5]. У іншому дослідженні [197] було продемонстровано, що С-715 практично не впливає на каталізований субфрагментом-1 міозину гідроліз АТФ в клітинах міометрія, в той час як С-772 виявляє найвищий після С-90 активуючий ефект: у концентрації 100 мкМ підвищує гідроліз АТФ в середньому на 60% порівняно з контролем. Таким чином, в цитованих роботах автори дійшли висновків, що саме фенілсульфонілімінні групи (присутні у С-772) грають вирішальну роль в модуляції АТФ-азної активності. Було виявлено, що значення уявних констант активації та коефіцієнтів Хілла для С-90 та С-772 були майже однаковими. Було проведено мінімізацію енергії тривимірних моделей досліджуваних сполук, для С-715 та С-772 значення склали 272.2 та 278.5 ккал/моль відповідно, що також дозволило здійснити докінг між сполуками С-90 і С-715 в якості порівняння та субфрагментом-1 міозину [197].

Таким чином, оскільки С-715 та С-772 не показали значущого впливу на РМСА, та контраверсійні результати стосовно впливу на субфрагмент-1 міозину, ми вирішили дослідити їх в якості ефекторів на  $\text{Ca}^{2+}$ -залежні процеси в ізольованих мітохондріях міометрія. Враховуючи різну функціоналізацію сполук по верхньому вінцю, наглядною буде порівняльна оцінка їхньої активності.

Для оцінки результатів, насамперед варто звернути увагу на певні фізико-хімічні аспекти структури досліджуваних сполук. Завдяки модифікації С-715 по верхньому вінцю двома трифторацетамідними залишками, розташованими на протилежних фенольних кільцях калікс[4]аренової чаші, він

не виявляє активність щодо РМСА, як вже було згадано [4, 5]. Наявність невеликих за розмірами та площею поверхні малополярних карбонільних груп відкриває можливість для дослідження більш специфічного впливу саме на  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальні системи та  $\text{Ca}^{2+}$ -залежні процеси в мітохондріях, як і у випадку С-772, хоча останній все-таки виявляв незначний інгібіторний вплив на РМСА завдяки наявності двох фенілсульфонілімінних груп, розташованих на сусідніх кільцях по верхньому вінцю калікс[4]аренової чаші. Проте його вплив виявився незначним у порівнянні зі сполуками-аналогами з трьома та чотирма (С-90, С-956) фенілсульфонілімінними замісниками [4].

Важливою характеристикою даних макромолекул також є відсутність великих гідрофобних замісників, як, наприклад, у С-956 (рис. 1.3), який містить два октильних ланцюги по нижньому вінцю. У нашому випадку, пропільні ланцюги є значно менш гідрофобними. Два ароматичні кільця в складі замісників по верхньому вінцю калікс[4]аренової чаші, що представлені у С-772, проте, є гідрофобними структурами, через що ми припускаємо, що, окрім того, що ця сполука має більш гідрофобні властивості, характер її взаємодій з ліпідними мембранами буде більш ефективним. Крім того, досліджувані калікс[4]арени мають нейтральний заряд, що передбачає відносну легкість проникнення в клітини і розподілу у внутрішньоклітинних компартментах.

Ми вважаємо, що нижча полярність та вища гідрофобність калікс[4]арену передбачають більш ефективний характер взаємодії з мембранами, зокрема внутрішньою мембраною мітохондрій, і більший вплив на транспортні системи, що входять до її складу та компоненти ЕТЛ.

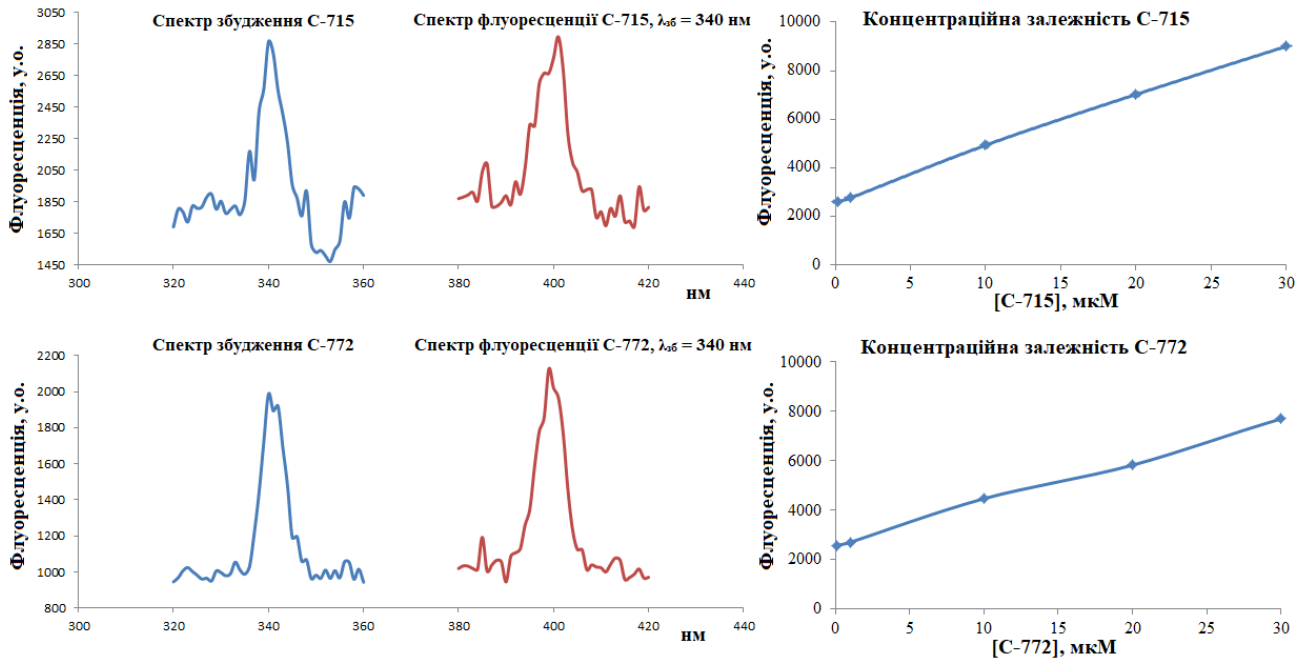
Фундаментальними показниками функціонування мітохондрій є ефективність роботи  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем, процеси окислення аденінових динуклеотидів (зокрема NADH), інтенсивність генерації АФК та гідродинамічний діаметр, який є інтегральним показником об'єму мітохондрій

[198]. Таким чином, дослідження саме цих критеріїв було пріоритетними напрямками представленої роботи.

### **3.1. Спектри збудження та флуоресценції, концентраційно-залежна інтенсивність флуоресценції калікс[4]аренів С-715 та С-772**

Для коректної постановки подальших експериментів та вибору оптимальних концентрацій досліджуваних сполук, методом спектрофлуориметрії було виявлено, що калікс[4]арени С-715 та С-772 аутофлуоресціюють в синьо-фіолетовій ділянці спектру. Довжини хвиль максимумів збудження та флуоресценції становлять 340 нм та 400 нм відповідно (**рис. 3.1**). Варто зазначити, що така довжина хвилі максимуму флуоресценції суттєво відрізняється від власної флуоресценції аденінових динуклеотидів мітохондрій, що дає можливість відстежувати взаємодію досліджуваних калікс[4]аренів з даними субклітинними структурами. Власна флуоресценція калікс[4]аренів обумовлена наявністю в їхніх структурах ароматичних кілець та карбонільних груп (у випадку С-715), а також ауксохромів, зокрема гідроксильних груп.

Інтенсивність флуоресценції калікс[4]аренів лінійно зростала лінійно концентраційно-залежно (0.1, 1, 10, 20, 30 мкМ) в робочому розчині без біологічних об'єктів (**рис 3.1**). У застосованому діапазоні концентрацій не спостерігається самогасіння флуоресценції сполук в робочому розчині. Застосування нижчих концентрацій не показало значущих відмінностей від контролю, а вищих – викликало помутніння у робочому середовищі внаслідок утворення непрозорих часточок.



**Рис. 3.1** – Спектри збудження та флуоресценції, концентраційна залежність інтенсивності флуоресценції калікс[4]аренів C-715 та C-772 (0,1, 1, 10, 20, 30 мкМ)

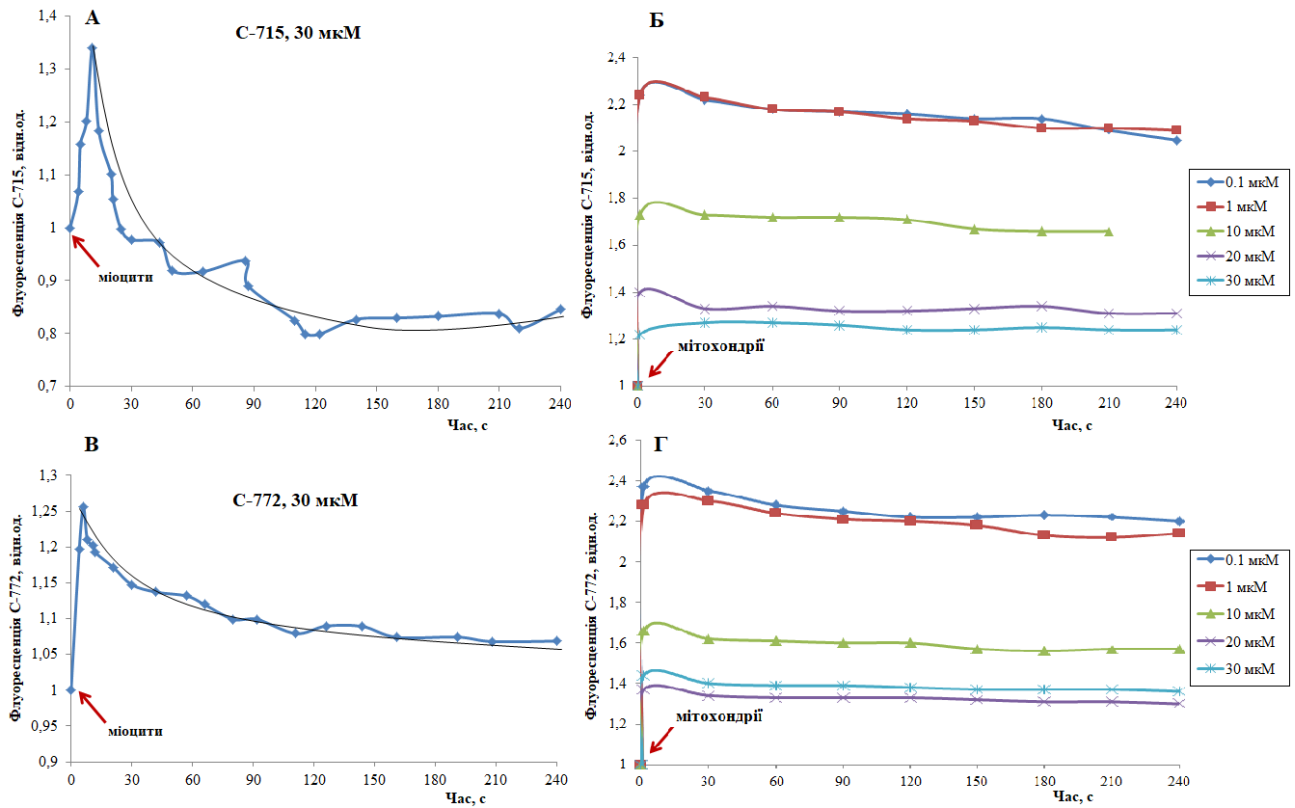
### 3.2. Дослідження взаємодії калікс[4]аренів C-715 та C-772 з міоцитами та ізольованими мітохондріями міомерія

Було досліджено ефекти взаємодії вибраних калікс[4]аренів з міоцитами міомерія та ізольованими мітохондріями ГМК. При внесенні у середовище з калікс[4]аренами у концентраціях 30 мкМ аліквоти суспензії міоцитів міомерія спостерігається різке підвищення інтенсивності флуоресценції калікс[4]арена з подальшим поступовим її зниженням (рис. 3.2 А, В). Таке різке збільшення флуоресценції, ймовірно, зумовлене взаємодією калікс[4]аренів з плазматичною мембраною міоцитів, тобто їхньою адсорбцією на поверхні клітини і відповідним переходом у більш гідрофобне середовище. Подальше проникнення в цитозоль, а також можливі процеси подальшої агрегації призводять до зниження флуоресцентного сигналу. Факт проникнення до

міоплазми структурно подібного калікс[4]арену С-956 та його солокалізації з мітохондріями був продемонстрований раніше з використанням методів спектрофлуориметрії та конфокальної мікроскопії [33].

З графіків на **рис. 3.2 А, В** видно, що калікс[4]арену С-715 властивий більш значний спалах інтенсивності флуоресценції, на відміну від С-772, проте і зниження після спалаху також є значно швидшим, і вже через 30 секунд інтенсивність флуоресценції зрівнюється зі значеннями такої до внесення міоцитів. Крім того, спостерігається і подальше її зниження протягом наступних хвилин (**рис. 3.2 А**). Додавання міоцитів до калікс[4]арену С-772, в свою чергу, спричиняє менший спалах інтенсивності флуоресценції, а також набагато більш повільне і менш значне зниження флуоресцентного сигналу (**рис. 3.2 В**), що може свідчити про те, що він краще затримується в мембрані. Це може бути обумовлено наявністю двох фенілсульфонілімінних замісників і, відповідно, кращою взаємодією з мембраною.

У випадку додавання калікс[4]аренів до ізольованих мітохондрій переважаючим є ефект їхньої взаємодії з зовнішньою поверхнею внутрішньої мембрани органел. При цьому флуоресцентний сигнал зростає, а фаза його зниження слабо виражена (**рис. 3.2 Б, Г**). Ми припускаємо, що це обумовлено специфічним хімічним складом внутрішньої мітохондрійної мембрани, її великим вмістом протеїнових комплексів та відносно малим об'ємом матриксу. Чим вищою є концентрація калікс[4]аренів, тим слабша інтенсивність флуоресцентного сигналу спостерігається, що пояснюється імовірним посиленням їхньої агрегації в мембрані і самогасінням флуоресценції.



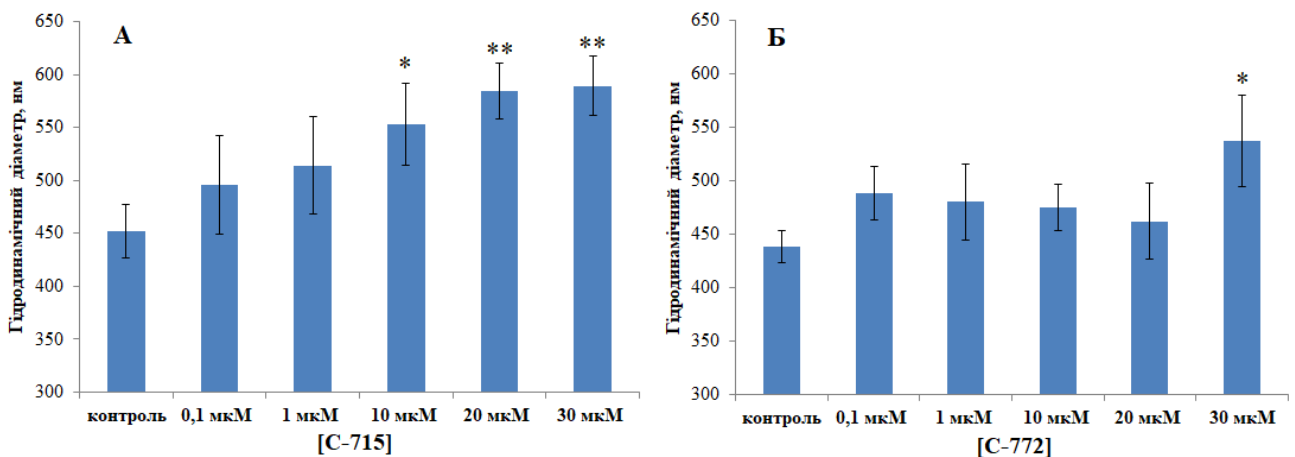
**Рис. 3.2** – Ефект взаємодії калікс[4]аренів С-715 (А, Б) та С-772 (В, Г) з міоцитами міометрія (30 мкМ) (А, В) та ізольованими мітохондріями ГМК (Б, Г). Стрілками позначено моменти внесення аліквот біологічних об'єктів до середовищ з калікс[4]аренами

### 3.3. Дослідження впливу калікс[4]аренів С-715 та С-772 гідродинамічний діаметр ізольованих мітохондрій

Відомо, що існує взаємозв'язок між об'ємом мітохондрій та показниками їхнього функціонування, зокрема поляризацією ВММ, інтенсивністю окислювальних та синтетичних процесів, генерацією АФК тощо. Відповідно, зміни у функціонуванні органел будуть супроводжуватися зміною їхньої геометрії та розміру [199, 200]. За допомогою методу лазерної кореляційної спектроскопії було оцінено показники гідродинамічного діаметра органел, що

інтегрально відображає їхній об'єм [201], в присутності досліджуваних калікс[4]аренів у робочому середовищі.

Показано, що вибрані калікс[4]арени, залежно від концентрації, викликають помірне зростання об'єму ізольованих мітохондрій. У випадку С-715, збільшення гідродинамічного діаметра в залежності від концентрації можна охарактеризувати як лінійне (рис. 3.3 А). За концентрацій 20 і 30 мкМ показник діаметра органел достовірно збільшився на близько 30% у порівнянні з контролем. Калікс[4]арен С-772, в свою чергу, загалом виявляє менший вплив: за концентрації 30 мкМ діаметр органел достовірно збільшується на приблизно 20%, проте за інших концентрації ефект є незначним (рис. 3.3 Б). Дані результати, на нашу думку, вказують на можливість втручання досліджуваних калікс[4]аренів в роботу ЕТЛ, що призводить до змін осмотичного балансу між матриксом ізольованих мітохондрій і зовнішнім середовищем, наслідком чого є помірне зростання об'єму органел. Проте, ми переконані, що це не свідчить про ті чи інші прояви мітохондрійної дисфункції.



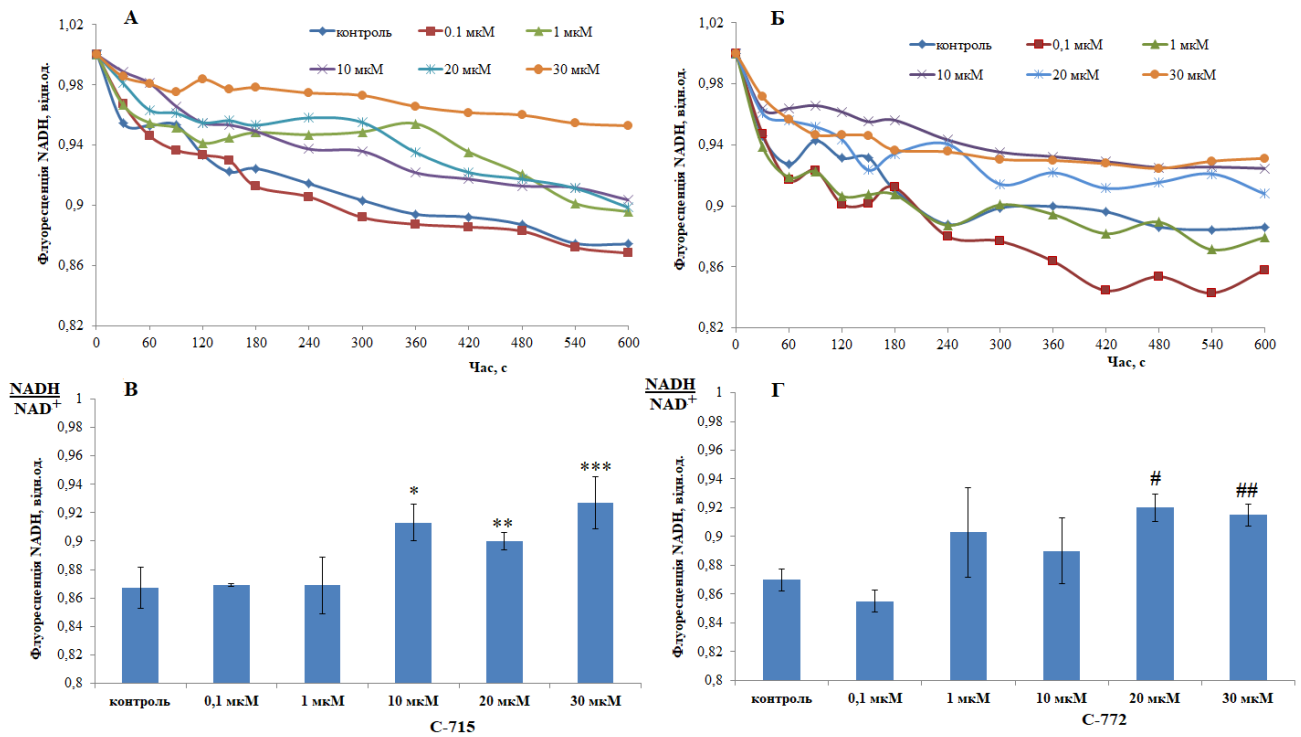
**Рис. 3.3** – Зміни гідродинамічного діаметра ізольованих мітохондрій за дії калікс[4]аренів С-715 (А) та С-772 (Б). Результати статистичної обробки.  $M \pm m$ ,  $n=7$ . Достовірно відносно контролю: \* -  $P=0.05$ , \*\* -  $P<0.01$

### 3.4. Дослідження впливу калікс[4]аренів С-715 та С-772 на процес окислення NADH в ізольованих мітохондріях

З метою дослідження впливу вибраних калікс[4]аренів на функціональну активність ЕТЛ, нами було проведено експерименти, що дозволяють зафіксувати зміну інтенсивності флуоресценції аденінових динуклеотидів, зокрема NADH. На відміну від окисленої форми  $\text{NAD}^+$ , відновленій формі NADH характерна власна флуоресценція, що дозволяє використовувати її в якості маркера функціональної активності дихального ланцюга [202, 203]. Зв'язок між активністю ЕТЛ та окисно-відновним співвідношенням аденінових динуклеотидів було продемонстровано раніше [204, 205]. Можливість впливу структурно подібних калікс[4]аренів, зокрема С-956, на процесі окислення динуклеотидів була також показана [33].

Результати наших експериментів свідчать про те, що вибрані калікс[4]арени залежно від часу та концентрації гальмують окислення NADH в ізольованих мітохондріях. За рахунок наявності в інкубаційному середовищі 5 мМ пірувату та сукцинату, які слугують субстратами для функціонування комплексів I та II ЕТЛ, ми спостерігали поступове зниження флуоресценції NADH, що свідчить про зміну співвідношення відновленої та окисленої форми  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ . З графіків на **рис. 3.4 А, Б** видно, що досліджувані калікс[4]арени у певних концентраціях чинять гальмівний вплив на окислення NADH з часом, що може свідчити про те, що вплив сполук на функціональну активність ЕТЛ може бути пов'язаний з пригніченням активності комплексу I дихального ланцюга.

Калікс[4]арен С-715 достовірно знижує швидкість окислення NADH у концентраціях 10, 20 і 30 мкМ, згідно зі статистичними результатами на **рис. 3.4 В**. У свою чергу, С-772, достовірно гальмує зниження окислення динуклеотиду у концентраціях 20 і 30 мкМ (**рис. 3.4 Г**).



**Рис. 3.4** – Вплив калікс[4]аренів С-715 (А, В) та С-772 (Б, Г) на окислення NADH в ізольованих мітохондріях. А, Б – результати типового експерименту; В, Г – результати статистичної обробки.  $M \pm t$ ,  $n=3$ . Достовірно відносно контролю: \* -  $P=0.05$ , \*\* -  $P=0.1$ , \*\*\* -  $P<0.05$ , # -  $P=0.01$ , ## -  $P<0.01$

Отже, помірне інгібування комплексу I ЕТЛ, про що свідчить гальмування окислення NADH, може мати наслідком зниження електрохімічного потенціалу ВММ, що й супроводжується помірним зростанням гідродинамічного діаметра органел. У той же час, зменшення потенціалу мітохондрійної мембрани може призводити до зниження акумуляції іонів Са матриксом та інтенсивності перебігу  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних процесів в мітохондріях.

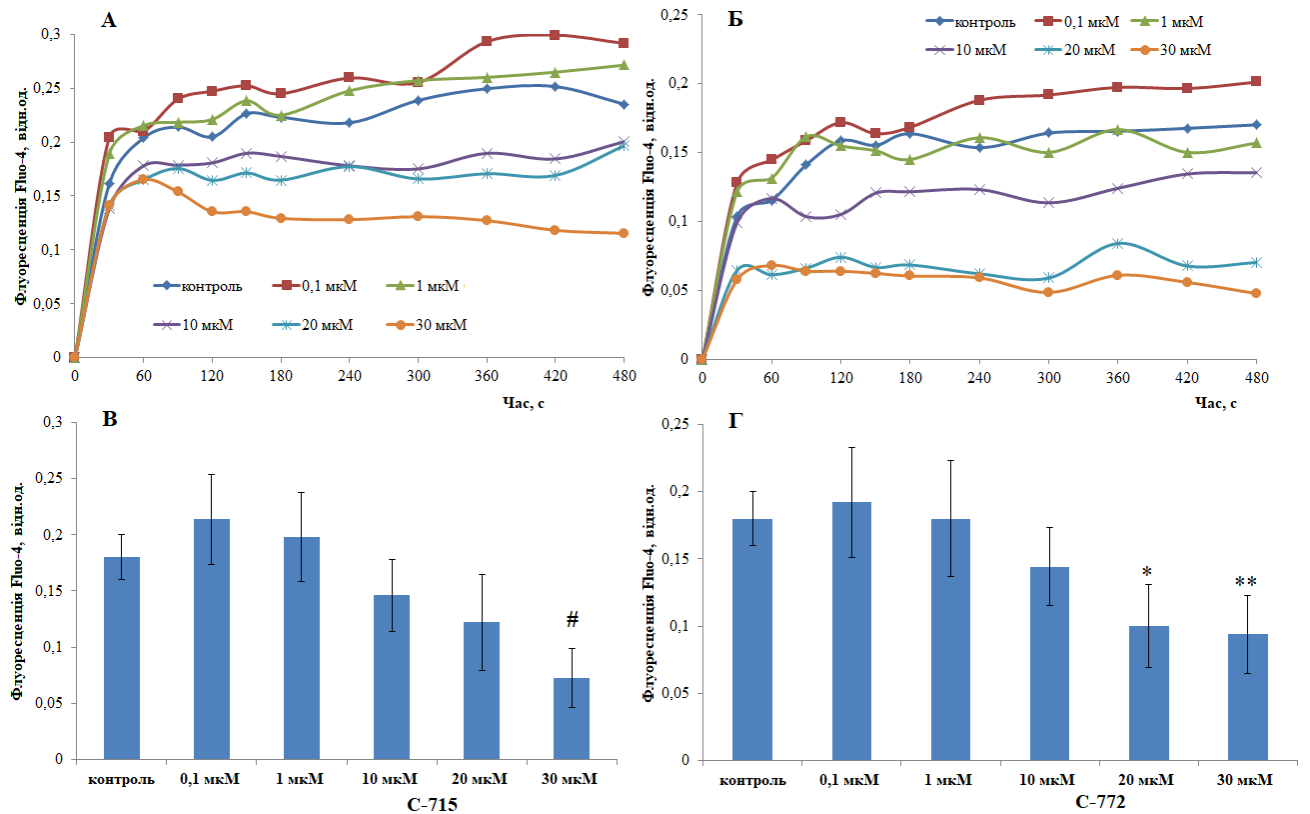
### 3.5. Дослідження впливу калікс[4]аренів С-715 та С-772 на $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальні процеси в ізольованих мітохондріях

Роль іонів  $\text{Ca}^{2+}$  в сигнальних та регуляторних процесах всередині клітин, зокрема міоцитів міометрія, важко переоцінити. Велика кількість досліджень присвячена їй, зокрема, спроможності мітохондрій даних клітин ефективно контролювати концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  всередині міоцитів, забезпечуючи таким чином скорочення і розслаблення м'язу. У разі збудження ГМК і підвищення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  всередині них, мітохондрії здатні оперативно акумулювати катіон енергозалежним шляхом, що забезпечується MCU.

Раніше було продемонстровано, що наявність сукцинату та  $\text{Mg-ATP}^{2-}$  у робочому середовищі є необхідною умовою енергізації мітохондрій для посилення процесу акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  з цитоплазми до матриксу органел [206, 207]. Завдяки перспективному для даних досліджень  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливому флуоресцентному зонду Fluo-4 AM [206], яким було навантажено суспензію ізольованих мітохондрій, ми змогли дослідити вплив калікс[4]аренів С-715 та С-772 на процес енергозалежної акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  методом спектрофлуориметрії. Показано, що досліджувані калікс[4]арени залежно від концентрації та часу знижують ефективність енергозалежної акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  ізольованими мітохондріями. Зокрема, калікс[4]арен С-715 у концентрації 30 мкМ достовірно знижує акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  на 60% відносно контролю (**рис 3.5 В**). Калікс[4]арен С-772, в свою чергу, у концентраціях 20 і 30 мкМ – на близько 40% відносно контролю (**рис. 3.5 Г**).

Аналіз даних щодо впливу досліджуваних калікс[4]аренів на окислення NADH в ізольованих мітохондріях і відповідного припущення щодо впливу сполук на функціональну активність ЕТЛ, зокрема його комплексу I, узгоджується з отриманими результатами щодо гальмівного впливу калікс[4]аренів на ефективність енергозалежної акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$ . Зниження

інтенсивності надходження іонів  $\text{Ca}^{2+}$  в матрикс мітохондрій, безумовно впливатиме на інтенсивність перебігу  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних процесів, зокрема активність  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних дегідрогеназ циклу Кребса та піруватдегідрогеназного комплексу, а також  $\text{Ca}^{2+}$ -залежного синтезу оксиду азоту, наявність якого в мітохондріях міоцитів було доведено раніше [32].

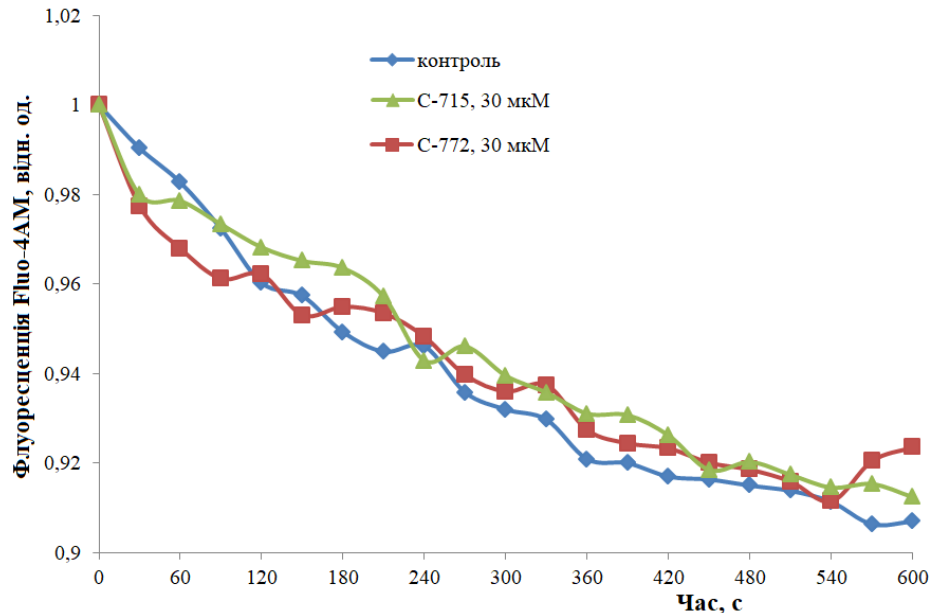


**Рис. 3.5** – Вплив калікс[4]аренів С-715 (А, В) та С-772 (Б, Г) на процес енергозалежної акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  в ізольованих мітохондріях. А, Б – результати типового експерименту; В, Г – результати статистичної обробки.  $M \pm m$ ,  $n=5$ .

Достовірно відносно контролю: # -  $P < 0.01$ , \* -  $P < 0.05$ , \*\* -  $P = 0.05$

Крім енергозалежної акумуляції, ми також досліджували процес  $\Delta\text{pH}$ -індукованого вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з матриксу мітохондрій, що реалізується  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінником ВММ. Завдяки наявності в середовищі  $\text{CsprA}$ , який виступає ефективним інгібітором  $\text{mPTP}$ , ми виключаємо участь пори в процесах виходу

$\text{Ca}^{2+}$  з матриксу органели. Ми виявили, що досліджувані калікс[4]арени не вплинули на процес  $\Delta\text{pH}$ -залежного виходу  $\text{Ca}^{2+}$  навіть у найбільшій з використаних концентрації, 30 мкМ (рис. 3.6).



**Рис. 3.6** – Вплив калікс[4]аренів С-715 та С-772 (30мкМ) на процес  $\Delta\text{pH}$ -індукованого вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з матриксу ізолюваних мітохондрій. Результати типового експерименту

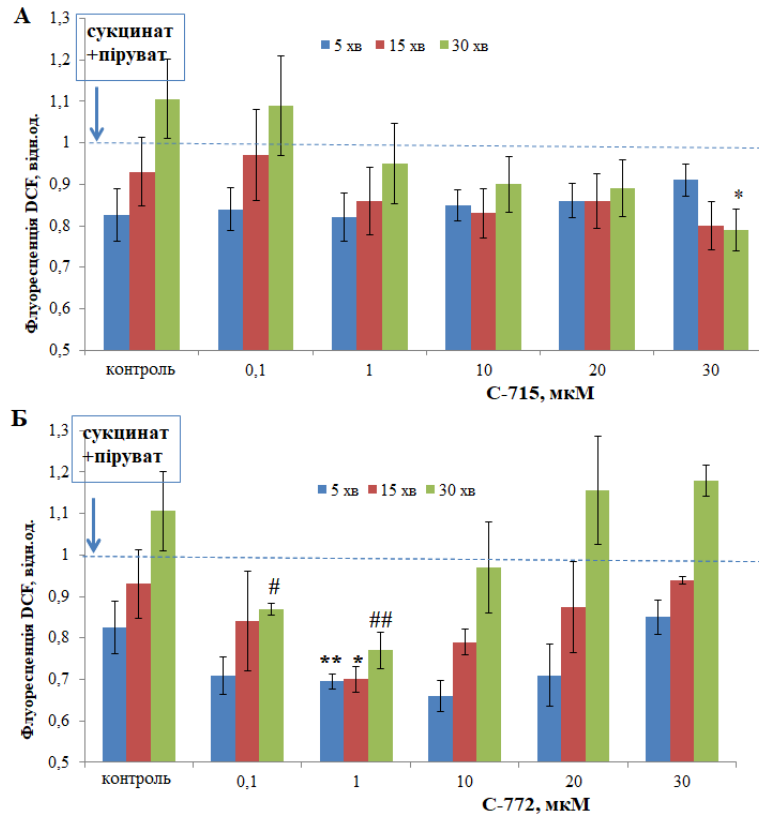
### 3.6. Дослідження впливу калікс[4]аренів С-715 та С-772 на процеси генерації активних форм кисню в ізолюваних мітохондріях

Відомо, що внаслідок гіперполяризації ВММ спостерігається експоненціальне зростання кількості АФК в органелах [208, 209]. Було показано наявність взаємозв'язку між рівнем акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксі мітохондрій, функціонуванням ЕТЛ, активністю  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних дегідрогеназ і піруватдегідрогеназного комплексу, а також рівнями генерації активних форм азоту та кисню в органелах [2]. Оскільки утворення АФК є  $\text{Ca}^{2+}$ -залежним процесом, це означає, що його інтенсивність тісно пов'язана з активністю ЕТЛ.

Також відомо, що комплекси III та I дихального ланцюга відіграють провідну роль в генерації АФК – радикали можуть утворюватися, зокрема, під час перенесення електрону на убіхінон та в місці знаходження Fe-S кластерних білків [126, 210].

Нами було встановлено, що окремі концентрації досліджуваних калікс[4]аренів залежно від часу зумовлюють зниження рівня генерації АФК мітохондріями. Оскільки підвищений рівень генерації АФК в даних органелах може призвести до мітохондрійної дисфункції, то вплив досліджуваних сполук може розглядатися як певна протекторна дія стосовно цих субклітинних структур. Ми припускаємо, що в основі цього ефекту лежить гальмування роботи комплексу I дихального ланцюга, що узгоджується з вище викладеними результатами стосовно впливу досліджуваних калікс[4]аренів на процеси окислення NADH та енергозалежної акумуляції  $Ca^{2+}$  в мітохондріях.

Із застосуванням АФК-чутливого флуоресцентного зонду DCF-DA та методу протокової цитометрії показано (**рис 3.7**), що дія калікс[4]арену C-772 проявляється за відносно низьких концентрацій і за менш тривалої експозиції. Не виключено, що за вищих концентрацій C-772 додатково відбувається втручання у функціонування комплексів II-IV ЕТЛ, внаслідок чого подальше зниження генерації АФК не спостерігається. У випадку калікс[4]арену C-715, його ефект на зниження рівня генерації АФК зростає зі збільшенням концентрації сполуки в робочому середовищі. Достовірний ефект зниження рівня генерації АФК на 30-й хвилині експозиції виявлено за концентрації 30 мкМ.



**Рис. 3.7** – Вплив калікс[4]аренів С-715 (А) та С-772 (Б) на процеси генерації АФК (за DCF-флюоресценцією) в ізольованих мітохондріях. Результати статистичної обробки.  $M \pm t$ ,  $n=4$ . Достовірно відносно контролю: \* -  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.1$ , # -  $P = 0.05$ , ## -  $P < 0.01$

Таким чином, ми показали, що калікс[4]арени С-715 і С-772, що мають власну флуоресценцію, проникають в міоцити міометрія, а також взаємодіють з ізольованими мітохондріями гладенького м'язу матки, помірно збільшуючи діаметр органел, проте не викликаючи розвитку мітохондрійної дисфункції. Результати нашої роботи свідчать про те, що досліджувані сполуки зумовлюють гальмування окислення NADH та пригнічення енергозалежної акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  ізольованими мітохондріями, не впливаючи при цьому на  $\Delta\text{pH}$ -залежний вихід катіону з органел. Ми припускаємо, що вплив сполук на функціональну активність ЕТЛ може бути пов'язаний з втручанням в функціонування

комплексу I дихального ланцюга, внаслідок чого також відбувається зниження електрохімічного потенціалу ВММ, що й супроводжується помірним зростанням гідродинамічного діаметра органел. У той же час, зменшення потенціалу мітохондрійної мембрани може призводити до зниження акумуляції іонів Са матриксом та інтенсивності перебігу Са<sup>2+</sup>-залежних процесів в мітохондріях, серед яких, в тому числі, продукція АФК. Ми показали, що окремі концентрації досліджуваних сполук залежно від часу зумовлюють зниження рівня генерації АФК ізольованими мітохондріями, що може розглядатися як протекторна дія стосовно органел. Виходячи з попередніх результатів, ми припускаємо, що гальмування окислення NADH у комплексі I ЕТЛ лежить в основі цього ефекту, оскільки комплекси III та I відіграють провідну роль в продукції мітохондрійних АФК. Калікс[4]арени C-715 і C-772 у мікромольних концентраціях можуть бути застосовані як ефективний засіб впливу на структурно-функціональну активність мітохондрій.

## ВИСНОВКИ

1. Продемонстровано, що калікс[4]арени C-715 і C-772 мають власну флуоресценцію. Аналіз зміни флуоресцентного сигналу під час взаємодії сполук з ізольованими мітохондріями та клітинами міометрія свідчить про можливість проникнення сполук в міоцити та взаємодії з мембраною мітохондрій.

2. Помірне збільшення гідродинамічного діаметру мітохондрій під дією досліджуваних калікс[4]аренів, або його відсутність, вказує на те, що сполуки не викликають мітохондрійної дисфункції.

3. Досліджувані сполуки пригнічують окислення NADH в ізольованих мітохондріях, що відображає інгібуючий вплив на функціонування дихального ланцюга, зокрема його комплексу I.

4. Вибрані калікс[4]арени знижують енергозалежну акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  ізольованими мітохондріями, більш виражена дія показана у випадку C-772.  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник, відповідальний за  $\Delta\text{pH}$ -індуковане вивільнення катіону з матриксу мітохондрій, виявився резистентним до дії C-715 та C-772.

5. Вивчені сполуки зумовлюють зниження генерації активних форм кисню мітохондріями, що може розглядатися як їхня протекторна дія стосовно цих субклітинних структур. Ефект більш гідрофобного C-772 проявляється за відносно низьких концентрацій і за менш тривалої експозиції.

6. Досліджені калікс[4]арени можуть бути використані в експериментальній практиці як засіб впливу на функціональну активність мітохондрій за відносно низьких концентрацій.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Rizzuto, R., Giorgi, C., Romagnoli, A., & Pinton, P. (2008).  $\text{Ca}^{2+}$  signaling, mitochondria and cell death. *Current molecular medicine*, 8(2), 119-130.
2. Feissner, R. F., Skalska, J., Gaum, W. E., & Sheu, S. S. (2009). Crosstalk signaling between mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  and ROS. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 14, 1197.
3. Rodik, R. V., Boyko, V. I., & Kalchenko, V. I. (2009). Calixarenes in bio-medical researches. *Current Medicinal Chemistry*, 16(13), 1630-1655.
4. Костерін, С. О., Кальченко, В. І., Векліч, Т. О., Бабіч, Л. Г., & Шликов, С. Г. (2019). Каліксарени як модулятори АТР-гідролазних систем гладеньком'язових клітин. *Київ: Наукова думка*.
5. Veklich, T. A., Shkrabak, A. A., Slinchenko, N. N., Mazur, I. I., Rodik, R. V., Boyko, V. I., ... & Kosterin, S. A. (2014). Calix[4]arene C-90 selectively inhibits  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase of myometrium cell plasma membrane. *Biochemistry (Moscow)*, 79, 417-424.
6. Gutsche, C. D. (2008). *Calixarenes: an introduction* (Vol. 10). Royal Society of Chemistry.
7. Neri, P., Sessler, J. L., & Wang, M. X. (Eds.). (2016). *Calixarenes and beyond* (pp. 1-1062). Cham: Springer International Publishing.
8. Ярош, О. К., Родік, Р. В., Кальченко, В. І., & Ярош, О. О. (2013). Калікс[п]арени—основа створення нових класів лікарських засобів (огляд літератури). *Журнал Національної академії медичних наук України*, (19, № 4), 421-434.
9. Gutsche, C. D., Dhawan, B., Levine, J. A., No, K. H., & Bauer, L. J. (1983). Calixarenes 9: Conformational isomers of the ethers and esters of calix[4]arenes. *Tetrahedron*, 39(3), 409-426.

10. Stewart, D. R., & Gutsche, C. D. (1999). Isolation, Characterization, and Conformational Characteristics of p-tert-Butylcalix[9–20]arenes. *Journal of the American Chemical Society*, *121*(17), 4136-4146.
11. Gutsche, C. D., Dhawan, B., No, K. H., & Muthukrishnan, R. (1981). Calixarenes. 4. The synthesis, characterization, and properties of the calixarenes from p-tert-butylphenol. *Journal of the American Chemical Society*, *103*(13), 3782-3792.
12. Gutsche, C. D., Dhawan, B., Leonis, M., & Stewart, D. (1990). para-tert-Butylcalix[6]arene. *Organic Syntheses*, *68*, 238-242.
13. Böhmer, V. (1995). Calixarenes, macrocycles with (almost) unlimited possibilities. *Angewandte Chemie International Edition in English*, *34*(7), 713-745.
14. Cornforth, J. W., Hart, P. A., Nicholls, G. A., Rees, R. J. W., & Stock, J. A. (1955). Antituberculous effects of certain surface-active polyoxyethylene ethers. *British journal of pharmacology and chemotherapy*, *10*(1), 73.
15. Casnati, A., Fabbi, M., Pelizzi, N., Pochini, A., Sansone, F., Unguro, R., ... & Tarzia, G. (1996). Synthesis, antimicrobial activity and binding properties of calix[4]arene based vancomycin mimics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *6*(22), 2699-2704.
16. Paquet, V., Zumbuehl, A., & Carreira, E. M. (2006). Biologically active amphotericin B-calix[4]arene conjugates. *Bioconjugate chemistry*, *17*(6), 1460-1463.
17. Dings, R. P., Chen, X., Hellebrekers, D. M., van Eijk, L. I., Zhang, Y., Hoye, T. R., ... & Mayo, K. H. (2006). Design of nonpeptidic topomimetics of antiangiogenic proteins with antitumor activities. *Journal of the National Cancer Institute*, *98*(13), 932-936.
18. Zhou, H., Wang, D. A., Baldini, L., Ennis, E., Jain, R., Carie, A., ... & Hamilton, A. D. (2006). Structure–activity studies on a library of potent calix[4]arene-based PDGF antagonists that inhibit PDGF-stimulated PDGFR tyrosine phosphorylation. *Organic & biomolecular chemistry*, *4*(12), 2376-2386.

19. Torgov, V., Kostin, G., Korda, T., Stoyanov, E., Kalchenko, V., Drapailo, A., ... & Varnek, A. (2005). Upper rim thioether derivatives of calix[4,6]arenes: extraction of fission Pd (II) and Ag (I). *Solvent extraction and ion exchange*, 23(6), 781-801.
20. Torgov, V., Kostin, G., Mashukov, V., Korda, T., Drapailo, A., & Kalchenko, V. (2005). Complexation and reduction of gold (III) during extraction from HCl by calix[4,6]arenes upper-Rim functionalized with alkyl-or tolylthiamethyl groups. *Solvent extraction and ion exchange*, 23(2), 171-187.
21. Marradi, M., Chiodo, F., García, I., & Penadés, S. (2013). Glyconanoparticles as multifunctional and multimodal carbohydrate systems. *Chemical Society Reviews*, 42(11), 4728-4745.
22. Puchnin, K., Zaikin, P., Cheshkov, D., Vatsouro, I., & Kovalev, V. (2012). Calix[4]tubes: an approach to functionalization. *Chemistry—A European Journal*, 18(35), 10954-10968.
23. Shriver, Z., Liu, D., & Sasisekharan, R. (2002). Emerging views of heparan sulfate glycosaminoglycan structure/activity relationships modulating dynamic biological functions. *Trends in cardiovascular medicine*, 12(2), 71-77.
24. Cherenok, S., Vovk, A., Muravyova, I., Shivanyuk, A., Kukhar, V., Lipkowski, J., & Kalchenko, V. (2006). Calix[4]arene  $\alpha$ -aminophosphonic acids: asymmetric synthesis and enantioselective inhibition of an alkaline phosphatase. *Organic letters*, 8(4), 549-552.
25. Vovk, A. I., Kalchenko, V. I., Cherenok, S. A., Kukhar, V. P., Muzychka, O. V., & Lozynsky, M. O. (2004). Calix[4]arene methylenebisphosphonic acids as calf intestine alkaline phosphatase inhibitors. *Organic & biomolecular chemistry*, 2(21), 3162-3166.
26. Park, H. S., Lin, Q., & Hamilton, A. D. (1999). Protein surface recognition by synthetic receptors: A route to novel submicromolar inhibitors for  $\alpha$ -chymotrypsin. *Journal of the American Chemical Society*, 121(1), 8-13.

27. Francese, S., Cozzolino, A., Caputo, I., Esposito, C., Martino, M., Gaeta, C., ... & Neri, P. (2005). Transglutaminase surface recognition by peptidocalix[4]arene diversomers. *Tetrahedron letters*, 46(10), 1611-1615.
28. Stoikova, E. E., Evtugyn, G. A., Belyakova, S. V., Khrustalev, A. A., Stoikov, I. I., Antipin, I. S., ... & Konovalov, A. I. (2001). 1, 3-Disubstituted p-tert-butylcalix[4]arenes as cholinesterase inhibitors. *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*, 39, 339-346.
29. 5,17-ді(арилсульфоніл)уреїдо-11,23-ди-трет-бутил-26,28-дигідрокси-25,27-дипропоксикалікс[4]арени, які виявляють гіпоглікемічну активність : пат. 96819 Україна : А61К 31/64, С07С 313/00 / О. К. Ярош, Р. В. Родік, О. М. Денисенко, А. І. Соловійов, В. І. Бойко, В. І. Кальченко. — № у 2014 04900 ; заявл. 08.05.2014 ; опубл. 25.02.2015 , Бюл. № 4. — 7 с.
30. N-ацилуреїдокалікс[4]арени : пат. 112222 Україна : С07С 313/34 / Р. В. Родік, В. І. Бойко, Ю. І. Матвеев, В. І. Кальченко. — № у 2016 05511 ; заявл. 23.05.2016 ; опубл. 12.12.2016 , Бюл. № 23. — 7 с.
31. Гіпоглікемічна активність n-ацилуреїдокалікс[4]аренів : пат. 112223 Україна : С07С 313/34 / О. К. Ярош, Р. В. Родік, О. М. Денисенко, А. І. Соловійов, В. І. Кальченко. — № у 2016 05512 ; заявл. 23.05.2016 ; опубл. 12.12.2016 , Бюл. № 23. — 10 с.
32. Danylovych, H. V., Danylovych, Y. V., Gulina, M. O., Bohach, T. V., & Kosterin, S. O. (2019). NO-synthase activity in mitochondria of uterus smooth muscle: identification and biochemical properties. *General Physiology and Biophysics*, 38(1), 39-50.
33. Danylovych, H. V., YuV, D., Rodik, R. V., Hurska, V. T., Kalchenko, V. I., & Kosterin, S. O. (2019). Calix[4]arenes modulate Ca<sup>2+</sup>-dependent processes smooth muscle cell mitochondria. *Chem. Res. J*, 4(6), 109-122.
34. Danylovych, H. V., Danylovych, Y. V., Rodik, R. V., Kalchenko, V. I., & Chunikhin, A. J. (2017). Calix[4]arenes as Modulators of Energy-Dependent Ca<sup>2+</sup>-

Accumulation and Functioning of the Electron Transport Chain in Smooth Muscle Mitochondria. *International Journal of Physiology and Pathophysiology*, 8(3).

35. Mazur, I. I., Veklich, T. O., Shkrabak, O. A., Mohart, N. A., Demchenko, A. M., Gerashchenko, I. V., ... & Kosterin, S. O. (2018). Selective inhibition of smooth muscle plasma membrane transport  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase by calixarene C-90 and its activation by IPT-35 compound. *Gen. Physiol. Biophys*, 37, 223-231.

36. Цимбалюк, О. В., & Костерін, С. О. (2013). Вплив каліксарену С-90 на скоротливу активність гладеньких м'язів міометрія щурів. *Біологічні студії*, (7, № 3), 5-20.

37. Tsybalyuk, O. V. (2021). Modulating the mechanokinetics of spontaneous contractions of the myometrium of rats using calix[4]arene C-90 – plasma membrane calcium ATPase inhibitor. *Біологічні студії/Studia Biologica*, 15(2), 3-14.

38. Векліч, Т. О., Шкрабак, О. А., Мазур, Ю. Ю., Родік, Р. В., Бойко, В. І., Кальченко, В. І., & Костерін, С. О. (2013). Кінетичні закономірності дії калікс[4]арену С-90 на  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азну активність плазматичної мембрани та на концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  в незбуджених клітинах міометрія. *Український біохімічний журнал*, (85, № 4).

39. Векліч, Т. О., Шкрабак, О. А., Мазур, Ю. Ю., Родік, Р. В., Кальченко, В. І., & Костерін, С. О. (2014). Кінетика інгібіторної дії калікс[4]арену С-90 на активність транспортної  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин. *The Ukrainian biochemical journal*, (86, № 5), 37-46.

40. Veklich, T. O. (2016). The inhibitory influence of calix arene of C-90 on the activity of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPases in plasma membrane and sarcoplasmic reticulum in myometrium cells. *The Ukrainian Biochemical Journal*, (88, № 2), 5-15.

41. Векліч Т. О., Шкрабак О. А., Ніконішина Ю. В., Родік Р. В., Кальченко В. І., Костерін С. О. (2017). Калікс[4]арен С-90 як перспективна супрамолекулярна сполука для регуляції активності  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы плазматичної мембрани

- гладеньком'язових клітин. Збірник наукових праць *Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології*. 15(№ 2), 373-380.
42. Лабинцева, Р.Д., Слінченко, Н.М., Векліч, Т.О., Родік, Р.В., Черенок, С.О., Бойко, В.І., Кальченко, В.І., Костерін, С.О. (2007) Порівняльне дослідження впливу каліксаренів на  $Mg^{2+}$ -залежні АТР-гідролазні ферментативні системи гладеньком'язових клітин матки. *Український біохімічний журнал*, (79, № 3), 44-54.
43. Шликов, С. Г., Бабіч, Л. Г., Слінченко, Н. М., Родік, Р. В., Бойко, В. І., Кальченко, В. І., Костерін, С. О. (2007) Каліксарен С-91 стимулює акумуляцію іонів Са в мітохондріях міометрія. *Український біохімічний журнал*, 79(№4), 28-33.
44. Векліч, Т. О., Костерін, С. О., Родік, Р. В., Черенок, С. О., Бойко, В. І., & Кальченко, В. І. (2006). Вплив каліксаренфосфонових кислот на  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТР-азну активність у плазматичній мембрані гладеньком'язових клітин. *Укр. біохім. журн*, 78(1), 70-78.
45. Векліч, Т. О., Кочешкова, Н. С., Родік, Р. В., Бойко, В. І., Воробець, З. Д., & Костерін, С. О. (2007). Порівняльне дослідження впливу каліксаренів на  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТРазну активність в плазматичній мембрані скоротливих та рухливих клітин. *Укр. біохім. журн*, 79(3), 19-28.
46. Veklich, T. O., Labyntseva, R. D., Shkrabak, O. A., Kosterin, S. O., Tsymbalyuk, O. V., Rodik, R. V., & Kalchenko, V. I. (2020). Inhibition of  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase and activation of myosin ATPase by calix[4]arene C-107 cause stimulation of isolated smooth muscle contractile activity. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 92(1), 21-30.
47. Векліч, Т. О., Шкрабак, О. А., Родік, Р. В., Кальченко, В. І., & Костерін, С. О. (2011). Вплив каліксарену С-107 на кінетичні параметри  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТР-ази плазматичної мембрани міоцитів матки. *Український біохімічний журнал*, (83, № 2), 36-44.

48. Бевза, О. В., Векліч, Т. О., Шкрабак, О. А., Родік, Р. В., Кальченко, В. І., & Костерін, С. О. (2013). Каліксарен С-107 як високоафінний супрамолекулярний інгібітор  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРази плазматичної мембрани. *Український біохімічний журнал*, (85, № 2), 5-19.
49. Векліч, Т. О., Шкрабак, О. А., Родік, Р. В., Кальченко, В. І., & Костерін, С. О. (2011). Каліксарен С-107 збільшує спорідненість  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин до убаїну. *Український біохімічний журнал*, (83, № 1), 38-44.
50. Бевза, А. А., Лабинцева, Р. Д., Родік, Р. В., Черенок, С. О., Костерін, С. О., & Кальченко, В. І. (2009). Вплив калікс[4]аренів на активність АТРази актоміозинового комплексу та субфрагмента-1 міозину міометрія. *Укр. біохім. журн*, 81(6), 49-58.
51. Лабинцева, Р. Д., Бевза, А. А., Бевза, О. В., Черенок, С. О., Кальченко, В. І., & Костерін, С. О. (2012). Структурно-функціональні основи міжмолекулярної взаємодії калікс[4]арену С-97 із субфрагментом-1 міозину міометрія. *Український біохімічний журнал*, (84, № 1), 34-44.
52. Бевза, А. А., Лабинцева, Р. Д., Бевза, О. В., Черенок, С. О., Кальченко, В. І., & Костерін, С. О. (2010). Кінетичні закономірності та механізм дії калікс[4]арену С-99 на АТРазну активність субфрагмента-1 міозину міометрія. *Український біохімічний журнал*, (82, № 6), 22-32.
53. Данилович, Г. В., Данилович, Ю. В., Коломієць, О. В., Костерін, С. О., Родік, Р. В., Черенок, С. О., ... & Карахім, С. О. (2012). Зміни поляризації плазматичної та внутрішньої мітохондріальної мембран клітин міометрія за дії каліксаренів–інгібіторів  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРази плазматичної мембрани. *Український біохімічний журнал*, (84, № 6), 37-48.
54. Veklich, T. O., Skrabak, O. A., Nikonishyna, Y. V., Rodik, R. V., Kalchenko, V. I., & Kosterin, S. O. (2018). Calix[4]arene C-956 selectively inhibits plasma

membrane  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase in myometrial cells. *Ukrainian Biochemical Journal*, (90, № 5).

55. Danylovych, G. V., Kolomiets, O. V., Danylovych, Y. V., Rodik, R. V., Kalchenko, V. I., & Kosterin, S. O. (2018). Calix[4]arene C-956 is effective inhibitor of  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -exchanger in smooth muscle mitochondria. *The Ukrainian Biochemical Journal*, (90, № 1), 25-33.

56. Бабіч, Л. Г., Шликов, С. Г., Кушнар'ова, А. М., Єсипенко, О. А., & Костерін, С. О. (2017). Халкон-вмісні калікс[4]арени—нанорозмірні модулятори поляризації мембран мітохондрій та вмісту йонізованого Са в них. *Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології*.

57. Данилович, Ю. В., Данилович, Г. В., Єсипенко, О. А., Кальченко, В. І., & Костерін, С. О. (2020). Халконові калікс[4]арени—супрамолекулярні сполуки, які модулюють електронно-транспортний ланцюг мітохондрій гладенького м'язу. *Nanosistemi, Nanomateriali, Nanotehnologii*, 18(3).

58. Shlykov, S. G., Sylenko, A. V., Babich, L. G., Karakhim, S. O., Chunikhin, O. Y., Yesypenko, O. A., ... & Kosterin, S. O. (2020). Calix[4]arene Chalcone Amides as Effectors of Mitochondria Membrane Polarization. *Nanosistemi, Nanomateriali, Nanotehnologii*, 18(3).

59. Shlykov, S. G., Kushnarova-Vakal, A. M., Sylenko, A. V., Babich, L. G., Chunikhin, O. Y., Yesypenko, O. A., ... & Kosterin, S. O. (2019). Calix[4]arene chalcone amides effects on myometrium mitochondria. *The Ukrainian Biochemical Journal*, (91, № 3), 46-55.

60. Babich, L. G., Shlykov, S. G., Boyko, V. I., Klyachina, M. A., & Kosterin, S. A. (2013). Calix[4]arenes C-136 and C-137 hyperpolarize myometrium mitochondria membranes. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 39, 649-655.

61. Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W. (2002). *Fundamentals of biochemistry* (pp. 80-81). New York: Wiley.

62. Kastaniotis, A. J., Autio, K. J., Kerätär, J. M., Monteuuis, G., Mäkelä, A. M., Nair, R. R., ... & Hiltunen, J. K. (2017). Mitochondrial fatty acid synthesis, fatty acids and mitochondrial physiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1862(1), 39-48.
63. Weinberg, F., & Chandel, N. S. (2009). Mitochondrial metabolism and cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1177(1), 66-73.
64. McBride, H. M., Neuspiel, M., & Wasiak, S. (2006). Mitochondria: more than just a powerhouse. *Current biology*, 16(14), R551-R560.
65. Li, X., Fang, P., Mai, J., Choi, E. T., Wang, H., & Yang, X. F. (2013). Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *Journal of hematology & oncology*, 6, 1-19.
66. Hajnóczky, G., Csordás, G., Das, S., Garcia-Perez, C., Saotome, M., Roy, S. S., & Yi, M. (2006). Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake in apoptosis. *Cell calcium*, 40(5-6), 553-560.
67. Green, D. R. (1998). Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell*, 94(6), 695-698.
68. Naumova, N., & Šachl, R. (2020). Regulation of cell death by mitochondrial transport systems of calcium and Bcl-2 proteins. *Membranes*, 10(10), 299.
69. Oh-Hama, T. (1997). Evolutionary consideration on 5-aminolevulinate synthase in nature. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 27(4), 405-412.
70. Rossier, M. F. (2006). T channels and steroid biosynthesis: in search of a link with mitochondria. *Cell calcium*, 40(2), 155-164.
71. Klinge, C. M. (2008). Estrogenic control of mitochondrial function and biogenesis. *Journal of cellular biochemistry*, 105(6), 1342-1351.
72. de Souza Breda, C. N., Davanzo, G. G., Basso, P. J., Câmara, N. O. S., & Moraes-Vieira, P. M. M. (2019). Mitochondria as central hub of the immune system. *Redox biology*, 26, 101255.

73. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2007). *Molecular biology of the cell*.
74. Forte, M., & Blachly-Dyson, E. (2001). VDAC channels. *IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)*, 52(3-5), 113-118.
75. Hoogenboom, B. W., Suda, K., Engel, A., & Fotiadis, D. (2007). The supramolecular assemblies of voltage-dependent anion channels in the native membrane. *Journal of molecular biology*, 370(2), 246-255.
76. Herrmann, J. M., & Neupert, W. (2000). Protein transport into mitochondria. *Current opinion in microbiology*, 3(2), 210-214.
77. Hayashi, T., Rizzuto, R., Hajnoczky, G., & Su, T. P. (2009). MAM: more than just a housekeeper. *Trends in cell biology*, 19(2), 81-88.
78. Schenkel, L. C., & Bakovic, M. (2014). Formation and regulation of mitochondrial membranes. *International journal of cell biology*, 2014.
79. Gomez, B., & Robinson, N. C. (1999). Phospholipase digestion of bound cardiolipin reversibly inactivates bovine cytochrome bc 1. *Biochemistry*, 38(28), 9031-9038.
80. Eble, K. S., Coleman, W. B., Hantgan, R. R., & Cunningham, C. C. (1990). Tightly associated cardiolipin in the bovine heart mitochondrial ATP synthase as analyzed by  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry*, 265(32), 19434-19440.
81. Paradies, G., Petrosillo, G., Paradies, V., & Ruggiero, F. M. (2009). Role of cardiolipin peroxidation and  $\text{Ca}^{2+}$  in mitochondrial dysfunction and disease. *Cell calcium*, 45(6), 643-650.
82. Belikova, N. A., Vladimirov, Y. A., Osipov, A. N., Kapralov, A. A., Tyurin, V. A., Potapovich, M. V., ... & Kagan, V. E. (2006). Peroxidase activity and structural transitions of cytochrome c bound to cardiolipin-containing membranes. *Biochemistry*, 45(15), 4998-5009.

83. Haines, T. H., & Dencher, N. A. (2002). Cardiolipin: a proton trap for oxidative phosphorylation. *FEBS letters*, 528(1-3), 35-39.
84. Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W. (2016). *Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level*. John Wiley & Sons.
85. Porcelli, A. M., Ghelli, A., Zanna, C., Pinton, P., Rizzuto, R., & Rugolo, M. (2005). pH difference across the outer mitochondrial membrane measured with a green fluorescent protein mutant. *Biochemical and biophysical research communications*, 326(4), 799-804.
86. Chan, D. C. (2006). Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell*, 125(7), 1241-1252.
87. Weitzman, J. K. P. (1987). Krebs citric acid cycle: half a century and still turning. In *Biochem. Soc. Symp* (Vol. 54, pp. 1-198).
88. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). The citric acid cycle. *Biochemistry*, 465-87.
89. Dimroth, P., Kaim, G., & Matthey, U. (2000). Crucial role of the membrane potential for ATP synthesis by F1Fo ATP synthases. *Journal of Experimental Biology*, 203(1), 51-59.
90. Schultz, B. E., & Chan, S. I. (2001). Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 30(1), 23-65.
91. Hirst, J. (2005). Energy transduction by respiratory complex I—an evaluation of current knowledge. *Biochemical Society Transactions*, 33(3), 525-529.
92. Lenaz, G., Fato, R., Genova, M. L., Bergamini, C., Bianchi, C., & Biondi, A. (2006). Mitochondrial Complex I: structural and functional aspects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1757(9-10), 1406-1420.
93. Wong, E. (2009). *Cells: molecules and mechanisms*. Axolotl Academic Publishing.

94. Satyanarayana, U. Chakrapani. U. (2010). Biochemistry. *Kolkata: Books and Allied.*
95. Lambert, A. J., & Brand, M. D. (2004). Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Journal of Biological Chemistry*, 279(38), 39414-39420.
96. Cecchini, G. (2003). Function and structure of complex II of the respiratory chain. *Annual review of biochemistry*, 72(1), 77-109.
97. Yankovskaya, V., Horsefield, R., Tornroth, S., Luna-Chavez, C., Miyoshi, H., Léger, C., ... & Iwata, S. (2003). Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science*, 299(5607), 700-704.
98. Horsefield, R., Iwata, S., & Byrne, B. (2004). Complex II from a structural perspective. *Current Protein and Peptide Science*, 5(2), 107-118.
99. Dervartanian, D. V., & Veeger, C. (1964). Studies on succinate dehydrogenase: I. Spectral properties of the purified enzyme and formation of enzyme-competitive inhibitor complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Specialized Section on Enzymological Subjects*, 92(2), 233-247.
100. Berry, E. A., Guergova-Kuras, M., Huang, L. S., & Crofts, A. R. (2000). Structure and function of cytochrome bc complexes. *Annual review of biochemistry*, 69(1), 1005-1075.
101. Crofts, A. R. (2004). The cytochrome bc 1 complex: function in the context of structure. *Annu. Rev. Physiol.*, 66, 689-733.
102. Iwata, S., Lee, J. W., Okada, K., Lee, J. K., Iwata, M., Rasmussen, B., ... & Jap, B. K. (1998). Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex. *Science*, 281(5373), 64-71.
103. Нельсон, Д. Л., & Кокс, М. М. (2015). Основи біохімії за Ленінджером: Навч. посібник/Переклад з англ. *Наук. ред. перекладу С. Комісаренко. Львів: БаК.*

104. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., ... & Yoshikawa, S. (1996). The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science*, 272(5265), 1136-1144.
105. Aledo, J. C., Valverde, H., Ruíz-Camacho, M., Morilla, I., & Lopez, F. D. (2014). Protein–Protein Interfaces from Cytochrome c Oxidase I Evolve Faster than Nonbinding Surfaces, yet Negative Selection Is the Driving Force. *Genome Biology and Evolution*, 6(11), 3064-3076.
106. Yoshikawa, S., Muramoto, K., Shinzawa-Itoh, K., Aoyama, H., Tsukihara, T., Shimokata, K., ... & Shimada, H. (2006). Proton pumping mechanism of bovine heart cytochrome c oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1757(9-10), 1110-1116.
107. Tsubaki, M., & Yoshikawa, S. (1993). Fourier-transform infrared study of cyanide binding to the Fea3-CuB binuclear site of bovine heart cytochrome c oxidase: implication of the redox-linked conformational change at the binuclear site. *Biochemistry*, 32(1), 164-173.
108. Kagawa, Y., & Racker, E. (1966). Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation: VIII. Properties of a factor conferring oligomycin sensitivity on mitochondrial adenosine triphosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 241(10), 2461-2466.
109. Rubinstein, J. L., Walker, J. E., & Henderson, R. (2003). Structure of the mitochondrial ATP synthase by electron cryomicroscopy. *The EMBO journal*.
110. Leslie, A. G., & Walker, J. E. (2000). Structural model of F1–ATPase and the implications for rotary catalysis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 355(1396), 465-471.
111. Dimroth, P., von Ballmoos, C., & Meier, T. (2006). Catalytic and mechanical cycles in F-ATP synthases. *EMBO reports*, 7(3), 276-282.
112. Capaldi, R. A., & Aggeler, R. (2002). Mechanism of the F1F0-type ATP synthase, a biological rotary motor. *Trends in biochemical sciences*, 27(3), 154-160.

113. Toei, M., & Noji, H. (2013). Single-molecule analysis of F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase inhibited by N, N-dicyclohexylcarbodiimide. *Journal of Biological Chemistry*, 288(36), 25717-25726.
114. Hong, S., & Pedersen, P. L. (2008). ATP synthase and the actions of inhibitors utilized to study its roles in human health, disease, and other scientific areas. *Microbiology and molecular biology reviews*, 72(4), 590-641.
115. Herb, M., Gluschko, A., & Schramm, M. (2021). Reactive oxygen species: not omnipresent but important in many locations. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 716406.
116. Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 373-399.
117. Devasagayam, T. P. A., Tilak, J. C., Bloor, K. K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S. S., & Lele, R. D. (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *Japi*, 52(794804), 4.
118. West, A. P., Shadel, G. S., & Ghosh, S. (2011). Mitochondria in innate immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 11(6), 389-402.
119. Herb, M., & Schramm, M. (2021). Functions of ROS in macrophages and antimicrobial immunity. *Antioxidants*, 10(2), 313.
120. Kim, H. J., Kim, C. H., Ryu, J. H., Kim, M. J., Park, C. Y., Lee, J. M., ... & Yoon, J. H. (2013). Reactive oxygen species induce antiviral innate immune response through IFN- $\lambda$  regulation in human nasal epithelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 49(5), 855-865.
121. Deffert, C., Cachat, J., & Krause, K. H. (2014). Phagocyte NADPH oxidase, chronic granulomatous disease and mycobacterial infections. *Cellular microbiology*, 16(8), 1168-1178.
122. Belikov, A. V., Schraven, B., & Simeoni, L. (2015). T cells and reactive oxygen species. *Journal of biomedical science*, 22, 1-11.

123. Massaad, C. A., & Klann, E. (2011). Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memory. *Antioxidants & redox signaling*, *14*(10), 2013-2054.
124. Beckhauser, T. F., Francis-Oliveira, J., & De Pasquale, R. (2016). Reactive oxygen species: Physiological and physiopathological effects on synaptic plasticity: Supplementary issue: Brain plasticity and repair. *Journal of experimental neuroscience*, *10*, JEN-S39887.
125. Sweatt, J. D. (2016). Neural plasticity and behavior—sixty years of conceptual advances. *Journal of neurochemistry*, *139*, 179-199.
126. Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology*, *552*(2), 335-344.
127. Turrens, J. F., Alexandre, A., & Lehninger, A. L. (1985). Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Archives of biochemistry and biophysics*, *237*(2), 408-414.
128. Zhang, L., Yu, L., & Yu, C. A. (1998). Generation of superoxide anion by succinate-cytochrome c reductase from bovine heart mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(51), 33972-33976.
129. Lenaz, G. (2001). The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. *IUBMB life*, *52*(3-5), 159-164.
130. Beckman, J. S., & Koppenol, W. H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *American Journal of Physiology-cell physiology*, *271*(5), C1424-C1437.
131. Radi, R., Cassina, A., Hodara, R., Quijano, C., & Castro, L. (2002). Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine*, *33*(11), 1451-1464.
132. Halliwell, B., Adhikary, A., Dingfelder, M., & Dizdaroglu, M. (2021). Hydroxyl radical is a significant player in oxidative DNA damage in vivo. *Chemical Society Reviews*, *50*(15), 8355-8360.

133. Martindale, J. L., & Holbrook, N. J. (2002). Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *Journal of cellular physiology*, *192*(1), 1-15.
134. Rehman, K., & Akash, M. S. H. (2017). Mechanism of generation of oxidative stress and pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: how are they interlinked?. *Journal of cellular biochemistry*, *118*(11), 3577-3585.
135. Ahmad, W., Ijaz, B., Shabbiri, K., Ahmed, F., & Rehman, S. (2017). Oxidative toxicity in diabetes and Alzheimer's disease: mechanisms behind ROS/RNS generation. *Journal of biomedical science*, *24*, 1-10.
136. Kaludercic, N., & Di Lisa, F. (2020). Mitochondrial ROS formation in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, *7*, 12.
137. Deshwal, S., Di Sante, M., Di Lisa, F., & Kaludercic, N. (2017). Emerging role of monoamine oxidase as a therapeutic target for cardiovascular disease. *Current Opinion in Pharmacology*, *33*, 64-69.
138. Kattoor, A. J., Pothineni, N. V. K., Palagiri, D., & Mehta, J. L. (2017). Oxidative stress in atherosclerosis. *Current atherosclerosis reports*, *19*, 1-11.
139. Casas, A. I., Nogales, C., Mucke, H. A., Petrain, A., Cuadrado, A., Rojo, A. I., ... & Schmidt, H. H. (2020). On the clinical pharmacology of reactive oxygen species. *Pharmacological reviews*, *72*(4), 801-828.
140. Tong, J., Rathitharan, G., Meyer, J. H., Furukawa, Y., Ang, L. C., Boileau, I., ... & Kish, S. J. (2017). Brain monoamine oxidase B and A in human parkinsonian dopamine deficiency disorders. *Brain*, *140*(9), 2460-2474.
141. Bai, R., Guo, J., Ye, X. Y., Xie, Y., & Xie, T. (2022). Oxidative stress: The core pathogenesis and mechanism of Alzheimer's disease. *Ageing research reviews*, *77*, 101619.
142. Elustondo, P. A., Nichols, M., Robertson, G. S., & Pavlov, E. V. (2017). Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake pathways. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, *49*, 113-119.

143. Bravo-Sagua, R., Parra, V., López-Crisosto, C., Díaz, P., Quest, A. F., & Lavandero, S. (2017). Calcium transport and signaling in mitochondria. *Compr Physiol*, 7(2), 623-634.
144. Shao, J., Fu, Z., Ji, Y., Guan, X., Guo, S., Ding, Z., ... & Shen, Y. (2016). Leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1 (LETM1) forms a  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  antiporter. *Scientific reports*, 6(1), 34174.
145. Mishra, J., Jhun, B. S., Hurst, S., O-Uchi, J., Csordás, G., & Sheu, S. S. (2017). The mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uniporter: Structure, function, and pharmacology. *Pharmacology of Mitochondria*, 129-156.
146. Patron, M., Checchetto, V., Raffaello, A., Teardo, E., Reane, D. V., Mantoan, M., ... & Rizzuto, R. (2014). MICU1 and MICU2 finely tune the mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uniporter by exerting opposite effects on MCU activity. *Molecular cell*, 53(5), 726-737.
147. Vais, H., Payne, R., Paudel, U., Li, C., & Foskett, J. K. (2020). Coupled transmembrane mechanisms control MCU-mediated mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(35), 21731-21739.
148. Rabinowitz, J. E., Goldman, S. J., Koch, W. J., Shanmughapriya, S., Caplan, J., Dietrich, A., ... & Merali, S. (2016). MCUR1 Is a Scaffold Factor for the MCU Complex Function and Promotes Mitochondrial Bioenergetics.
149. Bassi, M. T., Manzoni, M., Bresciani, R., Pizzo, M. T., Della Monica, A., Barlati, S., ... & Borsani, G. (2005). Cellular expression and alternative splicing of SLC25A23, a member of the mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent solute carrier gene family. *Gene*, 345(2), 173-182.
150. Danylovyh, Y. V., Kolomiets, O. V., Danylovyh, G. V., & Kosterin, S. O. (2015). Nitric oxide as possible regulator of energy-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  transport in mitochondria of uterine smooth muscle. *International Journal of Physiology and Pathophysiology*, 6(2).

151. Kolomiets, O. V., Danylovyh, Y. V., Danylovyh, H. V., & Kosterin, S. O. (2018). Ways and mechanisms of transmembrane exchange of  $\text{Ca}^{2+}$  in mitochondria. *International Journal of Physiology and Pathophysiology*, 9(3).
152. Sparagna, G. C., Gunter, K. K., Sheu, S. S., & Gunter, T. E. (1995). Mitochondrial calcium uptake from physiological-type pulses of calcium: a description of the rapid uptake mode. *Journal of Biological Chemistry*, 270(46), 27510-27515.
153. Beutner, G., Sharma, V. K., Giovannucci, D. R., Yule, D. I., & Sheu, S. S. (2001). Identification of a ryanodine receptor in rat heart mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 276(24), 21482-21488.
154. Palty, R., Silverman, W. F., Hershinkel, M., Caporale, T., Sensi, S. L., Parnis, J., ... & Sekler, I. (2010). NCLX is an essential component of mitochondrial  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(1), 436-441.
155. Samanta, K., Mirams, G. R., & Parekh, A. B. (2018). Sequential forward and reverse transport of the  $\text{Na}^+ \text{Ca}^{2+}$  exchanger generates  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations within mitochondria. *Nature communications*, 9(1), 156.
156. Jiang, D., Zhao, L., & Clapham, D. E. (2009). Genome-wide RNAi screen identifies Letm1 as a mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  antiporter. *Science*, 326(5949), 144-147.
157. Tsai, M. F., & Miller, C. (2014). Functional reconstitution of the mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  antiporter Letm1. *Biophysical journal*, 106(2), 428a.
158. Wingrove, D. E., & Gunter, T. E. (1986). Kinetics of mitochondrial calcium transport. I. Characteristics of the sodium-independent calcium efflux mechanism of liver mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 261(32), 15159-15165.
159. Nowikovsky, K., & Bernardi, P. (2014). LETM1 in mitochondrial cation transport. *Frontiers in physiology*, 5, 82530.
160. Kolomiets, O. V., Danylovyh, Y. V., & Danylovyh, G. V. (2015).  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  Exchanger in the Myometrium Mitochondria: Modulation by Exogenous and

Endogenous Compounds. *International Journal of Physiology and Pathophysiology*, 6(4).

161. Bernardi, P., & von Stockum, S. (2012). The permeability transition pore as a  $\text{Ca}^{2+}$  release channel: new answers to an old question. *Cell calcium*, 52(1), 22-27.

162. Rasola, A., & Bernardi, P. (2011). Mitochondrial permeability transition in  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent apoptosis and necrosis. *Cell calcium*, 50(3), 222-233.

163. Hurst, S., Hoek, J., & Sheu, S. S. (2017). Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  and regulation of the permeability transition pore. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 49, 27-47.

164. Mnatsakanyan, N., Beutner, G., Porter, G. A., Alavian, K. N., & Jonas, E. A. (2017). Physiological roles of the mitochondrial permeability transition pore. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 49, 13-25.

165. Baines, C. P., & Gutiérrez-Aguilar, M. (2018). The still uncertain identity of the channel-forming unit (s) of the mitochondrial permeability transition pore. *Cell Calcium*, 73, 121-130.

166. Bernardi, P., Rasola, A., Forte, M., & Lippe, G. (2015). The mitochondrial permeability transition pore: channel formation by F-ATP synthase, integration in signal transduction, and role in pathophysiology. *Physiological reviews*, 95(4), 1111-1155.

167. Basso, E., Fante, L., Fowlkes, J., Petronilli, V., Forte, M. A., & Bernardi, P. (2005). Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *Journal of Biological Chemistry*, 280(19), 18558-18561.

168. Broun, M. J., Bers, D. M., & Molkenin, J. D. (2020). A 20/20 view of ANT function in mitochondrial biology and necrotic cell death. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 144, A3-A13.

169. Varanyuwatana, P., & Halestrap, A. P. (2012). The roles of phosphate and the phosphate carrier in the mitochondrial permeability transition pore. *Mitochondrion*, 12(1), 120-125.

170. Giorgio, V., Von Stockum, S., Antoniel, M., Fabbro, A., Fogolari, F., Forte, M., ... & Bernardi, P. (2013). Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(15), 5887-5892.
171. Bonora, M., Bononi, A., De Marchi, E., Giorgi, C., Lebedzinska, M., Marchi, S., ... & Pinton, P. (2013). Role of the c subunit of the FO ATP synthase in mitochondrial permeability transition. *Cell cycle*, *12*(4), 674-683.
172. Zhou, H., Hu, S., Jin, Q., Shi, C., Zhang, Y., Zhu, P., ... & Chen, Y. (2017). Mff-Dependent Mitochondrial Fission Contributes to the Pathogenesis of Cardiac Microvasculature Ischemia/Reperfusion Injury via Induction of mROS-Mediated Cardiolipin Oxidation and HK 2/VDAC 1 Disassociation-Involved mPTP Opening. *Journal of the American Heart Association*, *6*(3), e005328.
173. Tan, W., & Colombini, M. (2007). VDAC closure increases calcium ion flux. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *1768*(10), 2510-2515.
174. Camara, A. K., Zhou, Y., Wen, P. C., Tajkhorshid, E., & Kwok, W. M. (2017). Mitochondrial VDAC1: a key gatekeeper as potential therapeutic target. *Frontiers in physiology*, *8*, 242373.
175. Szabó, I., & Zoratti, M. (1993). The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules: I. Binary structure and voltage dependence of the pore. *FEBS letters*, *330*(2), 201-205.
176. Crompton, M., Virji, S., & Ward, J. M. (1998). Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *European journal of biochemistry*, *258*(2), 729-735.
177. Elrod, J. W., & Molkenin, J. D. (2013). Physiologic functions of cyclophilin D and the mitochondrial permeability transition pore. *Circulation journal*, *77*(5), 1111-1122.

178. Halestrap, A. P., Clarke, S. J., & Javadov, S. A. (2004). Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion—a target for cardioprotection. *Cardiovascular research*, *61*(3), 372-385.
179. Shanmughapriya, S., Rajan, S., Hoffman, N. E., Higgins, A. M., Tomar, D., Nemani, N., ... & Madesh, M. (2015). SPG7 is an essential and conserved component of the mitochondrial permeability transition pore. *Molecular cell*, *60*(1), 47-62.
180. Tortora, G. J., & Derrickson, B. H. (2011). Principles of anatomy and physiology. 2008. Hoboken: John Wiley & Sons Google Scholar.
181. Pawlina, W., & Ross, M. H. (2018). *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology*. Lippincott Williams & Wilkins.
182. Betts, J. G., Young, K. A., Wise, J. A., Johnson, E., Poe, B., Kruse, D. H., ... & DeSaix, P. (2022). Anatomy and Physiology 2e.\
183. Schwartz, S. M., & Mecham, R. D. (1995). *The Vascular Smooth Muscle Cell* (pp. 1-410). New York, NY: Academic Press.
184. Aguilar, H. N., & Mitchell, B. F. (2010). Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility. *Human reproduction update*, *16*(6), 725-744.
185. Kosterin, S. O. (2003). Kinetics and Energetics of  $Mg^{2+}$ , ATP-Dependent  $Ca^{2+}$  Transport in the Plasma Membrane of Smooth Muscle Cells. *Neurophysiology*, *35*, 187-200.
186. Костерин, С. А., & Бурдыга, Ф. В. (1993). Транспорт и внутриклеточный гомеостаз  $Ca^{2+}$  в миометрии. *Успехи соврем. биологии*, *113*(4), 485-506.
187. Капля, А. А. (1997). Структурная организация изоферментов  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФ-азы в плазматической мембране. *Укр. біохім. журнал*, *69*(5-6), 12-24.
188. Tabb, T. N., & Garfield, R. E. (1992). Molecular biology of uterine contractility. *Clinical obstetrics and gynecology*, *35*(3), 494-504.
189. Hertelendy, F., & Zakar, T. (2004). Regulation of myometrial smooth muscle functions. *Current pharmaceutical design*, *10*(20), 2499-2517.

190. Ausems, E. J. (1986). The european convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. *Z. Fur. Vers*, 28, 219.
191. Mollard, P., Mironneau, J., Amedee, T., & Mironneau, C. (1986). Electrophysiological characterization of single pregnant rat myometrial cells in short-term primary culture. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 250(1), C47-C54.
192. Бабич, Л. Г., Шлыков, С. Р., Борисова, И. А., & Костерин, С. А. (1994). Энергозависимый транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  во внутриклеточных структурах гладкой мышцы. *Биохимия*, 59(8), 1218-1222.
193. Костерин, С. А., Браткова, Н. Ф., & Курский, М. Д. (1985). Роль сарколеммы и митохондрий в обеспечении кальциевого контроля расслабления миомерия. *Биохимия*, 50(8), 1350-1361.
194. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
195. Ключева, А. В., Левчук, Ю. Н., & Набока, Ю. Н. (2002). Фотон-корреляционная спектроскопия белков. *Там само.-2002.-74*, (5), 12-26.
196. Кокунин, В. А. (1975). Статистическая обработка данных при малом числе опытов. *Укр. биохим. журн*, 47(6), 776-790.
197. Labyntseva, R. D., Bevza, O. V., Lytvyn, K. V., Borovyk, M. O., Rodik, R. V., Kalchenko, V. I., & Kosterin, S. O. (2016). Calix[4]arene C-90 and its analogs activate ATPase of the myometrium myosin subfragment-1. *The Ukrainian Biochemical Journal*, (88, № 5), 48-61.
198. ДАНИЛОВИЧ, Г. В., & Данилович, Ю. В. (2018). БІОСИНТЕЗ ТА РЕГУЛЯТОРНА РОЛЬ ОКСИДУ АЗОТУ В МІТОХОНДРІЯХ ГЛАДЕНЬКОГО М'ЯЗА. *Матеріали Тематичного VII з'їзду Українського біофізичного товариства. Київ, Україна*, 11.

199. Kaasik, A., Safiulina, D., Zharkovsky, A., & Veksler, V. (2007). Regulation of mitochondrial matrix volume. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 292(1), C157-C163.
200. Nowikovsky, K., Schweyen, R. J., & Bernardi, P. (2009). Pathophysiology of mitochondrial volume homeostasis: potassium transport and permeability transition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1787(5), 345-350.
201. Кандаурова, Н. В., Чуніхін, О. Ю., Бабіч, Л. Г., Шликов, С. Г., & Костерін, С. О. (2010). Модулятори трансмембранного кальцієвого обміну в мітохондріях міометрія змінюють їхній гідродинамічний діаметр. *Ukrainian Biochemical Journal*, (82, № 6), 52-57.
202. Lakowicz, J. R., Szmajcinski, H., Nowaczyk, K., & Johnson, M. L. (1992). Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(4), 1271-1275.
203. Danylovych, H. V. (2016). Evaluation of functioning of mitochondrial electron transport chain with NADH and FAD autofluorescence. *The Ukrainian Biochemical Journal*, (88, № 1), 31-43.
204. Danylovych, H., Chunikhin, A., Danylovych, Y., & Kosterin, S. (2018). Methodology of Petri networks for simultaneous evaluation of the impact of different modifiers on the fluorescence of nucleotides from electron transport chain in isolated mitochondria and on the process of swelling. *BioTechnologia. Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology*, 99(1).
205. Bartolomé, F., & Abramov, A. Y. (2015). Measurement of mitochondrial NADH and FAD autofluorescence in live cells. *Mitochondrial Medicine: Volume I, Probing Mitochondrial Function*, 263-270.
206. Коломієць, О. В., Данилович, Ю. В., Данилович, Г. В., & Костерін, С. О. (2013). Вивчення акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  в ізольованих мітохондріях гладенького м'яза за допомогою зонда Fluo-4 AM. *Український біохімічний журнал*, (85, № 4), 30-39.

207. Коломієць, О. В., Данилович, Ю. В., Данилович, Г. В., & Костерін, С. О. (2014).  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -обмін у мітохондріях міометрія. *Ukrainian biochemical journal*, (86, № 3), 41-48.
208. Starkov, A. A., & Fiskum, G. (2003). Regulation of brain mitochondrial  $\text{H}_2\text{O}_2$  production by membrane potential and NAD (P) H redox state. *Journal of neurochemistry*, 86(5), 1101-1107.
209. Liu, S. S. (2010). Mitochondrial Q cycle–derived superoxide and chemiosmotic bioenergetics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1201(1), 84-95.
210. Casas, A. I., Nogales, C., Mucke, H. A., Petrain, A., Cuadrado, A., Rojo, A. I., ... & Schmidt, H. H. (2020). On the clinical pharmacology of reactive oxygen species. *Pharmacological reviews*, 72(4), 801-828.