

**Київський національний університет імені Тараса Шевченка**

**Інститут високих технологій**

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики

доц. Олексій Юрійович Нипорко

Протокол № \_\_\_\_\_ засідання кафедри

від “ \_\_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 20\_\_ р.

**ХАЛКОНОВІ КАЛІКС[4]АРЕНИ ЯК ПЕРСПЕКТИВНІ ЕФЕКТОРИ  
ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ МІТОХОНДРІЙ ГЛАДЕНЬКОГО  
М'ЯЗУ**

**Кваліфікаційна робота магістра**

студентки 2 курсу магістратури

напряму підготовки за спеціальністю

162 Біотехнології та біоінженерія

**Бойко Галини Сергіївни**

Науковий керівник:

доктор біологічних наук, професор кафедри

молекулярної біотехнології та біоінформатики

**Данилович Юрій Володимирович**

Оцінка захисту роботи

---

**Київ 2021 р.**

## АНОТАЦІЯ

**Бойко Г. С.** Халконові калікс[4]арени як перспективні ефектори функціональної активності мітохондрій гладенького м'язу

*Кваліфікаційна робота магістра за спеціальності біотехнологія та біоінженерія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Інститут високих технологій, кафедра молекулярної біотехнології та біоінформатики. – Київ, 2021.*

**Науковий керівник:** доктор біологічних наук Данилович Ю. В., професор кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики Інституту високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка

Експериментально досліджено та теоретично обґрунтовано вплив калікс[4]аренів на біоенергетичні, транспортні та метаболічні процеси в мітохондріях гладенького м'язу. Встановлено, що халконові калікс[4]арени гальмують окислення NADH та FADH<sub>2</sub> в електронно-транспортному ланцюзі, суттєво посилюють генерацію активних форм кисню, гальмують транспорт Ca<sup>2+</sup> та пригнічують синтез оксиду азоту в мітохондріях.

**Ключові слова:** калікс[4]арени, мітохондрії, транспорт кальцію, активні форми кисню та азоту, біоенергетика, гладенький м'яз.

## АННОТАЦИЯ

**Бойко Г. С.** Халконовые каликс[4]аены как перспективные эффекторы функциональной активности митохондрий гладкой мышцы

*Квалификационная работа магистра по специальности биотехнология и биоинженерия. – Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Институт высоких технологий, кафедра молекулярной биотехнологии и биоинформатики. – Киев, 2021.*

**Научный руководитель:** доктор биологических наук Данилович Ю. В., профессор кафедры молекулярной биотехнологии и биоинформатики

Института высоких технологий Киевского национального университета имени Тараса Шевченко

Экспериментально исследовано и теоретически обосновано влияние каликс[4]аренов на биоэнергетические, транспортные и метаболические процессы в митохондриях гладкой мышцы. Установлено, что халконовые каликс[4]арены тормозят окисления NADH и FADH<sub>2</sub> в электронно-транспортной цепи, и существенно усиливают генерацию активных форм кислорода, тормозят транспорт Ca<sup>2+</sup> и подавляют синтез оксида азота в митохондриях.

**Ключевые слова:** каликс[4]арены, митохондрии, транспорт кальция, активные формы кислорода и азота, биоэнергетика, гладкая мышца.

## SUMMARY

**Boiko H. S.** Chalcone calix[4]arenes as promising effectors of smooth muscle mitochondrial functional activity

*Qualifying work of the master on a speciality biotechnology and bioengineering. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Institute of High Technologies, Department of Molecular Biotechnology and Bioinformatics. – Kyiv, 2021.*

**Research supervisor:** Doctor of Biological Sciences Yu. V. Danylovysh, Professor of the Department of Molecular Biotechnology and Bioinformatics at Institute of High Technologies of Taras Shevchenko National University of Kyiv

The influence of calix[4]arenes on bioenergetic, transport and metabolic processes in smooth muscle mitochondria has been studied experimentally and theoretically. It was found that chalcone calix[4]arenes inhibit the oxidation of NADH and FADH<sub>2</sub> in the electron transport chain, and significantly enhance the generation of reactive oxygen species, inhibit the transport of Ca<sup>2+</sup> and suppress the synthesis of nitric oxide in mitochondria.

**Key words:** calix[4]arenes, mitochondria, calcium transport, reactive oxygen and nitrogen species, bioenergetics, smooth muscle.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ .....	5
ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ I Огляд літератури .....	8
1.1. Функціональна роль мітохондрій в клітині .....	8
1.1.1. Значення мітохондрій для біоенергетики та метаболізму.....	8
1.1.2. Значені мітохондрії, як джерела активних форм кисню.....	10
1.1.3. Опосередкована мітохондріями загибель клітини. ....	13
1.2. Роль кальцію в молекулярній фізіології мітохондрій.....	14
1.2.1. Системи транспорту кальцію в мітохондріях гладенького м'язу. ....	14
1.2.2. Роль мітохондрій в підтриманні кальцієвого гомеостазу клітини.....	17
1.3. Мітохондрії та система оксиду азоту .....	20
1.3.1. Синтез оксиду азоту мітохондріями. ....	20
1.3.2. Роль оксиду азоту у функціонуванні мітохондрій гладенького м'язу .....	22
1.4. Хімічна природа та біологічна активність каліксаренів.....	25
РОЗДІЛ II Матеріали та методи досліджень .....	30
2.1. Виділення фракцій ізольованих мітохондрій із міометрія щурів .....	30
2.2. Синтез халконовмісних калікс[4]аренів .....	31
2.2. Метод спектрофлуориметрії .....	32
2.3. Метод протокової цитометрії.....	33
2.5. Обчислення кінетичних параметрів енергозалежного транспорту $Ca^{2+}$ в мітохондріях.....	34
2.6. Статистичний аналіз .....	34
РОЗДІЛ III Результати досліджень та їх обговорення.....	35
3.1. Халконові калікс[4]арени як ефектори окиснення аденінових нуклеотидів в мітохондріях.....	35
3.2. Вплив халконових калікс[4]аренів на утворення активних форм кисню мітохондріями.....	38
3.3. Дія халконових калікс[4]аренів на концентрацію іонів кальцію в матриксі мітохондрій .....	40
3.4. Ефект халконових калікс[4]аренів на утворення оксиду азоту мітохондріями .....	45
ВИСНОВКИ.....	48
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....	49

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

АФК	– активні форми кисню
ПОЛ	– перекисне окиснення ліпідів
ГМК	– гладеньком’язові клітини
VDAC	– з англ. voltage-dependent anion channel – потенціал залежний аніонний канал
МХ	– мітохондрії
ПМ	– плазматична мембрана
СР	– саркоплазматичний ретикулум
mRyR	– мітохондрійні ріанодинчутливі Ca <sup>2+</sup> канали
cGMP	– циклічний гуанозинмонофосфат
ЕГТ	– етиленглікольтетраоцтова кислота
HEPES	– 4-(2-гідроксиетил)-піперазинетансульфонова кислота
DMFA	– диметилформахід
ЯМР	– ядерний магнітний резонанс

## ВСТУП

Калікс[4]арени – це поліфенольні макроциклічні супрамолекулярні сполуки. Вони є малотоксичними, а окремі представники доволі специфічні щодо модуляції іон-транспортних систем субклітинних структур [54]. Характерною особливістю будови халконовмісних калікс[4]аренів є наявність кількох халконових залишків по нижньому вінцю калікс[4]аренової чаші, що передбачає ефективну взаємодію з мембранними структурами і можливість впливу на мембрано-асоційовані транспортні, енергетичні і метаболічні процеси. Характерною особливістю цих сполук, з біохімічної точки зору, є відносно селективний і високоафінний вплив на катіон-транспортні системи субклітинних мембранних структур. Як доволі гідрофобні сполуки, калікс[4]арени здатні проникати в клітини і взаємодіяти з мітохондріями. Окрім того калікс[4]арени є нетоксичними для ссавців [23].

Халконовмісні калікс[4]арени змінюють поляризацію мітохондрійної мембрани та за їх присутності зростає рівень іонізованого кальцію в матриці органел [2]. Одним з підходів щодо визначення ефективності функціонування електронно-транспортного ланцюга є аналіз змін флуоресценції аденінових нуклеотидів (NADH/FAD), які відображають їх редокс-стан, та DCF-флуоресценції мітохондрій, що віддзеркалює утворення активних форм кисню [48].

Також мітохондрії є важливим джерелом оксиду азоту (NO) і ефективною мішенню його дії. За різних умов NO синтезується мітохондріями в NO-синтазній реакції (мітохондрійна NO-синтаза, яка активна за нормоксії) або нітрит-редуктазній (відновлення нітрит-аніонів гем-вмісними протеїнами в дезоксіформі за гіпоксичних умов) [45]. Оксид азоту регулює такі фундаментальні мітохондрійні процеси як синтез АТФ, транспорт іонів кальцію, функціонування пори перехідної провідності, інтенсивність протікання циклу Кребса, мітохондрійний біогенез тощо. Передбачається існування доволі складної системи прямих і зворотних, негативних і позитивних зв'язків між компонентами електронно-транспортного ланцюга,  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортними

протеїнами та NO-синтазою в мітохондріях [48]. Існує точка зору, що ці структури є вирішальними в регуляції функціональної активності мітохондрій.

Втім, наразі відсутні ефективні і нетоксичні модулятори  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних процесів в мітохондріях, зокрема функціональної активності електронно-транспортного ланцюга і синтезу оксиду азоту.

**Актуальність роботи** полягає в тому, що дослідження біохімічних властивостей халконовмісних калікс[4]аренів, які здатні ефективно і селективно впливати на функціональну активність мітохондрій, дозволять використати їх в майбутньому з метою спрямованого впливу на функціонування електронно-транспортного ланцюга, генерацію активних форм азоту та кисню і активність  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортних систем в цих субклітинних компартментах. Наслідком цього, в перспективі, може бути створення фармакологічних препаратів з метою корекції мітохондрійної дисфункції, яка лежить в основі численних патологічних станів (захворювання серцево-судинної системи, діабет, нейродегенеративні процеси тощо).

Отже, **метою** роботи було дослідити вплив халконовмісних калікс[4]аренів на  $\text{Ca}^{2+}$ -залежні біохімічні процеси в мітохондріях.

Відповідно до мети були поставлені наступні **завдання**:

1. Вивчити дію вибраних калікс[4]аренів на функціонування електронно-транспортного ланцюга в ізольованих мітохондріях гладеньком'язових клітин матки;
2. Дослідити вплив халконовмісних калікс[4]аренів на генерацію активних форм азоту та кисню в мітохондріях міометрія;
3. Оцінити ефекти досліджуваних калікс[4]аренів на транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  в ізольованих мітохондріях гладеньком'язових клітин матки;
4. Проаналізувати залежність можливих ефектів від хімічної структури макроциклів.

## РОЗДІЛ I

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Функціональна роль мітохондрій в клітині

В еукаріотів кожна ядерна клітина містить особливі двомембранні органели – мітохондрії. Вони забезпечують синтез АТФ, який є джерелом хімічної енергії *in vivo*. Ефективність функції мітохондрій є досить високою, тому по суті, вони є «силовими станціями клітини». Таку назву дав їм Філіп Сікевич у 1957 р., а сам термін «мітохондрія» – Карл Бенд у 1898 році [39].

Для певного типу клітин кількість мітохондрій є більш-менш постійною, однак може змінюватися при функціональній активності клітини або на різних її стадіях розвитку. Мітохондрії мають розміри від 1 до 70 мкм. та можуть займати близько 10-20% об'єму еукаріотичної клітини [39].

##### 1.1.1. Значення мітохондрій для біоенергетики та метаболізму

Живі організми є термодинамічними відкритими системами, тобто їхнє існування є неможливим без постійного обміну енергією і речовинами з навколишнім середовищем. В живих організмах відбуваються різноманітні процеси перетворення форм енергії, які слугують для підтримання високого рівня структурної організації організму, генерації електричного струму, синтезу клітинних компонентів та ін.. Така сукупність процесів отримала назву енергетичного обміну [65].

Поряд із енергетичним обміном важливу роль в життєдіяльності організму також відіграє обмін речовин, або метаболізм. Він являє собою сукупність послідовних ферментативних реакцій які далі об'єднуються в окремі метаболічні шляхи [39].

Розрізняють дві метаболічні фази: катаболізм та анаболізм. Катаболізм – це фаза метаболізму, у якій відбувається розщеплення поживних органічних молекул до простіших. Такі реакції супроводжуються вивільненням енергії, частина якої запасасться у формі АТФ або відновлених переносників електронів

а решта розсіюється у вигляді тепла [64]. Роль водорозчинних коферментів, здатних оборотно окислюватися та відновлюватися, відіграють нуклеотиди NAD, NADP, FMN і FAD. Реакції за участі коферментів  $\text{NAD}^+$  та NADPH просторово розділені та протікають у різних компартментах. Так, окиснення різноманітних субстратів відбувається в мітохондріях, а реакції відновлення – у цитозолі. Анаболізм це фаза метаболізму, у якій з простих за будовою попередників синтезуються більші складніші за будовою молекули. Такі реакції навпаки потребують надходження енергії [67].

Особливу роль в обміні енергії, в поєднанні реакцій двох метаболічних процесів та у виконанні зовнішньої роботи відіграє АТФ. Він використовується клітиною як джерело енергії, або як субстрат для деяких реакцій [39]. Процес синтезу АТФ може відбуватися в цитозолі або мітохондріях.

В мітохондріях синтез АТФ відбувається в результаті фосфорилування із використанням енергії трансмембранного електрохімічного градієнта протонів. Фосфорилування відбувається на внутрішній мембрані мітохондрій, яка є непроникною для іонів  $\text{H}^+$  та містить різноманітні функціональні транспортні системи, ферменти дихального ланцюга та АТФ-синтазні комплекси [67].

АТФ-синтетаза – це макромолекулярний комплекс із молекулярною масою 500 кДа, який каталізує синтез АТФ шляхом конверсії трансмембранного електрохімічного градієнта  $\text{H}^+$  в енергію макроергічного зв'язку АТФ. Після цього АТФ потрапляє в цитоплазму, де клітина використовує його в енергозалежних реакціях. Таким чином, мітохондрії здатні підтримувати певний рівень АТФ у клітині, який відіграє особливу роль в обміні енергії в живих організмах [39].

Отже, мітохондрії є енергоутворюючими органелами еукаріотичних клітин, забезпечуючи їх необхідною кількістю енергії. Мітохондрії також беруть участь у багатьох фізіологічних функціях організму, наприклад у скороченні м'язової тканини. Вони можуть відносно вільно переміщатись у цитоплазмі, наприклад у печінці, або бути зафіксованими – у м'язах. Для фіксації та для забезпечення кооперативної роботи мітохондрії часто утворюють розгалужену сітку, де їхні групи зв'язуються між собою міжмітохондрійними контактами.

Особливо складною розгалужена сітка спостерігається у м'язах оскільки мітохондрії приймають участь у скороченні м'язової тканини [64]. Наприклад у регуляції роботи пейсмеркерних клітин гладеньких м'язів вісцеральних систем, зокрема матки, а при зміні функціонального стану мітохондрій спостерігається порушення скоротливої активності міометрію [53].

Порушення нормального функціонування мітохондрій в клітині може призвести до численних наслідків. Таке порушення має назву «дисфункція мітохондрій» та являється типовим патологічним процесом, який може призвести до розвитку великої кількості захворювань нервової системи, органу зору, м'язової та серцево-судинної систем, нирок та ендокринних органів [18]. Таке поширення мітохондрійних захворювань в організмі зумовлене високою залежністю всіх органів та тканин від постачання енергії, а отже і від процесів синтезу молекули АТФ мітохондріями [3].

До виникнення мітохондрійної дисфункції можуть призвести порушення в таких головних процесах мітохондрій: в циклі трикарбонових кислот, в карнітиновому циклі, при окисненні жирних кислот, при транспорті електронів у дихальному ланцюгу й окисному фосфорилуванні [26].

Внаслідок дисфункції мітохондрій, можуть виникнути різноманітні мутації. Всього відомо 229 генних дефектів мітохондрійного енергетичного метаболізму, із них 192 ядерних та 37 мітохондрійних. Мітохондрійні мутації залежать в основному від метаболітів та кофакторів [63].

Отже, основним джерелом синтезу АТФ та постачання енергії є мітохондрії. Вони беруть участь у функціонуванні усіх органів та тканин, тому при порушенні в головних процесах мітохондрій може виникнути мітохондрійна дисфункція і, як наслідок, велика кількість захворювань.

### **1.1.2. Значені мітохондрії, як джерела активних форм кисню**

Поглинтий організмом кисень використовується для окиснення білків, жирів та вуглеводів. Окиснення одного граму кожної із цих речовин потребує неоднакової кількості кисню. Найбільше енергії вивільняється при окисненні

жирів і, відповідно, для вивільнення такої кількості енергії необхідна висока кількість кисню [39].

Більше 90% поглинутого кисню відновлюється мітохондрійною цитохром оксидазою до води та лише невелика частина перетворюється в частково відновленні продукти, які отримали загальну назву активних форм кисню [43]. Такі проміжні продукти можуть утворюватися у цитоплазмі, мікросомах, мембранах ядра та ендоплазматичному ретикулуму. Однак основним джерелом активних форм кисню є мітохондрії [67].

До активних форм кисню належать, наприклад, супероксид-аніон, пероксид-аніон та гідроксильний радикал. Вони є природними продуктами життєдіяльності клітин та задіяні у реалізації різноманітних біохімічних та фізіологічних процесах: регуляції тонуусу судин, синтезі простагландинів, клітинній проліферації, передачі сигналів від міжклітинних сигнальних молекул на регуляторні системи, які контролюють експресію генів, тощо [65, 16].

Реакції відновлення кисню до води становить основу біоенергетики організму людини і тварин. Такий процес забезпечує синтез АТФ та здійснюється у процесі клітинного дихання за рахунок приєднання чотирьох електронів [55]. На відміну від кінетично інертного кисню, його проміжні продукти відновлення є реакційноздатними. Серед них, особливе місце посідають вільні радикали. Це тому, що вони мають високу реакційну здатність, яка визначається присутністю неспарених електронів на зовнішній орбіталі атома або іона [59].

Відновлення кисню до води здійснюється в кілька етапів. В першому етапі задіяні різноманітні оксидази, такі як: NAD(P)H-дегідрогеназа, цитохром-с-оксидази мітохондрій та ін. [31]. Особливою властивістю ферментів-оксидаз є те, що вони каталізують ступінчасте відновлення кисню чи перикисю водню до води, при цьому не вивільняючи в середовище проміжні, реакційноздатні, а тому потенційно небезпечні для клітин, форми кисню [49].

Одноелектронні донорні кофактори, в ролі яких можуть виступати іони змінної валентності ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mo}^{2+}$ ) або органічні молекули, які можуть

існувати у вільнорадикальному стані (наприклад хінони та флавіни), здатні зумовлювати одноелектронне відновлення кисню до су пероксид-аніону [39, 56].

При утворенні супероксид радикалу, за нормального перебігу аеробного метаболізму використовуються близько 1–2 % всіх електронів що пересуваються по мітохондрійному дихальному ланцюгу. Кожна клітина людського організму за нормальних фізіологічних умов продукує 10<sup>10</sup> молекул (0,15 моля) супероксиду на добу, або 1,75 кг у рік [52].

Супероксид-аніон є джерелом інших АФК у клітині. Оскільки супероксид-аніон не може пройти крізь біологічні мембрани та є нестабільним у водних розчинах, то швидко дисмутує з утворенням пероксид-аніону [35, 39].

Приєднання третього електрону на шляху поступового чотирьохелектронного відновлення кисню до води спричиняє виникнення дуже реакційно здатного гідроксил-радикалу (OH<sup>•</sup>) та гідроксид-іону (OH<sup>-</sup>) [43, 39], а приєднання четвертого електрону до гідроксил-радикалу зумовлює повне відновлення кисню.

Основним генератором супероксид-аніону, пероксид-аніону та гідроксил-радикалу є дихальний ланцюг мітохондрій [12]. Отже, в процесі мітохондрійного дихання під час відновлення кисню до води можуть утворюватися три АФК: два радикали та один іон осигену [43]. Однак по справжньому «активною» формою кисню є лише гідроксил-радикал, проте оскільки його утворення пов'язане із виникнення супероксид-аніону та гідроксил-радикалу, то всі три проміжні продукти прийнято відносити до «активних».

Отже, генерація АФК є природним фізіологічним процесом. На відміну від кисню, його проміжні продукти є реакційноздатними і тому вони можуть неферментативно окислювати білки, ліпіди, вуглеводи та нуклеїнові кислоти. За фізіологічних умов АФК швидко метаболізуються і в клітинах не нагромаджуються, тому їхня концентрація не висока і становить 10<sup>-11</sup> - 10<sup>-8</sup> М [56, 43, 12].

### 1.1.3. Опосередкована мітохондріями загибель клітини

Функціонування клітин в багатоклітинному організмі в ряді випадків закінчується генетично запрограмованою їх загибеллю – апоптозом. Він сприяє збереженню порядку та нормального функціонування біологічних систем, позбавляє та захищає організм від ослаблених, пошкоджених, хворих та мутантних клітин [73]. Важливою особливістю апоптозу являється відсутність запальної реакції сусідніх клітин на продукти розпаду, оскільки деградуюча клітина зберігає цілісність мембрани до кінцевих стадій процесу [72].

Апоптоз запускається специфічними сигналами та є енергетично залежним та генетично контрольованим процесом. Існують два шляхи запуску програми апоптозу: рецепторний та мітохондрійний. У мітохондрійному шляху ключову роль відіграють мітохондрії і це пов'язано із тим, що на їх зовнішній мембрані локалізовані білки родини Bcl-2 і саме за їх активності залежить чи відбуватиметься апоптоз. [62]. У даному шляху апоптозу відбуваються зміни стану мітохондрій в результаті чого знижується мембранний потенціал, утворюються гігантські пори, набухає матрикс, розривається зовнішня мембрана [40, 52].

Апоптоз закінчується «акуратним» фагоцитозом макрофагами чи оточуючими паренхіматозними і стромальними клітинами без наслідків для навколишньої тканини [41].

Окрім того, під час апоптозу мітохондрії також беруть участь у передачі сигналу пов'язаного з пошкодженням ДНК (наприклад при радіації, підвищення температури чи підвищення концентрації АФК) [41].

Активні форми кисню в певній мірі беруть участь в процесі апоптозу. Наприклад, за аномально високим рівнем продукції АФК виникає окисний стрес, в результаті чого клітини вибраковуються та запускається процес апоптозу. Для контролю рівню АФК в клітині існують антиоксидантні системи, які здатні ефективно інгібувати процеси вільнорадикального окиснення в клітинах [40, 10]. До локалізованих в мітохондріях ферментативних

антиоксидантів належать супероксиддисмутаза та пероксидази, а до низькомолекулярних антиоксидантів – вітамін Е, каротиноїди та убіхінон [72].

Високі концентрації NO або пероксинітрит також можуть викликати апоптоз в макрофагах, тимоцитах, панкреатичних острівцях, нейронах та пухлинних клітинах. Під час такого процесу NO, зв'язуючись із цитохром с оксидазою, порушує функціонування електронно-транспортного ланцюга. Зазвичай при цьому трансформовані клітини набагато більш чутливі, ніж нормальні [60, 39]. Щодня близько 5% клітин організму піддаються апоптозу, а їхнє місце займають нові клітини. При цьому клітина зникає безслідно за 15-120 хв. [41, 60].

Отже, мітохондрії відіграють важливу роль у регуляції апоптозу який у свою чергу регулює інтенсивність імунної відповіді, запобігаючи таким чином небезпеці утворення пухлинних клітин.

## **1.2. Роль кальцію в молекулярній фізіології мітохондрій**

Мітохондрії, окрім синтезу АТР, також відіграють важливу роль у  $\text{Ca}^{2+}$  сигналізації. Так, наприклад, вони є внутрішньоклітинним депо  $\text{Ca}^{2+}$ , здатні змінювати характер  $\text{Ca}^{2+}$  -сигналу та його поширення у клітині, забезпечують роботу  $\text{Ca}^{2+}$ -помп плазматичної і внутрішньоклітинних мембран, спрямованих на зниження концентрації катіонів  $\text{Ca}^{2+}$  у цитозолі [52].

### **1.2.1. Системи транспорту кальцію в мітохондріях гладенького м'язу**

Гладенькі м'язи відіграють ключову роль у підтриманні сталого функціонування організму, оскільки скорочення-розслаблення їх лежить в основі функціонування кровоносних та лімфатичних судин, дихальної системи, шлунково-кишкового тракту, сечостатевої системи тощо. Матка займає особливе положення серед інших гладеньком'язових органів, що обумовлено тією специфічною функцією, яку вона виконує в організмі при виношуванні плоду та пологах [29]. В розвинутих країнах передчасні пологи і зрив вагітності

обумовлюють до 80 % смертності новонароджених, яка не пов'язана з вродженими вадами розвитку [71]. Дослідження біохімічних властивостей  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних процесів в МХ та впливу на них екзогенних модуляторів, зокрема каліксаринів, є важливим для пошуку специфічних та високоафінних ефекторів з метою спрямованої регуляції функціонування мітохондрій і контрактильної активності матки [29].

Активация гладеньком'язових клітин супроводжується підвищенням концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в міоплазмі, оскільки, внаслідок взаємоузгодженого функціонування сарколеми, плазмотичної мембрани (ПМ), саркоплазматичного ретикулуму (СР) та мітохондрій, відбувається пасивний транспорт іонів кальцію за концентраційним градієнтом із поза- та внутрішньоклітинних пулів [74, 47, 37]. При цьому, зниження концентрації іонів кальцію в міоплазмі ГМК є обумовленим енергозалежним процесом транспорту катіона, де задіяні іонні помпи та обмінники ПМ, СР та МХ. [23] В місцях контакту ендоплазматичного ретикулума, плазматичної мембрани та мітохондрій локальна концентрація іона кальцію може сягати десятків та навіть сотень мікромоль на 1 л. [47, 58].

Щоб потрапити до матриксу мітохондрій, іони  $\text{Ca}^{2+}$  мають пройти крізь зовнішню мембрану. Надходження іонів кальцію у міжмембранний простір мітохондрій здійснюється та регулюється за допомогою потенціалзалежних аніонних каналів (VDAC – з англ. voltage-dependent anion channel). У внутрішній мембрані мітохондрій також містяться структури які регулюють надходження  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондрії. Такі внутрішні структури можна поділити на два типи: системи що забезпечують надходження  $\text{Ca}^{2+}$  у матрикс мітохондрій, та системи що забезпечують вивільнення його у цитозоль [15, 17, 22].

Є такі основні системи, що забезпечують надходження  $\text{Ca}^{2+}$  у матрикс мітохондрій:  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортер, мітохондрійні р'янодинчутливі  $\text{Ca}^{2+}$ -канали (mRyR) та система швидкого поглинання  $\text{Ca}^{2+}$ . Нагромадження іонів  $\text{Ca}^{2+}$  у матриксі може відбуватись також і за участю  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -антипортера, однак при цьому необхідна деполяризації внутрішньої мембрани мітохондрій [8, 32].

З усіх перелічених вище систем внутрішньої мембрани, найбільш вивченої є одна – це  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортер, який забезпечує швидке та масове

надходження  $\text{Ca}^{2+}$  до матриксу. Рушійною силою такої транспортної системи є електрохімічний градієнт  $\text{Ca}^{2+}$ , а її активність залежить від концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у цитоплазмі [8].

Система «швидкого входу  $\text{Ca}^{2+}$ » транспортує іони  $\text{Ca}^{2+}$  у матрикс мітохондрій щонайменше у 300, а то і в 1000 разів швидше, ніж  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортер. Однак така система триває короткий період часу оскільки інактивується зв'язуючими сайтами при досягненні концентрації іонів кальцію 200 нмоль/л [8, 51].

mRyR  $\text{Ca}^{2+}$ -канали забезпечують вищу проникність  $\text{Ca}^{2+}$  ніж  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортер та здійснюють швидке захоплення іонів  $\text{Ca}^{2+}$  з високою провідністю та відносно низькою селективністю. Мітохондрійні ріанодиночутливі  $\text{Ca}^{2+}$ -канали отримали таку назву завдяки рослинному алкалоїду ріанодину, який був виділений із кори *Ruania speciosa* та специфічно впливає на дані канали [17, 39]. Для таких каналів характерний біфазний характер залежності транспортного процесу від концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ . Наприклад, при концентрації 10-40 мкмоль/л відбувається максимальний вхід  $\text{Ca}^{2+}$ , однак при концентрації в 50 мкмоль/л – канал пригнічується. Це може захистити від перевантаження МХ іонами кальцію та відкривання пори перехідної провідності [22, 27].

До систем виведення  $\text{Ca}^{2+}$  з мітохондрій у цитозоль належать  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обмінник внутрішньої мітохондрійної мембрани та  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник. [38]  $\text{Na}^+$ -залежний обмінник присутній у електрозбудливих тканинах, а  $\text{Na}^+$ -незалежний  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник – у незбудливих, наприклад, у тканинах нирки, легенів, печінки, а також у гладеньких м'язах. Хоча у деяких тканинах присутні обидва типи обмінників [38, 57].

Трансмембранний білок  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник підтримує низьку концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондріях та забезпечує його виведення з клітини в обмін на транспорт  $\text{Na}^+$  – один іон  $\text{Ca}^{2+}$  в обмін на три іони на  $\text{Na}^+$ . Рушійною силою  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника є електрохімічний градієнт  $\text{Na}^+$  внутрішньої мембрани. При цьому  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обмінник забезпечує електронейтральне виведення іонів з матриксу у цитозоль. Саме за допомогою такого обмінника,

виведення іонів  $\text{Ca}^{2+}$  з мітохондрій може бути спряженим із процесом транспортування протонів під час дихання [33, 38, 57].

$\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник діє електронеутрально – транспортує  $\text{Ca}^{2+}$  із мітохондрій, використовуючи енергію градієнта  $\text{H}^+$ . Так, виведення одного іона кальцію такою системою супроводжується входом у матрикс мітохондрій двох  $\text{H}^+$ . Однак,  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник також може працювати в реверсному режимі, забезпечуючи накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях при його низьких цитозольних концентраціях (менше 1 мкмоль/л) [37, 39].

Ще однією системою виведення  $\text{Ca}^{2+}$  з мітохондрій є мітохондрійна пора транз'єнтної проникності. Однак її зазвичай розглядають як патологію, оскільки ця пора відкривається при різних стресових чинниках (гіпоксії, ішемії) та, особливо, при перевантаженні мітохондрії іонами  $\text{Ca}^{2+}$ . При виході  $\text{Ca}^{2+}$  за допомогою такої системи, в мітохондріях знижується мембранний потенціал і вони набрякають. Ці процеси врешті-решт призводять до апоптозу або некрозу клітини [58, 57].

Отже, мітохондрійні  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортні системи підтримують оптимальну концентрацію іонів кальцію в матриксі та беруть участь у контролі кальцієвого гомеостазу в клітині, а для підтримання нормальної життєдіяльності клітини необхідна узгоджена їх робота.

### **1.2.2. Роль мітохондрій в підтриманні кальцієвого гомеостазу клітини**

Можна виділити три основні функції, які виконують  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортні системи мітохондрій в клітині. Це забезпечення внутрішнього кальцієвого гомеостазу, регуляція енергетичного метаболізму мітохондрій та запуск процесів клітинної загибелі [51].

Регуляція внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  є важливим механізмом в внутрішньоклітинній сигналізації. Вона досягається взаємодією кількох органел які поглинають та викидають кальцій, що забезпечує узгоджену та швидку передачу кальцієвого сигналу [30].

Мітохондрії відіграють важливу роль в цьому процесі, оскільки являються основною буферною системою для іонів  $\text{Ca}^{2+}$  [39]. Так, майже 99%

всього  $\text{Ca}^{2+}$  у матриксі мітохондрій є зв'язаним, при цьому він здатний до обміну, і лише 1% акумульованого  $\text{Ca}^{2+}$  перебуває у вільному стані. Протягом життя клітини, своєрідний  $\text{Ca}^{2+}$ -буфер, постійно змінюється [5].

Для пояснення цього, було запропоновано концепцію мікродоменів. Вона полягає в тому, що при надходженні чи вивільненні  $\text{Ca}^{2+}$  з немітохондрійних депо, створюються домени із високою концентрацією  $\text{Ca}^{2+}$ . Вона повинна бути більшою за 20 мкмоль/л і бути достатньою для активації поглинання  $\text{Ca}^{2+}$  системами сусідньої мітохондрії. Тобто, мікродомени нагромаджують  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями [38, 37].

Регулювання  $\text{Ca}^{2+}$  в клітині, а саме поглинання та виведення його з мітохондрій, відіграє фундаментальну роль у підтриманні та збереженні гомеостазу клітини. Регулювання  $\text{Ca}^{2+}$  забезпечує більшість основних процесів в клітині, наприклад регуляції енергетичного метаболізму [21].

Підвищення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазмі призводить до збільшення поглинання його мітохондріями із цитоплазми в мітохондрійний матрикс, де даний катіон формує комплекси з неорганічними та іншими фосфатами. При цьому іони  $\text{Ca}^{2+}$  активують три ферменти матриксу. Це піруватдегідрогеназа, цитратдегідрогеназа та  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназа, і крім них також деякі комплекси дихального ланцюга [14, 27].

Їх активація призводить до зростання рівня NADH, в результаті чого збільшується продукція АТР в мітохондріях. Активування трьох дегідрогеназ відбувається різними способами. Так, цитратдегідрогеназа та  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназа активуються внаслідок безпосереднього зв'язування  $\text{Ca}^{2+}$  з регуляторною субодиницею ферментів, а піруватдегідрогеназа – внаслідок  $\text{Ca}^{2+}$ -залежного дефосфорилування [20, 51].

Така передача кальцієвого сигналу із цитоплазм в мітохондрії дозволяє модулювати мітохондрійний метаболізм клітини. Після поглинання іонів  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями в них відбувається змінна протонного потенціалу, що й впливає на процеси окисного фосфорилування. Це у свою чергу впливає на продукування АТР. Окрім того, іони  $\text{Ca}^{2+}$  стимулюють розщеплення глюкози та глікогену, внаслідок чого також підвищується рівень АТР [25, 30].

Також, мітохондрії здатні змінювати внутрішньоклітинну концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  як локалізовано, так і по всій цитоплазмі. Здатність мітохондрій приймати участь в  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналізації, в більшій мірі залежить від типу клітин [14].

Так, наприклад в дорослих кардіоміцитах іони  $\text{Ca}^{2+}$  із цитоплазми збираються в основному за допомогою  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРази саркоплазматичного ретикулуму та обмінника плазматичної мембрани. В той же час, в інших не м'язевих клітинах, саме поглинання іонів  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями може відігравати ключову роль в регуляції концентрації іона в цитоплазмі [47,42]. Наприклад, в клітинах підшлункової залози, мітохондрії можуть попереджувати надлишкове збільшення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в апікальній частині цитоплазми [39].

Також мітохондрії є досить активними учасниками кальцієвих «хвиль» в нервових клітинах та молодих кардіоміцитах, локально змінюючи при цьому концентрацію іона на обмеженому просторі цитоплазми. Акумуляція  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями є важливим процесом в регуляції мітохондрійної та клітинної енергетики [61].

Надлишкове накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях може призвести до відкриття в органелах двох типів пор: транз'єнтної проникності та ліпідної пори, яка індукується жирними кислотами. Ліпідна пора і пора транз'єнтної проникності можуть призводити до утворення патології [5, 50].

Отже, регулювання  $\text{Ca}^{2+}$  в клітині, а саме поглинання та виведення його з мітохондрій, відіграє фундаментальну роль у підтриманні та збереженні гомеостазу клітини. При цьому мітохондрії виконують роль  $\text{Ca}^{2+}$ -буфера, впливають на поширення  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналу, прискорюють повернення  $\text{Ca}^{2+}$  до внутрішньоклітинних пулів та модулюють активність  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів і транспортерів плазматичної мембрани.

### 1.3. Мітохондрії та система оксиду азоту

Оксид азоту (NO) – це структурно проста молекула, яка є низькомолекулярною амфіфільною та вільнорадикальною. В біосистемах NO існує відносно короткий час, в залежності від мікрооточення до 5 с., і є внутрішньоклітинною та міжклітинно месенджерною і регуляторною молекулою [69]. Він бере участь у регуляції низки метаболічних реакцій, чим забезпечує нормальне функціонування організму. NO має широке коло біологічних та фізіологічних властивостей, наприклад регуляція серцево-судинної, нервової, ендокринної, імунної та репродуктивної систем організму [66].

#### 1.3.1. Синтез оксиду азоту мітохондріями

Мітохондрії виступають в ролі потенційної мішені для оксиду азоту або його редокс-форм. Це пояснюється тим, що NO опосередковано взаємодіє із різноманітними супрамолекулярними комплексами, внутрішньоклітинними та позаклітинними ефекторними молекулами. До даних молекул відносяться тіоли, хромопротеїни, а також супероксид-аніон, які переважно містяться або синтезуються МХ [39]. Окрім того, МХ здатні власне синтезувати NO завдяки роботі мітохондрійної NO-синтази і нітрит- та нітрат-редуктазною здатністю компонентів електронно-транспортного ланцюга [66].

Вперше механізм біосинтезу NO з L-аргініну був з'ясований у 1987 р.. In vivo в еукаріотичних клітинах NO може утворюватися двома шляхами: ензиматичним (окиснювальним) або неензиматичним (відновлювальним) [44]. Неензиматичний шлях утворення NO спостерігається, в основному, при патологічних станах для яких є характерним зниження рН середовища. Як прикладом таких станів можна навести гіпоксію (при якій спостерігається низький рівень кисню), артеріальну гіпертензію, цукровий діабет, та пониження за певних умов активності NO-синтаз [13].

Вважають, що за нестачі кисню інгібується NO-синтазний компонент оксиду азоту та зростає активність нітритредуктазної системи. Остання тісно

пов'язана із гемвмісними білками які здатні в дезоксиформі відновлювати нітрити в NO. До таких білків належать Hb, міоглобін, цитохромоксидаза та цитохромом P-450. Неензиматичний шлях ще називають відновлювальним, оскільки в його основі лежать реакції послідовного відновлення нітратів або нітритів до оксиду азоту [39, 11, 1].

В організмах людини та тварин, за нормальних умов, оксид азоту синтезується ензиматичним шляхом за участі особливих ферментів – родина ізоформ NO-синтази (NOS). За наявності NADPH, FMN, FAD, кальмодуліну, тетрагід-робіоптерину, кисню, а також іонів  $Ca^{2+}$  – NOS синтезують NO з L-аргініну, перетворюючи амінокислоту в L-цитрулін та оксид азоту [66, 13].

Структура NOS включає два домени: редуктазний та оксигеназний. Домени окремо функціонують один від одного і є різними каталітичними одиницями. Однак утворення NO можливе лише при взаємоузгодженій їх дії. Це пов'язано з тим, що домени NOS містять взаємопов'язані компоненти, які відіграють значну роль в окисненні L-аргініну [45]. Між двома доменами розміщений невеликий фрагмент який містить у своєму складі 20-25 амінокислотних залишків та здатен зв'язувати  $Ca^{2+}$ -кальмодулін. Електрони від NADPH передаються по редокс-ланцюгу на атом кисню, внаслідок чого він частково відновлюється та активується [50].

Структурно-функціональною особливістю NOS є димеризація субодиниць, переважно в ділянці оксигеназного домена. Швидкість протікання ензиматичного шляху в клітинах залежить від концентрації L-аргініну, а також від кількості й активності ферментів NOS. Наприклад, при надлишку позаклітинного L-аргініну посилюється синтез NO. В матриксі мітохондрій концентрація L-аргініну досягає в середньому 150-300 мкМ [45, 46, 11].

Всього розрізняють три ізоформи ферменту: нейрональна (nNOS), макрофагальна (iNOS, або mNOS) і ендотеліальна (eNOS) [13]. nNOS та eNOS ще називають конститутивними ензимами і є добре дослідженими. Вперше, вони були описані в нервовій тканині та в ендотелії судин відповідно. Нейрональна та ендотеліальна ізоформи постійно експресуються в клітині та є кальцій-залежними ферментами, а при активації продукують невелику кількість

NO в межах декількох млмоль/л, при цьому тривалість їхньої активації вимірюється секундами. Також існує мітохондрійна ізоформа (mtNOS), однак її вважають як один із сплайс-варіантів nNOS [45, 66, 1]. В імунокомпетентних клітинах особливе значення відіграє індукцйний ензим (iNOS). При цьому він не залежить від концентрації іонів кальцію, а для її активації потрібні декілька годин дії ендотоксинів, цитокінів та інших факторів, наприклад  $\gamma$ -опромінення. Активація iNOS спричиняє підвищення рівня NO у сотні, а то і в тисячу разів. Оскільки великі дози NO можуть бути токсичними для клітин, то дана ізоформа ферменту вважається патологічною, на відмінну від конститутивних NOS [69].

mtNOS основними характеристиками схожа з iNOS, а не з конститутивною формою. Однак їх швидкість продукції NO відрізняються і це вказує на те, що є фіксованою на внутрішній мембрані мітохондрій, тоді як iNOS являється цитозольним ферментом. Окрім того, амінокислотна послідовність mtNOS відповідає первинній послідовності nNOS. NO, синтезований mtNOS, регулює активність мітохондрій та редокс-гомеостаз. Так, відомо що оксид азоту здійснює регуляторну дію на мітохондрійне дихання, а ферменти дихального ланцюга входять в спектр мішеней NO та його метаболітів. Цитохроми мітохондрійного ланцюга електронного транспорту також здатні реагувати із оксидом азоту [13, 1, 11, 45].

Таким чином, NO тісно взаємопов'язаний із мітохондріями. Також, оскільки мітохондрійна NOS являється первинною мішенню оксиду азоту, то її можна використовувати в якості специфічної мішені для фармакологічної дії.

### **1.3.2. Роль оксиду азоту у функціонуванні мітохондрій гладенького м'язу**

До основних функціональних значень NO, можна віднести: релаксацію судинної стінки, тобто контроль артеріального тиску, регуляцію проникності мікросудин, дезагрегувальний та антиадгезивний ефекти на тромбоцити. Тобто оксид азоту має значний вплив на гладенькі м'язи. Наприклад, донори NO можуть викликати релаксацію міометрію [53, 46].

NO впливає на регуляцію в клітинах гладеньких м'язів основним чином модулюючи активність протеїнів, які забезпечують роботу скоротливого апарату, або впливаючи на транспортні мембранні системи, які контролюють  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаз. У матці джерелами оксиду азоту можуть виступати ендометріальна тканина та ендотелій судин [46, 9, 4].

Окрім регуляції активності систем транспорту  $\text{Ca}^{2+}$ , оксид азоту регулює такі основні функції в мітохондріях, як: контроль дихання та окисного фосфорилування, інгібування або індукція біогенезу, а також впливає на розподіл зарядів внутрішньої мітохондрійної мембрани. Окрім того, NO контролює експресію декількох ферментів в циклі Кребса. [9, 49, 50]

*Взаємодія оксиду азоту з електронно-транспортним ланцюгом.*

При низьких фізіологічних концентраціях NO змінюється рН матриксу та регулюється ефективність окисного фосфорилування. За нормального парціального тиску NO може гальмувати мітохондрійне дихання в різних тканинах та знижувати поглинання кисню мітохондріями оборотно-зв'язуючись та пригнічуючи активність комплексів електронно-транспортного ланцюга. Комплекси дихального ланцюга відрізняються різною чутливістю до NO [7, 39].

NO впливає на клітинне дихання за допомогою механізмів, залежних від cGMP. При концентраціях 0,5-1 мкМ оксиду азоту в мітохондріях, він здатен пригнічувати активність комплексу I дихального ланцюга, однак діє скоріше за все не напряму, оскільки NO, який подається безпосередньо до ізольованих мітохондрій, не викликає пригнічення активності комплексу I дихального ланцюга [45, 7].

Ендогенно-синтезований NO може безпосередньо пригнічувати дихання, інгібуючи цитохром c оксидазу у комплексі IV, зменшуючи таким чином споживання кисню. Це дає можливість клітинним ферментам з низькою спорідненістю до  $\text{O}_2$  оптимально функціонувати. Однак, при низькій концентрації кисню NO може конкурувати з ним в електронно-транспортному ланцюзі. Таке конкурування може призвести до метаболічної гіпоксії [66, 64].

Оксид азоту, взаємодіючи з Fe-S-центрами в III комплексі дихального ланцюга, гальмує транспорт електронів між цитохромами b та c1. Концентрація NO, яка необхідна для даного процесу, дорівнює 0,3-0,5 мкМ [66, 7].

При концентрації NO у матриксі в 10-20 нМ, оксид азоту здатен зворотно зв'язуватися з цитохром с-оксидазою. При інгібуванні цитохром с-оксидази може зростати рівень відновлених компонентів електронно-транспортного ланцюга, наприклад убісеміхінону [7, 1]. Напів-максимальне гальмування цитохром с-оксидази може відбуватися при концентраціях NO в 50-100 нМ.

Окрім того при надвисоких концентраціях оксиду азоту, наприклад при запаленні та зростанні експресії iNOS, він може реагувати з O<sub>2</sub>, утворюючи пероксинітри. Вони здатні викликати незворотне інгібування дихання мітохондрій та пошкоджують ряд мітохондрійних компонентів [11]. Тривалий вплив NO у високих концентраціях, може призвести до постійного пригнічення комплексу I і потенційно до різноманітних патологічних явищ, таких як деполяризація мітохондрійної мембрани, незворотне інгібування дихального ланцюга, вивільнення цитохрому с в цитозоль та нітрозилування ряду мітохондрійних протеїнів [7, 11, 45].

#### *Модуляція NO Ca<sup>2+</sup>-гомеостазу в мітохондріях.*

NO здатен модулювати процеси транспорту Ca<sup>2+</sup> в мітохондріях гладеньком'язових клітин, судин, кардіоміоцитів та гепатоцитів. Він відіграє центральну роль в підтриманні оптимальної концентрації іонів кальцію в міоплазмі та в мітохондрійному матриксі. Забезпечуючи нормальне функціонування електронно-транспортного ланцюга та метаболічних процесів, NO підтримує Ca<sup>2+</sup>-гомеостаз в клітині [4, 46].

В залежності від того, в яких частинах клітини розміщуються мітохондрії, вони знаходяться під впливом різних концентрацій Ca<sup>2+</sup>. Наприклад МХ, розташовані поблизу мікродоменів ендоплазматичного ретикулуму перебувають в умовах високої концентрації кальцію, яка може досягати десятки мк [4, 47, 49]. Це пояснюється тим, що пасивний транспорт Ca<sup>2+</sup> з СР індукується IP<sub>3</sub>-рецепторами та рідиночутливими Ca<sup>2+</sup>-каналами, які містять мітохондрії. У деяких гладеньком'язових клітин локальні зростання

концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  вздовж CP утворюють  $\text{Ca}^{2+}$ -хвилю. У CP NO може знижувати ефективність вивільнення катіона через канали  $\text{IP}_3$  та ріанодинового рецепторів. На рівні сарколеми NO може знижувати провідність кальцієвих каналів [47].

Таким чином, NO як безпосередньо впливає на зміни  $\text{Ca}^{2+}$ -акумуляуючої здатності мітохондрій, так і обумовлює модулювання енергетичного забезпечення клітини, наприклад міоцитів, а, отже і вплив на функціонування усіх АТР-залежних транспортних систем. Окрім того NO впливає на процес утворення комплексу  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулін, пригнічує активність кінази та стимулює фосфатази легких ланцюгів міозину [9, 50].

#### 1.4. Хімічна природа та біологічна активність каліксаренів

Каліксарени – це чашоподібні макроциклічні сполуки, молекули яких побудовані з фенольних фрагментів, які в свою чергу сполучені між собою метиленовими містками [52].

Термін «калікс[n]арен» був запропонований та введений в літературу американським хіміком Девідом Гютше. Слово «калікс» із грецької перекладається, як чаша-кратер для вина, оскільки оригінальна форма молекули є чашоподібною. Слово «арен» вказує на наявність у макроциклічному ансамблі ароматичних циклів [36]. Кількість ароматичних фрагментів у макроциклічному кістяку молекули позначається дескриптором [n]. В молекулах каліксаренів умовно виділяють два вінця: верхній та нижній, при цьому верхній вінець є більш широким ніж нижній. Калікс[4]арен має об'єм внутрішньої порожнини молекули в 10 кубічних ангстремів і містить чотири ароматичних фрагментів в каліксареновій чаші [68].

Особливою властивістю каліксаренів є здатність зв'язувати нейтральні молекули, аніони та катіони. Також вони мають здатність вбудовуватись у біомембрани, таким чином впливаючи на функціонування аніонних та катіонних помп [6].

Каліксарени виступають ефективними інгібіторами АТР-гідролазних систем. Так, калікс[4]арен С-97 ефективно інгібує АТРазну активність

субфрагмента-1 міозину міометрія, істотно збільшуючи гідродинамічний діаметр молекули субфрагмента-1. Це вказує на утворення міжмолекулярного комплексу між каліксареном та голівкою міозину [28]. Також є можливий механізм відновлення АТРазної активності за допомогою каліксаренів. Це може бути пов'язано із їх здатністю хелатувати важкі метали у розчині, на рівні субфрагмента-1, та вилучати їх із середовища інкубації. Так, наприклад, тіакалікс[4]арентетрасульфатат, за наявності важких металів, таких як  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  та  $\text{Cd}^{2+}$ , відновлює до контрольного рівня АТРазну активність субфрагмента-1 міозину [2, 44, 34].

Каліксарени здатні витіснити ключовий продукт апоптозу Araf-1 із комплексу з цитохромом с. Таким чином, каліксарени здатні міцно зв'язуватися із цитохромом с, порушуючи наближення відновлювальних агентів до гемової групи, на порядок зменшуючи швидкість реакції відновлення трьохвалентного заліза цитохрому с до двовалентного аскорбатіоном. Така взаємодія залежить від замісників на нижньому вінці каліксарену. Також важливим є координоване розміщення чотирьох пептидних петель на каліксареновій платформі. Це пов'язано із тим, що навіть окрема петля впливає на процес відновлення цитохрому с аскорбатом. Окрім того, цитохром с здатний зв'язуватися з карбоксильними похідними калікс[6]аренів та калікс[8]аренів [52, 60, 68].

Калікс[4]арен, зв'язуючись з цитохромом с ефективно інгібує ензим  $\alpha$ -хімотрипсину. Даний каліксарен є селективним, оскільки не впливає на активність іншої протеази – еластази. Калікс[4]арен є конкурентним інгібітором та здійснює так зване повільне інгібування, яке є подібним до інгібування декількох природих інгібіторів протеїнази [70].

Також є каліксарени, які являються потенційними інгібіторами таких сполук: хімотрипсину, холінестерази, L-лізиноксидази, трипази, лужної фосфатази та трансглутамінази. Деякі синтезовані каліксарени мають високий афінітет до катіонів металів. Таким чином вони здатні до ефективного пригнічення ензиматичної активності фосфатази, що містить  $\text{Zn}^{2+}$  у своїх активних сайтах, за рахунок того, що блокується доступ до субстрату [23, 28].

Також каліксарени мають комплексоутворювальні властивості та широкі можливості щодо функціоналізації різними групами. Таким чином, вони можуть утворювати супрамолекулярні системи, які утримуються та формуються силами міжмолекулярних нековалентних взаємодій. Механізми утворення та функціонування таких систем є подібними до механізмів організації та дії біологічних об'єктів. Наприклад ензимів, клітинних мембран, протеїнів та нуклеїнових кислот [28, 44].

Активність та селективність макроциклічних каліксаренових платформ визначається міжмолекулярними взаємодіями між субстратом та каталізатором. Така їх властивість дає можливість вивчати каліксаренів, як аналогів ензимів. До таких синтетичних ензимів належать, наприклад, сульфокалікс[6]арени, які виявилися ефективними кислими каталізаторами гідратації синтетичних аналогів NADH–1,4-дигідронікотинамідів. Каліксарени також можуть каталізувати гідроліз естерів карбонових кислот, процес алкоголізу N-ацетилподібних основних амінокислот (за наявності в середовищі метанолу), а металовмісні каліксарени здатні до трансестерефікації етерів фосфорних кислот [6, 2, 36].

Отже, каліксарени можна розглядати як аналоги природних ензимів, а синтетичні сполуки на їх основі, здатні каталізувати широкий спектр біохімічних реакцій.

Оскільки каліксарени мають в структурі ароматичні блоки, то вони мають гідрофобні властивості і тому можуть взаємодіяти із клітинними мембранами. Така властивість каліксаренів досить важлива, особливо у можливості використання їх у медицині. Проникнення або вбудовування (транслокація та інкопорація) каліксаренів в мембрани клітини залежить від замісників на верхньому та нижньому вінцях. В поєднанні з комплексоутворюючими властивостями, це дає змогу каліксаренам транспортувати крізь мембрану різні речовини. Окрім того, вони можуть зв'язуватися із мембраною та формувати в ній канали [23, 16].

Наприклад, тетраметокси(гіа)каліксарен може моделювати транспорт води крізь мембрану, а трет-бутилкалікс[4]арен, поєднаний з чотирма триплетами, – селективний фільтр для іонів  $K^+$ .

Є кілька способів утворення штучного каналу для іонів  $Ca^{2+}$  та  $Na$ . До першого способу належить такий процес: каліксарени, які імітують іонні канали, транспортуючи іони натрію вбудовуються в ліпідний бішар. При цьому амфифільні каліксарени формують у розчині міцели, які зливаються із мембранами, утворюючи таким чином мультиканали [36, 68].

Другий спосіб утворення штучного каналу для іонів калію та натрію можна розглянути на каліксрезорциноаренів. Такі каліксарени розміщуються на поверхні мембрани таким чином, що їх гідроксильні групи спрямовані у водний розчин, а гідрофобні довгі алкільні ланцюги – в глиб мембрани. За певні проміжки часу каліксарени розміщуються один на проти одного, по різних боках мембрани, в результаті чого утворюється відкритий каналоподібний простір. З часом, каліксарени пересуваються в різних напрямках і це пов'язано з динамічною структурою мембран. Внаслідок цього канал розбирається. Отже, канал утворюється за принципом самозбирання й, таким чином, аналогічно руйнується [2, 68, 70].

На основі каліксаренів, які виявляють іонофорні властивості, можна моделювати та вивчати транспортні процеси в мембранах. Також це дає змогу розробляти ефективні антибіотики подібними до природних і механізм дії яких полягає в порушенні трансмембранного потенціалу в клітинах та органідах [68].

На рівні катіонотранспортувальних систем нативних мембран, каліксарени можуть виявляти мембранотропні властивості. Наприклад, парасульфonatoкаліксарени є сильними блокаторами потенціалокерованих хлоридних каналів із винятковим тривалим часом блокування та субнанолярною константою інгібування [36].

Ще однією важливою властивістю каліксаренів є нездатність викликати імунну відповідь організму. Вони не виявляють токсичності у дозах що не перевищують 100 мг на 1 кг маси тіла. При цьому, каліксарени швидко

виводяться з організму із сечею та не накопчуються в селезінці, печінці та мозку [28].

Хоча, деякі каліксарени, все ж, здатні стимулювати імунну відповідь організму. Наприклад, антитіла проти калікс[4]аренів виявляються лише при імунізації каліксаренами кон'югованими протеїнами. Таким чином, імунна відповідь залежить від природи кон'югованого переносника в каліксаренах, а також від дози та способу імунізації [70].

Отже, оскільки халконові калікс[4]арени є малотоксичними, демонструють мембранотропну дію, добре проникають крізь плазматичну мембрану, здатні до супрамолекулярних взаємодій із біокатіонами, біоаніонами, біомолекулами та біомакромолекулами, а також слугують ефекторами різноманітних ензиматичних, рецепторних та транспортних мембранозв'язаних протеїнів, – то такі властивості калікс[4]аренів, роблять їх перспективними в дослідженнях біохімічних процесів, що асоційовані з субклітинними мембранами. Також перспективним є можливість застосування халконових каліксаренів для корекції мітохондрійних дисфункцій, які лежать в основі численних патологій та виникають при порушенні головних біохімічних процесів в мітохондріях [26, 63]. Впливаючи на різноманітні системи, наприклад на катіон-транспортні АТФ-гідролазні системи,  $Mg^{2+}$ , АТФ-залежної  $Ca^{2+}$ -помпи плазматичної мембрани,  $Ca^{2+}$ -уніпортеру мітохондрій та ін., можна контролювати біохімічні процеси та, таким чином, корегувати дисфункції мітохондрій. Біохімічні особливості впливу халконових калікс[4]аренів на  $Ca^{2+}$ -залежні процеси в мітохондріях, а саме редокс-стан аденінових нуклеотидів та генерацію активних форм азоту та кисню не досліджені. Вирішення цих питань є важливим з точки зору пошуку ефективних та селективних ефекторів функціональної активності мітохондрій. Дослідження дії нетоксичних халконових калікс[4]аренів на зазначені процеси є важливим етапом створення нових фармакологічних препаратів, дія яких спрямована на подолання мітохондрійної дисфункції і лікування «мітохондрійних хвороб».

## РОЗДІЛ II

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

В дослідах використовували статевозрілі невагітні нелінійні щури віком 2 місяці, середня маса тіла 200 г, маса матки 350-600 мг. Тварин вводили в стан наркозу шляхом витримування у камері, збагаченій парами хлороформу, після чого декапітували. При цьому усі маніпуляції з тваринами були проведенні відповідно до Закону України № 3447 IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» та Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та наукових цілей (Страсбург, 1986).

#### **2.1. Виділення фракцій ізольованих мітохондрій із міометрія щурів**

Препарат ізольованих мітохондрій отримали із міометрія невагітних щурів за допомогою методу диференційного центрифугування. Після того як виділили матку та очистили її від жирової та сполучної тканини, м'язовий препарат помістили у 0,9 % розчин NaCl. Препарат подрібнювали ножицями на шматочки розміром приблизно 2x2 мм, які далі переносили у робочий розчин з температурою 4 °С з наступним складом: 10 mM HEPES (pH 7,4), 250 mM цукрози та 1 mM EGTA.

Далі тканину гомогенізували за допомогою гомогенізатору Heidolph Silent Crusher 3 рази по 20 с., із охолодженням на льоду протягом 1 хв. Співвідношення тканин робочого розчину складав 1 : 9.

Гомогенат центрифугували протягом 15 хв. при 1 тис. обертів, за температури 4 °С. Супернатант збирали та центрифугували протягом 15 хв. при 12 тис. g., за температури 4 °С. Осад ресуспендували у робочому розчині, зі складом 10 mM HEPES (pH 7,4), 250 mM цукрози, та знову центрифугували протягом 15 хв при 12 тис. g за температури 4 °С. Одержану фракцію ізольованих мітохондрій ресуспендували в буфері 10 mM HEPES (pH 7,4), 250 mM цукрози та 1 мг/мл бичачого сироваткового альбуміну, у співвідношенні 100 мг тканини на 100 мл буфера. Одержану фракцію

ізолюваних мітохондрій зберігали на льоду впродовж усього експерименту. Вміст протеїну у фракції мітохондрій визначали стандартним методом Bradford за його реакцією з реактивом Кумасі G250. Середнє значення вмісту протеїну у мітохондрій фракції складало 2 мг/мл [44].

## 2.2. Синтез халконовмісних калікс[4]аренів

Синтез халконовмісних калікс[4]аренів був здійснений у відділі хімії фосфоранів Інституту органічної хімії НАН України. В дослідженнях використано наступні сполуки:

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

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

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

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

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

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

Калікс[4]арени розчиняли в диметилформаміді (DMFA) та вносили аліквоту 10 мкл безпосередньо до середовища інкубації. Кінцева концентрація DMFA в середовищі 0,5 %. В контролі DMFA у зазначеній концентрації не чинив впливу на досліджувані параметри. В дослідах використовували халконові калікс[4]арени в концентрації 10 мкМ, за збільшення цієї величини стабільність розчинів порушувалась, спостерігалось їх помутніння. При вивченні впливу калікс[4]аренів на енергозалежну акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$ , мітохондрії були преінкубовані з досліджуваними сполуками 3 хв.

## 2.2. Метод спектрофлуориметрії

Реєстрацію відносних значень рівня власної флуоресценції NADH та FAD в матриці ізольованих мітохондрій міометрія здійснювали на спектрофлуориметрі Qanta Master 40 РТІ.

Дослідження проводили в середовищі наступного складу, мМ: 20 HEPES (рН 7,4, 37 °С), 2 K<sup>+</sup>-фосфатний буфер (рН 7,4, 37 °С), 5 піруват натрію, 120 KCl, 5 сукцинат натрію. Аліквота (100 мкл) мітохондрійної фракції містила 100 мкг білку.

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

Навантаження мітохондрій чутливим до активних форм кисню флуоресцентним зондом DCF-DA у концентрації 25 мкМ проводили у середовищі, яке містило 10 мМ HEPES (рН 7,4; 25 °С), 250 мМ цукрозу, 0,1 % бичачий сироватковий альбумін, 0,02 % Pluronic F-127 протягом 30 хв., при 25 °С.

Навантаження мітохондрій Ca<sup>2+</sup>-чутливим флуоресцентним зондом Fluo-4 у концентрації 2 мкМ проводили у середовищі, яке містило 10 мМ HEPES (рН 7,4, 37 °С), 250 мМ сахарози, 0,1%-й бичачий сироватковий альбумін, 0,02 % Pluronic F-127 протягом 30 хв., при 37°С.

Дослідження змін вмісту іонізованого кальцію в матриці ізольованих мітохондрій здійснювали на спектрофлуориметрі Qanta Master 40 РТІ. Процес акумуляції Ca<sup>2+</sup> відбувався у середовищі, складу (мМ): 20 HEPES (рН 7,4, 37°С), 250 цукрози, 2 K<sup>+</sup>-фосфатний буфер (рН 7,4, 37 °С), 3 MgCl<sub>2</sub>, 3 АТР, 5 сукцинату натрію. Концентрація Ca<sup>2+</sup> становила 80 мкМ.

У випадку дослідження  $\Delta$ рН-індукованого вивільнення іонів кальцію з МХ, попередню енергозалежну акумуляцію Ca<sup>2+</sup> проводили протягом 5 хв., після чого аліквоту суспензії розводили в середовищі вивільнення Ca<sup>2+</sup> (2 мл), із наступним складом, мМ: 20 HEPES (рН 6,5-7,5; 37 °С), 2 K<sup>+</sup>-фосфатний буфер (рН 6,5-7,5; 37 °С), 250 цукрози, 5 сукцинат натрію та 5 мкМ циклоспорину.

Навантаження мітохондрій зондом BCECF-AM у концентрації 5 мкМ проводили у середовищі, яке містило 10 мМ HEPES (pH 7,4), 250 мМ цукрозу, 0,1 % бичачий сироватковий альбумін та 0,02 % Pluronic F-127, протягом 20 хв., при температурі 25°C.

Зонд, який не акумулювався в матриксі, відмивали від мітохондрій шляхом переосадження при 12 тис. g., протягом 15 хв. Ресуспендували і зберігали мітохондрії у вищеописаному середовищі. Реєстрацію флуоресценції BCECF-AM ( $\lambda_{\text{зб}} = 510$  нм,  $\lambda_{\text{фл}} = 535$  нм) та Fluo-4 AM ( $\lambda_{\text{зб}} = 490$  нм,  $\lambda_{\text{фл}} = 520$  нм) в мітохондріях, здійснювали на спектрофлуориметрі Quanta Master 40 РТІ.

### 2.3. Метод протокової цитометрії

*Дослідження утворення активних форм кисню (АФК) в ізольованих мітохондріях.* Утворення активних форм кисню (зміни DCF-флуоресценції) в ізольованих мітохондріях вивчали із використанням методу протокової цитофлуориметрії на протоковому цитометрі.

Середовище інкубації мало склад, мМ: 20 HEPES (pH 7,4, 25 °C), 2 K<sup>+</sup>-фосфатний буфер (pH 7,4, 25 °C), 25 KCl, 25 NaCl.

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

*Дослідження NO-синтазної активності в ізольованих мітохондріях.* Навантаження мітохондрій NO-чутливим флуоресцентним зондом DAF-FM-DA у концентрації 5 мкМ проводили в середовищі яке містило 10 мМ HEPES (pH 7,4, 25 °C), 250 мМ цукрози, 0,1 % бичачий сироватковий альбумін, 0,02 % Pluronic F-127 протягом 30 хв., при температурі 25 °C.

Склад середовища при визначенні NO-синтазної активності складав (мМ): 20 HEPES (pH 7,4, 25 °C), 2 K<sup>+</sup>-фосфатний буфер (pH 7,4, 25 °C), 125 KCl, 25 NaCl, 5 пірувату, 5 сукцинату, 0,05 L-аргініну, 0,1 Ca<sup>2+</sup>, 0,01 NADPH, 0,01 тетрагідробіоптерин.

Вміст протеїну в мітохондрійній фракції складав 15-20 мкг. Реакцію ініціювали внесенням аліквоти 20 мкл L-аргініну з Ca<sup>2+</sup>. Час інкубації 30 хв.

Виміри проводили із застосуванням протокового цитометра COULTER EPICS ( $\lambda_{\text{зб}} = 488 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{\text{фл}} = 515 \text{ нм}$  (канал F11)).

Значення флуоресцентної відповіді наводили у відносних одиницях як  $(F - F_0)/F_0$ , де  $F_0$  – початковий рівень флуоресценції,  $F$  – флуоресцентний сигнал через 30 хв.

## 2.5. Обчислення кінетичних параметрів енергозалежного транспорту $\text{Ca}^{2+}$ в мітохондріях

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

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

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

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

де,  $F_0$  – початкова флуоресценція,  $F$  – флуоресценція за відповідні проміжки часу,  $F_{\text{max}}$  – стаціонарний рівень флуоресценції, який досягається з часом як наслідок входу певної кількості іонів кальцію в матрикс. Даний метод розрахунку ґрунтується на тому, що збільшення флуоресценції  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливого зонду Fluo-4, яким було навантажено мітохондрії, адекватно відображає зміни концентрації іонізованого кальцію в матриксі [6].

## 2.6. Статистичний аналіз

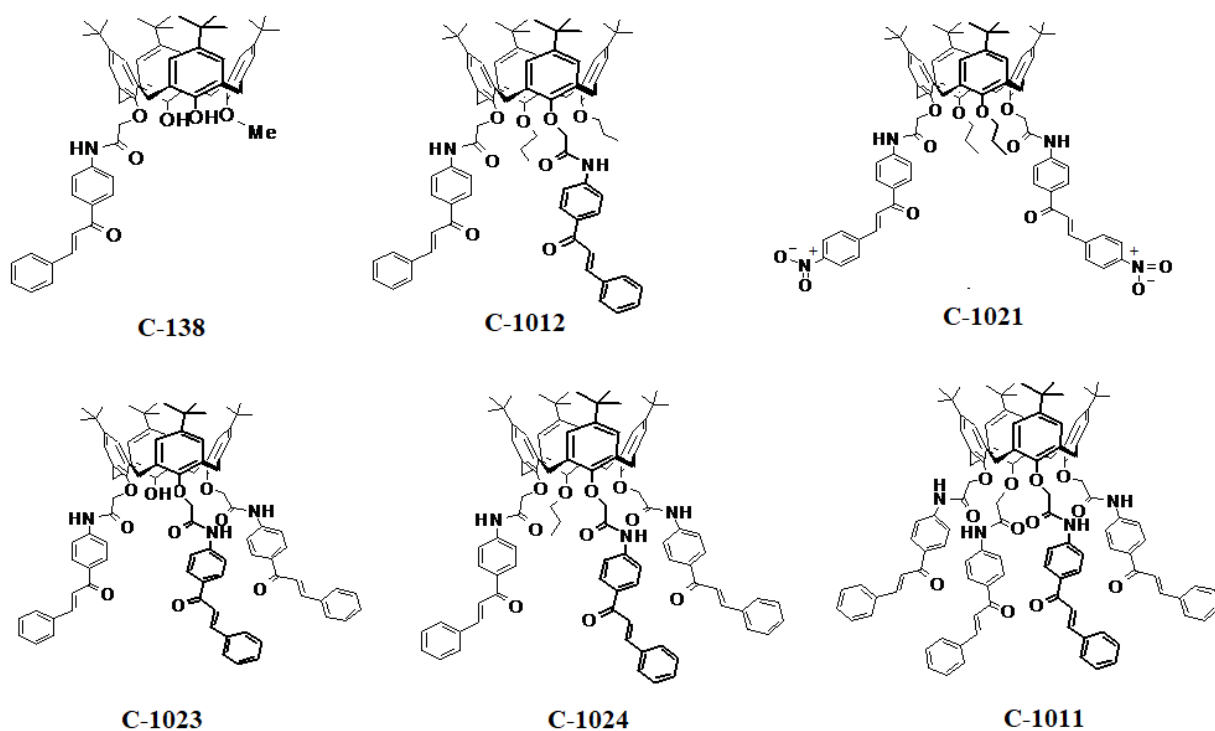
Здійснювали статистичну обробку результатів стандартним методом прийнятим для аналізу результатів біохімічних досліджень, використовуючи  $t$ -критерій Стьюдента [Прилуцький 2017]. За достовірні приймалися результати, в яких значення рівня значимості  $p < 0,05$ . Розрахунки проводили за допомогою стандартного програмного забезпечення MS Office Excell.

## РОЗДІЛ III

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1. Халконові калікс[4]арени як ефектори окиснення аденінових нуклеотидів в мітохондріях

Чистота препаратів халконовмісних калікс[4]аренів була підтверджена за допомогою інфрачервоної і ЯМР спектроскопії в Інституті органічної хімії НАН України. Структурні формули вибраних халконових калікс[4]аренів представлені на (рис. 1).



*Рис. 1. Структурні формули халконовмісних калікс[4]аренів*

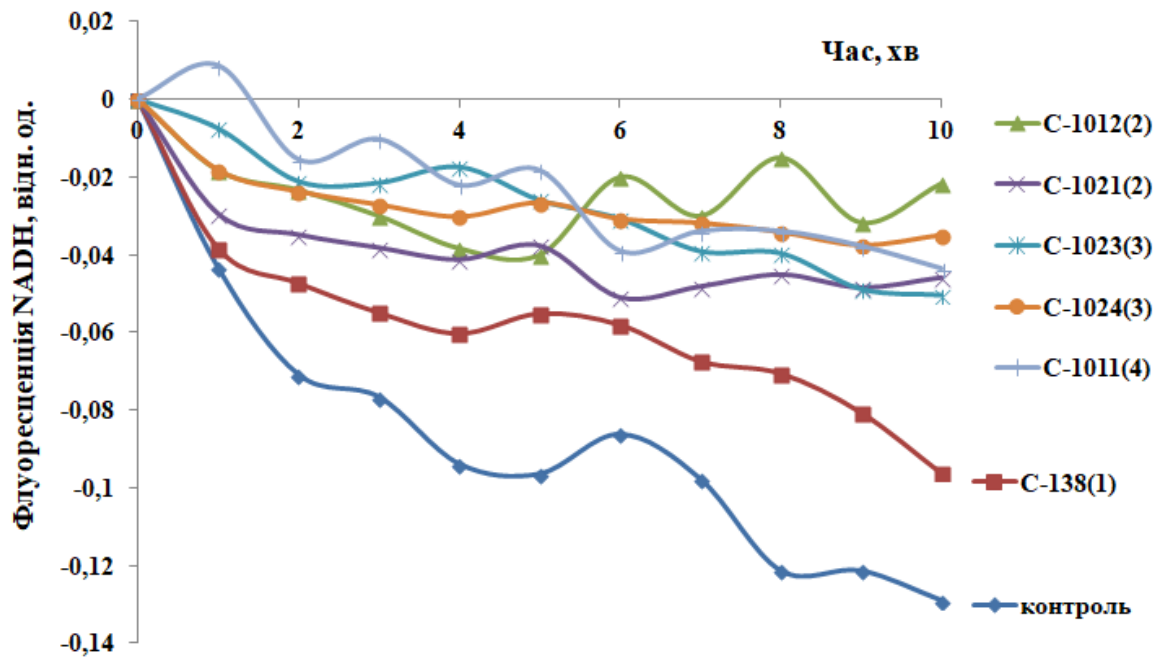
Досліджувані сполуки складаються з калікс[4]аренової чаші та різної кількості замісників по її нижньому вінцю – халконових хвостів. Кількість останніх варіює від однієї (сполука C-138) до двох (C-1012, C-1021), трьох (C-1023, C-1024) та чотирьох (C-1011). Розміри замісників однакові. Досліджувані калікс[4]арени відрізняються також природою хімічних груп у складі калікс[4]аренової чаші. Халконові хвости містять у своєму складі ароматичні

кільця, які надають досліджуваним сполукам високої гідрофобності, що збільшується зі збільшенням їхньої кількості. Халконові залишки С-1021 мають полярні групи.

Ефективність впливу халконовмісних калікс[4]аренів на біохімічні параметри ізольованих мітохондрій буде визначатися їхніми фізико-хімічними властивостями, зокрема кількістю та довжиною халконових хвостів, а також наявністю додаткових замісників як в хвостових частинах, так і в самій калікс[4]ареновій чаші. Інтенсивність біохімічних ефектів буде залежати від ефективності взаємодії передусім з внутрішньою мітохондрійною мембраною, яка в свою чергу, зумовлюється ступенем гідрофобності сполуки. Можна передбачити, що вища гідрофобність і нижча полярність калікс[4]арену зумовлять більш ефективну взаємодію з мембраною і інтенсивніший вплив на компоненти електронно-транспортного ланцюга та транспортні системи в ній локалізовані.

Використовуючи власну флуоресценцію коензимів NADH та FAD, можна проаналізувати функціональну активність електронно-транспортного ланцюга мітохондрій. В мітохондріях загалом спостерігається постійна концентрація даних нуклеотидів, тому зміна їхньої флуоресценції відображає саме окисно-відновний стан цих сполук, як результат активності відповідних комплексів дихального ланцюга.

Проведеними дослідженнями встановлено, що вибрані калікс[4]арени з різною інтенсивністю пригнічують окислення ендогенного NADH в мітохондріях, знижуючи флуоресцентну відповідь відновленої форми коензиму відносно контролю (рис. 2), що свідчить про гальмівний вплив на функціонування електронно-транспортного ланцюга, можливо, шляхом інгібування I дихального комплексу.



*Рис. 2. Вплив халконових калікс[4]аренів на інтенсивність окислення NADH в ізольованих мітохондріях.*

Цей ефект частково залежав від кількості халконових замісників: наявність лише одного, мала помірний вплив на флуоресценцію, тоді як їхнє зростання до двох-чотирьох супроводжувалось суттєвою гальмівною дією, що вже не залежала від кількості замісників. Можна припустити, що інтенсивність впливу на флуоресценцію NADH визначається не тільки кількістю халконових хвостів, а також наявністю додаткових функціональних груп в молекулах калікс[4]аренів. Зниження флуоресцентної відповіді ендogenous мітохондрійного FAD під впливом досліджуваних сполук відносно величини контрольного сигналу в наших дослідженнях свідчить про зменшення інтенсивності окислення цього нуклеотиду і, відповідно, гальмування роботи електронно-транспортного ланцюгу, вірогідно, шляхом пригнічення функціонування II дихального комплексу. Залежності ефекту від хімічної природи калікс[4]аренів в цих дослідженнях не виявлено (графічні дані не наведено).

Отже, вибрані калікс[4]арени з різною інтенсивністю гальмують окислення ендogenous NADH та FADH<sub>2</sub> в електронно-транспортному ланцюзі. Вплив на інтенсивність флуоресценції даних нуклеотидів визначається

кількістю халконових хвостів та наявністю додаткових функціональних груп в молекулах калікс[4]аренів. Так, сполука С-138(1), мала помірний вплив на флуоресценцію відносно контролю, а сполуки С-1012(2), С-1021(2), С-1023(3), С-1024(3) та С-1011(4) суттєво гальмували флуоресценцію.

### **3.2. Вплив халконових калікс[4]аренів на утворення активних форм кисню мітохондріями**

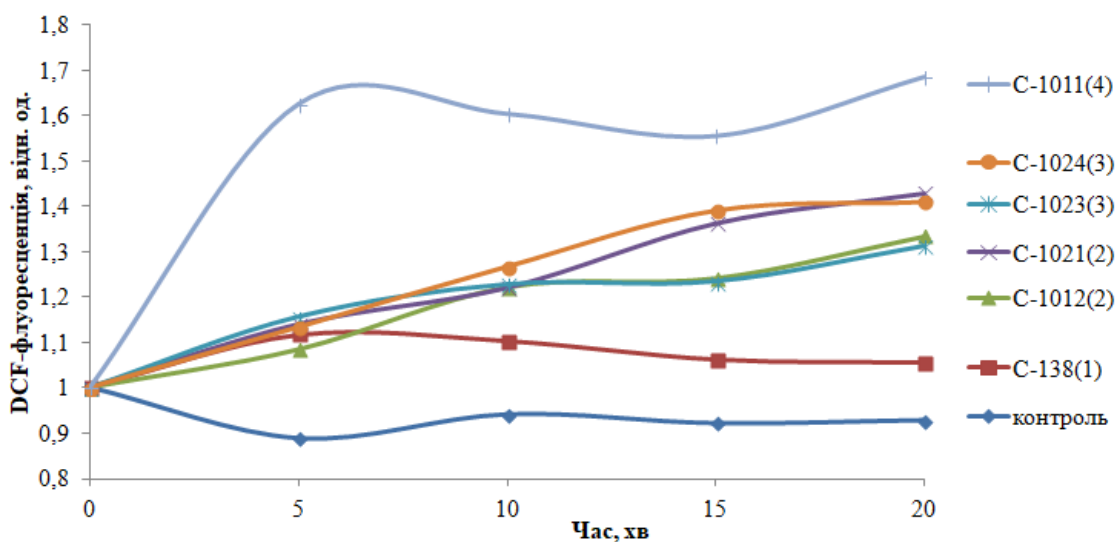
У клітинах, в результаті окисно-відновних реакцій, постійно проходить генерація активних форм кисню. До них належать продукти неповного відновлення атомарного кисню, вільні радикали, а також пероксид водню, синглетний кисень, гіпохлорит, пероксинітрит та озон. [10]

При окисному фосфорилуванні мітохондрійною цитохромоксидазою, яка каталізує 4-х електронне відновлення кисню до води, у клітинах використовується близько 95–98 % кисню. Далі, внаслідок чотирьох етапного одноелектронного відновлення, виникають проміжні продукти радикальної природи. [10] У мітохондрійному дихальному ланцюгу, можливе неповне відновлення кисню: якщо приєднується один електрон, то утворюється супероксидний радикал, а якщо двох – пероксид водню.

За фізіологічних умов АФК в дихальному ланцюзі мітохондрій утворюються в невеликій кількості. В мітохондріях швидкість утворення супероксид-аніону прямо пропорційна ступеню спряженості дихального ланцюга. Однак не всі дихальні комплекси мітохондрій продукують однакову кількість АФК. Найбільша кількість супероксид-аніону та пероксид-аніону генеруються комплексом I і комплексом III дихального ланцюга мітохондрій, а також при ферментативному відновленні кисню у реакціях, які каталізують NADH-цитохром-с-редуктаза та NADPH-цитохром-с-редуктаза. [3]

Також досить важливо підтримувати сталу кількість АФК, оскільки надмірна їхня кількість може спричинити патологічні зміни та призвести до загибелі клітини. [3]

Зростання DCF-флуоресценції за дії вибраних калікс[4]аренів відносно контрольних значень, свідчить про посилення генерації активних форм кисню, як наслідок інгібування окремих комплексів дихального ланцюга мітохондрій (рис. 3).



*Рис. 3. Вплив халконових калікс[4]аренів на утворення активних форм кисню в ізольованих мітохондріях.*

Інтенсивність цього ефекту корелювала з кількістю халконових замісників в досліджуваних сполуках. Спостерігалась тенденція до зростання флуоресцентної відповіді зі збільшенням кількості гідрофобних хвостів. Втім наявність додаткових хімічних груп різної полярності приводила до того, що ефекти калікс[4]аренів з двома та трьома халконовими залишками на DCF-флуоресценцію були майже подібними.

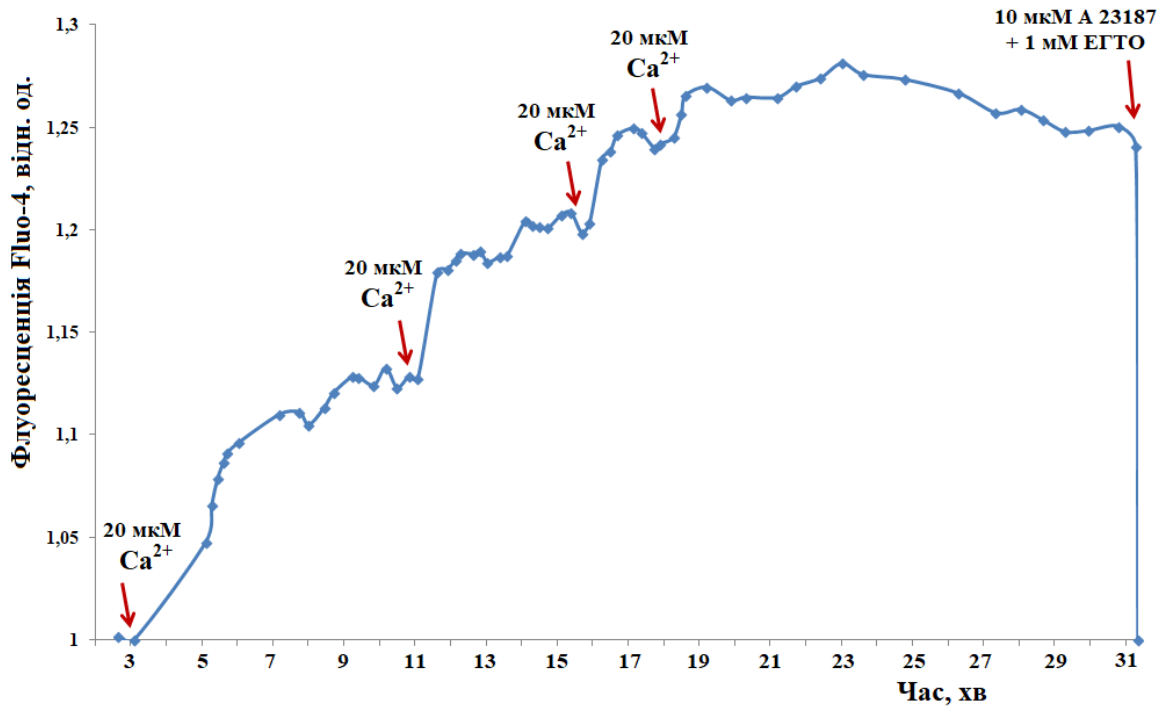
Отже, за дії вибраних калікс[4]аренів спостерігається посилення генерації активних форм кисню в ізольованих мітохондріях. Інтенсивність утворення АФК залежить від кількості халконових замісників в досліджуваних сполуках. Найбільша інтенсивність спостерігається в сполучі С-1011 (має чотири гідрофобних хвостів), найменша – в С-138 (має один гідрофобний хвіст).

### 3.3. Дія халконових калікс[4]аренів на концентрацію іонів кальцію в матриксі мітохондрій

Функціонування електронно-транспортного ланцюга лежить в основі біоенергетики мітохондрій, а створений внаслідок його роботи електрохімічний градієнт протонів та негативний потенціал на внутрішній мітохондрійній мембрані є основними факторами контролю локалізованих в ній транспортних систем. Одним з головних регуляторів активності електронно-транспортного ланцюга та метаболізму мітохондрій в цілому є концентрація іонів Ca в матриксі, яка підтримується на оптимальному рівні завдяки роботі  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортних систем. В мітохондріях міометрія у внутрішній мембрані локалізовані принаймні дві таких системи, а саме енергозалежної акумуляції іонів Ca ( $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортер) та  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  - обмінник. Ізольовані мітохондрії мають змогу акумулювати  $\text{Ca}^{2+}$  за присутності сукцинату та АТФ з позамітохондрійного середовища, про що свідчить зростання акумуляції катіону.

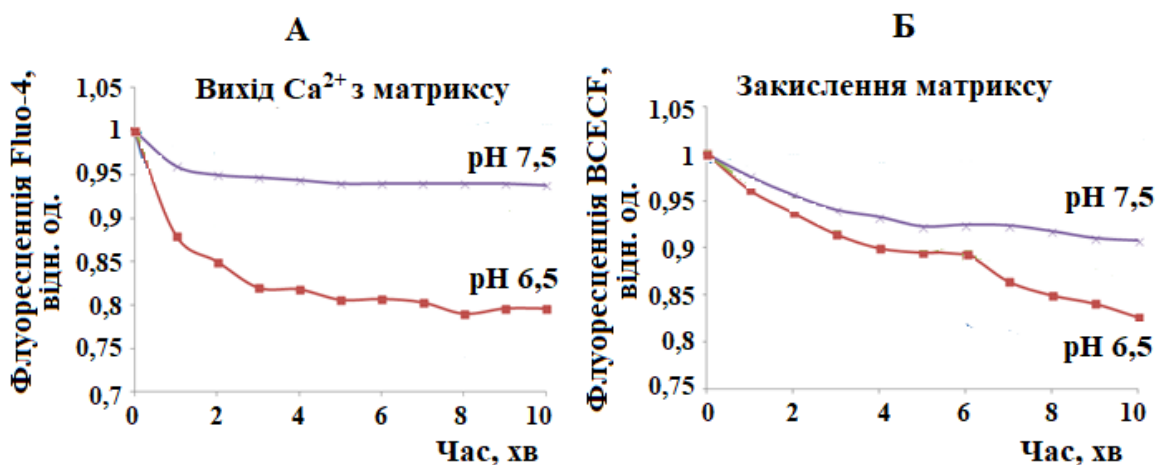
Зміни інтенсивності флуоресцентної відповіді  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливого зонду Fluo-4 відображають здатність енергізованих мітохондрій міометрію накопичувати та ефективно утримувати іони кальцію (рис. 4).

Додавання зростаючих концентрацій цього катіону приводить до збільшення флуоресцентного сигналу з послідуєчим виходом на платовий рівень, зі зростанням концентрацій катіону інтенсивність відповіді знижується через обмежену  $\text{Ca}^{2+}$ -ємність. Додавання  $\text{Ca}^{2+}$ -іонофора А-23187 (10 мкМ), а отже збільшення неспецифічної проникності мітохондрійної мембрани, має наслідком швидке вивільнення акумульованого  $\text{Ca}^{2+}$  в середовище з  $\text{Ca}^{2+}$ -хелатором ЕГТО (1 мМ). Поряд з цим в мітохондріях реєструється активність  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  - обмінника.



**Рис. 4.** Оцінка енергозалежної акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  в ізольованих мітохондріях за змінами інтенсивності флуоресценції Fluo-4.

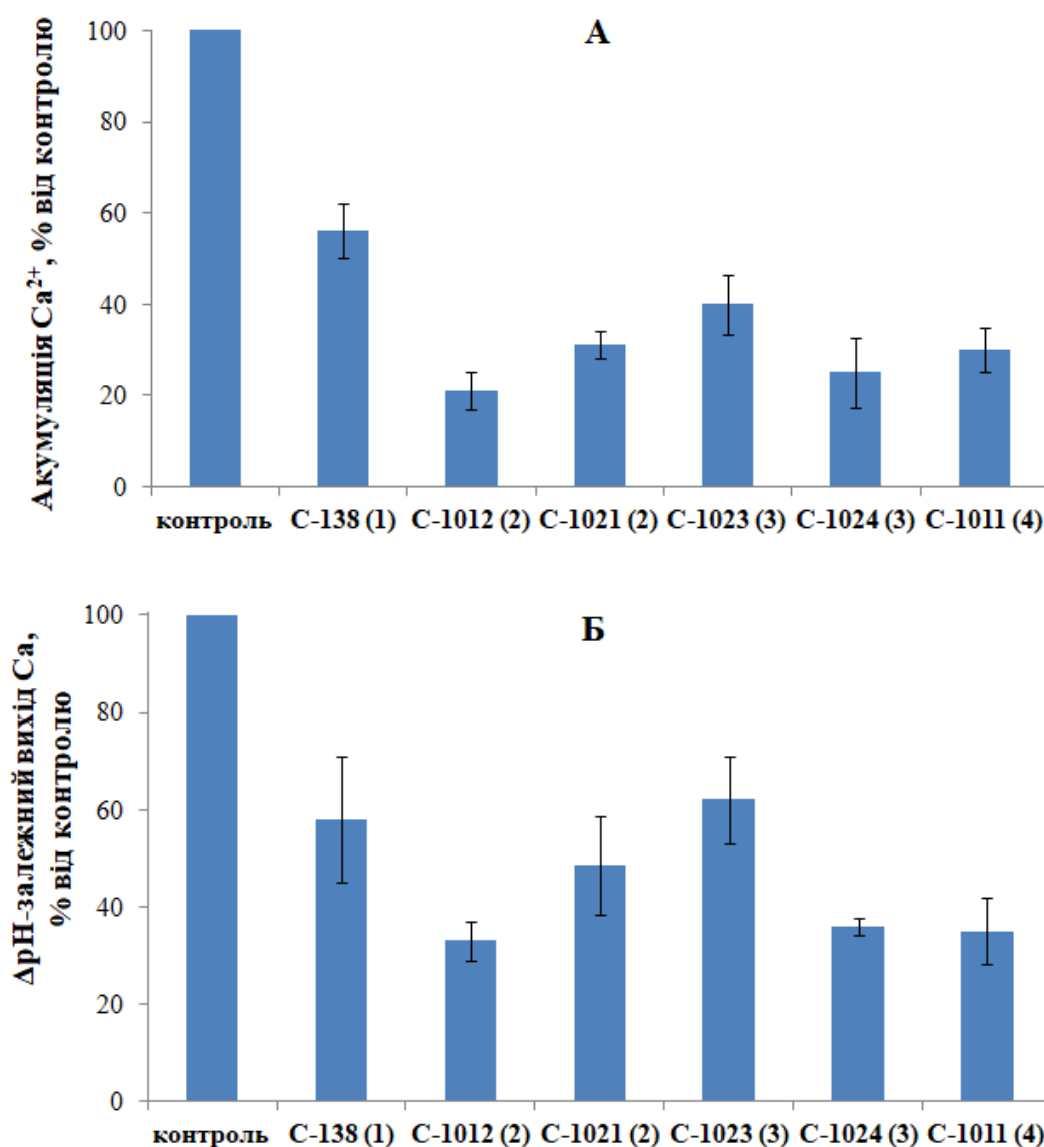
Мітохондрії мали змогу вивільняти попередньо акумульований в енергозалежному процесі  $\text{Ca}^{2+}$  за умови закислення позамітохондрійного середовища (рис. 5, А), згідно даних по зниженню флуоресценції Fluo-4 при зміні рН від 7,5 до 6,5 ( $\Delta\text{pH}$ -залежне вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$ ).



**Рис. 5.** Одночасні зміни концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  (А) та  $\text{H}^+$  (Б) в матриксі мітохондрій за умови функціонування  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника.

Паралельно відбувається також закислення матриксу, про що свідчить зниження флуоресценції рН-чутливого зонду BCECF, яким було навантажено мітохондрії (рис. 5, Б).

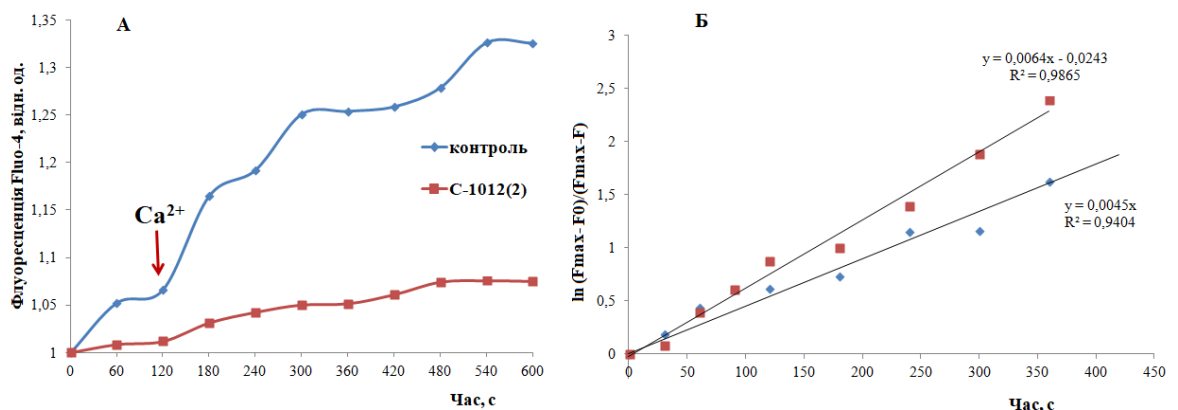
Вибрані халконові калікс[4]арени якісно подібно пригнічували енергозалежну акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  (рис. 6, А) та  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  - обмінника (рис. 6, Б) в мітохондріях. При зростанні кількості халконових замісників від одного до двох ефективність інгібіторного впливу суттєво зростала.



**Рис. 6.** Вплив халконових калікс[4]аренів на обмін  $\text{Ca}^{2+}$  в ізолюваних мітохондріях. Енергозалежна акумуляція (А),  $\Delta\text{pH}$ -залежний вихід  $\text{Ca}^{2+}$  (Б). За 100 % прийнято зміни флуоресцентного сигналу від Fluo-4 за відсутності калікс[4]аренів.  $M \pm m$ ,  $n=4$ .

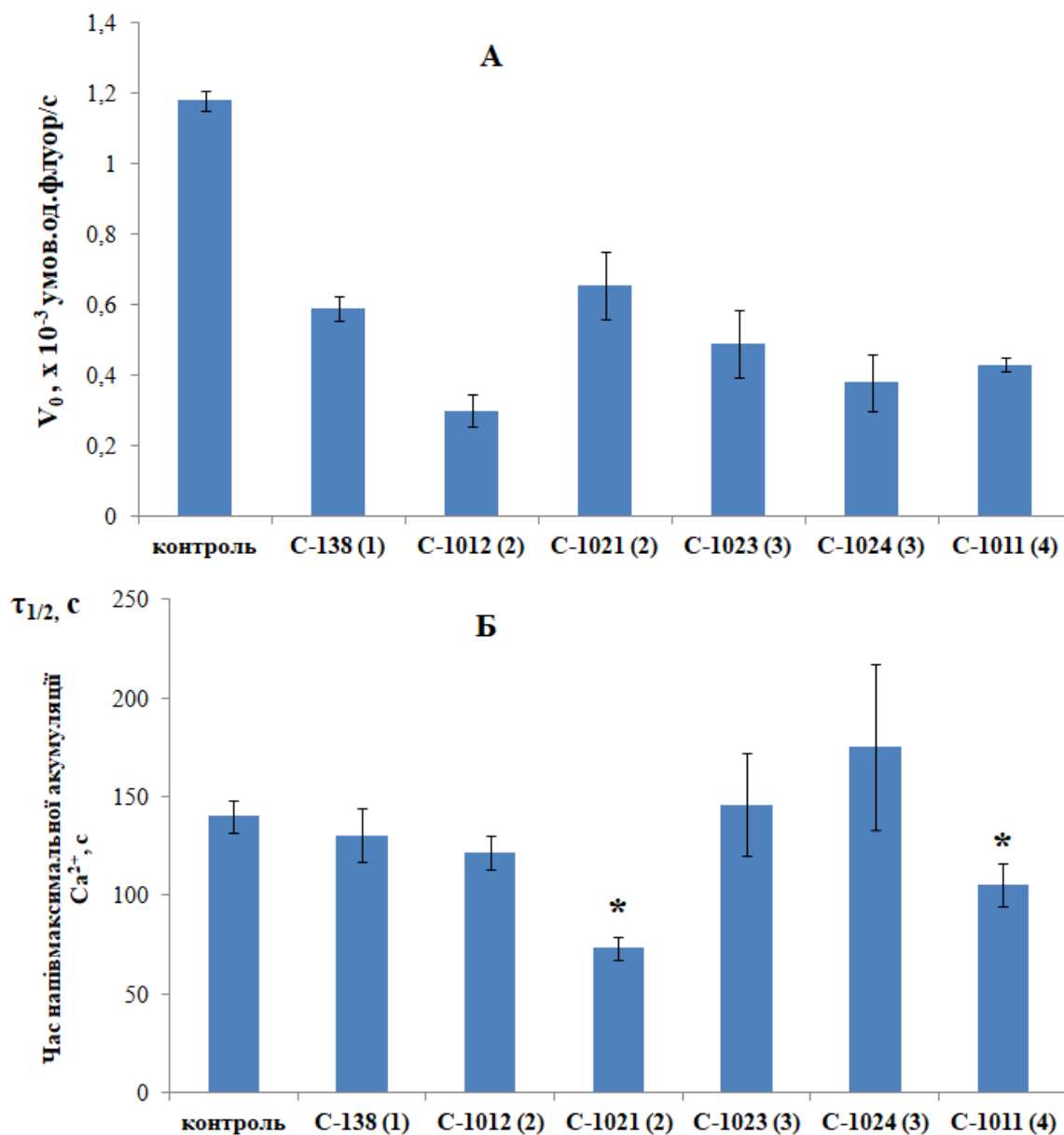
Втім наявність полярних груп ( $-\text{NO}_2$ ) в халконових хвостах у сполуки С-1021 мало наслідком послаблення взаємодії з внутрішньою мітохондрійною мембраною і відповідне зниження ефективності впливу відносно сполуки С-1012, яка не містить полярних замісників, за умови однокрової кількості халконових залишків (двох). Подальше зростання кількості замісників по нижньому вінцю калікс[4]аренової чаші вже не мало суттєвого впливу на інгібувальну здатність. Порівняння гальмівної дії калікс[4]аренів з трьома халконовими залишками (С-1023 та С-1024) свідчить про залежність ефективності впливу від природи замісників в самій чаші. Сполука С-1023, яка включає в себе полярну спиртову групу, поступається за ефективністю інгібувального впливу сполуці С-1024, яка має менш полярні замісники.

Аналіз змін флуоресцентної відповіді Fluo-4 з часом, яка відображає динаміку енергозалежної акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$ , свідчить про досягнення рівноважного стану транспортного процесу з виходом досліджуваної кривої на плато (рис. 7, А). Це дозволяє використати відповідні координати (рис. 7, Б) для розрахунків основних кінетичних параметрів транспортного процесу: початкової швидкості акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  ( $V_0$ ) та часу напівмаксимальної акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  (характеристичний час,  $\tau_{1/2}$ ).



**Рис. 7.** Енергозалежна акумуляція  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями в контролі та у присутності калікс[4]арена С-1012. Стрілочкою вказано момент внесення 80 мкМ  $\text{Ca}^{2+}$  до мітохондрій (А). Лінеаризація одержаних даних для розрахунку основних кінетичних параметрів транспортного процесу (Б).

Аналіз змін параметра  $V_0$  за дії калікс[4]аренів (рис. 8, А) показав її відповідність залежності інгібувального впливу від кількості халконових замісників та природи функціональних груп (рис. 6, А).



**Рис. 8.** Зміни основних кінетичних параметрів енергозалежної акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями в контролі та у присутності халконових калікс[4]аренів,  $M \pm m$ ,  $n=4$ . А - початкова швидкість  $V_0$  транспортного процесу; всі зміни достовірні відносно контролю,  $P < 0,05$ . Б - характеристичний час транспортного процесу  $\tau_{1/2}$ ; \* - зміни достовірні відносно контролю,  $P < 0,05$ .

Водночас достовірне зниження характеристичного часу акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями (рис. 8, Б) мало місце лише за дії калікс[4]аренів С-1021 (два халконові замісники) та С-1011 (чотири халконові замісники).

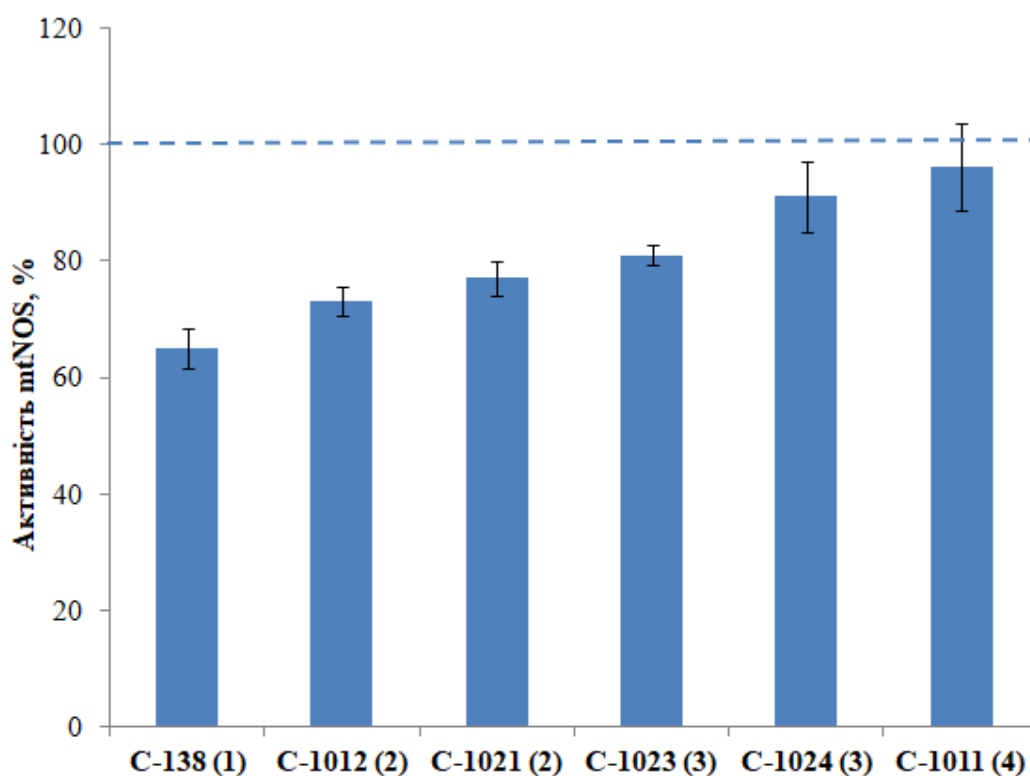
Зменшення досліджуваного параметру може свідчити про те, що на фоні інгібування енергозалежної акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  вибраними сполуками має місце зростання проникності внутрішньої мітохондрійної мембрани до катіону. Сполука С-1011 є найбільш гідрофобною з досліджуваних, ефективно взаємодіючи з ліпідними компонентами мембрани вона здатна чинити суттєвий вплив на її проникність до  $\text{Ca}^{2+}$ . Хоча полярність С-1021 повинна заважати взаємодії з внутрішньою мітохондрійною мембраною, не виключеним поясненням зниження  $\tau_{1/2}$  в цьому випадку може бути безпосередня взаємодія з  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортними протеїнами.

Отже, досліджувані халконові калікс[4]арени якісно подібно пригнічують енергозалежну акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  - обмінник  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях. Сполуки С-1012 (2) та С-138(1) ефективно інгібують транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  у внутрішній мембрані мітохондрій. Відносно сполуки С-1012 (2), сполука С-1021(2) має менший інгібіторний вплив, оскільки містить полярні замісники. Зростання кількості халконових замісників від трьох до чотирьох не має суттєвого впливу на інгібувальну здатність, однак вона залежить від природи замісників в самій чаші. Так, сполука С-1024 має менш полярні замісники ніж сполука С-1023, тому ефективніше інгібує транспорт  $\text{Ca}^{2+}$ . Зниження характеристичного часу акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями мало місце за дії лише сполуки С-1021 та С-1011.

### **3.4. Ефект халконових калікс[4]аренів на утворення оксиду азоту мітохондріями**

NO регулює основні функції мітохондрій, включаючи споживання кисню, окисне фосфорилування,  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаз тощо. В окремих тканинах також демонструють наявність мітохондрійної NO-синтази; хоча її локалізація дискутується, припускають зв'язок з внутрішньою мембраною. Синтез оксиду

азоту в мітохондріях активується  $\text{Ca}^{2+}$  та залежить від ступеня їхньої енергізації. В цій роботі ми дослідили дію халконових калікс[4]аренів на NO-синтазну активність в ізольованих мітохондріях за раніше встановлених оптимальних умов протікання реакції. Виявлено, що вибрані калікс[4]арени пригнічують в середньому на 10-35 % утворення оксиду азоту мітохондріями (рис. 9).



*Рис. 9. Вплив халконових калікс[4]аренів на активність мітохондрійної NO-синтази.  $M \pm m$ ,  $n=4-6$ .*

Причому зі зростанням кількості халконових хвостів у досліджуваних сполуках ступінь інгібування знижується. Таким чином, досліджуваний показник обернено пропорційний гідрофобності халконів. Вочевидь, інгібувальний ефект безпосередньо не пов'язаний ні з впливом калікс[4]аренів на електронно-транспортний ланцюг, ні з їхньою дією на  $\text{Ca}^{2+}$ -транспорт у внутрішній мітохондрійній мембрані. Скоріше за все, він асоційований з певною функціонально-важливою частиною мітохондрійної NO-синтази, що експонована у міжмембранний простір, а не з взаємодією із ліпідною компонентою внутрішньої мембрани. Отже, одержані результати непрямо

свідчать, що по відношенню до внутрішньої мітохондрійної мембрани NO-синтаза може бути інтегральним ензимом.

Отже, вибрані калікс[4]арени пригнічують в середньому на 10-35 % утворення оксиду азоту мітохондріями. Вплив халконових калікс[4]аренів на активність мітохондрійної NO-синтази обернено пропорційний гідрофобності халконів, тому при зростанні кількості халконових хвостів у досліджуваних сполуках ступінь інгібування знижується.

## ВИСНОВКИ

1. Халконові калікс[4]арени гальмують окислення NADH та FADH<sub>2</sub> в електронно-транспортному ланцюзі та суттєво посилюють генерацію активних форм кисню в мітохондріях.

2. Досліджувані калікс[4]арени інгібують транспорт Ca<sup>2+</sup> у внутрішній мітохондрійній мембрані.

3. Синтез оксиду азоту мітохондріями пригнічується халконовими калікс[4]аренами.

4. Зазначені ефекти залежали, в першу чергу, від природи та кількості халконових замісників на нижньому вінці калікс[4]аренової чаші, а також від природи інших замісників в молекулі.

Роботу виконано за фінансової підтримки грантів НАН України: «Розробка нових нанорозмірних каліксаренових ефекторів АТР-залежних ензиматичних та катіон-транспортуючих систем» №0118U006093, «Застосування каліксаренів як ефекторів енергозалежних Ca<sup>2+</sup>-транспортних систем з метою спрямованої модуляції процесів електро- та фармакомеханічного спряження в гладеньких м'язах» №0120U000183.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Andrew P. J., Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovascular Research*. 1999. Vol. 43. P. 521–531.
2. Babich L. G. Calix[4]arenes C-136 and C-137 Hyperpolarize Myometrium Mitochondria Membranes. *Journal of Bioorg. Chem.* 2013. V. 39. №. 6. P. 649-655.
3. Bose A., Beal M. F. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 2016. P. 216-231.
4. Bringold U., Ghafourifar P., Richter C. Peroxynitrite formed by mitochondrial NO synthase promotes mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  release. *Free Radic. Biol. Med.* 2000. Vol. 29. P. 343-348.
5. Csordás G., Várnai P., Golenár T., Sheu S. S., Hajnóczky G. Calcium transport across the inner mitochondrial membrane: molecular mechanisms and pharmacology. *Mol Cell Endocrinol.* 2012. Vol. 353. № 2. P. 109-113.
6. Danylovyh G. V. Calix[4]arene C-956 is effective inhibitor of  $\text{H}^{(+)}\text{-Ca}^{(2+)}$ -exchanger in smooth muscle mitochondria. *Ukr.Biochem.J.* 2018. Vol. 90. № 1. P. 25-33.
7. Davidsona Sean M., Duchen Michael R. Effects of NO on mitochondrial function in cardiomyocytes: Pathophysiological relevance. *Cardiovascular Research*. 2006. Vol. 71. № 1. P. 10-21.
8. De Stefani D., Patron M., Rizzuto R. Structure and function of the Mitochondrial Calcium Uniporter complex. *Biochim Biophys Acta.* 2015. Vol. 1853. № 9. P. 2006-2011.
9. Dedkova E.N., Blatter L.A. Modulation of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  by nitric oxide in cultured bovine vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2005. Vol. 289. P. 836–C845.
10. Fiers W., Beyaert R., Declercq W., Vandenabeele P. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene.* 1999. № 18. P. 7719—7730.

11. Förstermann U., Sessa W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012. Vol. 33 № 7. P. 829–837.
12. Fruehauf J. P., Meyskens L. F. Reactive Oxygen Species: A Breath of Life or Death? *Clin. Cancer Res*. 2007. Vol. 13, № 1. P. 789–794.
13. Ghafourifar P., Richter Ch. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Letters*. 1997. Vol. 418. P. 291-296.
14. Graier W. F, Frieden M, Malli R.. Mitochondria and  $\text{Ca}^{2+}$  signaling: old quests, new functions. *Eur J Physiol*. 2007. Vol. 455. № 3. P. 375-396.
15. Gunter T. E., Pfeiffer D. R. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol*. 1990. Vol. 258. № 5. P. 755-786.
16. Gutsche C. D. Calixarenes: An Introduction Monographs in Supramolecular Chemistry 2 edition. *Cambridge: Royal Society of Chemistry*. 2008. P.153.
17. Hoppe U. C. Mitochondrial calcium channels. *FEBS Lett*. 2010. № 10. P. 1975-1981.
18. Hudson G. The ageing brain, mitochondria and neurodegeneration. Mitochondria dysfunction in neurodegenerative disorders. Springer Int Publishing. 2016. № 5. P. 59-80.
19. Kosterin S. O. Transport of calcium in the smooth muscles. Kiev: Nauk. Dumka. 1990. [Russian].
20. Kostyuk P. G., Kostyuk O. P., Lukyanets E. A. Intracellular calcium signaling: structures and functions. Kiev: Nauk. Dumka. 2010. [Ukrainian].
21. Llorente-Folch I., Rueda C. B., Pardo B., Szabadkai G., Duchen M. R., Satrustegui J. The regulation of neuronal mitochondrial metabolism by calcium. *J Physiol*. 2015. Vol. 593. №16. C. 3447-3462.
22. Malli R., Graier W. F., Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  channels: Great unknowns with important functions. *FEBS Lett*. 2010. Vol. 584. № 10. P. 1942-1970.
23. Nimse S. B. Biological applications of functionalized calixarenes. *Chem. Soc. Rev*. 2013. Vol. 42. № 1. P. 366-386.
24. Palty R., Hershinkel M., Sekler I. Molecular Identity and Functional Properties of the Mitochondrial  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  Ex-changer. *J Biol Chem*. 2012. № 38. P. 50-67.

25. Pan S., Ryu S. Y., Sheu S. S. Distinctive characteristics and functions of multiple mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  influx mechanisms. *Sci China Life Sci.* 2011. Vol. 54. № 8. P. 763-769.
26. Picard M., McManus M. J. Mitochondrial signaling and neurodegeneration. Mitochondria dysfunction in neurodegenerative disorders. *Springer Int Publishing.* 2016. P. 107-137.
27. Rizzuto R., Marchi S., Bonora M., Aguiary P., Bononi A.  $\text{Ca}^{2+}$  transfer from the ER to mitochondria: When, how and why. *Biochim Biophys Acta.* 2009. № 11. P. 1342-1351.
28. Rodik R.V., Boyko V. I., Kalchenko V. I. Calixarenes in bio-medical researches. *Curr. Med. Chem.* 2009. Vol.16. №13. P. 1630–1655.
29. Roger C. Y. Myocytes, Myometrium, and Uterine Contractions. New York Academy of Sciences. 2007. № 1101. C. 72-84.
30. Santo-Domingo J., Wiederkehr A., De Marchi U. Modulation of the matrix redox signaling by mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$ . *World J Biol Chem.* 2015. № 6. P. 10-323.
31. The cytosolic subunit p67phox contains an NADPH-binding site that participates in catalysis by the leukocyte NADPH oxidase. Smith R. M., Connor J. A., Chen L. M. et al. ; *J. Clin. Invest.* 1996. Vol. 98. № 4. P. 77-983.
32. Tsai M. F., Jiang D., Zhao L., Clapham D., Miller C. Functional reconstitution of the mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  antiporter Letm1. *J Gen Physiol.* 2014.. 143. № 1. P. 67-73.
33. Vinogradov A. D. Energy transduction in mitochondria. *Soros Educ J.* 1999. № 9. P. 11-19.
34. Xiong D., Li H. Colorimetric detection of pesticides based on calixarene modified silver nanoparticles in water. *Nanotechnology.* 2008. Vol. 19. № 46. P. 465-502.
35. Антоняк Г. Л., Бабич Н. О., Сологуб Л. І. Утворення активних форм кисню та система антиоксидантного захисту в організмі тварин. *Біологія тварин.* 2000. Т. 2. № 2. С. 34–43. 34
36. Атамась Л. І. Супрамолекулярна хімія каліксаренів. *Журнал органічної та фармацевтичної хімії.* 2009. Вип. 2. № 26. С. 28-36.

- 37.Бабич Л. Г., Шлыков С. Г., Борисова Л. А. Энергозависимый транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  во внутриклеточных структурах гладкой мышцы *Биохимия*. 1994. Вып. 69. №8. С. 1218-1229.
- 38.Бабич Л. Г., Шлыков С. Г., Кандаурова Н. В., Костерин С. А. Трансмембранный обмен  $\text{Ca}^{2+}$  в деполяризованных митохондриях миомерия крыс. *Український біохімічний журнал*. 2011. Т. 83. № 6. С. 56-62.
- 39.Бабський А., Іккерт О., Манько В. Основи біоенергетики. Львів, 2017. 312 с.
- 40.Бережников Н. В. Апоптоз – управляемая смерть клетки. *Арх. анат. гистол. эмбриол.* 1990. Т. 99. № 12. С. 68-75.
- 41.Боровкова Н. В., Дамиров М. М., Олейникова О.Н. Апоптоз клеток эндометрия в норме и при пролиферативных заболеваниях матки. *Журнал им. Н.В. Склифосовского Неотложная медицинская помощь*. 2016. № 2. С. 48-53.
- 42.Векліч Т. О. Кінетичні закономірності дії калікс[4]арену С-90 на  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРазну активність плазматичної мембрани та на концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  в незбуджених клітинах міометрія. *Український біохімічний журнал*. 2013. Т. 85. № 4. С. 20-29.
- 43.Гривенникова В. Г., Виноградов А. Д. Генерация Активных Форм Кислорода Митохондриями. *Успехи биологической химии*. 2013. Вып. 53. С. 245-296.
- 44.Данилович Г. В. Зміни поляризації плазматичної та внутрішньої мітохондріальної мембран клітин міометрія за дії каліксаренів – інгібіторів  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТР-ази плазматичної мембрани. *Український біохімічний журнал*. 2012. Т. 84, № 6. С. 37-48.
- 45.Данилович Г. В., Богач Т. В., Данилович Ю.В. Біосинтез оксиду азоту в клітинах з L-аргініну. Особливості утворення та функціональна роль NO в мітохондріях. *Український біохімічний журнал*. 2018. Вип. 90. №1. С. 3-24.
- 46.Данилович Ю. В. Оксид азоту як регулятор внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу в міоцитах матки. *Український біохімічний журнал*. 2012. Т. 84. № 3. С. 5-25.

47. Данилович Ю. В. Характеристики пасивного виходу  $\text{Ca}^{2+}$  з саркоплазматичного ретикулула клітин міометрія щурів. *Фізіологічний журнал*. 2007. Т. 53. № 1. С. 55-61.
48. Данилович Ю. В., Данилович Г. В., Коломієць О. В., Родік Р. В., Кальченко В. І., Костерін С. О. Дія калікс[4]аренів на транспорт  $\text{Ca}^{2+}$ , електричний потенціал та активність електрон-транспортного ланцюга в мітохондріях гладенького м'язу. *Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології*. 2017. Т. 15. № 2. С. 365-371.
49. Данилович Ю. В., Данилович Г. В. Активні форми азоту і кисню в біохімічних процесах транспорту іонів кальцію та поляризації субклітинних структур гладенького м'язу. Київ : Наукова думка, 2019. 236 с.
50. Данилович Ю. В., Коломієць О. В., Данилович Г. В., Костерін С. О. Оксид азоту як один із регуляторів енергозалежного транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях міометрія. *Фізіологічний журнал*. 2014. Т. 60. № 2. С. 12-17.
51. Заводник И. Б. Митохондрии, кальциевый гомеостаз и кальциевая сигнализация. *Биомедицинская химия*. 2016. Т. 62. № 3. С. 311-317.
52. Зенков Н. К., Меншикова Е. Б. Активированные кислородные метаболиты в биологических системах. *Усп. совр. биол.* 1993. Т. 113. № 3. С. 286–296.
53. Калейнікова О. М., Блашків Т. В., Янчій О. Р., Вознесенська Т. Ю. Скоротлива активність міометрію миші в умовах зміни функціонального стану мітохондрій. *Український медичний альманах*. 2013. Т. 16. № 1. С. 186-188.
54. Каліксарени як модулятори АТР-гідролазних систем гладеньком'язових клітин / Костерін С. О., Кальченко В. І., Векліч Т. О., Бабіч Л. Г., Шликов С. Г. Київ : Наукова думка, 2019. 219 с.
55. Карбышев М.С., Абдуллаев Ш.П. Биохимия оксидативного стресса. Москва, 2018. 60 с.
56. Колісник М. І., Колісник Г. В., Нідзюлка Є., Влізло В. В. Активні форми кисню та їх роль у метаболізмі клітин. *Біологія тварин*. 2009. Вип. 11. № 2. С. 59-70.

57. Коломієць О. В., Данилович Ю. В., Данилович Г. В., Костерін С. О.  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -обмін у мітохондріях міометрія. *Ukr. Biochem. J.* 2014. Vol. 86. № 3. С. 41-48.
58. Коломієць О. В., Данилович Ю. В., Данилович Г. В., Костерін С. О. Шляхи та механізми трансмембранного обміну  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях. *Фізіологічний журнал.* 2017. Вип. 63. № 4. С. 87-104.
59. Кулинский В. И. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул : польза, вред, защита. *Сорос. обр. журн.* 1997. № 1. С. 2–7.
60. Лукьянова Л. Д. Сигнальная роль митохондрий при адаптации к гипоксии. *Фізіологічний журнал.* 2013. Т. 59. № 6. С. 141-154.
61. Лычковская Е. В., Труфанова Л. В., Белова О. А., Семенчуков А. А., Герцог Г. Е. Роль митохондрий в регуляции кальциевой сигнализации лимфоцитов. *Сибирское медицинское обозрение.* 2016. Т. 1. № 5. С. 5-14.
62. Манских В. Н. Пути гибели клетки и их биологическое значение. *Цитология.* 2007. Т. 49. № 11. С. 909-915.
63. Маньковська І. М., Гончар О. О., Носар В. І. та ін. Мітохондріальна дисфункція та оксидативні порушення у мозку щурів при моделюванні паркінсоноподібного синдрому: коригувальна дія капікору. *Фізіологічний журнал.* 2018. Т. 64. № 4. С. 82-90.
64. Мельничук С. Д., Хижняк С. В., Морозова В. С. та ін.. Енергетична функція мітохондрій кардіоміоцитів щурів за штучного гіпобіозу. *Фізіологічний журнал.* 2015. Т. 61. № 2. С. 15-22.
65. Мушкамбаров Н. Н., Кузнецов С. Л. Молекулярная биология. Москва : Мед. информ. агенство. 544 с.
66. Новиков В. Е., Левченкова О. С., Пожилова Е. В. Митохондриальная синтаза оксида азота и ее роль в механизмах адаптации клетки к гипоксии. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии.* 2016. Вип. 14. № 2. С. 38-46.
67. Огурцов А. Н. Молекулярная биоэнергетика клетки. Харьков : Харьков НТУ, 2009. 57 с.
68. Родік Р. В. Застосування каліксаренів для трансфекції ДНК у клітини. *Український біохімічний журнал.* 2012. Т. 84. № 5. С. 5-15.

69. Сибірна Н. О., Люта М. Я., Климишин Н. І. Молекулярні механізми депонування оксиду азоту в еритроцитах. *Біологічні Студії*. 2010. Т. 4. № 1. С. 143-160.
70. Стив Дж. В., Этвуд Дж. Л. Супрамолекулярная химия. Москва: ИКЦ «Академкнига», 2007. Т. 1. 480 с.
71. Ушакова Г. А., Петрич Л. Н. Современные представления о механизмах развития родовой деятельности. *Обзоры научной литературы*. 2016. № 2. С. 65.
72. Шаповал Г. С., Громова В. Ф. Механизмы антиоксидантной защиты организма при действии активных форм кислорода. *Укр. біохім. журн.* 2003. Т. 75. № 2. С. 5–13.
73. Широкова А. В. Апоптоз. Сигнальные пути и изменение ионного и водного баланса клетки. *Цитология*. 2007. Т. 49. № 8. С. 385-394.
74. Янчій Р. І., Калейнікова О. М., Вознесенська Т. Ю., Блашків Т. В., Бідзіля Ю. П. Скоротливість міометрія миші в умовах зміни функціонального стану мітохондрій. *Фізіологічний журнал*. 2013. Т. 59. № 4. С. 51-55.