

PACS numbers: 81.16.Fg, 82.39.-k, 87.14.-g, 87.15.R-, 87.16.Tb, 87.16.Uv, 87.19.Ff

Халконові калікс[4]арени — супрамолекулярні сполуки, які модулюють електронно-транспортний ланцюг мітохондрій гладенького м'язу

Ю. В. Данилович¹, Г. В. Данилович¹, О. А. Єсипенко², В. І. Кальченко²,
С. О. Костерін¹

¹Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України,
вул. Леонтовича, 9,
01030 Київ, Україна

²Інститут органічної хімії НАН України,
вул. Мурманська, 5,
02660 Київ, Україна

Халконові калікс[4]арени C-138, C-137, C-1023 та C-1011 у концентрації 10 мкМ залежно від кількості халконових замінників гальмують окиснення NADH та FADH₂ в електронно-транспортному ланцюзі ізольованих мітохондрій гладенького м'язу матки. Калікс[4]арени C-1023 та C-1011, що мають 3 та 4 замінники відповідно, посилюють генерацію активних форм Оксигену в мітохондріях. Гальмування окиснення NADH та FADH₂ в мітохондріях відображає можливість модуляції їхньої енергетики та, відповідно, функціонування Ca²⁺-транспортувальних систем.

Chalcone calix[4]arenes C-138, C-137, C-1023, and C-1011 at a concentration of 10 μM inhibit the oxidation of NADH and FADH₂ in the electron-transport chain of isolated uterine smooth-muscle mitochondria, depending on the amount of chalcone substitutes. Calix[4]arenes C-1023 and C-1011, having 3 and 4 substituents, respectively, enhance the generation of reactive oxygen species in the mitochondria. The inhibition of the NADH and FADH₂ oxidation in the mitochondria reflects the possibility of modulating their energy and, consequently, the functioning of Ca²⁺-transport systems.

Ключові слова: халконові калікс[4]арени, мітохондрії, активні форми Оксигену, електронно-транспортний ланцюг, гладенький м'яз.

Key words: chalcone calix[4]arenes, mitochondria, reactive oxygen species, electron-transport chain, smooth muscle.

(Отримано 26 листопада 2019 р.)

1. ВСТУП

Створення та підтримання трансмембранного електричного потенціалу на внутрішній мембрані мітохондрій внаслідок окиснення органічних субстратів і роботи електронно-транспортного ланцюга є одними з ключових ланок функціонування органел як Ca^{2+} -акумуляційної системи [1]. Пошук ефекторів, що здатні модифікувати рівень поляризації внутрішньої мітохондрійної мембрани й активність Ca^{2+} -транспортуючих систем у ній, є нагальним питанням біохемічної мембранології. Раніше було показано, що халконвмісні калікс[4]арени змінюють поляризацію мітохондрійної мембрани та за їхньої присутності зростає рівень йонізованого Ca в матриці органел [2]. Одним із підходів щодо визначення ефективності функціонування електронно-транспортного ланцюга є аналіз змін флюоресценції аденінових нуклеотидів (NADH/FAD), які відображають їхній редокс-стан [3], та DCF-флюоресценції мітохондрій, що віддзеркалює утворення активних форм Оксигену (АФО).

З метою встановлення біохемічних закономірностей впливу халконвмісних калікс[4]аренів на функціонування електронно-транспортного ланцюга ми дослідили дію сполук С-138, С-137, С-1023 та С-1011, які мають 1, 2, 3 та 4 халконові залишки відповідно на нижньому вінці калікс[4]аренової чаші, на флюоресценцію ендогенних нуклеотидів NADH і FAD й інтенсивність продукування АФО в ізольованих мітохондріях міометрія щурів.

2. ЕЛЕМЕНТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ МЕТОДИКИ

Препарат ізольованих мітохондрій одержували із міометрія щурів за допомогою стандартного підходу із застосуванням диференційного центрифугування [4]. Вміст протеїну у фракції визначали за загальноприйнятою методою Bradford M.M. навантаження мітохондрій АФО-чутливим флюоресцентним зондом DCF-DA у концентрації 25 мкМ проводили у середовищі, яке містило 10 мМ Hepes (pH 7,4, 25°C), 250 мМ цукрозу, 0,1% бичачий сироватковий альбумін протягом 30 хв. при 25°C. Для поліпшення процесу навантаження змішували барвник із Pluronic F-127 (0,02%). Утворення АФО (зміни DCF-флюоресценції) в ізольованих мітохондріях вивчали із використанням методи протокової цитофлюориметрії на проточному цитометрі COULTER EPICS XL™ (Beckman Coulter, США), що обладнаний аргонним лазером ($\lambda_{\text{зб}} = 488$ нм, $\lambda_{\text{фл}} = 515$ нм (Fl1 канал)) із програмним забезпеченням SYSTEM II™ Software (Beckman Coulter, США). Середовище інкубації (2 мл) мало склад (мМ): 20 Hepes (pH 7,4, 25°C), 2 калій-фосфатний буфер (pH 7,4, 25°C), 125 KCl, 25 NaCl, 5 піруват, 5 сукцинат.

Реєстрацію відносних значень рівня власної флюоресценції нук-

леотидів у матриксі ізольованих мітохондрій міометрія здійснювали на спектрофлюориметрі Quanta Master 40 РТІ. Дослідження проводили в середовищі вищезазначеного складу. Режим мірювання: NADH ($\lambda_{\text{аб}} = 350$ нм, $\lambda_{\text{фл}} = 450$ нм), FAD ($\lambda_{\text{аб}} = 450$ нм, $\lambda_{\text{фл}} = 533$ нм).

Синтезу халконвмісних калікс[4]аренів було здійснено у відділі хімії фосфоранів Інституту органічної хімії НАН України. Досліджувані сполуки розчиняли в диметилформаміді (DMFA) та вносили безпосередньо до середовища інкубації.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Калікс[4]арени — поліфенольні макроциклічні сполуки, які утворюють у розчинах наночастинки. Вони є малотоксичними, а вибрані представники доволі специфічні щодо модуляції йон-транспортувальних систем субклітинних структур [5]. Характерною особливістю будови халконвмісних калікс[4]аренів є наявність кількох халконових залишків (від 1 до 4 у випадку досліджуваних сполук) по нижньому вінцю калікс[4]аренової чаші, що передбачає ефективну взаємодію з мембранними структурами та можливість впливу на мембраносоційовані транспортні й енергетичні процеси. Як доволі гідрофобні сполуки, калікс[4]арени здатні проникати в клітини та взаємодіяти з мітохондріями. Структурні формули халконвмісних калікс[4]аренів, які мають різну кількість (1–4) халконових залишків на нижньому вінці каліксаренової чаші, наведено на рис. 1.

Для досягнення стану енергізації мітохондрій у середовище інкубації вносили 5 мМ піруват та 5 мМ сукцинат. Флюоресценція NADH з часом знижується за присутності субстратів дихання. Поряд із цим, вміст FADH₂ падає, і, відповідно, збільшується флюоресценція від FAD (рис. 2). Калікс[4]арени С-138, С-137, С-1023 та С-1011 залежно від кількості заміників у концентрації 10 мкМ гальмують окиснення NADH і FADH₂ в електронно-транспортному ланцюзі (рис. 2).

Калікс[4]арени С-1023 та С-1011, що мають 3 та 4 замітники відповідно, істотно збільшують утворення АФО в мітохондріях (рис.

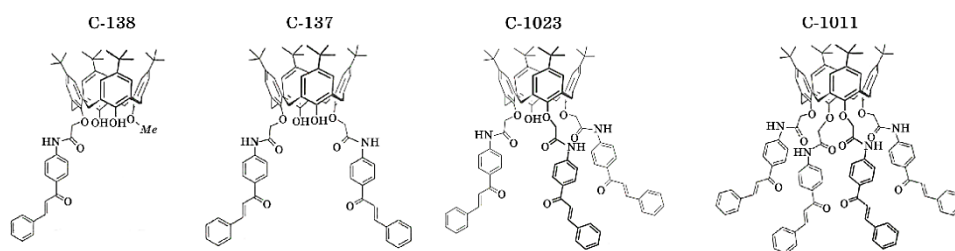


Рис. 1. Структура досліджуваних халконових калікс[4]аренів.¹

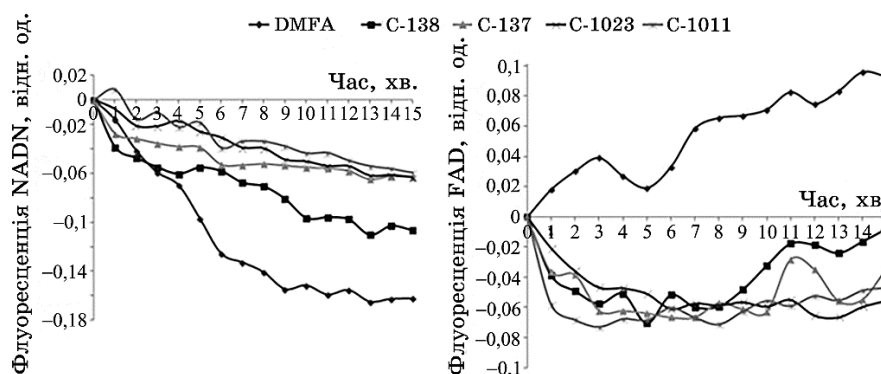


Рис. 2. Зміни флюоресценції NADH і FAD в ізолюваних мітохондріях міометрія за присутності калікс[4]аренів. Результати типового досліду.²

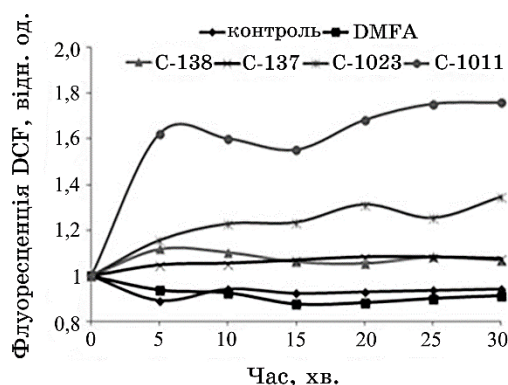


Рис. 3. Зміни флюоресценції DCF в ізолюваних мітохондріях міометрія за присутності халконових калікс[4]аренів. Результати типового досліду.³

3). Виражене гальмування окиснення NADH і FADH₂ в мітохондріях відображає можливість модуляції їхньої енергетики та, відповідно, роботи Ca²⁺-транспортувальних систем.

Динаміка Ca²⁺-сигналіngu контролюється такими субклітинними системами, як Ca²⁺-канали, помпи й обмінники, які забезпечують транспорт катіона крізь плазмалему та мембрани внутрішньоклітинних компартментів, що виконують функцію депо Ca²⁺, а саме, ендоплазматичного ретикулу та мітохондрій [1]. Спроможність мітохондрій накопичувати Ca²⁺ є визначальною для функціонування клітини в цілому, оскільки продукування ними АТФ залежить від концентрації даного катіона в матриксі, що зумовлено специфікою роботи відповідних дегідрогеназ. Разом з цим Ca²⁺-перевантаження мітохондрій є тригером відкриття пори перехідної проникності та розвитку апоптозу. В той же час від активнос-

ти дихального ланцюга та збільшення/зменшення за модулем мембранного потенціалу внутрішньої мембрани мітохондрій залежить ефективність функціонування систем транспорту Ca в мітохондріях [1]. Вірогідне пригнічення інтенсивності окисного фосфорилування за дії халконових калікс[4]аренів може вплинути на функціональний взаємозв'язок між мітохондріями та саркоплазматичним ретикулумом і/або мітохондрії–плазматична мембрана шляхом змін у постачанні АТФ для активного транспорту катіонів (Ca^{2+} , Na^+ , K^+) проти градієнту їхньої концентрації, а також модуляції Ca-транспортувальних систем у самих мітохондріях.

Таким чином, халконвмісні калікс[4]арени (С-138, С-137, С-1023 та С-1011) з різною ефективністю гальмують окиснення ендогенних нуклеотидів в електронно-транспортному ланцюзі за присутності субстратів дихання. Істотне посилення генерації АФО спостерігається за присутності калікс[4]аренів С-1023 та С-1011, що може привести до інтенсифікації окисних процесів у мітохондріях та опосередкованого АФО пониження інтенсивності окисного фосфорилування.

Роботу виконано за рахунок коштів бюджетної програми «Підтримка розвитку пріоритетних напрямів наукових досліджень» (КПКВК 6541230).

4. ВИСНОВКИ

Отже, вибрані халконвмісні калікс[4]арени гальмують окиснення NADH та FADH_2 в електронно-транспортному ланцюзі та посилюють генерацію активних форм Оксигену в мітохондріях залежно від кількості халконових замінників по нижньому вінцю калікс[4]аренової чаші. Гальмування окиснення NADH та FADH_2 в мітохондріях відображає можливість модуляції їхньої енергетики та, відповідно, функціонування Ca^{2+} -транспортувальних систем. Посилення генерації активних форм Оксигену, яке спостерігається за присутності калікс[4]аренів С-1023 та С-1011, може також привести до інтенсифікації окисних процесів у мітохондріях.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА—REFERENCES

1. O. V. Kolomiets, Yu. V. Danylovyh, H. V. Danylovyh, and S. O. Kosterin, *International Journal of Physiology and Pathophysiology*, **9**, No. 3: 256 (2018).
2. L. G. Babich, S. G. Shlykov, A. M. Kushnarova, O. A. Esypenko, and S. O. Kosterin, *Nanosistemi, Nanomateriali, Nanotehnologii*, **15**, No. 1: 193 (2017) (in Ukrainian); Л. Г. Бабіч, С. Г. Шликов, А. М. Кушнар'ова, О. А. Єсипенко, С. О. Костерін, *Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології*, **15**, № 1: 193 (2017); <https://doi.org/10.15407/nnn.15.01.0193>.
3. H. Danylovyh, A. Chunikhin, Yu. Danylovyh, and S. Kosterin, *BioTechnologia*,

- 99, No. 1: 37 (2018).
4. S. A. Kosterin, N. F. Bratkova, and M. D. Kursky, *Biokhimiya*, **50**, No. 8: 1350 (1985) (in Russian); С. А. Костерин, Н. Ф. Браткова, М. Д. Курский, *Биохимия*, **50**, № 8: 1350 (1985).
 5. M. Guiliani, I. Morbioli, F. Sansone, and A. Casnati, *Chemical Communications (Cambridge, England)*, **51**, No. 75: 14140 (2015).

¹*O. V. Palladin Institute of Biochemistry, N.A.S. of Ukraine,
9, Leontovych Str.
UA-01030 Kyiv, Ukraine*

²*Institute of Organic Chemistry, N.A.S. of Ukraine
5, Murmans'ka Str.,
UA-02660 Kyiv, Ukraine*

¹ Fig. 1. Structure of the investigated chalcone calix[4]arenes.

² Fig. 2. Fluorescence changes of NADH and FAD in isolated myometrial mitochondria in the presence of calix[4]arenes. The results of a typical experiment.

³ Fig. 3. Changes in DCF fluorescence in isolated myometrial mitochondria in the presence of chalcone calix[4]arenes. The results of a typical experiment.