

PACS numbers: 81.16.Fg, 82.45.Mp, 82.70.Uv, 87.15.R-, 87.16.Tb, 87.16.Uv, 87.19.Ff

## Халконовмісні калікс[4]арени як перспективні ефектори функціональної активності мітохондрій гладенького м'язу

Ю. В. Данилович<sup>1</sup>, Г. В. Данилович<sup>1</sup>, М. Д. Святненко<sup>1</sup>,  
О. А. Єсипенко<sup>2</sup>, В. І. Кальченко<sup>2</sup>, С. О. Костерін<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Інститут органічної хімії НАН України,  
вул. Мурманська, 5,  
02660 Київ, Україна

Досліджено вплив калікс[4]аренів, поліфенольних макроциклічних сполук, які містять від одного до чотирьох халконових угруповань на нижньому вінці калікс[4]аренової чаші, на біоенергетичні, транспортні та метаболічні процеси в мітохондріях гладенького м'язу. Дослідження проведено на ізольованих мітохондріях міометрія щурів із застосуванням флуоресцентної спектроскопії. Встановлено, що халконові калікс[4]арени гальмують окиснення NADH та FADH<sub>2</sub> в електронно-транспортному ланцюзі та істотно посилюють генерацію активних форм Оксигену в мітохондріях. Вони гальмують транспорт Ca<sup>2+</sup> (енергозалежну акумуляцію та H<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-обмінник) у внутрішній мітохондрійній мембрані та пригнічують синтезу оксиду Нітрогену. Досліджувані ефекти залежать від кількості халконових замісників, а також від заряду та полярності функціональних груп у замісниках та калікс[4]ареновій чаші. Зроблено висновок про перспективність застосування халконових калікс[4]аренів як інструментів у дослідженнях біохемічних процесів, що асоційовані з субклітинними мембранними структурами.

The influence of calix[4]arenes, *i.e.*, polyphenolic macrocyclic compounds containing from one to four chalcone groups on the lower crown of the calix[4]arena bowl, on bioenergetic, transport, and metabolic processes in smooth muscle mitochondria is studied. The study is performed on isolated mitochondria of rat myometrium using fluorescence spectroscopy. As found, 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 in mitochondria. They inhibit the transport of Ca<sup>2+</sup> (energy-dependent accumulation and H<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-exchanger) in the inner

mitochondrial membrane and inhibit the synthesis of nitric oxide. The studied effects depend on the number of chalcone substituents as well as on the charge and polarity of functional groups in the substituents and calix[4]arene bowl. The conclusion about the prospects of using chalcone calix[4]arenes as tools in the study of biochemical processes associated with subcellular membrane structures is made.

**Ключові слова:** калікс[4]арени, мітохондрії, транспорт Кальцію, активні форми Оксигену і Нітрогену, біоенергетика, гладенький м'яз.

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

*(Отримано 10 березня 2021 р.; після доопрацювання — 14 лютого 2022 р.)*

## 1. ВСТУП

Калікс[4]арени — поліфенольні макроциклічні сполуки. Вони є малотоксичними, а окремі представники доволі специфічні щодо модуляції йон-транспортувальних систем субклітинних структур [1]. Як доволі гідрофобні сполуки, калікс[4]арени здатні проникати в клітини та взаємодіяти з мітохондріями, що було доведено нами експериментально [2]. Введення на нижній вінець калікс[4]аренів біологічно активних (біорелевантних) халконових угруповань може зумовлювати ефективну взаємодію з мембранними структурами та можливість впливу на мембраноасоційовані транспортні, енергетичні та метаболічні процеси.

Створення та підтримання трансмембранного електричного потенціалу на внутрішній мембрані мітохондрій внаслідок окиснення органічних субстратів і роботи електронно-транспортного ланцюга є однією з ключових ланок функціонування органел як  $\text{Ca}^{2+}$ -акумуляційної системи. Йони  $\text{Ca}^{2+}$  є одними з важливих регуляторів біоенергетики та метаболічної активності мітохондрій [3–6]. Пошук ефекторів, що здатні впливати на функціонування електронно-транспортного ланцюга внутрішньої мітохондрійної мембрани й активність  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем в ній, є нагальним питанням біохемічної мембранології. Раніше показано, що халконовмісні калікс[4]арени змінюють поляризацію мітохондрійної мембрани, і за їхньої присутності зростає рівень йонізованого  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксі органел [7]. Одним з підходів щодо визначення ефективності функціонування електронно-транспортного ланцюга є аналіза змін флуоресценції аденінових нуклеотидів (NADH/FAD), які відображають їхній редокс-стан, і DCF-флуоресценції мітохондрій, що віддзеркалює утворення активних форм Оксигену [8–10].

Мітохондрії є важливим джерелом оксиду Нітрогену (NO) й

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) [11–13]. Оксид Нітрогену регулює такі фундаментальні мітохондрійні процеси як синтез АТФ, транспорт йонів Ca, функціонування пори перехідної провідності, інтенсивність перебігу Кребсового циклу, мітохондрійний біогенез тощо. Передбачається існування доволі складної системи прямих і зворотніх, негативних і позитивних зв'язків між компонентами електронно-транспортного ланцюга, Ca<sup>2+</sup>-транспортувальними протеїнами та NO-синтазою в мітохондріях. Існує точка зору, що ці структури є вирішальними в регуляції функціональної активності мітохондрій [11, 14–15]. У зв'язку з цим пошук ефективних модуляторів зазначених процесів серед вибраних калікс[4]аренів є актуальною задачею.

Метою представленої роботи було дослідити вплив халконовмісних калікс[4]аренів на електронно-транспортний ланцюг, генерацію активних форм Нітрогену (NO) й Оксигену та транспорт Ca<sup>2+</sup> у мітохондріях гладенького м'язу, проаналізувати залежність можливих ефектів від хемічної структури макроциклів.

## 2. МЕТОДИ ТА МАТЕРІАЛИ

У дослідах використовувалися статевозрілі невагітні нелінійні щури віком у 2 місяці; середня маса тіла — 200 г, маса матки — 350–600 мг. Тварин вводили в стан наркозу шляхом витримання у камері, збагаченій парами хлороформу, після чого декапітували. Усі маніпуляції з тваринами було проведено відповідно до Закону України №3447 IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» та Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних і наукових цілей (Страсбург, 1986).

Препарат ізольованих мітохондрій одержували із міометрія щурів за допомогою стандартного підходу із застосуванням диференційного центрифугування [16]. Вміст протеїну у фракції визначали за загальноприйнятою методою Bradford M.M.

Реєстрацію відносних значень рівня власної флюоресценції NADH і FAD у матриксі ізольованих мітохондрій міометрія здійснювали на спектрофлюориметрі Quanta Master 40 РТІ (Канада) із програмним забезпеченням FelixGX 4.1.0.3096. Дослідження проводили в середовищі наступного складу, мМ: 20 HEPES (pH 7,4; 37°C), 2 K<sup>+</sup>-фосфатного буферу (pH 7,4; 37°C), 120 KCl, 5 піривату Натрію, 5 сукцинату Натрію; аліквота (100 мкл) мітохондрійної фракції містила 100 мкг білку. Флюоресцентний сигнал

від NADH реєстрували при  $\lambda_{\text{зб}} = 350$  нм,  $\lambda_{\text{фл}} = 450$  нм, від FAD —  $\lambda_{\text{зб}} = 450$  нм,  $\lambda_{\text{фл}} = 533$  нм.

Навантаження мітохондрій чутливим до активних форм Оксигену флюоресцентним зондом DCF-DA у концентрації 25 мкМ проводили у середовищі, яке містило: 10 мМ HEPES (pH 7,4; 25°C), 250 мМ цукрози, 0,1% бичачого сироваткового альбуміну, 0,02% Pluronic F-127, протягом 30 хв. за температури у 25°C. Утворення активних форм Оксигену (зміни DCF-флюоресценції) в ізольованих мітохондріях вивчали із використанням методи протокової цитофлюориметрії на протоковому цитометрі COULTER EPICS XL™ (Beckman Coulter, США), що обладнаний аргонним лазером ( $\lambda_{\text{зб}} = 488$  нм,  $\lambda_{\text{фл}} = 515$  нм (F11-канал) ) із програмним забезпеченням SYSTEM II™ Software (Beckman Coulter, США). Середовище інкубації мало склад, мМ: 20 HEPES (pH 7,4; 25°C), 2 K<sup>+</sup>-фосфатного буферу (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 піруват + 5 мМ сукцинат.

Навантаження мітохондрій Ca<sup>2+</sup>-чутливим флюоресцентним зондом Fluo-4 AM у концентрації 2 мкМ проводили у середовищі, яке містило 10 мМ HEPES (pH 7,4; 37°C), 250 мМ сахарози, 0,1% бичачого сироваткового альбуміну, 0,02% Pluronic F-127, протягом 30 хв. за 37°C. Дослідження змін вмісту йонізованого Ca в матриці ізольованих мітохондрій здійснювали на спектрофлюориметрі Quanta Master 40 РТІ. Процес акумуляції Ca<sup>2+</sup> відбувався у середовищі складу, мМ: 20 HEPES (pH 7,4; 37°C), 250 цукрози, 2 K<sup>+</sup>-фосфатного буферу (pH 7,4; 37°C), 3 MgCl<sub>2</sub>, 3 АТР, 5 сукцинату Натрію; концентрація Ca<sup>2+</sup> становила 80 мкМ.

У випадку дослідження ΔрН-індукованого вивільнення йонів Ca з мітохондрій попередню енергозалежну акумуляцію Ca<sup>2+</sup> проводили протягом 5 хв., після чого аліквоту суспензії (100 мкл) розводили в середовищі вивільнення Ca<sup>2+</sup> (2 мл) наступного складу, мМ: 20 HEPES (pH 6,5–7,5; 37°C), 2 K<sup>+</sup>-фосфатного буферу (pH 6,5–7,5; 37°C), 250 цукрози, 5 сукцинату Натрію, 5 мкМ циклоспорину А.

Навантаження мітохондрій зондом BCECF-AM у концентрації 5 мкМ проводили у середовищі, яке містило: 10 мМ HEPES (pH 7,4), 250 мМ цукрози, 0,1% бичачого сироваткового альбуміну та 0,02% Pluronic F-127, протягом 20 хв. за температури у 25°C. Зонд, який не акумулювався в матриці, відмивали від мітохондрій шляхом переосадження із 12000g протягом 15 хв. Ресуспендували та зберігали мітохондрії у вищеописаному середовищі. Реєстрацію флюоресценції 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) у мітохондріях здійснювали на спектрофлюориметрі Quanta Master 40 РТІ.

Навантаження мітохондрій NO-чутливим флюоресцентним зондом DAF-FM-DA у концентрації 5 мкМ проводили в середовищі, яке містило: 10 мМ HEPES (рН 7,4; 25°C), 250 мМ цукрози, 0,1% бичачого сироваткового альбуміну, 0,02% Pluronic F-127, протягом 30 хв. за температури у 25°C. Склад середовища під час визначення NO-синтазної активності, мМ: 20 HEPES (рН 7,4; 25°C), 2 K<sup>+</sup>-фосфатного буферу (рН 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 тетрагідробіоптерину. Вміст протеїну в мітохондрійній фракції складав 15–20 мкг. Реакцію ініціювали внесенням аликвоти 20 мкл L-аргініну з Ca<sup>2+</sup>. Час інкубації — 30 хв. Мірювання проводили із застосуванням протокового цитометра COULTER EPICS XL<sup>TM</sup> ( $\lambda_{\text{об}} = 488$  нм,  $\lambda_{\text{фл}} = 515$  нм (канал F11)).

Початкову швидкість енергозалежної акумуляції Ca<sup>2+</sup> ( $V_0$ ) і характеристичний час напівмаксимальної акумуляції катіона ( $\tau_{1/2}$ ) розраховували за формулами:

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

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

де  $k$ , с<sup>-1</sup> — константа швидкості входу Ca<sup>2+</sup>, яку знаходимо з лінійної залежності зміни флюоресценції Fluo-4 від часу в координатах  $\ln((F_{\text{max}} - F_0)/(F_{\text{max}} - F))$ , де  $F_0$  — початкова флюоресценція,  $F$  — флюоресценція за відповідні проміжки часу,  $F_{\text{max}}$  — стаціонарний рівень флюоресценції, який досягається з часом як наслідок входу певної кількості йонів Ca в матрикс. Дана метода розрахунку ґрунтується на уявленні, що збільшення флюоресценції Ca<sup>2+</sup>-чутливого зонду Fluo-4, яким було навантажено мітохондрії, адекватно відображає зміни концентрації йонізованого Ca в матриксі.

Здійснювали статистичну обробку результатів за стандартною методою, прийнятою для аналізу результатів біохемічних досліджень з використанням Стьюдентового  $t$ -критерію [17].

Синтезу халконовмісних калікс[4]аренів було здійснено у відділі хімії фосфоранів Інституту органічної хімії НАН України. В дослідженнях було використано наступні сполуки:

- С-138 (5,11,17,23-Тетра-*трет*-бутил-25,27-дигідрокси-26-метокси-28-[(4'-бензиліденацетофеноніл)амінокарбонілметокси]калікс[4]арен);
- С-1012 (5,11,17,23-Тетра-*трет*-бутил-25,26-дипропокси-27,28-біс[(4'-бензиліденацетофеноніл)амінокарбонілметокси]калікс[4]арен);
- С-1021 (5,11,17,23-Тетра-*трет*-бутил-25,27-дипропокси-26,28-

- біс[(4'-(4''-нітробензиліден)ацетофеноніл)амінокарбонілметокси]калікс[4]арен);
- С-1023 (5,11,17,23-Тетра-*трет*-бутил-25-гідрокси-26,27,28-три[(4'-бензиліденацетофеноніл)амінокарбонілметокси]калікс[4]арен);
  - С-1024 (5,11,17,23-Тетра-*трет*-бутил-25-пропокси-26,27,28-три[(4'-бензиліденацетофеноніл)амінокарбонілметокси]калікс[4]арен);
  - С-1011 (5,11,17,23-Тетра-*трет*-бутил-25,26,27,28-тетра[(4'-бензиліденацетофеноніл)амінокарбоніл-метокси]калікс[4]арен).

Калікс[4]арени розчиняли в диметилформаїді (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 концентрації спостерігалось помутніння розчинів. Під час вивчення впливу калікс[4]аренів на енергозалежну акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондрії були преінкубовані з досліджуваними сполуками 3 хв.

### 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Чистоту препаратів халконовмісних калікс[4]аренів було підтверджено за допомогою ЯМР-спектроскопії в Інституті органічної

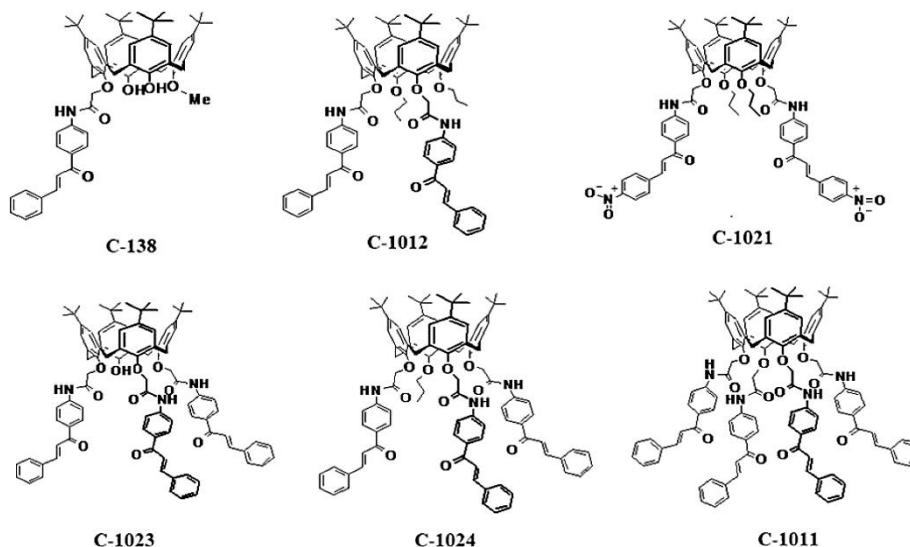
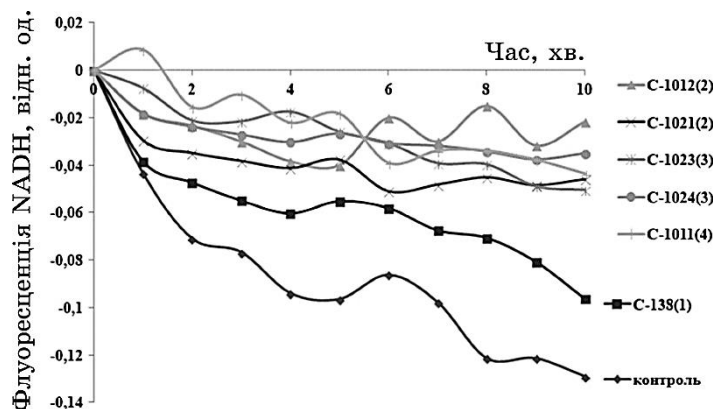


Рис. 1. Структурні формули халконовмісних калікс[4]аренів.<sup>1</sup>

хімії НАН України. Структурні формули вибраних халконових калікс[4]аренів представлено на рис. 1. Молекули досліджених сполук складаються з калікс[4]аренової чаші та різної кількості халконових замісників на її нижньому вінці. Кількість замісників варіює від одного (сполука С-138) до двох (С-1012, С-1021), трьох (С-1023, С-1024) та чотирьох (С-1011). Крім гідрофобних халконових замісників, калікс[4]арени містять гідрофобні групи *t*-Bu, OMe, OPr та гідрофільні OH-групи. Халконові залишки в сполуці С-1021 мають електронно-акцепторні полярні NO<sub>2</sub>-групи.

Ефективність впливу халконовмісних калікс[4]аренів на біохемічні параметри ізольованих мітохондрій буде визначатися їхніми фізико-хімічними властивостями, а саме, залежати від кількості та природи халконових угруповань і замісників у калікс[4]ареновій чаші. Інтенсивність біохемічних ефектів буде залежати від ефективності взаємодії, передусім, із 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 й інтенсивніший вплив на компоненти електронно-транспортного ланцюга та транспортні системи, в ній локалізовані.

Проведеними дослідженнями встановлено, що вибрані калікс[4]арени з різною інтенсивністю пригнічують окиснення ендогенного NADH у 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-



**Рис. 2.** Вплив халконових калікс[4]аренів на інтенсивність окиснення NADH в ізольованих мітохондріях (результат характерного дослідження). Тут і на наступних рисунках у дужках вказано відповідну кількість халконових замісників.<sup>2</sup>

дихального комплексу. Цей ефект частково залежав від кількості халконових замісників: наявність лише одного мала помірний вплив на флюоресценцію, тоді як їхнє зростання до двох, трьох і чотирьох супроводжувалось істотною гальмівною дією, що вже не залежала від кількості замісників. Можна припустити, що інтенсивність впливу на флюоресценцію NADH визначається не тільки кількістю халконових залишків, а й природою функціональних груп (*t*-Bu, OMe, OPr, OH, NO<sub>2</sub>) в молекулах калікс[4]аренів. Пониження флюоресцентної відповіді ендogenous мітохондріального FAD під впливом досліджуваних сполук відносно величини контрольного сигналу в наших дослідженнях свідчить про зменшення інтенсивності окиснення цього нуклеотиду і, відповідно, гальмування роботи електронно-транспортного ланцюга, вірогідно, шляхом пригнічення функціонування II-дихального комплексу. Залежності ефекту від хемічної природи калікс[4]аренів у цих дослідженнях не виявлено (графічні дані не наведено).

Інгібування окремих комплексів дихального ланцюга мітохондрій має наслідком посилення генерації активних форм Оксигену, про що свідчить зростання DCF-флюоресценції за дії вибраних калікс[4]аренів відносно контрольних значень (рис. 3). Інтенсивність цього ефекту корелювала з кількістю халконових замісників у досліджуваних сполуках. Спостерігалася тенденція до зростання флюоресцентної відповіді зі збільшенням кількості гідрофобних залишків. Втім наявність додаткових хемічних груп різної полярності приводила до того, що ефекти калікс[4]аренів з двома та трьома халконовими залишками щодо DCF-флюоресценції були майже подібними.

Функціонування електронно-транспортного ланцюга лежить в основі біоенергетики мітохондрій, а створений внаслідок його ро-

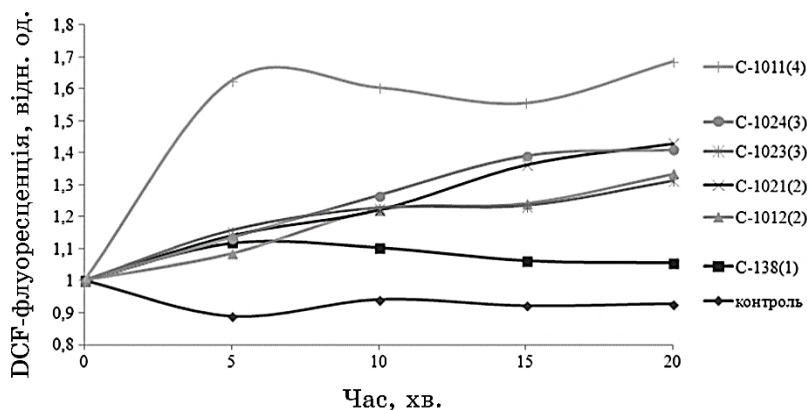


Рис. 3. Вплив халконових калікс[4]аренів на утворення активних форм Оксигену в ізолюваних мітохондріях (результат характерного дослідження).<sup>3</sup>



боти електрохімічний градієнт протонів і негативний потенціал (біля  $-180$  мВ) на внутрішній мітохондрійній мембрані є основними чинниками контролю локалізованих у ній транспортних систем. Одним з головних регуляторів активності електронно-транспортного ланцюга та метаболізму мітохондрій у цілому є концентрація йонів Ca в матриці, яка підтримується на оптимальному рівні завдяки роботі  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортних систем [18]. Доведено, що в мітохондріях міометрія у внутрішній мембрані локалізовані принаймні дві такі системи, а саме, енергозалежної акумуляції йонів Ca ( $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортер) і  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник [19–20]. Ізольовані мітохондрії мають змогу акумулювати  $\text{Ca}^{2+}$  за присутності сукцинату й АТФ з позамітохондрійного середовища, про що свідчить зростання акумуляції катіону. Зміни інтенсивності флюоресцентної відповіді  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливого зонду Fluo-4 відображають здатність енергізованих мітохондрій міометрія накопичувати й ефективно утримувати йони Ca (рис. 4).

Додавання зростаючих концентрацій цього катіону приводить до збільшення флюоресцентного сигналу з наступним виходом на рівень плато; зі зростанням концентрацій катіону інтенсивність відповіді знижується через обмежену  $\text{Ca}^{2+}$ -місткість. Додавання  $\text{Ca}^{2+}$ -йнофора А-23187 (10 мкМ), а отже, збільшення неспецифічної проникності мітохондрійної мембрани, має наслідком швидке вивільнення акумульованого  $\text{Ca}^{2+}$  у середовище з  $\text{Ca}^{2+}$ -хелатором ЕГТО (1 мМ). Поряд з цим, у мітохондріях реєструється активність  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника. Мітохондрії мали змогу вивільняти попередньо акумульований в енергозалежному процесі  $\text{Ca}^{2+}$  за умови закислення позамітохондрійного середовища (рис. 5, а) згідно з даними про пониження флюоресценції Fluo-4 за зміни рН від 7,5 до 6,5 ( $\Delta\text{pH}$ -залежне вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$ ). Паралельно відбувається також закислення матриксу, про що свідчить пониження флюоресценції рН-чутливого зонду VCECF, яким було навантажено мітохондрії (рис. 5, б).

Вибрані халконові калікс[4]арени пригнічували енергозалежну акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  (рис. 6, а) та  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник (рис. 6, б) в мітохондріях. При зростанні кількості халконових замісників від одного до двох ефективність інгібіторного впливу істотно зростала. Втім наявність полярних електроно-акцепторних груп  $\text{NO}_2$  в халконових залишках сполуки С-1021 мала наслідком послаблення взаємодії з внутрішньою мітохондрійною мембраною та відповідне пониження ефективності впливу щодо сполуки С-1012, яка не містить  $\text{NO}_2$ -груп, за умови однакової кількості халконових залишків. Подальше зростання кількості замісників на нижньому вінці калікс[4]аренової чаші вже не мало істотного впливу на інгібувальну здатність. Порівняння гальмівної дії калікс[4]аренів з трьома халконовими залишками (С-1023 і С-1024)

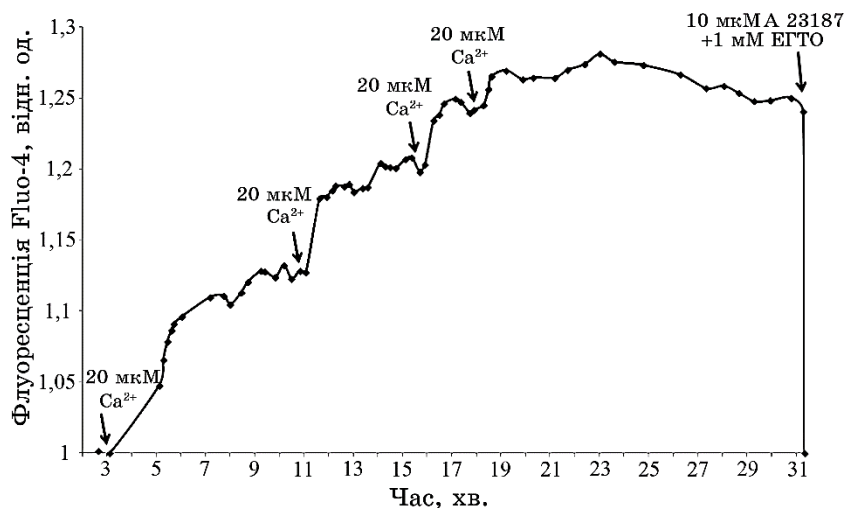


Рис. 4. Оцінка енергозалежної акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  в ізолюваних мітохондріях за змінами інтенсивності флуоресценції Fluo-4 (результат характерного дослідження).<sup>4</sup>

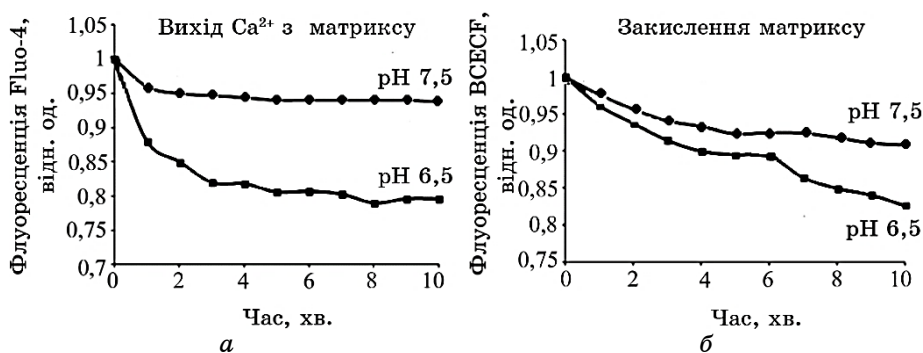
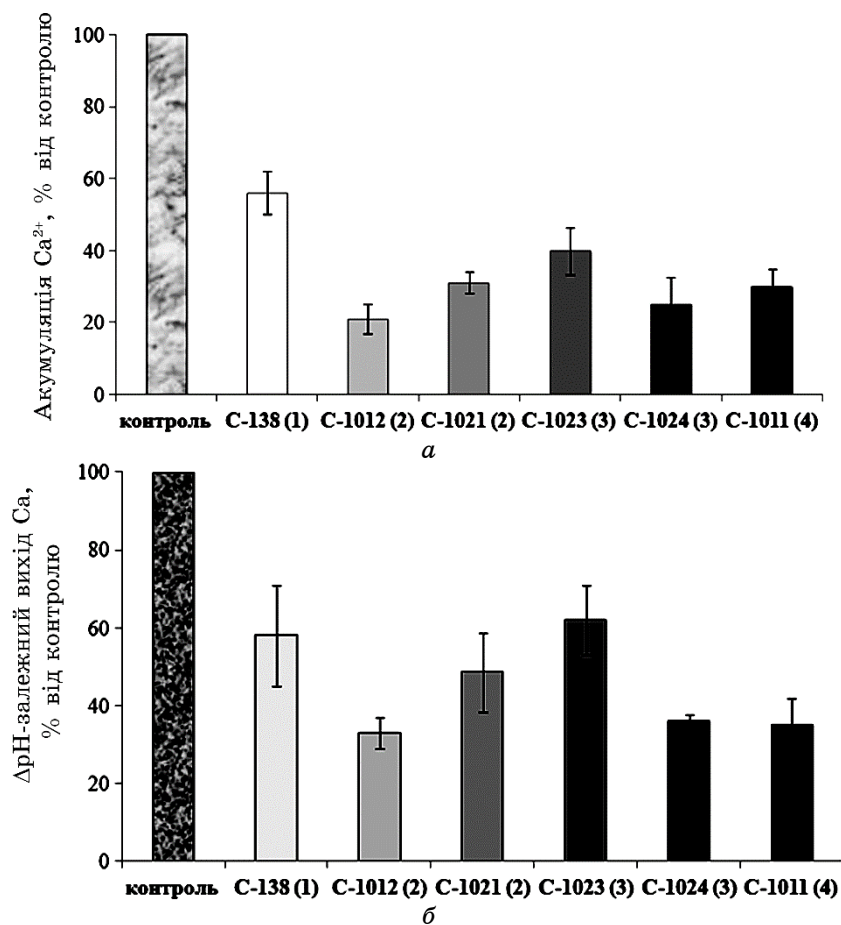


Рис. 5. Одночасні зміни концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  (а) і  $\text{H}^+$  (б) в матриксі мітохондрій за умови функціонування  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника (результат характерного дослідження).<sup>5</sup>

свідчить про залежність ефективності впливу від природи замісників у самій чаші. Сполука С-1023, яка містить гідрофільну фенольну ОН-групу, поступається за ефективністю інгібувального впливу сполуці С-1024, яка має гідрофобну групу ОРr.

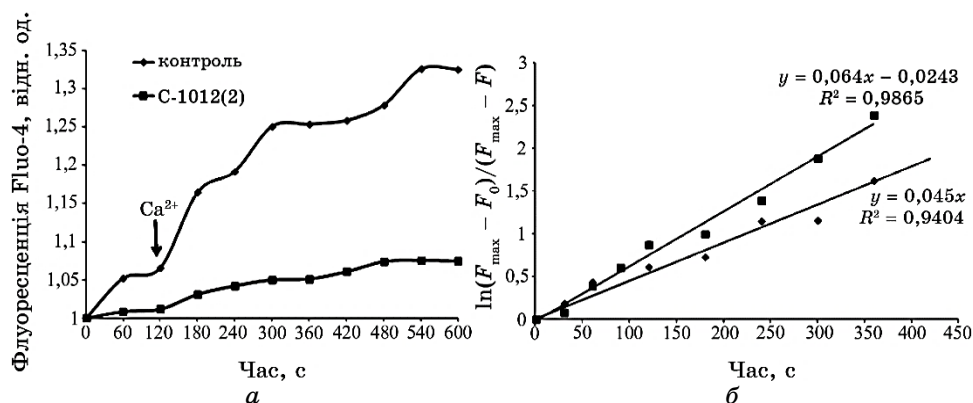
Аналіза змін флуоресцентної відповіді Fluo-4 з часом, яка відображає динаміку енергозалежної акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$ , свідчить про досягнення рівноважного стану транспортного процесу з виходом кривої на плато (рис. 7, а). Це дає змогу використати відповідні координати (рис. 7, б) для розрахунків основних кінетичних па-



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

раметрів транспортного процесу — початкової швидкості акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  ( $V_0$ ) і часу напівмаксимальної акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  (характеристичний час  $\tau_{1/2}$ ).

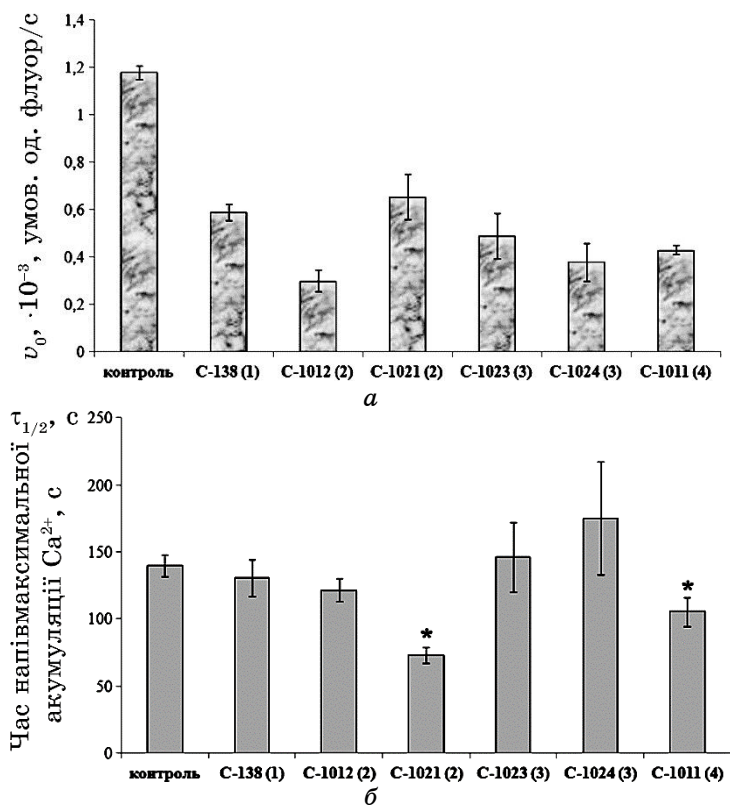
Аналіза змін параметра  $V_0$  за дії калікс[4]аренів (рис. 8, а) показала її відповідність залежності інгібувального впливу від кількості халконових замісників і природи функціональних груп (рис. 6, а). Водночас достовірне пониження характеристичного часу акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями (рис. 8, б) мало місце лише за дії калікс[4]аренів С-1021 (два халконові замісники) та С-1011 (чотири халконові замісники). Зменшення досліджуваного пара-



**Рис. 7.** Енергозалежна акумуляція  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями в контролі й у присутності калікс[4]арена С-1012. Стрілочкою вказано момент внесення  $80 \text{ мкМ}$   $\text{Ca}^{2+}$  до мітохондрій (а). Лінеаризація одержаних даних для розрахунку основних кінетичних параметрів транспортного процесу (б). (Результат характерного дослід.)<sup>7</sup>

метра 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 істотний вплив на її проникність до  $\text{Ca}^{2+}$ . Хоча негативні заряди С-1021 мають заважати взаємодії з внутрішньою мітохондрійною мембраною, ще одним поясненням пониження  $\tau_{1/2}$  в цьому випадку може бути безпосередня взаємодія з  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортними протеїнами.

Раніше нами було продемонстровано й охарактеризовано NO-синтазну активність в ізольованих мітохондріях міометрія, а також важливість мітохондрій як ендогенного джерела NO в гладенькому м'язі матки [21]. Відомо, що 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 із внутрішньою мембраною [22, 23]. В попередніх дослідженнях нами було продемонстровано, що синтез оксиду Нітрогену в мітохондріях активується  $\text{Ca}^{2+}$  і залежить від ступеня їхньої енергізації [21]. В цій роботі ми дослідили дію халконових калікс[4]аренів на NO-синтазну активність в ізольованих мітохондріях за раніше встановлених оптимальних умов перебігу реакції. Виявлено, що вибрані калікс[4]арени пригнічують у середньому на 10–35% утворення оксиду Нітрогену мітохондріями (рис. 9), причому зі зростанням



**Рис. 8.** Зміни основних кінетичних параметрів енергозалежної акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями в контролі й 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,  $p < 0,05$ .<sup>8</sup>

кількості халконових залишків у досліджуваних сполуках ступінь інгібування понижується.

Таким чином, досліджуваний показник обернено пропорційний гідрофобності калікс[4]аренів, котра підвищується по мірі зростання кількості халконових замісників. 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 із взаємодією із ліпідною компонентою внутрішньої мембрани. Нами було раніше показано, що синтез NO в

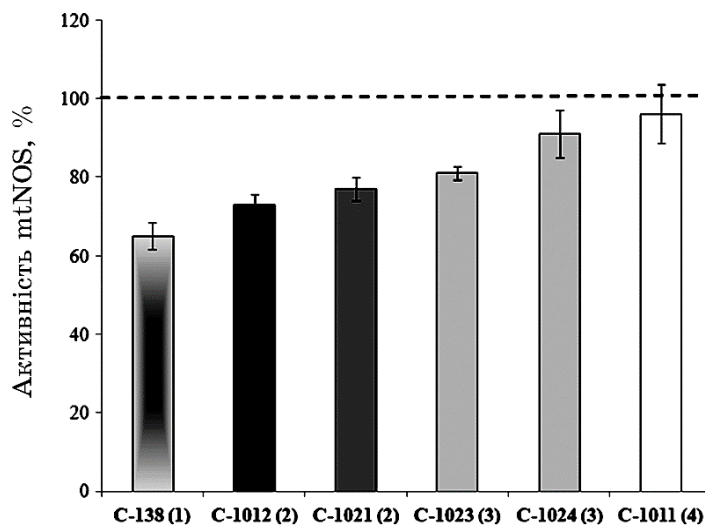


Рис. 9. Вплив халконових калікс[4]аренів на активність мітохондрійної NO-синтази.  $M \pm m$ ,  $n = 4-6$ .<sup>9</sup>

мітохондріях пригнічується інгібіторами транспорту  $\text{Ca}^{2+}$ . Отже, одержані результати непрямо вказують на те, що по відношенню до внутрішньої мітохондрійної мембрани NO-синтаза може бути інтегральним ензимом.

Проведені дослідження свідчать про перспективність застосування халконових калікс[4]аренів як інструментів у дослідженнях біохемічних процесів, що асоційовані з субклітинними мембранами, а також про важливість подальших студій, спрямованих на з'ясування зв'язку між їхньою структурою та біологічними ефектами. Ці дослідження можуть привести до синтезу селективних інгібіторів/активаторів клітинних процесів.

#### 4. ВИСНОВКИ

1. Халконові калікс[4]арени гальмують окиснення NADH і  $\text{FADH}_2$  в електронно-транспортному ланцюзі й істотно посилюють генерацію активних форм Оксигену в мітохондріях.
2. Досліджувані калікс[4]арени інгібують транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  у внутрішній мітохондрійній мембрані.
3. Синтеза оксиду Нітрогену 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 у

молекулі.

Роботу виконано за фінансової підтримки ґрантів НАН України: «Розробка нових нанорозмірних каліксаренових ефекторів АТФ-залежних ензиматичних та катіон-транспортуючих систем» (№0118U006093), «Застосування каліксаренів як ефекторів енергозалежних  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем з метою спрямованої модуляції процесів електро- та фармакомеханічного спряження в гладеньких м'язах» (№0120U000183).

## ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА—REFERENCES

1. S. O. Kosterin, V. I. Kalchenko, T. O. Veklich, L. G. Babich, and S. G. Shlykov, *Calixarenes as Modulators of ATP-Hydrolyzing System of Smooth Muscles* (Kyiv: Naukova Dumka: 2019) (in Ukrainian).
2. H. V. Danylovyh, Yu. V. Danylovyh, R. V. Rodik, V. T. Hurska, V. I. Kalchenko, and S. O. Kosterin, *Chem. Res. J.*, **4**, No. 6: 109 (2019).
3. S. Orrenius, L. Packer, and E. Cadenas, *Mitochondrial Signaling in Health and Disease* (New York: CRC Press: 2012).
4. B. R. Alevriadou, S. Shanmughapriya, A. Patel, P. B. Stathopoulos, and M. Madesh, *J. R. Soc. Interface*, **14**: 20170672 (2017); <https://doi.org/10.1098/rsif.2017.0672>
5. C. Zhao, A.Y. Wu, X. Yu, Y. Gu, Y. Lu, X. Song, N. An, and Y. Zhang, *J. Physiol. Pharmacol.*, **69**, No. 2: 151 (2018); <https://doi.org/10.26402/jpp.2018.2.01>
6. H. Yamamura, K. Kawasaki, S. Inagaki, Y. Suzuki, and Y. Imaizumi, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **314**: C88 (2018); <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00208.2017>
7. L. G. Babich, S. G. Shlykov, V. I. Boiko, M. A. Kliachina, and S. A. Kosterin, *Bioorg. Khim.*, **39**, No. 6: 728 (2013).
8. A. Daiber, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1797**, Nos. 6–7: 897 (2010); <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.01.032>
9. M. S. Islam, M. Honma, T. Nakabayashi, M. Kinjo, and N. Ohta, *Int. J. Mol. Sci.*, **14**, No. 1: 1952 (2013); <https://doi.org/10.3390/ijms14011952>
10. K. Staniszewski, S. H. Audi, R. Sepehr, E. R. Jacobs, and M. Ranji, *Ann. Biomed. Eng.*, **41**, No. 4: 827 (2013); <https://doi.org/10.1007/s10439-012-0716-z>
11. S. Shiva, *Nitric Oxide*, **22**, No. 2: 64-74 (2010); <https://doi.org/10.1016/j.niox.2009.09.002>
12. S. Shiva, *Redox Biol.*, **1**, No. 1: 40 (2013); <https://doi.org/10.1016/j.redox.2012.11.005>
13. J. O. Lundberg and E. Weitzberg, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **396**, No. 1: 39 (2010); <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.136>
14. V. Haynes, S. L. Elfering, R. J. Squires, N. Traaseth, J. Solien, A. Ettl, and C. Giulivi, *IUBMB Life*, **55**, Nos. 10–11: 599 (2003); <https://doi.org/10.1080/15216540310001628681>
15. J. Nagendran and E. D. Michelakis, *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, **296**: H1723 (2009); <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00380.2009>
16. S. A. Kosterin, N. F. Bratkova, and M. D. Kurskiy, *Biochemistry*, **50**, No. 8:

- 1350 (1985) (in Russian).
17. Yu. I. Prilutskiy, O. V. Ilchenko, O. V. Tsimbalyuk, and S. O. Kosterin, *Statistical Methods in Biology* (Kyiv: Naukova Dumka: 2017) (in Ukrainian).
  18. J. Santo-Domingo, A. Wiederkehr, and U. De Marchi, *World J. Biol. Chem.*, **6**, No. 4: 310 (2015); [https://doi: 10.4331/wjbc.v6.i4.310](https://doi:10.4331/wjbc.v6.i4.310)
  19. T. O. Veklich, S. O. Kosterin, and O. P. Shynlova, *Ukr. Biokhim. Zh.*, **74**, No. 1: 42 (2002) (in Ukrainian).
  20. O. V. Kolomiets, Yu. V. Danylovyh, and G. V. Danylovyh, *Int. J. Phys. Pathophys.*, **6**, No. 4: 287 (2015); [doi:10.1615/IntJPhysPathophys.v8.i3.50](https://doi:10.1615/IntJPhysPathophys.v8.i3.50)
  21. H. V. Danylovyh, Yu. V. Danylovyh, M. O. Gulina, T. V. Bohach, and S. O. Kosterin, *Gen. Physiol. Biophys.*, **38**, No. 1: 39 (2019); [https://doi:10.4149/gpb\\_2018034](https://doi:10.4149/gpb_2018034)
  22. S. L. Elfering, Th. M. Sarkela, and C. Giulivi, *J. Biol. Chem.*, **277**, No. 41: 38079 (2002); <https://doi.org/10.1074/jbc.M205256200>
  23. V. Haynes, S. Elfering, N. Traaseth, and C. Giulivi, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **36**, No. 4: 341 (2004); <https://doi.org/10.1023/B:JOB.0000041765.27145.08>

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

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

<sup>1</sup> Fig. 1. Structural formulas of chalcone-containing calix[4]arenes.

<sup>2</sup> Fig. 2. Influence of chalcone calix[4]arenes on the intensity of NADH oxidation in isolated mitochondria (this is result of a typical experiment). Here and in the following figures, the corresponding number of chalcone substituents is indicated in parentheses.

<sup>3</sup> Fig. 3. Influence of chalcone calix[4]arenes on the reactive oxygen species' formation in isolated mitochondria (this is result of a typical experiment).

<sup>4</sup> Fig. 4. Evaluation of energy-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation in isolated mitochondria by changes in Fluo-4 fluorescence intensity (this is result of a typical experiment).

<sup>5</sup> Fig. 5. Simultaneous changes in the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  (a) and  $\text{H}^+$  (b) in the mitochondrial matrix under the condition of functioning of the  $\text{H}^+-\text{Ca}^{2+}$ -exchanger (this is result of a typical experiment).

<sup>6</sup> Fig. 6. Influence of chalcone calix[4]arenes on  $\text{Ca}^{2+}$  exchange (for  $\text{Ca}^{2+}$  metabolism) in isolated mitochondria. Energy-dependent accumulation (a), pH-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  yield (b). 100%—changes in the fluorescent signal from Fluo-4 at the absence of calix[4]arenes.  $M \pm m$ ,  $n = 4$ .

<sup>7</sup> Fig. 7. Energy-dependent accumulation of  $\text{Ca}^{2+}$  by mitochondria in the control and in the presence of calix[4]arene C-1012. The arrow indicates the time of introduction of  $80 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  to mitochondria (a). Linearization of the obtained data for the calculation of the main kinetic parameters of the transport process (b). (This is result of a typical experiment.)

<sup>8</sup> Fig. 8. Changes in the main kinetic parameters of energy-dependent accumulation of  $\text{Ca}^{2+}$  by mitochondria in the control and in the presence of chalcone calix[4]arenes.  $M \pm m$ ,  $n = 4$ . a—initial velocity  $V_0$  of the transport process; all changes are significant relative to control,  $p < 0.05$ . b—characteristic time of the transport process  $\tau_{1/2}$ ; \*changes are significant relative to control,  $p < 0.05$ .

<sup>9</sup> Fig. 9. Influence of chalcone calix[4]arenes on the activity of mitochondrial NO-synthase.  $M \pm m$ ,  $n = 4-6$ .