

# Калікс[4]арени як модулятори енергозалежної акумуляції $\text{Ca}^{2+}$ та функціонування електронно-транспортного ланцюга в мітохондріях гладенького м'яза

Г.В. Данилович<sup>1</sup>, Ю.В. Данилович<sup>1</sup>, Р.В. Родік<sup>2</sup>, В.І. Кальченко<sup>2</sup>, О.Ю. Чуніхін<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ; <sup>2</sup>Інститут органічної хімії НАН України, Київ; e-mail: danylovych@biochem.kiev.ua; vik@bpci.kiev.ua

*Вивчено вплив супрамолекулярних макроциклічних сполук калікс[4]аренів (C-97, C-99, C-107) у концентрації 100 нмоль/л на процес енергозалежного транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  в ізольованих мітохондріях гладенького м'яза, а також аутофлуоресценцію мітохондріальних коензимів нікотинамідаденіндинуклетиду (НАДН) та флавінаденіндинуклеотиду (ФАД) і гідродинамічний діаметр цих органел. Із використанням  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливого флуоресцентного барвника Fluo-4 AM показано, що вибрані калікс[4]арени пригнічують енергозалежну акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями. Накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  (80 мкмоль/л в середовищі) супроводжується зростанням флуоресцентної відповіді зонда до  $1,57 \pm 0,04$  відн. од. За дії калікс[4]аренів C-97, C-99, C-107 флуоресцентний сигнал знижувався до значень  $0,88 \pm 0,08$ ,  $0,92 \pm 0,08$  та  $0,78 \pm 0,04$  відн. од. відповідно. Отже, вибрані калікс[4]арени призводять до вивільнення попередньо акумульованого мітохондріями  $\text{Ca}^{2+}$ . За дії C-97 та C-99 флуоресцентний сигнал від НАДН знижується до  $-0,11 \pm 0,02$  та  $-0,12 \pm 0,02$  відн. од. відповідно щодо контрольного значення  $-0,05 \pm 0,01$  відн. од. Аналіз флуоресцентної відповіді НАДН та ФАД у суспензії ізольованих мітохондрій свідчить, що вплив досліджуваних сполук на функціональну активність електронно-транспортного ланцюга пов'язаний із початковим стимулюванням активності I комплексу та наступним пригніченням  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних НАД-вмісних дегідрогеназ циклу Кребса. Разом з цим використання методу фотонної кореляційної спектроскопії для оцінки зміни об'єму мітохондрій (їхнього гідродинамічного діаметра) за дії вибраних калікс[4]аренів показало, що втручання в роботу електронно-транспортного ланцюга призводить до змін осмотичного балансу між матриксом мітохондрій і зовнішнім середовищем, наслідком чого є зростання об'єму ізольованих органел. Зокрема, за присутності C-97 гідродинамічний діаметр мітохондрій зростає на  $22 \pm 6\%$ , а C-99 – на  $34 \pm 8\%$ . Отже, одержані результати свідчать про доцільність подальших досліджень впливу калікс[4]аренів на  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаз та біоенергетику мітохондрій клітин гладеньких м'язів для пошуку ефективних модифікаторів їхньої функціональної активності.*

*Ключові слова:* мітохондрії; електронно-транспортний ланцюг; транспорт  $\text{Ca}^{2+}$ ; гладенькі м'язи.

## ВСТУП

Електрохімічний потенціал на внутрішній мітохондріальній мембрані є регулятором таких ключових структур як АТФ-синтаза та пора перехідної провідності, а його величина вказує на ефективність функціонування дихального ланцюга. Електричний потенціал мітохондрій регулює локалізовані в ній катіон-транспортувальні системи, зумовлю-

© Г.В. Данилович, Ю.В. Данилович, Р.В. Родік, В.І. Кальченко, О.Ю. Чуніхін

ючи важливу роль цих органел в підтриманні  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостазу клітин гладеньких м'язів [1-3].

Генерація потенціалу мітохондріальної мембрани забезпечується комплексами I – IV дихального ланцюга, а первинними переносниками електронів при окиснювальному фосфорилуванні є коензими нікотинамідаденіндинуклеотид (НАДН) та флавінаденіндинуклеотид (ФАДН<sub>2</sub>). Їх окиснен-

ня у мітохондріальному електронно-транспортному ланцюзі призводить до транслокації протонів через комплекси I, III та IV внутрішньої мембрани з матриксу у міжмембранний простір, а протонний градієнт разом з АДФ контролюють швидкість синтезу АТФ мітохондріями. Порушення дихання мітохондрій відображається в змінах редокс-стану піридинового та флавінового нуклеотидів. Таким чином, співвідношення окисненої та відновленої форм НАДН та ФАДН<sub>2</sub> є показником біоенергетики мітохондрій. НАДН та окислена форма ФАДН<sub>2</sub> – ФАД володіють власною флуоресценцією, зміни якої можуть відображати редокс-стан внутрішньомітохондріальних аденінових нуклеотидів, а, отже, бути маркером функціональної активності мітохондрій [4,5].

Зростання концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксі, передусім за рахунок стимуляції його транспорту  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортером, що функціонує як електрофоретична система, супроводжується активацією мітохондріальних дегідрогеназ (піруватдегідрогеназний комплекс та НАД-вмісні дегідрогенази циклу Кребса, зокрема  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназа та ізоцитратдегідрогеназа) [6]. Отже, зміни концентрацій  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях за дії як ендогенних, так і екзогенних модифікаторів (в тому числі фармакологічних агентів), є суттєвим чинником впливу на функціонування електронно-транспортного ланцюга. Тому пошук речовин, які здатні змінювати концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксі мітохондрій клітин гладеньких м'язів, що мають вирішальне значення у забезпеченні функціонування внутрішніх органів, і, відповідно, інтенсивність роботи електронно-транспортного ланцюга, є важливою проблемою сучасної молекулярної фізіології і біохімії.

У біохімічних і фізіологічних дослідженнях останніх років значна увага приділяється супрамолекулярним макроциклічним сполукам – калікс[4]аренам, а саме їх здатності модулювати перебіг катіон-транс-

портувальних процесів в субклітинних структурах [7]. У поле нашого зору увійшли калікс[4]арени – С-97, С-99, С-107, які можуть впливати як на потенціал плазмалеми, у зв'язку з убаїноподібним інгібуванням  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазної активності, так і на потенціал внутрішньої мембрани мітохондрій клітин гладенького м'яза матки (міометрія). Вибрані калікс[4]арени в концентраціях 50-100 нмоль/л викликали деполаризацію плазмалеми міоцитів та транз'єнтну (5-10 хв) гіперполяризацію внутрішньої мітохондріальної мембрани [8].

Метою роботи було дослідження впливу калікс[4]аренів – С-97, С-99, С-107 на енергозалежну акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  та зміни аутофлуоресценції піридинового та флавінового аденіндинуклеотидів в ізольованих мітохондріях гладенького м'яза матки щурів.

## МЕТОДИКА

*Одержання фракції мітохондрій міометрія.* Препарат ізольованих мітохондрій одержували із міометрія невагітних щурів за допомогою диференційного центрифугування [9]. Наркотизацію щурів викликали інгаляцією діетилового ефіру, після чого їх декапітували. Дотримувались усіх вимог щодо роботи з лабораторними тваринами (Міжнародна конвенція, Страсбург, 1986). Після видалення матки і очищення її від жирової та сполучної тканини, препарат тримали у 0,9 %-му розчині  $\text{NaCl}$ . Міометрій подрібнювали ножицями на шматочки розміром приблизно 2x2 мм, які переносили у робочий розчин з температурою 4 °С наступного складу (ммоль/л): 10–HEPES (pH 7,4), 250–цукроза, 1–EGTO. Тканину подрізували за допомогою гомогенізатору типу «Політрон» тричі по 20 с із охолодженням на льоду протягом 1 хв, співвідношення тканина : робочий розчин складала 1 : 9. Гомогенат центрифугували протягом 15 хв при 1 тис. г за 4 °С. Супернатант центрифугували протягом 15 хв при 12 тис. г за 4 °С. Осад

ресуспендували у робочому розчині складу (ммоль/л): 10–HEPES (рН 7,4), 250 – цукроза. Знову центрифугували протягом 15 хв при 12 тис. g за 4 °С. Впродовж експерименту одержану фракцію ізольованих мітохондрій зберігали на льоду. Визначали вміст білка у фракції мітохондрій за стандартним методом Bradford [10]. Середнє його значення було 2 мг/мл, а в пробі – 50 мкг/мл.

*Процедура навантаження мітохондрій флуоресцентним зондом Fluo-4 AM.* Навантаження мітохондрій зондом Fluo-4 AM в концентрації 2 мкмоль/л проводили у середовищі, яке містило 10 ммоль/л HEPES (рН 7,4, 37 °С), 250 ммоль/л цукрози, 0,1 % бичачий сироватковий альбумін, протягом 30 хв при 37 °С. Для покращення процесу навантаження змішували барвник із Pluronic F-127 (0,02 %) [11].

*Дослідження вмісту іонізованого Са в мітохондріях із використанням методу протокової цитофлуориметрії.* Відносні значення вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксі мітохондрій, навантажених Fluo-4 AM, реєстрували за допомогою методу протокової цитофлуориметрії на протоковому цитометрі COULTER EPICS XLTM (Beckman Coulter, США) з аргонним лазером ( $\lambda_{\text{зб.}} = 488$  нм,  $\lambda_{\text{фл.}} = 520$  нм, канал F11; програмне забезпечення SYSTEM ПТМ Software; “Beckman Coulter”, США). Використовували робочий протокол аналізу зразків, який був створений для характеристики фракції ізольованих мітохондрій міометрія. Події для аналізу обирали введенням логічного обмеження за параметрами бічного та прямого світлорозсіювання (SS та FS) в протокол протокового цитофлуориметра. Аналіз проб припиняли за умови реєстрації 10000 подій в межах виділеної ділянки. Середовище, з якого здійснювалась енергозалежна акумуляція  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями, мало склад (об’єм 2 мл, ммоль/л): 20–HEPES (рН 7,4, 37 °С), 250–цукроза, 2–калій-фосфатний буфер (рН 7,4, 37 °С), 3– $\text{MgCl}_2$ , 3–АТФ, 5–сукцинат натрію, концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  становила 80 мкмоль/л.

Енергозалежну акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  проводили протягом 5 хв. Величину флуоресцентної відповіді наводили у відносних одиницях як  $F/F_0$ , де  $F_0$  – початковий рівень флуоресценції,  $F$  – флуоресцентний сигнал після внесення діючих речовин.

*Реєстрація флуоресценції НАДН та ФАД в мітохондріях із використанням методу спектрофлуориметрії.* Реєстрацію відносних значень рівня власної флуоресценції НАДН ( $\lambda_{\text{зб.}} = 350$  нм,  $\lambda_{\text{фл.}} = 450$  нм) та ФАД ( $\lambda_{\text{зб.}} = 450$  нм,  $\lambda_{\text{фл.}} = 533$  нм) у фракції мітохондрій міометрія досліджували із використанням флуориметричного методу на спектрофлуориметрі Quanta Master 40 РТІ (Канада) із програмним забезпеченням FelixGX 4.1.0.3096. Дослідження проводили в середовищі наступного складу (об’єм 2 мл, ммоль/л): 20–Hepes (рН 7,4, 37 °С), 2– $\text{K}^+$ -фосфатний буфер (рН 7,4, 37 °С), 120– $\text{KCl}$ , 5–піруват натрію, 5–сукцинат натрію, аліквота (100 мкл) мітохондрій фракції містила 100 мкг білка. Відносні одиниці флуоресценції від НАДН та ФАД розраховували як відношення  $(F-F_0)/F_0$ , де  $F_0$  – початковий флуоресцентний сигнал,  $F$  – флуоресцентний сигнал за відповідні проміжки часу. В експериментах щодо впливу ротенону, антимицину враховували власну флуоресценцію цих речовин.

*Визначення гідродинамічного діаметра мітохондрій.* Значення гідродинамічного діаметра мітохондрій оцінювали за допомогою лазерного кореляційного спектрометра ZetaSizer-3 (Malvern Instruments, Велика Британія) з обчислювальним блоком-корелятором марки Computing correlator type 7032 та гелій-неоновим лазером ЛГН-111 із  $\lambda = 633$  нм і потужністю 25 мВт. Реєстрацію автокореляційної функції розсіюваного від суспензії мітохондрій лазерного опромінення проводили протягом 1 хв, 10-разово, під кутом розсіювання 90°. Автокореляційну функцію обробляли за допомогою стандартної комп’ютерної програми PCS-Size mode v 1.61. Склад середовища інкубацій (1 мл) відповідав опи-

саному вище для вивчення флуоресценції нуклеотидів. Аліквота мітохондріальної фракції була 50 мкл, що відповідало 50 мкг за білком.

Кожний експериментальний графік, котрий наведено в статті, являв собою типовий результат, що відтворювався 5 разів. Статистичний аналіз отриманих результатів проводили з використанням пакету стандартних програм IBM PC, застосовуючи загальновідомі методи [12] і критерій t Стьюдента.

Синтезували каліксаренфосфонові кислоти C-97 (5-біс(дигідроксифосфорил)метил-25,27-дипропоксикалікс[4]арен, C-99 (5,17-біс(дигідроксифосфонілметил)-25,27-дипропоксикалікс[4]арен, C-107 (5,17-ди(фосфоно-2-піридилметил)аміно-11,23-ди-трет-бутил-26,28-дигідрокси-5,27-дипропоксикалікс[4]арен) у відділі хімії фосфоранів Інституту органічної хімії НАН України під керівництвом член-кор. НАН України Кальченка В.І.

Калікс[4]арени розчиняли в ДМСО. При проведенні експериментів контролем слугувало внесення аліквоти розчинника до середовища інкубації.

В роботі були використані наступні реактиви: НЕРЕС, диметилсульфоксид (ДМСО), піруват натрію, сукцинат натрію, цукроза, АТФ, виробництва фірми «Sigma» (США), Fluor-4 AM, Pluronic F-127 – «Invitrogen» (США), бичачий сироватковий альбумін, мінеральні солі вітчизняного виробництва.

Розчини готували на бідистильованій воді, яка мала питому електропровідність не більше ніж 2,0 мкСм/см. Електропровідність води реєстрували за допомогою кондуктометра ОК-102/1 (Угорщина).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Основним механізмом, який забезпечує надходження  $\text{Ca}^{2+}$  до матрикса мітохондрій, є функціонування низькоафінного  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортера, що забезпечує потенціалзалежний, високоємнісний, чутливий до рутенієвого червоного шлях акумуляції катіона, активність якого оптимальна за мікромолярних концентрацій позамітохондріального  $\text{Ca}^{2+}$  [1-2, 13]. Вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з мітохондрій гладеньких м'язів відбувається значною мірою за участю  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника. Ця транспортна система в певних умовах здатна забезпечити як  $\Delta\text{pH}$ -залежне вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з мітохондрій (аверсний режим), так і акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  з цитозолу за відносно низьких (субмікромолярних) концентрацій катіона (реверсний режим) [1-3, 14].

Структурні формули досліджуваних калікс[4]аренів представлені на рис. 1. В основі їх будови лежить макроциклічне поліфенольне кільце – так звана “калікс[4]аренова чаша”, яка має замісники різної хімічної природи на верхньому вінці. Вибрані калікс[4]арени відрізняються взаєморозташуванням фосфонових залишків на

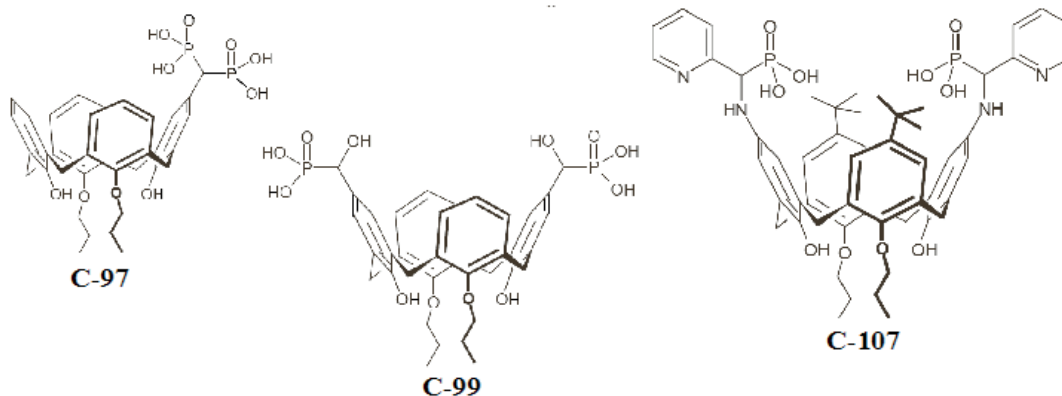


Рис.1. Структурні формули досліджуваних калікс[4]аренів

фенольних кільцях «калікс[4]аренової чаші». У випадку С-107 до складу замісників входить також азотовмісний гетероцикл (залишок піридину). Слід зазначити, що суто «калікс[4]аренова чаша» та замісники окремо не впливають на катіон-транспортувальні системи та поляризацію субклітинних структур міометрія [8]

Проведені дослідження виявили, що калікс[4]арени С-97, С-99 та С-107 в концентрації 100 нмоль/л мають тенденцію до зниження вмісту ендogenous іонізованого  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях за умови 5-хвилинної передінкубації з ними фракції органел (рис. 2, а). Втім, зазначені зміни не є статистично вірогідними. Також калікс[4]арени перешкоджають наступній енергозалежній акумуляції катіону, а у випадку С-99 спостерігається тенденція до ще більшого зниження рівня іонізованого  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксі мітохондрій. Внесення калікс[4]аренів у середовище інкубації після енергозалежної акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями призводить до статистично значущого зниження його вмісту, навіть нижче від базального (див. рис. 2, б). Такі ефекти не залежали від хімічної структури та взаєморозташування замісників у макроциклі. З нашої точки зору, гальмування енергозалежного транспорту Са в мітохондрії зумовлено адитивною дією: «каліксаренова

чаша» і замісники. Причому у випадку впливу калікс[4]аренів на досліджувану транспортувальну систему хімічна природа замісників не має вирішального значення.

Наші попередні дослідження виявили, що калікс[4]арени С-97 та С-99 здатні стимулювати  $\Delta\text{pH}$ -залежний вихід іонів Са з мітохондрій гладенького м'яза матки [15].

Отже, вибрані калікс[4]арени можуть пригнічувати енергозалежну акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями міометрія та знижувати концентрацію катіона, попередньо накопиченого в енергозалежному процесі, стимулюючи  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник їхньої внутрішньої мембрани. Але ефект вибраних калікс[4]аренів на  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальні системи мітохондрій є меншим, ніж на катіон-транспортувальні ензими плазматичної мембрани, зокрема  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФазу [16]. Така дія досліджуваних сполук може призвести до зниження активності  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних мітохондріальних дегідрогеназ і відповідного гальмування роботи електронно-транспортного ланцюга. Щоб перевірити це припущення необхідно вивчити вплив досліджуваних калікс[4]аренів на функціональну активність електронно-транспортного ланцюга, маркером активності якого, як зазначалось, виступає редокс-стан піридинового та флавінового нуклеотидів.

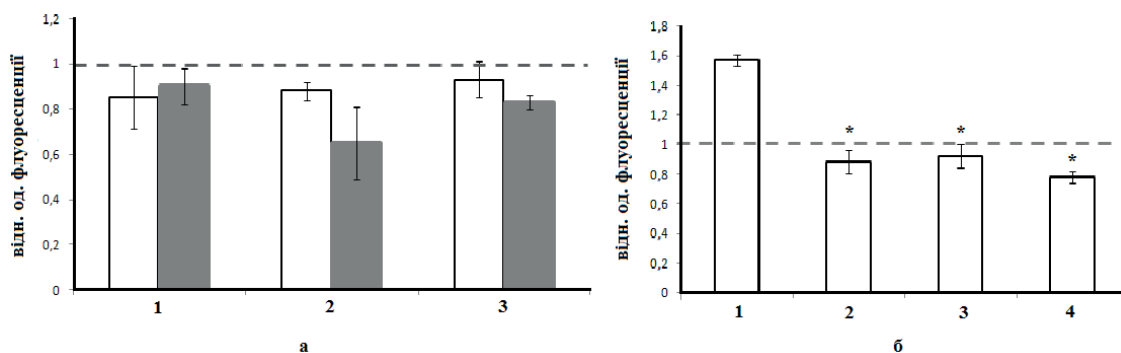


Рис.2. Вплив калікс[4]аренів на трансмембранний обмін  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях міометрія. Вміст іонізованого  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксі: а – за умови передінкубації суспензії мітохондрій з калікс[4]аренами (100 нмоль/л): 1 – С-97, 2 – С-99, 3 – С-107; прозорі стовпчики – передінкубація 5 хв з калікс[4]аренами, сірі стовпчики - додавання 80 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  в стандартному середовищі інкубації для енергозалежної акумуляції.

б – за умови попередньої енергозалежної акумуляції: 1 – додавання 80 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$ , 2 – С-97, 3 – С-99, 4 – С-107.

За 1 прийнято рівень іонізованого  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях (базальний) до внесення іонів Са та калікс[4]аренів. \*  $P < 0,05$  відносно значень при додаванні 80 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$



Для того, щоб продемонструвати відповідність між роботою електронно-транспортного ланцюга та окисно-відновним статусом аденінових нуклеотидів було проведено ряд попередніх досліджень. Вивчали залежність змін флуоресцентного сигналу НАДН та ФАД в нормі та за умова специфічного блокування I та III комплексів дихального ланцюга, а також при додаванні протонифору.

Виявлено реципрокність змін флуоресценції НАДН та ФАД. За присутності в середовищі інкубації пірувату та сукцинату (5 ммоль/л) флуоресценція від НАДН знижується, за рахунок функціонування I комплексу дихального ланцюга, флуоресценція від ФАД зростає (відповідно вміст  $\text{ФАДН}_2$  – знижується), що зумовлено роботою II комплексу (сукцинатдегідрогенази) (рис. 3). Ці результати відповідають уявленням інших авторів щодо змін редокс-стану зазначених нуклеотидів за нормального функціонування електронно-транспортного ланцюга у присутності субстратів дихання [4].

Блокування I комплексу ротеноном (5 мкмоль/л) або III комплексу антимицином А (1 мкг/мл) [17] призводило до зростання рівня флуоресценції НАДН, та не відображалось на флуоресценції від ФАД. У разі дії антимицину

інтенсивність окиснення ФАД була меншою, ніж в контролі, тобто повного блокування активності II комплексу не спостерігалось (графічні результати не наведено).

Протонофор СССР (10 мкмоль/л) викликав більш інтенсивне зниження флуоресценції від НАДН та ФАД, що вказує на посилення роботи I комплексу, але одночасно пригнічувалась активність II комплексу (графічні дані не наведено). Відомо, що внаслідок руйнування градієнту  $\text{H}^+$  відбувається роз'єднання дихання та окисного фосфорилування, наслідком чого є компенсаторне посилення функціональної активності окремих елементів дихального ланцюга мітохондрій [18].

Таким чином, одержані нами попередні результати свідчать про можливість дослідження функціональної активності електронно-транспортного ланцюга ізольованих мітохондрій міометрія, використовуючи експериментальні дані щодо змін власної флуоресценції коензимів НАДН та ФАД.

Внесення калікс[4]аренів спричинювало більш інтенсивне зниження флуоресценції від НАДН ізольованих мітохондрій порівняно з ДМСО, який використовували як контроль (рис. 4, а, б), що може бути зумовлено

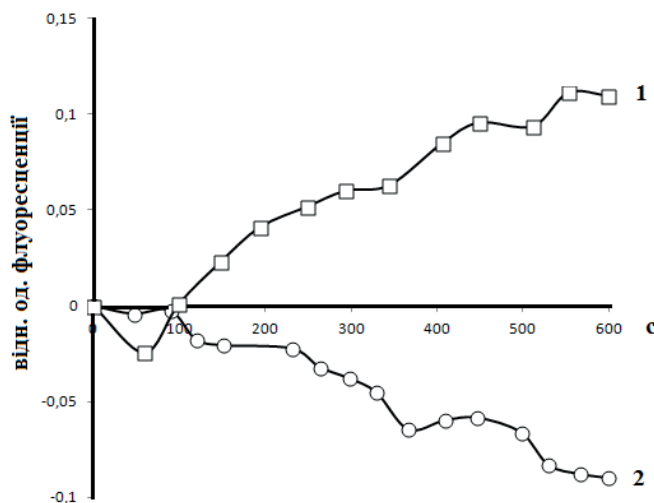


Рис. 3. Зміни флуоресценції від ФАД (1) та НАДН (2) в ізольованих мітохондріях клітин міометрія. Результати типового експерименту

стимулюванням І комплексу. Як зазначалося вище, калікс[4]арени зумовлюють транзйентне зростання потенціалу внутрішньої мітохондріальної мембрани, яке триває близько 5 хв [8]. Вихід іонів Ca з матриксу, спричинений досліджуваними сполуками, з часом може призвести до зниження активності ензимів циклу трикарбонових кислот з відповідним гальмуванням електронно-транспортного ланцюга та зменшенням поляризації мітохондріальної мембрани, що і пояснює лише короткотривалий їхній гіперполяризуючий ефект. Поряд з цим спостерігається відсутність змін флуоресценції від ФАД відносно ДМСО (рис. 4, в).

Важливою морфологічною ознакою дії речовин-модифікаторів функціонування дихального ланцюга та трансмембранного обміну катіонів в мітохондріях є зміна об'єму органел. Прецизійною методикою вивчення їхнього набухання є фотонна кореляційна

спектрометрія, яка дає змогу оцінити зміни гідродинамічного діаметра субклітинних структур [19].

Середнє значення гідродинамічного діаметра мітохондрій становило  $547 \pm 49$  нм, а за наявності аламетицину ( $7,5$  мкг/мл) збільшилося до  $800 \pm 39$  нм. Аламетицин використовується як потенційно найменш агресивний чинник пермеабілізації внутрішньої мітохондріальної мембрани [20]. Зміни гідродинамічного діаметра за дії аламетицину ми застосували як контроль –  $100\%$  набухання. Калікс[4]арени викликали збільшення цього показника в середньому на  $22 \pm 6\%$  (С-97) та  $34 \pm 8\%$  (С-99) щодо контролю (рис. 5).

Калікс[4]арени здатні в дослідах *in vitro* впливати на  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальні процеси в мітохондріях гладенького м'язу та змінювати їхню енергетику. Результати наших досліджень вказують на те, що дія калікс[4]аренів на  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальні системи

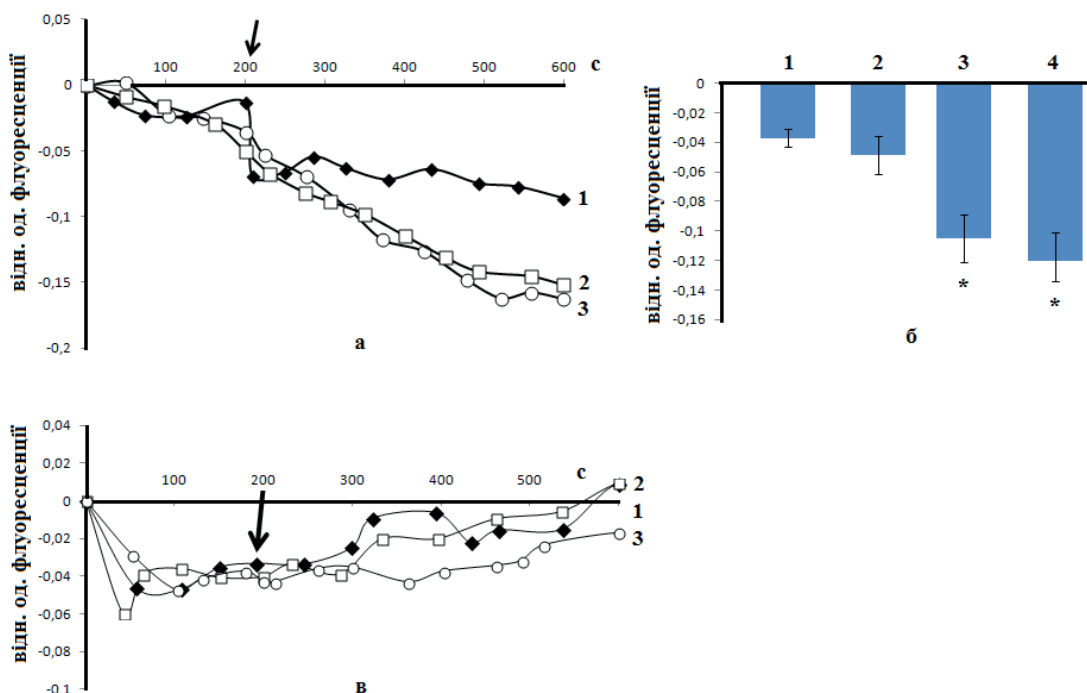


Рис. 4. Зміни флуоресценції від НАДН (а, б) та ФАД (в) за впливу калікс[4]аренів. 1 – внесення ДМСО, 2 –  $100$  нмоль/л С-97, 3 –  $100$  нмоль/л С-99. Дані типового експерименту (а, в; стрілочкою вказано момент додавання ефекторів) та статистична обробка експериментальних результатів для НАДН (б): 1 – зміни флуоресценції від НАДН у контролі, 2 – внесення ДМСО, 3 –  $100$  нмоль/л С-97, 4 –  $100$  нмоль/л С-99. \*  $P \leq 0,05$  відносно значень флуоресценції НАДН за наявності ДМСО. Для розрахунків середніх показників використовували величини флуоресцентного сигналу на 10-й хвилині інкубації

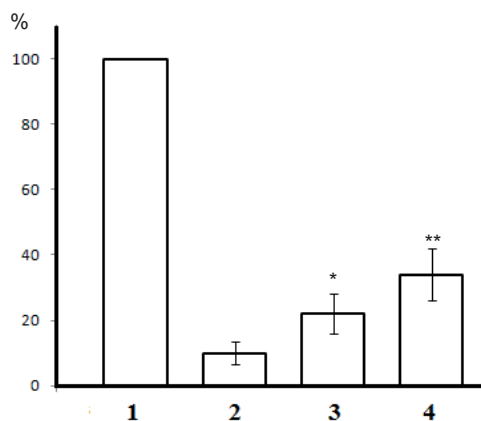


Рис. 5. Зміни гідродинамічного діаметра мітохондрій за дії калікс[4]аренів. 1 – контрольне (100 %) набухання в присутності аламетицину (7,5 мкг/мл), 2 – ДМСО, 3 – 100 нмоль/л С-97, 4 – 100 нмоль/л С-99. \*  $P \leq 0,1$ , \*\*  $P < 0,05$  відносно змін гідродинамічного діаметра за наявності ДМСО

мітохондрій спрямована на зниження концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у матриксі, а аналіз флуоресцентної відповіді НАДН та ФАД свідчить, що вплив калікс[4]аренів на функціональну активність електронно-транспортного ланцюга, передусім, пов'язаний із стимулюванням активності  $\text{I}^{\text{ro}}$  комплексу з послідуєчим пригніченням  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних НАД-вмісних дегідрогеназ циклу Кребса. Зміни у функціонуванні електронно-транспортного ланцюга, викликані калікс[4]аренами, призводять до змін осмотичного балансу між матриксом мітохондрій та зовнішнім середовищем.

*Автори висловлюють щире вдячність академіку НАН України, професору С.О. Костеріну за цінні рекомендації під час обговорення експериментальних результатів і в процесі написання рукопису.*

**А.В. Данилович<sup>1</sup>, Ю.В. Данилович<sup>1</sup>, Р.В. Родик<sup>2</sup>, В.І. Кальченко<sup>2</sup>, А.Ю. Чунихин<sup>1</sup>**

#### **КАЛИКС[4]АРЕНЫ КАК МОДУЛЯТОРЫ ЭНЕРГОЗАВИСИМОЙ АККУМУЛЯЦИИ $\text{Ca}^{2+}$ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ЭЛЕКТРОННО-ТРАНСПОРТНОЙ ЦЕПИ В МИТОХОНДРИЯХ ГЛАДКИХ МЫШЦ**

Изучено влияние супрамолекулярных макроциклических соединений калікс[4]аренов (С-97, С-99, С-107) в

концентрации 100 нмоль/л на процесс энергозависимого транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  в изолированных митохондриях гладких мышц, а также аутофлуоресценцию митохондриальных коэнзимов никотинамидадениндинуклеотида (НАДН) и флавинадениндинуклеотида (ФАД) и гидродинамический диаметр этих органелл. С использованием  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительного флуоресцентного красителя Fluo-4 AM показано, что выбранные калікс[4]арены подавляют энергозависимую аккумуляцию  $\text{Ca}^{2+}$  митохондриями. Накопление  $\text{Ca}^{2+}$  (80 мкмоль/л в среде) сопровождается ростом флуоресцентного ответа зонда от условной единицы до величины  $1,57 \pm 0,04$  отн. ед. флуоресценции. При действии калікс[4]аренов С-97, С-99, С-107 флуоресцентный сигнал снижался до значений  $0,88 \pm 0,08$ ,  $0,92 \pm 0,08$  и  $0,78 \pm 0,04$  отн. ед. соответственно. Итак, выбранные калікс[4]арены приводят к высвобождению предварительно аккумулированного митохондриями  $\text{Ca}^{2+}$ . Под действием С-97 и С-99 флуоресцентный сигнал от НАДН снижается до  $-0,11 \pm 0,02$  и  $-0,12 \pm 0,02$  отн. ед. соответственно по отношению к контрольному значению –  $-0,05 \pm 0,01$  отн. ед. Анализ флуоресцентного ответа НАДН и ФАД в суспензии изолированных митохондрий свидетельствует, что влияние исследуемых соединений на функциональную активность электронно-транспортной цепи связано с начальным стимулированием активности  $\text{I}^{\text{ro}}$  комплекса и последующим угнетением  $\text{Ca}^{2+}$  зависимых НАД-содержащих дегидрогеназ цикла Кребса. Наряду с этим использование метода фотонной корреляционной спектроскопии для оценки изменения объема митохондрий (их гидродинамического диаметра) под действием выбранных калікс[4]аренов показало, что вмешательство в работу электронно-транспортной цепи приводит к изменениям осмотического баланса между матриксом митохондрий и внешней средой, следствием чего является рост объема изолированных органелл. В частности, в присутствии С-97 гидродинамический диаметр митохондрий увеличился на  $22 \pm 6\%$ , а С-99 - на  $34 \pm 8\%$ . Итак, полученные результаты свидетельствуют о целесообразности дальнейших исследований влияния калікс[4]аренов на  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаз и биоэнергетику митохондрий клеток гладких мышц с целью поиска эффективных модификаторов их функциональной активности. Ключевые слова: митохондрии; электронно-транспортная цепь; транспорт  $\text{Ca}^{2+}$ ; гладкие мышцы.

**H.V. Danylovych<sup>1</sup>, Yu.V. Danylovych<sup>1</sup>, R.V. Rodik<sup>2</sup>, V.I. Kalchenko<sup>2</sup>, A.Ju. Chunikhin<sup>1</sup>**

#### **CALIX[4]ARENES AS MODULATORS OF ENERGY-DEPENDENT $\text{Ca}^{2+}$ -ACCUMULATION AND FUNCTIONING OF THE ELECTRON TRANSPORT CHAIN IN SMOOTH MUSCLE MITOCHONDRIA**

The influence of supramolecular macrocyclic compounds calix[4]arenes (C-97, C-99, C-107) at a concentration of



100 nM in the process of energy-dependent  $\text{Ca}^{2+}$ -transport in isolated mitochondria of smooth muscle, as well as autofluorescence mitochondrial coenzyme NADH, FAD and hydrodynamic diameter of these organelles was investigated. Using  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive fluorescent dye Fluo-4 AM it was shown that the selected calix[4]arenes can suppress energy-dependent accumulation of  $\text{Ca}^{2+}$  by mitochondria. Accumulation of  $\text{Ca}^{2+}$  (80  $\mu\text{M}$  in the medium) accompanied by the growth of the fluorescent probe response from a conventional unit to a value of  $1,57 \pm 0,04$  ( $n=5$ ). Calix[4]arenes C-97, C-99, C-107 falls fluorescent signal below the  $0,88 \pm 0,08$ ,  $0,92 \pm 0,08$  and  $0,78 \pm 0,04$  respectively. Thus, the selected calix[4]arenes lead to release of previously accumulated  $\text{Ca}^{2+}$  from mitochondria. Under the influence of C-97 and C-99 fluorescent signal from NADH reduced to  $-0,11 \pm 0,02$  and  $-0,12 \pm 0,02$ , respectively, in relation to the reference value  $-0,05 \pm 0,01$  ( $n=5$ ). Analysis of fluorescence response NADH and FAD in a suspension of isolated mitochondria suggests that the effects of test compounds on the functional activity of the electron transport chain is associated with the initial stimulation of its I-th complex and subsequent inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent NAD-containing Krebs cycle dehydrogenases. Along with this, the use of photon correlation spectroscopy to assess changes in the volume of mitochondria (their hydrodynamic diameter) under the action of selected calix[4]arenes has shown that interference with the electron transport chain leads to changes in the osmotic balance between the matrix of the mitochondria and the external environment. The result is the growth of isolated organelles volume. In particular, the hydrodynamic diameter of mitochondria increased by  $22 \pm 6\%$  and  $34 \pm 8\%$  ( $n=5$ ) in presence of C-97 or C-99. The conclusion was done about the advisability of further studies of the calyx[4]arenes effect on smooth muscle  $\text{Ca}^{2+}$ -homeostase and mitochondrial bioenergetics in order to find effective modifiers of their functional activity.

Keywords: mitochondria; electron transport chain;  $\text{Ca}^{2+}$ -transport; smooth muscle.

<sup>1</sup>*Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;* <sup>2</sup>*Institute of Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;* e-mail: *danylovykh@biochem.kiev.ua; vik@bpci.kiev.ua*

## REFERENCES

1. Kostyuk PG, Kostyuk OP, Lukyanets EA. Intracellular calcium signaling: structures and functions. Kiev: Naukova dumka, 2010. [Ukrainian].
2. Santo-Domingo J, Demareux N Calcium uptake mechanisms of mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Jun-Jul;1797(6-7):907-12
3. Pan S<sup>1</sup>, Ryu SY, Sheu SS. Distinctive characteristics and functions of multiple mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  influx mechanisms. *Sci China Life Sci*. 2011 Aug;54(8):763-9
4. Wang HW, Wei YH, Guo HW. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) fluorescence for detection of cell death. *Anticancer Agent Med Chem*. 2009; 9(9):1012-7
5. Heikal AA. Intracellular coenzymes as natural biomarkers for metabolic activities and mitochondrial anomalies. *Biomark Med*. 2010;4(2):241-63.
6. Gellerich FN, Gizatullina Z, Trumbeckaite S, Nguyen HP, Pallas T, Arandarcikaite O, Vielhaber S, Seppet E, Striggo F. The regulation of OXPHOS by extramitochondrial calcium. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1797(6-7):1018-27.
7. Giuliani M, Morbioli I, Sansone F, Casnati A moulding calixarenes for biomacromolecule targeting. *Chem. Commun.*, 2015, DOI: 10.1039/C5CC05204A.
8. Danylovykh HV, Danylovykh IuV, Kolomiets' OV, Kosterin SO, Rodik RV, Cherenok SO, Kal'chenko VI, Chunikhin OIu, Horchev VF, Karakhim SO. Changes in polarization of myometrial cells plasma and internal mitochondrial membranes under calixarenes action as inhibitors of plasma membrane  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase. *Ukr Biokhim Zh* (1999). 2012 Nov-Dec;84(6):37-48. [Ukrainian].
9. Kosterin SA, Bratkova NF, Kursky MD. The role of sarcolemma and mitochondria in  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent control of myometrium relaxation. *Biochemistry (Moscow)*. 1985; 50(8):1350-1361. [Russian].
10. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72:248-54.
11. Kolomiets' OV, Danylovykh IuV, Danylovykh HV, Kosterin SO.  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation study in isolated smooth muscle mitochondria using Fluo-4 AM. *Ukr Biochem J*. 2013 Jul-Aug;85(4):30-9 [Ukrainian].
12. Bailay NTJ. *Statistical methods in biology*. Great Britain: Cambridge University Press; 1995.
13. Malli R, Graier WF. Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  channels: Great unknowns with important functions. *FEBS Lett*. 2010; 584:1942-47.
14. Wei AC, Liu T, Cortassa S, Winslow RL, O'Rourke B. Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  influx and efflux rates in guinea pig cardiac mitochondria: low and high affinity effects of cyclosporine A. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813:1373-81.
15. Kolomiets' OV, Danylovykh IuV, Danylovykh GV.  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -exchanger in the myometrium mitochondria: modulation of exogenous and endogenous compounds. *Fisiol. Zh*. 2014;60(5):33-42. [Ukrainian].
16. Veklich TO, Koshechkova NS, Rodik RV, Boiko VI, Vorobets' ZD, Kosterin SO. Comparative study of calixarene effect on  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  -ATPase activity in plasma membrane of contractile and mobile cell. *Ukr Biokhim Zh* (1999). 2007;79(3):19-28. [Ukrainian].
17. Agarwal B, Dash RK, Stowe DF, Bosnjak ZJ, Camara AK. Isoflurane modulates cardiac mitochondrial bioenergetics by selectively attenuating respiratory complexes. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1837(3): 354–365.

18. Watzke N<sup>1</sup>, Diekert K, Obrdlik P. Electrophysiology of respiratory chain complexes and the ADP-ATP exchanger in native mitochondrial membranes. *Biochemistry*. 2010 Dec 7;49(48):10308-18.
19. Kandaurova N.V., Chunikhin A.Ju., Babich L.G., Shlykov S.G., Kosterin S.O. Modulators of transmembrane calcium exchange in myometrium mitochondria change their hydrodynamic diameter. *Ukr Biochem J*. 2010;82(6):52-57. [Ukrainian].
20. Gostimskaya IS, Grivennikova VG, Zharova TV, Bakeeva LE, Vinogradov AD. In situ assay of the intramitochondrial enzymes: use of alamethicin for permeabilization of mitochondria. *Anal Biochem*. 2003;313(1):46-52.

*Матеріал надійшов  
до редакції 14.12.2015*