

PACS numbers: 81.16.Fg, 82.39.Jn, 87.16.dp, 87.16.dr, 87.16.Tb, 87.19.Ff, 87.64.kv

Дія калікс[4]аренів на транспорт Ca^{2+} , електричний потенціал та активність електрон-транспортувального ланцюга в мітохондріях гладенького м'язу

Ю. В. Данилович¹, Г. В. Данилович¹, О. В. Коломієць¹, Р. В. Родік²,
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

Калікс[4]арени С-97 і С-99 у концентрації 100 нМ пригнічують енергозалежну акумуляцію Ca^{2+} ізольованими мітохондріями гладенького м'язу та знижують концентрацію цих катіонів у матриксі. Останній факт пояснюється зареєстрованою нами стимуляцією електрогенного $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -обмінника мітохондрій, яка супроводжується транзійтною поляризацією внутрішньої мітохондріальної мембрани. Аналіз флуоресцентного сигналу від ендogenous NADH мітохондрій свідчить, що дія досліджуваних калікс[4]аренів у гладенькому м'язі може бути спрямована також на пригнічення активності мітохондріальних дегідрогеназ.

Calix[4]arenes C-97 and C-99 at concentration of 100 nM inhibit the Ca^{2+} accumulation by isolated mitochondria from smooth muscle and reduce the concentration of these cations in the matrix. The latter is explained by the registered stimulation of electrogenic mitochondria $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -exchanger, which is accompanied by transient polarization of the inner mitochondrial membrane. Analysis of endogenous NADH fluorescence response of mitochondria suggests that the effect of the studied calix[4]arenes in the smooth muscle may be related to the inhibition of the respective dehydrogenases too.

Каликс[4]арены С-97 и С-99 в концентрации 100 нМ подавляют энергозависимую аккумуляцию Ca^{2+} изолированными митохондриями гладкой мышцы и снижают концентрацию этих катионов в матриксе. Последний факт объясняется зарегистрированной нами стимуляцией электрогенного $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -обменника митохондрий, которая сопровождается

ется транзистентной поляризацией внутренней митохондриальной мембраны. Анализ флуоресцентного сигнала от эндогенного NADH митохондрий свидетельствует, что действие исследуемых калікс[4]аренов в гладкой мышце может быть связано также и с угнетением активности митохондриальных дегидрогеназ.

Ключові слова: калікс[4]арени, йони Ca, мітохондрії, Ca²⁺-гомеостаз, гладенький м'яз.

Key words: calix[4]arenes, calcium ions, mitochondria, Ca²⁺-homeostasis, smooth muscle.

Ключевые слова: калікс[4]арены, ионы Ca, митохондрии, Ca²⁺-гомеостаз, гладкие мышцы.

(Отримано 30 листопада 2016 р.; після доопрацювання — 15 грудня 2016 р.)

1. ВСТУП

Серед широкого спектру функцій мітохондрій (біоенергетика, місце перебігу універсальних метаболічних процесів, джерело активних форм Оксигену, апоптоз тощо), які обумовлюють ключову роль цих органел для нормальної життєдіяльності клітин, чільне місце посідає їх значення в підтриманні внутрішньоклітинного Ca²⁺-гомеостазу. Доведено, що мітохондрії в клітинах гладеньких м'язів є високоемнісним Ca²⁺-депо, здатні термінувати Ca²⁺-сигнал і підтримувати низьку фізіологічно значущу концентрацію цього катіона в цитозолі, захищаючи клітини від Ca²⁺-перевантаження [1].

У зв'язку із першочерговим значенням іонів Ca для функціонування мітохондрій актуальним стає пошук екзогенних нетоксичних сполук, які б мали змогу ефективно діяти на їхні Ca²⁺-транспортувальні системи. Останні роки значна увага світової біологічної науки приділяється макроциклічним поліфенольним сполукам калікс[4]аренам, які, зокрема, здатні впливати на катіон-транспортувальні системи субклітинних структур [2].

Метою представленої роботи було дослідити біохімічні закономірності дії калікс[4]аренів з різною модифікацією фосфонових залишків по верхньому вінцю калікс[4]аренової чаші — С-97 та С-99 — на транспорт Ca²⁺ в мітохондріях міометрія, поляризацію внутрішньої митохондриальної мембрани та ефективність роботи електрон-транспортувального ланцюга.

2. ЕЛЕМЕНТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ МЕТОДИКИ

Одержання фракції мітохондрій міометрія лабораторних щурів

проводили за допомогою диференційного центрифугування [3].

Навантаження мітохондрій Ca^{2+} -чутливим флуоресцентним зондом Fluo-4 AM у концентрації 2 мкМ проводили у середовищі, яке містило 10 мМ Нерес (рН 7,4, 37°C), 250 мМ сахарозу, 0,1%-й бичачий сироватковий альбумін, протягом 30 хв. при 37°C. Для покращення процесу навантаження змішували барвник із Pluronic F-127 (0,02%) [4].

Дослідження змін вмісту іонізованого Ca в матриксі ізольованих мітохондрій здійснювали за допомогою Ca^{2+} -чутливого барвника Fluo-4 AM на спектрофлуориметрі Qanta Master 40 РТІ (Канада) із програмним забезпеченням FelixGX 4.1.0.3096. Процес акумуляції Ca^{2+} відбувався у середовищі складу, (мМ): 20 Нерес (рН 7,4, 37°C), 250 сахароза, 2 калій-фосфатний буфер (рН 7,4, 37°C), 3 MgCl_2 , 3 АТР, 5 сукцинат натрію, концентрація Ca^{2+} становила 80 мкМ [4].

Ініціювали ΔpH -залежне вивільнення акумульованого протягом 5 хв. Ca^{2+} 20-разовим розведенням мітохондріальної суспензії в середовищі складу, (мМ): 20 Нерес (рН 6,5, 37°C), 250 сахароза, 2 калій-фосфатний буфер (рН 6,5, 37°C), 5 сукцинат натрію, 5 мкМ циклоспорин А.

Ізольовали міоцити з матки лабораторних щурів із використанням колагенази та соєвого інгібітору трипсину [5].

Дослідження змін трансмембранного електричного потенціалу внутрішньої мітохондріальної мембрани міоцитів здійснювали методом протокової цитофлуориметрії із використанням потенціалочутливого флуоресцентного зонда 3,3'-дігексилкарбоціаніну ($\text{DiOC}_6(3)$) у фізіологічному розчині Хенкса [6]. Користувалися протоковим цитофлуориметром Coulter Epics XLTM («Beckman Coulter», США) з аргоновим лазером, $\lambda_{\text{зб}} = 488$ нм, $\lambda_{\text{фл}} = 510$ нм, канал F11.

Реєстрацію відносних значень рівня власної флуоресценції нуклеотидів в матриксі ізольованих мітохондрій міометрія здійснювали на спектрофлуориметрі Quanta Master 40 РТІ. Дослідження проводили в середовищі наступного складу, (мМ): 20 Нерес (рН 7,4, 37°C), 2K^+ -фосфатний буфер (рН 7,4, 37°C), 120 KCl , 5 піруват, 5 сукцинат. Режим вимірювання: NADH ($\lambda_{\text{зб}} = 350$ нм, $\lambda_{\text{фл}} = 450$ нм), FAD ($\lambda_{\text{зб}} = 450$ нм, $\lambda_{\text{фл}} = 533$ нм).

Здійснювали статистичну обробку результатів стандартним методом прийнятим для аналізу результатів біохімічних досліджень, використовуючи *t*-критерій Стьюдента.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вибрані калікс[4]арени (100 нМ) пригнічують енергозалежну акумуляцію Ca^{2+} ізольованими мітохондріями (рис. 1, а).

Досліджувані сполуки знижують концентрацію Ca^{2+} в матриксі ізольованих мітохондрій (рис. 1, а) та стимулюють вивільнення попередньо накопиченого Ca^{2+} (рис. 1, б). Останній факт свідчить на користь можливої стимуляції калікс[4]аренами $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -

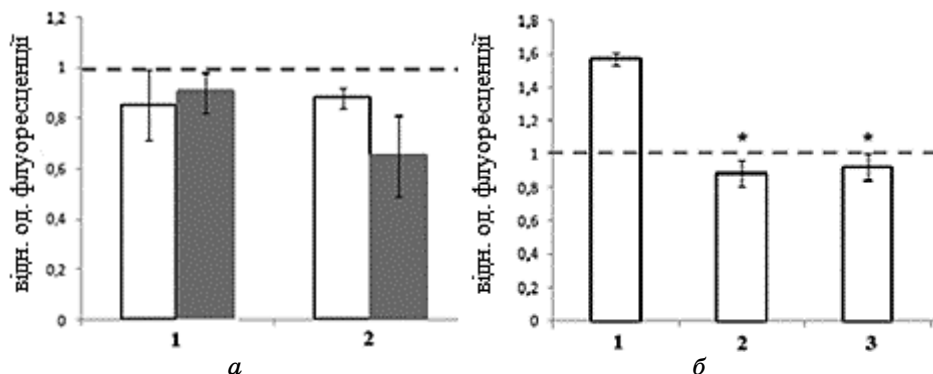


Рис. 1. Вплив калікс[4]аренів на вміст йонізованого Ca^{2+} в матриксі мітохондрій: а — за умови передінкубації мітохондрій з калікс[4]аренами (100 нМ): 1 — С-97, 2 — С-99; прозорі стовпчики — передінкубація 5 хв. з калікс[4]аренами, сірі стовпчики — додавання 80 мкМ Ca^{2+} в стандартному середовищі інкубації; б — за умови попередньої енергозалежної акумуляції Ca^{2+} в мітохондріях: 1 — додавання 80 мкМ Ca^{2+} , 2, 3 — внесення 100 нМ С-97 та С-99 відповідно після акумуляції катіона. За 1 прийнято вміст йонізованого Са в мітохондріях до внесення йонів Са та калікс[4]аренів; $M \pm m$; * — зміни вірогідні ($p < 0,05$) відносно значень при додаванні 80 мкМ Ca^{2+} , $n = 5$.¹

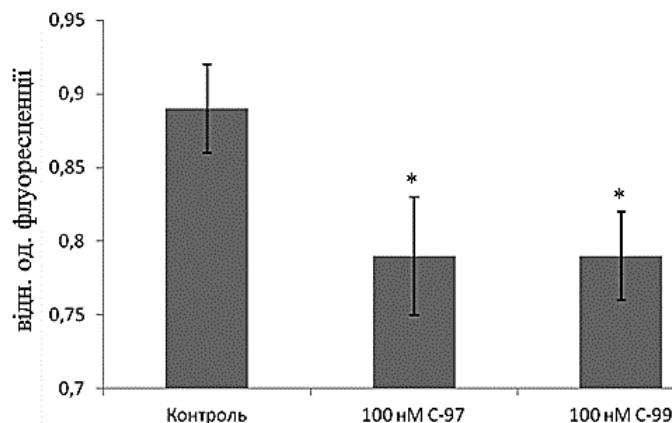


Рис. 2. Дія калікс[4]аренів на ΔpH -індукований транспорт Ca^{2+} з мітохондрій; $M \pm m$; * — зміни вірогідні відносно контролю ($p \leq 0,05$), $n = 6-7$.²

обмінника, що і підтверджується у відповідних дослідах (рис. 2).

Вибрані макроцикли прискорювали вивільнення раніше акумульованого Ca^{2+} з матриксу мітохондрій за умови активації $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обмінника (рис. 2), який функціонує в електрогенному режимі, що може призводити до додаткової поляризації внутрішньої мітохондріальної мембрани. Це явище дійсно спостерігається в експериментах, проведених на інтактних клітинах (рис. 3), про що свідчить транзйентне (близько 5 хв.) зростання флуоресценції потенціалочутливого зонда $\text{DiOC}_6(3)$. Слід зазначити, що в цих експериментах зміни поляризації мітохондрій досліджувались за умови деполаризації плазматичної мембрани, спричиненої передінкубацією клітин із убаїном. У випадку, коли електричний потенціал як плазматичної мембрани (додавання убаїну), так і мітохондрій (додавання азиду натрію — деполаризувального мітохондрій агента) був відсутній, ніякого ефекту досліджуваних калікс[4]аренів не спостерігалось (рис. 3).

Функціональну активність електрон-транспортувального ланцюгу мітохондрій можна проаналізувати, використовуючи власну флуоресценцію коензимів NADH та FAD . За постійної концентрації досліджуваних нуклеотидів в мітохондріях зміни їхньої флуоресценції відображають саме окиснювально-відновний стан цих сполук — результат активності відповідних комплексів дихального ланцюга. За дії калікс[4]аренів спостерігається зниження рівня флуоресценції NADH . Це може бути обумовлено послідовно двома причинами: початковою стимуляцією комплексу I, та, внаслідок активованого калікс[4]аренами виходу Ca^{2+} з міто-

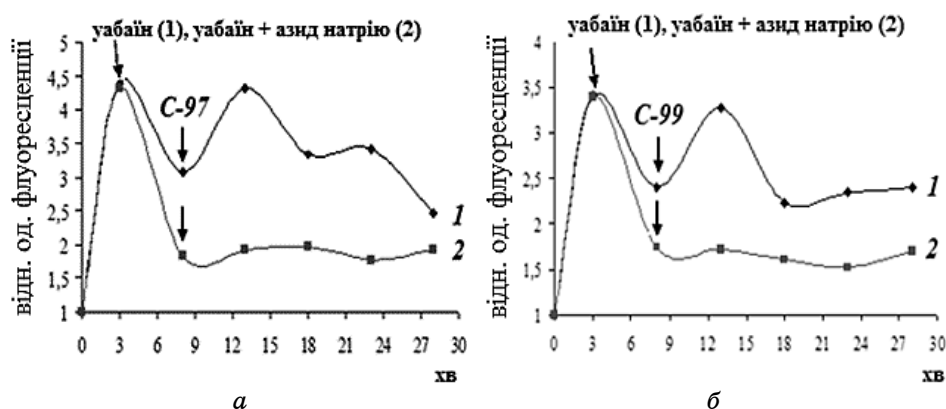


Рис. 3. Дія калікс[4]аренів С-97 (а) та С-99 (б) на поляризацію внутрішньої мітохондріальної мембрани. Стрілочкою вказано момент додавання (на 3 хв. інкубації клітин з зондом) 1 мМ убаїну (1) або 1 мМ убаїну + 5 мМ азиду натрію (2) та (на 8 хв.) калікс[4]аренів (100 нМ). Результати характерного дослідження.³

хондрій, наступним зниженням інтенсивності функціонування Ca^{2+} -залежних дегідрогеназ циклу трикарбонових кислот, що також зменшує рівень NADH. Поряд з цим спостерігається відсутність змін флуоресценції від FAD.

4. ВИСНОВКИ

Отже, дія калікс[4]аренів С-97 та С-99 на Ca^{2+} -транспортувальні системи мітохондрій спрямована на зниження концентрації Ca^{2+} у матриксі. Аналіз флуоресцентної відповіді NADH та FAD свідчить, що вплив вибраних калікс[4]аренів на функціональну активність електрон-транспортувального ланцюгу пов'язаний із пригніченням Ca^{2+} -залежних NAD-вмісних дегідрогеназ.

Синтез каліксаренфосфонових кислот С-97 (5-Біс(дигідрокси-фосфорил)метил-25,27-дипропоксикалікс[4]арен) та С-99 (5,17-Біс(дигідроксифосфонілметил)-25,27-дипро-поксикалікс[4]арен) був здійснений у відділі хімії фосфоранів Інституту органічної хімії НАН України.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Л. Г. Бабіч, С. Г. Шликов, С. О. Костерін, *Ukrainian Biochemical Journal*, **86**, No. 6: 18 (2014).
2. M. Guiliani, I. Morbioli, F. Sansone, and A. Casnati, *Chemical Communications (Cambridge, England)*, **51**, No. 75: 14140 (2015).
3. С. А. Костерин, Н. Ф. Браткова, М. Д. Курский, *Биохимия*, **50**, № 8: 1350 (1985).
4. О. В. Коломієць, Ю. В. Данилович, Г. В. Данилович, С. О. Костерін, *Український біохімічний журнал*, **85**, № 4: 30 (2013).
5. P. Mollard, J. Mironneau, T. Amedee, and C. Mironneau, *The American Journal of Physiology: Cell Physiology*, **250**, No. 1: C47 (1986).
6. M. Kalbocova, M. Vrbacky, Z. Drahota, and Z. Melkova, *Cytometry*, **52A**, Part A: 110 (2003).

REFERENCES

1. L. G. Babich, S. G. Shlykov, and S. O. Kosterin, *Ukrainian Biochemical Journal*, **86**, No. 6: 18 (2014) (in Ukrainian).
2. M. Guiliani, I. Morbioli, F. Sansone, and A. Casnati, *Chemical Communications (Cambridge, England)*, **51**, No. 75: 14140 (2015).
3. S. A. Kosterin, N. F. Bratkova, and M. D. Kursky, *Biokhimiya*, **50**, No. 8: 1350 (1985) (in Russian).
4. O. V. Kolomiets', Iu. V. Danylovyeh, H. V. Danylovyeh, and S. O. Kosterin, *Ukrainskiy Biokhimichniy Zhurnal*, **85**, No. 4: 30 (2013).
5. P. Mollard, J. Mironneau, T. Amedee, and C. Mironneau, *The American Journal of Physiology: Cell Physiology*, **250**, No. 1: C47 (1986).

6. M. Kalbocova, M. Vrbacky, Z. Drahota, and Z. Melkova, *Cytometry*, **52A**, Part A: 110 (2003).

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

²*Institute of Organic Chemistry, N.A.S. of Ukraine, Murmans'ka Str., 5, 02094 Kyiv, Ukraine*

¹ **Fig. 1.** Effect of calix[4]arenes on ionized Ca^{2+} content in the mitochondrial matrix: *a*—preincubation of mitochondria with calix[4]arenes (100 nM): 1—C-97, 2—C-99; transparent columns—preincubation 5 min with calix[4]arenes, grey bars—adding 80 μM Ca^{2+} to the incubation medium; *b*—in conditions of energy-dependent accumulation of Ca^{2+} in mitochondria: 1—addition of 80 μM Ca^{2+} , 2, 3—supplementation of 100 nM C-97 and C-99, respectively, after accumulation of cation. For conventional unit (1 on the axis), it is accepted the content of ionized calcium in the mitochondria before making calcium ions and calix[4]arenes; $M \pm m$; *—changes statistically different ($p < 0.05$) relative values when adding 80 μM Ca^{2+} , $n = 5$.

² **Fig. 2.** The calix[4]arenes action on ΔpH -induced Ca^{2+} -transport from mitochondria; $M \pm m$; *—changes statistically different ($p \leq 0.05$) relative control, $n = 6-7$.

³ **Fig. 3.** The action of calix[4]arenes C-97 (*a*) and C-99 (*b*) on the inner mitochondrial membrane polarization. Arrow indicated addendum (3 min incubation of cells with the probe) 1 mM ouabaine (1) or 1 mM ouabaine +5 mM sodium azide (2) and (8 min) calix[4]arenes (100 nM). The results of typical experiments.