

## ЗМІНИ ПОЛЯРИЗАЦІЇ ПЛАЗМАТИЧНОЇ ТА ВНУТРІШНЬОЇ МІТОХОНДРІАЛЬНОЇ МЕМБРАН КЛІТИН МІОМЕТРІЯ ЗА ДІЇ КАЛІКСАРЕНІВ – ІНГІБІТОРІВ Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТР-ази ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ

Г. В. ДАНИЛОВИЧ<sup>1</sup>, Ю. В. ДАНИЛОВИЧ<sup>1</sup>, О. В. КОЛОМІЄЦЬ<sup>1</sup>,  
С. О. КОСТЕРІН<sup>1</sup>, Р. В. РОДІК<sup>2</sup>, С. О. ЧЕРЕНОК<sup>2</sup>, В. І. КАЛЬЧЕНКО<sup>2</sup>,  
О. Ю. ЧУНІХІН<sup>1</sup>, В. Ф. ГОРЧЕВ<sup>1</sup>, С. О. КАРАХІМ<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

*Досліджено вплив супрамолекулярних макроциклічних сполук – калікс[4]аренів С-97, С-99, С-107 – убаїноподібних високоафінних інгібіторів Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТР-ази – на рівень поляризації плазматичної та мітохондріальної мембран гладеньком'язових клітин матки щурів. Вивчено дію цих сполук на характеристичні розміри міоцитів.*

*Із використанням лазерної конфокальної мікроскопії та специфічного щодо мітохондрій барвника MitoTracker Orange CM-H<sub>2</sub>TMRos доведено, що потенціалчутливий флуоресцентний зонд DiOC<sub>6</sub>(3) взаємодіє із мітохондріями в умовах штучного колапсу потенціалу на плазматичній мембрані, спричиненого передінкубацією міоцитів з убаїном (1 мМ).*

*Експериментами за допомогою методу протокової цитофлуориметрії та DiOC<sub>6</sub>(3) з'ясовано, що каліксарени С-97, С-99 та С-107 у концентраціях 50–100 нМ, які відповідають уявним константам інгібування натрієвої помпи сарколеми гладенького м'яза, зумовлюють деполаризацію плазматичної мембрани (на рівні 30% відносно контрольних значень) в умовах штучного колапсу мітохондріального потенціалу в разі передінкубації міоцитів у присутності 5 мМ азиду натрію.*

*В умовах штучної деполаризації сарколеми убаїном каліксарени С-97, С-99 та С-107 у концентрації 100 нМ зумовлюють транзйентне зростання мембранного потенціалу мітохондрій, яке сягає 40% від контрольного рівня і триває близько 5 хв. Одержані результати підтверджено даними лазерної конфокальної мікроскопії, згідно з якими С-99 та С-107 спричинюють істотне зростання флуоресценції навантажених DiOC<sub>6</sub>(3) міоцитів, передінкубованих з убаїном.*

*За допомогою методу фотонної кореляційної спектроскопії доведено, що С-99 та С-107 спричинюють зростання характеристичних розмірів міоцитів.*

*Ключові слова:* калікс[4]арени, плазматична мембрана, мітохондрії, трансмембранний потенціал, гладенькі м'язи, матка, фотонна кореляційна спектроскопія.

**П**отенціал на плазматичній мембрані (ПМ) та внутрішній мітохондріальній мембрані регулює функціонування локалізованих в них катіон-транспортних систем, зумовлюючи зміни концентрації Ca<sup>2+</sup> в цитоплазмі, необхідні для трансдукції кальцієвого сигналу [1]. Однією з електрогенних транспортних систем ПМ є убаїнчутлива Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТР-аза, яка здійснює активний переніс катіонів Na і K, забезпечуючи їхні електрохімічні градієнти, що необхідно для нормального функціонування електробудливих клітин [2–4]. Зміни у функціонуванні Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТР-ази, спричинені фізіологічно активними сполуками, безпосередньо пов'язані

із регуляцією внутрішньоклітинного Ca<sup>2+</sup>-гомеостазу і, відповідно, скоротливої здатності м'язової тканини [5]. Доведено важливу роль мітохондрій в механізмах Ca<sup>2+</sup>-сигналізації і шляхах, що ведуть до клітинної смерті, а також демонструється функціональний взаємозв'язок ПМ і мітохондрій [1]. Потенціал на мітохондріальній мембрані є індикатором енергетичного та функціонального статусу мітохондрій, що може бути використано для оцінки стану їхнього електронно-транспортного ланцюга, протонної помпи та пори перехідної провідності [6]. З огляду на вищезазначене, дослідження змін потенціалу ПМ і мітохондріальної мембрани під впливом

фізіологічно активних речовин є важливим завданням біомембранології.

У біохімічних і фізіологічних дослідженнях останніх років значна увага приділяється супрамолекулярним макроциклічним сполукам – калікс[4]аренам, а саме їхньої здатності впливати на такі різноманітні процеси, як імунна відповідь, скорочення м'язів, зсідання крові тощо [7–11].

Нашу увагу привернули калікс[4]арени **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-25,27-дипропоксикалікс[4]арен), які здатні впливати на потенціал сарколеми у зв'язку з їхнім убаїноподібним інгібуванням  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азної активності ПМ гладенького м'яза матки (міометрія). В порівняльних дослідженнях була використана сполука **C-150** (25,27-дипропоксикаліксарен) – суто каліксаренова «чаша», яка не впливає на активність натрієвої помпи. Відповідні значення  $\text{IC}_{50}$  складають: для **C-107** – 50 нМ (при концентрації 10 мкМ спостерігається повне інгібування ензиматичної активності); для **C-97** – 40 нМ (при 100 мкМ – повне інгібування активності ензиму); для **C-99** – 100 нМ (при концентрації 100 мкМ спостерігається близько 14% залишкової активності) [12].

У попередніх експериментах нами було доведено можливість тестування поляризації ПМ та мітохондріальної мембрани міометрія шурів із використанням потенціалчутливого зонда  $\text{DiOC}_6(3)$  та методу протокової цитометрії [13]. З метою коректного тестування потенціалу на мітохондріальній мембрані було використано 1 мМ убаїн, який деполаризує ПМ, інгібуючи активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази, а для тестування поляризації ПМ – азид натрію (5 мМ) або протонатор СССР (10 мкМ), які деполаризують мітохондріальну мембрану. Цю модель можна застосовувати для дослідження впливу речовин, які модулюють іонний транспорт у мембранах і можуть виступати модифікаторами потенціалу як ПМ, так і мітохондріальної мембрани.

Метою роботи було дослідження змін поляризації ПМ та мітохондріальної мембрани під впливом каліксаренів **C-97**, **C-99**, **C-107** та **C-150**.

## Матеріали і методи

Міоцити виділяли з матки невагітних лабораторних шурів із застосуванням колагенази та соєвого інгібітора трипсину за методом Молларда [14].

Мембранний потенціал реєстрували за зміною інтенсивності флуоресценції потенціалчутливого зонда  $\text{DiOC}_6(3)$  (3,3'-дігексилоксакарбоціаніну) в оптимальній концентрації 100 нМ [13] із використанням протокового цитометра Coulter Epics XLTM (Beckman Coulter, США) з аргонним лазером,  $\lambda_{\text{зб}} = 488$  нм,  $\lambda_{\text{фл}} = 510$  нм (канал F11). У наведеній серії експериментів виміри проводилися в модифікованому фізіологічному середовищі Хенкса: 137 мМ  $\text{NaCl}$ , 5,36 мМ  $\text{KCl}$ , 0,44 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,26 мМ  $\text{NaHCO}_3$ , 0,26 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,1%-на глюкоза, 10 мМ  $\text{HEPES}$  (pH 7,4), 0,03 мМ  $\text{CaCl}_2$ .

Контрольні експерименти щодо впливу калікс[4]аренів на інтенсивність флуоресценції 100 нМ  $\text{DiOC}_6(3)$  проводили за допомогою спектрофлуориметра Signe-4M (Латвія),  $\lambda_{\text{зб}} = 485$  нм,  $\lambda_{\text{фл}} = 505$  нм.

Під час дослідження впливу каліксаренів на потенціал ПМ клітини попередньо інкубували з 5 мМ  $\text{NaN}_3$  протягом 5 хв, інтенсивність флуоресценції  $\text{DiOC}_6(3)$  реєстрували на 3 хв інкубації міоцитів із барвником та додавали аліквоти розчинів каліксаренів в ДМСО.

При вивченні впливу каліксаренів на поляризацію мітохондріальної мембрани спочатку реєстрували інтенсивність флуоресценції  $\text{DiOC}_6(3)$  на 3 хв інкубації міоцитів із зондом, потім вносили 1 мМ убаїн й інкубували клітини 5 хв для надійної деполаризації ПМ, після чого додавали аліквоти розчинів каліксаренів. Контролем, який засвідчує, що за цих умов досліджувані каліксарени впливають (або не впливають) на поляризацію саме мітохондріальної мембрани слугували проби, в яких разом з 1 мМ убаїном вносили 5 мМ  $\text{NaN}_3$ , і за цих умов оцінювали ефекти макроциклів.

Для візуалізації мітохондрій був залучений флуоресцентний барвник MitoTracker Orange CM-H<sub>2</sub>TMRos у концентрації 200 нМ, для візуалізації ядер клітин – 50 мкМ Hoechst 33342. Розподіл  $\text{DiOC}_6(3)$  у клітині спостерігали за концентрації 200 нМ. У цих експериментах створювали умови штучного колапсу потенціалу на ПМ попередньою інкубацією міоцитів із 1 мМ убаїном. Просторовий

розподіл цих барвників у клітині досліджували на лазерному скануючому конфокальному мікроскопі LSM 510 META (Carl Zeiss, Німеччина) з використанням іммобілізованих із полі-L-лізином міоцитів [13]. Дослідження на конфокальному мікроскопі проводили в режимі Multi Track. Флуоресценцію Hoechst 33342 збуджували за допомогою лазера на довжині хвилі 405 нм, а для реєстрації сигналу використовували світлофільтр BP 420-480. Для збудження флуоресценції MitoTracker Orange CM-H2TMRos використовували лазер із довжиною хвилі 543 нм, а флуоресценцію реєстрували в діапазоні 560–615 нм (світлофільтр BP 560-615). Збудження флуоресценції DiOC<sub>6</sub>(3) здійснювали на довжині хвилі 488 нм, а її реєстрацію – в діапазоні 505–530 нм (світлофільтр BP 505-530). Вивчення кінетики розподілу флуоресцентних барвників у клітині проводили в режимі Time Series, а для кількісного аналізу застосовували функцію ROI (Region of Interest), яка дозволяє отримувати графік залежності інтенсивності флуоресценції від часу, усереднену для виділеної області.

Характеристичні розміри міоцитів (гідродинамічний діаметр) оцінювали за допомогою лазерного кореляційного спектрометра ZetaSizer-3 (Malvern Instruments, Велика Британія) з обчислювальним блоком-корелятором марки computing correlator type 7032 се. Використовували гелій-неоновий лазер ЛГ-111 з довжиною хвилі 633 нм і потужністю 25 мВт. Реєстрацію автокореляційної функції розсіяного від суспензії клітин лазерного опромінення проводили протягом 1 хв, 5-разово під кутом розсіювання 90°. Автокореляційну функцію обробляли за допомогою стандартної комп'ютерної програми PCS-Size mode v 1.61 [15].

Синтез каліксаренфосфонових кислот С-97, С-99, С-107 та С-150 здійснено у відділі хімії фосфоранів Інституту органічної хімії НАН України. Структуру каліксаренів підтверджено методами інфрачервоної спектроскопії та ядерного магнітного резонансу [16]. Концентрації каліксаренів, які було використано в експериментах, вказано в підписах до рисунків.

Статистичний аналіз одержаних даних проводили за допомогою пакету стандартних програм IBM PC, застосовуючи загальновідомі методи і *t*-критерій Стьюдента.

У роботі застосовували такі реактиви: Нерес, глюкоза, CaCl<sub>2</sub>, колагеназа тип IA (Sigma, США), DiOC<sub>6</sub>(3), Hoechst 33342, соєвий інгібітор трипсину (Fluka, Швейцарія),

MitoTracker Orange CM-H2TMRos (Invitrogen, США). Інші реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації чда.

### Результати та обговорення

Зонд DiOC<sub>6</sub>(3) є ліпофільним катіоном, який потенціалзалежно накопичується всередині обмеженого мембранного простору (ліпосоми, мітохондрії, клітини). Збільшення негативного потенціалу на клітинних мембранах призводить до посилення його акумуляції, що супроводжується зростанням інтенсивності флуоресценції. При цьому зонд, в першу чергу, перерозподіляється між ПМ і мітохондріальною мембраною залежно від концентрації, співвідношення «зонд/клітини», а також від функціонального стану самих клітин, передусім, від рівня поляризації мембранних структур. Згідно з даними літератури, переважне накопичення зонда відбувається в мітохондріях (потенціал близько -180 мВ) [17–21]. У наших дослідах як маркер на мітохондрії було використано зонд MitoTracker Orange CM-H<sub>2</sub>TMRos [22]. Як видно з рис. 1, розподіл флуоресцентних барвників MitoTracker Orange (а) та DiOC<sub>6</sub>(3) (б) має подібну присарколемну та навколядерну локалізацію. У разі одночасного застосування двох барвників (рис. 1, в) спостерігається накладання зображення. Одержані дані дають підставу вважати, що накопичення DiOC<sub>6</sub>(3) в клітині, передусім, пов'язане із мітохондріями. Як було нами показано раніше, DiOC<sub>6</sub>(3), зв'язується також із поляризованою ПМ і окреслює контури клітини [13].

Для запобігання некоректного трактування одержаних результатів нами, насамперед, у подальшому було поставлено контролю щодо неспецифічного впливу каліксаренів у концентраціях 10 нМ – 10 мкМ на флуоресценцію DiOC<sub>6</sub>(3) за допомогою метода спектрофлуориметрії (рис. 2).

З огляду на одержані результати (рис. 2), з метою запобігання неспецифічного гасіння флуоресценції DiOC<sub>6</sub>(3), каліксарени С-97, С-99 та С-107 слід використовувати відповідно в концентраціях 50–100, 100 та 50–500 нМ, що узгоджується з величинами констант інгібування Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФ-ази. Вищі концентрації спричинювали зниження флуоресцентного сигналу. Для порівняння було взято каліксарен С-150, який є незаміщеною каліксареновою чашею і не здатний інгібувати Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФ-азу. С-150 не впливає на флуоресценцію зонда в концентраціях 10 нМ – 1 мкМ.

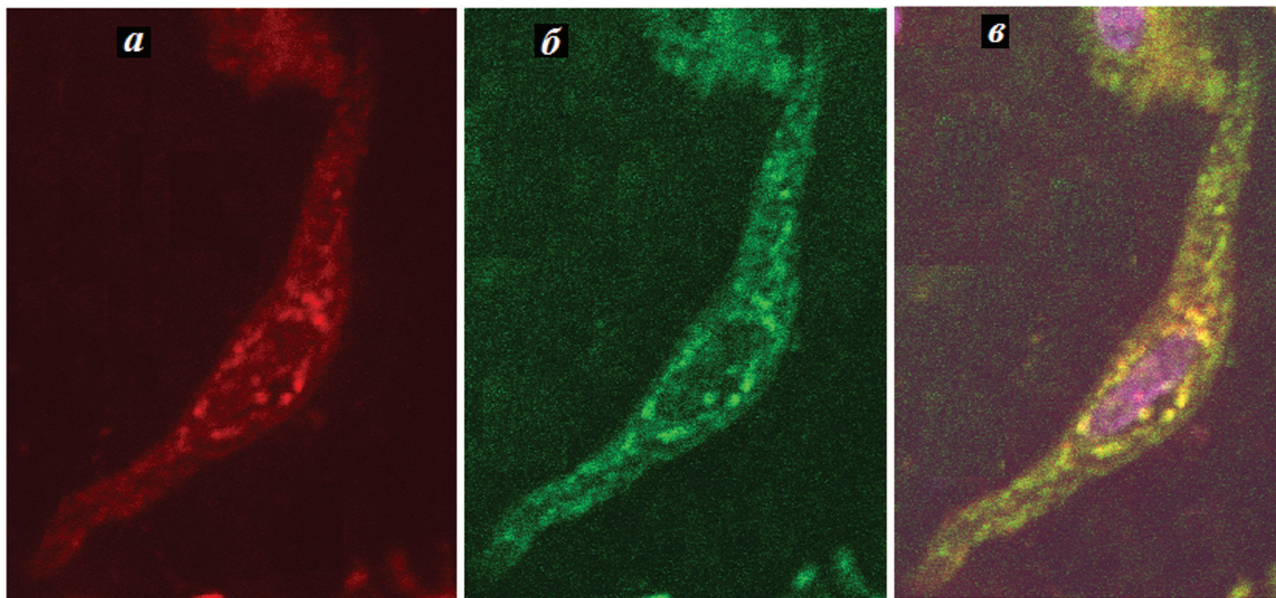


Рис. 1. Розподіл флуоресцентних зондів у міоциті матки: червоний – MitoTracker Orange CM-H<sub>2</sub>TMRos, зелений – DiOC<sub>6</sub>(3), фіолетовий – Hoechst 33342

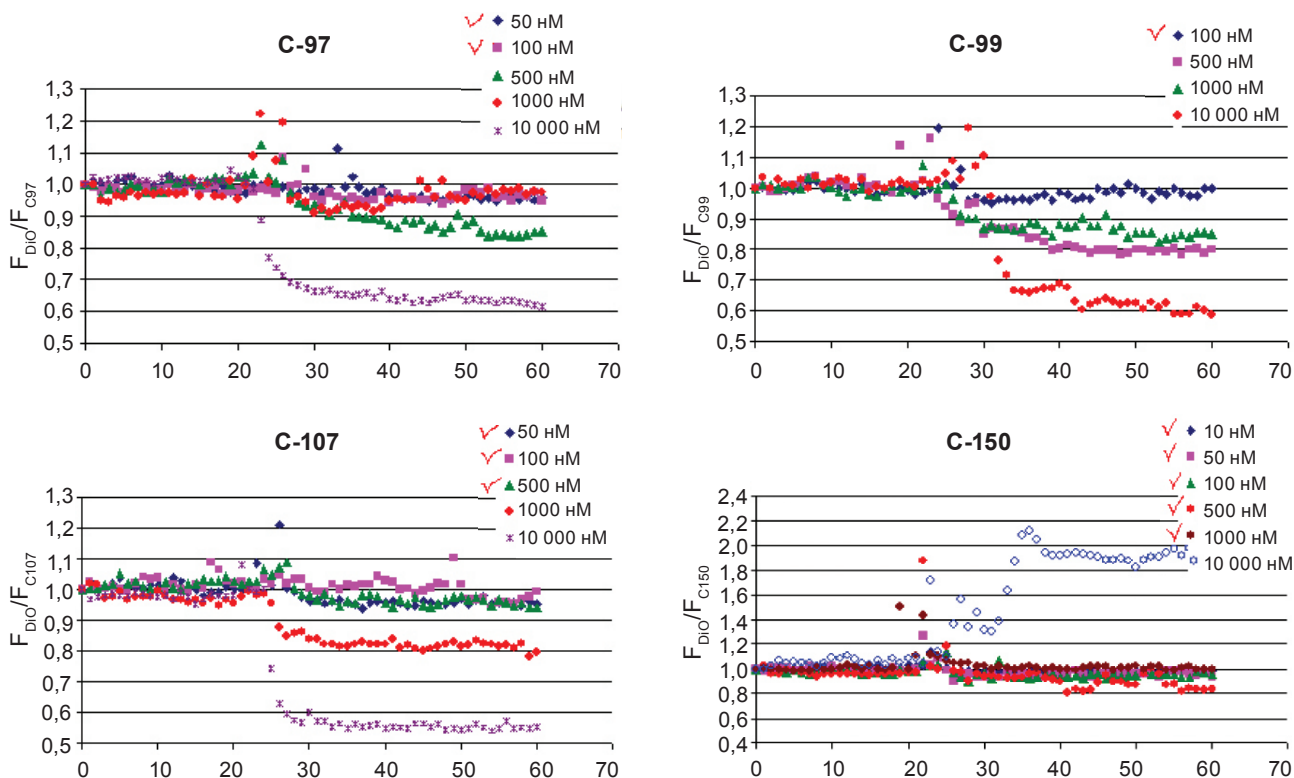


Рис. 2. Вплив калікс[4]аренів на флуоресценцію 100 нМ DiOC<sub>6</sub>(3) в середовищі Хенкса.  $F_{DiO}$  – інтенсивність флуоресценції DiOC<sub>6</sub>(3),  $F_{C97, C99, C107, C150}$  – інтенсивність флуоресценції DiOC<sub>6</sub>(3) після внесення відповідних каліксаренів (концентрації каліксаренів зазначено на панелях рисунків)

У зв'язку з тим, що каліксарени розчиняються в ДМСО, контролем у разі дослідження їх впливу на зміни поляризації мембран слугував

рівень інтенсивності флуоресценції DiOC<sub>6</sub>(3) за умов передінкубації міоцитів з ДМСО або внесення розчинника на платовому рівні.

У наших дослідженнях та роботах інших авторів показано, що зменшення інтенсивності флуоресценції зонда в клітинній суспензії свідчить на користь зниження поляризації ПМ і/або мітохондріальної мембрани, в той час як її зростання – про збільшення величини (за модулем) трансмембранного потенціалу [13, 20].

*Вплив каліксаренів на поляризацію плазматичної та внутрішньої мітохондріальної мембран гладеньком'язових клітин матки щурів.* При дослідженні впливу каліксаренів на потенціал ПМ клітини попередньо інкубували з інгібітором електронно-транспортного ланцюга мітохондрій азидом натрію (5 мМ) протягом 5 хв з метою деполаризації мітохондріальної мембрани, як було описано нами раніше [13]. Встановлено, що каліксарени С-97 (50–100 нМ), С-99 (100 нМ) та С-107 (50 нМ та 500 нМ) знижують флуоресцентну відповідь зонда, що свідчить на користь зменшення поляризації сарколеми і може частково бути пояснено інгібуючим впливом їх на  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТР-азу. Аналіз одержаної часової залежності дії каліксаренів показав, що сполуки С-97, С-99 та С-107 у концентраціях, які відповідають значенням  $\text{IC}_{50}$  для  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТР-ази, знижують рівень поляризації ПМ в середньому на 30% (за 100% прийнято значення інтенсивності флуоресценції зонда на 3-й хвилині інкубації з клітинами). Слід зазначити, що досліджені каліксарени мають у своїй структурі один або два фосфонові залишки чи фосфонові групи в поєднанні з фенольними фрагментами. Наявність цих структур забезпечує ефективне інгібування натрієвої помпи [16]. Водночас ефективність дії каліксарену С-150, в структурі якого відсутні замісники з верхнього вінця, в перші 4 хв інкубації з клітинами поступається іншим дослідженим макроциклам навіть за його концентрації 500 нМ (рис. 3).

В інтенсивності флуоресценції  $\text{DiOC}_6(3)$  за використання С-97 та С-107 концентраційно-залежних змін не спостерігається. Останнє пояснюється нами кількома причинами. Зміни поляризації ПМ можуть бути пов'язані як із впливом каліксаренів на натрієву помпу, так і зі зміною транспортування в мембрані потенціалутворюючих іонів шляхом модуляції активності відповідних каналів. Також продемонстровано, що окремі каліксарени виявляють властивості каналоформерів. Окрім того, досліджувані макроцикли мають значний негативний заряд через наявність фосфонових залишків, що в умовах зростання їх концентрації може

вплинути на потенціалзалежну акумуляцію зонда. Каналомодуючі або каналоформерні властивості можуть також пояснити наявність відносно слабо вираженого деполаризуючого ефекту С-150, який не впливає на активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТР-ази.

У подальших дослідженнях ми намагалися вирішити питання щодо можливості впливу калікс[4]аренів на поляризацію мітохондрій міометрія. Оскільки досліджувані сполуки у високій мірі є гідрофобними, вірогідним є проникнення їх крізь сарколему в цитоплазму.

Тому в наступному варіанті постановки експерименту клітини попередньо інкубували 5 хв з 1 мМ убаїном із метою надійної деполаризації ПМ, що відповідає описаній нами раніше процедурі [13]. Встановлено, що калікс[4]арени С-97, С-99 та С-107 спричинювали транз'єнтну поляризацію мітохондріальної мембрани, тривалість якої становила близько 5 хв після внесення досліджуваних речовин (рис. 4, а, б, в, крива 1). Максимальний рівень поляризації за впливу каліксаренів досягав 40% (за 100% прийнято значення інтенсивності флуоресценції зонда після інкубації міоцитів з убаїном). За цих самих умов каліксаренова «чаша» С-150 практично не впливає на потенціал мітохондріальної мембрани (графічні дані не наведено). В умовах тотальної деполаризації ПМ і мітохондріальної мембрани, спричиною попередньою інкубацією клітин з 1 мМ убаїном та 5 мМ азидом натрію, внесення зазначених каліксаренів не спричинює зміни в інтенсивності флуоресценції зонда (рис. 4, а, б, в, крива 2).

Одержані результати відповідають даним дослідів, проведених із використанням методу лазерної конфокальної мікроскопії. В контрольних експериментах ДМСО або не впливає на інтенсивність флуоресценції, або спричинює її збільшення, яке істотно нижче порівняно з дослідними зйомками. Встановлено, що каліксарени С-99 (рис. 5) та С-107 зумовлюють досить ефективно зростання флуоресценції окремих міоцитів, попередньо навантажених  $\text{DiOC}_6(3)$  у присутності 1 мМ убаїну. Таким чином, нами підтверджено здатність окремих каліксаренів спричинювати зростання мембранного потенціалу мітохондрій.

Було також досліджено зміни поляризації мембранних структур міоцитів, тобто одночасно і ПМ, і мітохондріальної мембрани, за дії вищезазначених каліксаренів в умовах передінкубації з ними клітин (5 хв) (рис. 6).

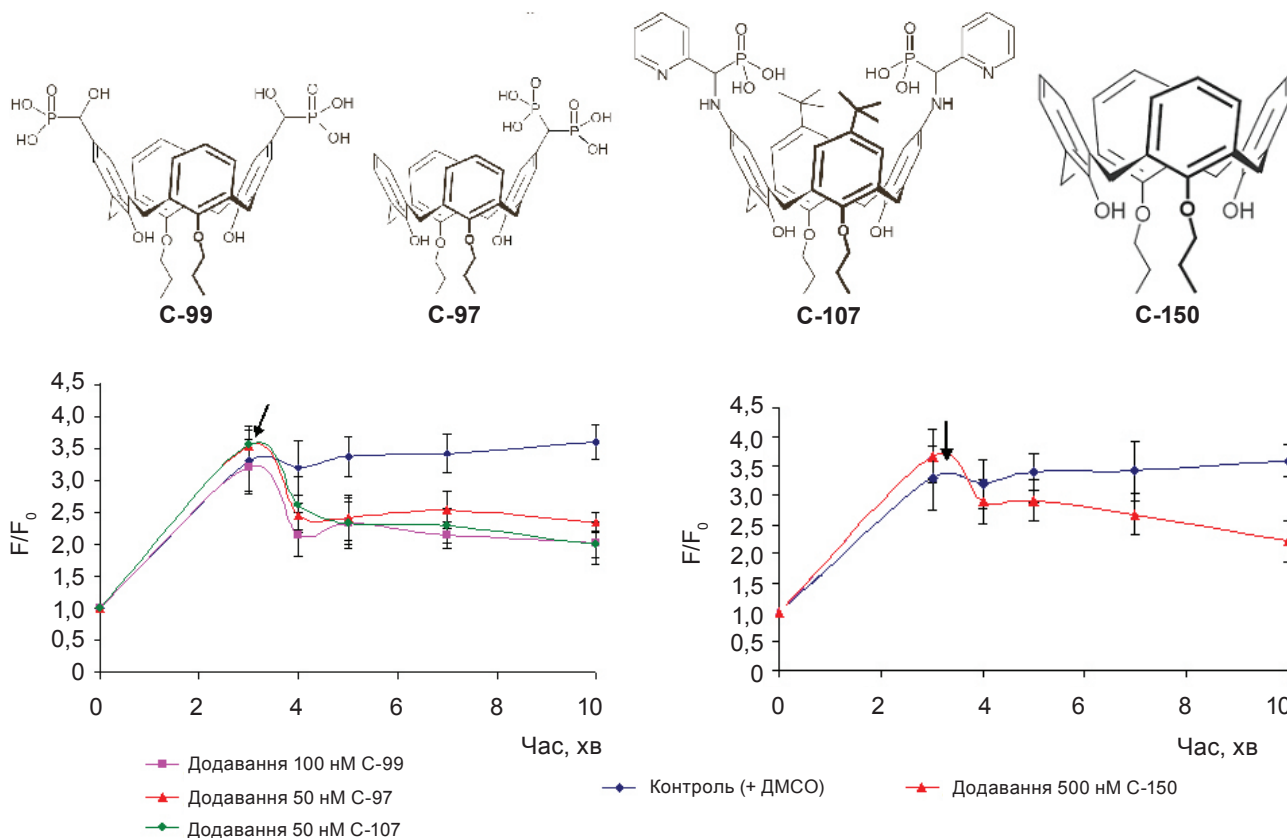


Рис. 3. Структурні формули калікс[4]аренів та результати щодо їх дії на поляризацію плазматичної мембрани міоцитів матки. Використані концентрації каліксаренів відповідають значенням  $IC_{50}$  для  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТР-ази. Стрілочкою вказано час додавання каліксаренів або ДМСО в контролі ( $M \pm m$ ,  $n = 5$ ). Флуоресцентний зонд – 100 нМ  $DiOC_6(3)$

В цьому варіанті постановки експерименту спостерігається зменшення інтенсивності флуоресценції  $DiOC_6(3)$  порівняно з контролем, що може свідчити на користь зниження рівня поляризації мембранних структур клітини, принаймні, за рахунок інгібування  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТР-ази або/і впливу на пасивну іонну проникність ПМ. У разі використання каліксаренів C-97 та C-107 не виявлено концентраційної залежності їх впливу.

Вірогідно, зниження рівня інтегрального показника поляризації мембранних структур клітини є наслідком відносно тривалого деполаризуючого ефекту каліксаренів на рівні сарколеми, який домінує над транз'єнтною поляризацією мітохондріальної мембрани.

Вплив каліксаренів на характеристичні розміри міоцитів. Можливість модуляції каліксаренами іон-транспортувальних систем міоцитів може бути основою їх впливу на форму або об'єм клітин. У наших попередніх дослідженнях із тестування характеристичних розмірів гладеньком'язових клітин матки із за-

стосуванням методу фотонної кореляційної спектроскопії було показано, що напрямок змін гідродинамічного діаметра клітин у низці випадків відповідав результатам тензометричних експериментів, проведених на гладеньких м'язах. Зокрема, характеристичні розміри зменшувались за дії  $Ca^{2+}$ -іонофору А-23187 та інгібіторів  $K^+$ -провідності сарколеми тетраетиламонію та 4-амінопіридину; у разі застосування убаїну гідродинамічний діаметр міоцитів зростав [15]. Ці попередні результати стали підставою використання зазначеного методу для оцінки впливу каліксаренів на характеристичні розміри міоцитів.

Середнє значення ефективного гідродинамічного діаметра міоцитів становить  $9,3 \pm 1,1$  мкм, ( $M \pm m$ ,  $n = 5$ ) (контроль). У разі внесення в середовище інкубації аліквоти ДМСО досліджуваний параметр не змінюється (рис. 7). У разі застосування каліксаренів C-99 та C-107 в концентрації 100 нМ зареєстровано зростання гідродинамічного діаметра в середньому на 83–85%. Напрямок змін

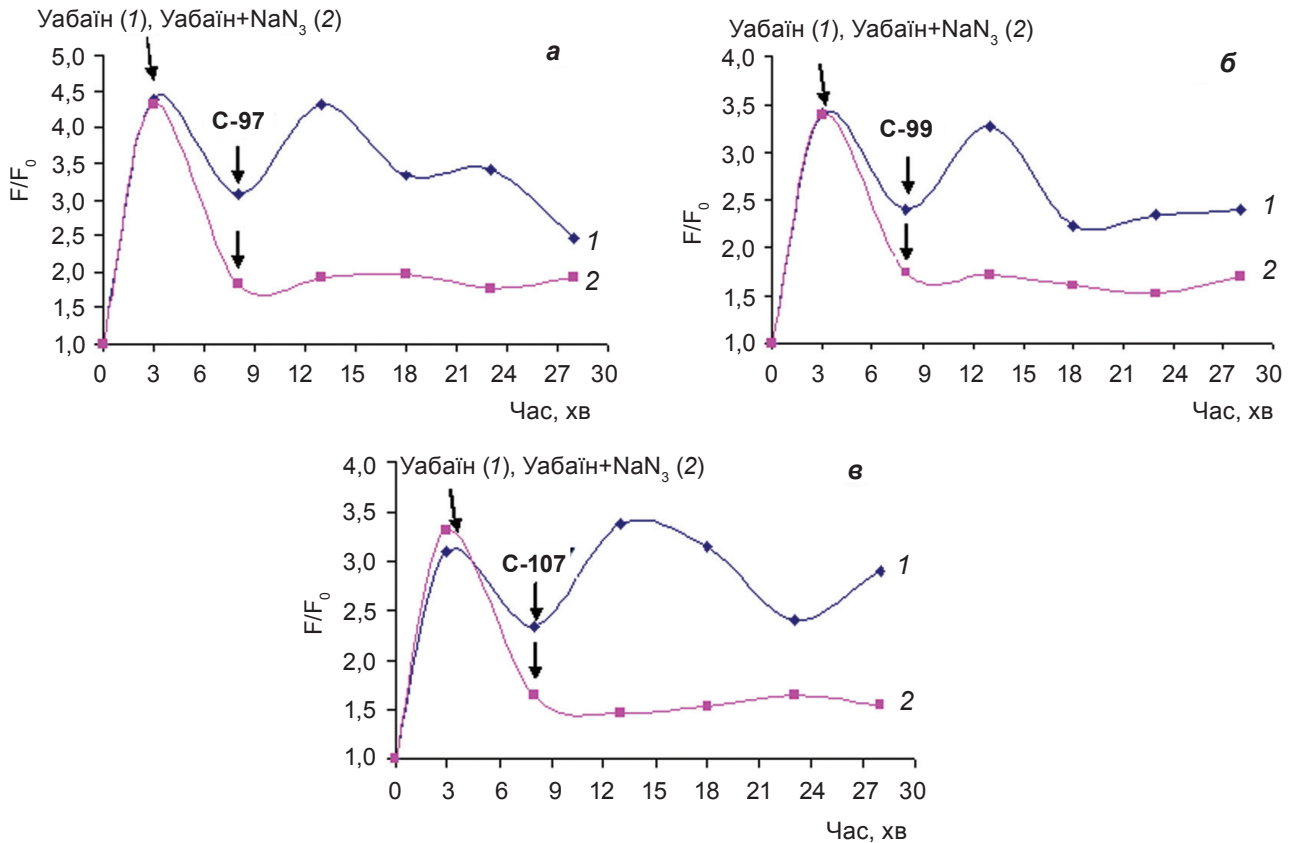


Рис. 4. Дія калікс[4]аренів С-97, С-99, С-107 та С-150 на поляризацію внутрішньої мітохондріальної мембрани. Стрілочкою вказано момент додавання (на 3-й хв інкубації клітин із зондом) 1 мМ убаїну (1) або 1 мМ убаїну + 5 мМ  $\text{NaN}_3$  (2) та (на 8-й хв) каліксаренів (100 нМ). Результати характерного досліду. Флуоресцентний зонд – 100 нМ  $\text{DiOC}_6(3)$

гідродинамічного діаметра, обчисленого за допомогою відповідної комп'ютерної програми для визначення об'єму (розподіл об'єктів залежно від їхнього об'єму) та інтенсивності (розподіл інтенсивності розсіювання світла частинками певного діаметра) збігалися. В тензометричних експериментах каліксарен С-99, аналогічно убаїну, знижував скоротливу активність гладенького м'яза [11]. Водночас, С-97 не впливає на характеристичні розміри міоцитів, що підтверджує припущення про те, що дія каліксаренів, принаймні на інтегральні клітинні показники, не завжди можна пояснити лише убаїноподібними ефектами. Отже, необхідні подальші дослідження, передусім їхніх каналоформерних властивостей. Слід відмітити, що каліксаренова чаша С-150 призводить до зменшення характеристичних розмірів клітин у середньому на 36%.

Описані вище дослідження проведені на суспензії міоцитів. Згідно з термодинамічним принципом мінімуму енергії такі об'єкти мають форму, наближену до округлої або

овальної. Таким чином, вплив досліджуваних речовин на характеристичні розміри міоцитів важко інтерпретувати як процеси вкорочення–подовження клітин. Зміни гідродинамічного діаметра можуть бути пояснені з огляду на можливі перебудови цитоскелета, які мають місце за дії речовин-модуляторів скоротливої активності. Зокрема, показано, що їх дія супроводжується виникненням як евагінацій, так і інвагінацій поверхні міоцитів [23, 24]. За інтерпретації одержаних нами результатів слід враховувати факт взаємодії актинових філаментів із сарколемою в гладеньком'язових клітинах [25]. Отже, впливи, які змінюють активність контрактильного апарату клітин міометрія, призведуть до відповідних змін їхньої морфології. Показано також, що скорочення клітин міометрія вагітних жінок супроводжується зменшенням об'єму міоцитів [26]. Нарешті, широковідомий зв'язок між  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами сарколеми, які регулюються змінами клітинного об'єму, та скоротливою активністю [27].

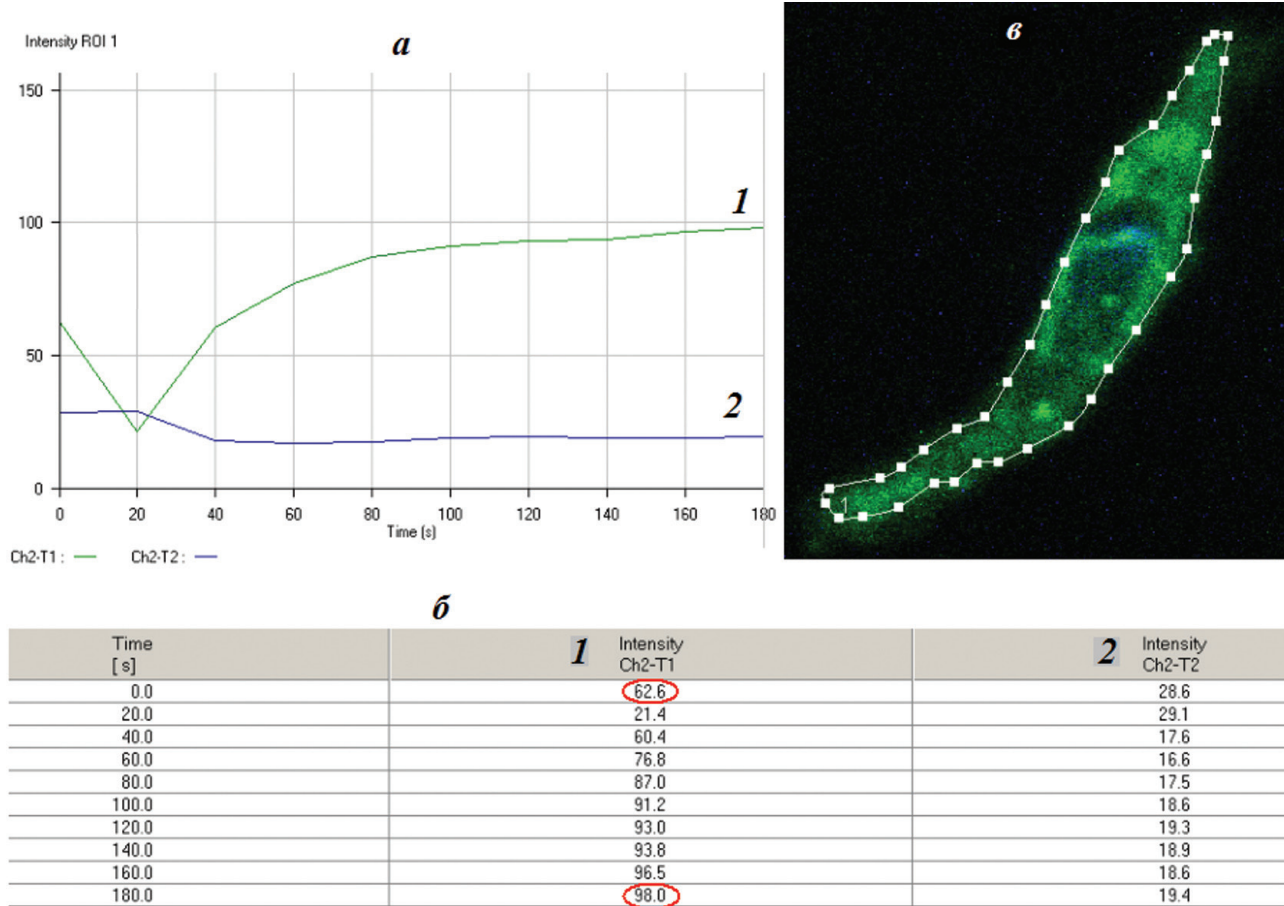


Рис. 5. Збільшення інтенсивності флуоресценції міоцита, попередньо навантаженого  $DiOC_6(3)$ , за внесення  $100\text{ нМ}$  С-99 у присутності  $1\text{ мМ}$  убаїну. Результати характерного досліду: а – кінетика спалаху флуоресценції  $DiOC_6(3)$  (крива 1) після внесення С-99, крива 2 – інтенсивність флуоресценції ядерного барвника Hoechst 33342; б – цифрова презентація графічних результатів а (1 –  $DiOC_6(3)$ , 2 – Hoechst 33342); результати (а) і (б) одержані на основі оцінювання інтенсивності флуоресценції, усередненої за площиною оптичного зрізу міоцита (в), параметр ROI 1

Вірогідним поясненням зареєстрованих нами змін ефективного гідродинамічного діаметра міоцитів (рис. 7) може бути також суттєве порушення осмотичної рівноваги між міоплазмою та позаклітинним середовищем як наслідок змін у транспортуванні іонів на рівні сарколеми за дії речовин, що модулюють скоротливу активність.  $Na^+$ -помпа регулює вміст води в цитоплазмі, оскільки гідрофільність  $Na^+$  вища порівняно із  $K^+$ . Отже, інгібітори цього ензиму здатні призводити до гідrataції клітин.

Таким чином, в ході проведених досліджень встановлено, що використані каліксарени здатні спричинювати деполаризацію ПМ і транзйентну поляризацію мітохондріальної мембрани клітин міомерія, причому ці ефекти залежать від наявності в структурі макроциклів замісників на верхньому вінці чаші. За дії каліксарену С-99, який аналогічно убаїну знижує скоротливу активність гладенького м'яза, зареєстровано зростання характеристичних розмірів міоцитів.



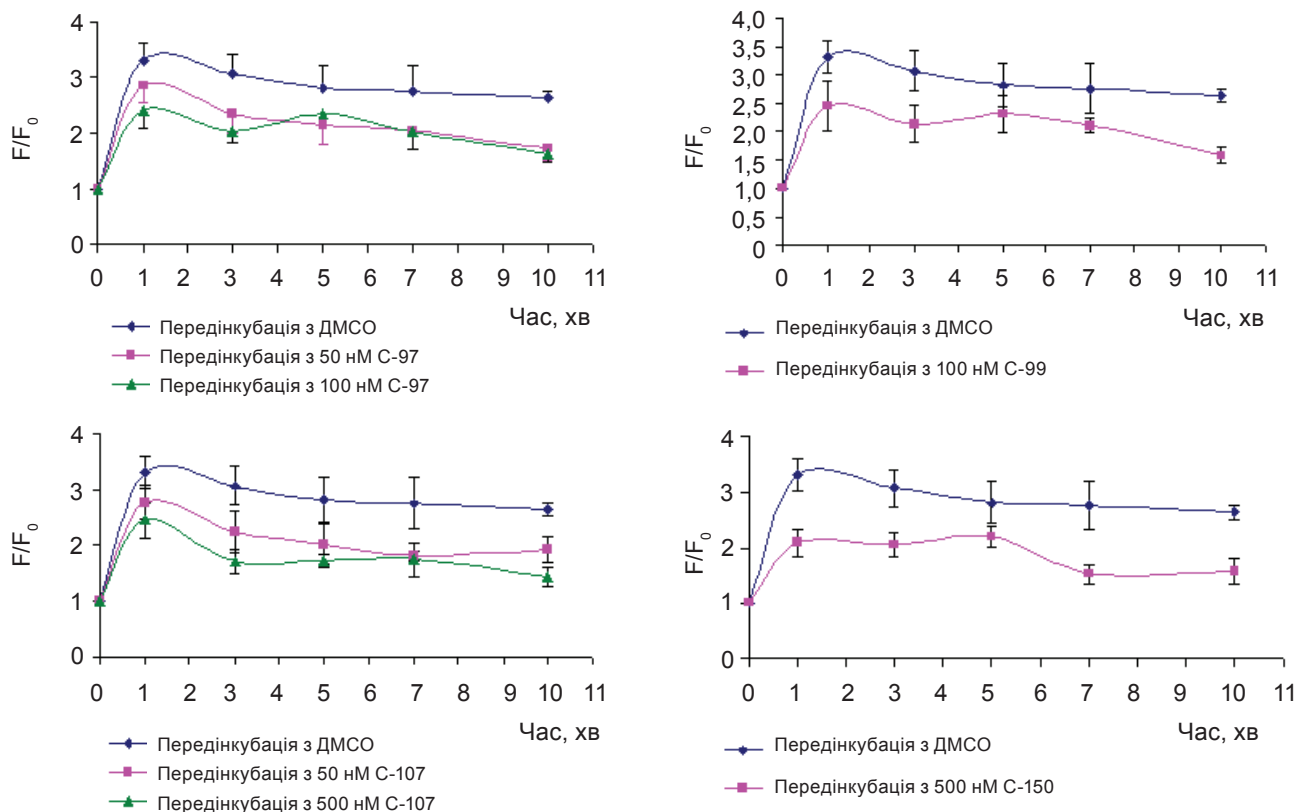


Рис. 6. Зміни флуоресцентної відповіді  $DiOC_6(3)$  в клітинній суспензії за умови передінкубації калікс[4]-аренів із міоцитами протягом 5 хв. Загальна тривалість впливу каліксаренів сягає 15 хв ( $M \pm t$ ,  $n = 5$ )

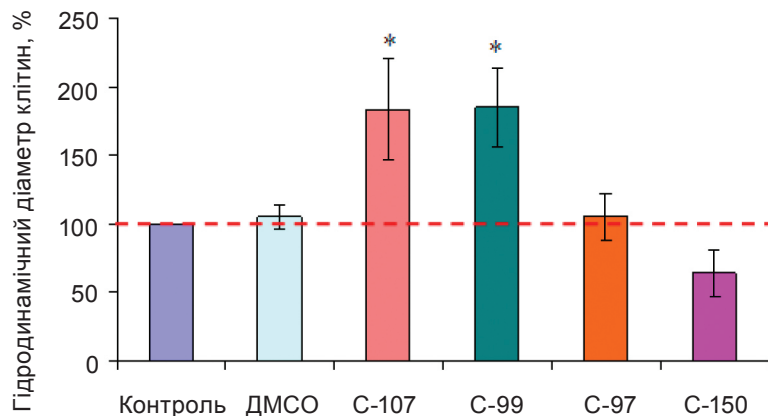


Рис. 7. Зміни гідродинамічного діаметра міоцитів за дії калікс[4]аренів (100 нМ). За 100% прийнято ефективний гідродинамічний діаметр клітин в середовищі Хенкса.  $M \pm t$ ,  $n = 5-6$ , \* зміни вірогідні відносно дослідів із ДМСО,  $P \leq 0,05$

*Робота виконувалась за підтримки програми наукових досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій» (№ держреєстрації 0110U005971), програмою фундаментальних досліджень НАН України та національним науковим центром Франції «Супрамолекулярні системи в хімії та біології. Каліксарени як модулятори активності ензиматичних та транспортних білків гладеньких м'язів» (№ держреєстрації 0110U000988), державною цільовою науково-технічною програмою «Нанотехнології та наноматеріали» (№ держреєстрації 0110U005970) та грантом НАН України на підтримку досліджень молодих вчених «Каліксарени як ефектори АТР-гідролаз плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин» (№ держреєстрації 0111U007135).*

**ИЗМЕНЕНИЕ ПОЛЯРИЗАЦИИ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ И ВНУТРЕННЕЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ МЕМБРАН КЛЕТОК МИОМЕТРИЯ ПОД ДЕЙСТВИЕМ КАЛИКСАРЕНОВ – ИНГИБИТОРОВ Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТР-азы ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ**

*А. В. Данилович<sup>1</sup>, Ю. В. Данилович<sup>1</sup>,  
О. В. Коломиец<sup>1</sup>, С. А. Костерин<sup>1</sup>,  
Р. В. Родик<sup>2</sup>, С. О. Черенок<sup>2</sup>,  
В. И. Кальченко<sup>2</sup>, А. Ю. Чунихин<sup>1</sup>,  
В. Ф. Горчев<sup>1</sup>, С. А. Карахим<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Институт биохимии им. А. В. Палладина  
НАН Украины, Киев;

<sup>2</sup>Институт органической химии  
НАН Украины, Киев;

e-mail: danylovych@biochem.kiev.ua;  
vik@bpci.kiev.ua

Исследовано влияние супрамолекулярных макроциклических соединений – каликс[4]аренов С-97, С-99, С-107 – убаиноподобных высокоаффинных ингибиторов Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТР-азы, на уровень поляризации плазматической и митохондриальной мембран гладкомышечных клеток матки крыс. Изучено действие этих соединений на характеристические размеры миоцитов.

С использованием лазерной конфокальной микроскопии и специфического для митохондрий красителя MitoTracker Orange CM-H<sub>2</sub>TMRos доказано, что потенциалчувствительный флуоресцентный зонд DiOC<sub>6</sub>(3) взаимодействует с митохондриями в условиях искусственного коллапса потенциала на плазматической мембране, вызванного прединкубацией миоцитов с убаином (1 мМ).

Экспериментами с использованием метода проточной цитофлуориметрии и DiOC<sub>6</sub>(3) показано, что каликсарены С-97, С-99 и С-107 в концентрациях 50–100 нМ, соответствующим кажущимся константам ингибирования натриевой помпы сарколеммы миомеритрия, вызывают деполяризацию плазматической мембраны (на уровне 30% относительно контрольных значений) в условиях искусственного коллапса митохондриального потенциала в случае прединкубации миоцитов в присутствии 5 мМ азида натрия.

В условиях искусственной деполяризации сарколеммы убаином, каликсарены С-97, С-99 и С-107 в концентрации 100 нМ вызывают транзистентное увеличение мембранного потенциала митохондрий, составляющее 40% от контрольного уровня и длящееся около 5 мин. Полученные результаты подтверждаются данными лазерной конфокальной микроскопии, согласно которым С-99 и С-107 вызывали существенный рост флуоресценции нагруженных DiOC<sub>6</sub>(3) миоцитов, прединкубированных с убаином.

С помощью метода фотонной корреляционной спектроскопии показано, что С-99 и С-107 вызывают рост характеристических размеров миоцитов.

**Ключевые слова:** каликс[4]арены, плазматическая мембрана, митохондрии, трансмембранный потенциал, гладкие мышцы, матка, фотонная корреляционная спектроскопия.

**CHANGES IN POLARIZATION OF MYOMETRIAL CELLS PLASMA AND INTERNAL MITOCHONDRIAL MEMBRANES UNDER CALIXARENES ACTION AS INHIBITORS OF PLASMA MEMBRANE Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase**

G. V. Danylovykh<sup>1</sup>, Yu. V. Danylovykh<sup>1</sup>,  
O. V. Kolomiets<sup>1</sup>, S. O. Kosterin<sup>1</sup>,  
R. V. Rodik<sup>2</sup>, S. O. Cherenok<sup>2</sup>,  
V. I. Kalchenko<sup>2</sup>, A. Ju. Chunikhin<sup>1</sup>,  
V. F. Gorchev<sup>1</sup>, S. A. Karakhim<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Palladine Institute of Biochemistry, National Academy of Science of Ukraine, Kyiv

<sup>2</sup>Institute of Organic Chemistry, National Academy of Science of Ukraine, Kyiv  
e-mail: danylovykh@biochem.kiev.ua;  
vik@bpici.kiev.ua

**S u m m a r y**

The influence of supramolecular macrocyclic compounds – calix[4]arenes C-97, C-99, C-107, which are ouabainomymetic high affinity inhibitors of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase, on the polarization level of plasmic and mitochondrial membranes of rat uterine smooth muscle cells was investigated. The influence of these compounds on the myocytes characteristic size was studied.

By using a confocal microscopy and specific for mitochondrial MitoTracker Orange CM-H<sub>2</sub>TMRos dye it was proved that the potential-sensitive fluorescent probe DiOC<sub>6</sub>(3) interacts with mitochondria. Artificial potential collapse of plasmic membrane in this case was modeled by myocytes preincubation with ouabain (1 mM).

Further experiments performed using the method of flow cytometry with DiOC<sub>6</sub>(3) have shown that the compounds C-97, C-99 and C-107 at concentration 50-100 nM caused depolarization of the plasma membrane (at the level of 30% relative to control values) in conditions of artificial collapse of mitochondrial potential by myocytes preincubation in the presence of 5 mM of sodium azide.

Under artificial sarcolemma depolarization by ouabain, calixarenes C-97, C-99 and C-107 at 100 nM concentrations caused a transient increase of mitochondrial membrane potential, that is 40% of the control level and lasted about 5 minutes. Calixarenes C-99 and C-107 caused a significant increase in fluorescence of myocytes in these conditions, which was confirmed by confocal microscopy too.

It was proved by photon correlation spectroscopy method that the C-99 and C-107 caused an increase of characteristic size of myocytes.

Key words: calix[4]arenes, plasma membrane, mitochondria, transmembrane potential, smooth muscle, uterus, photon correlation spectroscopy.

1. Graier W. F., Frieden M., Malli R. // Eur. J. Physiol. – 2007. – **455**. – P. 375–396.
2. Geering K. // Am. J. Physiol. Renal Physiol. – 2006. – **290**. – P. 241–250.
3. Веклич Т. О., Шкрабак О. А., Костерін С. О. // Укр. біохім. журн. – 2008. – **80**, № 4. – С. 42–50.
4. Капля А. А., Морозова В. С. // Там само. – 2010. – **82**, № 1. – С. 5–20.
5. Xie Z., Cai T. // Mol. Intervent. – 2003. – **3**, N 3 – P. 157–168.
6. Костюк П. Г., Костюк О. П., Лук'янець О. О. Внутрішньоклітинна кальцієва сигналізація: структури і функції. Київ, Наукова думка, 2010. – 175 с.
7. Da Silva E., Lazar A. N., Coleman A. W. // J. Drug. Sci. Tech. – 2004, – **14**, N 1. – P. 3–20.
8. Coleman A. W., Jebors S., Cecillon S. et al. // New J. Chem. – 2008. – **32**, N 5 – P. 780–782.
9. Paclat M-H., Rousseau C. F., Yannick C. et al. // J. Inclus. Phen. Macrocyc. Chem. – 2006. – **55**, N 3–4. – P. 353–357.
10. Grare M., Mourer M., Fontanay S. et al. // J. Antimicrob. Chemother. – 2007. – **60**, N 3 – P. 575–581.
11. Цимбалюк О. В., Онуфрійчук О. В., Веклич Т. О. та ін. // Фізика живого. – 2006. – **14**, № 1. – С. 53–72.
12. Веклич Т. О., Кочешкова Н. С., Родік Р. В. та ін. // Укр. біохім. журн. – 2007. – **79**, № 3. – С. 19–28.
13. Данилович Г. В., Данилович Ю. В., Горчев В. Ф. // Там само. – 2011. – **83**, № 3. – С. 99–105.
14. Mollard P., Mironneau J., Amedee T. et al. // Am. J. Physiol: Cell Physiology. – 1986. – **250**, N 1. – P. C47–C54.
15. Данилович Ю. В., Чуніхін О. Ю., Данилович Г. В. // Актуальные вопросы биологической физики и химии. Материалы VII Международной научно-технической конференции. Севастополь. – 2011. – С. 46–47.
16. Веклич Т. О., Костерін С. О., Родік Р. В. та ін. // Укр. біохім. журн. – 2006. – **78**, № 1. – С. 70–78.
17. Rottenberg H., Wu S. // Biochem. et Biophys. Acta. – 1998. – **1404**. – P. 393–404.
18. Salvioli S., Ardizzoni A., Franceschi C. et al. // FEBS Letters. – 1997. – **411**. – P. 77–82.

19. *Marchetti C., Jouy N., Leroy-Martin B. et al.* // Hum. Reprod. – 2004. – **12**, N 10. – P. 2267–2276.
20. *Kalbovcova M., Vrbacky M., Drahota Z. et al.* // Cytometry. – 2003. – **52A**, Part A. – P. 110–116.
21. *Brewis I. A., Morton J. E., Mohammad S. N. et al.* // J. Andrology. – 2000. – **21**, N 2. – P. 238–249.
22. *Bukman J. F., Hernandez H., Kress G. J. et al.* // J. Neuros. Meth. – 2001. – **104**. – P. 165–176.
23. *Momose K.* // Nihon Yakurigaku Zasshi. – 1993. – **101**, N 3. – P. 101–110.
24. *Maruyama I., Kobayashi M., Yoshida C., Momose K.* // J. Pharmacobiodyn. – 1987. – **10**, N 8. – P. 396–403.
25. *Gunst S. J., Tang D. D.* // Eur. Respir. J. – 2000. – **15**, N 3. – P. 600–616.
26. *Dessouky D. A.* // Am. J. Obstet. Gynecol. – 1976. – **125**, N 8. – P. 1099–1107.
27. *Remillard C. V., Yuan J. X.* // Br. J. Pharmacol. – 2005. – **145**, N 1. – P. 1–2.

Отримано 08.05.2012