

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О. В. ПАЛЛАДІНА

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

Яворовська Вікторія Ігорівна

УДК 577.152.3

ДИСЕРТАЦІЯ

ТІАКАЛІКС[4]АРЕНИ – ПРОТЕКТОРИ
АТР-ГІДРОЛАЗНОЇ АКТИВНОСТІ МІОЗИНУ МІОМЕТРІЯ
ВІД ВПЛИВУ КАТІОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

091 – біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Яворовська В.І.

Науковий керівник:

Костерін Сергій Олексійович,
академік НАН України,
доктор біологічних наук, професор.

Київ-2021

АНОТАЦІЯ

Яворовська В.І. Тіакалікс[4]арени – протектори АТР-гідролазної активності міозину міометрія від впливу катіонів важких металів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія». – Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ, 2021.

Міозин гладеньких м'язів — це актинозалежний молекулярний мотор, який перетворює хімічну енергію, депоновану в АТР у механічну енергію спрямованого руху вздовж актинових філаментів. Він входить до складу мускулатури внутрішніх органів, судин та шкіри. Міозин гладеньких м'язів — гексамер, що складається з двох важких ланцюгів (~ 200 кДа), двох легких регуляторних (~ 20 кДа) та двох легких суттєвих ланцюгів (~ 17 кДа). У важкому ланцюзі міозину гладеньких м'язів перші ~ 850 амінокислотних залишка N-кінцевої частини формують моторний домен здатний зв'язувати актин та здійснювати гідроліз АТР (головка міозину). Порушення ензиматичної (АТРазої) активності моторного домену може призводити до розладу скоротливої функції гладеньких м'язів.

Процес гідролізу АТР головкою міозину (субфрагмент-1) лежить в основі його скоротливої функції, тому забезпечення енергетичних потреб клітин гладеньких м'язів є надзвичайно важливим. Значну роль в забезпеченні клітин енергією у формі АТР відіграють мітохондрії завдяки процесу окисного метаболізму. Його порушення може сприяти розвитку розладу процесу скорочення гладеньких м'язів.

Міометрію серед інших гладеньких м'язів належить виняткова роль завдяки унікальним функціям в репродуктивній системі жіночого організму, пов'язаних з вагітністю та пологами. Різноманітні фактори довкілля можуть спричиняти порушення скоротливої функції міометрія серед них катіони важких металів. Вони представляють велику група речовин, що забруднюють довкілля,

серед них Pb та Cd є одними з найбільш токсичних. Ці елементи — дуже шкідливі для організму людини навіть у малій кількості. Важкі метали призводять до різних порушень репродуктивної системи жінки таких, як безпліддя, затримка статевого дозрівання, гормональні порушення та онкологічні захворювання статеві системи.

Останнім часом каліксарени та їх похідні тіакаліксарени розглядаються як хелатори та хемосенсиори катіонів металів у зв'язку з їх винятковою здатністю до комплексоутворення з іонами та нейтральними молекулами. Вони також розглядають в якості перспективних засобів проти отруєнь важкими металами особливо з огляду на їхню низьку токсичність та імуногенність.

Раніше у відділі біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України було показано, що катіони важких металів викликають зниження ензиматичної АТР-гідролазної активності міозину та активності актоміозинового комплексу міометрія. Була також виявлена можливість використання тіакалікс[4]аренів для усунення інгібувальних впливів катіонів важких металів на АТРази міозину. Проте залишалось багато питань, пов'язаних з механізмами впливу важких металів на АТР-гідролазу міозину. Нез'ясованими також були механізми впливу важких металів на міоцити гладенького м'яза матки. Зокрема, невивченим був вплив важких металів на енергетичне забезпечення клітин міометрія, яке є важливим для забезпечення скоротливої функції міометрія. Були запитання пов'язані з особливостями взаємодії тіакалікс[4]аренів та катіонів важких металів. Невідомими також були особливості їх впливу на клітини міометрія окремо та разом з катіонами важких металів. З огляду на це метою цієї роботи було дослідити можливості протекторної дії тіакалікс[4]аренів при шкідливих впливах катіонів важких металів на АТР-гідролазну активність міозину та функціонування дихального ланцюга мітохондрій клітин міометрія.

Для досягнення мети було поставлено наступні завдання:

1. Оцінити можливості використання тіакалікс[4]аренів, як протекторів від негативного впливу катіонів важких металів на АТР-гідролазну активність

субфрагмента-1 міозину.

2. Дослідити біохімічні показники функціонування дихального ланцюга мітохондрій міоцитів при сукупній дії катіонів важких металів та тіакалікс[4]аренів.

3. З'ясувати механізми взаємодії тіакалікс[4]аренів із катіонами Zn, а також можливості застосування цих сполук в якості внутрішньоклітинних флуоресцентних зондів до Zn^{2+} .

Спочатку була визначена ензиматична активність АТРази актоміозину за умов впливу катіонів Cd, Pb, Zn і Ni. Усі експерименти з встановлення впливів катіонів важких металів на ензиматичний гідроліз АТР проводились на субфрагменті-1 міозину, оскільки він є зручною експериментальною моделлю для вивчення впливу різних хімічних агентів на нативний міозин. Потім була вивчена здатність вибраних тіакалікс[4]аренів відновлювати АТР-гідролазну активність субфрагмента-1 міозину. Було показано, що катіони цих металів інгібують АТРазну активність субфрагмента-1 міозину міометрія. Встановлено, що катіони Pb (300 мкМ) інгібували АТР-гідролазу міозину на 88%, а катіони Cd (300 мкМ) на 56%. Коефіцієнт інгібування складав для Pb^{2+} $0,08 \pm 0,01$ мМ, а для Cd^{2+} $0,30 \pm 0,03$ мМ. Катіони Ni (300 мкМ) інгібували АТРазну активність субфрагмента-1 міозину лише на 30%. Катіони Zn^{2+} (5 мМ) інгібували активність АТРази на 43%.

Іонні радіуси катіонів Cd і Pb мають значно більші розміри порівняно з Mg^{2+} , тому взаємодія між Cd^{2+} та Pb^{2+} у сайті зв'язування Mg^{2+} в субфрагменті-1 міозину значно ускладнена. Отже, було зроблено припущення, що катіони Cd та Pb можуть зв'язуватися у функціонально важливих ділянках субфрагмента-1, що сприяють зв'язуванню та гідролізу АТР. Іонні радіуси Mg^{2+} , Zn^{2+} та Ni^{2+} в розчині подібні, тому найбільш імовірно, що Ni^{2+} та Zn^{2+} взаємодіють з ділянками зв'язування характерними для Mg^{2+} , але за досить значних концентрацій.

Було встановлено, що тіакалікс[4]арен C-800 у концентрації 100 мкМ

ефективно відновлював активність АТРази міозину за дії катіонів важких металів. Найбільш імовірно, що механізм захисної дії тіакалікс[4]арену С-800 базується на його здатності хелатувати Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} та Ni^{2+} із середовища інкубації за допомогою гідроксильних груп та атомів двохвалентного сульфуру на нижньому вінці макроциклу. На підставі даних, отриманих за допомогою методу комп'ютерного докінгу було також зроблено припущення, що тіакалікс[4]арени можуть «відтягувати» катіони важких металів з їх сайтів зв'язування у субфрагменті - 1 міозину.

Надалі було з'ясовано вплив катіонів важких металів на енергетичне забезпечення клітин міометрія. Для цього була досліджена здатність Cd^{2+} , Pb^{2+} та Zn^{2+} впливати на дихальний ланцюг мітохондрій клітин міометрія. Спочатку вивчалась здатність клітин міометрію відновлювати водорозчинні солі тетразолію до нерозчинних кристалів формазау за впливу катіонів Cd, Pb та Zn. Було встановлено, що катіони Cd та Pb посилюють утворення формазау клітинами міометрія приблизно в 2 рази за концентрації 1,25 мМ. Зроблено припущення, що його посилене утворення клітинами гладенького м'язу матки може бути пов'язаним з порушенням функціонування сукцинатдегідрогенази та НАДН-дегідрогеназного комплексу мітохондрій за впливу важких металів. При додаванні тіакалікс[4]арену С-800 інтенсивність відновлення МТТ реагенту міоцитами матки під впливом Cd та Pb знижувалась та поверталась до контрольного рівня. Це може пояснюватися, як зв'язуванням цих катіонів з середовища інкубації тіакалікс[4]ареном С-800, так і всередині клітин міометрія.

Для встановлення впливу Cd^{2+} , Pb^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} та Zn^{2+} на функціонування комплексів I та II дихального ланцюга було досліджено їх дію на рівень автофлуоресценції нікотинамідних та флавінових коферементів ізолюваних мітохондрій гладенького м'язу матки. При дослідженні автофлуоресценції НАДН в ізолюваних мітохондріях міометрія щура було встановлено, що після їх інкубації протягом 5 хв з катіонами Cd та Pb (1 мМ) вона зростала приблизно в 2,5 та 1,5 рази відповідно. Автофлуоресценція НАДН в ізолюваних мітохондріях

також посилювалась під впливом Zn^{2+} (1 мМ) на 25% відповідно, але вона не змінювалась за дії Ca^{2+} та Mg^{2+} (1 мМ). При дослідженні автофлуоресценції ФАД⁺ в ізольованих мітохондріях міометрія щура було показано, що вона зростала приблизно в 2 рази після їх інкубації протягом 5 хв з катіонами Cd (1 мМ) та майже не змінювалась під впливом Pb^{2+} (1 мМ). Вона також не змінювалась за дії Mg^{2+} , Ca^{2+} та Zn^{2+} (1 мМ).

Досліджувалась також здатність катіонів Cd, Pb та Zn впливати на інтенсивність утворення активних форм кисню клітинами гладенького м'язу матки. Посилення їх продукування - один з основних наслідків порушення функціонування електронтранспортного ланцюга. Було встановлено, що під впливом Cd^{2+} та Pb^{2+} (1 мМ) протягом 5 хв відбувалось посилення утворення активних форм кисню на 50%. В той час, як катіони Zn майже не впливали на їх утворення клітинами міометрія. Додавання тіакалікс[4]арену C-800 (100 мкМ) в середовище інкубації клітин міометрія з катіонами Cd не призводило до зниження продукування активних форм кисню міоцитами.

При дослідженні флуоресцентних властивостей комплексів важких металів та тіакалікс[4]аренів, виявлена можливість використання тіакалікс[4]арену C-800 в якості селективного та чутливого флуоресцентного зонда для Zn^{2+} в живих клітинах.

Ключові слова: міозин гладеньких м'язів, АТР-гідролаза, міометрій, важкі метали, тіакалікс[4]арени.

SUMMARY

Yavorovska V.I. Thiocalix[4]arenes – protectors of ATPase activity of myosin of myometrium from the influence of heavy metal cations. The qualifying scientific work on the rights of manuscript.

Thesis for a candidate degree in degree of doctor of philosophy in specialty 091

- "Biology". - Palladin Institute of Biochemistry of NAS of Ukraine, Kyiv, 2021.

Smooth muscle myosin is an actin-dependent molecular motor that transforms the chemical energy, deposited in ATP, into mechanical energy of directional movement along actin filaments. It is component of musculature of internal organs, vessels and skin. Smooth muscle myosin is hexamere which consist of two heavy chains (~ 200 kDa), two regulatory light chains (~ 20 kDa) and two essential light chains (~ 17 kDa). About 850 amino acid residues of the N-terminal part of the heavy chain forms a motor domain, capable of binding and hydrolysis of ATP (myosin head). The impairment of enzymatic (ATPase) activity of the motor domain can cause disorders of contractile function of smooth muscles.

The process of ATP hydrolysis by myosin head (subfragment -1) is the basis of contractile function. Thus providing energetic demands of smooth muscle cells in a form of ATP is extremely important. Mitochondria play an essential role in supply of cells with energy via the process of oxidative metabolism. Its impairment can facilitate disorders of the smooth muscle contraction. The myometrium possesses a unique role in the female reproductive system, associated with pregnancy and childbirth. Different environmental factors can lead to disorders of contractile function of the myometrium, including cations of heavy metals. They represent a broad group of substances polluting an environment. Pb and Cd are one of the most toxic among them. These elements are very noxious for human organism even in small amount. Heavy metals cause various disorders of the female reproductive system, in particular infertility, delayed puberty, hormonal disorders and gynecologic cancers.

The calixarenes and their thiacalixarene derivatives have been considered recently as chelators and sensors of metal cations due to their exceptional ability to form complexes with ions and neutral molecules. They are also regarded as remedies against heavy metal poisoning, especially given their low toxicity and immunogenicity.

It was determined earlier at the department of muscle biochemistry at the Palladin Institute of Biochemistry NAS Ukraine that heavy metal cations lead to a decrease of enzymatic activity of myosin ATPase and actomyosin complex of the

myometrium. It was also revealed the possibility of an application of thiacalix[4]arenes for the elimination of inhibitory effects of heavy metal cations on myosin ATPase. Nevertheless, it was a lot of questions related to the mechanisms of heavy metal cation action on myosin ATPase. The mechanisms of heavy metal cation action on the myocytes of uterine smooth muscle were also unclarified. In particular, the effect of heavy metal cations on the energy supply of myometrial cells has not been studied which is important for the contractile function of the myometrium. It was also questions related to peculiarities of interaction between thiacalix[4]arenes and heavy metal cations. The features of their influence on myometrium cells apart and together with heavy metal cations were also obscure. Therefore the aim of this research work was to study possible protective properties of thiacalix[4]arenes upon deleterious action of heavy metal cations on myosin ATPase activity and mitochondrial respiratory chain of myometrial cells. The following tasks were set for the achievement of the goal:

1. To evaluate the possibility of thiacalix[4]arene application as protectors against negative action of heavy metal cations on ATPase activity of myosin subfragment 1.
2. To study the biochemical characteristics of mitochondrial respiratory chain function upon joint action of heavy metal cations and thiacalix[4]arenes.
3. To found out mechanisms of interaction of thiacalix[4]arenes with Zn cations and the opportunity of their application as intracellular fluorescent probes to Zn^{2+} .

Firstly, the influence of Cd, Pb, Zn and Ni cations on the enzymatic activity of actomyosin ATPase was determined. All experiments on determining the effects of heavy metal cations on ATP hydrolysis were held on myosin subfragment 1. Since it is a convenient experimental model for studying the influence of compounds on native myosin. After that, it was studied the ability of selected thiacalix[4]arenes to restore ATPase activity of myosin subfragment 1. It was shown that Cd, Pb, Zn and Ni cations inhibited the myometrial ATPase activity of myosin subfragment 1. It was determined

that Pb cations (300 μM) have inhibited myosin ATPase on 88%, while Cd cations (300 μM) – on 56%. The coefficient of inhibition was $0,08 \pm 0,01$ mM for Pb^{2+} while it was $0,30 \pm 0,03$ mM for Cd^{2+} . Ni cations (300 μM) have inhibited ATPase activity of myosin subfragment 1 only on 30% while Zn^{2+} (5 mM) have inhibited ATPase activity on 40%. Since ionic radii of Cd and Pb cations have much greater sizes compared to Mg^{2+} thus interaction between Cd^{2+} and Pb^{2+} in the Mg^{2+} binding site of myosin subfragment 1 is considerably complicated. Therefore, it was made an assumption that Cd and Pb cations may be bond in sites essential for ATP binding and hydrolysis of myosin subfragment 1. Ionic radii of Zn^{2+} ta Ni^{2+} in solution are similar thus most likely Ni and Zn cations interact with sites similar for Mg^{2+} but at high concentrations.

It was established that thiacalix[4]arene C-800 effectively recovered ATPase activity of myosin subfragment 1 upon the action of heavy metal cations in its concentration of 100 μM . Most likely the mechanism of thiacalix[4]arene C-800 action is based on its ability to chelate Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} ta Ni^{2+} from incubation medium via hydroxyl groups and atoms of divalent sulfur at the lower rim of the macrocycle. Based on the method of computer docking, it was also assumed that thiacalix[4]arenes can "pull" heavy metal cations from their binding sites in the myosin subfragment 1.

Further, it was studied influence of the heavy metal cations on energy supply of myometrial cells. For this purpose, the capability of Cd^{2+} , Pb^{2+} and Zn^{2+} to affect the electron transport chain of mitochondria of myometrial cells was explored. Firstly, the ability of myometrial cells to reduce the water-soluble tetrazolium salts upon an influence of Pb^{2+} , Cd^{2+} and Zn^{2+} were studied. It was determined that Cd and Pb cations at the concentration 1,25 mM almost twice enhance a formazan formation by them. It was made an assumption that its increased formation is attributed to the impairment of mitochondrial succinate dehydrogenase and NADH: ubiquinone oxidoreductase functioning after the influence of heavy metal cations. The intensity of the MTT reagent reduction by uterine myocytes under the influence of Cd and Pb cations was decreased and returned to the control level after the addition of thiacalix[4]arene C-800. It can be explained both binding of these cations by thiacalix[4]arene C-800

from incubation medium and their chelation inside the myometrial cells.

The effect of Cd^{2+} , Pb^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} and Zn^{2+} on nicotinamide and flavin autofluorescence level of uterine smooth muscle isolated mitochondria was studied for determining their influence on complex I and complex II functioning of the respiratory chain. After the study of NADH autofluorescence in isolated mitochondria of rat myometrium, it was found that it increased following their incubation with Cd and Pb cations during 5 min for about 2 and 2,5 times correspondingly. The NADH autofluorescence of rat myometrial isolated mitochondria was also increased under the influence of Ca^{2+} and Zn^{2+} (1 mM) on 50% and 25% respectively but it was not affected by Mg^{2+} (1 mM). After the study of FAD autofluorescence in isolated mitochondria of rat myometrium, it was shown that it was enhanced approximately 2-fold after incubation for 5 min with Cd cations (1 mM) and was almost unchanged under the influence of Pb^{2+} (1 mM). It also was not affected by Mg, Ca and Zn cations (1 mM).

It was studied the ability of Cd, Pb and Zn cations to influence the reactive oxygen species production by cells of uterine smooth muscle. Their increased generation is one of the major consequences of the electron transport chain functioning impairment. It was determined that the production of the reactive oxygen species increased by 50% under influence of Cd^{2+} and Pb^{2+} (1 mM) for 5 min while Zn cations enhance their generation only by 20%. The addition of thiocalyx [4] arene C-800 (100 μM) to the incubation medium of myometrial cells did not reduce the production of reactive oxygen species by myocytes, caused by Cd cations.

During the study of fluorescent properties of thiocalyx[4]arene complexes with metals, it was revealed the possibility of an application of thiocalyx[4]arene C-800 as a selective fluorescent sensor for Zn^{2+} .

Keywords: smooth muscle myosin, ATPase, myometrium, heavy metal cations, thiocalyx[4]arenes.

Список публікацій здобувача за темою дисертації:

1. Labyntseva R, **Yavorovska V**, Bevza A, Drapailo A, Kalchenko V, Kosterin S. Thiocalix[4]arene-tetraphosphonate Eliminates Inhibitory Effects of Heavy Metals on Smooth Muscle Myosin S1 ATPase Activity. World Journal of Biochemistry and Molecular Biology. 2018; 3(2): 46-54. *(Дисертантка брала участь у виконанні експериментальної частини дослідження, взяла активну участь у аналізі її результатів, написанні та оформленні статті).*

2. Labyntseva RD, **Yavorovska VI**, Bevza OV, Drapaylo AB, Kalchenko VI, Kosterin SO. Thiocalix[4]arenes remove the inhibitory effects of Zn cations on the myosin ATPase activity. Nanoscale Research Letters, 2018; 13(1):224. *(Дисертантка взяла участь у виконанні експериментальної частини досліджень, взяла активну участь у аналізі результатів досліджень, написанні та оформленні статті).*

3. Labyntseva RD, **Yavorovska VI**, Bevza OV, Kalchenko VI, Kosterin SO. Calix[4]arenes as the effectors of smooth muscle myosin ATPase. "Myosin: Biosynthesis, Classes and Function", Nova Science Publishers, Inc. (USA). 2018. 89-135. *(Дисертантка брала активну участь у аналізі результатів досліджень, написанні та оформленні глави в монографії).*

4. **Yavorovska VI**, Labyntseva RD, Bevza O, Puhach AY, Drapaylo AB, Cherenok SO, Kalchenko VI, Kosterin SO. Thiocalix[4]arene phosphonate C-800 as a novel fluorescent probe for zinc in living cells. Ukr Biochem J. 2021; 93 (4): 26-36

Апробація матеріалів дисертації:

1. **V. Yavorovska**, R. Labyntseva. Tetrahydroxythiocalix[4]arene-tetraphosphonate Remove Inhibitory Effects of Pb and Cd Cations on Myosin ATPase Activity. EastWest Chemistry Conference, Lviv Polytechnic National University, October 10-12, Lviv, 2018: 143.

2. **Yavorovska V. I.**, Labyntseva R.D. Protective influence of thiocalix[4]arenes on myosin ATPase activity against inhibitory effects of Zn^{2+} . V International research and practice conference "Nanotechnology and Nanomaterials"

(NANO-2017) Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University, 23-26 August 2017, Chernivtsi, Ukraine: 662.

3. **Yavorovska V.I.**, Labyntseva R.D., Bevza O.V. A selective and sensitive fluorescent sensor: thiacalix[4]arene C-800 for Zn ions. Medical and Clinical Chemistry 21; 3(80):292-293.

4. Puhach A., **Yavorovska V.I.**, Labyntseva R.D. Thiacalix[4]arene C-800 as selective and sensitive fluorescent sensor for Zn ions. VII International research and practice conference “Nanotechnology and Nanomaterials” (NANO-2019), Lviv Polytechnic National University, 27-30 August 2019, Lviv, Ukraine:331.

5. Puhach A., **Yavorovska V.I.**, Labyntseva R.D. Thiacalixarene C-800 as a potential molecular tool for Zn^{2+} level measurement. VIII International Conference “Medical physics – the current status, problems, the way of development. Innovation technologies”, September 26-27, 2019, Kyiv, Ukraine. P.210-211.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	16
ВСТУП.....	18
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	27
1.1. Структурні особливості гладеньких м'язів.....	27
1.1.2. Міозини - молекулярні мотори.....	28
1.1.3. Ізоформи міозину гладеньких м'язів.....	31
1.2. Робочий цикл актоміозинового комплексу.....	32
1.3. Актин.....	33
1.4. Регуляція скорочення гладеньких м'язів.....	36
1.4.1. Незалежний від кальцію механізм скорочення гладеньких м'язів.....	36
1.4.2. Скорочення гладеньких м'язів опосередковане Ca^{2+}	38
1.5.1. Негативний вплив важких металів здоров'я людини та тварин.....	39
1.5.2. Негативний вплив важких металів на репродуктивну систему жінки.....	43
1.6. Порушення функціонування дихального ланцюга під впливом важких металів.....	43
1.6.1. Утворення активних форм кисню в клітині.....	43
1.6.2. Вплив важких металів на утворення активних форм кисню в клітині.....	45
1.7. Каліксарени.....	47
1.7.1. Вплив каліксаренів на актоміозиновий комплекс та активність ензимів.....	48
1.7.2. Вплив каліксаренів на транспортну систему гладеньких м'язів.....	49
1.8. Розробка ліків на основі каліксаренів та їх похідних.....	50
1.8.1. Протипухлинні препарати на основі каліксаренів.....	50
1.8.2. Антибактеріальні, противірусні та протигрибкові засоби на основі	

каліксаренів.....	52
1.8.3. Використання каліксаренів та їх похідних як хелаторів важких металів.....	53
1.8.4. Розробки флуоресцентних хемосенсорів на основі каліксаренів та їх похідних.....	54
1.9. Токсичність та імуногенність каліксаренів.....	54
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	56
2.1. Виділення субфрагмента-1 міозину з міометрія свині.....	56
2.2. Електрофоретичне розділення протеїнів в поліакриламідному гелі.....	57
2.3. Визначення активності АТРази субфрагмента-1 міозину.....	57
2.4. Отримання суспензії клітин міометрія з матки дорослих самок щура.....	58
2.5. Культивування міоцитів матки щура.....	60
2.6. Визначення метаболічної активності міоциті методом МТТ — тест.....	60
2.7. Флуоресцентна мікроскопія некультивованих клітин міометрія.....	60
2.8. Визначення активних форм кисню в клітинах.....	61
2.9. Виділення ізольованих мітохондрій з міометрія щура.....	61
2.10. Вивчення флуоресції НАДН та ФАД в ізольованих мітохондріях.....	62
2.11. Синтез та характеристика тіакалікс[4]аренів.....	62
2.12. Приготування розчинів двовалентних металів та визначення їх канцентрації.....	62
2.13. Комп'ютерне моделювання взаємодії лігандів (Pb^{2+} , Cd^{2+} та C-800) з субфрагментом-1 міозину.....	63
2.14. Статистичний аналіз результатів.....	63
3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	64
3.1. Вплив тіакалікс[4]арену C-800 на АТРазну активність субфрагмента-1 міозину міометрія за умов інгібованої дії катіонів Pb, Cd та	

Ni.....	64
3.2. Відновлювальна дія тіакалікс[4]аренів C-798 та C-800 на АТРазну активність субфрагмента-1 міозину міометрія за інгібувального впливу Zn^{2+}	69
3.3. Виявлення можливих ділянок зв'язування катіонів Pb та Cd в структурі субфрагмента-1 міозину методом комп'ютерного моделювання.....	74
3.4. Виявлення можливих ділянок зв'язування Zn^{2+} в структурі субфрагмента-1 міозину методом комп'ютерного моделювання.....	78
3.5. Вплив тіакалікс[4]арену C-800 на метаболічну активність мітохондрій клітин міометрія в присутності катіонів Cd та Pb	82
3.6. Автофлуоресценція НАДН та ФАД ⁺ в ізольованих мітохондріях міометрія за дії катіонів важких металів.....	87
3.7. Продуктування активних форм кисню у суспензії клітин міометрія щурів.....	92
3.8. Флуоресцентні властивості тіакалікс[4]аренів C-798 та C-800.....	95
3.8.1. Тіакалікс[4]арен C-800 — селективний та чутливий зонд до катіонів Zn.....	96
3.8.2. Вивчення інтенсивності флуоресценції тіакалікс[4]арену C-800 в міоцитах матки.....	100
3.8.3. Комп'ютерне моделювання взаємодії тіакалікс[4]аренів C-800 та C-799 з катіонами Zn.....	103
4. ЗАКЛЮЧНИЙ РОЗДІЛ.....	107
ВИСНОВКИ.....	113
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	115

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ГМ – гладенькі м'язи

ВЛ – важкий ланцюг міозину

ЛЛ₁₇ – суттєвий легкий ланцюг міозину

ЛЛ₂₀ – регуляторний легкий ланцюг міозину

КЛЛМ – кіназа легких ланцюгів міозину

ILK (Integrin-linked kinase)-Інтегрин-пов'язана кіназа

ROCK 1/2 (Rho-associated kinase 1/2)-Rho-асоційована кіназа 1/2

ZIPK (Zipper interacting protein kinase)- ZIP кіназа

ЕТЛ - електронтранспортний ланцюг

ЗТЕ- зворотний транспорт електронів

ЛД₅₀ – доза, яка викликає загибель 50% експериментальних тварин

K_m – уявна константа Міхаеліса

I_{0,5} – коефіцієнт інгібування

V_{max,ATP} – уявна максимальна швидкість процесу щодо АТР

ADP – аденозиндифосфат

АТР – аденозинтрифосфат

АФК - активні форми кисню

ВМ- важкий метал

ДАГ - діацилгліцерол

НАД- нікотинамідаденіндинуклеотид

ФАД — флавінаденіндинуклеотид

ФМН -флавінмононуклеотид

IP3 -інозитол трисфосфат

P_i – фосфат неорганічний

МТТ- (3- [4,5-диметилтіазол-2-іл] -2,5-дифенілтетразолій-бромід

DCFDA (2',7' –dichlorofluorescein diacetate) - 2 ', 7'-дихлордигідро-флуоресцеїн діацетат

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) – середовище Ігла, модифіковане

за способом Дульбекко

PBS (phosphate-buffered saline)- фосфатний буфер

ЯМР- ядерний магнітний резонанс

ВСТУП

Актуальність теми. Гладенькі м'язи (ГМ) утворюють скоротливу мускулатуру внутрішніх органів, судин та шкіри. Серед інших ГМ міометрій відіграє виняткову роль внаслідок його унікальних функцій в репродуктивній системі жіночого організму у зв'язку з вагітністю та пологами. Порухення скоротливої функції ГМ матки спричиняє різноманітні патології у вагітних жінок: слабкість пологової діяльності, передчасні пологи та викидні [1-3]. Зокрема, передчасні пологи призводять до найвищого рівня смертності серед новонароджених у розвинутих країнах [4]. Крім того, народжені передчасно немовлята потребують додаткового медичного догляду та мають підвищену схильність до захворювань у подальшому, зокрема розумової відсталості [5, 6].

Здатність міометрія до скорочення визначається взаємодією двох основних скоротливих протеїнів актину та міозину, що утворюють актоміозиновий комплекс. Міозин — це актинозалежний молекулярний мотор, який перетворює хімічну енергію, яка депонована в АТР у механічну енергію спрямованого руху вздовж актинових філаментів [7, 8]. Комплекс $MgATP^{2-}$ -субстрат АТРази міозину м'язів [9], тому важливим для забезпечення м'язового скорочення є постачання клітини енергією у формі АТР. Її продукують мітохондрії за допомогою окисного метаболізму поживних речовин за участі електронтранспортного ланцюга (ЕТЛ). Він складається з п'яти мультисубодиничних ензиматичних комплексів [10]. Електрони, віддані коферментам НАДН і $ФАДН_2$ в циклі трикарбонових кислот, передаються компонентам ЕТЛ в комплексі I (НАДН-дегідрогеназний комплекс) або комплексі II (сукцинатдегідрогеназа), а потім послідовно до комплексу III (убихінол-цитохром c редуктаза), комплексу IV (цитохром C оксидаза) врешті до кисню. Цей перенос електронів по ЕТЛ поєднується з транспортом протонів через внутрішню мембрану, створюючи електрохімічний градієнт, який використовується для утворення АТР комплексом V (F_0F_1 -АТР-синтаза)[11]. ЕТЛ також вважається одним із основних сайтів продукування активних форм кисню

(АФК) в клітинах, зокрема супероксиду, перекису водню та гідроксильного радикалу [12, 13]. Посилення генерування АФК призводить до окислювального стресу в клітині та зниження утворення в ній АТР. Найбільше супероксиду у мітохондріях ссавців утворюється комплексами I, II та III [14-17].

Важкі метали (ВМ)— велика група речовин, що забруднюють довкілля, серед них Pb та Cd є одними з найбільш токсичних. Ці елементи — дуже шкідливі для організму людини навіть у малій кількості. Особлива токсичність Pb та Cd, пов'язана з їх здатністю накопичуватись в органах та тканинах, оскільки організм людини не має ефективних механізмів їх виведення [17-20]. ВМ надходять до організму людини разом з їжею, напоями та повітрям [21]. Спосіб життя також може сприяти надходженню ВМ в організм, зокрема в організм курця при палінні надходить більша кількість Cd^{2+} так, як в одній сигареті його вміст складає 1-2 мкг. Найбільш поширеними джерелами забруднення катіонами Pb є металургійна промисловість, виробництво акумуляторів, фарб, пластмас, мастил, антидетонаційних присадок до автомобільних бензинів, напівпровідників та сонячних батарей [22]. Основними техногенними джерелами забруднення Pb^{2+} в Україні є викиди промислових підприємств та вугільних теплових електростанцій. Катіони Cd використовуються у виробництві пігментів, покриттів, стабілізаторів для пластмас, кольорових сплавів, гальванічних матеріалів, електричного та електронного обладнання [23-25]. За останні десятиріччя загострилась проблема накопичення відходів електронного обладнання, які можуть стати значним джерелом забруднення довкілля Cd^{2+} при їх неналежній утилізації. Найближчим часом ця проблема може постати перед населенням України так, як воно володіє значною кількістю побутової техніки та електронного обладнання [26, 27].

ВМ здатні викликати різноманітні порушення репродуктивної системи жінок, які призводять до безпліддя [28, 29], затримки статевого дозрівання [30], викликають гормональні порушення [31, 32] та онкологічні захворювання статеві системи [33]. В свою чергу Pb^{2+} викликають структурні зміни яєчника,

порушення оваріального циклу та сприяють розвитку міоми матки. Вони, здатні проникати крізь плацентарний бар'єр та викликати патології плода [34-36]. Деякі дослідження показали, що Pb^{2+} можуть безпосередньо призвести до більш високого ризику мимовільного переривання вагітності через можливий тератогенний вплив [37, 38].

Cd^{2+} мають властивості металоестрогену, який взаємодіє з рецепторами естрогену та прогестерону та призводить до гормональних порушень в організмі жінок [39]. Вони викликають різні захворювання жіночої репродуктивної системи такі, як ендометріоз, рак ендометрія та молочної залози [33, 38]. Cd^{2+} також може призводити до викиднів та безпліддя [33, 35, 39]. У вагітних жінок Cd^{2+} можуть проникати через плаценту та викликати різноманітні вади розвитку плода [40]. Вони також можуть секретуватись з молоком під час вигодовування дитини [41].

Катіони ВМ також викликають зниження ензиматичної активності актоміозинового комплексу та АТР-гідролазної активності міозину міометрія [42]. Вони здатні за певних умов заміщати Mg^{2+} у процесі гідролізу АТР, що каталізується міозином скелетних та гладеньких м'язів. При цьому стабільність та частота утворення комплексу АТР, металу та міозину, залежить від природи самого металу. Зокрема було показано, що вона найбільша для катіонів $Mn > Fe > Ni > Co > Mg$ і $Ca > Mn > Fe > Mg > Co$ [43]. При цьому катіони двовалентних катіонів крім Mg^{2+} стабілізують комплекс міозину з ADP^{2-} , дисоціація якого лімітує процес гідролізу АТР міозином [44]. Інгібування ензиматичної активності актоміозину катіонами Cd та Zn також пов'язана з їх впливом на початкову швидкість гідролізу АТР, що свідчить про безпосередній вплив іонів ВМ на взаємодію актину та міозину.

Катіони Cd і Pb також викликають порушення функціонування ЕТЛ клітини, що призводить до зниження рівня утворення АТР мітохондріями [45]. Cd^{2+} також можуть призводити до апоптозу, розриву зовнішньої мембрани мітохондрій, окислювального стресу, порушення активності ензимів, протеїнів-

транспортерів та іонних каналів [46]. Під їх впливом значно посилюється утворення АФК у клітинах, що значною мірою пов'язано із токсичністю Cd^{2+} для тварин, а також різних культур клітин [47-49]. Pb^{2+} також є потужним індуктором оксидативного стресу. Він здатен інгібувати ряд важливих антиоксидантних ензимів таких, як каталаза, супероксиддисмутаза та глутатіонпероксидаза [50].

З огляду на значну кількість порушень в організмі жінок, які викликані впливом ВМ важливим є пошук та розробка фармакологічних сполук, які можуть усувати їх токсичний вплив. До таких потенційних сполук належать каліксарени та їх похідні [51].

Каліксарени - макроциклічні олігомери фенолів молекули, яких мають чашоподібну структуру. Вони можуть бути функціоналізовані різними хімічними групами по верхньому та нижньому вінцю макроциклу. Гідрофобна порожнина каліксаренів дозволяє включати та утримувати широке коло компонентів [52].

В Україні працює відома наукова школа у галузі хімії каліксаренів під керівництвом академіка НАН України проф. Кальченка В.І. Інституту органічної хімії НАН України.

Перспективним напрямом є використання каліксаренів та їх похідних в якості хелаторів катіонів металів у живих системах тому, що каліксарени демонструють виняткову здатність до комплексоутворення як з іонами, так із нейтральними молекулами [53]. Показано, що наноемульсія каліксаренового карбоксилу здатна очищувати шкіру від контамінації ураном [54]. Їх сульфурвмісні похідні тіакаліксарени, завдяки щільно розміщеним на нижньому вінці макроциклу гідроксильним групам та атомам двохвалентного сульфуру, можуть утворювати міцні комплекси з катіонами двохвалентних металів. Вони здатні селективно та ефективно зв'язувати катіони важких металів та сприяти їх виведенню з організму [51, 55]. Це робить їх перспективними для розробки лікарських засобів для усунення токсичних впливів ВМ в організмі [51].

Завдяки своїм властивостям утворювати супрамолекулярні комплекси з широким колом речовин каліксарени та їх похідні також є перспективними для

розробки флуоресцентних хемосенсорів до різних катіонів та аніонів [56-58]. Зокрема, на основі тіакаліксаренів, розроблені селективні та чутливі флуоресцентні хемосенсиори до багатьох катіонів ВМ [59, 60].

Каліксарени також розглядаються, як перспективні сполуки для розробки лікарських препаратів для різних галузей медицини, зокрема протипухлинних препаратів, противірусних, антибактеріальних та протигрибкових засобів. Важливе значення у використанні каліксаренів як ліків має їх низька токсичність [61, 62] та імуногенність [63].

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано у відділі біохімії м'язів Інституту ім. О.В. біохімії Палладіна НАН України протягом 2016–2020 рр. у рамках планових досліджень за бюджетними темами: «Вивчення біохімічних механізмів спряження збудження та скорочення в гладеньком'язових клітинах» (ДРН^о 0114U003213, 2014-2018 рр.) та «Вивчення біохімічних механізмів функціонування гладеньком'язової клітини як Ca^{2+} -залежної тензоелектрохімічної рецепторної системи» (ДРН^о 0119U002508, 2019-2023 рр.).

Мета роботи: дослідити можливість протекторної дії тіакалікс[4]аренів при шкідливих впливах катіонів важких металів на АТР-гідролазну активність міозину та функціонування дихального ланцюга мітохондрій клітин міометрія.

Головні задачі:

1. Оцінити можливості використання тіакалікс[4]аренів, як протекторів від негативного впливу катіонів важких металів на АТР-гідролазну активність субфрагмента-1 міозину.

2. Дослідити біохімічні показники функціонування дихального ланцюга мітохондрій міоцитів при сукупній дії катіонів важких металів та тіакалікс[4]аренів.

3. З'ясувати механізми взаємодії тіакалікс[4]аренів із катіонами Zn, а також можливості застосування цих сполук в якості внутрішньоклітинних флуоресцентних зондів до Zn^{2+} .

Об'єкти дослідження: субфрагмент-1 міозину гладенького м'язу матки; міоцити міометрія; ізольовані мітохондрії ГМ клітин; Mg^{2+} -залежна АТР-гідролазна реакція; тіакалікс[4]арени.

Предмет дослідження: здатність такалікс[4]аренів відновлювати активність АТРази міозину при інгібуючому впливі катіонів важких металів; закономірності та механізм взаємодії тіакалікс[4]аренів з субфрагментом-1 міозину міометрія; здатність такалікс[4]аренів усувати негативні впливи катіонів важких металів на дихальний ланцюг мітохондрій міоцитів матки; можливість використання тіакалікс[4]аренів як внутрішньоклітинних флуоресцентних зондів до катіонів Zn у міоцитах матки.

Методи дослідження: флуоресцентна мікроскопія, протокова цитофлуориметрія, МТТ-тест, ензимологічні, спектрофотометрія, спектрофлуориметрія, комп'ютерне моделювання, докінг-аналіз, препаративна біохімія, біохімічна кінетика та статистичний аналіз.

Наукова новизна одержаних результатів. У роботі вперше на прикладі міоцитів матки досліджено можливість використання тіакалікс[4]аренів в якості хелатуючих агентів в живих системах. Зокрема, методом флуоресцентної мікроскопії показана здатність тіакалікс[4]аренів проникати всередину клітин міометрія. Методом МТТ-тесту виявлена здатність тіакалікс[4]арену C-800 знижувати негативний вплив катіонів Cd та Pb на дихальний ланцюг мітохондрій клітин міометрія, а саме НАДН-дегідрогенази та сукцинатдегідрогенази мітохондрій тому, що реакція відновлення МТТ реагенту відбувається переважно за рахунок ензимів та носіїв електронів мітохондрій.

Вперше встановлено, що тіакалікс[4]арени усувають інгібувальний вплив катіонів Cd, Pb, Zn та Ni на АТРази субфрагмента-1 міозину. З використанням методу комп'ютерного моделювання були запропоновані можливі механізми усунення тіакалікс[4]аренами негативних впливів Cd^{2+} , Pb^{2+} та Zn^{2+} на субфрагмент-1 міозину. Результати молекулярного докінгу тіакалікс[4]аренів C-798 та C-800 показали можливість взаємодії функціональних груп цих

тіакалікс[4]аренів з катіоном Zn в ділянці, яка наближена до АТР-гідролазного центру субфрагмента-1 міозину, за умови зв'язування катіону Zn^{2+} з протеїном.

Методами спектрофлуориметрії та флуоресцентної мікроскопії виявлена можливість використання тіакалікс[4]арену C-800 в якості чутливого та селективного флуоресцентного зонда до катіонів Zn. Показано, що флуоресценція тіакалікс[4]арену C-800 збільшувалася в клітинах міометрія, інкубованих з Zn^{2+} . Вона залежала від їх концентрації та часу інкубації. Для встановлення механізмів посилення флуоресцентних властивостей тіакалікс[4]арену C-800 катіонами Zn та особливостей їх взаємодії в комплексі було проведено комп'ютерне моделювання. Було показано, що катіони Zn зв'язуються на верхньому вінці макроциклу атомами кисню гідроксистофосфонілметильних груп та атомами сірки та кисню гідроксильних груп нижнього вінця. При цьому молекула тіакалікс[4]арену C-800 здатна зв'язати 1 або 2 катіона Zn.

Практичне значення одержаних результатів. Результати, що були одержані, перспективні для подальшого розглядання використання тіакалікс[4]аренів як хелатуючих агентів в медицині. Особливо, беручи до уваги відносну нешкідливість та низьку імуногенність каліксаренів.

З'ясована можливість застосування тіакалікс[4]арену C-800 як чутливого та селективного флуоресцентного зонда до Zn^{2+} , що може мати значення для подальших досліджень ефектів цього катіону в живих клітинах тому, що катіони Zn мають важливе значення для забезпечення життєдіяльності клітин та організму людини. Більше того, катіони Zn шкідливі у надлишковій кількості, тому моніторинг вмісту цих іонів в клітині може мати важливе практичне та теоретичне значення.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом, спільно з науковим керівником акад НАНУ, проф. Костеріним С.О. та старшим науковим співробітником, к.б.н. Лабинцевою Р.Д. сформульовані головні задачі дослідження та розроблено методи його проведення. Підбір, систематизація,

аналіз та узагальнення літературних даних було проведено дисертанткою особисто. Нею особисто виконані більшість експериментальних досліджень за винятком деяких експериментів, які були проведені спільно з співробітниками відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України к.б.н. Лабинцевою Р.Д. та Пугач А.Я., що відображено в спільних публікаціях. Результати теоретичних досліджень комп'ютерного моделювання виконані у співпраці із науковим співробітником відділу біохімії м'язів к.б.н. Бевзою О.В та співробітником ІОХ НАНУ, к.х.н. Черенком С.О. Аналіз власних експериментальних результатів, їх узагальнення, інтерпретація та формування основних положень і висновків роботи проведено спільно із науковим керівником та к.б.н. Лабинцевою Р.Д. . Автор приймав активну участь у написанні та підготовці до друку усіх статей та тез доповідей, що вийшли за темою дисертаційної роботи. Всі розділи роботи та її автореферат написані самостійно дисертанткою.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень, що викладені в дисертації, були представлені на міжнародних та українських наукових конференціях: XII Український біохімічний конгрес (Тернополь, 2019); VII International research and practice conference “Nanotechnology and Nanomaterials” (Львів, 2019); Eastwest Chemistry Conference (Львів, 2018); V International research and practice conference “Nanotechnology and Nanomaterials” (Чернівці, 2017). Результати експериментів також систематично доповідались та обговорювались на наукових семінарах відділу біохімії м'язів та засіданнях Вченої Ради Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України (2017-2020 pp.)

За результатами дисертації опубліковано 3 статті у фахових наукових журналах та глава в монографії:

Структура та обсяг роботи. Дисертаційна робота викладена на 143 сторінках машинописного тексту та включає розділи: вступ, огляд літератури, методи досліджень, результати досліджень та їх обговорення, заключний розділ, висновки та список використаних джерел, який містить посилання. Робота ілюстрована 32 рисунком.

Список використаних джерел охоплює 308 найменувань.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Структурні особливості гладеньких м'язів

М'язові тканини - це тканини, різні за будовою та походженням, але об'єднані здатністю до скорочення. Вони забезпечують переміщення організму та його частин у просторі, а також рух внутрішніх органів [64]. За морфофункціональними характеристиками виділяють три основні види м'язів: поперечносмугасті, серцеві та гладенькі.

ГМ утворюють скоротливу мускулатуру внутрішніх органів, судин та шкіри. Клітини ГМ мають веретеноподібну форму, їх довжина складає 20-200 мкм, а в матці під час вагітності може досягати 500 мкм. Клітини ГМ зібрані в пучки, що становлять функціональні одиниці тканини. Скоротливий апарат ГМ представлений протофібрилами аналогічними до міофібрил поперечносмугастих м'язів, однак вони не мають їхньої чіткої структури. Протофібрили ГМ утворені актином та міозином, що формують актиноміозиновий комплекс. В поперечносмугастих м'язах співвідношення товстих протофібрил до тонких становить 1 : 2 в той час, як у ГМ це співвідношення коливається від 1 : 5 до 1 : 27. Крім того, в ГМ матки актину в 6 разів більше ніж міозину. Актинові нитки ГМ утворюють пучки орієнтовані вздовж або навкіс по відношенню до поздовжньої осі міоцита.

Скоротлива активність ГМ регулюється іонами Са, за низького рівня Ca^{2+} скоротливий апарат ГМ представлений розрізненими тонкими філаментами та міозином. Під впливом підвищеної концентрації іонів Са міозини утворює товсті філаменти.

Клітини ГМ мають пластинки прикріплення на внутрішній поверхні плазмолем та щільні тільця - аналоги Z -ліній поперечно — посмугованих м'язів. Щільні тільця забезпечують скріплення кінців протофібрил та прикріплення їх до плазмолем. Вони складаються з α -актиніну. Мітохондрії клітин ГМ дрібні, ендоплазматичний ретикулум розвинений слабо, на відміну від

поперечносмугастих м'язів [65, 66].

1.1.2. Міозини - молекулярні мотори

Міозини — це актинозалежні молекулярні мотори, які використовують енергію гідролізу АТФ, щоб рухатись вздовж актинових філаментів. Міозини представляють собою велику родину, що включає близько 20 класів білків [67], що присутні в рослин, тварин та грибів. Вони виконують різноманітні функції в клітині такі, як міграція, адгезія, забезпечення скорочення м'язових клітин, беруть участь в сигнальній трансдукції, внутрішньоклітинному транспорті молекул та органел [68-73]. Міозини класифікують в надродини канонічних та неканонічних міозинів. Ця класифікація ґрунтується на основі філогенетичного та порівняльного аналізу відмінностей амінокислотних послідовностей найбільш консервативного для всіх родин N-кінцевого глобулярного моторного домену та хвостової частини міозину [70]. Згідно з класифікацією до канонічних міозинів належать міозини II. Дані міозини - єдині відомі міозини, що здатні утворювати товсті філаменти. До цієї родини належать всі м'язові міозини. Канонічні міозини були вперше описані понад 60 років тому у цитоплазмі м'язових клітин хребетних тварин. В наш час міозини II поділяють на 4 підродини: 1) міозини поперечносмугастих та серцевого м'язів; 2) міозин ГМ та нем'язові форми міозину; 3) міозин слизовиків *Dictyostelium*, *Acanthamoeba* та *Physarum*; 4) вид міозинів, що знайдені у грибах. Характерною особливістю цих міозинів є наявність довгого подвійно-спірального хвоста завдяки, якому лише їм властиво самостійно збиратися у товсті філаменти [71]. Міозини інших 19 родин належать до надродини неканонічних міозинів. Вони відрізняються різноманітністю структури, функцій та здатністю до димеризації з утворенням двоголовчатої форми, а вони також можуть перебувати у вигляді мономерів (одноголовчата форма) [69, 70].

Міозин родини II — гексамер, що складається з двох важких ланцюгів (~ 200 кДа), двох легких регуляторних (~ 20 кДа) та двох легких суттєвих ланцюгів

(~ 17 кДа). Ці поліпептидні ланцюги утримуються за рахунок нековалентних взаємодій, утворюючи комплекс під назвою мономерний міозин. Важкий ланцюг (ВЛ) міозину має три різні функціональні ділянки: N-кінцеву частину, що містить моторний домен, шийку та C-кінцеву частину, що може брати участь в утворенні надмолекулярних структур. В гладеньких м'язах перші ~ 850 а.о. N-кінцевої частини формують моторний домен здатний зв'язувати актин та здійснювати гідроліз АТР. Легкі ланцюги міозину прикріплені до шийки важкого ланцюга міозину, що формує важіль рухливості, якого забезпечує рух товстих філаментів відносно тонких актинових [73]. За головою (моторним доменом) знаходиться довга α -спіраль, що формує подвійну α -спіраль перша чверть якої (домен S2) забезпечує димеризацію важких ланцюгів. Решта C-кінцевої частини важкого ланцюга міозину забезпечує утворення товстих філаментів.

Головка міозину (субфрагмент-1) містить кілька доменів названих за їх молекулярною масою 25 кДа, 50 кДа- та 20 кДа домени [74]. 50-кДа домен поділений щілиною на „верхній” та „нижній” субдомени, які об'єднуються в один актин-зв'язувальний субдомен [75, 76] (Рис. 1.1). Конвертерний субдомен, що знаходиться в 20 кДа домені на межі моторного і регуляторного доменів являється найбільш рухливою частиною моторного домену міозину. Інші субдомени виявляють тільки незначні зміни положення за різних конформаційних станів голівки в процесі АТР-ного циклу. Функція конверторного субдомену – підсилення малих конформаційних змін у нуклеотидзв'язувальній кишені моторного домену, що відбуваються під час гідролізу АТР. Вони передаються до регуляторного домену, спричиняючи приєднання міозинової голівки до актинового філамента (утворюються так звані “поперечні містки”). Здійснення обертального руху містком відносно стрижневої частини міозину відбувається завдяки гнучким шарнірним ділянкам шийної частини важкого ланцюга (шарнір S-1–S-2). Завдяки шарнірам кожна голівка міозину здатна здійснювати багаторазові повороти, що періодично змінює кут її нахилу відносно ниток актину [9, 77-79].

Вважається, що міждоменна рухливість голівки міозину забезпечується щілиною та гнучкими одноланцюговими структурними елементами (з'єднаннями), які поєднують чотири субдомени моторного домену голівки міозину.

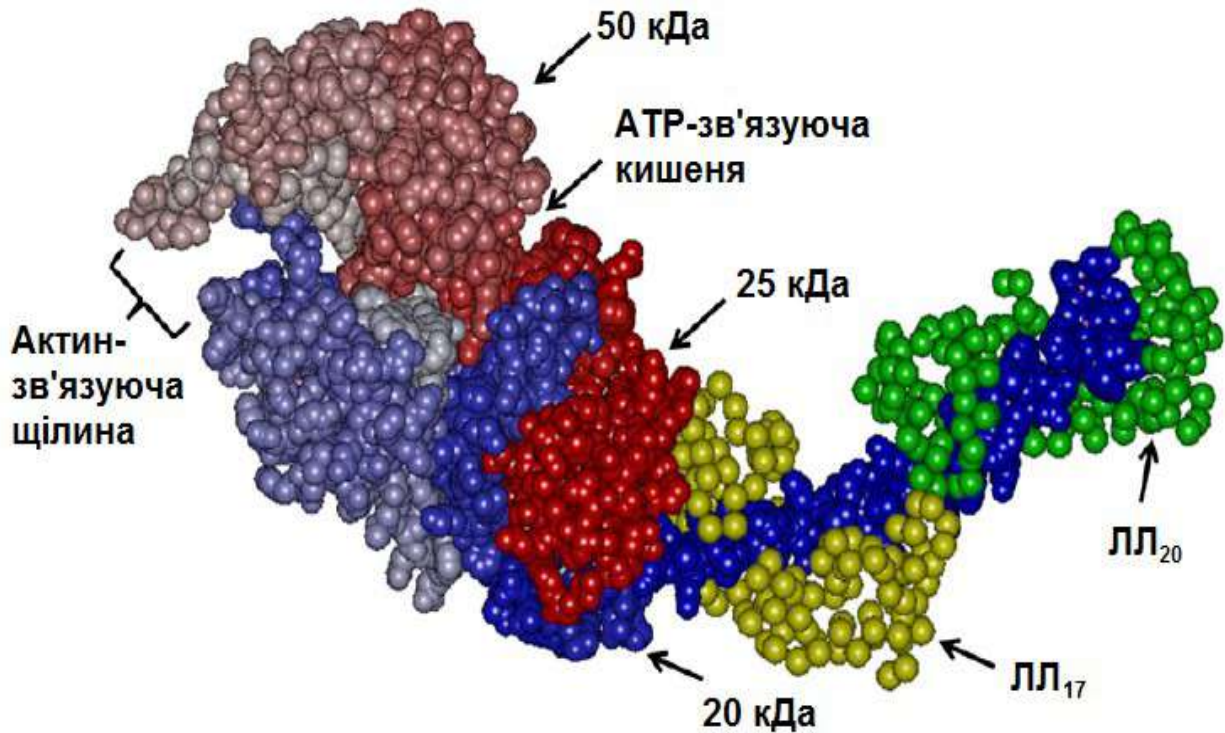


Рис.1.1. Доменна структура субфрагмента-1 міозину [45].

Одним із таких елементів є область реле, що з'єднує нижній субдомен актин-зв'язуючого домену з конвертером та контролює його рухи. Різна просторова орієнтація конвертора/реле (конверторно-релейного модуля) як змінного елемента відповідає різним структурним станам поперечного містка. Ділянка довжиною в 15 амінокислотних залишків перед конвертером є основою другого з'єднання – SH-спіраль, конформації, якого залежать від різних орієнтацій конвертера. Зв'язування нуклеотиду в нуклеотидзв'язуючому центрі сприяє розкручуванню SH-спіралі та віддаленню конвертера від моторного домену. Невід'ємною частиною нуклеотидзв'язуючої кишені голівки міозину є «перемикач»; це третій елемент, що знаходиться у нижній частині

актинзв'язуючої щілини, поблизу ділянки зв'язування АТР, і який відіграє основну роль у взаємодії між останньою та актинзв'язуючою поверхнею. Малі конформаційні зміни у «перемикачі» є наслідком чутливості до хімічних перетворень в активному центрі, що призводить до асоціації «реле» та «SH-спіралі», яка змінює взаємну орієнтацію нижнього 50-кДа субдомену та конвертера в той час як важіль ефективно вловлює та підсилює ці зміни [9].

1.1.3. Ізоформи міозину гладеньких м'язів

Описано чотири ізоформи міозину ГМ, які кодуються одним геном. Відмінності між ізоформами зумовлені процесом альтернативного сплайсинга, різні варіанти, якого зумовлюють утворення ізоформ міозину ГМ. Альтернативний сплайсинг 21 екзону призводить до включення короткої послідовності з семи амінокислот QGPSFAY в головці на N-кінці міозину та утворення ізоформи SMB (smooth muscle B) міозину. Вкорочена ізоформа SMA (smooth muscle A) міозину, відповідно, не містить амінокислотної вставки. Обидві ізоформи відрізняються за швидкістю гідролізу АТР. SMB має вдвічі більшу швидкість гідролізу АТР в порівнянні з SMA, а отже спричиняє вищу швидкість скорочення ГМ [80].

В тканинах рівень експресії ізоформ SMA і SMB відрізняється. Значний вміст ізоформи SMA в у тонічних м'язах аорти, матки та шлунку. В той час, як SMB найбільш виражено експресується в фазових м'язах сечового міхура, тонкого кишечника та легень [81]. Експресія ізоформ ВЛ міозину SMA і SMB змінюється в залежності від стадій розвитку та віку, так в аорті новонароджених щурів значний вміст ізоформи SMB в той час, як в аорті дорослих щурів вона майже відсутня [82].

Альтернативний сплайсинг 39 екзона, що містить у своєму складі стоп-кодон, призводить до утворення ізоформ SM1 (smooth muscle 1) та SM2 (smooth muscle 2). Ізоформа SM1 (204 кДа) на 34 амінокислотних залишка довша від ізоформи SM2 (smooth muscle 2) (200 кДа) [83]. Встановлено, що рівень експресії

ізоформ ВЛ міозину у всіх ГМ тканинах пов'язаний з розвитком та ростом організму. В ембріона вівці рівень експресії SM2 в аорті поступово знижується, але зростає вміст SM1. В той час, як в сечовому міхурі вівці вміст SM2, навпаки, поступово зростає впродовж розвитку плода [84]. Був ідентифікований неоднорідний розподіл ізоформ SM1 та SM2 у ГМ тканинах таких, як судини бика, стравохід опосумів. У деяких органах розподіл ізоформ міозину залежить від шару. Наприклад, повідомлялось, що ізоформа SM1 ВЛ міозину експресується як в повздовжньому, так і в круговому шарах матки кролика, в той час як ізоформа SM2 ВЛ міозину присутня тільки у повздовжньому шарі матки. В період вагітності експресія ізоформи SM1 у матці кролика була більш виражена в порівнянні з невагітними та в кроликів до десятого дня вагітності [85]. Співвідношення ізоформ хвостової частини ВЛ міозину (SM1 та SM2) у ГМ тканинах коливається у досить вузькому діапазоні (40: 60 або 60 : 40), хоча не виключено, що воно може залежати від стадій розвитку організму [83].

1.2. Робочий цикл актоміозинового комплексу

Скорочення усіх типів м'язів відбувається внаслідок взаємного ковзання актинових та міозинових філаментів, що супроводжується гідролізом АТР Mg^{2+} -АТРазою міозину [86, 87].

Робочий цикл актоміозинового комплексу складається із чотирьох етапів. Зв'язування АТР у нуклеотидзв'язуючому сайті міозину спричиняє швидку дисоціацію актоміозину, внаслідок значних конформаційних змін у поперечних містках. На цьому етапі поперечні містки міозинових протофібрил орієнтовані перпендикулярно до актинової протофібрили, але незамкнуті з ними. В каталітичному центрі міозину відбувається гідроліз молекули АТР, що веде до утворення стабільного комплексу міозину з продуктами реакції ($MgADP.Pi$). Цей етап відповідає замкнутому стану поперечного містка, що орієнтований перпендикулярно під кутом 90° до актинового філаменту. Генерована енергія витрачається на зміну просторової орієнтації голівки (повороту містка) у бік

наступного актинового мономеру тонкого філаменту (перехід $90^\circ - 45^\circ$), який повторно, але все ще слабо взаємодіє з міозином. В наслідок таких перебудов генерується тягнуча сила по відношенню до тонкого філаменту, яка зміщує актинову протофібрилу на невелику відстань біля 10 нм. Потім виникає більш міцне зв'язування актину з голівкою міозину, що ініціює вивільнення продуктів АТР-гідролазної реакції ADP та P_i з актин-зв'язувального центру та формування вихідного міцного актоміозинового комплексу. Зміни, що відбуваються в каталітичному центрі після дисоціації P_i викликають додаткове збільшення спорідненості міозину до актину. В наслідок чого обертальна можливість міозинового містка стає обмеженою [78, 79]. Під час кожної циклічної взаємодії міозину з актином гідролізується голівкою міозину одна молекула АТР до ADP та P_i .

ГМ міозин має свої особливості циклу гідролізу АТР. Вивільнення ADP із активного центру після гідролізу АТР, може уповільнюватись або припинятись і головка міозину на тривалий час залишається приєднаною до актинового філаменту. Таке уповільнення вивільнення ADP та P_i зумовлює тривале тонічне напруження ГМ та економне використання АТР в клітині. Підтримка тривалого тонічного напруження — важлива для виконання функцій багатьох видів ГМ, зокрема, підтримання високого кров'яного тиску у судинах. Вивільнення ADP з активного центру може бути прискорене фосфорилюванням ЛЛ20 міозину ГМ [9].

1.3. Актин

Актин — другий головний протеїн скоротливого апарату м'язів і один з основних білків цитоскелета клітини [65]. Вміст актину в клітинах значний він становить близько 10% від усього протеїну в м'язових клітинах, 1-5% загального протеїну нем'язевих клітин [71]. Він представлений шістьма ізоформами у ссавців. Дві ізоформи — скелетний α -актини та серцевий α -актин, представлені відповідно в клітинах поперечсмугастих та серцевому м'язах. Дві ізоформи:

гладеньком'язовий α -актин та гладком'язовий γ -актин експресуються в клітинах гладеньких м'язів [88, 89]. Гладеньком'язовий γ -актин експресується переважно у клітинах тонкого кишечника, інші клітини ГМ містять незначну кількість цієї ізоформи актину [90]. β -Актин та цитоплазматичний γ -актин розповсюджені у всіх типах клітин. В той час, як α -актин переважно експресуються м'язовими клітинами [89, 90]. Однак, при різних захворюваннях інші типи клітин починають експресувати гладеньком'язовий α -актин [91, 92].

Кожна ізоформа актину кодується окремим геном. Хоча послідовність амінокислот в усіх ізоформ актинів майже ідентична, вони відрізняються між собою лише кількома амінокислотними замінами на N-кінці, кожна з ізоформ виконує свої унікальні функції, які лише частково можуть компенсуватись іншими ізоформами актину [90]. α -Актини формують міофібрили та протофібрили м'язових клітин, β -актин та цитоплазматичний γ -актин утворюють мікрофіламенти цитоскелета [88].

Актин знаходиться в формі глобулярного мономеру (G-актин) або у вигляді волокнистого полімера (F-актин) — лінійного ланцюга, утвореного G-актинами (Рис. 1.2) [65]. G-актин має два домени — зовнішній та внутрішній, які мають різні розміри. Зовнішній (маленький) домен має менший розмір, а внутрішній більший (великий домен). Основні домени поділяють на чотири субдомени. Зовнішній та внутрішній домени утворюють розсілину, у якій зв'язуються нуклеотиди та іони двохвалентних металів (напр. Mg^{2+}). Актин — це АТРаза здатна каталізувати гідроліз АТР до АДФ і P_i [96, 97]. Кожна молекула G-актина містить комплекс Mg^{2+} з АТР або АДФ [71].

Полімеризація актину — складний процес, що відбувається в декілька етапів і потребує наявності катіонів металів та забезпечується факторами нуклеації актину. Спочатку G-актин утворює короткі та нестабільні олігомери - центри полімеризації. Після утворення коротких олігомерів, іде швидко приєднання мономерів актину до обох кінців із формуванням ниток актину. F-актин складається з двох ланцюгів скручених між собою в довгу правозакручену

дволанцюгову спіраль. Нитки актину — полярні, вони мають тупий або “+” кінець та гострий або “—” кінець. Мономери актину приєднуються до тупого кінця. На гострому кінці відбувається дисоціація G-актину. Отже, на тупому кінці іде процес полімеризації актину, а на гострому відбувається процес деполімеризації нитки актину. “+” кінець F-актину переважно утворений мономерами актину з АТР, а “—” кінець мономерами з АDP [65].

На даний час виявлено три основні класи нуклеаторів актину, що забезпечують його полімеризацію: комплекс Arp2/3, форміни і тандемні нуклеатори. Комплекс Arp2/3 включає сім субодиниць з яких Arp2 та Arp3 — структурно подібні до актину. Комплекс слугує сайтом нуклеації актинових філаментів, а також їх галудження під кутом 70° . Він сприяє утворенню розгалуженої актинової мережі в клітині [93, 94].

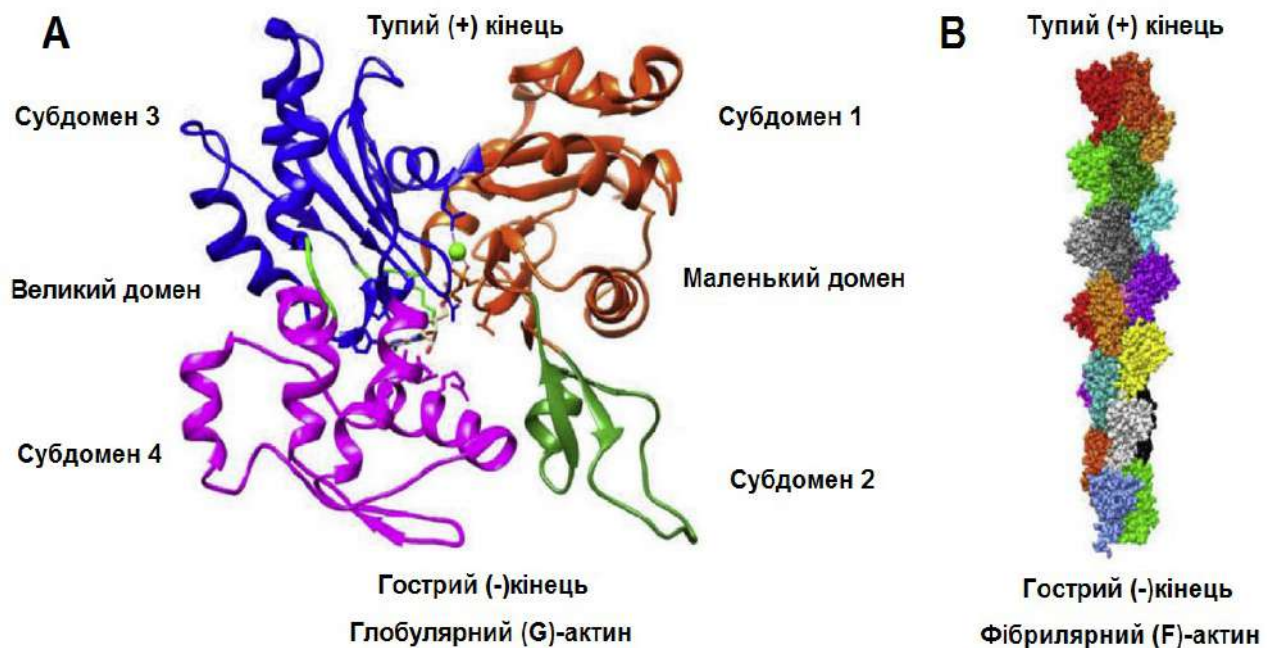


Рис 1.2. Форми актину глобулярний мономер (G-актин) (А) фібрилярний полімер (F-актин) (В) [97].

Форміни оточують швидко зростаючий тупий кінець F-актину,

залишаючись пов'язаними з ними, сприяючи подовженню актинових філаментів. Форміни беруть участь в утворенні нерозгалужених актинових філаментів [95]. Білки Spire та Cobl - тандемні нуклеатори актину, які мають WH2 домени, що здатні взаємодіяти з мономерним актином, забезпечуючи його полімеризацію. Spire одночасно взаємодіє з трьома G-актинами, тоді як Corb з чотирьома. Spire та Cobl сприяють утворенню нерозгалужених ниток актину, подібно до формінів. Нуклеатори актину беруть участь в утворенні цитокінетичних скоротливих кілець, філоподій, адгезивних контактів, ендо- та екзоцитозі [93-96].

1.4. Регуляція скорочення гладеньких м'язів

Фосфорилування ЛЛ₂₀ міозину по Ser19 відіграє важливу роль у забезпечення скорочення ГМ. Воно призводить до активації міозину ГМ, сприяючи посилення АТРазної активності, утворення товстих філаментів та ініціації його взаємодії з актином. Сила скорочення гладеньких м'язів багато в чому залежить від рівня фосфорилування міозину в ГМ клітині. Саме на її модифікацію направлено більшість механізмів регуляції скорочення і тонусу ГМ, а порушення цих механізмів веде до змін скоротливої функції ГМ з наступному розвитком патологічних станів. Фосфорилування ЛЛ₂₀ здійснюється рядом серин-треонінових кіназ за механізмами залежним та незалежним від кальцію. N- та C-кінцеві послідовності ЛС₂₀, а також залишки Thr18 і Ser19 - дуже консервативні в тварин та відіграють значну роль в фосфорилуванні ЛС₂₀. Послідовність RATS NVFAMF (амінокислотні залишки 16–25) навколо сайти фосфорилування, однакова у всіх видів тварин, які експресують ЛС₂₀. Arg16 відіграє головну роль у розпізнаванні субстрату кіназою легких ланцюгів міозину (КЛІМ) [97, 98], а три основні залишки Lys11, Lys12 і Arg13, хоча важливі для його впізнавання, однак відіграють у ньому меншу роль [99].

1.4.1. Незалежний від кальцію механізм скорочення гладеньких м'язів

Ряд кіназ здійснює фосфорилування міозину ГМ за незалежним від кальцію механізмом, зокрема ROCK (Rho-associated kinase) [100], ZIPK (Zipper interacting protein kinase) [101] та ILK (Integrin-linked kinase) [102]. Зміни в експресії цих кіназ можуть порушувати процес скорочення ГМ, сприяючи розвитку низки захворювань, зокрема гіпертонії [103, 104], астми [105], нетримання сечі [106, 107], серцевої недостатності [108], діабету [109, 110] та інших. Варто зазначити, що експресія кіназ залучених до фосфорилування ЛЛ₂₀ є тканиноспецифічною, що має важливе значення для модулювання скорочення ГМ різних органів. Так в ГМ судин рівень експресії ROCK1/2 є досить низьким той час, як у міометрії він є високим особливо під час вагітності [111].

Серин-треонінові кінази ILK, ROCK та ZIPK здатні фосфорилувати ЛЛ₂₀ додатково по Tre 18, а не тільки по Ser 19. При цьому, АТР-гідролазна активність дифосфорильованого міозину в 3 рази вища ніж монофосфорильованого. Приміром, подвійне фосфорилування ЛЛ₂₀ кіназою ROCK має важливе значення для регуляції скорочення міометрія [112], тому порушення експресії даної кінази можуть мати негативні наслідки для його функціонування.

Зворотній процес дефосфорилування міозину ГМ забезпечується фосфатазою ЛЛ₂₀, що призводить до інактивації міозину. Деякі кінази, що залучені до фосфорилування ЛЛ₂₀, беруть участь у регуляції активності фосфатази ЛЛ₂₀. Зокрема, активація ROCK та ZIPK знижує активність фосфатази ЛЛ₂₀, здійснюючи її фосфорилування по Thr853 та Thr696 у активному центрі, що збільшує внутрішньоклітинну концентрацію фосфорильованих ЛЛ₂₀, що запобігає розслабленню ГМ. Послідовність амінокислот навколо залишків Thr696 і Thr853 фосфатази ЛЛ₂₀, що фосфорилуються ROCK та ZIPK має схожий з ЛЛ₂₀ розподіл заряджених і гідрофобних залишків амінокислот [113]. Після фосфорилування ці послідовності зв'язуються в активному центрі фосфатази ЛЛ₂₀, знижуючи її активність шляхом аутоінгібування. Гіперактивація сигнального шляху

асоційованого з ROCK у серцево-судинній системі призводить до зниженої активності фосфатази PL_{20} , призводячи до стійкої вазоконстрикції та підвищення артеріального тиску. Тривала гіперактивація ROCK сприяє розвитку гіпертонічної хвороби, в якій задіяно ряд механізмів, включаючи порушення регуляції фактору обміну гуанінових нуклеотидів Rho [114].

Незалежний від кальцію механізм регуляції скорочення ГМ може посилювати їх відповідь на підвищення рівня кальцію у цитоплазмі міоцитів (сенсibilізація), що значно модулює процес скорочення. ROCK-залежна сенсibilізація ГМ до кальцію особливо важлива в гострій фазі звуження судин. Про це свідчать дослідження, що демонструють зменшення початкового судинозвужувального впливу механічних, гуморальних та нервових подразників при блокаді цього шляху [99].

1.4.2. Скорочення гладеньких м'язів опосередковане Ca^{2+}

Са - двовалентний катіон, що призводить до значних електрохімічних змін в ГМ клітині. Скорочення ГМ опосередковане Ca^{2+} викликає в першу чергу зміни товстих філаментів, на відміну від поперечносмугастих м'язів, де зміни переважно стосуються тонких актинових ниток [66]. У відповідь на певні подразники внутрішньоклітинна концентрація Ca^{2+} в ГМ зростає. При цьому він активує кислий протеїн кальмодулін, який зв'язує чотири катіона Са. Комплекс кальмодуліну та Ca^{2+} активує КЛЛМ, яка фосфорилує LC_{20} міозину по Ser19. Вміст Ca^{2+} в цитозолі збільшується через вивільнення катіонів Са з внутрішньоклітинних депо (ендоплазматичний ретикулум), а також надходження Ca^{2+} з позаклітинного простору через ліганд-залежні та потенціал-залежні Са-канали. Са-залежний сигнальний шлях є тканиноспецифічним та має деякі відмінності в різних тканинах та органах. Зокрема, в ГМ матки Са-канали L-типу - основні потенціал-залежні Са-канали під впливом Ca^{2+} відкриваються після деполяризації мембрани міоцитів матки та досягненні потенціалу приблизно 240 мВ під впливом Ca^{2+} , що забезпечує подальше надходження цього катіона в

клітину [115, 116]. Підвищення рівня Ca^{2+} в міоциті ініціює низку подій, що призводять до скорочення ГМ матки [117].

Скорочення ГМ стимулюється агоністами такими, як норадреналін, ангіотензин II, ендотелін та інші, які зв'язуючись з серпентинними рецепторами в плазматичній мембрані, сполученими з гетеротримерними G-білками, активують фосфоліпазу С β . Цей ензим каталізує утворення двох вторинних месенджерів IP $_3$ (інозитол трисфосфата) та ДАГ (діацилгліцеролу) з фосфатиділінозитол- 4,5-дифосфату плазматичної мембрани. Зв'язування IP $_3$ з рецепторами ендоплазматичного ретикулума призводить до вивільнення Ca^{2+} в цитозоль. ДАГ разом з Ca^{2+} активує протеїнкіназу С, яка фосфорилує цільові протеїни, зокрема Са-канали L-типу. Активація протеїнкінази С переважно сприяє скороченню ГМ. Існує кілька ізоензимів протеїнкінази С в ГМ, які являються тканниоспецифічними. Однак, функції протеїнкінази С в міометрії невідомі. Вважається, що вона може сприяти негативному зворотному зв'язку в міоцитах матки шляхом стимулювання інтерналізації і деградації рецепторів, а також пригнічення синтезу нових рецепторів, знижуючи транскрипцію їх мРНК [118-120].

1.5.1. Негативний вплив важких металів здоров'я людини та тварин

ВМ — велика група речовин, яка забруднює довкілля. Спеціалісти з охорони навколишнього середовища виокремлюють групу металів-токсикантів, які є найбільш небезпечними для здоров'я та життя людини та тварин. Ця група включає кадмій, мідь, арсен, нікель, меркурій, свинець, цинк та хром. Серед них Pb та Cd - одні з найбільш токсичних. Ці елементи — дуже шкідливі для організму навіть у малій кількості [18-20, 121]. Особлива небезпека від Pb і Cd полягає в їх здатності накопичуватись в органах та тканинах, оскільки організм людини не має ефективних механізмів їх виведення. Так для Cd період напіввиведення з нирки в людини складає 6-38 років, а з печінки 4-19 років [122]. Cd потрапляє до організму разом з їжею, напоями та повітрям [21]. Він

накопичується в легенях або кишечнику залежно від шляху надходження, а потім потрапляє в печінку, нирки, матку та молочні залози [123].

Cd- це перехідний, двохвалентний метал з вісьмома стійкими ізотопами, який був відкритий німецьким хіміком Строхмайєром у 1817 р. через вивчення домішок карбонату цинку. Цей метал зустрічається в природі в багатьох формах, однак найпоширенішим він є у складі карбонатів, хлоридів, оксидів, сульфатів та сульфідів. Cd- широко поширений елемент у земній корі, тому ерозія гірських порід та вулканічна активність сприяють його вивільненню. Cd міститься в океанських водах з вмістом близько 0,1 мкг / л. Однак, у річкових водах його вміст дещо нижчий від 1 до 13,5 нг / л, а в ґрунті міститься від 0,2 до 0,4мг / кг Cd. Людська діяльність також значною мірою сприяє забрудненню Cd довкілля. Його зазвичай отримують як побічний продукт концентратів цинку (Zn). Співвідношення Zn та Cd у більшості мінералів становить від 200:1 до 400:1. Цей метал може виділятися шляхом вторинної переробки батарей, мідно-кадмієвих сплавів та порошку з дугових печей. Він використовується при виготовленні різних товарів загального вжитку, зокрема нікель-кадмієвих батарей. На їх виробництво припадає 90% світового споживання цього елемента. Крім того, Cd використовується у виробництві пігментів, покриттів, стабілізаторів для пластмас, кольорових сплавів, гальванічних матеріалів, фотоелектричних пристроїв тощо [21, 24, 123, 124].

Спосіб життя значно впливає на потрапляння Cd в організм, приміром викурювання однієї сигарети збільшує його концентрацію в крові курця приблизно на 0,1–0,2 г/л, оскільки кожна сигарета містить 1 -2 мкг Cd. Мешканці великих індустріальних міст, також, отримують підвищену кількість Cd з повітрям порівняно з мешканцями сільської місцевості, оскільки вміст Cd в атмосфері міст складає 0,005-0,015 мкг/м³, а в районах міст з розвиненою промисловістю до 0,06 мкг / м³. Тоді як сільській місцевості його вміст становить становлять до 5 нг / м³ [125-127].

Pb - ковкий та легкоплавкий метал сріблястого кольору, який належить

до 4 групи періодичної таблиці. Pb здавна використовувався у побуті людини. Pb - досить поширений елемент земної кори, де його частка складає $1,6 \cdot 10^{-3} \%$. В природі Pb зустрічається у складі сульфідів, сульфатів та карбонатів, а також рудах урану та торію. Pb використовується для виробництва листового заліза, покриттів проти вологи, гуми, фарб, дротів, кабелів та акумуляторів. Основним джерелом забруднення Pb у містах є викиди від спалювання бензину у двигунах транспортних засобів. Однак останнім часом вміст Pb у бензині значно знижено згідно з екологічними вимог. В організмі близько 5% Pb утворює обмінний пул між м'якими тканинами і кров'ю, а решта 95% відкладається в кістках у вигляді нерозчинних фосфатів з періодом напіввиведення 20 - 30 років. Близько 93% Pb, що надходить у кров, швидко зв'язується з мембранами еритроцитів та гемоглобіном із періодом напіввиведення близько 35 днів [128-130]. Існують свідчення того, що при тривалому зберіганні в кістках значна частина Pb зв'язується з білками, зокрема, металтеонеїнами, що було продемонстровано на еритроцитах осіб, які зазнали впливу Pb [131]. Таке зв'язування має тенденцію до збільшення періоду напіввиведення Pb з крові. Населення отримує Pb з повітря та їжі приблизно в рівних пропорціях. Діти особливо сприйнятливі до впливу Pb завдяки легкому його проникненню через шлунково-кишковий тракт та гематоенцефалічний бар'єр [132]. Протягом минулого століття викиди Pb у атмосферне повітря спричиняли значне забруднення, головним чином через викиди від спалювання етильованого бензину.

Концентрація Pb в організмі людини залежить від різних факторів серед, яких місце проживання, спосіб життя та вік відіграють важливу роль. Підвищений рівень Pb в сироватці крові людини було виявлено у осіб, які мешкали у промислово розвинених регіонах, які палили та зловживали алкоголем [33].

Багато ВМ належать до мікроелементів необхідних для нормальної життєдіяльності та розвитку організму людини, такими є цинк, мідь, хром та ін. [133, 134]. Однак, надлишок цих мікроелементів призводить до порушень в

організмі [135].

Zn^{2+} є другим найпоширенішим катіоном металу після заліза в організмі людини. Він - необхідний мікроелемент для нормального розвитку організму та життєдіяльності людини. В організмі дорослої людини міститься 2-3 г Zn. Його недостатність призводить до відставання фізичного, розумового розвитку та статевого дозрівання у дітей. У дорослих нестача цинку може призводити до безпліддя [136, 137]. Zn^{2+} входить до складу понад 300 ензимів, включаючи вуглекислу ангідразу та алкогольдегідрогеназу. Zn^{2+} , також, є компонентом деяких факторів транскрипції в, яких цей катіон бере участь у зв'язуванні з генами-мішенями [138].

Незважаючи на те, що Zn - життєвоважливий мікроелемент, однак його надлишок є токсичним. Надлишок цього мікроелементу в організмі людини найчастіше виникає при прийомі ліків та біологічно активних добавок, що містять надлишок Zn в своєму складі. Оксиди, хлориди та сульфати цинку широко застосовуються в промисловості, зокрема для виробництва скла, фарб, штучних волокон, паперу тощо [135]. Надлишок Zn^{2+} в організмі може сприяти розвитку хвороби Альцгеймера, сприяючи відкладенню β -амілоїду в нейронах [139, 140], а також може сприяти розвитку раку простати у чоловіків [141].

Ni — біометал, який у входить до складу ензимів метаболізму сечовини. Ni також є мікроелементом, необхідним для правильного функціонування людського організму, оскільки він підвищує гормональну активність і бере участь у метаболізмі ліпідів. Цей метал широко використовується в багатьох галузях промисловості таких, як електроніка, медицина, ювелірна справа та виробництво автомобілів. Ni надходить до організму людини через дихальні шляхи, травну систему та шкіру [142]. Великі дози Ni або тривалий контакт з ним можуть викликати різноманітні побічні ефекти, зокрема призводити до алергії. Кількість людей, що страждають від алергії на Ni зростає, більш поширеною вона є серед жінок. Шкідливий вплив нікелю також полягає в його генотоксичності, тератогенності, імунотоксичності та канцерогенності [143, 144].

1.5.2. Негативний вплив важких металів на репродуктивну систему жінки

ВМ викликають різноманітні порушення репродуктивної системи жінки призводячи до безпліддя [33-36] , затримки статевого дозрівання у дівчат [32], викликають гормональні порушення в жінок [30, 31] та онкологічні захворювання статеві системи [33, 38] .

Pb викликає структурні зміни яєчника, порушення оваріального циклу, та сприяє розвитку міоми матки [20]. Він здатний проникати крізь плацентарний бар'єр та викликати патології плода [17]. Деякі дослідження показали, що Pb може безпосередньо призвести до більш високого ризику мимовільного переривання вагітності через можливий тератогенний вплив [39, 40].

Cd має властивості металоестрогену, взаємодіючи з рецепторами естрогену та прогестерону призводячи до гормональних порушень організму жінок та тварин [38]. Він викликає різні захворювання жіночої репродуктивної системи такі, як ендометріоз, викидні, безпліддя, рак ендометрію та молочної залози [33, 35, 38]. У вагітних жінок Cd здатен долати плацентарний бар'єр та проникати до організму плода та викликати різноманітні вади розвитку [40, 145, 146]. Він також може секретуватись з молоком під час вигодовування дитини [41].

1.6. Порушення функціонування дихального ланцюга під впливом важких металів

1.6.1. Утворення активних форм кисню в клітині

У ГМ мітохондрії займають біля 7% об'єму клітини. Вони часто зібрані в невеликі скупчення в перинуклеарному просторі біля саркоплазматичного ретикулума або розташовані вздовж міофіламентів переважно біля гладенького ендоплазматичного ретикулума [147]. Основна функція мітохондрій в еукаріотичній клітині – аеробне окиснення продуктів гліколізу вуглеводів та продуктів гідролізу ліпідів та протеїнів, для забезпечення енергією АТФ всіх

життєво важливих процесів [148, 149]. Молекули АТР, які утворюються завдяки процесу окисного фосфорилування у клітині ГМ використовуються для забезпечення процесів скорочення м'язів та інших залежних від АТР процесів. В середньому цикл скорочення-розслаблення м'яза потребує 0,057 мкМ АТР на г м'язової тканини [150]. У клітинах ГМ судин близько 30% енергії отримується завдяки окисному фосфорилуванню в той час, як решта енергетичних потреб клітини забезпечується завдяки гліколізу [151]. Порушення функціонування мітохондрій пов'язано з розвитком різних захворювань, зокрема раку, хвороби Альцгеймера, ішемії та атеросклерозу [152-155].

Мітохондрії також відіграють ключову роль у утворенні вільних радикалів у клітині. ЕТЛ мітохондрій вважається одним із основних місць утворення АФК в клітинах, зокрема супероксиду ($O_2^{\bullet-}$), перекису водню (H_2O_2) та гідроксильного радикалу [12, 13]. Більше того, більшість супероксиду у мітохондріях ссавців утворюється переважно комплексом I та комплексом III в ЕТЛ [14-16]. Комплексом I (НАДН-дегідрогеназний комплекс) містить 45 поліпептидів з молекулярною масою близько 1 МДа [156, 157]. Комплекс I у ссавців є місцем надходження електронів від НАДН в ЕТЛ. Окислення НАДН комплексом I відбувається у внутрішній мембрані мітохондрії, а також в матриксі. В матриксі також проходить цикл трикарбонових кислот і β -окислення жирів, які є основними джерелами НАДН в мітохондрії. При окисленні НАДН в комплексі I електрони переносяться через ФМН і Fe / S-центри на убіхінон. ФМН вважається основною ланкою продукування АФК комплексом I, оскільки він є першим носієм електронів в ньому [12]. Частка повністю відновленого ФМН визначається співвідношенням НАДН/НАД⁺, тому інгібування дихального ланцюга призводить до зниження інтенсивності дихання, збільшуючи співвідношення НАДН/ НАД⁺. Це призводить до утворення АФК мітохондріями [12, 158-160]. Співвідношення НАДН/НАД⁺ відносно низьке в матриксі мітохондрій при нормальному процесі дихання. Таким чином, комплексом I утворюється лише невелика кількості супероксиду за нормального

функціонування мітохондрій [161].

ЗТЕ- це інший механізм, за допомогою, якого НАДН-дегідрогеназний комплекс продукує велику кількість АФК [162-164]. ЗТЕ виникає у мітохондріях при надлишку відновленої форми убіхінона (убігідрохінона), що зменшує пул окисненого коензиму Q. При цьому частина електронів повертається назад від коензиму Q в комплекс I, відновлюючи НАД до НАДН [13]. Найбільш імовірно, що при ЗТЕ електрони повертаються назад в комплекс I через ФМН. Було показано, що ізольовані мітохондрії, що дихають на сукцинаті, продукують великі кількості АФК із комплексу I шляхом ЗТЕ [165], що може бути пов'язано з посиленою активністю сукцинатдегідрогенази (комплекс II). Отже, місце утворення АФК однакове під час ЗТЕ, як і при збільшенні співвідношення НАДН/ НАД⁺ [134]. Утворення АФК мітохондріями є важливим у патогенезі нейродегенеративних захворювань, ішемії та атеросклерозі та процесі старіння [165-167].

Комплекс III (комплекс цитохромів bc_1) ЕТЛ забезпечує надходження електронів від убіхінона до цитохрому c. Він також, вважається джерелом продукування супероксиду в мітохондріях. Комплекс III включає 11 поліпептидів, три геми і FeS-центр з молекулярною масою ~240 кДа. Інгібування комплексу III антимицином A призводить до утворення АФК. Відомо, що антимицин A блокує сайт зв'язування відновленого убіхінону в комплексі цитохромів bc_1 , це призводить до того, що комплексом III утворюється значна кількість супероксиду від реакції O_2 з семіхіноном. При цьому підвищення пулу відновленого убіхінону [172] та втрата цитохрому c_1 [32, 46] не впливає на утворення супероксиду в комплексі цитохромів bc_1 . Однак за фізіологічних умов утворення супероксиду комплексом III вважається незначним в порівнянні з комплексом I [161].

1.6.2. Вплив важких металів на утворення активних форм кисню в клітині

Функціонування мітохондрій порушується під впливом катіонів Cd і Pb, зокрема Cd^{2+} викликає порушення функціонування дихального ланцюга, призводить до апоптозу, розриву зовнішньої мембрани, окислювального стресу, порушення активності ензимів, білків-транспортів та іонних каналів [46] та індукується внутрішній шлях апоптозу, зокрема відбувається екстерналізація фосфатидилсерину, підвищення рівня PARP, BAD, апаф 1, каспаз 3 та 9, вивільнення цитохрому c разом зі зменшенням експресії Bcl2 в клітинах [173].

Під впливом катіонів Cd значно посилюється утворення АФК, які часто пов'язують з токсичністю Cd^{2+} для різних культур клітин [174-181], а також у тварин через різні шляхи надходження Cd^{2+} [182-185]. Було висловлено припущення, що механізми гострої токсичності Cd^{2+} включають зниження пулу глутатіону в результаті чого посилюється продукування АФК таких, як супероксид аніон, перекис водню та гідроксильні радикали [174, 183, 186]. Підвищений рівень АФК призводить до перекисного окислення ліпідів і пошкодження ДНК. Однак, до цього часу мало відомо про механізми утворення АФК під впливом катіонів Cd [165]. На відміну від гострої інтоксикації, роль АФК у хронічній токсичності Cd суперечлива та значно залежить від умов експерименту. Посилене утворення АФК під впливом Cd^{2+} може подолати антиоксидантний захист, що призводить до посилення перекисного окиснення ліпідів та окисного пошкодження ДНК [186, 187]. З іншого боку, введення низьких доз Cd тваринам протягом одного року збільшує рівень глутатіону в печінці та нирках без підвищення рівня перекисного окислення ліпідів тканин [188]. Окислення ліпідів під впливом Cd^{2+} помітні через 24 години після введення пероральної дози, але ці зміни зменшуються після повторного впливу Cd^{2+} [189]. Експресія генів, пов'язаних із захистом клітини від АФК при окислювальному стресі викликаному Cd^{2+} , зростає, зокрема посилюється експресія гемооксигенази-1, протеїну окислювального стресу A170, білків теплового шоку, GADD45 та GADD153. Однак, експресія генів, пов'язаних з метаболізмом, як правило, пригнічується внаслідок спроби подолання окислювального стресу клітиною

[190-193].

В багатьох дослідженнях показано, що Pb^{2+} є потужним індуктором окислювального стресу. Механізм його розвитку під впливом катіонів Pb включає дисбаланс між утворенням та усуванням АФК в клітинах, що призводить до пошкодження мембран, ДНК та білків. Показано, що Pb^{2+} інгібує ряд важливих антиоксидантних ензимів, зокрема каталазу [194], супероксиддисмутази [195, 196] та глутатіонпероксидазу. Pb^{2+} може ковалентно зв'язуватись з суфгідрильними групами ензимів, що призводить до їх інактивації, вони також здатні заміщувати важливі для каталізу метали, зокрема Mg, Ca і Zn в антиоксидантних ензимах. Встановлено, що Pb^{2+} сприяє окисненню ліпідів мембрани [197], що призводить до зниження потенціалу мітохондріальної мембрани та апоптозу, зокрема підвищує концентрацію цитохрому c в цитозолі, проапоптичного білка аraf-1, каспази 3 та каспази 9 [198]. Окислювальний стрес, викликаний Pb^{2+} , може знижувати рівень мітохондріальних антиоксидантних ензимів та порушення їх функціонування, зокрема супероксиддисмутази 2, зниження пулу глутатіону. Наслідком цього є зниження продукування енергії в клітині, а отже рівня АТФ [199].

1.7. Каліксарени

Негативний вплив ВМ на скоротливі властивості міометрія потребує пошуку фармакологічних сполук, які можуть усунути дію цих металів. Перспективним класом таких сполук є похідні каліксаренів та тіакаліксаренів завдяки їх здатності зв'язувати катіони різних металів [42, 51].

Каліксарени — макроциклічні сполуки чашоподібної структури, що одержують циклоконденсацією пара-заміщених фенолів з формальдегідом. Ароматичні кільця макроциклічного скелета формують гідрофобну порожнину [200].

Каліксарени були вперше синтезовані Адольфом Байером в 1872. Назву каліксарени запропонував Д. Гутче у 1982 оскільки циклічний тетрамер за своєю

формою нагадував грецьку вазу — “каліке” (від грец. чаша, кубок), а “арен” вказує на наявність ароматичних циклів у супрамолекулярному ансамблі [52].

Каліксарени здатні з високою селективністю зв’язувати іони і молекули в стійкі комплекси, розпізнавати і розділяти близькі за властивостями катіони і аніони, а також нейтральні молекули [201]. Вони здатні проникати всередину клітин завдяки гідрофобній чаші з ароматичних кілець [219].

Верхній, нижній вінця та кільце каліксаренів можуть бути піддані селективній хімічній функціоналізації, що дозволяє створювати різноманітні за своїми властивостями комплекси. Чашеподібна форма каліксарену дозволяє включати в свою порожнину і утримувати в ній широке коло компонентів. Властивості каліксаренів та їх похідних робить дані сполуки перспективними для використання в різних областях хімії, біології, медицини та нанотехнології [53, 201-203].

Каліксарени мають різноманітний вплив на біологічні процеси, зокрема змінюють активність ензимів [203-206], блокують хлоридні канали [207], запобігають утворенню тромбів [208] та мають мембранотропну активність [203]. Деякі похідні каліксаренів можуть каталізувати реакції гідролізу АТР [209] та нейромедіатора ацетилхоліна [210], діючи як штучні ензими. Похідні каліксаренів можуть використовуватись, як штучні антитіла [211] та вектори для трансфекції клітин [212].

1.7.1. Вплив каліксаренів на актоміозинний комплекс та активність ензимів

Деякі каліксарени являються ефективним активатором АТРази міозину. 5,11,17,23-тетра(трифтор)метил(фенілсульфоніліміно)-метиламіно-25,26,27,28-тетра-пропоксі-калікс[4]арен (С-90) активує АТР-азну активність актоміозинового комплексу міометрія більш ніж вдвічі [213].

Було показано, що 5,6-дигідроксифосфометил-26,28-дигідрокси-25,27-дигідрокси-калікс-[4]арен (С-99) інгібує активність міозинової АТРази та змінює

структуру актинових філаментів ГМ [214].

Калікс[4]арени функціоналізовані залишками фосфонової, амінофосфонової та метиленбісфосфонової кислот - ефективні інгібітори лужної фосфатази та тирозинфосфатази [215, 216].

Було встановлено, що каліксарени модифіковані залишками гідроксиметилфосфонової кислоти можуть пригнічувати активність глутатіон-S-трансферази. Вона є ключовим ферментом у процесі детоксикації ксенобіотиків в клітинах, що сприяє розвитку резистентності до дії ліків у багатьох видів пухлин [217].

1.7.2. Вплив каліксаренів на транспортну систему гладеньких м'язів

У скороченні ГМ важлива роль належить Mg^{2+} -залежним АТР-гідролазним ферментативним системам. У плазматичній мембрані, якій притаманна селективна проникність для різних речовин, знаходиться низка Mg^{2+} -залежних АТРаз, що забезпечують внутрішньоклітинний іонний гомеостаз. До них належать: транспортувальна Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРаза, з якою пов'язане активне Mg^{2+} -АТР-залежне транспортування Ca^{2+} в позаклітинне середовище; убаїнчутлива Na^+, K^+ -АТРаза, яка здійснює енергозалежне і протилежно направлене перенесення іонів Na^+ та K^+ із клітини та у клітину відповідно, а також убаїнрезистентна базальна Mg^{2+} -АТРаза, що бере участь в регуляції концентрації протонів у позаклітинному та внутрішньоклітинному просторі.

С-90 пригнічує активність Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази плазматичних мембран і фактично не впливає на Na^+, K^+ -АТразу та базальну Mg^{2+} -АТразу. Каліксарени С-97 та С-99 характеризуються інгібувальним впливом на гідроліз АТР Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРазою плазматичної мембрани. Каліксарен С-97 гальмує активність Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази на 70%, а каліксарен С-99 – на 50%. Найсильніше каліксарени С-97 та С-99 інгібують Na^+, K^+ -АТР-азу плазматичної мембрани: майже повністю пригнічуючи її активність [206, 213].

1.8. Розробка ліків на основі каліксаренів та їх похідних

Каліксарени розглядаються як перспективні хімічні макроциклічні сполуки для створення нових недорогих лікарських препаратів для різних галузей медицини. У цей період розвитку хімії каліксаренів визначальним є використання гідроксильних груп на нижньому вінці макроциклу, які дають змогу зі значним ступенем селективності зв'язувати “гостей” у вигляді фармацевтичних субстанцій і слугувати платформами для розробки високоселективних комплексоутворювачів, як нові ліки. Не менший інтерес становлять структури, отримані приєднанням радикалів до верхнього вінця каліксаренів. Утворені в першому і другому випадку комплекси можуть виступати як самостійні хімічні структури, що мають широкі біомедичні можливості. Для дизайну лікарських препаратів на основі молекули каліксарену, також, може використовуватись внутрішня ліпофільна (гідрофобна) порожнина, утворена ароматичними фрагментами і гідроксильними групами [218, 219]. Зокрема, калікс[4]арен модифікований групами метиленбісфосфонової та гідроксиметиленбісфосфонової кислот має інгібуючу дію щодо протеїнової тирозинфосфатази 1B, яка бере участь у трансдукції сигналу інсуліну та лептину, тому даний каліксарен може мати антидіабетичні властивості, а також використовуватись, як засіб при ожирінні [220]. Макроциклічні структури можуть зв'язувати токсини або дуже активні екзогенні сполуки, зменшуючи їх токсичність та забезпечуючи видалення токсичних речовин та метаболітів з організму. Вони також можуть використовуватись для адресної доставки активних фармацевтичних інгредієнтів, існуючих або майбутніх лікарських речовин [201, 203, 221].

1.8.1. Протипухлинні препарати на основі каліксаренів

Калікс[4]арени та їх похідні можуть використовуватись для розробки нових засобів для лікування онкологічних захворювань. Наприклад, калікс[4]арен функціоналізований чотирма платиновими центрами можуть

використоватись, як потенційний протипухлинний засіб. У порівнянні з хіміотерапевтичним засобом карбоплатином дана сполука виявила кращу активність щодо недрібноклітинного раку легень, гепатоцелюлярного раку та раку молочної залози [222]. При цьому напівмаксимальна інгібувальна концентрація (IC_{50}) цього калікс[4]арена у лінії клітин раку легенів становила 2,6 мкМ.

Калікс[6]арен функціоналізований сульфідними групами та етанолами на верхньому вінці може утворювати більш стійкі комплекси з відомим засобом проти раку іматинібом, який являється інгібітором протеїнкінази III. При цьому розмір порожнини каліксарену та характер приєднаних функціональних груп відігравали важливу роль у стабілізації комплексу іматиніба та каліксарена [223]. Було, також, показано, що калікс[6]арен та калікс[8]арен обидва модифіковані сульфідними групами на верхньому вінці макроциклу утворювали більш стабільні комплекси з перспективним протипухлинним засобом 3-феніл-1Н- [1] бензофуоро [3,2] піразолом, який є інгібітором тирозинкіназ. В даному випадку великі розміри гідрофобної порожнини цих каліксаренів та здатність сульфатних груп бути донорами водневого зв'язку забезпечували стабільність комплексу [224]. В іншому дослідженні повідомлялося, що ефект *in vivo* глікоконюгатів каліксу[4]арена включав значне зниження росту пухлини протягом двох тижнів на моделі меланоми мишей [225].

Було показано, що калікс[6]арен без модифікацій здатен пригнічувати ріст клітинної лінії карциноми підшлункової залози Ранс-1. Дана лінія характеризується посиленою експресією рецепторних тирозинкіназ MER та AXL. Сполука успішно переривала трансдукцію сигналу обох тирозинкіназ, а також інгібувала фосфатиділінозитид-3-кіназу. Крім того, калікс[6]арен проявив більшу ефективність порівняно з 5-фторурацилом, який часто призначають для лікування карциноми підшлункової залози [226].

Крім того, каліксарени можуть селективно вивільняти доставлені лікарські агенти з гідрофобної порожнини завдяки різниці рН здорових та

пухлинних тканин. Оскільки, у здорових тканин рН 7,4, а у ракових тканинах значення рН коливається 5,7-7,8 [227].

Даних з клінічних досліджень антинеопластичних препаратів на основі каліксаренів досі бракує. На сьогоднішній день згідно з базою даних клінічних випробувань у США проходить лише одне подібне дослідження першої фази. Сполука на основі каліксарену, що випробовується, являється інгібітором галектину-1 з потенційною антиангіогенною та протипухлинною активністю. Препарат функціонує через зниження регуляції багатofункціонального білка зв'язування вуглеводів, галектину-1, у пацієнтів з прогресуючими солідними пухлинами [219].

1.8.2. Антибактеріальні, противірусні та протигрибкові засоби на основі каліксаренів

Ведеться постійний пошук антибактеріальних препаратів через швидке набуття стійкості до них у мікроорганізмів. Тому все активніше ведеться пошук препаратів, які були б ефективними, але не викликали стійкості останніх. Сучасним методом створення біологічно активних сполук є молекулярний дизайн на основі структури мішені. Такими мішенями зазвичай є компоненти зовнішньої мембрани або клітинної стінки у бактерій. Потенційно ефективними сполуками для дизайну ліків виступають каліксарени. Катіонний водорозчинний гуанідинокаліксарен та його похідні, модифіковані біс-гетероциклічними групами виявились ефективним протитуберкульозними агентами. Вони мали здатність пригнічувати ріст двох штамів *M. tuberculosis* H27Rv та стійкого до відомого протитуберкульозного агента ізоніазиду штаму MYC1565. Каліксаренові міметики ванкоміцину, в яких каліксарен функціоналізовано пептидним містком, що містить D- або L-аланільні на верхньому вінці залишки, проявили значну антибактеріальну активність. Бактерицидна активність проти грампозитивних бактерій похідних каліксаренів коливалась від середніх до високих значень, хоча була меншою за ванкоміцин.

Активно ведуться пошуки нових противірусних ліків, зокрема від ВІЛ. Була виявлена противірусна активність натрієвих солей каліксаренів, модифікованих аніонними кобальт-дикарболідними групами. Ці макроцикли здатні інгібувати активність протеази ВІЛ з IC_{50} 91-210 нМ [228].

Перспективними напрямком є розробка нових протигрибкових засобів на основі калікс[4]аренів, модифікованих амфотерицином *B*, який є одним з найефективніших протигрибкових препаратів, який нажалі дуже токсичний. Отримані калікс[4]арени були випробувані проти *Saccharomyces cerevisiae* (BY4741). Виявилося, що протигрибкова активність каліксаренів, модифікованих амфотерицином *B*, була такою ж або вищою за активність амфотерицину *B*, (МІК — 0,10 і 0,25 М, відповідно). Проте гемотоксичність таких кон'югатів була у 10 разів меншою ніж власне у амфотерицину *B*. Функціоналізовані амфотерицином калікс[4]арени зберігають основний механізм його дії, зокрема здатність викликати витік іонів K^+ з везикул, сприяючи формуванню каналу в мембрані грибової клітини [229].

1.8.3. Використання каліксаренів та їх похідних як хелаторів важких металів

Досить перспективним є напрям використання каліксаренів та їх похідних в якості хелаторів катіонів металів. Було показано, що наноемульсія каліксаренового карбоксилу зданта очищувати шкіру від контамінації ураном [54]. Каліксареновий карбоксил - це *p*-трет-бутилкалікс[6]арен, що містить три карбонові групи, розташовані в C_3 симетрії з конічною конформацією, яка дозволяє утворювати псевдопланарний гексакоординатний комплекс з атомом урану з високою спорідненістю до нього [230].

Сульфурвмісні похідні каліксаренів - тіакалікс[4]арени здатні ефективно хелатувати перехідні метали та двохвалентні катіони, утворюючи міцні металокомплекси завдяки щільно розміщеним на нижньому вінці макроциклу гідроксильним групам та атомам двохвалентного сульфуру, які можуть зв'язувати

катіони металів. Було показано, що тіакалікс[4]арени тетрагідрокситіокалікс[4]арентетрасульфонат (С-798) та 5,11,17,23-Тетракіс[(гідрокси-етоксифосфоніл)метил]-25,26,27,28тетрагідрокси-тіакалікс[4]-арен (С-800) можуть відновлювати АТРазну активність субфрагмента-1 міозину від негативного впливу Cd^{2+} , Pb^{2+} та Zn^{2+} . Вони ефективно хелатують катіони цих ВМ, які інгбують активність АТРази міозину, відновлюючи її активність [51].

1.8.4. Розробки флуоресцентних хемосенсорів на основі каліксаренів та їх похідних.

Завдяки своїй винятковій здатності до комплексоутворення з різними катіонами та аніонами каліксарени та їх похідні тіакаліксарени розглядаються як перспективні сполуки для розробки флуоресцентних хемосенсорів. На основі тіаліксаренів, розроблені селективні та чутливі флуоресцентні хемосенсиори до катіонів ВМ таких, як Hg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} і Cr^{3+} [57, 59]. Зокрема, тіалікас[4]арен, функціоналізований чотирма нафталеновими групами, продемонстрував високу селективність щодо катіонів Hg [59]. Крім того, флуоресцентні хемосенсиори на основі тіалікас[4]аренів, модифікованих двома родаміновими та В-лактамними групами, виявляють високу чутливість та селективність щодо катіонів Fe і Cr [60].

1.9. Токсичність та імуногенність каліксаренів

Для можливості використання каліксаренів у медицині важливе значення має відсутність здатності викликати імунну відповідь і вираженої токсичності, агрегації та гемолізу еритроцитів за умов внутрішньовенного застосування.

Першовідкривач каліксаренів Д. Гютше відзначає, що найпростіші немодифіковані сполуки цього класу практично безпечні, про що свідчать результати Еймс-тесту [52]. Дослідження каліксаренсульфонатів при гальмуванні росту клітин на фібробластах людини показало, що похідні калікс[6 і 8]аренів

мають той же рівень токсичності, що і глюкоза. Деякі калікс[4]аренсульфанати мають низьку токсичність щодо багатьох клітинних ліній [61, 62, 231], а деякі похідні калікс[4]аренфосфорних кислот не впливають на ріст клітин фібробластів людини [56]. Нещодавно стало відомо, що тверді ліпідні наночастинки на основі амфифільних похідних калікс[4]аренів показують відсутність гемолітичних ефектів при концентраціях в межах до 300 мг/л, на відміну від твердих ліпідних наночастинки на основі амфифільних циклодекстринів, які показують їх значні гемолітичні ефекти [232].

Даних щодо впливу каліксаренів та їх похідних на організм бракує [233], але показано, що деякі фосфонатні та сульфонатні похідні каліксаренів — відносно нешкідливі для організму та мають малу імуногенність [63]. Вони не порушують функціонування нирок та печінки [234], а також не накопичуються у життєво важливих органах, зокрема мозку та печінці [235].

Каліксаренові матриці не є імуногенними, проте деякі каліксарени здатні стимулювати імунну відповідь. Досліди на тваринах виявили, що антитіла до калікс[4]аренів виявляються лише при імунізації ними, кон'югованими з протеїнами. При цьому імунна відповідь залежала від природи кон'югованого переносника, способу і дози імунізації [63]. Можна зробити висновок, що описані в літературі каліксарени можуть проявляти гемолітичні, токсичні та імуногенні властивості лише за присутності кон'югованих хімічних груп, а також за високих їх концентрацій.

Після аналізу джерел літератури можна дійти висновку, що каліксарени можуть використовуватись для розробки лікарських засобів, особливо враховуючи їх низьку токсичність та імуногенність. Перспективним напрямком є використання каліксаренів та їх похідних тіакаліксаренів як хелаторів катіонів металів у живих системах при отруєнні іонами металів, зокрема ВМ.

РОЗДІЛ 2.

2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Виділення субфрагмента-1 міозину з міометрія свині

Препарат актоміозину одержували із клітин гладенького м'яза матки свині за методом, модифікованим Weeds та Barany [236, 237]. М'язи матки свині старанно очищали від слизової оболонки та крові, промивали водою, гомогенізували разом із трьома об'ємами буфера складу: 1 мМ NaN₃; 60 мМ KCl; 0,5 мМ фенілметилсульфонілфтор; 0,3 мМ дитіотреїтол; 0,5 % тритон X-100; 10 мМ Трис-HCl, рН 6,8. М'язовий залишок осаджували центрифугуванням за допомогою центрифуги PC-6 (CPCP) при 6000 об/хв, а потім промивали 3–4 рази вищенаведеним буфером без тритону X-100. Актomioзин екстрагували за допомогою трьох об'ємів буфера, який містив 0,6 М KCl; 1 мМ NaN₃; 0,3 мМ дитіотреїтол; 0,5 мМ фенілметилсульфонілфтор; 20 мкг/мл соєвого інгібітора трипсину; 10 мМ трис-HCl, рН 7,5. М'язовий залишок після екстракції актоміозину відділяли центрифугуванням при 6000 об/хв. Для осадження актоміозину надосадову рідину розводили водою до 3–3,5 л. Осад актоміозину виділяли із надосадової рідини за допомогою центрифугування при 6000 об./хв, а потім розчиняли у мінімальній кількості 50 мМ Трис-HCl (рН 7,5), який містив 0,6 М KCl. Після цього його знову центрифугували для освітлення протягом 1 год при 105 000 g. Субфрагмент-1 міозину гладеньких м'язів матки одержували шляхом розщеплення актоміозину папаїном [238] із деякими модифікаціями. Реакцію проводили в 10 мМ Трис-HCl (рН 6,64 при 22°C), що містив 40 мМ KCl, 0,5 мМ дитіотреїтол, 10 мМ імідазол, 2 мМ MgCl₂, 10 мМ пірофосфат Na протягом 10 год.; вагове співвідношення актоміозин/папаїн – 500:1. Зупиняли реакцію 1 мМ монойодоцтовою кислотою. Розділення субфрагмента-1 проводили методом іонообмінної хроматографії хроматографічною системою Bio-Rad (США) на колонці з DEAE-Sepharose CL-6B. Елюцію здійснювали із використанням градієнта KCl від 0 до 0,2 М. Чистоту препарату контролювали методом електрофорезу в ПААГ за денатуруючих умов.

2.2. Електрофоретичне розділення протеїнів в поліакриламідному гелі

Чистоту та якісний склад препаратів актоміозину, міозину та субфрагмента-1 міозину ГМ, які використовувались для подальших досліджень, контролювали методом електрофорезу у ПААГ із додецилсульфатом натрію (ДСН) за методом Леммлі з деякими модифікаціями [239]. Гелі формували та полімеризували у камері для вертикального електрофорезу Mini-Protein I (Bio-Rad, США). Гель для концентрування протеїнів містив: 4 % акриламід, 0,05 М Трис-НСl рН 6,8, 1 % ДСН, а для розділення – 10 % акриламід, 0,15 М Трис-НСl рН 8,8, 1% ДСН. Реакцію полімеризації для обох гелів каталізували додаванням тетраметилетилендіаміну та потрібним об'ємом стокового 10 % розчину персульфату амонію. Електродний буферний розчин (рН 8,3) містив: 0,025 М Трис, трицин, 0,1 % ДСН. Розчин для нанесення зразків протеїну у ПААГ містив: 0,0625 М Трис- НСl, 2 % ДСН, 5 % β -меркаптоетанолу, 10 % гліцеролу, 1 мМ ЕДТА та бромфеноловий синій.

Концентрація протеїнів у зразках була 10-30 мкг. Розділення проб проводили за сили струму 20-40 мА протягом 1-2 годин. Фіксацію препаратів здійснювали в суміші ізопропанолу, оцтової кислоти та води у співвідношенні 2,5:1:6,5 впродовж 1-2 годин. Забарвлювали електрофореграми розчином 0,2% кумасі яскраво-блакитного R-250 у суміші, що містила: метанол, оцтову кислоту та воду у співвідношенні 4:1:5. ПААГ відмивали 7 % оцтовою кислотою. Результати електрофорезу дозволили стверджувати, що отримані препарати білків були достатньо очищеними, їх ми і використовували для подальших досліджень.

2.3. Визначення активності АТРази субфрагмента-1 міозину

АТР-гідролазну активність субфрагмента-1 міозину визначали у 96-лунковому планшеті при температурі 37° С у середовищі інкубації (загальний об'єм 0,1 мл). Концентрація протеїну (субфрагмента-1 міозину) становила 20

мкг/мл. Тривалість інкубації – 5 хв У дослідах по вивченню впливу важких металів та тіакалікс[4]арену C-800 на активність АТРази субфрагмента-1 міозину використовували стандартне середовище інкубації (трис-НСІ буфер (рН 7,2) – 20 мМ, КСІ – 100 мМ, СаСІ₂ – 0,01 мМ, МгСІ₂ – 5 мМ, АТР – 3 мМ), до якого додавали розчини Pb²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺ та Ni²⁺ та/або тіакалікс[4]арени відповідної концентрації. Концентрацію катіонів двохвалентних металів визначали титруванням за методом Мора [240]. Кількість протеїну у пробі становила 20 мкг. За нульову точку (100 %) приймали значення АТР-гідролазної активності, яке визначали за відсутності катіонів важких металів та тіакалікс[4]аренів у середовищі інкубації.

Зупиняли реакцію гідролізу АТР шляхом додавання до інкубаційної суміші 50 мкл 20 % трихлороцтової кислоти. Тривалість передінкубації та інкубації становили 1 - 2 хв Контролем на неферментативний гідроліз АТР слугували проби, в яких протеїни були відсутні. Кількість відщепленого від нуклеозидтрифосфату неорганічного фосфату P_i під час АТР-гідролазної реакції визначали методом Chen P.S. [241], який дозволяє визначити від 10 до 1000 наномолів P_i. До проб додавали фарбу, що містила 0,42 % розчин молібдату амонію в 1 н сірчаній кислоті та 10 % аскорбінову кислоту у співвідношенні 6:1. Через 20 хв інкубації при 37° С реєстрували оптичну густину середовища на планшетному рідері μQuwant (Biotek®Instruments, Inc., USA) при довжині хвилі 820 нм, що відповідає максимуму поглинання молібденового синього.

2.4. Отримання суспензії клітин міометрія з матки дорослих самок щура

Досліди на тваринах проводили згідно з європейською конвенцією захисту хребетних тварин , які використовуються в дослідах та інших наукових цілях (Страсбург, 1986). Щурів умертвляли методом цервікальної дислокації після інгаляції хлороформу. Матку ізолювали та поміщали в розчин Хенкса (136,9 мМ NaCl, 5,36 мМ KCl, 0,44 мМ KH₂PO₄, 4,5 мМ NaHCO₃, 0,26 мМ

Na_2HPO_4 , 1,26 мМ CaCl_2 , 0,4 мМ MgCl_2) об'ємом близько 5 мл при кімнатній температурі. Після чого матку ретельно відчищали від жиру та різали на частини розміром близько 1 мм. Фрагменти матки поміщали в розчин Хенкса без Ca^{2+} та Mg^{2+} (136,9 мМ NaCl , 5,36 мМ KCl , 0,44 мМ KH_2PO_4 , 4,5 мМ NaHCO_3 , 0,26 мМ Na_2HPO_4) об'ємом 5 мл для промивання, поставивши їх на водяну баню при 37°C з постійним помішуванням на 5 хв. Після цього розчин Хенкса відкидали та до фрагментів матки додавали дисоціюючий розчин (136,9 мМ NaCl , 5,36 мМ KCl , 0,44 мМ KH_2PO_4 , 4,5 мМ NaHCO_3 , 0,26 мМ Na_2HPO_4 , 0,1% колагенази типу 1 А та 0,01% соєвого інгібітора трипсину) об'ємом 2,5 мл. Дисоціюючий розчин з фрагментами матки поміщали на водяну баню при 37°C з постійним помішуванням на 20 хв після чого його відбирали. До фрагментів матки додавали розчин Хенкса без Ca^{2+} та Mg^{2+} об'ємом 5 мл з наступним піпетуванням протягом 5 хв після цього розчин відбирали. Потім до фрагментів матки додавали дисоціюючий розчин об'ємом 2,5 мл з наступним розміщенням на водяній бані при 37°C з постійним помішуванням протягом 20 хв. Дисоціюючий розчин відкидали, а фрагменти матки промивали розчином Хенкса без Ca^{2+} та Mg^{2+} об'ємом 5 мл з піпетуванням 2 рази по 5 хв обидва розчини збирали та поміщали в холодильник. Потім до фрагментів матки додавали дисоціюючий розчин об'ємом 2,5 мл. Їх поміщали на водяну баню при 37°C з постійним помішуванням на 20 хв, потім дисоціюючий розчин відкидали, а до фрагментів матки додавали розчин Хенкса без Ca^{2+} та Mg^{2+} об'ємом 5 мл 2 рази з наступним піпетуванням протягом 5 хв. При цьому обидва розчини збирали. Весь зібраний розчин Хенкса з суспензією клітин пропускали через капроновий фільтр та збирали в нову пробірку. Після цього центрифугували при 2000 об/хв протягом 10 хв. Супернатант відоремлювали, а до осаду, що містив клітини додавали фосфатний буфер (PBS) об'ємом 5 мл з наступним центрифугуванням при 1500 об/хв протягом 15 хв. Після цього супернатант відкидали до осаду додавали PBS об'ємом 5 з наступним центрифугуванням при 1500 об/хв протягом 15 хв [242]. Осад ресуспендували в PBS або DMEM потрібного об'єму.

2.5. Культивування міоцитів матки щура

Клітини культивували у поживному середовищі DMEM з додаванням суміші антибіотиків (пеніциліну 1000 U/мл, стрептоміцину 100мкг/мл) та антимікотику (амфотерицин В 0,25 мкг/мл), а також 10% фетальної сироватки телят при 37° С за концентрації CO₂ 5% в атмосфері.

2.6. Визначення метаболічної активності міоцитів методом МТТ - тесту

Для проведення МТТ тесту клітини нарощували до конфлюентного стану у планшетах на 96 лунок у поживному середовищі DMEM з додаванням суміші антибіотиків (пеніциліну 1000 U/мл, стрептоміцину 100 мкг/мл) та антимікотику (амфотерицин В 0,25 мкг/мл), а також 10% фетальної сироватки телят. Потім поживне середовище замінювали на безсироваткове із додаванням катіонів металів в концентрації від 0,75 мМ до 1,25 мМ, а також калікс[4]арену C-800 у концентрації 100 мкМ та культивували протягом 24 год при 37° С за 5% концентрації CO₂ в атмосфері. Контрольні клітини інкубували за аналогічних умов у поживному середовищі DMEM без додавання катіонів металів та тіакалікс[4]арену C-800. Надалі, вміст лунок замінювали на нове поживне середовище із додаванням розчину 0,5 мг/мл МТТ реагенту та витримували протягом 4-х годин при 37° С до утворення фіолетових кристалів формагану [243]. Обережно відбирали середовище, додавали буфер для лізису (10% ДСН та 0,6% оцтової кислоти в диметилсульфоксиді) та інкубували ще 5 хв за умов інтенсивного струшування [239]. Оптичне поглинання розчину вимірювали при 545 нм (тест) та 630 нм (порівняння) на планшетному рідері μQuwant (Biotek®Instruments, Inc., USA).

2.7. Флуоресцентна мікроскопія некультивованих клітин міометрія

Аліквоти суспензії міоцитів в PBS, pH 7,4, наносили на предметні

скельця, попередньо вкриті полі-L-лізином, на 2 год з їх наступною інкубацією з тіакалікс[4]ареном C-800 та катіонами Zn. Клітини візуалізували під мікроскопом Carl Zeiss LSM 510 Meta (Німеччина) з використанням ртутної ультрафіолетової лампи HBO-103 W/2 та синього фільтру FSet01wt. Знімки отримували за допомогою цифрової камери Zeiss Axion Cam HBC. Їх обробку проводили програмою FIJI.

2.8. Визначення активних форм кисню в клітинах

Суспензія клітин міометрія щурів навантажували 50 мкМ DCFDA протягом 40 хв на водяній бані при 37°C з постійним помішуванням. Для виявлення впливу ВМ окремо та разом з тіакалікс[4]ареном C-800 (100 мкМ) на утворення АФК у суспензії міоцитів матки, їх інкубували в PBS з Pb^{2+} та Cd^{2+} (1 мМ) протягом 5 хв. Також вивчали вплив тіакалікс[4]арен C-800 (100 мкМ) на суспензію міоцитів в PBS за їх інкубації протягом 5 хв.

Вміст АФК досліджували за допомогою протокової цитофлуориметрії на цитофлуориметрі COULTER EPICS XL (Beckman Coulter, USA) лазером з довжиною хвилі 488 нм.

2.9. Виділення ізольованих мітохондрій з міометрія щура

Самку щура присипляли інгаляцією хлороформу, а потім декапітували. Матку вилучали та поміщали в фізіологічний розчин (0,9% NaCl) об'ємом близько 10 мл та очищали її від жиру. Матку зважували на вагах, а потім фрагментували дрібними шматочками по 0,5 мм після чого до фрагментів матки додавали буфер для виділення мітохондрій (10 мМ HEPES (4-(2-гідроксиетил)-1-піперазинетансульфонова кислота), 250 мМ сахароза, 1 Мм ЕДТА) у співвідношенні 1:10. Далі фрагменти матки гомогенізували 3 рази по 30 с. за допомогою гомогенізатора на льоду. Отриманий гомогенат пропускали через капроновий фільтр, отриману рідину збирали до пробірки для центрифугування. Фільтрат центрифугували на центрифугі PC-6 (СРСР) при 1000 g протягом 15 хв

при 4°C. супернатант збирали та відкидали осад. Надосад центрифугували при 1200g протягом 15 хв при 4°C. До осаду додавали буфер для зберігання мітохондрій (10 мМ HEPES, 250 мМ сахароза) з наступним ресеспендуванням. Отриману суспензію центрифугували при 1200g протягом 15 хв при 4°C. До осаду додавали середовище для мітохондрій (10 мМ HEPES, 250 мМ сахароза, 0,01% знежирений бичачий сироватковий альбумін) у співвідношенні 1:1 від початкової маси матки [244].

2.10. Вивчення флуоресції НАДН та ФАД в ізольованих мітохондріях

Відносні значення флуоресценції НАДН та ФАД в ізольованих мітохондріях вимірювали на спектрофлуотометрі Quanta Master PTI (Канада) за допомогою програми FelixGX 4.1.0.3096. Дослідження проводили у 2 мл середовища, що містило 20 мМ HEPES (pH 7,4 при 37°C), 2 мМ K⁺-фосфатного буфера (pH 7,4 при 37°C), 120 мМ KCl, 5 мМ пірувата та 5 мМ сукцината. До розчину перед вимірюванням додавалось 100 мкл суспензії ізольованих мітохондрій, які інкубували з катіонами металів в концентрації 1 мМ протягом 5 хв. В контролі флуоресценцію НАДН та ФАД⁺ в ізольованих мітохондріях вимірювали при додаванні дистильованої води замість катіонів металів [245].

2.11. Синтез та характеристика тіакалікс[4]аренів

5,11,17,23-Тетракіс[(гідрокси-етоксифосфоніл)метил]-25,26,27,28-тетрагід-рокситіакалікс[4]арен (С-800) та тетрагідрокситіакалікс[4]арен-тетрасульфонат (С-798) синтезували та охарактеризували з використанням методів ЯМР та ІЧ-спектроскопії у відділі хімії фосфоранів Інституту органічної хімії НАН України під керівництвом акад. НАН України Кальченка В.І.

2.12. Приготування розчинів двовалентних металів та визначення їх канцтрації

Для приготування розчинів хлоридів металів (ZnCl₂, PbCl₂, CdCl₂ та NiCl₂)

використовували воду, яка була очищена за допомогою системи Crystal Bio (Adrona, Латвія). Електропровідність води становила менше 1 мкСм. Концентрацію катіонів двовалентних металів у розчинах визначали методом Мора [246].

2.13. Комп'ютерне моделювання взаємодії лігандів (Pb^{2+} , Cd^{2+} та C-800) з субфрагментом-1 міозину

Виконували з використанням програми "AutoDock", версія 4.2. У дослідженнях застосовували просторову структуру ензиму з ідентифікатором 1b7t в RSCB PDB. Комп'ютерне моделювання структурних особливостей тівкалікс[4]аренів C-798 та C-800 проводили за допомогою HyperChem 7.01. Були проведені молекулярно динамічні розрахунки методом MM2 з перевіркою за допомогою напівемпіричного методу (поле CNDO).

2.14. Статистичний аналіз результатів

Числові характеристики показників визначали методами описової статистики їх представляли у вигляді середнього значення та стандартного відхилення ($M \pm m$). Як критерій достовірності відмінностей між показниками, що порівнювались використовували параметричний t-критерій Стьюдента. При цьому різниця вважалась достовірною при рівні значущості $p < 0,05$. Статистичний аналіз даних проводився в програмі Excel statistics.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Вплив тіакалікс[4]арену C-800 на АТРазну активність субфрагмента-1 міозину міометрія за умов інгібованої дії катіонів Pb, Cd та Ni.

Субфрагмент-1 міозину є достатньою функціональною одиницею міозину, яка повністю зберігає АТРазну активність нативного міозину та здатність до взаємодії з актином. Він також є зручною моделлю для досліджень впливів різних речовин та сполук на нативний міозин завдяки високій розчинності у водних розчинах із низькою іонною силою порівняно зі слаботорозчинними молекулами нативного міозину [247].

Значення активності АТР-гідролази міозину становить 0,2 мкмоль P_i /хв на мг протеїну для міометрія кролика, а для мантиї кальмара та м'язів черевця трилобітів вона становить 0,94 та 0,4 мкмоль P_i /хв на мг протеїну відповідно. Слід зазначити, що активності АТРази міозину посмугованих м'язів в десятки разів вища ніж для ГМ, що обумовлено його структурними особливостями. Зокрема, для м'яза-розгинача пальців щура вона становить 28 мкмоль P_i /хв на мг протеїну, а для ліктьового м'яза-згинача людини 11 мкмоль P_i /хв на мг протеїну [248].

Комплекс $MgATP^{2-}$ є субстратом АТРази міозину м'язів [249] за певних умов у процесі гідролізу АТР, що каталізується міозином скелетних та гладеньких м'язів, Mg^{2+} може заміщуватися катіонами інших двовалентних металів, зокрема ВМ. При цьому стабільність та частота утворення комплексу АТР, металу та міозину залежить від природи металу. Показано, що вона знижується у послідовності: $Mn > Fe > Ni > Co > Mg$ та $Ca > Mn > Fe > Mg > Co$ [43].

Встановлено, що катіони інших двовалентних катіонів крім Mg стабілілізують комплекс міозину з ADP^{2-} , дисоціація якого є стадією, що лімітує процес гідролізу АТР міозином [42].

При вивченні впливів Pb^{2+} Cd^{2+} та Ni^{2+} показано, що вони інгібують АТР-

гідролазну активність субфрагмента-1 ГМ матки в концентрації від 30 мкМ до 300 мкМ. Найбільш помітний інгібувальний ефект для катіонів Pb (300 мкМ) становив близько 88%, а для катіонів Cd (300 мкМ) цей ефект був біля 56% (Рис 3.1). Коефіцієнт інгібування ($IC_{0.5}$) для Pb^{2+} становив $0,08 \pm 0,01$ мМ, а для Cd^{2+} він складав $0,30 \pm 0,03$ мМ.

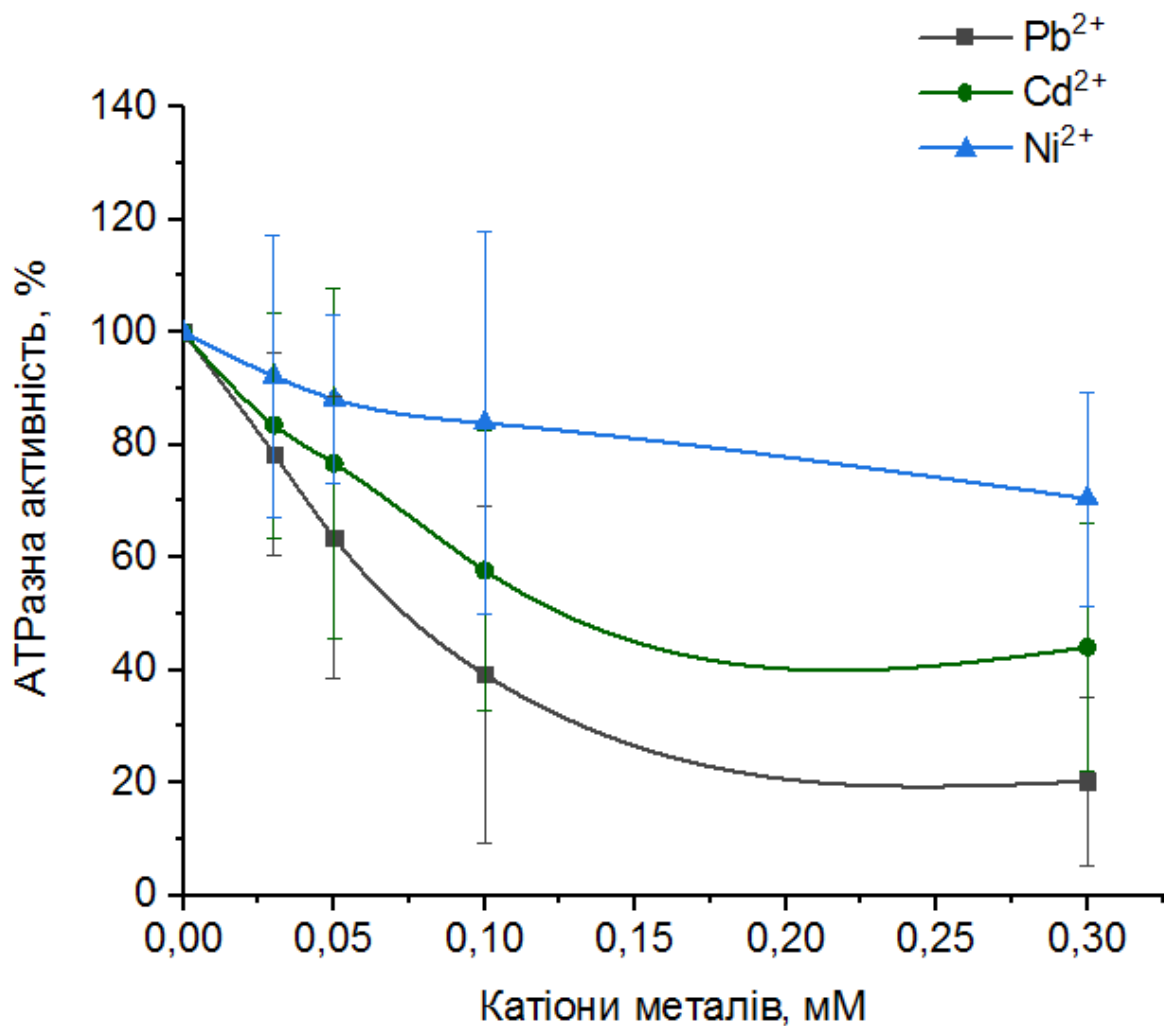


Рис 3.1. Катіони Pb, Cd та Ni концентраційно-залежно інгібують активність АТРази субфрагмента-1 міозину. За 100% приймали значення АТФазної активності субфрагмента-1 міозину без додавання катіонів важких металів ($M \pm m$, $n = 4$).

Інгібувальний вплив катіонів Pb та Cd був набагато більш помітним у

порівнянні з катіонами Ni, які інгібували АТРазну активність субфрагмента-1 міозину при концентрації 300 мкМ лише на 30%. При дослідженні впливів ВМ на АТРазну активність субфрагмента-1 міозину за 100 % приймали її величину без додавання катіонів ВМ в середовище інкубації.

Вміст ВМ в організмі може бути підвищеним [250-253], зокрема, у працівників виробництва елементів електричного живлення [251-254], автомобільних підприємств та автомайстерень [255] рівень Pb^{2+} у крові перевищував у 4 рази його рівень в осіб не задіяних на цих шкідливих підприємствах. Він становив 450,4 мкг/л у крові для працівників автомобільних підприємств та автомайстерень. В той же час, вміст Cd^{2+} у крові працівників автомобільної галузі перевищував їх вміст в осіб інших професій в 6 разів та становив 120,8 мкг/л [255]. При гострому отруєнні Pb^{2+} його рівень в крові може зрости до 1700 мкг/л [256]. До середовища інкубації, що містило Pb^{2+} Cd^{2+} та Ni^{2+} , додавали 100 мкМ розчину тіакалікс [4] арену C-800 (Рис. 3.2) у 50 мМ буфері Трис-НСІ (рН 7.2) для усунення інгібувального впливу катіонів цих металів на АТР-гідролазну активність субфрагмента-1 міозину міометрія.

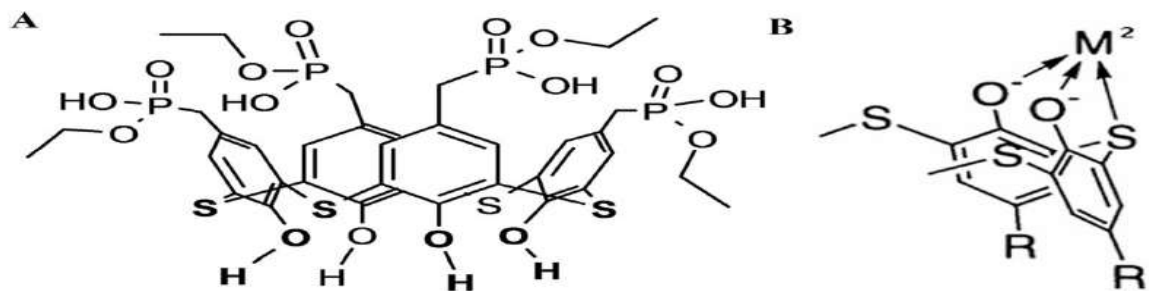


Рис 3.2. Хімічна структура 5,11,17,23-Тетракіс[(гідроксиетоксифосфоніл)метил]-25,26,27,28-тетрагідрокситіакалікс[4]арен (C-800)(A) та схема хелатного комплексу тіакалікс[4]арену з катіоном металу на нижньому вінці макроциклу (перевернуте положення) (B)[60].

Така сама кількість Трис-НСІ буферу додавали до контрольних зразків. Катіони Pb та Cd додавали в середовище інкубації в концентрації 100 мкМ, тоді як катіони Ni були внесені в концентрації 300 мкМ. Було встановлено, що тіакалікс[4]арен C-800 в концентрації 100 мкМ усував негативний вплив катіонів Pb та Cd на АТРазну активність субфрагмента-1 міозину міометрія при їх концентрації 100 мкМ (Рис. 3.3).

Тіакалікс[4]арен C-800 також відновлював АТРазну активність субфрагмента-1 міозину за дії катіонів Ni в концентрації 300 мкМ (рис. 3.4). В той же час тіакалікс[4]арен C-800 майже не впливав на АТР-гідролазну активність субфрагмента-1.

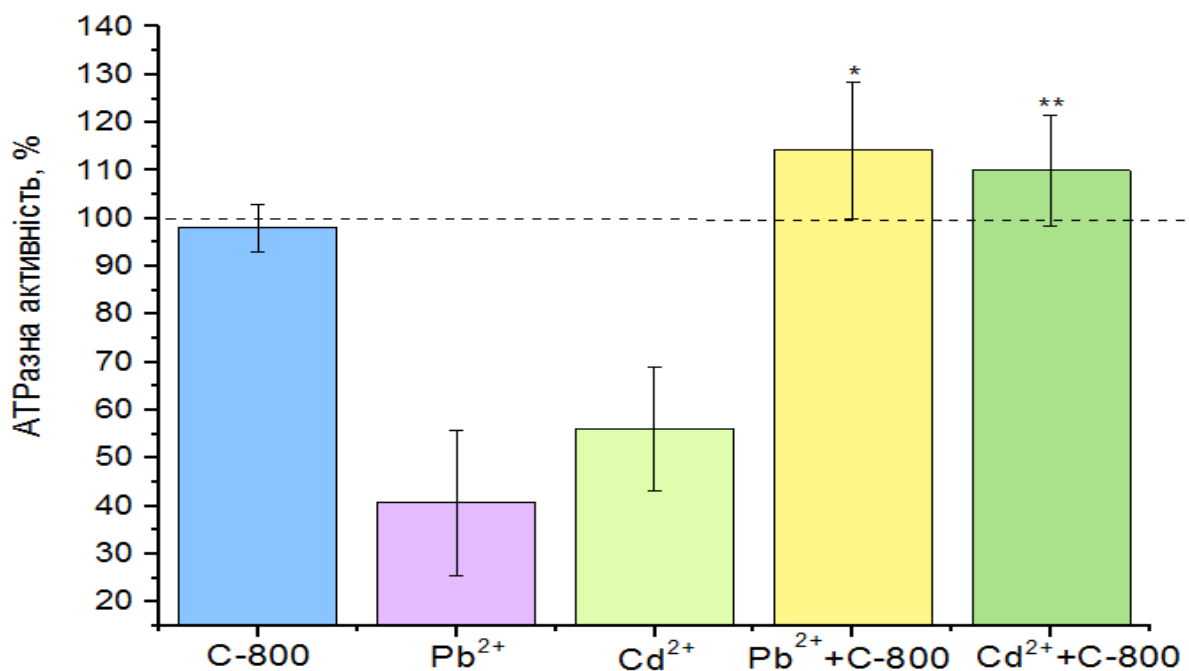


Рис 3.3. Тіакалікс[4]арен C-800 відновлює АТРазну активність субфрагмента-1 міозину після її інгібування Cd²⁺ та Pb²⁺ (100 мкМ) ($M \pm m$, $n = 5-6$). 100% - значення активності АТФази без додавання катіонів важких металів. Різниця між значеннями "Pb" і "Pb + C-800", а також між "Cd" і "Cd + C-800" є статистично достовірною ($p < 0,05$) і вказана як * і **, відповідно.

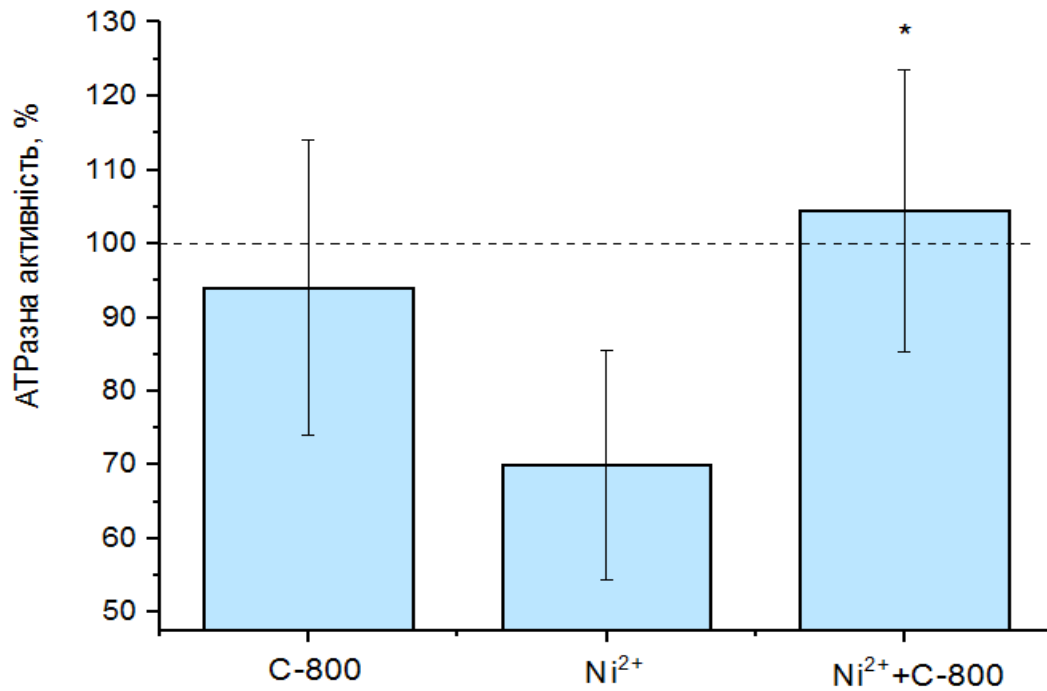


Рис 3.4. Тіакалікс[4]арен C-800 відновлює АТРазну активність субфрагмента-1 міозину після її інгібування Ni^{2+} (300 мкМ) ($M \pm m$, $n = 7-8$). 100% - значення активності АТФази без додавання катіонів Ni. Різниця між значеннями "Ni" та "Ni + C-800" є статистично достовірною ($p < 0,05$) та позначена *.

Найбільш імовірно, що механізм захисної дії тіакалікс[4]арену C-800 базується на його здатності хелатувати Pb^{2+} , Cd^{2+} та Ni^{2+} за допомогою гідроксильних груп та атомів двохвалентного сульфуру на нижньому вінці макроциклу (Рис. 3.2В) із середовища інкубації.

Оскільки іонні радіуси Mg^{2+} , Cd^{2+} і Pb^{2+} у розчині становлять 0,070; 0,102 та 0,126 нм відповідно [245], а катіони Cd і Pb мають значно більші розміри порівняно з Mg^{2+} , тому взаємодія між Cd^{2+} та Pb^{2+} у сайті зв'язування Mg^{2+} в субфрагменті-1 міозину ускладнена. Однак, експериментально було показано їх інгібувальну дію на АТРазну активність субфрагмента-1 міозину. Ми зробили припущення, що ці катіони можуть зв'язуватися на інших функціонально важливих ділянках субфрагмента-1, що сприяють зв'язуванню та гідролізу АТР. Було також зроблено припущення, що тіакалікс[4]арен C-800 може «відтягувати»

катіони Mg^{2+} з їх сайтів зв'язування у субфрагменті-1 міозину.

Іонні радіуси Mg^{2+} та Ni^{2+} дуже близькі – 0,070 та 0,067 нм відповідно, тому цілком імовірна можливість взаємодія Ni^{2+} з Mg^{2+} -зв'язувальними ділянками міозину. Отже катіони Ni можуть зв'язувати ділянки, які за фізіологічних умов займають катіони Mg , зокрема в активному центрі.

3.2. Відновлювальна дія тіакалікс[4]аренів C-798 та C-800 на АТРазну активність субфрагмента-1 міозину міометрія за інгібувального впливу Zn^{2+}

Zn^{2+} - один з найпоширеніших катіонів металів в організмі людини, який у значній кількості міститься в організмі людини. В організмі дорослої людини міститься близько 3 г (30 мМ) Zn [257]. Найбільша його кількість спостерігається в скелетних м'язах 100-200 мг/г (1,5-3 мМ/г), а також у кістковій тканині 30 мг/г (0,46 мМ/г) [257]. Він відіграє значну роль в життєдіяльності та нормальному розвитку людини. [136-138]. Одна надлишок Zn в організмі людини може викликати патологічні стани [135, 258]. При надлишковому споживанні Zn у вигляді ліків та біологічно активних добавок понад добову норму в 15 мг протягом тривалого часу може виникнути гостре отруєння Zn^{2+} . Воно виражається порушенням складу крові (нейтропенія та анемія) [258], нестачею катіонів Cu та підвищенням рівня “шкідливого” холестеролу у крові [259].

Нами вивчався вплив Zn^{2+} на гідроліз АТР субфрагментом-1 міозину міометрія. Концентраційна залежність впливу катіонів Zn на АТРазну активність субфрагмента-1 міозину міометрія свині досліджувалась у діапазоні концентрації Zn^{2+} від 0,5 до 5 мМ у середовищі інкубації, яке містило 3 мМ АТР, 5 мМ Mg^{2+} та 0,01 мМ Ca^{2+} . Найбільш виражений інгібувальний ефект Zn^{2+} (5 мМ) на АТРазну активність становив $43 \pm 8\%$ (Рис. 3.5). Тому подальші дослідження інгібувальних впливів Zn^{2+} на гідроліз АТР субфрагментом-1 міозином були проведені за 5 мМ цього катіону.

З метою з'ясування молекулярного механізму інгібувальної дії Zn^{2+} на АТР-гідролазну активність міозину ми досліджували вплив Zn^{2+} на спорідненість

АТРази субфрагмента-1 міозину до свого субстрату (АТР). При дослідженні залежності АТРазної активності субфрагмента-1 міозину від концентрації АТР у діапазоні від 0,5 до 5 мМ за фіксованої концентрації MgCl_2 (5 мМ) в контролі та за присутності 5 мМ Zn^{2+} були отримані куполоподібні графіки з максимальним значенням активності АТРази за 3 мМ АТР (Рис.3.6). Значення ензиматичної активності на цьому піку за присутності Zn^{2+} було на 30% нижчим ніж у контролі. Ці графіки у висхідній частині були лінеаризовані за методом Лайнуївера-Берка. Розрахунок кінетичних параметрів, а саме уявної константи Міхаеліса (K_m) та максимальної швидкості АТРази субфрагмента-1 міозину для АТР ($V_{\max, \text{АТР}}$), показав, що $V_{\max, \text{АТР}}$ ензиматичної активності міозину за присутності 5 мМ Zn^{2+} зменшується в 1,6 рази (38 ± 7 та 22 ± 6 нмоль $\text{P}_i/\text{хв}$ на 1 мг білку в контролі та за наявності Zn^{2+} відповідно, $n=5$). Значення K_m для гідролізу АТР субфрагментом 1 міозину статистично не змінювалось, хоча мало тенденцію до зниження ($0,49 \pm 0,15$ мМ у контролі, $0,38 \pm 0,12$ мМ у присутності Zn^{2+} , $M \pm m$, $n=5$).

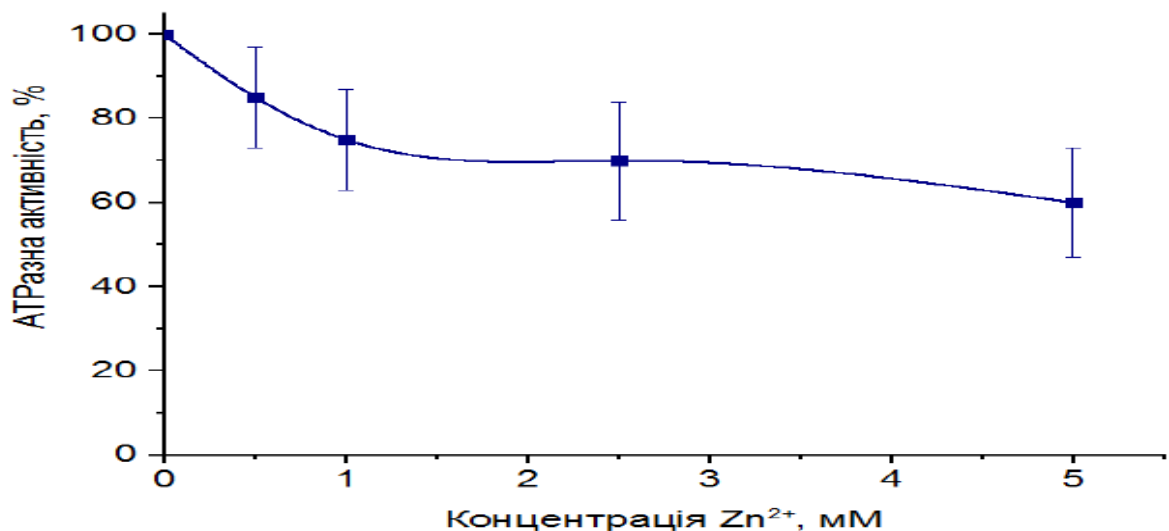


Рис.3.5. Катіони Zn концентраційно-залежно інгібують активність АТРази субфрагмента-1 міозину у концентрації 0,5-5,0 мМ. За 100% приймалось значення АТРазної активності без додавання Zn^{2+} ($M \pm m$, $n=6$).

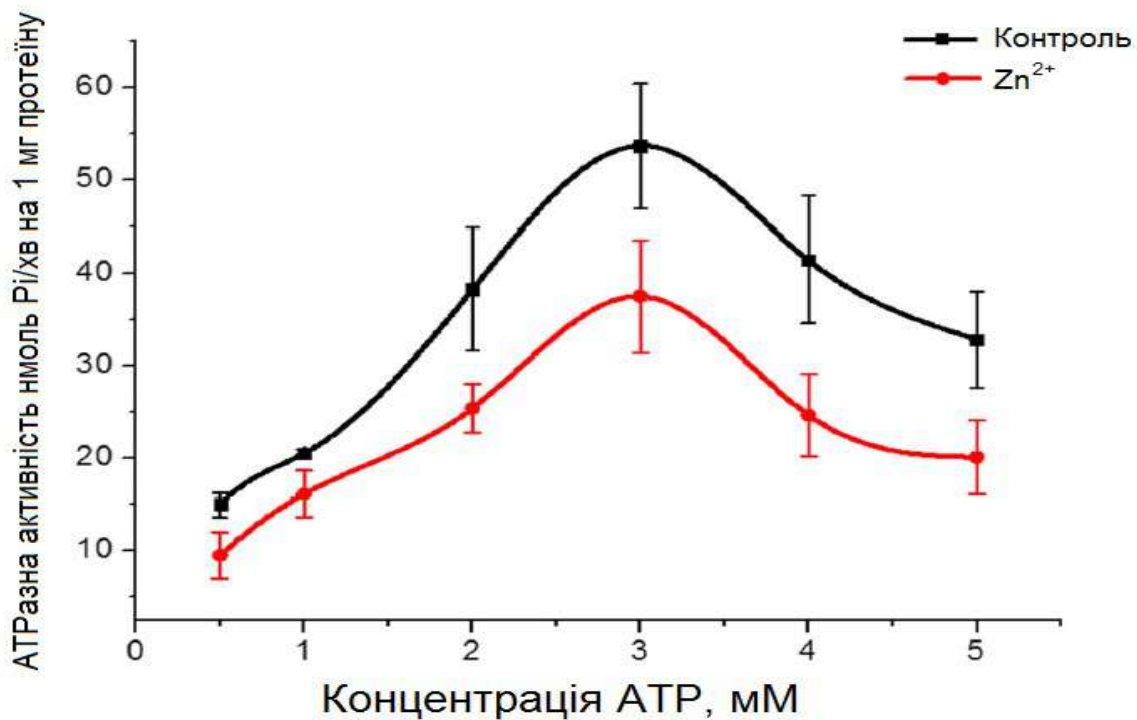


Рис 3.6. Залежність АТРазної активності субфрагмента-1 міозину від концентрації АТР за присутності Zn^{2+} (5 Мм) ($M \pm m$, $n=5$).

Відомо, що міозин за фізіологічних умов є Mg^{2+} -залежною АТРазою, її справжнім субстратом є комплекс MgATP^{2-} [260]. В цьому комплексі Mg^{2+} приймає участь у зв'язуванні АТР в активному центрі міозину, а також у каталізі гідролізу АТР. Mg^{2+} координується в активному центрі ензиму з бічними ланцюгами амінокислотних залишків Thr-186 та Ser-237, а також з β - та γ -фосфатними групами молекули АТР з утворенням β , γ -бідентатного комплексу з активними молекулами води, одна із них здійснює нуклеофільну атаку на γ -фосфат АТР. Mg^{2+} взаємодіє з негативно зарядженими групами АТР, поляризуючи їх, що полегшує нуклеофільну атаку на термінальний γ -фосфат АТР [261]. Отже цікавим було дослідити, вплив Zn^{2+} (5 мМ) на залежність АТРазної активності субфрагмента-1 міозину від концентрації Mg^{2+} у порівнянні з контролем. Виявилось, що підвищення концентрації Mg^{2+} в інкубаційному середовищі від 0,5 до 5 мМ за фіксованої концентрації АТР (3 мМ) за присутності 5 мМ Zn^{2+} не

призводить до зміни активності АТРази субфрагмента-1 міозину.

У той же час у контролі без додавання катіонів Zn була виявлена концентраційна залежність АТРазної активності субфрагмента-1 міозину від Mg^{2+} . Найвищий рівень гідролізу АТР субфрагментом-1 міозину в контролі був досягнутий при 3 мМ Mg^{2+} (Рис.3.7). Отже, 5 мМ Zn нівелює залежність ензиматичної активності субфрагмента-1 міозину від концентрації Mg^{2+} , за високих концентрацій Zn^{2+} АТРаза міозину стає практично не чутливою до присутності катіонів Mg . Іонні радіуси Mg^{2+} та Zn^{2+} дуже близькі – 0,070 та 0,076 нм, відповідно [262], тому можлива взаємодія Zn^{2+} з Mg^{2+} -зв'язувальними ділянками міозину. Катіони Zn за високих концентрацій можуть займати ділянки, які за фізіологічних умов зв'язують катіони Mg внаслідок чого за присутності високих концентрацій Zn^{2+} АТРаза міозину стане нечутливою до катіонів Mg .

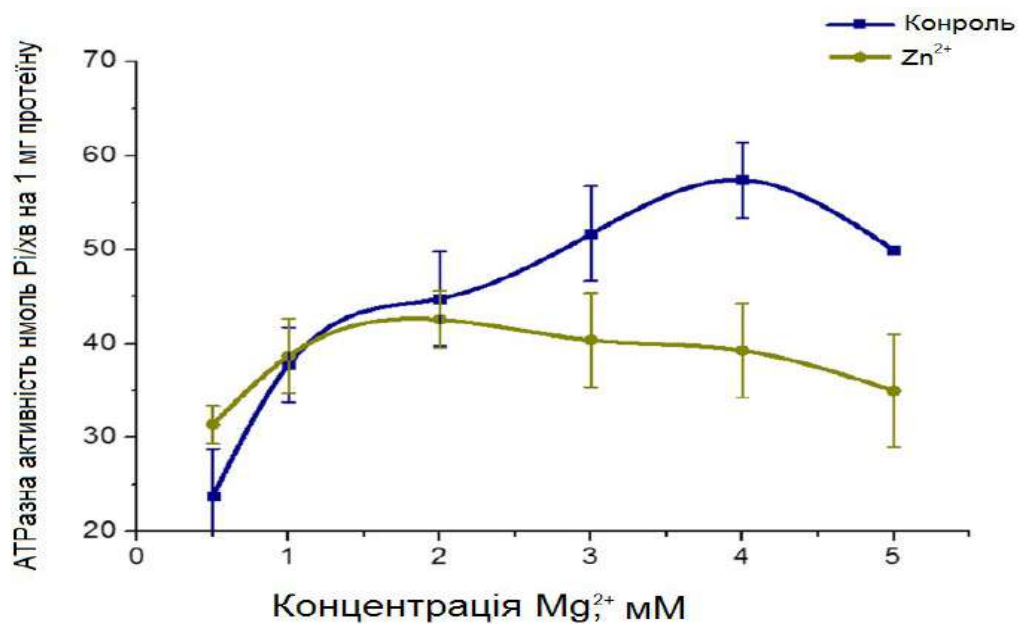


Рис 3.7. Залежність АТРазної активності субфрагмента-1 міозин від концентрації Mg^{2+} за присутності Zn^{2+} (5 ММ) ($M \pm m$, $n=6$).

Для дослідження здатності тіакалікс[4]аренів С-800 та С-798 (Рис. 3.8) усувати інгібуючий ефект Zn^{2+} на активність АТРази субфрагмента-1 міозину їх розчини з концентрацією 100 мкМ у 50 мМ трис-НСІ буфері (рН 7,2) додавали до інкубаційного середовища, що містило катіони Zn в концентрації 5 мМ. За

контроль приймали ензимачну активність без додавання Zn^{2+} та/або тіакалікса[4]аренів до інкубаційного середовища.

Показано, що тіакалікса[4]арен С-800 не впливає на активність АТРази міозину міометрія (Рис. 3.9). Водночас, тіакалікса[4]арен С-798 справляє незначний інгібувальний вплив на АТРазну активність субфрагмента-1 міозину. Він скоріше за все пов'язаний з екстракцією з інкубаційного середовища певної кількості Mg^{2+} , які необхідні для зв'язування АТР в активному центрі та його гідролізу [60].



Рис 3.8. Хімічна структура тетрагідрокситіокалікс[4]арен-тетрасульфонату (C-798)

Вірогідним механізмом відновлювальної дії тіакалікс[4]аренів С-798 та С-800 щодо АТРазної активності субфрагмента-1 міозину за присутності Zn^{2+} може бути здатність тіакалікс[4]аренів зв'язувати катіони Zn , призводячи до усунення їх з інкубаційного середовища. Однак, обидва тіакалікс[4]арени С-798 та С-800 в концентрації 100 мкМ, усувають інгібувальний ефект Zn^{2+} на АТР-гідролазну активність субфрагмента-1 міозину. Цей факт може вказувати на більшу спорідненість тіакалікс[4]арену С-798 до катіонів Zn порівняно з катіонами Mg .

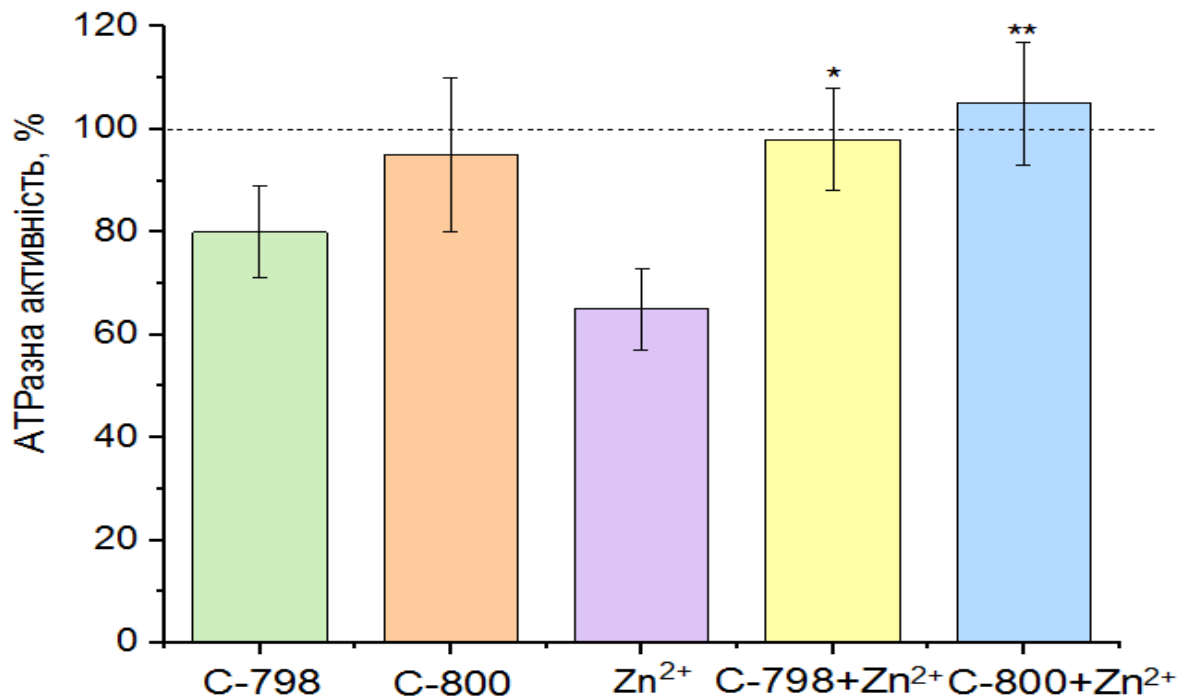


Рис.3.9. Тіакалікс[4]арени C-798 та C-800 (100 мкМ) відновлюють АТРазну активність субфрагмента-1 міозину після її інгібування Zn²⁺ (5 мМ). За 100 % приймали значення АТРазної активності без додавання катіонів Zn. Різниця між значеннями "Zn" та "Zn + C-798", а також "Zn" та "Zn + C-800" є статистично достовірною ($p < 0.05$) та позначена * та **, відповідно ($M \pm m$, $n = 5-6$).

3.3. Виявлення можливих ділянок зв'язування катіонів Pb та Cd в структурі субфрагмента-1 міозину методом комп'юторного моделювання

Для виявлення потенційних ділянок зв'язування Cd²⁺ та Pb²⁺ в структурі субфрагмента-1 міозину було проведено комп'юторне моделювання. Було показано, що катіони Pb, Cd та Ni можуть взаємодіяти із залишками амінокислот у декількох сайтах, що відіграють важливу роль в каталізі АТР субфрагментом-1 міозину. Крім того, дані ділянки можуть відрізнятись від сайтів зв'язування Mg²⁺.

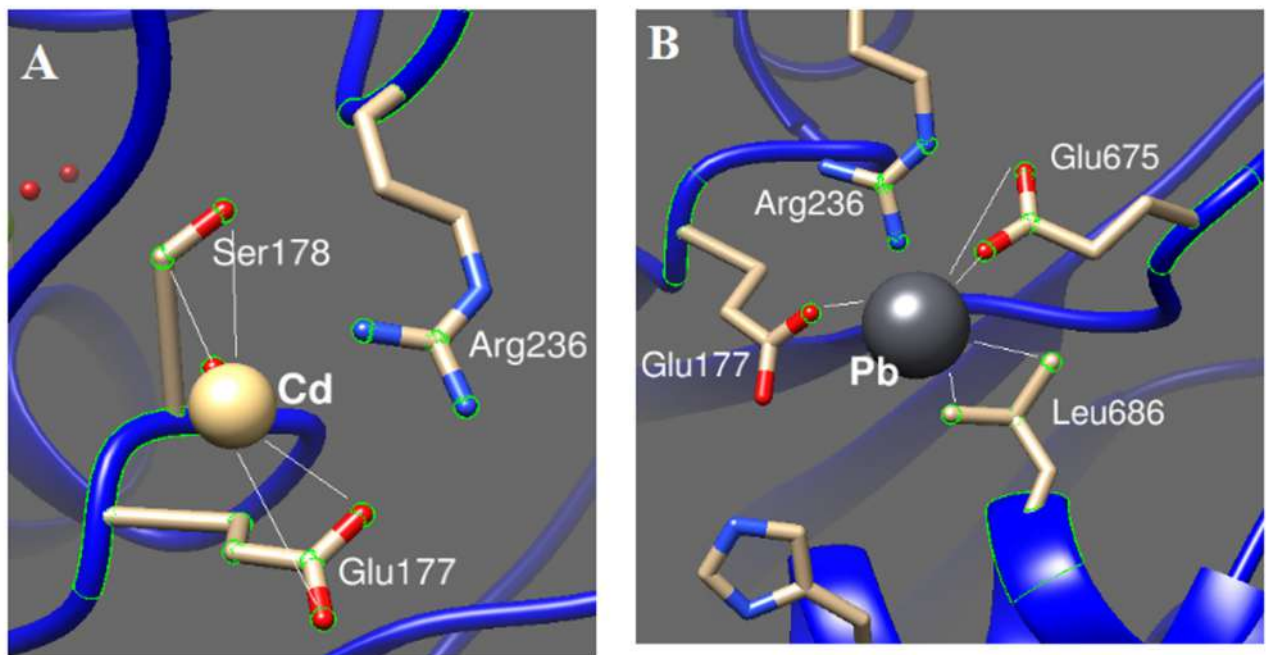
Активний центр міозину формується за участі Р-петлі (Gly176-Lys187), “перемикача 1” (Gly230-Phe243) та “перемикач 2” (Ile461-Ser471), а також “реле”,

50-кДа “верхнього” та 50-кДа “нижнього” субдоменів (Leu475-Glu506) [73]. Отже, більше уваги було надано можливим ділянкам зв'язування катіонів Pb та Cd наближеним до АТР-зв'язувальної кишені субфрагмента-1 міозину.

Оскільки іонні радіуси Mg^{2+} та Ni^{2+} в розчині подібні, найімовірніше, що Ni^{2+} взаємодіють з ділянками зв'язування, характерними для Mg^{2+} , але за досить значних концентрацій. Катіони Ni можуть взаємодіяти з субфрагмента-1 міозину у місці, наближеному до перемикача 2, що бере участь у зв'язуванні АТР і його гідролізі. Ni^{2+} взаємодіє з Glu 465 (довжина зв'язку 0,22) нм), Asp468 (довжина зв'язку 0,35 нм) і Leu653 з довжиною зв'язку 0,37 нм в ділянці, близькій до щілини між 50-кДа верхнім та 50-кДа нижнім субдоменами, що утворює кишеню для зв'язування АТР [263].

Було обрано два найбільш вірогідні сайти зв'язування для катіонів Cd та Pb в молекулі міозину. Cd^{2+} взаємодіє з Arg236 (довжина зв'язку 0,3 нм) в ділянці зв'язування 1. Вона знаходиться між АТР-зв'язуючою ділянкою і 50-кДа нижнім субдоменом (Ser652-Leu666), а також наближена до Р-петлі. Крім того, катіон Cd координує з атомами кисню Ser178 (довжина зв'язку 0,35 нм) і Glu177 (довжина зв'язку 0,27 та 0,36 нм) (Рис. 3.10А).

Катіон Pb взаємодіє з перемикачем 1 і Р-петлею, близькою до спіралі реле (Leu475-Glu506), в ділянці зв'язування 1 субфрагмента-1 міозину. Pb^{2+} також взаємодіє із залишками Arg236 (довжина зв'язку 0,25 нм) та Leu686 (довжина зв'язку 0,26 та 0,296 нм) в ділянці зв'язування 2 (Рис. 3.10 В), яка знаходиться у ділянці, біля верхнього 50-кДа субдомена (Leu218-Asp463, Glu605-Phe621) та наближена до перемикача 1 (Gly233-Phe246). Подібним чином катіон Cd взаємодіє з атомами кисню Glu327 (довжина зв'язку 0,24 нм), Glu326 (довжина зв'язку 0,32 нм) і Asp323 (довжина зв'язку 0,35 нм) в ділянці пов'язаній зі зв'язуванням та гідролізом



3.10. Ідентифікація іонних взаємодій Cd^{2+} (A) і Pb^{2+} (B) з ділянками зв'язування 1 у структурі субфрагмента-1 міозину за результатами комп'ютерного докінга (програма "Chimera"). Лініями показані іонні взаємодії.

АТР (Рис.3.11А). Крім того, катіон Pb взаємодіє з атомами кисню Glu177 (довжина зв'язку 0,32 нм) і Glu675 (довжина зв'язку 0,27 та 0,35 нм). Pb^{2+} взаємодіє з атомами кисню Glu 227 (довжина зв'язку 0,25 та 0,34 нм), та додатково у сайті зв'язування з атомом кисню Glu227 (довжина зв'язку 0,35). Катіон Pb також може взаємодіяти з Pro224 (довжина зв'язку 0,4нм) і Gln287 (довжина зв'язку 0,45 нм) у ділянці взаємодії, пов'язаній з перемикачем 1. Він бере участь в зв'язуванні і гідролізі АТР (Рис.3.11 В).

Досліджувалась також взаємодія тіакалікс[4]арену С-800 з ділянками зв'язування ВМ у субфрагменті-1 міозину. В першу чергу була розглянута структура тіакалікс[4]арену С-800 з мінімальною енергією. Тіакалікс[4]арен С-800 має конформацію конуса, яка стабілізується внутрішніми водневими зв'язками між фенольними групами. Наявність іонізованих груп на вінці

тіакалікс[4]арену значно підвищує значення електростатичних взаємодій у загальній енергії комплексу “хазяїн”-“гість” [218]. Був проведений комп'юторний докінг для дослідження можливої здатності тіакалікс[4]арену C-800 змінювати геометрію розташування катіонів Pb та Cd сайті зв'язування 1 субфрагмента-1 міозину. Було встановлено, що катіони Cd взаємодіють тетраедрично з His689 (довжина зв'язку 0,26) та Glu177 (довжина зв'язку 0,37) у субфрагменті 1 міозину, а також з атомами кисню та сульфуру на нижньому вінці тіакалікс[4]арену C-800

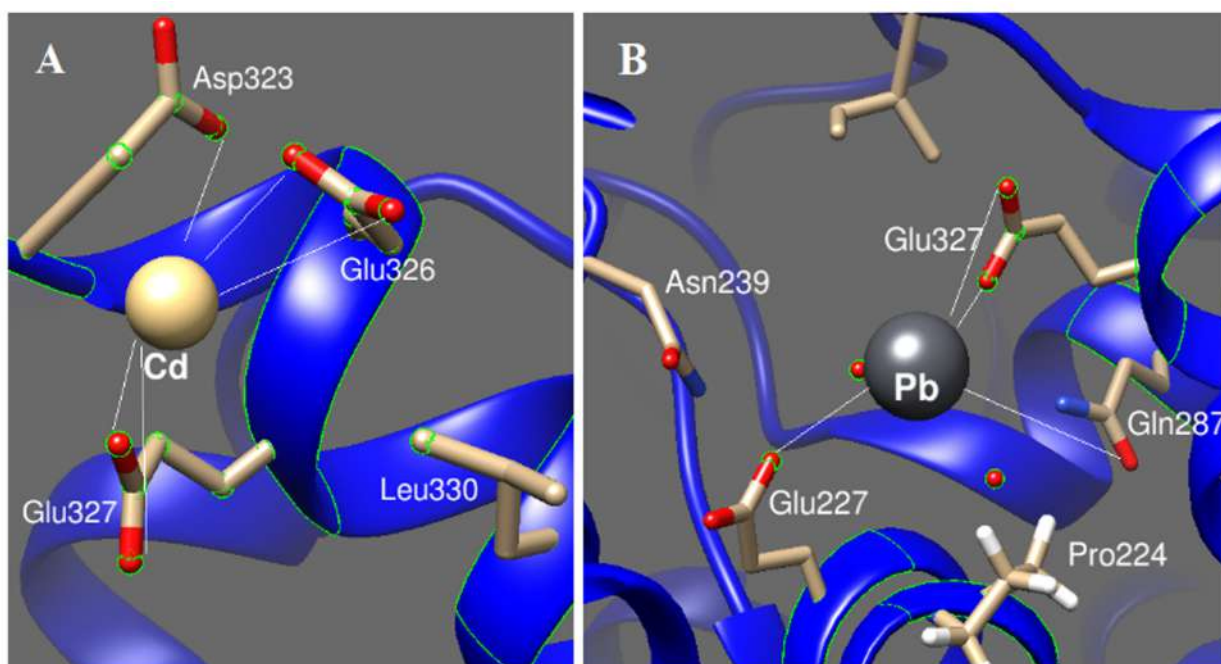


Рис. 3.11. Ідентифікація іонних взаємодій Cd^{2+} (A) і Pb^{2+} (B) з ділянками зв'язування 1 у структурі субфрагмента-1 міозину за результатами комп'ютерного докінга (програма “Chimera”). Лініями позначені іонні взаємодії.

(S4 – 0,15 нм; O4 – 0,27 нм; O1- 0,33 нм) (Рис 3.12A). Катіон Pb, який зв'язується з субфрагментом 1 міозину, взаємодіє з тіакалікс[4]ареном C-800. В результаті Pb^{2+} усувається з ділянки зв'язування в субфрагменті 1. Катіони Pb також можуть взаємодіяти з кількома атомами кисню та сульфуру на нижньому вінці тіакалікс[4]арену C-800 (O1 — 0,22 нм; S2 – 0,26 нм; O3 — 0,3 нм) (Рис 3.12B). Таким чином взаємодія між Cd^{2+} , Pb^{2+} та тіакалікс[4]ареном C-800 у субфрагменті

1 міозину може зменшувати інгібувальну дію даних катіонів. Функціональні групи тіакалікс[4]арену C-800, які взаємодіють з Cd^{2+} та Pb^{2+} , можуть значно послаблювати зв'язки між цими катіонами та залишками амінокислот в субфрагменті-1 міозину. При цьому збільшується відстань між ними.

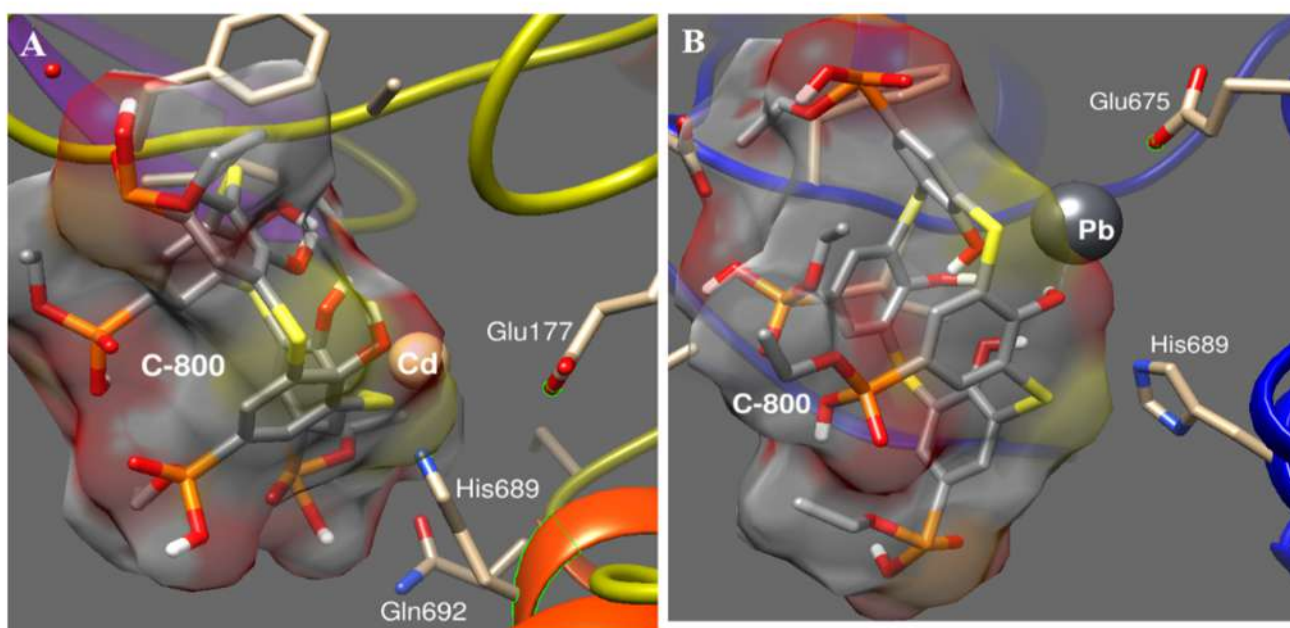


Рис. 3.12. Взаємодія катіонів Cd (A) і Pb (B) з амінокислотними залишками субфрагмента-1 міозину за присутності тіакалікс[4]арену C-800. Результати комп'ютерного докінга (програма "Chimera").

3.4. Виявлення можливих ділянок зв'язування Zn^{2+} в структурі субфрагмента-1 міозину методом комп'ютерного моделювання

Комп'ютерне моделювання показало, що катіони Zn мають декілька областей зв'язування в субфрагменті-1 міозину. Одна з них розташована у нижній частині щілини між верхнім та нижнім 50-кДа субдоменами, поблизу нуклеотид-зв'язувальної ділянки, безпосередньо біля Р-петлі. В ній Zn^{2+} взаємодіє з атомами кисню Glu177 (довжина зв'язків 0,23 і 0,39 нм відповідно), з атомом кисню Ser178 (довжина зв'язку 0,31 нм) та Arg236 (довжина зв'язку 0,32 нм) (Рис

3.13A).

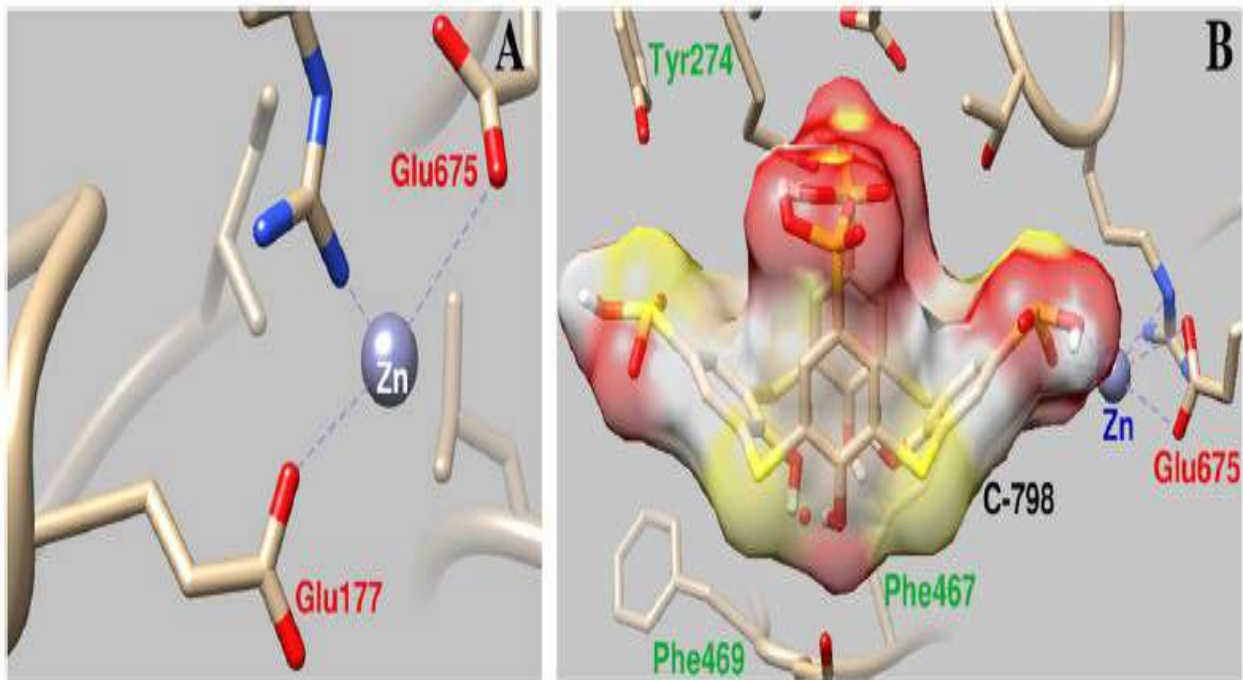


Рис 3.13. Ділянка зв'язування Zn^{2+} біля P-петлі субфрагмента-1 міозину та вплив тіакалікс[4]арену C-798 на взаємодію Zn^{2+} з нею. Результати комп'ютерного докінга (програма “Chimera”).

Інша ділянка зв'язувальна Zn^{2+} розташована в нижній частині верхнього 50-кДа субдомену (Leu218-Asp463, Glu605-Phe621) поблизу “перемикача 1” (Gly233-Phe246) і P-петлі (Рис. 3.14А). Zn^{2+} може координувати з атомами кисню Glu327 (довжина зв'язку 0,21 нм), Glu326 (довжина зв'язку 0,34 нм) та Asp323 (довжина зв'язку 0,32 нм) (Рис 3.14А). Катіон Zn також може взаємодіяти з голівкою міозину в регіоні, який контактує з “перемикачем 2”, взаємодіючи з Glu 465 (довжина зв'язку 0,24 нм), Asp468 (довжина зв'язку 0,31 нм) та Leu653 (довжина зв'язку 0,37 нм). В означених місцях ділянка зв'язування Zn^{2+} знаходиться біля ділянки, що зв'язує актин і щілини між верхнім та нижнім 50 кДа субдоменами. У нижній частині цієї щілини розташована кишеня, що зв'язує АТР. Ці Zn^{2+} зв'язувальні домени субфрагмента-1 міозину відіграють важливу

роль у зв'язуванні та гідролізі АТР. У цих ділянках відбуваються складні конформаційні перетворення в процесі перенесення енергії з сайту гідролізу АТР на поверхню, що зв'язує актин. Розглядаючи отримані результати докінгу Zn^{2+} , можна зробити висновок, що у зв'язуванні даного катіону з молекулою міозину основне значення відіграє його взаємодія з негативно зарядженими групами амінокислотних залишків ензиму, зокрема Glu та Asp.

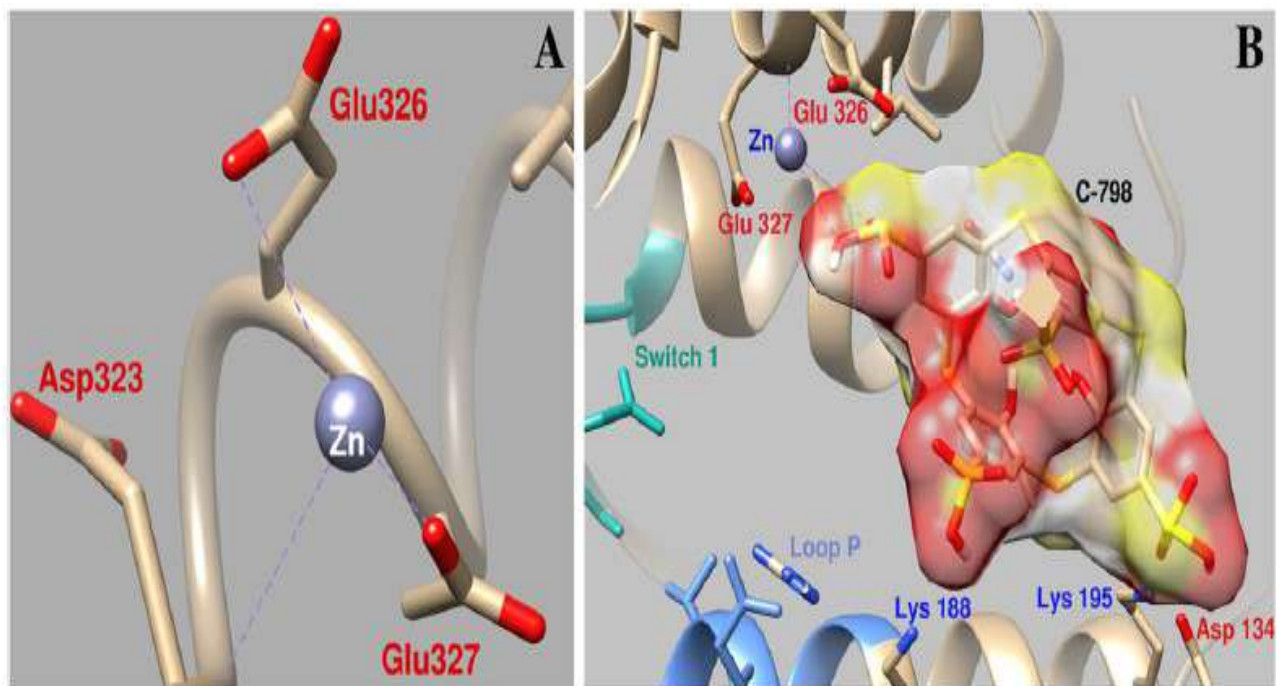


Рис 3.14. Ділянка зв'язування Zn^{2+} в субфрагменті-1 міозину біля Р-петлі та “перемикача 1” в субфрагменті-1 міозину (А) та вплив тіакалікс[4]арену С-798 на взаємодію Zn^{2+} в області Р-петлі та “перемикача 1” (В). Результати комп’ютерного докінга (програма “Chimera”).

Доречним було дослідити здатність даних тіакалікс[4]аренів взаємодіяти з катіонами Zn , які вже зв'язалися із ділянками поблизу активного центру міозину. Найбільшу увагу ми звернули на три найвірогідніші сайти зв'язування для Zn^{2+} , які наближенні до АТР-зв'язувальної ділянки субфрагмента-1 міозину [264].

Тіакалікс[4]арени С-798 та С-800 знаходяться в конформації «конус» з

містками із атомами сульфуру між ароматичними кільцями. Вона додатково стабілізується внутрішніми водневими зв'язками між фенольними групами. Була отримана енергетично мінімізована структура тіакалікс[4]арену: загальна енергія після мінімізації становила 64,5 ккал/моль. Наявність іонізованих груп на ободі (зокрема нижньому) тіакалікс[4]арена значно посилює внесок електростатичних взаємодій в загальну енергію взаємодії «гість-хазяїн». «Фіксація» тіакалікс[4]аренів C-798 та C-800 у «западині» моторного домена субфрагмента-1 міозину відбувається за участі декількох амінокислотних залишків.

Гідрофобна корзина тіакаліксарену фіксується залишками ароматичних амінокислот Phe467 та Phe469 у субфрагменті-1 міозину, негативно заряджені атоми кисню тіакаліксаренів взаємодіють із залишками амінокислот – Arg570, Asn572 та His689 зарядженими позитивно (Рис 3.13В).

При дослідженні впливу тіакалікс[4]арену C-798 на зміну положення катіону Zn^{2+} при докінгу в області, наближеній до моторного домена субфрагмента-1 міозину, показано, що за присутності тіакаліксарену зв'язаний з міозином Zn^{2+} взаємодіє з атомами кисню третьої сульфонільної групи тіакалікс[4]арену C-798 (довжини зв'язків O16 – 0,26 нм; O15 – 0,27 нм відповідно), проте майже не взаємодіє з атомами кисню залишків Asp323 та Glu326 молекули міозину, а з Glu327 координування відбувається значно слабше (довжина зв'язку 0,43 нм). При цьому тіакалікс[4]арен C-798 фіксується у «впадині» протейну за участі декількох амінокислотних залишків міозину. Зокрема, негативно заряджені атоми кисню сульфонільних груп тіакаліксарену взаємодіють із позитивно зарядженими амінокислотними залишками – Lys188, Lys195 та Gln221 субфрагмента-1 міозину (Рис 3.14 В).

Встановлено, що енергетична сфера катіону Zn^{2+} контактує і навіть дещо перекривається з поверхнею розповсюдження електростатичних взаємодій, обумовлених наявністю атомів кисню та атомів сірки в молекулі тіакалікс[4]арену C-798. Це свідчить, що досліджуваний катіон знаходяться у досить тісній взаємодії з негативно зарядженими атомами верхнього та нижнього

вінців тіакалікс[4]арену C-798. Імовірно, що тіакалікс[4]арен «відтягує» на себе катіон Zn , внаслідок чого взаємодія катіонів із амінокислотними залишками ензиму послаблюється.

Ми також провели комп'ютерне моделювання докінгу C-800 в області, наближеній до моторного домена субфрагмента-1 міозину, за умови попереднього зв'язування Zn^{2+} у цій ділянці. При цьому спостерігалась зміна положення катіону Zn : він взаємодіє з Arg236 (довжина зв'язку 0,37 нм), Glu675 (довжина зв'язку 0,41 нм) та атомами верхніх функціональних залишків тіакаліксарену (H26 – 2,36 нм; H30 – 2,96 нм; C30 – 0,31 нм; O5 – 3,7 нм; O16 – 0,4 нм, O7 – 0,48 та O11 – 0,51 нм). Zn^{2+} взаємодіє з C-800 подібно до C-798. Катіон Zn також віддаляється від попереднього місця зв'язування в даній області і знаходиться у взаємодії із Asp468 (довжина зв'язку 0,2 нм) та атомами нижнього вінця каліксарену (C4 – 1,96 нм; C14 – 2,07 нм; S3 – 2,16 нм; O2 – 2,26 нм; C3 – 2,97 нм; C20 – 3,10 нм; O4 – 4,2 нм; C14 – 3,0 нм та O3 – 4,1 нм).

Отже, результати докінгу тіакалікс[4]аренів C-798 та C-800 в ділянку субфрагмента-1 міозину, яка наближена до АТР-гідролазного центру, за умови зв'язування катіону Zn^{2+} з білком вказують на можливість взаємодії функціональних груп цих сполук з катіоном Zn . При цьому зв'язки Zn^{2+} із амінокислотними залишками субфрагмента-1 міозину значно послаблюються і відстань між ними збільшується. Внаслідок цього може усуватися негативний вплив катіону на АТРАЗну активність міозину.

3.5. Вплив тіакалікс[4]арену C-800 на метаболічну активність мітохондрій клітин міометрія в присутності катіонів Cd та Pb

Комплекс $MgATP^{2-}$ є субстратом для АТРази міозину [248], тому забезпечення енергетичних потреб ГМ клітини важливе для функціонування АТРази міозину, а отже процесу скорочення ГМ. Молекули АТР утворюються завдяки процесу окисного фосфорилування мітохондріями ГМ клітини [149, 150], які займають 3-5% її об'єму [147].

Метаболічна активність клітин ГМ матки оцінювалась методом МТТ-тесту, який базується на відновленні водорозчинної солі тетразолію (3-[4,5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифенілтетразолій-броміду або МТТ реагенту) метаболічно активними клітинами, що призводить до осідання кольорових формаганів [265]. Цей метод дозволяє вивчати метаболічну активність мітохондрій та непрямо визначати кількість життєздатних клітин. Він також широко застосовується для визначення антипроліферативної активності та цитотоксичності сполук [243].

Клітини міометрія в культурі інкубувались протягом 24 год з катіонами Cd та Pb концентрація, яких становила від 0,15 мМ до 1,25 мМ. Було показано, що Cd^{2+} та Pb^{2+} сприяють відновлюванню МТТ реагенту. Найінтенсивніше він відновлювався під впливом Cd^{2+} та Pb^{2+} при їх концентрації 1,25 мМ, а саме в 2 рази (Рис.3.15). Оскільки реакція відновлення МТТ реагенту відбувається переважно за рахунок мітохондріальних ензимів та носіїв електронів, тому в даному випадку посилене утворення формагану клітинами ГМ матки може бути пов'язаним з порушенням функціонування ЕТЛ мітохондрій. Вважається, що МТТ реагент у мітохондріях відновлюється переважно за рахунок активності сукцинатдегідрогенази (комплексу II) [265-268]. Не виключена також участь НАДН-дегідрогеназного комплексу у реакції відновлення МТТ в клітині та НАДН у якості донора електронів [265, 268]. Показано, що зменшення клітинного рівня НАДН супроводжується супутнім зниженням утворенням формагану з МТТ реагенту, а інгібування комплексу I ЕТЛ знижувало швидкість утворення формагану [269, 270].

Підвищення метаболічної активності клітин може бути пов'язаним зі збільшенням кількості мітохондрій внаслідок їх біогенезу, що призводить до посилення відновлення МТТ реагенту до формагану [271].

Збільшення утворення формагану клітинами міометрія також може бути пов'язаним із посилення їх проліферації під впливом катіонів Cd та Pb. Зокрема, катіони Cd за концентрації 1 мкМ здатні посилювати проліферацію клітинних

ліній раку грудної залози MCF-7, T47D та ZN-75-1 [272]. Cd^{2+} за хронічного впливу також призводить до збільшення ваги матки [273] та гіперплазії ендометрія у щурів [274]. Це може пояснюватись тим, що Cd^{2+} , а також Pb^{2+} відносяться до металоестрогенів [33; 275]. Показано, що Cd^{2+} здатен зв'язуватись

3

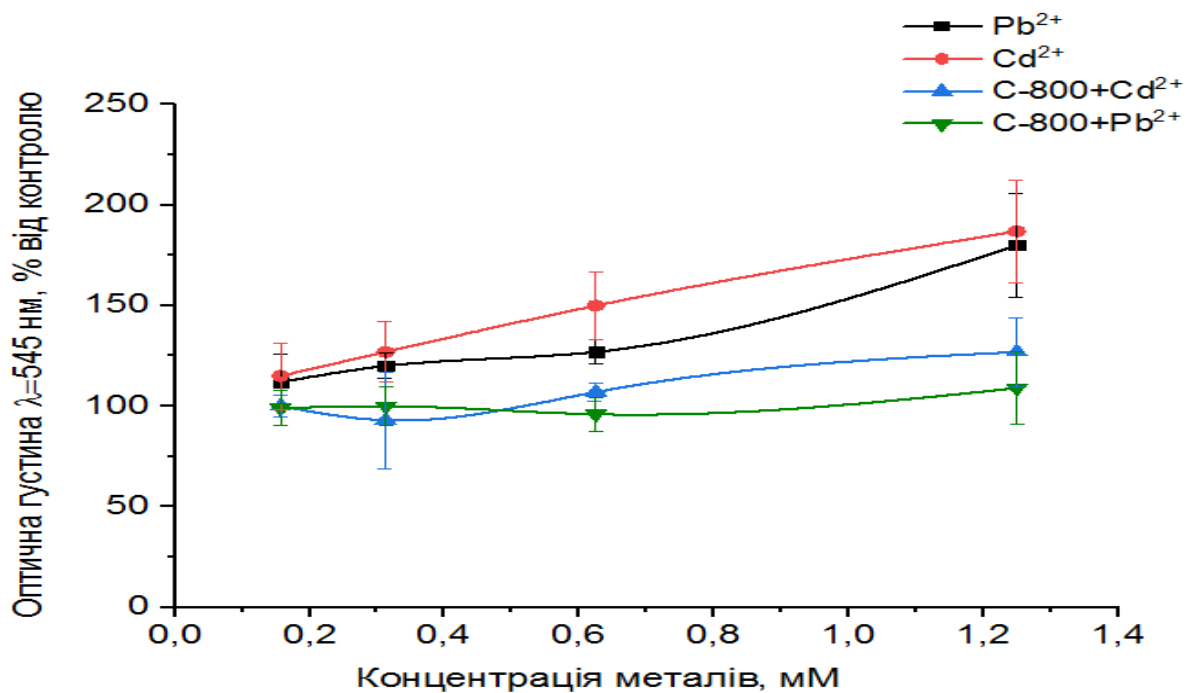


Рис. 3.15. Тіакалікс[4]арен C-800 (100 мкМ) нівелює порушення активності дихального ланцюга мітохондрій, яке було викликано катіонами Pb та Cd (використовували МТТ-тест). За 100 % приймалося значення оптичної густини формазану при $\lambda=545$ нм за відсутності катіонів важких металів та тіакалікс[4]арену C-800 ($M \pm m$; $n=4-6$).

рецептором естрогену α . Це призводить до блокування взаємодії та зниження доступності сайтів зв'язування рецептора естрогену α з естрадіолом, але при цьому його афінність не знижується [276]. Рецептор естрогену α відіграє значну роль в розвитку та підтримці функціонування жіночої репродуктивної системи. Зокрема, він стимулює рост та проліферацію клітин ендометрія матки, теки яєчника та протоків грудної залози [277]. Катіони Cd можуть зв'язуватись з

доменом зв'язування ліганду рецептора естрогену α . Можливими сайтами взаємодії для катіонів Cd у домені зв'язування ліганду рецептора естрогену α є залишки амінокислот C381, C447, E523, H524 і D538. Ще одним перспективним сайтом зв'язування Cd^{2+} є домен зв'язування ДНК. Катіони Cd можуть заміщувати Zn^{2+} в цьому домені оскільки вони мають подібні хімічні властивості. При цьому заміщення Zn^{2+} катіонами Cd незначно збільшує спорідненість у рецептора естрогену α до зв'язування ДНК [278].

Однією з мішеней Cd^{2+} також може слугувати мембранний рецептор естрогену GPR30. Показано, що катіони Cd сприяють проліферації клітини раку грудної залози SKBR3 при концентраціях від 50 до 500 нМ. Ця лінія є негативною за рецептором естрогену α та позитивною за рецептором естрогену GPR3 [279].

При додаванні тіакалікс[4]арену C-800 (100 мкМ) до середовища інкубації клітин інтенсивність відновлення МТТ реагенту (Рис. 3.16) за дії катіонів Cd та Pb знижувалась та поверталась до контрольного рівня. Це може пояснюватися як зв'язуванням цих катіонів з середовища інкубації, так і зменшенням шкідливого впливу Cd^{2+} та Pb^{2+} всередині клітин міометрія.

При вивченні впливу тіакалікс[4]арену C-800 на інтенсивність відновлення МТТ реагенту до формазану його додавали у концентрації 60-500 мкМ до середовища та інкубували клітини міометрія з ним протягом 24 год. Показано, що інтенсивність утворення формазану знижувалась на 30% при інкубації клітин з тіакалікс[4]ареном C-800 у концентрації 500 мкМ, при цьому вона залишилась майже незмінною у діапазоні концентрацій тіакалікс[4]арену C-800 60-250 мкМ (Рис. 3.16). Можна припустити, що тіакалікс[4]арен C-800 майже не впливає функціонування ЕТЛ мітохондрій та має низьку цитотоксичність у концентрації 60-250 мкМ.

Катіони Zn лише на 35% підвищували інтенсивність утворення формазану в клітинах ГМ матки за концентрації від 1,5 мМ на відміну від Cd^{2+} та Pb^{2+} . Отже можна припустити, що вони незначно можуть підвищувати

інтенсивність функціонування ЕТЛ мітохондрій (Рис. 3.17).

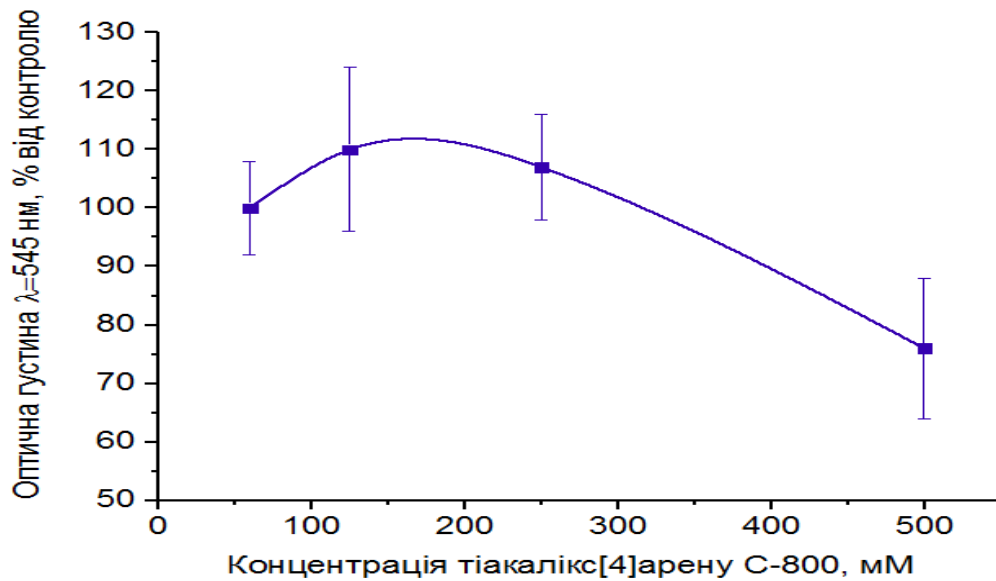


Рис 3.16. Відсутність впливу тіакарбікс[4]арену C-800 у концентрації 60-250 мкМ на дихальний ланцюг мітохондрій в клітинах гладенького м'яза матки. За 100 % приймалося значення оптичної густини формазану при $\lambda=545$ нм за відсутності тіакарбікс[4]арену C-800 ($M \pm m$; $n=4$).

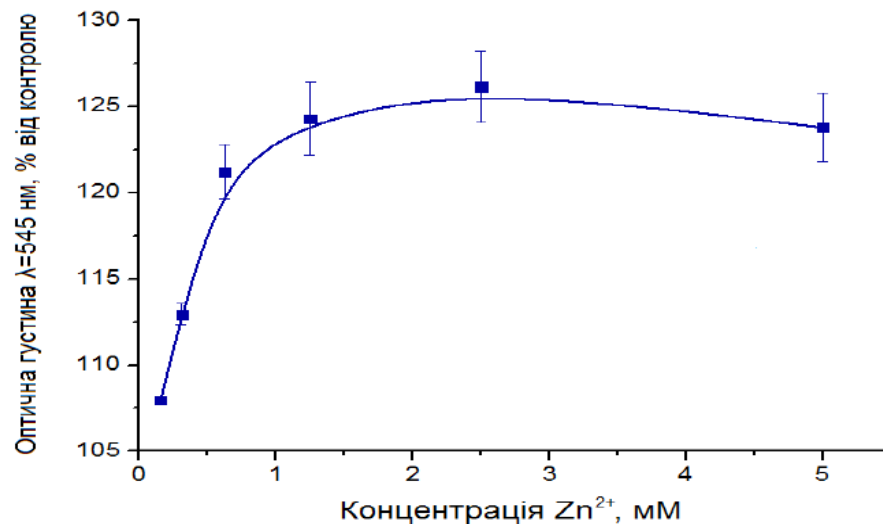


Рис 3.17. Незначне підвищення активності дихального ланцюга мітохондрій в клітинах гладенького м'яза матки за дії Zn^{2+} . За 100 % приймалося значення оптичної густини формазану при $\lambda=545$ нм за відсутності катіонів Zn ($M \pm m$; $n=4$).

3.6. Автофлуоресценція НАДН та ФАД в ізольованих мітохондріях міометрія за дії катіонів важких металів

Для того, щоб перевірити припущення про зв'язок між посиленням відновлення МТТ реагенту за дії Cd^{2+} та Pb^{2+} з порушенням функціонування комплексів I та II ЕТЛ мітохондрій у клітинах міометрія, ми дослідили зміни автофлуоресценції флавінових та нікотинамідних коензимів, оскільки НАДН та ФАДН_2 - основні донори електронів та протонів у ЕТЛ. НАД^+ отримує два електрони та протони із субстратів на декількох етапах циклу трикарбонових кислот та відновлюється до НАДН. ФАД^+ відновлюється до ФАДН_2 завдяки окисненню сукцината до фумарата сукцинатдегідрогеназою (комплексом II) ЕТЛ. Мітохондріальний НАДН окиснюється після передавання електронів в комплекс I (НАДН-дегідрогеназний комплекс) ЕТЛ, а ФАДН_2 окиснюється комплексом II віддаючи два електрона. Надалі електрони послідовно передаються від комплексу I та II до убихінону (коензиму Q), а з нього послідовно до комплексу III (комплекс цитохромів bc_1) та комплексу IV (цитохром-оксидазу), що призводить до відновлення молекулярного кисню до води. Потік електронів пов'язаний з "викачуванням" протонів комплексами I, III і IV через непроникну для них внутрішню мембрану мітохондрій у внутрішній міжмембранний простір. Це створює протонний градієнт необхідний для утворення АТФ у мітохондріях. [280].

Останнім часом зростає інтерес до використання внутрішньоклітинних флавінових та нікотинамідних коензимів як внутрішньоклітинних біомаркерів для вивчення метаболічної активності мітохондрій та її порушень [245, 281], оскільки саме вони є основними первинними переносниками електронів за процесу окиснювального фосфорилування. Мітохондрії мають підвищене співвідношення НАДН/ НАД^+ у порівнянні з цитоплазмою, яке складає від 7 до 8. НАДН та його окислена форма (НАД^+) також беруть участь у забезпеченні різних функцій мітохондрій, зокрема енергетичному обміні, гомеостазі кальцію, експресії генів, окислювальному стресі, старінні та апоптозі [282].

Ряд досліджень продемонстрував зв'язок між внутрішньою автофлюоресценцією НАДН з метаболізмом клітини та її патологіями. Рівень НАД⁺ у мітохондріях метаболічно більш активних клітин підвищений. Зокрема, у мітохондріях кардіоміоцитів він становить 70% (10.0 ± 1.8 нМ/мг протеїну), нейронах 50% (4.7 ± 0.4 нМ/мг протеїну), а у клітинах печінки 30-40% (3.2 ± 1.0 нМ/мг протеїну) [283]. У тканинах молодих організмів рівень НАД⁺ підвищений, зокрема, у шкірі новонароджених його рівень у 3 рази вищий ніж в шкірі дорослої людини, але з віком його рівень у клітинах знижується [283]. Фізична активності організму також впливає на рівень НАД⁺ у мітохондріях, зокрема у мітохондріях скелетних м'язів його рівень зростає при скороченні та збільшенні інтенсивності тренування [284]. На противагу цьому підвищення рівня НАДН спостерігається при зниженні метаболічної активності клітини, що характерно для клітин багатьох типів пухлин та метаболічно менш активних тканин [281, 285]. Зокрема, при раку грудної залози [269] та простати спостерігається значне збільшення рівня НАДН у малігнізованих тканинах порівняно з нормальними [286]. Зростання рівня НАДН відбувається також при певних захворюваннях таких, як діабетична кардіоміопатія [287], діабет, ожиріння [288] та гостра ниркова недостатність [289]. Отже, вивчення співвідношення НАДН/НАД⁺ дозволяє досліджувати клітинний метаболізм під час патофізіологічних змін [267].

Максимальна хвиля збудження для відновленої форми НАДН становить близько 340 нм тоді, як максимум емісії складає 450 нм. В той же час, окиснена форма нікотинамідного коензиму (НАД⁺) не має власної автофлюоресценції [290].

Вільний ФАД⁺ флуоресціює при хвилі збудження 450 нм з емісію при 525 нм в той час, як відновлена форма флавінового коензиму (ФАДН₂) не має власної флуоресценції. Унаслідок цього автофлюоресценція НАДН (458 нм) та ФАД⁺ (528 нм) може вивчатись незалежно за допомогою вибіркового збудження при 340 та 450 нм відповідно. ФАДН₂ та його окислена форма (ФАД) також мають вирішальне значення для багатьох окисно-відновних реакцій у живих клітинах

[291, 292]. Крім того, було показано, що функціонування ЕТЛ у ізольованих мітохондріях співвідносилось з окисно-відновним станом коензимів НАДН та ФАД. Отже, внутрішньоклітинний та мітохондріальний рівень цих коензимів має діагностичне значення в якості природного біомаркера внутрішньоклітинних окисно-відновних реакцій, енергетичного метаболізму та порушень при різних паталогічних станах [293].

При дослідженні автофлуоресценції НАДН в ізольованих мітохондріях міометрія щура було показано, що вона зростала приблизно в 2 та 1,5 раза після їх інкубації протягом 5 хв з катіонами Cd та Pb (Рис. 3.18), відповідно. Концентрація обох металів при цьому становила 1 мМ. Вона також зростала під впливом Zn^{2+} (1 мМ) на 50% (Рис. 3.19). Автофлуоресценція НАДН майже не змінювалась за дії Ca^{2+} та Mg^{2+} (1 мМ). Можна припустити, що катіони Cd і Pb, а

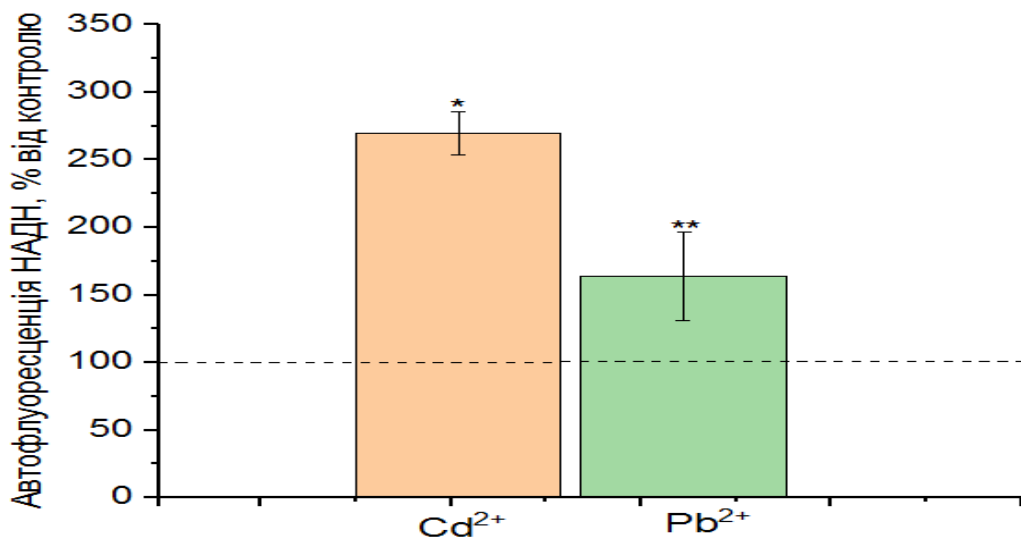


Рис. 3.18. Підвищення рівня автофлуоресценції НАДН в ізольованих мітохондріях міометрія щура за їх інкубації з Cd^{2+} та Pb^{2+} (1 мМ) протягом 5 хв. За 100 % приймалося значення автофлуоресценції НАДН в ізольованих мітохондріях гладенького м'яза матки без додавання катіонів металів. Різниця для Cd^{2+} та Pb^{2+} – статистично достовірна ($p < 0.05$) та позначена * та ** відповідно ($M \pm SD$; $n=4$).

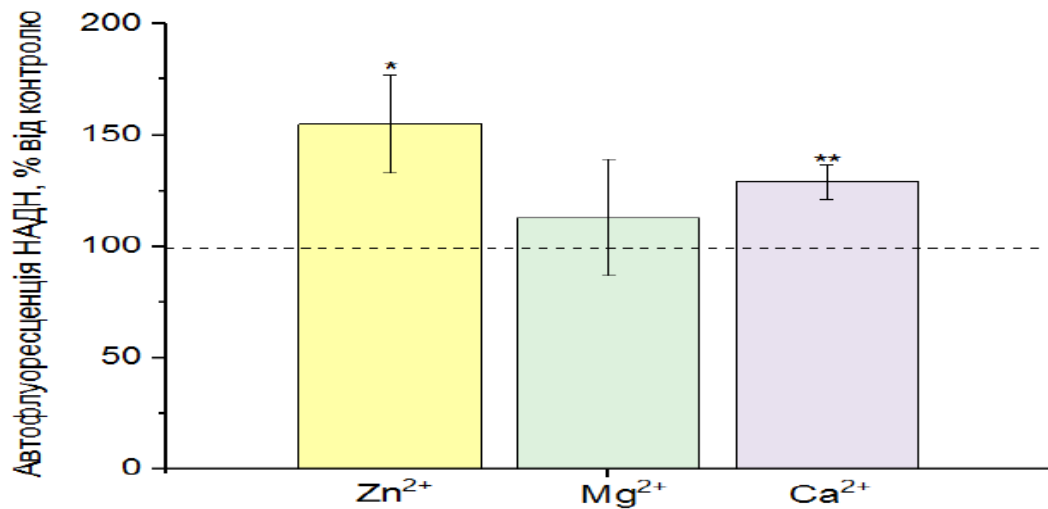


Рис. 3.19. Підвищення рівня автофлуоресценції НАДН в ізолюованих мітохондріях міометрія щура за їх інкубації протягом 5 хв з Zn^{2+} та Ca^{2+} (1 мМ). За 100 % приймали значення автофлуоресценції НАДН в ізолюованих мітохондріях без додавання катіонів двовалентних металів. Різниця для Zn^{2+} та Ca^{2+} – статистично достовірна ($p < 0.05$), вона позначена * та **, відповідно ($M \pm m$; $n=4$).

також меншою мірою катіони Са та Zn призводять до порушення функціонування НАДН-дегідрогеназного комплексу в ЕТЛ, що викликає підвищення рівня відновленої форми нікотинамідного коензиму (НАДН) в мітохондріях міометрія. Підвищення рівня НАДН спостерігається при зниженні метаболічної активності клітини, зокрема характерно для клітин багатьох типів пухлин та метаболічно менш активних тканин [285, 286]. Однак в поєднанні з підвищеним рівнем автофлуоресценції окисненого флавінового коензиму може свідчити про посилення окисно-відновних процесів [294]. При дослідженні автофлуоресценції ФАД⁺ в ізолюованих мітохондріях ГМ матки щура було показано, що вона зростала приблизно в 2 рази після їх інкубації протягом 5 хв з катіонами Cd (1 мМ) (Рис. 3.20). Однак вона майже не змінюється під впливом Pb²⁺. Автофлуоресценція ФАД⁺ також не змінюється під впливом Mg²⁺,

Ca^{2+} та Zn^{2+} за концентрації 1 мМ, які відносяться до важливих мікроелементів (Рис. 3.21).

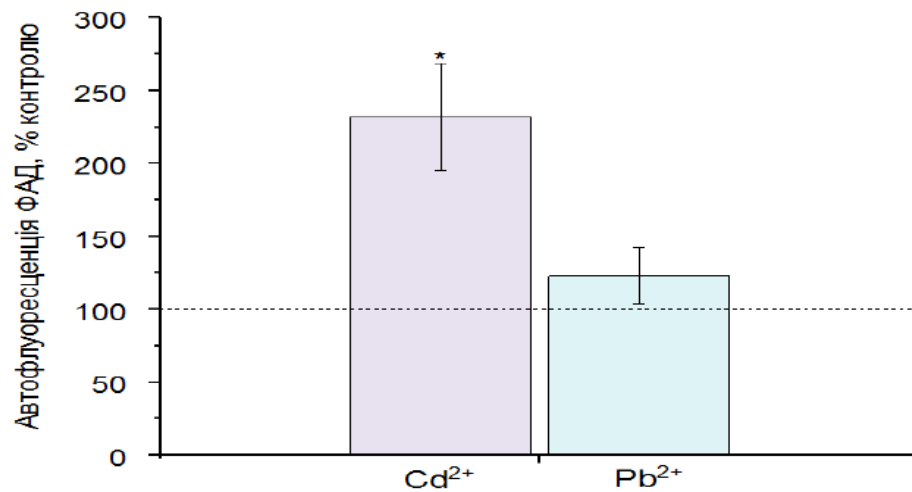


Рис. 3.20. Підвищення рівня автофлуоресценції ФАД в ізолюваних мітохондріях за їх інкубації протягом 5 хв з Cd^{2+} (1мМ) ($M \pm SD$; $n=4$). За 100 % приймалося значення автофлуоресценції ФАД в ізолюваних мітохондріях гладенького м'яза матки без додавання катіонів металів. Різниця достовірна ($p < 0.05$) для Cd^{2+} , позначена як*.

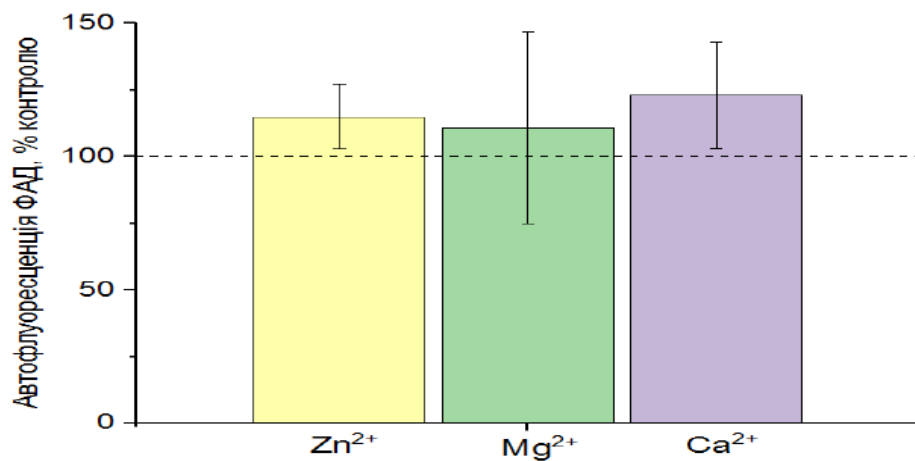


Рис.3.21. Відсутність впливу на автофлуоресценцію ФАД в ізолюваних мітохондріях міометрія щура за їх інкубації з Zn^{2+} , Ca^{2+} і Mg^{2+} (1 мМ) протягом 5 хв з ($M \pm SD$; $n=4$). За 100 % - значення автофлуоресценції ФАД в ізолюваних мітохондріях гладенького м'яза матки без додавання катіонів металів.

Отже можна припустити, що інкубація ізольованих мітохондрій міометрія з Cd^{2+} призводить до порушення функціонування сукцинатдегідрогенази (комплекс II) в ЕТЛ, а саме активації комплексу II та посилення процесу окиснення сукцинату. Таке порушення функціонування сукцинатдегідрогенази може сприяти посиленому утворенню АФК мітохондріями [295], а отже призводити до окислювального стресу в клітинах [296]. Зростання рівня ФАД спостерігається також незадовго до апоптозу, що супроводжується порушенням функціонування ЕТЛ, зокрема транспорту електронів [297].

3.7. Продукування активних форм кисню у суспензії клітин міометрія щурів

Утворення АФК - одним з основних наслідків порушення функціонування ЕТЛ. За фізіологічних умов при переносі електронів через ЕТС незначна частка електронів утікає та призводить до утворення вільних радикалів таких, як супероксид аніон, перекис водню та гідроксильні радикали [174, 183, 185]. Підвищений рівень АФК призводить до окислювального стресу зі свого боку до перекисного окислення ліпідів, білків і пошкодження ДНК. Зокрема, окислення ліпідів мембрани мітохондрій, викликане АФК [197], призводить до зниження її потенціалу, яке призводить до апоптозу внаслідок підвищення концентрації цитохрому c в цитозолі, проапоптичного білка апаф-1, каспаз 3 та 9 [198]. Окислювальний стрес також призводить до зниження синтезу АТФ в клітині, а отже продукування в ній енергії [199]. Основними сайтами продукування АФК в ЕТЛ є комплекси I, II та III [128, 265, 269].

Оскільки катіони ВМ здатні порушувати функціонування ЕТЛ, доречним було вивчити їх вплив на генерування АФК клітинами міометрія. Вплив катіонів Cd, Pb та Zn на продукування АФК у суспензії клітин ГМ матки щурів досліджували із застосуванням протокової цитофлуориметрії та використанням 2', 7'-дихлордигідрофлуоресцеїн діацетату (DCFDA) як зонда. Було показано, що

Cd^{2+} та Pb^{2+} у концентрації 1 мМ після інкубації протягом 5 хв підвищували утворення АФК міоцитами матки на 50%. В той час, як Zn^{2+} (1 мМ) сприяв посиленню генерування АФК клітинами міометрія на 20% після 5 хв інкубації (Рис. 3.22).

При додаванні тіакалікс[4]арен С-800 (100 мкМ) до середовища інкубації клітин міометрія з катіонами Cd (1 Мм) та їх наступній інкубуції протягом 5 хв не було встановлено зниження генерування АФК (Рис. 3.23).

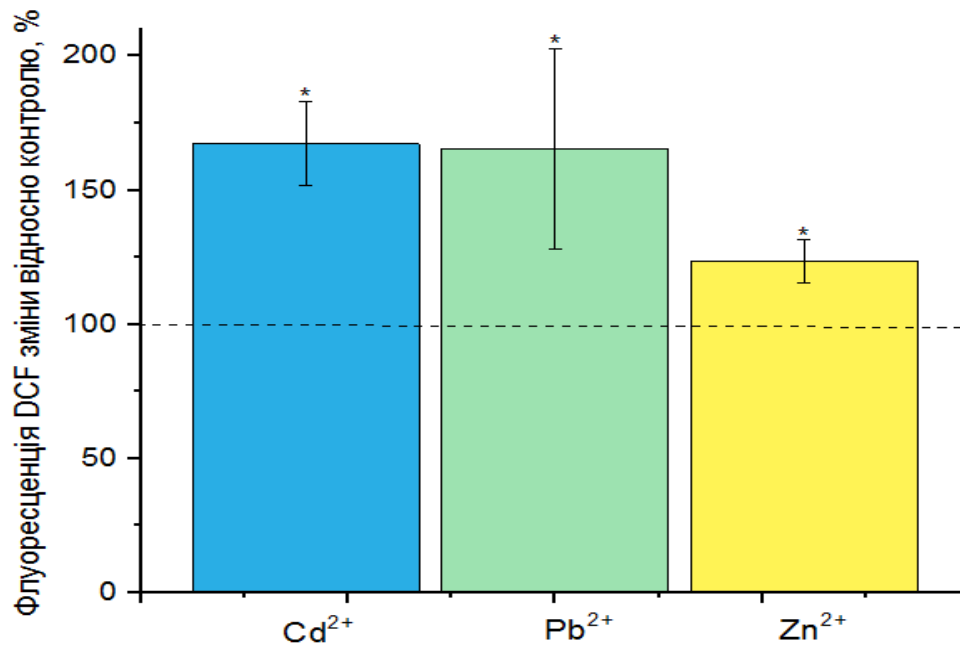


Рис. 3.22. Катіони Cd , Pb та Zn (1 мМ) посилюють утворення активних форм кисню в клітинах міометрія (час інкубації-5 хв). За 100% приймали інтенсивність флуоресценції DCF при $\lambda_{36}=488$ нм в клітинах міометрія без додавання катіонів металів ($M \pm m$; $n=3-8$). Різниця достовірна ($p < 0.05$) для Cd^{2+} , Pb^{2+} та Zn^{2+} , вона позначена як*.

Зокрема, інгібітори комплексу III стигмателін та актиноміцин А знижують продукування АФК за дії катіонів Cd у клітинній лінії гепатоми щура AS-30D. Це може свідчити про значний внесок наведеного комплексу у

генеруванні АФК, викликане Cd^{2+} . У клітинній лінії карциноми печінки щура AS-30D також виявлено, що Cd^{2+} сприяє утворенню АФК, викликаного порушенням функціонування комплексу II особливо, сайту окиснення хінолу [299].

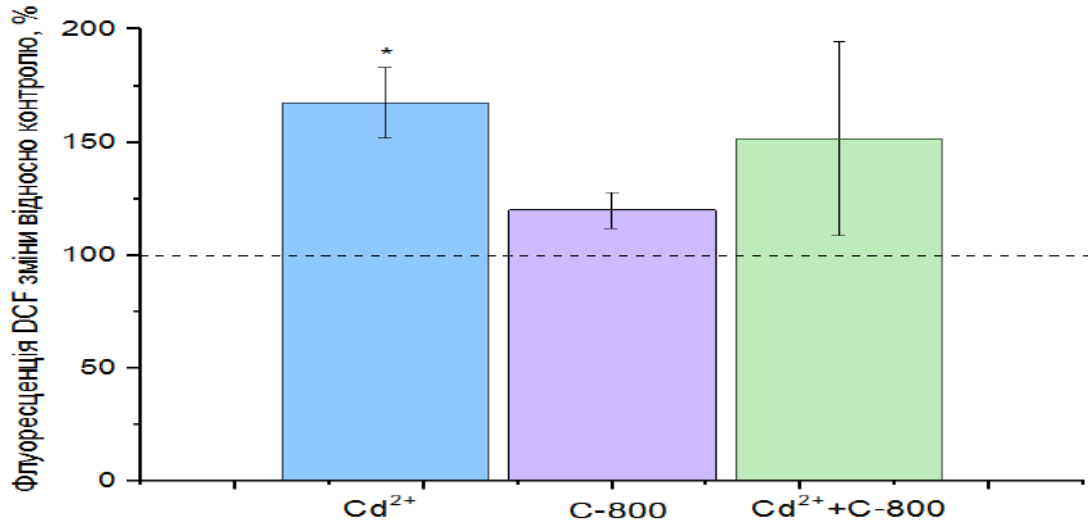


Рис. 3.23. Тіакалікс[4]арен C-800 (100 мкМ) не запобігає посиленню утворення активних форм кисню в клітинах міометрія за дії Cd^{2+} (1 мМ) (час інкубації - 5 хв). За 100% приймали інтенсивність флуоресценції DCF при $\lambda_{36}=488$ нм в клітинах міометрія без додавання катіонів металів та тіакалікс[4]арену C-800 ($M \pm m$; $n=4-8$). Різниця достовірна ($p < 0.05$) для Cd^{2+} , позначена як*.

Посилення утворення АФК під впливом катіонів Cd^{2+} , Pb^{2+} та Zn^{2+} в клітинах може призвести до окислювального стресу, який пов'язаний з перекисним окисленням ліпідів, білків та пошкодженням ДНК [18, 19], що ініціює розвиток багатьох захворювань [16, 17]. Деякими дослідженнями встановлено, що катіони Cd сприяють утворенню АФК комплексами II та III [298, 299].

Основна роль в продукуванні АФК сукцинатдегідрогеназою (комплекс II) за дії Cd^{2+} належить ділянці зв'язування флавіну за інгібування процесу відновлення убіхінону [300]. При цьому блокування сайту зв'язування сукцинату в комплексі II малатом пригнічує продукування АФК під впливом Cd^{2+} [301]. Катіони Pb посилюють утворення АФК сукцинатдегідрогеназою та майже

не впливають на їх генерування комплексом I в ЕТЛ у мітохондріях синапсів [302]. Pb^{2+} та Cd^{2+} також інгібують ряд важливих антиоксидантних ензимів, зокрема каталазу [194, 303], супероксиддисмутази [304] та глутатіонпероксидази [195, 196].

Катіони Pb здатні заміщувати важливі для каталізу метали, а саме Mg^{2+} , Ca^{2+} і Zn^{2+} в антиоксидантних ензимах. Крім того, катіони Pb також можуть ковалентно зв'язуватись з суфгідрильними групами ензимів, що призводить до їх інактивації. Катіони Cd здатні послаблювати антиоксидантний захист клітин, завдяки зниженню пулу глутатіону - однієї з основних антиоксидантних молекул в клітині [188].

3.8. Флуоресцентні властивості тіакалікс[4]аренів C-798 та C-800

Завдяки своїй винятковій здатності до комплексоутворення з різними катіонами та аніонами тіаліксарени можуть розглядатися, як перспективні сполуки для розробки флуоресцентних хемосенсорів [61-63]. Зокрема, на основі тіаліксаренів, вже розроблені селективні та чутливі флуоресцентні хемосенсиори до катіонів металів таких, як Hg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} і Cr^{3+} [62, 64, 65].

Тіакаліксарени мають покращену здатність зв'язувати катіони металів, яка пов'язана з гідроксильними групами та двовалентними атомами сірки. Вони щільно розташовані на нижньому краю, що дозволяє тіакаліксаренам хелатувати іони металів з утворенням стійких комплексів.

При дослідженні властивостей тіакалікс[4]аренів C-798 та C-800 було виявлено, що обидві сполуки мають флуоресцентні властивості. Показано, що при збудженні хвилею 340 нм флуоресценція тіакалікс[4]арену C-800 має максимальне значення емісії при довжині хвилі 380 нм. В той час, як для тіакалікс[4]арену C-798 максимум емісії становив 458 нм при хвилі збудження 399 нм.

При вивченні впливу Pb^{2+} , Zn^{2+} та Cd^{2+} на флуоресценцію

тіакалікс[4]арену C-798 встановлено, що катіони Zn та Cd не мали значного впливу на неї. В той же час, Pb^{2+} знижували інтенсивність флуоресценції тіакалікс[4]арену C-798, що може бути пов'язаним з агрегацією його молекул під їх впливом (Рис. 3.24).

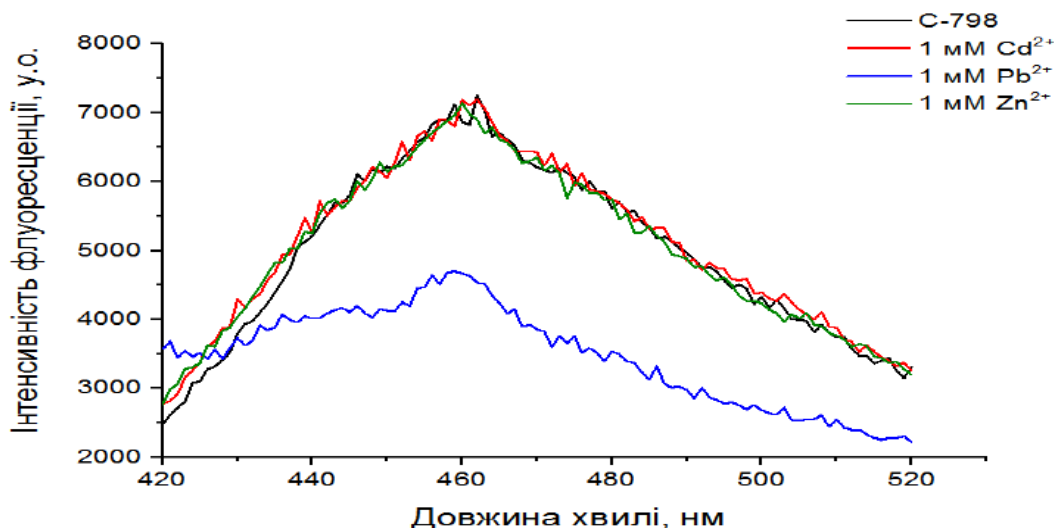


Рис 3.24. Відсутність впливу Zn^{2+} та Cd^{2+} (1 мМ) на інтенсивність флуоресценції тіакалікс[4]арену C-798 (100 мкМ) та її зниження за дії Pb^{2+} ($\lambda_{36}=399$ нм).

3.8.1. Тіакалікс[4]арен C-800 — селективний та чутливий зонд до катіонів Zn

Zn^{2+} - другий найпоширеніший катіон металу після Fe^{2+} в організмі людини. Його кількість становить 2-3 г в організмі дорослої людини. Найбільша кількість Zn^{2+} у організмі людини міститься в підшлунковій залозі та печінці. Zn^{2+} необхідний для нормального розвитку організму та життєдіяльності людини [144, 145], він також входить до складу понад 300 ензимів, зокрема вуглекислої ангідрази та алкогольдегідрогенази. Zn^{2+} -компонент деяких факторів транскрипції, в яких цей катіон бере участь у зв'язуванні з генами-мішенями [138].

У жіночому організмі Zn^{2+} відіграє важливу роль у забезпеченні

репродуктивної функції та необхідний для нормального розвитку плода [34]

Zn^{2+} відноситься до життєвоважливих мікроелементів, але його надлишок є токсичним [135] та може сприяти розвиткові багатьох захворювань [139-141].

Отже з огляду на роль катіонів Zn в організмі людини їх моніторинг в клітині є важливим завданням. З цією метою було розроблено ряд селективних флуоресцентних зондів до Zn^{2+} , що поділяються на два класи: зонди з невеликими розмірами молекулами та високомолекулярні протеїнові сенсори, які базуються на ферстерівському переносі енергії. Низькомолекулярні зонди, які переважно розроблені на основі квіноліна, бензазола та флуоресцеїна, зазвичай збільшують флуоресценцію при хелатуванні Zn^{2+} [305]. Переваги цих зондів полягають у тому, що вони можуть легко проникати в клітину, а також їх простому використанні. Крім того, вони дають високий сигнал флуоресценції порівняно з фоною автофлуоресценцією клітини, а також можуть флуоресціювати на різних довжинах хвиль [306]. Каліксарени та їх похідні тіакалісарени мають виняткову здатність до комплексоутворення з катіонами різних металів [53, 55], тому розглядаються як перспективні сполуки для розробки флуоресцентних хемосенсорів. На основі тіаліксаренів розроблені селективні та чутливі флуоресцентні хемосенсори до катіонів Hg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} і Cr^{3+} [57, 59, 60].

При дослідженні впливу катіонів Zn на флуоресценцію тіакалікс[4]арену C-800 встановлено, що вони значно підсилюють його флуоресценцію. Це робить його перспективним для використання в якості флуоресцентного хемосенсора до Zn^{2+} . При дослідженні впливу катіонів BM показано, що при додавання Zn^{2+} інтенсивність флуоресценції тіакалікс[4]арену C-800 значно підвищувалася. Була також показана залежність величини флуоресценції тіакалікс[4]арену C-800 від концентрації Zn^{2+} (Рис. 3.25). За сталої концентрації C-800 (100 мкМ) у середовищі за присутності 0,1 мМ Zn^{2+} спостерігалось зростання флуоресценції тіакалікс[4]арену у 2 рази, за присутності 0,25 мМ – майже в 10 разів, а за наявності 4 та 5 мМ збільшення флуоресценції досягало 100 разів. Ми також

дослідили вплив різних концентрацій Zn^{2+} на флуоресценцію тіакалікс[4]арену C-800 та залежність флуоресценції самого тіакалікс[4]арену C-800 від власної концентрації за дії Zn^{2+} . При дослідженні залежності інтенсивності флуоресценції тіакалікс[4]арену C-800 від його концентрації від 5 мкМ до 100 мкМ за сталої концентрації Zn^{2+} (5 мМ) встановлено, що флуоресценція тіакалікс[4]арену C-800 концентраційнозалежно зростає. Її інтенсивність має максимальне значення за присутності 100 мкМ тіакалікс[4]арену C-800 (Рис. 3.26).

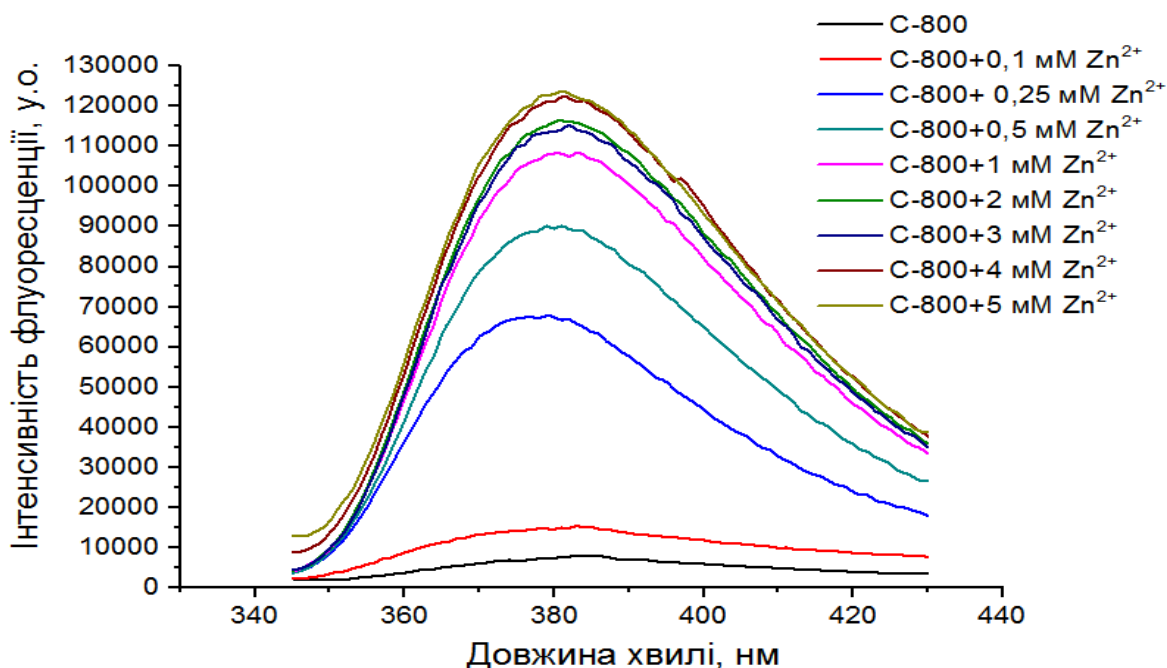


Рис. 3.25. Збільшення концентрації Zn^{2+} сприяє підвищенню інтенсивності флуоресценції тіакалікс[4]арену C-800 (100 мкМ, $\lambda_{36}=340$ нм).

Важливим критерієм для зонду є його селективність та чутливість до певного металу у різних концентраціях. З цією метою було досліджено селективність тіакалікс[4]арену C-800 щодо катіонів Zn серед інших катіонів двовалентних металів, зокрема Mg, Ca, Pb та Cd. Встановлено, що флуоресценція тіакалікс[4]арену C-800 є вибірковою щодо Zn^{2+} . Вона зростає при додаванні

іонів Zn та практично не змінюється за присутності катіонів інших металів таких, як Mg^{2+} , Ca^{2+} , Pb^{2+} та Cd^{2+} (Рис. 3.27).

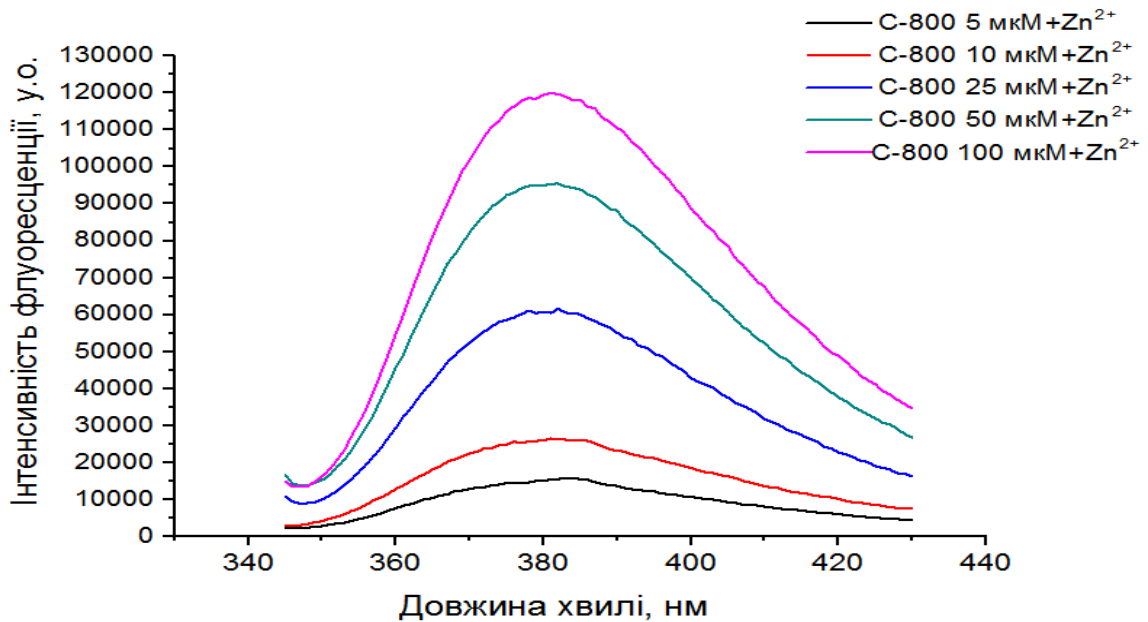


Рис.3.26. Збільшення концентрації тіакалікс[4]арену C-800 (5-100 мкМ, $\lambda_{36}=340$ нм) сприяє підвищенню інтенсивності його флуоресценції при дії катіонів Zn (5 мМ).

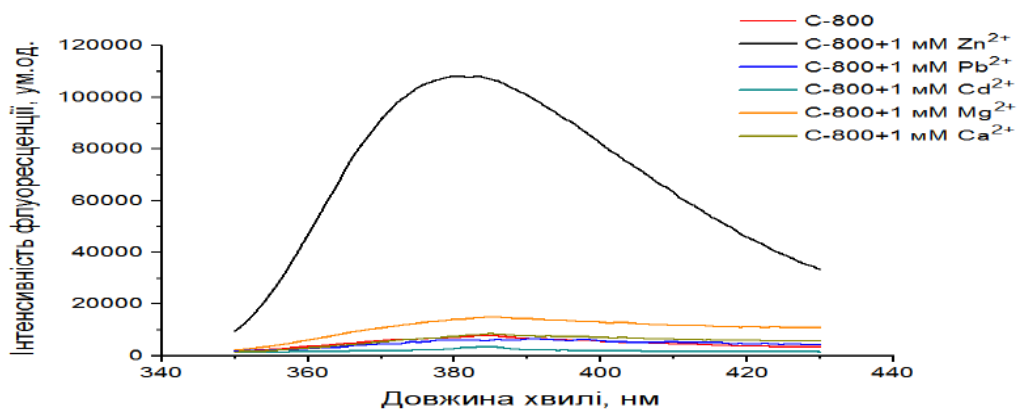


Рис. 3.27. Катіони Zn (1 мМ), на відміну від інших двовалентних катіонів, індуюють посилення флуоресценції тіакалікс[4]арену C- 800 (100 мкМ, $\lambda_{36}=340$ нм).

Отримані результати можуть свідчити про доцільність використання тіакалікс[4]арену С-800 в якості флуоресцентного зонда на Zn^{2+} в живих клітинах.

3.8.2. Вивчення інтенсивності флуоресценції тіакалікс[4]арену С-800 в міоцитах матки

Важливим критерієм для використання сполук як флуоресцентних зондів є їхня здатність проникати всередину клітини. З цією метою клітини міометрія були навантажені тіакалікс[4]ареном С-800 (100 мкМ) протягом 2 год.

З використанням флуоресцентної мікроскопії було виявлено збільшення флуоресценції міоцитів матки щура приблизно на 40% після навантаження тіакалікс[4]ареном С-800, а після додавання Zn^{2+} до клітин міометрія, попередньо навантажених тіакалікс[4]ареном С-800, спостерігалось підвищення інтенсивності їх флуоресценції приблизно на 70%, порівняно з контролем (Рис. 3.28). Посилення інтенсивність флуоресценції клітин, навантажених тіакалікс[4]ареном С-800, порівняно з контролем (Рис.3.29 В-С) може бути свідченням проникнення його всередину клітин.

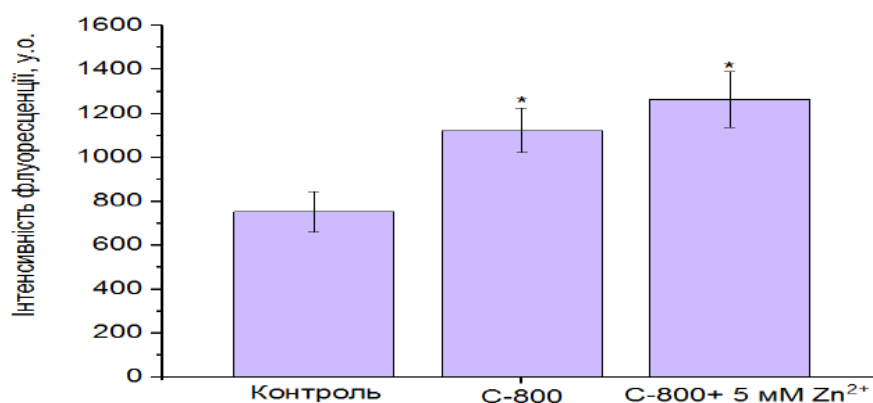


Рис. 3.28. Порівняння інтенсивності флуоресценції контролю, клітин, навантажених тіакалікс[4]ареном С-800 протягом 5 хв та наступної інкубації клітин з 5 мМ Zn^{2+} протягом 5 хв. Різниця між "Контролем", "С-800" та "С-800+5 мМ Zn^{2+} " є статистично достовірною ($p < 0.05$) і позначена як *.

Інтенсивність флуоресценції клітин, навантажених тіакалікс[4]ареном С-

800, також зростала в залежності від часу інкубації з катіонами Zn (Рис. 3.29 E-G).

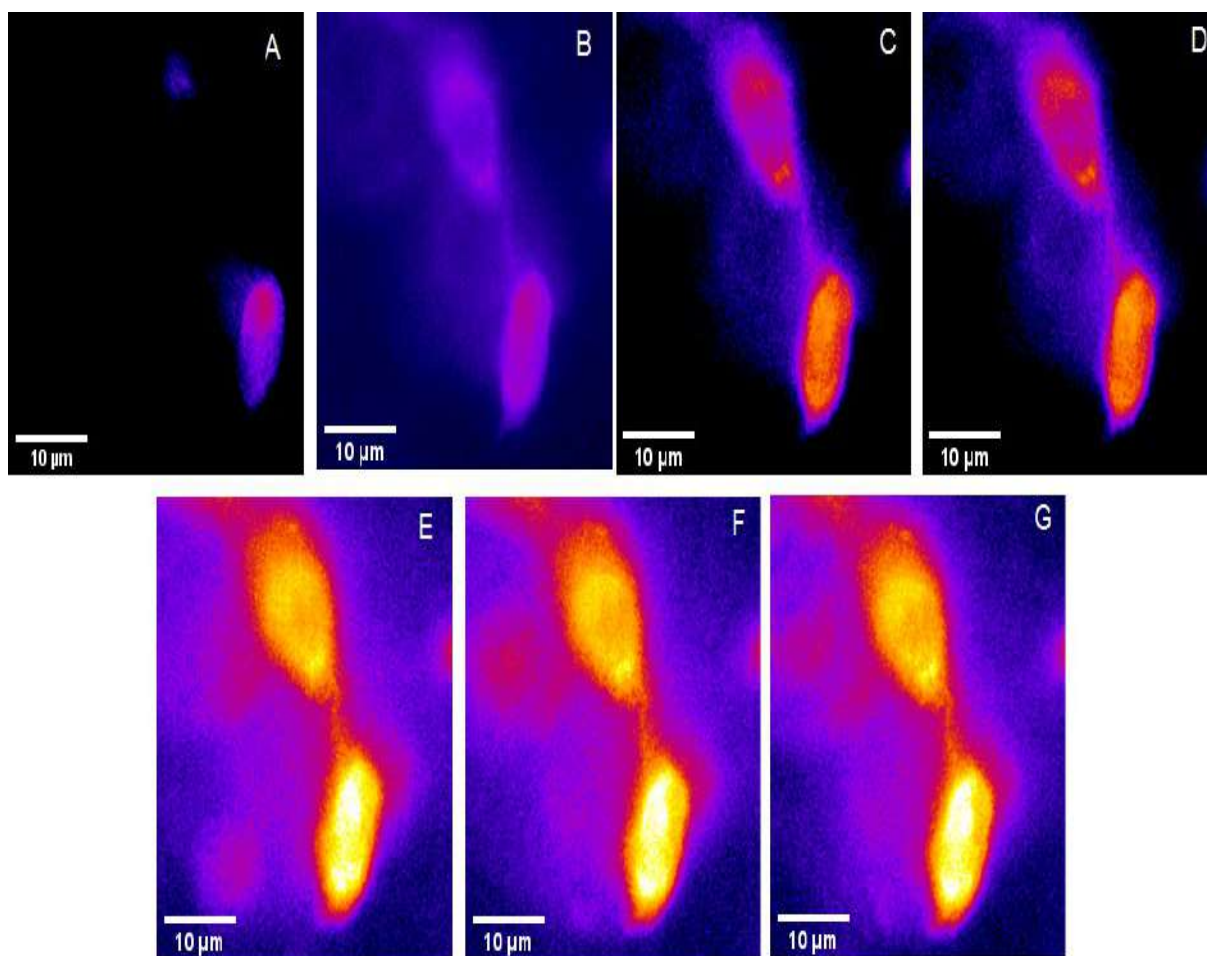


Рис. 3.29. Тіакалікс[4]арен C-800 є селективним флуоресцентним зондом на внутрішньоклітинні катіони Zn. Його флуоресценція в міоцитах залежить від часу інкубації з Zn^{2+} . Зображення флуоресцентна мікроскопії: A - контроль (ненавантажена тіакалікс[4]ареном C-800 клітина); B — клітина, навантажена тіакалікс[4]ареном C-800 протягом 1 хв; C- клітина, навантажена тіакалікс[4]ареном C-800 протягом 3 хв; E-клітина, навантажена тіакалікс[4]ареном C-800, після 1 хв інкубації з Zn^{2+} ; F- клітина, навантажена тіакалікс[4]ареном C-800, після 3 хв інкубації з Zn^{2+} ; G-клітина, навантажена тіакалікс[4]ареном C-800, після 5 хв інкубації з Zn^{2+} .

Для визначення функціональних груп тіакалікс[4]арену C-800, які визначають його флуоресцентні властивості, було досліджено вплив Zn^{2+} на

флуоресценцію аналога С-800 тіакалікс[4]арену С-799 (Рис. 3.30). Він структурно відрізняється від тіакалікс[4]арену С-800 тільки тим, що його функціональні групи на верхньому вінці не містять етильних радикалів. На відміну від тіакалікс[4]арену С-799 на верхньому вінці С-800 міститься чотири гідрокси-етоксифосфонілметильні групи. Виявилось, що флуоресценція С-799 за присутності 5 мМ Zn^{2+} також збільшується, однак вона в 2,5 рази менше у порівнянні з флуоресценцією тіакалікс[4]арену С-800 (Рис. 3.31).

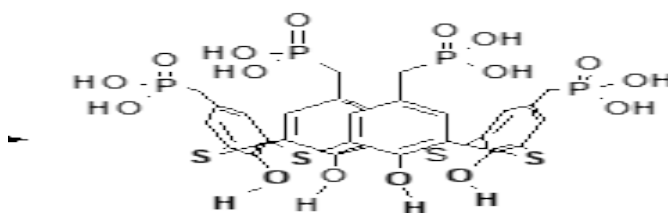


Рис. 3.30. Хімічна структура тетрагідрокситіакалікс[4]арен-тетрафосфонат (С-799).

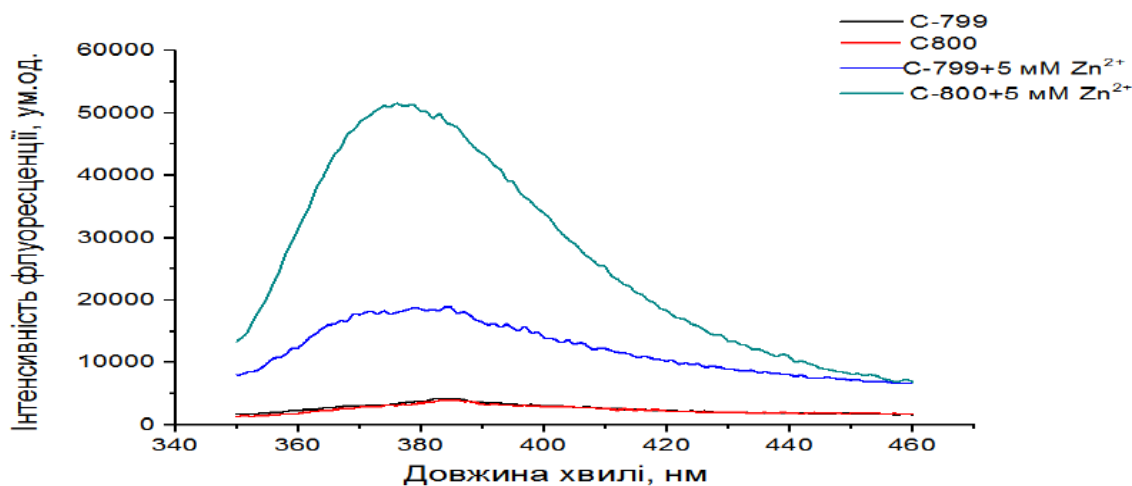


Рис. 3.31. У присутності катіонів Zn (5 мМ) тіакалікс[4]арен С-800 ($\lambda_{36} = 340$ нм) демонструє значно більшу інтенсивність флуоресценції, ніж тіакалікс[4]арен С-799 ($\lambda_{36} = 399$ нм).

3.8.3. Комп'ютерне моделювання взаємодії тіакалікс[4]аренів С-800 та

С-799 з катіонами Zn

Згідно розрахунків за програмою HyperChem молекула тіакалікс[4]арену С-800 має три основні локальні мінімуми з різницею енергій теплоутворення в межах від -5 ккал/моль до -16.1 ккал/моль - структури А, В, С, (Рис. 3.31А-С). Серед них найбільш енергетично вигідною є структура С з конформацією «1,3 альтернат» в якій дві пари дистальних бензенових кілець макроциклічного кістяка орієновані в протилежних напрямках від головної площини макроциклу утвореної чотирма атомами сірки. Така структура стабілізована чотирма внутрішньомолекулярними зв'язками $P=O \cdots H-O$ між фосфоновими групами, розташованими на протилежних сторонах макроциклічного кістяка. Дві інші структури А та В відрізняються від структури С як за енергією ($\Delta\Delta H = -5$ ккал/моль та -16.1 ккал/моль відповідно), так і за конформацією макроциклічного кістяка. Структури А та В мають конформацію «сплющений конус», в якій дві пари дистальних фенольних кілець орієнтовані «перпендикулярно» та «компланарно» головній площині макроциклу. При цьому структура А стабілізується двома внутрішньомолекулярними водневими зв'язками $P=O \cdots H-O$ між дистально розташованими фосфоновими групами. В той же час структура В стабілізується двома парами таких водневих зв'язків між проксимальними фосфоновими групами. Структури А та В розрізняються між собою величинами дієдральних та валентних кутів в макроциклічному кістяку і фрагментах Р-С-С-С. Структура В є стерично більш напруженою і менш енергетично вигідною ніж структура А ($\Delta\Delta H = -11.1$ ккал/моль). Слід зазначити, що в структурах А та В відсутня типова для тих тетрагідрокситіакалікс[4]аренів, які існують в конформації «регулярний конус», циркуляційна система чотирьох внутрішньомолекулярних водневих зв'язків між ОН групами нижнього вінця.

За даними молекулярного моделювання зв'язування катіонів Zn тіакалікс[4]ареном С-800 може відбуватися як за кооперативною участю фосфонових груп, так і за кооперативною участю двох атомів кисню та одного атому сірки нижнього вінця макроциклу. Внутрішньомолекулярні водневі зв'язки

$P=O \cdots H-O$ в структурах А, В, С переорганізують молекулу для зв'язування Zn^{2+} з утворенням комплексів D, E, F (Рис. 3.31 D-F) складу ліганд : метал:1:1, 1:2 та 1.2 відповідно. Принципово інший тип зв'язування Zn^{2+} спостерігається в структурі G, де має місце хелатування двох катіонів Zn атомами кисню та атомом ккал/моль) та «1,3-альтернат» структури F ($\Delta H = -30.8$ ккал/моль) в яких зв'язування Zn^{2+} відбувається за участю атомів кисню фосфонових груп.

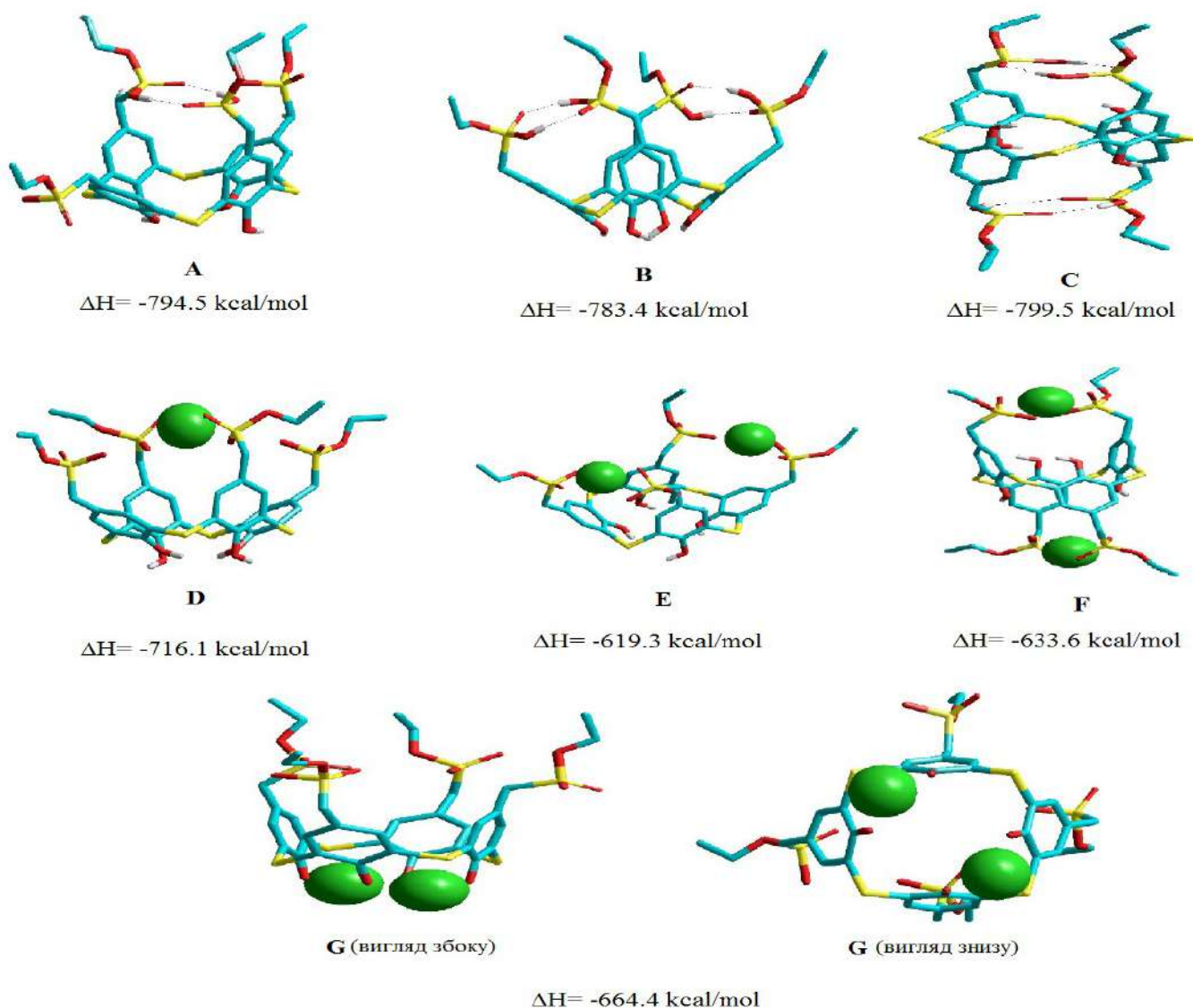
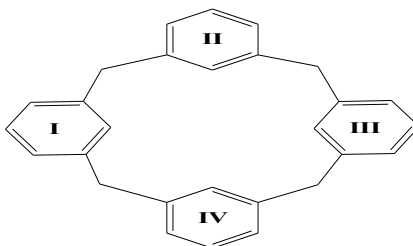


Рис. 3.32. Енергетично мінімізовані структури тіакаліксарена C-800 та його цинкових комплексів

Комплексоутворення змінює дієдральні кути в макроциклічному кістязку

тіакалікс[4]арену C-800 (Таблиця 1). Величина цих змін залежать від конформації макроциклу і механізму зв'язування. Конформація «1,3-альтернат» ліганду C є найбільш адаптована для кооперативного зв'язування катіону Zn фосфоновими групами, і зміни дієдральних кутів при комплексоутворенні є мінімальними. Значно більші зміни дієдральних кутів спостерігаються при хелатуванні Zn^{2+} дистальними та проксимальними фосфоновими групами в конусоподібних структурах A та B.

Табл. 1. Дієдральні кути ($^{\circ}$) утворені бензеновими кільцями з головною площиною макроциклу в вільних лігандах A,B,C та їх цинкових комплексах D,E,F,G.



Структура	I	II	III	IV
A	141	106	137	95
B	143	77	142	81
C	100	101	100	102
D	146	101	143	102
E	134	91	127	102
F	103	103	100	99
G	122	99	125	103

Проте найбільш суттєві зміни спостерігаються при зв'язуванні Zn^{2+} нижнім вінцем макроциклу конусоподібних лігандів A і B. Конформація «сплющений конус» лігандів A і B при комплексоутворенні трансформується в конформацію «регулярний конус» комплексу G. Слід зазначити, що в комплексі G в результаті алостеричного ефекту, індукованого зв'язуванням катіону Zn нижнім вінцем макроциклу, зникають внутрішньомолекулярні водневі зв'язки $P=O \cdots H-O$ на верхньому вінці макроциклу.

Такі зміни в просторовій структурі, обумовлені комплексоутворенням,

можуть бути причиною підвищення інтенсивності флуоресценції розчинів тікалікс[4]арену C-800 в присутності катіонів Zn. Підвищення інтенсивності флуоресценції може також індукуватись взаємодією катіону Zn з вільними електронними парами атомів кисню та сірки, які входять до хромофорної системи молекули тіакаліксарену.

РОЗДІЛ 4

ЗАКЛЮЧНИЙ РОЗДІЛ

Вивчення порушень скоротливої активності міометрія, викликаних різними факторами, на сьогодні є актуальним. Це обумовлено його особливим значенням серед інших ГМ у зв'язку зі специфічністю функцій міометрія в організмі жінки, а саме вагітністю та пологам. До речовин, здатних порушувати скоротливу функцію гладенького м'яза, належать катіони ВМ, які можуть впливати на активність скоротливих потейнів та регуляцію скорочення міометрія.

Необхідним є пошук потенційних фармакологічно активних сполук, здатних усувати негативні впливи важких металів на скоротливий апарат міометрія та спрямованих на нормалізацію порушень його контрактильної функції. Такі сполуки мають бути здатними проникати через плазматичну мембрану та ефективно зв'язувати катіони ВМ всередині клітин матки. З огляду на вищезазначене останнім часом все більше уваги приділяється каліксаренам та їхнім похідним тіакаліксаренам, які завдяки своїм властивостям можуть утворювати супрамолекулярні комплекси з біологічно важливими молекулами та іонами [52, 53]. Вони також здатні впливати на перебіг біохімічних процесів. Зокрема, деяким з каліксаренів притаманна протипухлинна активність [203, 219], бактерицидна, антивірусна [228] та модулююча дія щодо ензимів [204-206]. Отже в даний час каліксарени розглядаються як перспективні молекулярні платформи для дизайну фізіологічно активних сполук, оскільки каліксаренові матриці мають низьку токсичність та імуногенність [61-63]. Деякі каліксарени та тіакаліксарени добре розчиняються у водних розчинах, є гідрофільними та водночас здатні легко потрапляти через плазматичну мембрану в клітину [221].

У даній роботі вивчалась здатність вибраних тіакалікс[4]аренів усувати інгібувальний вплив ВМ на міозин ГМ матки та їх негативний вплив на дихальний ланцюг мітохондрій клітин міометрія, тому були поставлені наступні завдання: провести дослідження здатності тіакалікс[4]аренів С-798 та С-800 відновлювати активність АТРази міозину ГМ матки при інгібувальній дії ВМ;

дослідити вплив важких металів на дихальний ланцюг мітохондрій клітин міометрія, а також здатність тіакалікс[4]аренів модулювати їх.

Спершу була визначена ензиматична активність АТРази актоміозину за впливу катіонів Cd, Pb, Zn та Ni. Потім була вивчена здатність вибраних тіакалікс[4]аренів відновлювати АТР-гідролазну активність субфрагмента-1 міозину. Усі експерименти з встановлення впливів різних речовин на ензиматичний гідроліз АТР проводились на субфрагменті-1 міозину, оскільки він є зручною експериментальною моделлю для вивчення впливів на нативний міозин. Було встановлено, що катіони Cd, Pb, Zn та Ni інгібують АТРазну активність субфрагмента-1 міозину міометрія свині. Коефіцієнт інгібування для Pb^{2+} становив $0,08 \pm 0,01$ мМ тоді, як для Cd^{2+} він складав $0,30 \pm 0,03$ мМ. Набільш помітний інгібувальний ефект спостерігався для Pb^{2+} та Cd^{2+} за їх концентрації 300 мкМ. Він становив для катіонів Pb близько 88%, в той час як для катіонів Cd цей ефект складав біля 56%. Катіони Ni інгібували АТРазну активність субфрагмента-1 міозину при концентрації 300 мкМ лише на 30%, тоді як катіони Zn найбільше інгібували активність АТРази на 43% за їх концентрації 5 мМ. Розрахунок кінетичних параметрів показав, що $V_{max, ATR}$ ензиматичної активності міозину за присутності 5 мМ Zn^{2+} зменшується в 1,6 рази. Значення K_m для гідролізу АТР субфрагментом-1 міозину статистично не змінюється, але має тенденцію до зниження.

Іонні радіуси Mg^{2+} , Cd^{2+} і Pb^{2+} у розчині становлять 0,070; 0,102 та 0,126 нм, відповідно. Отже, катіони Cd і Pb мають значно більші розміри порівняно з Mg^{2+} , тому взаємодія між Cd^{2+} та Pb^{2+} у сайті зв'язування Mg^{2+} в субфрагменті - 1 міозину значно ускладнена. Однак, експериментально було показано їх інгібувальну дію на АТРазну активність субфрагмента-1 міозину. Враховуючи це, було зроблено припущення, що ці катіони можуть зв'язуватися у інших функціонально важливих ділянках субфрагмента-1, що сприяють зв'язуванню та гідролізу АТР. Іонні радіуси Mg^{2+} , Zn^{2+} та Ni^{2+} в розчині подібні 0,070, 0,076 і 0,069 відповідно, тому найімовірніше, що вони взаємодіють з ділянками

зв'язування характерними для Mg^{2+} .

Було встановлено, що тіакалікс[4]арен C-800 ефективно відновлював активність АТРази міозину за концентрації 100 мкМ. Найбільш імовірно, що механізм захисної дії тіакалікс[4]арену C-800 базується на його здатності хелатувати Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} та Ni^{2+} із середовища інкубації за допомогою гідроксильних груп та атомів двохвалентного сульфуру на нижньому вінці макроциклу. На підставі метода комп'ютерного докінгу було зроблено припущення, що тіакалікс[4]арен C-800 також може «відтягувати» катіони ВМ з сайтів їх зв'язування у субфрагменті-1 міозину.

Також була досліджена здатність Cd^{2+} , Pb^{2+} та Zn^{2+} впливати на дихальний ланцюг мітохондрій клітин міометрія, а саме відновлювати водорозчинні солі тетразолію до нерозчинних кристалів формагану. Було встановлено, що катіони Cd та Pb посилюють утворення формагану клітинами міометрія приблизно в 2 рази за концентрації 1,25 мМ. Реакція відновлення реагенту МТТ відбувається переважно за рахунок мітохондрійних ензимів та носіїв електронів, а саме сукцинатдегідрогенази та НАДН-дегідрогеназного комплексу, тому в даному випадку посилене утворення формагану клітинами гладенького м'язу матки може бути пов'язаним з порушенням функціонування комплексів I та II ЕТЛ мітохондрій.

При додаванні тіакалікс[4]арену C-800 інтенсивність відновлення реагенту МТТ клітинами ГМ матки під впливом Cd та Pb знижувалась та поверталась до контрольного рівня. Це може пояснюватися як зв'язуванням цих катіонів з середовища інкубації тіакалікс[4]ареном C-800, так і всередині клітин міометрія.

Для вивчення впливу катіонів Cd і Pb (1 мМ) на функціонування ЕТЛ мітохондрій було досліджено їх вплив на рівень автофлуоресценції нікотинамідних та флавінових коферементів ізольованих мітохондрій ГМ матки. За умов інкубації ізольованих мітохондрій протягом 5 хв з катіонами Cd, Pb та Zn (1 мМ) автофлуоресценція НАДН підвищувалась в 2, 1,5 рази та 50% відповідно.

Вона майже не змінювалась за дії Ca^{2+} та Mg^{2+} (1 мМ).

При дослідженні автофлуоресценції ФАД⁺ в ізольованих мітохондріях міометрія щура було показано, що вона зростала приблизно в 2 рази після їх інкубації протягом 5 хв з Cd^{2+} (1 мМ), але вона майже не змінювалась під впливом Pb^{2+} . Автофлуоресценція ФАД⁺ в ізольованих мітохондріях також не змінювалась за дії Mg^{2+} , Ca^{2+} та Zn^{2+} (1 мМ). Можна зробити припущення, що Cd^{2+} призводять до посилення функціонування сукцинатдегідрогенази (комплекс II) в ЕТЛ, викликаючи підвищення рівня ФАД⁺ в ізольованих мітохондріях міометрія.

Досліджувалась також здатність катіонів Cd, Pb та Zn впливати на інтенсивність утворення АФК клітинами міометрія. Було встановлено, що під впливом Cd^{2+} та Pb^{2+} (1 мМ) відбувалось посилення утворення АФК на 50% після 5 хв інкубації. В той час, як Zn^{2+} (1 мМ) сприяли посиленню генерування АФК клітинами міометрія на 20% після 5 хв інкубації. При переносі електронів через ЕТЛ від 0,4 до 4% спожитого мітохондріями кисню не повністю відновлюється, що призводить до утворення АФК [15]. Зміни функціонування ЕТЛ можуть сприяти посиленню продукування АФК під впливом катіонів Cd, Pb та Zn в клітинах, яке може призвести до появи окислювального стресу. Він пов'язаний з перекисним окисненням ліпідів, білків та пошкодженням ДНК [18, 19], які ініціюють розвиток багатьох захворювань [16, 17]. Показано, що катіони Pb сприяють утворенню АФК комплексом I [302] в ЕТЛ у мітохондріях синапсів та комплексом II у клітинах печінки [307]. Деякими дослідженнями встановлено, що катіони Cd сприяють утворенню АФК комплексами II та III. У клітинах карциноми печінки щура AS-30D виявлено, що катіони Cd порушують функціонування комплексу II, особливо сайту окиснення хінолу, що сприяє утворенню АФК [299, 300]. Основна роль в продукуванні АФК сукцинатдегідрогеназою належить ділянці зв'язування флавіну за інгібування процесу відновлення убіхінону [300]. Комплекс III також робить значний внесок у генерування АФК під впливом Cd^{2+} [299].

Крім того відомо, що катіони Cd та Pb знижують антиоксидантний захист клітин, зокрема можуть призводити до зниження пулу глутатіону [188] та інгібувати активність антиоксидантних ензимів [194, 195, 303, 304].

Додавання тіакалікс[4]арену C-800 (100 мкМ) в середовище інкубації клітин міометрія з катіонами Cd (1 мМ) не приводило до зниження продукування АФК міоцитами.

При вивченні властивостей тіакалікс[4]аренів C-798 та C-800 було виявлено, що обидві сполуки мають флуоресцентні властивості, максимальне значення флуоресценція тіакалікс[4]арену C-800 мав при довжині хвилі 380 нм при збудженні хвилею 340 нм. В той час, як для тіакалікс[4]арену C-798 максимум емісії складав 458 нм при хвилі збудження 399 нм.

При дослідженні впливу катіонів ВМ показано, що при додаванні Zn^{2+} інтенсивність флуоресценції C-800 значно підвищувалася. Була також показана залежність величини флуоресценції тіакалікс[4]арену C-800 від концентрації Zn^{2+} за сталої концентрації C-800 в 100 мкМ у середовищі. Вплив концентрації катіонів Zn на флуоресценцію тіакалікс[4]арену C-800 вивчався в діапазоні 0,1 – 5 мМ. Найвищої інтенсивності флуоресценція C-800 досягала за присутності 5 мМ Zn^{2+} , а саме у 100 разів .

При дослідженні залежності величини флуоресценції тіакалікс[4]арену C-800 від концентрації самого тіакалікс[4]арену від 5 до 100 мкМ за сталої концентрації Zn^{2+} (5 мМ) встановлено концентраційно-залежне збільшення величини флуоресценції C-800 з максимальним значенням її при 100 мкМ.

Встановлено, що флуоресценція тіакалікс[4]арену C-800 є вибірковою щодо Zn^{2+} . Вона практично не змінювалась за присутності катіонів інших металів, таких як Mg^{2+} , Ca^{2+} , Pb^{2+} та Cd^{2+} .

З використанням флуоресцентної мікроскопії було виявлено посилення інтенсивності флуоресценції міоцитів матки щура на близько 40% при додаванні тіакалікс[4]арену C-800 до середовища інкубації, що може бути свідченням швидкого проникнення тіакалікс[4]арену C-800 всередину клітин. При додаванні

Zn^{2+} до клітин міометрія, навантажених тіакалікс[4]ареном C-800, спостерігали збільшення інтенсивності флуоресценції на приблизно 70% порівняно з контролем в якості, якого використовували клітини, ненавантажені тіакалікс[4]ареном C-800. Інтенсивність флуоресценції клітин, навантажених тіакалікс[4]ареном C-800, зростала в залежності від часу їх інкубації з Zn^{2+} .

Отримані результати можуть свідчити про ймовірність використання тіакалікс[4]арену C-800 в якості селективного та чутливого флуоресцентного зонда для Zn^{2+} в живих клітинах.

Для визначення функціональних груп тіакалікс[4]арену C-800, що відповідають за його флуоресцентні властивості, було досліджено вплив Zn^{2+} на флуоресценцію аналога C-800 тіакалікс[4]арену C-799. Він структурно відрізняється від тіакалікс[4]арену C-800 тим, що функціональна група його верхнього вінця не містить етильного радикалу, наявного у тіакалікс[4]арену C-800, на верхньому вінці якого міститься чотири гідрокси-етоксифосфонілметильні групи. Виявилось, що флуоресценція тіакалікс[4]арену C-799 за присутності 5 мМ Zn^{2+} також збільшується, однак вона в 2,5 рази менша у порівнянні з флуоресценцією тіакалікс[4]арену C-800.

Для з'ясування причин впливу Zn^{2+} на флуоресцентні властивості тіакалікс[4]арену C-800 було проведено комп'ютерне моделювання їх взаємодії. За допомогою молекулярного докінгу було показано, що два катіони Zn займають найбільш енергетично вигідне положення при взаємодії з атомами кисню гідрокси-етоксифосфонілметильних груп верхнього вінця C-800, причому кожен з двох катіонів Zn взаємодіє з двома гідрокси-етоксифосфонілметильними групами. Чотири етильні залишки, які присутні на верхньому вінці тіакалікс[4]арену C-800, можуть відігравати важливу роль у стабілізації та врівноваженні конформації комплексу C-800 з катіонами Zn .

ВИСНОВКИ

Значна кількість патологій у жінок репродуктивного віку викликана порушенням скоротливої функції матки. Це обумовлено, зокрема, потраплянням в організм важких металів з довкілля та їх негативним впливом на АТР-гідролазну активність скоротливих протеїнів і енергетичні процеси в міоцитах. У дисертаційній роботі, виконаній на міометрії, були досліджені захисні властивості тіакалікс[4]аренів С-798 та С-800 при шкідливих впливах катіонів важких металів - Cd, Pb, Zn та Ni на АТР-гідролазну активність субфрагмента-1 міозину та функціонування дихального ланцюга мітохондрій.

1. Виявлено інгібувальний вплив Cd^{2+} , Pb^{2+} та Ni^{2+} на АТР-гідролазну активність субфрагмента-1 міозину. Вона відновлювалась до контрольного рівня при додаванні в середовище інкубації тіакалікс[4]арену С-800.

2. Встановлено, що інгібування АТРази субфрагмента-1 міозину міометрія Zn^{2+} є неконкурентним відносно АТР. В основі інгібувальної дії цього катіону лежить зменшення числа обертів АТРази. Тіакалікс[4]арени С-798 та С-800 можуть відновлювати до контрольного рівня АТР-гідролазну активність субфрагменту-1 міозину за присутності Zn^{2+} .

3. За допомогою методу комп'юторного моделювання встановлені можливі ділянки зв'язування катіонів Cd, Pb та Zn з амінокислотними залишками в субфрагменті-1 міозину поблизу активного центру. Зроблено припущення, що тіакалікс[4]арен С-800 здатен послаблювати взаємодію між катіонами Cd/Pb/Zn та амінокислотними залишками у субфрагменті-1 міозину.

4. Показано, що рівень автофлуоресценції НАДН зростає в ізольованих мітохондріях за їхньої інкубації з Cd^{2+} , Pb^{2+} та Zn^{2+} . Водночас, вплив інших катіонів двовалентних металів — Mg^{2+} та Ca^{2+} на автофлуоресценцію НАДН був відсутній. Продемонстровано також підвищення рівня автофлуоресценції ФАД в

ізолюваних мітохондріях за їхньої інкубації з Cd^{2+} . Фізіологічно значущі катіони двовалентних металів - Mg^{2+} , Ca^{2+} та Zn^{2+} на автофлуоресценцію ФАД в ізолюваних мітохондріях не впливали.

5. Встановлено, що під впливом Cd^{2+} та Pb^{2+} порушувалось функціонування дихального ланцюга мітохондрій. Тіакалікс[4]арен С-800 (100 мкМ) нівелював зміни активності дихального ланцюга мітохондрій, викликані катіонами Рb та Cd. При цьому сам тіакалікс[4]арен С-800 (100-300 мкМ) суттєво не впливав на функціонування дихального ланцюга мітохондрій.

6. Флуоресценція тіакалікс[4]арену С-800 є селективною для Zn^{2+} . Встановлено, що зазначену сполуку можна розглядати як чутливий та селективний флуоресцентний зонд до внутрішньоклітинних катіонів Zn. Показано також, що катіони Zn можуть зв'язуватись за кооперативною участю етокси-фосфонілметильних груп і за кооперативною участю атомів кисню та атомів сірки нижнього вінця макроциклу, досліджуваного тіакалікс[4]арену.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Shynlova O, Nadeem L, Zhang J, Dunk C, Lye S. Myometrial activation: Novel concepts underlying labor. *Placenta*. 2020; 92:28-36.
2. Ilicic M, Zakar T, Paul JW. The Regulation of Uterine Function During Parturition: an Update and Recent Advances. *Reprod Sci*. 2020;27(1):3-28.
3. Guerra DD, Hurt KJ. Gasotransmitters in pregnancy: from conception to uterine involution. *Biol Reprod*. 2019;101(1):4-25.
4. Glover AV, Manuck TA. Screening for spontaneous preterm birth and resultant therapies to reduce neonatal morbidity and mortality: A review. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2018 Apr;23(2):126-132.
5. O'Reilly H, Ni Y, Johnson S, Wolke D, Marlow N. Extremely preterm birth and autistic traits in young adulthood: the EPICure study. *Mol Autism*. 2021 May 6;12(1):30.
6. Mangham LJ, Petrou S, Doyle LW Cheah IGS. Economic assessment of neonatal intensive care. *Transl Pediatr*. 2019; 8(3): 246-256.
7. Khataee HR, Khataee AR. Applications of molecular motors in intelligent nanosystems. *Digest J. Nanomaterials and Biostructures*. 2009; 4(4):613 - 621
8. Coluccio L. Myosins. A superfamily of molecular motors. Springer; Berlin:2008.
9. Risal D, Gourinath S, Himmel DM. Myosin subfragment 1 structures reveal a partially bound nucleotide and a complex salt bridge that helps couple nucleotide and actin binding. *PNAS*. 2004; 101(24):8930–8935.5.
10. Bhatti JS, Bhatti GK, Reddy PH. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders - A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2017;1863(5):1066-1077.
11. Spinelli JB, Haigis MC. The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nat Cell Biol*. 2018;20(7):745-754.
12. Wong HS, Dighe PA, Mezera V, Monternier PA, Brand MD. Production of

superoxide and hydrogen peroxide from specific mitochondrial sites under different bioenergetic conditions. *J Biol Chem.* 2017;292(41):16804-16809.

13. Cadenas S. Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2018;1859(9):940-950

14. Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, Aksentijevic D, Sundier SY, Robb E. L. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature* 2014; 515: 431–435.

15. Scialo F, Mallikarjun V, Stefanatos R, Sanz A . Regulation of lifespan by the mitochondrial electron transport chain: reactive oxygen species dependent and reactive oxygen species-independent mechanisms. *Antioxid.Redox Signal.*2013; 19: 1953–1969.

16. Ten VS, Ratner V. Mitochondrial bioenergetics and pulmonary dysfunction: Current progress and future directions. *Paediatr Respir Rev.* 2020 Apr;34:37-45.

17. Cheng J, Nanayakkara G, Shao Y, Cueto R, Wang L. Mitochondrial proton leak plays a critical role in pathogenesis of cardiovascular Diseases. *Adv Exp Med Biol.* 2017;982:359-370.

18. Измеров НФ, Кириллов ВФ. Гигиена труда.-ГЕОТАРМедиа; М.: 2008.

19. Lippmann M. Environmental toxicants: human exposures and their Health effects. 4th Edition. Wiley, Hoboken, NJ, USA, 2009.

20. Rafati Rahimzadeh M, Rafati Rahimzadeh M, Kazemi S, Moghadamnia AA. Cadmium toxicity and treatment: An update. *Caspian J Intern Med.* 2017 ; 8(3):135-145.

21. Järup L. Hazards of heavy metal contamination. *Br Med Bull.* 2003; 68:167-182.

22. Трахтенберг ІМ, Дмитруха НМ, Луговський СП. Свинець — небезпечний полютант. Проблема стара і нова. Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки. 2015;3 (3):14-24.

23. Повякель ЛІ , Сноз СВ, Смердова ЛМ. Важкі метали як фактор ризику

для здоров'я людини та довільля при поводженні з відходами електричного та електронного обладнання. Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки. 2015;1-2:41-49.

24. Rafati Rahimzadeh M, Rafati Rahimzadeh M, Kazemi S, Moghadamnia AA. Cadmium toxicity and treatment: An update. *Caspian J Intern Med.* 2017 ; 8(3):135-145.

25. Кондратюк ВА. Загальна гігієна з основами екології. Укрмедкнига; Т.:2003.

26. Wagner TP. Shared responsibility for managing electronic waste: a case study of Maine. *Waste Manag.* 2009;29(12):3014-3021.

27. Шумило ОМ. Вирішення проблеми електронних відходів: Європейські підходи до української проблеми. ФОП "Клименко"; К.:2013.

28. Lee S, Min JY, Min KB. Female infertility associated with blood lead and cadmium levels. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(5):1794.

29. Butts CD, Bloom MS, McGough A, Lenhart N, Wong R. Variability of essential and non-essential trace elements in the follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization (IVF). *Ecotoxicol Environ Saf.* 2021;209:111733.

30. Golleberg AL , Hediger ML. Association between lead and cadmium and reproductive hormones in peripubertal U.S. Girls. *Environ Health Perspect .* 2010; 118(12): 1782-1787.

31. Nagata C, Nagao Y. Urinary cadmium and serum levels of estrogens and androgens in postmenopausal Japanese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005; 14(3): 705-708.

32. Wei Y, Zhu J. Blood levels of endocrine-disrupting metals and prevalent breast cancer among US women. *Med Oncol.* 2019;37(1):1.

33. Brito-Marcelino A, Duarte-Tavares RJ, Marcelino KB, Silva-Neto JA. Breast cancer and occupational exposures: an integrative review of the literature. *Rev Bras Med Trab.* 2021;18(4):488-496.

34. Tulić L, Vidaković S, Tulić I, Ćurčić M, Bulat Z. Toxic metal and trace

element concentrations in blood and outcome of in vitro fertilization in women. *Biol Trace Elem Res.* 2019;188(2):284-294.

35. Tanrikut E, Karaer A. Role of endometrial concentrations of heavy metals (cadmium, lead, mercury and arsenic) in the aetiology of unexplained infertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2014; 179: 187-190.

36. Колосова ИИ. Влияние ацетата свинца, солей тяжелых металлов на репродуктивную функцию. *Вестник проблем биологии и медицины.* 2013; 2(3): 13-18.

37. Borja-Aburto V, Hertz-Picciotto I, Rojas Lopez M, Farias P, Camilo Rios, Blanco J. Blood lead levels measured prospectively and risk of spontaneous abortion. *Am J Epidemiol.* 1999; 150(6): 590–597.

38. Aquino NB. Role of Cadmium and nickel in estrogen receptor signaling and breast cancer: metalloestrogens or not? *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2012; 30(3): 189–224.

39. Hertz-Picciotto I. The evidence that lead increases the risk for spontaneous abortion. *Am J Ind Med.* 2000; 38: 300–309.

40. Jacobo-Estrada T, Santoyo-Sanchez M. Cadmium handling, toxicity and molecular targets involved during pregnancy: lessons from experimental models. *Int J Mol Sci.* 2017 Jul 22;18(7):1590.

41. Cherkani-Hassani A, Ghanname I, Mouane N. Assessment of cadmium levels in human breast milk and the affecting factors: A systematic review, 1971-2014. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2017;57(11):2377-2391.

42. Labyntseva RD, UlyanenkoTV. Effect of heavy metal ions on superprecipitation and ATPase activity of uterine smooth muscle actomyosin activity. *Ukr Biokhim Zn.* 1998; 70(2): 71-77.

43. Peyser YM, Ben-Hur M, Werber MM, Muhlrud A. Effect of divalent cations on the formation and stability of myosin subfragment 1-ADP-phosphate analog complexes. *Biochemistry.* 1996;35(14): 4409-16.

44. Peyser YM, Ajtai K, Weber MM. Effect of Metal Cations on the

Conformation of Myosin Subfragment-1-ADP-Phosphate Analog Complexes: A Near-UV Circular Dichroism Study. *Biochemistry*. 1997;36(17):5170–5178.7.

45. Naveed M, Hejazi V, Abbas M, Kamboh AA. Dysfunction of cortical synapse-specific mitochondria in developing rats exposed to lead and its amelioration by ascorbate supplementation. *Biomed Pharmacother*. 2018; 97:67-74.

46. Meyer JN. Mitochondria as a target of environmental toxicants. *Toxicol Sci*. 2013. 134(1):1-17.

47. Liu J, Qu W, Kadiiska MB. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009; 238(3): 209–214.

48. Kumar A, Pandey R, Siddiqi NJ. Oxidative stress biomarkers of cadmium toxicity in mammalian systems and their distinct ameliorative strategy. *J Appl Biotechnol Bioeng*. 2019;6(3):126–135.

49. Hart BA, Lee CH, Shukla GS, Osier A, Eneman JD, Chiu JF. Characterization of cadmium-induced apoptosis in rat lung epithelial cells: evidence for the participation of oxidant stress. *Toxicology*. 1999; 133:43–58.

50. Patra RC, Rautray AK, Swarup D. Oxidative stress in lead and cadmium toxicity and its amelioration. *Veterinary Medicine International*. 2011; 2011:1-9.

51. Лабинцева РД, Бевза ОВ, Бевза АА. Захисний вплив тіакалікс[4]арен-тетрасульфонату на інгібування АТР-гідролазної активності субфрагмента-1 міозину міометрія катіонами важких металів. *Укр Біохім Журн*. 2014; 86(6):154-166.

52. Gutsche C. D. Calixarenes. *Acc . Chem. Res.* 1983; 16:61-170.

53. Mokhtari B. Applications of nano-baskets of calixarenes in chromatography. *Chromatography*. 2011; 73: 829–847.

54. Phan G, Semili N, Bouvier-Capely C, Landon G, Mekhloufi G, Huang N, Rebièr F, Agarande M. Calixarene cleansing formulation for uranium skin contamination. *Health Physics*. 2013; 105(4): 382-389.

55. Iki N, Morohashi N, Narumi F, Miyano S. High complexation ability of thiacalixarene with transition metal ions. The effect of replacing methylene bridges of

tetra(p-t-butyl)calyx[4]arenetetrol by epithio groups. Bull Chem So Jpn. 1998; 71:1597–1603.

56. Tang WP, Su MY. Calixarene-based fluorescent chemosensors for metal ions via clicking. Applied Mechanics and Materials. 2014;687-691:4223

57. Darjee SM. A new colorimetric and fluorescent chemosensor based on thiacalix[4]arene for fluoride ions. Tetrahedron Letters. 2014; 55(51):7094-7098.

58. Chen CF, Chen QY. A Highly Selective Fluorescent Chemosensor for H_2PO_4^- Based on a Calix[4]arene Tetraamide Derivative. European Journal of Organic Chemistry. 2005;12:2468 – 2472.

59. Miao F, Zhan Z, Zou Z. A new Hg^{2+} fluorescent sensors based on 1,3-alternate thiacalix[4]arene (L) and the complex of $[\text{L}+\text{Hg}^{2+}]$ as turn-on sensor for cysteine. Tetrahedron. 2012; 68 (10):2409-2413.

60. Zheng XY, Zhang WJ, Mu L, Zeng X. A novel rhodamine-based thiacalix[4]arene fluorescent sensor for Fe^{3+} and Cr^{3+} . [Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry](#). 2010; 68: 139–146.

61. Da Silva E. Haemolytic properties of some water-soluble-sulphonato-calix-[n]-arenes. Int J Pharm. 2004; 273(2): 57-62.

62. Mokhtari B. Applications of nano-baskets of calixarenes in chromatography. Chromatography. 2011; 73: 829–847.

63. Grote Garsey MH. Conjugation, immunoreactivity, and immunogenicity of calix[4]arenes; model study to potential calix[4]arene-based Ac^{3+} chelators . Bioconjug Chem. 1999; 10(4): 613-623.

64. Кашенко СА, Бобрышева ИВ. Гистология, цитология, эмбриология. Часть 1; Ноулидж. Л.: 2012.

65. Афанасьев ЮИ, Юрина НА. Гистология, эмбриология, цитология. ГОЭТАР-Медиа; М.:2019.

66. Squire J. Special Issue: The Actin-Myosin Interaction in Muscle: Background and Overview. Int J Mol Sci. 2019, 20(22), 5715.

67. Rüegg C, Veigel C. Molecular Motors: force and movement generated by

single myosin II molecules. *News Physiol Sci*. 2002; 17: 213-218.

68. Aguilar HN. Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility. *Hum Reprod Update*. 2010; 16(6):725-744.

69. Krendel M., Mooseker M.S. Myosins: Tails (and Heads) of Functional Diversity. *Physiology*. 2005; 10(3): 239–251.

70. Ryan JM, Nebenführ A. Update on Myosin Motors: Molecular Mechanisms and Physiological Functions. *Plant Physiol*. 2018; 176(1): 119–127.

71. Sweeney HL, Holzbaur ELF. Motor Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018;10(5):a021931

72. Sweeney HL, Houdusse A, Robert-Paganin J. Myosin Structures. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1239:7-19.

73. Holmes KC, Geeves MA. The structural basis of muscle contraction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2000; 355(1396): 419-431.

74. Mornet D, Bertrand R, Pantel P. Structure of the actin-myosin interface. *Nature*. 1981; 292(5821): 301-306.

75. Rayment I, Rypniewski WR, Schmidt-Bäse K. Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science*. 1993; 261(5117): 50-58.

76. Burgess S.A. Structures of smooth muscle myosin and heavy meromyosin in the folded, shutdown state. *J Mol Biol*. 2007;372(5):1165-1178.

77. Highsmith S. Lever arm model of force generation by actin-myosin-ATP. *Biochemistry*. 1999; 38(31): 9791-9797.

78. Burgess SA. Structures of smooth muscle myosin and heavy meromyosin in the folded, shutdown state. *J Mol Biol*. 2007; 372(5): 1165-1178.

79. Dominguez R. Crystal structure of a vertebrate smooth muscle myosin motor domain and its complex with the essential light chain: visualization of the pre-power stroke state. *Cell*. 1998; 94(5):559-71.

80. Kelly CA, Adelstein RS. Characterization of isoform diversity in smooth muscle myosin heavy chains. *Can J Physiol Pharmacol*. 1994; 11(72):1351-1360.

81. Leguillet R., Gil F. Insert smooth muscle myosin heavy chain (SM-B)

isoform expression in human tissues. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005; 289(7):1277–1285.

82. White SL, Zhou MY. Myosin heavy chain isoform expression in rat smooth muscle development. *Am J Physiol* -1998; 275(8):581-589.

83. Eddinger TJ, Meer DP. Myosin II isoforms in smooth muscle: heterogeneity and function. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007; 293(2): 493-508.

84. Arens YH, Rosenfeld CR, Kamm KE. Maturation differences between vascular and bladder smooth muscle during ovine development. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000; 278(5): 1305-13.

85. Capriani A, Chiavegato A, Franch R. Oestrogen-dependent expression of the SM2 smooth muscle-type myosin isoform in rabbit myometrium. *J Muscle Res Cell Motil*. 1997; 18(4): 413-27.

86. Huxley AF. Muscle structure and theories of contraction. *Prog Biophys Biophys Chem*. 1957;7(4):255–318.

87. Holmes KC. Muscle proteins--their actions and interactions. *Curr Opin Struct Biol*. 1996;6(6):781-789.

88. Ampe C, Van Troys M. Mammalian actins: isoform-specific functions and diseases. *Handb Exp Pharmacol*. 2017;235:1-37.

89. Kashina AS. Regulation of actin isoforms in cellular and developmental processes. *Semin Cell Dev Biol*. 2020;102:113-121.

90. Miwa T, Manabe Y. Structure, chromosome location, and expression of the human smooth muscle enteric type γ -actin gene: evolution of six human actin gene. *Mol and Cell Biol*. 1991; 11(6):3296-3306.

91. Anggorowati N, Ratna Kurniasari Ch, Damayanti K, Cahyanti T, Widodo I, Ghozali A, Romi MM, Sari DC, Arfian N. Histochemical and immunohistochemical study of α -SMA, collagen, and PCNA in epithelial ovarian neoplasm. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2017;18(3):667-671.

92. Kim S, You D, Jeong Y, Yu J, Kim SW, Nam SJ, Lee JE. TP53 upregulates α -smooth muscle actin expression in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Oncol*

Rep. 2019;41(2):1075-1082.

93. Guhathakurta P, Prochniewicz E, Thomas DD. Actin-Myosin Interaction: Structure, Function and Drug Discovery. *Int J Mol Sci.* 2018;19(9):2628

94. Rottner K, Faix J, Bogdan S. Actin assembly mechanisms at a glance. *J Cell Sci.* 2017; 130(20):3427-3435.

95. Courtemanche N. Mechanisms of formin-mediated actin assembly and dynamics. *Biophys Rev.* 2018; 10(6):1553-1569.

96. Grega-Larson NE, Crawley SW, Tyska MJ. Impact of cordon-bleu expression on actin cytoskeleton architecture and dynamics. *Cytoskeleton.* 2016;73(11):670-679.

97. Pearson RB, Jakes R, John M, Kendrick-Jones J. Phosphorylation site sequence of smooth muscle myosin light chain (Mr= 20000). *FEBS Lett.* 1984; 168: 108–112.

98. Zhi G, Herring PB, Stull JT. Structural requirements for phosphorylation of myosin regulatory light chain from smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 1994; 269:24723– 24727.

99. Walsh MP. Vascular smooth muscle myosin light chain diphosphorylation: mechanism, function, and pathological implications. *IUBMB Life.* 2011; 63(11): 987–1000.

100. Agu El-Yazbi AF, Abd-Elrahman KS. ROK and Arteriolar Myogenic Tone Generation: Molecular Evidence in Health and Disease. *Front Pharmacol.* 2017;8:87.

101. Niiro N, Ikebe M. Zipper-interacting protein kinase induces Ca²⁺-free smooth muscle contraction via myosin light chain phosphorylation. *J BiolChem.* 2001; 276: 29567–29574.

102. Wilson DP, Sutherland C, Borman MA, Deng JT. Integrin-linked kinase is responsible for Ca²⁺-independent myosin diphosphorylation and contraction of vascular smooth muscle. *Biochem J.* 2005; 392(3):641-648. 108.

103. He WQ, Qiao YN, Zhang CH, Peng YJ, Chen C, Wang P. Role of myosin

light chain kinase in regulation of basal blood pressure and maintenance of salt-induced hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011; 301(2):584-91.

104. Gil FR, Zitouni NB, Azoulay E, Maghni K. Smooth muscle myosin isoform expression and LC20 phosphorylation in innate rat airway hyperresponsiveness. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;291: L932–L940.

105. Sakai H, Suto W, Kai Y, Chiba Y. Mechanisms underlying the pathogenesis of hyper-contraction of bronchial smooth muscle in allergic asthma. *J Smooth Muscle Res*. 2017;53(0):37-47.

106. Anjum I. Calcium sensitization mechanisms in detrusor smooth muscles. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2018;29(3):227-235.

107. Peters SL, Schmidt M, Michel MC. Rho kinase: a target for treating urinary bladder dysfunction? *Trends Pharmacol Sci*. 2006;27:492–497.

108. Hisaoka T, Yano M, Ohkusa T, Suetsugu M, Ono K, Kohno M. Enhancement of Rho/Rho-kinase system in regulation of Vascular Smooth muscle contraction in tachycardia-induced heart failure. *Cardiovasc Res*. 2001 Feb 1;49(2):319-29.

109. Li W, Sasse KC, Bayguinov Y, Ward SM, Perrino BA. Contractile protein expression and phosphorylation and contractility of gastric smooth muscles from obese patients and patients with obesity and diabetes. *J Diabetes Res*. 2018;2018:8743874.

110. Su X, Changelkar A, Chacko S, Moreland RS. Diabetes decreases rabbit bladder smooth muscle contraction while increasing levels of myosin light chain phosphorylation. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004; 287(4):690-699.

111. Malik M, Roh M, England SK. Uterine contractions in rodent models and humans. *Acta Physiol (Oxf)*. 2021;231(4):e13607.

112. Hudson CA, Heesom KJ, López Bernal A. Phasic contractions of isolated human myometrium are associated with Rho-kinase (ROCK)-dependent phosphorylation of myosin phosphatase-targeting subunit (MYPT1). *Mol Hum Reprod*. 2012 ;18(5):265-79.

113. MacDonald JA, Walsh MP. Regulation of smooth muscle myosin light

chain phosphatase by multisite phosphorylation of the myosin targeting subunit, MYPT1. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2018;18(1):4-13.

114. Shimokawa H, Sunamura S, Satoh K. RhoA/Rho-Kinase in the cardiovascular system. *Circ Res*. 2016;118(2):352-66.

115. Berridge MJ. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. *JPhysiol*. 2008; 586.21: 5047–5061.

116. Терентьев АА. Биохимия мышечной ткани. М.: ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России. 2019.

117. Wray S, Prendergast C. The Myometrium: From Excitation to Contractions and Labour. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1124:233-263.

118. Lajat S, Harbon S, Tanfin Z. Carbachol-induced desensitization of PLC-beta pathway in rat myometrium: downregulation of Gqalpha/G11alpha. *Am J Physiol*. 1998; 275(3):636–645.

119. Ball A, Wang JW, Wong S, Zielnik B, Mitchell J, Wang N. Phorbol ester treatment of human myometrial cells suppresses expression of oxytocin receptor through a mechanism that does not involve activator protein-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006; 5:922–928.

120. Devost D, Carrier ME, Zingg HH. Oxytocin-induced activation of eukaryotic elongation factor 2 in myometrial cells is mediated by protein kinase C. *Endocrinology*. 2008; 1:131–138.

121. Rahman Z, Singh VP. The relative impact of toxic heavy metals (THMs) (arsenic (As), cadmium (Cd), chromium (Cr)(VI), mercury (Hg), and lead (Pb)) on the total environment: an overview. *Environ Monit Assess*. 2019;191(7):419.

122. Kjellstrom T; Nordberg GF. A kinetic model of cadmium metabolism in the human being. *Environ. Res*. 1978, 16: 248–269.

123. Genchi G, Sinicropi MS, Lauria G, Carocci A, Catalano A. The effects of cadmium toxicity. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 May 26;17(11):3782.

124. Satarug S, Baker JR, Urbenjapol S. A Global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. *Toxicol Lett*.

2003;137(1-2):65-83.

125. Kahn LG, Trasande L. Environmental toxicant exposure and hypertensive disorders of pregnancy: recent findings. *Curr Hypertens Rep.* 2018 Aug 8;20(10):87.

126. Hagedoorn IJM, Gant CM, Huizen SV. Lifestyle-Related Exposure to cadmium and lead is associated with diabetic kidney disease. *J Clin Med.* 2020;9(8):2432.

127. Mezynska M, Brzóska MM. Environmental exposure to cadmium-a risk for health of the general population in industrialized countries and preventive strategies. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2018; 25 (4):3211-3232.

128. Assi MA, Hezmee MN, Haron AW, Sabri MY, Rajion MA. The detrimental effects of lead on human and animal health. *Vet World.* 2016 ;9(6):660-671.

129. Kumar A. Lead Toxicity: Health hazards, influence on food chain, and sustainable remediation approaches. *Int J Environ Res Public Health.* 2020 Apr; 17(7): 2179.

130. Charkiewicz AE, Backstrand JR. Lead toxicity and pollution in Poland. *Int J Environ Res Public Health.* 2020 ;17(12):4385.

131. de Souza ID, de Andrade AS, Dalmolin RJ. . Lead-interacting proteins and their implication in lead poisoning. *Crit Rev Toxicol.* 2018 May;48(5):375-386.

132. Pruss-Ustun A, Wolf J, Corvalan C. Diseases due to unhealthy environments: an updated estimate of the global burden of disease attributable to environmental determinants of health. *J Public Health.* 2017; 39(3):464-475.

133. Arakawa Y. Trace Elements maintaining the vital functions. *Nihon Rinsho.* 2016; 74(7): 1058-65.

134. Mirnamniha M, Faroughi F, Tahmasbpour E. An overview on role of some trace elements in human reproductive health, sperm function and fertilization Process. *Rev Environ Health.* 2019; 34(4):339-348.

135. Rahimzadeh MR, Rahimzadeh MR. Zinc poisoning - symptoms, causes, treatments. *Mini Rev Med Chem.* 2020;20(15):1489-1498.

136. Baltaci AK, Mogulkoc R, Baltaci SB. Review: The role of zinc in the endocrine system. *Pak J Pharm Sci.* 2019;32(1):231-239.
137. Fallah A, Mohammad-Hasani A, Colagar AH. Zinc is an Essential Element for Male Fertility: A Review of Zn Roles in Men's Health, Germination, Sperm Quality, and Fertilization. *J Reprod Infertil.* 2018;19(2):69-81.
138. Hara T, Takeda TA, Takagishi T, Fukue K, Kambe T, Fukada T. Physiological roles of zinc transporters: molecular and genetic importance in zinc homeostasis. *J Physiol Sci.* 2017;67(2):283-301.
139. Wojtunik-Kulesza K, Oniszczyk A, Waksmundzka-Hajnos M . An attempt to elucidate the role of iron and zinc ions in development of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Biomed Pharmacother.* 2019 Mar;111:1277-1289.
140. Mezzaroba L, Alfieri DF, Colado Simão AN, Vissoci Reiche EM. The role of zinc, copper, manganese and iron in neurodegenerative diseases. *Neurotoxicology.* 2019;74:230-241.
141. Abeer M. . Zinc Intake and Risk of Prostate Cancer: Case-Control Study and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2016; 11(11): e0165956.
142. Zdrojewicz Z, Popowicz E, Winiarski J. Nickel- role in human organism and toxic effects. *Pol Merkur Lekarski.* 2016; 41(242):115-118.
143. Genchi G, Carocci A, Lauria G. Nickel: Human Health and Environmental Toxicology. *Int J Environ Res Public Health.* 2020 ; 17(3): 679.
144. Saito M, Arakaki R, Yamada A, Tsunematsu T. Molecular mechanisms of nickel allergy. *Int J Mol Sci.* 2016;17(2): 202.
145. Jacobo-Estrada T, Santoyo-Sánchez M, Thévenod F, Barbier O. Cadmium Handling, Toxicity and Molecular Targets Involved during Pregnancy: Lessons from Experimental Models. *Int J Mol Sci.* 2017;18(7):1590.
146. Geng HX, Wang L. Cadmium: Toxic effects on placental and embryonic development. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2019;67:102-107.
147. Trebak M, Earley S. *Signal Transduction and Smooth Muscle.* CRC Press Taylor & Francis Group ; BR: 2019.

148. Wilson DF. Oxidative phosphorylation: regulation and role in cellular and tissue metabolism. *J Physiol*. 2017;595(23):7023-7038.
149. Nolfi-Donagan D, Braganza A, Shiva S. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox Biol*. 2020;37:101674.
150. Barclay CJ. Energy demand and supply in human skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil*. 2017;38(2):143-155.
151. Chiong M, Cartes-Saavedra B, Norambuena-Soto I, Mitochondrial metabolism and the control of vascular smooth muscle cell proliferation. *Front Cell Dev Biol*. 2014;2:72.
152. Butterfield DA, Halliwell B. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci*. 2019;20(3):148-160.
153. Luo Y, Ma J, Lu W. The Significance of mitochondrial dysfunction in cancer. *Int J Mol Sci*. 2020;21(16):5598.
154. Davidson SM, Adameová A, Barile L, Cabrera-Fuentes HA. Mitochondrial and mitochondrial-independent pathways of myocardial cell death during ischaemia and reperfusion injury. *J Cell Mol Med*. 2020; 24(7):3795-3806.
155. Pinti MV, Fink GK, Hathaway QA, Durr AJ. Mitochondrial dysfunction in type 2 diabetes mellitus: an organ-based analysis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2019;316(2):268-285.
156. Galemou Yoga E, Angerer H, Parey K, Zickermann V. Respiratory complex I - Mechanistic insights and advances in structure determination. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*. 2020;1861(3):148153.
157. Formosa LE, Dibley MG, Stroud DA, Ryan MT. Building a complex complex: Assembly of mitochondrial respiratory chain complex I. *Semin Cell Dev Biol*. 2018; 76: 154-162.
158. Brand MD. Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. *Free Radic Biol Med*. 2016;100:14-31.

159. Fang J, Wong HS, Brand MD. Production of superoxide and hydrogen peroxide in the mitochondrial matrix is dominated by site I Q of complex I in diverse cell lines. *Redox Biol.* 2020;37:101722.

160. Kussmaul L, Hirst J. The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006; 103: 7607–7612.

161. Votyakova TV, Reynolds IJ. ψ m-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. *J. Neurochem.* 2001; 79: 266–277.

162. Robb EL, Hall AR, Prime TA, Eaton S, Szibor M. Control of mitochondrial superoxide production by reverse electron transport at complex I. *J Biol Chem.* 2018;293(25):9869-9879.

163. Sanz A. Mitochondrial reactive oxygen species: do they extend or shorten animal lifespan? *Biochim. Biophys. Acta.* 2016; 1857: 1116–1126.

164. Scialò F, Fernández-Ayala DJ, Sanz A. Role of mitochondrial reverse electron transport in ROS signaling: potential roles in health and disease. *Front Physiol.* 2017;8:428.

165. Bugger H, Pfeil K. Mitochondrial ROS in myocardial ischemia reperfusion and remodeling. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020 Jul 1;1866(7):165768.

166. Singh A, Kukreti R, Saso L, Kukreti S. Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. *Molecules.* 2019 Apr 22;24(8):1583.

167. Davalli P, Mitic T, Caporali A, Lauriola A, D'Arca D. ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:3565127.

168. Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994; 91: 10771-10778.

169. Rottenberg H, Hoek JB. The path from mitochondrial ROS to aging runs through the mitochondrial permeability transition pore. *Aging Cell.* 2017 ;16(5):943-955.

170. N Kolodkin A, Sharma RP, Colangelo AM. ROS networks: designs, aging, Parkinson's disease and precision therapies. *NPJ Syst Biol Appl*. 2020; 6(1):34.

171. Korge P, Calmettes G, John SA, Weiss JN. Reactive oxygen species production induced by pore opening in cardiac mitochondria: The role of complex III. *J Biol Chem*. 2017;292(24):9882-9895.

172. Kamarauskaite J, Baniene R, Trumbeckas D, Strazdauskas A, Trumbeckaite S. Increased succinate accumulation induces ROS Generation in *In Vivo* ischemia/reperfusion-affected rat kidney mitochondria. *Biomed Res Int*. 2020 Oct 13;2020:8855585.

173. Sinha K, Pal PB, Sil PC. Cadmium (Cd(2+)) exposure differentially elicits both cell proliferation and cell death related responses in SK-RC-45. *Toxicol In Vitro*. 2014;28(2):307-318.

174. Zhang Y, Jiang N, Liu Q, Zhu Y, Huang X. Role of mitochondrial damage in cadmium-induced cell apoptosis and DNA damage of hepatocytes. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2020;49(2):290-297.

175. Guo H, Ji J, Wei K, Sun J, Zhang Y, Sun X. MAPK/AP-1 and ROS participated in ratio- and time-dependent interaction effects of deoxynivalenol and cadmium on HT-29 cells. *Food Chem Toxicol*. 2021;148:111921.

176. Sudo K, VAN Dao C, Miyamoto A, Shiraishi M. Comparative analysis of in vitro neurotoxicity of methylmercury, mercury, cadmium, and hydrogen peroxide on SH-SY5Y cells. *J Vet Med Sci*. 2019 ;81(6):828-837.

177. Morcillo P, Esteban MÁ, Cuesta A. Heavy metals produce toxicity, oxidative stress and apoptosis in the marine teleost fish SAF-1 cell line. *Chemosphere*. 2016 Feb;144:225-233.

178. Xu G, Liu S, Huang M, Jiang X, Yang M. Cadmium induces apoptosis of human granulosa cell line KGN via mitochondrial dysfunction-mediated pathways. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2021; 220:112341.

179. He X, Chen MG, Ma Q. Activation of Nrf2 in defense against cadmium-induced oxidative stress. *Chem Res Toxicol*. 2008; 21:1375–1383.

180. Kiran Kumar KM, Naveen Kumar M, Patil RH. Cadmium induces oxidative stress and apoptosis in lung epithelial cells. *Toxicol Mech Methods*. 2016;26(9):658-666.
181. Zhuang J, Nie G, Yang F, Dai X, Cao H, Xing C, Hu G, Zhang C. Cadmium induces cytotoxicity through oxidative stress-mediated apoptosis pathway in duck renal tubular epithelial cells. *Toxicol In Vitro*. 2019;61:104625.
182. Dai Z, Cheng J, Bao L, Zhu X, Li H, Chen X, Zhang Y, Zhang J, Chu W, Pan Y, Huang H. Exposure to waterborne cadmium induce oxidative stress, autophagy and mitochondrial dysfunction in the liver of *Procypris merus*. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2020;204:111051.
183. Ma Y, Rivera-Ingraham G, Nommick A, Bickmeyer U, Roeder T. Copper and cadmium administration induce toxicity and oxidative stress in the marine flatworm *Macrostomum lignano*. *Aquat Toxicol*. 2020;221:105428.
184. Liu X, Chen Q, Ali N, Zhang J, Wang M, Wang Z. Single and joint oxidative stress-related toxicity of sediment-associated cadmium and lead on *Bellamya aeruginosa*. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2019;26(24):24695-24706.
185. Wu C, Zhang Y, Chai L, Wang H. Oxidative stress, endocrine disruption, and malformation of *Bufo gargarizans* embryo exposed to sub-lethal cadmium concentrations. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2017;49:97-104.
186. Zhu Y, Costa M. Metals and molecular carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2020;41(9):1161-1172.
187. Chen QY, DesMarais T, Costa M. Metals and mechanisms of carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2019; 59:537-554.
188. Kamiyama T, Miyakawa H, Li JP, Akiba T, Liu JH, Liu J, Marumo F, Sato C. Effects of one-year cadmium exposure on livers and kidneys and their relation to glutathione levels. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 1995; 88:177–186.
189. Djukić-Cosić D, Curčić Jovanović M, Plamenac Bulat Z, Ninković M, Malicević Z, Matović V. Relation between lipid peroxidation and iron concentration in mouse liver after acute and subacute cadmium intoxication. *J Trace Elem Med Biol*.

2008; 22:66–72.

190. Liu J, Kadiiska MB, Corton JC, Qu W, Waalkes MP, Mason RP, Liu Y, Klaassen CD. Acute cadmium exposure induces stress-related gene expression in wild-type and metallothionein-I/II null mice. *Free Radic Biol Med*. 2002; 32:525–535.

191. Regunathan A, Glesne DA, Wilson AK, Song J, Nicolae D, Flores T, Bhattacharyya MH. Microarray analysis of changes in bone cell gene expression early after cadmium gavage in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2003; 191:272–293.

192. Croue F, Beau B, Murat JC, Vincent C, Komatsu H, Obata F, Soleilhavoup JP. Expression of stress-related genes in a cadmium-resistant A549 human cell line. *J Toxicol Environ Health A*. 2005; 68:703–718.

193. Nemmiche S. Oxidative signaling response to cadmium. *Toxicol Sci*. 2017;156(1):4-10.

194. Karumuri SB, Singh H, Naqvi S, Mishra A, Flora SJ. Impact of chronic low dose exposure of monocrotophos in rat brain: Oxidative/ nitrosative stress, neuronal changes and cholinesterase activity. *Toxicol Rep*. 2019;6:1295-1303.

195 Xu Z, Fang Y, Chen Y, Yang W, Ma N. Protective effects of Se-containing protein hydrolysates from Se-enriched rice against Pb(2+)-induced cytotoxicity in PC12 and RAW264.7 cells. *Food Chem*. 2016;202:396-403.

196. Wu J, Li P, Shi Y, Fang Y. Neuroprotective effects of two selenium-containing peptides, TSeMMM and SeMDPGQQ, derived from selenium-enriched rice protein hydrolysates on Pb²⁺-induced oxidative stress in HT22 cells. *Food Chem Toxicol*. 2020;135:110932.

197. Caito SW, Aschner M. Mitochondrial redox dysfunction and environmental exposures antioxidant redox signal. 2015;23(6):578-95.

198. Wang ZK, Zhou XL, Song XB, Zhuang DM. Alleviation of lead-induced apoptosis by puerarin via inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening in primary cultures of rat proximal tubular cells. *Biol Trace Elem Res*. 2016;174(1):166-176

199. Virgolini MB, Aschner M. Molecular mechanisms of lead neurotoxicity.

Adv Neurotoxicol. 2021;5:159-213.

200. Hussain MA, Ashraf MU, Muhammad G, Tahir MN, Bukhari SNA. Calixarene: a versatile material for drug design and applications. Curr Pharm Des. 2017; 23(16):2377-2388.

201. Yilmaz M. Calixarene-based receptors for molecular recognition. Turkish J of Chem. 2013;37(6-):558 – 585.

202. Zhou X, Pathak P, Jayawickramarajah J. Design, synthesis, and applications of DNA-macrocyclic host conjugates. Chem Commun (Camb). 2018; 54(83):11668-11680.

203. Rodik RV, Boyko VI. Calixarenes in bio-medical researches. Curr Med Chem. 2009;6(1):1630-1655.

204. Buldenko VM, Trush VV, Kobzar OL, Drapailo AB, Kalchenko VI, Vovk AI. Calixarene-based phosphinic acids as inhibitors of protein tyrosine phosphatases. Bioorg Med Chem Lett. 2019 Mar 15;29(6):797-801.

205. Ali Y, Muhamad Bunnori N, Susanti D Synthesis, *in-Vitro* and *in Silico* Studies of Azo-Based Calix[4]arenes as Antibacterial Agent and Neuraminidase Inhibitor: A New Look Into an Old Scaffold. Front Chem. 2018;6:210.

206. Веклич ТО, Костерин СО. Вплив каліксарен фосфонових кислот на Na, К-АТФазну активність на плазматичних мембранах гладеньком'язових клітин. Укр. Біохім.журн. 2006; 78(1): 70-78.

207. Singh A.K. Development of chloride channel modulators. Kidney Int. 1995;48(10):985-993.

208. Hamuro U. Antitrombotic treatment with calix[n]arene compounds. Patent US5409959, 1995.

209. Шкрабак ОА, Веклич ТО. Каліксарензалежний гідроліз АТР II. Каталітичні властивості реакції стимульованої, каліксареном С-107. Укр біохім журн. 2008; 80(3):55-64.

210. Cuevas F. Toward an artificial acetylcholineesterase. Chem.Eur. J 2000; 6. (11):3228-3234.

211. Hamuro Y. A calixarene with four peptide loops: an antibody mimic for recognition of protein surfaces. *Angew Chem Int. Ed. Engl.* 1997;36(2): 2680-2683.
212. Geng WC, Huang Q, Xu Z, Wang R, Guo DS. Arginine clustering on calix[4]arene macrocycles for improved cell penetration and DNA delivery. *Theranostics*. 2019; 9(11):3094-3106.
213. Лабинцева РД, Слінченко НМ. Порівняльне дослідження впливу каліксаренів на Mg^{2+} -залежні АТФ-гідролазні ферментативні системи гладеньком'язових клітин матки. *Укр біохім журн*. 2007; 79(3): 44
214. Labyntseva RD, Bevza AA. Calix[4]arene C-99 inhibits myosin ATPase activity and changes the organization of contractile filaments of myometrium. *Ukr. Biochem J*. 2015;87(6):95-103.
215. Cherenok S, Vovk A, Muravyova I. Calix [4] arene α -aminophosphonic acids: asymmetric synthesis and enantioselective inhibition of an alkaline phosphatase. *Org Lett*. 2006;8(4):549–552.
216. Cherenok SO, Yushchenko OA, Tanchuk VY. Calix[4]arene- α -hydroxyphosphonic acids. Synthesis, stereochemistry, and inhibition of glutathione S-transferase. *ARKIVOC*. 2012;4:278–298.
217. Consoli GM, Granata G, Galante E, Di Silvestro I, Salafia L, Geraci C. Synthesis of water-soluble nucleotide-calixarene conjugates and preliminary investigation of their *in vitro* DNA replication inhibitory activity. *Tetrahedron*. 2007;63(44):10758–10763.
218. Naseer MM, Ahmed M, Hameed S. Functionalized calix[4]arenes as potential therapeutic agents. *Chem Biol Drug Des*. 2017;89(2):243-256.
219. Basilotta R, Mannino D, Filippone A, Casili G. Role of Calixarene in Chemotherapy Delivery Strategies. *Molecules*. 2021;26(13):3963 .
220. Trush VV, Cherenok SO, Tanchuk VY, Kukhar VP, Kalchenko VI, Vovk AI. Calix [4] arene methylenebisphosphonic acids as inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013;23(20):5619–5623.
221. Wang J, Ding X, Guo X. Assembly behaviors of calixarene-based

amphiphile and supra-amphiphile and the applications in drug delivery and protein recognition. *Adv Colloid Interface Sci.* 2019; 269:187-202.

222. Nasuhi Pur F, Dilmaghani KA. Calixplatin: novel potential anticancer agent based on the platinum complex with functionalized calixarene. *J Coord Chem.* 2014;67(3):440–448.

223. Galindo-Murillo R, Sandoval-Salinas ME, Barroso-Flores J. In silico design of monomolecular drug carriers for the tyrosine kinase inhibitor drug imatinib based on calix-and thiacalix [n] arene host molecules: a DFT and molecular dynamics study. *J Chem Theory Comput.* 2014; 10(2):825–834.

224. Galindo-Murillo R, Olmedo-Romero A, Cruz-Flores E, Petrar P, Kunsagi-Mate S, Barroso-Flores J. Calix[n]arene-based drug carriers: a DFT study of their electronic interactions with a chemotherapeutic agent used against leukemia. *Comp Theor Chem.* 2014;1035:84–91.

225. Hulíková K, Grobárová V, Křivohlavá R, Fišerová A. Antitumor activity of *N*-acetyl-*D*-glucosamine-substituted glycoconjugates and combined therapy with keyhole limpet hemocyanin in B16F10 mouse melanoma model. *Folia Microbiol.* 2010;55(5):528–532.

226. Rocha-Brito KJP, Fonseca EMB, Oliveira BGF, Fátima Â, Ferreira-Halder CV. Calix[6]arene diminishes receptor tyrosine kinase lifespan in pancreatic cancer cells and inhibits their migration and invasion efficiency. *Bioorg Chem.* 2020 ; 100:103881.

227. Xue Y, Guan Y, Zheng A, Xiao H. Amphoteric calix[8]arene-based complex for pH-triggered drug delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2013; 101:55–60.

228. Родік РВ. Антимікробна та протівірусна активність калікарєнів. *Журн. орг. та фарм. Хімії.* 2015. 13(1): 67-79.

229. Paquet V, Zumbuehl A, Carreira E. M. Biologically active amphoterecin B-calix[4]arene conjugates. *Bioconjugate Chem.* 2006; 17(6):1460-1473.

230. Memisoglu E. Non-surfactant nanospheres of progesterone inclusion

complexes with amphiphilic beta-cyclodextrins. J Ind Pharm. 2003; 251(1): 143-153.

231. Zhou X, Koizumi Y, Zhang M, Natsui M, Koyota S. Cadmium-coordinated supramolecule suppresses tumor growth of T-cell leukemia in mice. Cancer Sci. 2015;106(5):635-41.

232. Shahgaldian P. Para-acyl-calix-arene based solid lipid nanoparticles (SLNs): a detailed study of preparation and stability parameters. J Ind Pharm. 2003; 253(2): 23-38.

233. Dawn A, Deep S. Assessment of the *in vitro* toxicity of calixarenes and a metal-seamed calixarene: a chemical pathway for clinical application. Int J Biol Macromol. 2021; 167:787-795

234. Li M, Mao L, Chen M, Li M. Characterization of an Amphiphilic Phosphonated calixarene carrier loaded with carboplatin and paclitaxel: a preliminary study to treat colon cancer *in vitro* and *in vivo*. Front Bioeng Biotechnol. 2019; 7: 238.

235. Coleman AW; Jebors S; Cecillon S; Perret P; Garin D; Marti-Battle D; Moulin M Toxicity and Biodistribution of Para-Sulfonato-Calix[4]Arene in Mice. New J. Chem 2008, 32, 780–782.

236. Barany M, Barany K. Chicken gizzard myosin. Arch. Biochem.Biophys. 1966;113(1):P. 205–211.

237. Weeds AG, Taylor RS. Separation of subfragment-1 isoenzymes from rabbit skeletal muscle myosin. Nature. 1975; 257:54–56.

238. Suzuki H, Kondo Y. Effects of phosphorylation, MgATP, and ionic strength on the rates of papain degradation of heavy and light chains of smooth muscle heavy meromyosin at the S1-S2 junction. J Biol Chem.1988;263:10974–10979.

239. Schägger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal Biochem. 1987;166(2):368-79.

240. Cornish-Bowden A. Fundamentals of enzyme kinetics. 3rd edition. Portland Press, London: 2002.

241. Chen PS, Toribara J, Warner H. Microdetermination of phosphorus. Anal

Chem. 1956; 28:1756–175.

242. Gangula PR, Dong YL, Yallampalli C. Rat myometrial smooth muscle cells express endothelial nitric oxide synthase. *Human reproduction*. 1997; 12(3):561–568.

243. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application4 proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65: 55–63.

244. Kosterin SA, Bratkova NF., Kursky MD. The role of sarcolemma and mitochondria in calcium-dependent control of myometrium relaxation. *Biokhimiia*. 1985; 50(8): 1350–1361.

245. Danylovych HV. Evaluation of functioning of mitochondrial electron transport chain with NADH and FAD autofluorescence. *Ukr. Biochem. J.*, 2016; 88(1):31–43.

246. Harris DC. Quantitative chemical analysis. 6th edition. WH. Freeman, San Francisco: 2003.

247. Iwane AH, Kitamura K, Tokunaga M, Yanagida T. Myosin subfragment-1 is fully equipped with factors essential for motor function. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1997;230:76–80.

248. Barany M, ATPase Activity of Myosin Correlated with Speed of Muscle Shortening. *J Gen Physiol*. 1967; 50(6): 197–218.

249. Risal D, Gourinath S, Himmel DM. Myosin subfragment 1 structures reveal a partially bound nucleotide and a complex salt bridge that helps couple nucleotide and actin binding. *PNAS*. 2004;101(24): 8930–8935.

250. Kowalska M. The determinants of lead and cadmium blood levels for preschool children from industrially contaminated sites in Poland. *Int J Occup Med Environ Health* . 2018;31(3):351–359.

251. Batra J, Thakur A, Meena SK, Singh L, Kumar J, Juyal D. Blood lead levels among the occupationally exposed workers and its effect on calcium and vitamin D metabolism: A case-control study. *J Family Med Prim Care*. 2020

31;9(5):2388-2393.

252. Kalahasthi R, Barman T. Assessment of Lead Exposure and urinary- δ -aminolevulinic acid levels in male lead acid battery workers in Tamil Nadu, India. *J Health Pollut.* 2018;8(17):6-13.

253. Kumar R. Blood Lead levels in occupationally exposed workers involved in battery factories of delhi-NCR region: effect on vitamin D and calcium metabolism. *Indian J Clin Biochem.* 2020 Jan; 35(1): 80–87.

254. Rzymiski P, Rzymiski P, Tomczyk K. Metal status in human endometrium: relation to cigarette smoking and histological lesions. *Environ Res.* 2014;132:328-33.

255. Alli LA. Blood level of cadmium and lead in occupationally exposed persons in Gwagwalada, Abuja, Nigeria. *Interdiscip Toxicol.* 2015; 8(3): 146–150.

256. Du X, Zheng W, Ye Q. Rare cases of severe life-threatening lead poisoning due to accident or chronic occupational exposure to lead and manganese: Diagnosis, treatment, and prognosis. *Toxicol Ind Health.* 2020; 36(12):951-959.

257. Mertz W. Trace elements in human and animal nutrition. 5th edition. Academic Press Inc, Orlando: 1987.

258. Igit P, Lee E, Harper W. Toxic effects associated with consumption of zinc. *Case Report.* 2002; 77(7):713-716.

259. Fosmire GJ. Zinc toxicity. *Am J Clin Nutr.* 1990;51(2):225-7.

260. Grigorenko BL, Rogov AV, Topol IA, Burt SK, Martinez HM, Nemukhin AV. Mechanism of the myosin catalyzed the hydrolysis of ATPase rationalized by molecular modeling. *PNAS.* 2007; 104(17):7057–706134.

261. Connolly BA, Eckstein F. Structure of mono- and divalent nucleotidecomplex in myosin ATP-ase. *J Biol Chem.* 1981; 256(18):9450–9456.

262. Bugaenko LT, Ryabykh SM, Bugaenko AL. A Nearly complete system of average crystallographic ionic radii and its use for determining ionization potentials. *Mosc. Univer.Chem. Bull.* 2008; 63 (6): 303–317.

263. Sigel H. Adenosine 5'-triphosphate (ATP4-): Aspects ofthe coordination chemistry of a multitalented biologicalsubstrate. *Pure Appl Chem.* 2004; 76: 375–388.

264. Preller M, Manstein DJ. Myosin motors: structural aspects and functionality, in reference module in life sciences. Comprehensive Biophysics. 2012; 4: 118–150.

265. Berridge M, Tan A, McCoy K, Wang R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. Biochemica. 1996; 4:14–19.

266. Klostergaard J, Kilbourn RG, Foster WA, Lopez-Berestein G. Rapid, quantitative microassay for the monokine respiration inhibitory factor. J Immunol Methods. 1987;101(1):97-108.

267. Colle D, Santos DB, Hartwig JM. Succinobucol *versus* probucol: Higher efficiency of succinobucol in mitigating 3-NP-induced brain mitochondrial dysfunction and oxidative stress *in vitro*. Mitochondrion. 2013;13(2):125-33.

268. Berridge M, Tan A. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. Arch Biochem Biophys. 1993;303(2):474-82.

269. Surin AM, Sharipov RR, Krasil'nikova IA Disruption of functional activity of mitochondria during MTT assay of viability of cultured neurons. Biochemistry. 2017;82(6):737-749.

270. Berridge M, Tan A. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. Biotechnol Annu Rev. 2005;11:127-52.

271. Rai Y, Pathak R, Kumari N, Sah DK. Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. Sci Rep. 2018;8(1):1531.

272. Siewit CL, Gengler B, Vegas E, Puckett R, Louie MC. Cadmium promotes breast cancer cell proliferation by potentiating the interaction between ERalpha and c-Jun. Mol Endocrinol. 2010;24(5):981–992.

273. Liu J, Huang H, Zhang W, Li H. Cadmium-induced increase in uterine wet weight and its mechanism. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol. 2010 ;89(1):43-49.

274. Nasiadek M, Danilewicz M, Klimczak M. Subchronic exposure to cadmium causes persistent changes in the reproductive system in female wistar Rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:6490820.

275. Aquino NB, Sevigny MB, Sabangan J, Louie MC. Role of cadmium and nickel in estrogen receptor signaling and breast cancer: metalloestrogens or not? *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. 2012; 30(3): 189–224.

276. Stoica A, Katzenellenbogen BS, Martin MB. Activation of estrogen receptor- α by the heavy metal cadmium. *Mol Endocrinol*. 2000; 14(4):545–553.

277. Lee HR, Kim TH, Choi KC. Functions and physiological roles of two types of estrogen receptors, ER α and ER β , identified by estrogen receptor knockout mouse. *Lab Anim Res* 2012; 28(2), 71-76.

278. Aquino NB, Sevigny MB. Role of cadmium and nickel in estrogen receptor signaling and breast cancer: Metalloestrogens or Not? *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. 2012 ; 30(3): 189–224.

279. Yu X, Filardo EJ, Shaikh ZA. The membrane estrogen receptor GPR30 mediates cadmium-induced proliferation of breast cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010; 245(1):83–90.

280. Stein LR. The dynamic regulation of NAD metabolism in mitochondria. *Trends Endocrinol Metab*. 2012;23(9):420-428.

281. Bird DK, Yan L, Vrotsos KM, et al. Metabolic mapping of MCF 10A human breast cells via multiphoton fluorescence lifetime imaging of the coenzyme NADH. *Cancer Res*. 2005;65:8766–8773.

282. Vishwasrao HD, Heikal AA, Kasischke KA, Webb WW. Conformational dependence of intracellular NADH on metabolic state revealed by associated fluorescence anisotropy. *J. Biol. Chem*. 2005;280:25119–25126.

283. Alano CC. Differences among cell types in NAD(+) compartmentalization: a comparison of neurons, astrocytes, and cardiac myocytes. *J Neurosci Res*. 2007; 85:3378–3385.

284. White AT, Schenk S. NAD⁺/NADH and skeletal muscle mitochondrial

adaptations to exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012 Aug 1;303(3):308-321.

285. Uppal A, Gupta PK. Measurements of NADH concentration in normal and malignant human tissues from breast and oral cavity. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2003;37:45–50.

286. Pu Y, Wang W, Tang G, Alfano RR. Changes of collagen and nicotinamide adenine dinucleotide in human cancerous and normal prostate tissues studied using native fluorescence spectroscopy with selective excitation wavelength. *J Biomed Opt.* 2010;15(4):047008.

287. Berthiaume JM, Kurdys JG, Muntean DM, Rosca MG. Mitochondrial NAD^+/NADH redox state and diabetic cardiomyopathy. *Antioxid Redox Signal.* 2019;30(3):375-398.

288. Okabe K, Yaku K, Tobe K, Nakagawa T. Implications of altered NAD metabolism in metabolic disorders. *J Biomed Sci.* 2019; 26(1):34.

289. Ralto KM, Rhee EP, Parikh SM. NAD^+ homeostasis in renal health and disease. *Nat Rev Nephrol.* 2020;16(2):99-111.

290. Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy. Second edition. Plenum Publisher, New York, 1999.

291. Islam MS, Honma M, Nakabayashi T, Kinjo M, Ohta N. pH dependence of the fluorescence lifetime of FAD in solution and in cells. *Int J Mol Sci.* 2013; 14(1): 1952-1963.

292. Chorvat DJ, Chorvatova A. Spectrally resolved time-correlated single photon counting: a novel approach for characterization of endogenous fluorescence in isolated cardiac myocytes. *J. Eur. Biophys.* 2006;36:73–83.

293. Heikal AA. Intracellular coenzymes as natural biomarkers for metabolic activities and mitochondrial anomalies. *Biomark. Med.* 2010;4(2): 241-263.

294. Kindzelskii A, Petty HR. Fluorescence spectroscopic detection of mitochondrial flavoprotein redox oscillations and transient reduction of the NADPH oxidase-associated flavoprotein in leukocytes. *Eur Biophys J.* 2004;33(4):291-9.

295. Du Y, Miller CM, Kern TS. Hyperglycemia increases mitochondrial

superoxide in retina and retinal cells. *Free Rad Biol Med*. 2003;35:1491–9.

296. Maleki S. Mitochondrial redox studies of oxidative stress in kidneys from diabetic mice. 2012. *Biomed Opt Express*. 3: 273–281.

297. Kindzelskii A, Petty HR. Fluorescence spectroscopy as a biomarker in a cell culture and in a nonhuman primate model for ovarian cancer chemopreventive agents *Eur Biophys J*. 2004; 33(4):291-299.

298. Wang Y, Fang J, Leonard SS, Rao KM. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*. 2004 Jun 1;36(11):1434-43.

299. Belyaeva EA, Dymkowska D, Wieckowski MR, Wojtczak L. Reactive oxygen species produced by the mitochondrial respiratory chain are involved in Cd²⁺-induced injury of rat ascites hepatoma AS-30D cells. *Biochim Biophys Acta*. 2006 ; 1757(12):1568-74.

300. Belyaeva EA. Respiratory complex II in mitochondrial dysfunction-mediated cytotoxicity: Insight from cadmium. *J Trace Elem Med Biol*. 2018;50:80-92.

301. Cameron I, McNamee PM A, Markham RM, Morgan M. The effects of cadmium on succinate and NADH-linked substrate oxidations in rat hepatic mitochondria, *J. Appl. Toxicol*. 1986;6:325–330.

302. Ahmad F, Salahudin M, Alamoudi W. Dysfunction of cortical synapse-specific mitochondria in developing rats exposed to lead and its amelioration by ascorbate supplementation. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2018; 14: 813–824.

303. Wang J, Zhang H. Molecular mechanism on cadmium-induced activity changes of catalase and superoxide dismutase. *Int J Biol Macromol*. 2015;77:59-67.

304. Huang YH, Shih CM, Huang CJ, Lin CM Effects of cadmium on structure and enzymatic activity of Cu,Zn-SOD and oxidative status in neural cells. *J Cell Biochem*. 2006; 98(3):577-589.

305. Nolan EM, Lippard SJ. Small-molecule fluorescent sensors for investigating zinc metalloneurochemistry. *Acc Chem Res*. 2009;42(1):193-203.¹

306. Carpenter MC, Lo MN, Palmer AE. Techniques for measuring cellular

zinc. Arch Biochem Biophys. 2016;611:20-29.

307. Ma L, Liu JY, Dong JX, Xiao Q, Zhao J, Jiang FL. Toxicity of Pb^{2+} on rat liver mitochondria induced by oxidative stress and mitochondrial permeability transition Toxicol Res (Camb). 2017;6(6):822-830.

308. Kumar R, Lee YO, Bhalla V, Kumar M, Kim JS. Recent developments of thiacalixarene based molecular motifs. Chem. Soc. Rev. 2014; 43: 4824-4870.