

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 головою 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 статевої 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 АТРазу 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 можливість 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 С-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 формагану за впливу катіонів Cd, Pb та Zn. Було встановлено, що катіони Cd та Pb посилюють утворення формагану 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 коферментів ізольованих мітохондрій гладенького м'язу матки. При дослідженні автофлуоресценції НАДН в ізольованих 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 ізольованих 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 С-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 С-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.

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).*

Апробація матеріалів дисертації:

1. **V. Yavorovska**, R. Labyntseva. Tetrahydroxythiacalix[4]arene-tetraphosphate 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 thiacalix[4]arenes on myosin ATPase activity against inhibitory effects of Zn²⁺. 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 Zn²⁺ 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.