

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики

проф. Нипорко Олексій Юрійович

Протокол № \_\_\_\_\_ засідання кафедри

від “ \_\_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 20\_\_ р.

**ВПЛИВ КАЛІКС[4]АРЕНУ С-1130 НА КІНЕТИЧНІ ПАРАМЕТРИ  
Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТРази ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ ТА  
МЕХАНОКІНЕТИКУ ПРОЦЕСУ «СКОРОЧЕННЯ —  
РОЗСЛАБЛЕННЯ» ГЛАДЕНЬКОГО М'ЯЗУ МАТКИ**

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра  
студента спеціальності 091 Біологія

ОП «Біологія (високі технології)»

**Мельник Варвари Володимирівни**

Науковий керівник

професор кафедри молекулярної

біотехнології та біоінформатики

д.б.н. **Цимбалюк Ольга Володимирівна**

Частина роботи виконана у відділі біохімії м'язів

Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України

під керівництвом д.б.н. **Т. О. Векліч**

Оцінка захисту роботи

---

Київ — 2024 р.

## АНОТАЦІЯ

Мельник В.В. Вплив калікс[4]арену С-1130 на кінетичні параметри  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТРази плазматичної мембрани та механокінетику процесу «скорочення — розслаблення» гладенького м'язу матки. — Випускна кваліфікаційна робота бакалавра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Біологія (високі технології)».

У роботі досліджено залежності кінетичних параметрів інгібування  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТРази плазматичної мембрани клітин міометрія калікс[4]ареном С-1130 від концентрації іонів Mg, Na, K та АТР. Встановлено, що калікс[4]арен С-1130 практично не впливає на спорідненість  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТРази до Mg, K та АТР, проте калікс[4]арен С-1130 модифікує спорідненість  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТРази до іонів Na.

З'ясовано, що під дією калікс[4]арену С-1130 відбувається зростання внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у гладеньком'язових клітинах. Запропоновано молекулярний механізм впливу калікс[4]арену С-1130 на концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  в міоплазмі клітин міометрія.

Підтверджено, що причиною змін скорочувальної активності препаратів міометрія за дії калікс[4]арену С-1130 було саме інгібування  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТРази плазматичної мембрани, оскільки на тлі дії убаїну (відомого інгібітору  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТРази) відбувалося посилення спонтанних скорочень препаратів міометрія, тоді як подальше аплікування калікс[4]арену С-1130 не змінювало їх механічну активність.

Результати отримані в ході виконання роботи можуть бути використані для вдосконалення існуючих та створення нових високоефективних лікарських засобів, здатних модулювати порушення функціонування міометрія, а також створюють можливості для вирішення фундаментальних біологічних питань.

Ключові слова:  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТРаза, плазматична мембрана, калікс[4]арен С-1130, гладенькі м'язи, міометрій, скорочення, убаїн.

## ABSTRACT

Melnyk V.V. Influence of calix[4]arene C-1130 on the kinetic parameters of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase of the plasma membrane and mechanokinetics of the «contraction — relaxation» process of the uterine smooth muscle. — Bachelor's thesis in the speciality 091 Biology, educational programme «Biology (high technologies)».

The work investigates the dependence of the kinetic parameters of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase inhibition of the plasma membrane of myometrial cells by calix[4]arene C-1130 on the concentration of Mg, Na, K and ATP ions. It was found that calix[4]arene C-1130 has practically no effect on the affinity of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase for Mg, K and ATP, but calix[4]arene C-1130 modifies the affinity of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase for Na ions.

It has been shown that calix[4]arene C-1130 increases the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in smooth muscle cells. The molecular mechanism of calix[4]arene C-1130 effect on  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in the myoplasm of myometrial cells was proposed.

It was confirmed that the reason for changes in the contractile activity of myometrial preparations under the influence of calix[4]arene C-1130 was the inhibition of the plasma membrane  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. Increased spontaneous contractions were observed in myometrial preparations under the influence of ouabain, a known inhibitor of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. The subsequent application of calix[4]arene C-1130 did not alter their mechanical activity.

The results obtained can be practical in improving existing and creating new highly effective drugs that can modulate myometrial dysfunction. They can also create opportunities for solving fundamental biological issues.

Keywords:  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, plasma membrane, calix[4]arene C-1130, smooth muscle, myometrium, contraction, ouabain.

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ I.....	9
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	9
1.1. Системи транспорту іонів Са у гладеньких м'язах.....	9
1.1.1. Функціональне значення обміну іонів Са у гладеньких м'язах.....	9
1.1.2. Білкові транспортні системи, що опосередковують обмін іонів Са у гладеньких м'язах.....	9
1.2. Участь натрієвої помпи у функціонуванні гладеньких м'язів.....	10
1.2.1. Натрієва помпа як складова плазматичної мембрани міоцитів.....	10
1.2.2. Структура натрієвої помпи.....	11
1.2.3. Ізоформи натрієвої помпи.....	13
1.2.4. Ізоформи натрієвої помпи у вісцеральних гладеньких м'язах.....	14
1.2.5. Біофізичні та біохімічні основи зв'язку між натрієвою помпою та системами транспорту іонів Са у гладеньких м'язах.....	14
1.2.6. Регуляція та модифікація активності натрієвої помпи плазматичної мембрани.....	15
1.3. Властивості та механокінетика гладеньких м'язів матки.....	17
1.3.1. Властивості тканин гладеньких м'язів.....	17
1.3.2. Міометрій — будова і властивості.....	19
1.3.3. Механокінетика процесів скорочення-розслаблення міометрія.....	19
1.4. Каліксарени та їх біологічна активність.....	21
1.4.1. Структура та фізико-хімічні властивості каліксаренів.....	21
1.4.2. Прояви біологічної активності каліксаренів.....	22
1.4.3. Перспективи використання каліксаренів.....	22
1.4.4. Каліксарени-інгібітори натрієвої помпи.....	23
РОЗДІЛ II.....	24
МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ.....	24
2.1. Структура та синтез калікс[4]арену С-1130.....	24
2.2. Тварини та тканини, які було використано в дослідженнях.....	24
2.3. Методи препаративної біохімії.....	25

	5
2.3.1. Виділення суспензії гладеньком'язових клітин з матки щурів. ....	25
2.3.2. Виділення фракції плазматичних мембран клітин міометрія свині. ....	26
2.3.3. Виділення препаратів міометрія щурів для тензометричних експериментів. ....	27
2.4. Флуоресцентні методи.....	28
2.4.1. Дослідження міоцитів методом лазерної скануючої конфокальної мікроскопії.....	28
2.5. Ензимологічні методи. ....	29
2.5.1. Оцінка активності АТР-гідролаз у фракції плазматичних мембран. ....	29
2.6. Тензометричні методи. ....	30
2.6.1. Реєстрація скоротливої активності. ....	30
2.7. Методи математичного моделювання.....	31
2.8. Методи кінетичного аналізу.....	32
2.9. Методи статистичного аналізу.....	33
РОЗДІЛ III .....	34
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ .....	34
3.1. Особливості дії калікс[4]арену С-1130 на активність натрієвої помпи.....	34
3.1.1. Дія калікс[4]арену С-1130 на концентраційну залежність активності натрієвої помпи від іонів Mg.....	34
3.1.2. Дія калікс[4]арену С-1130 на концентраційну залежність активності натрієвої помпи від АТР.....	36
3.1.3. Дія калікс[4]арену С-1130 на концентраційну залежність активності Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -АТРази від співвідношень концентрацій [Na <sup>+</sup> ]/[K <sup>+</sup> ]......	38
3.2. Вплив калікс[4]арену С-1130 на концентрацію іонів Са у клітинах гладеньких м'язів.....	40
3.3. Вплив калікс[4]арену С-1130 на параметри спонтанної скорочувальної активності міометрія за дії уабаїну. ....	41
3.4. Вплив калікс[4]арену С-1130 на спонтанну скорочувальну активність міометрія, яка була індукована електромеханічно та фармакомеханічно. ....	44
ВИСНОВКИ.....	47
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	48

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- АХЕ – ацетилхолін естераза
- БСА – бичачий сироватковий альбумін
- ГМ – гладенькі м'язи
- ГМК – гладеньком'язова клітина
- ДМСО – диметилсульфоксид
- ЕГТА – етиленглікольдіамінтетраоцтова кислота
- ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота
- ЛЗД – ліганд-зв'язувальні ділянки
- МХ – мітохондрія
- ПКА – протеїнкаіаза А
- ПКС – протеїнкаіаза С
- ПМ – плазматична мембрана
- СР – саркоплазматичний ретикулум
- ЛКС – лазерно-кореляційна спектроскопія
- ADP – аденозиндифосфат
- ATP – аденозинтрифосфат
- CTP – цитидинтрифосфат
- GTP – гуанозинтрифосфат
- $[Ca^{2+}]_e$  – зовнішньоклітинна концентрація кальцію
- $[Ca^{2+}]_i$  – внутрішньоклітинна концентрація кальцію
- Pi – фосфат неорганічний
- fluo-4 AM – 2-{[2-(2-{5-[біс(карбоксиметил)аміно]-2-метилфенокси}етокси)-4-(2,7-дифлуоро-6-гідрокси-3-оксо-3H-ксантен-9-іл)феніл](карбоксиметил)аміно}ацетова кислота;
- Ноеchst – 2'-(4-етоксифеніл)-6-(4-метил-1-піперазиніл)-1H,3'H-2,5'-бібензimidазол
- Нерес – N-2-гідроксиетилпіперазин-N-2-етансульфонова кислота
- DiOC6(3) – 3,3'-дігексиллоксакарбоцианінйодит
- SDS – натрій додецилсульфат
- Tris – трис(гідроксиметил)амінометан

Tg – тапсигаргін

Ca<sup>2+</sup>-помпа – Mg<sup>2+</sup>, АТР-залежна Ca<sup>2+</sup>-транспортувальна система плазматичної мембрани та саркоплазматичного ретикулуму

Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-АТРаза – Mg<sup>2+</sup>-залежна АТРаза, що активується іонами Са

Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТРаза – Mg<sup>2+</sup>-залежна АТРаза, що активується іонами Na і K

Mg<sup>2+</sup>-АТРаза – “базальна” Mg<sup>2+</sup>-АТРаза, Ca<sup>2+</sup>-незалежна Mg<sup>2+</sup>-залежна АТРаза, визначається в присутності Mg<sup>2+</sup> (мМ), але за відсутності Ca<sup>2+</sup> в середовищі інкубації

Ca<sup>2+</sup>-АТРаза – низькоафінна щодо іонів Са, Mg<sup>2+</sup>-незалежна АТРаза, визначається в присутності Ca<sup>2+</sup> (мМ), але за відсутності Mg<sup>2+</sup> в середовищі інкубації

I<sub>0,5</sub> – коефіцієнт інгібування (концентрація інгібітору, при якій рівень транспортувальної чи ензиматичної активності становить 50 % від контрольної величини)

K<sub>a</sub> – уявна константа активації

K<sub>i</sub> – уявна константа інгібування

K<sub>m</sub> – уявна константа Міхаеліса

V<sub>max</sub> - максимальна початкова швидкість реакції гідролізу АТР

n<sub>H</sub> – коефіцієнт Хілла

n – кількість дослідів

## ВСТУП

Розробка нових регуляторів мембранозв'язаних систем іонного транспорту є необхідною складовою дослідження механізмів, що лежать в основі найважливіших біохімічних та біофізичних процесів, зокрема таких як електро- та фармакомеханічне sprzęження у гладеньких м'язах (ГМ). Результати такого пошуку мають багато перспектив у практичному аспекті, адже вони можуть слугувати основою створення фармакологічних препаратів спрямованих на корегування патологічних станів контрактильної функції ГМ.

Серед гладеньком'язових органів матці належить виняткова роль внаслідок її унікальної функції в організмі — виношування плоду та пологів. Порушення контрактильної активності матки є основою виникнення низки патологій, таких як безпліддя, дисменорея, ендометріоз тощо. Тому існує нагальна потреба у створенні лікарських засобів, здатних нормалізувати скоротливу активність матки і запобігати порушенням її функціонування.

У плазматичній мембрані (ПМ) клітин гладеньких м'язів функціонує  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза — електроензим, що підтримує трансмембранний градієнт іонів  $\text{Na}^+$  та  $\text{K}^+$ , і тому відіграє важливу роль у формуванні мембранного потенціалу клітини та забезпеченні низки клітинних функцій.  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза займає ключову роль у регуляції низки біохімічних процесів, то вона є потенційною мішенню для впливу фармакологічних регуляторних чинників.

Пошук ефекторів, які здатні з високою спорідненістю, селективністю та ефективністю змінювати ензиматичну активність окремих протеїнів — одне з найбільш важливих завдань сучасної біохімії. У такому контексті перспективними слід вважати каліксарени — функціоналізовані різними хімічними групами макроциклічні сполуки, які здатні спрямовано і вибірково змінювати активність ензимів та іон-транспортуючих систем клітини.

Тому **метою** роботи було вивчення закономірностей інгібіторного впливу калікс[4]арену С-1130 на АТР-гідролазні активності ПМ та скоротливу активність гладеньких м'язів матки.

## РОЗДІЛ І

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Системи транспорту іонів Са у гладеньких м'язах.

##### 1.1.1. Функціональне значення обміну іонів Са у гладеньких м'язах.

Функціонування контрактильного апарату гладеньких м'язів залежить від злагодженої роботи іон-транспортуючих систем, які створюють стан динамічної рівноваги трансмембранних концентраційних градієнтів іонів  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  і  $\text{Ca}^{2+}$  [1]. Скорочувальна здатність гладеньких м'язів в основному регулюється змінами внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  [2]. Ці зміни можуть приймати різні форми, найпростішою з яких є загальноклітинне збільшення вмісту іонів Са [3]. Скорочення гладеньких м'язів викликається збільшенням внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  внаслідок вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  із запасів у гладенькому саркоплазматичному ретикулумі та надходження  $\text{Ca}^{2+}$  із позаклітинного простору через  $\text{Ca}^{2+}$ -канали плазматичної мембрани (ПМ) [4]. Таким чином, зміни  $\text{Ca}^{2+}$  можуть бути стійкими або тимчасовими, стаціонарними або динамічними тощо [3].

1.1.2. Білкові транспортні системи, що опосередковують обмін іонів Са у гладеньких м'язах.

Регуляція внутрішньоклітинного рівня  $\text{Ca}^{2+}$  включає велику кількість білків, включаючи різні мембранні білки [4]. ПМ містить кілька типів каналів, які опосередковують надходження  $\text{Ca}^{2+}$  з позаклітинного середовища, проте основний внутрішній деполяризаційний струм потенціалів дії клітин міометрія, як прийнято вважати, виникає через надходження  $\text{Ca}^{2+}$  через  $\text{Ca}^{2+}$ -канал L-типу [5]. Існує дві системи для екструзії  $\text{Ca}^{2+}$ , а саме: низькоафінний, високоємний  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник (NCX) і високоафінна, низькоємна  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРаза (помпа  $\text{Ca}^{2+}$  ПМ, PMCA) [1]. NCX має низьку афінність до  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_{\text{Ca}} = 1$  мкМ) та високе число обертів, а PMCA властива висока спорідненість до іонів Са ( $K_{\text{Ca}} = 0,1-0,3$  мкМ), та невелика кількість обертів [6].

Активність NCX є основним способом екструзії  $\text{Ca}^{2+}$ , в умовах коли цитозольний вільний  $\text{Ca}^{2+}$  перевищує рівень спокою в клітинах, оскільки транспортна здатність  $\text{Ca}^{2+}$  NCX зазвичай у 60 разів вища, ніж у PMCA [7].  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник ПМ (NCX) представляє велике сімейство білків, які опосередковують вхід/вихід  $\text{Ca}^{2+}$  і, таким чином, модулюють передачу сигналів  $\text{Ca}^{2+}$  та різноманітні фізіологічні функції на клітинному, системному та органному рівнях [8, 9].  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник є двонаправленим транспортером, який може імпортувати три  $\text{Na}^+$  в цитоплазму в обмін на один вихід  $\text{Ca}^{2+}$  (прямий режим) або керувати витоком трьох  $\text{Na}^+$  на поглинання одного  $\text{Ca}^{2+}$  (зворотний/реверсний режим) [10, 11]. Робочий напрямок NCX визначається електрохімічними градієнтами  $\text{Ca}^{2+}$  і  $\text{Na}^+$ , а також потенціалом клітинної мембрани та ліпідним оточенням [12, 13].

У зв'язку з важливістю  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника для нормального функціонування організму людини, фармакологічне націлювання на тканиноспецифічні варіанти  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника може мати широке клінічне застосування [14, 15, 16]. Однак наразі ця перспектива залишається нереалізованою головним чином тому, що основні молекулярні механізми функціонування  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника залишаються невідомими [17].

## **1.2. Участь натрієвої помпи у функціонуванні гладеньких м'язів.**

### **1.2.1. Натрієва помпа як складова плазматичної мембрани міоцитів.**

$\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза (NKA, натрієва помпа) є інтегральним білком плазматичної мембрани клітин тварин і належить до класу ферментів транслоказ [18].  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза відповідає за генерування та підтримку трансмембранних іонних градієнтів, які мають життєво важливе значення для клітинної функції та підлеглих дій, таких як регуляція цитоплазматичного об'єму, підтримка рН, генерація потенціалів дії та вторинного активного транспорту [19, 20]. Мембранний потенціал спокою типової клітини становить -70 мВ [21]. Іони  $\text{K}^+$  матимуть тенденцію витікати з клітини, оскільки їхній рівноважний потенціал (-91 мВ) більш негативний, ніж

трансмембранний потенціал. Іони  $\text{Na}^+$  мають високу схильність до входження у клітину, оскільки як хімічний, так і електричний градієнти (рівноважний потенціал +64 мВ) сприяють поглинанню  $\text{Na}^+$ . На противагу цьому,  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза викачує 3  $\text{Na}^+$  із клітини та 2  $\text{K}^+$  у клітину за рахунок розщеплення 1 молекули АТР (цікаво, що НКА відповідає приблизно за 15-20 % витрат енергії в стані спокою в цілому організмі) [22, 23]. Тобто, завдяки функціонуванню НКА натрій і калій рухаються проти градієнтів концентрації. Таким чином, натрієва помпа підтримує градієнт вищої концентрації  $\text{Na}^+$  позаклітинно та вищої концентрації  $\text{K}^+$  внутрішньоклітинно [24]. Цей електрохімічний градієнт також створює рушійну силу для мембранного транспорту метаболітів, поживних речовин та іонів. Окрім транспорту іонів, НКА може взаємодіяти з сусідніми білками і в такий спосіб відігравати вирішальну роль у внутрішньоклітинній передачі сигналів, таких як активація загибелі клітини, виживання клітини, проліферації клітини тощо [25, 26, 27]. Залежно від типу клітини після активації  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза стимулює проліферацію здорових клітин [28, 29] або, навпаки, пригнічує проліферацію пухлинних клітин [30]. Саме тому нормальне функціонування  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази в плазматичній мембрані є життєво важливим для клітин ссавців, а регуляція цього ферменту відіграє ключову роль в етіології низки патологічних процесів [31, 32, 33, 34]. Однак більшість фармакологічних стратегій не спрямовані на активність  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази через її складність і погане розуміння механізмів, залучених до модуляції  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази [35].

### 1.2.2. Структура натрієвої помпи.

$\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза є членом сімейства Р-АТРаз, групи інтегральних мембранних білків, яким властива низка специфічних консервативних послідовностей, пов'язаних з їх гідролітичною функцією АТР, і наявністю кількох гідрофобних доменів, які утворюють трансмембранні  $\alpha$ -спіралі [36, 37]. Також важливою особливістю Р-АТРаз є утворення кислотостійкого фосфорильованого проміжного продукту як частини їх реакційного циклу

[38]. Вперше було запропоновано R. Vane Albers [39] і модифіковано Post et al. [40], що P-АТРази можуть перебувати в двох конформаційних станах E1 та E2, які відрізняються своєю спорідненістю до іонів  $\text{Na}^+$  (вища в «дефосфорильованій» конформації E1) і  $\text{K}^+$  (вища спорідненість в «фосфорильованій» конформації E2) та чутливістю до АТР і АDР.

Конформаційні зміни індукуються фосфорилуванням E1, тобто E1P спонтанно перетворюється на E2P [41, 42]. І навпаки, дефосфорилування E2P супроводжується спонтанним перетворенням E2 в E1. Після того, як  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза зв'язується з Mg-АТР і 3 іонами  $\text{Na}^+$ , ензим аутофосфорилується. Це призводить до переходу в стан E1P-ADP, де сайти зв'язування іонів не доступні для цитоплазми. Після вивільнення ADP,  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза переходить у стан E2P, і сайти зв'язування іонів відкриваються у бік цитоплазми. Зв'язування  $\text{K}^+$  запускає процес дефосфорилування і переводить  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза у  $\text{K}^+$ -блокований стан. Потім  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза переходить у стан E2 і, нарешті, повертається до стану E1, вивільняючи  $\text{K}^+$  у цитоплазму, і цикл може повторитися знову [43, 44].

$\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза складається з трьох субодиниць: альфа ( $\alpha$ ) – каталітична одиниця (~110 кДа), що складається з трьох цитоплазматичних доменів (A, актуатор; N, зв'язування нуклеотидів; P, фосфорилування) і 10-трансмембранний (ТМ)-спіральный домен (ТМD); бета ( $\beta$ ) — єдина позаклітинна одиниця ТМ (~35 кДа), необхідна для стабільності  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази та мембранного трафіку; гамма ( $\gamma$ ), FX $\gamma$ D — регуляторна одиниця (~10 кДа), яка модулює ферментативну активність шляхом зміни афінності  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази до  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  або АТР [45, 46].  $\alpha$ -субодиниця має великий внутрішньоклітинний домен із сайтом зв'язування АТР і фосфорилування, трансмембранний домен, що складається з 10 сегментів, відповідальних за транспорт іонів, і позаклітинний домен із сайтами зв'язування серцевих стероїдів [47].  $\alpha$ -субодиниця належить до підгрупи Пс родини P-АТРаз, її визначною рисою є транз'єнтне формування фосфорильованого залишку аспартату в процесі каталітичного циклу, а також модифікація окисно-

відновної чутливості  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази у процесі глутатіонілування ензиму [36, 48].  $\beta$ -субодинаця сприяє збірці  $\alpha$ -субодинаці (діє як білок-шаперон), підвищує стабільність та модулює її афінність іонів. Важлива роль  $\beta$ -субодинаці полягає в коректному введенні  $\alpha$ -субодинаці в мембрану [49].  $\gamma$ -субодинаця є тканиноспецифічною та діє як модулятор НКА: вона впливає на спорідненість ензиму до іонів і АТФ, на додаток до транспортних і стабілізаційних властивостей [50]. Наприклад, додавання  $\gamma$ -субодинаці до НКА змінює її спорідненість до одновалентних катіонів: комплекс  $\alpha\beta\gamma$  має меншу спорідненість до  $\text{Na}^+$  і  $\text{K}^+$ , ніж комплекс  $\alpha\beta$  [51]. Ізоформи  $\gamma$ -субодинаці мають різну електрофоретичну рухливість і по-різному впливають на спорідненість комплексу  $\alpha\beta\gamma$  до  $\text{Na}^+$  [52]. Крім того, FXFD також може бути субстратом для посттрансляційної модифікації [53].

### 1.2.3. Ізоформи натрієвої помпи.

Для  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази є характерною молекулярна гетерогенність, яка є результатом експресії та диференціальної асоціації багатьох ізоформ як її  $\alpha$ -, так і  $\beta$ -субодинаць [54]. Субодинаці демонструють кілька ізоформ, чотири ізоформи  $\alpha$ -субодинаці ( $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$  і  $\alpha_4$ ) та три ізоформи  $\beta$ -субодинаці ( $\beta_1, \beta_2$  і  $\beta_3$ ), які можуть об'єднуватися в 12 різних ізоферментів  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази з різною функціональною активністю для тканини. Сім ізоферментів  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази також є специфічними ізоформами  $\gamma$ -субодинаці [55]. Відмінності амінокислотних послідовностей між ізоформами незначні [56].

Ізоформи натрієвої помпи демонструють тканинно-специфічний патерн експресії. Поєднання  $\alpha_1$ -субодинаці з  $\beta_1$ -субодинацею зустрічається майже в кожній тканині [57], а також  $\alpha\beta$  є основним ізоферментом нирки, тканини, яка класично використовувалася як для препаративної  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази та наступних біохімічних експериментів [58]. На відміну від широкого розподілу  $\alpha_1$  і  $\beta_1$  в тканинах, інші комбінації  $\alpha$ - і  $\beta$ -поліпептидів є менш розповсюдженими. Патерн експресії ізоформи  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази, як на рівні мРНК, так і на рівні білка, був найбільш детально вивчений на щурах [59].

$\alpha 4$ -ізоформа є специфічною для яєчок [60].  $\alpha 2$ -ізоформа переважає в адипоцитах [61], м'язах [62], серці [63], мозку [64] і гладеньких м'язах [65], а  $\alpha 3$  у великій кількості міститься в нервових тканинах [66].  $\beta 2$ -ізоформа міститься в скелетних м'язах [62] і нервових тканинах [67], тоді як  $\beta 3$  присутня в яєчках, сітківці, печінці та легенях [68].

#### 1.2.4. Ізоформи натрієвої помпи у вісцеральних гладеньких м'язах.

З усіх наразі відомих ізоформ  $\alpha$ -субодиниці  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази наявність в гладеньких м'язах підтверджена лише для двох ізоформ —  $\alpha 1$  і  $\alpha 2$  [69].  $\alpha 1$ -ізоформа широко експресується майже в усіх тканинах і має відносно рівномірний розподіл у клітинах [70]. Навпаки,  $\alpha 2$ -ізоформа експресується в більш обмеженому наборі типів тканин і має точковий клітинний розподіл [69], вона локалізована разом з NCX в областях, де саркоплазматичний ретикулум (SR) прилягає до плазматичної мембрани [70, 71]. Через цей специфічний локалізований розподіл було висунуто гіпотезу, що НКА може модулювати не лише  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , але й  $\text{Ca}^{2+}$  навантаження SR [71]. Однак регуляція цієї взаємодії до кінця не з'ясована.

#### 1.2.5. Біофізичні та біохімічні основи зв'язку між натрієвою помпою та системами транспорту іонів Ca у гладеньких м'язах.

Було з'ясовано, що  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза є важливою для регуляції внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ . Фізичний зв'язок між  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРазою, NCX і запасом кальцію у саркоплазматичному ретикулумі вперше був продемонстрований у гладеньком'язових клітинах [71]. Вважається, що в плазматичній мембрані гладеньком'язових клітин  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза, яка містить  $\alpha 2$ - і  $\alpha 3$ -субодиниці, дуже близько контактує з NCX (ізоформа 1, NCX1) та ендоплазматичним ретикуломом [72, 73].  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза взаємодіє з NCX, утворюючи специфічний кальцієвий сигнальний мікродомен у багатьох різних типах клітин, включаючи гладеньком'язові клітини. Крім того, N-кінці субодиниць  $\alpha 2$  і  $\alpha 3$   $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази містять загальний структурний мотив, який дозволяє цим субодиницям націлюватися на мікродомени плазматичної

мембрани, що забезпечують сполучення сарколеми і ендоплазматичного ретикулуу [74]. Активність  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника у цих мікродоменах регулюється локальними концентраціями  $\text{Na}^+$  або  $\text{Ca}^{2+}$ , але сайти зв'язування іонів для регуляції не є сайтами, що беруть участь у транспортуванні іонів [75]. Хоча наразі не існує специфічного агоніста зворотного режиму роботи NCX, проте відомо, що збільшення внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Na}^+$  спричинює NCX-залежний приплив  $\text{Ca}^{2+}$  всередину клітини і викликає тимчасове скорочення гладеньких м'язів судин [76]. Таким чином, маємо можливість ініціації переходу NCX у реверсний режим роботи за рахунок специфічного інгібування NKA. Зміни активності NKA, зокрема  $\alpha 2$ -ізоформи, через інгібування серцевими глікозидами призводять до змін у клітинному гомеостазі  $\text{Ca}^{2+}$  і, в деяких випадках, до посиленого навантаження внутрішньоклітинних запасів  $\text{Ca}^{2+}$  [77]. Пояснення навантаження депо полягає в тому, що підвищення внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Na}^+$  уповільнює виведення  $\text{Ca}^{2+}$  із цитозолу через NCX і дозволяє  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРази сарко(ендо)плазматичного ретикулуу (SERCA) секвеструвати більше  $\text{Ca}^{2+}$  у депо [78]. Отже, дослідження механізмів модуляції функціонального стану натрієвої помпи є перспективними з огляду на можливості вирішення фундаментальних біологічних питань та створення фармакологічних речовин, націлених на корекцію патологічних станів, що пов'язані з дисфункцією скорочення-розслаблення гладеньких м'язів.

1.2.6. Регуляція та модифікація активності натрієвої помпи плазматичної мембрани.

Найважливішим локальним регуляторним механізмом для  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази є внутрішньоклітинні та позаклітинні концентрації  $\text{Na}^+$  і  $\text{K}^+$ , проте на активність ензиму також впливають гіпоксія, пурини, окислювальний стрес, рН, оксид азоту та АТР [79].

Гіпертонія призводить до ремоделювання сайту зв'язування  $\text{Na}^+$  молекули NKA в серці [80]. Ця адаптація відбувається у відповідь на

підвищену внутрішньоклітинну концентрацію натрію ( $[Na^+]_i$ ), викликану підвищенням артеріального тиску, і вона не залежить від рівня синтезу оксиду азоту (NO). Навпаки, підвищена активність NO-синтази була пов'язана з підвищенням спорідненості ферменту до АТР, і відповідним зростанням ефективності використання АТР як субстрату [81].

Зміни в доступності кисню модифікують активність  $Na^+,K^+$ -АТРази [81]. Було встановлено, що транспортна та гідролітична активність НКА однаково пригнічена як у гіпоксичних, так і в гіпероксичних умовах. Гіпоксія призводить до пошкодження  $Na^+,K^+$ -АТРази за двома механізми: 1) окислений комплекс НКА розкладається протеосомально, що призводить до зниження експресії цього іонного насоса на клітинній мембрані; 2) окислювальний стрес активує протеїнкіназу С (PKC), яка фосфорилує НКА, в результаті чого НКА інтерналізується з клітинної мембрани [82, 83].

$Na^+,K^+$ -АТРази має здатність зв'язувати групу хімічних речовин — кардіотонічні стероїди (або серцеві глікозиди) [84]. Показано, що деякі рослини містять кардіотонічні стероїди, такі як убаїн, дигоксин, дигітоксин тощо [85, 86]. Проте серцеві глікозиди виробляються не лише рослинами: у тканинах ссавців було виявлено п'ять різних серцевих глікозидів, включаючи убаїн, дигоксин, маринобуфагенін, телоцинобуфагін і 19-норбуфалін [87]. Ендогенні серцеві глікозиди виробляються в надниркових залозах і гіпоталамусі [87]. Кардіотонічні стероїди мають багато фізіологічних і фармакологічних ефектів, зокрема в серцево-судинній системі, нирковій і мозковій тканинах [73, 88]. Також можливим є використання серцевих глікозидів для лікування раку та аутоімунних захворювань [89, 90].

Чутливість  $Na^+,K^+$ -АТРази до кардіотонічних стероїдів визначається сайтом зв'язування цих сполук, що розміщений на позаклітинній частині  $\alpha$ -субодиниці між трансмембранними доменами M1–M2, M5–M6 та M7–M8 [91, 92]. Сайт зв'язування серцевих глікозидів часто називають сайтом зв'язування убаїну, оскільки це кардіотонічний стероїд, який найчастіше використовується [93]. Встановлено, що найвищою спорідненістю до кардіотонічних стероїдів  $Na^+,K^+$ -АТРаза володіє у фосфорильованому

конформаційному стані E2 [94]. Цим пояснюється інгібувальна дія серцевих глікозидів на NKA: молекули KTC зв'язують і стабілізують  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази в конформації E2, пригнічуючи транспортну активність ферменту [95]. Результатом пригнічення NKA, індукованого серцевими глікозидами, є збільшення сили скорочення м'язів. Підвищена внутрішньоклітинна концентрація  $\text{Na}^+$  обмежує екструзію  $\text{Ca}^{2+}$  через  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник, що призводить до посиленого поглинання  $\text{Ca}^{2+}$  в саркоплазматичний ретикулум  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРазию та збільшення індукованого зростанням  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  вивільнення кальцію з CP у процесі скорочення м'язу [96].

Відмінні механізми регуляції  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази виникають після зв'язування кардіотонічних стероїдів зі специфічним сайтом на  $\alpha$ -субодиниці  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази, але при низьких концентраціях ефектора ( $\leq$  нМ), яких недостатньо для інгібування транспорту іонів [97]. В результаті активуються: міжклітинне сигналювання, коливання внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ , транскрипція генів, ріст і проліферація клітини [98].

### **1.3. Властивості та механокінетика гладеньких м'язів матки.**

#### 1.3.1. Властивості тканин гладеньких м'язів.

Гладенькі м'язи (ГМ) можна знайти в усіх системах органів: шлунково-кишкового тракту, серцево-судинної (кровоносні та лімфатичні судини), ниркової (сечовий міхур), сечівник та сечоводи (статеві шляхи чоловіків і жінок), дихальних шляхів, покривів (м'язи, що піднімають волосся), сенсорної (циліарний м'яз і райдужна оболонка ока) [99]. Клітини гладеньких м'язів (ГМК) не мають поперечно-посмугованих структур, характерних для серцевих і скелетних м'язів: ГМК також містять актинові і міозинові волокна, проте вони розташовані у вигляді листів, а не веретен, що зумовлює гладкий вигляд клітин цього типу м'язів [100]. На відміну від біполярних міозинових філаментів, однобічно полярні філаменти гладких м'язів виявляються менш стабільними, проте здатними змінювати свою довжину шляхом полімеризації та деполімеризації [101]. Також, як результат відсутності саркомерної

організації філаментів, гладкі м'язи не містять тропонінового комплексу, який є необхідним для скорочення скелетних м'язів, і, таким чином, мають інший механізм контролю надходження  $\text{Ca}^{2+}$  у клітину [102]. ГМК іннервуються вегетативною нервовою системою [103]. Крім того, скорочення гладенької мускулатури контролюється гормонами, аутокринними/паракринними агентами тощо [104]. У випадку ГМ шлунково-кишкового тракту також наявна нейрональна система забезпечення регуляції скорочень і здійснення перестатальтики — надзвичайно добре розвинута інтрамуральна мережа нейронів (сплетення Ауербаха та Мейснера) [105].

Гладенькі м'язи класифікують за ембріологічними, анатомічними, фізіологічними, молекулярними ознаками [106]. Схемою класифікації гладеньких м'язів на основі їх функції є дихотомія скорочень гладеньких м'язів на фазні та тонічні. Фазова гладенька мускулатура характерна для шлунково-кишкової та сечостатевої систем і виявляє ритмічну скорочувальну активність [107, 108]. Тонічна гладенька мускулатура є характерною для дихальної та кровоносної систем, і вона схильна до тривалих скорочень [109].

Гладенькі м'язи поділяються на два типи: однокомпонентні і багатокомпонентні [106]. Однокомпонентні гладенькі м'язи складаються з кількох клітин, з'єднаних через коннексини, які можуть стимулюватися синхронно лише з одного синаптичного входу [110]. Коннексини формують канали з низьким електричним опором між клітинами і забезпечують шляхи для ефективного проведення потенціалів дії та сприяють міжклітинній комунікації між групами гладеньких м'язових клітин [111, 112]. У багатокомпонентних гладеньких м'язах кожна клітина отримує синаптичний сигнал окремо, тому багатокомпонентний гладенький м'яз має набагато точніший контроль збудження [110]. На основі наведених вище класифікацій можна виокремити дві функціональні групи. Вісцеральна гладенька мускулатура зазвичай розглядається як фазова, однокомпонентна, а гладенька мускулатура судин — як тонічна, багатокомпонентна, однак існує значна фенотипова різноманітність гладких м'язів як вісцеральної, так і судинної систем [113].

### 1.3.2. Міометрій — будова і властивості.

Стінка матки утворена гладенькою мускулатурою — міометрієм, який належить до вісцеральних гладеньких м'язів та є функціональним синцитієм [114]. Таким чином, домінуюча клітинна популяція стінки матки складається з клітин, які містять скоротливий апарат, відповідальний за генерацію скорочувальної сили. Міометрій складається з трьох шарів: внутрішній і зовнішній шари в основному містять клітини гладеньких м'язів, а проміжний шар є рясно васкуляризованим [115]. М'язові волокна внутрішніх циркулярних шарів розташовані концентрично навколо довгої осі матки, а зовнішнього поздовжнього шару — паралельно.

Клітини міометрія мають веретеноподібну форму, розміром від 2 до 10 мкм в діаметрі і від 200 до 600 мкм в довжину [116]. Веретеноподібні м'язові клітини об'єднані в пучки по 10–50 клітин [117]. Крім «робочих» гладеньком'язових клітин тканина міометрія містить клітини-регулятори спонтанної активності, які мають подібні до інтерстиціальних клітин Кахаля (ІСС, телоцитів) функціональні характеристики [118]. Ці клітини мають невелику сому і від 1 до 5 довгих виростів – телоподій, збагачених мітохондріями, ендоплазматичним ретикулумом та зі значною кількістю кавеол у ПМ [119, 120]. ІСС-подібні клітини у міометрії модулюють частоту спонтанних скорочень (аналогічно до ІСС в гладеньком'язових шарах шлунково-кишкового тракту), на противагу «робочим» міоцитам, які відповідають за визначення їх амплітуди [121]. Реєстрація розподілу іонів  $\text{Ca}^{2+}$  на зрізах живої тканини міометрія свідчить про те, що передача сигналів скорочувальної активності починається на кордонах пучків гладеньких м'язів, у місцях, де розташовані ІСС-подібні клітини міометрія [122].

### 1.3.3. Механокінетика процесів скорочення-розслаблення міометрія.

Контракційна здатність міометрія є складним і динамічним фізіологічним процесом [123, 124]. Подібно до багатьох вісцеральних гладеньких м'язів, скорочення міометрія мають фазовий характер; вони демонструють збереження тонуспокою з циклами дискретних,

періодичних скорочень різної частоти, амплітуди та тривалості [125]. Спонтанна електрична активність у м'язах матки складається з періодичних спалахів потенціалів дії [126]. Потенціали дії в міометрії є результатом залежних від напруги та часу змін іонної проникності мембрани, зокрема, потенціал дії виникає, коли надходження іонів  $\text{Na}^+$  всередину клітини створює потенціал протилежний за знаком потенціалу спокою [127].

Клітини міометрія використовують перехресний цикл між актином і міозином для розвитку скорочення, а іони  $\text{Ca}^{2+}$  служать для ініціації цього процесу [128]. Скорочення матки ініціюються тимчасовим підвищенням концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазмі, що відбувається через надходження кальцію з позаклітинної рідини в клітину через керовані напругою  $\text{Ca}^{2+}$ -канали L-типу на поверхневій мембрані та/або вивільнення кальцію з саркоплазматичного ретикулуму (CP) [129]. Інші внутрішні струми міометрія, які, ймовірно, є функціональними, включають ті, що опосередковуються  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами T-типу,  $\text{Na}^+$ -каналами та  $\text{Cl}^-$ -каналами [130]. Підвищення внутрішньоклітинної концентрації кальцію ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) викликає активацію кальмодуліну (CalM), цитозольного білка, залежного від кальцію, здатного зв'язувати чотири іони  $\text{Ca}^{2+}$  [131]. Утворення комплексу  $\text{Ca}^{2+}$ -CalM активує кіназу легкого ланцюга міозину (MLCK), що призводить до негайного та значного збільшення фосфорилування регуляторного легкого ланцюга міозину-20 (MLC20) і подальшої ініціації перехресного мостового циклу [132]. Фосфорилування MLC20 за допомогою MLCK служить основним фактором, що впливає на величину та тривалість скорочення [133]. Розслаблення опосередковується дефосфорилуванням міозину фосфатазою легких ланцюгів міозину та зниженням концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  через його екструзію з клітини та/або секвестрування в саркоплазматичний ретикулум [134].

Скорочення міометрія є фізіологічно важливим, оскільки адекватна скорочувальна здатність матки сприяє транспортуванню сперматозоїдів до фаллопієвих труб, сприяє імплантації запліднених яйцеклітин і видаляє фанмерти тканинного матеріалу під час менструального циклу [135, 136].

Аберрантні скорочення матки можуть призвести до передчасних пологів та інших ускладнень і є важливою причиною материнської захворюваності та смертності [137, 138]. Наприклад, атонія матки, тобто неспроможність матки адекватно скоротитися у відповідь на ендогенний окситоцин під час пологів, є основною причиною післяпологової кровотечі, яка є одним із 5 основних етіологічних факторів материнської смертності [139].

#### **1.4. Каліксарени та їх біологічна активність.**

##### **1.4.1. Структура та фізико-хімічні властивості каліксаренів.**

Полігідроксильовані платформи, такі як каліксарени, резорцинарени або пірогалоарени, є перспективними нанорозмірними сполуками, які здатні селективно і контрольовано змінювати активність ензимів та іон-транспортуючих систем, є каліксарени [140, 141].

Калікс[*n*]сарени сформовані як ліпофільна чаша з *n* бензольних одиниць, з'єднаних метиленовими містками в орто-положенні, яка може бути функціоналізована різними хімічними групами [142, 143]. Кількість одиниць ароматичних сполук може бути від 4 до 20, хоча каліксарени з 4-8 бензольними фрагментами є найпоширенішими [144]. Дослідження стабільності менших каліксаренів (калікс[3]аренів) виявило структурне напруження, наслідком якого є нестабільність молекули [145]. Структура калікс[*n*]аренів подібна до інших полігідроксильованих макроциклів, а розмір порожнини макроциклу залежить від кількості ароматичних циклів [146]. Наприклад, діаметр верхнього вінця каліксаренової чаші був оцінений як 3,8 Å для калікс[4]аренів і 5,0 Å для калікс[6]аренів [147].

Каліксарени являють собою універсальний клас макроциклічних сполук у супрамолекулярній хімії, які можуть утримувати невеликі молекули або іони у своїх чітко визначених гідрофобних порожнинах у процесі утворення комплексу «господар — гість»: можливість розміщення в різну за розмірами (*n* = 4, 6, 8 і більше) ліпофільну порожнину, утворену бензольними кільцями,

активних фармацевтичних інгредієнтів (солей, іонів, амінокислот та ін.), або вже відомих фармакологічних засобів [148, 149, 150]. Олігомерна природа каліксаренів, тобто наявність повторюваних фенольних одиниць у циклічному масиві, робить ці макроцикли ідеальними каркасами для побудови багатовалентних лігандів з підвищеною спорідненістю до цільових макромолекул, таких як білки, нуклеїнові кислоти та ліпіди [151].

#### 1.4.2. Прояви біологічної активності каліксаренів.

Структура каліксаренів, а також їх здатність до самоорганізації та молекулярного розпізнавання, обумовили перспективність їх дослідження [152]. Цей клас сполук має значний потенціал слугувати платформою для розробки біологічно активних речовин [153]. Каліксарени та їх похідні використовуються як носії для протиракових [154, 155], протизапальних [156], антитромботичних [157], антифунгальних [158], антибактеріальних [159], протимікробних [160] препаратів. Крім того, для простих похідних каліксаренів не було виявлено токсичності та імуногенних властивостей [161, 162]. Саме тому каліксарени є важливими біосумісними молекулами для покращення розчинності, хімічної реактивності та зниження цитотоксичності та імуногенності лікарських засобів [163].

#### 1.4.3. Перспективи використання каліксаренів.

Накопичені за останні 40 років досліджень відомості про хімію каліксаренів та особливості їх синтезу дозволяють чітко контролювати реакційну здатність, конформацію та структуру вихідних макроциклів. Здебільшого, каліксарени синтезують нагріванням суміші пара-трет-бутилфенолу і формальдегіду: завдяки зваженому вибору основи, температури реакції та часу реакції каліксарени різної форми та розміру кілець можуть бути синтезовані з хорошим виходом і чистотою [164]. Функціональні групи, такі як карбоксилати, фосфати або сульфонати, можуть бути введені в гідроксильовану платформу каліксарену за допомогою легкодоступних реакцій [140, 165]. Таким чином, здатність утворювати

супрамолекулярні комплекси з біологічно важливими молекулами та іонами, а також особливості будови та варіативність структурної модифікації каліксаренів дозволяють із доцільними фінансовими та трудовими витратами синтезувати на їх основі якісні таргетовані ефектори [166]. Дійсно, каліксарени набули значення в терапевтичній сфері, особливо сприяючи вдосконаленню систем введення активних речовин [167, 168, 169, 170].

Серед усіх калікс[*n*]аренів калікс[4]арени представляють особливий інтерес через їх легкодоступність, унікальні конформаційні особливості та легкі постмакроциклічні модифікації як на нижньому, так і на верхньому вінцях [171]. Калікс[4]арени можуть бути функціоналізовані такими хімічними групами як амідні, іміні, сірка, семікарбазон і алкільні групи, серед іншого, утворюючи широкий спектр макроциклічних сполук з різними вибірковістю, розчинністю і ступенем гідрофобності [172]. Функціональні особливості калікс[4]аренів обумовили те, що вони поступово стають одними з найбільш вивчених макромолекул, що застосовуються в широкому спектрі галузей, включаючи: доставка ліків [173, 174, 175]; доставка генів [176, 177, 178]; каталіз [179, 180, 181]; атомна промисловість [182, 183]; розробка сенсорів [184, 185, 186]; синтез полімерів [187, 188, 189].

#### 1.4.4. Каліксарени-інгібітори натрієвої помпи.

Дослідження науковців відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна виявили, що окремі каліксарени мають здатність селективно, не зачіпаючи інші системи активного транспорту іонів через плазматичну мембрану, інгібувати роботу  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази. Встановлено, що каліксарен-фосфонові кислоти — калікс[4]арени С-97, С-99, С-107 — у концентрації 100 мкМ пригнічують ферментативну активність  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази на 86-98 %, тоді як на базальну активність  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРази практично не впливають, а також вони більш ефективно, ніж убаїн, пригнічують ферментативну активність натрієвої помпи [190, 191]. Серед каліксаренів з шифрами С-97, С-99, С-107 найефективніший інгібуючий вплив на активність  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази має каліксарен-метиленбісфосфонова кислота — каліксарен С-97 [190].

## РОЗДІЛ II

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

#### 2.1. Структура та синтез калікс[4]арену С-1130.

Синтез та опис фізико-хімічних властивостей калікс[4]арену С-1130 (5,17-ди(фосфоно-2-піридилметил)аміно-11,23-ди-*трет*-бутил-26,28-дигідрокси-25,27-диоктилоксикалікс[4]арен) (рис. 1) проводилися у відділі хімії макроциклічних сполук Інституту органічної хімії НАН України під керівництвом академіка НАН України, професора В.І. Кальченка. Для цього було використано методи ЯМР та інфрачервоної спектроскопії.

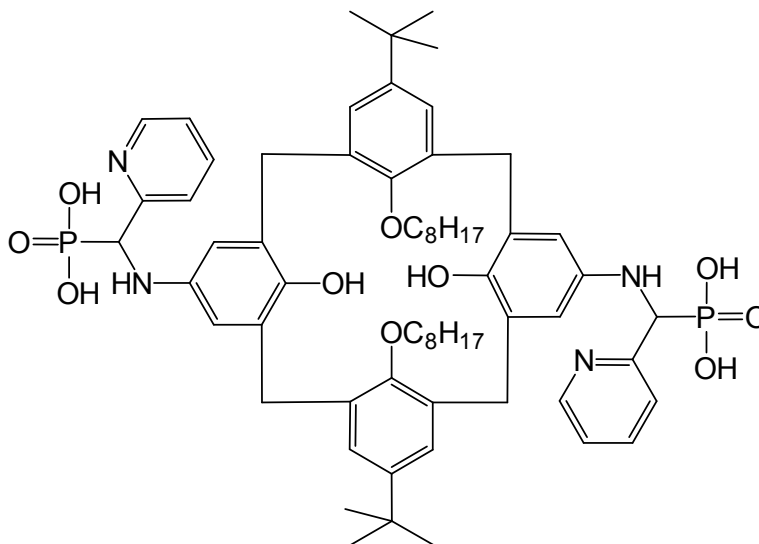


Рисунок 2.1.1 — Структурна формула калікс[4]арену С-1130.

#### 2.2. Тварини та тканини, які було використано в дослідженнях.

У ході дослідження як об'єкт вивчення інгібіторної дії калікс[4]арену С-1130 на активність  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази ПМ використовувались препарати гладенької мускулатури матки невагітних щурів та свиней. Лабораторних тварин, а саме невагітних щурів, утримували відповідно до стандартного раціону віварію. Тварин піддавали наркозу за допомогою витримання у камері, насиченій парами хлороформу, після чого тварин забивали методом декапітації та видаляли матку для проведення експериментальної роботи. Дослідження проводилося відповідно до Хельсінської декларації (Всесвітня медична асамблея, 1964), Міжнародних принципів Європейської конвенції

про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), Декларації принципів толерантності (28 сесія ЮНЕСКО, 1995), Універсальної декларації по біоетиці та правах людини (ООН, 1997), норм Конвенції про захист прав людини у зв'язку з впровадженням нових біомедичних технологій, прийнятою у 1997 році у м. Ов'єдо (Іспанія) та підписаною Верховною Радою України у 2002 році, Закону України № 3447 IV «Про захист тварин від жорстокого поводження».

### **2.3. Методи препаративної біохімії.**

#### **2.3.1. Виділення суспензії гладеньком'язових клітин з матки щурів.**

Суспензію ГМК матки виділяли з невагітних щурів, що попередньо (за 16 годин до забору тканини) естрогенізувалися. Естрогенізацію проводили для збільшення розмірів матки. Процедура естрогенізації передбачала одноразове внутрішньом'язове введення 50 мкл 0,1 % розчину естрадіолу. Клітинну суспензію одержували з використанням колагенази і соєвого інгібітору трипсину за допомогою методу Mollard у частково модифікованому вигляді.

Виділений орган матки щура звільняли від жиру і сполучної тканини та переносили в розчин Хенкса (розчин А) наступного складу: 136,9 мМ NaCl; 5,36 мМ KCl ; 0,44 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,26 мМ  $\text{NaHCO}_3$ ; 0,26 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 1,26 мМ  $\text{CaCl}_2$ ; 0,4 мМ  $\text{MgCl}_2$ ; 0,4 мМ  $\text{MgSO}_4$ ; 5,5 мМ глюкоза; 10 мМ HEPES (pH = 7,4 при 37°C). Подрібнення тканини здійснювали шляхом розрізання її ножицями на невеликі шматочки (середній розмір – 2×2 мм) і відмивання від крові та високих концентрацій іонів Ca (3 рази по 5 хв) в 5 мл розчину Б (розчин Хенкса вищеприведеного складу, який замість  $\text{MgCl}_2$  і  $\text{MgSO}_4$  містить  $\text{CaCl}_2$  в концентрації 0,03 мМ). Далі тканинний матеріал інкубували протягом 20 хв при 37°C у режимі постійного перемішування у розчині для покращення дисоціації тканини об'ємом 2 мл, яке являє собою розчин колагенази (0,1 %), BSA (0,1 %) і соєвого інгібітора трипсину (0,01 %), що був приготовлений на розчині Б. Через 20 хв середовище дисоціації тканини

відбирали, а тканину переносили в вільний від ензиматичного препарату розчин Б. Паралельно, для більш швидкої дисоціації клітин тканинний препарат обережно піпетували за допомогою серологічної піпетки (щонайменше 30 разів протягом 2-3 хв). Розчин Б, який містив дисоційовані клітини, відбирали. На противагу цьому, тканинний препарат переносили в нову порцію середовища для ініціації дисоціації клітин, що містить колагеназу та соєвий інгібітор трипсину. Наведена процедура повторювалась 5-6 разів. Дві перші порції розчину Б, що використовувався для піпетування (і не містив колагенази та соєвого інгібітору трипсину, але містив дисоційовані клітини), відкидали, у зв'язку з тим, що вони містили значну кількість фрагментів тканини та клітин. Остані 3-4 порції збирали, об'єднували і центрифугували 10 хв при 80g. Отриманий клітинний осад промивали розчином, у складі якого містилися 25 мМ HEPES-KOH (pH=7,4 при 8°C), 150 мМ NaCl і 0,4% БСА. Далі проводилося повторне центрифугування (аналогічно до згаданого вище режиму). Потім клітини переносили в середовище зберігання, яке містило 25 мМ HEPES-KOH (pH=7,4 при 8°C), 150 мМ NaCl, і зберігали при низькій температурі (на льодяній бані).

### 2.3.2. Виділення фракції плазматичних мембран клітин міометрія свині.

Для отримання ПМ з міометрія матки свині, виконувалися наступні кроки: спочатку тканину забирали через 10-20 хвилин після забою тварини і піддавали очищенню від жиру, видаляли ендометрій та промивали у фізіологічному розчині, а потім зберігали у порціях по 10-20 грамів у рідкому азоті. Усі операції виконувалися на льоду з метою уникнення денатурації білків (при температурі 4°C). Далі 15 г тканини подрібнювали спочатку ножицями, а потім за допомогою ножового гомогенізатора типу «Політрон» на швидкості 10000 об/хв, проводячи 3 цикли по 20 секунд з перервами по 2 хвилини для охолодження, у 60 мл середовища гомогенізації, у якому співвідношення «тканина:середовище гомогенізації» становило 1:4. Середовище гомогенізації містило 20 мМ Tris-HCl (pH 7,4 при 8°C), 250 мМ сахарози, 2 мМ етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА) та 600 мМ KCl.

Отриманий препарат піддавали центрифугуванню протягом 20 хвилин при 3000 g з метою видалення тканинних обривків, ядер та мітохондрій. Надосадову рідину, що містила мікосомальну фракцію, нашаровували на ступінчатий градієнт сахарози та центрифугували. Потім інтерфазну зону відбирали пастерівською піпеткою. До отриманої суспензії додавали охолоджений бідистилят і осаджували протягом 1,5 години при 105000 g на кутовому роторі. Осад з везикулами ПМ, суспендували у 3 мл середовища із складом 20 мМ Tris-HCl (pH 7,4 при 8°C) та 150 мМ KCl, та в подальшому зберігали в рідкому азоті. Вищезазначений метод гарантує одержання фракції ПМ, яка містить в собі інвертовані везикули.

Кількість білка в мембранному препараті визначається методом Bradford за його реакцією з реагентом Кумасі G250. Як стандарт використовувався БСА. Цей метод має високу чутливість при визначенні концентрацій білка в межах 2-120 мкг/мл і дає стійке забарвлення розчину білка (не зникає протягом щонайменше 1 години). Метод ґрунтується на реакції аніонної форми реагенту Кумасі з позитивно зарядженими амінокислотами білка, що зумовлює зміну кольору барвника з червоного на синій (максимум поглинання при 595 нм).

2.3.3. Виділення препаратів міометрія щурів для тензометричних експериментів.

Для аналізу впливу калікс[4]арену С-1130 на скоротливу активність гладеньких м'язів матки дослідження проводили на препаратах міометрія щурів лінії Wistar. Роги матки розрізали на смужки розміром 2×10 мм у поздовжньому напрямку, зберігаючи ендотеліальний шар інтактним. Для вивчення спонтанних скорочень використовували фрагменти рогів матки, розташовані з боку яєчників. Усі етапи дослідження проводили у розчині Кребса (мМ): 120,4 NaCl; 5,9 KCl; 15,5 NaHCO<sub>3</sub>; 1,2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,2 MgCl<sub>2</sub>; 2,5 CaCl<sub>2</sub>; 11,5 глюкоза (pH 7,4).

## 2.4. Флуоресцентні методи.

2.4.1. Дослідження міоцитів методом лазерної скануючої конфокальної мікроскопії.

Для проведення конфокально-мікроскопічних досліджень необхідно було попередньо іммобілізувати суспензію ГМК (100 мкл) на предметному склі, обробленому полі-L-лізином (200 мкл) (2 год при температурі 25°C). Міоцити, які не іммобілізувалися за час витримки на предметному склі, відмиваються розчином Б (склад наведено вище). Далі до іммобілізованих клітин додається 100 мкл розчину Б.

Для оцінки змін у концентрації іонів кальцію ( $[Ca^{2+}]_i$ ) у міоцитах використовувалися зонди Hoechst 33342 (для маркування ядер клітин) та fluo-4 AM (для реєстрації змін у концентрації  $Ca^{2+}$  у клітині). Для поліпшення розподілу зондів у розчині додавали Pluronic (0,2%). Вимірювання здійснювали за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопу LSM 510 META від «Carl Zeiss» (Німеччина) у режимі Multi Track.

Флуоресценцію зонда Hoechst 33342 збуджували діодним лазером на довжині хвилі 405 нм та реєстрували за допомогою світлофільтра BP 420-480 нм, а флуоресценцію fluo-4 AM збуджували аргонним лазером на довжині хвилі 488 нм та реєстрували за допомогою світлофільтра BP 505-530 нм.

Для аналізу обирали клітини веретеноподібної форми з чітко видимими ядрами, забарвленими за допомогою ДНК-чутливого флуоресцентного барвника Hoechst. Вимірювання тривало 5 хвилин і проводилося у режимі запису низки послідовних знімків клітин (часовий інтервал між знімками тривав 15-20 секунд). У цей час до досліджуваного зразку вводили розчин  $Ca^{2+}$  (2 мМ) для перевірки цілісності ПМ. Після цього вводили ДМСО (2 мкл) або аліквоту калікс[4]арену C-150 (20 мкМ) для контролю, або калікс[4]арен C-1130 (20 мкМ) для експерименту.

Для кількісного аналізу використовували функцію ROI (Region of Interest), яка дозволяє генерувати графіки залежності інтенсивності флуоресценції від часу, усереднені в межах заданої області.

## 2.5. Ензимологічні методи.

### 2.5.1. Оцінка активності АТР-гідролаз у фракції плазматичних мембран.

#### 2.5.1.1. Оцінка активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази у фракції плазматичних мембран.

«Загальну» АТРазну активність фракції ПМ ГМК досліджували у середовищі об'ємом 0,4 мл наступного складу: 3 мМ АТР, 3 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 0,95 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 25 мМ  $\text{NaCl}$ , 125 мМ  $\text{KCl}$ , 1 мМ ЕГТА, 20 мМ Нерес-tris-буфер (рН 7,4), 1  $\text{NaN}_3$ , 1 мМ убаїн, 0,1 мкМ тапсигаргін, 0,1 % дигітонін. Кількість білка у фракції ПМ — 20-30 мкг; температура — 37°C; час інкубації — 4 хв.

Ензиматичну реакцію ініціювали додаванням до інкубаційної суміші 50 мкл фракції ПМ (8°C), а зупиняли її протікання — введенням 1 мл «стоп»-розчину, у якому містилися 1,5 М натрій оцтовокислий, 3,7 % формальдегід, 14 % етанол, 5 % трихлороцтова кислота (рН 4,3 при 8°C).

Як контроль на неензиматичний гідроліз АТР брали аналогічне середовище інкубації, але без фракції ПМ. Для оцінки кількості ендogenous  $\text{P}_i$  в препараті використовувалась аліквота фракції ПМ, розчинена у воді. Таким чином, «загальна» АТРазна активність являла собою різницю між кількістю утвореного  $\text{P}_i$  в присутності фрагментів ПМ та без них, з урахуванням вмісту ендogenous  $\text{P}_i$  в фракції ПМ. Для визначення кількості продукту реакції застосовувався метод W. Rathbun та V. Betlach: до зразку додавали 0,05 мл 2% розчину  $\text{MoNH}_4$ , перемішували та вносили 0,1 мл 6,75 мМ розчин  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Через 15 хвилин оптичну густину зразку визначали за допомогою спектрофотометра SPECORD UV VIS (довжина хвилі 660 нм).

«Базальну»  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРазну активність у зразку визначали у аналогічному середовищі інкубації, але за умови відсутності в середовищі інкубації іонів  $\text{Ca}^{2+}$ .  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазну активність обраховували як різницю між величиною «загальної» АТРазної і «базальної»  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активностями. Встановлене середнє значення питомої активності  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ становить  $3,4 \pm 0,3$  мкмоль  $\text{P}_i$ /мг білка за 1 год ( $M \pm m$ ;  $n = 7$ ).

2.5.1.2. Оцінка  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРазної та  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності у фракції плазматичних мембран.

«Загальну»  $\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазну активність визначали у фракції ПМ ГМК в середовищі інкубації об'ємом 0,4 мл наступного складу: 1 мМ АТР, 3 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 125 мМ  $\text{NaCl}$ , 25 мМ  $\text{KCl}$ , 1 мМ ЕГТА, 20 мМ Нерес-Tris-буфер (рН 7,4), 1 мМ  $\text{NaN}_3$ , 0,1 мкМ тапсигаргін, 0,1 % дигітонін. Кількість білка у фракції ПМ — 20-30 мкг; температура —  $37^\circ\text{C}$ ; час інкубації — 4 хв.

Ініціацію та зупинку ензиматичної реакції і визначення продукту реакції  $\text{P}_i$  здійснювали аналогічно до методики описаної у пункті 2.5.1.1.

«Базальну»  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРазну активність визначали в такому ж середовищі інкубації, як і «загальну» АТРазну активність, але за умови додавання селективного інгібітору  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази — убаїну (1 мМ). Середнє значення питомої ензиматичної активності «базальної»  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРази складало  $18,1 \pm 1,2$  мкмоль  $\text{P}_i$ /мг білка за 1 год ( $M \pm m$ ;  $n=7$ ).

Убаїнчутливу  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРазну активність обраховували як різницю між «загальною»  $\text{Mg}^{2+}, \text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРазної і «базальною»  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності. Встановлене середнє значення питомої ензиматичної активності  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази складало  $10,2 \pm 0,7$  мкмоль  $\text{P}_i$ /мг білка за 1 год ( $M \pm m$ ;  $n=7$ ).

## 2.6. Тензометричні методи.

### 2.6.1. Реєстрація скоротливої активності.

Тензометричні експерименти проводили з використанням устаткування, виготовленого в Інституті фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України. Реєстрацію скорочувальної активності м'язових препаратів проводили у ізометричному та ізотонічному режимах, за допомогою датчика сили і датчика переміщення відповідно. Препарати м'язів поміщали в робочу камеру приладу ( $V_{\text{ефект.}} = 0,2$  мл) з проточним розчином Кребса ( $v = 7$  мл/хв) та залишали на 1 годину, за умови надання їм пасивного навантаження на рівні 10 мН, для стабілізації скорочень. Температура у робочій камері регулювалася рідинним термостатом (температуру тримали на рівні  $37,5^\circ\text{C}$ ).

Для тензометричних досліджень калікс[4]арен С-1130 розчиняли у ДМСО та додавали до розчину Кребса так, щоб кінцева концентрація ДМСО складала 0,1% від загального об'єму розчину Кребса. Інгібітор  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази убаїн додають у розчин Кребса з концентрацією 1 мМ; перед реєстрацією спонтанних скорочень, препарати інкубували у проточному розчині Кребса з убаїном протягом 30 хв. В усіх експериментах препарати міометрія перебували у розчинах з концентрацією ДМСО рівною 0,1%.

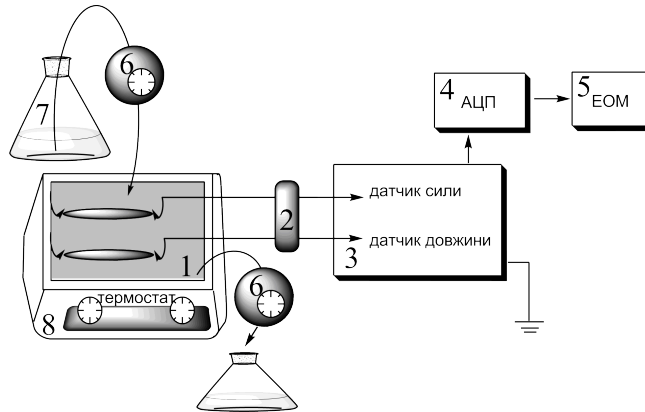


Рисунок 2.6.1.1 — Устаткування для тензометричних експериментів:  
 1 — робоча камера з м'язовими препаратами, які закріплено на гачках;  
 2 — датчики сили (реєстрація в ізометричних умовах) та переміщення (реєстрація в ізотонічних умовах); 3 — підсилювач; 4 — аналого-цифровий перетворювач (АЦП); 5 — комп'ютер (ЕОМ); 6 — перестальтичні насоси;  
 7 — набір робочих розчинів; 8 — рідинний термостат.

## 2.7. Методи математичного моделювання.

Спонтанну скоротливу активність ГМ препаратів досліджували за допомогою методу багатопараметричного механокінетичного аналізу [192].

Ізометричні спонтанні скорочення аналізували за допомогою методу

лінеаризації у подвійних логарифмічних координатах:  $\left[ \ln\left(\frac{f_R}{f_C}\right); \ln\left(1 + \frac{\Delta t}{t}\right) \right]$ , де

$f$  і  $t$  — миттєві значення сили та часу на рівні скоротливого циклу, а індексами С та R позначено фази скорочення і розслаблення відповідно,  $\Delta t$  — заданий довільно фіксований інтервал часу.

Із лінеаризованих графіків визначали характеристичні константи  $k$  і  $n$ , які надалі використовували для розрахунку параметрів: часових ( $\tau_0$ ,  $\tau_C$  і  $\tau_R$ ), силових ( $F_{\max}$ ,  $F_C$  та  $F_R$ ), швидкісних ( $V_C$  і  $V_R$ ) та імпульсних ( $I_{\max}$ ,  $I_C$  та  $I_R$ ) параметрів. Тут  $V_C$  і  $V_R$  – максимальні швидкості фаз скорочення і розслаблення відповідно, а  $I_{\max}$ ,  $I_C$  та  $I_R$  – параметри імпульсу сили на рівні амплітуди та максимальних швидкостей фаз скорочення і розслаблення відповідно.

Ізотонічні спонтанні скорочення аналізували за схожим алгоритмом: їх лінеаризували у координатах  $\left[ \ln\left(\frac{\Delta l_R}{\Delta l_C}\right); \ln\left(1 + \frac{\Delta t}{t}\right) \right]$ , де  $\Delta l_C$  – зміна довжини зразку м'язу на рівні суто фази скорочення в будь-який момент часу  $t < \tau_0$ , а  $\Delta l_R$  – зміна довжини зразку м'язу на рівні суто фази розслаблення в момент часу  $t + \Delta t > \tau_0$  ( $\Delta t = const$ , що обирається дослідником).

Із лінеаризованих графіків визначали характеристичні константи  $k$  і  $n$ , які використовували для розрахунку параметрів: часових ( $\tau_0$ ,  $\tau_C$  і  $\tau_R$ ), укорочення ( $\Delta L_{\max}$ ,  $\Delta L_C$  та  $\Delta L_R$ ) та швидкісних ( $V_C$  і  $V_R$ ).

Аналіз кінетичних закономірностей процесів скорочення-розслаблення ГМ препаратів для викликаних (електро- і фармакомеханічно) скорочень проводили із використанням методу Костеріна-Бурдиги [193]. Окремі фрагменти скорочувальних відповідей (фази скорочення і розслаблення)

лінеаризували в координатах  $\left\{ \ln\left(\frac{f_m - f}{f}\right); \ln t \right\}$  та визначали параметри:  $\tau$  та  $n$ .

Далі значення цих параметрів використовували для розрахунку нормованої максимальної швидкості фази розслаблення  $V_N$ .

## 2.8. Методи кінетичного аналізу.

Числові значення уявних констант активації іонами ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) і субстратом, констант Міхаеліса та коефіцієнтів Хілла  $n_H$  розраховували за допомогою концентраційних залежностей, побудованих у логарифмічних координатах згідно з лінеаризованим рівнянням Хілла:  $\lg[(V_{\max} - V)/V] =$

$n_H \cdot \lg K - n_H \cdot \lg S$ . Тут  $V$  — питома ензиматична активність,  $V_{\max}$  — максимальна питома ензиматична активність у випадку наявності в середовищі інкубації субстрату або іона-активатора,  $K$  — уявна константа Міхаеліса для субстрату або уявна константа активації іонів-активаторів,  $S$  — концентрація субстрату або іона-активатора в середовищі інкубації.

Під час дослідження впливу калікс[4]арену на ензиматичну активність, значення коефіцієнтів інгібування ( $I_{0,5}$ ) та коефіцієнтів Хілла ( $n_H$ ) визначалися за допомогою лінеаризованих графіків Хілла згідно з рівнянням  $\lg[(V_{\max}-V)/V] = -n_H \lg I_{0,5} + n_H \lg [C-1130]$ . Тут  $V_{\max}$  та  $V$  відповідають питомим ензиматичним активностям у відсутності («нульова точка») та в присутності калікс[4]арену в концентрації  $[C-1130]$ .

## 2.9. Методи статистичного аналізу.

Аналіз експериментальних даних проводили з використанням методів варіаційної статистики. Для кінетичних та статистичних обчислень використовували програмне забезпечення MS Excel та Origin 2018.

Перевірку вибірок на їх приналежність до нормального розподілу генеральних сукупностей здійснювали за допомогою критерію Шапіро-Уїлка. Для оцінки вірогідних відмінностей між середніми значеннями вибірок контролю та проби використовували t-критерій Стьюдента або однофакторний дисперсійний аналіз (one-way ANOVA). Усі результати вважали достовірними при значенні  $p < 0,05$  (ймовірність того, що спостережувані результати були отримані випадково, дорівнює 5%). Для кількісного аналізу достовірності апроксимації даних лінійною функцією використовували F-критерій Фішера ( $R^2 \geq 0,95$ ).

Отримані результати представлені у вигляді середнього значення  $\pm$  стандартної похибки середнього, де  $n$  — це кількість дослідів ( $M \pm m, n = N$ ).

## РОЗДІЛ ІІІ

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1. Особливості дії калікс[4]арену С-1130 на активність натрієвої помпи.

У попередніх дослідженнях ми показали, що на рівні ПМ калікс[4]арен С-1130 (100 мкМ) селективно, ефективно (до рівня  $2,1 \pm 0,6$  % відносно контролю), дозозалежно і афінно (коефіцієнт інгібування  $I_{0,5} = 38 \pm 5$  нМ, коефіцієнт Хілла  $n_H = 0,42 \pm 0,03$ ) пригнічує функціонування  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази і водночас не впливає на інші АТР-гідролази плазматичної мембрани, оскільки він суттєво не змінює параметри функціонування  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРази,  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРази і  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ. Тому далі ми вирішили з'ясувати механізм інгібувальної дії зазначеного каліксарену на  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРазну активність.

3.1.1. Дія калікс[4]арену С-1130 на концентраційну залежність активності натрієвої помпи від іонів Mg.

Для з'ясування кінетичного механізму інгібуючої дії калікс[4]арену С-1130 досліджували, чи змінюється спорідненість  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази до її субстратів під впливом інгібітора.

Компонентами  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -залежної АТР-гідролазної реакції, що каталізується  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРазою, є не лише іони Na та K, а також іони Mg та молекула АТР.  $\text{Mg}^{2+}$  діє як кофактор і зв'язується з регуляторним центром  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази [194]. До того ж, істинним субстратом в реакції фосфорилування  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази є  $\text{MgATP}^{2-}$  хелатний комплекс. Проте, у високих концентраціях (десятки мМ)  $\text{Mg}^{2+}$  інгібує  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРазу.

Нами було показано, що ферментативна активність  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази зростала зі збільшенням концентрації  $\text{MgCl}_2$  від 0,01 до 3 мМ за фіксованої концентрації АТР (1 мМ) у середовищі інкубації (рис. 3).

Значення уявної константи активації  $K_{Mg}$   $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази становило  $169 \pm 5$  мкМ ( $M \pm m$ ;  $n = 5$ ). Значення коефіцієнта Хілла  $n_{H, Mg}$  становило  $0,90 \pm 0,04$  для  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази (негативний кооперативний ефект) ( $M \pm m$ ;  $n = 5$ ).

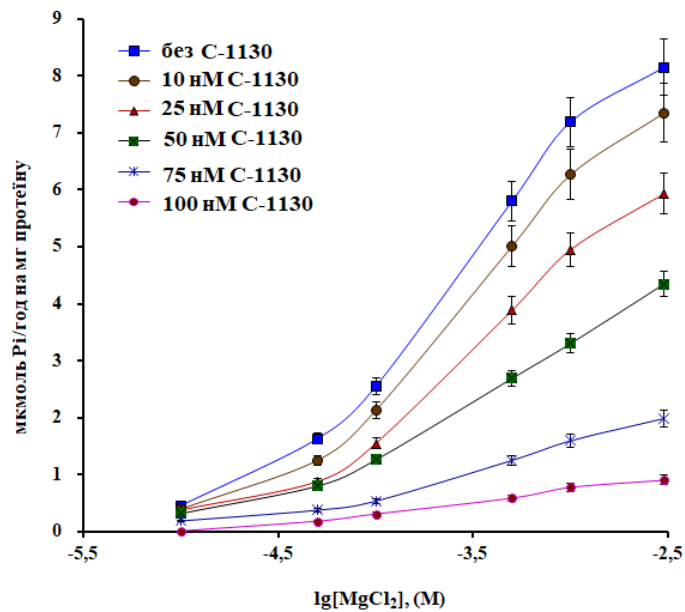


Рисунок 3.1.1.1 — Вплив калікс[4]арену C-1130 (1, 25, 50, 75 та 100 нМ) на залежність питомої ензиматичної активності Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТРази у фракції ПМ клітин міометрія від концентрації MgCl<sub>2</sub> (M ± m; n = 5).

Концентрація АТФ — 1 мМ.

Вивчаючи вплив калікс[4]арену C-1130 (1, 25, 50, 75 та 100 нМ) на спорідненість Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТРази до Mg<sup>2+</sup>, спостерігали поступове зниження Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТРазної активності по мірі збільшення концентрації C-1130 в середовищі інкубації (рис. 3). Проте, калікс[4]арен C-1130 не модифікує характер залежності активності Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТРази від концентрації Mg<sup>2+</sup>. Тобто V<sub>max</sub> для Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТРазної активності за присутності калікс[4]арену C-1130 зменшувалась. Також було встановлено, що за присутності калікс[4]арену C-1130 у різних концентраціях значення коефіцієнта активації K<sub>Mg</sub> та коефіцієнта Хілла n<sub>H,Mg</sub> для Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТРази залишалися незмінними (рис. 4).

Таким чином, спорідненість Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТРази до іонів Mg не залежить від присутності калікс[4]арену C-1130 у середовищі інкубації, що свідчить про відсутність конкуренції між іоном Mg та C-1130. Отже, інгібувальний ефект калікс[4]арену C-1130 на Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТРази ПМ не пов'язаний із зменшенням спорідненості ензиму до іонів Mg під дією цієї речовини. Можна припустити, що сайт зв'язування Mg та гіпотетичний сайт взаємодії ензиму з калікс[4]ареном C-1130 не перекриваються на поверхні Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТРази.

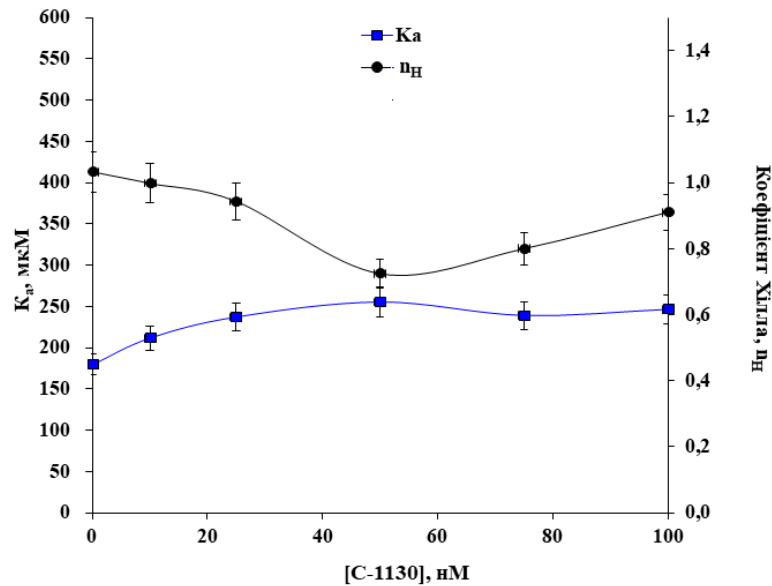


Рисунок 3.1.1.2 — Вплив калікс[4]арену С-1130 на кінетичні параметри (константу активації  $K_{Mg}$  і коефіцієнт Хілла  $n_{H,Mg}$ ) дії  $MgCl_2$  на активність  $Na^+,K^+$ -АТРази у фракції ПМ міомерія ( $M \pm m$ ,  $n = 5$ ).

3.1.2. Дія калікс[4]арену С-1130 на концентраційну залежність активності натрієвої помпи від АТР.

Далі, в контексті кінетичної інтерпретації впливу калікс[4]арену С-1130 на ензиматичну активність  $Na^+,K^+$ -АТРази ПМ міомерія, ми дослідили його дію на характер концентраційної залежності цієї активності від АТР.

Збільшення концентрації АТР у середовищі інкубації від 0,01 до 1 М призводило до зростання активності  $Na^+,K^+$ -АТРази в ПМ за фіксованої концентрації  $MgCl_2$  (3 мМ) у середовищі інкубації (рис. 5). Розраховано уявну константу активації  $K_{m,ATP}$  та коефіцієнт  $n_{H,ATP}$ , які становлять  $195,3 \pm 8,4$  мкМ та  $1,12 \pm 0,09$  для  $Na^+,K^+$ -АТРази в ПМ ( $M \pm m$ ;  $n = 5$ ). Величина коефіцієнту Хілла  $n_{H,ATP}$  вказує на позитивний кооперативний ефект залежності активності  $Na^+,K^+$ -АТРази від концентрації АТР.

У досліджах із каталітичного титрування  $Na^+,K^+$ -АТРази ПМ АТР було знайдено, що калікс[4]арен С-1130 (1, 25, 50, 75 та 100 нМ) гальмує ензиматичну активність натрієвої помпи (рис. 5). У випадку дії С-1130 спостерігали зниження активності  $Na^+,K^+$ -АТРази, але характер залежності активності фермента від концентрації АТР був подібним до характеру

залежності зареєстрованої у контролі (за відсутності калікс[4]арену С-1130), але платовий рівень активності зі зростанням концентрації калікс[4]арену знижується. Тобто, калікс[4]арен С-1130 ініціює зменшення значення параметру  $V_{\max}$  (швидкість гідролізу АТР) для  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРазної активності, що свідчить про зменшення числа обертів  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази за його дії.

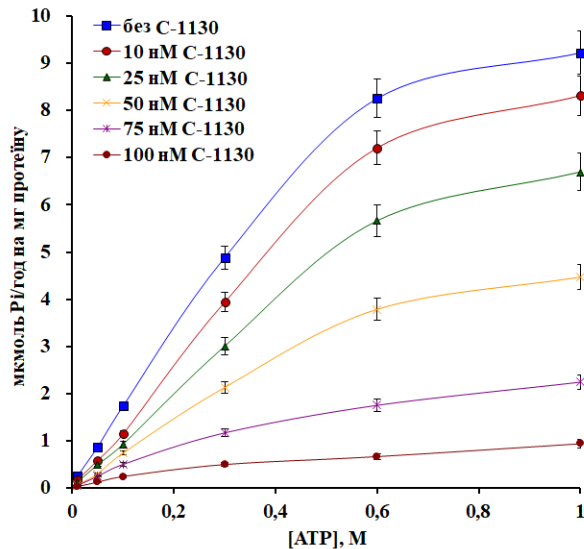


Рисунок 3.1.2.1 — Вплив калікс[4]арену С-1130 (1, 25, 50, 75 та 100 нМ) на залежність питомої ензиматичної активності  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази у фракції ПМ клітин міометрія від концентрації АТР ( $M \pm m$ ;  $n = 5$ ).

Концентрація  $\text{MgCl}_2$  — 3 мМ.

Було вивчено вплив калікс[4]арену С-1130 на спорідненість ензиму до АТР (рис. 6). Значення уявної константи Міхаеліса  $K_{m, \text{АТР}}$  та коефіцієнта Хілла  $n_{\text{АТР}}$  за присутності різних концентрацій калікс[4]арену С-1130 достовірно не відрізняються від контрольних значень цих параметрів у відсутності С-1130 в середовищі інкубації. Отже, вплив калікс[4]арену С-1130 на  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази є неконкурентним по відношенню до АТР.

Таким чином, спорідненість  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази до АТР практично не залежить від присутності калікс[4]арену С-1130 у середовищі інкубації, що свідчить про відсутність конкуренції між інгібітором та АТР. Аналогічно до ситуації з сайтом зв'язування  $\text{Mg}$ , можна припустити, що сайт зв'язування АТР та гіпотетичний сайт взаємодії ензиму з калікс[4]ареном С-1130 не перекриваються на поверхні  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази.

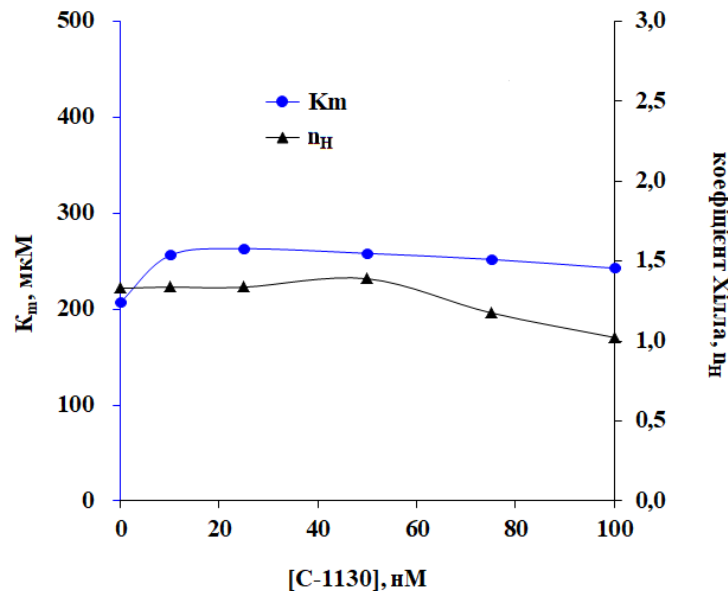


Рисунок 3.1.2.2 — Вплив калікс[4]арену С-1130 на кінетичні параметри (константу Міхаеліса  $K_{m,ATP}$  і коефіцієнт Хілла  $n_{H,ATP}$ ) дії АТР на активність  $Na^+,K^+$ -АТРази у фракції ПМ клітин міомерія ( $M \pm m$ ,  $n = 5$ ).

3.1.3. Дія калікс[4]арену С-1130 на концентраційну залежність активності  $Na^+,K^+$ -АТРази від співвідношень концентрацій  $[Na^+]/[K^+]$ .

Було показано, що за умов фіксованої сумарної концентрації катіонів  $[Na^+] + [K^+] = 150$  мМ, графік залежності активності  $Na^+,K^+$ -АТРази від співвідношення концентрацій  $[Na^+]/[K^+]$  має куполоподібний вигляд (ліва та права гілки – “натрієва” та “калієва” відповідно) (рис. 7). У випадку відсутності в середовищі інкубації іонів Na чи K, активність ензиму не реєструється. Співвідношення концентрацій  $[Na^+]/[K^+]$ , сформоване 120 мМ NaCl і 30 мМ KCl, є найбільш сприятливим для функціонування ензиму.

Величина константи активації для іонів Na ( $K_{Na}$ ) для  $Na^+,K^+$ -АТРази становить  $50 \pm 4$  мМ, а величина коефіцієнта Хілла ( $n_{H,Na}$ ) —  $1,76 \pm 0,09$  ( $M \pm m$ ;  $n = 5$ ). Величина константи активації для іонів K ( $K_K$ ) становить  $8,7 \pm 0,3$ , а величина коефіцієнта Хілла ( $n_{H,K}$ ) —  $2,02 \pm 0,11$  ( $M \pm m$ ;  $n = 5$ ).

Встановлено, що калікс[4]арен С-1130 (1, 25, 50, 75 та 100 нМ) зменшував ензиматичну активність  $Na^+,K^+$ -АТРази, але не порушував характер її куполоподібної залежності від співвідношення  $[Na^+]/[K^+]$  за ізотонічних умов (рис. 8).

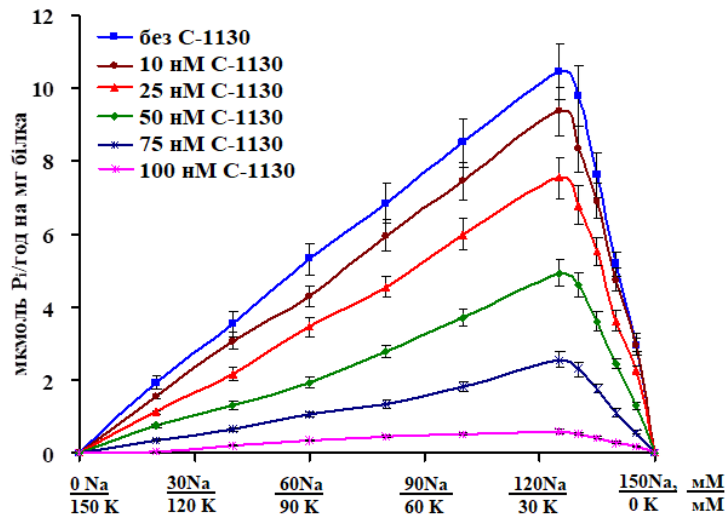


Рисунок 3.1.3.1 — Вплив калікс[4]арену C-1130 (1, 25, 50, 75 та 100 нМ) на залежність  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРазної активності у фракції ПМ клітин міометрія від концентрації іонів Na та K ( $M \pm m$ ;  $n = 5$ ).

Калікс[4]арен C-1130 за ізотонічних умов вірогідно збільшував  $K_{\text{Na}}$   $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТрази: від  $50 \pm 4$  мМ (контроль) до  $80 \pm 6$  мМ (у присутності калікс[4]арену) ( $p < 0,05$ ;  $M \pm m$ ;  $n = 5$ ). Проте, змін у спорідненості  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТрази до іонів K не спостерігалось —  $K_{\text{K}}$  становила  $8,7 \pm 0,3$  (контроль) та  $8,71 \pm 0,4$  (у присутності калікс[4]арену) ( $p > 0,05$ ;  $M \pm m$ ;  $n = 5$ ).

Отже, можна припустити, що калікс[4]арен C-1130 інгібує  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТразу за рахунок зменшення спорідненості ензиму до іонів Na.

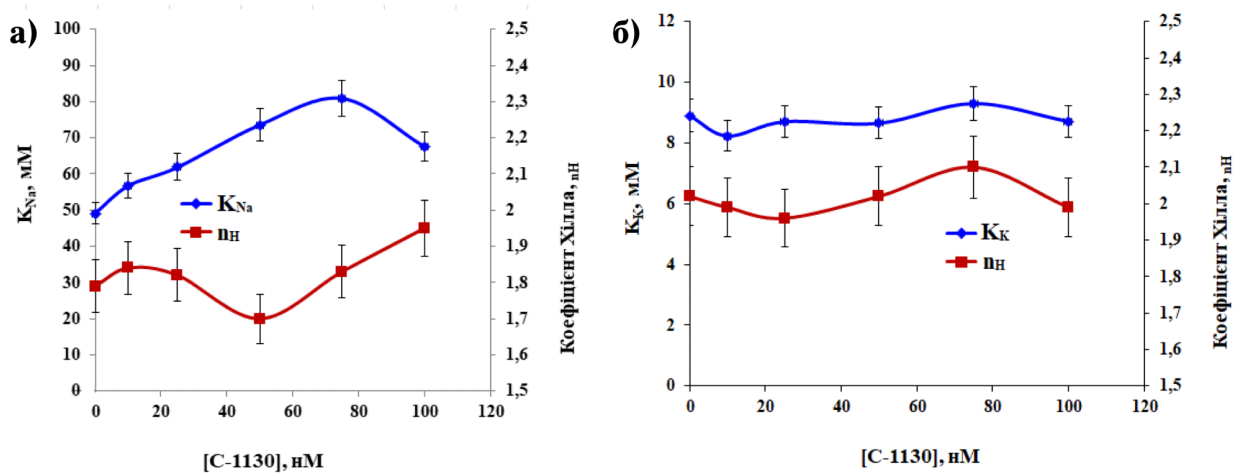


Рисунок 3.1.3.2 — Вплив калікс[4]арену C-1130 на кінетичні параметри залежності активності  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТрази у ПМ клітин міометрія від концентрації іонів Na (а) і K (б) ( $M \pm m$ ,  $n = 5$ ).

### 3.2. Вплив калікс[4]арену С-1130 на концентрацію іонів Са у клітинах гладеньких м'язів.

Важливим питанням було з'ясувати, чи буде впливати калікс[4]арен С-1130 на внутрішньоклітинну концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  гладеньком'язових клітинах. Тому у своїх подальших експериментах ми оцінювали концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  в міоплазмі методом конфокальної мікроскопії із використанням  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливого зонду fluo-4 під впливом калікс[4]арену С-1130. Було показано, що під дією калікс[4]арену С-1130 (10 мкМ) відбувається різке зростання флуоресцентної відповіді  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливого зонду fluo-4 АМ у клітині (рис. 9). Протягом наступних 3 хв концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  знижується, що свідчить про залучення механізмів релаксації концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРаза ПМ,  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортер мітохондрій), проте не повертається до початкового рівня, а залишається дещо підвищеною. Незмінним лишався рівень флуоресценції Hoechst, який був локалізований в основному в ядрі ГМК. Отже, калікс[4]арен С-1130 — інгібітор  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРази ПМ підвищує концентрацію цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  у ГМК.

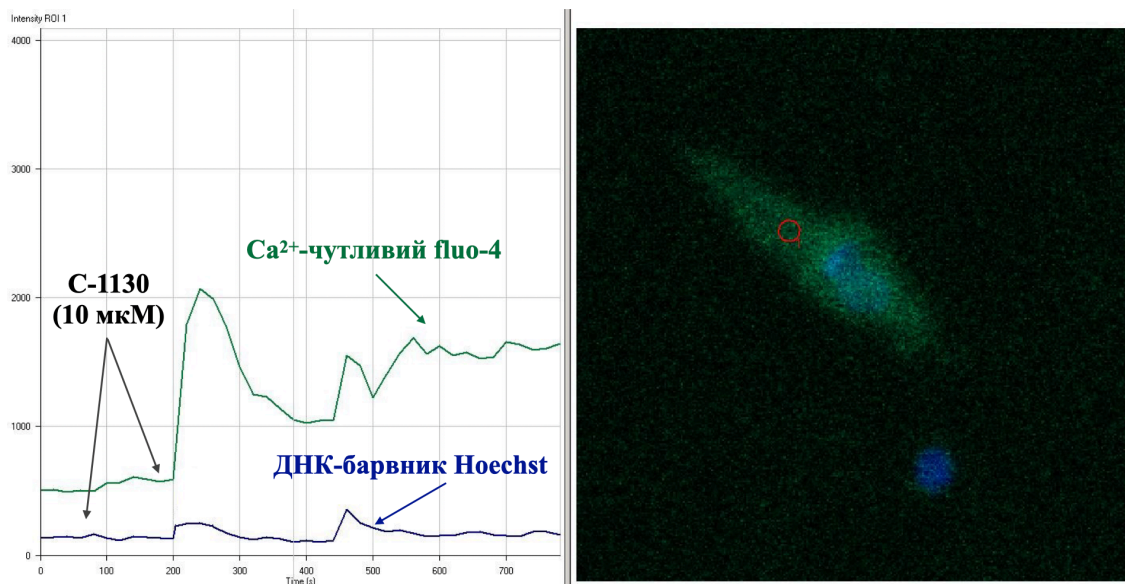


Рисунок 3.2.1 — Зміна флуоресценції зондів в міоциті матки, зареєстрована за допомогою конфокальної мікроскопії: ДНК-чутливого Hoechst та  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливого fluo-4 АМ. На 200 сек було внесено аліквоту розчину калікс[4]арену С-1130 (кінцева концентрація — 10 мкМ). Наведено результати типового експерименту ( $n = 7$ ).

Одержані результати дають підстави припустити, що під дією калікс[4]арену С-1130 відбувається інгібування  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази ПМ та, як результат, зростання внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Na}^+$ , що в свою чергу зумовлює перехід  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника у реверсний (зворотний) режим роботи, орієнтований на експортування 3 іонів  $\text{Na}^+$  з цитоплазми в обмін на вхід 1 іону  $\text{Ca}^{2+}$ . Подібний молекулярний механізм забезпечує зростання концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  всередині міоцитів.

### **3.3. Вплив калікс[4]арену С-1130 на параметри спонтанної скорочувальної активності міометрія за дії убаїну.**

Попередньо було встановлено, що внесення в омиваючий гладенькі м'язи розчин калікс[4]арену С-1130 (10 мкМ) супроводжувалося посиленням спонтанних скорочень. Так, за інкубації препаратів з С-1130 упродовж 10-30 хвилин амплітуда спонтанних скорочень міометрія у середньому досягала  $135,7 \pm 3,8$  % щодо контролю ( $p < 0,05$ ;  $M \pm m$ ;  $n = 5$ ), тоді як їх частота залишалася на контрольному рівні.

Для підтвердження того, що причиною змін скорочувальної активності препаратів міометрія за дії калікс[4]арену С-1130 було саме інгібування  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази ПМ, далі ми реєстрували і оцінювали з використанням механокінетичного аналізу дію калікс[4]арену С-1130 на спонтанну ізометричну скорочувальну активність препаратів міометрія, які попередньо упродовж 30 хв інкубували у проточному розчині Кребса з убаїном у концентрації 1 мМ (відомий інгібітор  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази, який за даної концентрації повністю блокує роботу ензиму).

На тлі дії убаїну відбувалося суттєве посилення спонтанних ізометричних скорочень, тоді як наступне додавання калікс[4]арену С-1130 у середовище інкубації не змінювало активність препаратів міометрія (рис. 10).

Для кількісної оцінки міри посилення спонтанних скорочень препаратів міометрія, скорочення за дії убаїну та калікс[4]арену С-1130 на тлі убаїну були проаналізовані методом багатопараметричного механокінетичного аналізу [192].

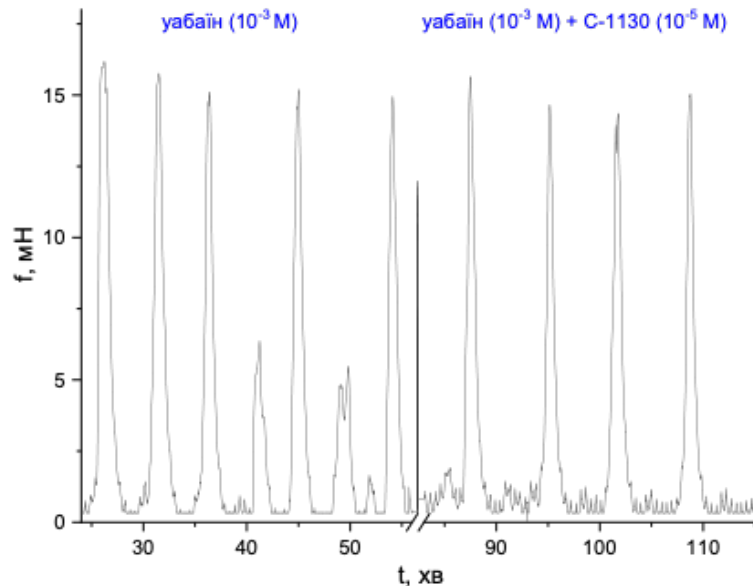


Рисунок 3.3.1 — Спонтанні скорочення міометрія щурів на тлі уабаїну (1 мМ) та сумісної дії уабаїну (1 мМ) та калікс[4]арену С-1130 (10 мкМ).

Наведено типові механограми.

Було встановлено, що на тлі сукупної дії уабаїну та С-1130 часові параметри амплітуди були співставні з аналогічними параметрами за дії лише уабаїну (рис. 11). Показники часу досягнення амплітуди ( $\tau_{\max}$ ), часу механограми, за якого досягається максимальна швидкість скорочення ( $\tau_C$ ) і часу, за якого досягається максимальна швидкість фази розслаблення ( $\tau_R$ ), у середньому становили відповідно  $111,4 \pm 3,6 \%$ ,  $120,0 \pm 4,1 \%$  та  $116,9 \pm 3,8 \%$  ( $p > 0,05$ ;  $M \pm m$ ;  $n = 5$ ).

До того ж, за даних експериментальних умов калікс[4]арен С-1130 не змінював силові параметри  $F_{\max}$ ,  $F_C$  та  $F_R$  (рис. 11): так, параметр сили, при якій спостерігається максимальна швидкість фази скорочення ( $F_C$ ) становив у середньому  $108,7 \pm 3,4 \%$  ( $p > 0,05$ ;  $M \pm m$ ;  $n = 5$ ) та параметр сили, при якій спостерігається максимальна швидкість фази розслаблення ( $F_R$ ) становив у середньому  $93,9 \pm 3,8 \%$  ( $p > 0,05$ ;  $M \pm m$ ;  $n = 5$ ), а параметр сили в точці амплітуди спонтанного скорочення ( $F_{\max}$ ) становив ( $p > 0,05$ ;  $M \pm m$ ;  $n = 5$ ).

Аналогічно, не мали достовірних відмінностей імпульсні параметри ( $I_{\max}$ ,  $I_C$  та  $I_R$ ) за дії лише уабаїну та калікс[4]арену С-1130 на тлі уабаїну (рис. 11). Так, показник імпульсу сили в точці  $F_C$  ( $I_C$ ) становив  $114,3 \pm 9,4 \%$  ( $p >$

0,05;  $M \pm m$ ;  $n = 5$ ); показник імпульсу сили в точці  $F_R$  ( $I_R$ ) складав  $103,1 \pm 5,7$  % ( $p > 0,05$ ;  $M \pm m$ ;  $n = 5$ ). Також параметр імпульсу сили в точці амплітуди спонтанного скорочення ( $I_{\max}$ ) становив  $108,1 \pm 3,9$  % ( $p > 0,05$ ;  $M \pm m$ ;  $n = 5$ ).

Також за дії калікс[4]арену С-1130 на тлі уабаїну не спостерігалось відмінностей показників максимальних швидкостей фаз скорочення ( $V_C$ ) і розслаблення ( $V_R$ ) порівняно з аналогічними параметрами на тлі лише уабаїну (рис. 11): параметри  $V_C$  і  $V_R$  у середньому склали  $87,8 \pm 4,5$  % ( $p > 0,05$ ;  $M \pm m$ ;  $n = 5$ ) та  $109,1 \pm 5,3$  % ( $p > 0,05$ ;  $M \pm m$ ;  $n = 5$ ) відповідно. За умови нормування  $V_C$  і  $V_R$  на амплітуду скорочень ми отримуємо відсутність ефектів калікс[4]арену С-1130: нормована максимальна швидкість фази скорочення у середньому складає  $90,6 \pm 4,9$  % ( $p > 0,05$ ;  $M \pm m$ ;  $n = 5$ ) щодо ефекту лише уабаїну прийнятого за 100%, та нормована максимальна швидкість фази розслаблення – відповідно у середньому  $112,5 \pm 5,6$  % ( $p > 0,05$ ;  $M \pm m$ ;  $n = 5$ ).

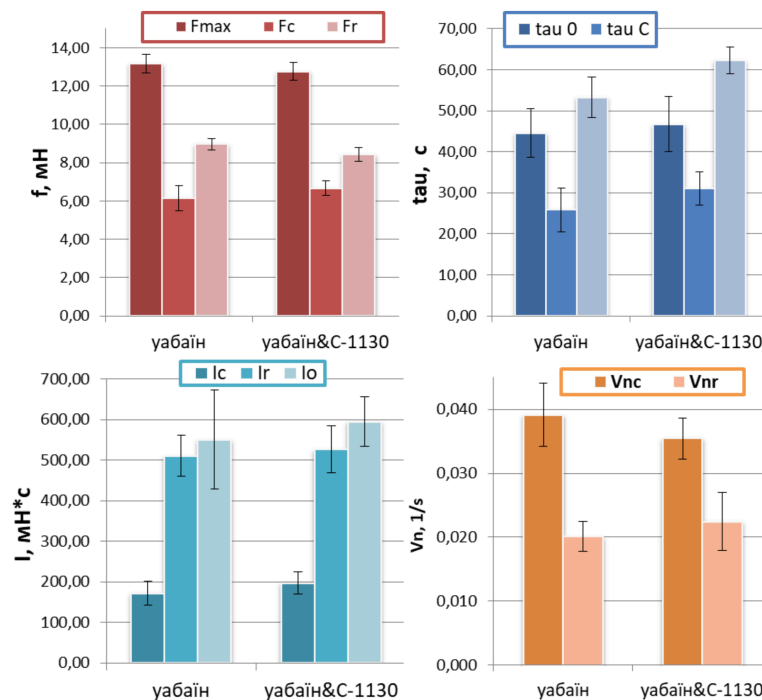


Рисунок 3.3.2 — Параметри спонтанної скорочувальної активності міометрія щурів за дії уабаїну (1 мМ) та за дії калікс[4]арену С-1130 (10  $\mu$ М) на тлі уабаїну: А — часові параметри ( $\tau_0$ ,  $\tau_C$  та  $\tau_R$ ); Б — силові параметри ( $F_{\max}$ ,  $F_C$  та  $F_R$ ); В — імпульсні параметри ( $I_{\max}$ ,  $I_C$  та  $I_R$ ); Г — швидкісні параметри ( $V_C$  та  $V_R$ ) ( $M \pm m$ ,  $n = 5$ ).

Таким чином, в умовах попередньої дії убаїну сполука С-1130 не змінює механокінетику спонтанних скорочень, що вказує на те, що цей калікс[4]арен лише блокує  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаду ПМ та не впливає на інші протеїни, які залучені до процесів скорочення-розслаблення міометрія.

### **3.4. Вплив калікс[4]арену С-1130 на спонтанну скорочувальну активність міометрія, яка була індукована електромеханічно та фармакомеханічно.**

Надалі становило інтерес здійснити дослідження впливу С-1130 на окремі ланки проведення сигналу активації скорочувальної активності через сарколему міоцитів. Тож на наступному етапі нами було досліджено та проаналізовано механокінетичні ефекти цього калікс[4]арену на параметри скорочень міометрія, індукованих за шляхом електромеханічного (модель активації надходження іонів  $\text{Ca}^{2+}$  внаслідок гіперкалієвої деполяризації ПМ) спряження збудження-скорочення.

Скорочувальну активність мультіклітинних препаратів поздовжніх гладеньких м'язів маткових труб щурів зі збереженим ендометрієм реєстрували в ізометричному режимі за постійного навантаження 10 мН. Калікс[4]арен С-1130 використовували у концентрації 10 мкМ. Аналіз кінетичних закономірностей скорочень (zareєстрованих через 15 хв після початку аплікування С-1130) здійснювали відповідно до методу Костеріна-Бурдиги розрахунку нормованих на амплітуду максимальних швидкостей фаз скорочення ( $V_{\text{NC}}$ ) та розслаблення ( $V_{\text{NR}}$ ).

На тлі дії калікс[4]арену С-1130 спостерігалось суттєве збільшення амплітуди скорочення препаратів міометрія, активованого аплікуванням гіперкалієвого розчину (80 мМ), причому тонічна фаза цих скорочень залишалася без змін (рис. 12). Так, за дії цієї сполуки у концентрації 10 мкМ спостерігалось суттєве збільшення фазного компоненту (амплітуди) у середньому до  $147,1 \pm 7,9 \%$  ( $p < 0,01$ ;  $M \pm m$ ;  $n = 5$ ), тоді як тонічний компонент був на рівні  $95,0 \pm 3,8 \%$  ( $p > 0,05$ ;  $M \pm m$ ;  $n = 5$ ).

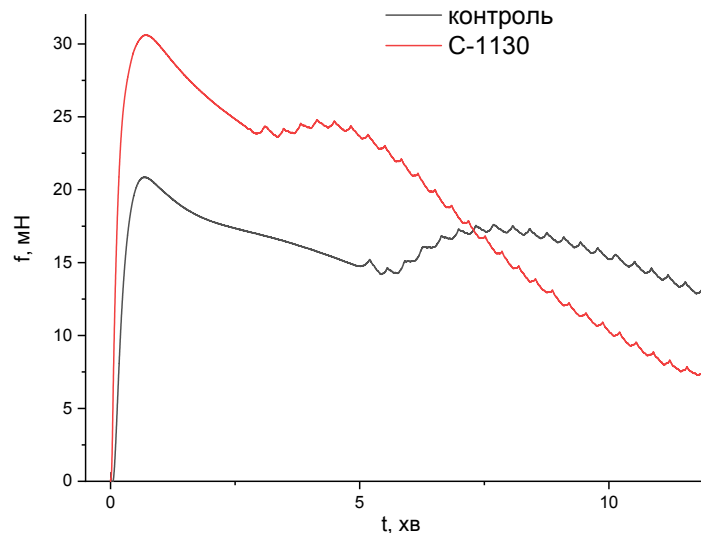


Рисунок 3.4.1 — Викликані аплікуванням гіперкалієвого розчину (80 мМ) скорочення міометрія щурів у контролі та за дії калікс[4]арену С-1130 (10 мкМ, тривалість інкубації з С-1130 перед початком реєстрації 15 хв).

Наведено типові механограми.

Надалі скорочення у контролі та за дії калікс[4]арену С-1130 були проаналізовані методом механокінетичного аналізу Костеріна-Бурдиги. Встановлено, що на тлі дії С-1130 зменшується показник нормованої максимальної швидкості фази скорочення ( $V_{NC}$ ) (становить  $70,1 \pm 4,9\%$  ( $p < 0,01$ ;  $M \pm m$ ;  $n = 5$ ), а відповідний показник фази розслаблення ( $V_{NR}$ ) навпаки збільшується до  $147,1 \pm 8,3\%$  ( $p < 0,01$ ;  $M \pm m$ ;  $n = 5$ ).

На наступному етапі досліджень було важливо перевірити вплив калікс[4]арену С-1130 на скорочення препаратів міометрія при активації за шляхом фармакомеханічного спряження збудження-скорочення (за дії головного утеротонічного гормону окситоцину).

Скорочувальну активність мультиклітинних препаратів поздовжніх гладеньких м'язів маткових труб щурів зі збереженим ендометрієм індукували окситоцином (0,1 МО) і реєстрували в ізометричному режимі за постійного навантаження 10 мН. Калікс[4]арен С-1130 використовували у концентрації 10 мкМ. Аналіз кінетичних закономірностей скорочень (zareєстрованих через 15 хв після початку аплікування С-1130) здійснювали за методом Костеріна-Бурдиги.

На тлі дії калікс[4]арену C-1130 спостерігалось суттєве збільшення амплітуди скорочення препаратів міометрія, активованого аплікуванням окситоцину (0,1 МО), причому тонічна фаза цих скорочень залишалася без змін (рис. 13). Також, аналогічно до гіперкалієвої контрактури, за дії цієї сполуки у концентрації 10 мкМ спостерігалось суттєве збільшення фазного компоненту окситоцинових скорочень у середньому до  $129,7 \pm 4,8 \%$  ( $p < 0,01$ ;  $M \pm m$ ;  $n = 5$ ), тоді як тонічний компонент також залишався на рівні контролю ( $p > 0,05$ ;  $M \pm m$ ;  $n = 5$ ).

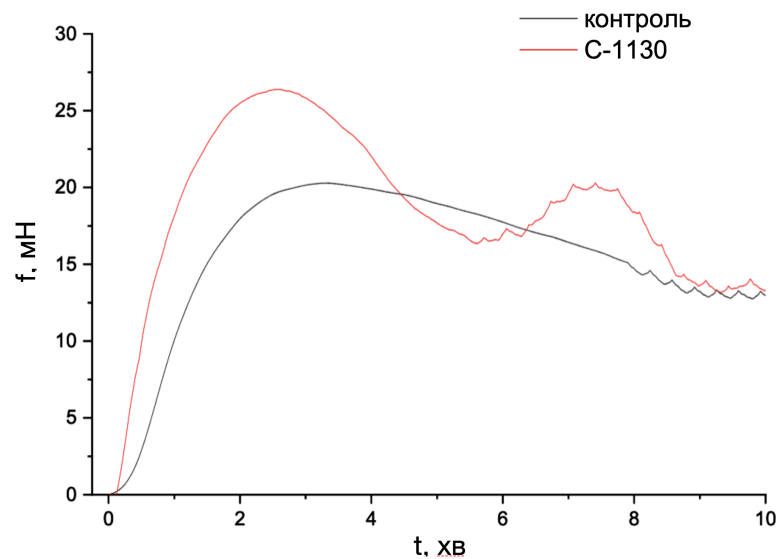


Рисунок 3.4.2 — Викликані аплікуванням окситоцину (0,1 МО) скорочення міометрія щурів у контролі та за дії калікс[4]арену C-1130 (10 мкМ, тривалість інкубації з C-1130 перед початком реєстрації 15 хв). Наведено типові механограми.

Надалі скорочення у контролі та на тлі калікс[4]арену C-1130 були проаналізовані методом механокінетичного аналізу Костеріна-Бурдиги. Встановлено, що в умовах дії C-1130 суттєво зростає показник нормованої максимальної швидкості фази скорочення ( $V_{NC}$ ) (складає у середньому  $132,3 \pm 5,4 \%$  ( $p < 0,01$ ;  $M \pm m$ ;  $n = 5$ ), тоді як відповідний показник фази розслаблення ( $V_{NR}$ ) збільшується до  $278,9 \pm 11,6 \%$  ( $p < 0,01$ ;  $M \pm m$ ;  $n = 5$ ).

Аналізуючи отримані результати, можна передбачити, що ефекти калікс[4]арену C-1130 є виключно наслідком порушення іонного гомеостазу в клітинах міометрія індукованого блокуванням  $Na^+, K^+$ -АТРази ПМ.

## ВИСНОВКИ

1. Калікс[4]арен С-1130 зменшує спорідненість  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази ПМ до іонів  $\text{Na}^+$ , але не впливає на спорідненість до іонів  $\text{K}^+$  і  $\text{Mg}^{2+}$  та молекули АТР (відсутній вплив на константи спорідненості і коефіцієнт Хілла). Проте, калікс[4]арен С-1130 зменшує максимальну швидкість гідролізу АТР.

2. Калікс[4]арен С-1130 (10, 25 та 50 мкМ) призводив до зменшення гідродинамічного діаметру гладеньком'язевих клітин матки щурів (при концентрації 50 мкМ — на 55 % відносно контролю).

3. Калікс[4]арен С-1130 (10 мкМ) підвищує концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  у гладеньком'язових клітинах. Протягом 3 хв концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  частково знижується, проте вона не повертається на початковий рівень.

4. Калікс[4]арен С-1130, в умовах попередньої дії убаїну, не змінює механокінетику спонтанних скорочень, що вказує на те, що цей калікс[4]арен блокує лише  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаду ПМ.

5. Ефекти калікс[4]арену С-1130 є виключно наслідком порушення іонного гомеостазу в клітинах міометрія індукованого блокуванням  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази ПМ.

6. Імовірно, підвищення внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в клітинах міометрія під дією калікс[4]арену С-1130 зумовлено інгібуванням натрієвої помпи та зростанням внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Na}^+$ . Це спричинює перехід  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника у реверсний режим роботи, орієнтований на збільшення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  всередині міоцитів.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. Brini M., Carafoli E. The plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase and the plasma membrane sodium calcium exchanger cooperate in the regulation of cell calcium. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2011: 1–15. doi: 10.1101/cshperspect.a004168.
2. Hill-Eubanks D.C., Werner M.E., Heppner T.J., Nelson M.T. Calcium signaling in smooth muscle. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 Sep 1;3(9):a004549. doi: 10.1101/cshperspect.a004549.
3. Sanders K.M. 2001. Invited review: Mechanisms of calcium handling in smooth muscles. *J Appl Physiol* 91: 1438–1449. <https://doi.org/10.1152/jappl.2001.91.3.1438>.
4. Chen J., Sitsel A., Benoy V., Sepúlveda M.R., Vangheluwe P. Primary Active  $\text{Ca}^{2+}$  Transport Systems in Health and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2020 Feb 3;12(2):a035113. doi: 10.1101/cshperspect.a035113.
5. Shmigol A.V., Eisner D.A., Wray S. Properties of voltage-activated  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  transients in single smooth muscle cells isolated from pregnant rat uterus. *J Physiol.* 1998 Sep 15; 511 (Pt3) (Pt3): 803-11. doi: 10.1111/j.1469-7793.1998.803bg.x.
6. Oloizia B., Paul R.J.  $\text{Ca}^{2+}$  Clearance and contractility in vascular smooth muscle: Evidence from gene-altered murine models // *J. Mol. Cellul. Cardiol.* – 2008. – 45, N 3. –P. 347–362. , Floyd R., Wray S. Calcium transporters and signalling in smooth muscles // *Cell Calcium.* – 2007. – 42, N 4–5. – P. 467–476. doi: 10.1016/j.yjmcc.2008.05.024.
7. Blaustein, M.P.; Juhaszova, M.; Golovina, V.A.; Church, P.J.; Stanley, E.F. Na/Ca exchanger and PMCA localization in neurons and astrocytes: Functional implications. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2002, 976, 356–366. doi: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb04762.x.
8. Khananshvili D. Basic and editing mechanisms underlying ion transport and regulation in NCX variants. *Cell Calcium.* 2019;85:102131. doi: 10.1016/j.ceca.2019.102131.

9. Ottolia M., John S., Hazan A., Goldhaber J.I. The Cardiac Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> Exchanger: From Structure to Function. *Compr. Physiol.* 2021;12:2681–2717. doi: 10.1002/cphy.c200031.
10. Blaustein, M.P.; Lederer, W.J. Sodium/calcium exchange: Its physiological implications. *Physiol. Rev.* 1999, 79, 763–854. doi: 10.1152/physrev.1999.79.3.763.
11. Xue J., Zeng W., Han Y., John S., Ottolia M., Jiang Y. Structural mechanisms of the human cardiac sodium-calcium exchanger NCX1. *Nat Commun.* 2023 Oct 4;14(1):6181. doi: 10.1038/s41467-023-41885-4.
12. Khananshvili, D. Distinction between the two basic mechanisms of cation transport in the cardiac Na<sup>(+)</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange system. *Biochemistry* 1990, 29, 2437–2442. doi: 10.1021/bi00462a001.
13. Conrard L., Tyteca D. Regulation of Membrane Calcium Transport Proteins by the Surrounding Lipid Environment. *Biomolecules.* 2019 Sep 20;9(10):513. doi: 10.3390/biom9100513.
14. Molinaro P., Natale S., Serani A., Calabrese L., Secondo A., Tedeschi V., Valsecchi V., Pannaccione A., Scorziello A., Annunziato L. Genetically modified mice to unravel physiological and pathophysiological roles played by NCX isoforms. *Cell Calcium.* 2020;87:102189. doi: 10.1016/j.ceca.2020.102189.
15. Rodrigues T., Piccirillo S., Magi S., Preziuso A., Ramos V.d.S., Serfilippi T., Orciani M., Alvarez M.M.P., Tersariol I.L.D.S., Amoroso S., et al. Control of Ca<sup>2+</sup> and metabolic homeostasis by the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchangers (NCXs) in health and disease. *Biochem. Pharmacol.* 2022;203:115163. doi: 10.1016/j.bcp.2022.115163.
16. Pannaccione A., Piccialli I., Secondo A., Ciccone R., Molinaro P., Boscia F., Annunziato L. The Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in Alzheimer's disease. *Cell Calcium.* 2020 May;87:102190. doi: 10.1016/j.ceca.2020.102190.
17. Khananshvili D. Structure-Dynamic and Regulatory Specificities of Epithelial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> Exchangers (NCX) In: Hamilton K., Devor C.D.,

- editors. *Ion Channels and Transporters of Epithelia in Health and Disease*. Springer International Publishing AG; Cham, Switzerland: 2020. pp. 325–381. Chapter 8.
18. Bejček J., Spiwok V., Kmoníčková E., Rimpelová S. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase Revisited: On Its Mechanism of Action, Role in Cancer, and Activity Modulation. *Molecules*. 2021 Mar 28;26(7):1905. doi: 10.3390/molecules26071905.
  19. Mobasheri A., Avila J., Cózar-Castellano I., Brownleader MD., Trevan M., Francis MJ., Lamb JF., Martín-Vasallo P. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. *Biosci Rep* 2000 Apr; 20(2):51-91. doi: 10.1023/a:1005580332144.
  20. Fedosova N.U., Habeck M. and Nissen P. (2021) Structure and function of Na,K-ATPase-the sodium-potassium pump. *Compr. Physiol.* 12, 2659–2679 10.1002/cphy.c200018.
  21. Suhail M. Na, K-ATPase: Ubiquitous Multifunctional Transmembrane Protein and its Relevance to Various Pathophysiological Conditions. *J Clin Med Res*. 2010 Feb;2(1):1-17. doi: 10.4021/jocmr2010.02.263w.
  22. Clausen T., Van Hardeveld, Everts M.E. Significance of cation transport in control of energy metabolism and thermogenesis. *Physiol Rev*. 1991;71(3):733–774. doi: 10.1152/physrev.1991.71.3.733.
  23. Shrivastava A.N., Triller A., Melki R. Cell biology and dynamics of Neuronal Na<sup>(+)</sup>/K<sup>(+)</sup>-ATPase in health and diseases. *Neuropharmacology*. 2020;169:107461.
  24. Pivovarov A.S., Calahorro F., Walker R.J. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pump and neurotransmitter membrane receptors. *Invert Neurosci*. 2018 Nov 28;19(1):1. doi: 10.1007/s10158-018-0221-7.
  25. Askari A. The other functions of the sodium pump. *Cell Calcium*. 2019 Dec;84:102105. doi: 10.1016/j.ceca.2019.102105., Askari A. The sodium pump and digitalis drugs: Dogmas and fallacies. *Pharmacol Res Perspect*. 2019 Jul 19;7(4):e00505. doi: 10.1002/prp2.505.

26. Silva C.I.D., Gonçalves-de-Albuquerque C.F., Moraes B.P.T., Garcia D.G., Burth P. Na/K-ATPase: Their role in cell adhesion and migration in cancer. *Biochimie*. 2021 Jun;185:1-8. doi: 10.1016/j.biochi.2021.03.002.
27. Panizza E., Zhang L., Fontana J.M., Hamada K., Svensson D., Akkuratov E.E., Scott L., Mikoshiba K., Brismar H., Lehtiö J., Aperia A. Ouabain-regulated phosphoproteome reveals molecular mechanisms for Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase control of cell adhesion, proliferation, and survival. *FASEB J*. 2019 Sep;33(9):10193-10206. doi: 10.1096/fj.201900445R.
28. Aydemir-Koksoy A., Abramowitz J., Allen J.C. Ouabain-induced signaling and vascular smooth muscle cell proliferation. *J. Biol. Chem*. 2021;276:46605–46611. doi: 10.1074/jbc.M106178200.
29. Chen L., Jiang P., Li J., Xie Z., Xu Y., Qu W., Feng F., Liu W. Periplocin promotes wound healing through the activation of Src/ERK and PI3K/Akt pathways mediated by Na/K-ATPase. *Phytomedicine*. 2019;57:72–83. doi: 10.1016/j.phymed.2018.12.015.
30. Khajah M.A., Mathew P.M., Luqmani Y.A. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase activity promotes invasion of endocrine resistant breast cancer cells. *PLoS ONE*. 2018;13:e0193779. doi: 10.1371/journal.pone.0193779.
31. Zhu M., Sun H., Cao L., Wu Z., Leng B., Bian J. Role of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in ischemic stroke: in-depth perspectives from physiology to pharmacology. *J Mol Med (Berl)*. 2022 Mar;100(3):395-410. doi: 10.1007/s00109-021-02143-6.
32. Silva A.R., de Souza E., Souza K.F.C, Souza T.B., Younes-Ibrahim M, Burth P, de Castro Faria Neto HC, Gonçalves-de-Albuquerque CF. The Na/K-ATPase role as a signal transducer in lung inflammation. *Front Immunol*. 2024 Jan 17;14:1287512. doi: 10.3389/fimmu.2023.1287512.
33. Zhang X., Lee W., Bian J.S. Recent Advances in the Study of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in Neurodegenerative Diseases. *Cells*. 2022 Dec 16;11(24):4075. doi: 10.3390/cells11244075.

34. Ashok N., Khamar P., D'Souza S., Gijis M., Ghosh A., Sethu S., Shetty R. Ion channels in dry eye disease. *Indian J Ophthalmol.* 2023 Apr;71(4):1215-1226. doi: 10.4103/IJO.IJO\_3020\_22.
35. Kinoshita, P. F., Orellana, A. M. M., Nakao, V. W., de Souza Port's, N. M., Quintas, L. E. M., Kawamoto, E. M., & Scavone, C. (2022). The Janus face of ouabain in Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and calcium signalling in neurons. *British Journal of Pharmacology*, 179(8), 1512–1524. <https://doi.org/10.1111/bph.15419>.
36. Horisberger J.D. Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. *Physiology (Bethesda)*. 2004. Vol. 19. P. 377–387. doi: 10.1152/physiol.00013.2004.
37. Stock C., Heger T., Basse Hansen S., Thirup Larsen S., Habeck M., Dieudonné T., Driller R., Nissen P. Fast-forward on P-type ATPases: recent advances on structure and function. *Biochem Soc Trans.* 2023 Jun 28;51(3):1347-1360. doi: 10.1042/BST20221543.
38. Saffioti N.A., de Sautu M., Ferreira-Gomes M.S., Rossi R.C., Berlin J., Rossi J.P.F.C., Mangialavori I.C. E2P-like states of plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase characterization of vanadate and fluoride-stabilized phosphoenzyme analogues. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2019 Feb 1;1861(2):366-379. doi: 10.1016/j.bbamem.2018.11.001.
39. R.W. Albers. Biochemical aspects of active transport *Annu. Rev. Biochem.*, 36 (1967), pp. 727-756. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.36.070167.003455>
40. R.L. Post, S. Kume, T. Tobin, B. Orcutt, A.K. Sen Flexibility of an active center in sodium-plus-potassium adenosine triphosphatase *J. Gen. Physiol.*, 54 (1969), pp. 306-326. doi: 10.1085/jgp.54.1.306.
41. Michael Palmgren, P-type ATPases: Many more enigmas left to solve, *Journal of Biological Chemistry*, Volume 299, Issue 11, 2023, 105352, ISSN 0021-9258, <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.105352>.
42. Nguyen P.T., Deisl C., Fine M., Tippetts T.S., Uchikawa E., Bai X.C., Levine B. Structural basis for gating mechanism of the human sodium-potassium

- pump. *Nat Commun.* 2022 Sep 8;13(1):5293. doi: 10.1038/s41467-022-32990-x.
43. Dyla, M., Kjaergaard, M., Poulsen, H. & Nissen, P. Structure and mechanism of P-Type ATPase ion pumps. *Ann. Rev. Biochem.*10.1146/annurev-biochem-010611-112801 (2019).
  44. Dyla M., Basse Hansen S., Nissen P., Kjaergaard M. Structural dynamics of P-type ATPase ion pumps. *Biochem Soc. Trans.* 2019;47:1247–1257. doi: 10.1042/BST20190124.
  45. Apell H.J. Finding Na,K-ATPase: I - from cell to molecule. *Substantia.* 2018;2:17–28.
  46. Seflova J., Habibi N.R., Yap J.Q., Cleary S.R., Fang X., Kekenés-Huskey P.M., Espinoza-Fonseca L.M., Bossuyt J.B., Robia S.L. Fluorescence lifetime imaging microscopy reveals sodium pump dimers in live cells. *J Biol Chem.* 2022 May;298(5):101865. doi: 10.1016/j.jbc.2022.101865.
  47. Li Z., Langhans S.A. Transcriptional regulators of Na,K-ATPase subunits. *Front Cell Dev Biol* 26 (2015) 3:66. doi: 10.3389/fcell.2015.00066.
  48. Poluektov Y.M., Dergousova E.A., Lopina O.D., Mitkevich V.A., Makarov A.A., Petrushanko I.Y. Na,K-ATPase  $\alpha$ -subunit conformation determines glutathionylation efficiency. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019 Feb 26;510(1):86-90. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.01.052.
  49. McDonough A.A., Geering K., Farley R.A. The sodium pump needs its beta subunit. *FASEB J.* 1990;4(6):1598–1605. doi: 10.1096/fasebj.4.6.2156741.
  50. Meyer D.J., Bijlani S., de Sautu M., Spontarelli K., Young V.C., Gatto C., Artigas P. FXYD protein isoforms differentially modulate human Na/K pump function. *J Gen Physiol.* 2020 Dec 7;152(12):e202012660. doi: 10.1085/jgp.202012660.
  51. Arystarkhova E., Wetzel R.K., Asinovski N.K., Sweadner K.J. The gamma subunit modulates Na(+) and K(+) affinity of the renal Na,K-ATPase. *J Biol Chem.* 1999;274(47):33183–33185. doi: 10.1074/jbc.274.47.33183.
  52. Kuster B., Shainskaya A., Pu H.X., Goldshleger R., Blostein R., Mann M., Karlisch S.J. A new variant of the gamma subunit of renal Na,K-ATPase.

- Identification by mass spectrometry, antibody binding, and expression in cultured cells. *J Biol Chem.* 2000;275(24):18441–18446. doi: 10.1074/jbc.M001411200.
53. Yap J.Q., Seflova J., Sweazey R., Artigas P., Robia S.L. FXYP proteins and sodium pump regulatory mechanisms. *J Gen Physiol* (2021) 153:e202012633. doi: 10.1085/jgp.202012633.
  54. Blanco G., Mercer R.W. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol.* 1998 Nov;275(5):F633-50. doi: 10.1152/ajprenal.1998.275.5.F633.
  55. Gagnon K.B., Delpire E. Sodium transporters in human health and disease. *Front Physiol* (2021) 11:588664. doi: 10.3389/fphys.2020.588664.
  56. Sweadner K.J. Isozymes of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Biochim Biophys Acta.* 1989;988(2):185–220. doi: 10.1016/0304-4157(89)90019-1.
  57. Lingrel J.B. Na,K-ATPase: isoform structure, function, and expression. *J Bioenerg Biomembr.* 1992 Jun;24(3):263-70. doi: 10.1007/BF00768847.
  58. Glynn, I. M. The Na,K-transporting adenosine triphosphatase. In: *The Enzymes of Biological Membranes* (2nd ed.), edited by A. Martonosi. New York: Plenum, vol. 3, p. 35–114.
  59. Blanco G., Mercer R.W. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol.* 1998 Nov;275(5):F633-50. doi: 10.1152/ajprenal.1998.275.5.F633.
  60. Shamraj O.I., Lingrel J.B. A putative fourth Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase alpha-subunit gene is expressed in testis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Dec 20;91(26):12952-6. doi: 10.1073/pnas.91.26.12952.
  61. Lytton J., Lin J. C., Guidotti G. Identification of two molecular forms of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase in rat adipocytes. Relation to insulin stimulation of the enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, Volume 260, Issue 2, 1985, Pages 1177-1184, ISSN 0021-9258, [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)71224-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)71224-X).
  62. Lavoie L., Levenson R., Martin-Vasallo P., Klip A. The molar ratios of alpha and beta subunits of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase differ in distinct subcellular

- membranes from rat skeletal muscle. *Biochemistry*. 1997 Jun 24;36(25):7726-32. doi: 10.1021/bi970109s.
63. Zahler R., Brines M., Kashgarian M., Benz E.J. Jr, Gilmore-Hebert M. The cardiac conduction system in the rat expresses the alpha 2 and alpha 3 isoforms of the Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Jan 1;89(1):99-103. doi: 10.1073/pnas.89.1.99.
64. McGrail K.M., Phillips J.M., Sweadner K.J. Immunofluorescent localization of three Na,K-ATPase isozymes in the rat central nervous system: both neurons and glia can express more than one Na,K-ATPase. *J Neurosci*. 1991 Feb;11(2):381-91. doi: 10.1523/JNEUROSCI.11-02-00381.1991.
65. Staehr C., Rajanathan R. and Matchkov V.V. (2019) Involvement of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase isoforms in control of cerebral perfusion. *Exp. Physiol*. 104, 1023–1028 10.1113/EP087519.
66. Hieber V., Siegel G.J., Fink D.J., Beaty M.W., Mata M. Differential distribution of (Na, K)-ATPase alpha isoforms in the central nervous system. *Cell Mol Neurobiol*. 1991 Apr;11(2):253-62. doi: 10.1007/BF00769038.
67. Lemas M.V., Fambrough D.M. Sequence analysis of DNA encoding an avian Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase beta 2-subunit. *Biochim Biophys Acta*. 1993 Jul 4;1149(2):339-42. doi: 10.1016/0005-2736(93)90219-p.
68. Arystarkhova E., Sweadner K.J. Tissue-specific expression of the Na,K-ATPase beta3 subunit. The presence of beta3 in lung and liver addresses the problem of the missing subunit. *J Biol Chem*. 1997 Sep 5;272(36):22405-8. doi: 10.1074/jbc.272.36.22405.
69. Shelly D.A., He S., Moseley A., Weber C., Stegemeyer M., Lynch R.M., Lingrel J., Paul R.J. Na<sup>+</sup> pump  $\alpha$ 2-isoform specifically couples to contractility in vascular smooth muscle: evidence from gene-targeted neonatal mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C813–C820, 2004. doi: 10.1152/ajpcell.00389.2003.
70. Juhaszova M., Blaustein M.P. Na<sup>+</sup> pump low and high ouabain affinity alpha subunit isoforms are differently distributed in cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1800–1805, 1997. doi: 10.1073/pnas.94.5.1800.

71. Moore E.D., Etter E.F., Philipson K.D., Carrington W.A., Fogarty K.E., Lifshitz L.M., Fay F.S. Coupling of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump and sarcoplasmic reticulum in smooth muscle. *Nature* 365: 657–660, 1993. doi: 10.1038/365657a0.
72. Blanco G., Mercer R. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *The American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 1998. Vol.; 275, N 44. P. F633–F650. doi: 10.1152/ajprenal.1998.275.5.F633.
73. Blaustein M.P. and Hamlyn J.M. (2020) Ouabain, endogenous ouabain and ouabain-like factors: The Na(+) pump/ouabain receptor, its linkage to NCX, and its myriad functions. *Cell Calcium* 86, 102159 10.1016/j.ceca.2020.102159.
74. Song H., Lee M.Y., Kinsey S.P., Weber D.J., Blaustein M.P. An N-terminal sequence targets and tethers Na<sup>+</sup> pump alpha2 subunits to specialized plasma membrane microdomains. *J Biol Chem*. 2006;281:12929–12940. doi: 10.1074/jbc.M507450200.
75. DiPolo R., Beauge L. Sodium/calcium exchanger: influence of metabolic regulation on ion carrier interactions. *Physiol Rev*. 2006;86:155–203. doi: 10.1152/physrev.00018.2005.
76. Zhang J., Ren C., Chen L., Navedo M.F., Antos L.K., Kinsey S.P., Iwamoto T., Philipson K.D., Kotlikoff M.I., Santana L.F., Wier W.G., Matteson D.R., Blaustein M.P. Knockout of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in smooth muscle attenuates vasoconstriction and L-type Ca<sup>2+</sup> channel current and lowers blood pressure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;298:H1472–83. doi: 10.1152/ajpheart.00964.2009.
77. Blaustein M.P. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores and cell responsiveness. *Am J Physiol Cell Physiol* 264: C1367–C1387, 1993. doi: 10.1152/ajpcell.1993.264.6.C1367.
78. Tracy J. Pritchard, Peggy Sue Bowman, Andrew Jefferson, Metiner Tosun, Ronald M. Lynch, and Richard J. Paul. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase and Ca<sup>2+</sup> clearance

- proteins in smooth muscle: a functional unit. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010 Aug; 299(2): H548–H556. doi: 10.1152/ajpheart.00527.2009.
79. Pirkmajer S., Chibalin A.V. Chapter ten - hormonal regulation of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase from the evolutionary perspective. In: Orlov SN, editor. *Current topics in membranes*, vol. 83 .Cambridge, MA 02139, United States: Academic Press; (2019). p. 315–51.
80. Vlkovicova J., Javorkova V., Mezesova L., Pechanova O., Vrbjar N. Regulatory role of nitric oxide on the cardiac Na, K-ATPase in hypertension. *Physiol Res*. 2008;57(Suppl 2):S15–S22. doi: 10.33549/physiolres.931547.
81. Petrushanko I.Y., Bogdanov N.B., Lapina N., Boldyrev A.A., Gassmann M., Bogdanova A.Y. Oxygen-induced Regulation of Na/K ATPase in cerebellar granule cells. *J Gen Physiol*. 2007;130(4):389–398. doi: 10.1085/jgp.200709783.
82. Alharbi Y., Kapur A., Felder M., Barroilhet L., Stein T., Pattnaik B.R., Patankar M.S. Plumbagin-induced oxidative stress leads to inhibition of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (NKA) in canine cancer cells. *Sci Rep*. 2019 Aug 7;9(1):11471. doi: 10.1038/s41598-019-47261-x.
83. Baloglu E. Hypoxic Stress-Dependent Regulation of Na,K-ATPase in Ischemic Heart Disease. *Int J Mol Sci*. 2023 Apr 26;24(9):7855. doi: 10.3390/ijms24097855.
84. Bagrov A. Y., Shapiro J. I., Fedorova O. V. (2009). Endogenous cardiotonic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. *Pharmacol. Rev.* 61, 9–38. doi: 10.1124/pr.108.000711.
85. Schoner W., Scheiner-Bobis G. Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth. *Am J Physiol Cell Physiol* 293: C509–C536, 2007. doi: 10.1152/ajpcell.00098.2007.
86. Liu J., Xie Z.J. The sodium pump and cardiotonic steroids-induced signal transduction protein kinases and calcium-signaling microdomain in regulation of transporter trafficking. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Dec;1802(12):1237-45. doi: 10.1016/j.bbadis.2010.01.013.

87. Mijatovic T., Van Quaquebeke E., Delest B., Debeir O., Darro F., Kiss R. (2007). Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy. *Biochim. Biophys. Acta* 1776, 32–57. doi: 10.1016/j.bbcan.2007.06.002.
88. Blaustein M.P., Gottlieb S.S., Hamlyn J.M., Leenen F.H.H. Whither digitalis? What we can still learn from cardiotonic steroids about heart failure and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2022 Dec 1;323(6):H1281-H1295. doi: 10.1152/ajpheart.00362.2022.
89. Matozzo F. H., Votto A. P. S., Rodrigues-Mascarenhas S., Cavalcante-Silva L. H. A., Valente R. C., Rumjanek V. M. (2020). Ouabain as an Anti-cancer Agent. *Curr. Top. Biochem. Res.* 21, 25–40. , Du J., Jiang L., Chen F., Hu H., Zhou M. (2021). Cardiac Glycoside Ouabain Exerts Anticancer Activity via Downregulation of STAT3. *Front. Oncol.* 11. 1275. 10.3389/FONC.2021.684316.
90. Škubník J., Pavlíčková V., Rimpelová S., Atkin-Smith G., Tixeira R., Baxter A. A. (2021). Cardiac Glycosides as Immune System Modulators. *Biomolecules* 11, 659. 10.3390/BIOM11050659.
91. Ogawa H., Shinoda T., Cornelius F., Toyoshima C. (2009). Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase) with bound potassium and ouabain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 13742–13747. doi: 10.1073/pnas.0907054106.
92. Horesh N., Pelov I., Pogodin I., Zannadeh H., Rosen H., Mikhrina A.L., Dvela-Levitt M., Sampath V.P., Lichtstein D. Involvement of the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ 1 Isoform and Endogenous Cardiac Steroids in Depression- and Manic-like Behaviors. *Int J Mol Sci.* 2024 Jan 29;25(3):1644. doi: 10.3390/ijms25031644.
93. Lingrel J.B. The physiological significance of the cardiotonic steroid/ouabain-binding site of the Na,K-ATPase. *Annu Rev Physiol.* 2010;72:395-412. doi: 10.1146/annurev-physiol-021909-135725.
94. Cornelius F., Mahmmoud Y. A., Toyoshima C., Metal fluoride complexes of Na,K-ATPase: Characterization of fluoride-stabilized phosphoenzyme

- analogues and their interaction with cardiotonic steroids. *J. Biol. Chem.* 286, 29882–29892 (2011). doi: 10.1074/jbc.M111.259663.
95. Matchkov V.V., Krivoi I.I. Specialized Functional Diversity and Interactions of the Na,K-ATPase. *Front Physiol.* 2016 May 25;7:179. doi: 10.3389/fphys.2016.00179.
  96. Katz A., Lifshitz Y., Bab-Dinitz E., Kapri-Pardes E., Goldshleger R., Tal D.M., Karlsh S.J. Selectivity of digitalis glycosides for isoforms of human Na,K-ATPase. *J Biol Chem.* 2010 Jun 18;285(25):19582-92. doi: 10.1074/jbc.M110.119248.
  97. Hamlyn J.M., Blaustein M.P. Endogenous ouabain: Recent advances and controversies. *Hypertension* (2016) 68:526–32. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.06599.
  98. Chomczynski P.W., Vires K.M. A real-time PCR method to genotype mutant mouse models with altered affinity for cardiotonic steroids on the Na,K-ATPase. *PLoS One* (2022) 17:. doi: 10.1371/journal.pone.0267348.
  99. Brant B. Hafen; Micah Shook; Bracken Burns et al. Anatomy, Smooth Muscle. [Updated 2022 Jul 18]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532857/>
  100. Noto R.E., Leavitt L., Edens M.A. Physiology, Muscle. [Updated 2022 May 8]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532258/>.
  101. Wang L., Chitano P., Seow C.Y. Filament evanescence of myosin II and smooth muscle function. *J Gen Physiol.* 2021 Mar 1;153(3):e202012781. doi: 10.1085/jgp.202012781.
  102. Gash M.C., Kandle P.F., Murray I. et al. Physiology, Muscle Contraction. [Updated 2020 Apr 26]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537140/>.

103. Itoh H., Sakai J., Imoto A., Creed K.E. The control of smooth muscle tissues by nonadrenergic noncholinergic (NANC) nerve fibres in the autonomic nervous system. *J Smooth Muscle Res.* 1995 Jun;31(3):67-78. Japanese. doi: 10.1540/jsmr.31.67.
104. Webb R.C. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ.* 2003 Dec;27(1-4):201-6. doi: 10.1152/advan.00025.2003. PMID: 14627618.
105. Tobias A., Sadiq N.M. Physiology, Gastrointestinal Nervous Control. [Updated 2022 Sep 26]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545268/>
106. Brant B. Hafen; Bracken Burns et al. Physiology, Smooth Muscle. [Updated 2022 Aug 22]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526125/>.
107. Sanders K.M. Spontaneous Electrical Activity and Rhythmicity in Gastrointestinal Smooth Muscles. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1124:3-46. doi: 10.1007/978-981-13-5895-1\_1.
108. Fry C.H., McCloskey K.D. Spontaneous Activity and the Urinary Bladder. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1124:121-147. doi: 10.1007/978-981-13-5895-1\_5.
109. Lam M., Lamanna E., Bourke J.E. Regulation of Airway Smooth Muscle Contraction in Health and Disease. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1124:381-422. doi: 10.1007/978-981-13-5895-1\_16.
110. Pogoda K., Kameritsch P., Mannell H., Pohl U. Connexins in the control of vasomotor function. *Acta Physiol (Oxf).* 2019 Jan;225(1):e13108. doi: 10.1111/apha.13108.
111. Pohl U. Connexins: Key Players in the Control of Vascular Plasticity and Function. *Physiol Rev.* 2020 Apr 1;100(2):525-572. doi: 10.1152/physrev.00010.2019.

112. Lucaciu S.A., Leighton S.E., Hauser A., Yee R., Laird D.W. Diversity in connexin biology. *J Biol Chem.* 2023 Nov;299(11):105263. doi: 10.1016/j.jbc.2023.105263.
113. Fisher S.A. Vascular smooth muscle phenotypic diversity and function. *Physiological Genomics.* 2010. Vol. 42, suppl. A (3). P. 169–187. doi: 10.1152/physiolgenomics.00111.2010.
114. Crețoiu S.M., Crețoiu D., Popescu L.M. Human myometrium — the ultrastructural 3D network of telocytes. *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* 2012. Vol. 16, N 11. P. 2844–2849. doi: 10.1111/j.1582-4934.2012.01651.x.
115. Cavallé F., Cabrol D., Ferre F. Human myometrial smooth muscle cells and cervical fibroblasts in culture : a comparative study. *Methods Mol Med.* 1996;2:335-44. doi: 10.1385/0-89603-335-X:335. PMID: 21359752.
116. Kuriyama, H., K. Kitamura, T. Itoh, and R. Inoue. Physiological Features of Visceral Smooth Muscle Cells, With Special Reference to Receptors and Ion Channels. *Physiol. Rev.* 78: 811–920, 1998. doi: 10.1152/physrev.1998.78.3.811.
117. Terttu Katila, Chapter 7 - Uterine Contractility, Editor(s): Juan C. Samper, Jonathan F. Pycock, Angus O. McKinnon, *Current Therapy in Equine Reproduction*, W.B. Saunders, 2007, Pages 44-51.
118. Wray S., Burdyga T., Noble D. et al. Progress in understanding electro-mechanical signalling in the myometrium. *Acta Physiologica.* 2015. Vol. 213, N 2. P. 417–431. doi: 10.1111/apha.12431.
119. Roatesi I., Radu B.M., Crețoiu D. et al. Uterine telocytes: a review of current knowledge. *Biology of Reproduction.* 2015. Vol. 93, N 1. 10. doi: 10.1095/biolreprod.114.125906.
120. Aleksandrovykh V., Walocha J.A., Gil K. Telocytes in female reproductive system (human and animal). *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* 2016. Vol. 20, N 6. P. 994–1000. doi: 10.1111/jcmm.12843.

121. Friedmacher F., Rolle U. Interstitial cells of Cajal: clinical relevance in pediatric gastrointestinal motility disorders. *Pediatr Surg Int.* 2023 Apr 27;39(1):188. doi: 10.1007/s00383-023-05467-1.
122. Hutchings G., Williams O., Cretoiu D., Ciontea S.M. Myometrial interstitial cells and the coordination of myometrial contractility. *J Cell Mol Med.* 2009 Oct;13(10):4268-82. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00894.x.
123. Shmygol A., Blanks A.M., Bru-Mercier G., Gullam J.E., Thornton S. Control of uterine Ca<sup>2+</sup> by membrane voltage: toward understanding the excitation-contraction coupling in human myometrium. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Apr; 1101:97-109. doi: 10.1196/annals.1389.031.
124. Maxey A.P., McCain M.L. Tools, techniques, and future opportunities for characterizing the mechanobiology of uterine myometrium. *Exp Biol Med (Maywood).* 2021 May; 246(9): 1025 - 1035. doi: 10.1177/1535370221989259.
125. Susan Wray, Sarah Arrowsmith, Chapter 90 - Uterine Smooth Muscle, Editor(s): Joseph A. Hill, Eric N. Olson, Muscle, Academic Press, 2012, Pages 1207-1216. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:82493964>
126. Garfield R.E., Maner W.L. Physiology and electrical activity of uterine contractions. *Semin Cell Dev Biol.* 2007 Jun;18(3):289-95. doi: 10.1016/j.semcdb.2007.05.004.
127. Chappell M., Payne S. The action potential. Biosystems and biorobotics. In: *Physiology for Engineers.* In: Guglielmelli E, editor. Rome, Springer Nature. 2020. p. pp 36.
128. Webb R.C. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ.* 2003 Dec;27(1-4):201-6. doi: 10.1152/advan.00025.2003.
129. Wray S. Insights into the uterus. *Exp Physiol.* 2007;92:621–31. <http://dx.doi.org/10.1113/expphysiol.2007.038125>.
130. Tong W.C., Choi C.Y., Kharche S., Holden A.V., Zhang H., Taggart M.J. A computational model of the ionic currents, Ca<sup>2+</sup> dynamics and action potentials underlying contraction of isolated uterine smooth muscle. *PLoS*

- One. 2011 Apr 29;6(4):e18685. doi: 10.1371/annotation/d317e049-4927-4906-95a5-cd0198a3feb9.
131. Johnson J.D., Snyder C., Walsh M., Flynn M. Effects of myosin light chain kinase and peptides on Ca<sup>2+</sup> exchange with the N- and C-terminal Ca<sup>2+</sup> binding sites of calmodulin. *J Biol Chem*. 1996;2:761–7. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.271.2.761>.
  132. Shojo H., Kaneko Y. Oxytocin-induced phosphorylation of myosin light chain is mediated by extracellular calcium influx in pregnant rat myometrium. *J Mol Recognit*. 2001;6:401–5. <http://dx.doi.org/10.1002/jmr.551>.
  133. Butler T., Paul J., Europe-Finner N., Smith R., Chan E.C. Role of serine-threonine phosphoprotein phosphatases in smooth muscle contractility. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2013;304:485–504. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00161.2012>.
  134. Matthew A., Shmygol A., Wray S. Ca<sup>2+</sup> entry, efflux and release in smooth muscle. *Biol Res*. 2004;37(4):617–624. doi: 10.4067/s0716-97602004000400017.
  135. Li W.N., Dickson M.J., DeMayo F.J., Wu S.P. The role of progesterone receptor isoforms in the myometrium. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2022 Nov;224:106160. doi: 10.1016/j.jsbmb.2022.106160.
  136. Flores D., Madhavan M., Wright S., Arora R. Mechanical and signaling mechanisms that guide pre-implantation embryo movement. *Development*. 2020 Dec 21;147(24):dev193490. doi: 10.1242/dev.193490.
  137. Malik M., Roh M., England S.K. Uterine contractions in rodent models and humans. *Acta Physiol (Oxf)*. 2021 Apr;231(4):e13607. doi: 10.1111/apha.13607.
  138. Koutras A., Fasoulakis Z., Syllaios A., Garmpis N., Diakosavvas M., Pagkalos A., Ntounis T., Kontomanolis E.N. Physiology and Pathology of Contractility of the Myometrium. *In Vivo*. 2021 May-Jun;35(3):1401-1408. doi: 10.21873/invivo.12392.

139. Gill P., Patel A., Van Hook J.W. Uterine Atony. 2023 Jul 4. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan.
140. Español E.S., Villamil M.M. Calixarenes: Generalities and Their Role in Improving the Solubility, Biocompatibility, Stability, Bioavailability, Detection, and Transport of Biomolecules. *Biomolecules*. 2019 Mar 5;9(3):90. doi: 10.3390/biom9030090.
141. Кальченко В. И., Костерин С. А., Веклич Т. А., Родик Р. В., Шкрабак А. А., Мазур Ю. Ю., Слинченко Н. Н. Синтез новых перспективных утеростимуляторов на основе каликсаренсульфонамидинов и их биохимическая активность // Монографія: Фундаментальні проблеми створення нових речовин і матеріалів хімічного виробництва. — Київ: Академперіодика, 2016. — Р. 224—235.
142. Pan Y.C., Hu X.Y., Guo D.S. Biomedical Applications of Calixarenes: State of the Art and Perspectives. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2021 Feb 8;60(6):2768-2794.
143. Rodik R.V., Klymchenko A.S., Jain N. et al. Virus-sized DNA nanoparticles for gene delivery based on micelles of cationic calixarenes. *Chemistry*. 2011. Vol. 17, N 20. P. 5526-5538. doi: 10.1002/chem.201100154
144. Gutsche D. Calixarenes: A personal history. In: Vicens J., Harrowfield J., editors. *Calixarenes in the Nanoworld*. Springer; Dordrecht, The Netherlands: 2007. pp. 1–19. doi:10.1007/978-1-4020-5022-4.
145. Mammino L. Bowl-shaped structures from acylphloroglucinols: An ab initio and DFT study. *Mol. Phys*. 2017;115:2254–2266. <https://doi.org/10.1080/00268976.2017.1306127>
146. Del Valle E.M. Cyclodextrins and their uses: A review. *Process Biochem*. 2004;39:1033–1046. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00258-9](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00258-9).
147. Shinkai, S.; Araki, K.; Manabe, O.J. Does the calixarene cavity recognise the size of guest molecules? On the hole-size selectivity in water-soluble calixarenes. *Chem. Soc. Chem. Commun*. 1988, 3, 187–189. <https://doi.org/10.1039/C39880000187>.

148. О. К. Ярош, Р. В. Родік, В. І. Кальченко, О. О. Ярош. Калікс[4]арени — основа створення нових класів лікарських засобів (огляд літератури). Журнал Національної академії медичних наук України. - 2013. - т. 19, № 4. - С. 421-434.
149. Nag R., Rao C.P. Calixarene-mediated host-guest interactions leading to supramolecular assemblies: visualization by microscopy. *Chem Commun (Camb)*. 2022 May 20;58(41):6044-6063. doi: 10.1039/d2cc01850k.
150. Li W., Xu W., Zhang S., Li J., Zhou J., Tian D., Cheng J., Li H. Supramolecular Biopharmaceutical Carriers Based on Host-Guest Interactions. *J Agric Food Chem*. 2022 Oct 12;70(40):12746-12759. doi: 10.1021/acs.jafc.2c04822.
151. Giuliani M., Morbioli I., Sansone F., Casnati A. Moulding calixarenes for biomacromolecule targeting. *Chem Commun (Camb)*. 2015 Sep 28;51(75):14140-59. <https://doi.org/10.1039/C5CC05204A>.
152. Bohmer V. Calixarenes, macrocycles with (almost) unlimited possibilities. — *Angewandte Chemie International Edition in English*. 1995. V. 34. P. 713-745. <https://doi.org/10.1002/anie.199507131>.
153. Naseer M.M., Ahmed M., Hameed S. Functionalized calix[4]arenes as potential therapeutic agents. *Chem Biol Drug Des*. 2017 Feb;89(2):243-256. doi: 10.1111/cbdd.12818.
154. Muravev A.A., Voloshina A.D., Sapunova A.S., Gabdrakhmanova F.B., Lenina O.A., Petrov K.A., Shityakov S., Skorb E.V., Solovieva S.E., Antipin I.S. Calix[4]arene-pyrazole conjugates as potential cancer therapeutics. *Bioorg Chem*. 2023 Oct;139:106742. doi: 10.1016/j.bioorg.2023.106742.
155. Liu Q., Zhang T.X., Zheng Y., Wang C., Kang Z., Zhao Y., Chai J., Li H.B., Guo D.S., Liu Y., Shi L. Calixarene-Embedded Nanoparticles for Interference-Free Gene-Drug Combination Cancer Therapy. *Small*. 2021 Feb;17(8):e2006223. doi: 10.1002/sml.202006223.
156. Wang C., Chang Y.X., Chen X., Bai L., Wang H., Pan Y.C., Zhang C., Guo D.S., Xue X. A Calixarene Assembly Strategy of Combined Anti-Neuroinflammation and Drug Delivery Functions for Traumatic Brain Injury

- Therapy. *Molecules*. 2022 May 6;27(9):2967. doi: 10.3390/molecules27092967.
157. Da Silva, E.; Ficheux, D.; Coleman, A.W. Anti-thrombotic activity of water-soluble calix[n]arenes. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 2005, 52, 201–206. <https://doi.org/10.1007/s10847-004-6715-4>.
158. Alex J.M., Rennie M.L., Engilberge S., Lehoczki G., Dorottya H., Fizil Á., Batta G., Crowley P.B. Calixarene-mediated assembly of a small antifungal protein. *IUCrJ*. 2019 Feb 5;6(Pt 2):238-247. doi: 10.1107/S2052252519000411.
159. Padnya P.L., Terenteva O.S., Akhmedov A.A., Iksanova A.G., Shtyrlin N.V., Nikitina E.V., Krylova E.S., Shtyrlin Y.G., Stoikov I.I. Thiocalixarene based quaternary ammonium salts as promising antibacterial agents. *Bioorg Med Chem.* 2021 Jan 1;29:115905. doi: 10.1016/j.bmc.2020.115905.
160. Shurpik D.N., Padnya P.L., Stoikov I.I., Cragg P.J. Antimicrobial Activity of Calixarenes and Related Macrocycles. *Molecules*. 2020 Nov 5;25(21):5145. doi: 10.3390/molecules25215145.
161. Hussain M.A., Ashraf M.U., Muhammad G., Tahir M.N., Bukhari S.N.A. Calixarene: A Versatile Material for Drug Design and Applications. *Curr Pharm Des.* 2017; 23(16): 2377-2388. doi: 10.2174/1381612822666160928143328.
162. Dawn A., Yao X., Yu Y., Jiang J., Kumari H. Assessment of the in vitro toxicity of calixarenes and a metal-seamed calixarene: a chemical pathway for clinical application. *Supramol Chem.* 2019;31(7):425-431. doi: 10.1080/10610278.2019.1616732.
163. Abd Karim N.F.N., Supian F.L., Musa M., Ayop S.K., Azmi M.S.M., Yazid M.D., Yi W.Y. Calixarene Derivatives: A Mini-Review on their Synthesis and Demands in Nanosensors and Biomedical Fields. *Mini Rev Med Chem.* 2023;23(6):734-745. doi: 10.2174/1389557522666220928120727.
164. Gorbunov A.; Kuznetsova J.; Deltsov I.; Molokanova A.; Cheshkov D.; Bezzubov S.; Kovalev V.; Vatsouro I. Selective azide-alkyne cycloaddition

- reactions of azidoalkylated calixarenes. *Org. Chem. Front.* 2020, 7, 2432–2441. doi: 10.1039/D0QO00650E.
165. Zadmard R, Akbarzadeh A, Jalali MR. Highly functionalized calix[4]arenes via multicomponent reactions: synthesis and recognition properties. *RSC Adv.* 2019 Jun 24;9(34):19596-19605. doi: 10.1039/c9ra03354h.
166. Marcos P.M., Berberan-Santos M.N. Fluorescent homooxacalixarenes: recent applications in supramolecular systems. *Front Chem.* 2023 Oct 6;11:1258026. doi: 10.3389/fchem.2023.1258026.
167. Chao J., Song K., Wang H., Guo Z., Zhang B., Zhang T. Study on the Inclusion Interaction of P-Sulfonatocalix[n]Arenes with Norfloxacin. *Phys. Chem. Liq.* 2017;55:579–588. doi: 10.1080/00319104.2016.1250270.
168. Seridi L., Boufelfel A., Soltani S. Structural, Electronic and QTAIM Analysis of Host-Guest Interaction of Warfarin with  $\beta$ -Cyclodextrin and Calix[4]Arene. *J. Mol. Liq.* 2016;221:885–895. doi: 10.1016/j.molliq.2016.06.071.
169. Khan K., Badshah S.L., Ahmad N., Rashid H.U., Mabkhot Y. Inclusion Complexes of a New Family of Non-Ionic Amphiphilic Dendrocalix[4]Arene and Poorly Water-Soluble Drugs Naproxen and Ibuprofen. *Molecules.* 2017;22:783. doi: 10.3390/molecules22050783.
170. Mehra C., Gala R., Kakatkar A., Kumar V., Khurana R., Chatterjee S., Kumar N.N., Barooah N., Bhasikuttan A.C., Mohanty J. Cooperative Enhancement of Antibacterial Activity of Sanguinarine Drug through p-Sulfonatocalix[6]Arene Functionalized Silver Nanoparticles. *Chem. Commun.* 2019;55:14275–14278. doi: 10.1039/C9CC07378G.
171. Naseer M.M., Ahmed M., Hameed S. Functionalized calix[4]arenes as potential therapeutic agents. *Chem Biol Drug Des.* 2017 Feb;89(2):243-256. doi: 10.1111/cbdd.12818.
172. Ferreira J.F., Bagatin I.A. A Cr(VI) selective probe based on a quinoline-amide calix[4]arene. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2018;189:44–50. doi: 10.1016/j.saa.2017.07.056.

173. Bahojb Noruzi E., Molaparast M., Zarei M., Shaabani B., Kariminezhad Z., Ebadi B., Shafiei-Irannejad V., Rahimi M., Pietrasik J. Para-Sulfonatocalix[n]Arene-Based Biomaterials: Recent Progress in Pharmaceutical and Biological Applications. *Eur. J. Med. Chem.* 2020;190:112121. doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112121.
174. Rahimi M., Karimian R., Noruzi E.B., Ganbarov K., Zarei M., Kamounah F.S., Yousefi B., Bastami M., Yousefi M., Kafil H.S. Needle-Shaped Amphoteric Calix[4]Arene as a Magnetic Nanocarrier for Simultaneous Delivery of Anticancer Drugs to the Breast Cancer Cells. *Int. J. Nanomed.* 2019;14:2619–2636. doi: 10.2147/IJN.S194596.
175. Cagil E.M., Hameed O., Ozcan F. Production of a new platform based calixarene nanofiber for controlled release of the drugs. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019 Jul;100:466-474. doi: 10.1016/j.msec.2019.03.038.
176. Geng W.C., Huang Q., Xu Z., Wang R., Guo D.S. Gene delivery based on macrocyclic amphiphiles. *Theranostics.* 2019 May 18;9(11):3094-3106. doi: 10.7150/thno.31914.
177. Burilov V., Makarov E., Mironova D., Sultanova E., Bilyukova I., Akyol K., Evtugyn V., Islamov D., Usachev K., Mukhametzyanov T., Solovieva S., Antipin I. Calix[4]arene Polyamine Triazoles: Synthesis, Aggregation and DNA Binding. *Int J Mol Sci.* 2022 Nov 28;23(23):14889. doi: 10.3390/ijms232314889.
178. Jiang T., Gonzalez K.M., Cordova L.E., Lu J. Nanotechnology-enabled gene delivery for cancer and other genetic diseases. *Expert Opin Drug Deliv.* 2023 Apr;20(4):523-540. doi: 10.1080/17425247.2023.2200246.
179. Kauerhof D., Niemeyer J. Functionalized Macrocycles in Supramolecular Organocatalysis. *ChemPlusChem.* 2020;85:889–899. doi: 10.1002/cplu.202000152.
180. Yue L.-J., Liu Y.-Y., Xu G.-H., Ma J.-F. Calix[4]Arene-Based Polyoxometalate Organic–Inorganic Hybrid and Coordination Polymer as Heterogeneous Catalysts for Azide–Alkyne Cycloaddition and Knoevenagel

- Condensation Reaction. *New J. Chem.* 2019;43:15871–15878. doi: 10.1039/C9NJ03930A.
181. Wang C., Wang S.J., Kong F.G. Calixarene-Protected Titanium-Oxo Clusters and Their Photocurrent Responses and Photocatalytic Performances. *Inorg Chem.* 2021 Apr 5;60(7):5034-5041. doi: 10.1021/acs.inorgchem.1c00063.
182. Spagnul A., Bouvier-Capely C., Phan G., Rebière F., Fattal E. A new formulation containing calixarene molecules as an emergency treatment of uranium skin contamination. *Health Phys.* 2010 Sep;99(3):430-4. doi: 10.1097/HP.0b013e3181d1a1b6.
183. Wang J., Zhuang S. Cesium Separation from Radioactive Waste by Extraction and Adsorption Based on Crown Ethers and Calixarenes. *Nucl. Eng. Technol.* 2020;52:328–336. doi: 10.1016/j.net.2019.08.001.
184. Ren H., Wang H., Wen W., Li S., Li N., Huo F., Yin C. A summary of calixarene-based fluorescent sensors developed during the past five years. *Chem Commun (Camb).* 2023 Nov 21;59(93):13790-13799. doi: 10.1039/d3cc04179d.
185. Parikh J., Bhatt K., Modi K., Patel N., Desai A., Kumar S., Mohan B. A versatile enrichment of functionalized calixarene as a facile sensor for amino acids. *Luminescence.* 2022 Mar;37(3):370-390. doi: 10.1002/bio.4186.
186. Nikšić-Franjić I., Colasson B., Reinaud O., Višnjevac A., Piantanida I., Pavlović Saftić D. Novel pyrene-calix[4]arene derivatives as highly sensitive sensors for nucleotides, DNA and RNA. *RSC Adv.* 2023 Sep 13;13(39):27423-27433. doi: 10.1039/d3ra05696a.
187. Kirila T. U. Smirnova A. V. Filippov A. S. Razina A. B. Tenkovtsev A. V. Filippov A. P. Thermosensitive star-shaped poly-2-ethyl-2-oxazine. Synthesis, structure characterization, conformation, and self-organization in aqueous solutions. *Eur. Polym. J.* 2019;120:109215. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2019.109215.
188. Zadmand R., Hokmabadi F., Jalali M.R., Akbarzadeh A. Recent progress to construct calixarene-based polymers using covalent bonds: synthesis and

- applications. RSC Adv. 2020 Sep 3;10(54):32690-32722. doi: 10.1039/d0ra05707j.
189. Hokmabadi F., Zadmard R., Akbarzadeh A., Tafakori V., Jalali M.R., Ahmadian G. Synthesis of a new chitosan-p-tert-butylcalix[4]arene polymer as adsorbent for toxic mercury ion. R Soc Open Sci. 2022 May 24;9(5):211223. doi: 10.1098/rsos.211223.
190. Veklich T.O., Kosterin S.O., Rodik R.V., Cherenok S.O., Boiko V.I., Kal'chenko V.I. Effect of calixarene-phosphonic acid on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in plasma membranes of the smooth-muscle cells. Ukr Biokhim Zh (1999). 2006 Jan-Feb;78(1):70-86. Ukrainian. PMID: 17147269.
191. Veklich T.O., Shkrabak O.A., Kosterin S.O., Rodik R.V., Cherenok S.O., Boiko SO, Boiko VI, Kal'chenko VI. The calixarenes C-97 and C-107 stimulate influence of ouabain on the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in plasmatic membrane of smooth muscle cells. Ukr Biokhim Zh (1999). 2006 Nov-Dec;78(6):53-63. Ukrainian. PMID: 17494319.
192. Костерін С. О., Цимбалюк О. В. Механокінетика вісцеральних гладеньких м'язів та її модуляція наноматеріалами. Наукова думка. 2022.
193. Burdyga V, Kosterin SA. Kinetic analysis of smooth muscle relaxation. Gen Physiol Biophys. 1991 Dec;10(6):589-98.
194. Вплив каліксарену С-107 на кінетичні параметри Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТР-ази плазматичної мембрани міоцитів матки / Т. О. Векліч, О. А. Шкрабак, Р. В. Родік, В. І. Кальченко, С. О. Костерін // Український біохімічний журнал. — 2011. — Т. 83, № 2. — С. 36-44. — Режим доступу: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/BioChem\\_2011\\_83\\_2\\_7](http://nbuv.gov.ua/UJRN/BioChem_2011_83_2_7).