

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра біохімії

Завідувач кафедри проф. Олексій САВЧУК

Протокол №____ засідання кафедри

від “____” _____ 20__ р.

**Na⁺, K⁺-АТФазна АКТИВНІСТЬ ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ
ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВИХ КЛІТИН ТА СКОРОТЛИВІ ВЛАСТИВОСТІ
МІОМЕТРІЯ ЗА ДІЇ КАЛІКС[4]АРЕНУ С-1220**

Випускна кваліфікаційна робота
студента денної форми навчання
за спеціальністю Біологія та біохімія
Селітреннікова Сергія Валерійовича

Науковий керівник від кафедри
канд. біол. наук., доц. Синельник Т.Б.

Робота виконана у відділі біохімії м'язів Інституту біохімії імені
О.В. Палладіна НАН України під керівництвом провідн. наук. співроб., д-ра
біол. наук, ст. дослідника Векліч Тетяни Олександрівни

Оцінка захисту роботи

Київ – 2026 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АТФ	–	аденозинтрифосфат;
АТФаза	–	аденозинтрифосфатаза;
ГМ	–	гладенькі м'язи;
ГМК	–	гладеньком'язова клітина;
ДМСО	–	диметилсульфоксид;
ЛКС	–	лазерно-кореляційна спектроскопія;
ПМ	–	плазматична мембрана;
K_a	–	уявна константа активації;
K_m	–	уявна константа Міхаеліса;
n	–	кількість дослідів.
n_H	–	коефіцієнт Хілла;
V_{max}	–	максимальна початкова швидкість реакції гідролізу АТФ;

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. Структурно-функціональна характеристика Na^+, K^+ -АТФази та біологічна активність каліксаренів як потенційних модуляторів ферменту....	7
1.1. Структура та особливості функціонування Na^+, K^+ -АТФази плазматичної мембрани	7
1.1.1. Структурна організація та механізм роботи Na^+, K^+ -АТФази.....	8
1.1.2. Механізми регуляції Na, K^+ -АТФази	10
1.1.3. Фізіологічна роль Na^+, K^+ -АТФази	13
1.2. Загальна характеристика каліксаренів та особливості ефекторної дії каліксаренів на деякі ензими	16
1.2.1. Структура, синтез та фізико-хімічні властивості каліксаренів	16
1.2.2. Каліксарени як модулятори біологічних мішеней.....	18
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень	22
2.1. Матеріали, реактиви та обладнання.....	22
2.2. Дизайн експерименту та об'єкти дослідження.....	23
2.3. Отримання фракції плазматичних мембран клітин міометрія	24
2.4. Отримання гладеньком`язових клітин матки щурів	26
2.5. Визначення Na^+, K^+ -АТФазної активності у плазматичних мембранах клітин міометрія	28
2.6. Методи кінетичного аналізу	30
2.7. Дослідження міоцитів методом лазерно-кореляційної спектроскопії...31	31
2.8. Методи тензометричного дослідження	32
2.9. Статистичний аналіз	34
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення	36
3.1. Активність натрієвої помпи за дії калікс[4]арену С-1220	36
3.1.1. Активність натрієвої помпи за різних концентрацій АТФ за дії калікс[4]арену С-1220	36

3.1.2. Активність натрієвої помпи за різних концентрацій іонів магнію за дії калікс[4]арену С-1220	39
3.2. Гідродинамічний діаметр гладеньком'язових клітин міометрія за дії калікс[4]арену С-1220.....	42
3.3. Оцінка скоротливої активності смужок міометрія за дії калікс[4]арену С-1220	44
ВИСНОВКИ	48
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	49

ВСТУП

У сьогоденній ензимології постає значуще завдання – глибоке вивчення усіх ланок процесів фармакомеханічного та електромеханічного спряження у гладеньком'язових структурах задля підбору нових потенційно ефективних низькомолекулярних регуляторів систем, що підтримують іонний гомеостаз у клітинах.

Обґрунтування доцільності такого пошуку полягає у значній кількості позитивних практичних аспектів, оскільки саме такі ефектори, що характеризуються високою селективністю й афінністю, оборотністю ензиматичної дії та низькою токсичністю разом з високою біодоступністю, є фундаментом для синтезу фармацевтичних препаратів нового покоління.

Нормальне фізіологічне функціонування порожнистих органів значною мірою визначається чіткою та збалансованою роботою гладеньких м'язів (ГМ), які, вкриваючи стінки цих органів, забезпечують контрактильну активність. Вона, зі свого боку, підтримується складною мережею транспортних систем, залучених у підтримку іонного гомеостазу кальцію у клітині та за її межами. Відомо, що порушення злагодженої роботи таких систем негативно впливає на процеси скорочення-розслаблення ГМ та, відповідно, призводить до виникнення низки патологічних станів з боку систем органів [1-3].

Плазматична мембрана (ПМ) клітин гладеньких м'язів усіх типів щільно пронизана системами активного іонного транспорту – АТФазами. Одна з таких систем, Na^+, K^+ -АТФаза, забезпечує вивільнення іонів натрію за межі клітини та акумулювання калію у цитозолі. Завдяки роботі цього електроензиму реалізується збудливість клітини, вторинно-активний транспорт, та опосередковано контролюється ряд ключових метаболічних процесів. Так, впливаючи на концентраційний баланс натрію, калію,

кальцію, цей ензим регулює процеси скорочення та розслаблення клітини, її проліферативну та секреторну активність, апоптоз, а також низку інших значущих сигнальних шляхів. При цьому сама Na^+, K^+ -АТФаза є мішенню впливу як фізіологічних регуляторних чинників, так і фармакологічних агентів [4-6].

Порушення скоротливої здатності міометрія (гладеньком'язовий шар матки) призводить до слабкості пологової діяльності, спонтанних абортів, передчасних пологів, викидней, атонії, гіпотонусу та гіпертонусу матки [7-9]. Через це існує нагальна потреба у створенні нових ефективних лікарських засобів, здатних запобігати та протидіяти порушенням функціонування міометрія. Перспективними кандидатами на роль таких препаратів є сполуки класу каліксаренів, які завдяки своїм структурним і функціональним особливостям становлять значний інтерес для біомедичних досліджень та можуть бути одержані шляхом масштабного синтезу з оптимальними економічними витратами [10–14].

Метою роботи було проаналізувати Na^+, K^+ -АТФазну активність плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин та скоротливі властивості міометрія за дії калікс[4]арену С-1220. Для реалізації поставленої мети необхідно було вирішити наступні завдання:

1. Визначити кінетичні параметри (уявну константу Міхаеліса K_m , уявну константу активації K_a та коефіцієнт Хілла n_H) Na^+, K^+ -АТФази за дії калікс[4]арену С-1220 при різних концентраціях АТФ та іонів Mg^{2+}
2. Дослідити гідродинамічний діаметр гладеньком'язових клітин міометрія за дії калікс[4]арену С-1220.
3. Охарактеризувати скоротливу активність смужок міометрія за дії калікс[4]арену С-1220.

РОЗДІЛ 1

СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА Na⁺,K⁺-АТФази ТА БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ КАЛІКСАРЕНІВ ЯК ПОТЕНЦІЙНИХ МОДУЛЯТОРІВ ФЕРМЕНТУ

1.1. Структура та особливості функціонування Na⁺,K⁺-АТФази плазматичної мембрани

Na⁺,K⁺-АТФаза плазматичної мембрани (відома також як натрієва помпа, КФ 3.6.3.9) є енергозалежною системою мембранного перенесення, що притаманна тваринним клітинам. Даний фермент забезпечує виведення іонів Na⁺ із цитозолу в екстрацелюлярний простір з одночасним транспортуванням іонів K⁺ всередину клітини, використовуючи для цього процесу енергію гідролізу АТФ (при цьому дотримується стехіометричне співвідношення: на 1 молекулу АТФ припадає 3 іони Na⁺ та 2 іони K⁺). Структурно натрієва помпа організована як комплекс із двох нековалентно сполучених субодиниць – α та β , а в специфічних типах тканин до складу ансамблю входить також додаткова регуляторна γ -субодиниця [15].

Каталітична α -субодиниця характеризується молекулярною масою в межах 100–113 кДа; вона пронизує мембрану десятьма альфа-спіральними сегментами та містить у своїй архітектурі активний центр, ділянки для зв'язування катіонів натрію та калію, а також рецепторні зони для інгібіторів. β -субодиниця, що є глікопротеїном із молекулярною масою білкової частини 50–60 кДа (без урахування глікозилування), відіграє критичну роль у забезпеченні правильної просторової орієнтації Na⁺,K⁺-АТФази в ліпідному бішарі, контролюючи її транслокацію з ендоплазматичного ретикулу до плазматичної мембрани. Цей поліпептид лише один раз перетинає мембрану,

причому його N-термінальний кінець локалізований у цитоплазматичному просторі. β -субодиниця залучена до процесів регуляції кінетичних характеристик ферменту, є необхідною для активації процесу розщеплення АТФ, іонної транслокації та взаємодії з такими інгібіторами, як убаїн. За відсутності належного зв'язку з β -компонентом (який реалізується в ділянці між 7-м та 8-м трансмембранними доменами), α -субодиниця втрачає здатність до транспортування іонів [16]. У високоочищених зразках ензиму обидві основні субодиниці (α та β) виявляються в еквімолярних кількостях [17]. Крім того, ідентифіковано найменшу, третю за рахунком, γ -субодиницю, молекулярна маса якої становить 70-11 кДа, і яка представлена кількома ізоформами. Оскільки ланцюг цього білка містить консервативну послідовність амінокислот Phe-Xaa-Tyr-Asp, його відносять до родини FXYD-білків. Роль γ -субодиниці полягає у тканиноспецифічній модуляції функціонування натрієвого насоса, що може проявлятися як у посиленні, так і в пригніченні його активності [18].

1.1.1. Структурна організація та механізм роботи Na^+, K^+ -АТФази

Відповідно до раніше викладених відомостей, поліпептидна послідовність α -субодиниці Na^+, K^+ -АТФази характеризується наявністю десяти трансмембранних сегментів, що прошивають плазматичну мембрану, при цьому обидва термінальні кінці, а саме N- та С-кінці, локалізовані з боку цитозолу (рис. 1.1).

Найважливішими функціональними одиницями α -субодиниці вважаються три основні цитоплазматичні домени, серед яких виділяють: А-домен, що виконує активаційну роль та відповідає за спряження конформаційних перебудов; Р-домен, у якому безпосередньо реалізується

процес фосфорилування ферменту; N-домен, що є нуклеотид-зв'язувальною ділянкою, призначеною для специфічної взаємодії з молекулою АТФ. Велика кількість амінокислотних залишків даного ланцюга зосереджена саме у внутрішньоклітинному просторі, де вони формують масивний цитозольний домен.

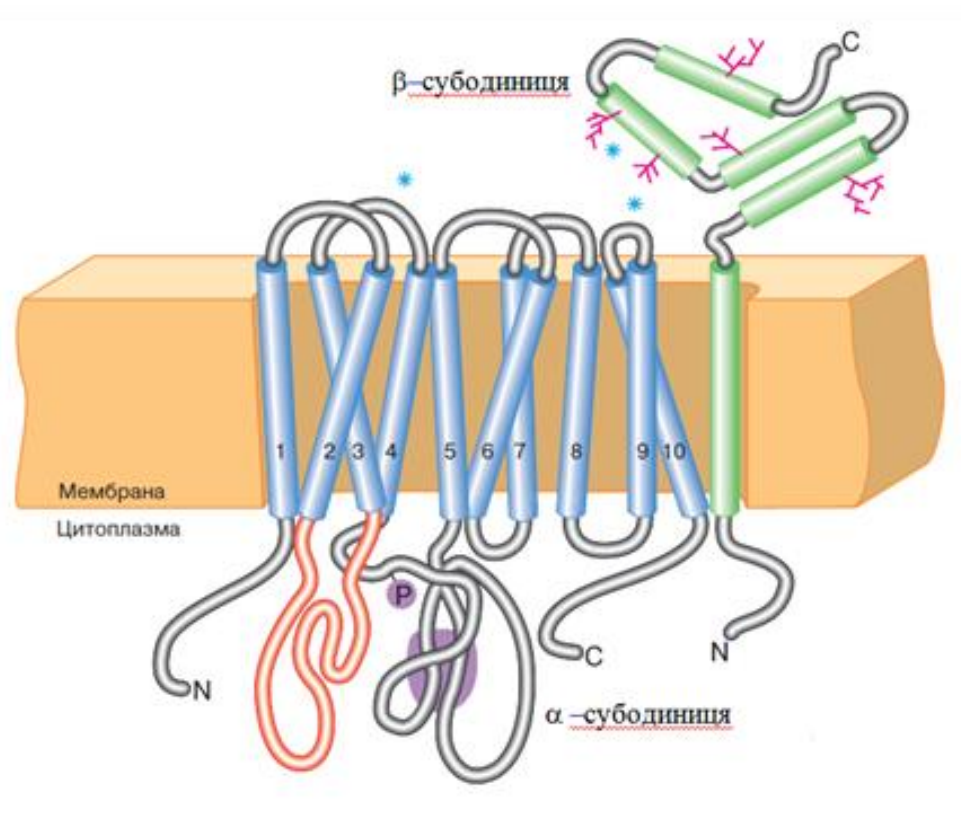


Рис. 1.1. Схема просторового розташування Na^+, K^+ -АТФази в архітектурі клітинної мембрани (адаптовано з [19])

Свою чергою, β -субодина на зовнішній поверхні своєї молекули має три дисульфідні містки та три ділянки для N-глікозилювання, до яких приєднані розгалужені вуглеводневі фрагменти [19].

У клітинах ссавців зазвичай виділяють чотири ізоформи α -субодинаці, а саме $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ та $\alpha 4$, а також три ізоформи β -субодинаці, до яких належать $\beta 1$, $\beta 2$ та $\beta 3$ [20]. Взаємодія цих компонентів призводить до формування різноманітних варіантів $\alpha\beta$ -димерів, причому отримані ізоферменти

характеризуються специфічними кінетичними параметрами та мають неоднаковий розподіл у різних тканинах або на різних стадіях онтогенезу [21]. Суттєвою відмінністю між цими ізоформами є їхня неоднакова чутливість до впливу серцевих глікозидів. Зокрема, $\alpha 1$ -субодиниця, що присутня у клітинах нирок, демонструє значну резистентність до дії убаїну, тоді як $\alpha 2$ - та $\alpha 3$ -субодиниці, характерні для нервових та м'язових клітин, навпаки, виявляють високу афінність до цього інгібітора. Було з'ясовано, що $\alpha 1$ -ізоформа у щурів має вкрай низьку чутливість до убаїну, оскільки її константа дисоціації (K_d) становить 48000 нМ, тоді як для інших субодиниць, таких як $\alpha 2$, $\alpha 3$ та $\alpha 4$, цей показник є значно нижчим і дорівнює 115, 1,6 та 312 нМ, відповідно, що свідчить про їхню високу вразливість до дії препарату [22-24]. Крім того, ці ізоформи відрізняються спорідненістю до АТФ та іонів натрію, здатністю до інгібування іонами кальцію, рівнем стійкості до впливу окисників, вільних радикалів та ендогенних протеаз, а також механізмами регуляції їхнього біосинтезу та активності в клітині [25-27]. Згідно з наявними літературними даними, Na^+, K^+ -АТФаза функціонує як олігомерний комплекс, а саме як асиметричний тетрамер, сформований із чотирьох α/β -протомерів, між якими існують як позитивні, так і негативні синергетичні взаємодії [28]. Таким чином, Na^+, K^+ -АТФаза є ферментом із надзвичайно складною структурною організацією, що безпосередньо пов'язано зі специфікою його функціонування у плазматичних мембранах клітин організму.

1.1.2. Механізми регуляції Na^+, K^+ - АТФази

Використовуючи енергію, що вивільняється під час гідролізу АТФ для забезпечення активного транспорту іонів, Na^+, K^+ -АТФаза реалізує складний багатостадійний механізм, у якому беруть участь іони Na^+ , K^+ , Mg^{2+} та

молекула АТФ. У процесі перебігу реакції даний фермент здатний переходити між двома основними конформаційними станами – E1 і E2. При цьому у формі E1 ензим характеризується високою афінністю до АТФ та іонів натрію.

Основні етапи реакційного циклу Na^+, K^+ -АТФази схематично представлені на рис. 1.2.

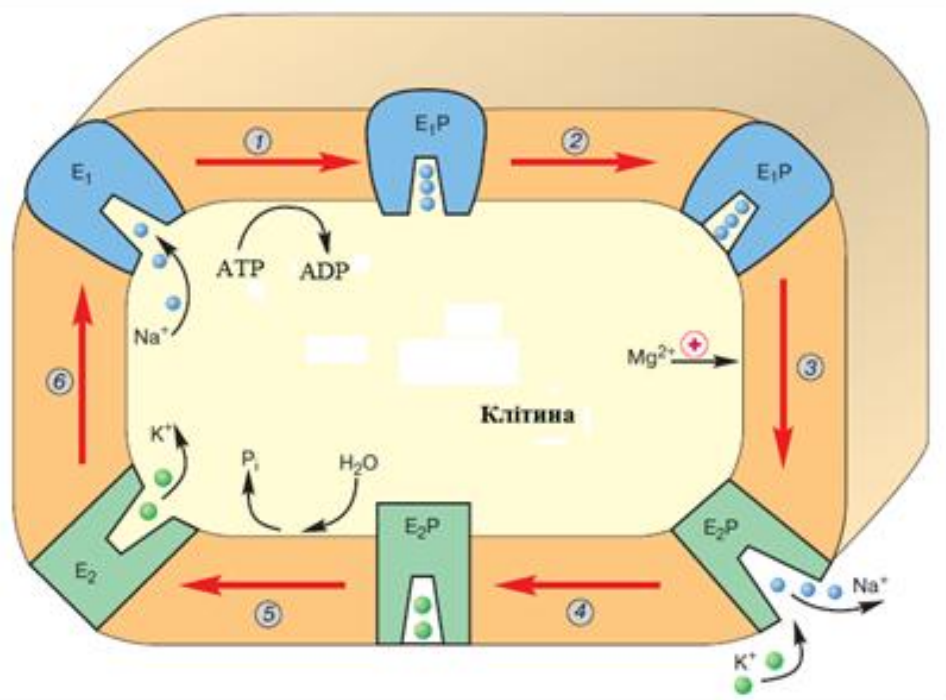


Рис. 1.2. Схема реакційного циклу Na^+, K^+ -АТФази плазматичної мембрани (адаптовано з [27])

У конформаційному стані E1 фермент взаємодіє з іонами Na^+ та АТФ, що призводить до формування фосфорильованого комплексу E1-Ф [27]. Унаслідок фосфорилування білкової молекули іони натрію переходять в оклюдований стан, у якому вони стають недоступними для обміну. Далі відбувається конформаційна перебудова ензиму ($\text{E1} \rightarrow \text{E2}$), що забезпечує перенесення іонів Na^+ через мембрану та активує зв'язування ферменту з іонами K^+ , необхідне для їх подальшого транспорту. Комплекс E2-Ф набуває

більшої гідрофільності та зазнає дефосфорилювання з виділенням неорганічного фосфату в цитозоль. Після цього іони K^+ також від'єднуються від центру зв'язування та переміщуються у цитозоль, а фермент знову переходить у вихідний конформаційний стан ($E2 \rightarrow E1$), що супроводжується його взаємодією з іонами натрію. Завершальний етап циклу одночасно забезпечує підготовку Na^+,K^+ -АТФази до ініціації наступного транспортного циклу [28].

Кардіоактивні стероїди, які також відомі як серцеві глікозиди, виявляють високу вибірковість щодо інгібування активності Na^+,K^+ -АТФази. Ці сполуки, похідні циклопентанопергідрофенантрону, найбільш широко представлені уабаїном (строфантином-G) та строфантидином [29]. Окрім кардіоактивних стероїдів, до специфічних інгібіторів Na^+,K^+ -АТФази належать також палітоксин і сингунарин [30]. Зв'язування кардіоглікозидів із Na^+,K^+ -АТФазою відбувається у спеціалізованому уабаїн-зв'язувальному центрі, локалізованому на зовнішньому боці плазматичної мембрани клітини. Інгібувальна дія уабаїну проявляється вже за концентрації 10^{-5} М, що призводить до порушення транспорту іонів Na^+ і K^+ та повного припинення ферментативної активності. Фосфорилювання ферменту та його перехід у конформаційний стан $E2-F$ створює сприятливі умови для зв'язування кардіоглікозидів. Вважається, що кардіоглікозиди фіксують Na^+,K^+ -АТФазу у стані $E2-F$, спричиняючи зміни конформації цитоплазматичних доменів ферменту і тим самим перешкоджаючи зворотному переходу з $E2$ у $E1$ стан [31].

1.1.3. Фізіологічна роль Na^+, K^+ -АТФази

Na^+, K^+ -АТФаза є одним із ключових ферментів плазматичної мембрани, оскільки велика кількість біохімічних процесів безпосередньо залежить від її активності. Фермент не лише підтримує високий внутрішньоклітинний рівень іонів K^+ та низьку концентрацію Na^+ , але й формує натрієвий електрохімічний градієнт, необхідний для функціонування вторинно-активного транспорту, зокрема натрій-залежних котранспортних систем.

Основною фізіологічною функцією Na^+, K^+ -АТФази є підтримання трансмембранних градієнтів концентрацій Na^+ та K^+ , які є невід'ємною умовою нормального функціонування клітини. Забезпечуючи електрогенний транспорт (3 Na^+ назовні та 2 K^+ всередину на кожний цикл гідролізу АТФ), натрієва помпа безпосередньо формує від'ємний мембранний потенціал спокою, що є критично важливим для збудливих клітин – нейронів та м'язових волокон. Крім того, Na^+, K^+ -АТФаза бере активну участь у регуляції осмотичного тиску внутрішньоклітинного середовища, контролюючи клітинний об'єм і запобігаючи осмотичному набряку.

Натрієвий електрохімічний градієнт, що формується Na^+, K^+ -АТФазою, слугує рушійною силою для функціонування численних вторинно-активних транспортних систем. Цей феномен має ключове значення в кількох фізіологічних контекстах.

У клітинах епітелію кишечника та ниркових каналців натрій-залежні котранспортери з суперродини SLC (solute carrier proteins, білки-переносники розчинів) використовують градієнт Na^+ , створений Na^+, K^+ -АТФазою, для поглинання глюкози (SGLT1, SGLT2 – sodium-dependent glucose transporters, натрій-залежні транспортери глюкози) та амінокислот (наприклад, SNAT2 – sodium-dependent neutral amino acid transporter, натрій-залежний транспортер нейтральних амінокислот) із просвіту органа проти градієнта їхньої

концентрації. Na^+, K^+ -АТФаза, локалізована на базолатеральній мембрані ентероцитів і клітин ниркових каналців, підтримує низький внутрішньоклітинний рівень Na^+ , що забезпечує безперервне надходження цих речовин у клітину [32].

Після вивільнення нейромедіаторів (глутамату, гамма-аміномасляної кислоти, гліцину, моноамінів) у синаптичну щілину їх повторне захоплення пресинаптичними терміналами та гліальними клітинами також здійснюється за рахунок натрій-залежних транспортерів (родини SLC1 й SLC6). Рушійною силою для цього процесу є градієнт Na^+ , що підтримується Na^+, K^+ -АТФазою. Таким чином, нормальна активність натрієвої помпи є необхідною умовою ефективного припинення синаптичної передачі та запобігання ексайтотоксичності.

Натрієвий градієнт, що забезпечується Na^+, K^+ -АТФазою, слугує рушійною силою і для роботи $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника (sodium-calcium exchanger, NCX), який забезпечує виведення кальцію з клітини та впливає на внутрішньоклітинну концентрацію Ca^{2+} . Робота цього обмінника є особливо важливою в кардіоміоцитах та гладеньком'язових клітинах, де внутрішньоклітинний Ca^{2+} є ключовим регулятором скорочення [33].

У гепатоцитах Na^+, K^+ -АТФаза підтримує натрієвий градієнт, необхідний для функціонування натрій-залежного транспортера жовчних кислот NTCP (sodium taurocholate co-transporting polypeptide, натрій-таурохолат котранспортуєчий поліпептид), за допомогою якого жовчні кислоти надходять із портальної крові у гепатоцит. Ефективна реабсорбція жовчних кислот із кишківника за участі апікального натрій-залежного транспортеру жовчних кислот (apical sodium-dependent bile acid transporter, ASBT) та їх повернення до гепатоцитів є основою ентерогепатичної циркуляції, порушення якої може призводити до холестазу [34].

Окрім класичної транспортної функції, Na^+, K^+ -АТФаза виконує

посередницьку роль у процесах внутрішньоклітинної сигналізації, локалізуючись у мікродоменах плазматичної мембрани (кавеолах). Зв'язування убаїну та споріднених із ним гормоноподібних ендогенних сполук сприяє активації внутрішньоклітинних сигнальних каскадів (включаючи такі, що залучають Src-кіназу, EGFR, ERK1/2 та мітохондріальні шляхи), що призводять до активації протоонкогенів і транскрипційних факторів та стимуляції синтезу білків. Інгібування Na^+, K^+ -АТФази убаїном сприяє розвитку гіпертрофії м'язової тканини серця і судин [40]. Встановлено також чіткий взаємозв'язок між активністю Na^+, K^+ -АТФази у гладеньких м'язових клітинах судин та процесами апоптозу: підвищення активності ферменту стимулює загибель клітин, тоді як його блокада убаїном чинить антиапоптичну дію [35].

За умов розвитку таких патологічних станів, як гіпотиреоз, дифузний токсичний зоб і цукровий діабет, функціональна активність натрієвої помпи зазнає значних змін [36]. Артеріальна гіпертензія, ймовірно, є макроскопічним проявом гіпертрофії гладеньком'язових клітин судинної стінки, індукованої зниженням активності Na^+, K^+ -АТФази та порушенням пов'язаних із нею транспортних і сигнальних процесів [37].

Таким чином, Na^+, K^+ -АТФаза є багатофункціональним ензимом, що забезпечує не лише підтримання іонного гомеостазу, але й виступає ключовою ланкою у низці фізіологічних процесів: від абсорбції поживних речовин та виведення нейромедіаторів до регуляції клітинного об'єму, секреції жовчі та сигнальної трансдукції.

1.2. Загальна характеристика каліксаренів та особливості ефекторної дії каліксаренів на деякі ензими

1.2.1. Структура, синтез та фізико-хімічні властивості каліксаренів

Каліксарени є макроциклічними сполуками, які утворюються в результаті циклоконденсації пара-заміщених фенолів із формальдегідом. Їхня структура складається з фенольних фрагментів, з'єднаних між собою метиленовими містками, що формує жорсткий макроциклічний каркас.

Термін «калікс[n]арен» був уведений Д. Гютше та відображає чашоподібну форму молекули (від лат. *calix* – чаша) і наявність ароматичних циклів (*aren*). У класичних калікс[4]аренах розрізняють верхній та нижній вінці, а також центральну макроциклічну область (рис. 1.3) [38]. Об'єм внутрішньої порожнини калікс[4]арену в середньому становить близько 10 \AA^3 , що визначає його рецепторні властивості.

Синтез калікс[4]аренів може здійснюватися класичним методом лужно-каталізованої циклоконденсації пара-заміщених фенолів із формальдегідом з утворенням лінійних олігомерів і їх подальшою внутрішньомолекулярною циклізацією. Згодом були розроблені високоефективні методи синтезу калікс[4]-, калікс[6]- та калікс[8]аренів із використанням темплейтного ефекту, який ґрунтується на відповідності розмірів катіонів лужних металів та сформованого макроциклу. Вихід реакції залежить від температурних умов і природи використаного катіона.

Сучасні синтетичні підходи дозволяють отримувати похідні каліксаренів з різними містковими групами (C, S, Se) та варіабельною кількістю ароматичних фрагментів — від трьох до двадцяти. Калікс[4]арени можуть існувати у чотирьох основних конформаційних формах: «конус», «частковий

конус», «1,2-альтерната» та «1,3-альтерната» (рис. 1.4).

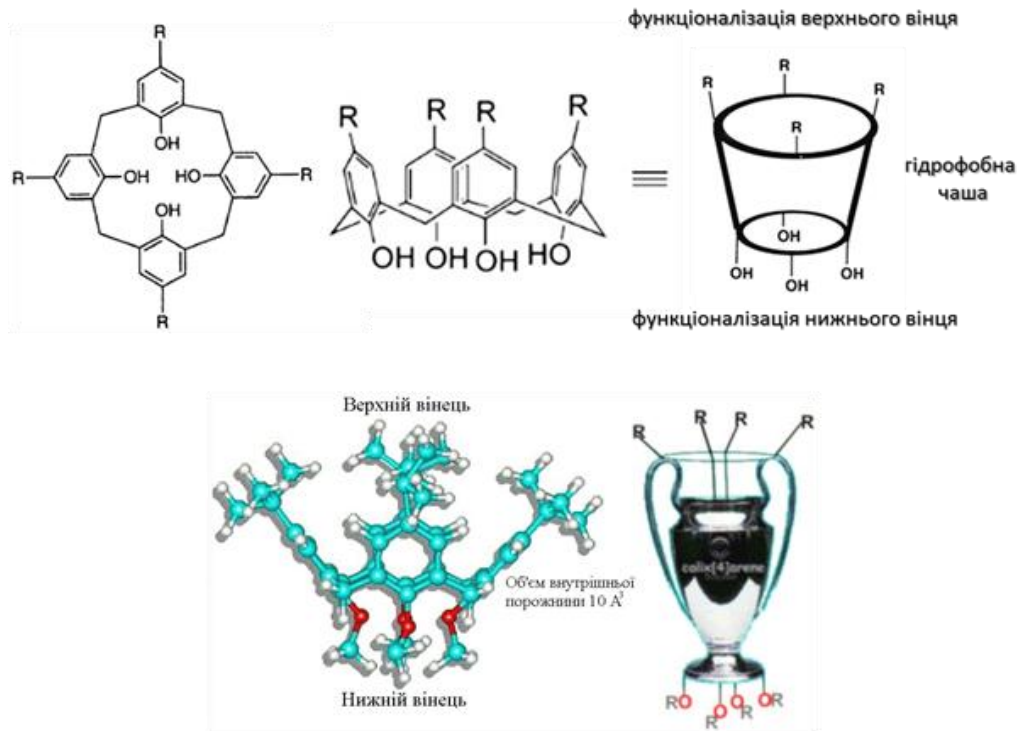


Рис. 1.3. Репрезентивна схема будови молекули калікс[4]арену (адаптовано з [38])

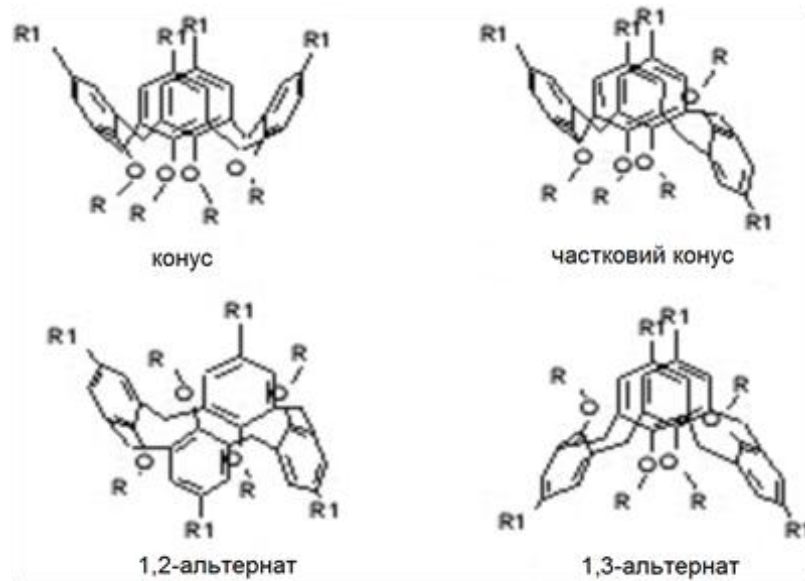


Рис. 1.4. Зображення конформаційних станів калікс[4]аренів (адаптовано з [39])

При цьому метиленовий каркас залишається відносно жорстким, тоді як ароматичні кільця здатні змінювати своє просторове положення.

Дані досліджень, проведених із використанням ядерного магнітного резонансу, свідчать про те, що в розчині каліксарени переважно перебувають у стабільній конусній конформації, яка формує впорядковані ліпофільні порожнини. Стабільність цієї структури забезпечується системою внутрішньомолекулярних водневих зв'язків між фенольними групами нижнього вінця.

Подальший розвиток методів стереоселективної та регіоселективної функціоналізації каліксаренової платформи відкриває перспективи створення внутрішньохіральных макроциклів, що значно розширює можливості їх цільового використання у біологічних системах *in vivo*.

1.2.2. Каліксарени як модулятори біологічних мішеней

Каліксарени належать до класу супрамолекулярних макроциклічних сполук, які завдяки своїй унікальній просторовій організації та здатності до селективного зв'язування різноманітних субстратів розглядаються як перспективні модулятори біологічних мішеней. Зростаюча кількість наукових публікацій протягом останніх 10–15 років свідчить про значний інтерес до застосування каліксаренів у біології, біотехнології, медицині, фармакології, аналітичній хімії та нанотехнологіях.

Завдяки можливості формування стабільних супрамолекулярних комплексів каліксарени використовуються як імітатори ферментів і рецепторів, їхні ефектори, біосенсиори, а також як функціональні платформи для створення ДНК-чипів.

Окрім цього, вони придатні для розділення нейтральних молекул,

стабілізації органічних полімерів і модифікації біологічно активних поверхонь.

Незважаючи на значну кількість прикладів ефективного застосування каліксаренових рецепторів, встановлення механізмів їхньої ефекторної дії на ферментативні системи залишається складним завданням. У науковій літературі накопичено чимало даних, що підтверджують здатність каліксаренів чинити як активуючий, так і інгібуючий вплив на транспортні ферменти, проте молекулярні механізми цієї взаємодії з'ясовані лише частково. Ефекторна та ензиматична активність найбільш характерна для деяких представників калікс[4]аренів і калікс[6]аренів [40, 41].

Сучасні підходи дозволяють використовувати каліксарени як універсальні платформи для конструювання штучних рецепторів. Так, було створено рецептор на основі калікс[4]арену, що містить чотири пептидні петлі та виявляє селективну чутливість до цитохрому *c*. Іншим прикладом є комплекс гадолінію з калікс[4]ареном, запропонований як контрастний агент для магнітно-резонансної томографії. Його взаємодія з альбуміном сироватки крові людини зумовлена поєднанням координаційних зв'язків із йонами металу та гідрофобних взаємодій між ароматичними фрагментами макроциклу і амінокислотними залишками білка.

Окрему групу досліджень становить вивчення каліксаренів як потенційних регуляторів факторів росту та інгібіторів ферментів. Зокрема, деякі похідні проявляють антагоністичну дію щодо тромбоцитарного фактора росту, а також інгібують активність таких ферментів, як хімотрипсин, холінестераза, лужна фосфатаза та 1-лізиноксидаза. На основі сульфокалікс[6]аренів були створені функціональні аналоги ферментів, здатні каталізувати гідратацію НАД·Н, синтетичних нікотинамідів, естерів карбонових і фосфорних кислот. Водночас водорозчинний калікс[4]арентетрасульфонат без металевих центрів демонструє здатність

каталізувати гідроліз АТФ [42].

Важливою властивістю каліксаренів є їхня здатність взаємодіяти з біологічними мембранами завдяки наявності гідрофобних ароматичних фрагментів. Це дозволяє їм виконувати роль переносників, імітуючи функцію іонних каналів та забезпечуючи трансмембранний транспорт певних речовин. Зокрема, трет-бутилкалікс[4]арен селективно транспортує іони Na^+ , калікс[5]арен проявляє високу ефективність щодо іонів Ca^{2+} , тоді як калікс[6]арен характеризується вибірковістю до іонів Cs^+ .

Останнім часом активно досліджується роль каліксаренів як регуляторів активності АТФ-гідролазних систем. У роботах, виконаних в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, показано, що калікс[4]арени структурних типів С-97, С-99, С-107, С-956 та інші здатні викликати деполяризацію плазматичної мембрани та підвищення мембранного потенціалу мітохондрій до 45% порівняно з контролем. Також виявлено їхній вплив на АТФазну активність субфрагмента-1 міозину у клітинах міометрія, що супроводжується збільшенням гідродинамічного діаметра гладеньком'язових клітин внаслідок утворення комплексу між каліксареном і головкою міозину.

Перспективи фармакологічного застосування каліксаренів тісно пов'язані з оцінкою їхньої біологічної безпечності. Проведені дослідження підтвердили відсутність канцерогенної активності (тест Еймса), токсичного впливу на клітини людини та лабораторних тварин, а також гемолітичної дії при фізіологічних концентраціях. Каліксарени без додаткових функціональних груп не індукують імунної відповіді, тоді як її виникнення можливе лише у разі використання білкових кон'югатів [43, 44].

Отже, каліксарени є ефективними модуляторами широкого спектра біологічних процесів. Водночас роль цих сполук як ефекторів АТФ-гідролазних систем, зокрема Na^+, K^+ -АТФази плазматичних мембран гладеньком'язових клітин, залишається недостатньо вивченою, що зумовлює

актуальність подальших досліджень у цьому напрямку.

РОЗДІЛ 2.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали, реактиви та обладнання

У роботі використовували наступні реактиви та матеріали: АТФ динатрієва сіль (Sigma-Aldrich, США), $MgCl_2$ (Sigma-Aldrich, США), $NaCl$ (Sigma-Aldrich, США), KCl (Sigma-Aldrich, США), HEPES (Sigma-Aldrich, США), трис- HCl (Sigma-Aldrich, США), сахароза (Sigma-Aldrich, США), ЕГТА (Sigma-Aldrich, США), убаїн (Sigma-Aldrich, США), тапсигаргін (Sigma-Aldrich, США), дигітонін (Sigma-Aldrich, США), NaN_3 (Sigma-Aldrich, США), молібдат амонію (Sigma-Aldrich, США), хлорид олова $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ (Sigma-Aldrich, США), барвник Кумасі G-250 (Sigma-Aldrich, США), бичачий сироватковий альбумін (Sigma-Aldrich, США), колагеназа (Sigma-Aldrich, США), соєвий інгібітор трипсину (Sigma-Aldrich, США), флуоресцентний зонд fluo-4 AM (Molecular Probes, США), ДНК-специфічний барвник Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, США), полі-L-лізин (Sigma-Aldrich, США), диметилсульфоксид (ДМСО, Sigma-Aldrich, США). Досліджувану сполуку калікс[4]арен C-1220 (5,17-біс(дигідроксифосфоніл(сульфа-мідотоліл)метил)-25,27-дипропоксикалікс[4]арен) було попередньо синтезовано у відділі хімії макроциклічних сполук Інституту органічної хімії НАН України (синтез здійснено д-ром хім. наук С.О. Черенком та його співробітниками).

Для вимірювання оптичної густини використовували спектрофотометр SPECORD UV VIS (Carl Zeiss, Німеччина). Конфокальну мікроскопію проводили на приладі LSM 510 META (Carl Zeiss, Німеччина). Гомогенізацію тканини виконували за допомогою гомогенізатора «Політрон» (Kinematica AG, Швейцарія). Ультрацентрифугування здійснювали на ультрацентрифузі

Beckman Coulter Optima L-80 XP (Beckman Coulter, США) з використанням кутового ротора та бакет-ротора. Тензометричні дослідження виконувалися з використанням дротяного тензодатчика (місцева розробка, Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України). Гідродинамічний діаметр клітин визначали за допомогою лазерного кореляційного спектрометра (місцева розробка, Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України). Молекулярне моделювання проводили на персональному комп'ютері з використанням програмного забезпечення AutoDock (Scripps Research, США) та UCSF Chimera (UCSF, США).

2.2. Дизайн експерименту та об'єкти дослідження

У дослідженні були використані два об'єкти тваринного походження: тканина міометрія свині (*Sus scrofa domesticus*) та клітини міометрія невагітних самок щурів лінії Wistar. Усі маніпуляції з лабораторними тваринами проводилися відповідно до принципів біоетики та положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) і законодавства України щодо гуманного поводження з лабораторними тваринами.

Тканину міометрія свині отримували на м'ясокомбінаті одразу після забою тварин. З цього матеріалу виділяли фракцію плазматичних мембран гладеньком'язових клітин (ГМК) відповідно до методики, описаної у підрозділі 2.3. Отриману фракцію ПМ використовували для визначення Na^+, K^+ -АТФазної активності та дослідження кінетики її інгібування калікс[4]ареном C-1220 (підрозділи 2.5 та 2.6).

Суспензію ізольованих ГМК отримували з матки невагітних самок щурів лінії Wistar (маса тіла 180–220 г, n = 15), яких піддавали естрогенізації за 16

годин до вилучення тканини (введення 17β -естрадіолу підшкірно в дозі 0,5 мкг/тварину). Процедуру отримання суспензії ГМК описано у підрозділі 2.4. Отриману суспензію ГМК використовували для оцінки їхнього гідродинамічного діаметру методом лазерно-кореляційної спектроскопії за дії калікс[4]арену C-1220.

Для тензометричних досліджень скоротливої активності використовували мультиклітинні препарати – поздовжні смужки рогів матки невагітних щурів лінії Wistar (маса тіла 180–220 г, $n = 10$). Процедуру тензометричного дослідження описано у підрозділі 2.8.

2.3. Отримання фракції плазматичних мембран клітин міометрія

Фракцію плазматичних мембран (ПМ) виділяли з гладеньком'язових клітин міометрія свині відповідно до методики, описаної Кондратюк Т. та співавт. [45]. Маткову тканину вилучали через 10–20 хв. після евтаназії тварин, після чого її очищали від жирової тканини та ендометрія, ретельно промивали у фізіологічному розчині й заморожували у рідкому азоті порціями масою 10–20 г. Безпосередньо перед проведенням експерименту 15 г тканини подрібнювали за допомогою ножиць та гомогенізатора «Політрон» (10 000 об./хв., три цикли по 20 с) з інтервалами охолодження тривалістю 2 хв., використовуючи 60 мл середовища для гомогенізації (співвідношення тканини до середовища становило 1:4). Середовище для гомогенізації мало наступний склад (мМ): трис-НСl – 20 (рН 7,4), сахароза – 250, етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА) – 2, КСl – 600. Усі етапи виконували за температури 4 °С.

Отриманий гомогенат піддавали центрифугуванню при 3000 g протягом 18 хв. з метою осадження недисоційованих фрагментів тканини, клітинних органел, ядер та мітохондрій. Надосадову рідину акуратно нашаровували на

ступінчастий сахарозний градієнт у такому співвідношенні: 30% сахароза з 0,6 М КСl : 15% сахароза з 0,6 М КСl : надосадова рідина = 6 мл : 5 мл : 20 мл. Подальше центрифугування здійснювали у бакет-роторі протягом 90 хв. при прискоренні 105 000 g. Інтерфазний шар, локалізований між двома фракціями сахарози, відбирали за допомогою пастерівської піпетки, після чого отриману суспензію ПМ розводили охолодженим бідистильованим водним розчином до кінцевої концентрації сахарози 2,5% і знову центрифугували протягом 1 год. при 105 000 g з використанням кутового ротора. Осад, що складався з мембранних везикул, ресуспендували у 3 мл середовища такого складу (мМ): 20 трис-НСl (рН 7,4) та 150 КСl. Отриману суспензію зберігали у рідкому азоті до подальшого використання.

Застосування зазначеної методики [46] для ізоляції фракції ПМ ГМК забезпечує отримання збагаченого препарату, що містить везикульовані фрагменти інвертованих мембран, орієнтованих цитоплазматичною поверхнею назовні.

Вміст білка у мембранному препараті визначали за методом Bradford [47], який базується на специфічній взаємодії барвника Кумасі G-250 з білковими компонентами. Принцип методу полягає у зв'язуванні аніонної форми барвника з позитивно зарядженими амінокислотними залишками білкових молекул, унаслідок чого відбувається спектральне зміщення забарвлення реактиву з червоно-коричневого у синій діапазон із максимумом поглинання при довжині хвилі 595 нм. Метод характеризується високою чутливістю та селективністю при визначенні концентрації білка в межах 2–120 мкг/мл, при цьому стабільність забарвлення зберігається щонайменше протягом однієї години. Порівняно з методом Лоурі, тест Bradford має суттєві переваги, оскільки не реагує на наявність іонів натрію, калію та магнію, а також не зазнає впливу з боку трис-буферу та ЕДТА.

2.4. Отримання гладеньком'язових клітин матки щурів

Для одержання суспензії ГМК з міометрія невагітних щурів, яких піддавали естрогенізації за 16 годин до вилучення тканини, застосовували методику Молларда та співавт. з певними модифікаціями [48].

Після ізоляції матки у тварин видаляли жирову та сполучну тканину, після чого орган інкубували в розчині Хенкса (розчин А) такого складу (мМ): глюкоза – 5,5; NaCl – 136,9; KCl – 5,36; CaCl₂ – 1,26; KH₂PO₄ – 0,44; Na₂HPO₄ – 0,26; NaHCO₃ – 0,26; MgSO₄ – 0,4; MgCl₂ – 0,4; HEPES (pH 7,4) – 10. Після цього тканину механічно подрібнювали ножицями на дрібні фрагменти розміром приблизно 2 × 2 мм та тричі промивали протягом 5 хв. у 5 мл розчину Б – модифікованого розчину Хенкса, що не містив MgCl₂ та MgSO₄, але включав CaCl₂ у концентрації 0,03 мМ. Дана процедура дозволяла ефективно видалити залишки крові та знизити вміст іонів кальцію.

Подрібнені фрагменти тканини інкубували протягом 20 хв. при температурі 37 °С за умов постійного перемішування у 2 мл середовища для дисоціації, яке складалося з 0,1% розчину колагенази, 0,1% бичачого сироваткового альбуміну, 0,01% соєвого інгібітора трипсину та розчину Б. Після завершення інкубації ферментативне середовище видаляли, а тканинні залишки промивали розчином Б без додавання ферментів. Для інтенсифікації процесу клітинної дисоціації тканину обережно піпетували скляною піпеткою протягом 1–2 хв., виконуючи 15–20 циклів аспірації.

Після цього розчин Б, що містив відокремлені клітини, відбирали, тоді як залишки тканини повторно піддавали інкубації у свіжому середовищі дисоціації з колагеназою та соєвим інгібітором трипсину. Загалом тканинний матеріал інкубували у середовищі дисоціації 5–6 разів для досягнення максимального вивільнення клітин. Перші дві порції розчину Б, отримані

після піпетування та які не містили ферментів, не використовували у подальших дослідженнях, оскільки вони мали значну кількість клітинних уламків і пошкоджених клітин. Наступні 3–4 порції з дисоційованими клітинами об'єднували та центрифугували протягом 10 хв. при 80 g.

Осад, отриманий після центрифугування, що містив дисоційовані клітини, промивали буферним розчином, який складався з 25 мМ HEPES-KOH (pH 7,4), 150 мМ NaCl та 0,4% бичачого сироваткового альбуміну, після чого повторно центрифугували за аналогічних умов. Очищені клітини ресуспендували у середовищі зберігання, що включало 25 мМ HEPES-KOH (pH 7,4) та 150 мМ NaCl, і зберігали на льоду до моменту використання в подальших експериментах.

Підрахунок загальної кількості клітин та оцінку їх життєздатності здійснювали за допомогою гемоцитометра (камери Горяєва). У середньому в 1 мл отриманої суспензії ГМК містилося $6,58 \times 10^6$ клітин, з яких 90–95% залишалися життєздатними. Життєздатність клітин визначали шляхом фарбування трипановим синім.

Додаткову оцінку якості клітинного препарату проводили методом скануючої лазерної конфокальної мікроскопії з використанням приладу LSM 510 META (Carl Zeiss, Німеччина) (рис. 2.1). Аналіз отриманих зображень показав, що клітини зберігають характерну для гладеньком'язових міоцитів морфологію, зокрема веретеноподібну форму. Для проведення подальших експериментів відбирали лише ті ГМК, у яких не спостерігалось підвищення флуоресценції у відповідь на додавання вільного Ca^{2+} у концентрації 1 мМ на предметне скло з клітинним препаратом.

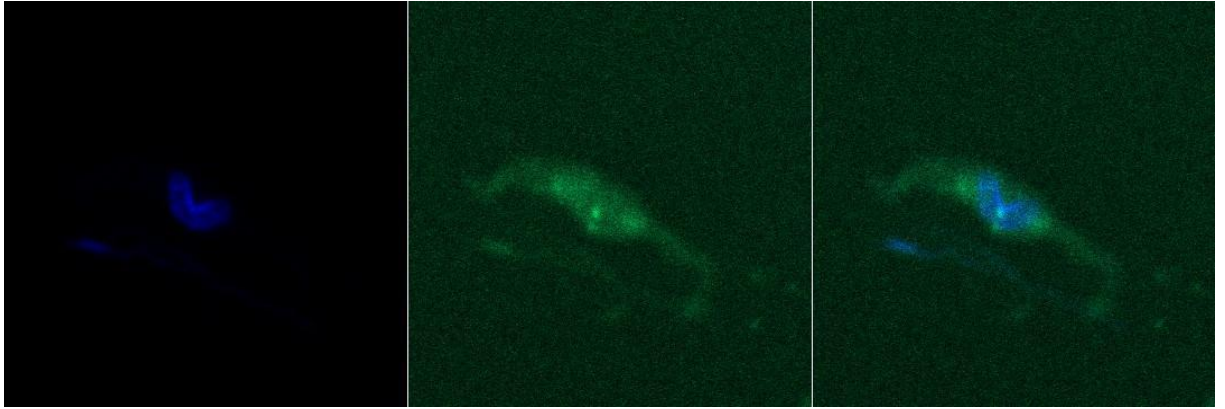


Рис. 2.1. Мікрофотографія гладеньком'язової клітини міометрія, отримана методом скануючої лазерної конфокальної мікроскопії (Об.×40, Ок.×10)

За наявності порушень цілісності ПМ очікувалося б значне зростання інтенсивності флуоресценції внаслідок зв'язування іонів кальцію з відповідним зондом у саркоплазмі. Такий ефект свідчив би про підвищення внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} у пошкоджених клітинах, що є наслідком неконтрольованого проникнення іонів кальцію через дефекти мембрани.

2.5. Визначення Na^+ , K^+ -АТФазної активності у плазматичних мембранах клітин міометрія

Визначення Na^+ , K^+ -АТФазної активності проводили у фракції ПМ ГМК міометрія свиней за температури 37 °С. Дослідження ґрунтувалося на реєстрації швидкості гідролізу АТФ з утворенням неорганічного фосфату (Фн) у стандартних умовах інкубації з урахуванням іонної специфічності ферменту та його чутливості до селективного інгібітора – убаїну.

Інкубаційне середовище загальним об'ємом 0,4 мл містило (в мМ): АТФ

– 1; $MgCl_2$ – 3; $NaCl$ – 125; KCl – 25; EGTA – 1; HEPES-трис-буфер – 20 (pH 7,4); NaN_3 – 1. Для усунення внеску Ca^{2+} -залежних АТФаз у середовище додатково вносили 0,1 мкМ тапсигаргіну, а для підвищення проникності мембранних везикул – 0,1 % дигітоніну. Концентрація білка у мембранному препараті становила 20–30 мкг, тривалість інкубації – 4 хв.

Спочатку визначали загальну Na^+,K^+,Mg^{2+} -АТФазну активність. Ензиматичну реакцію ініціювали додаванням аліквоти мембранної суспензії до інкубаційного середовища. Припинення реакції здійснювали шляхом внесення 1 мл стоп-реактиву відповідно до методики, описаної в роботі [49]. Стоп-реактив містив 1,5 М ацетат натрію, 3,7 % формальдегід, 14 % етанол та 5 % трихлороцтову кислоту; рН стоп-реактиву становив 4,3, температура розчину – 8 °С.

Для контролю неспецифічного гідролізу АТФ використовували інкубаційне середовище аналогічного складу без додавання мембранної фракції. Вміст ендogenous неорганічного фосфату у препараті визначали шляхом інкубації мембран у дистильованій воді. Загальну кількість утвореного Фн розраховували з урахуванням відповідних контрольних значень.

Кількісне визначення неорганічного фосфату проводили за методом Rathbun і Vetlach [50]. До реакційної проби додавали 0,05 мл 2 % розчину молібдату амонію, після ретельного перемішування – 0,1 мл 6,75 мМ розчину хлориду олова ($SnCl_2 \cdot 2H_2O$). Через 15 хв. реєстрували оптичну густину зразків за допомогою спектрофотометра SPECORD UV VIS при довжині хвилі 660 нм.

Для виокремлення убаїнчутливої Na^+,K^+ -АТФазної активності паралельно визначали Mg^{2+} -залежну АТФазну активність у присутності 1 мМ убаїну – специфічного інгібітора Na^+,K^+ -АТФази [51]. Значення убаїнчутливої Na^+,K^+ -АТФазної активності розраховували як різницю між сумарною Na^+,K^+,Mg^{2+} -АТФазною активністю та убаїннечутливою Mg^{2+} -

АТФазною активністю. Такий підхід дозволяє селективно оцінити функціональний стан Na^+, K^+ -АТФази у фракції ПМ.

При дослідженні впливу калікс[4]арену С-1220 на активність Na^+, K^+ -АТФази використовували стандартне інкубаційне середовище, до якого додавали досліджувану сполуку у концентраціях 10, 25, 50, 75 та 100 нМ. Для цього готували маточний розчин калікс[4]арену С-1220 концентрацією 20 мкМ на основі ДМСО, який безпосередньо перед експериментом розводили дистильованою водою до необхідної концентрації. Контрольні проби містили відповідну кількість розчинника.

2.6. Методи кінетичного аналізу

Значення уявних констант активації іонами Mg^{2+} , уявних констант Міхаеліса, а також коефіцієнтів Хілла (n_H) визначали на підставі концентраційних кривих, побудованих у логарифмічних координатах відповідно до лінеаризованої форми рівняння Хілла [24]:

$$\lg[(V_{\max} - V)/V] = n_H \cdot \lg K - n_H \cdot \lg S \quad (2.1)$$

де:

V – питома ензиматична активність;

V_{\max} – максимальне значення питомої ензиматичної активності за наявності у середовищі інкубації субстрату або іона-активатора;

K – уявна константа Міхаеліса або уявна константа активації відповідно для субстрату реакції чи іонів-активаторів;

S – концентрація субстрату або іона-активатора в інкубаційному середовищі.

Величини уявної константи активації K_a (для іонів Mg^{2+}), а також коефіцієнтів Хілла визначали на основі лінеаризованих графіків Хілла відповідно до рівняння:

$$\lg[(V_{\max} - V)/(V - V_0)] = n_H \cdot \lg K_a - n_H \cdot \lg A \quad (2.2)$$

де:

V_0 – питома ензиматична активність у відсутності активатора в інкубаційному середовищі;

A – концентрація активатора у середовищі інкубації.

2.7. Дослідження міоцитів методом лазерно-кореляційної спектроскопії

Гідродинамічний діаметр ГМК міометрія щурів визначали методом лазерно-кореляційної спектроскопії (ЛКС) з використанням лазерного кореляційного спектрометра (місцева розробка, Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України).

Суспензію ГМК, отриману згідно з підрозділом 2.4, інкубували з калікс[4]ареном C-1220 у концентраціях 25, 50, 75 та 100 нМ протягом 1 хв. 5 разів за температури 37 °С. Контрольні зразки містили еквівалентний об'єм розчинника (ДМСО). Після інкубації зразки поміщали у вимірювальну кювету приладу.

Метод ЛКС базується на аналізі флуктуацій інтенсивності розсіяного лазерного випромінювання, зумовлених броунівським рухом частинок у суспензії. За автокореляційною функцією інтенсивності розсіяного світла

розраховували коефіцієнт дифузії частинок, а гідродинамічний діаметр визначали згідно з рівнянням Стокса–Ейнштейна:

$$d = kT / (3\pi \eta D) \quad (2.3)$$

де:

d – гідродинамічний діаметр частинки,

k – стала Больцмана,

T – абсолютна температура,

η – динамічна в'язкість середовища,

D – коефіцієнт трансляційної дифузії.

Для кожного зразка проводили не менше 5 незалежних вимірювань. Результати представляли як середній ефективний гідродинамічний діаметр ($M \pm m, n = 5$).

2.8. Методи тензометричного дослідження

Скоротливу активність гладеньких м'язів рогів матки щурів досліджували на препаратах, для приготування яких роги матки розрізали у поздовжньому напрямку на смужки середнього розміру 2 x 10 мм, залишаючи ендотеліальний шар інтактним; оскільки вищою пейсмерною активністю володіє тканина міометрія з боку яєчників, перевагу віддавали фрагментам рогів цих ділянок.

У дослідах використовували розчин Кребса (мМ): 120,4 NaCl; 5,9 KCl; 15,5 NaHCO₃; 1,2 NaH₂PO₄; 1,2 MgCl₂; 2,5 CaCl₂; 11,5 глюкоза; рН розчину становив 7,4.

Механічну активність смужок міометрія реєстрували за допомогою

дротяного тензодатчика (місцева розробка, Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України) в ізометричному режимі. Один кінець препарату фіксували нерухомо, другий з'єднували з датчиком за допомогою шовкової нитки. Сигнал з датчика реєстрували та оцифровували за допомогою персонального комп'ютера у вигляді механограми спонтанної скоротливої активності.

Для тензометричних експериментів калікс[4]арен С-1220 попередньо розчиняли в ДМСО та вносили в розчин Кребса у концентрації 10 мкМ так, щоб остаточною аліквота органічного розчинника становила 0,1% від загального об'єму розчину. Зазначена концентрація була обрана на підставі даних літератури щодо ефективних концентрацій каліксаренів при дослідженні скоротливої активності гладеньких м'язів [51]. Параметри спонтанної скоротливої активності реєстрували через 15 хв. після внесення препарату. Контрольні скорочення досліджували в розчинах, які містили 0,1% ДМСО.

З отриманих механограм визначали такі параметри спонтанної скоротливої активності: часові – час досягнення максимуму скорочення (t_0), характеристичний час фази скорочення (τ_C) та характеристичний час фази розслаблення (τ_R); силові – максимальну силу скорочення (F_{max}), характеристичну силу фази скорочення (F_C) та характеристичну силу фази розслаблення (F_R); імпульсні – максимальний імпульс скорочення (I_{max}), імпульс фази скорочення (I_C) та імпульс фази розслаблення (I_R). Параметри розраховували відповідно до стандартної методики кількісного аналізу механограм [52].

2.9. Статистичний аналіз

Обробку отриманих експериментальних результатів здійснювали з використанням загальноприйнятих методів варіаційної статистики відповідно до літературних джерел [54,55,56].

Середнє арифметичне значення (M) визначали за формулою:

$$M = \sum x_i / n \quad (2.4)$$

де:

\sum – символ сумування;

x_i – окрема варіанта;

n – загальна кількість варіант.

Похибку середнього арифметичного (m) розраховували за наступним співвідношенням:

$$m = \sigma / \sqrt{n - 1} \quad (2.5)$$

де:

σ – середнє квадратичне відхилення;

n – кількість варіант.

Оцінку статистичної вірогідності різниці між середніми арифметичними величинами проводили із застосуванням критерію Стьюдента (t), який обчислювали за формулою:

$$t = (M_1 - M_2) / \sqrt{m_1^2 + m_2^2} \quad (2.6)$$

Усі математичні розрахунки виконували з використанням стандартного програмного забезпечення пакета “MS Office” на персональному комп’ютері типу IBM PC/AT.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Активність натрієвої помпи за дії калікс[4]арену С-1220

У попередніх дослідженнях ми показали, що синтетична сполука калікс[4]арен С-1220 у концентрації 100 мкМ ефективно (на 96 % відносно контролю) інгібувала активність Na^+, K^+ -АТФази ПМ міоцитів матки. У той же час при використанні у такій самій концентрації ця сполука практично не впливала на ензиматичні активності «базальної» Mg^{2+} -АТФази, Ca^{2+} -АТФази і $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФази ПМ: відповідні активності становили $96,2 \pm 0,8\%$, $93,4 \pm 0,9\%$ та $95,3 \pm 0,8\%$ від контрольного значення ($M \pm m$; $n = 5$). Отже, калікс[4]арен С-1220 селективно (на рівні ПМ) пригнічує активність Na^+, K^+ -АТФази ПМ, не впливаючи на активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФази, Mg^{2+} -АТФази і Ca^{2+} -АТФази ПМ. Тому для подальшої кінетичної інтерпретації впливу калікс[4]арену С-1220 на ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТФази ПМ міометрія ми дослідили його дію на характер концентраційних залежностей даної активності від АТФ та іонів Mg^{2+} .

3.1.1. Активність натрієвої помпи за різних концентрацій АТФ за дії калікс[4]арену С-1220

Згідно отриманих результатів, підвищення концентрації АТФ у середовищі інкубації в діапазоні від 0,01 до 1 мМ у контролі призводить до підвищення ензиматичної активності Na^+, K^+ -АТФази за умов фіксованої концентрації MgCl_2 (3 мМ) в інкубаційному середовищі (рис. 3.1). Методом

Хілла були розраховані уявна константа Міхаеліса K_m (для АТФ як субстрату) та коефіцієнт Хілла n_H , які становлять $187,4 \pm 8,4$ мкМ та $1,25 \pm 0,16$, відповідно ($n = 5$) (рис. 3.2). Слід зазначити, що отримане значення K_m є дещо нижчим порівняно з даними для Na^+, K^+ -АТФази нервової тканини щурів (260 мкМ [56]), що може відображати тканиноспецифічні відмінності у кінетичних властивостях ферменту.

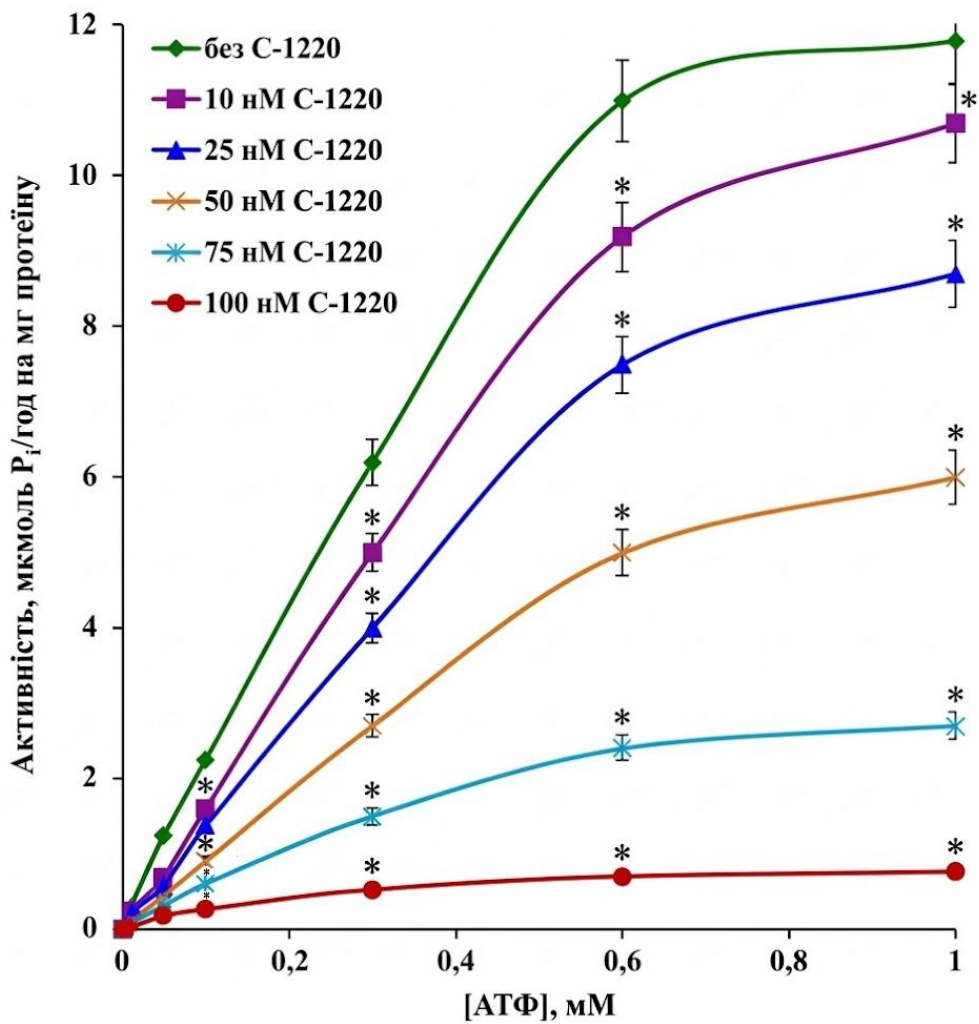


Рис. 3.1. Питома ензиматична активність Na^+, K^+ -АТФази у фракції плазматичних мембран клітин міомеріа за різних концентрацій АТФ за дії калікс[4]арену С-1220 ($M \pm m$; $n = 5$); концентрація MgCl_2 – 3 мМ

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем

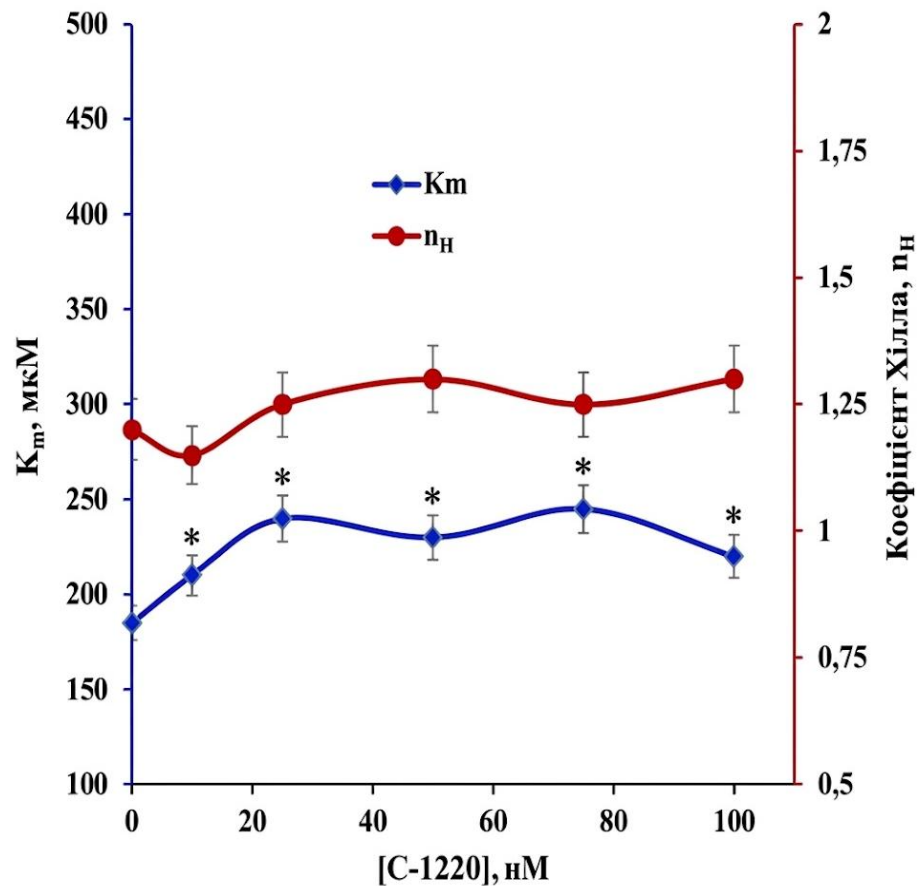


Рис. 3.2. Кінетичні параметри (константа Міхаеліса K_m і коефіцієнт Хілла n_H) Na^+, K^+ -АТФазної активності (для АТФ як субстрату) у фракції плазматичних мембран клітин міомерія за дії калікс[4]арену С-1220 ($M \pm m$; $n = 5$); концентрація [С-1220] = 0 нМ – контроль; концентрація MgCl_2 – 3 мМ

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем

Надалі було проаналізовано кінетичні параметри, що характеризують спорідненість ензиму до АТФ, за дії калікс[4]арену С-1220. Було досліджено концентраційну залежність Na^+, K^+ -АТФазної активності від АТФ за дії 5-ти концентрацій калікс[4]арену С-1220 (10, 25, 50, 75 та 100 нМ). В усіх випадках спостерігається зниження ензиматичної активності фермента, з різним ступенем ефективності. При цьому залежність Na^+, K^+ -АТФазної активності

від вмісту АТФ виявляє характер, подібний до такого у контролі (тобто без калікс[4]арену С-1220), але платовий рівень активності зі зростанням концентрації каліксарену знижується (рис. 3.1).

Розраховані середні значення уявної константи Міхаеліса K_m за присутності калікс[4]арену С-1220 у досліджених концентраціях статистично значущо перевищують контрольне значення ($p < 0,05$), що свідчить про зниження спорідненості ензиму до АТФ за дії каліксарену (рис. 3.2).

Коефіцієнти Хілла n_H за присутності різних концентрацій калікс[4]арену С-1220 статистично значущо не відрізняються від контрольного значення, що вказує на збереження кооперативності ензиматичної реакції по АТФ (рис. 3.2).

Отже, калікс[4]арен С-1220, призводячи до гальмування Na^+, K^+ -АТФазної активності, знижує спорідненість ензиму до АТФ, не змінюючи при цьому кооперативності ензиматичної реакції. Очевидно, що інгібування калікс[4]ареном С-1220 відбувається як за рахунок зниження числа обертів ензиму (V_{max}), так і за рахунок зменшення його спорідненості до субстрату.

3.1.2. Активність натрієвої помпи за різних концентрацій іонів магнію за дії калікс[4]арену С-1220

Відомо, що значення Mg^{2+} для метаболізму пояснюється його властивостями як промотора структури макромолекул, субстратзв'язувального іона і переносника електронів. Відомий цілий ряд Mg^{2+} -залежних ферментів, де роль Mg^{2+} не обмежується активацією субстрату, а пов'язана із формуванням активного (каталітичного) центру. Проте найбільш широко відома роль Mg^{2+} в утворенні хелатного комплексу з АТФ – субстратом аденозинтрифосфатазних реакцій. Вважають, що іони Mg^{2+} вступають у взаємодію із фосфатними зарядженими групами АТФ,

поляризують їх і підвищують реакційну здатність системи, полегшуючи нуклеофільну атаку на термінальний фосфат АТФ [57].

Згідно отриманих результатів, ензиматична активність Na^+, K^+ -АТФази ПМ міометрія у контролі (тобто без калікс[4]арену С-1220) зростає зі збільшенням концентрації MgCl_2 від 0,01 до 3 мМ за умов фіксованих концентрацій АТФ (1 мМ) в інкубаційному середовищі (рис. 3.3).

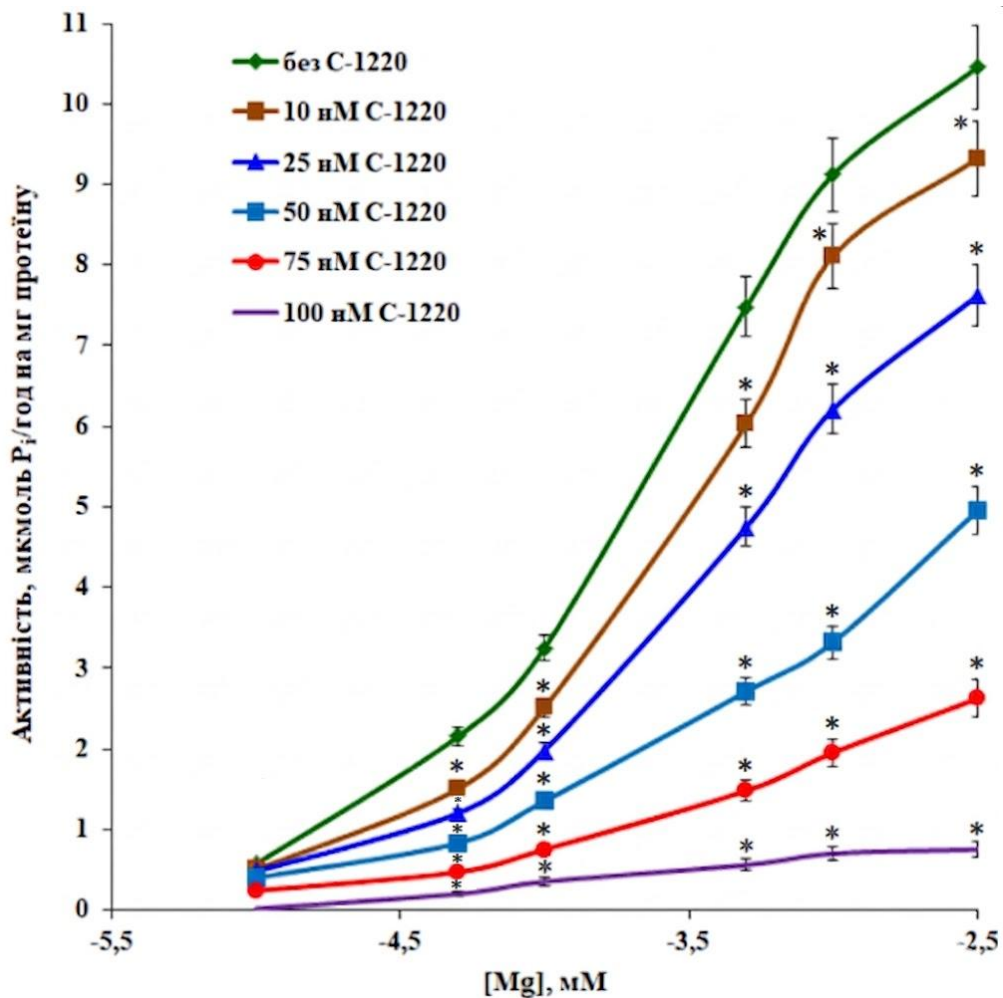


Рис. 3.3. Питома ензиматична активність Na^+, K^+ -АТФази у фракції плазматичних мембран клітин міометрія за різних концентрацій MgCl_2 за дії калікс[4]арену С-1220 ($M \pm m$; $n = 5$); концентрація АТФ – 1 мМ

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем

Було досліджено концентраційну залежність Na^+, K^+ -АТФазної активності від концентрації MgCl_2 за дії п'яти концентрацій калікс[4]арену С-1220 (10, 25, 50, 75 та 100 нМ). В усіх випадках спостерігається зниження ензиматичної активності порівняно з контролем, що зростає зі збільшенням концентрації каліксарену (рис. 3.3). При цьому характер залежності активності від концентрації MgCl_2 залишається подібним до контрольного.

Значення уявної константи активації Na^+, K^+ -АТФази K_a у контролі становить $182 \pm 5,20$ мкМ, величина коефіцієнта Хілла $n_H - 1,09 \pm 0,06$ ($M \pm m$; $n = 5$) (рис. 3.4).

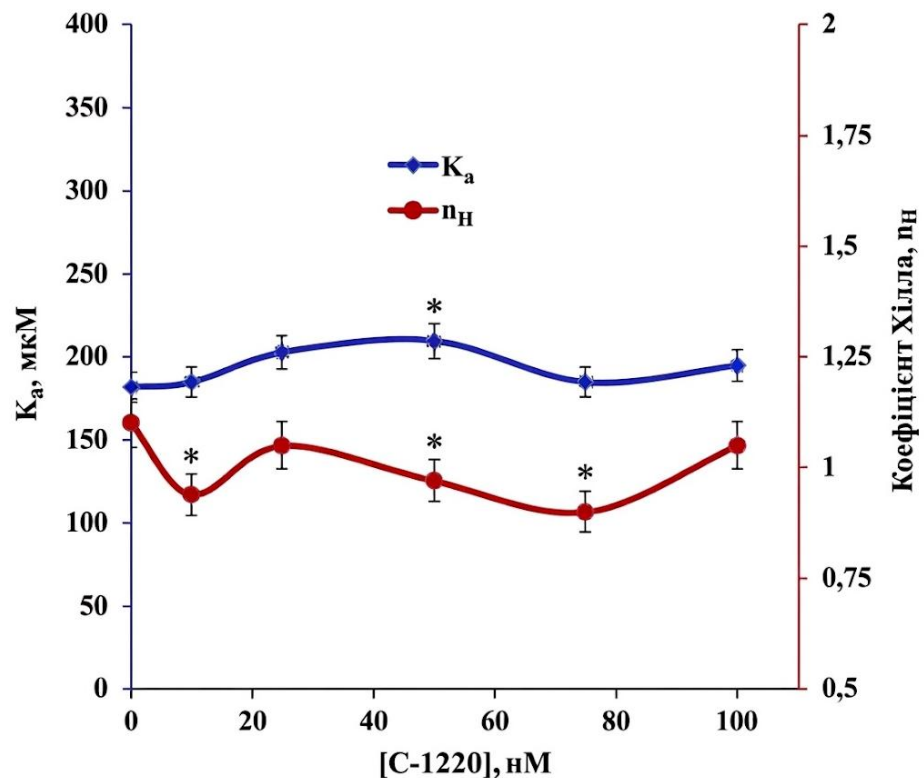


Рис. 3.4. Кінетичні параметри (константа активації K_a і коефіцієнт Хілла n_H) активації Na^+, K^+ -АТФази хлоридом магнію у фракції плазматичних мембран клітин міометрія за дії калікс[4]арену С-1220 ($M \pm m$; $n = 5$); концентрація $[\text{С-1220}] = 0$ нМ – контроль; концентрація АТФ – 1 мМ

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем

Слід відмітити, що концентрація вільних іонів Mg^{2+} у середовищі інкубації може суттєво відрізнятись та лінійно не залежати від концентрації $MgCl_2$, тому представлені кінетичні параметри були розраховані саме для $MgCl_2$, а не для Mg^{2+} .

Розраховані значення уявної константи активації K_a за дії калікс[4]арену C-1220 у концентрації 50 нМ достовірно перевищують контрольне значення ($p < 0,05$). Коефіцієнт Хілла n_H , що характеризує кооперативність ензиматичної реакції по іонах магнію, достовірно знижується порівняно з контролем при концентраціях калікс[4]арену C-1220 10, 50 та 75 нМ ($p < 0,05$), що свідчить про зменшення кооперативності зв'язування іонів Mg^{2+} з ензимом за цих умов (рис. 3.4).

Отже, одержані результати вказують на те, що високоефективна інгібіторна дія калікс[4]арену C-1220 на Na^+, K^+ -АТФазну активність має неконкурентний характер відносно АТФ й іонів Mg^{2+} та пов'язана зі зниженням числа обертів ензиму у його присутності.

3.2. Гідродинамічний діаметр гладеньком'язових клітин міометрія за дії калікс[4]арену C-1220

Вплив калікс[4]аренів на іон-транспортувальні системи міоцитів може детермінувати їх вплив на форму клітин. Зміну форми ГМК через їх скорочення та модифікацію водно-осмотичного балансу дає змогу встановлювати лазерна кореляційна спектроскопія, за допомогою якої можливо фіксувати зміни ефективного гідродинамічного діаметру ГМК.

Згідно даних літератури показано, що чинники, які підвищують скоротливу відповідь ГМ, так само наочно змінюють ефективний гідродинамічний діаметр ГМК [58].

Як показали результати експериментів, внесення утеротоніка окситоцину (100 нМ) призводило до зменшення ефективного гідродинамічного діаметру у випадку суспензії ГМК на 28% відносно контрольного значення (рис 3.5). У якості контролю на розчинник аплікація аліквоти розчину ДМСО не призводила до істотних змін досліджуваного параметру – гідродинамічний діаметр змінювався лише на 4% відносно контролю. У той же час використання інгібітору Na^+, K^+ -АТФази калікс[4]арену С-1220 у концентраціях 25, 50 і 100 нМ, зумовлювало, аналогічно до дії окситоцину, зменшення гідродинамічного діаметра на 30%, 49% та 60%, відповідно, відносно контролю (рис. 3.5).

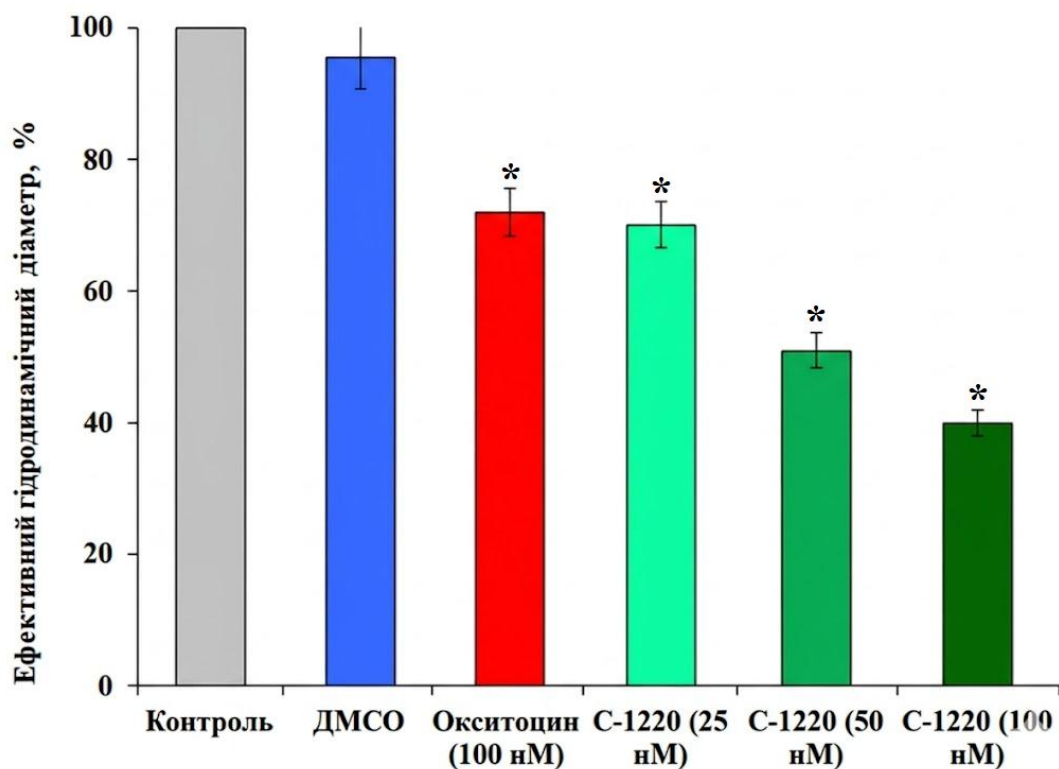


Рис. 3.5. Ефективний гідродинамічний діаметр гладеньком'язових клітин міометрія за дії різних ефекторів ($M \pm m$, $n = 7$); за 100 % прийнято контрольне значення гідродинамічного діаметру гладеньком'язових клітин за відсутності ефекторів

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем

За даними літератури, зміна гідродинамічного діаметра ГМК корелює зі змінами скоротливих властивостей гладеньких м'язів [59]. Так, оскільки наше дослідження було проведено на суспензії міоцитів, клітини якої мають округлу форму, зміну гідродинамічного діаметру не можна трактувати як скорочення/подовження, але це можна пояснити з погляду на перебудови елементів цитоскелета, які супроводжують процес скоротливої активності, що, у свою чергу, призводить до зміни морфології ГМК [55]. Крім того, зміни активного транспорту іонів можуть спричинити модифікації водно-осмотичного балансу між клітинами та середовищем інкубації, що також впливатиме на об'єм клітин.

Отже, калікс[4]арен С-1220 зменшує ефективний гідродинамічний діаметр ГМК ідентично до дії утеротоніка окситоцину. Подібна зміна гідродинамічного діаметру може трактуватися як сукупність подій, які супроводжують процеси скорочення/розслаблення ГМК, а також як результат зміни водно-осмотичного балансу.

Оскільки раніше було показано, що зміна гідродинамічного діаметру ГМК під впливом скоротливих агентів корелює зі станом скорочення ГМ [56], то подібні результати свідчать про перспективні можливості використання калікс[4]арену С-1220 як регулятора скоротливої активності ГМ матки.

3.3. Оцінка скоротливої активності смужок міометрія за дії калікс[4]арену С-1220

Оскільки, як переконливо показано у попередніх серіях експериментів, калікс[4]арен С-1220 пригнічує Na^+, K^+ -АТФазну активність ПМ та зменшує гідродинамічний діаметр міоцитів, можна припустити, що він здатний також змінювати функціональні властивості цілісної тканини ГМ. Тож наше наступні

дослідження стосувалися вивчення спонтанної та стимульованої скоротливої активності мультіклітинних гладеньком'язових препаратів рогів матки невагітних щурів.

Внесення калікс[4]арену C-1220 у розчин, що омивав гладеньком'язові препарати, спричинило активацію спонтанних скорочень (рис. 3.6). Так, за дії цієї сполуки у концентрації 10 мкМ, обраній на підставі даних літератури [56], спостерігалось підвищення амплітуди скорочень (F_{max}), яка через 15 хв. від початку аплікації на 48% перевищувала контрольне значення (рис. 3.6).

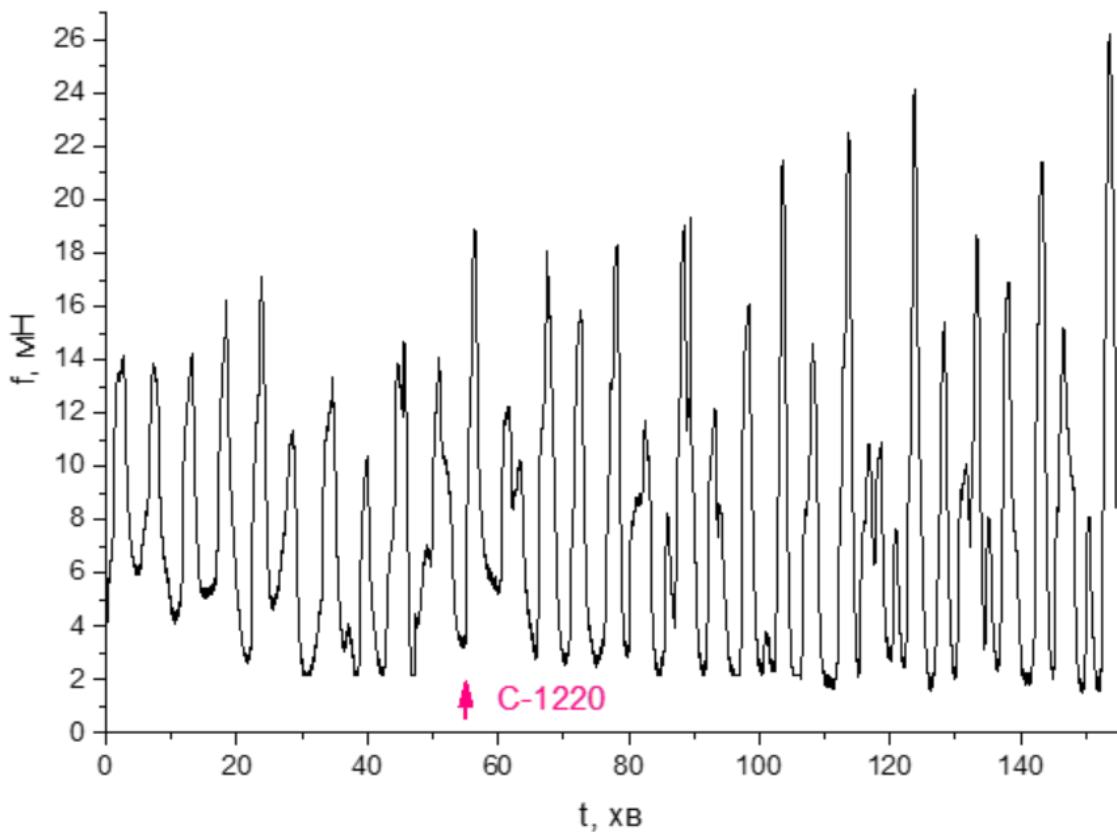


Рис. 3.6. Результати дослідження спонтанної скоротливої активності міометрія щурів у контролі та на тлі дії калікс[4]арену C-1220 (10 мкМ). Наведено типову механограму. Стрілкою позначено момент внесення C-1220 в розчин, що омиває гладеньком'язові препарати

До окремих спонтанних скорочень (у контролі та за дії калікс[4]арену C-

1220) було застосовано метод комплексного механокінетичного аналізу. Встановлено, що сполука С-1220 не спричиняє статистично значущих змін часових параметрів, таких як час амплітуди (τ_{\max}), а також характеристичні часи фаз скорочення (τ_C) і розслаблення (τ_R) (рис. 3.7, А).

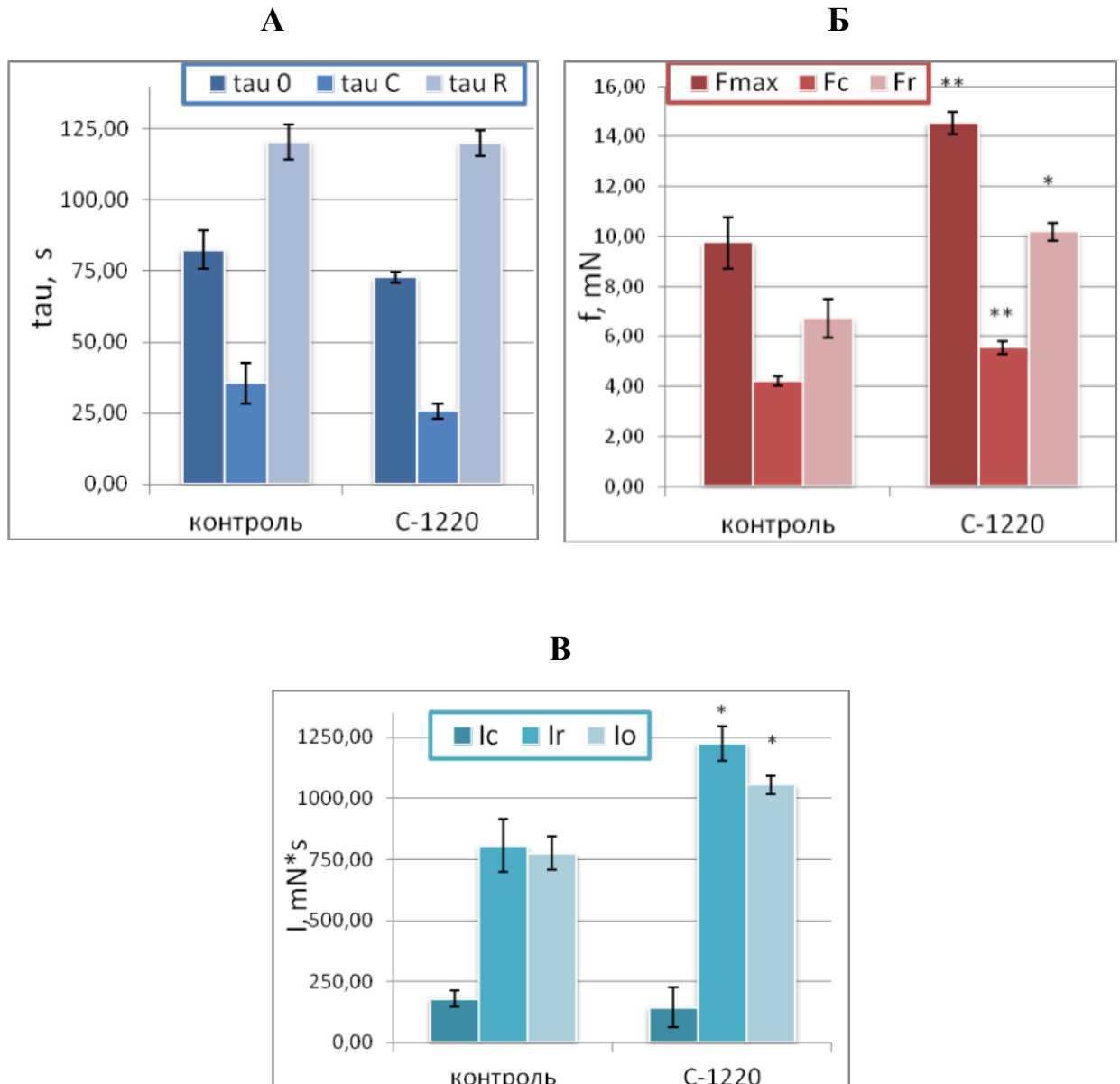


Рис. 3.7. Параметри спонтанної скоротливої активності міометрія щурів за дії калікс[4]арену С-1220 (10 μM): А – часові параметри (τ_0 , τ_C і τ_R); Б – силові параметри (F_{\max} , F_C та F_R); В – імпульсні параметри (I_{\max} , I_C та I_R) ($M \pm m$, $n = 5$)

* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ – різниця статистично значуща відносно контролю

Водночас за дії калікс[4]арену С-1220 суттєво зростає не лише амплітуда

(F_{\max}), але й інші силові параметри (рис. 3.7, Б). Зокрема, значення параметру сили, при якій має місце максимальна швидкість фази скорочення (F_C), перевищує таке у контролі на 32%, а значення показника сили, при якій має місце максимальна швидкість фази розслаблення (F_R) – на 52%.

Аналізуючи отримані результати, можна передбачити, що обумовлені калікс[4]ареном C-1220 підвищення амплітуди і частоти спонтанних скорочень є наслідком підвищення концентрації іонів Ca^{2+} в міоплазмі гладеньком'язових клітин (спричиненого індукцією реверсного режиму роботи Na^+/Ca^{2+} -обмінника в умовах порушення натрієвого концентраційного градієнту) [55].

Представлені в роботі результати мають значення для більш глибокого розуміння біохімічних і фізико-хімічних властивостей Na^+,K^+ -АТФази ПМ гладеньком'язових клітин та механізмів спрямованої регуляції функціональної активності цієї системи.

ВИСНОВКИ

Отримані результати свідчать про те, що калікс[4]арен С-1220 є ефективним інгібітором Na^+, K^+ -АТФази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин міометрія та модулятором їх скоротливої активності, що визначає перспективність подальшого вивчення цієї сполуки як потенційного фармакологічного агента для регуляції функцій гладеньких м'язів матки.

1. Встановлено, що калікс[4]арен С-1220 у концентраціях 10, 25, 50, 75 та 100 нМ дозозалежно пригнічує активність Na^+, K^+ -АТФази плазматичної мембрани клітин міометрія, підвищуючи уявну константу Міхаеліса для АТФ (K_m) без статистично значущих змін коефіцієнту Хілла, що свідчить про зниження спорідненості ензиму до субстрату за збереження кооперативності реакції. Щодо іонів Mg^{2+} як активатора – інгібування має переважно неконкурентний характер.
2. Показано, що калікс[4]арен С-1220 у концентраціях 25, 50 і 100 нМ, подібно до дії утеротоніка окситоцину, призводить до зменшення гідродинамічного діаметру гладеньком'язових клітин міометрія на 30%, 49% та 60% відповідно відносно контрольного значення, що може свідчити про зміни скоротливого стану клітин та їх водно-осмотичного балансу.
3. Тензометричними дослідженнями продемонстровано, що за дії калікс[4]арену С-1220 у концентрації 10 мкМ спостерігається активація спонтанних скорочень міометрія та зростання їх окремих силових (F_{\max} , F_C і F_R) та імпульсних (I_C , I_R і I_0) механокінетичних параметрів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Костерін, С., Бабіч, Л., Шликов, С., Данилович, Ю., Векліч, Т. та Мазур, Ю. (2016). *Біохімічні властивості та регуляція Ca^{2+} -транспортувальних систем мембранних структур гладеньком'язових клітин*. Київ: Наукова Думка.
2. Wang, S., Li, B., Qiao, H., Lv, X., Liang, Q., Shi, Z., Xia, W., Ji, F. and Jiao, J. (2021). Alterations in Na^+/K^+ -ATPase isoforms and neuronal activity in the enteric nervous system following opioid exposure. *Neurogastroenterology & Motility*, 33(2), e13914.
3. Li, X., Long, M., Zhong, S. and Luo, J. (2025). The functions of FXYD family members in human health and disease. *Genes & Diseases*, 13(3), p. 101847.
4. Tanriover, C. (2022). A new immune disease: systemic hypertension. *Clinical Kidney Journal*, 888, pp. 173–182.
5. Vinayak, S., Rupal, R., Bijina, M., Rashmi, C., Anirudh, S., Awanish, K. and Shivendra, C. (2023). Phospholipase C: underrated players in microbial infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 94, pp. 115–123.
6. Yan, D., Li, L., Zhong, Z., Yu, T., Xia, O., Yaotai, W. and Jianzhong, Z. (2022). Drug-loaded nanoparticles conjugated with genetically engineered bacteria for cancer therapy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 597, pp. 42–47.
7. Cao, R., Yang, Z., Hu, S., Liang, S., Zhang, S., Zhu, S., Lu, L., Long, C., Yao, S., Ma, Y. and Liang, X. (2022). Molecular mechanism of mouse uterine smooth muscle regulation on embryo implantation. *Molecular Sciences*, 23(20), 12494.
8. Abishankari, R., Trang, L., Barbara, H. and Bernard, R. (2022). High-content imaging analyses of the effects of bisphenols and organophosphate esters on TM4 mouse Sertoli cells. *Biology of Reproduction*, 107(5), pp. 889–901.
9. Tunstall, M., Adcock, A., and Latimer, L. (2021). Hypoxia-induced changes in

- calcium signaling and their impact on myometrial function. *Reproductive Sciences*, 28(6), pp. 1544-1557.
10. Цимбалюк, О. та Костерін, С. (2012). Na^+, K^+ -АТРаза, ендогенні кардіостероїди та їхня трансдукторна роль. *Український біохімічний журнал*, 84(1), сс. 5–17.
 11. Poulsen, H., Khandelia, H., Morth, J., Bublitz, M., Mouritsen, O., Egebjerg, J. and Nissen, P. (2012). Neurological disease mutations compromise a C-terminal ion pathway in the Na^+/K^+ -ATPase. *Biology of Reproduction*, 107(5), pp. 889–901.
 12. Санагурський, Д. (2008). *Об'єкти біофізики: монографія*. Львів: Видавничий центра ЛНУ імені Івана Франка.
 13. Hilbers, F., Kopec, W., Isaksen, T., Holm, T., Lykke-Hartmann, K., Nissen, P., Khandelia, H. and Poulsen, H. (2016). Tuning of the Na, K -ATPase by the beta subunit. *Sci. Rep.*, 6, 20442.
 14. Zhou, Y. and Wu, Q. (2022). Molecular insights into the mechanisms of ion transport by Na^+/K^+ -ATPase: Implications for drug development. *Journal of Molecular Biology*, 434(4), 167379.
 15. Bai, L., Ma, S. and Liu, X. (2021). Na^+/K^+ -ATPase: Its physiological role and modulation in health and disease. *Biochemical Pharmacology*, 189, 114297.
 16. Nguyen, T., and Lee, J. (2022). Recent advances in Na^+, K^+ -ATPase research: Isoform-specific roles in health and disease. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 29, 100975.
 17. Obradovic, M., Sudar-Milovanovic, M., Gluovic, Z., Banjac, K., Rizzo, M. and Isenovic, M. (2023). The Na^+/K^+ -ATPase: A potential therapeutic target in cardiometabolic diseases. *Frontiers in Endocrinology*, 100(3), pp. 1085–1124.
 18. Akimova, O., Tverskoi, A., Smolyaninova, L., Mongin, A., Lopina, O., La, J., Dulin, N. and Orlov, S. (2015). Critical role of the $\alpha 1$ - Na^+, K^+ -ATPase subunit in insensitivity of rodent cells to cytotoxic action of ouabain. *Apoptosis*. 20(9), pp. 1200–1210.

19. Zhou, Y., Li Y., Zhang, X. and Wang, L. (2021). Regulation of Na⁺,K⁺-ATPase by magnesium and calcium ions: implications for cellular function. *Frontiers in Physiology*, 12, 678123.
20. Zhang, X., Lee, W. and Bian, J. (2022). Recent Advances in the Study of Na⁺/K⁺-ATPase in Neurodegenerative Diseases. *Journal of Molecular Biology*, 433(15), 166998.
21. Yang, L., Liu, H. and Wang, Z. (2022). Molecular mechanisms underlying ouabain-induced vascular smooth muscle cell growth and migration. *Journal of Vascular Research*, 59(5), pp. 264–277.
22. Yuan, C. and Manunta, P. (2022). Endogenous ouabain: up-to-date review. *Journal of Hypertension*, 40(1), pp. 10–23.
23. Nguyen, T. and Lee, M. (2024). Calixarene-based nanomaterials for environmental remediation. *Journal of Hazardous Materials*, 21(2), pp. 11–29.
24. Костерін, С., Кальченко, В., Векліч, Т., Бабіч, Л. та Шликов, С. (2019). *Калікс[4]арени як модулятори АТФ-гідролазних систем гладеньком'язових клітин*. Київ: Наукова Думка.
25. Кальченко, В. та Родік, Р. (2017). Супрамолекулярні наномашини та старт-матеріали. (2017). *Вісник НАН України*, 1, pp. 84–90.
26. Wang, H. and Zhao, M. (2023). Functionalization of water-soluble calixarenes for enhanced catalytic performance. *ACS Catalysis*, 13(7), pp. 3920–3935.
27. Jiang, F., Zhang, L. and Liu, Y. (2022). Recent advancements in calixarene-based materials: Synthesis, properties, and applications in supramolecular chemistry. *Frontiers in Chemistry*, 10, 832256.
28. Luo, Z., Zhao, Y. and Maa, C. (2014). Synthesis and anti-integrase evaluation of novel calix[4]arene derivatives containing the triazolyl 1,3-diketo moiety. *Chinese Chemical Letters*, 25(5), pp. 737–740.
29. Neri, P., Sessler, J. and Wang, M-X. (2016). *Calixarenes and Beyond*. Switzerland: Springer International Publishing.
30. Прилуцька, С. (2020). *Розробка технології посилення протипухлинної*

активності цисплатину за використання C60 фулерену. Дис. д. біол. наук. Інст-т біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка.

31. Arnott, S. (2018). Inherently Chiral Calixarenes: Synthesis and Applications. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 24(8), pp. 1744–1754.
32. Mitsui, R. and Hashitani, R. (2020). Synchrony of spontaneous Ca²⁺ activity in microvascular mural cells. *Journal of smooth muscle reaserch*, 56(3), pp. 1–18.
33. Лабинцева, Р., Бевза, О. та Бевза, А. (2014). Захисний вплив тіакалікс[4]арентетрасульффонату на інгібування АТР-гідролазної активності субфрагмента А-1 міозину міометрія катіонами важких металів. *Український біохімічний журнал*, 86(6), сс. 154–166.
34. Komisarenko, S., Kosterin, S., Lugovskoy, E. and Kalchenko, V. (2013). Calixarene methylene bisphosphonic acids as promising effectors of biochemical processes. *Ukr. biochem. Journ.*, 85(6), pp. 106–128.
35. Balasahe, S. and Nimsea, T. (2013). Biological applications of functionalized calixarenes. *Chem. Soc. Rev.*, 42, pp. 366–386.
36. Xue, Y., Guan, Y., Zheng, A. and Xia, H. (2013). Amphoteric calix[8]arene-based complex for pH-triggered drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 101, pp. 55–60.
37. Coleman, A., Jebors, S. and Cecillon, S. (2008). Toxicity and biodistribution of para-sulfonato-calix[4]arene in mice. *New J. Chem.*, 32, pp. 780–782.
38. Wang, J., Zhang, Z. and Huang, S. (2023). Functional characterization of myometrial smooth muscle cells: Insights into calcium signaling and contraction mechanisms. *Biology of Reproduction*, 108(2), pp. 266–278.
39. Chengying, M., Chengkun, W., Dingyi, L., Wenxian, Y., Ningning, L. and Ning, G. (2022). Structural insights into the membrane microdomain organization by SPFH family proteins. *Cell research*, 32(2), pp. 176–189.
40. Векліч, Т., Костерін, С. та Шинлова, О. (2002). Катіонна специфічність системи акумуляції Ca²⁺ в мітохондріях клітин гладенького м'яза.

Український біохімічний журнал, 74(1), сс. 42–48.

41. González-González, M. and Hernández-Rosales, M. (2023). A new electrochemical approach for acetylcholinesterase activity using carbon nanomaterials. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 355, 131249.
42. Kumar, S. and Patel, H. (2022). Differential localization of calcium transporters in astrocytes: Impact on neurovascular coupling. *Glia*, 70(3), pp. 452–467.
43. Tsymbalyuk, O. and Kosterin, S. (2012). Na⁺,K⁺-ATPase, endogenous cardiosteroids and their transducer role. *Ukr. Biochem. J*, 84 (1), pp. 5–17.
44. Yulin, R., Andrew, T., Gunnar, M., Kaitlyn, M., Judith, C. and Gallucci, A. (2024). Douglas Kinghorn, Digoxin and its Na⁺/K⁺-ATPase-targeted actions on cardiovascular diseases and cancer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 114, 117939.
45. Shi, J., Yang, Y., Cheng, A., Xu, G. and He, F. (2020). Metabolism of vascular smooth muscle cells in vascular diseases. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 319(3), pp. H613–H631.
46. Li, J., Lai, P., Tribe, R. and Johnson, M. (2021). Transcription factors regulated by cAMP in smooth muscle of the myometrium at human parturition. *Biochemical Society Transactions*, 49(2), pp. 997–1011.
47. Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72(1), pp. 248–282.
48. Contreras, R., Torres-Carrillo, A., Flores-Maldonado, C., Shoshani, L. and Ponce, A. (2024). Na⁺/K⁺-ATPase: more than an electrogenic pump. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(11), 6122.
49. Koutras, A., Fasoulakis, Z., Syllaios, A., Garmpis, N., Diakosavvas, M., Pagkalos, A., Ntounis, T. and Kontomanolis, E. N. (2021). Physiology and pathology of contractility of the myometrium. *In Vivo*, 35(3), pp. 1401–1408.
50. Rathbun, W. and Betlach, V. (1969). Estimation of enzymically produced

- orthophosphate in the presence of cysteine and adenosine triphosphate. *Anal. Biochem.*, 28(1–3), pp. 436–445.
51. Fedosova, N., Habeck, M. and Nissen, P. (2021). Structure and function of Na,K-ATPase – the sodium-potassium pump. *Comprehensive Physiology*, 12(1): 2659–2679.
52. Staehr, C., Aalkjaer, C. and Matchkov, V. V. (2023). The vascular Na,K-ATPase: clinical implications in stroke, migraine, and hypertension. *Clinical Science (London)*, 137(20), pp. 1595–1618.
53. Кокунін, В. (1975). Статистична обробка даних при малому числі дослідів. *Український біохімічний журнал*, 47(6), сс. 776–791.
54. Костерін, С. та Бурчинська, Н. (1987). Метод визначення кінетичних характеристик Ca^{2+} -транспортуючих систем субклітинних структур гладких м'язів. *Український біохімічний журнал*, 59(2), pp. 66–69.
55. Tsybalyuk, O., Veklich, T., Maliuk, O., Cherenok, S., Kalchenko, V. and Kosterin, S. (2025). Kinetic regularities of thiacalix[4]arene C-1193 action on Na^+ , K^+ -ATPase activity of the plasma membrane and contractile activity of the myometrium. *Biology Studies*, 19(1), pp. 3–23.
56. Векліч, Т., Шкрабак, О., Родік, Р., Бойко, В. та Кальченко, В. (2011). Вплив каліксарену С-107 на кінетичні параметри Na^+ , K^+ -АТФ-ази плазматичної мембрани міоцитів матки. *Український біохімічний журнал*, 83(2), pp. 36–44.
57. Данилович, Ю., Чуніхін, О. та Данилович, Г. (2013). Тестування змін розмірів міоцитів матки за дії модуляторів її скоротливої активності методом лазерної кореляційної спектроскопії. *Український біохімічний журнал*, 85(1), pp. 32–39.
58. Данилович, Г., Данилович, Ю., Коломієць, О., Бабіч, Л. та Костерін, С. (2012). Зміни поляризації плазматичної та внутрішньої мітохондріальної мембран клітин міометрія за дії каліксаренів – інгібіторів Na^+ , K^+ -АТФ-ази плазматичної мембрани. *Український біохімічний журнал*, 84(6), pp. 37–

48.

