

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної

біотехнології та біоінформатики

доц. Олексій Юрійович Нипорко

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

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

**ВИВЧЕННЯ ЗАКОНОМІРНОСТЕЙ І МЕХАНІЗМІВ ВПЛИВУ  
КАЛІКС[4]АРЕНУ С-1087 НА СКОРОЧУВАЛЬНУ ФУНКЦІЮ  
МІОМЕТРІЯ ЩУРІВ**

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра

студента спеціальності

091 Біологія

ОП «Біологія (високі технології)»

**Яргутова Микити Андрійовича**

Науковий керівник:

професор кафедри молекулярної

біотехнології та біоінформатики

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

Оцінка захисту роботи

---

**Київ – 2024 р.**

## АНОТАЦІЯ

Яргутов М. А. – Вивчення закономірностей і механізмів впливу калікс[4]арену С-1087 на скорочувальну функцію міометрія щурів. – Випускна кваліфікаційна робота бакалавра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Біологія (високі технології)».

Мета даної дипломної роботи полягає у дослідженні біологічної активності калікс[4]арену С-1087 та його впливу на скорочувальну функцію міометрія щурів. Калікс[4]арени – це клас макроциклічних сполук, що мають перспективи використання у біомедицині завдяки своїй унікальній здатності до формування комплексів з різними молекулами.

У роботі проведено серію експериментів на щурах, спрямованих на визначення впливу калікс[4]арену С-1087 на частоту і силу скорочень міометрія. Використано *in vitro* фармакологічні і кінетичні моделі для виявлення потенційних механізмів дії цієї сполуки. Оцінено параметри скорочувальної активності міометрія, зміни в його контрактильних властивостях під дією калікс[4]арену, а також можливі побічні ефекти.

Результати дослідження показали, що калікс[4]арен С-1087 виявляє значний вплив на скорочувальну функцію міометрія, змінюючи її інтенсивність і частоту. Виявлено, що вплив цієї сполуки залежить від концентрації, що свідчить про можливість її використання в регулюванні міометріальної активності. Окремо було досліджено молекулярні механізми, через які калікс[4]арен С-1087 впливає на міометрій, зокрема, взаємодію з рецепторними структурами клітин.

Отримані дані можуть бути використані для розробки нових терапевтичних засобів для регулювання скорочувальної функції міометрія, що має значення для лікування ряду гінекологічних захворювань. Перспективи подальших досліджень включають більш детальне вивчення молекулярних механізмів дії калікс[4]аренів та їх потенційного застосування в клінічній практиці.

**Ключові слова:** каліксарени, кальцієва помпа плазматичної мембрани, гладеньком'язова тканина міометрія.

## Зміст

ВСТУП .....	6
РОЗДІЛ 1 .....	8
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	8
1.1 Структурно-функціональна організація гладеньком'язової тканини міометрія .....	8
1.2. Роль кальцієвої помпи плазматичної мембрани (ПМКА) у скорочувальній функції вісцеральних гладеньких м'язів.....	10
1.2.1. Структура ПМКА.....	10
1.2.2 Функціональні властивості ПМКА.....	13
1.2.3 Ізоформи ПМКА .....	13
1.2.4 Взаємодія ПМКА з іншими клітинними протеїнами і участь у сигнальній функції клітини.....	16
1.2.5. Інформація про зміну функціонування вісцеральних гладеньких м'язів у мишей з нокаутом ПМКА.....	17
1.3. Каліксарени як перспективні молекули для створення ліків .....	17
1.3.1. Структура каліксаренів .....	17
1.3.2. Каліксарени-модулятори систем первинного активного транспорту Ca <sup>2+</sup> .....	19
2.МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ .....	21
2.1 Метод тензометрії .....	21
2.2 Кінетичний аналіз викликаних скорочень .....	24
2.3. Метод повного механокінетичного аналізу .....	25
2.4 Статистичний аналіз .....	27
3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	28
3.1. Спонтанна скорочувальна активність міометрія щурів за умов аплікування калікс[4]арену C-1087 .....	28
3.2. Механокінетичні ефекти за умов блокування активності кальцієвої помпи саркоплазматичного ретикулуму .....	32
3.3. Механокінетичні ефекти тіакалікс[4]арену C-1087 на тлі блокування активності кальцієвої помпи саркоплазматичного ретикулуму. ....	35
3.4. Механокінетичні ефекти тіакалікс[4]арену C-1087 на тлі блокування активностей СЕРКА та NO-синтаз.....	37

3.5. Механокінетичні ефекти тіакалікс[4]арену С-1087 на тлі блокування активності NO-синтаз .....	42
ВИСНОВКИ.....	45
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	46

## ВСТУП

У сучасній біомедичній науці важливим напрямком є дослідження впливу нових хімічних сполук на функціонування різних органів і систем організму. Особливий інтерес викликають молекулярні механізми регуляції скорочувальної функції міометрія, адже розуміння цих процесів є ключовим для розробки ефективних методів лікування та профілактики різних патологій вагітності та пологів.

Однією з перспективних груп сполук, які можуть впливати на міометрій, є каліксарени. Калікс[4]арени є макроциклічними сполуками, що мають унікальні фізико-хімічні властивості та здатність до специфічного зв'язування з різними біомолекулами. Це відкриває широкі можливості для їх застосування в біомедичних дослідженнях, зокрема, у вивченні механізмів регуляції скорочувальної активності міометрія.

У даній роботі досліджується вплив калікс[4]арену С-1087 на скорочувальну функцію міометрія щурів. Вибір саме цієї сполуки зумовлений її високою біологічною активністю та здатністю до модифікації функціонального стану клітинних мембран. Основна мета дослідження полягає у вивченні закономірностей і механізмів впливу калікс[4]арену С-1087 на міометрій, що може мати важливе значення для подальшого розвитку фармакологічних стратегій у сфері репродуктивної медицини.

Актуальність дослідження обумовлена необхідністю розробки нових підходів до управління скорочувальною активністю міометрія з метою профілактики та лікування патологій, пов'язаних з аномаліями скорочувальної діяльності матки. Результати цього дослідження можуть внести значний внесок у розуміння молекулярних основ регуляції міометрія та сприяти створенню нових фармакологічних агентів для клінічного застосування.

*Метою даної роботи* було дослідити закономірності і механізми впливу калікс[4]арену С-1087 на скорочувальну функцію міометрія щурів.

Для досягнення мети при виконанні роботи були виконані наступні завдання:

1. Дослідити спонтанні ізотонічні та ізометричні скорочення препаратів міометрія за аплікування калікс[4]арену С-1087 (10 мкМ), здійснити їх повний механокінетичний аналіз.
2. Зареєструвати скорочувальні відповіді міометрія на аплікування гіперкалієвого розчину на тлі каліксарену С-1087 та розрахувати їх нормовані максимальні швидкостей фаз скорочення і розслаблення.
3. Дослідити механокінетичні ефекти калікс[4]арену С-1087 на спонтанні скорочення міометрія в умовах попереднього блокування СЕРКА тапсигаргіном.
4. Дослідити механокінетичні ефекти калікс[4]арену С-1087 на спонтанні скорочення міометрія в умовах попереднього блокування СЕРКА тапсигаргіном і синтезу оксиду азоту L-NAME.
5. Зареєструвати і проаналізувати скорочувальні відповіді міометрія на аплікування гіперкалієвого розчину на тлі каліксарену С-1087 за передінкубації м'язів з L-NAME.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1 Структурно-функціональна організація гладеньком'язової тканини міометрія

Еукаріотичні клітини мають внутрішній цитоскелетний каркас, який надає їм характерної форми. Цитоскелет дозволяє клітинам транспортувати везикули, змінювати форму, мігрувати та скорочуватися. Ця динамічна структура утворена трьома класами філаментів: актиновими мікрофіламентами, проміжними філаментами та мікротрубочками. У цьому дослідженні цитоскелет культивованих клітин міометрія людини вивчали методом імуногістохімії з використанням специфічних антитіл проти вінкуліну, цитокератину, віментину, тубуліну та RhoA, ковалентно мічених флуоресцентною міткою. Полімеризований актин візуалізували за допомогою кон'югованого з флуоресцеїном фалоїдину. Клітини міометрія були дуже багаті на актинові волокна, які зазвичай виглядали як паралельні пучки вздовж найдовшої осі клітин. Спостерігалася сильна експресія вінкуліну, який концентрувався в місцях фокальної адгезії актин-вінкулін. Проміжні філаменти (віментин і цитокератин), навпаки, були організовані в щільну цитоплазматичну сітку, яка виключала ядерний простір. Подібна картина спостерігалася і для тубуліну. RhoA мав дифузний розподіл і був пов'язаний з актиновими волокнами. Вплив окситоцину на клітини провокував вкорочення актинових волокон на 10%. Ці результати демонструють, що гладком'язові клітини міометрія мають багату цитоскелетну структуру і що агоністи, які стимулюють активацію міометрія, викликають помітні зміни в актинових волокнах, які можуть бути важливими для ефективної скоротливості.

Гладкі м'язи матки дуже схожі на гладкі м'язи інших вісцеральних органів, але мають суттєву відмінність - скоротливу активність. Під час

вагітності вона перебуває у стані спокою. Неefективне з'єднання між клітинами через низький рівень експресії щілинних з'єднань та інгібуючий вплив оксиду азоту є важливими факторами, відповідальними за мінімальну скоротливу активність гладеньких м'язів матки під час гестації. Пологи - це стан, при якому матка часто і сильно скорочується, щоб вигнати продукти зачаття. Нестабільність мембранного потенціалу гладеньких м'язів матки лежить в основі спонтанності скорочень гладеньких м'язів матки. Відбуваються зміни в кальцієвих регуляторних механізмах, які сприяють більш сильному скороченню м'яза. Передумовою ефективності цих скорочень є здатність міометрію поширювати свою електричну активність, в чому полягає важливість щілинних з'єднань. Термін вагітності характеризується сприятливим співвідношенням естрогенів і прогестерону та посиленням регуляції щілинних з'єднань, що робить міометрій функціональним синцитієм. На цю підвищену активність і реактивність матки накладається низка маткових стимуляторів, таких як простагландини і окситоцин, які, за відсутності маткових релаксантів, призводять до сильних, тривалих, ритмічних і регулярних маткових скорочень і початку пологів[1].

Гладком'язова тканина міометрія характеризується багатою цитоскелетною структурою[1], яка відіграє вирішальну роль у регуляції її скоротливої активності. Ця тканина складається з декількох типів клітин і регулюється різними сигнальними молекулами[2]. Міометрій взаємодіє через щілинні з'єднання, синхронізуючи свою функцію шляхом проведення електрофізіологічних стимулів[3]. Структурні дослідження спрямовані на з'ясування молекулярної організації складових ниток у гладком'язових волокнах, висвітлюючи подібності та відмінності з посмугованими м'язами[4]. Під час вагітності міометрій зазнає змін, що сприяють більш сильному скороченню, з посиленням регуляції щілинних з'єднань і набором маткових стимуляторів, таких як простагландини і окситоцин, що призводить до тривалих скорочень і початку пологів[5]. Ці фактори в сукупності

впливають на структурну та функціональну організацію гладком'язової тканини міометрія.

## **1.2. Роль кальцієвої помпи плазматичної мембрани (ПМКА) у скорочувальній функції вісцеральних гладеньких м'язів**

Кальцієвий насос плазматичної мембрани (ПМКА) відіграє вирішальну роль у скоротливій функції вісцеральних гладких м'язів[6][7][8][9][10]. РМС бере участь у регуляції внутрішньоклітинного рівня кальцію, який необхідний для скорочення та розслаблення м'язів. Різні ізоформи та альтернативний сплайсинг ПМКА сприяють його різноманітним функціям у контролі цитоплазматичної концентрації кальцію та посередництві кальцій-залежних сигнальних шляхів. Крім того, сарколема ПМКА діє як сигнальна молекула, впливаючи на серцеву скоротливість і судинний тонус через шляхи передачі сигналу. Дисрегуляція активності ПМКА може призвести до зміни кальцієвого сигналу, що потенційно впливає на скоротливість м'язів у відповідь на стимули, такі як адренергічна активація. Розуміння складних механізмів ПМКА у вісцеральних гладких м'язах має вирішальне значення для з'ясування фізіологічних процесів, що лежать в основі м'язового скорочення і розслаблення.

### **1.2.1. Структура ПМКА**

Кальцієва помпа плазматичної мембрани, також відома як РМСА (plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase), є важливим білком, який забезпечує активний транспорт іонів кальцію ( $\text{Ca}^{2+}$ ) з цитоплазми клітини до зовнішнього середовища. Цей процес є критично важливим для підтримання низького внутрішньоклітинного рівня кальцію, що необхідно для регуляції численних клітинних функцій.

Структурні компоненти кальцієвої помпи РМСА:

1. Трансмембранні домени:

PMCA має 10 трансмембранних сегментів, які утворюють пору для транспорту іонів кальцію. Ці сегменти перетинають плазматичну мембрану, дозволяючи білку здійснювати перехід  $\text{Ca}^{2+}$  через мембрану. Трансмембранні сегменти розташовані таким чином, що забезпечують ефективний транспорт кальцію. Вони утворюють шлях, через який іон кальцію може переміщатися завдяки енергії, отриманій від гідролізу АТФ. Трансмембранні сегменти складаються з гідрофобних амінокислот, що дозволяє їм взаємодіяти з гідрофобним середовищем мембрани. Це типово для білків, які інтегруються в клітинні мембрани. Кожен з трансмембранних сегментів має специфічну роль у структурі та функціонуванні помпи. Деякі сегменти безпосередньо беруть участь у зв'язуванні та транспортуванні іонів кальцію, інші – у формуванні каналів та підтримці структурної стабільності білка. Під час роботи кальцієвої помпи трансмембранні сегменти зазнають конформаційних змін, що дозволяє білку переключатися між станами з високою та низькою афінністю до іонів кальцію, забезпечуючи їх ефективний транспорт.

## 2. Цитоплазматичні домени:

Основні цитоплазматичні домени PMCA включають:

**Актуарний домен (А-домен):** Це регуляторний домен, який бере участь у передачі сигналів і відповідає за регуляцію активності помпи. Взаємодіє з кальмодуліном, який, зв'язуючись із кальцієм, активує PMCA.

**Фосфорилуючий домен (Р-домен):** Цей домен відповідає за автотрансфосфорилування помпи в ході її роботи. Він містить місце для зв'язування АТФ та виконує функцію перенесення фосфатної групи до ключового аспартату, що є критичним для руху іонів кальцію.

**Нуклеотид-зв'язуючий домен (N-домен):** Цей домен забезпечує зв'язування та гідроліз АТФ, що забезпечує енергію для функціонування помпи. N-домен взаємодіє з Р-доменом для здійснення фосфорилування.

Петлі та лінкери: Крім основних доменів, РМСА містить кілька цитоплазматичних петель і лінкерів, які з'єднують ці домени та допомагають у їхньому взаємному розташуванні і функціонуванні. Вони також можуть мати регуляторні сайти, що взаємодіють з іншими білками та регулюють активність помпи.

Ці домени працюють в координації для забезпечення ефективного виведення кальцію з цитоплазми, підтримуючи необхідний баланс кальцію в клітині, що є критичним для нормальної функції багатьох клітинних процесів.

### 3. Сайти зв'язування кальцію і АТР:

РМСА має високоспецифічні сайти для зв'язування іонів кальцію і АТР, що необхідні для гідролізу АТР і енергетичного забезпечення процесу транспорту.

### 4. Кальмодулін-зв'язуючий домен:

РМСА має регуляторний домен, який зв'язується з кальмодулином, білком, що регулює активність помпи у відповідь на зміни концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ . Кальмодулін (CaM) є білком, який зв'язується з іонами кальцію і регулює активність багатьох білків і ензимів, включаючи кальцієві помпи. Коли концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазмі підвищується, кальцій зв'язується з кальмодулином, що призводить до зміни його конформації. У такому активованому стані кальмодулін здатен зв'язуватися з кальмодулін-зв'язуючим доменом РМСА, що значно підвищує активність цієї помпи.

Кальмодулін-зв'язуючий домен РМСА складається з кількох специфічних амінокислотних послідовностей, які утворюють сайт зв'язування для кальмодуліна. Зв'язування кальмодуліна призводить до алостеричних змін у структурі РМСА, що сприяє її активації і підвищує ефективність транспорту кальцію з клітини

### 1.2.2 Функціональні властивості ПМКА

$\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза плазматичної мембрани (PMCA) відіграє важливу роль у різних біологічних процесах. Дослідження показують, що PMCA бере участь в екструзії кальцію в амелобластах під час формування емалі, регулюючи цитозольний рівень  $\text{Ca}^{2+}$  [11] [12]. Функція PMCA поширюється на фотозахисну та протигрибкову активність, що проявляється в синтезі п-метоксикоричної кислоти (PMCA) за допомогою реакції Перкіна, що демонструє антиоксидантні та сонцезахисні властивості [13]. Крім того, підкреслюється значення PMCA в клітинах нейронів, причому ізоформи PMCA2 і PMCA3 високо експресуються в мозку і мають вирішальне значення для кальцієвого гомеостазу, де вікове зниження функції PMCA може впливати на клітинну фізіологію і підвищувати сприйнятливість до нейротоксичних уражень [14]. Крім того, функціоналізація PMCA шляхом осадження атомних шарів на поверхні поліметилметакрилату покращує змочуваність, поверхневу твердість і хімічну стійкість, демонструючи його потенціал у покращенні властивостей матеріалів для стоматологічних застосувань [15].

### 1.2.3 Ізоформи ПМКА

Кальцієвий насос плазматичної мембрани (PMCA) відіграє вирішальну роль у підтримці клітинного кальцієвого гомеостазу[15][16]. Ізоформи PMCA кодуються чотирма генами і мають специфічні для кожного типу клітин та стадії розвитку патерни експресії[17]. Альтернативний сплайсинг генерує різноманітні ізоформи, такі як PMCA4x та PMCA4z, з відмінними функціональними властивостями[14]. Варіант PMCA4zb демонструє вищу АТФ-азну активність та спорідненість до  $\text{Ca}^{2+}$  порівняно з PMCA4xb, що вказує на диференційовану регуляцію[15]. Крім того, PMCA взаємодіє з базигіном (BSG), впливаючи на міграцію клітин та метастазування при прогресуванні раку. Зокрема, активація PMCA мономерним альфа-синуклеїном посилює виведення кальцію в синапсах нейронів, що свідчить

про його фізіологічну роль у кліренсі кальцію. Загалом, функціональні властивості РМСА складно регулюються і мають вирішальне значення для клітинної кальцієвої сигналізації та гомеостазу.

Існує чотири ізоформи кальцієвого насоса плазматичної мембрани, які позначаються як РМСА1, РМСА2, РМСА3 і РМСА4. Ці ізоформи кодуються окремими генами і мають тканинспецифічні патерни експресії, а також функціональні відмінності. Ось короткий огляд кожної ізоформи:

1. РМСА1: Ізоформа РМСА1, важливий компонент кальцієвого насосу плазматичної мембрани, відіграє значну роль у кальцієвій сигналізації та гомеостазі різних типів клітин, зокрема В-клітин. Дослідження показали, що РМСА1 необхідний для нормального розвитку В-клітин та  $\text{Ca}^{2+}$  сигналізації, причому нокаут РМСА1 призводить до підвищення базального рівня  $\text{Ca}^{2+}$ , збільшення рівня в ER-сховищах та порушення кліренсу  $\text{Ca}^{2+}$  у В-клітинах [11]. Крім того, РМСА1 залучений до регуляції кальцієвого гомеостазу під час запліднення, оскільки порушення сигналізації  $\text{Ca}^{2+}$  в ооцитах через умовне видалення РМСА1 призводить до збільшення експозиції  $\text{Ca}^{2+}$  у запліднених яйцеклітинах, що впливає на ріст і склад тіла нащадків [12]. Складний баланс, що підтримується РМСА1 у контролі рівня  $\text{Ca}^{2+}$ , підкреслює його критичну роль у клітинних функціях та фізіологічних процесах, підкреслюючи його значення як для нормального розвитку, так і для патологічних станів, таких як прогресування раку [13] [14].

2. РМСА2: Кальцієві АТФ-ази плазматичної мембрани (РМСА) відіграють вирішальну роль у підтримці клітинного кальцієвого гомеостазу, причому різні ізоформи мають різні функції. У той час як ізоформа РМСА4 інтенсивно вивчається в контексті прогресії та метастазування раку [1] [2] [3], ізоформа РМСА2 є менш вивченою. Дослідження показали, що варіанти РМСА4, зокрема РМСА4z, демонструють відмінності в АТФазній активності та чутливості до регуляторних механізмів порівняно з РМСА4x [4]. Експресія

різних ізоформ РМСА суворо регулюється в нормальних і патологічних умовах, впливаючи на такі клітинні функції, як клітинна міграція, ріст і апоптотична резистентність [5]. Подальші дослідження специфічної ролі та регуляторних механізмів ізоформи РМСА2 є важливими для всебічного розуміння її внеску в клітинну кальцієву сигналізацію та потенційних наслідків при захворюваннях. РМСА2 також експресується в багатьох тканинах, але особливо багато його в клітинах нервової системи, таких як нейрони і гліальні клітини. Він бере участь у кальцієвій сигналізації нейронів і має вирішальне значення для таких процесів, як вивільнення нейромедіаторів і синаптична пластичність.

3. РМСА3: РМСА3 переважно міститься в м'язових тканинах, включаючи серцеві та скелетні м'язи. Він необхідний для регулювання рівня кальцію в м'язових клітинах, що має вирішальне значення для скорочення і розслаблення м'язів. Кальцієві АТФ-ази плазматичної мембрани (РМСА) відіграють вирішальну роль у підтримці рівня цитозольного кальцію, причому різні ізоформи мають специфічні функції. РМСА3 є однією з ізоформ, які беруть участь у регуляції кальцієвого гомеостазу, зокрема в нейрональних клітинах [1]. Дослідження показали, що мутації в генах, що кодують РМСАs, включаючи АТР2В3, який кодує РМСА3, можуть призвести до неврологічних розладів, таких як втрата слуху та мозочкова атаксія [2]. Крім того, ізоформи РМСА4 беруть участь у прогресуванні раку, причому РМСА4b пригнічується при певних типах раку, впливаючи на міграцію клітин і метастазування [3] [4]. Альтернативний сплайсинг РМСА4 генерує різні варіанти, такі як РМСА4x і РМСА4z, з відмінними функціональними властивостями, включаючи відмінності в АТФ-азній активності та афінності до кальцію [5]. Розуміння специфічних ролей ізоформ РМСА, таких як РМСА3 і РМСА4, є важливим для з'ясування їхнього внеску в клітинну кальцієву сигналізацію та пов'язані з нею патології.

4. PMCA4: PMCA4 широко експресується і міститься в різних тканинах, включаючи епітеліальні клітини, лімфоцити та внутрішнє вухо. Він відіграє важливу роль у кальцієвій сигналізації в цих тканинах і бере участь у таких процесах, як міграція клітин, імунна відповідь та слух. Ізоформа PMCA4 кальцієвого насоса плазматичної мембрани відіграє вирішальну роль у регуляції сигналізації та гомеостазу  $Ca^{2+}$  в клітинах, причому різні варіанти сплайсингу демонструють різні функціональні властивості [1]. Дослідження показали, що порушення регуляції PMCA4 може впливати на міграцію клітин, метастазування та прогресування раку, причому для різних типів раку спостерігаються різні ролі [2] [3] [4]. Зокрема, гіперекспресія PMCA4 пов'язана з низькою виживаністю пацієнтів при протоковій аденокарциномі підшлункової залози (PDAC), що підкреслює його потенціал як терапевтичної мішені при цьому типі раку [5]. Складний баланс варіантів PMCA4, таких як PMCA4b, у підтримці низьких цитозольних рівнів  $Ca^{2+}$  є важливим для нормального функціонування клітин, і порушення цього балансу може призвести до патогенних наслідків, включаючи метастазування раку. Розуміння різних ролей та регуляторних механізмів ізоформ PMCA4 має вирішальне значення для з'ясування їхнього впливу на клітинні процеси та прогресування захворювань.

Кожна ізоформа має специфічні структурні та регуляторні особливості, які дозволяють їй виконувати свої унікальні функції в різних клітинних контекстах. Крім того, альтернативний сплайсинг і посттрансляційні модифікації ще більше урізноманітнюють і регулюють активність насоса PMCA.

#### **1.2.4 Взаємодія ПМКА з іншими клітинними протеїнами і участь у сигнальній функції клітини**

Кальцієві АТФ-ази плазматичної мембрани (PMCA) відіграють важливу роль у клітинних сигнальних шляхах, взаємодіючи з білками-партнерами для регулювання кальцієвої трансдукції сигналу [1]. PMCA, такі

як PMCA4, фізично взаємодіють з CFTR, хлорним каналом, на апікальній мембрані епітеліальних клітин, де CFTR-залежний рекрутинг кальмодуліну визначає активність PMCA4 [2]. Крім того, PMCA утворюють комплекси з нейропластином, впливаючи на рівень їх експресії та швидкість кліренсу кальцію, хоча вплив нейропластину на кальцієвий баланс є комплексним і може включати інші фактори [3]. Крім того, аналіз близького зв'язування (PLA) є цінним методом для вивчення білок-білкових взаємодій, в тому числі за участю фосфоінозитидів та їхніх зв'язуючих білків у клітинах [4]. Загалом, PMCA не тільки витісняють кальцій з клітин, але й діють як модулятори шляхів сигнальної трансдукції через взаємодію з різними білками-партнерами.

### **1.2.5. Інформація про зміну функціонування вісцеральних гладеньких м'язів у мишей з нокаутом ПМКА**

Функція вісцеральних гладких м'язів у нокаutowаних PMCA мишей зазнає значних змін. Дослідження ізоформ PMCA 1, 2 і 4 у мишей показують, що вони відіграють різні фізіологічні ролі: Дефіцит PMCA1 призводить до апоптозу гладких м'язів судин, втрата PMCA2 впливає на сенсорні клітини внутрішнього вуха та лактуючі молочні залози, а нульові мутанти PMCA4 демонструють безпліддя та дефектний  $Ca^{2+}$ -сигнал у В-лімфоцитах. Крім того, PMCA1 і PMCA4 відіграють різну роль у скоротливості гладких м'язів: PMCA1 сприяє загальному кліренсу  $Ca^{2+}$ , а PMCA4 необхідний для карбахол-стимульованого скорочення. Ці дані підкреслюють спеціалізовані функції ізоформ PMCA у підтримці гомеостазу  $Ca^{2+}$  та регуляції фізіологічних процесів у різних тканинах, включаючи вісцеральні гладенькі м'язи [1].

## **1.3. Каліксарени як перспективні молекули для створення ліків**

### **1.3.1. Структура каліксаренів**

Каліксарени — це макроциклічні сполуки, які складаються з фенольних підгруп, з'єднаних метиленовими містками ( $-CH_2-$ ). Вони мають

чашоподібну структуру, звідки походить їхня назва ("калікс" від грецького "чаша" і "арен" від "арену", тобто ароматичне кільце).

Основні особливості структури каліксаренів:

1. Фенольні підгрупи: Основний будівельний блок каліксаренів - це фенольні кільця. Кількість фенольних підгруп може варіювати, утворюючи різні каліксарени, наприклад, калікс[4]арен, калікс[6]арен та калікс[8]арен, де число вказує на кількість фенольних кілець.

2. Метиленові містки: Фенольні кільця з'єднані між собою метиленовими містками (-CH<sub>2</sub>-), які з'єднують положення 2 та 6 кожного фенольного кільця. Це створює циклічну структуру.

3. Конформації: Каліксарени можуть існувати у різних конформаціях залежно від взаємного розташування фенольних підгруп:

- Конус (cone): всі фенольні кільця орієнтовані в одному напрямку, утворюючи чашоподібну структуру.

- Частковий конус (partial cone): один фенольний кільце повернуто в протилежну сторону.

- 1,2-альтернація (1,2-alternate): фенольні кільця чергуються по напрямку.

- 1,3-альтернація (1,3-alternate): кожне друге фенольне кільце повернуто в протилежну сторону.

4. Функціональні групи: На фенольних кільцях можуть бути різноманітні замісники, що дозволяє модифікувати фізико-хімічні властивості каліксаренів. Найчастіше використовуються алкільні або арильні групи.

5. Кавітарність: Внутрішня порожнина каліксаренів дозволяє їм взаємодіяти з різними гостями, утворюючи комплекси через ван-дер-ваальсові, π-π, або водневі зв'язки.

Каліксарени знаходять застосування в хімії хост-гест, селективному вилученні йонів, сенсорах, каталізаторах і матеріалознавстві завдяки їхнім унікальним структурним і функціональним властивостям.

### **1.3.2. Каліксарени-модулятори систем первинного активного транспорту $\text{Ca}^{2+}$**

Однією з цікавих властивостей каліксаренів є їх здатність модулювати систему первинного активного транспорту кальцію ( $\text{Ca}^{2+}$ ) у клітинах. Первинний активний транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  включає перенос іонів кальцію через клітинні мембрани за допомогою специфічних білків-насосів, таких як  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФази, які використовують енергію гідролізу АТФ для транспортування  $\text{Ca}^{2+}$  проти його електрохімічного градієнта.

Механізм дії каліксаренів:

**Зв'язування з іонами  $\text{Ca}^{2+}$ :** Каліксарени можуть формувати стабільні комплекси з іонами  $\text{Ca}^{2+}$  завдяки своїй кавітній структурі, що забезпечує селективне зв'язування. Це дозволяє знизити концентрацію вільного  $\text{Ca}^{2+}$  в клітині.

**Взаємодія з мембранними білками:** Деякі каліксарени здатні впливати на активність мембранних білків, таких як  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФази. Вони можуть змінювати конформацію білка або його мікрооточення, впливаючи на його функціональність і ефективність транспорту  $\text{Ca}^{2+}$ .

**Модуляція сигнальних шляхів:** Каліксарени можуть також впливати на сигнальні шляхи, що регулюють активність  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаз. Це включає вплив на вторинні месенджери, фосфорилування білків та інші процеси, які контролюють активність кальцієвих насосів.

Приклади використання каліксаренів

**Біомедицина:** Каліксарени можуть бути використані для регулювання внутрішньоклітинних рівнів  $\text{Ca}^{2+}$ , що має важливе значення при лікуванні

захворювань, пов'язаних з дисбалансом кальцію, таких як кардіоміопатії та нейродегенеративні захворювання.

Дослідження клітинних процесів: Каліксарени як інструменти для модулювання рівня  $Ca^{2+}$  можуть використовуватися в фундаментальних дослідженнях, що стосуються клітинної сигналізації, апоптозу та інших процесів.

## 2.МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

### 2.1 Метод тензометрії

Механокінетичні властивості ГМ ШКТ досліджували на препаратах вісцеральних ГМ нелінійних білих щурів та щурів лінії Wistar. Усі експерименти за участі тварин проводили у відповідності до законодавства України та норм Європейського Співтовариства щодо гуманного поводження з лабораторними тваринами. Умертвіння щурів здійснювали із використанням ефірного наркозу.

Для дослідження скорочувальної активності використовували тензометричне устаткування, яке передбачало можливість реєстрації скорочувальної активності одночасно двох м'язових препаратів: у ізометричному та ізотонічному режимах реєстрації (Рис. 2.1 ).

Скорочувальну активність ГМ рогів матки досліджували на препаратах, для приготування яких роги матки розрізали у поздовжньому напрямку на смужки середнього розміру 2 x 10 мм, залишаючи ендотеліальний шар інтактним. Для дослідження спонтанної і викликані скорочувальної активності препарати ГМ поміщали в робочу камеру (ефективний об'єм 2,0 мл) тензометричного устаткування (Рис. 2.1) з проточним розчином Кребса (швидкість протікання - 7 мл/хв.) та залишали на 1 годину до стабільної відтворюваності спонтанних і викликаних скорочень. Термостатування робочої камери здійснювали за допомогою рідинного термостату на рівні 37 °С.

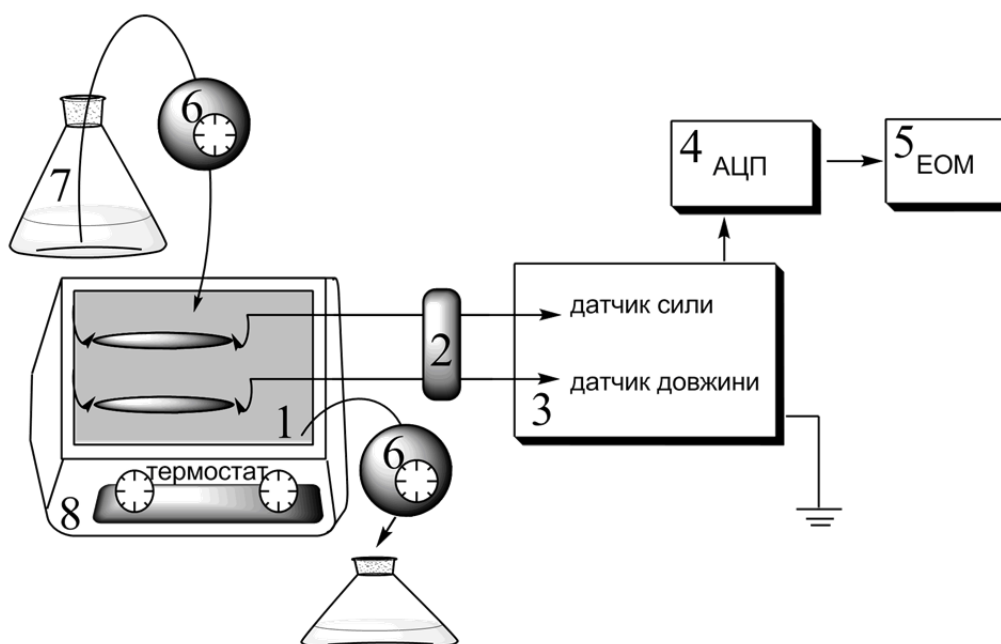


Рис. 2.1. Блок-схема устаткування для тензометричних експериментів на багатоклітинних препаратах гладеньких м'язів: 1 - робоча камера з робочим розчином і м'язовими препаратами, зафіксованими на гачках; 2 – датчики сили та переміщення; 3 – підсилювач сигналів; 4 – аналого-цифровий перетворювач (позначено АЦП); 5 – комп'ютер (позначено ЕОМ); 6 – перестальтичні насоси; 7 – набір робочих розчинів; 8 – рідинний термостат.

У роботі було здійснено дослідження закономірностей та механізмів дії на ГМ калікс[4]арену з шифром С-1087 ((5,11,17,23-тетра(трифтор)метил(фенілсульфоніліміно)метиламіно-25,27-дигексилокси-26,28-дигідрокситіакалікс[4]арен)) (Рис. 2.2), який було синтезовано і охарактеризовані методами ЯМР і ІЧС у відділі хімії фосфоранів в Інституті органічної хімії НАН України під керівництвом акад. НАН України, проф. Кальченка В.І. та люб'язно надано нам для досліджень.

В досліді використовували розчин 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; рН розчину становив 7,4. Гіперкалієвий розчин (ГКР), який містив іони K<sup>+</sup> у концентрації 80 мМ, готували шляхом ізотонічної заміни в вихідному розчині Кребса необхідної частини іонів Na<sup>+</sup> на еквімолярну кількість іонів K<sup>+</sup>.

Тіакалікс[4]арен С-1087 попередньо розчиняли в ДМСО і в концентрації 10 мкМ вносили в розчин Кребса або ГКР (остаточно аліквота розчину органічного розчинника становила 0,1 % від загального об'єму цього розчину).

Тапсигаргін (стокова концентрація у ДМСО становила 1 мМ) в концентрації 0,5 мкМ вносили в розчин Кребса; час попередньої інкубації (перед початком реєстрації спонтанних скорочень, які аналізували методом багатопараметричного механокінетичного аналізу препаратів у проточному розчині Кребса з тапсигаргіном становив 20 хв.

Неселективний блокатор NO-синтаз L-NAME вносили в розчин Кребса у концентрації 0,1 мМ; час попередньої інкубації (перед початком реєстрації спонтанних скорочень, які аналізували методом багатопараметричного механокінетичного аналізу) препаратів у проточному розчині Кребса з L-NAME становив 20 хв.

Контрольну скорочувальну активність і скорочення на тлі L-NAME досліджували в розчинах, які містили 0,1 % ДМСО.

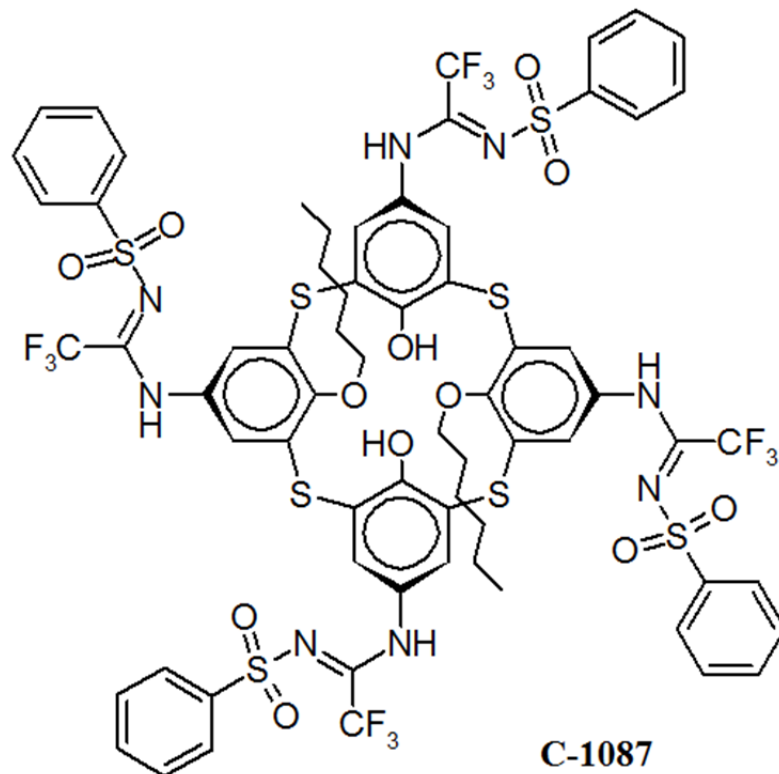


Рис. 2.2. Структурна формула тіакалікс[4]арену С-1087.

## 2.2 .Кінетичний аналіз викликаних скорочень

Аналіз кінетичних закономірностей процесів скорочення та розслаблення гладком'язових препаратів проводили окремо для фаз скорочення та розслаблення повної механокінетичної кривої з використанням модифікованого методу Костеріна-Бурдиги. Цей метод передбачає, що фрагмент механограми одиничного скорочення, зокрема фаза розслаблення, може бути задовільно описаний емпіричним рівнянням:

$$f = f_m \frac{\tau^n}{\tau^n + t^n} \quad (2.1)$$

де:  $f$  – миттєва сила скорочувальної відповіді ГМ (в момент часу  $t$ );  
 $f_m$  – максимальна сила фазного скорочення ГМ;  
 $\tau$  – характеристичний час скорочувальної відповіді (момент часу, в яких миттєва сила розслаблення м'язу дорівнює половинному значенню максимальної сили:  $f = 0,5 f_m$ );  
 $n$  – логарифмічний декремент крутизни механокінетичної кривої, тобто  $n = d\{\ln[(f_m-f)/f]\}/dt$ .

Час, у який досягається  $f_m$ , приймають за початкову точку відліку фази розслаблення  $t = 0$  (Рис. 2.6), тоді як поточному значенню часу  $t$  відповідає значення миттєвої сили  $f$ .

Лінеаризованою формою рівняння (2.1) є наступна:

$$\ln\left(\frac{f_m - f}{f}\right) = n \ln t - n \ln \tau \quad (2.2)$$

Тоді за рівнянням (2.2) фазу розслаблення можна лінеаризувати у координатах  $\left\{ \ln\left(\frac{f_m - f}{f}\right); \ln t \right\}$ ; з неї визначаються параметри:  $n$  та  $\tau$ .

Значення  $n$  і  $\tau$  використовували для розрахунку нормованої максимальної швидкості фази розслаблення ( $V_n$ ):

$$V_n = \frac{(n-1)^{\frac{n-1}{n}} \cdot (n+1)^{\frac{n+1}{n}}}{4n\tau}. \quad (2.3)$$

Оскільки параметр нормованої максимальної швидкості (2.3) не залежить від амплітуди скорочення, він є корисним для порівняння даних, отриманих на різних м'язових препаратах.

### 2.3. Метод повного механокінетичного аналізу

Емпіричне відношення, яким можна описати вищезгадані кінетичні закономірності для кривої скорочення-розслаблення ГМ, має наступний вигляд:

$$f = A \cdot t^n \cdot e^{-kt}$$

Із даного співвідношення отримуємо:

$$A = \left(\frac{e}{\tau_0}\right)^n F_{max} = \left(\frac{ke}{n}\right)^n F_{max}$$

$$\tau_0 = \frac{\tau_c + \tau_R}{2} = \frac{n}{k}$$

$$\tau_c = \frac{n - \sqrt{n}}{k}$$

$$\tau_R = \frac{n + \sqrt{n}}{k}$$

Відповідно до рівнянь для сили, де  $f=F_C$  в точці перегину ( $t=\tau_C$ ) на фазі скорочення, також для швидкості скорочення, де  $V=V_C$  в цій точці, згідно співвідношенням, маємо механокінетичної кривої маємо:

$$F_c = F_{Max} \times \left(\frac{n - \sqrt{n}}{n}\right)^n \times e^{\sqrt{n}}$$

$$V_c = k \times F_{max} \times \left(\frac{n - \sqrt{n}}{n}\right)^{n-1} \times \frac{e^{\sqrt{n}}}{\sqrt{n}}$$

Аналогічно, у випадку для сили  $f=F_R$  в точці перегину ( $t=\tau_R$ ) на фазі розслаблення, так само і для швидкості розслаблення  $V_R$  в цій точці механокінетичної кривої маємо:

$$F_R = F_{Max} \times \left( \frac{n + \sqrt{n}}{n} \right)^n \times e^{-\sqrt{n}}$$

$$V_R = -k \times F_{max} \times \left( \frac{n + \sqrt{n}}{n} \right)^{n-1} \times \frac{e^{-\sqrt{n}}}{\sqrt{n}}$$

Згідно із залежностями на рівні фаз скорочення та розслаблення гладенької мускулатури для значень імпульсів сили  $I_C$  та  $I_R$  у точках перегину з абсцисою  $\tau_C$  та  $\tau_R$  можна записати, відповідно:

$$I_C = F_{Max} \times \left( \frac{n - \sqrt{n}}{n} \right)^{n+1} \times \frac{n}{k} \times e^{\sqrt{n}}$$

$$I_R = F_{Max} \times \left( \frac{n + \sqrt{n}}{n} \right)^{n+1} \times \frac{n}{k} \times e^{-\sqrt{n}}$$

Тоді, можемо вивести рівняння у випадку повної механокінетичної кривої маємо співвідношення для імпульсу сили  $I$ :

$$I_{\tau_0} = F_{Max} \times \tau_0 = F_{Max} \times \frac{n}{k}$$

Для аналізу повного профілю поодиноких спонтанних скорочень, їх лінеаризували у координатах  $\left[ \ln \left( \frac{fR}{fC} \right); \ln \left( 1 + \frac{\Delta t}{t} \right) \right]$ , де  $f$  і  $t$  – миттєві значення сили та часу на рівні скоротливого циклу значення сили та часу на рівні скоротливого циклу,  $F_C$  і  $F_R$  – відповідно значення сили в точках перегину механограми на рівні фаз скорочення (від початку зростання сили до її максимального значення  $F_{max}$ ) і розслаблення (від максимального значення сили  $F_{max}$  і до її повернення на базальний рівень),  $\Delta t$  – заданий довільно фіксований інтервал часу (він варіював у межах 5-10 с). Із лінеаризованих графіків визначали 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.

## 2.4 Статистичний аналіз

Експериментальні дані обробляли методами варіаційної статистики із використанням програми OriginPro2018. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами двох вибірок, для яких було підтверджено приналежність до нормально розподілених сукупностей, використовували t-критерій Стьюдента для залежних груп даних.

Аналіз достовірності апроксимації даних лінійною функцією здійснювали із використанням F-тесту Фішера; коефіцієнт кореляції Пірсона ( $r$ ) був не нижчим від 0,95 та детермінації ( $R^2$ ) був не нижчим від 0,9.

У всіх випадках достовірними вважали результати за умови значення ймовірності  $p < 0.05$ . Результати представлені як середнє арифметичне  $\pm$  стандартна похибка середнього,  $n$  – кількість дослідів.

### 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1. Спонтанна скорочувальна активність міометрія щурів за умов аплікування калікс[4]арену С-1087

За умов ізометричного режиму реєстрації скорочувальної активності гладкої мускулатури (ГМ) матки, додавання до омиваючого розчину препарату каліксарену С-1087 (10 мкМ) не впливало на їх базальне напруження (Фіг. 7А). Однак, після 20 хвилин передінкубації, спостерігалось зниження амплітуди спонтанних скорочень у середньому до 78,4 % від контрольного рівня, прийнятого за 100 % ( $p < 0.01$ ,  $n = 8$ ). За аналогічних умов в ізотонічному режимі реєстрації, каліксарен С-1087 (10 мкМ) спричиняв розслаблення ГМ, а також зниження амплітуди спонтанних скорочень у середньому до 76,6 % від контрольного рівня ( $p < 0.001$ ,  $n = 7$ ) (Рис. 3.1).

Аналіз механокінетичних параметрів окремих циклів скорочення-розслаблення (аналізували фрагмент механограми зі скороченнями після 20 хвилин впливу С-1087) показав, що як в ізометричному, так і в ізотонічному режимах реєстрації під впливом каліксарену С-1087 спостерігається суттєве зменшення показників сили (в ізометричному режимі) і довжини (в ізотонічному режимі) в точках переходу фаз скорочення (FC і  $\Delta LC$ ) або укорочення ( $\Delta LC$  і  $\Delta LR$ ), та розслаблення (FR і  $\Delta LR$ ). Показники FC і FR під впливом С-1087 у середньому становили 71,9 % і 79,4 % від контрольних значень, прийнятих за 100 % ( $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ). Показники  $\Delta LC$  і  $\Delta LR$  під впливом С-1087 у середньому склали 73,8 % і 77,1 % від контрольних значень, прийнятих за 100 % ( $p < 0.001$ ,  $n = 7$ ).

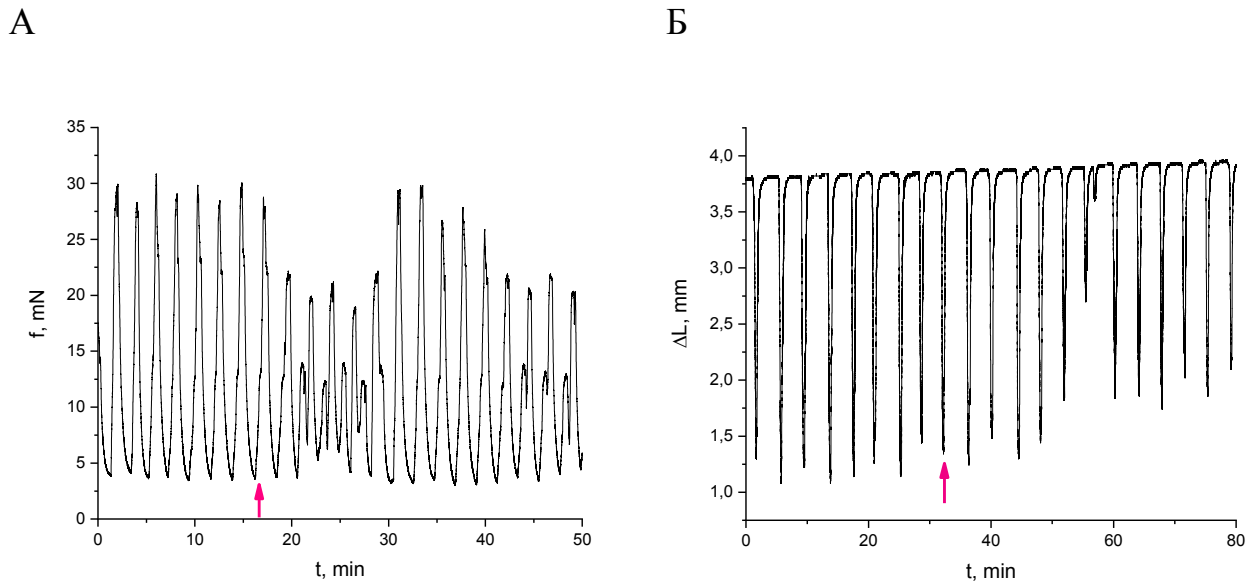


Рис. 3.1. Спонтанна скорочувальна активність міометрія щурів (А – за ізометричного та Б – за ізотонічного режимів реєстрації) у контролі й на тлі дії каліксарену С-1087 (10 мкМ). Момент початку аплікації С-1087 показано стрілкою. Наведено типові механограми.

Також, при реєстрації скорочувальної активності в ізометричному режимі під дією каліксарену С-1087, спостерігалось значне пригнічення максимальної швидкості фази розслаблення: параметр VR в середньому складав 70,5 % порівняно з контрольним значенням, прийнятим за 100 % ( $p < 0.01$ ,  $n = 6$ ). Параметр ізотонічного розслаблення не показував значних відмінностей від контрольного значення (85,1 %,  $p > 0.05$ ,  $n = 6$ ).

У присутності С-1087 не відбувалося змін у кінетиці наростання сили (ізометричного скорочення та ізотонічного укорочення): максимальні швидкості фази скорочення ( $V_c$  та  $V_{nc}$ ) не мали статистично значущих відмінностей від контролю.

Були виявлені кінетичні закономірності скорочувальної активності гладкої мускулатури матки щурів, викликані аплікацією гіперкалієвого розчину (80 мМ) під дією каліксарену С-1087 у концентрації 10 мкМ (Рис.

3.2). Відомо, що при такій активації скорочення ГМ обумовлюється входом іонів  $\text{Ca}^{2+}$  через потенціалкеровані  $\text{Ca}^{2+}$ -канали, а процеси зниження внутрішньоклітинної концентрації цього катіону (на фазі розслаблення) відбуваються завдяки системам енергозалежного транспорту [3].

Як і у випадку ізометричних спонтанних скорочень, скорочення міометрія, активовані аплікацією гіперкалієвого розчину (80 мМ) (Рис. 3.2 А), характеризувалися значним зменшенням параметру нормованої максимальної швидкості фази розслаблення  $V_{nr}$  (в середньому до 46,7 % від контрольного значення, прийнятого за 100 %,  $p < 0.01$ ,  $n = 5$ ).

Аналогічні зміни також спостерігалися у кінетиці скорочень міометрія, активованих гіперкалієвим розчином (80 мМ) в ізометричному режимі. У цьому випадку параметр  $V_{nr}$  в середньому складав 32,9 % від контрольного значення, прийнятого за 100 % ( $p < 0.001$ ,  $n = 5$ ).

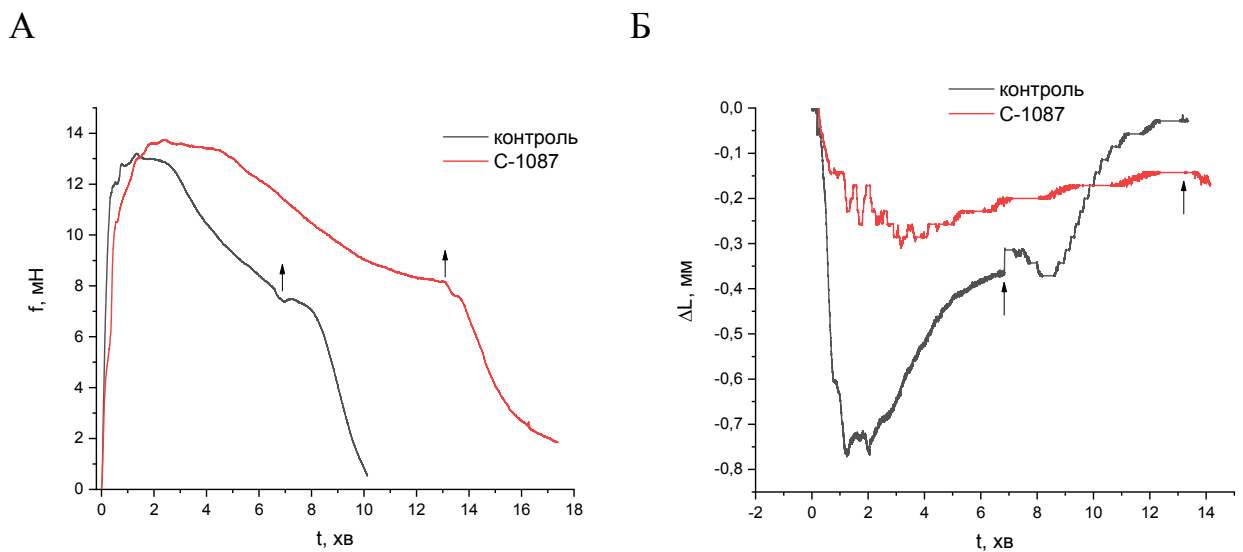


Рис. 3.2. Скорочення активність міометрія щурів (А – за ізометричного та Б – за ізотонічного режимів реєстрації), викликані аплікуванням гіперкалієвого розчину (80 мМ) у контролі й на тлі дії каліксарену С-1087 (10 мкМ). Момент відмивання гіперкалієвого розчину показано стрілками. Наведено типові механограми.

Варто також зазначити, що у разі ізометричного режиму реєстрації скорочувальної активності амплітуда скорочень гладеньких м'язів під впливом каліксарену С-1087 значно знижувалась (Рис. 3.2). Розглядаючи механізми, за допомогою яких каліксарен С-1087 змінює механокінетичні параметри скорочувальних реакцій міометрія, слід пам'ятати, що на сьогодні немає селективних блокаторів кальцієвої помпи плазматичної мембрани (ПМ), і ми можемо орієнтуватися лише на дані, отримані з моделей з порушеною експресією окремих ізоформ цього ензиму [Liu06, Liu07, Ishida05]. Зокрема, дослідження Liu L. та співавторів [Liu06, Liu07] показали, що при використанні мишей з ПМКА4-/-, ПМКА1+/- та ПМКА1+/-/4-/-, для гладеньких м'язів сечового міхура з ПМКА1+/- та ПМКА1+/-/4-/- спостерігалось значне уповільнення фази розслаблення скорочувальних реакцій на застосування гіперкалієвого розчину та агоністів мускаринових холінорецепторів карбахолу. Тож суттєве зниження максимальних швидкостей розслаблення ( $V_r$  і  $V_{nr}$ ), викликане каліксареном С-1087, може бути пов'язане зі спрямованим інгібуванням кальцієвої помпи ПМ.

Таким чином, усі наведені приклади свідчать, що синтезований каліксарен С-1087 селективно та ефективно впливає на  $Ca^{2+}$ -помпу ПМ, підвищуючи концентрацію  $Ca^{2+}$  — тригера скорочення та підвищення тонуусу гладеньких м'язів, а також змінюючи скоротливу активність міометрія, тобто має фізіологічний ефект своєї інгібіторної дії. Отже, нова малотоксична низькомолекулярна хімічна сполука непептидної природи — каліксарен С-1087 є селективним інгібітором  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -АТРази ПМ клітин міометрія і має перспективу як субстанція для створення ефективних препаратів, що стимулюють пологову активність та/або підвищують базальний тонус гладеньких м'язів матки після пологів. Друге призначення нової речовини — використання як ефективного та селективного інгібітора

Ca<sup>2+</sup>-помпи ПМ у подальших наукових дослідженнях, оскільки наразі відсутні комерційно доступні такі селективні інгібітори.

### 3.2. Механокінетичні ефекти за умов блокування активності кальцієвої помпи саркоплазматичного ретикулу

Для з'ясування ролі СЕРКА у механокінетиці процесів скорочення-розслаблення ми дослідили дію блокатора цієї помпи, тапсигаргіну, на спонтанну скорочувальну активність міометрія щурів. Введення тапсигаргіну (0,5 мкМ) в омиваючий розчин міометрія супроводжувалося транзійтним збільшенням базального напруження та підвищенням амплітуди і частоти спонтанних скорочень (Рис. 3.3). Після 20 хвилин дії тапсигаргіну амплітуда скорочень залишалася підвищеною ( $137,8 \pm 4,2$  % від контролю,  $p < 0.05$ ,  $n=7$ ), а їх частота поверталася до контрольного рівня.

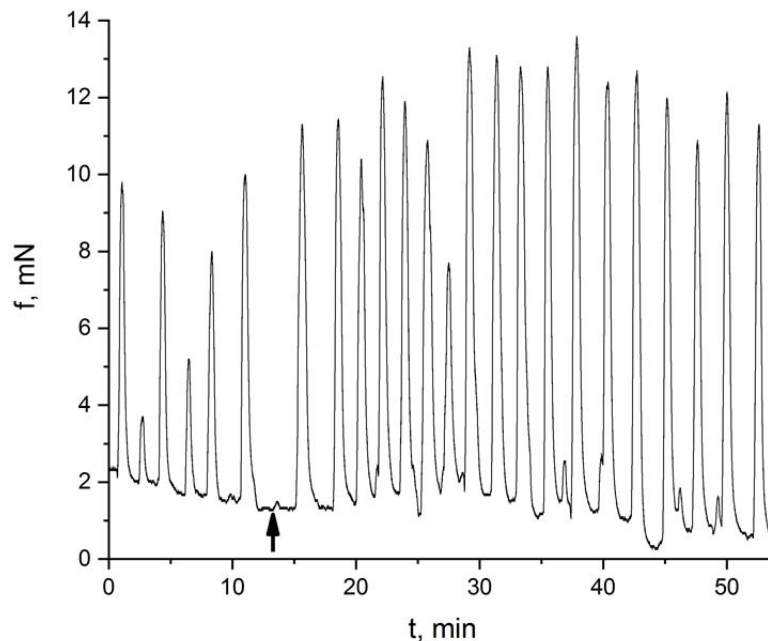


Рис. 3.3. Зміна спонтанної скорочувальної активності міометрія щурів за блокування кальцієвої помпи саркоплазматичного ретикулу тапсигаргіном (0,5 мкМ). Момент внесення тапсигаргіну в омиваючий гладенькі м'язи розчин Кребса позначено стрілкою. Наведено типову механограму.

За допомогою багатопараметричного механокінетичного аналізу було встановлено, що тапсигаргін суттєво змінював окремі цикли скорочення-розслаблення, значно підвищуючи силові, швидкісні та імпульсні параметри (Рис. 3.4). Важливо зазначити, що блокування СЕРКА не уповільнювало процес розслаблення м'язових препаратів, як можна було б очікувати, а призводило до достовірного збільшення максимальної швидкості фази розслаблення ( $V_R$ ).

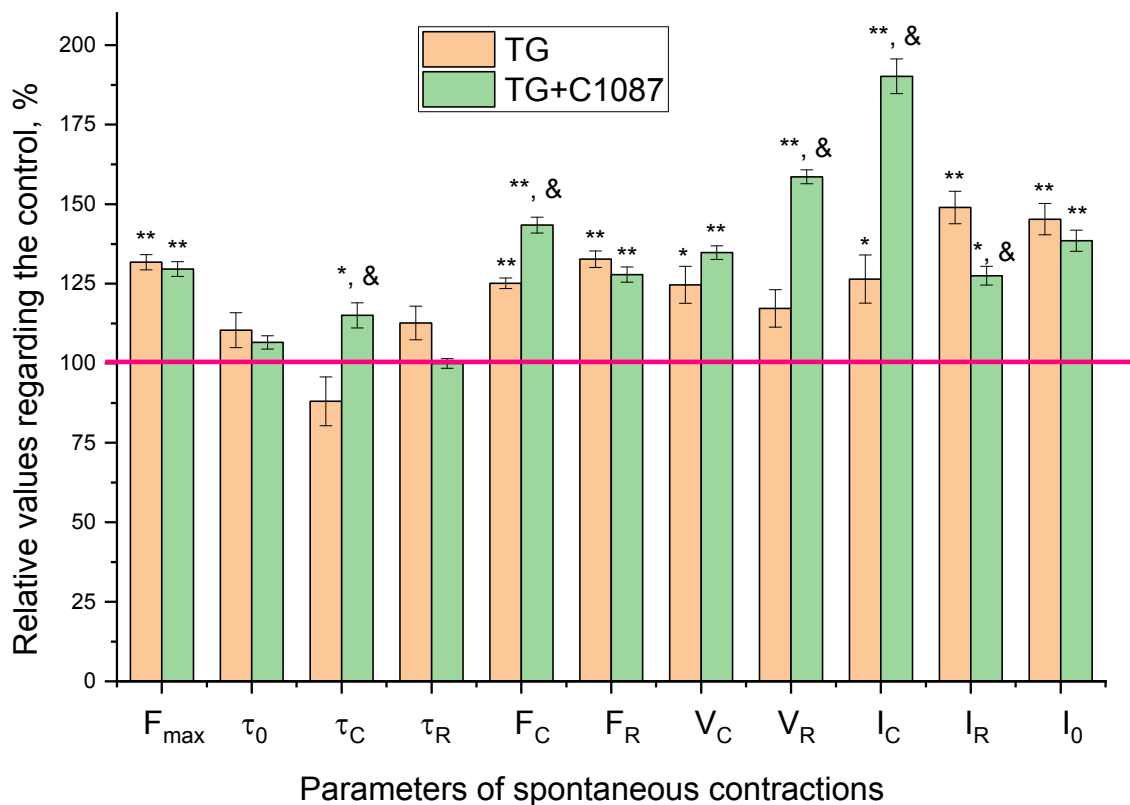


Рис. 3.4. Відносні зміни механокінетичних параметрів спонтанних скорочень міометрія щурів за блокування активності СЕРКА тапсигаргіном (TG, 0,5 мкМ) та дії тіокалікс[4]арену С-1087 (10 мкМ) на тлі тапсигаргіну. Параметри представлені у % щодо відповідних контрольних значень, прийнятих за 100 %.  $M \pm m$ ,  $n = 7$ . Тут та в інших випадках механокінетичні параметри розраховували згідно з методом [19].

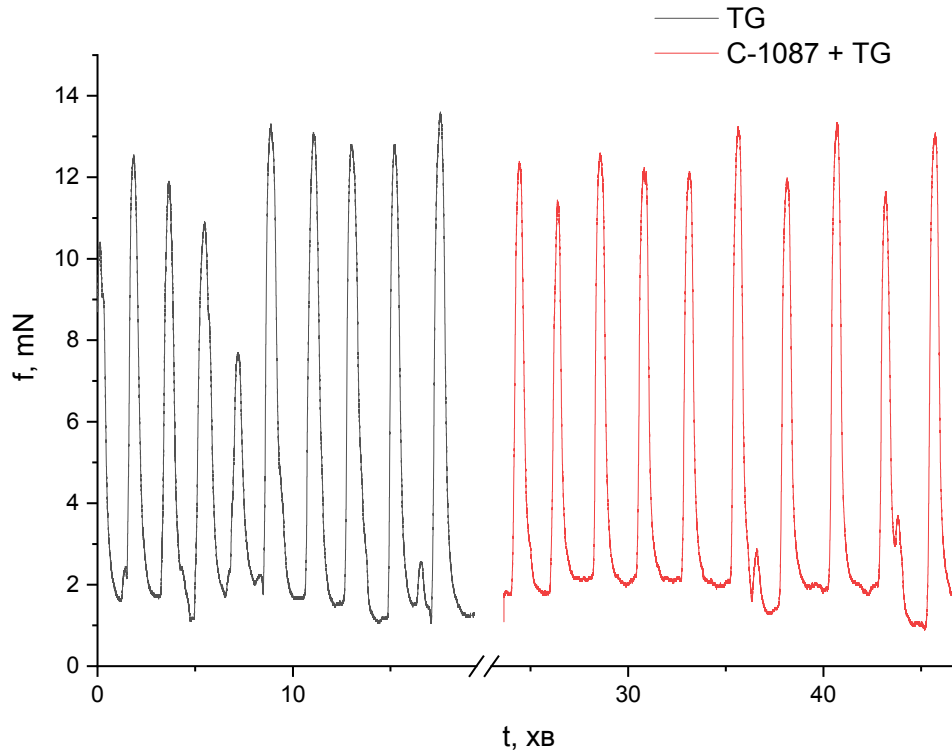
Можна передбачити можливі механізми, через які блокування СЕРКА викликає активацію спонтанних скорочень міометрія з повною зміною кінетики окремих циклів скорочення-розслаблення. СЕРКА – це внутрішньоклітинне депо кальцію ( $\text{Ca}^{2+}$ ), яке у клітинах міометрія відіграє роль основного джерела підвищення внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) під час активації скорочення агоністами-утеротоніками та захоплення цих катіонів після дії агоністів [40, 41]. Однак, ймовірно, його участь у підтриманні спонтанних скорочень міометрія незначна і зводиться до модуляції збудливості гладком'язових клітин та часткового захоплення іонів кальцію СЕРКА під час розслаблення з подальшим їх векторним вивільненням поблизу плазматичної мембрани, що активує  $\text{Ca}^{2+}$ -залежні  $\text{K}^+$ -канали [22, 42].

Ймовірно, що присутність тапсигаргіну спричиняє зростання концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у цитозолі. Як показують дані Gravina F.S. і колег [42], блокування СЕРКА циклопіазонієвою кислотою спричиняє зростання  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , пов'язане із посиленням входу цих катіонів з позаклітинного простору через потенціалкеровані  $\text{Ca}^{2+}$ -канали L-типу. Оскільки блокування СЕРКА підвищує  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , зокрема у примембранному просторі, можна передбачити за цих умов активацію  $\text{Ca}^{2+}$ -активованих мембранних протеїнів (зокрема,  $\text{Ca}^{2+}$ -активованих  $\text{K}^+$ -каналів та NO-синтаз) [22, 24, 42, 43]. Це припущення обґрунтоване, оскільки в міометрії невагітних щурів експресуються конститутивні  $\text{Ca}^{2+}$ -активовані ізоформи NO-синтази (найбільше ендотеліального типу і дещо менше нейронального типу), тоді як індукцйбельна  $\text{Ca}^{2+}$ -незалежна ізоформа присутня у слідових кількостях і значно збільшується під час вагітності [45, 46]. Також у міометрії щурів експресуються  $\text{Ca}^{2+}$ -активовані  $\text{K}^+$ -канали (великої та малої провідності), які є важливими для регуляції скорочувальної активності цієї тканини [47, 48, 49].

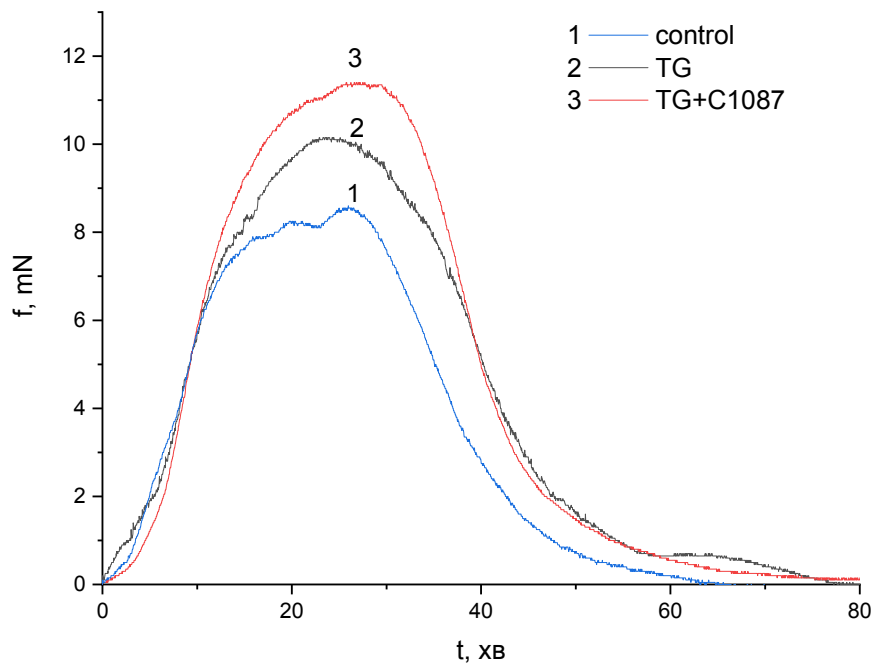
### 3.3. Механокінетичні ефекти тіокалікс[4]арену С-1087 на тлі блокування активності кальцієвої помпи саркоплазматичного ретикулу.

Як зазначають численні дослідження [19, 23, 35, 44], головним механізмом викачування іонів  $\text{Ca}^{2+}$  з цитоплазми клітин міометрія після збудження є ПМКА. Наші попередні дослідження показали, що блокатор ПМКА тіокалікс[4]арен С-1087 у концентрації 10 мкМ знижує амплітуду спонтанних скорочень міометрія щурів до  $78,4 \pm 5,2$  % відносно контролю ( $p < 0.05$ ,  $n=6$ ) за умови постійної частоти [38]. Одиначні цикли скорочень при дії С-1087 мали значно уповільнену фазу розслаблення, а параметр  $V_R$  становив у середньому  $70,5 \pm 3,8$  % відносно контролю ( $p < 0.01$ ,  $n=6$ ).

У наступній серії експериментів досліджували вплив цієї сполуки на механокінетичні параметри спонтанних скорочень міометрія при попередньому блокуванні СЕРКА (Рис. 3.4 та 3.5). При блокуванні СЕРКА тапсигаргіном (0,5 мкМ, час попередньої інкубації 20 хв) тіокалікс[4]арен С-1087 не впливав на амплітуду та частоту спонтанних скорочень (Рис. 3.5 А), проте значно змінював кінетичні параметри циклів скорочення-розслаблення (Рис. 3.4, 3.5 Б). Порівняно з умовами дії лише тапсигаргіну, С-1087 збільшував такі параметри: характеристичний час фази скорочення ( $\tau_C$ ) до  $130,7 \pm 4,1$  % ( $p < 0.05$ ,  $n=7$ ); максимальну швидкість фази розслаблення ( $V_R$ ) до  $135,3 \pm 4,6$  % ( $p < 0.01$ ,  $n=7$ ); імпульс сили на рівні максимальної швидкості фази скорочення (IC) до  $150,4 \pm 4,9$  % ( $p < 0.01$ ,  $n=7$ ). Дисперсійний аналіз показав, що частка впливу блокаторів  $\text{Ca}^{2+}$ -помп (СЕРКА тапсигаргіну та ПМКА тіокалікс[4]арену С-1087) на механокінетичні параметри спонтанних скорочень міометрія становить приблизно 60-65 % (наприклад, для амплітуди це 61 %), тоді як частка впливу інших, не врахованих в експериментах факторів – близько 35-40 %.



А



Б

Рис. 3.5. Зміна спонтанної скорочувальної активності міометрія щурів за блокування  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи саркоплазматичного ретикулуму тапсигаргіном (TG, 0,5 мкМ) та дії тіокалікс[4]арену С-1087 (10 мкМ) на лі тапсигаргіну: А – фрагмент механограм, Б – подинокі спонтанні скорочення.

Отже, при блокуванні СЕРКА додаткове блокування ПМКА тіокалікс[4]ареном С-1087 викликало значні зміни механокінетики фаз скорочення і розслаблення. Особливо помітне прискорення процесу розслаблення приблизно на третину. Цей суперечливий ефект (відносно дії на VR лише С-1087) може бути пов'язаний із  $Ca^{2+}$ -регульованими процесами, зокрема можливим посиленням витоку іонів  $K^+$  через  $Ca^{2+}$ -чутливі  $K^+$ -канали (KCa) плазматичної мембрани, які є важливими регуляторами розслаблення міометрія [43]. Також, при підвищеному  $[Ca^{2+}]_i$ , особливо у примембранних ділянках при блокуванні ПМКА, суттєво зростає активність NO-синтаз [8-10]; наші попередні дослідження показали, що зростання концентрації NO прискорює процес релаксації міометрія [44].

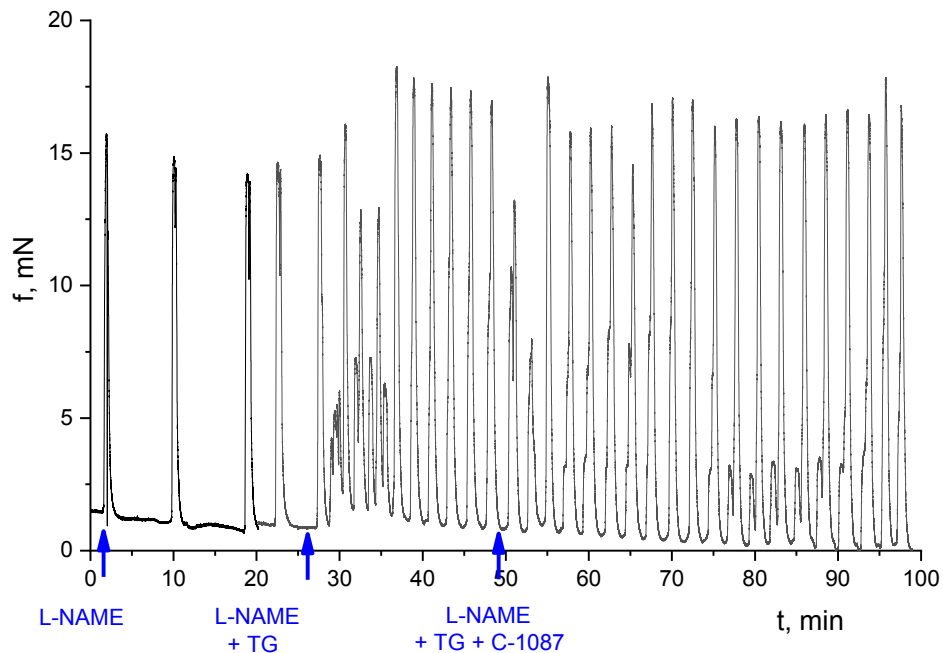
Наступні дослідження були спрямовані на вивчення впливу тіокалікс[4]арену С-1087 та тапсигаргіну на механокінетичні ефекти щодо спонтанної активності міометрія в умовах попереднього блокування активності NO-синтаз.

#### **3.4. Механокінетичні ефекти тіокалікс[4]арену С-1087 на тлі блокування активностей СЕРКА та NO-синтаз**

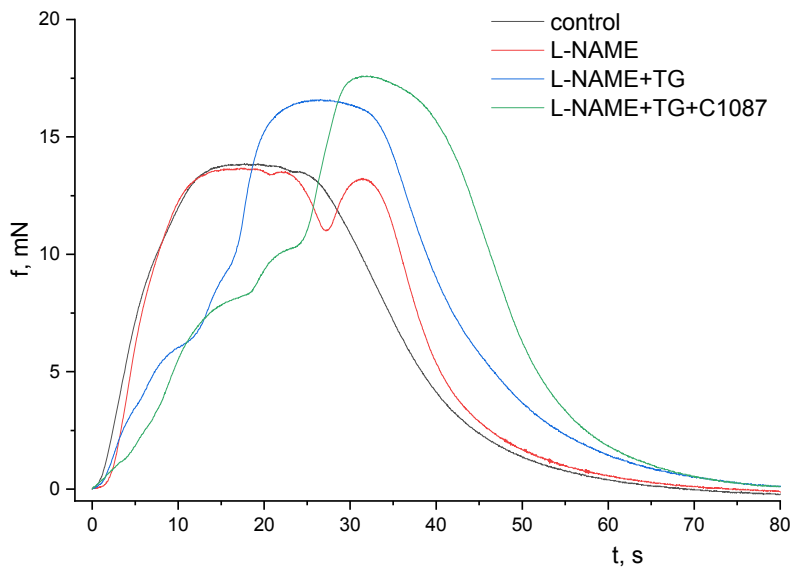
Попередня інкубація м'язових препаратів з блокатором NO-синтази L-NAME (100 мкМ, 20 хв) не впливала на частотно-амплітудні параметри спонтанної скорочувальної активності (Рис. 3.6). Проте за цих умов спостерігалось значне уповільнення фази скорочення, що проявлялось збільшенням відповідних механокінетичних параметрів (Рис. 3.6): характерного часу фази скорочення ( $\tau_c$ ) до  $143,4 \pm 8,3$  % ( $p < 0.05$ ,  $n=7$ ); імпульсу сили на рівні максимальної швидкості скорочення (IC) до  $157,8 \pm 9,9$  % ( $p < 0.01$ ,  $n=7$ ).

На тлі блокування NO-синтази L-NAME (100 мкМ, 20 хв) блокатор СЕРКА тапсигаргін (0,5 мкМ, 20 хв) викликав транзйентне підвищення базального напруження і значне збільшення амплітуди та частоти скорочень (Рис. 3.6 А). Також спостерігалися зміни окремих параметрів скорочувальних циклів, зокрема, кінетика фази скорочення змінювалася суттєвіше (Рис. 3.7). У порівнянні з дією лише L-NAME, під впливом тапсигаргину на тлі L-NAME достовірно зростали (у %, щодо ефекту L-NAME, прийнятого за 100 %): час досягнення амплітуди ( $\tau_0$ ) до  $155,0 \pm 3,9$  % ( $p < 0.01$ ,  $n=7$ ); характерний час фази скорочення ( $\tau_C$ ) до  $139,6 \pm 4,0$  % ( $p < 0.05$ ,  $n=7$ ); характерний час фази розслаблення ( $\tau_R$ ) до  $121,3 \pm 10,9$  % ( $p < 0.05$ ,  $n=7$ ); сила при максимальній швидкості фази скорочення (FC) до  $120,5 \pm 4,0$  % ( $p < 0.05$ ,  $n=7$ ); імпульс сили на рівні максимальної швидкості скорочення (IC) до  $169,8 \pm 15,4$  % ( $p < 0.01$ ,  $n=7$ ); імпульс сили на рівні максимальної швидкості розслаблення (IR) до  $138,6 \pm 2,7$  % ( $p < 0.05$ ,  $n=7$ ); імпульс сили на рівні максимуму ( $I_{max}$ ) до  $144,5 \pm 1,7$  % ( $p < 0.05$ ,  $n=7$ ).

Таким чином, блокування СЕРКА на тлі блокування синтезу NO супроводжується суттєвими змінами механокінетики фаз скорочення (що проявляється збільшенням параметрів  $\tau_0$ ,  $\tau_C$  та IC) і розслаблення (що проявляється збільшенням параметру IR). Проте, якщо порівнювати ці результати з параметрами спонтанних скорочень під дією лише тапсигаргину, вплив блокування NO-синтази найбільше стосується змін механокінетики фази скорочення.



А



Б

Рис. 3.6. Зміна спонтанної скорочувальної активності міометрія шурів за блокування  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи саркоплазматичного ретикулуму тапсигаргіном (TG, 0,5 мкМ) на тлі та дії блокатора NO-синтаз L-NAME (100 мкМ), тіокалікс[4]арену C-1087 (10 мкМ) на тлі дії тапсигаргіну і L-NAME: А – фрагмент механограми, Б – поодинокі спонтанні скорочення. Наведено типові механограми.

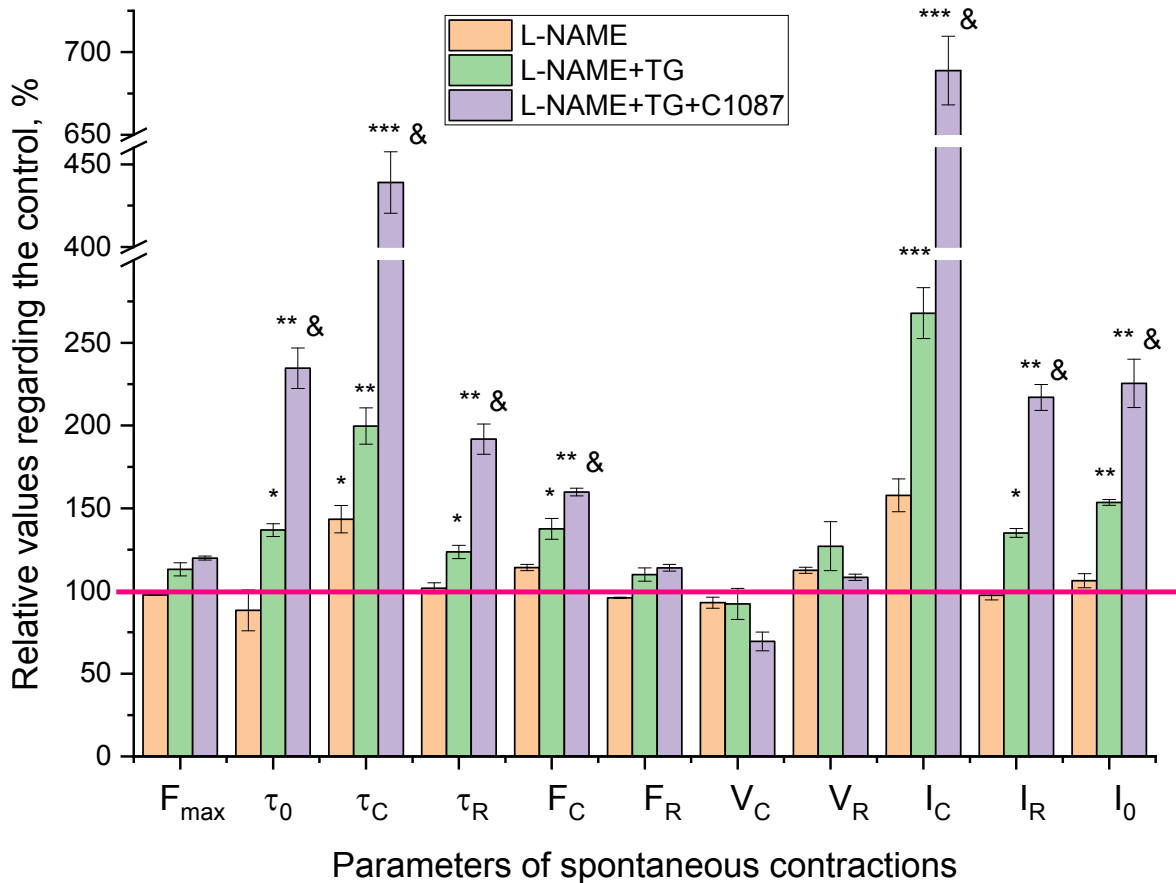


Рис. 3.7. Відносні зміни параметрів спонтанних скорочень міометрія шурів за блокування NOS неселективним блокатором L-NAME (100 мкМ), СРКА тапсигаргіном (TG, 0,5 мкМ) та дії тіакалікс[4]арену С-1087 (10 мкМ) на тлі тапсигаргіну. Параметри представлені у % щодо відповідних контрольних значень, прийнятих за 100%.  $M \pm SEM$ ,  $n = 7$ . \*  $p < 0.05$ ; -  $p < 0.01$  – щодо контролю; & -  $p < 0.05$  – щодо L-NAME+ тапсигаргін.

У наступній серії експериментів досліджували закономірності впливу тіакалікс[4]арену С-1087 на тлі блокування NO-синтаз та СЕРКА на спонтанну скорочувальну активність міометрія шурів.

Тіакалікс[4]арен С-1087 (10 мкМ) на тлі блокування СЕРКА тапсигаргіном (0,5 мкМ) і NOS неселективним блокатором L-NAME (0,1 мМ) не впливав на амплітудно-часові характеристики спонтанної скорочувальної активності міометрія, однак спричиняв значну модуляцію кінетики окремих скорочень як на рівні фази скорочення, так і розслаблення (Рис. 3.6, 3.7). Так,

відносні значення кінетичних параметрів спонтанних скорочень за дії С-1087 на тлі L-NAME і тапсигаргіну (порівняно з відповідними параметрами за дії лише L-NAME і тапсигаргіну: час досягнення амплітуди ( $\tau_0$ ) до  $171,5 \pm 12,2$  % ( $p < 0.01$ ,  $n=7$ ); характеристичний час фази скорочення ( $\tau_C$ ) до  $219,8 \pm 18,6$  % ( $p < 0.01$ ,  $n=7$ ); характеристичний час фази розслаблення ( $\tau_R$ ) до  $155,2 \pm 9,1$  % ( $p < 0.01$ ,  $n=7$ ); максимальна швидкість фази скорочення ( $V_C$ ) до  $75,4 \pm 5,6$  % ( $p < 0.05$ ,  $n=7$ ); максимальна швидкість фази розслаблення ( $V_R$ ) до  $85,2 \pm 1,9$  % ( $p < 0.05$ ,  $n=7$ ); імпульс сили на рівні максимальної швидкості скорочення ( $I_C$ ) до  $257,1 \pm 20,8$  % ( $p < 0.01$ ,  $n=7$ ); імпульс сили на рівні максимальної швидкості розслаблення ( $I_R$ ) до  $160,7 \pm 7,8$  % ( $p < 0.05$ ,  $n=7$ ); імпульс сили на рівні максимуму ( $I_{max}$ ) до  $146,9 \pm 14,6$  % ( $p < 0.05$ ,  $n=7$ ).

При здійсненні дисперсійного аналізу також було встановлено, що частка впливу блокаторів  $Ca^{2+}$ -помп (СЕРКА тапсигаргіну та ПМКА тіакалікс[4]арену С-1087) на тлі блокування NO-синтаз на механокінетичні параметри спонтанних скорочень міометрія зростає та складає близько 70-80 %. Зокрема, у випадку амплітудних параметрів цей показник складав: для  $F_{max}$  78,3 % (та для неврахованих факторів 21,7 %),  $F_C$  81,1 % (та для неврахованих факторів 18,9 %) та для  $F_R$  67,3 % (та для неврахованих факторів 32,7 %). Тож усунення внеску NO-залежної зміни скорочувальної активності дозволяє в суттєво більшій мірі ізолювати ефекти саме блокування систем первинного активного транспорту  $Ca^{2+}$  в міоцитах, зокрема внесок саме ПМКА в регуляцію спонтанних скорочень міометрія.

Отже, здатність до пригнічення процесу розслаблення тіакалікс[4]ареном С-1087 (10 мкМ) при попередньому блокуванні СЕРКА проявляється при блокуванні NO-синтаз. Тож оскільки ефекти С-1087 на тлі блокування СЕРКА щодо параметрів спонтанних скорочень суттєво залежали від активності NOS, це слугує додатковим підтвердженням інгібування під дією С-1087  $Ca^{2+}$ -помпи ПМ (яка є ключовим регулятором NOS).

### 3.5. Механокінетичні ефекти тіакалікс[4]арену C-1087 на тлі блокування активності NO-синтаз

Зручною фармакологічною моделлю для дослідження процесів скорочення гладкої мускулатури через активацію надходження  $\text{Ca}^{2+}$  через потенціалкеровані канали та подальшу екструзію цих катіонів під час фази розслаблення є ГКР-індуковане скорочення [43, 44]. У попередніх наших дослідженнях було показано [37], що попередня інкубація гладкої мускулатури матки щурів з тіакалікс[4]ареном C-1087 (10 мкМ) суттєво уповільнює процес релаксації ГКР-індукованого скорочення, а показник нормованої максимальної швидкості фази розслаблення знижується більш ніж удвічі порівняно з контролем. Таким чином, модель ГКР-індукованого скорочення є зручною для вивчення участі систем активного транспорту іонів  $\text{Ca}^{2+}$  через плазматичну мембрану. У наступній серії експериментів ми досліджували вплив тіакалікс[4]арену C-1087 (10 мкМ) на тлі попереднього блокування NO-синтаз L-NAME (0,1 мМ, тривалість інкубації 30 хв).

Попередня інкубація гладкої мускулатури з L-NAME (0,1 мМ) спричиняла незначне посилення ГКР-індукованих скорочень. Кінетичний аналіз показав, що блокування NO-синтаз супроводжувалося деяким підвищенням швидкості процесу розслаблення (Рис. 3.8, механограма 2). На тлі L-NAME тіакалікс[4]арен C-1087 (10 мкМ) повністю пригнічував процес розслаблення ГКР-індукованого скорочення міометрія, що свідчить про потужну здатність цієї сполуки блокувати процеси екструзії іонів  $\text{Ca}^{2+}$  з гладкої мускулатури (Рис. 3.8, механограма 3)

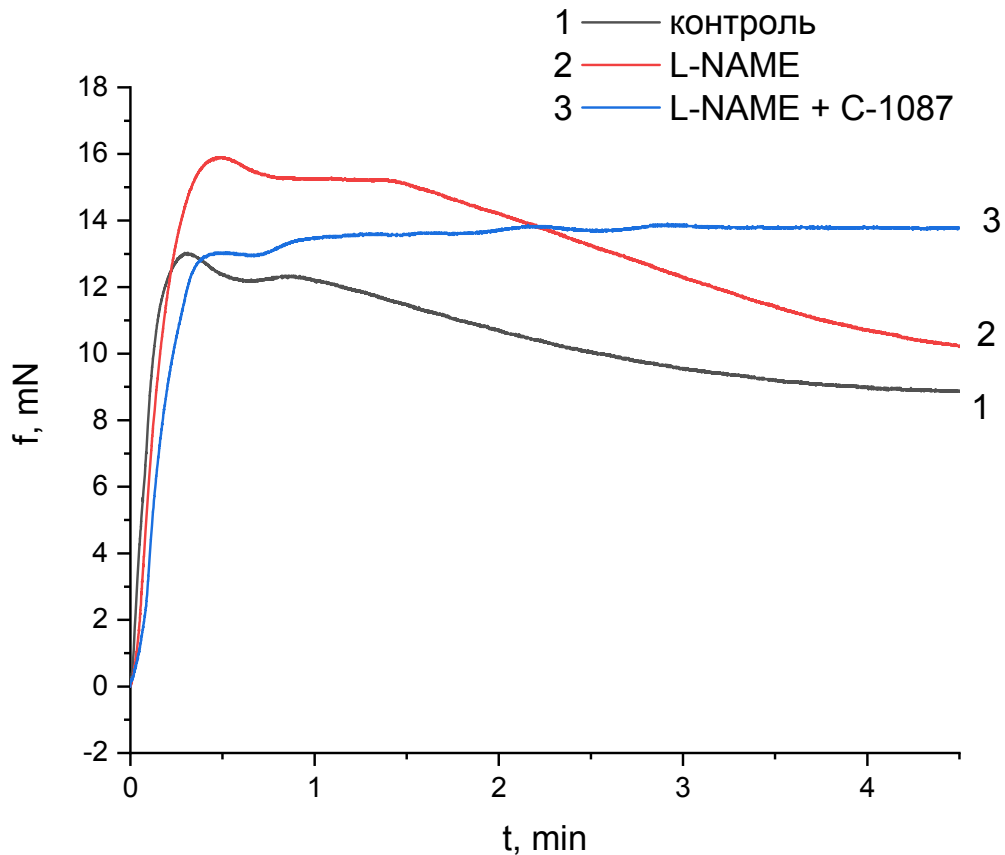


Рис. 3.8. Скорочення міометрія шурів, індуковані аплікацією гіперкалієвого розчину (80 мМ) у контролі (1); в умовах блокування NO-синтаз передінкубацією з L-NAME (0.1 мМ, тривалість попередньої інкубації 30 хв) (2); за дії тіокалікс[4]арену С-1087 (10 мкМ) на тлі блокування NO-синтаз L-NAME (3). Наведено типові механограми.

Отже, результати наших досліджень показують, що тіокалікс[4]арен С-1087, пригнічуючи ПМКА (і, ймовірно, до деякої міри – СЕРКА [37]), спричиняє зміни у функціонуванні  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних систем у гладкій мускулатурі. Це призводить до змін кінетики скорочення-розслаблення. Ця сполука, блокуючи процеси активного транспорту іонів  $\text{Ca}^{2+}$  з міоплазми, значно уповільнює фазу розслаблення як спонтанних, так і активованих скорочень міометрія, а також викликає сплеск флуоресцентного  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналу у ізольованих міоцитах. Втім, на ПМКА-залежні механокінетичні ефекти С-1087 значною мірою накладаються вторинні процеси, зумовлені підвищенням

вмістом іонів  $Ca^{2+}$  у примембранній області гладкої мускулатури. Це може впливати на провідність  $KCa$ -каналів, а також на активність конститутивних  $NO$ -синтаз [25-27]. Останнє припущення добре підтверджується дослідженнями ГКР-активованих скорочень на тлі  $L$ -NAME. Отже, можна передбачити, що тіакалікс[4]арен  $C$ -1087 є ефективним інгібітором ПМКА та перспективною сполукою для розробки на його основі фармакологічних препаратів для модуляції скорочувальної активності гладкої мускулатури.

## ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що аплікування калікс[4]арену С-1087 (10 мкМ) до препаратів міометрія щурів призводить до зниження амплітуди і частоти спонтанних скорочень в ізометричному та ізотонічному режимах реєстрації, а поодинокі цикли скорочень на тлі С-1087 мали суттєво уповільнену фазу розслаблення.
2. Виявлено, що каліксарен С-1087 інгібує скорочувальні відповіді міометрія на аплікування гіперкалієвого розчину, спричиняючи також суттєве зниження максимальних швидкостей їх фаз розслаблення ( $V_r$  і  $V_{nr}$ ), що, ймовірно пов'язано зі спрямованим інгібуванням кальцієвої помпи плазматичної мембрани міоцитів.
3. Показано, що на тлі блокування СЕРКА тапсигаргіном калікс[4]арен С-1087 не впливав на амплітуду та частоту спонтанних скорочень, але суттєво прискорював їх фазу розслаблення.
4. Встановлено, що калікс[4]арен С-1087 (10 мкМ) на тлі блокування СЕРКА тапсигаргіном і NOS неселективним блокатором L-NAME не змінює амплітудно-часові характеристики спонтанної скорочувальної активності міометрія, однак спричиняв суттєве зниження швидкостей їх фаз скорочення і розслаблення.
5. Виявлено, що на тлі L-NAME калікс[4]арен С-1087 спричиняє повне пригнічення процесу розслаблення індукованого аплікуванням гіперкалієвого розчину скорочення міометрія, що вказує на потужну здатність цієї сполуки блокувати процеси екструзії іонів  $Ca^{2+}$  з міоцитів і підтверджує блокування ПМКА за дії С-1087.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Yu, J. T., & Bernal, A. L. (1998). The cytoskeleton of human myometrial cells. *Reproduction*, *112*(1), 185–198. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1120185>
2. To, V., IuIu, M., & So, K. (2015). [MG2+,ATP-DEPENDENT PLASMA MEMBRANE CALCIUM PUMP OF SMOOTH MUSCLE CELLS. II. REGULATION OF ACTIVITY]. *PubMed*, *87*(2), 5–25. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26255336>
3. Roberts-Thomson, S. J., Chalmers, S. B., & Monteith, G. R. (2019). The Calcium-Signaling Toolkit in Cancer: Remodeling and Targeting. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *11*(8), a035204. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a035204>
4. Purwaningsih, Y., Indriyanti, E., & Masduqi, A. F. (2022). Synthesis of PMCA (P-Methoxy Cinnamic Acid) using Perkin Reaction and Its Activity as Photo Protective and Antifungal Agent. *JKPK (Jurnal Kimia Dan Pendidikan Kimia)*, *7*(2), 138. <https://doi.org/10.20961/jkpk.v7i2.61294>
5. Proctor, G. B. (2006). Muscarinic receptors and salivary secretion. *Journal of Applied Physiology*, *100*(4), 1103–1104. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01546.2005>
6. Pensa, E. (2018). Enhanced Properties of Polymethyl Methacrylate Coated with Atomic Layer Deposited Ceramic Nanofilm. *Applied Surface Science (North-Holland)*. <https://oatd.org/oatd/record?record=handle%3A10027%2F22938>
7. Oceandy, D., Mamas, M., & Neyses, L. (2007). Targeting the sarcolemmal calcium pump: a potential novel strategy for the treatment of cardiovascular disease. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry*, *5*(4), 300–304. <https://doi.org/10.2174/187152507782109890>
8. Madácsy, T., Varga, Á., Papp, N., Tél, B., Pallagi, P., Szabó, V., Kiss, A., Fanczal, J., Rakonczay, Z., Tizslavicz, L., Rázga, Z., Hohwieler, M., Kleger, A., Gray, M., Hegyi, P., & Maléth, J. (2022). Impaired regulation of PMCA

- activity by defective CFTR expression promotes epithelial cell damage in alcoholic pancreatitis and hepatitis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 79(5). <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04287-1>
9. Kuo, K., & Leo, J. M. (2018). Enhancement of vascular smooth muscle contractility by alterations of membranous architecture. *the Anatomical Record*, 302(2), 186–192. <https://doi.org/10.1002/ar.23946>
  10. Koledova, V. V., & Khalil, R. A. (2006). CA<sup>2+</sup>, calmodulin, and cyclins in vascular smooth muscle cell cycle. *Circulation Research*, 98(10), 1240–1243. <https://doi.org/10.1161/01.res.0000225860.41648.63>
  11. Jain, V., Saade, G. R., & Garfield, R. E. (2000). Structure and function of the myometrium. In *Advances in organ biology* (pp. 215–246). [https://doi.org/10.1016/s1569-2590\(00\)08009-5](https://doi.org/10.1016/s1569-2590(00)08009-5)
  12. Egarter, C., & Husslein, P. (1992). Biochemistry of myometrial contractility. *Baillière's Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 6(4), 755–769. [https://doi.org/10.1016/s0950-3552\(05\)80187-7](https://doi.org/10.1016/s0950-3552(05)80187-7)
  13. Eddinger, T. J. (2014). Smooth Muscle □ Protein translocation and tissue function. *the Anatomical Record*, 297(9), 1734–1746. <https://doi.org/10.1002/ar.22970>
  14. Corradi, G. R., Mazzitelli, L. R., Petrovich, G. D., De Tezanos Pinto, F., Rochi, L., & Adamo, H. P. (2021). Plasma membrane CA<sup>2+</sup> pump PMCA4Z is more active than splicing variant PMCA4X. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.668371>
  15. Cooke, P. (1983). Organization of contractile fibers in smooth muscle. In *Springer eBooks* (pp. 57–77). [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-9296-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-9296-9_3)
  16. Cartwright, E. J., Oceandy, D., Austin, C., & Neyses, L. (2011). Ca<sup>2+</sup> signalling in cardiovascular disease: the role of the plasma membrane calcium pumps. *Science China. Life Sciences/Science China. Life Sciences*, 54(8), 691–698. <https://doi.org/10.1007/s11427-011-4199-1>
  17. Boczek, T., Radzik, T., Ferenc, B., & Zylinska, L. (2019). The puzzling role of Neuron-Specific PMCA isoforms in the aging process. *International*

- Journal of Molecular Sciences*, 20(24), 6338.  
<https://doi.org/10.3390/ijms202463381> Hutchings G, Williams O, Cretoiu D, Ciontea SM. Myometrial interstitial cells and the coordination of myometrial contractility. *J Cell Mol Med*. 2009;13(10):4268-4282. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00894.x
18. Bru-Mercier G, Gullam JE, Thornton S, Blanks AM, Shmygol A. Characterization of the tissue-level Ca<sup>2+</sup> signals in spontaneously contracting human myometrium. *J Cell Mol Med*. 2012 Dec;16(12):2990-3000. doi: 10.1111/j.1582-4934.2012.01626.x. PMID: 22947266; PMCID: PMC4393727.
  19. Di Tommaso S, Cavallotti C, Malvasi A, Vergara D, Rizzello A, De Nuccio F, Tinelli A. A Qualitative and Quantitative Study of the Innervation of the Human Non Pregnant Uterus. *Curr Protein Pept Sci*. 2017;18(2):140-148. doi: 10.2174/1389203717666160330105341. PMID: 27063643.
  20. Darios ES, Seitz B, Watts SW. Smooth muscle pharmacology in the isolated virgin and pregnant rat uterus and cervix. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012 Jun;341(3):587-96. doi: 10.1124/jpet.111.191031. Epub 2012 Feb 24. PMID: 22366660.
  21. Matthew A, Shmygol A, Wray S. Ca<sup>2+</sup> entry, efflux and release in smooth muscle. *Biol Res*. 2004;37(4):617-24. doi: 10.4067/s0716-97602004000400017. PMID: 15709690..
  22. Noble K, Matthew A, Burdyga T, Wray S. A review of recent insights into the role of the sarcoplasmic reticulum and Ca entry in uterine smooth muscle. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2009 May;144 Suppl 1:S11-9. doi: 10.1016/j.ejogrb.2009.02.010. Epub 2009 Mar 13. PMID: 19285773.
  23. Noble D, Borysova L, Wray S, Burdyga T. Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry and depolarization explain the anomalous behaviour of myometrial SR: effects of SERCA inhibition on electrical activity, Ca<sup>2+</sup> and force. *Cell Calcium*. 2014 Sep;56(3):188-94. doi: 10.1016/j.ceca.2014.07.003. Epub 2014 Jul 17. PMID: 25084623; PMCID: PMC4169181.

24. Pehlivanoglu B, Bayrak S, Doğan M. A close look at the contraction and relaxation of the myometrium; the role of calcium. *J Turk Ger Gynecol Assoc.* 2013;14(4):230-234. Published 2013 Dec 1. doi:10.5152/jtgga.2013.67763
25. Floyd R, Wray S. Calcium transporters and signalling in smooth muscles. *Cell Calcium.* 2007 Oct-Nov;42(4-5):467-76. doi: 10.1016/j.ceca.2007.05.011. Epub 2007 Jul 10. PMID: 17624426.
26. Schuh K, Uldrijan S, Telkamp M, Rothlein N, Neyses L. The plasmamembrane calmodulin-dependent calcium pump: a major regulator of nitric oxide synthase I. *J Cell Biol.* 2001 Oct 15;155(2):201-5. doi: 10.1083/jcb.200104131. Epub 2001 Oct 8. PMID: 11591728; PMCID: PMC2198825.
27. T. Kosterin S.O., Babich L.G., Shlykov S.G., Danylovyh Iu.V., Veklich T.O., Mazur Yu.Yu. Biochemical properties and regulation of smooth muscle cell Ca<sup>2+</sup>-transporting systems. K.: Science opinion, 2016. 210p.
28. Michelangeli F, East JM. A diversity of SERCA Ca<sup>2+</sup> pump inhibitors. *Biochem Soc Trans.* 2011 Jun;39(3):789-97. doi: 10.1042/BST0390789. PMID: 21599650.
29. Jaskulska A, Janecka AE, Gach-Janczak K. Thapsigargin-From Traditional Medicine to Anticancer Drug. *Int J Mol Sci.* 2020 Dec 22;22(1):4. doi: 10.3390/ijms22010004. PMID: 33374919; PMCID: PMC7792614.
30. Szewczyk MM, Pande J, Grover AK. Caloxins: a novel class of selective plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump inhibitors obtained using biotechnology. *Pflugers Arch.* 2008 May;456(2):255-66. doi: 10.1007/s00424-007-0348-6. Epub 2007 Oct 2. PMID: 17909851.
31. Veklich TA, Shkrabak AA, Slinchenko NN, Mazur II, Rodik RV, Boyko VI, Kalchenko VI, Kosterin SA. Calix[4]arene C-90 selectively inhibits Ca<sup>2+</sup>,Mg<sup>2+</sup>-ATPase of myometrium cell plasma membrane. *Biochemistry (Mosc).* 2014 May;79(5):417-24. doi: 10.1134/S0006297914050058. PMID: 24954592.

32. Veklich TO, Shkrabak OA, Mazur Iulu, Rodik RV, Kal'chenko VI, Kosterin SO. [Kinetics of inhibitory effect of calix[4]arene C-90 on activity of transporting plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase of smooth muscle cells]. *Ukr Biochem J.* 2014 Sep-Oct;86(5):37-46. Ukrainian. PMID: 25816586.
33. Veklich TO. The inhibitory influence of calix[4]Arene of C-90 on the activity of  $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ -ATPases in plasma membrane and sarcoplasmic reticulum in myometrium cells. *Ukr Biochem J.* 2016 Mar-Apr;88(2):5-15. doi: 10.15407/ubj88.02.005. PMID: 29227596.
34. Kosterin S.O., Kalchenko V.I., Veclich T.O., Babich L.G., Shlykov S.G. Calixarenes as modulators of ATP-hydrilizing systems of smooth muscles. Kyiv. Naukova Dumka. 2019.
35. Tsymbalyuk, O.V., Kosterin, S.O., 2013. The effect of calixarene C-90 on the contractile activity of myometrium smooth muscles of rats. *Studia Biologica* 7, 3, 5-20.
36. S. Kosterin, O. Tsymbalyuk, O. Holden Multiparameter analysis of mechanokinetics of the contractile response of smooth muscles. *Series on Biomechanics, Vol.35 No.1 (2021),14-30*
37. Mollard P., Mironneau J., Amedee T., Mironneau C. Electrophysiological characterization of single pregnant rat myometrial cells in short-term primary culture. *Am. J. Physiol: Cell Physiology.* 1986; 19(1): C47-C54.
38. Shmigol AV, Eisner DA, Wray S. The role of the sarcoplasmic reticulum as a  $\text{Ca}^{2+}$  sink in rat uterine smooth muscle cells. *J Physiol.* 1999;520 Pt 1(Pt 1):153-163. doi:10.1111/j.1469-7793.1999.00153.x
39. Taggart MJ, Wray S. Contribution of sarcoplasmic reticular calcium to smooth muscle contractile activation: gestational dependence in isolated rat uterus. *J Physiol.* 1998;511 ( Pt 1)(Pt 1):133-144. doi:10.1111/j.1469-7793.1998.133bi.x

40. Gravina FS, Parkington HC, Kerr KP, et al. Role of mitochondria in contraction and pacemaking in the mouse uterus. *Br J Pharmacol*. 2010;161(6):1375-1390. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00949.x
41. Tribe RM, Moriarty P, Poston L. Calcium homeostatic pathways change with gestation in human myometrium. *Biol Reprod*. 2000 Sep;63(3):748-55. doi: 10.1095/biolreprod63.3.748. PMID: 10952916.
42. Brainard AM, Korovkina VP, England SK. Potassium channels and uterine function. *Semin Cell Dev Biol*. 2007;18(3):332-339.
43. Цимбалюк О.В., Костерін С.О. Вплив каліксарену С-90 на скоротливу активність гладеньких м'язів міометрія щурів. *Studia Biologica*. 2013; 7(2): 87-98.
44. Trujillo MM, Ausina P, Savineau JP, Marthan R, Strippoli G, Advenier C, Pinto FM, Candenas ML. Cellular mechanisms involved in iso-osmotic high  $K^+$  solutions-induced contraction of the estrogen-primed rat myometrium. *Life Sci*. 2000;66(25):2441-53. doi: 10.1016/s0024-3205(00)80004-1. PMID: 10894087.
45. Chatterjee, S., Gangula, P. R., Dong, Y. L., & Yallampalli, C. (1996). Immunocytochemical localization of nitric oxide synthase-III in reproductive organs of female rats during the oestrous cycle. *The Histochemical journal*, 28(10), 715–723. <https://doi.org/10.1007/BF02409009>
46. Dong, Y. L., Gangula, P. R., & Yallampalli, C. (1996). Nitric oxide synthase isoforms in the rat uterus: differential regulation during pregnancy and labour. *Journal of reproduction and fertility*, 107(2), 249–254. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1070249>
47. Aaronson, P. I., Sarwar, U., Gin, S., Rockenbauch, U., Connolly, M., Tillet, A., Watson, S., Liu, B., & Tribe, R. M. (2006). A role for voltage-gated, but not  $Ca^{2+}$ -activated,  $K^+$  channels in regulating spontaneous contractile activity in myometrium from virgin and pregnant rats. *British journal of pharmacology*, 147(7), 815–824. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706644>

48. Rahbek, M., Nazemi, S., Odum, L., Gupta, S., Poulsen, S. S., Hay-Schmidt, A., & Klaerke, D. A. (2014). Expression of the small conductance  $\text{Ca}^{2+}$  - activated potassium channel subtype 3 (SK3) in rat uterus after stimulation with  $17\beta$ -estradiol. *PloS one*, 9(2), e87652. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087652>
49. Brown, A., Cornwell, T., Korniyenko, I., Solodushko, V., Bond, C. T., Adelman, J. P., & Taylor, M. S. (2007). Myometrial expression of small conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels depresses phasic uterine contraction. *American journal of physiology. Cell physiology*, 292(2), C832–C840. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00268.2006>