

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.

**ДОСЛІДЖЕННЯ ЗАКОНОМІРНОСТЕЙ І МЕХАНІЗМІВ ВПЛИВУ
КАЛІКСАРЕНУ С-956 НА СКОРОЧУВАЛЬНУ АКТИВНІСТЬ
МІОМЕТРІЯ**

Випускна кваліфікаційна робота магістра

Студента спеціальності

16.162 «Біотехнологія»

ОП «Високі технології (Біотехнологія)»

Гурського Леоніда Анатолійовича

Науковий керівник

професор кафедри молекулярної

біотехнології та біоінформатики

д.б.н. Цимбалюк Ольга Володимирівна

Оцінка захисту роботи

Київ – 2024 р.

АНОТАЦІЯ

Дипломна робота магістра: 48 сторінок, 12 рисунків, 17 джерел літератури.

У роботі досліджено вплив макроциклічної сполуки калікс[4]арену С-956 на гомеостаз іонів Ca^{2+} у міоцитах матки та скорочувальну активність багатоклітинних м'язових препаратів міометрія. Встановлено, що калікс[4]арен С-956 селективно та з високою афінністю інгібує активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази плазматичної мембрани, індукує підвищення внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} та спричинює активацію спонтанної скорочувальної активності гладеньком'язових препаратів. Виявлено, що ефекти калікс[4]арену С-956 на спонтанну скорочувальну активність міометрія є суттєво більш вираженими в умовах блокування синтезу NO, що може бути пояснено структурно-функціональною взаємодією ензимів NO-синтази і Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази плазматичної мембрани.

Ключові слова: ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВІ КЛІТИНИ, КАЛІКС[4]АРЕНИ, МІОМЕТРІЙ, ПЛАЗМАТИЧНА МЕМБРАНА, Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаза, СКОРОЧУВАЛЬНА АКТИВНІСТЬ.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- Ca²⁺ — іон кальцію
- ICCs — міжклітинні клітини Кахаля (interstitial cells of Cajal)
- MLC — легкий ланцюг міозину (myosin light chain)
- RhoA/Rho кінза — сигнальний шлях, що регулює сенсibiliзацію кальцію і інгібує MLC фосфатазу
- CaMg—АТФази - ферменти, що транспортують Ca²⁺ і Mg²⁺ через мембрани (Ca²⁺ Mg²⁺ -АТФази)
- PKC — протеїнкіназа C (protein kinase C)
- NO — оксид азоту (nitric oxide)
- cGMP — циклічний гуанозинмонофосфат (cyclic guanosine monophosphate)
- MAPK — мітоген-активована протеїнкіназа (mitogen-activated protein kinase)
- ER — ендоплазматичний ретикулум (endoplasmic reticulum)
- IP₃ — інозитол 1,4,5трифосфат (inositol triphosphate)
- SERCA — Ca²⁺ -АТФаза саркоплазматичного ретикулуму (sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺ -ATPase)
- RyR — рiанодинові рецептори (ryanodine receptor)
- PMCA — Ca²⁺ -АТФаза плазматичної мембрани (plasma membrane Ca²⁺ -ATPase)
- NCX — натрієво-кальцієвий обмінник (sodium-calcium exchanger)
- Na⁺ /K⁺ -АТФаза — натрієво-калієва АТФаза (sodium-potassium ATPase)
- HIF — гіпоксiєно-індукований фактор (hypoxia-inducible factor)
- COX — циклооксигеназа (cyclooxygenase)
- CaCCs — кальцій-активовані хлоридні канали (calcium-activated chloride channels)
- ATP — аденозинтрифосфат (adenosine triphosphate)
- ADP — аденозиндифосфат (adenosine diphosphate)

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1	6
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	6
1.1 Загальні уявлення про міометрій.....	6
1.1.1 Сигнальні шляхи, що регулюють скорочення міометрія	7
1.2 Внутрішньоклітинний гомеостаз Ca ²⁺	8
1.3 Фізіологія гладких м'язів.....	9
1.3.1 Механізм скорочення гладких м'язів	10
1.3.2 Розслаблення гладких м'язів.....	11
1.3.3 Класифікація механізмів активації Ca ²⁺ у ГМК.....	11
1.3.4 Механізми активації і модулювання Ca ²⁺ сигналізації	12
1.3.5 Регуляція скорочень гладеньких м'язів.....	12
1.3.6 Хвилі Потенціалу Дії.....	13
1.3.7 Роль Іонних Каналів	14
1.3.8 Са-АТФаза плазматичної мембрани (PMCA).....	14
1.3.9 Натрієво-кальцієвий обмінник (NCX).....	15
1.3.10 Na, K-АТФаза.....	15
1.3.12 Взаємодії між SR та плазматичною мембраною	16
1.4 Характеристики та функції Ca ²⁺ /Mg ²⁺ АТФази	17
1.4.1 Класи Ca ²⁺ /Mg ²⁺ АТФаз.....	17
1.4.2 Структурна організація	18
1.4.3 Цикл транспорту іонів.....	18
1.5 Загальні уявлення про каліксарен С-956	19
1.5.1 Синтез каліксарену С-956	19
1.5.2 Біологічні та фармакологічні властивості.....	20
1.5.3 Токсичність.....	21
1.5.4 Застосування.....	21
РОЗДІЛ 2	22
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	22

РОЗДІЛ 3	26
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	26
3.1. Закономірності впливу калікс[4]арену С-956 на спонтанну скорочувальну активність міометрія щурів	26
3.2. Механокінетичні ефекти дії калікс[4]арену С-956 на спонтанну скорочувальну активність міометрія щурів за блокування синтаз оксиду азоту	32
3.3. Модуляція калікс[4]ареном С-956 викликаних гіперкалієвою деполаризацією скорочувальної активності міометрія щурів.....	39
3.4. Модуляція калікс[4]ареном С-956 викликаних окситоцином скорочувальної активності міометрія щурів	42
ВИСНОВКИ.....	46
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	48

ВСТУП

Метою даної роботи є дослідження закономірностей і механізмів впливу каліксарену С-956 на скорочувальну активність міометрія. Зокрема, дослідження спрямоване на вивчення впливу каліксарену С-956 на спонтанну та викликану скорочувальну активність міометрія щурів, а також на визначення його ефективності як можливого утеротоніка.

Актуальність цього дослідження обумовлена необхідністю пошуку нових ефективних засобів для регулювання скорочувальної активності матки, особливо у контексті управління пологовою діяльністю та лікування ускладнень, пов'язаних з дисфункцією міометрія. Наразі існує потреба у нових фармакологічних агентах, які можуть специфічно впливати на скорочувальні процеси в міометрії, з мінімальними побічними ефектами.

Каліксарени, завдяки своїм унікальним хімічним властивостям, відкривають нові можливості для розробки таких засобів. Каліксарен С-956 вже продемонстрував свою ефективність як інгібітор Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани, що дозволяє припустити його потенційне використання для регуляції скорочувальної активності гладеньких м'язів.

Перспективи цього дослідження включають можливість подальшої розробки каліксарену С-956 як утеротоніка, що може знайти застосування в клінічній практиці для стимуляції пологової діяльності та лікування інших патологій, пов'язаних з гіпотонією або атонією матки. Також результати цього дослідження можуть стати основою для подальшого вивчення механізмів дії каліксаренів та їх застосування у медицині.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Загальні уявлення про міометрій

Міометрій – це м'язовий шар стінки матки, який відіграє ключову роль у процесі пологів. Механізми його скорочень, що призводять до народження дитини, є складними і багатоетапними [1].

Іонні канали відіграють вирішальну роль у регуляції скорочувальної активності міометрія. Вони забезпечують потік іонів через клітинні мембрани, що створює електричні сигнали, необхідні для ініціації скорочень. Різні типи іонних каналів, включаючи кальцієві, калієві та хлоридні канали, беруть участь у цьому процесі.

Кальцієві канали є основними регуляторами внутрішньоклітинного рівня кальцію, що визначає силу та тривалість скорочень міометрія[3]. Відкриття цих каналів під дією різних стимулів, таких як гормони та нейромедіатори, забезпечує надходження кальцію в клітини, що призводить до активації скорочувальних білків[4].

Калієві канали регулюють мембранний потенціал міометріальних клітин та впливають на їх збудливість[4]. Вони забезпечують відтік калію з клітин, що сприяє реполяризації мембрани після скорочення та відновленню готовності до наступного скорочення.

Хлоридні канали, зокрема кальцій-активовані хлоридні канали (CaCCs), беруть участь у генерації електричних сигналів, необхідних для скорочень міометрія. Вони забезпечують вихід хлоридів з клітин, що сприяє деполяризації мембрани та ініціації скорочень[3].

1.1.1 Сигнальні шляхи, що регулюють скорочення міометрія

Скорочувальна активність міометрія регулюється різними сигнальними шляхами, які передають інформацію від зовнішніх стимулів до внутрішньоклітинних ефекторів. Основними компонентами цих шляхів є рецептори на поверхні клітин, вторинні месенджери та протеїнкінази.

Окситоцинові рецептори є основними рецепторами, які регулюють скорочення міометрія під час пологів. Вони активуються окситоцином, що призводить до активації внутрішньоклітинних сигнальних шляхів та підвищення рівня кальцію в клітинах[5].

Протеїнкінази, такі як протеїнкіназа С (PKC) та мітоген-активована протеїнкіназа (МАРК), беруть участь у регуляції скорочувальної активності міометрія. Вони фосфорилують різні білки, що змінює їх активність та забезпечує адаптацію клітин до змінних умов під час пологів[8].

Ендотелій, що вистилає внутрішню поверхню судин, відіграє важливу роль у регуляції скорочувальної активності міометрія через виділення різних вазоактивних речовин, таких як оксид азоту (NO), ендотелін та простагліцилін[4].

Оксид азоту (NO) є потужним вазодилататором, який також може впливати на скорочення міометрія. NO синтезується ендотеліальними клітинами і дифундує в сусідні м'язові клітини, де активує гуанілатциклазу та збільшує рівень циклічного гуанозинмонофосфату (cGMP) [8]. Це призводить до зниження внутрішньоклітинного рівня кальцію та релаксації міометріальних клітин.

Ендотелін є потужним вазоконстриктором, який також може викликати скорочення міометрія. Він синтезується ендотеліальними клітинами і діє через специфічні рецептори на поверхні міометріальних клітин, що призводить до підвищення внутрішньоклітинного рівня кальцію і активації скорочувальних механізмів[7].

Простагландини є важливими регуляторами скорочувальної активності міометрія. Вони синтезуються з арахідонової кислоти під дією циклооксигенази (COX) і можуть викликати як скорочення, так і релаксацію міометрія в залежності від їх типу і концентрації[7].

Гіпоксія, або зниження рівня кисню в тканинах, може суттєво впливати на скорочення міометрія. Гіпоксія може викликати гіпоксійно-індуковане підвищення сили скорочення (HIFI), яке допомагає підтримувати скорочення під час пологів[8]. Гіпоксія активує різні молекулярні механізми, що дозволяють міометрію адаптуватися до зниженого рівня кисню. До них відносяться активація гіпоксійно-індукованого фактора (HIF), збільшення вироблення аденозину та простагландинів, а також активація специфічних іонних каналів, що сприяють підвищенню внутрішньоклітинного рівня кальцію.

Основна частина стінки матки складається з гладкої мускулатури, організованої в пучки, які, в свою чергу, організовані у фасцикулати. Під час пологів матка піддається фазовим скороченням, які пом'якшують і розширюють шийку матки, а потім виштовхують плід[2]. Ці процеси відомі як латентна, активна і друга стадії пологів відповідно. Кожна стадія супроводжується періодичним збільшенням внутрішньоматкового тиску, але друга стадія зазвичай супроводжується добровільними або мимовільними зусиллями матері щодо виштовхування плода[1].

1.2 Внутрішньоклітинний гомеостаз Ca^{2+}

Внутрішньоклітинний гомеостаз кальцію є ключовим для функціонування клітин. Системи транспорту кальцію в плазматичній мембрані, мітохондріях та ендо(сарко)плазматичному ретикулумі відіграють важливу роль у підтримці цього гомеостазу[3].

Ca^{2+} -АТФази плазматичної мембрани є високоафінними ензимними системами, які взаємодіють з Ca^{2+} з K_m нижче 1 мкМ, але мають низьку

загальну транспортну здатність. Ці ензими важливі для тонкого регулювання кальцію у клітинах, зокрема у серцевих клітинах, де $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмінник може працювати паралельно як масивна система для виведення Ca^{2+} [7].

Регуляція Ca^{2+} -помпи саркоплазматичного ретикулуму гормонами є важливим аспектом гомеостазу кальцію. Фосфорилування фосфоламбану кіназами збільшує швидкість гідролізу АТФ і транспорту кальцію, що сприяє активації ензиму[8]. Ca^{2+} -АТФаза ендоплазматичного ретикулуму, як і саркоплазматичного ретикулуму, важливий для накопичення Ca^{2+} з навколишнього середовища.

Сьогодні вважається, що ендо(сарко)плазматичний ретикулум регулює цитозольний Ca^{2+} до рівнів спокою від 100 до 200 нМ і робить це швидко. Мітохондрії, як вважається, відіграють другорядну роль або взагалі не беруть участі в контролі цитозольного Ca^{2+} , але здатні накопичувати великі кількості Ca^{2+} завдяки своєму потенціалу коакумулювати фосфат і утворювати відкладення гідроксиапатиту в матричному просторі[3]. Одним з ключових білків, що зв'язують кальцій у саркоплазматичному ретикулумі, є кальсеквестрин. Цей білок, знайдений у термінальних цистернах саркоплазматичного ретикулуму, зв'язує великі кількості Ca^{2+} з низькою афінністю. Це важливо для його мобілізації у відповідь на деполяризацію. Кальсеквестрин має здатність зв'язувати близько 40-50 молекул Ca^{2+} на одну молекулу білка, що робить його ефективним сховищем кальцію в клітинах.

1.3 Фізіологія гладких м'язів

Гладкі м'язи відрізняються від серцевих і скелетних м'язів відсутністю стриженого вигляду і не підпорядковуються свідомому контролю. Вони вистилають стінки органів і трубчастих структур тіла (кровоносні судини, шлунок, кишечник, сечовий міхур, дихальні шляхи, матка і кавернозні синуси статевих органів) [4]. Також пучки гладких м'язових клітин прикріплені до волосся шкіри та до райдужної оболонки та кришталика ока.

Контракційна активність ініціюється взаємодією Ca^{2+} з кальмодуліном, що стимулює фосфорилування легкого ланцюга міозину (MLC). Ca^{2+} сенсibiliзація регулюється шляхом RhoA/Rho кіназного шляху, який інгібує дефосфорилування MLC, підтримуючи генерування сили. Видалення Ca^{2+} з цитозолу і стимуляція MLC фосфатази ініціюють процес розслаблення гладких м'язів[5].

1.3.1 Механізм скорочення гладких м'язів

Ca^{2+} -залежне скорочення гладких м'язів: Скорочення гладких м'язів ініціюється змінами в товстих філаментах, тоді як у посмугованих м'язах Ca^{2+} регулює скорочення через зміни в тонких філаментах[6]. У відповідь на специфічні стимули концентрація внутрішньоклітинного Ca^{2+} збільшується, і цей активуючий Ca^{2+} зв'язується з кальмодуліном[7]. Цей комплекс активує MLC кіназу для фосфорилування легкого ланцюга міозину[6].

Внутрішньоклітинна концентрація Ca^{2+} збільшується через його вивільнення з внутрішньоклітинних сховищ (саркоплазматичного ретикулуму) та через вхід із позаклітинного простору через Ca^{2+} канали[8].

Фосфатаза MLC (міозин-фосфатаза) видаляє високоеенергетичний фосфат з легкого ланцюга міозину, сприяючи розслабленню гладких м'язів. Rho кіназа фосфорилує міозин-зв'язуючу субодиницю MLC фосфатази, інгібуючи її активність і тим самим підтримуючи фосфорильований стан легкого ланцюга міозину, що сприяє скороченню. Фармакологічні інгібітори Rho кінazi, такі як фасудил і Y-27632, блокують її активність, конкуруючи з місцем зв'язування АТФ на ферменті[7,8].

1.3.2 Розслаблення гладких м'язів

Відбувається як результат видалення контрактильного стимулу або дії речовин, які стимулюють інгібування контрактильного механізму (наприклад, атріальний натрійуретичний фактор є вазодилататором)[4].

Механізми зниження Ca^{2+} : Включають захоплення Ca^{2+} у саркоплазматичний ретикулум або його видалення з клітини через плазматичну мембрану. Са, Mg-АТФази на саркоплазматичному ретикулумі та плазматичній мембрані сприяють зниженню концентрації Ca^{2+} . Ванадат, тапсігаргін та циклопіазонова кислота інгібують Са, Mg-АТФази саркоплазматичного ретикулуму, що знижує рівень внутрішньоклітинного Ca^{2+} [3]. Na^+/Ca^{2+} обмінники на плазматичній мембрані також сприяють зниженню внутрішньоклітинного Ca^{2+} і можуть бути інгібовані амilorидом та хінідином.

1.3.3 Класифікація механізмів активації Ca^{2+} у ГМК

Механізм А:

Активація через деполяризацію мембрани: Цей механізм включає відкриття L-тип каналів, залежних від напруги (VOCs), що дозволяють зовнішньому Ca^{2+} проникати в клітину для ініціації скорочення. Приклади тканин з таким механізмом включають *vas deferens*, сечовий міхур і матку[4].

Вас деференс: Симпатичні нейрони виділяють АТФ і норадреналін (NA), які активують P2X1 рецептори і $\alpha 1$ -адренорецептори відповідно, викликаючи вхід Ca^{2+} і генерацію потенціалів збудження з'єднань (EJPs). Це спричиняє швидкі перистальтичні скорочення.

Механізм В:

У багатьох тонічних ГМК (судинні, дихальні шляхи, кавернозні тіла) генеруються періодичні імпульси Ca^{2+} . Мембранна деполяризація допомагає синхронізувати осцилятори, але не є первинним механізмом активації. Під час спорожнення сечового міхура нейромедіатори викликають серії

потенціалів дії, керованих мембранним осцилятором, що включає Ca^{2+} та K^{+} канали. Основні компоненти осцилятора - це канали, що послідовно деполяризують та гіперполяризують мембрану[4].

Механізм С:

Пейсмекерні клітини, такі як міжклітинні клітини Кахаля (ICCs), генерують цитозольні осцилятори Ca^{2+} . Приклади включають шлунково-кишкові та уретральні ГМК.

Так, у матці працює ендогенний мембранний осцилятор: Генерує періодичні деполяризації, викликаючи вхід Ca^{2+} і подальше вивільнення Ca^{2+} через RYRs. Це забезпечує часті та сильні скорочення під час пологів[11].

1.3.4 Механізми активації і модулювання Ca^{2+} сигналізації

Модуляція через нейромедіатори та гормони:

Ацетилхолін (ACh): Активація мускаринових рецепторів викликає вивільнення Ca^{2+} з ЕР через InsP_3 рецептори.

Серотонін (5-НТ): Активація 5-НТ рецепторів викликає вивільнення Ca^{2+} з ЕР.

Норадреналін (NA): Активація α_1 -адренорецепторів сприяє вивільненню Ca^{2+} з ЕР.

Ендотелін-1 (ET-1): Викликає вивільнення Ca^{2+} через активацію ЕТА рецепторів, збільшуючи контрактильну активність.

Оксид азоту (NO): Викликає релаксацію через підвищення рівнів циклічного GMP, що зменшує внутрішньоклітинний Ca^{2+} [11].

1.3.5 Регуляція скорочень гладеньких м'язів

Скорочення гладких м'язів регулюється змінами внутрішньоклітинного Ca. Транспортери кальцію, включаючи PMCA та SERCA, відіграють ключову

роль у підтримці низького рівня Са у стані спокою, підвищенні Са для скорочення та відновленні Са для релаксації[7,8].

Вхід кальцію у вісцеральні гладкі м'язи контролюється мембранним потенціалом, головним чином через L-тип Са каналів. Ці канали, чутливі до дигідропіридину, є основними, а часто і єдиними типами Са каналів, що експресуються у багатьох гладких м'язах. Вони постачають більшу частину Са, необхідного для активації міофіламентів, і є мішенню для фармацевтичних втручань, спрямованих на лікування, наприклад, гіпертонії та передчасних пологів[9].

Останнім часом були надані дані про експресію Са каналів Т-типу у різних гладких м'язах, таких як матка, сім'явивідні протоки, уретра, сечовий міхур і судинна тканина. Функціональна роль Са каналів Т-типу в гладких м'язах залишається не до кінця ясною[8].

1.3.6 Хвилі Потенціалу Дії

Типи Потенціалу Дії: В людському міометрії описано два типи хвиль потенціалу дії: плато-тип та шпильковий тип. Ці типи хвиль мають різні характеристики та впливають на скорочення по-різному.

Плато-Тип: Має швидкий початок, за яким слідує тривала фаза деполяризації. Цей тип потенціалу дії забезпечує гладке, монофазне скорочення, яке триває протягом всієї тривалості потенціалу дії. Плато-тип потенціалу дії підтримує тривалу деполяризацію між -30 та -20 мВ, що триває приблизно одну хвилину[5,6].

Шпильковий Тип: Складається з серії коротких піків, які часто групуються в сплески. Цей тип потенціалу дії викликає рвані, багатокомпонентні скорочення. Шпилькові потенціали часто супроводжуються групами піків, що створює багатофазні скорочення[5,6].

1.3.7 Роль Іонних Каналів

Хлоридні Канали: Значна роль хлоридних каналів у формуванні хвиль потенціалу дії, особливо плато-типу. Вони активуються в присутності Ca^{2+} і можуть сприяти тривалому збереженню деполяризації мембрани. У міометрії людини ці канали присутні в субпопуляції клітин і можуть значно впливати на частоту спонтанних скорочень[4].

Кальцієві Канали є важливими для входу Ca^{2+} під час потенціалу дії, який підтримує високий рівень АТФаза Ca^{2+} АТФаза, необхідний для скорочення. Існують два типи кальцієвих каналів у міометрії: L-тип і T-тип[3].

Канали L-типу : Ці канали є основними шляхами для входу Ca^{2+} у міометрії і регулюються багатьма факторами, включаючи гормони. Під час тривалої деполяризації вони підтримують постійний потік Ca^{2+} , що забезпечує підтримку скорочення.

Канали T-типу : Ці канали активуються при нижчих напругах і можуть бути залучені до генерації повторюваних шпилькових потенціалів дії. Вони менш тривалі, але можуть впливати на ініціацію скорочення[10].

1.3.8 Са-АТФаза плазматичної мембрани (PMCA)

PMCA є P-типом Са-АТФази, що регулюється кальмодуліном. Порівняно з обмінником Na/Ca, PMCA має відносно низьку здатність до транспорту Са. Ідентифіковано чотири ізоформи PMCA (1–4) з 80–90% гомології амінокислотних послідовностей і 10 трансмембранними ділянками[12]. Послідовності вирівнювання показують, що структура PMCA схожа на структуру SR Са-АТФази, з тією різницею, що остання має значно менший С-кінцевий хвіст. С-кінцевий хвіст відповідає за регуляцію PMCA кальмодуліном. Різні ізоформи PMCA мають різну базальну активність, афінність до кальмодуліну та швидкість активації[7]. У гладких м'язах є

свідчення, що активність РМСА регулюється сGMP та РКС, а також кальмодуліном.

1.3.9 Натрієво-кальцієвий обмінник (NCX)

Обмінник Na/Ca є мембранним електрогенним антипортером, присутнім у більшості типів клітин. Він використовує градієнт Na, створений Na, K-АТФазою, для виведення Ca. Під час кожного циклу один іон Ca обмінюється на три іони Na, тому він електрогенний. Реакція обмінника може відбуватися в будь-якому напрямку, залежно від відносних концентрацій АТФазаNa]. Якщо позаклітинний Na значно знижений (30 мМ), відбувається ступінчасте підвищення АТФазаCaАТФаза, оскільки обмінник змінює напрямок і Ca входить у клітину[9]. Пряме інгібування Na, K-АТФази з допомогою оуабайну також викликає підвищення АТФазаCaАТФаза в гладких м'язах, що свідчить про локальне підвищення АТФазаNaАТФаза і наступний вплив на обмінник Na/Ca[8].

1.3.10 Na, K-АТФаза

Цей фермент підтримує високу внутрішньоклітинну концентрацію K і низьку Na, що є життєво важливим для функціонування клітин. Як і РМСА та SR Ca-АТФаза, Na, K-АТФаза є Р-типом АТФази з 10 трансмембранними ділянками і має близьку гомологію з SR Ca-АТФазою, більше ніж з РМСА. Хоча Na, K-АТФаза класично описується як така, що має дві домени, α та β , третій трансмембранний аксесорний білок був ідентифікований і класифікований як γ субодиниця і є членом великої родини одноланцюгових мембранних білків, деякі з яких функціонально взаємодіють з Na, K-АТФазою і називаються білками FXYD[8]. Експресія ізоформ Na, K-АТФази залежить від виду та тканини і має різну кінетику для іонного транспорту, чутливості до Ca та афінності до оуабайну. Специфічна регуляція експресії

ізоформ Na, K-АТФази α була продемонстрована у багатьох гладких м'язах, включаючи матку, тонкий кишечник, легені та сечовий міхур[7].

1.3.11 Вивільнення та захоплення Ca в SR

Саркоплазматичний ретикулум (SR) відіграє важливу роль у сигнальних процесах кальцію в гладких м'язах, з рецепторами IP₃ та ріанодиновими рецепторами (RyR), що опосередковують вивільнення Ca. SERCA, ще одна P-тип Ca-АТФаза, активно транспортує Ca в SR[6]. Здатність SR зберігати Ca важлива для модуляції рівня цитозольного Ca та підтримки функції гладких м'язів. SERCA допомагає знижувати рівень цитозольного Ca, сприяючи релаксації гладких м'язів. Він працює спільно з механізмами виведення Ca через плазматичну мембрану для регулювання сигналів Ca. Утримування Ca в SR дозволяє SR функціонувати як резервуар для Ca, який можна швидко мобілізувати під час стимуляції. Взаємодії між SR та плазматичною мембраною, особливо в мембранних мікродоменах, є важливими для ефективного транспорту та сигналізації Ca[8].

1.3.12 Взаємодії між SR та плазматичною мембраною

У багатьох гладких м'язах виявлені сфінголіпідні та холестеринозбагачені домени, відомі як рафти, або кавеоли, коли вони містять білок кавеолін, розташовані поблизу периферійного SR[8]. Просторове поєднання в мікродоменах може бути корисним для підтримання суворої регуляції гомеостазу кальцію та сигналізації в гладких м'язах. Кавеоли ідентифікуються як місця скупчення багатьох білків, залучених у сигнальні процеси кальцію в гладких м'язах. Кавеоли зазвичай мають розмір 50–90 нм і значно збільшують площу поверхні клітини (приблизно на 70%). Вони також можуть поєднувати численні сигнальні білки в обмеженій зоні, іноді називаючи її сигналомом. Серед найбільш досліджених сигнальних

молекул є Src, Ras та EGFR (рецептор епідермального фактора росту), які всі функціонально поєднані у кавеолах[8].

1.4 Характеристики та функції Ca²⁺/Mg²⁺ АТФази

Ca²⁺/Mg²⁺ АТФаза є важливим ферментом, що належить до родини Р-типів АТФаз. Ці ферменти використовують енергію, що виділяється під час гідролізу АТФ, для транспорту іонів через мембрани клітин. Ca²⁺/Mg²⁺ АТФаза відіграє критичну роль у підтримці гомеостазу іонів кальцію та магнію в клітинах[12].

1.4.1 Класи Ca²⁺/Mg²⁺ АТФаз

SERCA (Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-АТФаза): В основному зустрічається в м'язових клітинах і забезпечує повернення Ca²⁺ до саркоплазматичного ретикулуму після скорочення[12].

PMCA (Plasma Membrane Ca²⁺-АТФаза): Розташовані на плазматичній мембрані, виводить Ca²⁺ з клітини, регулюючи його концентрацію в цитоплазмі[12].

SPCA (Secretory Pathway Ca²⁺-АТФаза): Розташовані у мембранах секреторних шляхів, забезпечує накопичення Ca²⁺ в органелах секреторного шляху[12].

У м'язових клітинах, особливо в скелетних і серцевих, Ca²⁺ відіграє ключову роль у скороченні м'язів. Коли м'яз отримує сигнал на скорочення, Ca²⁺ вивільняється з саркоплазматичного ретикулуму в цитоплазму, де він зв'язується з тропоніном, що призводить до зміни конформації тропоміозину і відкриття активних сайтів на актині для зв'язування з міозином. Після скорочення, Ca²⁺ швидко повертається в саркоплазматичний ретикулум за допомогою SERCA, що забезпечує релаксацію м'яза[13].

Ca^{2+} також є важливим вторинним месенджером у багатьох клітинних сигнальних шляхах. Наприклад, при активації рецепторів, що зв'язані з G-білками, утворюється інозитол 1,4,5-трифосфат (IP3), який викликає вивільнення Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулуму[13,14]. Це підвищення концентрації Ca^{2+} в цитоплазмі може активувати різні ферменти, включаючи протеїнкінази, які регулюють багато клітинних процесів, таких як метаболізм, секреція і експресія генів.

1.4.2 Структурна організація

$\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ АТФаза складається з кількох функціональних доменів, кожен з яких виконує специфічну роль у транспортуванні іонів[14].

Цитоплазматичний домен: Містить сайт зв'язування АТФ і регуляторні субодиниці. Тут відбувається гідроліз АТФ, що забезпечує енергію для транспорту.

Трансмембранний домен: Складається з кількох гідрофобних сегментів, які формують канал для проходження іонів через мембрану.

Іонний сайт зв'язування: Локалізується в трансмембранному домені, де відбувається зв'язування Ca^{2+} або Mg^{2+} [14].

1.4.3 Цикл транспорту іонів

1. Ініціація: Фермент зв'язує Ca^{2+} на цитоплазматичному боці мембрани.

2. Гідроліз АТФ: АТФ зв'язується з ферментом і гідролізується до АДФ і фосфату, що призводить до фосфорилування ферменту і зміни його конформації.

3. Транспортування: Зміна конформації переносить Ca^{2+} через мембрану.

4. Вивільнення іонів: Ca^{2+} вивільняється на протилежному боці мембрани.

5. Дефосфорилування: Фермент піддається дефосфорилуванню і повертається до початкової конформації, готовий до нового циклу[14].

1.5 Загальні уявлення про каліксарен С-956

Каліксарени є макроциклічними поліфенольними сполуками, які можуть вибірково впливати на транспорт іонів у субклітинних мембранних структурах. Останніми роками було встановлено, що каліксарени, такі як С-90 і С-956, ефективно інгібують активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаз плазматичної мембрани та саркоплазматичного ретикулуму в гладеньких м'язах[15].

Каліксарен С-956 є біологічно та фармакологічно активною сполукою з формулою 5,11,17,23-тетра(трифтор)метил(фенілсульфоніліміно)-метиламіно-25,27-діоктилокси-26,28-дипропоксикаліксАТФаза4]арен, яка виявляє властивість ефективного специфічного інгібітора Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазної активності плазматичної мембрани (ПМ) клітин міомерія. Сполука має високу селективність до Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази ПМ, не впливаючи на інші види АТФаз[16].

1.5.1 Синтез каліксарену С-956

Синтез каліксарену С-956 включає кілька стадій:

1. Алкілування: Взаємодія 5,11,17,23-тетра-трет-бутил-25,27-дігидрокси-26,28-діоктилоксикаліксАТФаза4]арену з пропілбромідом у суперосновному середовищі.

2. Нітрування: Нітрування отриманої сполуки надлишком азотної та оцтової кислот.

3.Відновлення: Відновлення 5,11,17,23-тетранітро-25,27-діоктилокси-26,28-дипропоксикаліксАТФаза4]арену гідразин-гідратом над нікелем Ренея до 5,11,17,23-тетрааміно-25,27-діоктилокси-26,28-дипропоксикаліксАТФаза4]арену.

4. Електрофільна реакція: Реакція з N-сульфонілімідоїлхлоридом, що приводить до утворення каліксарену С-956[16].

1.5.2 Біологічні та фармакологічні властивості

Каліксарен С-956 складається з макроциклічного поліфенольного кільця, яке містить сульфонамідні групи та аліфатичні ланцюги, що сприяє його взаємодії з гідрофобними частинами мембран і проникненню в клітини[14].

Каліксарен С-956 виявляє ефективне селективне інгібування Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ клітин міометрія. Він не впливає на активність Na^{+} , K^{+} -АТРази та Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани, що підтверджує його високу специфічність до Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази[17].

Калікс[4]арен С-956 є ефективним інгібітором H^{+} - Ca^{2+} -обмінника в мітохондріях гладеньких м'язів. Він виявляє концентраційно-залежний інгібуючий вплив, знижуючи початкову швидкість V_0 та збільшуючи характеристичний час $\tau_{1/2}$ ΔpH -індукованого виходу Ca^{2+} [16].

Висока чутливість H^{+} - Ca^{2+} -обмінника та Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази до інгібуючого впливу С-956 може вказувати на специфічне націлення калікс[4]арену на H^{+} -транспортний компонент цих систем.

Каліксарен С-956 має власну флуоресценцію в синьо-фіолетовій області спектру. Інтенсивність флуоресценції зростає лінійно зі збільшенням концентрації в безклітинному середовищі[15].

Взаємодія з міоцитами змінює інтенсивність флуоресценції: спочатку збільшується, потім зменшується залежно від концентрації. Додавання

детергенту дигітоніну не впливало на флуоресценцію, що свідчить про проникнення C-956 у цитоплазму.

Каліксарен C-956 проникає через плазматичну мембрану міоцитів, колокалізується з мітохондріями і пригнічує H^+ - Ca^{2+} -обмінник внутрішньої мембрани мітохондрій без впливу на енергозалежне накопичення Ca^{2+} органелами.

50 μ M C-956 значно стимулює активність NO-синтази в ізольованих мітохондріях і пригнічує функціонування електрон-транспортного ланцюга шляхом інгібування окислення NADH і FADH₂[16].

C-956 не впливає значно на генерацію активних форм кисню в мітохондріях.

Інгібування ΔpH -залежного вивільнення Ca^{2+} з мітохондріального матриксу веде до підвищення Ca^{2+} -залежних процесів, зокрема біосинтезу NO, що, в свою чергу, знижує активність дихального ланцюга[17].

1.5.3 Токсичність

Первинна лабораторна токсикологічна оцінка показала, що LD₅₀ при пероральному введенні перевищує 2000 мг/кг маси тіла мишей, що класифікує каліксарен C-956 як малотоксичну речовину (IV клас токсичності) [16].

1.5.4 Застосування

У клінічній медицині каліксарен C-956 може бути використаний для стимуляції пологової активності під час ускладнень та/або для підвищення базального тонусу гладеньких м'язів матки, особливо у випадку виведення посліду після пологів.

У лабораторній практиці каліксарен C-956 може бути використаний для таргетного зменшення активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ та

дослідження іонних, молекулярних та мембранних механізмів обміну Ca^{2+} у гладеньких м'язах[15,16].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктом були багатоклітинні гладеньком'язові препарати рогів матки щурів.

Евтаназія щурів здійснювалась відповідно до етичних норм. Після евтаназії, розрізали черевну порожнину щура по середній лінії. Видалили роги матки, відділяючи їх від навколишніх тканин. Розрізали роги матки на сегменти довжиною 10-15 мм. Видалили серозну оболонку і непотрібні тканини, залишаючи тільки гладеньком'язові шари. Промили фізіологічним розчином до прозорого розчину та помістили у розчин Кребса (такого складу, мМ: 120,4 NaCl; 5,9 KCl; 15,5 NaHCO_3 ; 1,2 NaH_2PO_4 ; 1,2 MgCl_2 ; 2,5 CaCl_2 ; 11,5 глюкоза; рН 7,4).

Для реєстрації спонтанної скорочувальної активності використовували тензометричне обладнання (Рис. 2.1), яке дозволяє одночасно відстежувати скорочувальну активність двох гладком'язових препаратів в ізометричному та ізотонічному режимах. Для аналізу механокінетичних параметрів використовували записи спонтанних скорочень, виконані в ізометричному режимі при постійному навантаженні 10 мН. Реєстрацію скорочень для аналізу здійснювали не раніше, ніж через 60 хвилин після того, як препарат був поміщений в камеру тензометричного обладнання та підданий постійному навантаженню.

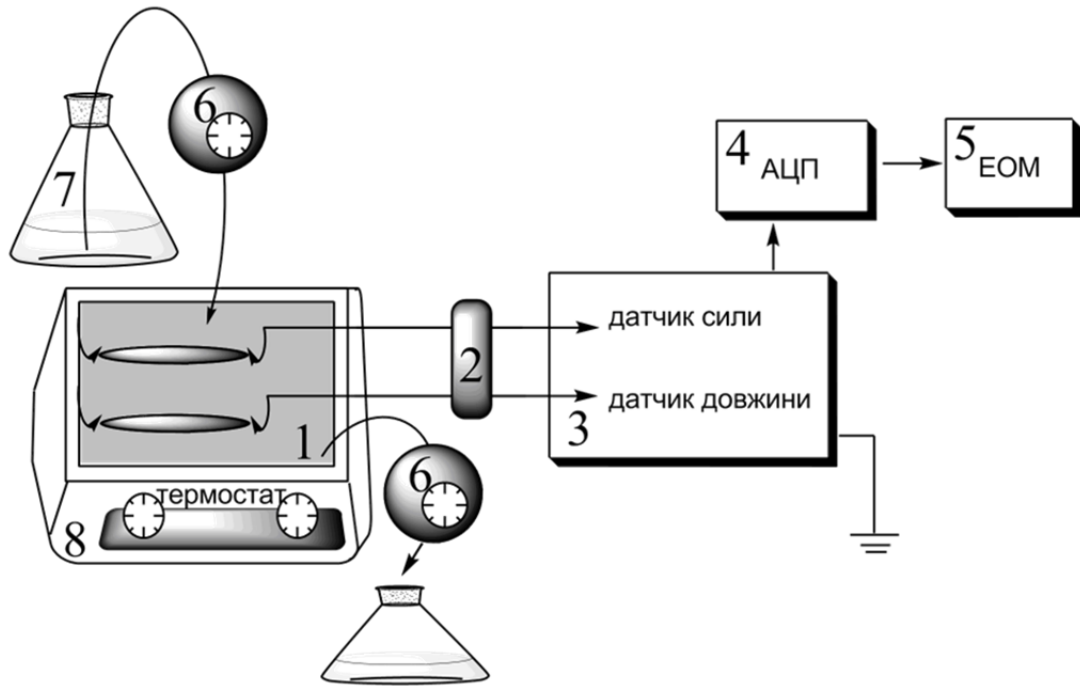


Рис. 2.1. Принципова схема тензометричного устаткування: 1 - робоча камера з проточним розчином Кребса (ефективний об'єм, температура 37 °С, швидкість протікання розчину 5 мл/хв.) та закріпленими гладеньком'язовими препаратами; 2 – тензометричні датчики; 3 – підсилювач; 4 – аналого-цифровий перетворювач; 5 – комп'ютер; 6 – перестальтичні насоси для прокачування робочих розчинів (7); 8 – термостат.

Повний механокінетичний аналіз здійснювали відповідно до методу Костеріна, початковим етапом якого була лінеаризація у координатах

$$\left[\ln \left(\frac{f_R}{f_C} \right); \ln \left(1 + \frac{\Delta t}{t} \right) \right], \text{ тут:}$$

$-f$ і t – миттєві значення сили і часу на рівні фази скорочення (С) і розслаблення (R),

$-F_C$ і F_R – значення сили в точках перегину фаз скорочення і розслаблення (за їх максимальних швидкостей),

$-\Delta t$ – довільно обраний постійний інтервал часу (в даному випадку містився в межах 5-9 с).

Із лінеаризованих кривих визначали характеристичні константи k і n :

$$n = \left(\frac{\tau_0}{\tau_R - \tau_0} \right)^2 = \left(\frac{\tau_0}{\tau_0 - \tau_C} \right)^2$$

$$k = \frac{\tau_0}{(\tau_R - \tau_0)^2} = \frac{\tau_0}{(\tau_0 - \tau_C)^2}$$

Надалі характеристичні константи використовували для розрахунку параметрів скорочувального процесу:

- часові (τ_0 , τ_C і τ_R) параметри – показники часу в точці амплітуди та у точках перегину фаз скорочення і розслаблення, відповідно

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

$$\tau_C = \frac{n - \sqrt{n}}{k},$$

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

- силові (F_{max} , F_C та F_R) – тут F_{max} , - амплітуда скорочення, F_C та F_R значення сили f у точках перегину частин скорочувальної відповіді на рівні фаз скорочення і розслаблення відповідно:

$$F_C = F_{max} \cdot \left(\frac{n - \sqrt{n}}{n} \right)^n \cdot e^{\sqrt{n}},$$

$$F_R = F_{max} \cdot \left(\frac{n + \sqrt{n}}{n} \right)^n \cdot e^{-\sqrt{n}},$$

- швидкісні (V_C і V_R) параметри – максимальні швидкості фази скорочення і фази розслаблення, відповідно:

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

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

- імпульсні (I_{\max} , I_C та I_R) параметри – імпульси сили в точках амплітуди F_{\max} і перегину фаз скорочення і розслаблення відповідно:

$$I_{\tau_0} = F_{\max} \cdot \tau_0 = F_{\max} \cdot \frac{n}{k}$$

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

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

Дані механокінетичного аналізу обробляли за допомогою статистичних методів, використовуючи програми Excel та Origin 2018. Нормальність розподілу даних перевіряли за тестом Шапіро-Уїлка. Для виявлення значущих відмінностей між середніми значеннями контрольної групи та досліджуваних груп, застосовували непарний t-критерій Стьюдента (гомогенність дисперсій перевіряли за допомогою критерію Фішера).

Достовірність апроксимації лінеаризованих даних лінійною функцією перевіряли з використанням F-критерію Фішера; у всіх випадках коефіцієнти детермінації (R^2) були не нижчими за 0,96.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Із результатів ензиматичних досліджень відомо, що калікс[4]арен С-956 володіє інгібіторною активністю щодо Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани, а також до деякої міри проявляє властивість інгібування Ca^{2+} -помпи саркоплазматичного ретикулуму ізольованих гладеньком'язових клітин матки та препаратів суспензії плазматичних мембран міоцитів []. Втім, для перспектив використання цієї речовини як утеротоніка не менш важливо, щоб зберігалася здатність активувати скорочувальну активність також в умовах інтактної тканини. Тому на багатоклітинних гладеньком'язових препаратах рогів матки щурів за ізометричного режиму реєстрації, нами було досліджено ефекти цієї сполуки (за фіксованої концентрації 10^{-5} М) на механокінетику спонтанної та викликаной за шляхами електро- і фармакомеханічного спряження скорочувальної активності.

3.1. Закономірності впливу калікс[4]арену С-956 на спонтанну скорочувальну активність міометрія щурів

Внесення в омиваючий гладеньком'язові препарати розчин Кребса 10 мкМ калікс[4]арену С-956 не спричиняло змін базального напруження та їх спонтанної скорочувальної активності (амплітуди і частоти). Встановлено,

що за попередньої інкубації препаратів міометрія з калікс[4]ареном С-956 (10 мкМ, упродовж 20-40 хв) параметри спонтанної скорочувальної активності у середньому становили щодо контрольних значень, прийнятих за 100 %: амплітуда $113,7 \pm 2,3$ % ($n=5$, $p<0.05$) та частота $116,7 \pm 4,6$ % ($n=5$, $p<0.05$). Таким чином, за використаної концентрації 10 мкМ калікс[4]арен С-956 слабо проявляє здатність до модифікації спонтанних скорочень міометрія (Рис. 3.1).

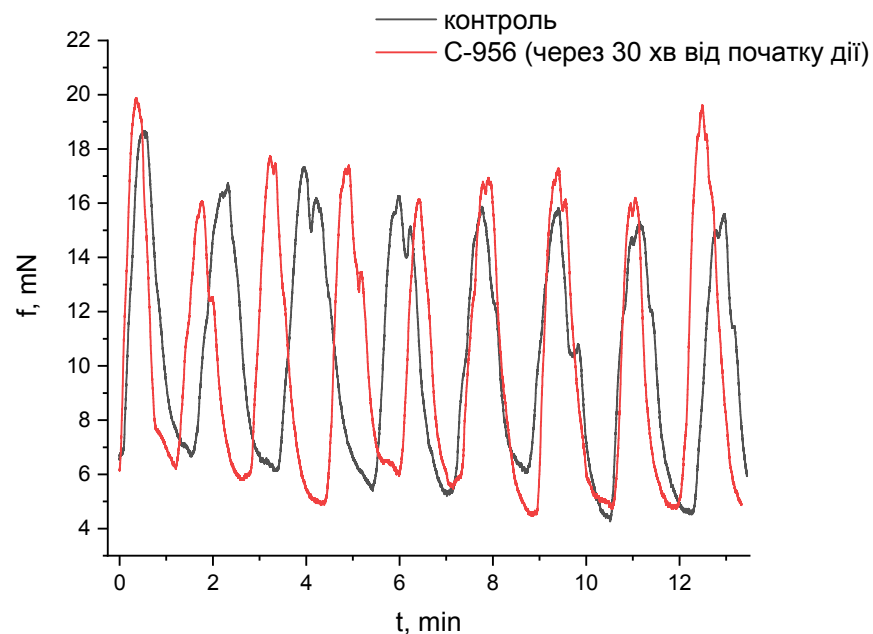
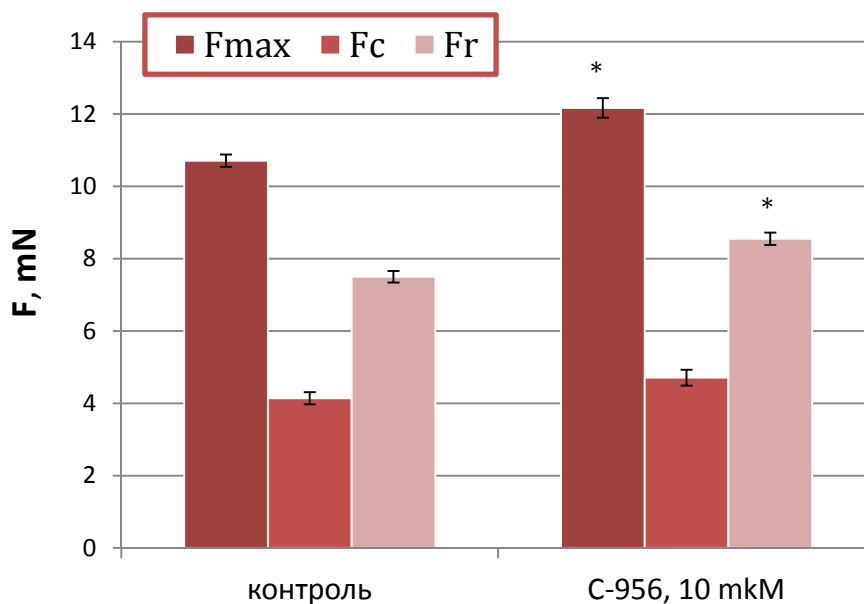


Рис. 3.1. Спонтанна скорочувальна активність (за ізометричного режиму реєстрації) міометрія щурів у контролі та на тлі дії калікс[4]арену С-956 (10^{-5} М). Усі експерименти проведені на тлі дії розчинника DMSO (0,1%).

Наведено типові механограми запису спонтанних скорочень.

Надалі окремі спонтанні скорочення аналізували методом багатопараметричного механокінетичного аналізу Костеріна із розрахунком параметрів: часових (τ_0 , τ_C і τ_R), силових (F_{\max} , F_C та F_R), швидкісних (V_C і V_R) та імпульсних (I_0 , I_C та I_R) параметрів. Тут V_C і V_R – максимальні швидкості фаз скорочення і розслаблення відповідно, а I_{\max} , I_C та I_R – параметри імпульсу сили на рівні амплітуди та максимальних швидкостей фаз скорочення і розслаблення відповідно.

Було виявлено, що на тлі С-956 достовірно зростають і інші, крім F_{\max} , силові параметри спонтанних скорочень (**Рис. 3.2 А**). Так, параметр сили, за якої має місце максимальна швидкість фази розслаблення (F_R), достовірно зростав порівняно з контролем, досягаючи у середньому $113,9 \pm 2,0 \%$ ($n=5$, $p<0.05$); також і аналогічний параметр фази скорочення (F_C) мало тенденції до збільшення (у середньому до $111,4 \pm 4,9 \%$, $n=5$, $p>0.05$).



А

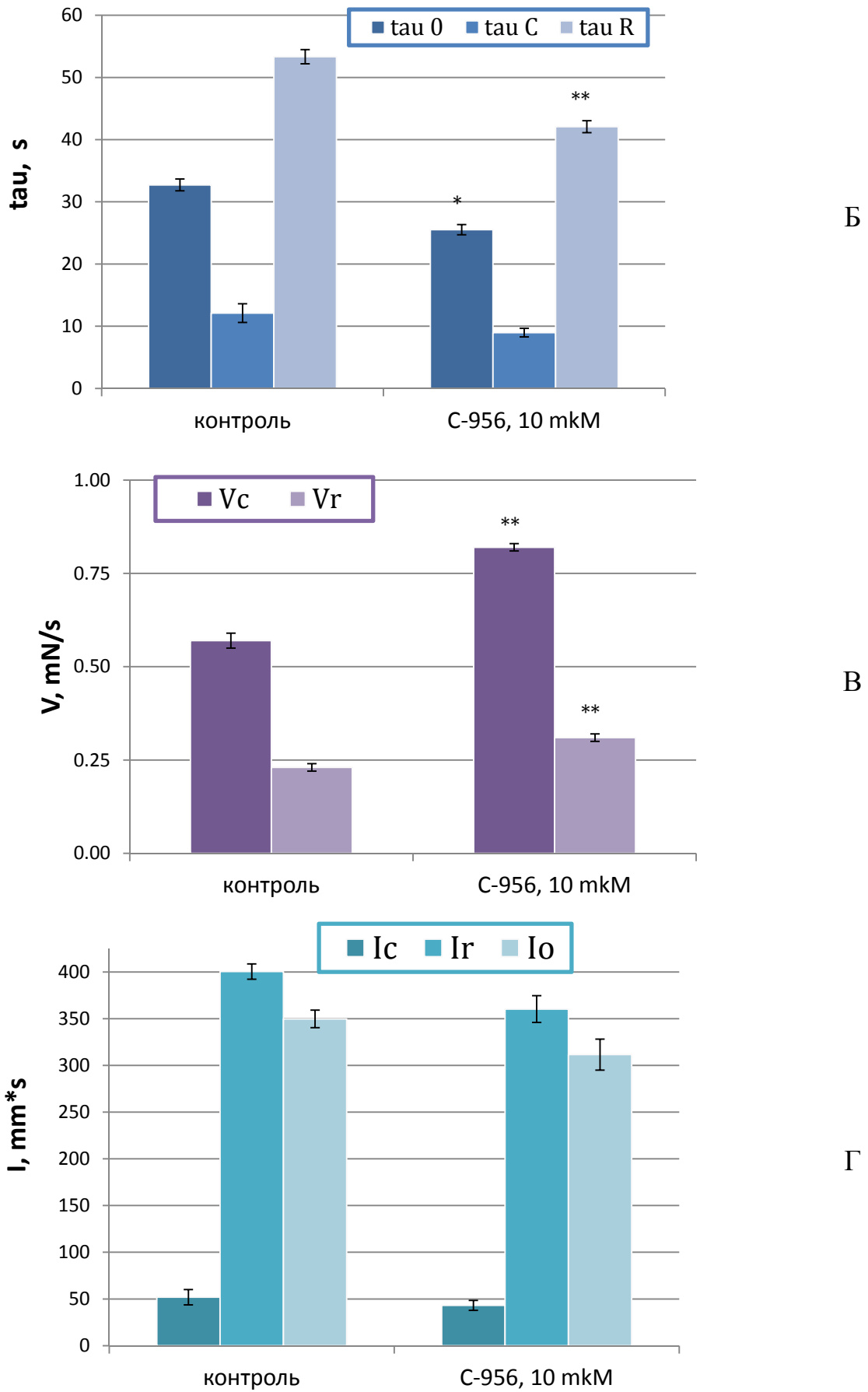


Рис. 3.2. Зведення механокінетичних параметрів спонтанної скорочувальної

активності міометрія щурів за дії калікс[4]арену С-956 (використано у концентрації 10 μM): А – силові параметри (F_{\max} , F_C та F_R); Б – часові параметри (τ_0 , τ_C і τ_R); В – швидкісні параметри (V_C і V_R); Г – імпульсні параметри (I_0 , I_C та I_R). $n = 5$; * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$ – достовірно щодо контролю.

Разом з тим, за дії калікс[4]арену С-956 суттєво і в однаковій мірі (близько чверті щодо контролю) зменшувалися показники усіх часових параметрів. Так, показник часу досягнення амплітуди (τ_{\max}) та показники часу, за яких досягаються максимальні швидкості фаз скорочення (τ_C) і розслаблення (τ_R) становили: відповідно $78,0 \pm 3,2$ % ($n=5$, $p < 0.05$), $74,2 \pm 7,7$ % ($n=5$, $p > 0.05$) та $78,9 \pm 2,3$ % ($n=5$, $p < 0.01$) до щодо контрольних параметрів (**Рис. 2.3 Б**).

Оскільки сполука С-956 спричиняла протилежні ефекти щодо часових (зменшення) і амплітудних (збільшення) параметрів, це позначилося на формуванні кількісних значень імпульсних параметрів, які хоча і проявляли тенденції до зниження, однак не мали суттєвих відмінностей щодо відповідних контрольних показників (**Рис. 3.2 В**). Так, імпульс сили на рівні амплітуди (I_{\max}) у середньому складав $89,1 \pm 5,3$ % ($n=5$, $p > 0.05$), а імпульс на рівні максимальної швидкості фази скорочення (I_C) і розслаблення (I_R) були у середньому $83,2 \pm 12,2$ % та $90,0 \pm 3,7$ % відповідно (у обох випадках $n=6$, $p > 0.05$).

Також за дії калікс[4]арену С-956 суттєво і в однаковій мірі зростали показники максимальних швидкостей фаз скорочення (V_C) і розслаблення (V_R), які у середньому становили $143,2 \pm 1,8$ % ($n=5$, $p < 0.01$) та $137,4 \pm 2,1$ % ($n=5$, $p < 0.01$), відповідно (**Рис. 3.2 Г**).

Використана для механокінетичного аналізу модель передбачала розрахунок абсолютних значень максимальних швидкостей V_C і V_R , але

цікаво було перевірити зміни швидкісних параметрів не залежно від амплітуди. Тому нами було застосовано метод розрахунку нормованих максимальних швидкостей фаз скорочення і розслаблення Костеріна-Бурдиги []. Було встановлено, що сполука С-956 також призводила до суттєвого зростання незалежних від амплітуди швидкісних параметрів (**Рис. 3.3**). Так, нормована максимальна швидкість фази скорочення (V_{nc}) становила у середньому $126,4 \pm 3,0 \%$ ($n=5$, $p<0.01$) та нормована максимальна швидкість фази розслаблення (V_{nr}) – у середньому $120,2 \pm 0,6 \%$ ($n=5$, $p<0.05$) щодо контрольних значень, прийнятих за 100 %.

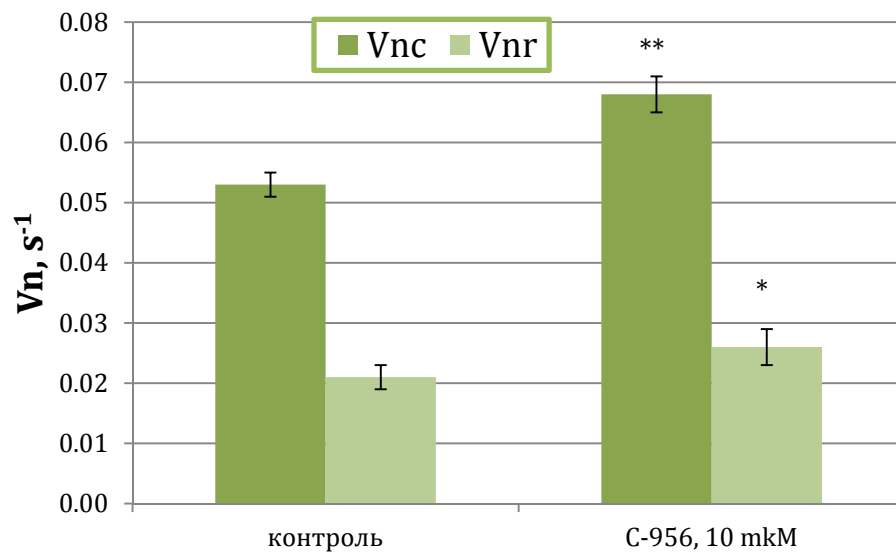


Рис. 3.2. Нормовані максимальні швидкості фаз скорочення і розслаблення (відповідно, V_{nc} і V_{nr}) спонтанних скорочень міометрія щурів за дії калікс[4]арену С-956 (використано у концентрації 10 μM). $n = 5$; * - $p<0.05$, ** - $p<0.01$ – достовірно щодо контролю.

Таким чином, за використаної концентрації 10 мкМ калікс[4]арен С-956 слабо проявляє здатність до модифікації спонтанних скорочень міометрія, зокрема щодо модуляції процесу розслаблення.

3.2. Механокінетичні ефекти дії калікс[4]арену С-956 на спонтанну скорочувальну активність міометрія щурів за блокування синтаз оксиду азоту

Відомо, що крім іон-транспортувальної ролі ПМКА залучена до формування кавеоларних сигнальних білкових комплексів, таким чином, що функціонально активні молекули ПМКА блокують роботу синтаз оксиду азоту і навпаки, при блокуванні ПМКА спостерігається суттєве посилення синтезу NO в клітинах. Молекули NO спричиняють токолітичний ефект, не лише знижуючи амплітуду скорочень, але й значно прискорюючи процес релаксації міометрія. Тому нами було здійснено перевірку припущення, щодо можливого внеску NO у пригнічення амплітуди спонтанних скорочень міометрія щурів за присутності калікс[4]арену С-956. У роботі було застосовано неселективний інгібітор NO-синтаз L-NAME.

Наступні експерименти передбачали дослідження ефектів калікс[4]арену С-956 (10 мкМ) на тлі попереднього блокування NO-синтаз сполукою L-NAME (0.1 мМ, попередня інкубація становила 30 хвилин) (**Рис. 3.4**).

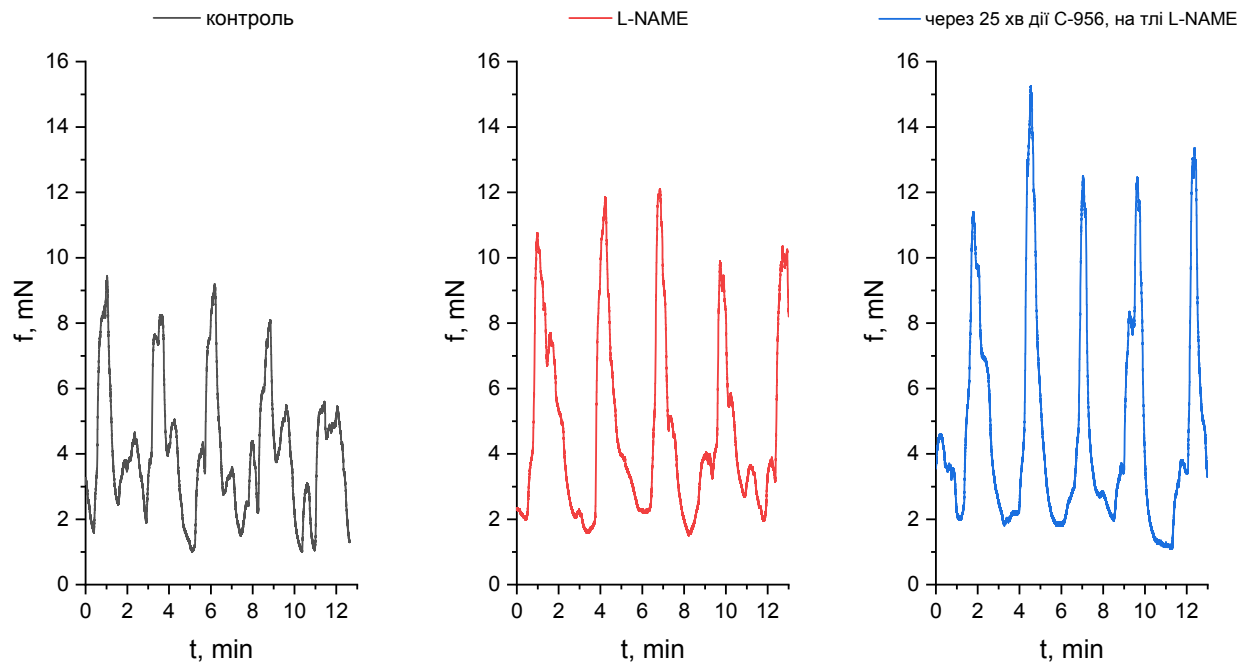


Рис. 3.4. Спонтанна скорочувальна активність міометрія щурів у контролі, на тлі дії неселективного блокатора синтезу оксиду азоту L-NAME (10^{-4} М, попередня інкубація становила 30 хвилин) та на тлі дії калікс[4]арену С-956 (10^{-5} М, через 25 хвилин після початку аплікування) в умовах попередньої інкубації м'язових препаратів з L-NAME. Усі експерименти проведені на тлі дії розчинника DMSO (0,1%).

Наведено типові механограми запису спонтанних скорочень.

На тлі заблокованого синтезу NO ефекти калікс[4]арену С-956 були суттєво більш вираженими. Так, застосування L-NAME супроводжувалось тенденціями до підвищення амплітуди спонтанних скорочень, а у випадку додавання калікс[4]арену С-956 спричиняло зростання амплітуди у

середньому до $161,9 \pm 5,2$ % (щодо контролю, прийнятого за 100%, $n = 5$; $p < 0.01$) (Рис. 3.5).

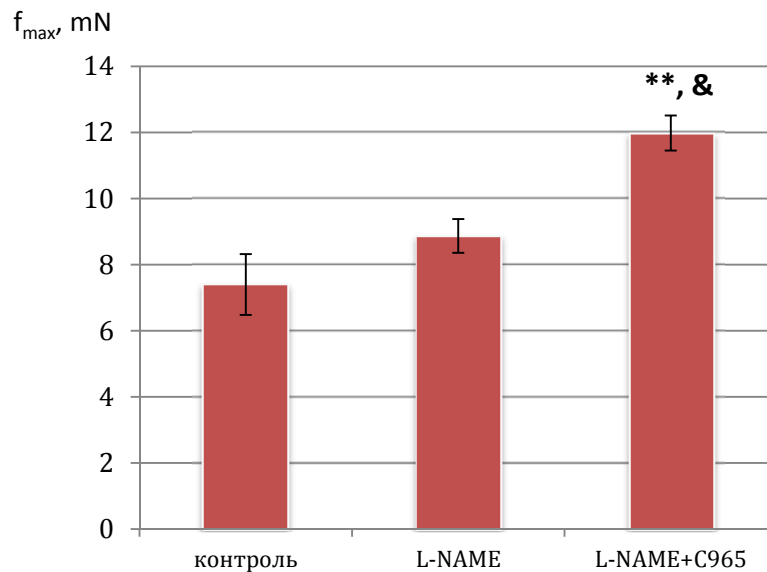


Рис. 3.5. Амплітуда (F_{\max}) спонтанних скорочень міометрія щурів у контролі, на тлі дії неселективного блокатора синтаз оксиду азоту L-NAME (10^{-4} М, попередня інкубація становила 30 хвилин) та на тлі дії калікс[4]арену С-956 (10^{-5} М, через 25 хвилин після початку аплікування) в умовах попередньої інкубації м'язових препаратів з L-NAME. $n = 5$; ** - $p < 0.01$ – достовірно щодо контролю та & - $p < 0.05$ – достовірно щодо L-NAME.

Надалі за допомогою методу багатопараметричного механокінетичного аналізу Костеріна було проаналізовані окремі спонтанні скорочення, зареєстровані за дії L-NAME (10^{-4} М, до аналізу брали скорочення після 30 хвилин від початку аплікування речовини).

Встановлено, що при дії L-NAME силові параметри (F_{\max} , F_c , F_r) склали 128,27% ($n=5$; $p < 0.01$), 132,84% ($n=5$; $p < 0.01$), 116,28% ($n=5$;

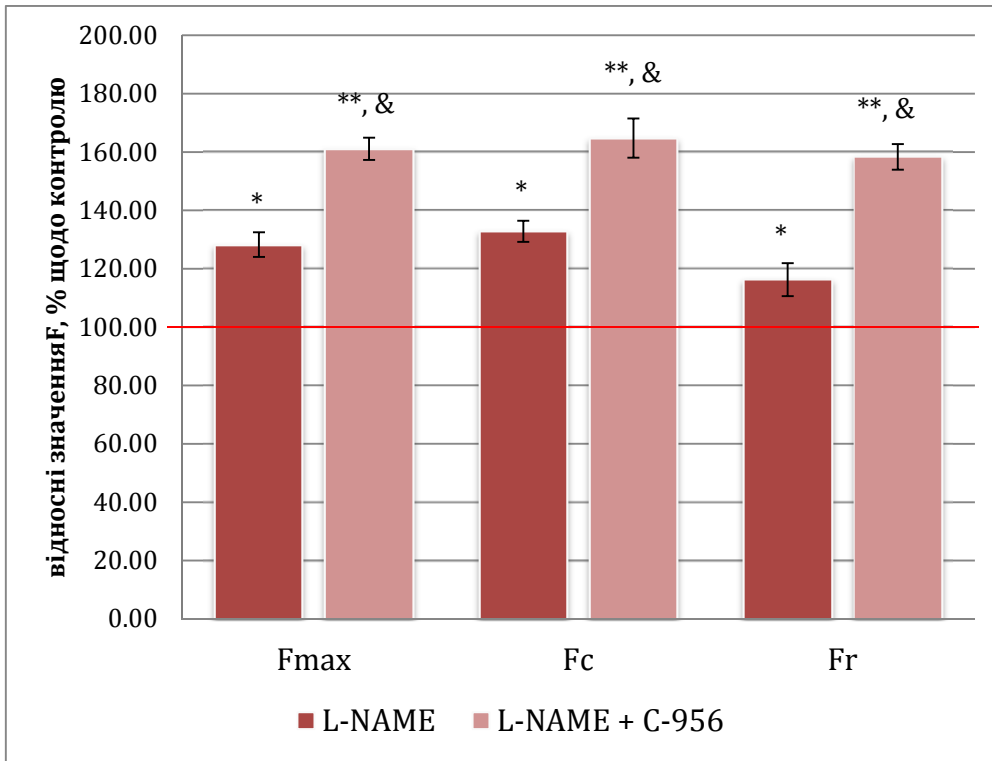
$p < 0.01$) відносно контролю. При дії С-956 на тлі L-NAME силові параметри (F_{\max} , F_c , F_r) склали 161,10% ($n=5$; $p < 0.05$), 164,78% ($n=5$; $p < 0.05$), 158,33% ($n=5$; $p < 0.05$) відносно контролю.

При дії L-NAME часові параметри (τ_0 , τ_C і τ_R) склали 114,50% ($n = 5$; $p < 0.05$), 142,20% ($n = 5$; $p < 0.05$), 103,72% ($n = 5$; $p < 0.05$) відносно контролю.

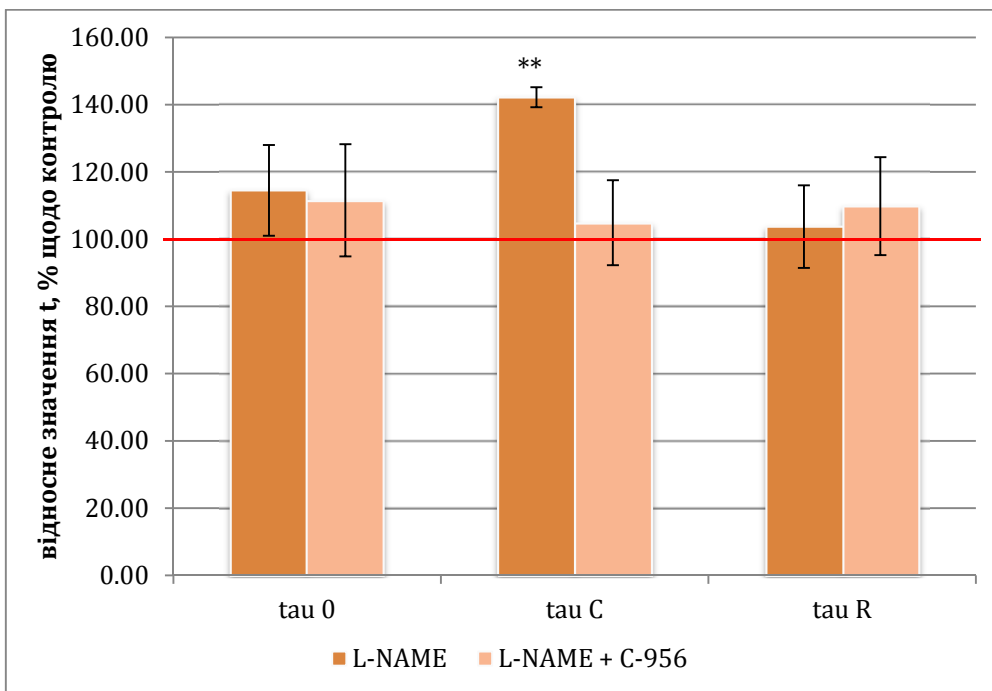
При дії С-956 на тлі L-NAME часові параметри (τ_0 , τ_C і τ_R) склали 111,53% ($n = 5$; $p < 0.01$), 104,87% ($n = 5$; $p < 0.01$), 109,80% ($n = 5$; $p < 0.01$) відносно контролю.

При дії L-NAME швидкісні параметри (V_C і V_R) склали 109,09% ($n = 5$; $p < 0.05$), 144,44% ($n = 5$; $p < 0.05$) відносно контролю. При дії С-956 на тлі L-NAME швидкісні параметри (V_C і V_R) склали 143,64% ($n = 5$; $p < 0.01$) , 81,48% ($n = 5$; $p < 0.01$) відносно контролю.

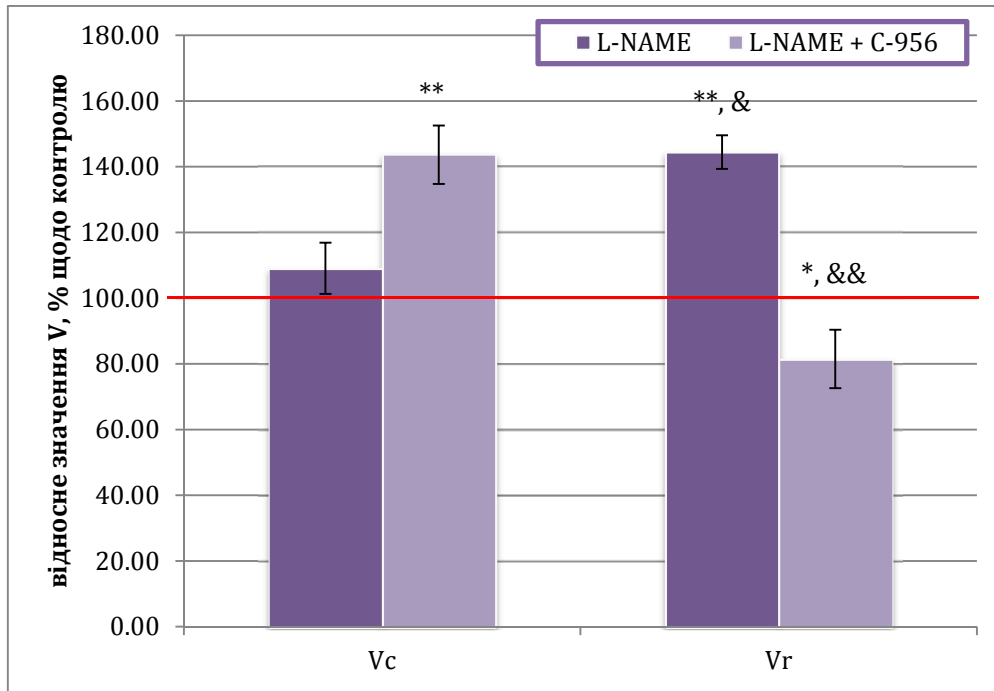
При дії L-NAME імпульсні параметри (I_0 , I_C та I_R) склали 198,59% ($n = 5$; $p < 0.05$), 107,14% ($n = 5$; $p < 0.05$), 118,48% ($n = 5$; $p < 0.05$) відносно контролю. При дії С-956 на тлі L-NAME імпульсні параметри (I_0 , I_C та I_R) склали 177,87% ($n = 5$; $p < 0.01$), 125,48% ($n = 5$; $p < 0.01$), 138,60% ($n = 5$; $p < 0.01$) відносно контролю.



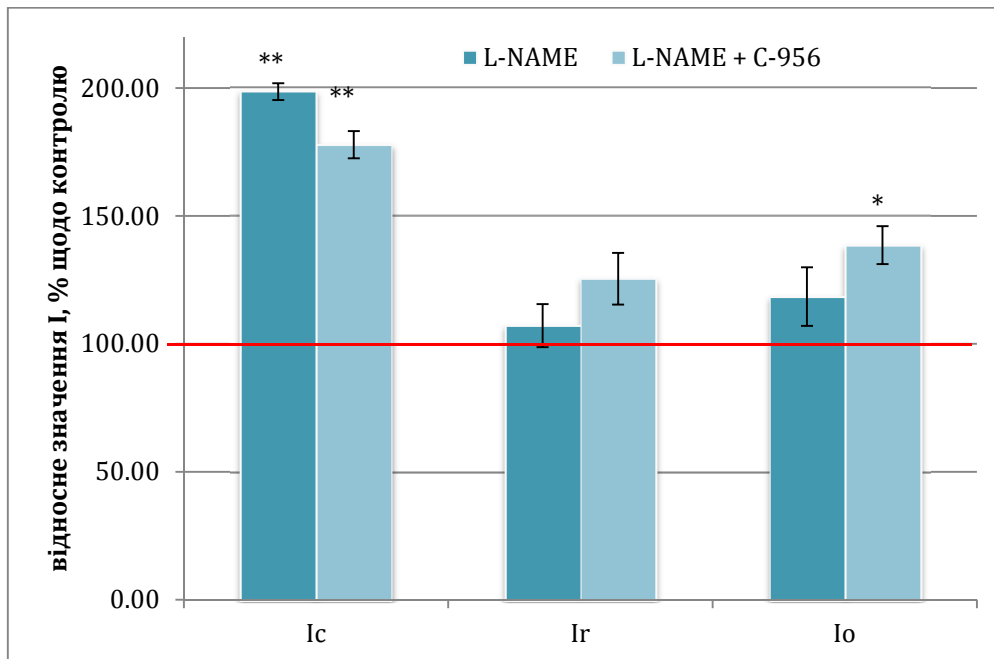
А



Б



B



Г

Рис. 3.6. Зведення відносних (щодо контролю, прийнятого за 100 %) механокінетичних параметрів спонтанної скорочувальної активності міометрія щурів на тлі дії неселективного блокатора синтаз оксиду азоту L-NAME (10^{-4} М, попередня інкубація становила 30 хвилин) та на тлі дії калікс[4]арену C-956 (10^{-5} М, через 25 хвилин після початку аплікування) в умовах попередньої інкубації м'язових препаратів з L-NAME: А – силові параметри (F_{\max} , F_C та F_R); Б – часові параметри (τ_0 , τ_C і τ_R); В – швидкісні параметри (V_C і V_R); Г – імпульсні параметри (I_0 , I_C та I_R). $n = 5$; * - $p < 0.05$ та

** - $p < 0.01$ – достовірно щодо контролю, * - $p < 0.05$ та ** - $p < 0.01$ щодо L-NAME.

Також передінкубація препаратів міометрія з L-NAME (10^{-4} М) суттєво позначилася на параметрах нормованих максимальних швидкостей: у випадку фази скорочення мало місце зменшення V_{nc} до $79,5 \pm 2,8$ % щодо контролю ($n=5$, $p < 0.05$), тоді як параметр V_{nr} знижувався у середньому до $45,1 \pm 2,4$ % ($n=5$, $p < 0.001$) щодо контролю, прийнятого за 100 % (Рис. 3.7).

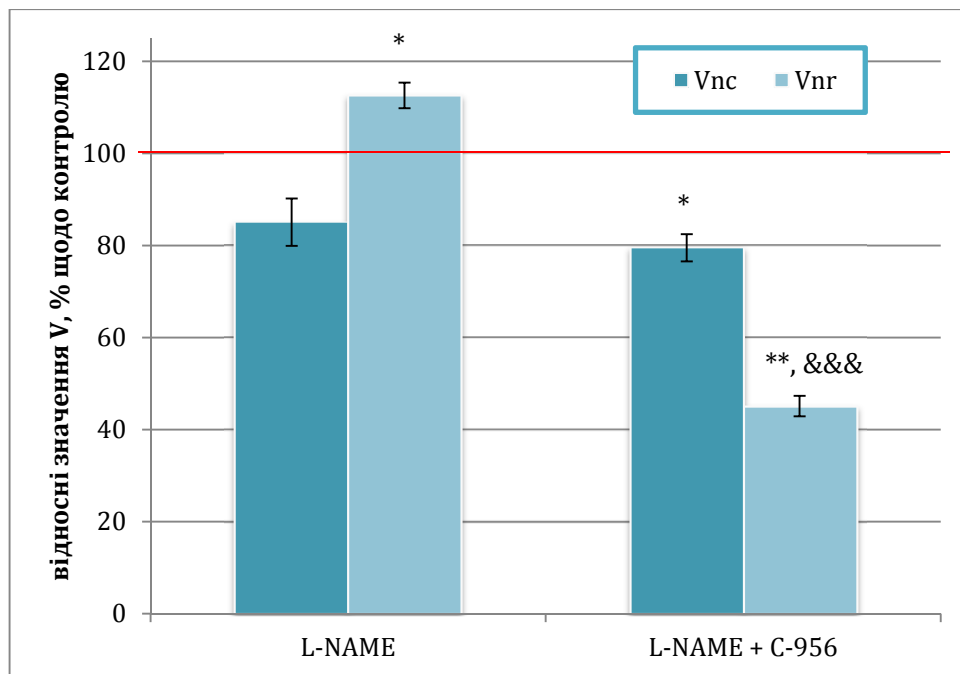


Рис. 3.7. Відносні значення нормованих максимальних швидкостей фаз скорочення (V_{nc}) і розслаблення (V_{nr}) спонтанних скорочень міометрія щурів у контролі, в умовах блокування синтаз оксиду азоту L-NAME (10^{-4} М, тривалість передінкубації 30 хв) та за дії калікс[4]арену С-956 (10^{-5} М, тривалість передінкубації з С-956 становила 25 хв) на тлі блокування синтаз оксиду азоту L-NAME (10^{-4} М). $n=5$; * - $p < 0.05$ і ** - $p < 0.01$ щодо

контролю, $p < 0.001$ щодо L-NAME.

Тож калікс[4]арен С-956, який, як показано ензиматичними дослідженнями препаратів плазматичних мембран міоцитів, є високоафінним інгібітором Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани [], за фіксованої концентрації 10^{-5} М суттєво впливає на механокінетику спонтанної скорочувальної активності міометрія щурів, значно уповільнюючи фазу розслаблення спонтанних ізометричних скорочень. Також встановлено, що ефекти С-956 на спонтанні скорочення значно модулюються в умовах блокування синтезу оксиду азоту. Такі ефекти, ймовірно, пов'язані з гальмуванням екструзії іонів Ca^{2+} з цитозолу міоцитів.

3.3. Модуляція калікс[4]ареном С-956 викликаних гіперкалієвою деполяризацією скорочувальної активності міометрія щурів

На наступному етапі нами було досліджено закономірності впливу калікс[4]арену С-956 на викликані за шляхом електромеханічного спряження збудження-скорочення міометрія щурів. Електромеханічне спряження моделювали використанням гіперкалієвого розчину (80 мМ).

Як відомо, за даного способу активації скорочення міоцитів забезпечується входом іонів Ca^{2+} від через потенціалкервані Ca^{2+} -канали, а процеси зниження внутрішньоклітинної концентрації цього катіону (на рівні

фази розслаблення) відбуваються за рахунок функціонування систем енергозалежного транспорту.

У випадку ізометричних скорочень міометрія, активованих гіперкалієвим розчином (80 мМ), калікс[4]арен С-956 (10^{-5} М) спричиняв підвищення амплітуди до $123,4 \pm 4,6$ % порівняно з контролем, прийнятим за 100% ($n=5$, $p < 0.05$) (Рис. 3.8).

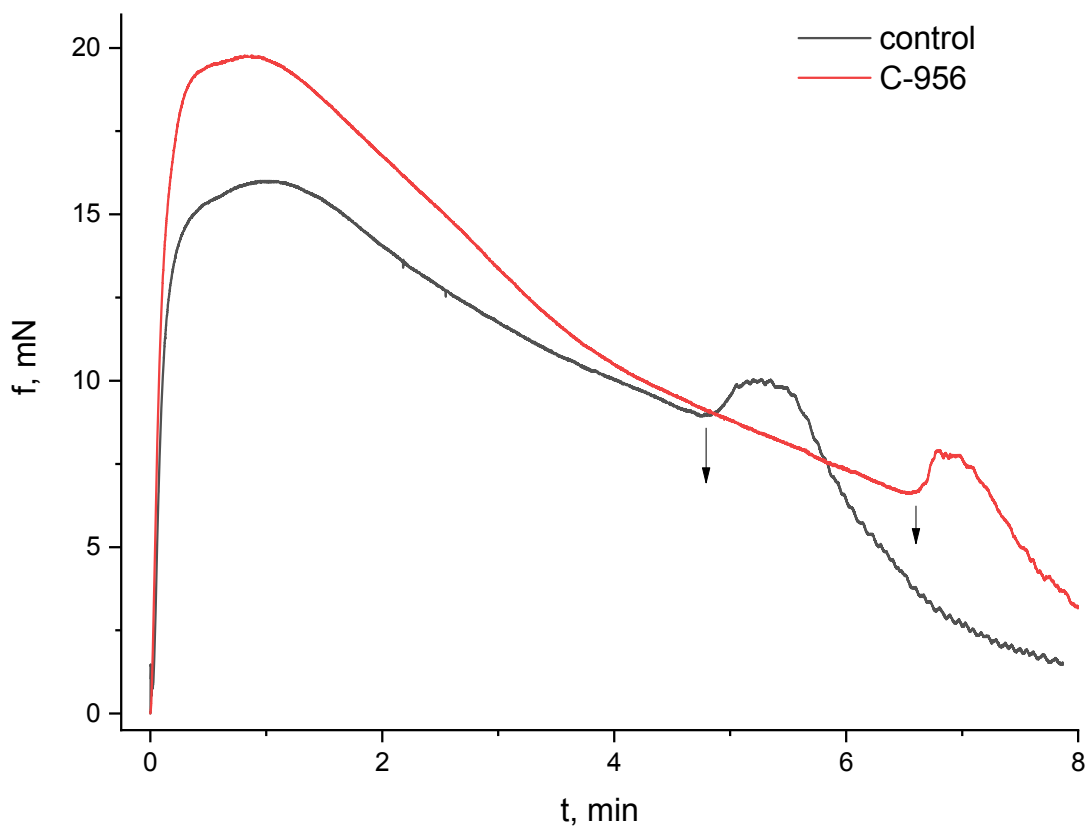


Рис. 3.8. Порівняння ізометричних скорочень міометрія, індукованих аплікацією гіперкалієвого розчину (80 мМ) у контролі та за дії калікс[4]арену С-956 (10^{-5} М). Усі експерименти проведені на тлі дії розчинника DMSO (0,1%). Стрілками показано момент початку відмивання препаратів від гіперкалієвого розчину.

Кінетичним аналізом показано, що за дії C-956 нормована максимальна швидкість фази скорочення V_{nc} залишалась на рівні контролю, тоді як швидкість розслаблення V_{nr} знижувалась у середньому до $85,1 \pm 3,7\%$ ($n=5$, $p < 0.05$).

Наступні експерименти здійснювали на тлі попереднього блокування NO-синтаз сполукою L-NAME (0.1 мМ, тривалість попередньої інкубації становила 30 хвилин) (Рис. 3.9). Застосування L-NAME призводило до підвищення максимальної сили скорочення до $131,5 \pm 4,2\%$ ($n=5$, $p < 0.05$). Щодо контролю, тоді як параметри нормованих максимальних швидкостей фаз скорочення V_{nc} та V_{nr} були на рівні контрольних (у середньому становили 94,8 % та 93,5 % відповідно).

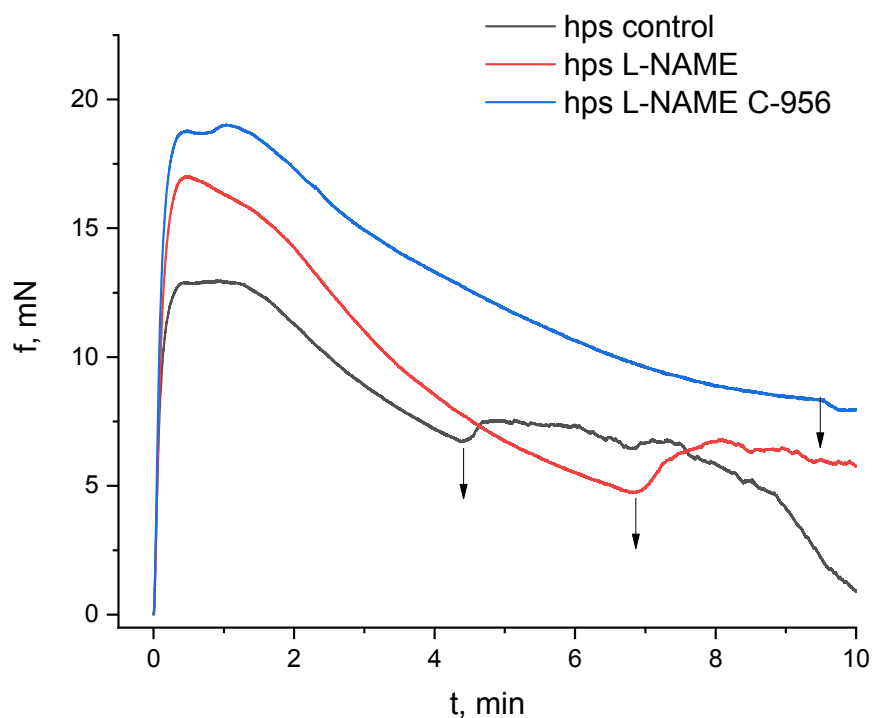


Рис. 3.9. Порівняння скорочень міометрія, індукованих аплікацією

гіперкалієвого розчину (80 мМ), на тлі блокування NO-синтаз у контролі (control hps), на тлі блокування NO-синтаз передінкубацією з L-NAME (0.1 мМ, 30 хвилин) та за дії калікс[4]арену C-956 (10^{-5} М) на тлі блокування NO-синтаз (hps L-NAME C-956). Усі експерименти проведені на тлі дії розчинника DMSO (0,1%). Стрілками показано момент початку відмивання препаратів від гіперкалієвого розчину.

На тлі дії L-NAME калікс[4]арен C-956 спричиняв збільшення максимальної сили скорочення, яке становило у середньому $111,8 \pm 3,6$ % (n=5, p > 0.05) щодо L-NAME та $146,9 \pm 4,9$ % (n=5, p < 0.05) щодо контролю.

Механокінетичним аналізом встановлено, що нормована максимальна швидкість фази скорочення V_{nc} була на рівні контрольної (у середньому $109,1 \pm 4,4$ %; n=5, p > 0.05). Нормована максимальна швидкість фази розслаблення V_{nr} під дією C-956 суттєво зменшувалась та у середньому становила $58,1 \pm 4,2$ % (n=5, p < 0.01) щодо ефекту L-NAME та $54,3 \pm 3,5$ % (n=5, p < 0.001) щодо контролю.

3.4. Модуляція калікс[4]ареном C-956 викликаних окситоцином скорочувальної активності міометрія щурів

Метою наступного етапу дослідження було встановлення закономірностей впливу калікс[4]арену C-956 на викликані за шляхом фармакомеханічного спряження збудження-скорочення міометрія щурів.

Фармакомеханічне спряження моделювали використанням утеротонічного гормону окситоцину (0,1 МО).

У випадку ізометричних скорочень міометрія, активованих окситоцином (0,1 МО) на тлі попередньої інкубації препаратів з калікс[4]ареном С-956 (10^{-5} М, тривалість попередньої інкубації 30 хв) спостерігалось суттєве підвищення їх амплітуди у середньому до $125,3 \pm 4,8$ % порівняно з контролем, прийнятим за 100% ($n=5$, $p<0.05$) (Рис. 3.10).

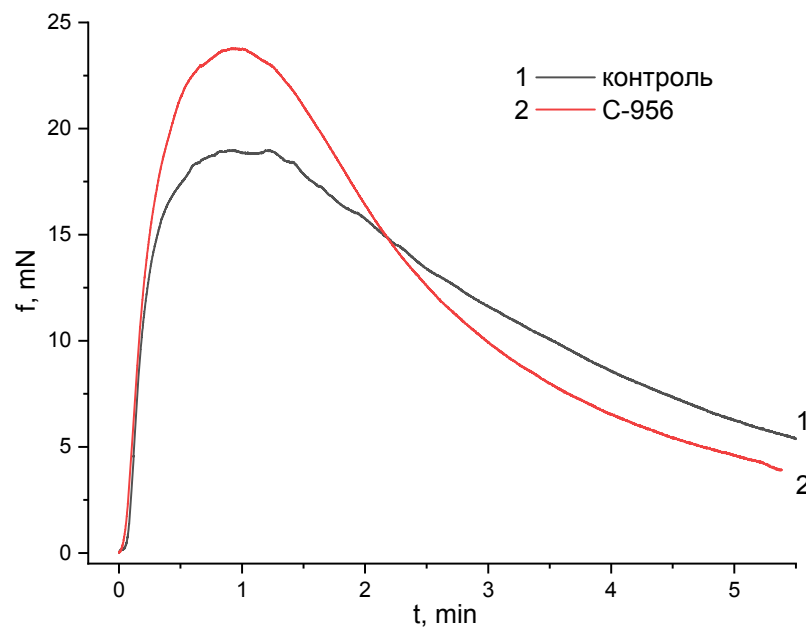


Рис. 3.10. Порівняння скорочень міометрія, індукованих аплікацією окситоцину (0,1 МО) у контролі та за дії калікс[4]арену С-956 (10^{-5} М). Усі експерименти проведені на тлі дії розчинника DMSO (0,1%). Наведено типові механограми.

Кінетичним аналізом було встановлено, що за даних умов нормована максимальна швидкість фази скорочення V_{nc} залишалась на рівні контролю,

але на тлі С-956 зростала нормована максимальна швидкість фази розслаблення V_{nr} у середньому до $125,9 \pm 2,1$ % ($n=5$, $p<0.05$).

Ефекти калікс[4]арену С-956 на тлі L-NAME щодо окситоцинового скорочення не мали суттєвих відмінностей відносно ефектів, зареєстрованих за дії лише L-NAME (**Рис.3.11**): максимальна сила скорочення становила $104,8 \pm 5,1$ % (щодо дії L-NAME, $n=5$, $p>0.05$), а механокінетичні параметри зазнавали частково змін. Так швидкість фази скорочення (V_{nc}) у середньому становила $121,3 \pm 4,4$ % щодо дії L-NAME ($n=5$, $p<0.05$) та $106,6 \pm 3,7$ % щодо контролю ($n=5$, $p>0.05$), а нормована максимальна швидкість розслаблення (V_{nr}) у середньому становила $116,0 \pm 4,8$ % щодо дії L-NAME та $105,1 \pm 5,3$ % щодо контролю (у обох випадках $n=5$, $p>0.05$).

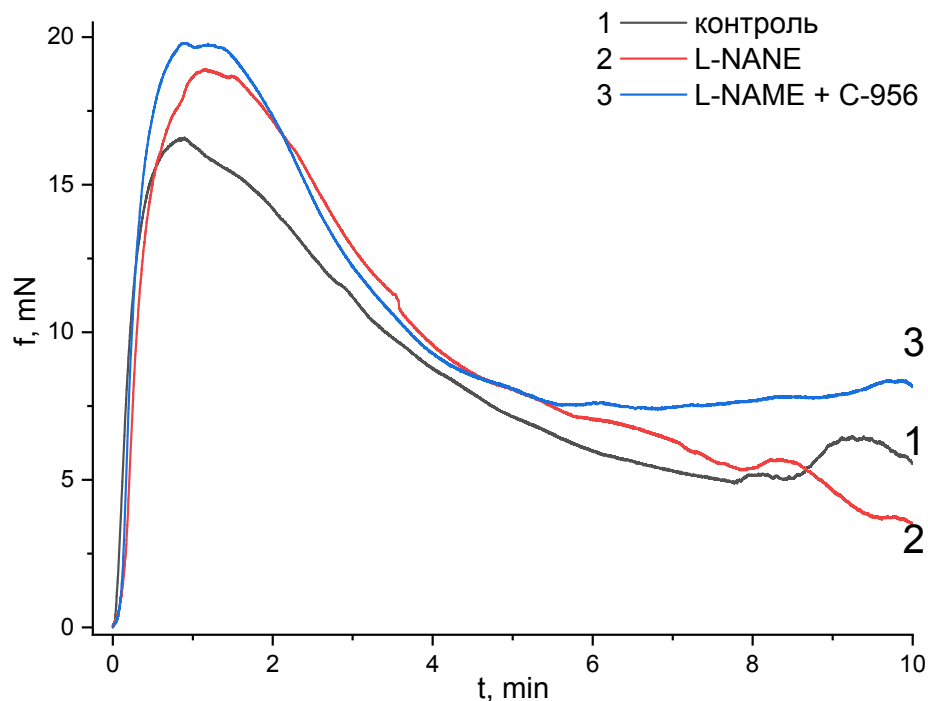


Рис. 3.11. Порівняння скорочень міометрія, індукованих аплікацією окситоцину (0,1 МО): у контролі, на тлі блокування NO-синтаз

передінкубацією з L-NAME (0.1 мМ, 30 хвилин) та за дії калікс[4]арену C-956 (10^{-5} М) на тлі блокування NO-синтаз L-NAME (0.1 мМ). Усі експерименти проведені на тлі дії розчинника DMSO (0,1%). Наведено типові механограми.

Разом з тим варто уваги той факт, що за дії калікс[4]арену C-956 на тлі L-NAME суттєво збільшений рівень залишкового скорочення (так званий тонічний компонент окситоцинового скорочення). Це, ймовірно, вказує на підвищений рівень іонів Ca^{2+} в цитоплазмі, який може спричиняти калікс[4]арен C-956 внаслідок блокування ПМКА і, можливо, також частко Ca^{2+} -помпи саркоплазматичного ретикулуму.

Тож сполука C-956 спричиняє активацію окситоцинових скорочень, які на її тлі характеризуються підвищенням нормованої максимальної швидкості фази розслаблення (V_{nr}). Попереднє блокування NO-синтаз усуває ефект калікс[4]арену C-956 щодо V_{nr} , а також супроводжується підвищенням тонічного компоненту окситоцинового скорочення, що ймовірно, підтверджує здатність цієї сполуки блокувати Ca^{2+} -помпу плазматичної мембрани та спричиняти утримання підвищеної концентрації іонів Ca^{2+} в цитоплазмі гладеньком'язових клітин міометрія.

ВИСНОВКИ

1. Каліксарен С-956 при концентрації 10 мкМ має обмежений вплив на спонтанні скорочення міометрія щурів. Сполука дещо підвищує амплітуду і частоту скорочень, однак ці зміни не є статистично значущими для всіх параметрів. При цьому було відзначено суттєве зменшення часових параметрів скорочувальної активності, що свідчить про прискорення фази розслаблення.

2. Використання багатопараметричного механокінетичного аналізу показало, що каліксарен С-956 значно впливає на силові, швидкісні та імпульсні параметри скорочувальної активності міометрія. Зокрема, збільшення швидкості фази скорочення та розслаблення вказує на потенційну здатність сполуки модулювати скорочувальну активність гладеньких м'язів.

3. Дослідження впливу каліксарену С-956 на тлі блокування синтаз оксиду азоту (L-NAME) показало, що каліксарен С-956 значно підвищує амплітуду спонтанних скорочень у цих умовах. Це свідчить про можливий зв'язок між інгібіцією Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани і підвищенням концентрації іонів кальцію в цитоплазмі, що в свою чергу підвищує скорочувальну активність міометрія.

4. Каліксарен С-956 суттєво впливає на скорочення, викликані гіперкалієвою деполяризацією, підвищуючи їх амплітуду і знижуючи швидкість розслаблення. Це підтверджує, що сполука може модулювати

електромеханічне спряження в гладеньких м'язах, що є важливим для розуміння її потенційного використання як утеротоніка.

Загалом, результати цього дослідження свідчать про потенціал каліксарену С-956 як регулятора скорочувальної активності міометрія, що може мати важливі застосування в клінічній практиці для управління пологовою діяльністю та лікуванням дисфункцій гладеньких м'язів матки. Подальші дослідження повинні бути спрямовані на детальніше вивчення механізмів дії каліксарену С-956 та його ефективності у різних фізіологічних та патологічних умовах.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. YOUNG, Roger C. Myocytes, myometrium, and uterine contractions. *Annals of the new york academy of sciences*, 2007, 1101.1: 72-84.
2. WRAY, Susan; PRENDERGAST, Clodagh. The myometrium: from excitation to contractions and labour. *Smooth Muscle Spontaneous Activity: Physiological and Pathological Modulation*, 2019, 233-263.
3. CARAFOLI, Ernesto. Intracellular calcium homeostasis. *Annual review of biochemistry*, 1987, 56.1: 395-433.
4. IINO, Masamitsu. Calcium release mechanisms in smooth muscle. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 1990, 54.4: 345-354.
5. FLOYD, Rachel; WRAY, Susan. Calcium transporters and signalling in smooth muscles. *Cell calcium*, 2007, 42.4-5: 467-476.
6. BERRIDGE, Michael J. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. *The Journal of physiology*, 2008, 586.21: 5047-5061.
7. WEBB, R. Clinton. Smooth muscle contraction and relaxation. *Advances in physiology education*, 2003, 27.4: 201-206.
8. SHMYGOL, Anatoly, et al. Control of uterine Ca²⁺ by membrane voltage: toward understanding the excitation–contraction coupling in human myometrium. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2007, 1101.1: 97-109.
9. WRAY, S., et al. Progress in understanding electro–mechanical signalling in the myometrium. *Acta Physiologica*, 2015, 213.2: 417-431.
10. SANBORN, Barbara M. Relationship of ion channel activity to control of myometrial calcium. *The Journal of the Society for Gynecologic Investigation: JSGI*, 2000, 7.1: 4-11.

11. WRAY, Susan; SHMYGOL, Anatoly. Role of the calcium store in uterine contractility. In: *Seminars in cell & developmental biology*. Academic Press, 2007. p. 315-320.
12. SOLOFF, Melvyn S.; SWEET, Patricia. Oxytocin inhibition of (Ca²⁺+Mg²⁺)-ATPase activity in rat myometrial plasma membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 1982, 257.18: 10687-10693.
13. ENYEDI, Agnes, et al. Characteristics of the Ca²⁺ pump and Ca²⁺-ATPase in the plasma membrane of rat myometrium. *Biochemical Journal*, 1988, 252.1: 215-220.
14. HAYNES, D. H. Mechanism of Ca²⁺ transport by Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase pump: analysis of major states and pathways. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 1983, 244.1: G3-G12.
15. DANYLOVYCH, G. V., et al. Calix I4I arene C-956 is effective inhibitor of H⁺-Ca²⁺-exchanger in smooth muscle mitochondria. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 2018, 90, № 1: 25-33.
16. VEKLICH, T. O., et al. Calix| 4| arene C-956 selectively inhibits plasma membrane Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase in myometrial cells. *Ukrainian Biochemical Journal*, 2018, 90, № 5.
17. DANYLOVYCH, Hanna V., et al. Calix [4] arenes modulate Ca²⁺-dependent processes smooth muscle cell mitochondria. *Chem. Res. J*, 2019, 4.6: 109-122.