

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА  
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики

доц. Нипорко Олексій Юрійович

Протокол № \_\_\_\_ засідання кафедри

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

**ДОСЛІДЖЕННЯ МЕХАНІЗМІВ МОДУЛЯЦІЇ СКОРОЧУВАЛЬНОЇ  
АКТИВНОСТІ МІОМЕТРИЯ ЩУРІВ ЗА БЛОКУВАННЯ НАТРІЄВОЇ  
ПОМПИ КАЛІКС[4]АРЕНОМ С-1220**

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра  
студентки спеціальності 091 Біологія

ОП: «Біологія (високі технології)»

**Кравець Надії Ярославівни**

Науковий керівник

професор кафедри молекулярної

біотехнології та біоінформатики

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

Оцінка захисту роботи

---

## АНОТАЦІЯ

Кравець Н. Я. Дослідження механізмів модуляції скорочувальної активності міометрія щурів за блокування натрієвої помпи калікс[4]ареном С-1220. – Випускна кваліфікаційна робота бакалавра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Біологія (високі технології)». У роботі було проведено дослідження спонтанних і викликаних за шляхами електро- і фармакомеханічного спряження скорочень міометрія щурів на тлі калікс[4]арену С-1220 (10  $\mu\text{M}$ ), структурного аналога калікс[4]арену С-99, для якого попередньо виявлено здатність блокувати  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРазу плазматичної мембрани. Встановлено, що калікс[4]арен С-1220 активує спонтанні скорочення та збільшує окремі механокінетичні параметри скорочень, включаючи силові ( $F_{\text{max}}$ ,  $F_{\text{C}}$  та  $F_{\text{R}}$ ), швидкісні ( $V_{\text{C}}$  і  $V_{\text{R}}$ ) та імпульсні ( $I_{\text{C}}$ ,  $I_{\text{R}}$  та  $I_{\text{max}}$ ). Виявлено, що зміна швидкісних параметрів спонтанних скорочень не є специфічною для  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем міоцитів, оскільки нормування  $V_{\text{C}}$  і  $V_{\text{R}}$  на амплітуду скорочень нівелює їх відмінності від контрольних показників. При передінкубації м'язових препаратів матки за умов впливу калікс[4]арену С-99 спостерігається аналогічне зростання силових, швидкісних та імпульсних параметрів. Калікс[4]арен С-1220 суттєво змінює параметри нормованих максимальних швидкостей  $V_{nc}$  і  $V_{nr}$  скорочувальних відповідей міометрія, активованих окситоцином і ацетилхоліном, не впливаючи на амплітуду скорочень. Він знижує тонічний компонент скорочення, індукований гіперкалієвим розчином, та підвищує нормовану максимальну швидкість фази скорочення ( $V_{nc}$ ). Результати дослідження свідчать про значний вплив калікс[4]арену С-1220 на скорочувальну активність міометрія, що може бути використано для розробки нових підходів до регуляції скорочувальної активності гладеньких м'язів.

**Ключові слова:**  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТР-аза, калікс[4]арен С-1220, скорочувальна активність, тензометрія, гладенькі м'язи, фармакомеханічне та електромеханічне спряження.

## ABSTRACT

Kravets N. Investigation of the mechanisms of modulation of the contractile activity of rat myometrium by blocking the sodium pump with calix[4]arene C-1220. – Bachelor's thesis in the specialty 091 Biology, Educational Program «Biology (High Technologies)». The study investigated spontaneous and electro- and pharmacomechanically induced contractions of rat myometrium in the presence of calix[4]arene C-1220 (10  $\mu$ M), a structural analog of calix[4]arene C-99, which has previously been shown to block  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase of the plasma membrane. It was found that calix[4]arene C-1220 activates spontaneous contractions and increases certain mechanokinetic parameters of contractions, including force ( $F_{\max}$ ,  $F_C$  and  $F_R$ ), velocity ( $V_C$  and  $V_R$ ), and impulse ( $I_C$ ,  $I_R$  and  $I_{\max}$ ). It was also found that the change in the speed parameters of spontaneous contractions is not specific to myocyte  $\text{Ca}^{2+}$ -transport systems, since the normalization of  $V_C$  and  $V_R$  to the amplitude of contractions eliminates their differences from the control values. During the preincubation of uterine muscle preparations under the influence of calix[4]arene C-99, a similar increase in force, velocity, and impulse parameters was observed. Calix[4]arene C-1220 significantly changes the parameters of normalized maximum velocities  $V_{nc}$  and  $V_{nr}$  of myometrial contractile responses activated by oxytocin and acetylcholine without affecting the amplitude of contractions. It reduces the tonic component of the contraction induced by hyperpotassium solution and increases the normalized maximum velocity of the contraction phase ( $V_{nc}$ ). The results of the study indicate a significant effect of calix[4]arene C-1220 on the contractile activity of the myometrium, which can be used to develop new approaches to the regulation of smooth muscle contractile activity.

**Key words:**  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, calix[4]arene C-1220, contractile activity, strain gauge, smooth muscle, pharmacomechanical and electromechanical coupling.

## ЗМІСТ

ВСТУП .....	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1. Клітинний склад тканини міометрія .....	7
1.2. Спонтанна скорочувальна активність міометрія: ймовірні механізми ..	9
1.3. Властивості $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФази плазматичної мембрани, її ізоформи та значення у підтриманні збудливості клітин міометрія .....	12
1.4. Фізико-хімічні властивості калікс[4]аренів; біохімічні властивості калікс[4]аренів-інгібіторів $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФази (С-107 і С-99) та класичного інгібітора убаїну .....	14
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	18
2.1. Метод тензометрії (в ізометричному режимі реєстрації) .....	18
2.2. Кінетичний аналіз викликаних скорочень.....	18
2.3. Кінетичний аналіз спонтанних скорочень.....	19
2.4. Статистична обробка .....	20
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	23
3.1. Дослідження механізмів модуляції скорочувальної активності міометрія щурів за блокування натрієвої помпи калікс[4]ареном С-1220..	23
3.2. Повний механокінетичний аналіз спонтанної скорочувальної активності міометрія щурів за дії калікс[4]арену С-99 .....	28
3.3. Викликані за шляхом фармакомеханічного спряження скорочення міометрія щурів за дії калікс[4]арену С-1220 .....	31
3.4. Вивчення закономірностей впливу калікс[4]арену С-1220 на викликані за шляхом електромеханічного спряження збудження-скорочення реакції міометрія щурів .....	35
ВИСНОВКИ.....	38
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	40

## ВСТУП

Трансмембранний градієнт одновалентних катіонів, який забезпечує  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-аза, є важливим для основних процесів життєдіяльності, таких як водно-сольовий обмін, генерація збудження, і регуляція метаболізму клітин. Доведено, що експресія генів, клітинний ріст, апоптоз, проліферація, рухливість, кров'яний тиск і серцеві скорочення регулюються за участю цього ензиму [1].  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-аза відіграє ключову роль у контролі скорочувальної активності гладеньких м'язів [2].

Багато досліджень вказують на перспективу використання макроциклічних олігомерів фенолів — каліксаренів, як селективних регуляторів  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази. Каліксарени можуть без труднощів проникати через плазматичні мембрани клітин і показують потенціал для розробки нових селективних інгібіторів та активаторів внутрішньоклітинних біохімічних процесів завдяки їхній здатності зворотно змінювати функціональну активність певних білків [3–10]. У відділі біохімії м'язів Інституту біохімії було встановлено, що калікс[4]арен С-1220, аналог калікс[4]арену С-99, інгібує активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази плазматичної мембрани.

Таким чином, **метою** цієї роботи було з'ясувати механізми модуляції скорочувальної активності міометрія шурів за блокування  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази калікс[4]ареном С-1220.

Відповідно до мети було поставлено наступні **завдання**:

1. На багатоклітинних препаратах міометрія дослідити спонтанну скорочувальну активність міометрія за дії С-1220; провести повний механокінетичний аналіз;
2. Здійснити дослідження викликаних деполяризацією плазматичної мембрани ( $\text{K}^+$ -деполяризація) скорочень міометрія на тлі калікс[4]арену С-1220 ;

3. Здійснити дослідження викликаних за шляхом фармакомеханічного спряження скорочень міометрія на тлі калікс[4]арену С-1220.

Протягом виконання роботи були використані **методи**: тензометрії в ізометричному режимі реєстрації; механокінетичний аналіз та статистичні методи обробки даних.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Клітинний склад тканини міометрія

Міометрій є функціональним синцитієм. Фізіологічною одиницею скорочення в м'язах матки є окремі гладенькі м'язи. Гладенькі м'язи матки — це видовжені клітини з центрально розташованим ядром і плазматичною мембраною, яка виконує роль бар'єра між позаклітинним і внутрішньоклітинним середовищами. Ці м'язи мають неправильну форму, їхній розмір коливається між 5-10 мкм в діаметрі й 300-600 мкм в довжину [11]. В ультраструктурі гладеньких м'язів виявлено дві значні модифікації — саркоплазматичний ретикулум і скоротливий апарат. У гладеньких м'язах матки скорочення відбувається завдяки взаємодії товстих і тонких міофіламентів. Ідентифіковано три різних типи філаментів [12-14]. Цитоплазма гладеньких м'язів містить нитки міозину, тропоміозину, філаміну, кальдесмону та проміжні нитки, що складаються з віментину та десміну, які утворюють цитоскелет [15]. Розташування міофіламентів є випадковим, що протидіє швидкості розвитку сили в клітинах посмугованих м'язів. Саркоплазматична сітка в матці не розвинена, але в цій ділянці присутня густа мережа мішечків і каналців, а в саркоплазматичній мембрані виявлено кальцій [16]. Після естрогенної терапії в ендоплазматичному ретикулумі гладеньких м'язів матки зростає значення шорсткої ендоплазматичної сітки та збільшується швидкість синтезу білків. Інші важливі клітинні органели, такі як мітохондрії, ядра і апарат Гольджі, також знаходяться в цьому регіоні [17,18].

Гладенькі м'язи матки містять щілинні з'єднання, які присутні майже у всіх тканинах. При розгляді під електронним мікроскопом ці щілинні з'єднання виглядають як дві мембрани, з'єднані між собою з невеликим проміжком у 2-3 нм. Вони складаються з великої кількості каналів. М'язи

матки містять білок сх-43 масою 43kDa, який відповідає за формування цих каналів. Вони складаються з невеликих молекул, неорганічних іонів, амінокислот і комплексів [19,20].

Щілинні з'єднання у м'язах матки допомагають клітинам працювати метаболічно та електрично. Гладенькі м'язи матки проявляють спонтанну активність, яка характеризується реполяризацією та депольаризацією. Плазматична мембрана гладеньких м'язів має різницю потенціалів близько — 70 мВ у стані спокою, яка знижується під час депольаризації через збільшення проникності для  $\text{Ca}^{2+}$  і  $\text{Na}^+$  [21].

В міометрії наявні стовбурові клітини. Тканинно-специфічні дорослі соматичні стовбурові клітини міометрія допомагають у ремоделюванні тканин, хоча вони не мають специфічних маркерів, їх не можна легко визначити та ідентифікувати через їх дефіцит, вивчено, що Oct-4/CD44/Nanog можуть слугувати маркерами клітинної поверхні для ідентифікації підмножини клітин міометрія щурів. Ці клітини демонструють характеристики стовбурових клітин, а їх кількість збільшується з репродуктивною зрілістю та підвищенням рівня естрогену і прогестерону в сироватці крові, що вказує на наявність стовбурових клітин міометрія, які також є гормонозалежними [22,23]. Повна характеристика цих клітин допоможе зрозуміти механізми, що беруть участь у фізіологічній регенерації жіночого репродуктивного апарату [22,24].

Телоцити — це різновид інтерстиціальних клітин, які співіснують з клітинами міометрія. Це невеликі структури овальної або трикутної форми, які діють як каркас, що допомагає під час відновлення/оновлення тканин. Вони мають специфічні довгі відростки, які називаються телоподами, що з'єднуються з сусідніми клітинами. Ці клітини також містяться в структурі деяких інших органів, таких як серце, скелетні м'язи, певні кровоносні судини, матка, плацента, шлунково-кишковий тракт, тонкий кишківник і легені [25]. Телоцити також відіграють важливу роль у розумінні нормальної фізіології та патології матки. Особливо в скоротливості міометрія та імунних

реакціях. Телоцити можна вважати «гормональними сенсорами» в матці, оскільки вони допомагають у рості та диференціації ендометрію в гормонозалежний спосіб, спричиняючи гіперплазію, яка сприяє міграції клітин та проліферації тканини міометрія.

## 1.2. Спонтанна скорочувальна активність міометрія: ймовірні механізми

Порушена активність міометрія матки у людини є серйозною проблемою для здоров'я. Однак клітинні та тканинні механізми, які підтримують міометрій матки у стані спокою під час вагітності, а також ініціюють і підтримують тривалі скорочення матки під час пологів, вивчені недостатньо.

Електрофізіологія міометрія є складною як з погляду того, як змінюються властивості клітин і тканин під час вагітності, так і з погляду того, як ініціюється і підтримується електрична активність і механічні скорочення. За останні кілька десятиліть були проведені масштабні експериментальні дослідження [26-33] з метою детального вивчення клітинної та тканинної електрофізіології матки. Було показано, що механічні скорочення матки є результатом інтегрованої електрофізіології, біохімії та біомеханіки гладеньком'язових клітин матки в тканині міометрія та їх синхронізації з механічно пасивною підтримувальною тканиною та її архітектурою.

Координовані скорочення в м'язовому органі, як правило, ініціюються і підтримуються ділянкою клітин-пейсмейкерів, які модулюють біоелектричні сигнали. Органи з гладенькими м'язами, такі як матка, скорочуються зі значно меншою частотою, ніж серце (порядок хвилин, а не секунд), але скорочення можуть підтримуватися протягом більш тривалих періодів. У шлунково-кишковій системі функція електричного кардіостимулятора координується інтерстиціальними клітинами Кахаля (ICCs),

спеціалізованими нейронними інтерстиціальними клітинами, які опосередковують координоване скорочення [34]. Подібні клітини були ідентифіковані в матці, названі міометріальними клітинами Кахалія (ICLCs). Їх розсіяне розташування по всьому міометрію матки вказує на те, що замість конкретної ізольованої ділянки водія ритму потенціали дії виникають в різних точках по всьому органу [35]. Електрична активність, необхідна для забезпечення інтенсивних, координованих переймів, стає можливою завдяки збільшенню кількості щілинних з'єднань, що забезпечує низький опір шляху активації по всій тканині [36]. Попри критично важливу роль матки, особливо під час вагітності, і докази унікальних особливостей її електрофізіологічної функції, електрофізіологія матки недостатньо вивчена і потребує активних досліджень, порівняно з електрофізіологією серця або шлунково-кишкового тракту.

Під час скорочення головка міозину зв'язується з актиноюю ниткою, що призводить до перехресної циклічності та створення напруги при русі міозинової нитки вздовж актинової нитки [37]. Щоб ініціювати цей процес, перехідний пік кальцію ( $\text{Ca}^{2+}$ ) безпосередньо передує піку виробництва сили під час скорочення. Цей  $\text{Ca}^{2+}$  зв'язується з кальмодуліном, викликаючи активацію кінази легких ланцюгів міозину (MLCK) та ініціюючи цикл перехресного містка [38]. Ця пряма дія зв'язування кальцію з кальмодуліном у гладеньком'язових клітинах відрізняється від серцевих або скелетних посмугованих м'язових клітин, які потребують проміжних продуктів, таких як тропонін, для прикріплення головок міозину. У гладеньких м'язах дует актин-міозин може перебувати у так званому «стані фіксації» [39], що дозволяє підтримувати форму органу, а також здійснювати скорочення і рух з мінімальними витратами енергії.

На сьогодні існує декілька добре охарактеризованих агоністів/антагоністів скорочення гладких м'язів матки, включаючи блокатори  $\text{Ca}^{2+}$  каналів, окситоцин, прогестерон та атосибан (інгібітор окситоцин-опосередкованого вивільнення інозитолтрифосфату з

міофібрил) [40].

$\text{Ca}^{2+}$  вивільняється із саркоплазматичного ретикулулу через IP3R, підвищуючи внутрішньоклітинну концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  і стимулюючи фосфорилування міозину. Фосфорилування міозину також може запускатися гормонами і активними речовинами через G-протеїн-зв'язані рецептори [41].

Скорочення і розслаблення в міометрії є результатом циклічної деполаризації та реполаризації мембран міофібрил. Деполаризація зумовлена вхідним струмом, який переважно переноситься іонами  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{Na}^+$ , тоді як реполаризація включає вихідний струм через швидкі залежні від напруги іони  $\text{K}^+$  та повільні  $\text{Ca}^{2+}$ -активовані компоненти. Частота та інтенсивність скорочень міометрія визначаються послідовністю та тривалістю потенціалів дії в кожній міофібрилі [42]. Внутрішньоклітинна концентрація  $\text{Ca}^{2+}$   $[\text{Ca}^{2+}]_i$  слугує важливим тригером для скоротливого апарату матки, а потенціали дії міометрія впливають на форму переходу кальцію всередину.

Перетворення хімічних сигналів в електричні на клітинній мембрані має фундаментальне значення для клітинної комунікації. Надходження  $\text{Ca}^{2+}$  в міофібрили міометрія є життєво важливим стимулом для скоротливої активності матки. Важливими  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами є:

1)  $\text{Ca}^{2+}$ -канали L-типу і T-типу, які піддаються  $\text{Ca}^{2+}$ -залежному транспорту завдяки розташуванню потенціалчутливих доменів (заряджених сегментів S4) та відкриттю і закриттю воріт S6 [43].

2) Потенціалкеровані  $\text{Na}^+$ -канали,  $\text{Na}$ -активовані  $\text{K}^+$ -канали, потенціалкеровані  $\text{Na}^+$ -канали та канали витоку  $\text{Na}^+$ , неселективні канали,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза та катіонні канали, що активуються гіперполяризацією.

3) Потенціалзалежні  $\text{K}^+$  канали, двопорові доменні  $\text{K}^+$  канали,  $\text{Ca}^{2+}$ -активовані  $\text{K}^+$  канали з великою, малою та проміжною провідністю [44].

Електрична сигналізація у збудливих клітинах, таких як м'язи, нейрони та ендокринні клітини, включає генерацію та проведення потенціалів дії за допомогою потенціалкерованих  $\text{Na}^+$  каналів. Збільшення вхідного потоку

іонів натрію ( $\text{Na}^+$ ) викликає деполяризацію мембрани і призводить до більш збудливого і скоротливого стану матки через відкриття потенціалкерованих  $\text{Ca}^{2+}$  каналів. І навпаки, збільшення вихідного потоку  $\text{K}^+$  призводить до більш негативного мембранного потенціалу, що сприяє спокою. Потенціалкеровані  $\text{Na}^+$ -канали відіграють важливу роль у багатьох фізіологічних процесах, контролюючи потенціали дії у збудливих тканинах. Феррейра та ін. (2021) припустили, що в міометрії матки натрієва сигналізація через взаємодію  $\text{Na}^+$ -активованого  $\text{K}^+$ -каналу і неселективного каналу витоку  $\text{Na}^+$  дозволяє цим каналам функціонально регулювати мембранний потенціал міометрія, впливаючи на збудливість і скоротливість. Комбінована дія цих двох каналів регулює збудливість матки, а зниження цієї дії активує скоротливість матки. Таким чином, деполяризація мембранного потенціалу спокою міометрія необхідна для переходу матки зі стану спокою в скоротливий стан [45].

1.3. Властивості  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази плазматичної мембрани, її ізоформи та значення у підтриманні збудливості клітин міометрія

Згідно з класифікацією ензимів,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза, що є інтегральним мембранним іон-транспортуючим білком, належить до сімейства транслоказ, які використовують енергію від гідролізу АТФ для транспорту іонів.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза існує у вигляді димеру, що складається з  $\alpha$  і  $\beta$  субодиниць, які мають чотири і три тканиноспецифічні ізоформи відповідно [46,47,48,49,50].

$\alpha$ -субодиниця є каталітичною частиною ферменту і, таким чином, виконує всі процеси, пов'язані з транспортом іонів  $\text{Na}^+$  та  $\text{K}^+$  через плазматичну мембрану клітини. Вона складається з трансмембранної та цитоплазматичної частин, другу з яких можна поділити на актуаторну (А), нуклеотидзв'язуючу (N) та фосфорилуючу (P). Просторова структура трансмембранного домену складається з 10  $\alpha$ -спіралей і є дуже гомологічною до тривимірної структури трансмембранного домену іншої АТФази — сарко/ендоплазматичної ретикулярної  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФази [51].

$\beta$ -субодиниця впливає на спорідненість іонів  $\text{Na}^+$  та  $\text{K}^+$  до їхніх сайтів зв'язування [52] та підвищує рівень трансляції  $\alpha$ -субодиниці [53].  $\beta$ -субодиниця складається з позаклітинного домену та однієї трансмембранної спіралі, яка взаємодіє з трансмембранними спіралями  $\text{M}_7$  та  $\text{M}_{10}$   $\alpha$ -субодиниці. Позаклітинний домен  $\beta$ -субодиниці містить три сайти глікозилювання [54,55], в яких залишки аспарагіну глікозилюються олігосахаридами, що містять N-ацетилглюкозамін, манозу і частково галактозу [56]. Рівень глікозилювання  $\beta$ -субодиниці впливає на її згортання та подальшу транслокацію в плазматичну мембрану клітини [57]. Крім того,  $\beta$ -субодиниця також захищає  $\alpha$ -субодиницю від деградації, оскільки  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза транслокується до плазматичної мембрани клітини лише у вигляді гетеродимерного комплексу  $\alpha/\beta$  [58,59]. Однак рівень глікозилювання  $\beta$ -субодиниці має значення не лише для вищезгаданих процесів, але й відіграє значну роль в інших подіях, таких як клітинна адгезія та поляризація. Повідомлялося, що в поляризованих гепатоцитах  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза після деглікозилювання  $\beta$ -субодиниці транслокується в апікальну, а не базолатеральну мембрану [60]. Спрямування  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази на базолатеральну мембрану є важливим, оскільки дві сусідні клітини здатні утворювати щільні з'єднання через взаємодію  $\beta$ -субодиниць [61].

Попри те, що  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза зазвичай присутня у вигляді гетеродимеру  $\alpha$  і  $\beta$  субодиниць, в деяких випадках клітини виробляють одну додаткову субодиницю, позначену як FX $\gamma$ D. Субодиниця FX $\gamma$ D включає загалом сім ізоформ, які в усіх випадках утворені однією  $\alpha$ -спіраллю. Експресія субодиниці FX $\gamma$ D є високоспецифічною лише для деяких тканин, переважно нирок, серця та м'язів.

Інша роль субодиниці FX $\gamma$ D полягає у стабілізації  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази в плазматичній мембрані клітини через взаємодію з фосфатидилсерином [62]. Індивідуальна ізоформа субодиниці FX $\gamma$ D модулює активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази залежно від спорідненості іонів  $\text{Na}^+$  та  $\text{K}^+$  до неї.

Як зазначалося вище, основна роль  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази полягає у

підтримці гомеостазу концентрації іонів  $\text{Na}^+$  та  $\text{K}^+$ , завдяки чому вона робить значний внесок в осморегуляцію та підтримання мембранного потенціалу спокою. Крім того, функція  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази пов'язана з клітинною сигналізацією, що є результатом її взаємодії з серцевими стероїдами. Серцеві стероїди — це речовини стероїдної природи, які природним чином містяться в різних рослинах, переважно з роду наперстянки, та організмах. Однак існують також ендогенні серцеві стероїди, такі як убаїн і дигідроубаїн [63]. Ендогенні серцеві стероїди, ймовірно, є причиною того, що  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза містить у своїй структурі сайт зв'язування для цих сполук, які наш організм виробляє в пікомолярних і низьких наномолярних концентраціях. За таких низьких концентрацій  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза не пригнічується, а навпаки, її активність стимулюється, або ж вона може діяти як сигнальний перетворювач. Стимуляція активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази була виявлена ізоформоспецифічно, тобто найбільш чутливою до цієї стимуляції була  $\alpha_2$  ізоформа [64].

Давно відомо, що певна частина  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази зв'язується з нерецепторною тирозинкіназою, кавеоліном та рецептором епідермального фактора росту, які разом утворюють сигналоому в кавеолах цитоплазматичної мембрани. У такому випадку  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза втрачає свою транспортну функцію і, навпаки, здобуває сигнальну функцію [65,66]. Активні форми кисню відіграють певну роль у передачі сигналу від  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази до нерецепторної тирозинкінази і, таким чином, ймовірно, утворюють самопідсилювальну петлю.

1.4. Фізико-хімічні властивості калікс[4]аренів; біохімічні властивості калікс[4]аренів-інгібіторів  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази (С-107 і С-99) та класичного інгібітора убаїну

Натрій-калієвий насос ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза) відповідає за створення градієнтів концентрації  $\text{Na}^+$  і  $\text{K}^+$  через плазматичну мембрану і тому відіграє

важливу роль, наприклад, у генеруванні потенціалів дії. Серцеві глікозиди, які вже понад 2 століття призначають при застійній серцевій недостатності, є ефективними інгібіторами цієї АТФ-ази.

Убаїн, отриманий з рослини *Strophanthus gratus*, представляє клас серцевих глікозидів, які застосовуються для лікування застійної серцевої недостатності та надшлуночкових аритмій вже понад 200 років. Вони пригнічують активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази й тим самим підвищують внутрішньоклітинну концентрацію  $\text{Na}^+$ , що, своєю чергою, уповільнює обмін  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , що призводить до підвищення внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  і сильнішого скорочення м'язів [67]. Однак їхній терапевтичний індекс є низьким, і тому ведеться активний пошук структурної інформації про їхнє зв'язування.

Убаїн — ендогенний кардіотонічний стероїд, який відіграє важливу роль у здоров'ї та хворобах, він регулює все, починаючи від серцево-судинної функції до метаболізму та росту клітин [68].  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза відіграє життєво важливу роль у регуляції мембранного потенціалу гладеньких м'язів і серця [69]. Каталітична субодиниця цього ферменту,  $\alpha$ , має три ізоформи, виявлені у щурів:  $\alpha_1$  є відносно нечутливою, тоді як  $\alpha_2$  і  $\alpha_3$  відносно чутливі до серцевих глікозидів, таких як убаїн. Як і інші глікозиди [70], убаїн інгібує активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  АТФ-ази шляхом зв'язування з  $\alpha_2$  субодиницею. Припускають, що це інгібування змінює внутрішньоклітинний гомеостаз кальцію  $\text{Ca}^{+2}$  у гладеньких м'язових клітинах, посилюючи таким чином відповіді на агоністи скоротливості [71-74].

Було проведено багато досліджень мутагенезу [75-82] та моделювання. Однак, як саме убаїн зв'язується з АТФ-азою, досі не з'ясовано. Зокрема, він зв'язується з АТФ-азою в різних станах реакційного циклу з різною афінністю. Хоча встановлено, що він з високою афінністю зв'язується з АТФ-азою в E2P-подібних станах, комплекси АТФ-аза-убаїн, утворені в результаті прямої (тобто в присутності АТФ +  $\text{Na}^+$  +  $\text{Mg}^{2+}$ ) і зворотної реакцій, мають різні властивості [83]. Особливо складним є вплив  $\text{K}^+$ , який

прискорює дефосфорилування АТФ-ази й тим самим антагонізує зв'язування убаїну. Проте убаїн зв'язується з АТР-азою навіть у стані  $E2 \cdot 2K^+$ , хоча і з мМ афінністю, і стабілізує оклюзію  $K^+$  [84]. Таким чином, зв'язування в цьому стані є специфічним [83, 84], хоча афінність низька. Клінічно антагонізм між серцевими глікозидами та сироватковим  $K^+$  є добре відомим фактором токсичності серцевих глікозидів. Тому низькоафінна структура у зв'язаному з  $K^+$  стані також важлива, оскільки вона може пролити світло на механізм антагонізму.

Дослідження показують, що макроциклічні сполуки, такі як каліксарени, можуть бути молекулярною платформою для створення потенційно біоактивних сполук. Каліксарени мають структуру з верхнім вінцем, центральним макроциклом з ароматичних аренових фрагментів і нижнім вінцем з гідрокси- чи алкоксигрупами. Каліксарени можуть без труднощів проникати через плазматичні мембрани клітин і показують потенціал для розробки нових селективних інгібіторів та активаторів внутрішньоклітинних біохімічних процесів завдяки їхній здатності зворотно змінювати функціональну активність певних білків. Вони характеризуються низькою токсичністю та імуногенністю, а також легко синтезуються за вже відомими методами. Крім того, каліксарени можна використовувати як аналоги ензимів для моделювання складних ензиматичних процесів [3–10].

Каліксарени є хімічними сполуками з макроциклічною структурою, які мають чашоподібну будову. Схематичну структуру калікс[4]аренів показано на рисунку 1.1.

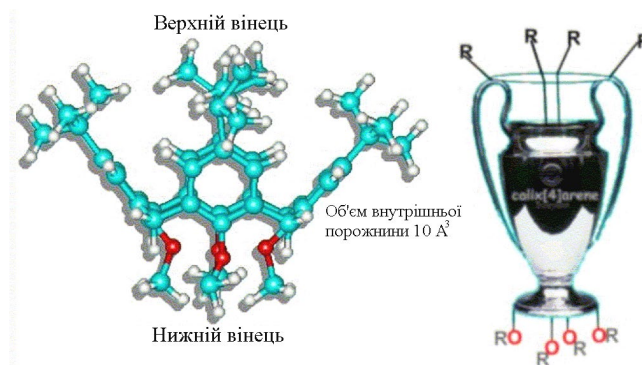


Рисунок 1.1 – Схематична структура калікс[4]аренів [88].

Ці сполуки формуються шляхом циклоконденсації паразаміщених фенолів з формальдегідом [85]. Вони складаються з фрагментів фенолів, які з'єднані метиленовими містками [86, 87].

Раніше було показано, що калікс[4]арени С-99 та С-107 ефективно інгібують ензиматичну активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРази в плазматичній мембрані, не впливаючи при цьому на активність  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРази. Дослідження показали, що ці сполуки пригнічують активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРази дозозалежним чином і набагато ефективніше, ніж уабаїн: значення  $I_{0,5}$  для них менші за 0,1 мкМ, тоді як для уабаїну  $I_{0,5}$  становить 20-30 мкМ. Було встановлено, що структурні компоненти калікс[4]арену С-107 в широкому діапазоні концентрацій майже не впливають на активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРази та  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРази в плазматичній мембрані. Отже, ефект інгібування калікс[4]арену С-107 обумовлений спільною дією двох амінофосфонових груп, орієнтованих на каліксареновій платформі, а не тетрафенольним макроциклом або окремим амінофосфоновим залишком [89].

## РОЗДІЛ 2.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Метод тензометрії (в ізометричному режимі реєстрації)

Тензометричні дослідження проводилися на зразках вісцеральних гладеньких м'язів матки щурів. Для вивчення скорочувальної активності гладеньких м'язів рогів матки використовували препарати, приготовані шляхом поздовжнього розрізання оваріальної частини рогів матки на смужки, залишаючи ендотеліальний шар неушкодженим.

М'язові смужки середнього розміру ( $2 \times 10$  мм) поміщали в робочу камеру об'ємом 2 мл, яка містила проточний розчин Кребса зі швидкістю протікання 5 мл/хв і підтримувалася при температурі  $37^{\circ}\text{C}$ . Препарату був наданий пасивний натяг у 10 мН і його залишали на годину для досягнення стабільної відтворюваності спонтанних скорочень, після чого ці скорочення реєстрували й аналізували. Скорочувальну активність досліджували в ізометричному режимі з використанням тензометричного датчика сили, а сигнали фіксували за допомогою аналого-цифрового перетворювача.

Підготовка зразків та тензометричні експерименти проводилися у розчині Кребса, який складався з: 5,9 KCl; 1,2  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 15,5  $\text{NaHCO}_3$ ; 120,4 NaCl; 2,5  $\text{CaCl}_2$ ; 1,2  $\text{MgCl}_2$ ; 11,5 глюкоза; значення рН розчину становило 7,4.

Експерименти проводилися за такою схемою: після 20-хвилинної передінкубації з калікс[4]ареном C-1220 (10 мкМ) спонтанні скорочення реєстрували протягом 10-20 хвилин для механокінетичного аналізу.

#### 2.2. Кінетичний аналіз викликаних скорочень

Ми вивчали механокінетичні параметри скорочень міометрія щурів, використовуючи активатори скорочень з різними механізмами дії: деполяризацію плазматичної мембрани гладеньких м'язових клітин. А за

допомогою гіперкалієвого розчину (80 мМ), активацію окситоцинових рецепторів — утеротоніком окситоцином (0,1 МО) та стимуляцію мускаринових холінорецепторів — нейротрансмітером ацетилхоліном ( $10^{-5}$  М). Також важливо, що в цій тканині обидва згадані агоністи активують рецептори, пов'язані з  $G_{q/11}$ -білками, і викликають скорочення через ІТФ-залежний шлях [90].

Встановлено, що препарати міометрія при  $K^+$ -індукованій деполяризації (80 мМ) демонструють скоротливу відповідь із такими середніми кінетичними параметрами: нормована максимальна швидкість фази скорочення  $V_{nc} = 4,03 \pm 0,54$  хв $^{-1}$  ( $n = 7$ ); нормована максимальна швидкість фази розслаблення  $V_{nr} = 0,52 \pm 0,06$  хв $^{-1}$  ( $n = 7$ ) [96].

Скорочення міометрія, викликані окситоцином (0,1 МО), характеризуються такими кінетичними параметрами: швидкість фази скорочення  $V_{nc} = 3,31 \pm 0,59$  хв $^{-1}$  ( $n = 9$ ); швидкість фази розслаблення  $V_{nr} = 0,23 \pm 0,05$  хв $^{-1}$  ( $n = 9$ ). Скорочення міометрія, спричинені аплікацією ацетилхоліну ( $10^{-5}$  М) в нормальному розчині Кребса, мали такі кінетичні параметри: швидкість фази скорочення  $V_{nc} = 3,67 \pm 0,47$  хв $^{-1}$  ( $n = 6$ ); швидкість фази розслаблення  $V_{nr} = 0,24 \pm 0,13$  хв $^{-1}$  ( $n = 6$ ) [96].

### 2.3. Кінетичний аналіз спонтанних скорочень

Маткові труби мають ділянки з джерелами спонтанної активності в цервікальному та оваріальному відділах. Наукова група під керівництвом К. В. Казаряна [91-93] виявила, що основним джерелом ритму в маткових трубах є оваріальний відділ. Окситоцин, головний утеротонічний гормон, сприяє домінуванню оваріального відділу та координації функціонування всіх ритмогенних ділянок міометрія [93]. Регуляція збудливості та скоротливої активності гладеньких м'язів матки забезпечує підтримку фертильності, здатність виношувати плід і проходження пологів [94, 95]. Згідно зі статистикою, щонайменше половина випадків смерті

новонароджених у світі пов'язана з передчасними пологами, причиною яких є порушення регуляції напруження гладеньких м'язів і процесів скорочення-розслаблення міометрія.

Раніше були отримані усереднені кінетичні параметри спонтанних скорочень позовжніх гладеньких м'язів міометрія щурів ( $n = 12$ ) лінії Wistar (вік тварин 3-5 місяців), вони наведені нижче у таблиці 2.1 [96]. Також був проведений кінетичний аналіз циклів скорочення-розслаблення спонтанних скорочень. Середні показники нормованих максимальних швидкостей цих скорочень становили  $V_{nc} = 8,42 \pm 0,39 \text{ хв}^{-1}$  ( $n = 28$ ) та  $V_{nr} = 3,13 \pm 0,18 \text{ хв}^{-1}$  ( $n = 37$ ).

Таблиця 2.1 – Кінетичні параметри спонтанних скорочень позовжніх гладеньких м'язів міометрія щурів лінії Wistar [96].

<b>Параметр спонтанних скорочень</b>	<b><math>M \pm m</math></b>
Кількість скорочень/10 хв	$13,0 \pm 0,7$
Амплітуда, мН	$7,2 \pm 0,6$
Тривалість маткового циклу, с	$47,2 \pm 1,7$
Тривалість циклу скорочення-розслаблення, с	$25,2 \pm 1,0$
Тривалість фази скорочення, с	$9,07 \pm 0,36$
Тривалість фази розслаблення, с	$15,80 \pm 0,95$
Тривалість пауз між скороченнями, с	$22,0 \pm 1,4$
Коефіцієнт асиметрії	$0,57 \pm 0,05$
Середня швидкість спаду сили фази скорочення ( $f_{max}/t$ ), мН/хв	$47,7 \pm 3,5$
Середня швидкість спаду сили фази розслаблення ( $f_{max}/t$ ), мН/хв	$27,6 \pm 1,1$
Індекс скоротливої активності в одиницях Монтевідео, ум. од.	$94,1 \pm 6,0$
Індекс скоротливої активності в Олександрійських одиницях, ум. од.	$2364,3 \pm 94,5$

#### 2.4. Статистична обробка

Аналіз механокінетичних характеристик скорочення-розслаблення гладеньких м'язів в умовах *in vitro* є ключовим для розуміння механізмів електро- і фармакомеханічного спряження та оцінки впливу різних

фізіологічно активних і фармакологічних сполук на скоротливу активність. Типова механокінетична крива  $f = f(t)$  в ізометричному режимі реєстрації скоротливої активності процесу скорочення-розслаблення гладеньких м'язів має складну форму. Вона характеризується двома точками перегину:  $F_C$ ;  $\tau_C$  під час фази скорочення та  $F_R$ ;  $\tau_R$  під час фази розслаблення, де  $F$  і  $\tau$  — це відповідно значення сили  $f$  і часу  $t$  в точках перегину ( $(d^2f/dt^2)\tau_C, \tau_R = 0$ ). Також на кривій присутня точка екстремуму, яка відповідає максимуму  $F_{\max}$  сили  $f$  у момент часу  $t = \tau_0$  ( $(df/dt), \tau_0 = 0$ ).

Повний профіль спонтанних циклів скорочення-розслаблення вивчався за допомогою багатопараметричного емпіричного методу комплексного механокінетичного аналізу. Цей метод включає розрахунок часових ( $\tau_0, \tau_C$  і  $\tau_R$ ), силових ( $F_{\max}, F_C$  та  $F_R$ ), швидкісних ( $V_C$  і  $V_R$ ), та імпульсних параметрів ( $I_{\max}, I_C$  та  $I_R$ ). За цим методом одиничні спонтанні скорочення переводили в лінійні координати  $\left[ \ln\left(\frac{f_R}{f_C}\right); \ln\left(1 + \frac{\Delta t}{t}\right) \right]$ , де  $f$  і  $t$  — миттєві значення сили та часу під час фаз скорочення (позначено як «С») і розслаблення (позначено як «R») скоротливого циклу.  $F_C$  і  $F_R$  — відповідно значення сили в точках перегину механограми під час фаз скорочення (від початку збільшення сили до її максимального значення  $F_{\max}$ ) і розслаблення (від максимуму сили  $F_{\max}$  до її повернення до базального рівня).  $\tau_C$  і  $\tau_R$  — характеристичний час фаз скорочення (час, коли реєструється  $F_C$ ) і розслаблення (час, коли реєструється  $F_R$ );  $\tau_0$  — характеристичний час амплітуди (час, коли реєструється  $F_{\max}$ );  $V_C$  і  $V_R$  — максимальні швидкості фаз скорочення і розслаблення;  $I_{\max}$  — імпульс сили на рівні амплітуди  $F_{\max}$ ;  $I_C$  і  $I_R$  — імпульс сили на рівні максимальних швидкостей скорочення і розслаблення [96].

Аналіз кінетичних закономірностей процесів скорочення-розслаблення проводили із використанням модифікованого методу Костеріна С.О. та Бурдиги Ф.В. [97].

Дані були проаналізовані за допомогою методів варіаційної статистики, використовуючи програми Origin 2018 та Microsoft Excel 365. Для перевірки

того, чи належать вибірки до нормально розподілених сукупностей, застосовували критерій Шапіро-Уїлка. Щоб визначити значущі відмінності між середніми величинами вибірок, використовували t-тест для залежних вибірок або однофакторний дисперсійний аналіз (one-way ANOVA), а для апостеріорного порівняння — тест Бонферроні. Результати вважали достовірними при значенні  $p$  менше ніж 0,05. Для аналізу відповідності даних лінійній функції використовували F-критерій Фішера; коефіцієнти детермінації ( $R^2$ ) становили не менше 0,9. Результати представлені як середнє арифметичне  $\pm$  стандартна похибка середнього,  $n$  — кількість дослідів.

### РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1. Дослідження механізмів модуляції скорочувальної активності міометрія щурів за блокування натрієвої помпи калікс[4]ареном С-1220

Попередньо, науковою групою відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України на препаратах суспензії плазматичних мембран міоцитів матки щурів було встановлено, що калікс[4]арен С-1220 вибірково (порівняно з іншими системами первинного активного іонного транспорту плазматичної мембрани і саркоплазматичного ретикулуму) і суттєво пригнічує активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРази. Калікс[4]арен С-1220 є аналогом сполуки С-99, для якого, як і для відомого блокатора  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРази убаїну, відома здатність індукувати активацію моторики гладеньких м'язів шлунково-кишкового тракту і міометрія щурів, ймовірно шляхом зміни трансмембранного градієнта іонів  $\text{Na}^+$ , з наступним переведенням  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника у реверсний режим функціонування [96]. Тому першою задачею було дослідити спонтанну скорочувальну активність міометрія щурів за дії  $10 \mu\text{M}$  калікс[4]арену С-1220, проаналізувати її механокінетичні параметри, а також здійснити аналогічні дослідження механокінетики циклів скорочення-розслаблення за дії калікс[4]арен С-99 і убаїну.

Аналіз кінетичних закономірностей скорочень (після 15 хв після початку аплікування інгібітора  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРази) здійснювали відповідно до розробленого методу емпіричного багатопараметричного аналізу із розрахунком часових ( $\tau_0$ ,  $\tau_C$  і  $\tau_R$ ), силових ( $F_{\max}$ ,  $F_C$  та  $F_R$ ), швидкісних ( $V_C$  і  $V_R$ ), імпульсних ( $I_C$ ,  $I_R$  та  $I_{\max}$ ) параметрів.

Внесення калікс[4]арену С-1220 в розчин, омиваючий гладеньком'язові препарати, спричиняло активації спонтанних скорочень (Рисунок 3.1). Так, за дії цієї сполуки у концентрації  $10 \mu\text{M}$  спостерігалось підвищення амплітуди скорочень ( $F_{\max}$ ), яка через 15 хв від початку аплікації становила у

середньому  $148,9 \pm 3,1$  % щодо контролю, прийнятим за 100 % ( $n = 5$ ,  $p < 0,01$ ). Також за даних умов спостерігалось суттєве зростання частоти скорочень (у середньому до  $136,4 \pm 4,6$  %,  $n = 5$ ,  $p < 0,05$ ).

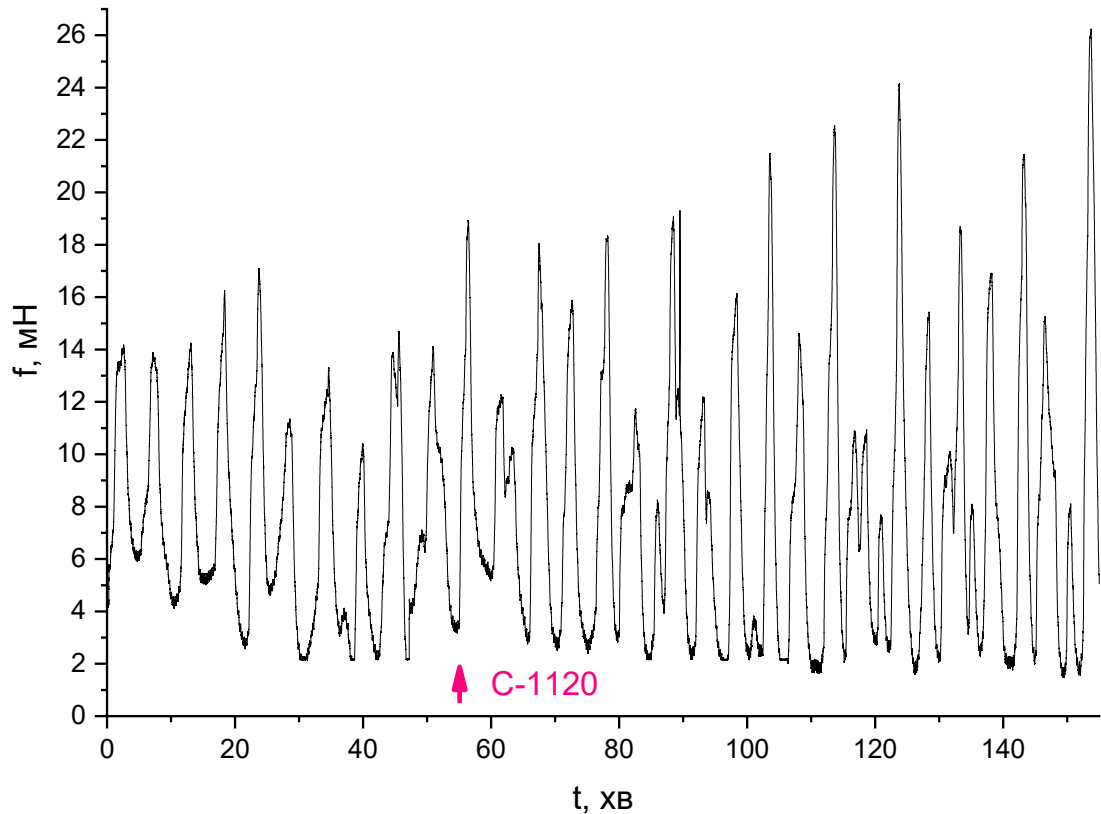


Рисунок 3.1 – Спонтанна скорочувальна активність (за ізометричного режиму реєстрації) міометрія щурів у контролі та на тлі дії калікс[4]арену С-1220 (10  $\mu$ М). Наведено типову механограму. Стрілкою позначено момент внесення С-1220 в омиваючий розчин.

До окремих спонтанних скорочень (у контролі та за дії калікс[4]арену С-1220) було застосовано метод комплексного механокінетичного аналізу. Встановлено, що сполука С-1220 не впливає на часові параметри: зокрема, час амплітуди ( $\tau_{\max}$ ) у середньому становив  $83,7 \pm 6,5$  ( $n = 5$ ,  $p > 0,05$ ), та характеристичні часи фаз скорочення ( $\tau_C$ ) і розслаблення ( $\tau_R$ ) були на рівні відповідно  $72,4 \pm 10,7$  ( $n = 5$ ,  $p > 0,05$ ) та  $99,7 \pm 3,7$  % ( $n = 5$ ,  $p > 0,05$ ) відносно відповідних контрольних параметрів (Рисунок 3.2 А).

За дії калікс[4]арену C-1220 суттєво зростала не лише амплітуда ( $F_{\max}$ ), але і інші силові параметри (Рисунок 3.2 Б): зокрема параметри сили, при якій має місце максимальна швидкість фази скорочення ( $F_C$ ) становив у середньому  $131,5 \pm 4,5 \%$  ( $n = 5, p < 0,01$ ) та сили, при якій має місце максимальна швидкість фази розслаблення ( $F_R$ ) у середньому складав  $151,9 \pm 3,5 \%$  ( $n = 5, p < 0,01$ ) порівняно з відповідними контрольними показниками.

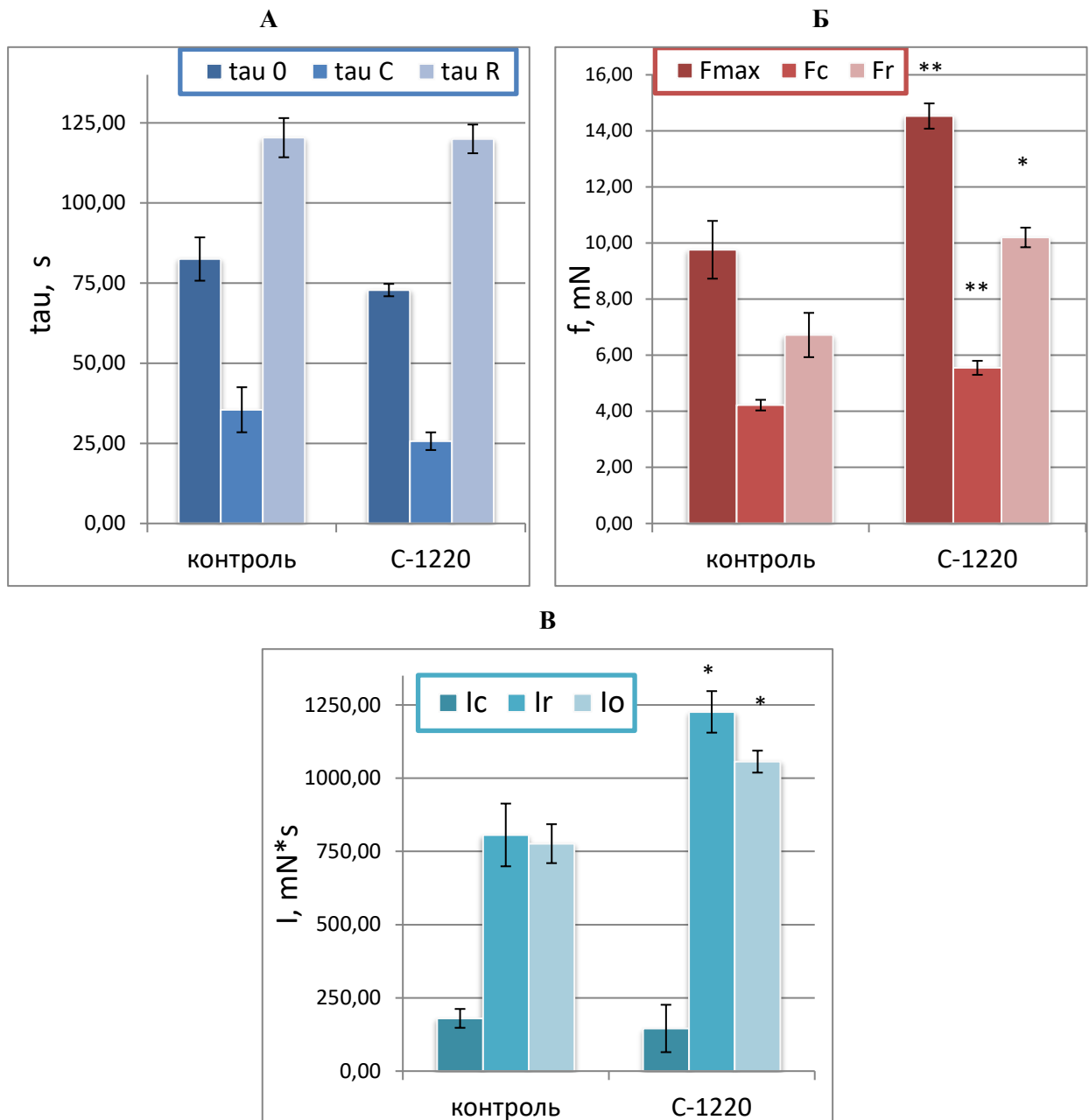


Рисунок 3.2 – Параметри спонтанної скорочувальної активності міометрія щурів у контролі та за попередньої інкубації препаратів на тлі калікс[4]арену

C-1220 (10  $\mu\text{M}$ ): А – часові параметри ( $\tau_0$ ,  $\tau_C$  і  $\tau_R$ ); Б – силові параметри ( $F_{\text{max}}$ ,  $F_C$  та  $F_R$ ); В – імпульсні параметри ( $I_{\text{max}}$ ,  $I_C$  та  $I_R$ ).  
 $n = 5$ ; \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$  – різниця достовірна щодо контролю.

Інший блок механокінетичних параметрів – імпульсні параметри – за дії калікс[4]арену C-1220 змінювалися частково. Так, показник імпульсу сили в точці  $F_C$  ( $I_C$ ) зберігався на рівні контролю і у середньому складав  $80,9 \pm 14,9$  % ( $n = 5$ ,  $p > 0,05$ ). Показник імпульсу сили в точці  $F_R$  ( $I_R$ ) щодо контролю суттєво зростав і становив у середньому  $152,1 \pm 8,8$  % ( $n = 5$ ,  $p < 0,05$ ) щодо контролю, прийнятого за 100 %. Також достовірно збільшувався параметр імпульсу сили в точці амплітуди спонтанного скорочення ( $I_{\text{max}}$ ), який у середньому досягав  $136,1 \pm 3,5$  % ( $n = 5$ ,  $p < 0,05$ ) щодо контрольного значення (Рисунок 3.2 В).

Важливими параметрами, які дозволяють передбачати зміни функціонування систем пасивного і активного транспорту іонів  $\text{Ca}^{2+}$ , є швидкісні параметри. У нашому дослідженні були визначені абсолютні показники максимальних швидкостей фаз скорочення ( $V_C$ ) і розслаблення ( $V_R$ ), а також нормовані на амплітуду параметри максимальних швидкостей фаз скорочення ( $V_{\text{nc}}$ ) і розслаблення ( $V_{\text{nr}}$ ). Встановлено, що на тлі 10  $\mu\text{M}$  C-1220 параметри  $V_C$  суттєво зростав у середньому до  $141,3 \pm 4,7$  % ( $n = 5$ ,  $p < 0,05$ ), тоді як  $V_R$  не мав статистично значущих відмінностей від контролю (його середнє значення було  $110,4 \pm 8,0$  %,  $n = 5$ ,  $p > 0,05$ ) (Рисунок 3.3 А).

Використання нормування швидкісних параметрів на амплітуду спричиняло нівелювання ефектів сполуки C-1220 (Рисунок 3.3 Б). За даних розрахунків параметр  $V_{\text{nc}}$  у середньому становив  $92,6 \pm 2,9$  % ( $n = 5$ ,  $p > 0,05$ ), та  $V_{\text{nr}}$  був на рівні  $76,2 \pm 8,2$  % ( $n = 5$ ,  $p > 0,05$ ) щодо контролю.

Аналізуючи отримані результати ми можемо передбачити, що обумовлені калікс[4]ареном C-1220 підвищення амплітуди і частоти спонтанних скорочень є наслідком підвищеного рівня іонів  $\text{Ca}^{2+}$  в міоплазмі

гладеньком'язових клітин (як наслідок індукування порушенням натрієвого концентраційного градієнта реверсного режиму роботи  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника).

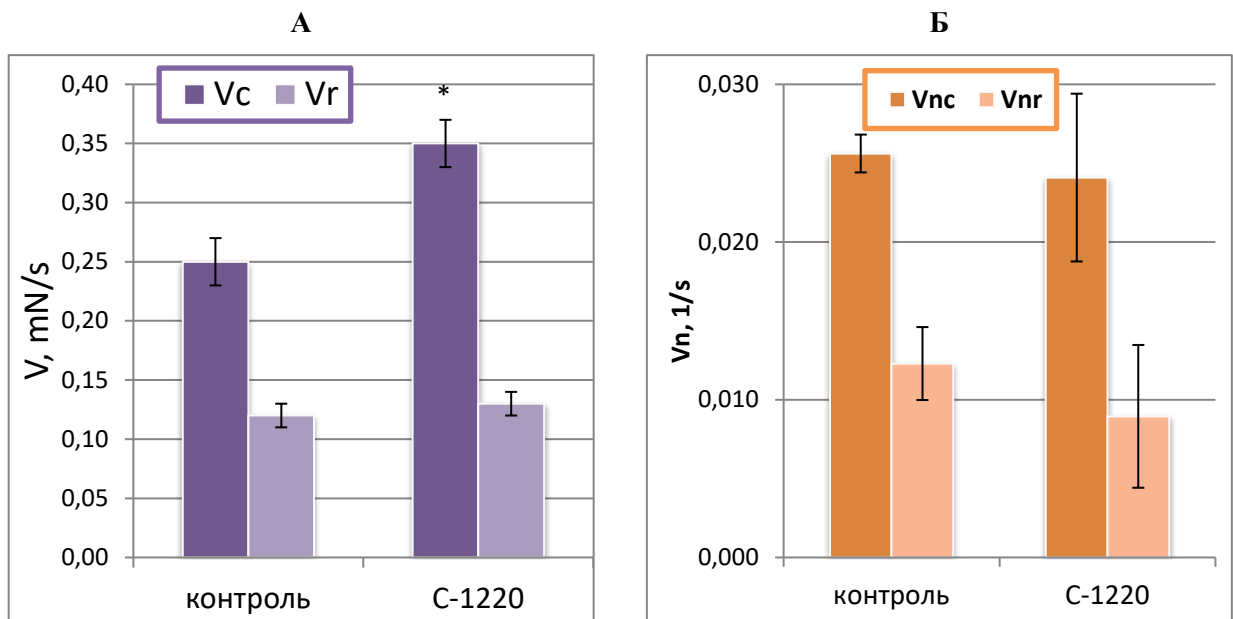


Рисунок 3.3 – Швидкісні параметри спонтанної скорочувальної активності міометрія щурів у контролі та за попередньої інкубації препаратів на тлі калікс[4]арену C-1220 (10  $\mu\text{M}$ ): А – абсолютні максимальні швидкості фаз скорочення і розслаблення (відповідно  $V_C$  і  $V_R$ ); Б – нормовані на амплітуду максимальні швидкості фаз скорочення і розслаблення (відповідно  $V_C$  і  $V_R$ ).

$n = 5$ ; \* -  $p < 0,05$  – різниця достовірна щодо контролю.

Тож оскільки нормовані максимальні швидкості як фази скорочення, так і фази розслаблення спонтанних скорочень за дії C-1220 були на рівні контролю, ймовірно передбачити, що цей калікс[4]арен не має вибіркового впливу на важливі кальцій-транспортуючі протеїни міоцитів матки, а ефекти збільшення силових параметрів обумовлюються зростанням внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  внаслідок порушення кальцієвого обміну при блокуванні  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРази сарколеми.

### 3.2. Повний механокінетичний аналіз спонтанної скорочувальної активності міометрія щурів за дії калікс[4]арену С-99

Оскільки калікс[4]арен С-1220, який є структурно подібним до калікс[4]арену С-99, як і С-99 є інгібітором  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРази плазматичної мембрани міометрія, а також калікс[4]арени С-99 і С-1220 активують спонтанні скорочення міометрія, тож задачею наступного етапу дослідження було здійснення повного механокінетичного аналізу окремих спонтанних циклів скорочення-розслаблення за дії сполуки С-99 (10  $\mu\text{M}$ ).

За ізометричного режиму реєстрації моторики міометрія було встановлено, що калікс[4]арен С-99 спричиняє достовірні зміни окремих спонтанних скорочень: на тлі цієї сполуки мала місце поява складних скорочень та підвищення амплітуди. Так, за дії С-99 у концентрації 10  $\mu\text{M}$  спостерігалось підвищення  $F_{\text{max}}$  скорочень у середньому до  $180,6 \pm 17,1 \%$  ( $n = 6$ ,  $p < 0,01$ ) (Рисунок 3.4).

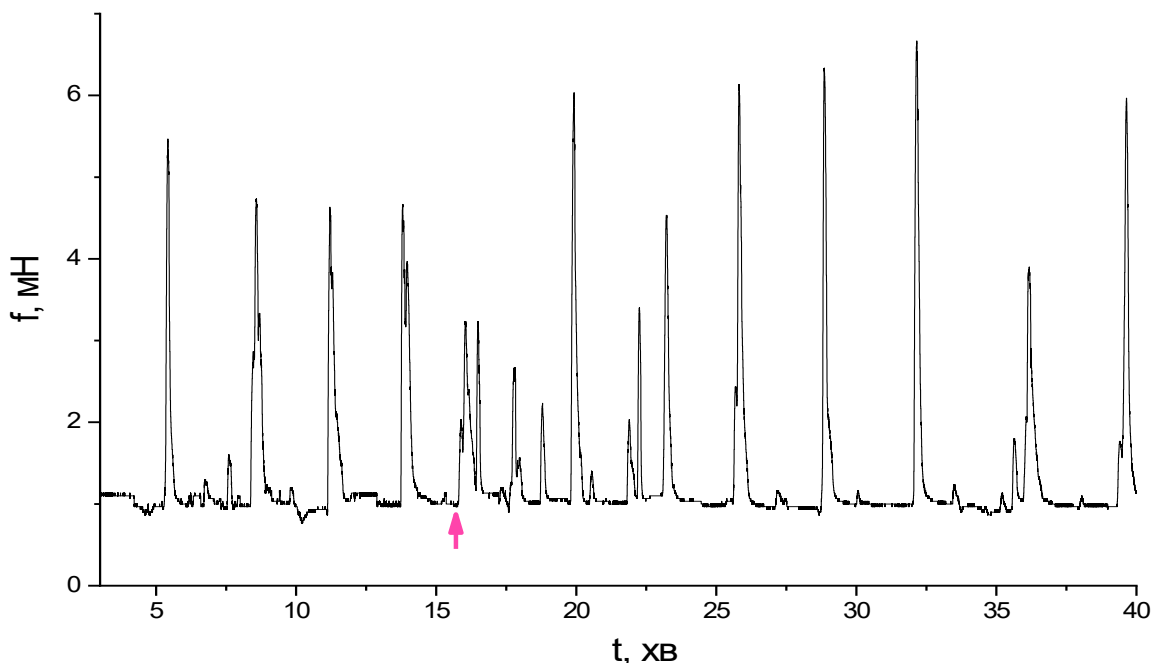


Рисунок 3.4 – Спонтанна скорочувальна активність (за ізометричного режиму реєстрації) міометрія щурів у контролі та на тлі дії калікс[4]арену С-99

(10  $\mu\text{M}$ ). Наведено типову механограму. Стрілкою позначено момент внесення С-99 в омиваючий розчин.

Окремі спонтанні скорочення (у контролі та за дії калікс[4]арену С-99) аналізували методом комплексного механокінетичного аналізу. Було виявлено, що С-99, як і його структурний аналог С-1220, практично не впливає на часові параметри. Так, часовий параметр амплітуди ( $\tau_{\text{max}}$ ) і часу механограми, за якого спостерігалася максимальна швидкість фази скорочення ( $\tau_{\text{C}}$ ), залишалися на контрольних рівнях (Рисунок 3.5 А), а показник часу, за якого спостерігалася максимальна швидкість фази розслаблення ( $\tau_{\text{R}}$ ) виявляв невелике зростання (у середньому до  $122,4 \pm 7,1 \%$ ,  $n = 6$ ,  $p < 0,05$ ).

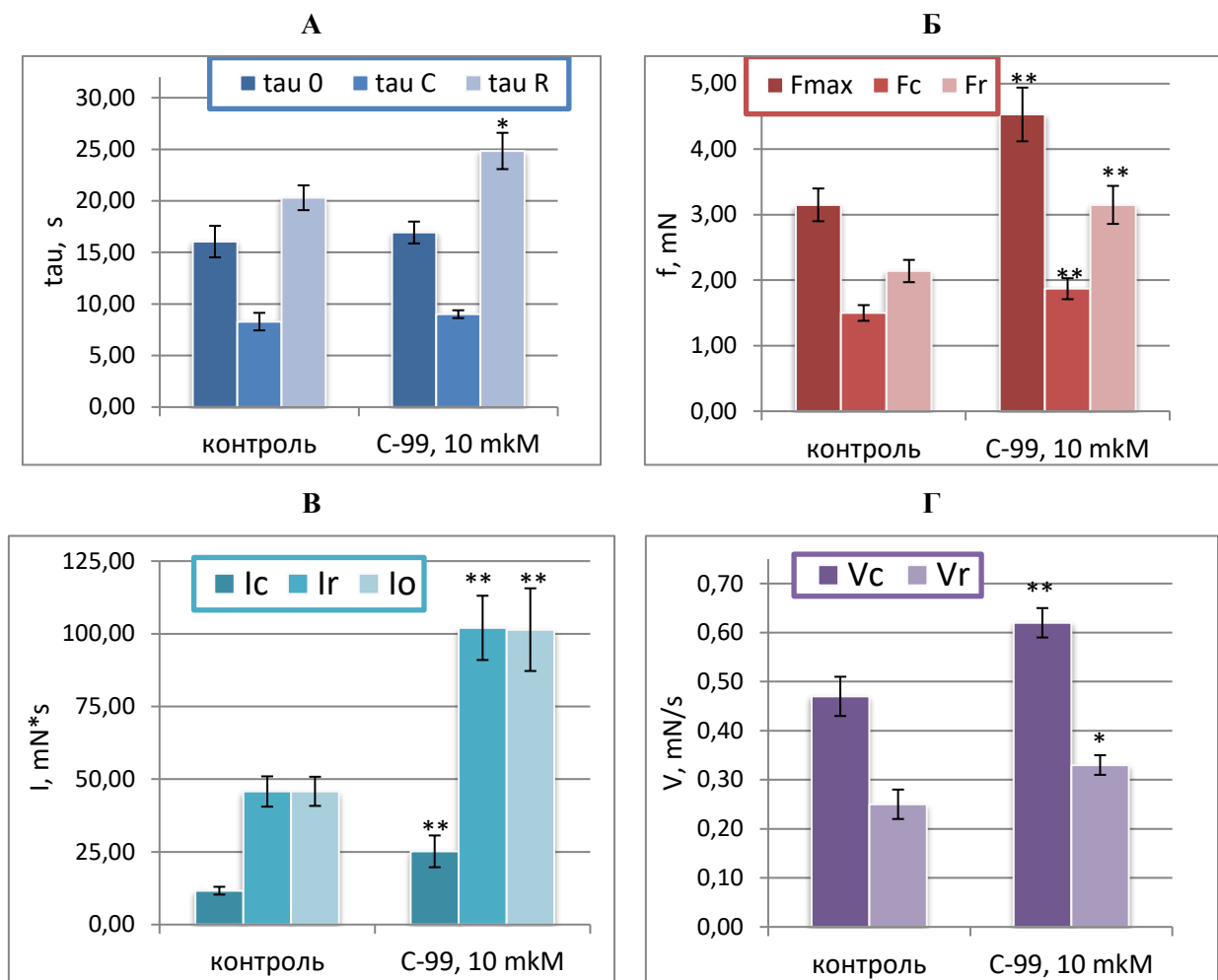


Рисунок 3.5 – Параметри спонтанної скорочувальної активності міометрія щурів у контролі та за попередньої інкубації препаратів на тлі калікс[4]арену

C-99 (10  $\mu$ M): А – часові параметри ( $\tau_0$ ,  $\tau_C$  і  $\tau_R$ ); Б – силові параметри ( $F_{max}$ ,  $F_C$  та  $F_R$ ); В – імпульсні параметри ( $I_{max}$ ,  $I_C$  та  $I_R$ ); Г – швидкісні параметри ( $V_C$  і  $V_R$ ).

$n = 6$ ; \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$  – різниця достовірна щодо контролю.

Також, подібно до C-1220, на тлі калікс[4]арену C-99 суттєво та в однаковій мірі зростали усі силові ( $F_{max}$ ,  $F_C$  та  $F_R$ ) параметри (Рисунок 3.5 Б). Так, за даних умов параметр сили, при якій має місце максимальна швидкість фази скорочення ( $F_C$ ) становив у середньому  $179,6 \pm 17,2$  % ( $n = 6$ ,  $p < 0,01$ ) та параметр сили, при якій має місце максимальна швидкість фази розслаблення ( $F_R$ ) становив у середньому  $180,6 \pm 18,1$  % ( $n = 6$ ,  $p < 0,01$ ).

Оскільки формули для розрахунку імпульсних параметрів у чисельнику містять множник – амплітудні параметри, за дії калікс[4]арену C-99 також суттєво (у понад два рази порівняно з контролем) зростали усі вони ( $I_C$ ,  $I_R$  та  $I_0$ ). Так, показник імпульсу сили в точці  $F_C$  ( $I_C$ ) у середньому становив  $216,0 \pm 21,7$  % ( $n = 6$ ,  $p < 0,01$ ). Також показник імпульсу сили в точці  $F_R$  ( $I_R$ ) у середньому зростав до  $223,0 \pm 24,6$  % ( $n = 6$ ,  $p < 0,01$ ) щодо контролю, та параметр імпульсу сили в точці амплітуди спонтанного скорочення ( $I_{max}$ ) становив  $221,4 \pm 23,9$  % ( $n = 6$ ,  $p < 0,01$ ) щодо контрольного значення (Рисунок 3.5 В).

Також за дії калікс[4]арену C-99, подібно до сполуки-аналога C-1220, достовірно зростали показники максимальних швидкостей фаз скорочення ( $V_C$ ) і розслаблення ( $V_R$ ) (Рисунок 3.5 Г) та у середньому складала  $131,9 \pm 10,9$  % ( $n = 6$ ,  $p < 0,05$ ) та  $130,7 \pm 9,8$  % ( $n = 6$ ,  $p < 0,05$ ) відповідно. Втім, за умови нормування  $V_C$  і  $V_R$  на амплітуду скорочень ми отримали інверсію ефектів: нормована максимальна швидкість фази скорочення у середньому досягала 73,1 % щодо контролю прийнятого за 100 %, та нормована максимальна швидкість фази розслаблення – відповідно у середньому 72,4 %.

У будь-якому випадку зміни швидкісних параметрів за дії калікс[4]арену C-99 не можна вважати специфічним щодо  $Ca^{2+}$ -

транспортувальних систем міоцитів, модуляція фази скорочення і розслаблення відбувається в однаковій мірі. Водночас можна відмітити, що сполука С-1220, ймовірно, є більш вдалим інгібітором  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази плазматичної мембрани, оскільки в її присутності нормовані максимальні швидкості скорочення-розслаблення є на рівні контрольних показників.

### 3.3. Викликані за шляхом фармакомеханічного спряження скорочення міометрія щурів за дії калікс[4]арену С-1220

Як було нами попередньо встановлено, калікс[4]арен С-1220 – структурний аналог інгібітора натрієвої помпи калікс[4]арену С-99, подібно до С-99 активує спонтанну скорочувальну активність препаратів міометрія та змінює її механокінетичні параметри. Втім, в умовах інтактної тканини важливо мати інформацію про скорочувальні реакції міометрія, викликані важливими природними утеротоніками – гормоном окситоцином і нейротрансмітером парасимпатичної нервової системи ацетилхоліном. Тому наступною нашою задачею було вивчення ефектів калікс[4]арену С-1120 на механокінетику викликаних за шляхом фармакомеханічного спряження скорочень міометрія щурів.

Викликані окситоцином (0,1 МО) і ацетилхоліном (10  $\mu\text{M}$ ) скорочення мультіклітинних препаратів поздовжніх гладеньких м'язів маткових труб щурів зі збереженим ендометрієм реєстрували в ізометричному режимі. Калікс[4]арен С-1120 використовували у фіксованій концентрації 10  $\mu\text{M}$ .

Як і у випадку спонтанної скорочувальної активності, за передінкубації м'язових препаратів з калікс[4]ареном С-1220 (10  $\mu\text{M}$ ) спостерігалася суттєва модуляція викликаних агоністами скорочень (Рисунок 3.6). Так, у випадку окситоцин-активованих скорочень мали місце тенденції до їх активації: амплітуда їх фазного компонента у середньому становила  $114,5 \pm 5,9$  % щодо контролю ( $n = 4$ ,  $p > 0,05$ ), тоді як їх тонічний компонент достовірно зменшувався у середньому до  $63,8 \pm 7,3$  % ( $n = 4$ ,  $p < 0,05$ ).

У випадку ацетилхолін-викликаних скорочень амплітуда їх фазного компонента залишалася на контрольному рівні (у середньому становила  $103,1 \pm 4,8 \%$ ,  $n = 4$ ,  $p > 0,05$ ), однак їх тонічний компонент суттєво зростав у середньому до  $165,7 \pm 6,4 \%$  ( $n = 4$ ,  $p < 0,05$ ).

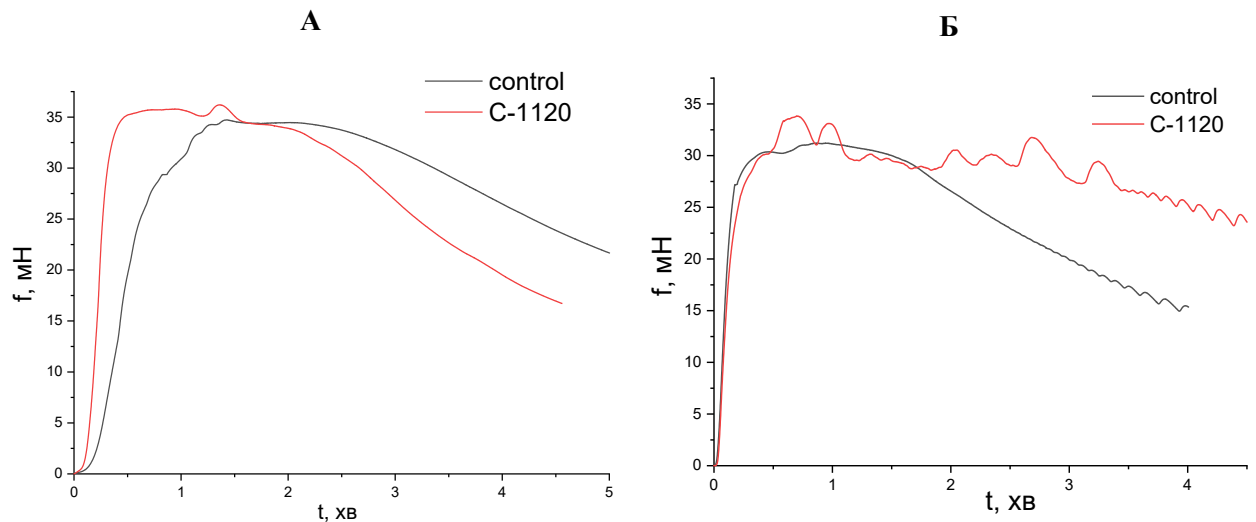


Рисунок 3.6 – Модуляція викликаних окситоцином (0,1 МО; А) та ацетилхоліном (10 μМ; Б) скорочень міометрія щурів за дії калікс[4]арену С-1120 (10 μМ; тривалість передінкубації 30 хв). Наведено типові механограми.

При формуванні фазного компонента, в обох випадках окситоцинових і мускаринових ацетилхолінових рецепторів М3-підтипу проведення внутрішньоклітинного реалізується опосередковано активації  $G_{q/11}$ -протеїнів з наступною активацією фосфоліпази С-β [90]. Власне фазний компонент є результатом зростання внутрішньоклітинної концентрації іонів  $Ca^{2+}$ , які вивільняються з саркоплазматичного ретикулуму через інозитол-1,4,5-трифосфат-чутливі  $Ca^{2+}$ -канали [40]. Ріанодин-чутливі  $Ca^{2+}$ -канали в саркоплазматичному ретикулумі міоцитів матки (на відміну від кишківника) не відіграють жодної ролі у вивільненні цих катіонів за дії агоністів. Тож закономірно передбачити, що загальні можливості саркоплазматичного

ретикулуму з вивільнення іонів  $\text{Ca}^{2+}$  за дії калікс[4]арену С-1120 залишаються незмінними.

У формування тонічного компонента ацетилхолін-індукованих скорочень міометрія щурів беруть участь декілька паралельних процесів: по-перше, роблять свій внесок у процеси деполяризації і рівень  $\text{Ca}^{2+}$  мускаринові холінорецептори M2L-підтипу; по-друге, за деполяризації здійснюється активація потенціалкерованих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів L-типу в плазмалемі та вхід цих катіонів; по-третє, здійснюються процеси екструзії іонів  $\text{Ca}^{2+}$  поза межі клітини через  $\text{Ca}^{2+}$ -помпу і  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник плазматичної мембрани, а також їх закачування до внутрішньоклітинних  $\text{Ca}^{2+}$ -депо (саркоплазматичного ретикулуму і мітохондрій); по-четверте, процеси сенситизації протеїнів скорочувального апарату міоцитів за  $\text{Ca}^{2+}$ -залежними і  $\text{Ca}^{2+}$ -незалежними шляхами [43]. У випадку окситоцинових скорочень у формування тонічного компонента на аналогічному (порівняно з ацетилхоліновою системою) рівні будуть брати участь процеси, промарковані як «по-друге» і «по-четверте», тоді як перший процес буде повністю відсутнім, а третій процес (що стосується екструзії) буде модифікований, оскільки відомо, що окситоцин здатний пригнічувати  $\text{Ca}^{2+}$ -помпу плазматичної мембрани [40]. Тож за сукупності цих факторів формується передумова різноспрямованих ефектів калікс[4]арену С-1220 на тонічну складову цих агоніст-викликаних скорочень міометрія.

Надалі аналіз кінетичних закономірностей викликаних скорочень здійснювали відповідно до методу аналізу Костеріна-Бурдиги із розрахунком нормованих максимальних швидкостей фаз скорочення і розслаблення ( $V_{n_C}$  і  $V_{n_R}$  відповідно) [97]. скорочувальні відповіді у контролі та на тлі дії С-1120 були проаналізовані методом механокінетичного аналізу Костеріна-Бурдиги (Рисунок 3.7).

Виявлено, що у випадку ацетилхолін-активованих скорочень міометрія за дії цього калікс[4]арену нормована максимальна швидкість фази скорочення ( $V_{n_C}$ ) суттєво зростає майже втричі (у середньому до  $286,9 \pm$

11,4 %,  $p < 0,01$ ;  $n = 4$ ), тоді як нормована максимальна швидкість фази розслаблення ( $Vn_R$ ) має тенденції до збільшення ( $139,3 \pm 12,1$  %,  $p > 0,05$ ;  $n = 4$ ) (Рисунок 3.7 А). У випадку окситоцин-викликаних скорочень за дії С-1220 спостерігалось суттєве (до  $61,7 \pm 8,8$  %,  $n = 4$ ,  $p < 0,05$ ) зниження параметра нормованої максимальної швидкості фази розслаблення ( $Vn_R$ ), тоді як значення нормованої максимальної швидкості фази скорочення залишалося на контрольному рівні (у середньому  $99,2 \pm 5,1$  %,  $n = 4$ ,  $p > 0,05$ ) (Рисунок 3.8 Б).

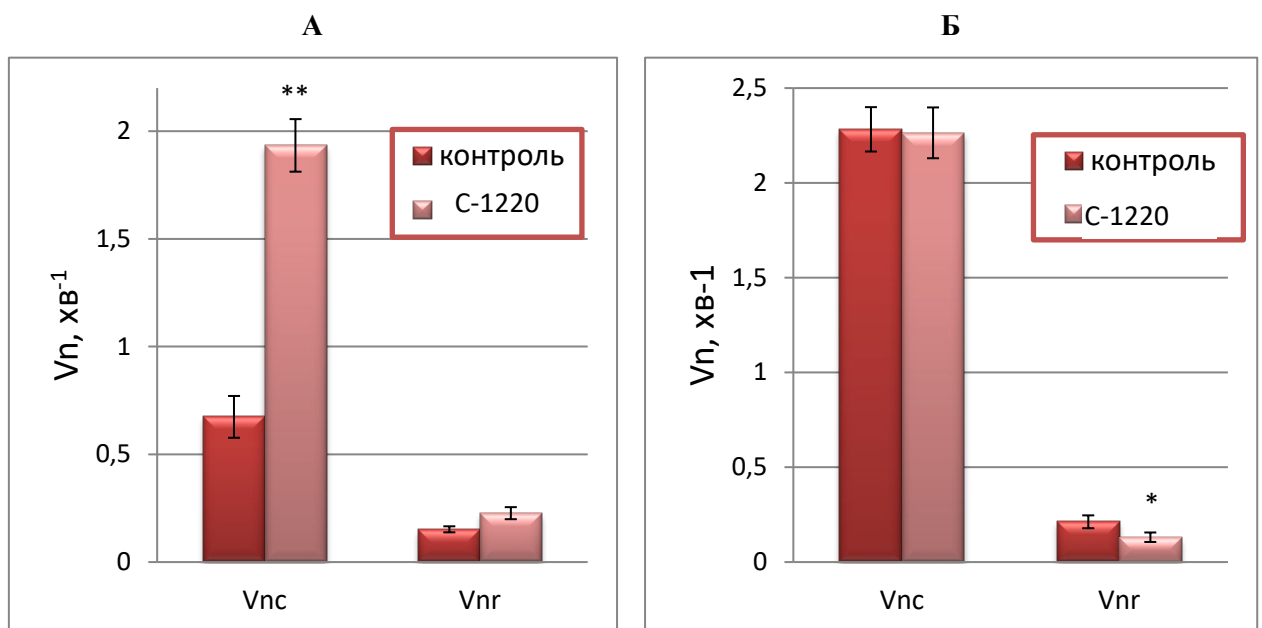


Рисунок 3.7 – Нормовані максимальні швидкості фази скорочення ( $Vn_C$ ) і розслаблення ( $Vn_R$ ) викликаних окситоцином (0,1 МО; А) та ацетилхоліном (10  $\mu$ М; Б) скорочень міометрія щурів за дії калікс[4]арену С-1220 (10  $\mu$ М; тривалість передінкубації 30 хв) ( $n = 4$ ,  $M \pm m$ ).

Позначено: \* -  $p < 0.05$  та \*\* -  $p < 0.01$  – щодо контролю.

Такі відмінності швидкостей фази розслаблення агоніст-викликаних скорочень можуть бути пояснені тими ж самими міркуваннями, як і у випадку розбіжностей тонічних компонентів. У випадку ж відмінностей фаз

скорочення, можна припустити, що за аплікування окситоцину відбувається більш швидка мобілізація іонів  $\text{Ca}^{2+}$  з саркоплазматичного ретикулу.

Також, порівнюючи механокінетичні ефекти калікс[4]арену С-1220 (10  $\mu\text{M}$ ) та іншого раніше дослідженого калікс[4]арену-інгібітора натрієвої помпи С-99 [96], використаного за аналогічної концентрації, варто зазначити, що обидві сполуки справляють загалом подібні ефекти на механокінетичні параметри, тож попередньо можна передбачити, що головною мішенню дії калікс[4]арену С-1220 в міоцитах є  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРаза плазматичної мембрани.

3.4. Вивчення закономірностей впливу калікс[4]арену С-1220 на викликані за шляхом електромеханічного спряження збудження-скорочення реакції міометрія щурів

На попередніх етапах досліджень було встановлено, що калікс[4]арен С-1220 активує спонтанну скорочувальну активність препаратів міометрія та змінює її механокінетичні параметри, а також не впливаючи на амплітуду скорочень, суттєво змінює параметри нормованих максимальних швидкостей  $V_{n_C}$  і  $V_{n_R}$  викликаних за шляхом фармакомеханічного спряження (ацетилхоліном і окситоцином) скорочень мультиклітинних гладеньком'язових препаратів матки щурів. Оскільки у ці ефекти могли робити внесок зміни функціонування потенціалкерованих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів плазматичної мембрани, наступним завданням, вирішеним у роботі, було дослідження та аналіз механокінетичних ефектів калікс[4]арену С-1220 на параметри скорочень міометрія, індукованих за шляхом електромеханічного (модель активації надходження іонів  $\text{Ca}^{2+}$  внаслідок деполяризації плазматичної мембрани гіперкалієвим розчином) спряження збудження-скорочення.

За дії калікс[4]арену С-1220 амплітуда скорочень препаратів міометрія, активованих аплікуванням гіперкалієвого розчину (80 мМ), залишалася без змін (у середньому становила  $93,5 \pm 7,1$  %,  $n = 5$ ,  $p > 0,05$ ), однак тонічна

складова цих скорочень достовірно знижувалася та у середньому становила  $79,3 \pm 6,7 \%$  ( $n = 5$ ,  $p < 0,05$ ) (Рисунок 3.8).

Зазначені ефекти можуть бути пов'язані як з модуляцією кінетичних характеристик функціонування потенціалкерованих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів L-типу, так і з активацією процесів активного транспорту цих катіонів з цитоплазми міоцитів [43].

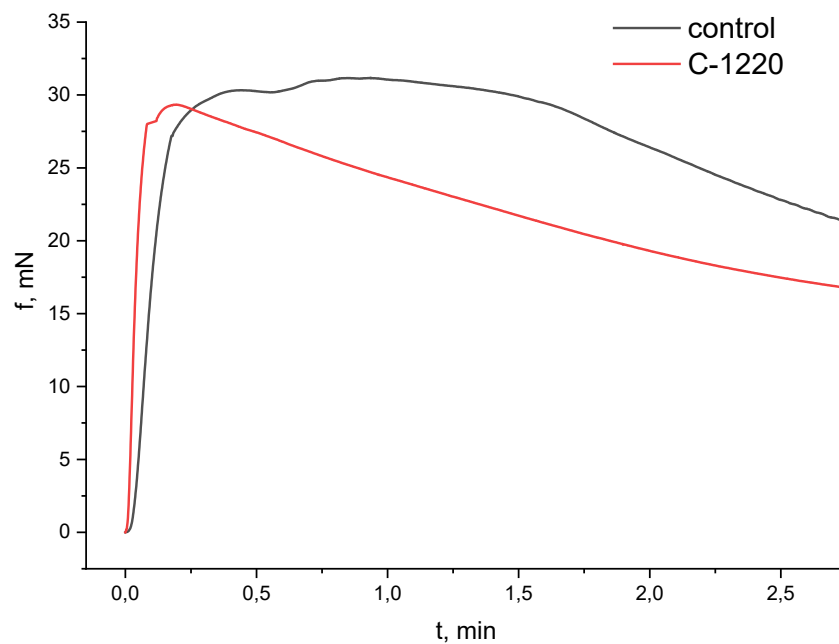


Рисунок 3.8 – Викликані аплікуванням гіперкалієвого розчину (80 мМ) скорочення міометрія щурів у контролі та за дії калікс[4]арену C-1220 (10 мкМ, тривалість інкубації з C-1220 перед початком реєстрації 15 хв).

Наведено типові механограми.

Надалі скорочення у контролі та за дії калікс[4]арену C-1220 були проаналізовані методом механокінетичного аналізу Костеріна-Бурдиги [97]. Встановлено, що на тлі C-1220 суттєво зростав показник нормованої максимальної швидкості фази скорочення ( $V_{nc}$ ) (у середньому до  $273,9 \pm 7,4 \%$ ,  $n = 5$ ,  $p < 0,01$  щодо контролю), тоді як відповідний показник фази розслаблення не виявляв статистично значущих змін (він у середньому становив  $108,5 \pm 6,2 \%$ ,  $n = 5$ ,  $p > 0,05$ ) (Рисунок 3.9).

Можемо зіставити одержані результати щодо модуляції скорочень, активованих аплікуванням гіперкалієвого розчину, калікс[4]аренами С-1220 та його структурним аналогом С-99 [96]. Обидві сполуки не змінювали амплітудні фазні значення скорочувальних відповідей; також на тлі калікс[4]аренів С-1220 та С-99 не змінювалися параметри нормованих максимальних швидкостей фази розслаблення. Відмінність у їх дії полягає у тому, що С-99 не впливав на кінетику фази скорочення, тоді як С-1220 суттєво її активував. Однак, загалом ефекти обох сполук були подібними, тож можна передбачити, що ефекти сполуки С-1220 обумовлюються блокуванням  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРази плазматичної мембрани, тоді як інші системи активного іонного транспорту в м'яцях матки щурів не є чутливими до дії цього тлі калікс[4]арену.

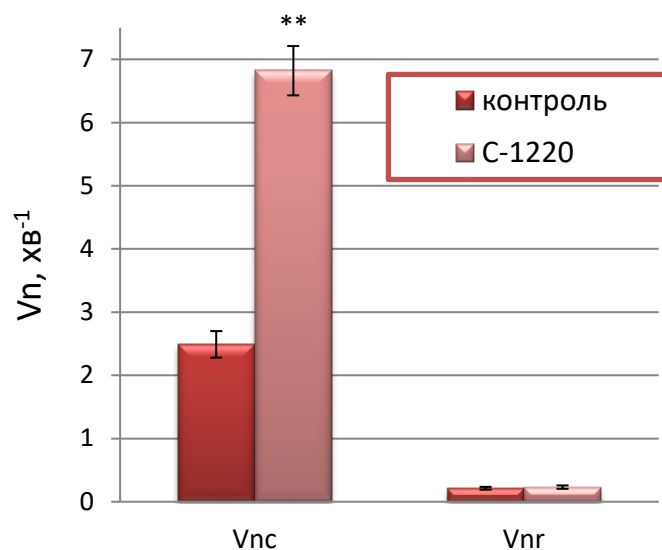


Рисунок 3.9 – Параметри нормованих максимальних швидкостей фаз скорочення ( $V_{nc}$ ) та розслаблення ( $V_{nr}$ ) викликаних гіперкалієвим розчином (80 мМ) скорочень міометрія щурів у контролі та за попередньої інкубації препаратів на тлі калікс[4]арену С-1220 (10  $\mu\text{M}$ , тривалість попередньої інкубації 15 хв;  $n = 5$ ).

\* -  $p < 0,01$  – різниця достовірна щодо контролю.

## ВИСНОВКИ

У дипломній роботі було проведено дослідження спонтанних і викликаних за шляхами електро- і фармакомеханічного спряження скорочень міометрія щурів на тлі калікс[4]арену С-1220 (10  $\mu\text{M}$ ), структурного аналога калікс[4]арену С-99, для яких попередньо виявлено здатність блокувати  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРази плазматичної мембрани.

1. Встановлено, що за дії калікс[4]арену С-1220 спостерігається активація спонтанних скорочень та зростання їх окремих механокінетичних параметрів: силових ( $F_{\text{max}}$ ,  $F_{\text{C}}$  та  $F_{\text{R}}$ ), швидкісних ( $V_{\text{C}}$  і  $V_{\text{R}}$ ), імпульсних ( $I_{\text{C}}$ ,  $I_{\text{R}}$  та  $I_0$ ). Зростання швидкісних параметрів спонтанних скорочень не можна вважати специфічним щодо  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем міоцитів, адже нормування  $V_{\text{C}}$  і  $V_{\text{R}}$  на амплітуду скорочень нівелює їх відмінності від контрольних показників
2. Показано, що за передінкубації м'язових препаратів матки на тлі калікс[4]арену С-99 (структурного аналога С-1220 з доведеною активністю щодо  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРази плазматичної мембрани) спостерігаються активація спонтанних скорочень та зростання силових ( $F_{\text{max}}$ ,  $F_{\text{C}}$  та  $F_{\text{R}}$ ), швидкісних ( $V_{\text{C}}$  і  $V_{\text{R}}$ ) та імпульсних ( $I_{\text{C}}$ ,  $I_{\text{R}}$  та  $I_0$ ) параметрів.
3. Виявлено, що калікс[4]арен С-1220, не впливаючи на амплітуду скорочень, суттєво змінює параметри нормованих максимальних швидкостей  $Vn_{\text{C}}$  і  $Vn_{\text{R}}$  скорочувальних відповідей міометрія, активованих окситоцином і ацетилхоліном.
4. Встановлено, що калікс[4]арен С-1220 не впливає на амплітуду фазного компонента та параметр нормованої максимальної швидкості фази розслаблення ( $V_{\text{nr}}$ ), але суттєво знижує тонічний компонент скорочення, індукований гіперкалієвим розчином, а також достовірно підвищує параметр нормованої максимальної швидкості фази скорочення ( $V_{\text{nc}}$ ).

5. Порівняння даних щодо модуляції механокінетики викликаних скорочень міометрія калікс[4]аренами C-1220 та C-99 дозволяє передбачити, що C-1220 на рівні тканини міометрія інгібує  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазу плазматичних мембран та внаслідок цього впливає на скорочувальну активність.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. Lingrel J. B., Williams M. T., Vorhees C. V., Moseley A. E. *Bioenerg. Biomembr.* 2007. 39. P. 385–389.
2. Pritchard T. J., Bowman P. S., Jefferson A. et al. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2010. 299, N 2. P. 548–556.
3. Кальченко В. І., Родік Р. В., Бойко В. І. *Журн. орг. фарм. хімії.* 2005. 3, № 4. С. 13–29.
4. Geide I., Soldatov D., Kramarenko O. et al. *J. Struct. Chem.* 2005. 46. P. S28–S32.
5. Coleman A. W., Jebors S., Cecillon S. et al. *New J. Chem.* 2008. 32. P. 780–782.
6. Da Silva E., Lazar A. N., Coleman A. W. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2004. 14, N 1. P. 3–20.
7. Paclet M-H., Rousseau C. F., Yannick C. et al. *J. Inclus. Phenom. Macrocycl. Chem.* 2006. 55, N 3–4. P. 353–357.
8. Gutsche C. D. *Calixarenes Revisited*, Stoddart J. F., Ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry 1998. P. 233.
9. Lalor R., Baillie-Johnsos H., Redshew C. et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2008. 130, N 10. P. 2892–2893.
10. Perret F., Lazar A. N., Coleman A. W. *Chem. Commun.* 2006. P. 2425–2438.
11. Finn CA, Porter DG. *Handbooks in reproductive biology. In The uterus.* Vol. 1, London: Elek Science; 1975.
12. Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science.* 1972;175(4023):720–731.
13. Somlyo AP, Somlyo AV. *Ultrastructure of smooth muscle. Smooth Muscle.* 1975;3–45.

14. Verhoeff A, Garfield R, ... JR-AP, 1986 undefined . Myometrial activity related to gap junction area in periparturient and in ovariectomized oestrogen treated sheep. europepmc.org.
15. Bergman RA. Uterine smooth muscle fibers in castrate and estrogen-treated rats. *J Cell Bio.* 1968;36(3):639–648.
16. Broderick R, Broderick KA. Ultrastructure and calcium stores in the myometrium. 1990;1–33.
17. Ross R, Klebanoff SJ. Fine structural changes in uterine smooth muscle and fibroblasts in response to estrogen. *J Cell Bio.* 1967;32(1):155–167.
18. Garfield RE, Somlyo AP. Structure of smooth muscle. *Calcium Contract.* 1985;1–36.
19. Peracchia C. Structural correlates of gap junction permeation. *Int Rev Cytol.* 1980. Jan 1;66(C):81–146.
20. Sáez JC, Martinez AD, Branes MC, et al. Regulation of gap junctions by protein phosphorylation. *Braz J Med Biol Res.* 1998;31(5):593–600.
21. Supplement JM-PR, 1962 undefined . Regulation of activity in uterine smooth muscle. [pubmed.ncbi.nlm.nih.gov](http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov).
22. Ono M, Bulun SE, Maruyama T. M i n i r e v i e w tissue-specific stem cells in the myometrium and tumor-initiating cells in leiomyoma 1. *Biol Reprod.* 2014;91(6):149–150.
23. Brakta S, Mas A, Al-Hendy A. The ontogeny of myometrial stem cells in OCT4-GFP transgenic mouse model. *Stem Cell Res Ther.* 2018. Nov 29;9(1):1–8.
24. Maruyama T, Masuda H, Ono M, et al. Human uterine stem/progenitor cells: Their possible role in uterine physiology and pathology. *Reproduction.* 2010;140(1):11–22.
25. Othman ER, Elgamal DA, Refaiy AM, et al. Identification and potential role of telocytes in human uterine leiomyoma. *Contracept Reprod Med.* 2016.

26. Lammers WJEP, Stephen B, Al-Sultan MA, Subramanya SB, Blanks AM. The location of pacemakers in the uteri of pregnant guinea pigs and rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2015;309:R1439–1446.
27. Young RC. Myocytes, myometrium, and uterine contractions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007;1101:72–84.
28. Taggart MJ, Wray S. Contribution of sarcoplasmic reticular calcium to smooth muscle contractile activation: gestational dependence in isolated rat uterus. *J. Physiol.* 1998;511:133–144.
29. Lutton, E. J., Lammers, W. J. E. P., James, S., Berg, H. A. van den & Blanks, A. M. Identification of uterine pacemaker regions at the myometrial-placental interface. *bioRxiv* 152678 10.1101/152678 (2017).
30. Burdyga T, Borisova L, Burdyga AT, Wray S. Temporal and spatial variations in spontaneous Ca events and mechanical activity in pregnant rat myometrium. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2009;144(Suppl 1):S25–32.
31. Matthew A, Shmygol A, Wray S. Ca<sup>2+</sup> entry, efflux and release in smooth muscle. *Biol. Res.* 2004;37:617–624.
32. Yoshino M, Wang SY, Kao CY. Sodium and Calcium Inward Currents in Freshly Dissociated Smooth Myocytes of Rat Uterus. *J. Gen. Physiol.* 1997;110:565–577.
33. Inoue Y, Sperelakis N. Gestational change in Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> channel current densities in rat myometrial smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 1991;260:C658–663.
34. Sanders K. M. (1996). A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 111, 492–515.
35. Lammers W. J. E. P. (2013). The electrical activities of the uterus during pregnancy. *Reprod. Sci.* 20, 182–189.

36. Miller S. M., Garfield R. E., Daniel E. E. (1989). Improved propagation in myometrium associated with gap junctions during parturition. *Am. J. Physiol.* 256, C130–C141.
37. Hafen B. B., Burns B. (2022). *Physiology, smooth muscle*. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing.
38. Wray S. (2007). Insights into the uterus. *Exp. Physiol.* 92, 621–631.
39. Dillon P. F., Aksoy M. O., Driska S. P., Murphy R. A. (1981). Myosin phosphorylation and the cross-bridge cycle in arterial smooth muscle. *Science* 211, 495–497.
40. Garfield L., Chin E. Pharmacology for preterm labor. *J. Perinat. Neonatal Nurs.* 2020;34:155–161.
41. Malik M., Roh M., England S.K. Uterine contractions in rodent models and humans. *Acta Physiology.* 2021;231(4).
42. Obayashi S., Word R.N. *Encyclopedia of Hormones*; 2003. Anatomic and Cellular Considerations of Uterine Contractility; pp. 540–545.
43. Hering S., Zangerl-Plessl E.M., Beyl S., Hohaus A., Andranovits S., Timin E.N. Calcium channel gating. *Pflugers Arch.* 2018;470:1291–1309.
44. Wray S., Arrowsmith S. Uterine excitability and ion channels and their changes with gestation and hormonal environment. *Annu. Rev. Physiol.* 2021;83:331–357.
45. Ferreira J.J., Chinwendu A., Puga-Molina IC., Ma X., England S.K., Santi C.M. SLO2.1/NALCN a sodium signaling complex that regulates uterine activity. *iScience.* 2021.
46. Edwards I.A., Bruce G., Lawrenson C., Howe L., Clapcote S.J., Deuchars S.A., Deuchars J. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase  $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 3 isoforms are differentially expressed in  $\alpha$ - and  $\gamma$ -motoneurons. *J. Neurosci.* 2013;33:9913–9919.
47. Radzyukevich T.L., Neumann J.C., Rindler T.N., Oshiro N., Goldhamer D.J., Lingrel J.B., Heiny J.A. Tissue-specific role of the Na,K-ATPase  $\alpha$ 2 isozyme in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 2013;288:1226–1237.

48. Sanchez G., Nguyen A.N.T., Timmerberg B., Tash J.S., Blanco G. The Na,K-ATPase alpha4 isoform from humans has distinct enzymatic properties and is important for sperm motility. *Mol. Hum. Reprod.* 2006;12:565–576.
49. Hundal H.S., Marette A., Ramlal T., Liu Z., Klip A. Expression of beta subunit isoforms of the Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase is muscle type-specific. *FEBS Lett.* 1993;328:253–258.
50. Arystarkhova E., Sweadner K.J. Tissue-specific expression of the Na,K-ATPase beta3 subunit. The presence of beta3 in lung and liver addresses the problem of the missing subunit. *J. Biol. Chem.* 1997;272:22405–22408.
51. Peterková L., Kmoníčková E., Ruml T., Rimpelová S. Sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase inhibitors: Beyond anticancer perspective. *J. Med. Chem.* 2020;63:1937–1963.
52. Hilbers F., Kopec W., Isaksen T.J., Holm T.H., Lykke-Hartmann K., Nissen P., Khandelia H., Poulsen H. Tuning of the Na,K-ATPase by the beta subunit. *Sci. Rep.* 2016;6:20442.
53. Rajasekaran S.A., Gopal J., Willis D., Espineda C., Twiss J.L., Rajasekaran A.K. Na,K-ATPase β1-subunit increases the translation efficiency of the α1-Subunit in MSV-MDCK cells. *Mol. Biol. Cell.* 2004;15:3005–3508.
54. Miller R.P., Farley R.A. All three potential N-glycosylation sites of the dog kidney (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase beta-subunit contain oligosaccharide. *Biochim. Biophys. Acta.* 1988;954:50–57.
55. Beggah A.T., Jaunin P., Geering K. Role of glycosylation and disulfide bond formation in the beta subunit in the folding and functional expression of Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 1997;272:10318–10326.
56. Kanagawa M., Matsumoto K., Iwasaki N., Hayashi Y., Yamaguchi Y. Structural analysis of N-glycans attached to pig kidney Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *J. Glyc. Lip.* 2013;S5:005.
57. Tokhtaeva E., Munson K., Sachs G., Vagin O. N-Glycan-dependent quality control of the Na,K-ATPase β2 subunit. *Biochemistry.* 2010;49:3116–3128.

58. Béguin P., Hasler U., Staub O., Geering K. Endoplasmic reticulum quality control of oligomeric membrane proteins: Topogenic determinants involved in the degradation of the unassembled Na,K-ATPase alpha subunit and in its stabilization by beta subunit assembly. *Mol. Biol. Cell.* 2000;11:1657–1672.
59. Tokhtaeva E., Sachs G., Vagin O. Assembly with the Na,K-ATPase  $\alpha 1$  subunit is required for export of  $\beta 1$  and  $\beta 2$  subunits from the endoplasmic reticulum. *Biochemistry.* 2009;48:11421–11431.
60. Lian W.N., Wu T.W., Dao R.L., Chen Y.J., Lin C.H. Deglycosylation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase causes the basolateral protein to undergo apical targeting in polarized hepatic cells. *J. Cell Sci.* 2006;119:11–22.
61. Vagin O., Tokhtaeva E., Sachs G. The role of the  $\beta 1$  subunit of the Na,K-ATPase and its glycosylation in cell-cell adhesion. *J. Cell. Biol.* 2006;281:39573–39587.
62. Silva E.C.C., Masui D.C., Furriel R.P., McNamara J.C., Barrabina H., Scofano H.M., Perales J., Teixeira-Ferreira A., Leone F.A., Fontesa C.F.L. Identification of a crab gill FXDY2 protein and regulation of crab microsomal Na,K-ATPase activity by mammalian FXDY2 peptide. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* 2012;1818:2588–2597.
63. el-Masri M.A., Clark B.J., Qazzaz H.M., Valdes R. Human adrenal cells in culture produce both ouabain-like and dihydroouabain-like factors. *Jr. Clin. Chem.* 2002;48:1720–1730.
64. Gao J., Wymore R.S., Wang Y., Gaudette G.R., Krukenkamp I.B., Cohen I.S., Mathias R.T. Isoform-specific stimulation of cardiac Na/K pumps by nanomolar concentrations of glycosides. *J. Gen. Physiol.* 2002;119:297–312.
65. Wang H., Haas M., Liang M., Cai T., Tian J., Li S., Xie Z. Ouabain assembles signaling cascades through the caveolar Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *J. Biol. Chem.* 2004;279:17250–17259.

66. Liang M., Tian J., Liu L., Pierre S., Liu J., Shapiro J., Xie Z.J. Identification of a pool of non-pumping Na/K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 2007;282:10585–10593.
67. Prassas I, Diamandis EP. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7:926–935.
68. Bagrov AY, Shapiro JI, Fedorova OV. Endogenous cardiotonic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. *Pharmacol Rev.* 2009;61(1):9–38.
69. Lingrel JB, Kuntzweiler T. Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase. *J Biol Chem.* 1994;269(31):19659–19662.
70. Schoner W, Scheiner-Bobis G. Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;293(2):C509–C536.
71. Leenen FHH. The central role of the brain aldosterone-“ouabain” pathway in salt-sensitive hypertension. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1802(12):1132–1139.
72. Blaustein MP. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores and cell responsiveness. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1993;264(6):C1367–C1387.
73. Blaustein MP, Zhang J, Chen L, Song H, Raina H, Kinsey SP, Izuka M, Iwamoto T, Kotlikoff MI, Lingrel JB, Philipson KD, Wier WG, Hamlyn JM. The pump, the exchanger, and endogenous ouabain: signaling mechanisms that link salt retention to hypertension. *Hypertension.* 2009;53(2):291–298.
74. Blaustein MP, Hamlyn JM. Signaling mechanisms that link salt retention to hypertension: Endogenous ouabain, the Na<sup>+</sup> pump, the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger and TRPC proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1802(12):1219–1229.
75. Price EM, Rice DA, Lingrel JB. Structure-function studies of Na,K-ATPase. Site-directed mutagenesis of the border residues from the H1–H2 extracellular domain of the  $\alpha$  subunit. *J Biol Chem.* 1990;265:6638–6641.

76. Lingrel JB, Orłowski J, Price EM, Pathak BG. Regulation of the  $\alpha$ -subunit genes of the Na,K-ATPase and determinants of cardiac glycoside sensitivity. *Soc Gen Physiol Ser.* 1991;46:1–16.
77. Schultheis PJ, Wallick ET, Lingrel JB. Kinetic analysis of ouabain binding to native and mutated forms of Na,K-ATPase and identification of a new region involved in cardiac glycoside interactions. *J Biol Chem.* 1993;268:22686–22694.
78. Feng J, Lingrel JB. Analysis of amino acid residues in the H5–H6 transmembrane and extracellular domains of Na,K-ATPase alpha subunit identifies threonine 797 as a determinant of ouabain sensitivity. *Biochemistry.* 1994;33:4218–4224.
79. Palasis M, Kuntzweiler TA, Argüello JM, Lingrel JB. Ouabain interactions with the H5–H6 hairpin of the Na,K-ATPase reveal a possible inhibition mechanism via the cation binding domain. *J Biol Chem.* 1996;271:14176–14182.
80. Crambert G, Schaer D, Roy S, Geering K. New molecular determinants controlling the accessibility of ouabain to its binding site in human Na,K-ATPase  $\alpha$  isoforms. *Mol Pharmacol.* 2004;65:335–341.
81. Qiu LY, Koenderink JB, Swarts HGP, Willems PHGM, De Pont JJHHM. Phe783, Thr797, and Asp804 in transmembrane hairpin M5–M6 of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase play a key role in ouabain binding. *J Biol Chem.* 2003;278:47240–47244.
82. Qiu LY, et al. Reconstruction of the complete ouabain-binding pocket of Na,K-ATPase in gastric H,K-ATPase by substitution of only seven amino acids. *J Biol Chem.* 2005;280:32349–32355.
83. Forbush B., III Cardiotonic steroid binding to Na,K-ATPase. *Curr Topics Memb Transport.* 1983;19:167–201.
84. Or E, Goldshleger ED, Tal DM, Karlish SJ. Solubilization of a complex of tryptic fragments of Na,K-ATPase containing occluded Rb ions and bound ouabain. *Biochemistry.* 1996;35:6853–6864.

85. Luo Z., Zhao Y., Maa C. et al. Synthesis and anti-integrase evaluation of novel calix[4]arene derivatives containing the triazolyl 1,3-diketo moiety. *Chinese Chemical Letters*. 2014, 25(5): 737–740.
86. Bohmer V. Calixarenes, Macrocycles with (Almost) Unlimited Possibilities. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1995, 34: 713-745.
87. Neri P., Sessler J.L., Wang M-X. *Calixarenes and Beyond*. Springer International Publishing Switzerland. 2016, 1062 p.
88. Gutsche C.D., Alam I. Calixarenes 23. Complexation and Catalytic Properties of Water Soluble Calixarenes. *Tetrahedron*. 1988, 44: 4689 – 4694.
89. Векліч Т.О., Шкрабак О.А., Черенок С.О., Кальченко В.І., Костерін С.О. Порівняльне дослідження впливу калікс[4]арену С-99 та його аналогів на  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  -азну активність у плазматичній мембрані міоцитів матки. *Укр. біохім. журн.* 2012, 84(6): 49-57.
90. Abdalla F.M., Marystica E., Picarelli Z.P. et al. Effect of estrogen on muscarinic acetylcholine receptor expression in rat myometrium. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2004. Vol. 213, N 2. P. 139-148.
91. Kazaryan K.V., Unanyan N.G., Mkrtchyan A.V. Interaction of pacemaker activities of the extreme parts of the fallopian tubes in non-pregnant rats. *Reports of NAS of Armenia*, 2014; 114(1): 69-75.
92. Kazaryan K. V., Hunanyan N. G., Meliksetyan I. B. et al. Role of oxytocin in activation of spontaneous electrical activity of the body and horns of the uterus in non-pregnant rats. *Cytology*. 2010. T. 52, № 12. P. 990—996.
93. Kazaryan K.V., Piliposyan T.A. The ovarian region of the myometrium and its role in the regulation of spontaneous electrical activity. *Medical science of Armenia NAS RA*, 2016; LVI (2): 46-54.
94. Xu J., Menon S.N., Singh R. et al. The Role of Cellular Coupling in the Spontaneous Generation of Electrical Activity in Uterine Tissue. *PLoS One*. 2015. Vol. 10, N 3. 0118443. doi: 10.1371/journal.pone.0118443.

95. Pehlivanoglu B., Bayrak S., Dogan M. A close look at the contraction and relaxation of the myometrium; the role of calcium. *Journal of the Turkish: German Gynecological Association*. 2013. Vol. 14. P. 230-234.
96. С. О. Костерін, О. В. Цимбалюк. Механокінетика вісцеральних гладеньких м'язів та її модуляція наноматеріалами. НАН України, Ін-т біохімії ім. О. В. Палладіна. - Київ : Наукова думка, 2022.
97. Burdyga Th.V., Kosterin S.A. Kinetic analysis of smooth muscle relaxation. *Gen Physiol Biophys*, 1991; 10(6): 589–598.