

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра фізіології людини і тварин

Завідувач кафедри Макарчук М. Ю.

Протокол № засідання кафедри

від «___» _____ 2023 р.

**ТІАКАЛІКС[4]АРЕН С-1087 ЯК СЕЛЕКТИВНИЙ ЕФЕКТОР КАЛЬЦІЙ-
ТРАНСПОРТНИХ СИСТЕМ ТА СКОРОТЛИВОЇ АКТИВНОСТІ
ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ**

Кваліфікаційна робота магістра
денної форми навчання
за спеціальністю 091 «Біологія»
Малюка Олександра Віталійовича

Науковий керівник від кафедри
Кандидат біологічних наук, доцент
Пасічніченко О. М.

Робота виконана у відділі біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
НАН України
під керівництвом ст.н.сп., доктора біологічних наук Векліч Т. О.

Оцінка захисту роботи

Київ-2023 р.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	3
ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. Огляд літератури	6
1.1. Системи транспорту Ca^{2+} -іонів у гладеньких м'язах.....	6
1.1.1. Структура та функціональні властивості РМСА.....	8
1.1.2. Механізми регуляції роботи РМСА гладеньких м'язів <i>in vivo</i>	11
1.1.3. Штучні ефектори кальцієвої помпи плазматичної мембрани та перспективи їх застосування у медицині.....	13
1.2. Каліксарени та прояви їх біологічної активності	17
1.2.1. Структура та фізико-хімічні властивості каліксаренів.....	18
1.2.2. Перспективи використання каліксаренів у біотехнології, та фармакології.....	21
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень	26
2.1. Синтез тіакалікс[4]арену C-1087	26
2.2. Виділення суспензії гладеньком'язових клітин з матки.....	27
2.3. Виділення фракції плазматичних мембран з клітин міометрія.....	30
2.4. Визначення РМСА активності.....	31
2.5. Дослідження міоцитів методом конфокальної мікроскопії.....	32
2.6. Тензометричні та механокінетичні дослідження.....	34
2.7. <i>In silico</i> методи дослідження РМСА та C-1087.....	36
2.8. Кінетичний та статистичний аналіз.....	37
2.9. Матеріали та реактиви.....	37
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та їх обговорення	38
3.1. Дія тіакалікс[4]арену C-1087 та активність АТРази плазматичної мембрани.....	38
3.2. Вплив тіакалікс[4]арену C-1087 на концентрацію Ca^{2+} у саркоплазмі.....	41
3.3. Параметри скорочень поздовжніх гладеньких м'язів під дією тіакалікс[4]арену C-1087	44
3.4. Моделювання <i>in silico</i> взаємодії Са-помпи з тіакалікс[4]ареном C-1087	47
ВИСНОВКИ	52
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	53

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ГМ – гладенькі м'язи

ГМК – гладеньком'язова клітина

Ca^{2+} – катіони кальцію

$[\text{Ca}^{2+}]_c$ – концентрація вільного кальцію у цитоплазмі

ДМСО – диметилсульфоксид

ПМ – плазматична мембрана

СР – саркоплазматичний ретикулум

АТР – аденозинтрифосфат

Fluo-4 AM – 2- $\{[2-(2-\{5-[бис(карбоксиметил)аміно]-2-метилфенокси\}ето-кси)-4-(2,7-дифлуоро-6-гідрокси-3-оксо-3Н-ксантен-9-іл)феніл](карбоксиметил)аміно\}$ ацетова кислота;

Ноеchst – 2'-(4-етоксифеніл)-6-(4-метил-1-піперазиніл)-1Н,3'Н-2,5'-бібензimidазол

Нерес – N-2-гідроксиетилпіперазин-N-2-етансульфонова кислота

Tris – трис(гідроксиметил)амінометан

Ca^{2+} -помпа – Mg^{2+} , АТР-залежна Ca^{2+} -транспортувальна система плазматичної мембрани та саркоплазматичного ретикулуму

PMCA – plasma membrane Ca^{2+} -АТРase (Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРaza плазматичної мембрани);

SERCA – sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -АТРase (Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРaza саркоплазматичного ретикулуму)

$I_{0,5}$ – коефіцієнт інгібування (концентрація інгібітору, за якої рівень ензиматичної активності становить 50 % від контрольної величини)

P_i – фосфат неорганічний

K_a – уявна константа активації

K_i – уявна константа інгібування

K_m – уявна константа Міхаеліса

n_H – коефіцієнт Хілла

n – кількість дослідів

ВСТУП

Стабільне функціонування шлунково-кишкового тракту, кровоносних й лімфатичних судин, нирок, матки й сечового міхура, сфінктерів зіниці ока, ряду залоз внутрішньої, зовнішньої й змішаної секреції, а також дихальних шляхів реалізується завдяки активній роботі гладеньких м'язів (ГМ), що забезпечується динамічними процесами їх скорочення-розслаблення [1, 2].

Гладеньком'язова клітина (ГМК), яка розглядається як динамічна система, має властивість швидкої реакції на зміну концентрації катіонів вільного кальцію (Ca^{2+}) у саркоплазмі, за межами клітини та у внутрішньоклітинних депо. Кальцій зі свого боку, виступає найважливішим месенджером та реалізує широкий спектр функціональних можливостей ГМК. Задля нормального перебігу процесів скорочень та розслаблень, фізіологічна внутрішньоклітинна концентрація катіонів кальцію має динамічно та оборотно коливатися у межах від 100 нМ до $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л меж. Така регуляція здійснюється через роботу Ca^{2+} -транспортних систем, які локалізуються у різних компартментах клітини. Найбільший внесок з активного виведення кальцію за межі клітини припадає на Mg^{2+} -залежну помпу у плазматичній мембрані (ПМ) [3,4].

Відомо, що порушення гомеостазу іонів у ГМК має наслідком появу патологічних станів з боку різних систем органів, як-от: артеріальної гіпо- й гіпертензії, порушення моторики ШКТ, астми, спонтанних абортів, передчасних пологів, викидней, атонії тощо [5].

З огляду на важливість згаданої транспортної системи, актуальним завданням біомедичних та, зокрема, фізіологічних досліджень, залишається синтез високоселективних ефекторів, які можуть демонструвати інгубуючий або активуючий вплив на ензими-транспортери іонів кальцію. Такі дослідження необхідні, по-перше, для успішної розробки фармакологічних препаратів, які виявлятимуть терапевтичні властивості шляхом ефективною модифікації функціонального стану протеїнів, а по-друге, для з'ясування фундаментальних механізмів електромеханічного та фармакомеханічного sprzęження.

З огляду на контекст проблематики, перспективними можуть вважатися каліксарени – макроциклічні сполуки, специфіка молекулярної будови та варіативність структурної модифікації яких, дозволяють синтезувати якісні таргетовані ефектори із доцільними фінансовими та трудовими витратами. Базуючись на викладеному вище, сформульовано **мету роботи**: з'ясувати закономірності дії синтезованого тіакалікс[4]арену **C-1087** як ефектора транспортних систем та скоротливої активності міомерія.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні **завдання**:

1. Вивчити селективність щодо систем іонного транспорту та дію тіакалікс[4]арену **C-1087** на активність АТР-гідролаз ПМ клітин міомерія.
2. Визначити вплив тіакалікс[4]арену **C-1087** на зміну кількості вільного Ca^{2+} у саркоплазмі ГМК.
3. З'ясувати вплив тіакалікс[4]арену **C-1087** на тензометричні параметри при скоротливій активності міомерія.
4. Встановити схему взаємодії ліганду (тіакалікс[4]арен **C-1087**) з рецептором (Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаз) шляхом комп'ютерного моделювання.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Системи транспорту Ca^{2+} -іонів у гладеньких м'язах

Вільний кальцій виступає універсальними неорганічними клітинними месенджерами, він є критично важливими для гладенької мускулатури оскільки, що Ca^{2+} -залежні сигнали безпосередньо контролюють низку базових процесів у клітині, серед яких: скорочення, розслаблення, проліферація, секреція та апоптоз. Такі сигнали регулюються завдяки системам енергозалежного та енергонезалежного транспорту іонів у клітинний цитозоль та викиду останніх за межі саркоплазми у позаклітинний простір або у внутрішньоклітинні депо, що і являє собою процес регуляції кальцієвої цитоплазматичної концентрації ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) [1-4].

У саркоплазму кальцій заходить із позаклітинного простору крізь ПМ або ж із внутрішньоклітинних кальцієвих депо. Основне таке депо знаходиться у саркоплазматичному ретикулумі (СР). За проникнення катіонів у саркоплазму відповідають Ca^{2+} -канали, які розташовуються на ПМ та на мембрані СР. В ПМ вбудовано три типи: потенціал-, депо- та ліганд-керовані кальцієві-канали; на ретикулярній мембрані знаходиться два типи ліганд-керіваних: інозитол-1,4,5-трифосфатні-чутливі та ріанодинові. Інозитол-трифосфатні рецептори на мембрані СР гладенької мускулатури відкриваються при взаємодії з лігандом – інозитол-1,4,5-трифосфатом, він синтезується під дією фосфоліпази С на ПМ. Ріанодинові рецептори, зі свого боку, активуються впливом кофеїну та підвищенням $[\text{Ca}^{2+}]_c$ або перевантаженням кількості Ca^{2+} у депо СР. Втім, джерела входу Ca^{2+} тісно пов'язані між собою. Так, значна активація систем транспорту одного типу буде пропорційно опосередковано впливати на зменшення активності компенсаторних систем інших типів з метою утримання іонного гомеостазу клітини [1, 3, 4].

Провідними системами видалення Ca^{2+} із цитозолу виступають: $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза (локалізується і у ПМ і у ретикулярній мембрані); $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник та Ca^{2+} -уніпортер у мітохондріях. $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ (PMCA) та CP відповідальні за підтримку $[\text{Ca}^{2+}]_c$ у стані спокою, тоді як $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник активно працює вже при регуляції високих стимуляторних концентрацій. Незважаючи на низьку афінність мітохондрій ГМК до Ca^{2+} , ці органели також діють як системи зниження $[\text{Ca}^{2+}]_c$. У такому випадку енергія дихального ланцюга, яка використовується на синтез аденозинтрифосфату (АТФ), звільняється на катіонний транспорт [3, 5-7].

Саме позаклітинне середовище у ГМ тканині є основним джерелом надходження Ca^{2+} у саркоплазму при процесах скорочення, саме тому виведення іону також відбувається саме поза межі внутрішнього простору ГМК. Така задача виконується системами транспорту саме у ПМ - $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазою, разом із $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінником. За допомогою використання методу фіксації напруги [11] було з'ясовано, що, зокрема, у клітинах міометрія (гладеньком'язова оболонка матки) саме $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза ПМ є провідною та ключовою системою у описаному каскаді процесів – завдяки роботі цього ензиму відкачується приблизно 70 % об'єму іонів, проти 30 %, які видаляються через $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмінник [7-11, 12].

Виходячи з беззаперечно важливої ролі Ca^{2+} -помпи у підтримці фізіологічних концентрацій цього іону у ГМ в стані спокою, у даному підрозділі буде детально порівняно та описано властивості даного ензиму, його структурну організацію, функціональне значення, а також регуляцію й модифікацію активності.

1.1.1. Структура та функціональні властивості РМСА

Низький вміст Ca^{2+} -АТРаза плазматичної мембрани в плазмалемі, а тому і складність отримання останніх у високоочищеному вигляді стали перешкодою на шляху до з'ясування чіткої структури ензиму. Тому будова $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ встановлена дещо гірше, ніж будова аналога такої системи у СР (SERCA), хоча була відмічена чітка гомологія в структурі обох ензимів [6-10].

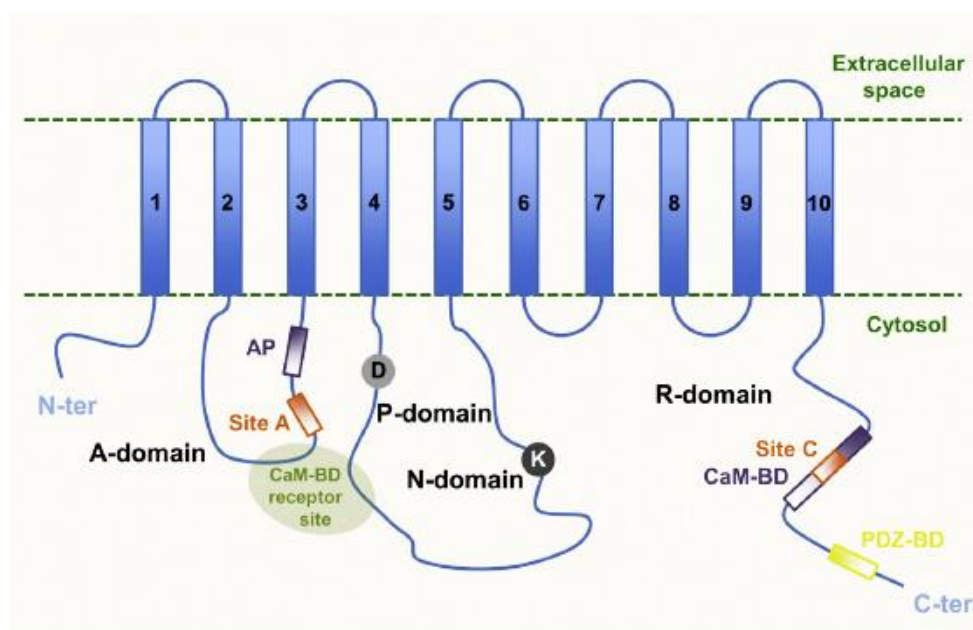


Рис. 1.1. Схема будови РМСА [15] (пояснення нижче у тексті)

Встановлено, що молекула РМСА представлена $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазою ПМ у ГМ складається з десяти трансмембранних ділянок, в яких COOH - й NH_2 -кінці розташовані із внутрішньої сторони мембрани. Значна частина протеїну (орієнтовно 80 %) знаходиться у цитозолі й складається з трьох частин. Перша – це А-петля, що формується із β -складчатих шарів між 2 й 3 трансмембранними сегментами. Ця структура необхідна для спряження гідролізу молекул АТР, транслокації катіонів кальцію, а також передачі інформації про зміну конформації під час реакційного циклу. Петля також має одну з послідовностей, що формує відповідь на дію кислих фосфоліпідів. Друга частина – N-петля, що

локалізована в петлі між наступною парою сегментів – 4 та 5 з сайтом приєднання молекул АТР і сайтом синтезу проміжного аспартил-фосфату. Остання частина – це (Р-петля), що являє собою особливу структуру, характерну лише для $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаз ПМ. Вона утворена COOH -хвостом із α -спіралей й β -складчатих шарів. На ній розміщені сайти для регуляції активності (до прикладу, сайт для зв'язування з важливим ефектором кальмодуліном). Ключова відмінність кальцієвої помпи ПМ від аналогічного ензиму в СР полягає у COOH -хвості, що в ретикулярній АТРазі є приблизно у 4 рази меншим – 20-50 залишків у останньої проти 70-200 у першої [9, 10].

Ca^{2+} -помпа ПМ у геномі ссавців кодується чотирма неалельними генами з розміром 70-100 кб. Різні ізоформи мають близько 80 % амінокислотної гомології, а от N- та С-кінці мають найменшу подібність і саме вони відповідальні за структурні відмінності між ізоформами АТРаз. ГМК мають у своєму складі найбільш універсальні Ca^{2+} -помпи – 1 і 4 ізоформи, (вони ж характерні і іншим тканинам). Втім, і $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТразу 2 ізоформи можна знайти у матці – вона може ефективно транспортувати кальцій і за відсутності стимулу кальмодуліном [11,12].

Досліджувана АТРаза міометрія характеризується питомою активністю до $80 \cdot 10^{-4}$ моль/л P_i /за 1 год на мг протеїну (солюбілізований препарат очищували афінною хроматографією на кальмодулін-сефарозі «4Б» з азолектином). Значення говорять про низьку активність, так як аналогічний показник для “базальної” магнієвої-АТрази, яка маскує вищезгадану, майже у 10 разів вищий. Варто уточнити, що показник активності визначається фізіологічним станом тканини міометрія. Зокрема, у період вагітності він значно зменшується – із $87,2 \pm 6,3$ (n=6) до $34,1 \pm 3,1$ (n=5) мк P_i /за 1 год на мг протеїну. Константа спорідненості у субстратній ензиматичній реакції MgATP^{2-} за очищеної солюбілізованої ПМ $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТрази міометрія сягає 0,56 мМ [5,6,9,12-14].

Найвища активність системи спостерігається при концентрації $[\text{Ca}^{2+}]$ у межах від 5 до $29 \cdot 10^{-4}$ моль/л значень, оптимальне значення рН для мембранному препараті – 6.4-7.0, однак для солюбілізованого ферменту - 7,5-8,0 (така різниця

виникає через відмінності у конфігурації і доступності активного центру ензиму). Температурний оптимум для помпи міометрія складає 40-45 °С (до прикладу, у еритроцитах – 37-41 °С). Енергія активації АТР-гідролазної реакції, яку каталізує система, складає 56,4 кДж/моль. У результаті перевірки транспортної системи субстратами АТР, УТР, GTP та СТР було встановлено, що Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза ПМ міометрія гідролізує виключно молекули АТР і є значно специфічною до них [13-15].

Найбільша активність накопичення Ca^{2+} , залежна від Mg^{2+} , АТР клітинах міометрія фіксується за 3-5 мМ концентрації іонів магнію (конц. АТР у інкубаційному середовищі – 3 мМ). Величини констант активації за за магнієм та максимальної швидкості реакції K_{Mg} і V_{max} складають, відповідно: у випадку Mg^{2+} , АТР-залежного накопичення Ca^{2+} – 0,39 мМ і 17,4 нмоль Ca^{2+} /за 15 хв на мГ протеїну та у випадку Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРадної активності – 0,18 мМ і $7,7 \cdot 10^{-4}$ моль/л P_i /за год на мГ протеїну за годину. Величини K_{Mg} для Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази складають 0,2 і 1,2 мМ відповідно. Вищеописані величини, також, набувають максимального значення при концентрації АТР 1 мМ (за MgCl_2 в середовищі інкубації – 5 мМ) [12,13,16].

Вищеописані розрахункові дані демонструють, що розглянута ензиматична система у гладенькій мускулатурі – це молекулярна машина, яка здійснює Mg^{2+} , АТР-залежний активний транспорт Ca^{2+} крізь ПМ клітини з саркоплазми внутрішньоклітинного простору до позаклітинного середовища тканини.

Повноцінний механізм спряження активного транспорту РМСА залишається з'ясованим лише частково, але приблизну схему вдається відтворити, виходячи із даних про роботу такої ж структури у СР клітини (SERCA).

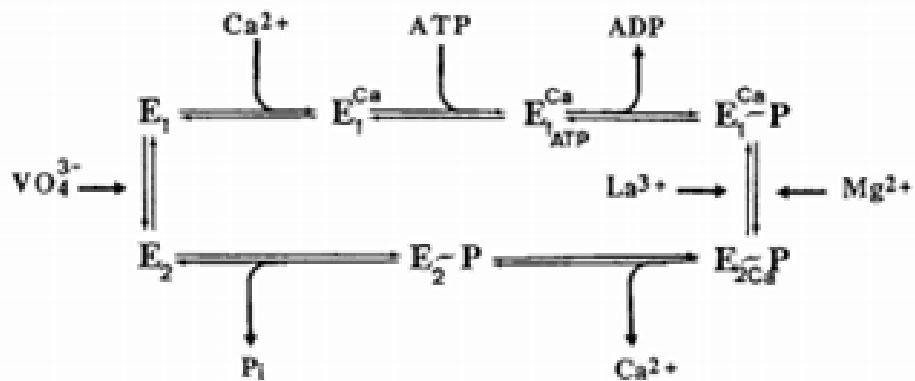


Рис. 1.2. Ланцюжок каталітичних реакцій РМСА (адаптовано з [20]).

E_1 -конформація має високу спорідненість до Ca^{2+} зі сторони цитоплазми ($K_{Ca} \sim 10^{-7} - 10^{-6} M$). Приєднання АТР з кальцієм до неї ініціює структурні зміни, які зумовлюють появу стану E_2 , тобто переміщення Ca^{2+} за межі ГМК. Далі фосфорильований проміжний продукт зазнає гідролізу, в наслідок чого вивільняється кальцій, та помпа знову повертається до E_1 стану. Швидкість дефосфорилування збільшується через іони К чи під'єднання молекул АТР до регуляторного сайту (кальмодулін пришвидшує відщеплення АТР). Перехід зі стану E_2 до E_1 інгібується за присутності Ca^{2+} в мілімолярних концентраціях.

Очищена Ca^{2+} -помпа показує найвище значення питомої активності при 40 °С. Енергія активації (E_a) гідролізу АТР сольобілізованою помпою складає $56,4 \pm 1,5$ кДж/моль, реконструйованою в азолектинових ліпосомах - $68,0 \pm 5,1$ кДж/моль, а для Mg^{2+} , АТР-залежного транспорту кальцію (завдяки реконструйованому ензиму) - $63,1 \pm 2,9$ кДж/моль [18,19].

Вагомим обмеженням, яке заважає з'ясуванню фізіологічної ролі Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ ГМ, зокрема, є недостатність даних про наявність і механізми роботи специфічних інгібіторів цього ензиму. Більшість наразі відомих даних про роботу системи визначено шляхом використання генетично модифікованих організмів, а це очевидно знижує достовірність отриманих результатів та ставить

під питання доцільність їх екстраполяції, адже підвищення чи зниження експресії транспортної системи спроможне викликати зміни у експресії також і компенсаторних систем іонного транспорту, які впливатимуть на регуляцію кальцієвого гомеостазу.

Достеменно з'ясовано, що Са-помпа ПМ забезпечує підтримання 80-100 нМ сталої концентрації (відносно низькі значення) вільного кальцію у саркоплазмі ГМК в стані спокою (завдяки високій афінності одночасно з низькою максимальною швидкістю). У клітинах міометрія провідна роль такого гомеостазу припадає на Ca^{2+} -помпу ПМ 4 ізоформи, внесок якої у релаксацію становить 65 – 85 %, а у виведення катіонів у позаклітинне середовище – 70 % (решта виводиться $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінником) [20,21].

Окремою функцією $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ виділяється антипорт протонів. Наслідком високої активності є закиснення рН всередині клітини. Даний процес додатково стимулює розслаблення ГМК, адже низькі значення рН пригнічують активність роботи L-типу Ca^{2+} -каналів (що наповнюють саркоплазму кальцієм з метою його участі у ініціації скорочення м'язу). Завдяки таким особливостям етап релаксації міометрія подовжується, що допомагає уникнути проблем із гіпоксичним ушкодженням тканини матки та плоду. Вищеописане закиснення середовища клітини може змінювати спорідненість кальцію до зв'язувальних білків, через здатність протонів конкурувати з катіоном. Наявний також опосередкований вплив на аналогічну систему у мембрані СР, бо оптимальне рН для її роботи складає 6,8. Серед менш з'ясованих та не менш важливих механізмів впливу $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -АТРази на ГМК варто відзначити контроль рівня Ca^{2+} у примембранних ділянках, що є важливим у ендокринній секреції, виділенні нейротрансмітерів тощо. Встановлено і регуляторний вплив деяких ізоформ помпи на Ca^{2+} -залежні сигнальні шляхи, що сприяють апоптозу та проліферації клітин (зокрема, кальциневрин/NFAT-шлях та вплив четвертої ізоформи АТРази) [13-18].

Вміст $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -АТРази у ПМ кількісно складає орієнтовно 0,1 % від усіх протеїнів мембрани. Найбільша густина розташування ензиму зафіксована у

кавеолах, у яких, вірогідно, ініціюються кальцієві хвилі, важливі для сигнальної трансдукції [17].

1.1.2. Механізми регуляції роботи РМСА гладеньких м'язів *in vivo*

РМСА є найбільш складним за будовою ензимом серед інших АТР гідролаз Р-типу. Вона містить велику регуляторну ділянку, тому вказана система транспорту кальцію характеризується значним спектром механізмів активування та інгібування роботи. У такому контексті виділяють важливі для функціонування помпи регуляторні механізми, серед яких наступні групи: білок-білкові взаємодії (активація через кальмодулін, взаємодія з білками, із PDZ-доменом у складі); ковалентні модифікації (олігомеризація, обмежений протеоліз, фосфорилування протеїнкіназами типів А та С); активація кислими фосфоліпідами та ненасиченими жирними кислотами [19, 20].

Літературні дані вказують на наявність механізмів активації системи у клітині, які включають просторовий та часовий фактори (схема нижче) і, зокрема, відрізняються за кінетикою (повільна/швидка активація) (рис. 1.3). Так, до головних активаторів АТРази відноситься кальмодулін, протеїнкіназа А й мембранні фосфоліпіди, кальпаїн та катіони кальцію, що зв'язані з алостеричними центрами на С-кінці ензиматичної системи [11,14,18].

Нестимульована помпа має низьку афінність до Ca^{2+} ($K_d=10-20 \cdot 10^{-4}$ моль/л), саме тому за фізіологічної концентрації Ca^{2+} у саркоплазмі вона є неактивною. При взаємодії $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази з кальмодуліном (активований Са низькомолекулярний висококонсервативний протеїн) відбувається підвищення спорідненості РМСА до катіонів Са ($K_d=200$ нМ) та збільшується значення V_{\max} реакції гідролізу молекул АТР. Наразі, за літературними даними, є два шляхи механізму активації Ca^{2+} -помпи білком кальмодуліном.



Рис. 1.3. Часові та просторові фактори регуляції роботи РМСА (адаптовано з [17]).

За першим, кальмодулін знаходиться у постійно зв'язаному з ензимом стані, однак за умов низької концентрації катіонів такий комплекс є неактивним і тому, лише додаткове зв'язування Ca^{2+} з помпою спричиняє конформаційні зміни у молекулі і таким чином зумовлює активацію. Другий шлях пояснює взаємодію кальмодуліну з ензимом тільки у комплексі з кальцієм і лише після стимуляції. За результатами низки досліджень [15,16,19] відомо, що у еритроцитах кальмодулін є набагато більш сконцентрований, ніж РМСА сконцентрований у ПМ ГМК. Константа дисоціації кальмодуліну є низькою, до того ж, у гіалоплазмі еритроцитів відсутні кальмодулінзв'язувальні білки (у першу чергу – кіназа легкого ланцюга міозину та кіназа фосфорилази), отже, імовірно, існує мембранна фракція кальмодуліну, що постійно тісно зв'язана з помпою. Вона визначає афінність останньої до Ca^{2+} і слугує незалежною субодиницею транспортного ензиму. Однак, дані більшості інших джерел літератури вказують на альтернативний механізм активації помпи регуляторним білком, оскільки виходячи з інформації про структуру будови РМСА, з'ясовано, що при відсутності стимуляції, ділянка зв'язування кальмодуліну у С-хвості є заблокованою через взаємодію з цитозольними петлями цього ж ензиму.

Припускається, що перший механізм активації Са-помпи регуляторним білком характерний для конкретних клітин високої функціональної спеціалізації. Тобто, з певних тканин неможливо виділити препарат чистого ензиму за допомогою афінної хроматографії на кальмодуліні (імовірно, як раз через зв'язаність помпи з кальмодуліном).

Іншими значущими активаторами системи виступають кислі фосфоліпіди, що аналогічно кальмодуліну виплавають на афінність АТР гідролази до Ca^{2+} . Кислі фосфоліпіди мембрани з боку негативно заряджених голівок взаємодіють з позитивно зарядженими амінокислотами А-домену й С-термінального хвосту $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази. Активуючий вплив залежить від кількості негативних зарядів молекули ліпиду. Найбільш активуючими є фосфатидилінозитол-4-фосфат та фосфатидилінозитол-4,5-біфосфат, меншу ефективність мають – молекули кардіоліпіну, фосфатидилсерину та фосфатидилінозитулу [22].

Дослідження РМСА, солюбілізований з фракцій ПМ із мозку щурів та очищений методом афінної хроматографії на кальмодуліні і реконструйований у везикулах з різним ліпідним складом, показали, що ацетильований тубулін здатен інгібувати помпу. Втім, якщо ліпідне оточення ензиму складається з більш як 10 % кислих фосфоліпідів, ацетильований тубулін (300 мкг/мл) навпаки зумовлює зростання активності транспортної системи у 27 разів [20].

С-кінцева ділянка $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази є також мішенню для протеїнкіназ А та С типів. З'ясовано, що фосфорилування серинового залишку протеїнкіназою А зумовлює зростання афінності Са-помпи до катіонів Са. Проте, активація кислими фосфоліпідами та активація фосфорилуванням – це взаємовиключні процеси. Так, активація протеїнкінази А потребує інозитолтрифосфат-залежного виходу кальцію з СР, що зі свого боку потребує гідролізу кислого фосфоліпиду фосфатидилінозитол-4,5-біфосфату PIP₂. Тобто регуляція активності ензиму опосередковується здебільшого саме короткими стимулами. Наприклад, одразу після того як певний агоніст спричиняє гідроліз фосфатидилінозитол-4,5-біфосфату, відбувається зниження активності, однак воно завершується

подальшою активацією Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази через зростання $[\text{Ca}^{2+}]_c$ та стимуляцію протеїнкіназою А [23].

За певними джерелами, фосфорилування залишків треоніну та серину нижче протеїнкіназою С призводить до зростання максимальної швидкості ензиматичної реакції, що каталізується АТРазою. Але було встановлено [21], що значення константи Міхаеліса для катіонів Са залишається сталим.

Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза ПМ є субстратом дії внутрішньоклітинних протеаз, кальпаїнів та каспаз. Відщеплення С-кінцевої ділянки білка за участю кальпаїнів призведе до активації ензиму (при цьому функціонування не залежатиме від концентрації кальмодуліну). Імовірно, такий необоротний механізм регуляції стає можливим лише за умов патологічного зростання $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Підвищення рівня останнього, виступає тригером відщеплення N-кінцевого фрагменту молекули кальпаїну, зміни конформації протеїну і як наслідок, його активації та гідролізу відповідних субстратів. Таким чином, збільшення активності помпи у відповідь на активацію кальпаїнів є захисним механізмом при перевантаженні ГМК катіонами кальцію [19-22].

Універсальним для усіх ізоформ є аутоінгібування, що полягає у екрануванні С-кінцевим доменом ділянок зв'язування кальмодуліну у 2 цитозольних петлях. Також, інгібіторами помпи можуть слугувати фосфатази, F-актин, ацетильований тубулін та протеїн «14-3-3».

Внесення G-актину у очищену АТРаду 4b ізоформи (ізолювану з еритроцитів) показало зниження активності ензиму при полімеризації актину та утворенні фібрилярної форми протеїну. При чому, зв'язок між активністю та процесами полімеризації актину реалізується через зміни $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Відповідно, зростання рівня позаклітинної концентрації іону стимулює деполімеризацію актину та підвищує активність транспорту. Такі дані свідчать про складний еволюційно розвинений механізм захисту клітин від патологічних збільшень концентрацій, у якому залучені і протеїни цитоскелету [20].

1.1.3. Штучні ефектори кальцієвої помпи плазматичної мембрани та перспективи їх застосування у медицині

Використанням методів нокауту генів, що кодують окремі ізоформи $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази мають наслідком розвиток низки патологій та летальних випадків. Зокрема, порушення експресії гену РМСА 1 на стадії ембріогенезу призводить до смерті ембріону; порушення у постембріональному періоді розвитку зумовлює низку серцево-судинних захворювань (здебільшого, артеріальну гіпертензію). Нокаут гену РМСА 2 ініціює розвиток глухоти, атаксії та загибель мотонейронів спинного мозку. Мутації у гені РМСА 3 викликають мозочкову атаксію. В решті-решт, повне видалення РМСА 4 має наслідком безпліддя у самців (через стерильність сперматозоїдів), а підвищена експресія також індукує гіпертензію [20-24].

Порушення експресії РМСА та зміна її активності також важливі у розвитку дисфункцій досліджуваного у ході роботи міометрія. Так, за прееклампсії спостерігається спадання активності помпи в ГМК міометрія та базальній мембрані синцитіотрофобласта вагітних жінок на 50 %. У разі гіпотонусу міометрія також відбувається порушення регуляції активності систем активного транспорту іонів Са з саркоплазми. Наразі засобом лікування дистоції слугує лише пептидний гормон окситоцин, але і він ефективний тільки для 50 % пологів та має чимало небажаних побічних ефектів.

Усі відомі зараз інгібітори $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ є неселективними низькоспецифічними сполуками, які пригнічують активність і інших мембранних АТРаз, що викликає додаткові ризики порушення іонного гомеостазу у ГМ. Зазначені неспецифічні інгібітори об'єднуються у 4 групи: неорганічні іони ($\text{La}^{3+}, \text{VO}^{3-}, \text{Cd}^{2+}, \text{Ni}^{2+}, \text{Mn}^{2+}$ та Zn^{2+}); сполуки, які взаємодіють з радикалами амінокислот ензиму (еозин, зокрема), антагоністи кальмодуліну (нейролептики фенотіазинового ряду, кальмідазоліум), а також фактори, які блокують антипорт H^{+} під час реакції – лужне середовище. Такі інгібітори є низькомолекулярними, простими у використанні, мають відносно невисоку

вартість. Проте, основним їх недоліком залишається відсутність специфічності відносно ізоформ Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ ГМК. Кілька років тому були віднайдені нові селективні інгібітори – пептиди із класу калоксинів та супрамолекулярні сполуки – каліксарени (розглядаються у ході роботи) [20,25].

Пошук штучних активаторів Ca^{2+} -помп ускладнений через відсутність ефективного методу детекції конформаційних змін ензиму під час реакційного циклу. Також на заваді стоїть складніша, порівняно з інгібуванням, кінетика активації ензиму. Відомий низькомолекулярний активатор SERCA – істарокзим має ряд недоліків, зокрема низьку специфічність дії, а тому вузький терапевтичний індекс, а також значну токсичність. Скринінг сполук із застосуванням методу резонансного перенесення енергії флуоресценції FRET дозволив віднайти штучно синтезовані сполуки, що здатні активувати помпу CP у кардіоміоцитах на 60 % відносно контрольного значення. Серед штучних активаторів Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ наразі відомі тільки химерні білки: тропонін С-кальмодулін, який виступає протеоміметиком кальмодуліну та підвищує афінність системи у еритроцитах до кальцію [18,21,25].

Отже, підсумовуючи підрозділ, варто наголосити на значимості Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ гладенької мускулатури як комплексної транспортної системи, яка впливає на найважливіші процеси у ГМК шляхом регуляції $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Відповідно, ключовим актуальним завданням постає пошук низькомолекулярного специфічного афінного інгібіторного ефектора, що у повній мірі дозволить вивчити роботу даної системи для попередження та терапії суттєвої кількості патофізіологічних станів з боку різних систем органів.

1.2. Каліксарени та прояви їх біологічної активності

1.2.1. Структура та фізико-хімічні властивості каліксаренів

Каліксарени, за схожістю з фулеренами, циклодекстринами та краун-ефірами, є супрамолекулярними сполуками, що здатні утворювати стабільні

комплекси типу «господар-гість» із органічними молекулами та з іонами металів, незважаючи на подібність їх властивостей, а також адаптувати власну структуру до будови речовини, що зв'язується.

Термін "калікс[*n*]арен" було запропоновано Д. Гютше. Частина «арен» вказує на ароматичні цикли, «калікс» з латинської «кубок/чаша», що відсилає до відповідної форми структури молекули (рис. 1.4). Так, каліксарени являють собою макроциклічні сполуки чашоподібної будови, що синтезуються шляхом циклоконденсації формальдегіду з паразаміщеними фенолами. Молекули зібрані з фенольних фрагментів, які сполучені між собою метиленовими містками, а середній об'єм простору порожнини всередині молекули сягає 10 кубічних ангстерм [26-28].

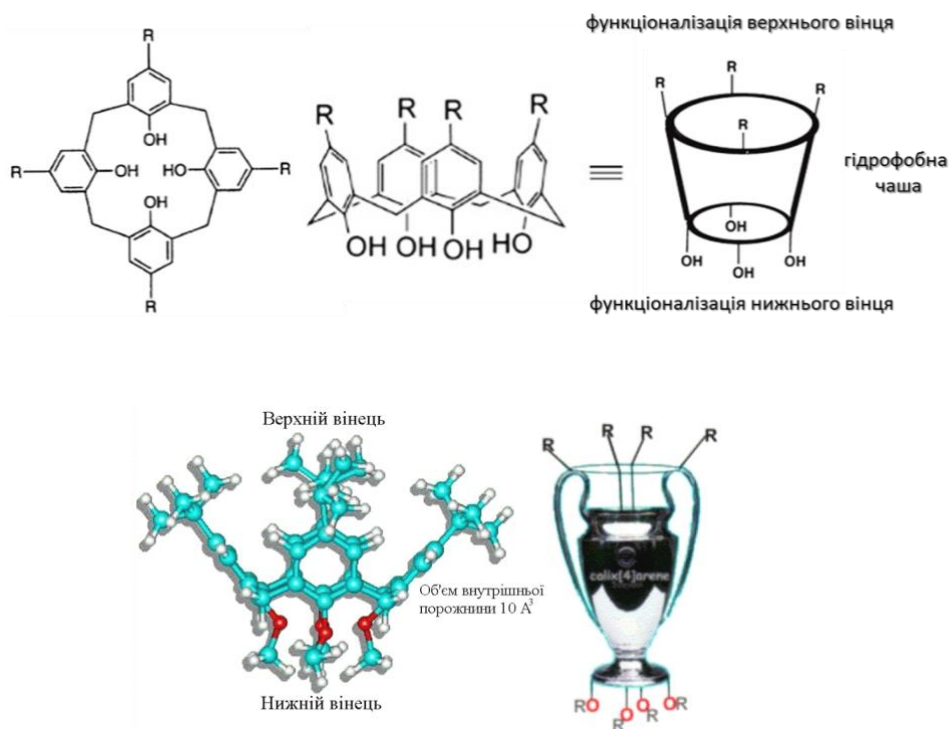


Рис. 1.4. Репрезентивна схема будови молекули калікс[4]арену (адаптовано з [26]).

Варіюючи розміри та хімічну природу замісників на вінцях чаші, можна синтезувати таргетовані сполуки з новими властивостями. Класичний метод їх синтезу дає змогу отримати молекули із різними за кількістю у макроциклі фенольними фрагментами. Шлях синтезу передбачає циклоконденсацію пара-

заміщених фенолів та формальдегіду в лінійні олігомери під дією лужного каталізатору з подальшою їх внутрішньомолекулярною циклізацією [29].

Більш сучасна та технологічна варіація синтезу дає якісний вихід (50-80 % продукту) через темплатний ефект, який реалізує відповідність між розмірами макроциклу та іона лужного металу. Відтак, результат циклізації залежатиме від температури перебігу реакції та застосування конкретного лужного металу. Наразі вже є віднайдено шлях синтезу різних похідних каліксарену, що варіюватимуть містковими групами (Se, C або S) та кількість фрагментів аренів – від 3 до 20, зокрема. Варто підкреслити, що найбільш ефективні органічні рецептори у такому контексті – це каліксаренові та тіакаліксаренові платформи з 4; 6 або 8 структурними блоками. Завдяки методам органічної хімії можна функціоналізувати молекули деякими хімічними групами. Відповідно до цього, гідроксильні групи з нижнього вінця конвертуються у естери та етери, а трет-бутильні групи верхнього вінця заміщуються внаслідок обробки сполукою хлоридом алюмінію [27-30].

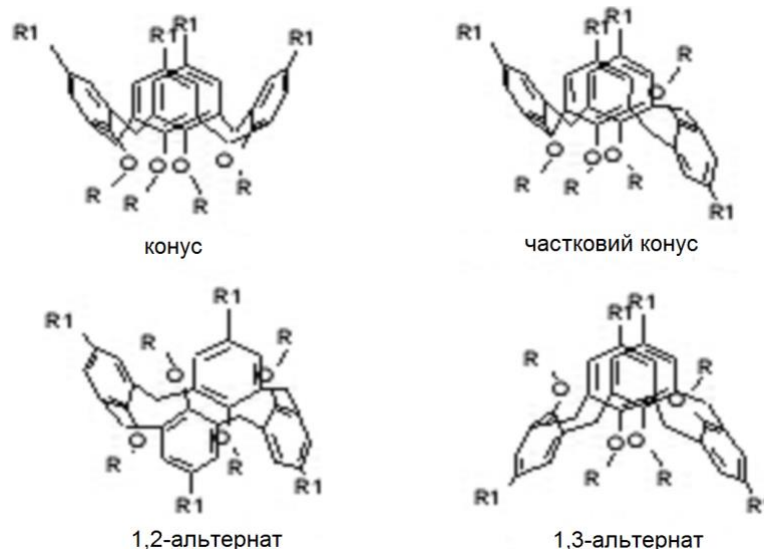


Рис. 1.5. Зоображення конформаційних станів сполук [27]

Калікс[4]аренам властиві 4 конформаційні стани – «частковий конус», «конус», «1,2 та 1,3-альтернати» (рис. 1.5.). Метиленовими зв'язками проходить головна макроциклічна площина, вона лишається незмінною, у той час як

ароматичні фрагменти змінюють розташування відносно останньої. Кількість можливих конформацій зростає разом із кількістю фрагментів фенолу для молекул із більшими макроциклами. Методом ядерно-магнітного резонансу встановлено, що у розчину каліксаренів властива чітка конусна конформація із високовпорядкованими ліпофільними порожнинами; стабілізація ж реалізується водневими зв'язками між фенольними групами у нижньому вінці.

У останні роки, розвивається надсучасна методика стереоселективного та регіоселективного нанесення на платформу каліксарену функціональних груп за для синтезу внутрішньохіральних сполук, що дасть змогу суттєво розширити можливості специфічного застосування *in vivo* [28,31,32].

1.2.2. Перспективи використання каліксаренів у біотехнології та фармакології



Рис. 1.6. Схема переліку виявлених біологічних ефектів каліксаренів.

Про перспективність використання каліксаренів у медицині, біотехнології, аналітичній хімії, матеріалознавстві, нанотехнології тощо, свідчить значна кількість стабільно зростаючих публікацій літератури за останні 10-15 років.

Сполуки можуть знайти застосування як імітатори ензимів та рецепторів, їх ефектори, біосенсори; як платформи для ДНК-чипів; можуть використовуватися для розділення нейтральних молекул та стабілізації органічних полімерів [27-33].

Існує чимало прикладів успішного застосування рецепторів, синтезованих на основі каліксаренів, однак доведення ефекторної, а зокрема каталітичної функцій цих сполук є більш складною проблемою. Наразі у літературі є чимало підтверджень активаційної або інгібуючої дії каліксаренів на транспортні ензими, утім, сам механізм залишається лише частково з'ясованим. Ензиматичною ефекторною активністю характеризується низка представників групи калікс[4]аренів та калікс[6]аренів.

Сучасні методи дозволяють використовувати каліксарени як платформи для розробки рецепторів. Так, вдалося синтезувати чутливий до цитохрому С рецептор з 4 пептидних петель, що сконструйовані на платформі калікс[4]арену. Нещодавно також запропоновано використання комплексу гадолінію із калікс[4]ареном як контрастного агенту при проведенні МРТ дослідів. Комплекс зв'язується із сироватковим альбуміном людини через координацію іонами металу та завдяки гідрофобним взаємодіям макроциклічних ароматичних кілець із фрагментами аспаргіну й глутаміну. Також, серія згаданих сполук розглядається як антагоніст тромбоцитарного фактору росту й наслідків дії останнього у живих системах. Серед іншого, сполуки виступають інгібіторами хімотрипсину, холінестеразу, лужної фосфатази й 1-лізиноксидазу. Аналоги ензимів - сульфокалікс[6]арени каталізують гідратацію НАД \cdot Н та синтетичних аналогів, нікотинамідів, естерів карбонових кислот, ефірів фосфорних кислот. Водорозчинний калікс[4]арентетрасульфонат не містить металів та каталізує гідроліз молекул АТР, що з'ясовано через використання методів імпульсного радіолізу та лазерного фотолізу [28,34,35].

Здатність до комплексоутворення та можливість функціоналізації хімічними групами – перевага досліджуваних молекул, що уможлиблює їх застосування як складних біологічних систем. Так, було досягнуто прогресу у

створенні каліксаренових протеоміметиків (імітують структуру та функцію частин поверхні протеїнів та модулюють білок-білкові взаємодії). Встановлено також низку протипухлинних властивостей калікс[6]аренів, що чинять інгібуючий вплив на процеси проліферації ракових клітин підшлункової залози. Так, препарат «ОТХ008» (США) – інгібітор білка галектину-1 використовується у рамках протоколу онкологічної терапії [35]. На додаток, ці супрамолекулярні комплекси знаходять застосування як бактерицидні, фунгіцидні та противірусні сполуки.

Окремим важливим напрямком виділимо використання каліксаренів для взаємодії з клітинними мембранами, що забезпечується їх ароматичним блоком з гідрофобним властивостям. Так, сполуки здатні вбудовуватись у мембрану, з метою реалізації трансмембранного транспорту деяких речовин завдяки імітації дії іонних каналів. Відповідно до цього, трет-бутилкалікс[4]арен селективно транспортує іони натрію полегшеною дифузиею; калікс[5]арен – якісний переносник кальцію; а калікс[6]арен – цезію [30-34].

Останні часом у науковій спільноті активно розробляють нові форми та класи сполук за для їх використання як регуляторів ензиматичної активності АТР-гідролазних систем у клітині. Зокрема, в Інституті біохімії ім. Палладіна НАНУ проведено низку успішних дослідів із калікс[4]аренами структурних типів **C-97**, **C-99**, **C-107**, **C-956** та інші (рис. 1.6.). У ході дослідів з'язовано, що вищезгадані молекули зумовлюють деполяризацію ПМ та збільшують мембранний потенціал мітохондрій (на 45 % вище від контролю за концентрації 100 нМ протягом 5 хв.), а також впливають на АТРазну активність субфрагмента-1 у клітинах міометрія, тим самим збільшуючи гідродинамічний діаметр ГМК (пояснюється утворенням комплексу голівки міозину з каліксареном) [36].

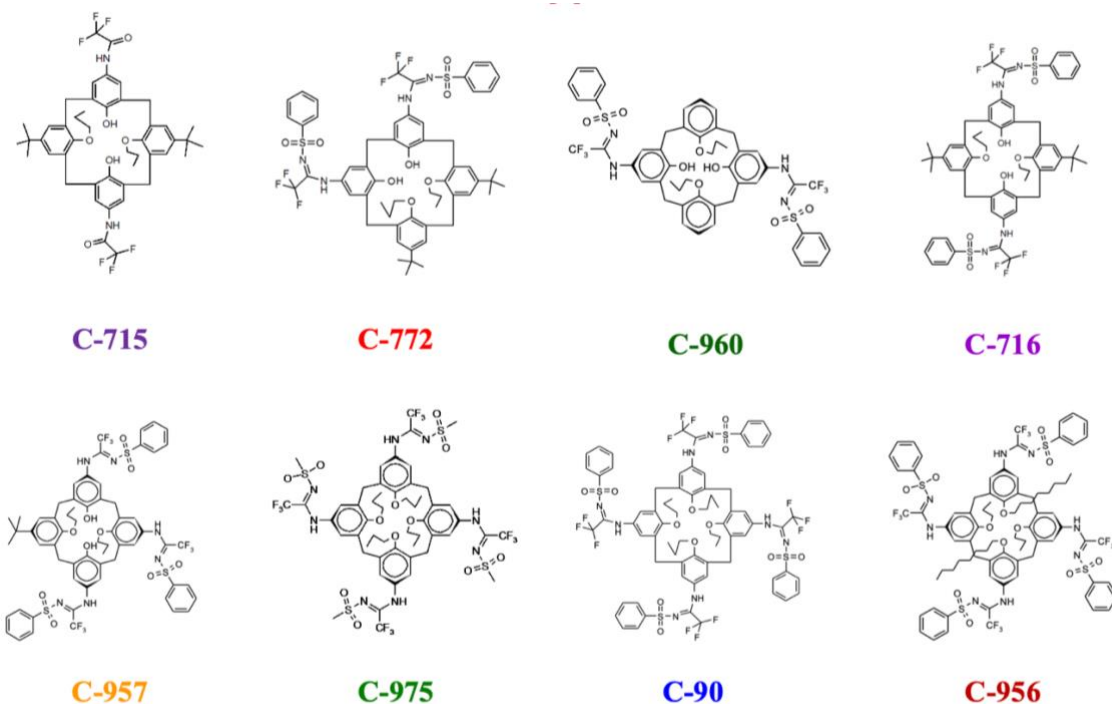


Рис. 1.7. Структурні формули інших каліксаренів, синтезованих у рамках схеми дослідів.

Важливо підкреслити, що у разі широкого фармакологічного застосування сполук з класу каліксаренів необхідно бути певними у їх нездатності до виклику імунної відповіді, а також високої токсичності, появі гемолізу й агрегації еритроцитів. Отож, проведення широкої низки досліджень продемонструвало прийнятність використання калікс[а]ренів у біомедичній практиці [33-37].

Так, сполуки продемонстрували відсутність канцерогенного впливу на організм (за тестом Еймса). Доведено також, що каліксарени та їх похідні не впливають на ріст фібробластів людини та не проявляють токсичних властивостей за дозування менше 100 мг / 1 кг маси миші. Ліпідні наночастинки амфіфільних каліксаренів у межах 300 мг/л не проявляють гемолітичних ефектів й не мають впливу на функціонування нейтрофілів. Каліксарени, до нижнього вінця яких під'єднані гуанідинові групи, демонструють незначний рівень токсичного впливу на клітини – так, близько 80 % із загальної кількості зберегли прояви життєдіяльності через 48 годин після взаємодії. «Чисті» каліксарени

матриці (чаша без під'єднаних груп) не викликали відповіді імунної системи. Антитіла до калікс[4]аренів утворюються у випадку імунізації сполуками, що є кон'югованими з протеїнами (імунна відповідь залежатиме від природи переносника) [33-37].

Підсумовуючи підрозділ, варто заключити, що макроциклічні сполуки з класу каліксаренів проявляють себе як ефективні модулятори значної кількості біологічних процесів у живих системах на різних рівнях; вони успішно використовуються у міждисциплінарних галузях біології й медицини та знаходять застосування як у фундаментальних дослідженнях, так і як фармакологічні препарати, що мають якісний терапевтичний вплив при лікуванні ряду патологічних станів організму людини та тварин. Проте, актуальною проблемою постає недостатня кількість даних щодо ролі каліксаренів як ефекторів АТР-гідролазних систем, зокрема Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ гладенької мускулатури.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Експериментальна частина кваліфікаційної роботи магістра виконана на базі відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (зав. відділом – академік НАН України Сергій Олексійович Костерін).

2.1. Синтез тіакалікс[4]арену С-1087

Тіакалікс[4]арен С-1087

(5,11,17,23тетра(трифтор)метил(фенілсульфоніліміно)метиламіно-25,27-дигексилокси-26,28-дигідрокситіакалікс[4]арен) та суто тіакаліксаренова «чаша» без приєднаних до неї груп – тіакалікс[4]арен С-1145 (25,27-дипропокситіакалікс[4]арен) (рис. 2.1.) були синтезовані та охарактеризовані із використанням методів ЯМР та інфрачервоної спектроскопії у відділі хімії фосфоранів Інституту органічної хімії НАН України (зав. відділом – академік НАНУ професор В.І. Кальченко).

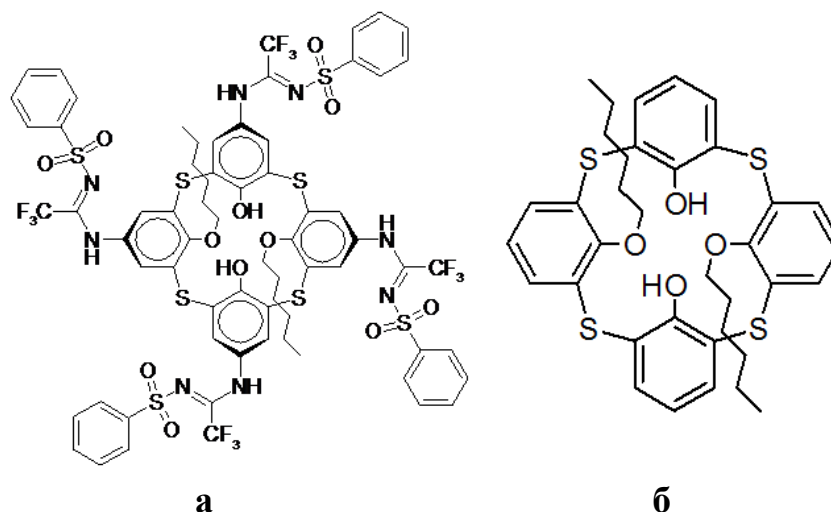


Рис. 2.1. Структурні формули досліджуваного тіакалікс[4]арену С-1087 (а) та тіакаліксаренової «чаші» С-1145 (б), що використовувалася у якості контрольного тесту.

Стисла схема синтезу тіакаліксарену **C-1087** представлена на рис. 2.2.

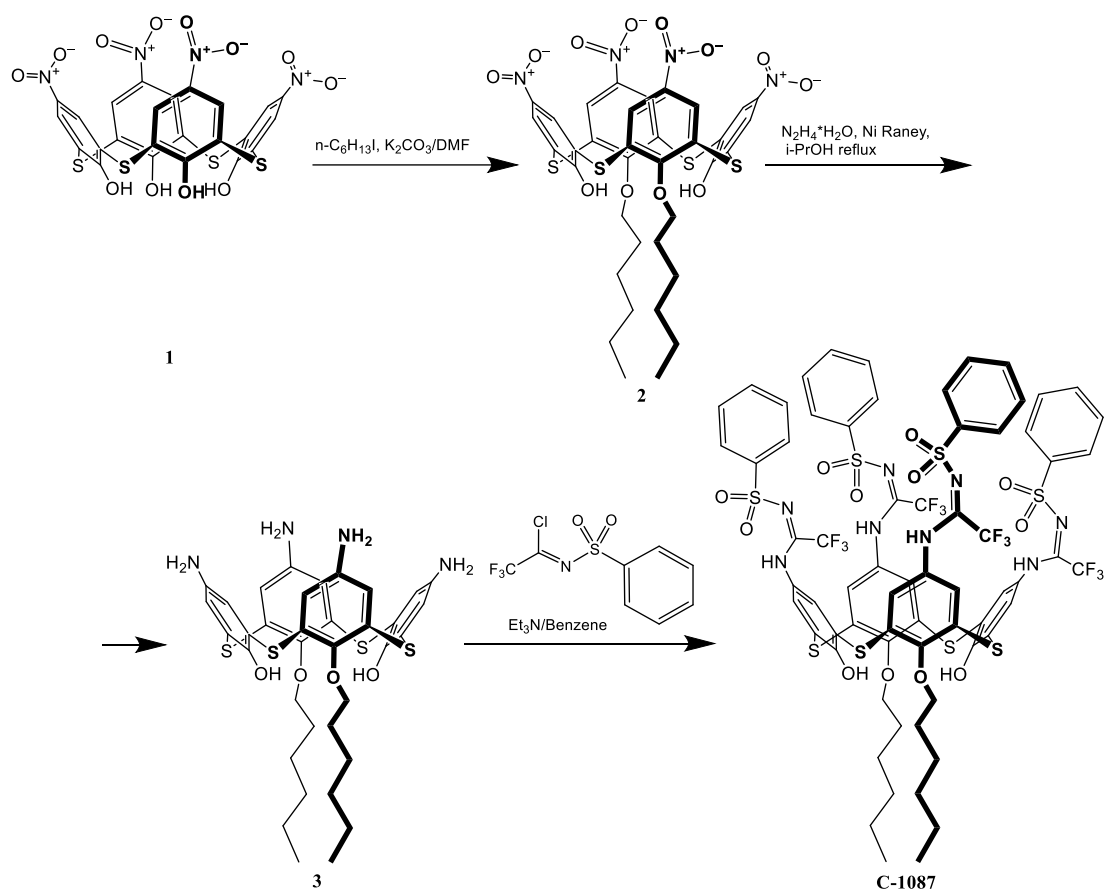


Рис. 2.2. Схема синтезу тіакалікс[4]арену **C-1087**.

2.2. Виділення суспензії ГМК з матки

При виконанні експериментальної частини курсової роботи використовували препарат ГМК міометрія невагітних свиней та щурів. Матку свиней одержала у м. Київ на Дарницькому м'ясокомбінаті. Невдовзі після забою тварини, орган видаляли і очищали від жиру та ендометрія, промивали у фізіологічному розчині й залишали зберігати у рідкому азоті. Лабораторні тварини – невагітні щури, які утримувалися на стандартному раціоні у віварії. Піддослідні тварини наркотизувалися методом їх поміщення у камеру, що наповнювалася парами хлороформу. Після даної процедури щурів евтаназували шляхом швидкої декапітації та відокремлювали матку з метою подальшого виділення суспензії клітин з органу. Всі досліди проводились у чіткій

відповідності до: Хельсінської декларації (Всесвітня медична асамблея, 1964); універсальної декларації з біоетики та прав людини (ООН, 1997); міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986); норм Конвенції про захист прав людини у зв'язку з впровадженням нових біомедичних технологій, прийнятою у 1997 році у м. Ов'єдо (Іспанія); декларації принципів толерантності (28 сесія ЮНЕСКО, 1995), а також підписаного Верховною Радою України у 2002 році, Закону України № 3447 IV «Про захист тварин від жорстокого поводження».

За 16 годин перед забором тканини, невагітних щурів піддавали естрогенізації. Суспензію ГМК міометрія одержували методом Mollard та співавторів [38] (з певними модифікаціями).

Виділений орган матки очищали від сполучної тканини та переносили в Хенкс (розчин А) складу: (мМ): NaCl – 136,9; KCl - 5,36; KH_2PO_4 - 0,44; NaHCO_3 - 0,26; Na_2HPO_4 - 0,26; CaCl_2 - 1,26; MgCl_2 – 0,4; MgSO_4 – 0,4; глюкоза – 5,5; HEPES (pH = 7,4, 37 °C) - 10. Тканину розрізали ножицями на шматки приблизно 2 на 2 мм. Згодом препарат відмивали від крові та високих концентрацій іонів Ca, три рази по 5 хв поміщували в 5 мл Хенкс розчину Б (на відміну від А – не містить MgCl_2 і MgSO_4 , проте має у складі 0,03 мМ CaCl_2). Після такої процедури тканину інкубували протягом 20 хв за 37 °C, у режимі постійного перемішування у 2 мл середовища дисоціації тканини. Середовище – це розчин колагенази (0,1 %), бичого сироваткового альбуміну (0,1 %) і соєвого інгібітора трипсину (0,01 %), який був підготовлений на Хенкс розчині Б. Після 20 хв середовище дисоціації тканини відбирали, в той час як тканину переносили у розчин Б, вільний від ензиматичного препарату. З метою прискорення дисоціації, препарат від 15 до 20 разів піпетували скляною піпетку протягом 1-2 хвилин. Розчин Б (із дисоційованими клітинами) відбирали, а препарат із тканиною знову додавали до іншої порції середовища дисоціації ГМК з колагеназою та соєвим інгібітором трипсину. Процедуру аналогічно повторювали 5 або 6 разів. Дві перші порції розчину Б, що використовувався у піпетуванні (тобто, не містив ні колагенази, а

ні соєвого інгібітору трипсину) та містив дисоційовані клітини, відкидали, в зв'язку з тим, що вони містили у своєму складі пошкоджені фрагменти клітин та тканини у цілому. Решту – 3 або 4 порції збирали, об'єднували та центрифугували 10 хв за 80g. Отриманий осад з ГМК промивали розчином 25 мМ HEPES-КОН (рН=7,4; 8°C), 150 мМ NaCl і 0,4% бичого сивороточного альбуміну. Після промивання знову піддавали центрифугуванню за тих самих умов. Протягом підготування та безпосередньо проведення запланованого дослідження, клітини поміщали у спеціальне середовище зберігання, що складалось із 25 мМ HEPES-КОН (рН=7,4; 8 °C), 150 мМ NaCl. Флакони закріплювали у посудині з льодом з метою підтримки низьких температур препарату.

Використовуючи гемоцитометр (камеру Горяєва), було проведено розрахунки як безпосередньо життєздатних клітин, так і загальної кількості клітин у виділеному препараті. Так, в 1 мл отриманої ГМК суспензії було знайдено у середньому $6,58 \times 10^6$ міоцитів (заг. кількість), 90-95 % з яких зберігали життєздатність (такий параметр визначали шляхом фарбування препарату вітальним барвником трипановим синім).

З метою додаткової перевірки препарату було знайдено та візуалізовано одну ГМК за допомогою методу скануючої конфокальної мікроскопії (прилад LSM 510 META “Carl Zeiss”, Німеччина). Клітини забарвлювали зондом Hoerst, чутливим до ДНК та fluo-4 AM, чутливим до вільного кальцію (рис. 2.3).



Рис. 2.3. Візуалізація ГМК міометрія з препарату, отримана скануючим лазерним конфокальним мікроскопом.

Проведене дослідження показує, що клітини мають чітку властиву гладеньком'язову морфологію з веретеноподібною формою. Для експериментів використовувалися такі ГМК, що перевірялися на відсутність збільшення флуоресценції у відповідь на внесення вільного Ca^{2+} (1 мМ конц.) на предметне скельце препарату. У випадку наявних розривів у структурі ПМ, ми мали б спостерігати чітко виражену зміну значень яскравості флуоресценції (через зв'язку кальцію з зондом у саркоплазмі), тобто зростання $[\text{Ca}^{2+}]_c$ в пошкодженій клітині внаслідок прямого проникнення Ca^{2+} у цитозоль ГМК через розриви у суцільній структурі ПМ.

2.3. Виділення фракції плазматичних мембран з клітин міометрія

Фракцію ПМ виділяли із ГМК міометрія свині відповідно до методики, яка описана у роботі Кондратюк Т. та співавторів [39]. Матку відокремлювали 10-20 хв. потому після забою тварини, очищали орган від жирової тканини та ендометрію, згодом промивали у фізіологічному розчині та зберігали 10-20 грамовими порціями у рідкому азоті. Безпосередньо перед експериментом 15 г тканини подрібнювали ножицями та ножовим гомогенізатором "Політрон" (10000 об/хв тричі по 20 секунд) з перервами у 2 хвилини з метою охолодження у 60 мл середовища гомогенізації. Співвідношення тканини до такого середовища гомогенізації складало 1:4. Склад: мМ: 20 трис-НСІ (рН 7,4 при 8 °С), 250 сахароза, 2 етилендіамінтетраоцтова кислота, 600 КСІ (усі операції проводили при 4 °С). Одержаний гомогенат центрифугували при 18 хв 3000 g з метою видалення обривків тканин та органел, ядер та мітохондрій зокрема. Надосадову рідину нашаровували на ступінчатий градієнт сахарози у такому порядку із співвідношенням: 30 % сахароза з 0,6 М КСІ : 15 % сахароза з 0,6 М КСІ : надосадова рідина = 6 мл : 5 мл : 20 мл. Три пробірки із системою ступінчатого градієнта центрифугували в бакет-роторі протягом 90 хв. 105000 g, за температури +8 °С. Інтерфазну зону поміж двох розчинів сахарози відбирали

пастерівською піпеткою, тоді як отриману суспензію ПМ розводили охолодженим бідистилятом до 2,5 % сахарози і осаджували протягом 1 години за 105000 g на кутовому роторі. Осад, що являв собою мембранні везикули, суспендували у 3 мл середовища складом, мМ: 20 Tris-HCl (pH 7,4 при 8 °C), 150 мМ KCl. Суспензію препарату зберігали у скрапленому азоті.

Використання вищезначеного методу [39] одержання фракції ПМ ГМК гарантує одержання фракції, збагаченої везикульованими фрагментами інвертованих мембран, що замкнені внутрішньою стороною назовні.

Кількість протеїну у препараті мембрани визначали методом Bradford [40] за реакцією із реактивом Кумасі G250. В основі методу лежить реакція аніонної форми Кумасі з позитивно зарядженими амінокислотами у складі білка. Завдяки такій реакції, колір барвника змінюється із червоно-коричневого на синій із максимумом поглинання у 595 нм. Така техніка характеризується високою чутливістю при визначенні концентраційних показників білка у межах 2-120 мкг/мл (розвиток стійкого забарвлення розчину протеїнів, що не зникає протягом години щонайменше). Також, на відміну від альтернативного методу Лоурі, визначенню білка за допомогою зазначеного реактиву Кумасі G250 не заважають іони Na, Mg, K чи наявність у розчині Tris й EDTA.

2.4. Визначення РМСА активності у фракції плазматичних мембран

Загальну АТРазну активність визначали у фракції ПМ клітин міометрія при 37 °C у стандартному середовищі (0,4 мл), склад (мМ): 3 АТР, 3 MgCl₂, 0,95 CaCl₂, 25 NaCl, 125 KCl, 1 EGTA, 20 Hepes-tris-буфер (pH 7,4), 1 NaN₃, 1 убаїн, 0,1 · 10⁻⁴ моль/л тапсигаргін і 0,1 % дигітонін. Необхідні розрахунки були виконані із використанням комп'ютерної програми «MAXCHEL». Кількість білку фракції в пробі складає 20-30 мкг. Час інкубації становить 5 хв. Реакцію ініціювали введенням до середовища інкубації аліквоти 50 мкл суспензії ПМ, а зупиняли - додаванням 1 мл “стоп“-розчину складу: 1,5 М натрій оцтовокислий,

3,7 % формальдегід, 14 % етанол, 5 % ТХУ, рН 4,3 (при 8 °С). Кількість продукту реакції P_i визначали за методом W. Rathbun et V. Betlach [24].

Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРазну активність розраховували як різницю між величинами АТРазних активностей за умов присутності та відсутності екзогенних іонів Са.

Для визначення АТРазної активності СР суспензію клітин (концентрація білку 20 мкг в пробі) пермеабілізували дігітоніном (0,1 %). Загальну АТРазну активність визначали у стандартному середовищі (об'єм – 0,4 мл), яке містило (мМ): 3 АТР, 3 $MgCl_2$, 0,95 $CaCl_2$, 25 NaCl, 125 KCl, 1 ЕГТА, 20 Нерес-tris-буфер (рН 7,4), 1 NaN_3 , 1 убаїн. Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРазну активність СР розраховували по різниці між величинами АТРазної активності за присутності та відсутності в середовищі інкубації $0,1 \cdot 10^{-4}$ моль/л тапсигаргіну.

У дослідах по вивченню впливу різних концентрацій тіакалікс[4]арену С-1087 ($1-100 \cdot 10^{-4}$ моль/л) на Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРазну активність використовували стандартне середовище інкубації, що було описане вище, до якого додавали аліквоту розчину тіакалікс[4]арену у відповідній концентрації. У дослідах використовували концентрований (20 мМ) розчин калікс[4]арену С-1087 в ДМСО, який розводили водою [41,42].

2.5. Дослідження міоцитів методом лазерної скануючої конфокальної мікроскопії

Клітини міометрія (об'єм суспензії 100 мкл) при проведенні конфокально-мікроскопічних досліджень іммобілізували 2 год на предметному склі, що обробляли полі-L-лізином (100 мкл), за температури 25 °С. Міоцити, що не закріплювалися, відмивали розчином Хенксу Б (склад та властивості зазначені у попередніх підрозділах), після чого до іммобілізованих ГМК додавали 100 мкл розчину Б.

При фіксації динаміки змін $[Ca^{2+}]_c$ міоцити обробляли двома зондами: Hoechst 33342 (тестує ядро клітини через чутливість до ДНК; синій колір

флуоресценції) та fluo-4 AM (тестує зміну концентрації кальцію у саркоплазмі; зелений колір флуоресценції). Другий зонд було використано у формі ацетоксиметил ефіру (AM) за для забезпечення легкого проходження крізь неущкоджено ПМ. У середовищі всередині клітини, з ацетоксиметил ефіру під впливом естераз вивільняються карбоксильні групи, завдяки чому барвник набуває здатності до зв'язування кальцію і, як наслідок, активізації флуоресценції безпосередньо у цитозольному просторі, незважаючи на порядково вищу концентрацію Ca у позаклітинному середовищі. Для розрахунку потрібної концентрації зонду застосовували формулу з урахуванням маси та молярної ваги барвника. Таким чином, кінцева концентрація. – $4,6 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Важливо, що даний флуоресцентний барвник за властивостями є Ca^{2+} -зв'язуючим буфером, а тому при дослідженнях на ГМК варто застосовувати саме мінімально допустиму дієву концентрацію зонду, адже у великій кількості (конц. більше $200 \cdot 10^{-4}$ моль/л) зонд здатен порушити функціональної здатності ГМ через захоплення значної кількості іонів Ca. З метою покращення навантаження у фарбувальний розчин додавали Pluronic 0,2 %. 20 хв. потому після процедури фарбування, на препарат наносили нове середовище для змиття залишків зайвого барвника.

Власне дослідження динаміки руху кальцію проводили у режимі Multi Track на скануючому лазерному конфокальному мікроскопі LSM 510 META “Carl Zeiss”, Німеччина. Процес вимірювання являє собою серію послідовних знімків клітини (time series) з частотою 15-20 секунд впродовж 5 хвилин, під час яких вносили 2 мкл диметилсульфоксид (ДМСО) або аліквоту тіакалікс[4]арену **C-1145** (суто чаша) $20 \cdot 10^{-4}$ моль/л у якості контролю, чи власне $20 \cdot 10^{-4}$ моль/л тіакалікс[4]арен **C-1087** у якості проби. Флуоресценцію збуджували діодним лазером на 405 нм для ДНК-чутливого Hoechst 33342, реєстрували світлофільтром BP 420-480 нм, а флуоресценцію Ca-чутливого fluo-4 AM збуджували аргоновим лазером на 488 нм та реєстрували у діапазоні 505-530 нм (світлофільтр BP 505-530).

Для кількісного аналізу використовували стандартну програмну функцію Region of Interest, вона формує графік залежності інтенсивності (усереднений для виділеної області клітини) флуоресценції у відносних одиницях від часу.

2.6. Тензометричні та механокінетичні дослідження

Тензометричні досліди проводили на препаратах поздовжніх ГМ рогів матки із збереженим ендотелієм. М'язові смужки розміром – 2 x 10 мм вміщували в робочу камеру (2 мл) з проточним розчином Кребса (швидкість протікання - 5 мл/хв.) при 37 °С. Скоротливу активність реєстрували як у ізометричному так і у ізотонічному режимах. У ізометричному режимі надавали пасивний натяг рівнем 10 мН; а за ізотонічного режиму, вільний кінець препарату навантажували 10 мН. Препарат зберігали 1 годину до стабільної відтворюваності скорочень. Сигнали реєстрували аналого-цифровим перетворювачем.

В дослідах використовували розчин Кребса (мМ): 120,4 NaCl; 5,9 KCl; 15,5 NaHCO₃; 1,2 NaH₂PO₄; 1,2 MgCl₂; 2,5 CaCl₂; 11,5 глюкоза; рН розчину складає 7,4. Гіперкалієвий розчин (K⁺ у конц. 80 мМ) готували ізотонічною заміною в вихідному розчині Кребса необхідної частини іонів Na⁺ на еквімолярну кількість іонів K⁺.

Тіакалікс[4]арен **C-1087** попередньо розчиняли у ДМСО, згодом, у 10⁻⁴ моль/л конц. вносили у розчин Кребса або гіперкалієвий розчин (остаточна аліквота - 0,1% від заг. об'єм). Контрольні скорочення досліджували в розчинах, що містили 0,1% ДМСО (використання 0,1% ДМСО не впливає на базальне напруження або спонтанні й викликані скорочення препаратів міометрія).

Вивчення кінетики спонтанної скоротливої активності ізометричного та ізотонічного скорочення-розслаблення здійснювали за емпіричним багатопараметричним методом комплексного механокінетичного аналізу окремо на рівні фаз скорочення та розслаблення мускулатури [28]. За фазу скорочення

вважали фрагмент скоротливої відповіді від початку зміни сили до моменту її максимального значення (амплітуда фазного скорочення). Фаза розслаблення починалась від максимуму фазного скорочення та тривала до виходу на стабільний рівень тонічного скорочення. У відповідності до такого методу експериментальні механокінетичні криві ізометричного скорочення-розслаблення лінеаризували у координатах:

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

де f , t – значення сили та часу на рівні скоротливого циклу, F_C і F_R – значення сили в точках перегину механограми на рівні фаз скорочення і розслаблення відповідно, а Δt – заданий довільно фіксований інтервал часу (35-70 секунд).

Ізотонічні криві (окремо на рівні фази укорочення і фази розслаблення) лінеаризували у координатах:

$$\left[\ln\left(\frac{\Delta L_R}{\Delta L_C}\right); \ln\left(1 + \frac{\Delta t}{t}\right) \right],$$

де ΔL і t – миттєві значення укорочення препарату (відносно початкової довжини L_0) та часу на рівні скоротливого циклу, ΔL_C і ΔL_R – відповідно значення укорочення препарату в точках перегину механограми на рівні фаз скорочення і розслаблення, Δt – заданий довільно фіксований інтервал часу (20-29 секунд).

З лінеаризованих графіків визначали k та n константи, що використовували для розрахунку часових та силових параметрів відповідно: (τ_0 , τ_C і τ_R) й (F_{\max} , F_C та F_R у випадку ізометричних скорочень або ΔL_{\max} , ΔL_C і ΔL_R – ізотонічних),

швидкісних (V_C і V_R), а також відносних параметрів ($\frac{\tau_0}{\tau'_0}, \frac{\tau_C}{\tau'_C}, \frac{\tau_R}{\tau'_R}, \frac{F_{max}}{F'_{max}}, \frac{F_C}{F'_C}, \frac{F_R}{F'_R}, \frac{\Delta L_{max}}{\Delta L'_{max}}, \frac{\Delta L_C}{\Delta L'_C}, \frac{\Delta L_R}{\Delta L'_R}, \frac{V_C}{V'_C}$ та $\frac{V_R}{V'_R}$).

2.7. *In silico* методи дослідження РМСА та С-1087

Усі дослідження з комп'ютерного моделювання взаємодій кальцієвої помпи зі структурою тіакалікс[4]арену С-1087 були виконані та люб'язно надані кандидатом біологічних наук, старшим науковим співробітником Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України Бєвза Олександром Васильовичем.

Хімічну структуру тіакалікс[4]арену, що виступав лігандом, створювали методом оптимізації геометрії. Оптимізовані структури були задіяні для стикування із S-1 міометрія в докінг-програмному забезпеченні «AutoDock» (версія 4.1). Визначення стабільності зв'язування та конформаційних змін у досліджуваному комплексі здійснювали методом моделювання молекулярної динаміки. Оптимізацію геометрії - мінімізацію енергії та молекулярну динаміку проводили у ПЗ «Chimera» із врахуванням електростатичних та Леннард-Джонс взаємодій, за наступних умов: інтервал кроку обчислення – 1,0 фс; інтервал кадру – 10 фс; закінчення після 10000 кроків; швидкість нагрівання/охолодження – 1 ккал/атом/пс; баростат Андерсена – 1,0132 бар, час відновлення – 1,5 пс; термостат Нозе' – 298 К, час відновлення – 0,2 К/пс. Застосовували силове поле Amber ff14SB. Метод підрахунку заряду атомів Zn – AM1 BCC.

Відбір оптимальних результатів проводили: за геометричними показниками положення лігандів в комплексі «каліксарен – субфрагмент-1 міометрія» та за енергетичними показниками, враховуючи енергію зв'язування у комплексі «ліганд – рецептор».

Наступним етапом розраховували оптимальну геометрію утворених комплексів та визначали енергетично вигідне розташування лігандів у просторі субфрагмент-1 міометрія. У роботі використовували просторову структуру S-1 міозину з ідентифікатором - 6lIE в базі даних протеїнів RSCB Protein Data Bank.

Мінімізацію проводили завдяки методу MMFF94 (Merck Molecular Force Field), із врахуванням Ван-дер-Ваальсових та електростатичних взаємодій, за наступних параметрів: крутизна сходження – 100; її розмір кроку – 0,002 нм; кон'югований градієнт кроків сходження – 10; розмір кон'югованого градієнту кроків сходження – 0,002 нм.

2.8. Кінетичний та статистичний аналіз

Статистичний аналіз даних проводили із задіянням методів варіаційної статистики. Кінетичні та статистичні розрахунки проводили з використанням ПЗ MS Excel та Origin Lab версій 2019 року.

Перевірку вибірок на нормальний розподіл генеральних сукупностей здійснювали за критерієм Шапіро-Уїлка. Для розрахунку вірогідних відмінностей між середніми величинами вибірок використовували t-критерій Стьюдента. У інших випадках достовірними вважали результати за виконання умови $p < 0.05$. Аналіз достовірності апроксимації даних лінійною функцією здійснювали за F-критерієм Фішера; коефіцієнти детермінації (R^2) становили не менше 0,96. Результати представлені як середнє арифметичне \pm стандартна похибка середнього, значення n вказує на кількість дослідів.

2.9. Матеріали та реактиви

В ході виконання роботи було використано наступні реактиви: тіакалікс[4]арен **C-1145**, тіакалікс[4]арен **C-1087**, аденозинтрифосфат, Нерес, убаїн, тапсигаргін, Hoechst, fluo-4 AM, коллагеназа, полі-L-лізин (“Sigma”, США); Tris-гідроксиметил-амінометан (“Reanal”, Угорщина); дигітонін (“Merck”, Німеччина); ЕГТА (“Fluka”, Швейцарія); окситоцин (“Гедеон Ріхтер”, Угорщина). А також інші реактиви українського виробництва класифікації ч.д.а. та х.ч.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Дія тіакалікс[4]арену С-1087 та активність АТРази плазматичної мембрани

У нещодавніх дослідженнях було продемонстровано синтетичну сполуку калікс[4]арен **С-90** (один з перших ефективних структурних попередників тіакалікс[4]арену **С-1087**), яка в концентрації $100 \cdot 10^{-4}$ моль/л на 75 % відносно контролю пригнічує активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ міометрія [8]. Додатково також було з'ясовано, що згадана сполука пригнічує ензиматичну активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази, локалізованої у СР на 58 % відносно контролю (рис. 3.1.).

Відтак, у ході експериментів, нами було досліджено дію низки структурних аналогів калікс[4]арену **С-90**, зокрема і попередника **С-956** у результаті чого було з'ясовано, що найбільш ефективні значення інгібіторної дії на Ca^{2+} -помпу демонструє саме тіакалікс[4]арен **С-1087**. Якість його дії, а також його селективність по відношенню до помпи СР помітно покращуються у порівнянні з конкурентними сполуками-попередниками.

Так, нами було встановлено, що макроциклічна сполука тіакалікс[4]арен з кодовою назвою **С-1087** у $100 \cdot 10^{-4}$ моль/л концентрації ефективно інгібує $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазну активність ПМ ГМК матки до значень $14,9 \pm 0,5$ % відносно контрольного значення взятого за 100 %. Також, з'ясовано, що сполука чинить значно менш ефективний вплив на ензиматичну активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР – на 34 % відносно контролю, що демонструє його високу селективність. (рис. 3.1.). Така властивість є вкрай актуальною, оскільки транспортна помпа у СР вже має відповідні селективні ефектори (детальніше у підрозділі 1.1.3.).

Важливо відмітити, що тіакаліксаренова «чаша» (тіакалікс[4]арен **С-1145** без специфічних функціональних груп у молекулі), що відігравала роль контролю (підтверджуючи саме реактивну дію «прикріплених» до чаші груп)

практично не має впливу на ензиматичну активність маткової $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ (графічні дані не наведено).

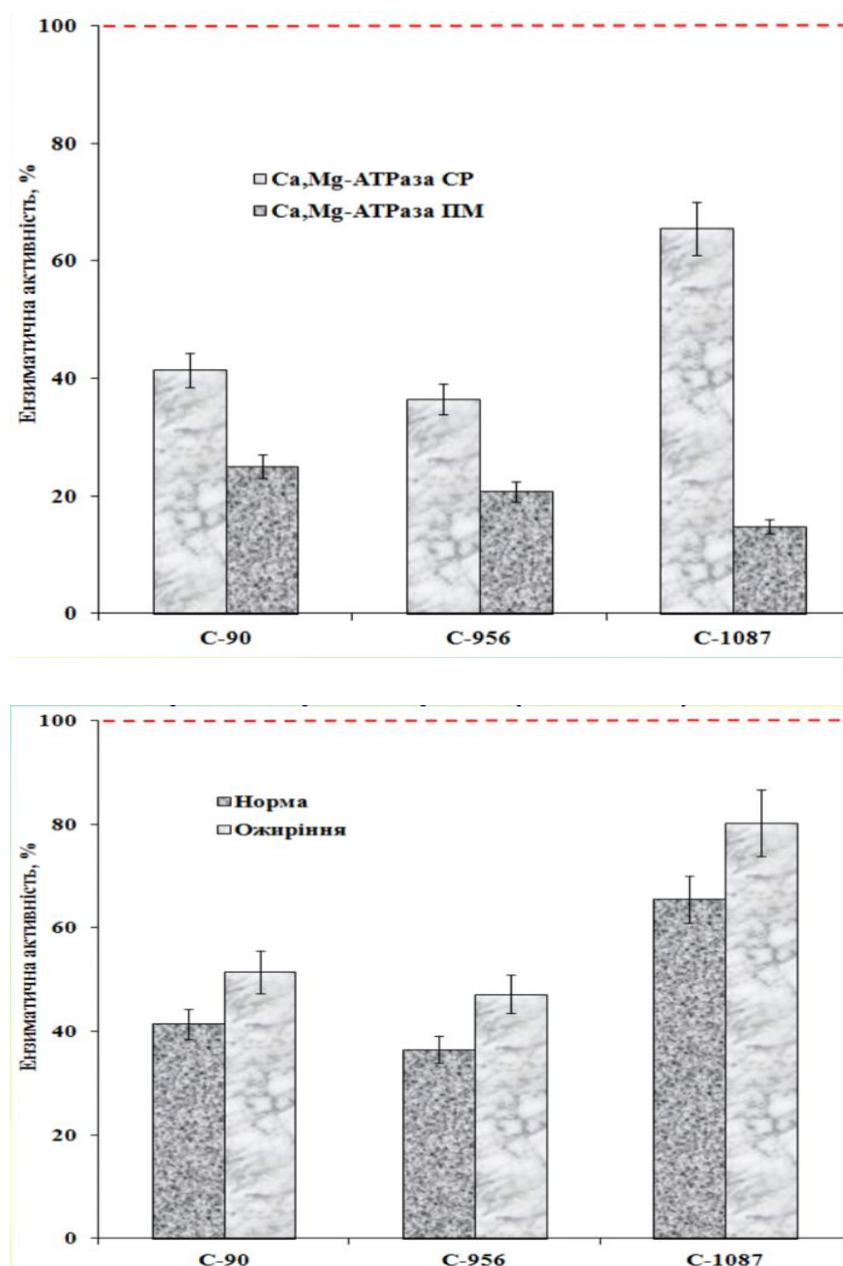


Рис. 3.1. Вгорі - порівняння впливу калікс[4]арену **C-90** ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/л конц.), **C-956** ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/л конц.) та тіакалікс[4]арену **C-1087** ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/л конц.) на АТР-гідролазну активність у ПМ міометрія щурів. Внизу – вплив калікс[4]аренів на активність ензимів CP клітин матки за умов нормі та при наявному ожирінні ($M \pm m$, $n=5$). За 100 % прийнято значення питомих ензиматичних активностей за умов відсутності реактивного агенту у середовищі інкубації.

Нами також було розраховано концентраційну залежність інгібуючої дії ефектора (у діапазоні концентрацій $(10^{-8} - 10^{-4} \text{ M})$) на активність ензиму ПМ і СР (див рис. 3.2.1.). Відповідно до отриманих даних, С-1087 дозозалежно пригнічує АТРазну активність. Тіакалікс[4]арен С-1087 у всьому діапазоні концентрацій $(10^{-8} - 10^{-4} \text{ M})$ дозозалежно (доза вводиться цілій тварині) пригнічує також АТРазну активність ретикулуму, втім величину коефіцієнта інгібування $I_{0,5}$ неможливо прорахувати, оскільки за максимальної концентрації ця сполука чинить інгібіторний ефект менше, ніж на 50 % відносно контролю, взятого за 100 %.

Значення коефіцієнта Хілла $n \text{ H}$ складає $0,58 \pm 0,03$ (практично однакова для порівнюваних каліксаренів) ($M \pm m; n = 5$).

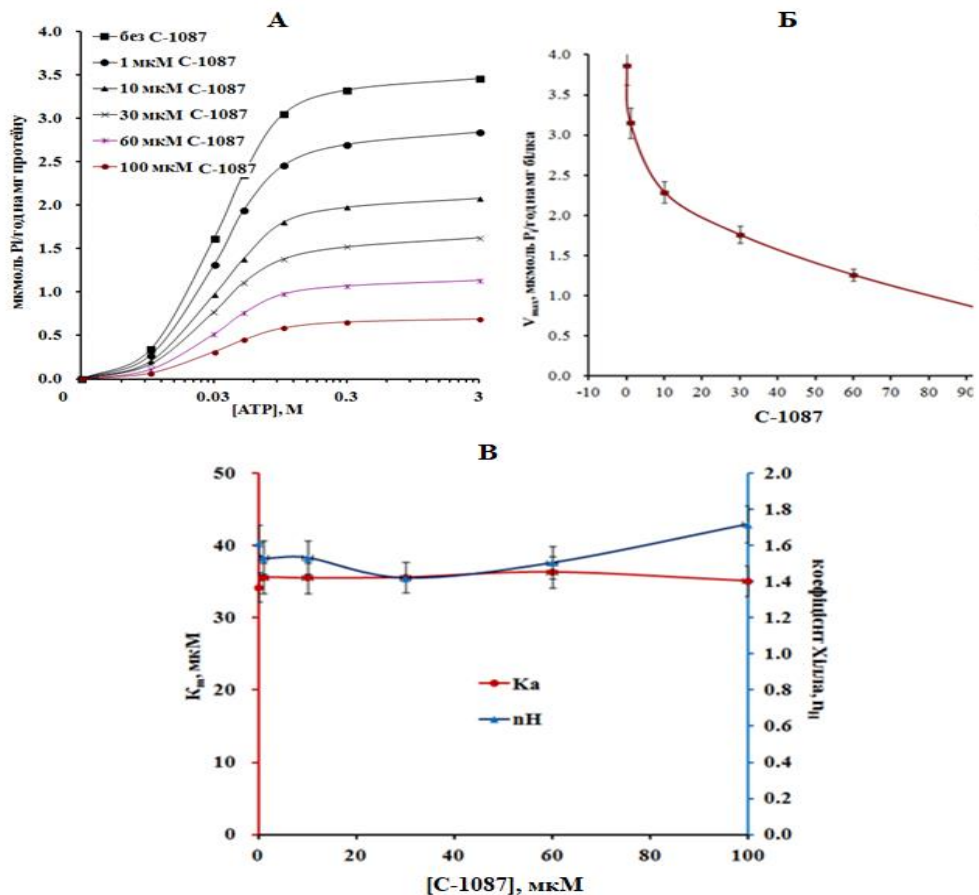


Рис. 3.2. А) Вплив збільшення концентрації тіакалікс[4]арену **С-1087** на залежність активності помпи ПМ від концентрації АТР ($M \pm m, n = 5$). Б) Вплив

концентрації тіакалікс[4]арену **C-1087** на максимальну початкову швидкість реакції гідролізу АТР (каталізується РМСА ензимом) ($M \pm m$, $n = 5$), а також В) вплив концентрації ефектору на уявну константу Міхаеліса K_m і коефіцієнт Хілла n_H за аналогічних умов ($M \pm m$, $n = 5$). За 100 % взято значення питомих активностей ензиму при відсутності ефекторів у середовищі інкубації.

Отже, проміжні результати дозволяють заключити, що **C-1087** більш ефективно у порівнянні з конкурентами пригнічує активність помпи ПМ. При цьому він значно менш ефективно впливає на компенсаторні системи іонного транспорту, що свідчить про досягнення більшого рівня селективності.

3.2. Вплив тіакалікс[4]арену **C-1087** на концентрацію Ca^{2+} у саркоплазмі

У попередніх розділах роботи було окреслено, що розподіл саркоплазматичної концентрації Ca^{2+} , а також відповідний показник у позаклітинному середовищі є безперечно важливими для нормального функціонування тканини, оскільки саме динаміка кальцієвої сигналізації значним чином впливає на контрактильний тонус мускулатури внутрішніх органів. Зважаючи на наявні дані про різні системи транспорту ГМК, а зокрема і Ca^{2+} -помпу ПМ, що виступає однією з провідних систем активного транспортування Ca з цитозолу у позаклітинний простір, необхідним етапом досліджень є з'ясування впливу можливого ефектора вищезгаданої помпи – тіакалікс[4]арену **C-1087** на гомеостаз Ca^{2+} у клітині. Для з'ясування зазначених параметрів підтримки іонного гомеостазу було використано скануючий конфокальний мікроскоп (Zeiss LSM 510 «МЕТА»), а також зонди, що є чутливими до катіонів та до фрагментів молекул ДНК (детальніше у підрозділі 2.5.).

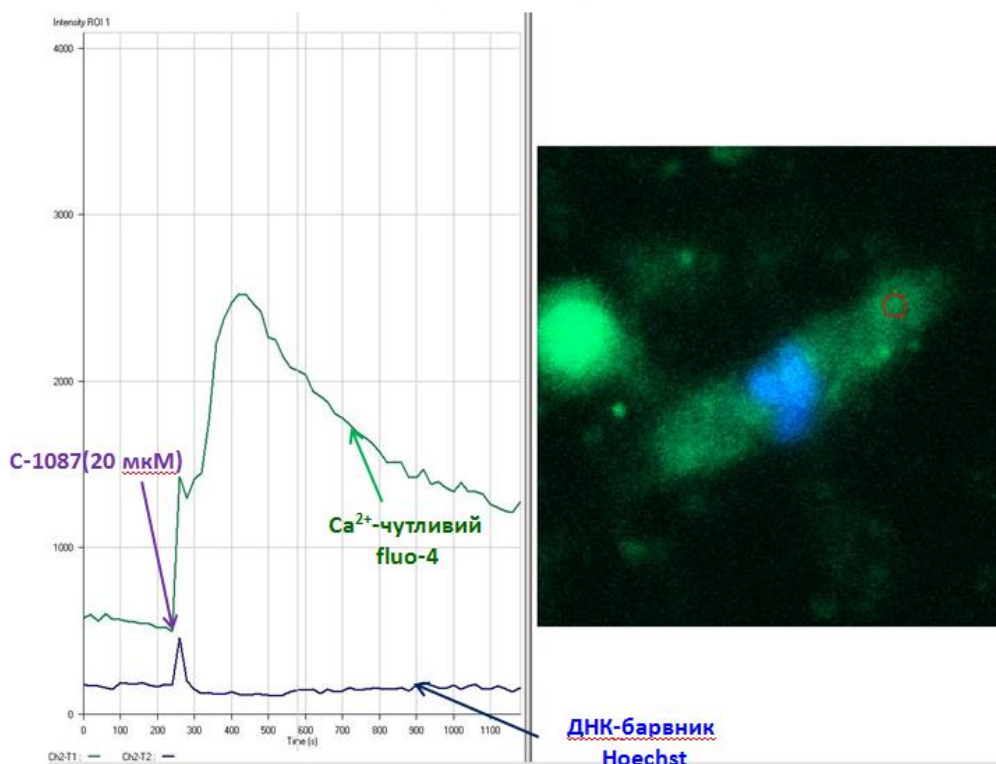


Рис. 3.3. Зміни флуоресценції чутливих зондів (за умов дії **C-1087**) у міоциті, а також конфокальне зображення ГМК. Результат типового експерименту.

Так, на графіку відображено залежність відносних одиниць інтенсивності флуоресценції зондів від часу (у секундах). Стрілки демонструють момент внесення аліквоти розчину препарату тіакалікс[4]арену **C-1087** із кінцевою концентрацією у $20 \cdot 10^{-4}$ моль/л.

Зеленим кольором на мікрофотографії підсвічується активований fluo-4 AM (зонд), чутливий до вільних катіонів кальцію у саркоплазмі та введений у цитозоль описаним у попередньому розділі методом. Синім кольором виділено ядро клітини, воно люмінісцює завдяки Hoechst 33342 (ДНК-чутливий зонд). Червоним кружечком (у правій верхній частині клітини) обведено ділянку гіалоплазми, на якій проводили аналіз.

Варто відмітити: кількісні виміри флуоресценції зондів у внутрішньоклітинному просторі ускладнюються через істотну наявність

нерівноважних та Ca^{2+} -незалежних флуктуацій. Описаний ефект, імовірно, зумовлюється зміною концентрації зонда у самій клітині через значущу сорбційну активність низки компонентів (також, т.з. шум помітно й за межами клітини м'язу).

На графіку також можна побачити різке підвищення значень $[\text{Ca}^{2+}]_c$, що проявляється після внесення аліквоти С-1087 на препарат. Такий ефект пов'язано із зниженням базальної активності РМСА, тобто ензим зменшує швидкість та якість виведення катіонів за межі міоциту.

Так, проміжний результат підтверджує, що даний структурний різновид каліксарену чинить інгібувальний вплив на транспортний ензим.

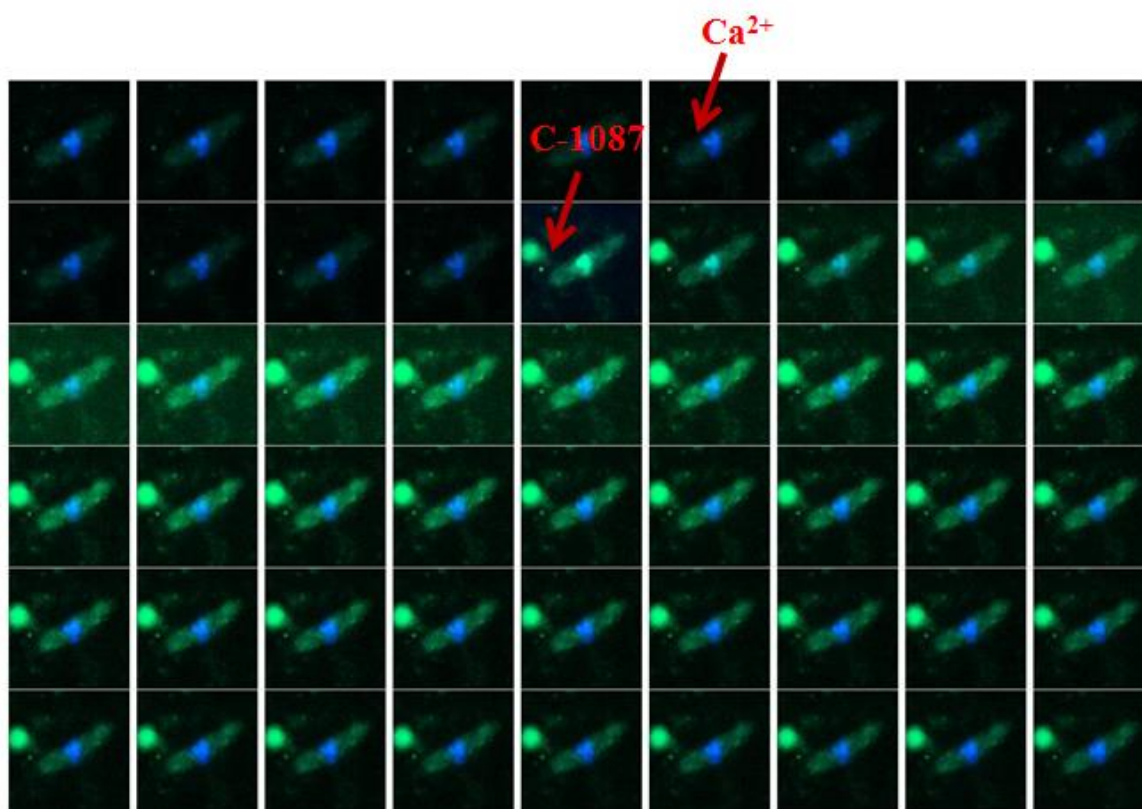


Рис. 3.4. Серія послідовних фотознімків міоциту матки щура. Стрілками вказано на час внесення препарату Ca^{2+} ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/л концентрація) (контроль) та досліджуваного тіакалікс[4]арену **С-1087** ($20 \cdot 10^{-4}$ моль/л концентрація).

Рисунок показує, що протягом 100 секунд після появи ефектора, інтенсивність свічення знижується з чіткою тенденцією до руху у бік початкового рівня (графік з попереднього рисунку), що може бути пояснено

включенням компенсаторних транспортних систем, наявних у клітині. Мова йде, зокрема, про Ca^{2+} -уніпортер, локалізований у мітохондрій та Na^+ - Ca^{2+} -обмінник у ПМ (як системи, що чинять провідний вплив). Згаданим молекулярним машинам притаманна нижча афінність до Ca , тому вони релаксують сигнал у випадку лише надвисоких значень $[\text{Ca}^{2+}]_c$. – >400 нМ.

Менше з тим, ми не можемо відкидати той факт, що підвищення концентрації у середині ГМК також частково може мати залежність від інгібуючого впливу тіакалікс[4]арену **C-1087** на роботу описаної раніше АТР гідролази, розташовану у мембрані ретикуму.

Контролем у експерименті слугував розчин суто тіакалікс[4]аренової «чаші» **C-1145** ($20 \cdot 10^{-4}$ моль/л), її дія не продемонструвала вираженого впливу на активність АТРази (тобто, підвищення флуоресцентного сигналу fluo-4 не спостерігалось). Інтенсивність флуоресценції зонду Hoechst, який було локалізовано в у ядрі ГМК, також залишалася майже на змінною (з урахуванням флуктуацій різної природи).

3.3. Параметри скорочень поздовжніх гладеньких м'язів під дією тіакалікс[4]арену **C-1087**

Вважалося, що зміни $[\text{Ca}^{2+}]_c$ при дії тіакалікс[4]арену **C-1087** здатні спричинити зміни базального напруження і скоротливості міометрія, тому у подальших експериментах, нами встановлювалася дія ефектору на тензометричні, а також механокінетичні параметри скорочень рогів матки щурів (не вагітних).

Так, при ізометричному режимі реєстрації скоротливої активності ГМК, внесення $10 \cdot 10^{-4}$ моль/л розчину тіакалікс[4]арену **C-1087** до препарату, що омиває м'язи, не мало наслідком прямої зміни їх базального напруження, втім через 20 хв після передінкубації було зафіксовано зменшення амплітуди спонтанних скорочень до приблизно 78,4 % відносно контролю, (узятого за 100

% рівень); ($p < 0.01$, $n=8$). Ізотонічний режим реєстрації за аналогічних умов демонструє, що 10 мМ **C-1087** сприяє розслабленню мускулатури та пригнічує амплітуду спонтанних скорочень до приблизно 76,6 % відносно контролю (графічні дані не наведено); ($p < 0.001$, $n=7$).

Аналіз механокінетичних параметрів поодиноких циклів скорочення-розслаблення встановив, що у випадку обох режимів реєстрації, під дією **C-1087** відбувається значне зменшення показників сили і довжини, за ізометричного та ізотонічного режів відповідно, у точках перегину фаз скорочення – F_C і ΔL_C відповідно та розслаблення – F_R і ΔL_R відповідно (до аналізу брали фрагмент механограми зі скороченнями після 20 хв від старту дії препарату). Отже, параметри F_C і F_R при роботі **C-1087** становили 71,9 % та 79,4 %; ($p < 0.05$, $n=6$). Параметри ΔL_C і ΔL_R відповідно дорівнювали 73,8 % та 77,1 % (порівняно з контролем, що взято за 100 %); ($p < 0.001$, $n=7$).

Реєстрація активності у ізометричному режимі за дії тіакалікс[4]арену **C-1087** показувала пригнічення максимальної швидкості фази розслаблення. Так, V_R становив 70,5 % (порівняно з контрольним, взятим за 100 %); ($p < 0.01$, $n=6$). Показник ізотонічного розслаблення не продемонстрував помітних відмінностей відносно контролю (85,1 %; $p > 0.05$, $n=6$).

Додатково нами було встановлено кінетичні закономірності скоротливої активності міометрія щурів, викликані аплікуванням гіперкалієвого розчину (концентрація 80 мМ) за дії **C-1087** $10 \cdot 10^{-4}$ моль/л (рис. 3.5.). Активації скорочення ГМ у такому механізмі забезпечується входом кальцію від кризь потенціалкеровані Ca^{2+} -канали, а процеси зниження внутрішньоклітинної концентрації цього на фазі розслаблення відбуваються за рахунок функціонування систем енергозалежного активного транспорту.

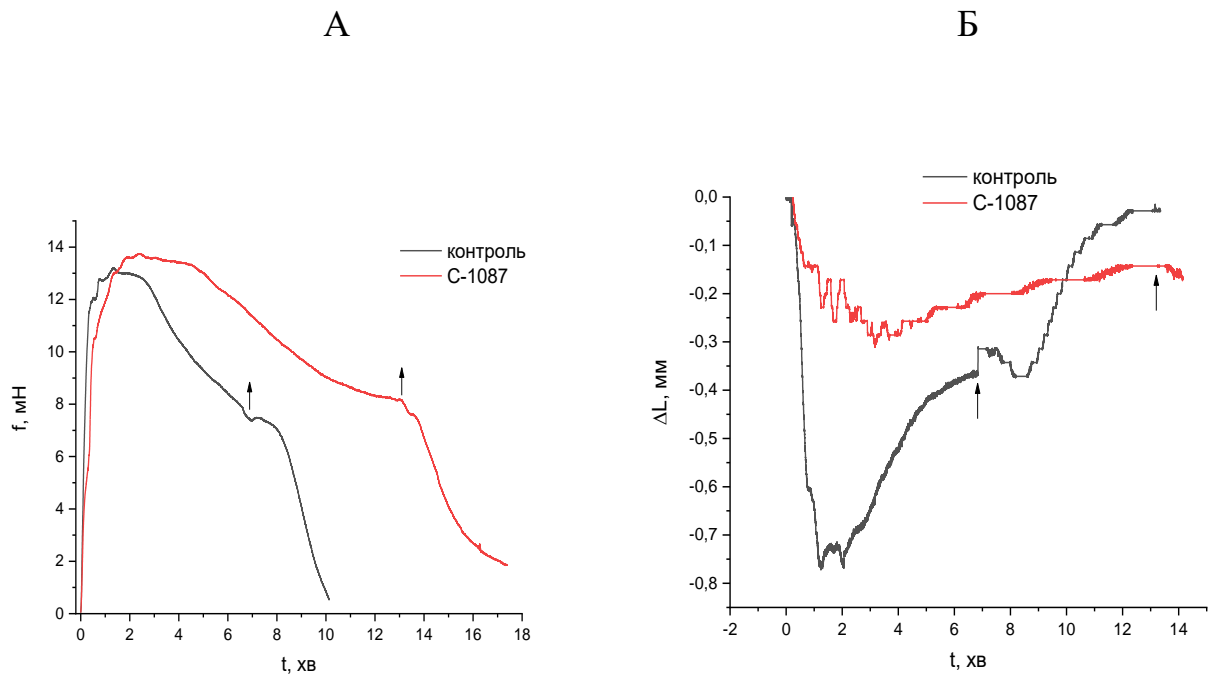


Рис. 3.5. Скоротлива активність клітин міометрія щурів за ізометричного (А) та ізотонічного (Б) режимів реєстрації. Активність викликана аплікуванням гіперкалієвого розчину (контроль) та дією тіакалікс[4]арену С-1087 (проба). Стрілками вказано на момент вимивання гіперкалієвого розчину.

Які і у вищеприведеному випадку, ізометричні спонтанні скорочення, активовані аплікуванням гіперкалієвого розчину показують суттєве зменшення значення V_{nr} – максимальної швидкості розслаблення (до 46,7 % відносно контролю, взятого за 100 %; $p < 0.01$, $n=5$).

Аналогічний результат спостерігався і у кінетиці ізотонічного режиму. Так, параметр за V_{nr} складав 32,9 % відносно контролю, взятого за 100 % ($p < 0.001$, $n=5$).

Слід підкреслити, що у випадку ізометричного режиму амплітуда укорочень мускулатури від дії тіакалікс[4]арену С-1087 суттєво знижувалась, що демонструє рис. 3.5.Б.

При поясненні механізмів, завдяки яким тіакалікс[4]арен С-1087 впливає на механокінетичні параметри міометрія, варто брати до уваги факт відсутності відомих селективних інгібіторів кальцієвої помпи РМСА. Відтак, ми маємо

змогу спиратись лише на ті дані, які були одержані на низці моделей із порушеною експресією ряду окремих ізоформ транспортної молекули [22,27].

Зокрема, у роботі [43] використання мишей з $PMCA4^{-/-}$, $PMCA1^{-/-}$ та $PMCA1^{+/-}/4^{-/-}$ ізоформами (для мускулатури сечового міхура з $PMCA1^{-/-}$ та $PMCA1^{+/-}/4^{-/-}$) спостерігалось значуще зниження фази розслаблення у відповідь на аплікування гіперкалієвого розчину та на дію агоністів мускаринових холінорецепторів карбахолу.

Отже, індуковане С-1087 зниження максимальних швидкостей розслаблення може бути пов'язане безпосередньо з селективним інгібуванням досліджуваної Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази у ПМ.

3.4. Моделювання *in silico* взаємодії Са-помпи з тіакалікс[4]ареном С-1087

Усі дослідження з комп'ютерного моделювання взаємодій кальцієвої помпи зі структурою тіакалікс[4]арену С-1087 були виконані та люб'язно надані кандидатом біологічних наук, старшим науковим співробітником Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України Бевза Олександром Васильовичем.

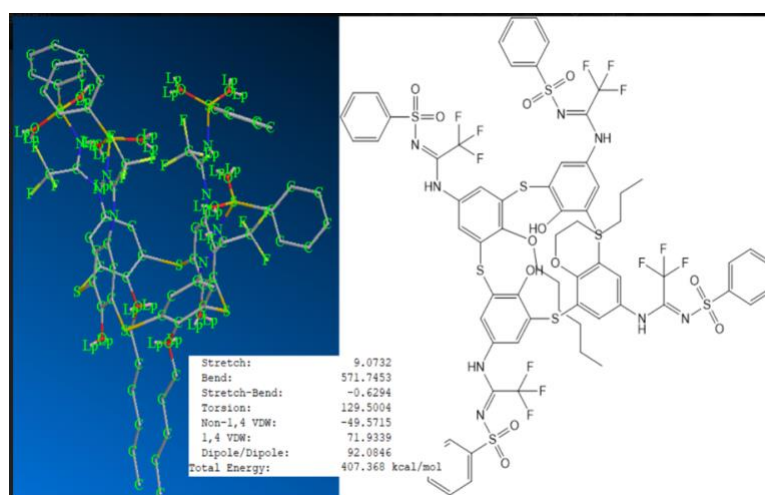


Рис. 3.6. Структура (5,11,17,23тетра(трифтор)метил (фенілсульфоніліміно)метиламіно-25,27-дигексилокси-26,28-дигідрокситіакалікс[4]арен) (С-1087).

На рисунку вище наведено енергетично мінімізовану структуру досліджуваної сполуки. Розрахунок такої мінімізації є необхідним для подальших розрахунків. Модель побудовано завдяки ChemOffice за допомогою параметру *molecular mechanics 2*.

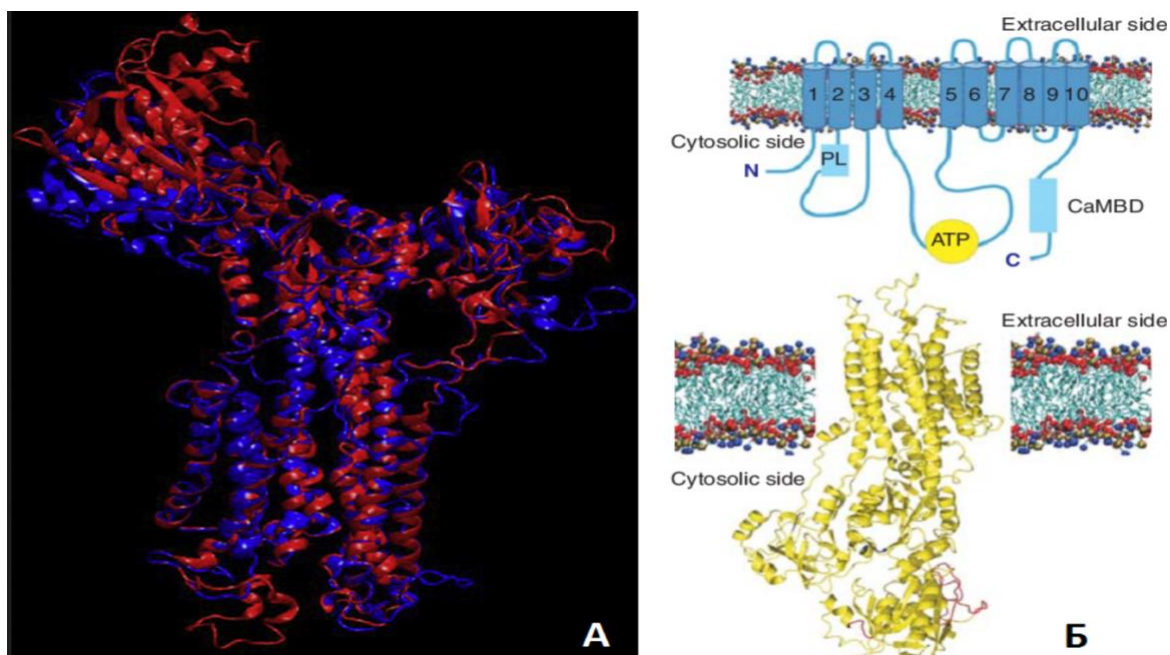


Рис. 3.7. А) Структурна суперпозиція РМСА на шаблон кальцевої помпи СР. Б) Моделі насосу РМСА.

Рисунок показує порівняння структури кальцевих pomp у ПМ та СР (накладення синього та червоного кольору відповідно. А також, ліворуч зображено моделі топологічна (зверху) та мембранозв'язана (знизу) досліджуваної АТР-гідролази.

Також, методом докінгу було встановлено місця зв'язування лігандів з функціонально-активними ділянками РМСА та SERCA в областях 1 і 2 для власне досліджуваного каліксарену **C-1087** та суто «чаші» **C-1145**.

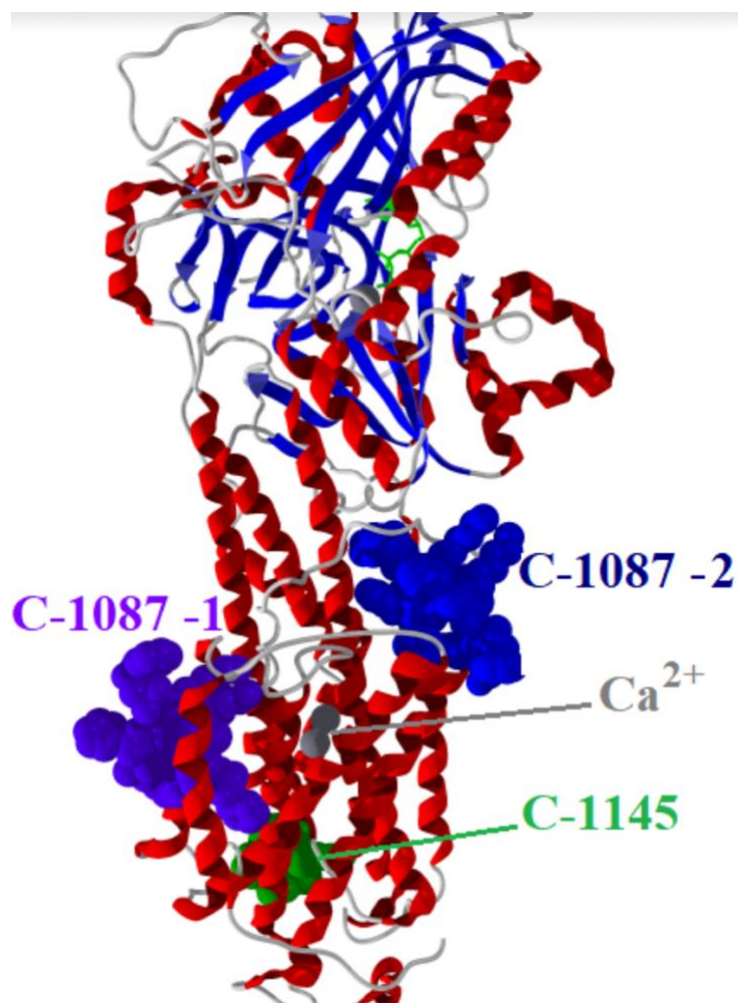


Рис. 3.8. Ймовірні місця зв'язування лігандів з функціонально-активними ділянками Ca²⁺-помпи.

За допомогою ПЗ VirtualDocker було візуалізовано (рис. 3.9.) амінокислотне оточення комплексу тіакаліксарену C-1087 з Ca²⁺,Mg²⁺-АТРазою в областях зв'язування 1 (ліворуч) та 2 (праворуч). Цифрами вгорі відмічені номери трансмембранних доменів кальцієвого насоса.

За результатами проведеного моделювання було встановлено, що у взаємодії каліксарену C-1087 з Ca-помпою провідну роль відіграють саме особливості структурної організації синтезованого тіакаліксарену C-1087. Вона впливає на взаємодію із ензимом, а відтак, на механізм регуляції насоса та властивості фосфоліпідного матрикса у структурі ПМ, який також здатен до впливу на чутливість до каліксаренів.

Відповідно, інгібуючий ефект каліксарену С-1087 на активність помпи пов'язаний саме з поєднаним впливом чотирьох просторово орієнтованих на верхньому «вінці» тіакалікс[4]аренової платформи фенолсульфонілтріфторометилацетімідоамідних функціональних груп, а не з дією тетрафенольного макроциклу (детальніше про структуру сполук у підрозділі 1.2.).

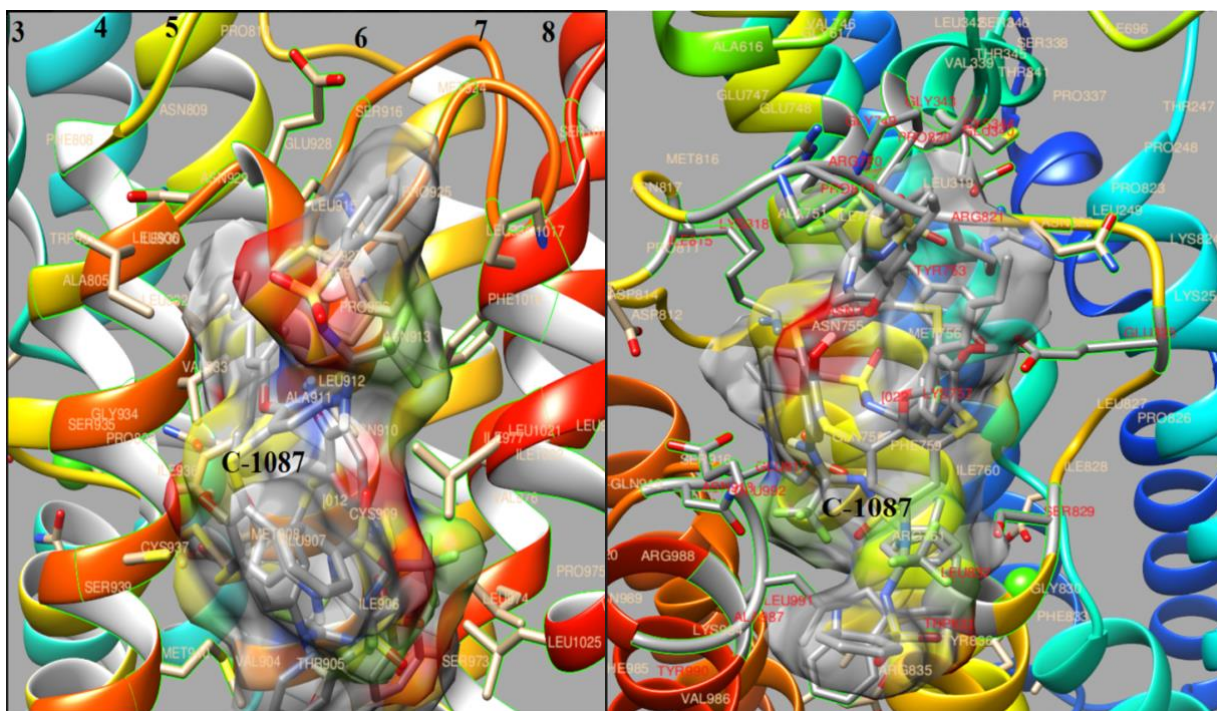


Рис. 3.9. Комплекс каліксарену С-1087 з кальцієвою АТРазою у першій та другій областях зв'язування (ліворуч та праворуч відповідно).

Підбиваючи підсумок за отриманими результатами роботи, можна заключити, що синтетична сполука тіакалікс[4]арен **С-1087** виявляє себе у якості інгібітора (високого ступеня селективності) активності Ca^{2+} -помпи у ПМ ГМК. Його дія модифікує процеси скорочення-розслаблення гладенької мускулатури шляхом впливу на Ca сигнали на клітинному рівні.

Отримані дані все ще потребують доповнення та поглиблення досліджень ефектора та його конкурентів, втім результати можуть бути корисними для подальшого вивчення процесів фармакомеханічного та електромеханічного спряження й обміну іонів у клітині.

До того ж, результати знайдуть застосування у процесі розробки групи фармакологічних препаратів, що застосовуються при функціональних патологіях гладенької мускулатури. Показані результати є додатково важливими у пошуці різного виду кореляцій структурної формули сполук із класу каліксаренів та їх конкурентів з механізмом їх впливу на живі системи, за для синтезу якнайбільш дієвих селективних ефекторів, що мають низьку токсичність.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що тіакалікс[4]арен **C-1087** (у $100 \cdot 10^{-4}$ моль/л концентрації) діє як селективний на мембранному рівні інгібітор $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани міометрія щура.
2. Показано, що внесення $20 \cdot 10^{-4}$ моль/л розчину ефектору тіакалікс[4]арену **C-1087** має наслідком підвищення внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} у гіалоплазмі клітин гладеньких м'язів, що пов'язується зі зниженням базальної активності молекулярної машини, яка транспортує кальцій.
3. З'ясовано, що сполука тіакалікс[4]арен **C-1087** ($10 \cdot 10^{-4}$ моль/л) сприяє суттєвому зменшенню максимальної швидкості розслаблення спонтанних і активованих гіперкалієвим розчином скоротливих відповідей гладеньком'язових клітин матки щура.
4. Із використанням методів *in silico* було успішно вивчено взаємодію тіакалікс[4]арену **C-1087** із транспортувальною Ca^{2+} -АТР гідролазою плазматичної мембрани та саркоплазматичного ретикулума.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Burdyga, T. and Richard, J. (2012). Calcium Homeostasis and Signaling in Smooth Muscle Muscle. Joseph Hill, Boston Waltham. Ch.2, pp. 1155-1171.
2. Mitsui, R. and Hashitani, R. (2020). Synchrony of spontaneous Ca^{2+} activity in microvascular mural cells. *Journal of smooth muscle reaserch*, 56(3), pp. 1-18.
3. Данилович, Ю., Данилович, Г., Коломієць, О., Костерін, С., Карахім, С. та Чуніхін, О. (2014). Дослідження впливу нітрозактивних сполук на поляризацію внутрішньої мембрани мітохондрій в міоцитах матки щурів із використанням потенціалчутливого флуоресцентного зонда $\text{DiOC}_6(3)$. *Укр. біохім. журн.*, 86(12), сс. 42–55.
4. Векліч, Т., Мазур, Ю. та Костерін, С. (2015). Mg^{2+} , АТФ-залежна кальцієва помпа плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин. II. Регуляція активності. *Укр. біохім. журн.*, 87(20), сс. 5-25.
5. Бабіч, Л., Шликов, С. та Костерін, С. (2014). Транспорт Ca^{2+} в мітохондріях гладеньких м'язів. *Укр. біохім. журн.*, 86(6), сс. 18-30.
6. Danylovych, Iu., Karakhim, S. and Danylovich, H. (2014). Electrochemical potential of the inner mitochondrial membrane and Ca^{2+} homeostasis of myometrium cells. *The Ukrainian Biochemical Journal.*, 87(5), pp. 61-71.
7. De Juan-Sanz, J., Nunez, E. and Zafra, F. (2014). Presynaptic control of glycine transporter 2 (GlyT2) by physical and functional association with plasma membrane Ca^{2+} -ATPase (PMCA) and Na^{+} - Ca^{2+} exchanger (NCX). *The Journal of Biological Chemistry.*, 289(49), pp. 34308-34324.
8. Oloizia, B. and Paul, R. (2009). Ca^{2+} Clearance and contractility in vascular smooth muscle: Evidence from gene-altered murine models. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 45(3), pp. 347-362.
9. Tadini-Buoninsegni, F., Smeazzetto, S., Gualdani, R., and Moncelli, M. (2018). Drug Interactions With the Ca^{2+} -ATPase From Sarco(Endo)Plasmic Reticulum (SERCA). *Frontiers in Molecular Biosciences*, 5. pp. 1-8.

10. Linde, C., Di Leva, F. and Domi, T. (2008). Inhibitory interaction of the 14-3-3 proteins with ubiquitous (PMCA1) and tissue-specific (PMCA3) isoforms of the plasma membrane Ca^{2+} pump. *Cell calcium journ.*, 43(6), pp. 550-61.
11. Курский, М., Слинченко, Н. и Любаковская, Л. (1990). Реконструкция очищенной Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы сарколемы миомерия в липосомы и ее каталитические свойства. *Укр. Биохим. журн.*, 62(3), сс. 66-71.
12. Marianela G., Ferreira-Gomes F., Rossi J. & Marianela G. (2017). Regulation of the Plasma Membrane Calcium ATPases by the actin cytoskeleton, *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
13. Ortega, C., Ortolano, S. and Carafoli E. (2010). Krebs. Calcium: A Matter of Life or Death. The plasma membrane calcium pump. *Elsevier.*, p. 179-197.
14. Arrowsmith, S., Keov, P. and Gruber, C. (2018). Contractility Measurements of Human Uterine Smooth Muscle to Aid Drug Development, *Medicine journ.*, 26(131), pp. 56-63.
15. Boczek, T., Lisek, M., Ferenc, B., Kowalski, A., Stepinski, D., Wiktorska, M., and Zylinska, L. (2014). Plasma Membrane Ca^{2+} -ATPase Isoforms Composition Regulates Cellular pH Homeostasis in Differentiating PC12 Cells in a Manner Dependent on Cytosolic Ca^{2+} Elevations. *PLoS ONE*, 9(7), pp. 102-117.
16. Strehler, E. (2011). Plasma membrane calcium ATPase proteins as novel regulators of signal transduction pathways. *World J. Biol. Chem.*, 1(6) pp. 201-208.
17. Lopreiato R. (2014). The Plasma Membrane Calcium Pump: New Ways to Look at an Old Enzyme, *The Journal of Biological Chemistry*, 289, № 15. – p. 10261–10268.
18. Thomas, R. (2012). The $\text{Ca}^{2+}:\text{H}^{+}$ coupling ratio of the plasma membrane calcium ATPase in neurones is little sensitive to changes in external or internal pH. *Cell Calcium journ.*, 49(5), pp. 357-364.

19. Chen, Y., Cao, J. and Zhong, J. (2015). Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase regulates Ca^{2+} signaling and the proliferation of airway smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 740(1), pp. 733-741.
20. Ortega, C., Ortolano, S. and Carafoli E. (2010). Krebs. Calcium: A Matter of Life or Death. The plasma membrane calcium pump. *Elsevier.*, p. 179-197.
21. Monesterolo, N., Amaiden, M., and Campetelli A. (2012). Regulation of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase activity by acetylated tubulin: influence of the lipid environment. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1818(3), pp. 601-608.
22. Шликов, С. (2010). Окситоцин та його роль у контролі внутрішньоклітинного рівня іонів кальцію в міометрії. *Укр. біохім. журн.*, 81(9), сс. 5–14.
23. Ritchie, M., Zhou, Y. and Soboloff, J. (2012). Transcriptional mechanisms regulating Ca^{2+} homeostasis. *Cell Calcium journ.*, 49(5), pp. 314-321.
24. Gros, R., Afroze, T. and You X.-M. (2013). Plasma membrane calcium ATPase overexpression in arterial smooth muscle increases vasomotor responsiveness and blood pressure. *Circulation Research.*, 93(7), pp. 614-621.
25. Strehler, E. (2013). Plasma membrane calcium ATPases as novel candidates for therapeutic agent development. *J Pharm Pharm Sci.*, 16(2), pp. 190-206.
26. Gutsche, C. (2004). Calixarenes: Synthesis and Historical Perspectives. *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry. New York.*, 1, pp. 153 – 160.
27. Cherenok, S., Dutasta, J. and Kalchenko, V. (2006). Phosphorus-containing chiral macrocycles. *Current Org. Chem.*, 10, pp. 2307–2331.
28. Luo, Z., Zhao, Y. and Maa, C. (2014). Synthesis and anti-integrase evaluation of novel calix[4]arene derivatives containing the triazolyl 1,3-diketo moiety. *Chinese Chemical Letters.*, 25(5), pp. 737–740.
29. Neri, P., Sessler, J. and Wang, M-X. (2016). Calixarenes and Beyond. *Springer International Publishing Switzerland.*, pp. 1062-1065.
30. Костерін, С., Кальченко, В. та Векліч, Т. (2019). *Калікс[4]арени як модулятори АТФ-гідролазних систем гладеньком'язових клітин*. Київ: Наукова Думка.

31. Tairov, M. and Kalchenko, V. (2004). Chiral Calixarenes. *Ukrainian Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry.*, 29(2), pp. 3-19.
32. Danylyuk, O. (2007). *Solid-state complexes of water-soluble calixarenes with biorelevant molecules: Dissertation within International Ph.D Studies.* Placz, Warsaw.
33. Лабинцева, Р., Бевза, О. та Бевза, А. (2014). Захисний вплив тіакалікс[4]арентетрасульффонату на інгібування АТР-гідролазної активності субфрагмента А-1 міозину міометрія катіонами важких металів. *Український біохімічний журнал.*, 86(6), сс. 154-166.
34. Balasahe, S., Nimsea, T. (2013). Biological applications of functionalized calixarenes. *Chem. Soc. Rev.*, 42, pp. 366-386.
35. Xue, Y., Guan, Y., Zheng, A. and Xia, H. (2013). Amphoteric calix[8]arene-based complex for pH-triggered drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.*, 101, pp. 55- 60.
36. Komisarenko, S., Kosterin, S., Lugovskoy, E. and Kalchenko, V. (2013). Calixarene methylene bisphosphonic acids as promising effectors of biochemical processes. *Ukr. biochem. Journ.*, 85(6), pp. 106-128.
37. Coleman, A., Jebors, S. and Cecillon, S. (2008). Toxicity and biodistribution of para-sulfonato-calix[4]arene in mice. *New J. Chem.*, 32, pp. 780-782.
38. Mollard, P., Mironneau, J., Amedee, T. and Mironneau, C. (1986). Electrophysiological characterization of single pregnant rat myometrial cells in short-term primary culture. *American Journal of Physiology: Cell Physiology.*, 19(1), pp. 47-C54.
39. Кондратюк, Т., Быченко, С. та Прищеп, Л. (1986). Выделение и характеристика фракции плазматических мембран миометрия свинки. *Украинский биохимический журнал.*, 58(4), pp. 50-56.
40. Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72(1), pp. 248-282.

41. Rathbun, W. and Betlach, V. (1969). Estimation of enzymically produced orthophosphate in the presence of cysteine and adenosine triphosphate. *Anal. Biochem.*, 28(1-3), pp. 436–445.
42. Костерин, С. и Бурчинская Н.Ф. (1987). Метод определения кинетических характеристик Ca^{2+} - транспортирующих систем субклеточных структур гладких мышц. *Украинский биохимический журнал.*, 59(2), сс. 66-69.
43. Liu L., Ishida Y., Okunade G., Shull G., Paul R. (2006). Role of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in contraction-relaxation processes of the bladder: evidence from PMCA gene-ablated mice. *Am J Physiol Cell Physiol*, 290(4): 1239-1247.