

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»
Кафедра біохімії

Завідувач кафедри проф. Олексій САВЧУК

Протокол № ____ засідання кафедри

від “ ____ ” _____ 20 ____ р.

**ПОРІВНЯЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ДІЇ ВИБРАНИХ
КАЛІКС[4]АРЕНІВ НА АКТИВНІСТЬ Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази
САРКОПЛАЗМАТИЧНОГО РЕТИКУЛУМА, «БАЗАЛЬНИЙ» РІВЕНЬ
 Ca^{2+} В ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВИХ КЛІТИНАХ МІОМЕТРІЯ І АОРТИ**

Випускна кваліфікаційна робота
студентки денної форми навчання
за спеціальністю Біологія та біохімія
Сивак Софії Сергіївни

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

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

Оцінка захисту роботи

Київ – 2026 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ГМ	–	гладенькі м'язи;
ГМК	–	гладеньком'язові клітини;
$I_{0,5}$	–	коефіцієнт інгібування (концентрація інгібітору, при якій рівень транспортувальної чи ензиматичної активності становить 50 % від контрольної величини);
K_i	–	уявна константа інгібування;
CP	–	саркоплазматичний ретикулум;
Cx43	–	connexin 43 (конексин 43);
IP_3R	–	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (рецептор до інозитол-1,4,5-трифосфату);
n	–	кількість дослідів;
n_H	–	the Hill coefficient (коефіцієнт Хілла);
PDB	–	protein data bank (світовий банк даних білків);
PLB	–	phospholamban (фосфоламбан);
RyR	–	ryanodine receptor (ріанодиновий рецептор);
SERCA	–	sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+},Mg^{2+} -ATPase (Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРаза саркоплазматичного ретикулуму);
SLN	–	sarcolipin (сарколіпін).

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. Ca^{2+}, Mg^{2+}-АТРаза гладеньком'язових клітин та каліксарени	7
1.1. Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза саркоплазматичного ретикулуму гладеньком'язових клітин.....	7
1.2. Особливості структури та функціонування гладеньком'язових клітин міометрія і аорти	13
1.3. Макроциклічні олігомери фенолів каліксарени як модулятори біологічних мішеней	20
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень	24
2.1. Матеріали та реактиви	24
2.2. Схема та об'єкти дослідження.....	24
2.3. Отримання суспензії гладеньком'язових клітин матки й аорти щурів....	26
2.4. Визначення Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРадної активності саркоплазматичного ретикулуму гладеньком'язових клітин матки й аорти щурів.....	27
2.5. Дослідження міоцитів аорти щурів методом конфокальної мікроскопії .	28
2.6. Методи тензометричного дослідження.....	30
2.7. Кінетичний аналіз	30
2.8. Статистичний аналіз	32
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення	33
3.1. Активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази саркоплазматичного ретикулуму гладеньком'язових клітин міометрію та аорти щурів за дії калікс[4]аренів С-90, С-956 та С-1087	33
3.2. Активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази саркоплазматичного ретикулуму гладеньком'язових клітин аорти щурів за дії різних концентрацій калікс[4]арену С-956	34
3.3. Оцінка кінетичних параметрів Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази саркоплазматичного ретикулуму гладеньком'язових клітин аорти щурів за дії калікс[4]арену С-956.....	36

3.3.1. Активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази саркоплазматичного ретикулуму гладеньком'язових клітин аорти щурів за різних концентрацій іонів магнію за дії калікс[4]арену С-956	36
3.3.2. Активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази саркоплазматичного ретикулуму гладеньком'язових клітин аорти щурів за різних концентрацій АТР за дії калікс[4]арену С-956.....	38
3.4. Концентрація Ca^{2+} у саркоплазмі гладеньком'язових клітин аорти щурів за дії калікс[4]арену С-956	40
3.5. Скоротлива активність кільцевих сегментів грудної аорти щурів за дії калікс[4]арену С-956.....	42
ВИСНОВКИ	44
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	45

ВСТУП

Гладенькі м'язи (ГМ), скорочення та розслаблення яких лежить в основі функціонування кровоносних та лімфатичних судин, шлунково-кишкового тракту, дихальних шляхів, зіниці ока та матки, відіграють важливу роль у забезпеченні життєдіяльності організму [1]. Для реалізації процесів скорочення/розслаблення ГМ необхідно, щоб рівень цитоплазматичного Ca^{2+} динамічно змінювався від 100 нМ у стані спокою до 1 мкМ і навіть більше під час збудження [2]. У міоцити гладеньких м'язів Ca^{2+} потрапляє з позаклітинного простору крізь плазматичну мембрану через різноманітні кальцієві канали або вивільнюється з внутрішньоклітинних Ca^{2+} депо шляхом пасивного транспорту за хімічним градієнтом. Провідними системами енергозалежного видалення Ca^{2+} з цитозолу є кальцієві помпи плазматичної мембрани та саркоплазматичного ретикулуму (СР), $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник плазматичної мембрани, а також Ca^{2+} -уніпортер мітохондрій [3]. $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР й плазматичної мембрани відповідальні за підтримку цитозольної концентрації кальцію у спокої, тоді як $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник активно працює для регуляції високих стимуляторних концентрацій.

$\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -АТРаза СР забезпечує зниження внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} внаслідок акумуляції цього катіона в ретикулярному пулі [4, 5]. Сучасні дані літератури свідчать, що СР є одним з найбільших клітинних депо кальцію [6].

Порушення скоротливої функції аорти супроводжує такі поширені патології як гіпертонічна хвороба, діабет, системні запальні процеси [7-9]. Зазвичай такі патології обумовлені порушеннями у функціонуванні мембранозв'язаних систем переносу катіонів та/або скоротливих протеїнів. Тому перспективним є пошук сполук, які були б здатні модифікувати скоротливу функцію аорти у випадку зазначених патологічних станів і водночас були б нетоксичними для організму.

З огляду на все вищезазначене, особливої актуальності набуває пошук сполук, які дозволяли б модулювати активність Ca^{2+} -помпи СР. У цьому контексті особливий інтерес викликають макроциклічні олігомери фенолів –

каліксарени. Численні літературні дані вказують на перспективність застосування цих макроциклічних сполук як ефекторів ензимів, імітаторів рецепторів, ферментів, стабілізаторів органічних полімерів, промоутерів трансфекції [10-12]. Особливості будови каліксаренів (гідрофобна аренова чаша із замісниками на верхньому та нижньому вінцях) та їхні специфічні фізико-хімічні властивості (ліпофільність, низька токсичність та імуногенність) дозволяють, змінюючи розміри та хімічну природу замісників на вінцях чаші, модифікувати вже існуючі сполуки й синтезувати нові, що мають інші характеристики та селективність [13]. Попередні дослідження деяких таких новосинтезованих сполук із групи калікс[4]аренів встановили їхню здатість модулювати ензиматичну та транспортну активність мембранозв'язаних катіон-транспортувальних АТР-гідролаз та ензиматичну активність скоротливих протеїнів [14].

Отже, метою даної роботи було проаналізувати $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазну активність саркоплазматичного ретикулуму й «базальний» рівень Ca^{2+} в гладеньком'язових клітинах аорти та міометрію щурів за дії калікс[4]арену С-956. Відповідно, було поставлено наступні завдання:

1. Оцінити активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази саркоплазматичного ретикулуму гладеньком'язових клітин аорти та міометрію щурів за дії калікс[4]аренів С-90, С-956 та С-1087.
2. Дослідити активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази саркоплазматичного ретикулуму гладеньком'язових клітин аорти щурів за дії різних концентрацій калікс[4]арену С-956.
3. Проаналізувати кінетичні параметри $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази саркоплазматичного ретикулуму гладеньком'язових клітин аорти щурів за дії калікс[4]арену С-956.
4. Визначити концентрацію Ca^{2+} у саркоплазмі гладеньком'язових клітин аорти щурів за дії калікс[4]арену С-956.
5. Проаналізувати скоротливу активність кільцевих сегментів грудної аорти щурів за дії калікс[4]арену С-956.

РОЗДІЛ 1

Ca²⁺,Mg²⁺-АТРаза ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВИХ КЛІТИН ТА КАЛІКСАРЕНИ

1.1. Ca²⁺,Mg²⁺-АТРаза саркоплазматичного ретикулу гладеньком'язових клітин

Внутрішньоклітинна динаміка кальцію жорстко регулюється взаємодією кількох Ca²⁺-помп, каналів та Ca²⁺-зв'язувальних білків. Для підтримки фундаментальних клітинних процесів та сигналізації клітини підтримують значний, майже 20000-кратний градієнт концентрації Ca²⁺ між внутрішньоклітинним та позаклітинним середовищами [15]. Ca²⁺,Mg²⁺-АТРаза сарко/ендоплазматичного ретикулу (sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺,Mg²⁺-ATPase, SERCA) відіграє ключову роль у підтримці низького рівня Ca²⁺ у цитозолі шляхом перекачування цих іонів із цитозолу в сарко/ендоплазматичний ретикулум за рахунок енергії гідролізу АТФ. Помпа SERCA, побудована з одного поліпептидного ланцюга молекулярною масою 110 кДа, локалізується у мембранах як ендоплазматичного, так і саркоплазматичного ретикулу. Цей фермент належить до родини АТРаз Р-типу – мембранозв'язаних АТРаз, каталітичний цикл яких передбачає утворення проміжної фосфорильованої форми ферменту [16].

SERCA існує в трьох ізоформах, що кодуються трьома різними генами: *SERCA1*, *SERCA2* та *SERCA3*, кожен з яких, у свою чергу, може утворювати різні сплайсинг-варіанти ферменту. Наприклад, ген *SERCA2* шляхом альтернативного сплайсингу продукує чотири сплайсинг-варіанти (2a–2d). *SERCA2a* виявляється у серцевому м'язі, повільноскорочуваних скелетних м'язах та гладеньком'язових клітинах (ГМК) [17]. Згідно з результатами останніх досліджень, проведених методом криоелектронної мікроскопії (cryogenic electron microscopy, cryo-EM), специфічний для гладеньких м'язів

сплайсинг-варіант SERCA2b характеризується унікальною топологією, що включає додатковий 11-й трансмембранний сегмент та люмінальне розширення [18]. Ці структури забезпечують вищу спорідненість ферменту до іонів кальцію порівняно з іншими сплайсинг-варіантами, що є ключовим фактором у підтриманні базального рівня Ca^{2+} у незбуджених клітинах міометрія та аорти [19].

Механізм функціонування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР описується класичною кінетичною моделлю пост-Альберса, яка базується на послідовному переході ферменту між декількома основними конформаційними станами. Згідно з цією моделлю, транспорт іонів Ca^{2+} через мембрану СР спряжений із гідролізом АТР та супроводжується значними структурними перебудовами чотирьох функціональних доменів білка: N (нуклеотид-зв'язувальний), P (містить сайт для фосфорилування), A (актуаторний) та ТМ (трансмембранний). Під час транспортування іонів Ca^{2+} зв'язування АТР пов'язане зі зміною конформаційних станів SERCA з E1 на E2. Ці два стани мають різну спорідненість до іонів Ca^{2+} , причому E1 має високу спорідненість, а E2 – низьку [20].

На початковому етапі у стані E1 (згідно Світового банку даних білків (Protein Data Bank, PDB), PDB ID: 3w5b) помпа виявляє високу спорідненість до цитозольного кальцію, що забезпечує зв'язування двох іонів Ca^{2+} та молекули АТР з формуванням стабільного проміжного комплексу $\text{E1} \cdot 2\text{Ca}^{2+} \cdot \text{ATP}$ (PDB ID: 1vfp). Подальший гідроліз АТР супроводжується перенесенням фосфатної групи на залишок аспартату в P-доміні з утворенням фосфорильованого стану $\text{E1P} \cdot 2\text{Ca}^{2+} \cdot \text{ADP}$ (PDB ID: 2zbd), у якому акумулюється енергія для наступної структурної перебудови. Вивільнення ADP ініціює масштабний конформаційний перехід до стану E2P (PDB ID: 3ar8), що супроводжується різким зниженням спорідненості транспортних центрів до кальцію та їх переорієнтацією в бік люмена СР для вивільнення іонів. Після завершення транслокації транспортні сайти стабілізуються двома люмінальними протонами (H^+), а за участі A-доміну

відбувається дефосфорилювання ферменту з переходом у стан E2 (PDB ID: 3w5c). Завершальний етап циклу передбачає вивільнення протонів у цитозоль та вихід неорганічного фосфату, що забезпечує повернення АТРази до вихідного стану E1 і відновлення її високої спорідненості до Ca^{2+} для ініціації наступного акту транспорту [19, 20]. Схема цього перетворення наведена на рис. 1.1.

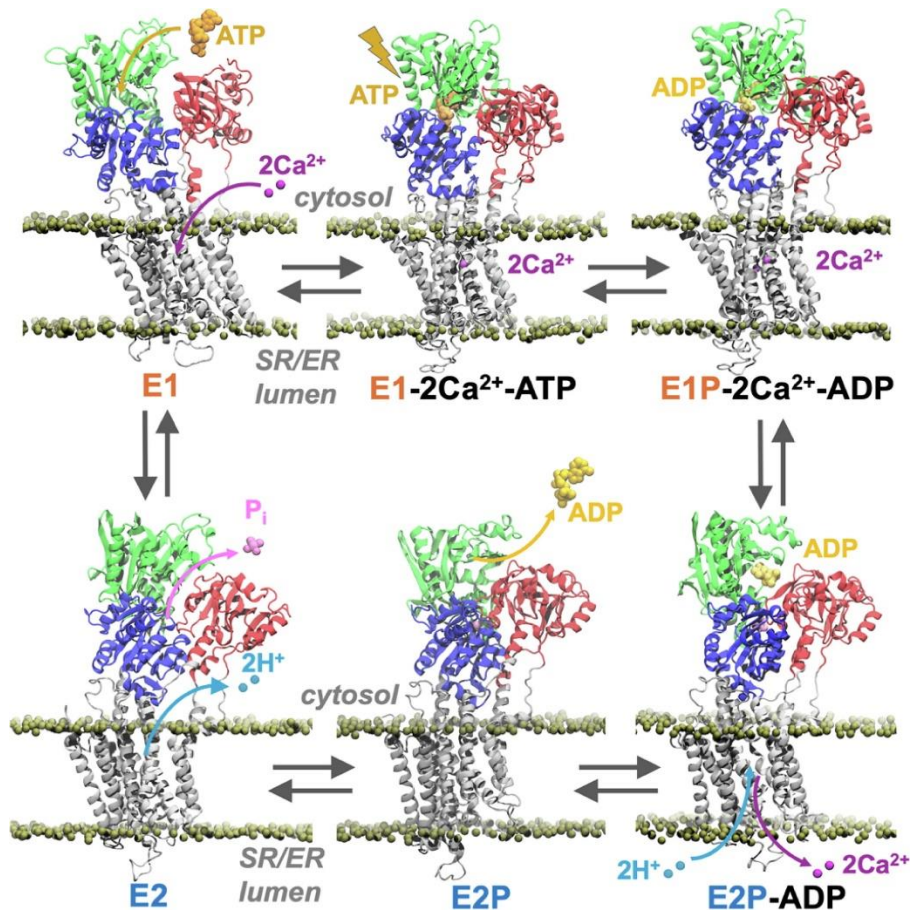


Рис. 1.1. Схематичне зображення проміжних структурних станів, що виникають під час каталітичного циклу $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази сарко/ендоплазматичного ретикулуму [4]

Отже, за один каталітичний цикл $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза саркоплазматичного ретикулуму транспортує два іони Ca^{2+} із цитозолу у просвіт СР за рахунок гідролізу однієї молекули АТР [21]. Вивільнення Ca^{2+} із СР пов'язане зі значним поглинанням Mg^{2+} та K^{+} для підтримки мембранного потенціалу

близько нуля. Іони магнію часто діють в антагонізмі до активуючої функції кальцію. При зв'язку збудження-скорочення антагонізм Mg^{2+}/Ca^{2+} виникає внаслідок прямої та непрямой взаємодії Mg^{2+} з ріанодиновим рецептором (ryanodine receptor, RyR). Оскільки цитозольна концентрація вільного Mg^{2+} на декілька порядків перевищує концентрацію Ca^{2+} , іони магнію ефективно конкурують з іонами кальцію за зв'язування з сайтом активації RyR кальцієм, незважаючи на їхню відносно низьку спорідненість. Крім того, здатність зв'язувати поліфосфати робить Mg^{2+} важливим регулятором АТФ-залежних процесів шляхом буферизації концентрації вільного АТФ і, таким чином, опосередковано відіграє роль у праймінгуванні RyRs за допомогою АТФ до активації Ca^{2+} [22]. Тримерні внутрішньоклітинні катіонні канали, сімейство транспортерів K^+ у СР, забезпечують врівноважуючий потік K^+ , який зменшує деполяризацію мембрани СР для підтримки ефективних механізмів вивільнення та поглинання Ca^{2+} . Хоча K^+ та Mg^{2+} відіграють важливу роль у електричній компенсації дефіциту заряду, що виникає внаслідок поглинання та вивільнення Ca^{2+} СР, концентрації цих іонів недостатні для необхідної загальної компенсації заряду, тому у балансуванні відносно невеликого дефіциту заряду, викликаного іонним обміном через СР, додатково залучаються потоки H^+ . Вимірювання переносу заряду після додавання Ca^{2+} або АТФ до мікросомальних везикул, адсорбованих на твердій мембранній системі, показують, що обмін Ca^{2+}/H^+ відбувається через SERCA, де іони H^+ активно транспортуються з просвіту СР до цитозолу [21].

Активність Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази СР регулюється низкою ендогенних білків, посттрансляційними модифікаціями, а також концентрацією іонів та метаболітів у клітині. Така багаторівнева регуляція забезпечує точний контроль внутрішньоклітинного гомеостазу Ca^{2+} у ГМК.

Одними з основних регуляторів SERCA є малі трансмембранні білки – фосфоламбан (phospholamban, PLB) та сарколіпін (sarcolipin, SLN). PLB зв'язується з трансмембранним доменом SERCA та знижує його спорідненість до Ca^{2+} , стабілізуючи фермент у вільному від Ca^{2+} стані (E2). У

такому стані транспортні сайти помпи є недоступними для іонів кальцію, що призводить до пригнічення її активності. Встановлено, що зв'язування PLB і Ca^{2+} є взаємовиключним, що лежить в основі механізму інгібування SERCA [23]. Додатково показано, що PLB порушує алостеричний зв'язок між сайтами зв'язування АТФ і Ca^{2+} , знижуючи ефективність активації помпи [24].

Важливою особливістю регуляції SERCA є залежність від фосфорилування PLB. У нефосфорильованому стані PLB інгібує активність SERCA, тоді як його фосфорилування протеїнкіназами (такими як протеїнкіназа А або Ca^{2+} , кальмодулін-залежна протеїнкіназа ІІ) призводить до ослаблення взаємодії з помпою і відновлення його активності. Таким чином, PLB виступає як динамічний регулятор, що забезпечує швидке перемикання між інгібованим і активним станами SERCA [17].

SLN є ще одним регуляторним білком, який модулює активність SERCA, проте механізм його дії має певні відмінності. SLN не лише знижує афінність SERCA до Ca^{2+} , але й може порушувати спряження між гідролізом АТФ і транспортом іонів кальцію, що призводить до так званого «роз'єднання» (uncoupling) помпи. У результаті частина енергії АТФ вивільняється у вигляді тепла без ефективного транспорту Ca^{2+} , що має важливе значення для регуляції клітинного метаболізму [17].

Крім білкових регуляторів, активність SERCA залежить від концентрації іонів Mg^{2+} , які є необхідними кофакторами для зв'язування АТФ і забезпечення його гідролізу. Mg^{2+} стабілізує комплекс АТФ і бере участь у формуванні активного центру ферменту, що є необхідним для здійснення каталізу. Зміни концентрації Mg^{2+} можуть впливати на швидкість функціонування помпи та ефективність транспорту Ca^{2+} [26].

Важливу роль у регуляції SERCA відіграють також посттрансляційні модифікації, зокрема зміни, спричинені дією окисників. Окисний стрес може призводити до модифікації амінокислотних залишків у структурі SERCA, що супроводжується зниженням його активності та порушенням кальцієвого

гомеостазу. Такі зміни мають особливе значення за патологічних станів, пов'язаних із дисфункцією гладеньких м'язів [17].

Таким чином, активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази СР регулюється складною системою взаємодій, що включає білкові інгібітори, іонні фактори та посттрансляційні модифікації. Це забезпечує точне налаштування транспорту Ca^{2+} відповідно до функціональних потреб ГМК.

SERCA є ключовим компонентом системи регуляції внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу. Основною функцією цього ферменту є активний транспорт іонів Ca^{2+} із цитозолу в просвіт саркоплазматичного ретикулуму за рахунок енергії гідролізу АТФ, що забезпечує підтримання низької концентрації Ca^{2+} у цитозолі та формування внутрішньоклітинних кальцієвих депо. Завдяки цьому SERCA відіграє центральну роль у підтриманні кальцієвого гомеостазу клітини [19].

У ГМК регуляція рівня Ca^{2+} безпосередньо визначає функціональний стан скорочувального апарату. Підвищення концентрації Ca^{2+} у цитозолі активує скорочення, тоді як його видалення за участю SERCA сприяє переходу клітини у стан розслаблення. Таким чином, SERCA забезпечує завершення кальцієвого сигналу та відновлення вихідного рівня Ca^{2+} після активації клітини. Цей процес є критично важливим для нормального функціонування гладеньких м'язів, включаючи міометрій і судинну стінку [26].

Важливою фізіологічною функцією SERCA є підтримання базального рівня Ca^{2+} у незбуджених клітинах. Завдяки високій спорідненості до кальцію помпа ефективно видаляє навіть незначні підвищення цитозольної концентрації Ca^{2+} , запобігаючи спонтанній активації кальцій-залежних процесів. Це має особливе значення для ГМК судин, де порушення кальцієвого гомеостазу може призводити до змін судинного тонуусу та розвитку патологій, зокрема гіпертензії [26].

У ГМК судин SERCA бере участь у регуляції кальцієвих коливань та хвиль, які визначають силу і тривалість скорочення. Підтримання

адекватного функціонування SERCA необхідне для запобігання тривалому підвищенню цитозольного Ca^{2+} , що може спричиняти вазоконстрикцію та порушення судинної функції [27].

У міометрії SERCA відіграє важливу роль у контролі скоротливої активності матки. Регулюючи швидкість видалення Ca^{2+} із цитозолу, помпа впливає на тривалість та інтенсивність скорочень гладеньких м'язів матки. Це визначає перехід від стану спокою до активних скорочень і має критичне значення для нормального перебігу вагітності та пологів [27].

Крім участі у скороченні м'язів, SERCA виконує ширші функції у клітинній фізіології. Він залучений до регуляції клітинної сигналізації, метаболізму, експресії генів, секреції та процесів виживання клітин. Порушення функції SERCA призводить до дисбалансу кальцієвого гомеостазу, розвитку стресу ендоплазматичного ретикулуму та асоціюється з низкою патологічних станів [19].

Отже, $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза CP є центральним елементом системи регуляції внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу, що забезпечує координацію скорочення і розслаблення гладеньких м'язів, підтримання базального рівня Ca^{2+} та інтеграцію кальцієвих сигналів у клітинні метаболічні й регуляторні процеси.

1.2. Особливості структури та функціонування гладеньком'язових клітин міометрія і аорти

Гладенькі м'язи відіграють важливу роль у регулюванні функцій різноманітних порожнистих органів, таких як судини, дихальні шляхи, шлунково-кишковий тракт, матка та репродуктивні шляхи, сечовий міхур та уретра, тощо. Гладенькі м'язи виконують дві основні ролі: забезпечують зміну форми органа та дають йому змогу витримувати внутрішній тиск. Для досягнення цих фундаментальних цілей гладенькі м'язи розробили механізми

механічного зчеплення, які дозволяють розвивати потужні та скоординовані скорочення при відносно низьких енергетичних витратах. Наприклад, у шлунково-кишковому тракті гладенькі м'язи повинні зазнавати періодичних, але скоординованих фазових скорочень, щоб просувати харчову грудку через травний канал. Водночас у дихальних шляхах та судинах гладенькі м'язи частіше перебувають у різних станах тонічного скорочення, але можуть динамічно регулюватися для розслаблення або скорочення у відповідь на специфічні нейрогуморальні та гемодинамічні сигнали [27].

Матка є органом, що складається з гладеньких м'язів, здатних до скорочень, проте механізми, які керують її скорочувальною функцією, досі недостатньо вивчені. Вона може скорочуватися без нервової чи гормональної стимуляції, але протягом усього свого існування переживає періоди періодичної активації та відносного спокою. Найбільш яскравим прикладом цього є вагітність, коли протягом більшої частини терміну вагітності для здорового росту плода необхідна відсутність скорочень, а під час пологів для успішного перебігу пологового процесу потрібні значні, скоординовані скорочення. Однак протягом репродуктивного гормонального циклу існують певні закономірності скорочень, причому найнижча амплітуда та тривалість скорочень спостерігаються у фазі після овуляції, а найвища – під час менструації (у людей). Матка забезпечує захист і живлення (через кровопостачання) плоду, що розвивається, і скорочується, щоб народити дитину у відповідний час, чим робить вирішальний внесок у життя кожної людини [28].

ГМК матки є спеціалізованими міоцитами, основною функцією яких є забезпечення скорочувальної активності органа. Їхнє скорочення базується на взаємодії двох ключових компонентів: скоротливого апарату та СР, який виконує роль внутрішньоклітинного депо кальцію [29]. Скоротливий апарат організований за принципом моделі ковзних філаментів і включає три основні типи міофіламентів: товсті міозинові, тонкі актинові та проміжні філаменти. Актинові та проміжні філаменти формують розгалужену

внутрішньоклітинну мережу, яка фіксується за допомогою щільних тілець і щільних смуг: перші забезпечують зв'язок між філаментами, тоді як другі – прикріплення до плазматичної мембрани [28, 29]. Більша частина об'єму клітини зайнята саме цими структурами, причому актин значно переважає за кількістю міозин [29].

Скорочення ГМК відбувається внаслідок взаємодії міозинових головок з актиновими філаментами з утворенням перехресних містків, що супроводжується генерацією сили. Ініціація цього процесу залежить від короткочасного підвищення концентрації Ca^{2+} у цитозолі, який зв'язується з кальмодуліном і активує кіназу легких ланцюгів міозину (myosin light chain kinase, MLCK), запускаючи цикл скорочення. Важливу роль у цьому процесі відіграє гідроліз АТФ, що забезпечує енергетичне підґрунтя для руху міозинових філаментів [30]. СР бере участь у регуляції скорочення, вивільняючи Ca^{2+} зі своїх запасів [28]. На відміну від поперечно-посмугованих м'язів, у ГМК кальцій безпосередньо взаємодіє з кальмодуліном без участі тропоніну. Характерною особливістю є також здатність до «latch-стану», що дозволяє підтримувати тривале скорочення з мінімальними витратами енергії [30].

Скорочувальна активність ГМК міометрія тісно пов'язана з іонними потоками через плазматичну мембрану. Іони Ca^{2+} , K^+ , Na^+ та Cl^- переміщуються через специфічні канали та транспортери, формуючи мембранний потенціал і потенціали дії. Локальні іонні струми генерують електричні сигнали, що поширюються у вигляді хвиль по тканині міометрія, забезпечуючи координацію скорочень [30]. Іони калію забезпечують підтримання мембранного потенціалу спокою та реполяризацію, тоді як Na^+ і Cl^- можуть брати участь у деполяризації клітин, особливо під час вагітності [28, 30]. Передбачається, що іони Cl^- також сприяють підвищенню збудливості та скоротливої активності міометрія під час пологів [28].

Основним шляхом надходження Ca^{2+} у клітину є потенціалозалежні кальцієві канали L-типу. Визначальна роль цих каналів у транспорті Ca^{2+}

через плазматичну мембрану добре підтверджена експериментально: зокрема, їхнє блокування ніфедипіном призводить до повного припинення скоротливої активності клітин [31]. Деполяризація плазматичної мембрани міоцитів супроводжується відкриттям цих каналів і входом Ca^{2+} у клітину, що, у свою чергу, може ініціювати додаткове вивільнення кальцію з СР, посилюючи скорочення [28].

Водночас у міометрії внутрішньоклітинні запаси Ca^{2+} у СР відіграють меншу роль у безпосередній ініціації скорочення порівняно з трансмембранним входом іонів, хоча вони й мають важливе модулююче значення [32]. СР формує просторово-часові характеристики цитозольних Ca^{2+} -сигналів за участю $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази, яка транспортує іони кальцію назад у СР після скорочення. Разом із плазматичною Ca^{2+} -АТРазою (plasma membrane Ca^{2+} -ATPase, PMCA) та натрій-кальцієвим обмінником ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger, NCX), SERCA забезпечує ефективне видалення Ca^{2+} із цитозолу та підтримання клітинного кальцієвого гомеостазу [28, 32].

Вивільнення Ca^{2+} із СР відбувається через канали рецептора інозитол-1,4,5-трифосфату (inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, IP3R) та RyR, що беруть участь в ініціації скорочення [28]. Зокрема, активація IP3R під дією окситоцину спричиняє підвищене вивільнення Ca^{2+} , що посилює скорочення, пригнічує активність Na^+ -активованих K^+ -каналів та підвищує чутливість скоротливого апарату до кальцію [33].

Підвищення внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} у ГМК міометрія також забезпечується механізмом депо-керованого кальцієвого входу (store-operated calcium entry, SOCE). Цей механізм залучає білки STIM (stromal interaction molecule, молекула взаємодій стромы, що міститься у мембрані СР й виступає сенсором наповнення цього депо кальцієм) та Orai (кальцієвий канал плазматичної мембрани, закритий за умов заповнення СР іонами кальцію). Коли внутрішнє депо клітини – СР – порожніє після скорочення, білки STIM змінюють форму, подаючи сигнал на плазматичну мембрану. Це викликає зміну конформації молекул Orai, відкриття кальцієвих каналів й

надходженн кальцію у клітину ззовні, що додатково підтримує кальцієві сигнали [34].

Важливу роль у регуляції цих процесів відіграють кавеоли – спеціалізовані мембранні мікродомени, багаті на іонні канали, такі як Cl^- -канали, що активуються Ca^{2+} , K^+ -канали високої провідності, а також вище описані компоненти системи SOCE [28]. Вони також модулюють активність Ca^{2+} -каналів L-типу [28]. Таким чином, попри головну роль Ca^{2+} -каналів L-типу у ініціації скорочення, динаміка Ca^{2+} у ГМК регулюється складною мережею взаємопов'язаних механізмів.

Як зазначалось раніше, ключову роль у завершенні скорочення та відновленні базального рівня Ca^{2+} відіграє SERCA, що транспортує іони кальцію з цитозолу зворотно у СР. Підтримання кальцієвого гомеостазу за участю SERCA є критично важливим для нормального функціонування м'язових клітин, тоді як її дисфункція може бути пов'язана з віковими змінами або ж призводити до розвитку патологічних станів, таких як нейродегенеративні розлади та м'язові дистрофії. У міометрії регуляція активності іонних каналів і транспортерів, включаючи SERCA, є одним із ключових механізмів контролю скоротливої активності гладеньком'язових клітин [35].

Аорта – це найбільша кровоносна судина, що простягається від грудної клітки до черевної порожнини й складається з трьох шарів: інтими, медіа та адвентиції. ГМК – переважний тип клітин артеріальної стінки – є важливими для нормального функціонування кровоносних судин. Ці клітини, будучи повністю диференційованими, демонструють скоротливий фенотип, який у першу чергу відповідає за регулювання судинного тону, кровотоку та артеріального тиску. Як основний клітинний компонент стінок аорти, ГМК повинні бути динамічними, щоб адаптуватися до мінливого мікросередовища та підтримувати неушкоджену структуру та функціональність стінки аорти. На відміну від термінально диференційованих клітин, ГМК можуть змінювати свої морфологічні та функціональні характеристики за певних

умов. Було виявлено, що ГМК, виділені з аорти свині, за умов низької щільності посіву змінюють веретеноподібну форму на поліморфну та демонструють експоненціальний ріст у відповідь на дію мітогенів [36].

За фізіологічних умов ГМК відіграють ключову роль у регуляції судинного тонуусу шляхом синтезу компонентів позаклітинного матриксу, таких як еластин і колаген, і реагують на гемодинамічний стрес податливістю та скоротливістю. Приблизно 90 % клітин медіа становлять концентрично розташовані ГМК веретеноподібної форми. Вони характеризуються добре організованими актин-міозиновими філаментами з мітохондріями, локалізованими поблизу скоротливого апарату. Для цих клітин характерна висока експресія канонічних скоротливих маркерів, таких як α -актин гладеньких м'язів (α -smooth muscle actin, α -SMA), важкий ланцюг міозину гладеньких м'язів (smooth muscle myosin heavy chain, SM-MHC), білок гладеньких м'язів 22 α (smooth muscle protein 22 α , SM22 α) та кальпонін, а також низька здатність до проліферації та міграції й кальцій-залежна скоротливість, що забезпечує підтримку судинного тонуусу [37].

У стінці аорти, окрім типових ГМК, присутні також перицитоподібні клітини, локалізовані переважно в адвентиції поблизу *vasa vasorum*. Вони характеризуються нижчою скоротливою активністю, але зберігають здатність до міграції, проліферації та диференціації, що має значення для процесів регенерації судинної стінки. За патологічних умов, зокрема при атеросклерозі, ГМК можуть мігрувати з медії в інтиму та набувати синтетичного або запального фенотипу, що супроводжується ремоделюванням позаклітинного матриксу та розвитком уражень судин [38].

Клітинно-клітинні та клітинно-матричні зв'язки між різними шарами стінки аорти відіграють вирішальну роль у координації функції ГМК та їхньої реакції на механічне напруження та запальні подразники. Конексин 43 (connexin 43, Cx43) є найбільш широко експресованим конексином у ГМК, який «зшиває» клітини в єдину функціональну мережу. Як компонент щільних контактів він бере участь у міжклітинній провідності електричного

сигналу, поширенні кальцієвих хвиль, у синхронізації скорочень та передачі прозапальних сигналів. Дослідження показали, що Сх43 відіграє координуючу роль у міжшаровій комунікації всередині судинної стінки, регулюючи функцію ГМК та судинний тонус. В умовах гіпоксії або запалення експресія Сх43 підвищується, що змінює реакцію ГМК на стрес [39]. Через інтегрини ГМК також взаємодіють з позаклітинним матриксом, сприяючи механотрансдукції, яка впливає на клітинну міграцію, проліферацію та запальні реакції. Крім того, N-кадгерин, ключовий кадгерин, що експресується в ГМК, відіграє важливу роль у підтримці стабільності шаруватої структури, контролі міграції клітин та передачі сигналів механічного стресу [40].

Скоротливість є однією з найважливіших і визначальних функцій ГМК. Втрата цієї скоротливої функції може порушити судинний тиск, підвищити напругу стінки аорти та сприяти утворенню аневризми. На скоротливу функцію ГМК впливають різні фактори, включаючи дисбаланс у матричному мікрооточенні, підвищене напруження зсуву кровотоку (shear stress) та дисрегуляція цитокінів [38]. Динамічні зміни діаметра судин значною мірою залежать від активації та інактивації (зокрема, за рахунок реакцій фосфорилування/дефосфорилування) скоротливих білків у ГМК судин. Скоротливий апарат ГМК судин включає актин і міозин, а також високоорганізований цитоскелет [41].

Ключовою подією, що поєднує процеси збудження та скорочення гладеньких м'язів судин, є збільшення внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} у відповідь на механічні, гуморальні або нервові подразники. Кальцієвий сигналінг контролює основні функції клітин ГМК і тонко налаштовується проникними для кальцію каналами, обмінниками та іншими транспортними системами плазматичної мембрани, а також внутрішньоклітинними джерелами, включаючи СР, мітохондрії та кальційзв'язувальні білки [41].

Внутрішньоклітинний кальцій регулює жорсткість ГМК (cell stiffness), беручи участь у міозин-опосередкованому скороченні та кальцій-залежних процесах регуляції жорсткості та адгезії. Ці процеси потребують α -SMA, інтегрину $\alpha 5\beta 1$ та інтегрин-залежних взаємодій клітини з позаклітинним матриксом [42]. Скоротлива функція ГМК в першу чергу ініціюється позаклітинними стимулами, такими як ангіотензин II або норадреналін. Ці стимули активують специфічні мембранні рецептори, що згодом призводить до відкриття напругозалежних кальцієвих каналів або IP3R й підвищення внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} . Кальцій надалі зв'язується з кальмодуліном, утворюючи комплекс, що активує MLCK, яка зрештою сприяє взаємодії актину та міозину та скороченню клітин [38].

Отже, ГМК міометрія та аорти мають спільні фундаментальні механізми скорочення, що базуються на кальцієвій сигналізації та актин-міозиновій взаємодії, однак відрізняються функціональною спеціалізацією. У міометрії ці процеси забезпечують репродуктивну функцію, тоді як в аорті – беруть участь у підтримці судинного тонуусу та гемодинамічної стабільності.

1.3. Макроциклічні олігомери фенолів каліксарени як модулятори біологічних мішеней

Каліксарени є класом макроциклічних сполук, що утворені внаслідок циклоконденсації фенолів з формальдегідом та характеризуються наявністю просторово організованої чашоподібної структури. Завдяки своїй тривимірній архітектурі ці сполуки здатні до формування супрамолекулярних комплексів за принципом «господар–гість», у яких внутрішня порожнина макроциклу виступає як рецептор для різноманітних іонів і молекул. Така структурна організація визначає їхню високу селективність та афінність до широкого спектра біологічно значущих субстратів [14].

Супрамолекулярна природа каліксаренів базується на нековалентних взаємодіях, зокрема водневих зв'язках, електростатичних і гідрофобних ефектах, що забезпечують стабільність комплексів із «гостями». Це дозволяє розглядати каліксарени як універсальні молекулярні платформи для розпізнавання та селективного зв'язування біомолекул, включаючи білки, нуклеїнові кислоти та низькомолекулярні ліганди. У контексті сучасної супрамолекулярної хімії вони виступають інструментом спрямованого конструювання функціональних систем із заданими властивостями [14, 43].

Особливий інтерес становить здатність каліксаренів виступати ефекторами біологічних процесів. Ефектори – це низькомолекулярні сполуки, здатні модулювати функціональну активність ферментів, транспортних білків і рецепторів шляхом специфічної взаємодії з ними. Використання таких молекул є одним із ключових підходів сучасної фізико-хімічної біології для дослідження механізмів ензиматичного каталізу, мембранного транспорту та клітинної сигналізації. Каліксарени, завдяки своїй структурній гнучкості та можливості функціоналізації, відповідають основним вимогам до ефекторів, що включають селективність, оборотність дії та достатній рівень афінності до біомішеней [14].

Важливою властивістю каліксаренів є їхня біологічна активність. Деякі представники цього класу сполук демонструють мембранотропні властивості, що забезпечують їхню здатність проникати через плазматичну мембрану клітин і взаємодіяти з внутрішньоклітинними структурами. Встановлено, що каліксарени можуть виступати інгібіторами або активаторами ферментативних систем, впливати на транспорт іонів, пригнічувати клітинну адгезію, а також проявляти антитромботичні та антипухлинні ефекти. Така різноманітність біологічних ефектів свідчить про їхній значний потенціал як фармакологічно активних агентів [14].

Особливе значення має взаємодія каліксаренів із мембранозв'язаними транспортними системами іонів, зокрема Ca^{2+} -транспортувальними АТРазами. Ca^{2+} -АТРази Р-типу, до яких належить SERCA, відіграють

ключову роль у підтриманні внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу шляхом активного транспорту іонів Ca^{2+} із цитозолу до саркоплазматичного або ендоплазматичного ретикулу. Функціонування SERCA є критично важливим для регуляції скоротливості гладеньких м'язів, включаючи міометрій і судинну стінку, оскільки саме зниження цитозольної концентрації Ca^{2+} забезпечує релаксацію клітин [44].

У монографії [14] показано, що каліксарени можуть безпосередньо впливати на активність Ca^{2+} -АТФаз, змінюючи швидкість транспорту кальцію та ефективність його накопичення у внутрішньоклітинних депо. Така модулююча дія може проявлятися як інгібуванням, так і активацією ферменту залежно від структури каліксарену, його функціональних замісників і умов середовища. Зокрема, взаємодія каліксаренів із ліпідним оточенням мембрани або безпосередньо з білковими доменами SERCA може змінювати конформаційні переходи ферменту, що лежать в основі його каталітичного циклу.

Враховуючи, що кальцієвий гомеостаз є центральним механізмом регуляції скорочення гладеньких м'язів, вплив каліксаренів на SERCA має важливе функціональне значення. У міометрії це може визначати силу та тривалість скорочень, тоді як у судинах – регуляцію судинного тонуусу та артеріального тиску. Таким чином, модуляція активності SERCA за допомогою каліксаренів може розглядатися як перспективний підхід до контролю скоротливої активності ГМК [44].

Порушення функції SERCA пов'язане з розвитком різноманітних патологічних станів, які включають серцево-судинні захворювання, гіпертензію, нейродегенеративні процеси та м'язові дистрофії. У цьому контексті каліксарени привертають увагу як потенційні фармакологічні агенти, здатні відновлювати або коригувати порушений кальцієвий гомеостаз. Їхня відносно низька токсичність, можливість структурної оптимізації та висока селективність до біологічних мішеней роблять їх перспективними кандидатами для створення нових лікарських засобів [44].

Таким чином, каліксарени є не лише ефективними супрамолекулярними рецепторами, але й потужними модуляторами функціонування мембранних ферментів, зокрема SERCA. Їхнє використання відкриває нові можливості для дослідження механізмів регуляції кальцієвого гомеостазу та розробки інноваційних підходів до впливу на скоротливу активність гладеньких м'язів.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали та реактиви

У процесі виконання роботи використовували такі реактиви: калікс[4]арени С-90, С-956 та С-1087; аденозинтрифосфат (adenosine triphosphate, АТР), НЕРЕС, убаїн, тапсигаргін, Hoechst 33342, fluo-4 АМ, колагеназа, полі-L-лізин (Sigma-Aldrich, США); Tris-гідроксиметил-амінометан (Reanal, Угорщина); дигітонін (Merck, Німеччина); етиленгліколь-біс(β-аміноетиловий ефір)-N,N,N',N'-тетраоцтова кислота (ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid, EGTA) (Fluka, Швейцарія); окситоцин (Gedeon Richter, Угорщина), а також інші реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації «ч.д.а.» та «х.ч.».

Калікс[4]арени С-90 (5,11,17,23-тетра(трифторометил)-(фенілсульфоніліміно)метиламіно-25,26,27,28-тетрапропоксикалікс[4]арен), С-956 (5,11,17,23-тетра(трифторометил)-(фенілсульфоніліміно)метиламіно-25,27-діоктилокси-26,28-дипропоксикалікс[4]арен) та С-1087 (5,11,17,23-тетра(трифторометил)-(фенілсульфоніліміно)метиламіно-25,27-дигексил-окси-26,28-дигідрокситакалікс[4]арен) (рис. 2.1) були синтезовані та ідентифіковані із застосуванням методів спектроскопії ядерного магнітного резонансу та інфрачервоної спектроскопії у відділі хімії макроциклічних сполук Інституту органічної хімії НАН України під керівництвом академіка НАН України В. І. Кальченка [15–17].

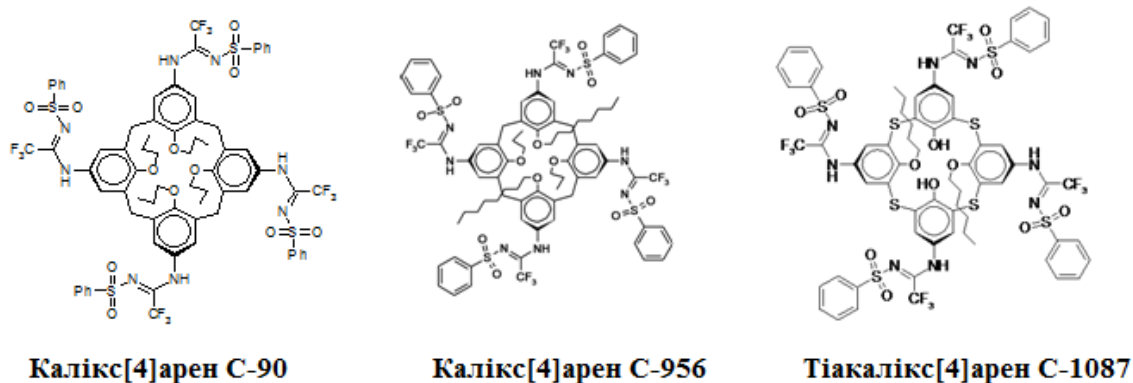


Рис. 2.1. Структурні формули калікс[4]аренів С-90, С-956 та тіакалікс[4]арену С-1087

2.2. Схема та об'єкти дослідження

Об'єктом дослідження слугували щури-самиці лінії Wistar віком 3–4 місяці. З метою отримання біологічного матеріалу тварин піддавали евтаназії з дотриманням етичних норм відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних тварин (Страсбург, 1986 р.) та Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Після евтаназії від тварин відбирали три види біоматеріалу: суспензію живих ГМК аорти й міометрію та препарат кільцевих сегментів грудної аорти. Кожен із цих об'єктів використовували для проведення різних серій досліджень відповідно до поставлених завдань.

На основі суспензії живих ГМК проводили три серії досліджень. По-перше, спектрофотометричним методом визначали активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази СР ГМК міометрію та аорти щурів за дії калікс[4]аренів С-90, С-956 та С-1087. По-друге, вивчали активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази СР ГМК аорти за дії різних концентрацій калікс[4]арену С-956 й методами кінетичного аналізу оцінювали її кінетичні

параметри. По-третє, методом конфокальної мікроскопії з використанням Ca^{2+} -чутливого флуоресцентного зонду fluo-4 AM досліджували потенційні зміни концентрації кальцію у ГМК аорти за дії калікс[4]арену C-956.

Препарат кільцевих сегментів грудної аорти використовували для тензометричного дослідження скоротливої активності гладеньких м'язів судин за дії калікс[4]арену C-956. Реєстрацію базального напруження (ізометричний режим реєстрації) та діаметру (ізотонічний режим реєстрації) кільцевих сегментів грудної аорти щурів здійснювали за допомогою спеціалізованої вимірювальної системи.

2.3. Отримання суспензії гладеньком'язових клітин матки й аорти щурів

Суспензію ГМК матки та аорти невагітних щурів, попередньо естрогенізованих за 16 год. до вилучення тканини, отримували із застосуванням колагенази та соєвого інгібітора трипсину за методом Молларда та співавт. [45, 46] із певними модифікаціями. Естрогенізацію проводили з метою індукції гіпертрофії матки: тваринам внутрішньом'язово вводили 50 мкл 0,1 % розчину естрадіолу. Відомо, що під впливом естрогенів у міометрії активується синтез актоміозинового комплексу та зростає проліферативна активність м'язових клітин. Евтаназію тварин здійснювали шляхом інгаляційного наркозу хлороформом із подальшою декапітацією.

Одержання клітинної суспензії включало декілька послідовних етапів. Після ізоляції матки та аорти тканину очищали від жирових і сполучнотканинних компонентів і переносили у розчин Хенкса (розчин А) такого 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. Далі тканину подрібнювали на фрагменти розміром приблизно 2×2 мм і тричі відмивали (по 5 хв.) у 5 мл розчину Б, що являв

собою модифікований розчин Хенкса без $MgCl_2$ і $MgSO_4$, зі зниженою концентрацією $CaCl_2$ (0,03 мМ).

Наступним етапом була ферментативна дисоціація: тканинні фрагменти інкубували протягом 20 хв. при $37\text{ }^\circ\text{C}$ за умов постійного перемішування у 2 мл середовища, виготовленого на основі розчину Б, що містило колагеназу (0,1 %), бичачий сироватковий альбумін (0,1 %) та соєвий інгібітор трипсину (0,01 %). Після інкубації ферментативне середовище видаляли, а тканину переносили у свіжий розчин Б без ферментів. Для підвищення ефективності дисоціації клітин проводили механічне піпетування (15–20 разів протягом 1–2 хв.) за допомогою скляної піпетки. Отриману клітинну суспензію відбирали, після чого залишкову тканину знову піддавали обробці новою порцією ферментативного середовища. Цикл ферментативної обробки та механічної дисоціації повторювали 5–6 разів.

Перші дві порції клітинної суспензії, отримані після піпетування (без ферментів), відбраковували через наявність пошкоджених клітин і тканинних фрагментів. Подальші 3–4 порції об'єднували та піддавали центрифугуванню протягом 10 хв. при 80 g. Осад клітин двічі промивали буфером, що містив 25 мМ HEPES-KOH (рН 7,4; $8\text{ }^\circ\text{C}$), 150 мМ NaCl і 0,4 % бичачого сироваткового альбуміну, із подальшим центрифугуванням за тих самих умов. На завершальному етапі клітини ресуспендували у середовищі зберігання аналогічного складу (без альбуміну), охолоджували (на льоду) та використовували для подальших експериментальних досліджень.

2.4. Визначення Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазної активності саркоплазматичного ретикулуму гладеньком'язових клітин матки й аорти щурів

Загальну АТРазну активність визначали в суспензії міоцитів при температурі $37\text{ }^\circ\text{C}$ у стандартному інкубаційному середовищі об'ємом 0,4 мл, що містило (мМ): АТР – 3; $MgCl_2$ – 3; $CaCl_2$ – 0,95; NaCl – 25; KCl – 125;

EGTA – 1; HEPES-Tris – 20 (pH 7,4 при 37 °C), а також 1 мМ NaN₃, 1 мМ убаїну та 0,1 % дигітоніну. Вміст білка мембранної фракції у пробі становив 20–30 мкг. Тривалість інкубації складала 5 хв. Реакцію запускали додаванням 50 мкл суспензії міоцитів до інкубаційного середовища, тоді як її зупинку здійснювали шляхом внесення 1 мл стоп-розчину, що містив 1,5 М ацетат натрію, 3,7 % формальдегіду, 14 % етанолу та 5 % трихлороцтової кислоти (pH 4,3; 8 °C).

Ca²⁺,Mg²⁺-АТРазну активність визначали як різницю між загальною АТРазною активністю у присутності та за відсутності 0,1 мкМ тапсигаргіну в інкубаційному середовищі. Кількість неорганічного фосфату (Pi), що утворювався в ході реакції, визначали за методом Rathbun і Betlach [23].

2.5. Дослідження міоцитів аорти шурів методом конфокальної мікроскопії

Для проведення конфокально-мікроскопічних досліджень ГМК аорти (100 мкл суспензії) іммобілізували на предметному склі, попередньо обробленому полі-L-лізином (100 мкл), протягом 2 год. при температурі 25 °C. Клітини, що не адгезувалися до поверхні, видаляли шляхом промивання розчином Хенкса Б (склад якого наведено у попередніх підрозділах), після чого до зафіксованих ГМК додавали 100 мкл цього ж розчину.

Для реєстрації змін внутрішньоклітинної концентрації Ca²⁺ клітини інкубували з двома флуоресцентними зондами: Hoechst 33342 (2'-(4-етоксифеніл)-5-(4-метилпіперазин-1-іл)-2,5'-бі-1H-бензімідазол – ядерний барвник, специфічний до ДНК, із синьою флуоресценцією) та fluo-4 AM (ацетилоксиметил 2-[2-[2-[5-[3-(ацетилоксиметокси)-2,7-дифлуоро-6-оксоксантен-9-іл]-2-[біс[2-(ацетилоксиметокси)-2-оксоетил]аміно]феноксі]етокси]-N-[2-(ацетилоксиметокси)-2-оксоетил]-4-метиланіліно]ацетат –

кальцій-чутливий індикатор, що забезпечує зелену флуоресценцію). Fluo-4 застосовували у формі ацетоксиметилового ефіру (AM), що забезпечує його проникнення через інтактну плазматичну мембрану. У середині клітини під дією естераз відбувається гідроліз ефірної групи з утворенням активної форми барвника, здатної зв'язувати іони Ca^{2+} , що супроводжується зростанням інтенсивності флуоресценції у цитозолі, попри вищу концентрацію кальцію у позаклітинному середовищі. Кінцеву концентрацію зонду (4,6 мкМ) визначали розрахунковим шляхом з урахуванням молекулярної маси та вихідної концентрації барвника.

Слід враховувати, що fluo-4 є не лише індикатором, але й кальцій-зв'язувальним буфером, тому його концентрацію підбирали мінімально ефективною. При високих концентраціях (понад 200 мкМ) барвник може порушувати функціональний стан клітин через надмірне зв'язування Ca^{2+} . Для покращення проникнення зонду до фарбувального розчину додавали 0,2 % Pluronic. Через 20 хв. після інкубації клітини промивали свіжим середовищем для видалення надлишку барвника.

Дослідження динаміки внутрішньоклітинного кальцію здійснювали в режимі Multi Track на скануючому лазерному конфокальному мікроскопі LSM 510 META (Carl Zeiss, Німеччина). Реєстрацію проводили у вигляді серії послідовних зображень (time series) з інтервалом 15–20 с протягом 5 хв. У процесі експерименту до препарату додавали 2 мкл диметилсульфоксиду або аліквоту калікс[4]арену C-956 (кінцева концентрація 20 мкМ).

Збудження флуоресценції Hoechst 33342 здійснювали діодним лазером із довжиною хвилі 405 нм, реєстрацію сигналу проводили у діапазоні 420–480 нм (фільтр BP 420–480). Для fluo-4 AM використовували аргонний лазер із довжиною хвилі 488 нм, а реєстрацію проводили у діапазоні 505–530 нм (фільтр BP 505–530).

Кількісну обробку отриманих даних виконували із застосуванням стандартної функції Region of Interest (ROI), яка дозволяє будувати графіки

залежності інтенсивності флуоресценції (усередненої в межах вибраної ділянки клітини) від часу у відносних одиницях.

2.6. Методи тензометричного дослідження

Тензометричні дослідження виконували в ізометричному та ізотонічному режимах на препаратах кільцевих сегментів грудної аорти (шириною 2–3 мм) зі збереженим ендотеліальним шаром. Отримані гладеньком'язові препарати розміщували у робочій камері об'ємом 2 мл, через яку постійно протікав розчин Кребса зі швидкістю 8 мл/хв.; температуру середовища підтримували на рівні 37 °С. Препаратам задавали початкове пасивне навантаження 10 мН і витримували їх у цих умовах не менше 1 год. для стабілізації. Реєстрацію механічних сигналів здійснювали після їх підсилення з використанням аналого-цифрового перетворювача.

У ході експериментів застосовували стандартний розчин Кребса такого складу (мМ): NaCl – 120,4; KCl – 5,9; NaHCO₃ – 15,5; NaH₂PO₄ – 1,2; MgCl₂ – 1,2; CaCl₂ – 2,5; глюкоза – 11,5; рН – 7,4. Для індукції скорочення використовували також гіперкалієвий розчин (80 мМ), який отримували шляхом ізотонічної заміни частини іонів Na⁺ у розчині Кребса на еквімолярну кількість K⁺.

Кінетичні параметри скорочення, викликаного гіперкалієвим розчином, аналізували за методом Костеріна–Бурдиги з визначенням нормалізованих максимальних швидкостей фаз скорочення (V_{nc}) і розслаблення (V_{nr}) [47].

2.7. Кінетичний аналіз

Розрахунок уявних констант Міхаеліса, уявних констант активації іонами Mg²⁺ та коефіцієнтів Хілла (n_H) здійснювали за допомогою

концентраційних залежностей. Ці криві були подані в логарифмічному масштабі на основі лінеаризованого рівняння Хілла [24]:

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

де:

V – питома ензиматична активність;

V_{\max} – максимальна питома ензиматична активність за присутності субстрату або іона-активатора в інкубаційному середовищі;

K – уявна константа Міхаеліса (для субстрату реакції, K_m) або уявна константа активації (для іонів-активаторів, K_{Mg} у випадку іонів магнію);

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

Для безпосереднього знаходження параметрів уявної константи активації K_a (зокрема, для іонів Mg^{2+} – K_{Mg}) та коефіцієнтів Хілла застосовували лінійні графіки Хілла згідно з таким рівнянням:

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

де:

V_0 – питома ензиматична активність за умови повної відсутності активатора в інкубаційному середовищі;

A – концентрація внесеного активатора.

2.8. Статистичний аналіз

Статистичну обробку отриманих даних здійснювали із застосуванням методів варіаційної статистики. Статистичні розрахунки виконували з використанням програмного забезпечення MS Excel та OriginLab (версії 2019 року).

Нормальність розподілу вибірок перевіряли за допомогою критерію Шапіро–Уїлка. Для оцінки достовірності відмінностей між середніми значеннями застосовували t-критерій Стьюдента. У всіх випадках статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$. Якість апроксимації експериментальних даних лінійною залежністю оцінювали за допомогою F-критерію Фішера; при цьому коефіцієнт детермінації (R^2) становив не менше 0,96.

Отримані результати наведено у вигляді середнього арифметичного значення \pm стандартна похибка середнього ($M \pm m$).

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази саркоплазматичного ретикулуму гладеньком'язових клітин міометрію та аорти щурів за дії калікс[4]аренів С-90, С-956 та С-1087

У попередніх дослідженнях [14, 48, 49] співробітники відділу біохімії м'язів Інституту біохімії імені О.В. Палладіна НАН України показали, що калікс[4]арени С-90, С-956 та С-1087 ефективно пригнічували кальцієві помпи плазматичної мембрани. Тому для розширення наукової теоритичної бази було вирішено проаналізувати їх дію на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТразу СР ГМК аорти та міометрія.

Згідно одержаних результатів, за дії калікс[4]аренів С-90, С-956 та С-1087, використаних у концентрації 100 мкМ, Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазна активність СР клітин міометрію щурів знижується до рівня $43,4 \pm 0,5 \%$, $39,5 \pm 0,6 \%$ та $63,2 \pm 1,2 \%$, відповідно, від такої за відсутності калікс[4]аренів у середовищі інкубації (рис. 3.1). Подібним чином досліджені сполуки діють і на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТразу СР ГМК аорти щурів: залишкова ензиматична активність у цьому випадку становить $39,2 \pm 0,4 \%$, $30,4 \pm 0,3 \%$ та $68,4 \pm 0,8 \%$ від рівня контролю, відповідно, для калікс[4]аренів С-90, С-956 та С-1087 (рис. 3.1).

Отже, калікс[4]арен С-956, застосований у концентрації 100 мкМ, пригнічує Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазну активність СР більшою мірою як у випадку ГМК міометрію, так і у випадку ГМК аорти, що вказує на його більшу ефективність. Саме тому ця сполука була використана у подальших дослідженнях.

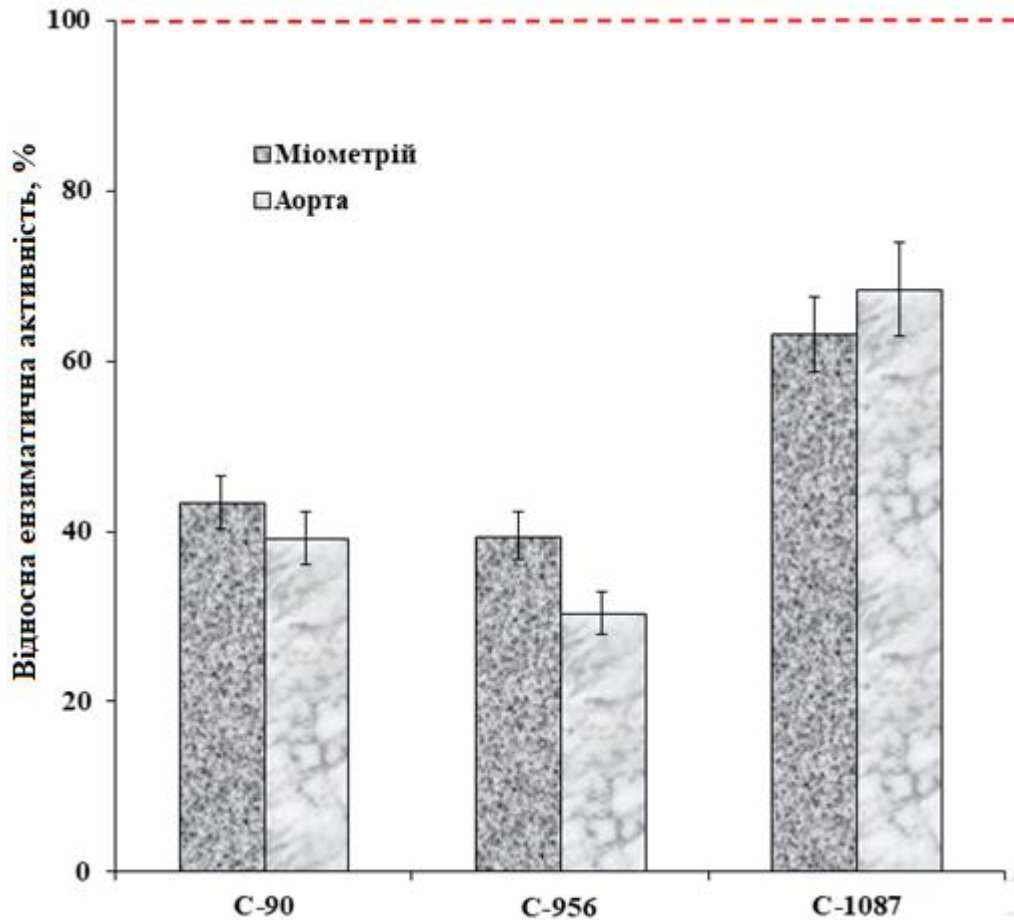


Рис. 3.1. Відносна ензиматична активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази саркоплазматичного ретикулула клітин міометрію та аорти щурів за дії калікс[4]аренів С-90, С-956 і С-1087 (100 мкМ) ($M \pm m$, $n=5$). За 100 % прийнято значення питомої ензиматичної активності за відсутності калікс[4]аренів у середовищі інкубації

3.2. Активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази саркоплазматичного ретикулулу гладеньком'язових клітин аорти щурів за дії різних концентрацій калікс[4]арену С-956

Оскільки калікс[4]арен С-956 виявився найбільш ефективним інгібітором $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР клітин аорти, на наступному етапі

дослідження було проаналізовано активність цього фермента за дії різних концентрацій калікс[4]арену С-956 (10^{-8} – 10^{-4} М) (рис. 3.2). Також було розраховано величину коефіцієнта інгібування $I_{0,5}$ ($53,2 \pm 1,8$ мкМ) й значення коефіцієнта Хілла n_H ($0,57 \pm 0,04$).

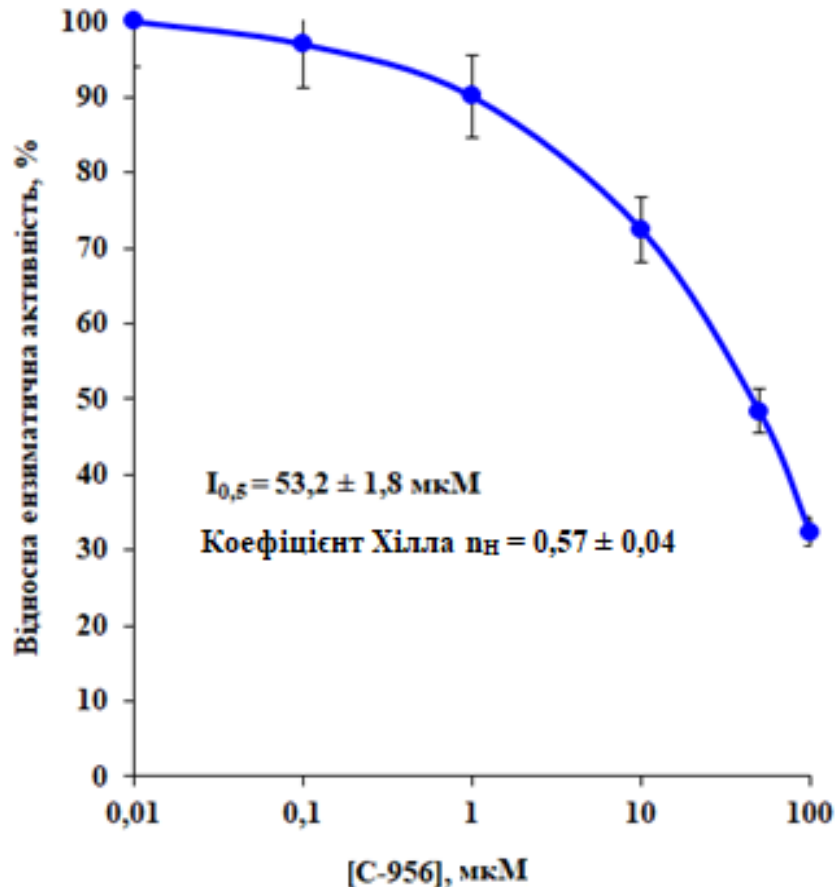


Рис. 3.2. Відносна ензиматична активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази саркоплазматичного ретикулула клітин аорти щурів за дії різних концентрацій калікс[4]арену С-956 ($M \pm m, n = 5$). За 100 % прийнято значення питомої ензиматичної активності за відсутності калікс[4]арену С-956 у середовищі інкубації

Отже, калікс[4]арен С-956, використаний у концентрації 100 мкМ, ефективно пригнічує ензиматичну активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази саркоплазматичного ретикулула клітин аорти щурів (рис. 3.1, 3.2).

3.3. Оцінка кінетичних параметрів Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази саркоплазматичного ретикулуму гладеньком'язових клітин аорти щурів за дії калікс[4]арену С-956

3.3.1. Активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази саркоплазматичного ретикулуму гладеньком'язових клітин аорти щурів за різних концентрацій іонів магнію за дії калікс[4]арену С-956

Для встановлення кінетичного механізму інгібування Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази СР калікс[4]ареном С-956 ми перевірили чи змінюється спорідненість цього фермента до субстратів їх реакції під впливом інгібітора.

Значення Mg^{2+} для метаболізму пояснюється його властивостями як промотора структури макромолекул, субстратзв'язувального іона і переносника електронів. Відомо багато Mg^{2+} -залежних ензимів, де роль Mg^{2+} не обмежується активацією субстрату, а пов'язана із формуванням активного (каталітичного) центрів. Проте найбільш широко відома роль Mg^{2+} в утворенні хелатного комплексу з АТР – субстратом аденозинтрифосфатазних реакцій. Вважають, що іони Mg^{2+} вступають у взаємодію із фосфатними зарядженими групами АТР, поляризують їх і підвищують реакційну здатність системи, полегшуючи нуклеофільну атаку на термінальний фосфатний залишок АТР [50].

Згідно отриманих результатів, ензиматична активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази СР зростає при збільшенні концентрації MgCl_2 від 0,1 до 3 мМ за умови фіксованих концентрацій АТР (3 мМ) в інкубаційному середовищі (рис. 3.3, контроль).

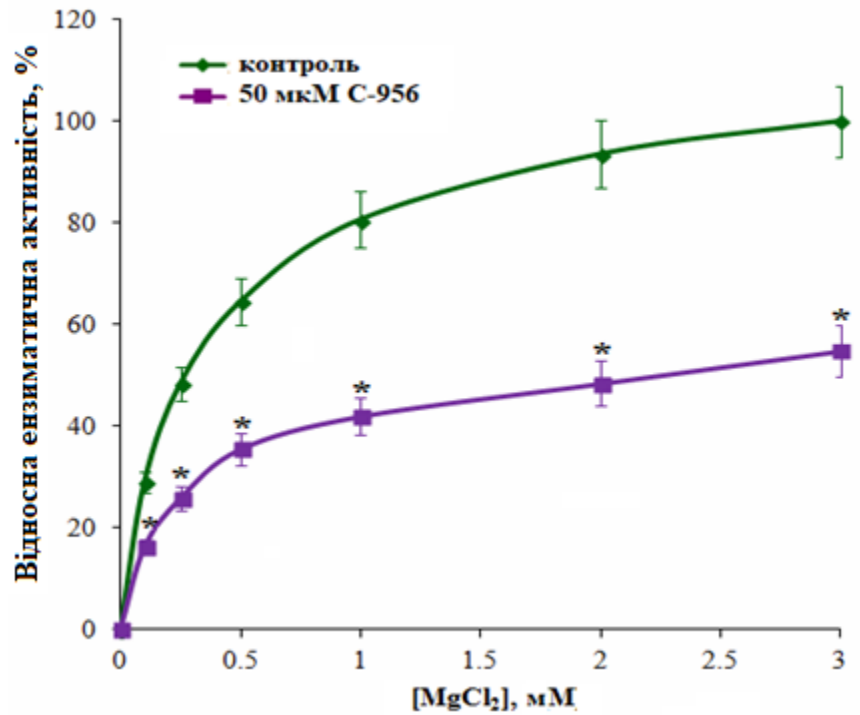


Рис. 3.3. Відносна ензиматична активність $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -АТРази саркоплазматичного ретикулуму гладеньком'язових клітин аорти щурів за різних концентрацій іонів магнію за дії калікс[4]арену С-956 ($M \pm m$, $n=5$)

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем

Значення уявної константи активації $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР хлоридом магнію K_{Mg} складає $0,32 \pm 0,02$ мМ ($M \pm m$; $n = 5$). При цьому величина коефіцієнта Хілла $n_{\text{н},\text{Mg}}$ становить $1,10 \pm 0,03$ ($M \pm m$; $n=5$).

Для вивчення потенційного впливу калікс[4]арену С-956 на спорідненість ензиму до Mg^{2+} було оцінено АТР-гідролазну активність $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР гладеньком'язових клітин аорти щурів за різних концентрацій іонів магнію в умовах дії калікс[4]арену С-956 (концентрація 50 мкМ). Показано зниження ензиматичної активності $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР відносно контролю, водночас зберігається характер залежності ферментативної активності від концентрації MgCl_2 , як у контролі без калікс[4]арену С-956. Тобто дія калікс[4]арену С-956 спричиняє зниження платового рівня активності $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР (рис. 3.3). Також

продемонстровано, що під впливом калікс[4]арену С-956 (50 мкМ), спостерігається незначне зростання коефіцієнту K_{Mg} до $0,36 \pm 0,02$ мМ ($M \pm m$; $n=5$). При цьому величина коефіцієнта Хілла практично не змінюється: $1,00 \pm 0,04$ ($M \pm m$; $n=5$).

Таким чином, спорідненість Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази СР гладеньком'язових клітин аорти щурів до $MgCl_2$ майже не залежить від наявності калікс[4]арену С-956 у середовищі інкубації, що вказує на відсутність конкуренції між $MgCl_2$ та С-956.

3.3.2. Активність Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази саркоплазматичного ретикулуму гладеньком'язових клітин аорти щурів за різних концентрацій АТР за дії калікс[4]арену С-956

На наступному етапі дослідження було показано, що підвищення концентрації АТР у середовищі інкубації в діапазоні від 0,01 до 3 мМ (рис. 3.4, контроль) призводило до збільшення ензиматичної активності Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази СР за умов фіксованої концентрації $MgCl_2$ (3 мМ) в інкубаційному середовищі. Методом Хілла були розраховані уявна константа Міхаеліса K_m та коефіцієнт Хілла $n_{н,АТР}$ для АТР, які становлять $137,1 \pm 5,1$ мкМ і $0,97 \pm 0,01$ для Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази СР ($M \pm m$; $n = 5$).

Надалі було досліджено потенційний вплив калікс[4]арену С-956 на спорідненість ензиму до АТР. Було досліджено АТР-гідролазну активність Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази СР гладеньком'язових клітин аорти щурів за різних концентрацій АТР в умовах дії калікс[4]арену С-956 (концентрація 50 мкМ). Як видно з рис. 3.4, при дії С-956 спостерігається зниження активності Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази СР, при цьому залежність ензиматичної активності від АТР виявляє характер, подібний до відповідної контрольної залежності без калікс[4]арену С-956, але під впливом С-956 відбувається зниження платового рівня активності.

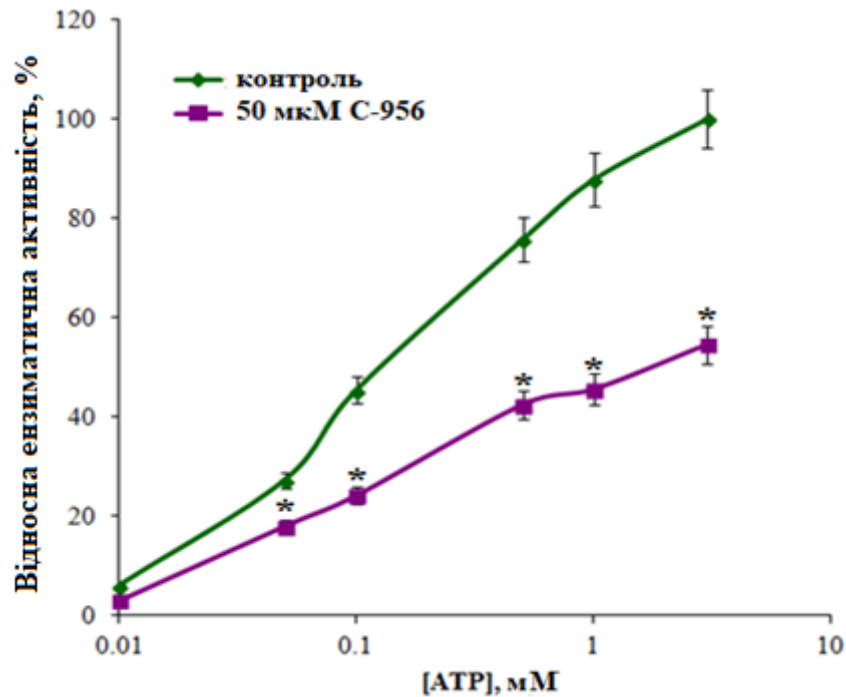


Рис. 3.4. Відносна ензиматична активність $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -АТРази саркоплазматичного ретикулуму гладеньком'язових клітин аорти щурів за різних концентрацій АТФ за дії калікс[4]арену С-956 ($M \pm m$, $n = 5$)

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем

Отже, калікс[4]арен С-956 знижує швидкість ензиматичного гідролізу АТФ $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -АТРазою СР, що свідчить про зменшення числа обертів ензиму за його дії. Також були розраховані уявна константа Міхаеліса K_m та коефіцієнт Хілла $n_{\text{н,АТФ}}$ за наявності калікс[4]арену С-956, які становлять $144,2 \pm 7,5$ мкМ та $0,87 \pm 0,12$ ($M \pm m$; $n = 5$). Отже, каліксарен С-956 не змінює вказані параметри. Таким чином, вплив калікс[4]арену С-956 на $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -АТРазу СР є неконкурентним відносно АТФ і пов'язаний виключно з ефектом на V_{max} .

Отже, спорідненість $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР до АТФ практично не залежить від наявності калікс[4]арену С-956 у середовищі інкубації, що вказує на відсутність конкуренції між АТФ та інгібітором. Тому можна

припустити, що субстратні центри Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази СР і гіпотетичний сайт взаємодії калікс[4]арену С-956 не перекриваються на поверхні ензимів.

Отримані дані вказують на те, що калікс[4]арен С-956 діє на помпу СР за механізмом повного неконкуретного інгібування.

3.4. Концентрація Ca^{2+} у саркоплазмі гладеньком'язових клітин аорти щурів за дії калікс[4]арену С-956

Зважаючи на те, що кальцієва помпа СР відіграє важливу роль у контролі концентрації іонів Ca^{2+} у цитоплазмі гладеньких м'язів, важливо з'ясувати, чи буде впливати калікс[4]арен С-956 на внутрішньоклітинну концентрацію Ca^{2+} у ГМК аорти. Тому у подальших експериментах було досліджено потенційні зміни концентрації Ca^{2+} в ГМК аорти під впливом калікс[4]арену С-956. Для цього було використано метод конфокальної мікроскопії та Ca^{2+} -чутливий зонд fluo-4 АМ, (рис. 3.5).

Було показано, що за дії калікс[4]арену С-956 (20 мкМ) відбувається різке зростання флуоресцентної відповіді Ca^{2+} -чутливого зонду fluo-4 АМ у ГМК аорти (рис. 3.5, А). Протягом 2-х наступних хвилин концентрація Ca^{2+} поступово знижується, що свідчить про залучення компенсаторних механізмів (Ca^{2+} -уніпортер мітохондрій, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник плазматичної мембрани) до релаксації кальцієвого сигналу. Отже, калікс[4]арен С-956 – інгібітор Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази СР – індукує підвищення концентрації Ca^{2+} у ГМК аорти.

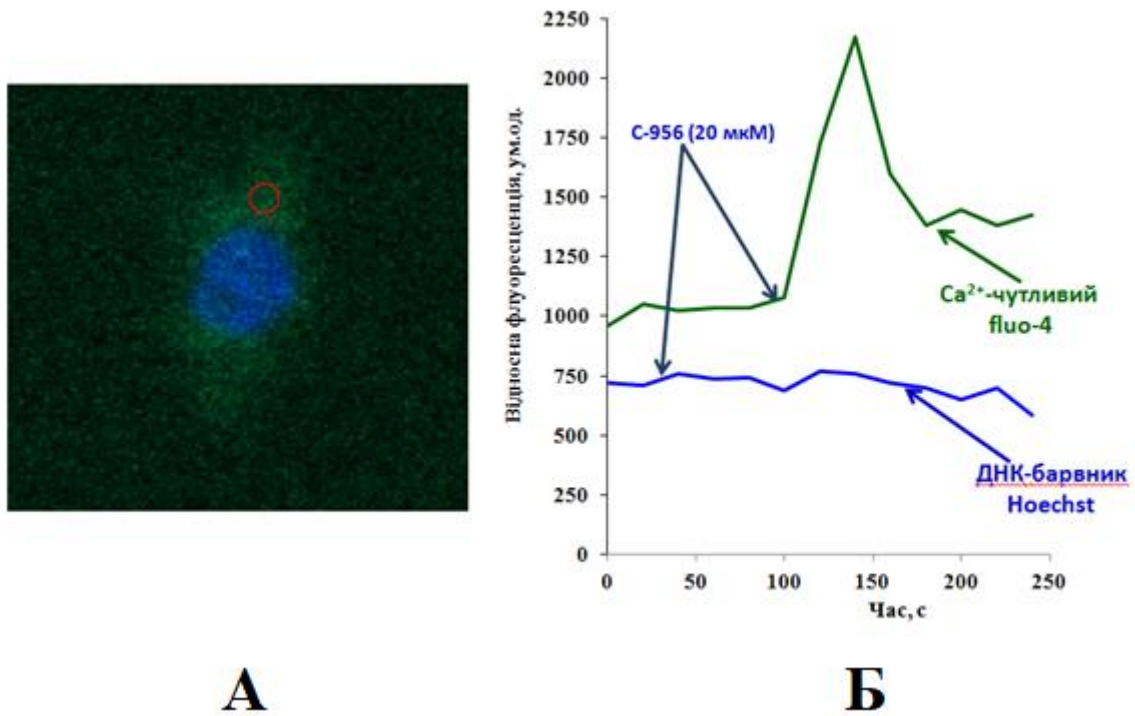


Рис. 3.5. Результати дослідження вмісту кальцію в міоцитах аорти методом скануючої лазерної конфокальної мікроскопії із застосуванням Ca^{2+} -чутливого fluo-4 АМ та ДНК-чутливого Hoechst зондів: А – мікрофотографія, зареєстрована за допомогою конфокальної мікроскопії (Об. \times 40, Ок. \times 10), Б – інтенсивність флуоресцентної відповіді зондів в міоциті (стрілками показано внесення аліквоти розчину калікс[4]арену С-956 (20 мкМ; наведено результати типового експерименту)

При використанні калікс[4]аренової «чаші» С-150 (26,28-дигідрокси-25,27-дипропоксикалікс[4]арен) (10 мкМ), яка за попередніми результатами не мала вираженого впливу на активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази СР, такого підвищення флуоресцентного сигналу fluo-4 АМ не спостерігалось (результати не наведено). Також незмінним лишався рівень флуоресценції Hoechst, який був локалізований в основному в ядрі ГМК, та фону.

3.5. Скоротлива активність кільцевих сегментів грудної аорти щурів за дії калікс[4]арену С-956

Оскільки калікс[4]арен С-956 спричиняв блокування Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази СР, а також суттєво підвищував внутрішньоклітинну концентрацію іонів Ca^{2+} в цитоплазмі ГМК клітин аорти, цікавим було дослідити ефекти цієї сполуки на функціонування аорти в умовах максимально наближених до інтактних – на мультиклітинних препаратах кілець грудної аорти зі збереженим ендотелієм.

Після додавання сполуки С-956 ($10\ \mu\text{M}$) в омиваючий препарати розчин майже одразу спостерігалися тенденції до зниження базального рівня напруження (або у випадку ізотонічного режиму реєстрації – діаметра кілець аорти), на тлі яких з'являлися (або посилювалися) спонтанні коливання (рис. 3.6, 3.7).

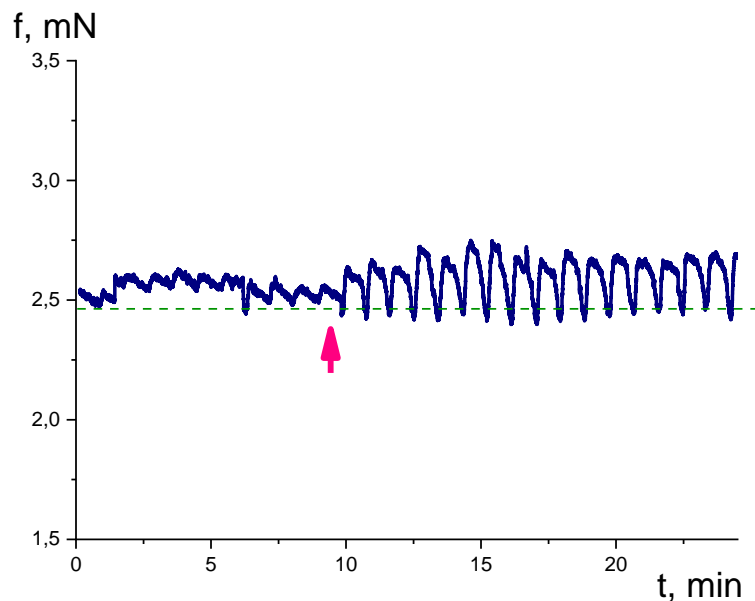


Рис. 3.6. Типова механограма ефекту (за ізометричного режиму реєстрації) аплікування калікс[4]арену С-956 ($10\ \mu\text{M}$) на базальне напруження препарату грудної аорти щурів (стрілкою позначено момент внесення С-956 в розчин, що омиває гладеньком'язові препарати)

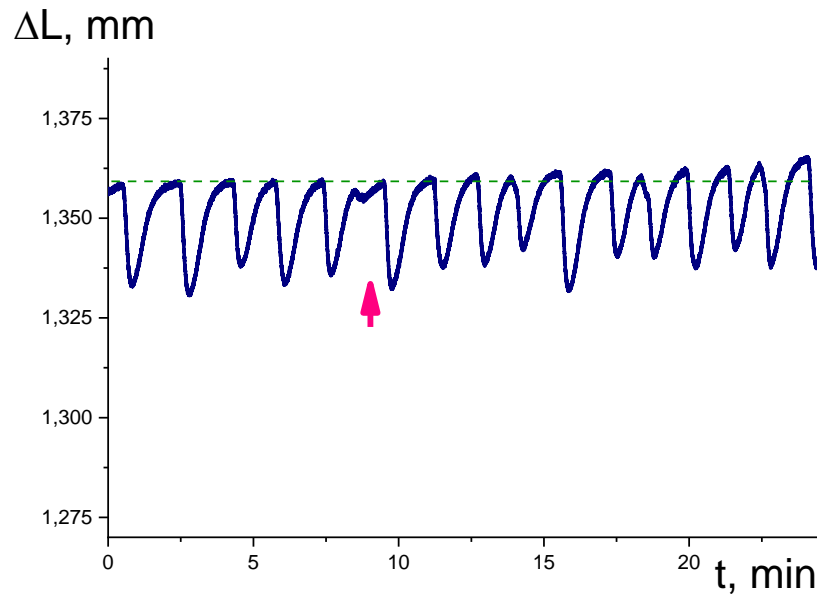


Рис. 3.7. Типова механограма ефекту (за ізотонічного режиму реєстрації) аплікування калікс[4]арену С-956 (10 μM) на діаметр препарату грудної аорти щурів (стрілкою позначено момент внесення С-1220 в розчин, що омиває гладеньком'язові препарати)

Оскільки калікс[4]арен С-956 збільшував амплітудні параметри викликаних за електромеханічним шляхом скорочень аорти, не змінюючи при цьому їхніх кінетичних характеристик, можна передбачити, що за його дії підвищення базальної внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca^{2+} обумовлює активацію хвиль напруження м'язових препаратів та посилення скорочень.

Передбачається, що отримані експериментальні дані, які були одержані з використанням калікс[4]арену С-956 – інгібітора $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР аорти, можуть мати важливе значення для з'ясування мембранних механізмів катіонного обміну у гладеньких м'язах.

ВИСНОВКИ

Показано, що калікс[4]арен С-956 є ефективним інгібітором $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази саркоплазматичного ретикулузму гладеньком'язових клітин міометрію та аорти щурів. Отримані результати обумовлюють перспективність подальшого дослідження цієї сполуки як потенційного фармакологічного агента, спрямованого на регуляцію функцій гладеньких м'язів аорти.

1. З використанням методів ензиматичного та кінетичного аналізу продемонстровано, що калікс[4]арен С-956 у концентрації 100 мкМ чинить найбільш суттєву інгібіторну дію на $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазу активність саркоплазматичного ретикулузму клітин міометрію та аорти щура порівняно з калікс[4]аренами С-90 та С-1087.
2. Встановлено, що калікс[4]арен С-956 ефективно пригнічує активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази саркоплазматичного ретикулузму аорти щура: величина коефіцієнта інгібування $I_{0,5}$ складає $53,2 \pm 1,8$ мкМ, значення коефіцієнта Хілла n_H становить $0,57 \pm 0,04$.
3. Доведено, що калікс[4]арен С-956 діє на $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазу саркоплазматичного ретикулузму аорти щура за механізмом повного неконкурентного інгібування (відносно АТР та іонів Mg^{2+}).
4. За допомогою конфокальної мікроскопії з використанням кальцій-чутливого флуоресцентного зонду fluo-4 АМ встановлено, що аплікація калікс[4]арену С-956 до іммобілізованих міоцитів аорти зумовлює зростання внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca^{2+} .
5. Показано, що калікс[4]арен С-956 активує хвилі напруження, а також збільшує амплітудні параметри викликаних за електромеханічним шляхом скорочень аорти, не змінюючи при цьому їхніх кінетичних характеристик.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Костерін, С., Бабіч, Л., Шликов, С., Данилович, Ю., Векліч, Т. та Мазур, Ю. (2016). *Біохімічні властивості та регуляція Ca^{2+} -транспортувальних систем мембранних структур гладеньком'язевих клітин*. Київ: Наукова Думка.
2. Костерін, С. (1990). *Транспорт кальцію в гладеньких м'язах*. Київ: Наукова Думка.
3. Noble, D. and Herchuelz, A. (2007). Role of Na^{+}/Ca^{2+} exchange and the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in cell function. *EMBO Reports*, 8(3), pp. 228–232.
4. Wray, S. and Shmygol, A. (2007). Role of the calcium store in uterine contractility. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 18, pp. 315–320.
5. Shmygol, A., Eisner, D. and Wray, S. (1999). The role of the sarcoplasmic reticulum as a Ca^{2+} sink in rat uterine smooth muscle cells. *Journal of Physiology*, 520(1), pp. 153–163.
6. Foskett, J., White, C., Cheung, K. and Mak, D. (2007). Inositol trisphosphate receptor Ca^{2+} release channels. *Physiological Reviews*, 87, pp. 593–658.
7. Humphrey, J. (2021). Mechanisms of vascular remodeling in hypertension. *American Journal of Hypertension*, 34(5), pp. 432–441.
8. Zub, P., Kizub, I., Parchenko, V., Zhytniakivska, O. and Taran, I. (2025). Modulation of rat aortic contractions by ultradisperse TiO_2 nanoparticles. *Studia Biologica*, 19(2), pp. 3–22.
9. Melo, B., Rodrigues, S., Lacchini, S. and Michelini, L. (2021). Type 2 diabetes progression affects vascular contractility. *Scientific Reports*, [online] Volume 11, p. 6052. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85606-7> [Accessed 15 Mar. 2021].
10. Agrawal, Y. and Bhatt, H. (2004). Calixarenes and their biomimetic applications. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2(3–4), pp. 237–274.
11. Rodik, R., Boyko, V. and Kalchenko, V. (2016). Calixarenes in biotechnology and biomedical research. *Frontiers in Medicinal Chemistry*, 8, pp. 206–301.

12. Nimse, S. and Kim, T. (2013). Biological applications of functionalized calixarenes. *Chemical Society Reviews*, 42(1), pp. 366–386.
13. Coleman, A., Jebors, S., Cecillon, S., Perret, P., Garin, D., Marti-Battle, D. and Bhatt, H. (2008). Toxicity and biodistribution of para-sulfonato-calix[4]arene. *New Journal of Chemistry*, 32, pp. 780–782.
14. Костерін, С., Кальченко, В., Векліч, Т., Бабіч, Л. та Шликов, С. (2019). *Каліксарени як модулятори АТФ-гідролазних систем гладеньком'язових клітин*. Київ: Наукова думка.
15. Palmgren, M. (2023). P-type ATPases: many more enigmas left to solve. *Journal of Biological Chemistry*, [online] Volume 299, p. 105352. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.105352> [Accessed 18 Dec. 2023].
16. Sim, S. and Park, E. (2023). P5-ATPases: structure, substrate specificities, and transport mechanisms. *Current Opinion in Structural Biology*, [online] Volume 79, p. 102531. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2023.102531> [Accessed 5 Apr. 2023].
17. Periasamy, M. and Kalyanasundaram, A. (2007). SERCA pump isoforms: their role in muscle physiology and pathophysiology. *Muscle & Nerve*, 35(4), pp. 430–442.
18. Zhang, K., Zhu, D. and Grigorieff, N. (2025). DiffPose: Differentiable projection matching for fast pose inference in cryo-EM. *Researchgate*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.22082.85441> [Accessed 3 Feb. 2025].
19. Viskupicova, J. and Espinoza-Fonseca, L. (2025). Allosteric modulation of SERCA pumps. *Journal of Molecular Biology*, [online] Volume 437, p. 169200. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2025.169200> [Accessed 15 Oct. 2025].
20. Xu, H. and Van Remmen, H. (2021). The SarcoEndoplasmic Reticulum Calcium ATPase (SERCA) pump: a potential target for intervention in aging and skeletal muscle pathologies. *Skeletal Muscle*, [online] Volume 11, p. 25. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13395-021-00280-7> [Accessed 12 Nov. 2021].

21. Espinoza-Fonseca, L. (2017). Ca^{2+} -ATPase and proton transport: implications for structural function. *Molecular BioSystems*, 13(4), pp. 633–637.
22. Iaparov, B., Zahradnikova, A., Polakova, E. and Zahradnik, I. (2022). Magnesium ions moderate calcium-Induced calcium release in cardiac calcium release sites by binding to ryanodine receptor activation and inhibition sites. *Frontiers in Physiology*, [online] Volume 12, p. 805956. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.805956> [Accessed 25 Jan. 2022].
23. Akin, B. and Jones, L. (2012). Characterizing phospholamban to sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 2a (SERCA2a) protein binding interactions in human cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles using chemical cross-linking. *Journal of Biological Chemistry*, 287(10), pp. 7582–7593.
24. Autry, J., Thomas, D. and Bharat, T. (2024). Cryo-EM structures of the cardiac SERCA2a pump with phospholamban in three lipid bilayer states. *Science Advances*, 10(25), pp. 821–840.
25. Inesi, G., Tadini-Buoninsegni, F., Mikkelsen, S. and Lewis, D. (2019). Interactions of sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA) with substrate and solutes. *Biophysical Chemistry*, 251, p. 106187.
26. Dai, C. and Khalil, R. (2025). Vascular smooth muscle calcium regulation in hypertension. *Biomolecules*, 15(6), p. 892–914.
27. Yu, Q. and Tian, W. (2025). The role of SERCA in vascular diseases, a potential therapeutic target. *Cell Calcium*, [online] Volume 129, p. 103039. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2025.103039> [Accessed 23 Jul. 2025].
28. Wilson, D. (2011). Vascular smooth muscle structure and function. In: D. Bhatt, ed. *Cardiovascular Intervention*. Philadelphia: Elsevier, pp. 1–15.
29. Garrett, A., Veiseh, M., Bharat, T., Bharat, T., Bharat, T. and Wray, S. (2022). Uterine smooth muscle physiology. *Frontiers in Physiology*, 13, p. 931893.
30. Aguilar, H. and Mitchell, B. (2010). Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility. *Human Reproduction Update*, 16(6), pp. 725–744.

31. Wray, S. and Arrowsmith, S. (2021). Uterine excitability and ion channels and their changes with gestation and hormonal environment. *Annual Review of Physiology*, 83, pp. 331–357.
32. Wray, S., Jones, K. and Kupittayanant, S. (2003). Calcium signaling and uterine contractility. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 10(5), pp. 252–264.
33. Wray, S. and Prendergast, C. (2019). The myometrium: from excitation to contractions and labour. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1124, pp. 233–263.
34. Ferreira, J., Butler, A., Stewart, A., Bharat, T. and Bharat, T. (2019). Oxytocin regulation of myometrial excitability. *Journal of Physiology*, 597(8), pp. 2161–2181.
35. Putney, J. (2018). Store-operated calcium entry: an historical overview. *Advances in Biological Regulation*, 68, pp. 88–96.
36. Zangeneh, F. and Hantoushzadeh, S. (2023). The physiological basis with uterine myometrium contractions from electro-mechanical/hormonal myofibril function to the term and preterm labor. *Heliyon*, [online] Volume 9(11), e22259. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e22259> [Accessed 19 Nov. 2023].
37. Hu, Y., Davison, F., Zhang, Z. and Xu, Q. (2023). Smooth muscle heterogeneity and plasticity in health and aortic aneurysmal disease. *International Journal of Molecular Sciences*, [online] Volume 24, p. 11701. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms241411701> [Accessed 20 Jul. 2023].
38. Qian, G., Xin, Z., Xin, Z. and Xin, Z. (2022). Abdominal aortic aneurysm formation with a focus on vascular smooth muscle cells. *Life*, [online] Volume 12(2), p. 191. Available at: <https://doi.org/10.3390/life12020191> [Accessed 25 Jan. 2022].
39. Shi, D., Li, Y., Zhou, L. and Wang, D. (2025). The pathophysiological role of vascular smooth muscle cells in abdominal aortic aneurysm. *Cells*, [online]

Volume 14(13), p. 1009. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells14131009> [Accessed 2 Jul. 2025].

40. Pohl, U. (2020). Connexins: key players in the control of vascular plasticity and function. *Physiological Reviews*, 100(2), pp. 525–572.
41. Liu, J., Wang, Y., Pan, Q. and Su, Y. (2023). Cell adhesion molecules: overview and implications in lung diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), p. 70–98.
42. Touyz, R., Alves-Lopes, R., Rios, F., Camargo, L., Anagnostopoulou, A., Arner, A. and Montezano, A. (2018). Vascular smooth muscle contraction in hypertension. *Cardiovascular Research*, 114(4), pp. 529–539.
43. Feng, X., Bhatt, D. and Bhatt, D. (2019). Vascular stiffness mechanisms in aging. *Molecular Nutrition & Food Research*, 63(21), 220–242.
44. De Juan-Sanz, J., Nunez, E., Zafra, F., Berrocal, M., Cordoba, J. and Aragon, C. (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). *Journal of Biological Chemistry*, 289(49), pp. 34308–34324.
45. Shkrabak, O., Veklich, T., Kosterin, S. and Babich, L. (2022). Inhibition of Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase of smooth muscle sarcoplasmic reticulum by calix[4]arene C-956. *Ukrainian Biochemical Journal*, 94(4), pp. 18–35.
46. Amedee, T., Renaud, J., Bhatt, D. and Bhatt, D. (1986). Isolation and culture of smooth muscle cells from rat myometrium. *British Journal of Pharmacology*, 88(4), pp. 873–880.
47. Missiaen, L., De Smedt, H., Droogmans, G. and Casteels, R. (1991). Ca^{2+} release induced by inositol 1,4,5-trisphosphate is a steady-state phenomenon controlled by luminal Ca^{2+} in permeabilized cells. *Nature*, 357(6379), pp. 599–602.
48. Burdyga, T. and Kosterin, S. (1991). Kinetic analysis of smooth muscle relaxation. *General Physiology and Biophysics*, 10(6), pp. 589–598.
49. Veklich, T., Shkrabak, O., Rodik, R., Kalchenko, V. and Kosterin, S. (2023). Thiocalix[4]arene C-1087 as an inhibitor of Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase of uterine smooth muscle. *Ukrainian Biochemical Journal*, 95(6), pp. 5–20.

50. Tsymbaluk, O., Veklich, T., Shkrabak, O., Rodik, R., Kalchenko, V. and Kosterin, S. (2024). Calix[4]arene C-956 as a modulator of Ca²⁺ transport in smooth muscle cells. *Studia Biologica*, 18(3), pp. 3–24.