

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

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології
та біоінформатики

к.б.н, доц. О.Ю. Нипорко

Протокол № ____ засідання кафедри

від “ ____ ” _____ 2023 р

**ТІАКАЛІКС[4]АРЕН С-1087 ЯК ІНГІБІТОР КАЛЬЦІЄВОЇ ПОМПИ
ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ ТА МОДУЛЯТОР КОНЦЕНТРАЦІЇ
КАЛЬЦІЮ В ГЛАДЕНЬКОМ’ЯЗОВИХ КЛІТИНАХ**

Випускна кваліфікаційна робота магістра
студентки спеціальності 091 Біологія
ОП «Біоінформатика і структурна біологія»

Гольден Олександр Віталіївни

Науковий керівник від кафедри
професор кафедри молекулярної
біотехнології та біоінформатики, доктор
біологічних наук **Цимбалюк О.В.**

Робота виконана у відділі біохімії м’язів
Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України
під керівництвом д.б.н. **Т.О. Векліч**

Оцінка захисту роботи

Київ – 2023 р.

АНОТАЦІЯ

Гольден О.В. Тіакалікс[4]арен С-1087 як інгібітор кальцієвої помпи плазматичної мембрани та модулятор концентрації кальцію в гладеньком'язових клітинах. – Випускна кваліфікаційна робота магістра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Біоінформатика і структурна біологія».

У роботі досліджено вплив супрамолекулярної сполуки тіакалікс[4]арену С-1087 на активність Mg^{2+} , АТР-залежної кальцієвої помпи плазматичної мембрани, а також його дію гоместаз вільного кальцію в гладеньком'язових клітинах матки. Було встановлено, що тіакалікс[4]арен С-1087 є високоафінним та селективним інгібітором транспортної Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази, що спричиняє ріст внутрішньоклітинної концентрації іонів Са та провокує зменшення ефективного гідродинамічного діаметра міоцитів, запускаючи процес скорочення. Також було здійснене комп'ютерне моделювання взаємодії досліджуваної сполуки з Ca^{2+} -помпою, яке засвідчує наявність декількох енергетично вигідних сайтів зв'язування ліганду з ензимом, що відповідало результатам експериментальних досліджень.

Одержані результати можуть бути підставою для створення нових фармакологічних препаратів на основі тіакалікс[4]арену С-1087, дія яких буде спрямована на модифікацію скоротливої активності міометрія у випадку його патологічних станів, або для синтезу нових макроциклічних сполук з покращеною інгібуючою здатністю.

Ключові слова: гладеньком'язові клітини, Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза, калікс[4]арени, міометрій, плазматична мембрана.

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. Огляд літератури	7
1.1.Механізми транспорту іонів Са в мембранних структурах гладеньком'язових клітин	7
1.2.Структурна організація та молекулярна біологія Са ²⁺ ,Mg ²⁺ -АТРаз плазматичної мембрани.....	8
1.3.Функціональна роль Са ²⁺ , Mg ²⁺ -АТРазі.....	10
1.4.Особливості локалізації Са ²⁺ -помпи у клітинах	12
1.5.Загальна характеристика каліксаренів та їх застосування у медико-біологічних дослідженнях.....	14
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи дослідження	20
2.1.Матеріали.....	20
2.2.Виділення фракцій плазматичних мембран клітин міометрія	21
2.3.Визначення ензиматичних активностей.....	22
2.4.Виділення ГМК міометрія	24
2.5.Визначення змін концентрації вільного Са ²⁺ в ГМК з використанням методу конфокальної мікроскопії	25
2.6.Метод лазерно-кореляційної спектроскопії	26
2.7.Комп'ютерне моделювання взаємодії тіакалікс[4]арену С-1087 та Са ²⁺ ,Mg ²⁺ -АТРазі ПМ	27
2.8.Статистична обробка результатів.....	28
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення	29
3.1.Визначення дії тіакалікс[4]арену С-1087 на Са ²⁺ ,Mg ²⁺ -АТР-гідролазну активність плазматичної мембрани клітин матки	29
3.2.Дослідження впливу тіакалікс[4]арену С-1087 на концентрацію Са ²⁺ в ГМК матки.....	31
3.3.Вплив тіакалікс[4]арену С-1087 на ефективний гідродинамічний діаметр ГМК	33

3.4.Комп'ютерне моделювання взаємодії тіакалік[4]сарену С-1087 з Ca ²⁺ ,Mg ²⁺ -АТРазою ПМ	35
ВИСНОВКИ	39
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	40

ВСТУП

Безсумнівно, що іони Ca є важливим елементом для підтримки нормальної функціональної активності абсолютно всіх тканин і органів. Втім, регуляція зміни концентрації Ca^{2+} є критично важливою для клітин гладеньких м'язів, адже контролює життєво важливі функції скорочення – розслаблення гладеньком'язових клітин (ГМК) [1-4].

Враховуючи те, що концентрація іонів кальцію в позаклітинному середовищі у 10^4 разів перевищує концентрацію Ca^{2+} цитоплазмі ГМК, під час процесу скорочення саме позаклітинний простір слугує головним джерелом надходження даних іонів у міоцит. У процесі релаксації ГМК вирішальне значення у видаленні іонів Ca з цитозолу виконує саме Mg^{2+} , АТР-залежна кальцієва помпа плазматичної мембрани (ПМ), яка транспортує один іон кальцію з клітини за один каталітичний акт. При цьому викид Ca^{2+} відбувається проти градієнта концентрації, що розділяє зовнішнє і внутрішнє середовище клітини [5-7]. І саме висока афінність даного ензиму до Ca^{2+} ($K_{\text{Ca}^{2+}} = 0,3-0,5 \text{ мкМ}$) дозволяє досягти високої точності у регуляції внутрішньоклітинної концентрації вказаних іонів.

Наразі відомо, що існує велика кількість патологічних станів, пов'язаних з порушенням процесів скорочення – розслаблення ГМ, зокрема міометрія. Сюди належать викидні, слабкість пологової діяльності, гіпо- та гіпертонус матки, післяпологова кровотеча тощо [8-10]. Таким чином, спираючись на важливу регуляторну роль Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази ПМ у клітинах, регулювання та модифікація її активності мали б значну користь у дослідженні та подальшому лікуванні вказаних патологій.

З огляду на вищезазначене, пошук ефекторів, які були б нетоксичними і здатними оборотно та селективно змінювати функціональну активність помпи, є актуальним, оскільки міг би знайти застосування як у сфері фундаментальних досліджень, так і у сфері прикладних досліджень для створення нових ефективних лікарських засобів.

Тому, *метою* даної роботи було з'ясувати закономірності впливу тіакалікс[4]арену С-1087 на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазну активність плазматичної мембрани та гомеостаз іонів Са у міоцитах матки.

Згідно з метою було поставлено наступні *завдання*:

1. Дослідити селективність дії тіакалікс[4]арену С-1087 шляхом визначення питомих ензиматичних активностей Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази, Na^+ , K^+ -АТРази, Mg^{2+} -АТРази та Ca^{2+} -АТРази ПМ, а також визначити кінетичні параметри (коефіцієнт інгібування, коефіцієнт Хілла).
2. Вивчити вплив тіакалікс[4]арену С-1087 на внутрішньоклітинну концентрацію вільного кальцію.
3. Проаналізувати вплив тіакалікс[4]арену С-1087 на ефективний гідродинамічний діаметр клітин міометрія.
4. Провести молекулярний докінг взаємодії тіакалік[4]сарену С-1087 з Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазою ПМ клітин міометрія.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Механізми транспорту іонів Са в мембранних структурах гладеньком'язових клітин

Іони Са є життєво важливими для регуляції і здійснення більшості клітинних процесів та явищ, виступаючи вторинними месенджерами і реалізуючи такі основоположні функції, як ріст клітини, апоптоз, запліднення, нейротрансмісія тощо. Флуктуації концентрації даних іонів у ГМК є критично значущими і для регуляції процесів збудження та розслаблення гладеньких м'язів (ГМ), а особливо ГМ матки. Концентрація Ca^{2+} в ГМК в стані спокою складає $\sim 0,1$ мкМ, в той час як поза клітиною дане значення становить ~ 1 мМ.

Під час впливу на клітину певних гормонів або фармакологічних препаратів відбувається збудження, що результує у стрімкому рості концентрації кальцію на кілька сотень нМ, іноді до 1 мкМ [11]. Даний процес відбувається завдяки роботі кальцієвих каналів ПМ та внутрішньоклітинного кальцієвого депо – ендо(сарко)плазматичного ретикулума (СР). Таким чином, при стимулюванні збільшення концентрації вільного Ca^{2+} у цитоплазмі, головну роль виконують мембранні системи пасивного транспорту, а процес розслаблення здійснюють системи активного транспорту, як-от $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза ПМ та СР, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник, а також Ca^{2+} -уніпортер в мітохондріях [12–15]. Перші дві системи відкачки контролюють сталість концентрації Ca^{2+} у стані спокою клітини, в той час як $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник регулює вихід основного пулу іонів Са, будучи ключовим гравцем за його високих концентрацій [16]. Така різниця у функціональній активності спостерігається через різну афінність ензимів до Ca^{2+} , а також через різну швидкість реакції. Mg^{2+} , АТР-залежна кальцієва помпа ПМ і СР є високоафінною щодо іонів Са ($K_{\text{Ca}} \approx 0,2$ мкМ), але має низьку швидкість реакції, порівняно з $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -

обмінником, який має невелику спорідненість до Ca^{2+} ($K_{\text{Ca}} = 1 \text{ мкМ}$), але більшу швидкість [16-18]. Відсоткове співвідношення у сприянні викиду іонів Ca в позаклітинне середовище сильно обумовлене типом ГМК. Наприклад, у ГМ матки, на відміну від інших ГМ, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обміннику належить $\sim 30\%$ транспортованого кальцію, тоді як $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази – близько 70% [5].

1.2. Структурна організація та молекулярна біологія $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани

Mg^{2+} , АТР-залежна кальцієва помпа ПМ відноситься до родини транспортерів Р-типу, як й інші іонні насоси [15]. Дані ензими характеризуються утворенням фосфорильованого інтермедіату, що результує у формуванні ацилфосфату, який і забезпечує ензим енергією, достатньою для перекачки одного іону Ca проти градієнта концентрації. Ca^{2+} -помпа складається з десяти α -спіралей, що перетинають мембрану, а N- та C-хвости розміщені в цитозолі, причому більша частина білку виступає всередину клітини (рис. 1.1). Характерною є наявність двох великих петель з боку цитоплазми, які умовно ділять помпу на три ділянки [13]. Перша невелика цитозольна петля сполучає другу і третю трансмембранні α -спіралі, формуючи тим самим А-домен (активаторний домен), завданням якого є сполучення переносу одного іону Ca з гідролізом однієї молекули АТР. Друга велика петля, розміщена між четвертою і п'ятою спіралями, утворює N-домен (сайт приєднання нуклеотиду) та Р-домен (сайт утворення аспартилфосфату). Головною відмінністю $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ від інших АТРаз є достатньо великий С-кінець (60-200 залишків), який виконує функції регуляції активності Ca^{2+} -помпи, маючи сайт приєднання кальмодуліну [13, 19, 20]. Коли помпа є неактивною, сайт зв'язування кальмодуліну безпосередньо взаємодіє з А- і N-доменами, інгібуючи її. Коли концентрація кальцію в цитоплазмі зростає, утворюються комплекси Ca^{2+} -кальмодулін, які і витісняють даний сайт з активаторного домену помпи.

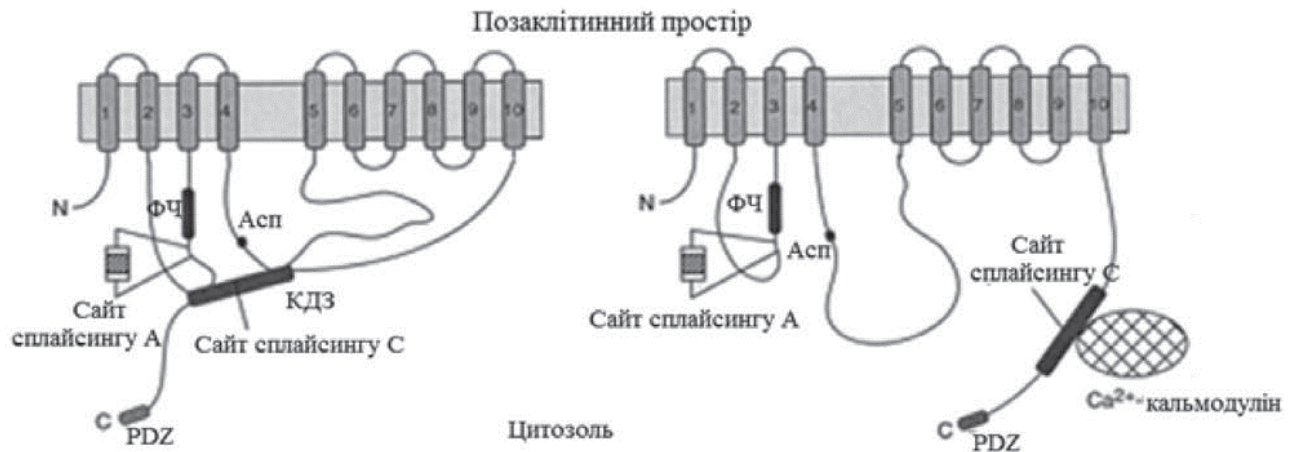


Рис. 1.1 – Схематичне зображення структурної організації $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ (адаптовано з [20]): КЗД – кальмодулінзв'язуючий домен, ФЧ – сайт, чутливий до фосфоліпідів, Асп – ділянка утворення аспартату, PDZ – сайт зв'язування postsynaptic density protein.

Існує кілька різних ізоформ $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ, що кодуються наступними чотирма генами: Ca^{2+} -помпа ПМ 1 (12 хромосома, локус q21-q23), ізоформа 2 (хромосома 3, локус p26-p25), $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ 3 (X хромосома, локус q28) і ізоформа 4 помпи (хромосома 1, локус q25-q28) [21-24]. Кожен з генів демонструє складну екзон-інтронну картину, що включає значну кількість альтернативно сплайсованих екзонів. Таким чином, внаслідок альтернативного сплайсингу, що відбувається в трьох областях, може бути отримано більш як 30 різних варіантів сплайсингу ізоформ помпи. Поліпептиди складаються приблизно з 1100-1200 амінокислот, молекулярна маса становить ~ 130 кДа [20, 25, 26]. Ступінь схожості ізоформ складає близько 80%, при цьому подібність N- та С-хвостів є невеликою.

Наявність великої кількості ізоформ і сплайс-варіантів $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ викликає питання щодо функціональної значимості такого різномайття. Дослідження на рівні мРНК і білку демонструють, що ізоформа 1 експресується абсолютно у всіх тканинах, через що її називають Ca^{2+} -помпою “домашнього господарства”, хоча її сплайс-варіанти експресуються в певних типах клітин, як-от швидких м'язах чи специфічних нейронах [27]. Ізоформа

4 помпи теж присутня у більшості тканин дорослої людини, а її варіанти виявляють у еритроцитах, серці та ГМ [28]. На відміну від згаданих вище, ізоформи 2 і 3 мають значно більш обмежене розподілення в тканинах, втім яскраво виражено вони експресуються у певних частинах мозку та скелетних м'язах. Важливо, що навіть в межах однієї тканини чи типу клітин, декілька варіантів $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ експресуються одночасно, але на різних рівнях і з різною субклітинною локалізацією. Це особливо помітно у сильно поляризованих клітинах, наприклад у клітинах фоторецепторів сітківки ока [29].

Сплайс-варіанти ізоформ $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ, що різняться по довжині та складу амінокислотних залишків С-кінця, зазначають літерами а і б. В цьому випадку особливо важливою є їх різниця в афінності до кальмодуліну, а також відмінність по кінетиці активації/інактивації кальмодуліном [15, 18]. Ця особливість значною мірою відповідає за те, що існують “швидкі” і “повільні” ізоформи помпи, а також за те, що називають “ефектом пам'яті” $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази. Це концепція, згідно з якою ізоформи з низькою швидкістю дисоціації кальмодуліну швидше реагують на послідовні викиди Ca^{2+} після початкового кальцієвого транзйенту, оскільки кальмодулін залишається сполученим з помпою під час періодичного зниження $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в клітині. Як наслідок, різні сплайс-варіанти мають неоднакову “пам'ять” про попередню активацію, що результує у відмінностях в тому, як вони справляються з різними кальцієвими навантаженнями [30,31].

1.3. Функціональна роль $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази

Висока афінність Mg^{2+} , АТР-залежної кальцієвої помпи ПМ до іонів Са робить її ідеальною системою для підтримки рівня вільного цитозольного кальцію $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Втім, на сьогодні не зафіксовано афінних і водночас селективних низькомолекулярних інгібіторів Ca^{2+} -помпи, що ставить певні межі у з'ясуванні її фізіологічних та патофізіологічних функцій. Через це

більшість досліджень з визначення даного аспекту були проведені на генно модифікованих організмах [32-34]. Так, миші з нокаутованим геном Ca^{2+} -помпи 1 помирають ще під час раннього ембріонального розвитку. Нокаут гену другої ізоформи, а також його спонтанні мутації, призводять до виникнення глухоти та атаксії. Делеція Ca^{2+} -помпи 4 викликає погіршення руху сперматозоїдів і подальше безпліддя, а також зміни функціональності тромбоцитів, зокрема їх агрегацію [35]. У ГМ матки за $\sim 70\%$ виведеного кальцію відповідає саме четверта ізоформа помпи, а ось в сечовому міхурі це значення складає близько 30% для всіх ізоформ. Цікаво, що нульові мутанти по ізоформі 4 помпи не проявляли летальних випадків, не дивлячись на те, що ця ізоформа є найпоширенішою в ГМК [36-38].

Втім, помилково вважати, що $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза ПМ виконує лише функцію підтримки кальцієвого гомеостазу на базальному рівні. Насправді, вона виконує в клітині велику сукупність не менш значущих функцій [33, 39, 40]:

1) Активність помпи супроводжується антипортом протонів, що може призвести до підкислення рН всередині клітини. Це в свою чергу, сприяє ще більшій релаксації ГМ, адже зменшує активність кальцієвих каналів L-типу, а також призводить до змін у спорідненості Ca^{2+} -залежних білків до іонів Са. Крім цього, зниження рН також чинить вплив на функціональну активність рН-залежних ензимів;

2) Уповільнення функціонування помпи призводить до збільшення ефективності поновлення пулу вільного Ca^{2+} у кальцієвих депо – СР та мітохондріях;

3) Під час функціональної активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ можливе сприяння стимуляції активності і Ca^{2+} -помпи СР, адже її сприятливий рівень рН складає 6,8;

4) Існують дані щодо можливого зв'язку рівнів експресії даного ензиму з ростом ГМК. Так, підвищення експресії $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ спричинює гальмування росту клітини, а зниження її активності викликає зміни у

проліферації клітин судин, що може бути корисним для встановлення етіології захворювань серцево-судинної системи;

5) Значущим є не лише контроль цитоплазматичного Ca^{2+} , але і примембранна регуляція концентрації згаданих іонів, що є важливим для таких базових функцій, як скорочення, проліферація, секреція гормонів та нейротрансмітерів тощо;

6) Також цікавою є гіпотеза щодо зв'язку пригніченої активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ з процесами старіння клітини.

Згідно з вищезазначеним, функціональна роль Ca^{2+} -помпи ПМ не обмежується лише регуляцією відносно низьких внутрішньоклітинних концентрацій Ca^{2+} в ГМК у стані спокою. Більш того, різні ізоформи і варіанти сплайсингу можуть виконувати кардинально різні функції у клітинах. У ГМК експресуються в більшій мірі Ca^{2+} -помпи 1 та 4, тоді як інші дві ізоформи переважають у мозочку, молочних залозах, завитку внутрішнього вуха тощо [41].

На жаль, основна частина досліджень з визначення функціональної ролі $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ виконувалась на генетично модифікованих організмах, що сильно нівелює чистоту і якість отриманих результатів. З огляду на це, проблема пошуку селективних ефекторів помпи, які разом з тим були б оборотними, нетоксичними і афінними, є нагальною в контексті сучасних біохімічних досліджень, адже це значно поглибило б сучасні уявлення про роль $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ.

1.4. Особливості локалізації Ca^{2+} -помпи у клітинах

Відсоток, який припадає на кальцієву помпу ПМ відносно всіх мембранозв'язаних білків не є високим – 0,1% [42]. Втім, локалізація $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази у специфічних інвагінаціях ПМ – кавеолах – була встановлена багатьма дослідженнями [43, 44]. Вони є підкласом ліпідних рафт діаметром ~70 нм, що включають маркерний білок кавеолін і багаті на холестерол,

сфінголіпіди та фосфатидилсерин, а також не піддаються впливу розчинників. Велика кількість життєво важливих для клітини білків ПМ концентруються саме в кавеолах, що дозволяє припустити істотне значення саме такого їх розміщення у виконанні належної їм функції. Існує припущення, що кавеоли функціонують як платформи, які беруть участь в латеральному упорядкуванні певних білків під час їх переміщення в клітині, а також під час процесів передачі сигналу. Разом з тим, концентрація Ca^{2+} -помпи в даних інвагінаціях ПМ орієнтовно у 20 разів перевищує її вміст в інших регіонах плазмалемі. Оскільки сполуки, на які багаті кавеоли, в теорії мають чинити стимуляторний вплив на активність помпи, наприклад в експериментах на культурі клітин було показано активаторну дію фосфатидилсерину на ензиматичну активність, в дослідях *in vitro* це не підтвердилось: активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази падала зі зменшенням рухливості мембрани, що вказує на гальмівну дію кавеолярного оточення щодо помпи [43]. Таке розміщення помпи у мембрані має і певну функціональну значимість, адже кавеоли просторово пов'язані і з мембраною CP, збільшуючи обумовлений ним вихід іонів Ca, а також мають велику кількість інших рецепторів, транспортерних білків (NO-синтаза, протеїнкінази), що беруть участь у процесах кальцій-опосередкованої передачі сигналу [45, 46]. Таким чином, кавеоли здатні виступати вихідними пунктами утворення кальцієвих хвиль, відіграючи значну роль в сигнальних каскадах клітини [33].

Одним з імовірних варіантів регуляції $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ може бути її близьке кавеолярне розташування з фосфоліпазою C. Даний механізм полягає у зниженні пулу кислих фосфоліпідів шляхом гідролізу PIP_2 фосфоліпазою. А кислі фосфоліпіди, як відомо, чинять активаторний ефект на активність Ca^{2+} -помпи [33, 43].

Втім, переважна більшість молекул $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ після екстракції спостерігається саме у детергент-диспергованій фракції, в той час коли кавеоли виявляють у несолюбілізованій в розчиннику фракції [13, 21]. Локальне просторове розміщення Ca^{2+} -помпи в плазмалемі певним чином

координується впливом на її PDZ-домен білків MAGUK (мембран-асоційованої гуанілат кінази) та PISP. Наведені білки здатні з різним афінитетом зв'язуватись з PDZ-доменом $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази 2b і 4b у ГМ [47]. Взаємовплив помпи і білків MAGUK [48, 49], NHERF2 (регуляторний фактор-2 Na^+/H^+ -обмінника) [50] або PISP [51] результує у можливості контролю просторової орієнтації і локалізації необхідних сплайс-варіантів помпи у відповідних місцях ПМ або цитоскелету, що забезпечить потрібні властивості кальцієвого сигналу [52].

Отже, вивчення особливостей структурної організації, молекулярної біології та функціональних властивостей транспортної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ знаходиться у фокусі численних досліджень протягом тривалого періоду. І всі результати збігаються в одному: Ca^{2+} -помпа $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза ПМ здійснює всебічні та різноманітні завдання і функції в клітинах гладеньких м'язів. Сюди належать як звичайний контроль концентрації іонів Ca в клітині, так і регуляція життєво важливих процесів ГМК, як-от клітинний ріст чи апоптоз. Тому, спираючись на критичну роль Mg^{2+} , АТР-залежної кальцієвої помпи ПМ у функціонуванні ГМ, а особливо ГМ матки, вагомою є важливість дослідження відхилень її функціонування при різноманітних патологічних станах міометрія. З огляду на цю проблематику, перспективним був би пошук і розробка таких сполук, які давали б змогу змінювати активність транспортної Ca^{2+} -помпи з високою спорідненістю та селективністю дії.

1.5. Загальна характеристика каліксаренів та їх застосування у медико-біологічних дослідженнях

Останнім часом все більшої популярності серед дослідників набувають каліксарени – супрамолекулярні чашоподібні сполуки, які отримують конденсацією паразаміщених фенолів та формальдегіду за одночасної дії кислот чи лугів [53-57]. Слово “калікс” означає з грецької чашу-кубок, а закінчення “арен” вказує на присутність ароматичних кілець в структурі

каліксарену (рис. 1.2). Важливо, що вони можуть формувати стійкі комплекси “господар-гість” з катіонами і аніонами металів, а також з нейтральними, органічними та біомолекулами. Будучи конформаційно лабільними, вони здатні пристосовуватись для утворення більш енергетично вигідних зв’язків зі своїм оточенням, що також дозволяє їм розрізняти подібні за властивостями сполуки.

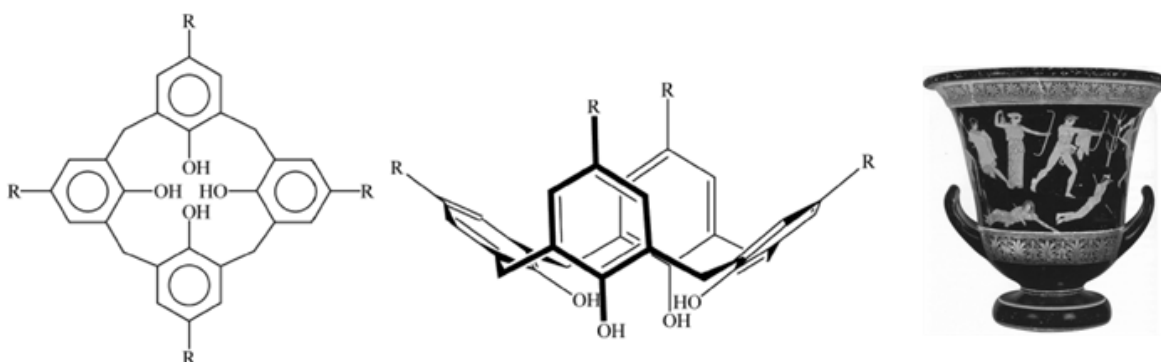


Рис. 1.2 – Схематичне зображення дво- і тривимірної структури каліксарену та грецька чаша-кубок.

Такі унікальні властивості зумовлені структурою каліксаренів: вона включає так звану “каліксаренову чашу” (центральні ароматичні залишки) та умовно верхній (широкий) і нижній (вузький) вінці. І саме хімічна природа замісників на цих вінцях буде детермінувати властивості новосинтезованої сполуки. Таким чином, всі складові частини молекули каліксарену формують гідрофобну порожнину, яка може зв’язувати інші низькомолекулярні сполуки чи іони [61].

Втім, найцікавішою є ширина спектру їх біологічної активності: чимало результатів досліджень підтверджують їх можливе застосування в якості ефекторів (активаторів та інгібіторів) ензимів, імітаторів рецепторів, регуляторів транспортних білків, а також як потенційних лікарських препаратів, що можуть виявляти протипухлинні, антитромботичні, протитуберкульозні ефекти тощо [56-60].

Незважаючи на те, що сьогодні існує багато прикладів використання каліксаренів в якості платформи для створення рецепторів, їх роль в якості

потенційних ефекторів наразі ще недосконало вивчена. І проблема полягає не у відсутності результатів, що дані сполуки чинять інгібуючу/активууючу дію, а у не до кінця з'ясованому механізмі такої дії. Здебільшого ефекторну дію на ензими показують представники калікс[4]аренів та калікс[6]аренів [62].

В якості прикладу рецептору на основі каліксарену можна навести цитохром С-чутливий рецептор з 4 поліпептидних петель, які були синтезовані на каліксареновій платформі. Крім того, відоме застосування гадоліній-каліксаренового комплексу в якості контрастної речовини у МРТ. Принцип дії полягає у зв'язуванні комплексу з альбумінами крові завдяки гідрофобності аренових кілець та координації з іонами металів. Також нещодавно було синтезовано рецептор на основі калікс[8]арену, що має змогу впізнавати ключові амінокислотні залишки на поверхні триптази [63]. Доведено, що каліксарени можуть чинити інгібіторний вплив на деякі ферменти, як-от хімотрипсин, лужну фосфатазу, холінестеразу, лізиноксидазу тощо. В літературі описані каліксарени – інгібітори фосфатази: завдяки їх високій спорідненості до катіонів металів, відбувається перешкоджання доступу субстрату (Zn^{2+}) до ферменту [64]. А за інгібування активності L-лізиноксидази одним з представників калікс[6]аренів був створений патент на метод заживлення шкірного покриву, оскільки даний білок створює зв'язки між молекулами міжклітинного простору, що є важливим чинником під час фібролітичних захворювань [65]. Значних перспектив було досягнуто в галузі створення біоміметичних пептидів на каліксареновій основі, де вони імітують структурні і функціональні характеристики деяких областей на поверхні білків [66]. А ось представники сульфокалікс[6]аренів можуть виступати в якості синтетичних ферментів, каталізуючи гідратацію 1,3-дигідронікотинамідів (аналогів NADPH). Участь в цій реакції приймають негативно заряджені сульфогрупи верхнього вінця та донорні ОН-групи нижнього вінця макроциклу. Швидкість реакції при цьому збільшується в 500-1200 разів [67]. Також методом лазерного фотолізу було продемонстровано, що гідрофільний калікс[4]арен-тетрасульфонат здатний то гідролізу АТР [68].

Втім, важливою властивістю каліксаренів є їх мембранотропна функція, яка можлива завдяки гідрофобному складнику хімії каліксаренів. Така інкорпорація у плазмалемі і її перетин залежить насамперед від замісників на вінцях [69]. Ця особливість дозволяє, зокрема, транспортувати крізь ПМ різноманітні сполуки. Так, третбутилкалікс[4]арен здатен переносити іони натрію крізь штучну ПМ, хоч це відбувається втричі повільніше порівняно з клітинним іонофором моненсином [70]. Крім того, була описана здатність тетраметоксикаліксарену, подібно до білка аквапорину, транспортувати молекули води крізь ПМ [71]. На сьогоднішній день охарактеризовано та запатентовано застосування каліксаренів в якості сполук з фунгіцидною, противірусною та бактерицидною дією. Представники пептидокаліксаренів проявляють антибактеріальну дію щодо пеніцилін-резистентних та пеніцилін-чутливих грам позитивних бактерій, не впливаючи при цьому на грамнегативні. Такий ефект схожий на дію антибіотика ванкоміцину, що зв'язується з глікопротеїдами клітинної стінки бактерій і перешкоджає її росту [72].

Щодо впливу каліксаренів на ензиматичні активності транспортних АТРаз, було проведено чимало досліджень на цю тему. Яскраві приклади таких ефектів описані в роботі С.В. Комісаренка (2013), зокрема гальмівний вплив калікс[4]арену С-97 із одиничною метилен-бісфосфоною групою на верхньому вінці каліксаренової чаші на ензиматичну активність субфрагменту-1 міозину ГМ матки, при цьому величина $I_{0,5} = 80$ мкМ. Також цікавими є результати впливу калікс[4]арену С-192 із 4 метилен-бісфосфоновими групами на верхньому вінці чаші на процеси полімерації фібрину [73]. Можна висунути припущення, що така значуща роль метилен-бісфосфонових груп в даному інгібіторному впливі калікс[4]аренів пояснюється схожістю їх структури зі структурами обумовлена їх структурною подібністю до PP_i та фосфату, що з'являється в результаті гідролізу АТР субфрагментом міозину. Проте калікс[4]арен С-97 чинить також гальмівну дію на Na^+, K^+ -АТразу ПМ, а її спорідненість до даної сполуки

на кілька порядків випереджає субфрагмент-1 міозину. З використанням методу лазерно-кореляційної спектрометрії було виявлено збільшення гідродинамічного діаметра субфрагмента міозину за впливу 50 мкМ калікс[4]арену C-97, що може свідчити на користь утворення комплексу міозин-калікс[4]арен. Молекулярне моделювання підтвердило це припущення і показало, що в утворенні комплексу головним чином беруть участь гідрофобні та електростатичні взаємодії.

Перспективними є наукові результати щодо ролі каліксаренів як компонентів лікарських засобів, що пригнічують ріст пухлин. Таким чином, гліко-калікс[4]арен пригнічує міграцію і ріст клітин гліоми [74]. Інший підхід для створення протипухлинних препаратів на каліксареновій основі має на меті стимулювання імунної відповіді організму на ракові клітини. Так, N-ацетиглюкозамінкаліксарен, зв'язуючись з рецепторами CD69, викликає активацію цитотоксичних клітин, що спричинює імунну відповідь.

На сьогоднішній день наявний лише один антираковий засіб на каліксареновій платформі, що знаходиться на стадії клінічних випробувань. Це речовина "OTX008", яка інгібує протеїн галектин-1, що бере участь у процесах проліферації та міжклітинних взаємодіях [75]. Але позитивні результати наведених вище досліджень вказують на великі перспективи і чималу кількість таргетних білків, що можуть виступати цільовими мішенями різноманітних структурних аналогів каліксаренів.

Також слід згадати про противірусні ефекти деяких представників калікс[4]аренів. Наприклад, сульфonato-калікс[4]арени проявляють значну ефективність проти значного числа ДНК- та РНК-вмісних вірусів. Високу активність вони виявили проти вірусу герпесу, адже спостерігалось високоселективне зв'язування з його білковим капсидом, що не дозволяло потрапляти вірусним частинкам до клітин [76].

Отже, проаналізовані дані вказують на величезний діапазон можливостей використання каліксаренів у різноманітних областях біохімії, біотехнології, фармакології, аналітичної хімії тощо. Втім, багато деталей щодо механізмів дії

даних речовин на ензиматичну активність АТР-гідролаз є ще не до кінця з'ясованими. Таким чином, актуальним є питання ролі каліксаренів як потенційних ефекторів життєво важливих транспортних ензимів, зокрема Mg^{2+} , АТР-залежної кальцієвої помпи ПМ клітин міометрія.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Матеріали

Об'єктом для з'ясування інгібіторного впливу сполуки тіакалікс[4]арену С-1087 на активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ були фракції плазматичних мембран, екстраговані з міометрія свині. Цілісні клітини ГМ виділяли з міометрія невагітних щурів задля вивчення впливу досліджуваної сполуки на концентрацію Ca^{2+} в ГМК. Щури піддавались випарам хлороформу, що спричинювали в них стан наркозу, після чого їх умертвляли методом декапітації у віварії Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна.

Робота виконувалась згідно з Хельсінською декларацією (Всесвітня медична асамблея, 1964), Міжнародними принципами Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що застосовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), Декларацією принципів толерантності (28 сесія ЮНЕСКО, 1995), Універсальною декларацією по біоетиці та правах людини (ООН, 1997), нормами Конвенції про захист прав людини у зв'язку з впровадженням нових біомедичних технологій, прийнятою у 1997 році у м. Ов'єдо (Іспанія) та підписаним Верховною Радою України у 2002 році, Законом України № 3447 IV «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Під час виконання експериментів застосовувались наступні реактиви: тіакалікс[4]арен С-1087, Hepes, Tris ("Reanal", Угорщина), убаїн, ЕГТА ("Fluka", Швейцарія), АТФ, fluo-4 АМ, тапсигаргін, полілізин ("Sigma", США), окситоцин, розчини NaCl, KCl, K_2HPO_4 , NaHCO_3 , Na_2HPO_4 , CaCl_2 , MgCl_2 , MgSO_4 , глюкоза, колагеназа, ДМСО.

Тіакалікс[4]арен С-1087 - 5,11,17,23-тетра-(трифтор) метил(феніл-сульфоніліміно)метил-аміно-25,27-дигексил-окси-26,28-дигідрокси-тіакалікс[4]арен було синтезовано та описано за допомогою методу ЯМР та ІЧ

спектроскопії у відділі хімії фосфоранів Інституту органічної хімії НАН України (завідуючий відділом – академік НАНУ проф. В.І. Кальченко). Схему його синтезу зображено на рис. 2.1.

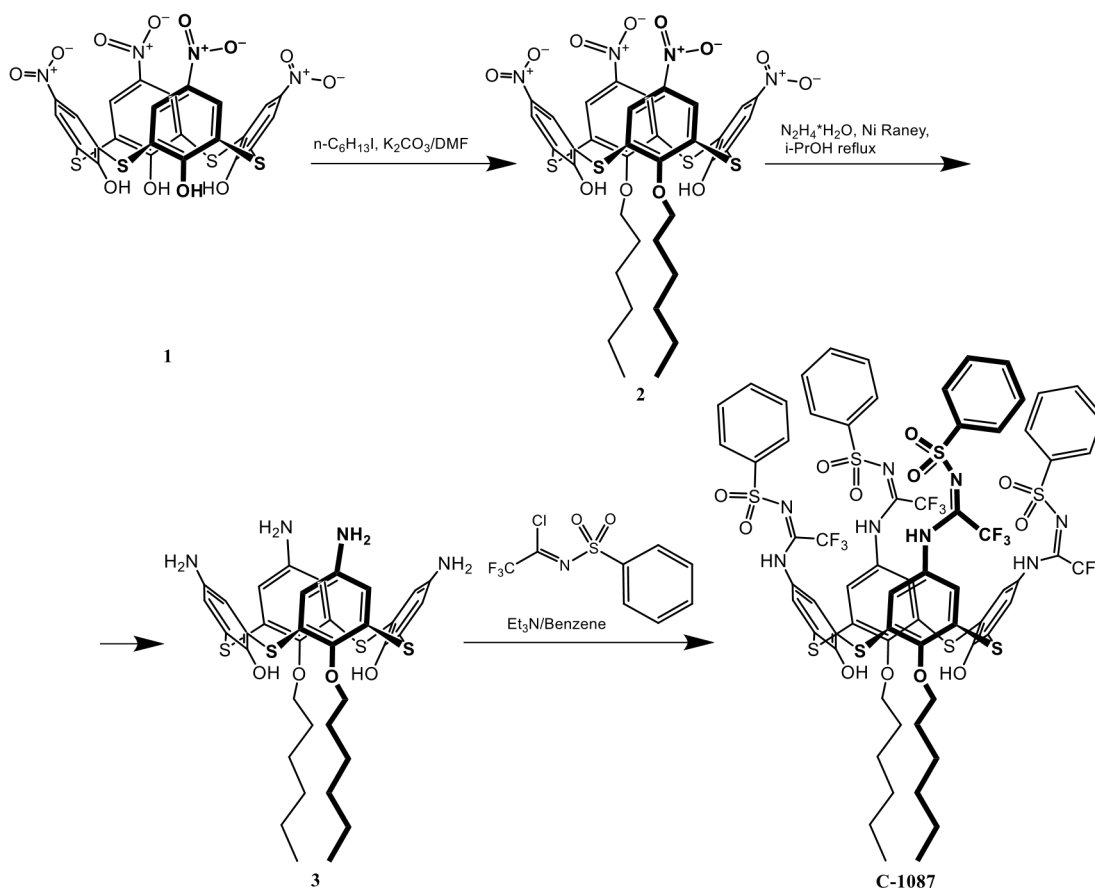


Рис. 2.1 – Схематичне зображення реакцій синтезу тіакалікс[4]арену C-1087.

2.2. Виділення фракцій плазматичних мембран клітин міометрія

Вплив тіакалікс[4]арену C-1087 на АТР-гідролазні активності ПМ досліджували на фракціях ПМ, екстрагованих з міометрія свині згідно методики в роботі [77]. Розчин для виділення включав 20 мМ Tris-HCl (рН 7,4 при 8 °С), 0,25 М сахароза, 2 мМ ЕДТА та 600 мМ КСl. Для запобігання денатурації протеїнів у складі ПМ, усі етапи роботи були проведені на льоду.

Для виділення фракції ПМ використовували ножовий гомогенізатор “Політрон” (10 тис. об/хв), яким дезінтегрували тканину міометрія. Перед цим

брали 15г тканини, роздрібнювали її ножицями і гомогенізували в розчині для виділення у відношенні 1 частина тканини до 4 частин середовища виділення. Процедуру повторювали тричі по 15 секунд з інтервалом у хвилину. Далі за допомогою центрифуги осаджували гомогенат протягом 20 хв при 3 тис. г і +8 °С. Далі відділяли супернатант, що містив потрібні нам фракції ПМ, від осаду, і очищували його у градієнті щільності сахарози. Для цього наносили рідкий супернатант на градієнт по черзі: 30% розчин сахарози в 0,6 М розчині КСl , далі 15% розчин сахарози в 0,6 М КСl, і 15 мл надосадової рідини. Отриману систему центрифугували 1,5 год на бекет-роторі при +8 °С і 105 тис. г. Після цього екстрагували фракцію плазматичних мембран між шарами сахарози з різним % і додавали до неї бідистиллят, поки концентрація сахарози становитиме 2,5% і центрифугували 1 годину при 105 тис. г. Одержаний осад надалі суспендували у розчині для зберігання об'ємом 3 мл і складом 15 мМ Tris-HCl (pH 7,4 при +8 °С), 285 мМ КСl.

Вміст протеїну у мембранних везикулах детермінували за методом Bradford [78], в якості контролю був використаний БСА. Оптична густина була визначена при довжині хвиді 600 нм на СФ-2000.

2.3. Визначення ензиматичних активностей

Загальну АТРазну активність ПМ встановлювали у мембранних фракціях за температури +37 °С у 0,5 мл розчину наступного складу: 3 мМ АТР, 3 мМ MgCl₂, 0,95 мМ CaCl₂, 25 мМ NaCl, 100 мМ КСl, 1 мМ ЕГТА, 10 мМ буферний розчин Hepes-Tris (pH 7,4), 1 мМ NaN₃ (інгібітор АТРази мітохондрій [79]), 1 мМ убаїн (інгібітор Na⁺,K⁺-АТРази [80, 81]), 0,1 мкМ тапсигаргін (інгібітор Ca²⁺-помпи CP [79]) і 0,1% розчин дигітоніну (фактор перфорації ПМ [82]). Згідно з розрахунками комп'ютерної програми «MAXCHEL», за наявних фізико-хімічних та концентраційних характеристик середовища інкубації, концентрація вільних іонів Са складала 1 мкМ. Білковий вміст у пробі фракції ПМ складав близько 25 мкг, період інкубації становив 7 хв. Ензиматичну

реакцію розпочинали додаванням до розчину 50 мкл аліквоти мембранних везикул, а завершували внесенням 1 мл “стоп-розчину”, що складався з 1,5 М CH_3COONa , 4% розчину формальдегіду, 15% етанолу та 5% ТХУ при рН 4,3. Кількість продукту реакції – фосфату неорганічного P_i розраховувалась методом W. Rathbun [83].

Ензиматичну активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ визначали як різницю значень загальної АТРазної активності та базальної Mg^{2+} -АТРазної активності, тобто у наявності та відсутності в розчині інкубації екзогенного кальцію, відповідно.

На противагу $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази, Mg^{2+} -АТРаза є глікопротеїном, що є нечутливим до ортованадату, виявляє негативний кооперативний ефект щодо АТР та чия ізоелектрична точка лежить в кислій зоні рН шкали. Тому базальна Mg^{2+} -АТРазна активність визначається у мембранній фракції в тому ж середовищі, що загальна АТРазна активність, але за відсутності CaCl_2 .

Na^+, K^+ -АТРазну активність розраховували за тим же принципом: як різницю АТРазних активностей у наявності та відсутності 1 мМ убаїну – специфічного інгібітора Na^+, K^+ -обмінника. У цих дослідженнях значення питомої активності Na^+, K^+ -АТРази та базальної Mg^{2+} -АТРази ПМ складало $10 \pm 0,9$ і $18 \pm 1,3$ мкМ P_i /мг протеїну за 1 годину ($M \pm m$; $n = 7$), відповідно.

Крім того, у везикулах ПМ міометрія було виявлену іншу активність, відмінну від $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази. Це так звана Mg^{2+} -незалежна, Ca^{2+} -залежна АТРазна активність, яка спостерігалась на тлі наявності в розчині інкубації іонів Ca^{2+} і АТР у мМ концентраціях, але за відсутності іонів Mg [84, 85]. Ca^{2+} -АТРаза має низьку спорідненість до кальцію: значення K_{Ca} складає 1 мМ [85]. Для знаходження Ca^{2+} -АТРазної активності, використовували наведений вище принцип, і рахували її як різницю між кількістю фосфату неорганічного P_i , що виник в інкубаційному розчині за наявності і відсутності мембранної фракції, з врахуванням корекції на вміст ендogenous P_i в фракції везикул ПМ. Таким чином, величина ензиматичної активності низькоафінної Mg^{2+} -незалежної

Ca²⁺-залежної АТРази ПМ складала $12 \pm 2,3$ мкмоль Р_i/мг протеїну за 1 годину ($M \pm m$; n = 7).

У експериментах з дослідження дії діапазону концентрацій тіакалікс[4]арену С-1087 (до 100 мкМ) на ензиматичну активність Ca²⁺-помпи, користувались стандартним розчином інкубації з додаванням аліквоти розчину тіакалікс[4]арену досліджуваної концентрації. При цьому використовувався 20 мМ розчин тіакалікс[4]арену С-1087 в ДМСО, який надалі диспергували у воді.

2.4. Виділення ГМК міометрія

Дослідження впливу тіакалікс[4]арену С-1087 на концентрацію іонів Са в міоцитах, а також на їх ефективний гідродинамічний діаметр, виконувалось на суспензії ГМК, екстрагованих з матки невагітних молодих щурів.

Міометрій акуратно відокремлювали від оточуючих сполучних тканин і та вміщували в розчин Хенкса А наступного складу: 137 мМ NaCl, 5,4 мМ KCl, 0,5 мМ KH₂PO₄, 0,3 мМ NaHCO₃, 0,3 мМ Na₂HPO₄, 0,03 мМ CaCl₂, 5,5 мМ глюкоза, 10 мМ HEPES (рН 7,4 при 37°C). Далі міометрій подрібнювали на маленькі квадратики приблизно одного розміру – 0,2 на 0,2 см і очищували від залишків крові, сполучної тканини тощо. Для цього тричі по 5 хвилин вміщували матеріал у розчин Хенкса Б, який був ідентичний за складом до розчину А, але не включав MgCl₂ і MgSO₄. Після очищення проводили інкубацію тканинного матеріалу у 2 мл середовища для дисоціації клітин при 37 °С впродовж 20 хв, постійно помішуючи. Дане середовище містило 0,1% розчин колагенази 1А, 0,1% розчин БСА та 0,01% розчин соєвого інгібітора трипсину, що були зроблені з використанням розчину Б. За час інкубації в тканинних шматочках відбувається розщеплення міжклітинної речовини, тому задля пришвидшення цього процесу матеріал піпетували протягом 5 хв, попередньо відібравши розчин для дисоціації, і помістивши препарат у розчин Б.

Далі цей розчин Б, з залишками сполучної тканини і розірваними клітинами, вилучали з пробірки, а у тканинний матеріал знову додавали розчин для дисоціації міоцитів і інкубували за таких самих умов. Наведену схему повторювали близько 5-6 разів.

Дві початкові партії відібраного з дисоційованими ГМК розчину Б, не використовували у подальших експериментах, оскільки вони містили ще не чисті клітини, а їх уламки і тканинні фрагменти. Решту партій поєднували, пропускали крізь сітчастий фільтр з синтетичного матеріалу і центрифугували протягом 15 хв на 80 g задля осадження міоцитів і відділення їх від розчину дисоціації. Далі отриманий осад ресуспендували в розчині Хенкса Б і відтворювали етап центрифугування і фільтрації ще раз. Одержану суспензію ГМК міометрія щурів зберігали в холодильнику при +8 °С.

2.5. Визначення змін концентрації вільного Ca^{2+} в ГМК з використанням методу конфокальної мікроскопії

Виділені клітини матки щурів для їх використання у мікроскопічних методах, наносили на предметне скельце з полілізином (150 мкл) і витримували близько двох годин задля кращої іммобілізації. Незакріплені клітини прибирали шляхом відмивання розчином Б.

Дослідження проводились на лазерному скануючому конфокальному мікроскопі LSM510 «МЕТА» (“CarlZeiss”, Німеччина). Для змоги реєструвати флуктуації внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca^{2+} , клітини навантажували флуоресцентними зондами Hoechst та fluo-4 AM впродовж 15 хв. Далі на скельце додавали 2 мкл 40 мМ CaCl_2 , щоб упевнитись в цілісності мембрани ГМК: в цьому випадку флуоресценція в середині клітини не буде зростати.

Зрештою, для аналізу зміни концентрації кальцію під дією каліксарену, обирали клітини правильної класичної веретеноподібної форми з видимим, підсвіченим ДНК-чутливим зондом (синій колір) Hoechst ядром. Щодо зонду

fluo-4 AM, то він може флуоресціювати тільки після його гідролізу ферментами-естеразами клітини. Маючи високу спорідненість до кальцію, він утворює комплекси з даними іонами і спричинює зелену флуоресцентну відповідь.

Для кількісного аналізу застосовували функцію ROI (Region of Interest), завдяки якій можна вивести графіки, що демонструватимуть залежність інтенсивності флуоресценції від часу, і будуть усереднені в конкретній обраній області ГМК. Також для фіксації концентраційних змін робили серії послідовних знімків з частотою 4 знімки за хвилину, під час яких додавали на скельце аліквоту розчину C-1087 у концентрації 20 мкМ.

2.6. Метод лазерно-кореляційної спектроскопії

Задля визначення ефективного гідродинамічного діаметру ГМК використовувався лазерно-кореляційний спектрометр “Zeta Sizer-3” (Malvern Instruments, Великобританія), оснащений гелій-неоновим лазером ЛГН-111 ($P = 25$ мВт, $\lambda = 633$ нм). Ширина спектру вимірювання приладу складає 1 нм - 20 мкм.

Метод лазерно-кореляційної спектроскопії (ЛКС) застосовується в біохімічних і медико-біологічних дослідженнях в основному для з'ясування гідродинамічних розмірів різноманітних біооб'єктів, або визначення рівня гідратації різних сферичних частинок в цілому. Основа роботи приладу полягає у аналізі кореляційної функції зміни інтенсивності розсіяних променів на частинках сферичної форми в розчині. Броунівський рух частинок в рідині викликає коливання їх місцевої концентрації, що результує у неоднакових локальних коефіцієнтах заломлення, і таким чином, в зміні сили розсіяного світла під час трансмісії лазерного променя крізь згадане середовище. Інтенсивність розсіяного випромінювання залежить від показників дифузії частинок та їх гідродинамічного діаметра. Розраховується він за формулою Ейнштейна-Стокса у програмі PCS-SizeMode v1.61:

$$d(H) = \frac{k_B \cdot T}{3\pi\eta D},$$

де k_B - стала Больцмана, T – температура в Кельвінах, η – в'язкість середовища, D – коефіцієнт дифузії.

Зрештою реєстрування і статистичний аналіз лазерних променів здійснюється 5 разів впродовж 1 хв за температури +25 °С і під кутом розсіювання в 90°. В результаті одержують функцію розподілу частинок – в нашому випадку ГМК – за їх розмірами: по осі X безпосередньо розміри в нанометрах, а по осі Y – частка частинок певного розміру в розчині.

В нашому випадку в кювету вносили було внесено 0,1 мл суспензії ГМК та 0,9 мл розчину А, склад якого був описаний вище. Після фіксації контрольних показників, у цю ж кювету додавали 0,01 мл розчину тіакалікс[4]арену С-1087 і виконано вимірювання зміни гідродинамічного діаметру міоцитів.

2.7. Комп'ютерне моделювання взаємодії тіакалікс[4]арену С-1087 та Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ

Оптимізацію тривимірної структури тіакалікс[4]арену С-1087 здійснювали методом мінімізації потенціальної енергії у силовому полі MMFF94 (Merck Molecular Force Field), де враховувались електростатичні та вандерваальсові взаємодії. При цьому були обрані наступні параметри: крутизна спуску – 100, величина кроку – 2 пм, градієнт кроків спуску – 2 пм. Далі вже оптимізовану структуру тіакаліксарену використовували в стикуванні з Ca^{2+} -помпою в програмному пакеті "AutoDock" версії 4.2 [86].

Після цього селекцію найбільш оптимальних результатів здійснювали за показниками геометрії розташування тіакалікс[4]арену С-1087 у місці зв'язування з Ca^{2+} -помпою, а також за показниками енергії, застосовуючи інтегровані в ПЗ функції для обчислення енергетичних значень утворених

комплексів. Таким чином, обирали комплекси з найменшим значенням показника вільної енергії і найкращою скоринговою функцією. Аналіз результатів і створення ілюстрацій здійснювали в програмі “Chimera”.

Для докінгу використовували тривимірну структуру $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ з ідентифікатором 611E з бази даних просторових структур білків (RSCB Protein Data Bank).

2.8. Статистична обробка результатів

Статистичний аналіз здійснювали із застосуванням програми Origin 2018. Аналіз вибірок на їх віднесення до сукупностей з нормальним розподілом реалізовували, використовуючи критерій Шапіро-Уїлка. Для обрахунку різниці між середніми значеннями вибірок застосовували t-тест для взаємозалежних вибірок або однофакторний статистичний тест (one-way ANOVA). Надійними результатами вважали ті, в яких значення імовірності p , становило менше 5% ($p < 0,05$). Аналіз надійності підгонки результатів лінійною функцією проводили із застосуванням F-критерію Фішера; коефіцієнт кореляції (R^2) не був нижчим за 0,95. Результати викладені як середнє арифметичне \pm стандартна похибка, а n – число експериментів.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Визначення дії тіакалікс[4]арену С-1087 на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-гідролазну активність плазматичної мембрани клітин матки

Задля виявлення вибіркості дії досліджуваної сполуки – тіакалікс[4]арену С-1087 на ензиматичну активність Mg^{2+} , АТР-залежної кальцієвої помпи у фракціях мембранних везикул, методами ензимології був досліджений вплив даного ефектора на АТР-гідролазні активності ПМ. Так, було встановлено, що тіакалікс[4]арен С-1087 за концентрації в 0,1 мМ є дієвим інгібітором Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазної активності ПМ міоцитів, адже гальмує її активність до $15 \pm 0,3\%$ щодо контрольного рівня, прийнятого як 100% ($M \pm m$; $n = 5$) (рис. 3.1).

Важливо, що поряд із цим, тіакаліксарен у ідентичній концентрації практично не чинив інгібуючу дію на інші АТР-гідролазні активності ПМ; Na^+ , K^+ -АТРази він дещо принічував на $8 \pm 0,3\%$; значення базальної Mg^{2+} -АТРази активності знизилось на $5,1 \pm 1\%$; а активність Mg^{2+} -незалежної, Ca^{2+} -АТРази ПМ тіакалікс[4]арен С-1087 знизив на $10 \pm 0,8\%$, втім такий вплив не є статистично значущим (рис. 3.1).

Варто додати, що сама каліксаренова чаша (калікс[4]арен С-150; 25,27-дипропоксикалікс[4]арен) теж фактично не чинить дії на ензиматичну активність Ca^{2+} -помпи (результати не наведені).

Таким чином, тіакалікс[4]арен С-1087 у концентрації 0,1 мМ ефективно і з високим рівнем селективності інгібує активність Mg^{2+} , АТР-залежної кальцієвої помпи у фракціях ПМ міоцитів, без відповідного впливу на

ензиматичну активність інших мембранних АТР-гідролаз, куди відносяться Na^+ , K^+ -АТРаза, Ca^{2+} -АТРаза та Mg^{2+} -АТРаза ПМ.

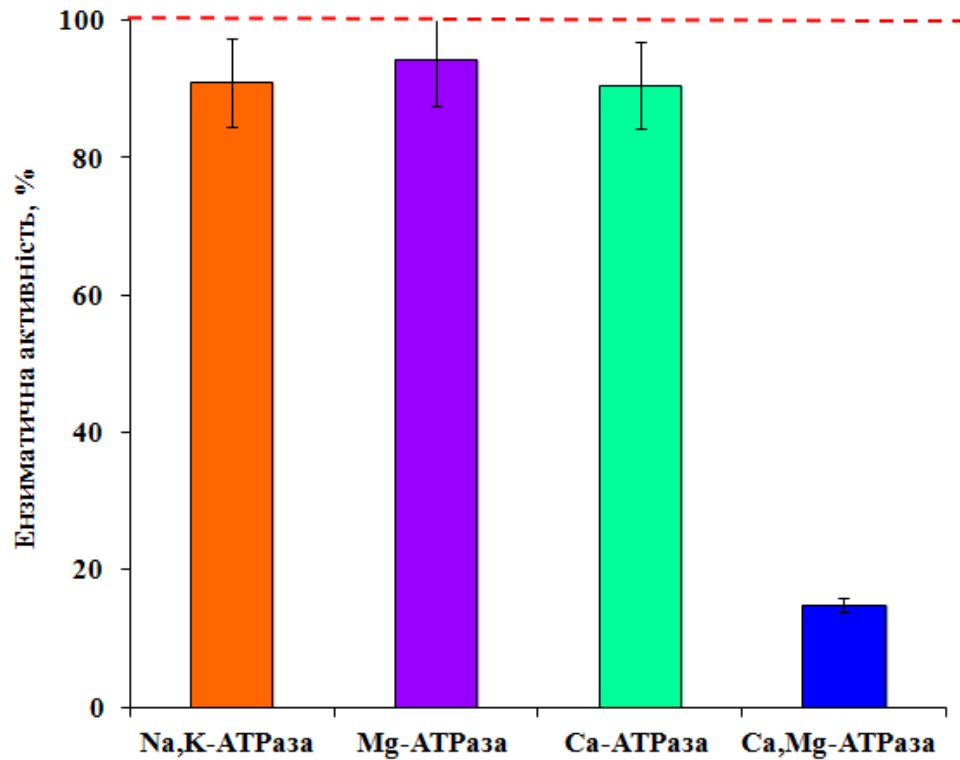


Рис. 3.1 – Вплив тіакалікс[4]арену С-1087 (0,1 мМ) на АТР-гідролазні активності у мембранних фракціях клітин міометрія ($M \pm m$, $n = 5$). За 100% взяте значення питомих ензиматичних активностей за відсутності в розчині для інкубації тіакалікс[4]арену С-1087.

Наступним етапом було дослідження концентраційної залежності інгібуючого ефекту аналізованої сполуки, в проміжку концентрацій 0,1 – 100 мкМ, на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-гідролазну активність ПМ.

Як можна спостерігати на рис. 3.2, тіакалікс[4]арен С-1087 дозообумовлено та ефективно гальмує ензиматичну активність транспортної Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ. Значення уявної константи інгібування $I_{0,5}$ в даному випадку складає 9,4 мкМ, а величина коефіцієнта Хілла n_H становить $0,57 \pm 0,02$ ($M \pm m$; $n = 5$). Важливо, що значення $I_{0,5}$ для калікс[4]арену С-90 (який є попереднім аналогом С-1087) є більшим, аніж для тіакалікс[4]арену С-1087

($I_{0,5} = 20 \pm 0,4$ мкМ) [87], втім коефіцієнт Хілла n_H майже зовсім однаковий для обидвох сполук.

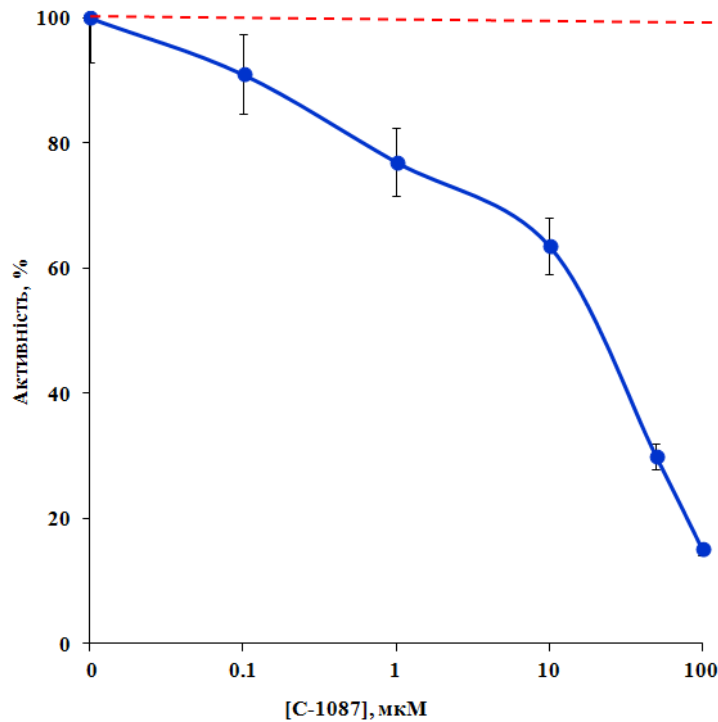


Рис. 3.2 – Концентраційна залежність гальмівної дії тіакалікс[4]арену С-1087 на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазну активність ПМ ГМК ($M \pm m$, $n = 5$). За 100 % взята величина питомої ензиматичної активності при відсутності тіакалікс[4]арену С-1087 в інкубаційному розчині.

3.2. Дослідження впливу тіакалікс[4]арену С-1087 на концентрацію Ca^{2+} в ГМК матки

З огляду на те, що Mg^{2+} , АТР-залежна кальцієва помпа ПМ є критичною системою, що контролює термінацію кальцієвого сигналу в цитозолі клітин ГМ, показовим було б дослідження дії тіакалікс[4]арену С-1087 на флуктуації цитоплазматичного пулу іонів Са безпосередньо в ГМК. Тому на наступному етапі ми з'ясовували ефективність дії досліджуваного тіакаліксарену на зміну внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} із залученням методу конфокальної мікроскопії. Реєстрацію кальцієвого сигналу здійснювали за рахунок

застосування Ca^{2+} -чутливого флуоресцентного зонду зеленого кольору fluo-4 АМ. В результаті, додавання до іммобілізованих на предметному скельці ГМК сполуки тіакалікс[4]арену С-1087 у 20 мкМ концентрації, викликало стрімкий ріст рівня флуоресценції, і, відповідно, концентрації Ca^{2+} в клітині (рис. 3.3). В той же час інтенсивність флуоресценції фону та ядра ГМК (синім кольором, ДНК-чутливий барвник Hoechst), залишалась сталою. Втім, упродовж наступних 2-3 хв концентрація Ca^{2+} поступово зменшувалась, але не верталась до значення її початкового рівня, що вказує на активізацію компенсаторних механізмів, якими можуть бути Ca^{2+} -уніпортер мітохондрій чи Na^+ - Ca^{2+} -обмінник ПМ.

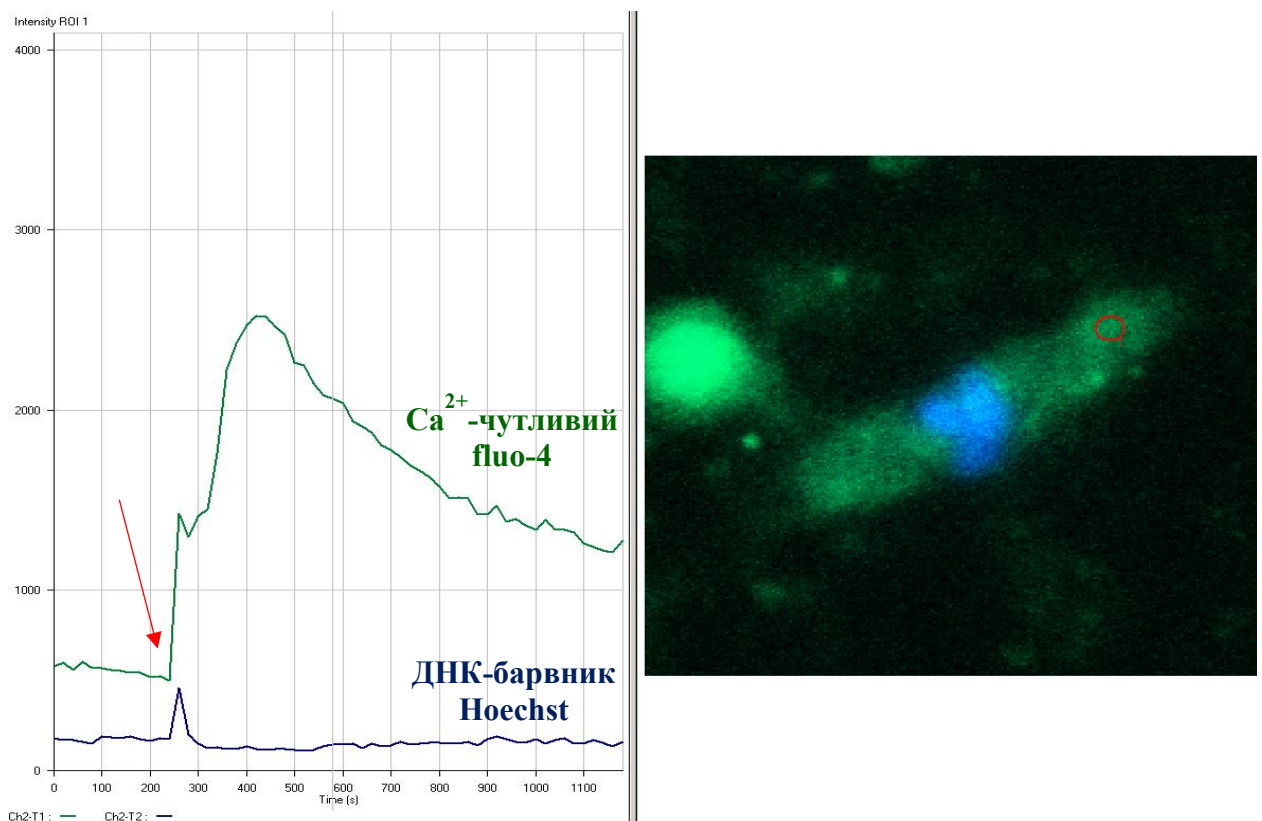


Рис. 3.3 – Вплив тіакалікс[4]арену С-1087 (20 мкМ) на інтенсивність флуоресцентного сигналу зондів: Ca^{2+} -чутливого зонду fluo-4 АМ (зеленим) та ДНК-чутливого зонду Hoechst (синім) в ізолюваній клітині ГМ (праворуч). Стрілкою вказано на момент внесення аліквоти розчину тіакалікс[4]арену С-1087. Наведений результат типового експерименту.

Важливо, що додавання до ГМК розчину калікс[4]арену С-150 (каліксаренової чаші) не спричинило зростання флуоресценції, а отже і концентрації Ca^{2+} в міоциті, що корелює з даними ензиматичних досліджень.

Отже, за результатами даних конфокальної мікроскопії, тіакалікс[4]арен С-1087 – інгібітор Ca^{2+} -помпи ПМ – індукує зростання пулу вільного Ca^{2+} в ізольованих ГМК міометрія.

3.3. Вплив тіакалікс[4]арену С-1087 на ефективний гідродинамічний діаметр ГМК

Згідно з результатами досліджень конфокальної мікроскопії на ізольованих міоцитах, а також впливу досліджуваної сполуки на ензиматичну активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ, вплив тіакалікс[4]арену С-1087 на Ca^{2+} -помпу безсумнівно призводить до росту концентрації іонів Са в ГМК. Тому можна припустити, що ці події спричинять і модифікації контрактильності міоцита, і зрештою змінять його гідродинамічний діаметр. Відомо, що зростання концентрації вільного Ca^{2+} в цитоплазмі до 10 мкМ призводить до утворення комплексу Ca^{2+} -кальмодулін, що надалі стимулює кіназу легких ланцюгів міозину, яка фосфорилує залишки Ser в складі міозину і спричинює його взаємодію з актиновими філаментами. Всі ці дії ведуть до одного результату – запуску процесу скорочення [88]. Тому на цій стадії роботи доцільно було проаналізувати вплив тіакалікс[4]арену С-1087 на зміну гідродинамічного діаметра клітин ГМ за допомогою методу лазерної скануючої спектроскопії.

Здобуті результати вказують на статистично значуще зменшення гідродинамічного діаметру ГМК під дією тіакалікс[4]арену С-1087 у концентрації 50 мкМ відносно контролю. При цьому розчин DMSO (контроль на розчинник) не впливав на зміну гідродинамічного діаметру міоцитів, а розчин окситоцину (100 нМ) слугував контролем на контрактильність, адже це найбільш відомий утеротонік, який частіше за все використовується в

акушерській справі і відомий своєю здатністю викликати ріст концентрації Ca^{2+} і викликати скорочення ГМ. Окситоцин спричинював зменшення діаметру клітин до $72 \pm 4,32\%$ щодо контрольного значення (суспензія ГМК в розчині А), а ось тіакалікс[4]арен С-1087 зменшував ефективний гідродинамічний діаметр до $55 \pm 3,1\%$, що вказує на більшу ефективність даної сполуки порівняно з окситоцином (рис. 3.4).

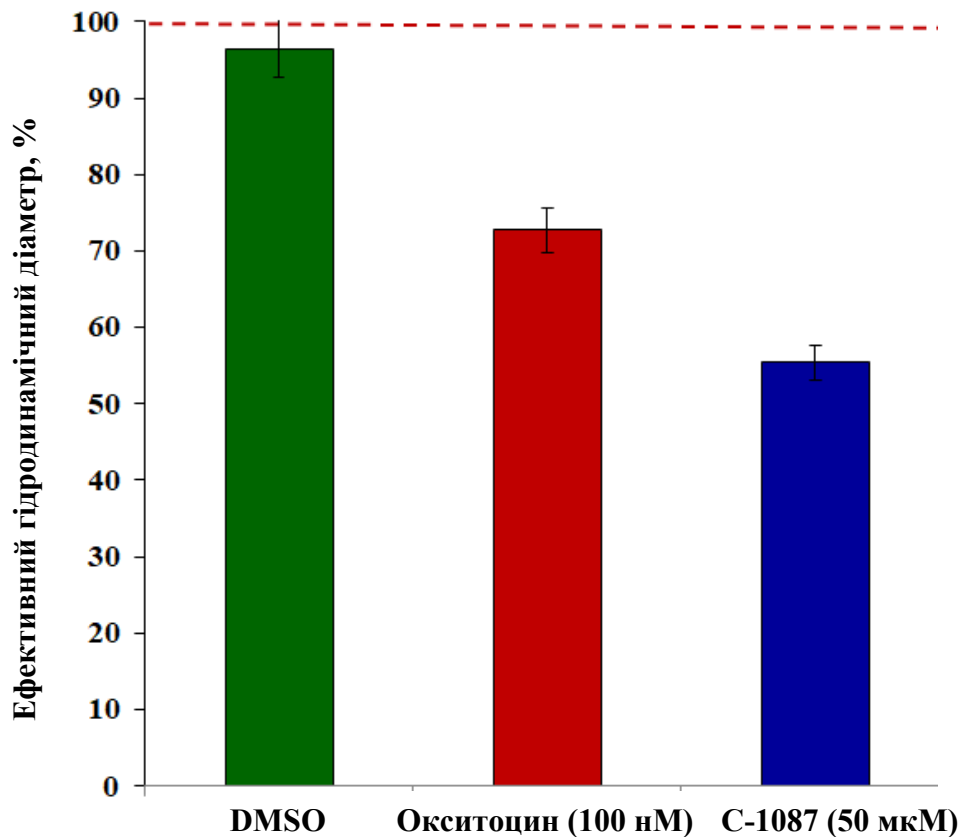


Рис. 3.4 – Дія тіакалікс[4]арену С-1087 (50 мкМ) на ефективний гідродинамічний діаметр ГМК ($M \pm m$, $n = 7$). За 100 % взято значення гідродинамічного діаметра клітин в розчині А без ефекторів.

Таким чином, дані методу ЛКС вказують, що тіакалікс[4]арен С-1087, будучи інгібітором Ca^{2+} -помпи ПМ і підвищуючи внутрішньоклітинну концентрацію кальцію, зумовлює зменшення ефективного гідродинамічного діаметру ГМК подібно до утеротоніка окситоцину, що свідчить про скорочення клітин міометрія.

3.4. Комп'ютерне моделювання взаємодії тіакалік[4]сарену C-1087 з Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазою ПМ

Більш детальна інформація щодо тривимірної структури тіакалік[4]сарену C-1087 була отримана після мінімізації її енергії. Так, сполука має дещо “вивернуту” конусоподібну конформацію: бічні проксимальні залишки у 5 і 11 положеннях із розташованими дистально третбутильними залишками, протилежно орієнтовані іншій парі проксимальних залишків у 17 і 23 положеннях з дистально розташованими третбутильними залишками. Відстані між сусідньо розміщеними атомами кисню нижнього вінця складають 0,29 і 0,31 нм, що вказує на можливість утворення внутрішньомолекулярних Н-зв'язків сусідніх пропоксигруп.

Визначення точного розміщення досліджуваного тіакаліксарену в сайті зв'язування є ускладненим через те, що Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза ПМ безпосередньо зв'язана з мембраною, і взаємні переміщення цитоплазматичних доменів помпи протягом реакційного циклу є суттєвими. Втім, існування потенційних сайтів взаємодії ліганду з ліганд-зв'язуючим сайтом на поверхні Ca^{2+} -помпи підтверджується значеннями вигідних мінімальних енергій зв'язування та оточенням амінокислотних залишків. Результати проведеного докінгу вказують на два найбільш імовірні місця приєднання ліганду до кальцієвої помпи (рис. 3.5).

Перша область взаємодії тіакалік[4]сарену C-1087 з Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазою знаходиться просторово наближено до місця приєднання іонів Ca, що знаходиться в зоні петлі між четвертою, шостою та восьмою трансмембранними спіралями. В результаті утворюється гідрофобна порожнина з водорозчинними залишками по периферії. В цій взаємодії приймають участь залишки Cys909, Leu912, Leu915, Asn929, Leu932, Cys937, Met940, Leu970, Leu974, Leu1021, Leu1025 кальцієвої помпи та сульфоніламідинової групи тіакаліксарену. А ароматичні кільця ліганду

формують стекінг-взаємодію з амінокислотними залишками Thr905, Pro926, Trp927, Val933, Ile936.

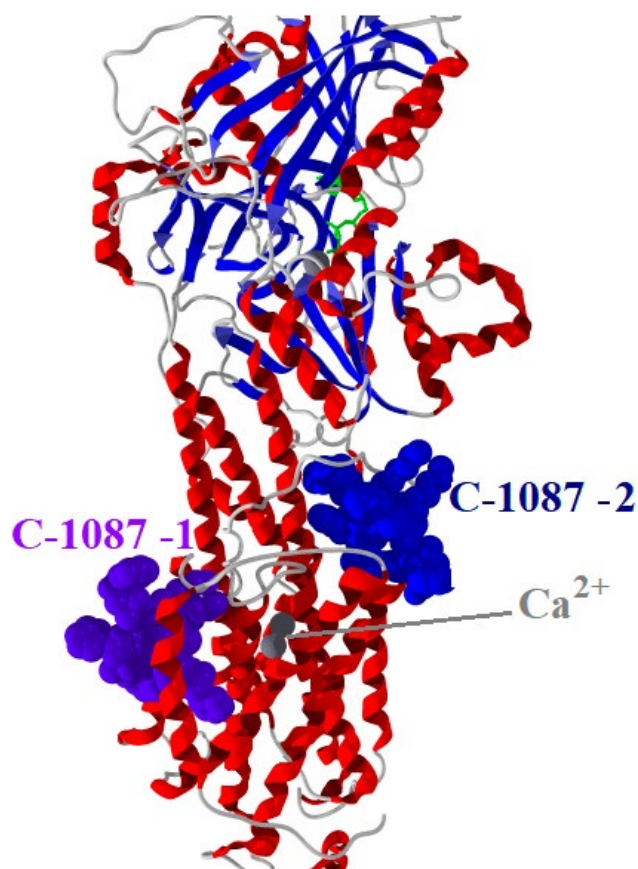


Рис. 3.5 – Найвірогідніші місця зв'язування тіакалікс[4]арену C-1087 з функціонально-активними ділянками Ca^{2+} - помпи в сайтах 1 та 2, отримані методом молекулярного докінгу.

Безсумнівно, зв'язування досліджуваної сполуки в цьому сайті може викликати погіршення конформаційної лабільності помпи і афінитет до іонів Ca (рис. 3.6, зверху).

Другий сайт взаємодії лежить в зоні, просторово наближеній до нуклеотид зв'язуючого центру, що може чинити негативний вплив на доступність АТФ до цієї ділянки Ca^{2+} -помпи. При цьому заряджені амінокислотні залишки Arg750, Arg655 та Lys492 взаємодіють із сульфоніламідinovими групами тіакаліксарену, а залишки Gly343, Cys344, Gly749, Lys757, Lys818, Trp831 та Ala987 – із трифторметильними залишками.

В той же час ароматичні кільця формують гідрофобні та стекінг-взаємодії з амінокислотами Tyr753, Pro819, Pro820, Tyr990 та Leu991 (рис.3.6, знизу).

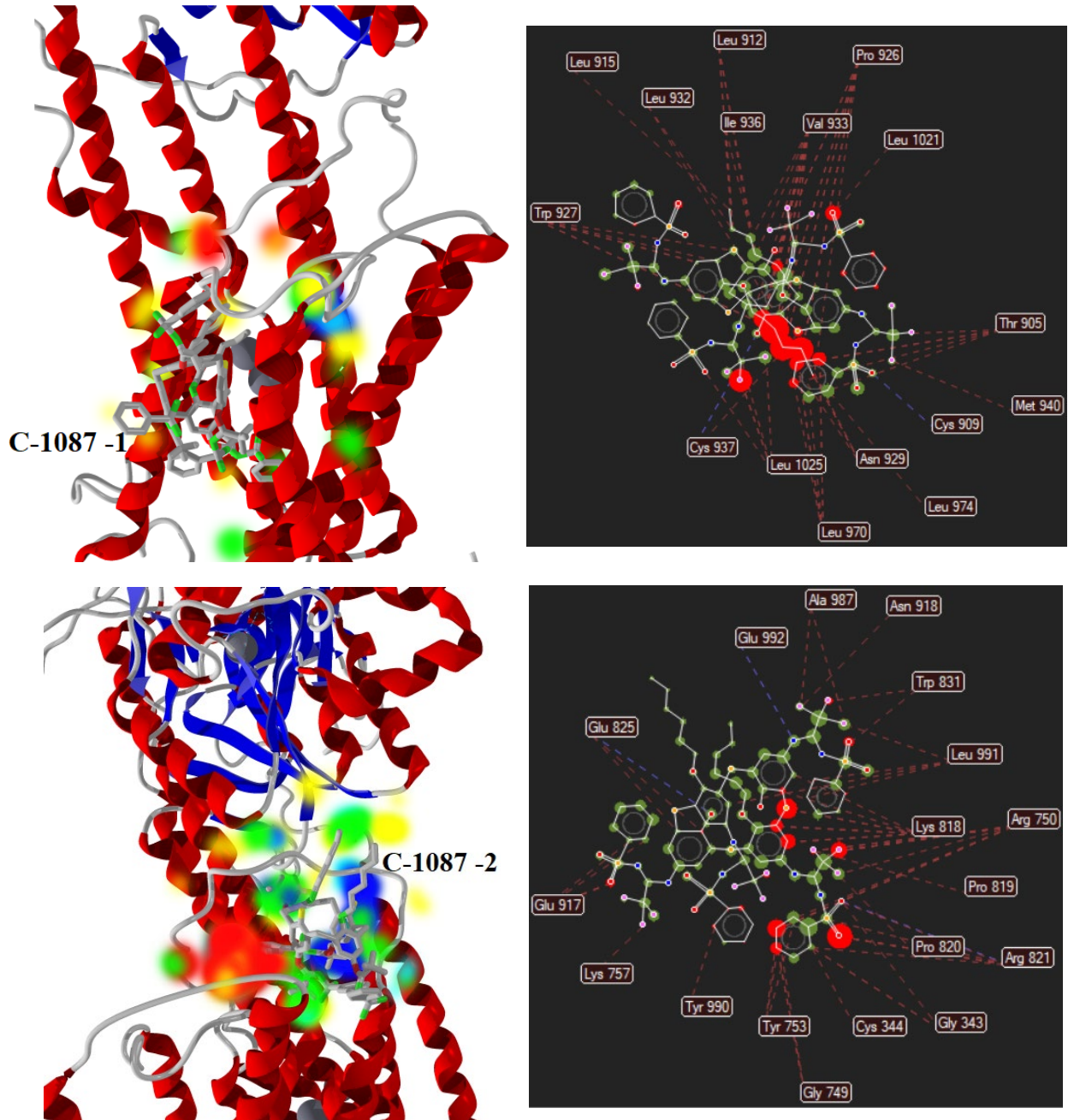


Рис. 3.6 – Типи взаємодій, що беруть участь при формуванні комплексу тіакалікс[4]арен – Ca^{2+} -помпа в областях 1 (зверху) та 2 (знизу).

Амінокислоти, що утворюють водневі зв'язки з тіакаліксареном, виділені коричневим штрих-пунктиром; зеленим кольором позначені стеричні взаємодії, блакитним – акцептори протону, жовтим – донори протону, синім та червоним – електростатичні взаємодії.

Таким чином, результати докінгу засвідчують, що стабілізація комплексу переважним чином відбувається за рахунок гідрофобних та стекінг-взаємодій фенольних залишків ліганду з ароматичними залишками помпи, а також за рахунок електростатичних взаємодій та водневих зв'язків між бічними залишками ліганду і зарядженими амінокислотами Ca^{2+} -помпи. Це все відповідає експериментальним даним щодо можливості тіакалікс[4]арену С-1087 впливати на активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ.

ВИСНОВКИ

1. Тіакалікс[4]арен С-1087 селективно та з високою афінністю ($I_{0,5} = 9,4$ мкМ) гальмує активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ, не маючи при цьому впливу на активності інших мембранних АТР-гідролаз.
2. З використанням методу конфокальної мікроскопії виявлено, що тіакалікс[4]арен С-1087 провокує збільшення цитоплазматичної концентрації Ca^{2+} в ГМК матки.
3. Подібно до дії утеротоніку окситоцину, тіакалікс[4]арен С-1087 призводив до зменшення ефективного гідродинамічного діаметру міоцитів до 55% щодо контролю.
4. Методом молекулярного докінгу встановлено імовірні сайти зв'язування досліджуваного ліганду з $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазою ПМ, а також взаємодії, які приймають в цьому участь.

З огляду на отримані результати, можна зробити висновок про ефективність тіакалікс[4]арену С-1087 як нового ефектора Mg^{2+} , АТР-залежної кальцієвої помпи ПМ ГМК матки, а також щодо можливості розробки на основі даної сполуки ще більш селективного та афінного інгібітора транспортної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Webb R.C. Smooth muscle contraction and relaxation. *Advances in Physiology Education*. 2003; 27(4): 201-206.
2. Wray S. Insights into the uterus. *Experimental Physiology*. 2007; 92(4): 621-631.
3. Wray S., Kupittayanant S., Shmygol A., Smith R.D., Burdyga T. The physiological basis of uterine contractility: a short review. *Exp. Physiol*. 2001; 86(2): 239-246.
4. Kosterin S.O., Babich L.G., Shlykov S.G., Danylovyh Iu.V., Veklich T.O., Mazur Yu.Yu. Biochemical properties and regulation of smooth muscle cell Ca^{2+} -transporting systems. K.: Science opinion, 2016. 210p.
5. Shmigol A., Eisner D. A., Wray S. Carboxyeosin decreases the rate of decay of the $[Ca^{2+}]_i$ transient in uterine smooth muscle cells isolated from pregnant rats. *Pflugers Arch*. 1998; 437: 158-160.
6. Veklich T.O., Mazur Iu.I., Kosterin S.O. Mg^{2+} ,ATP-depenent plasma membrane calcium pump of smooth muscle cells. II. Regulation of activity. *Ukr. Biochem. J*. 2015; 87(2): 5-25. (In Ukrainian)
7. Brini M. Plasma-Membrane Calcium Pump: Structure and Function. Elsevier Inc. 2013; 3: 525-529.
8. Uterine contractility / Ed. by R.E. Garfield.-Serano Simposia, VSA, Norwill, Massachuses, 1990. – 388 p.
9. Hertelendy F. Zakar T. Regulation of myometrial smooth muscle functions. *Curr. Pharm. Des*. 2004; 10 (20): 2499-2517.
10. Lehninger, A. L., Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2000). *Lehninger principles of biochemistry*. New York: Worth Publishers. ISBN-13: 978-1429234146
11. Kostyuk PG, Kostyuk OP, Lukyanets EA. Intracellular calcium signaling: structures and functions. Kiev: Nauk. Dumka; 2010. [Ukrainian]

12. Burdyga T., Richard J. P. Chapter 86 – Calcium Homeostasis and Signaling in Smooth Muscle Muscle, Joseph Hill, Boston/ Waltham. –2012. – P. 1155–1171.
13. Pande J., Grover A.K. Plasma membrane calcium pumps in smooth muscle: from fictional molecules to novel inhibitors // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2005. – 83. – P. 743–754.
14. Chalmers S., Olson M.L., MacMillan D., Rainbow R.D., McCarron J.G. Ion channels in smooth muscle: Regulation by the sarcoplasmic reticulum and mitochondria / *Cell Calcium.* – 2007. – 42, N 4–5. – P. 447–466.
15. Strehler E.E., Adelaida G.F., Penniston J.T., Caride A.J. Plasma membrane Ca^{2+} -pumps: structural diversity as basis for functional versatility // *Biochem. Soc. Trans.* – 2007. – 35, Pt 5. – P. 919–922.
16. Matthew A., Shmygol A., Wray S. Ca^{2+} entry, efflux and release in smooth muscle // *Biol. Res.* – 2004. – 37, N 4. – P. 617–624.
17. Oloizia B., Paul R.J. Ca^{2+} Clearance and contractility in vascular smooth muscle: Evidence from gene-altered murine models // *J. Mol. Cellul. Cardiol.* – 2008. – 45, N 3. –P. 347–362.
18. Floyd R., Wray S. Calcium transporters and signalling in smooth muscles // *Cell Calcium.* – 2007. – 42, N 4–5. – P. 467–476.
19. Carafoli E. Biogenesis: plasma membrane calcium ATPase: 15 years of work on the purified enzyme // *FASEB J.* –1994. – 13. –P. 993-1002.
20. Strehler E.E., Zacharias D.A. Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps // *Physiol. Rev.* – 2001. – 81, N 1. – P. 21-50.
21. Pande J., Mallhi K.K., Grover A.K. Role of third extracellular domen of plasma membrane Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase based on novel inhibitor caloxin 3A1 // *Cell Calcium.* – 2005. – 37, N 3. – P. 245–250.
22. Olson S., Wang M.G., Carafoli E., Strehler E.E., McBride O.W. Localization of two genes encoding plasma membrane Ca^{2+} transporting ATPases to human chromosomes 1q25–32 and 12q21–23 // *Genomics* – 1991. – 9. – P. 629–641.

23. Wang M.G., Yi H., Hilfiker H., Carafoli E., Strehler E.E., McBride O.W. Localization of two genes encoding plasma membrane Ca^{2+} ATPases isoform 2 (ATP2B2) and 3 (ATP2B3) to human chromosomes 3p26→p25 and Xq28, respectively // *Cytogenet. Cell Genet.* – 1994. – 67. – P. 41–45.
24. Kuzmin I., Stackhouse T., Latif F., Duh F.M., Geil L., Gnarra J., Yao M., Li H., Tory K., Le Paslier D., Chumakov I., Cohen D., Chinault A.C., Linehan W.M., Lerman M.I., Zbar B. One-megabase yeast artificial chromosome and 400-kilobase cosmid-phage contigs containing the von Hippel-Lindau tumor suppressor and Ca^{2+} -transporting adenosine triphosphatase isoform 2 genes // *Cancer Res.* – 1994. – 54. – P. 2486–2491.
25. Burk S.E., Shull G.E. Structure of the rat plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isoform 3 gene and characterization of alternative splicing and transcription products // *J. Biol. Chem.* – 1992. – 267. –P. 19683–19690.
26. Hilfiker H., Strehler-Page M.A., Stauffer T.P., Carafoli E., Strehler E.E. Structure of the gene encoding the human plasma membrane calcium pump isoform 1 // *J. Biol. Chem.* – 1993. – 268. – P. 19717–19725.
27. Keeton TP, Burk SE, Shull GE. Alternative splicing of exons encoding the calmodulin-binding domains and C-termini of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isoforms 1,2,3, and 4. *J. Biol. Chem.* 1993;268:2740–2748.
28. Strehler EE, Caride AJ, Filoteo AG, Xiong Y, Penniston JT, Enyedi Á . Plasma membrane Ca^{2+} ATPases as dynamic regulators of cellular calcium handling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007;1099:226–236.
29. Dumont RA, Lins U, Filoteo AG, Penniston JT, Kachar B, Gillespie PG. Plasma membrane Ca^{2+} ATPase isoform 2a is the PMCA of hair bundles. *J. Neurosci.* 2001;21:5066–5078.
30. Caride A.J., Elwess N.L., Verma A.K., Filoteo A.G., Enyedi A., Bajzer Z., Penniston J.T. The rate of activation by calmodulin of isoform 4 of the plasma membrane Ca^{2+} -pump is slow and is changed by alternative splicing // *J. Biol. Chem.* –1999. – 274, N 49. – P. 35227-32.

31. Caride A.J., Penheiter A.R., Filoteo A.G., Bajzer Z., Enyedi A., Penniston J.T. The plasma membrane calcium pump displays memory of past calcium spikes. Differences between isoforms 2b and 4b / *J. Biol. Chem.* –2001. – 276, N 43. – P. 39797-804.
32. Gutierrez-Martin Y., Martin-Romero F. J., Henao F., Gutierrez-Merino C. Sytosomal plasma membrane Ca^{2+} pump activity inhibition by repetitive micromolar ONOO-pulses // *Free Radical Biol. Med.* – 2002. – 32, N. 1. – P. 46–55.
33. Monteith G. R., Wanigasekara Y., Roufogalis B. D. The plasma membrane calcium pump, its role and regulation: new complexities and possibilities // *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* – 1998. – 40. – P. 183–190.
34. Oliveira V. H., Nascimento K. S. O., Freire M. M., Moreira O. C., Scofano H. M., Barrabin H., Mignaco J. A. Mechanism of modulation of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase by arachidonic acid // *Prostagland. Lipid Mediators.* – 2008. – 87. – P. 47–53.
35. Cartwright E.J., Oceandy D., Austin C., Neyses L. Ca^{2+} signalling in cardiovascular disease: the role of the plasma membrane calcium pumps // *Science China.* – 2011. – 54, №8. – p. 691 – 698.
36. Liu L., Ishida Y., Okunade G., Pyne-Geithman G.J., Shull G.E., Paul R.J. Distinct roles of PMCA isoforms in Ca^{2+} homeostasis of bladder smooth muscle: evidence from PMCA gene-ablated mice // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* –2007. –292, N 1. – P. C423–431.
37. Okunade G.W., Miller M.L., Pyne G.J., Sutliff R.L., O'Connor K.T., Neumann J.C., Andringa A., Miller D.A., Prasad V., Doetschman T., Paul R.J., Shull G.E. Targeted ablation of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase (PMCA) 1 and 4 indicates a major housekeeping function for PMCA1 and a critical role in hyperactivated sperm motility and male fertility for PMCA4 // *J. Biol. Chem.* – 2004. – 279, N 32. – P. 33742-50.
38. Usachev Y.M., DeMarco S.J., Campbell C., Strehler E.E., Thayer S.A. Bradykinin and ATP accelerate Ca^{2+} efflux from rat sensory neurons via protein

- kinase C and the plasma membrane Ca^{2+} pump isoform 4 // *Neuron*. – 2002. – 33. – P. 113–122.
39. Ishida Y., Paul R.J. Ca^{2+} clearance in smooth muscle: lessons from gene-altered mice // *J. Smooth Muscle Res.* – 2005. – 41, N 5. – P. 235-45.
40. Noble D., Herchuelz A. Role of Na/Ca exchange and the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in cell function // *EMBO reports*. – 2007. – 8, N 3. – P. 228 – 232.
41. Monteith G. R., Roufogalis B. D. The plasma membrane calcium pump a physiological perspective on its regulation // *Cell Calcium*. – 1995. – 18. – P. 459-470.
42. Leva F.D., Domi T., Fedrizzi L., Lim D., Carafoli E. The plasma membrane Ca^{2+} -ATPase of animal cells: Structure, function and regulation // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2008. – 476, N 1. – P. 65 – 74.
43. Zhang J., Xiao P., Zhang X. Phosphatidylserine externalization in caveolae inhibits Ca^{2+} efflux through plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in ECV304 // *Cell Calcium*. – 2009. – 45. – P. 177–184.
44. Pang Y., Zhu H., Wu P., Chen J. The characterization of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in rich sphingomyelin-cholesterol domains // *FEBS Lett.* – 2005. – 579, N 11. – P. 2397-403.
45. Brini M., Carafoli E. Calcium pump in health and disease // *Physiol. Rev.* – 2009. – 89. – P. 1341-1378.
46. Giacomello M., Mario A., Scarlatti C., Primerano S., Carafoli E. Plasma membrane calcium ATPase and related disorders // *Internat. J. Biochem Cell Biol.* – 2012. – 45, N 3. – P. 753–762.
47. Schuh K., Quaschnig T., Knauer S., Hu K., Kocak S., Roethlein N., Neyses L. Regulation of vascular tone in animals overexpressing the sarcolemmal calcium pump. – *J. Biol. Chem.* – 2003. – 278, N 42. – P. 41246-52.
48. DeMarco S.J., Strehler E.E. Plasma membrane Ca^{2+} -atpase isoforms 2b and 4b interact promiscuously and selectively with members of the membrane-

- associated guanylate kinase family of PDZ (PSD95/Dlg/ZO-1) domain-containing proteins // *J. Biol. Chem.* – 2001. – 276, N 24. – P. 21594-600.
49. Kim E., DeMarco S.J., Marfatia S.M., Chishti A.H., Sheng M., Strehler E.E. Plasma Membrane Ca^{2+} ATPase Isoform 4b Binds to Membrane-associated Guanylate Kinase (MAGUK) Proteins via Their PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) Domains // *J. Biol. Chem.* – 1998. – 273, N3. – P. 1591–5.
50. DeMarco S.J., Chicka M.C., Strehler E.E. Plasma Membrane Ca^{2+} -ATPase Isoform 2b Interacts Preferentially with Na^+/H^+ Exchanger Regulatory Factor 2 in Apical Plasma Membranes // *J. Biol. Chem.* – 2002. – 277. – P. 10506-10511.
51. Goellner G.M., DeMarco S.J., Strehler E.E. Characterization of PISP, a novel single-PDZ protein that binds to all plasma membrane Ca^{2+} -ATPase b-splice variants // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2003. – 986. – P. 461-71.
52. Pászty K., Antalffy G., Penheiter A.R., Homolya L., Padányi R., Iliás A., Filoteo A.G., Penniston J.T., Enyedi A. The caspase-3 cleavage product of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase 4b is activated and appropriately targeted // *Biochem. J.* – 2005. – 391, Pt 3. – P. 687-92.
53. Кальченко В.І., Родік Р.В., Бойко В.І. Каліксарени. Перспективи медико-біологічного застосування // *Журнал органічної та фармацевтичної хімії.* – 2005. – 3, № 4. – С. 13-29.
54. Coleman A.W., Jebors S., Cecillon S. Toxicity and biodistribution of para-sulfonato-calix[4]arene in mice // *New. J. Chem.* – 2008. – 32. – P. 780-782.
55. Lalor R., Baillie-Johnson H., Redshew C., Matthews S.E., Mueller A. Cellular uptake of a fluorescent calix[4]arene derivative // *J. Am. Chem. Soc.* – 2008. – 130, N 10. – P. 2892–2893.
56. Palet M-H., Rousseau C.F., Yannick C., Morel F., Coleman A.W. An absence of non-specific immune response towards para-sulphonato-calix[n]arenes // *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry.* – 2006. – 55, N 3-4. – P. 353-357.

57. Т.О. Векліч, О.А. Шкрабак, С.О. Черенок, В.І. Кальченко, С.О. Костерін. Порівняльне дослідження впливу калікс[4]арену С-99 та його аналогів на Na^+, K^+ -АТР-азну активність у плазматичній мембрані міоцитів матки // Укр. біохім. журн. - 2012. - Т. 84, № 6. - С. 49-57.
58. Komisarenko S.V., Kosterin S.O., Lugovskoy E.V., Kalchenko V.I. Calixarene methylene bisphosphonic acids as promising effectors of biochemical processes // Укр. біохім. журн. – 2013. – 85, № 6. – С. 106–128.
59. Векліч Т.О., Шкрабак О.А., Родік Р.В., Кальченко В.І., Костерін С.О. Каліксарен С-107 збільшує спорідненість Na^+, K^+ -АТР-ази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин до убаїну // Укр. біохім. журн. - 2011. - 83, № 1. - С. 38–44.
60. Векліч Т., Шкрабак О., Мазур Ю. Активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТР-ази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин селективно пригнічується калікс[4]ареном С-90 // Вісник Львівського університету. - 2014. - вип. 68. - С. 337-347.
61. Фёгле Ф. Каликсарены // Химия комплексов «гость-хозяин». Синтез, структуры и применения / Фёгле Ф., Вебер Э. – Пер. с англ. – М.: Мир, 1988. – С. 445-502.
62. Sartori A. Calix[4]arene metal complexes as nuclease and transacylase mimics / Sartori A // A thesis in chemistry. MA thesis. – 2004. - P.1-191.
63. Kosterin, S.O., 2013. The effect of calixarene C-90 on the contractile activity of myometrium smooth muscles of rats. *Studia Biologica* 7, 3, 5-20.
64. Костерін С.О., Векліч Т.О., Прилуцький Ю.І., Бориско П.О. Кінетичне тлумачення своєрідної рН-залежності ферментативної активності „базальної” Mg^{2+} -АТР-ази сарколеми гладенького м'язу. Український біохімічний журнал. 2005, 77(6): 37-45.
65. Al-Nijji J., Andolf E., Laurini R., Batra S. Nitric oxide synthase activity in human trophoblast, term placenta and pregnant myometrium. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2003. Vol. 1, N 1. P. 51-58.

66. Hertelendy F., Zakar T. Regulation of myometrial smooth muscle functions. *Current Pharmaceutical Design*. 2004. Vol. 10, N 20. P. 2499-2517.
67. Luo Z., Zhao Y., Maa C. et al. Synthesis and anti-integrase evaluation of novel calix[4]arene derivatives containing the triazolyl 1,3-diketo moiety. *Chinese Chemical Letters*. 2014. Vol. 25, N 5. P. 737–740.
68. Komisarenko S.V., Kosterin S.O., Lugovskoy E.V., Kalchenko V.I. Calixarene methylene bisphosphonic acids as promising effectors of biochemical processes. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2013. T. 85, № 6. C. 106-128.
69. Yao Tian-Ming, Ye Zhi-Feng, Wang Li. et al. Supramolecular interaction between water-soluble calix[4]arene and ATP – the catalysis of calix[4]arene for hydrolysis of ATP. *Spectrochimica Acta. Part A*. 2002. Vol. 58. P. 3033-3038.
70. Jain M.K., Jahagirdar D.V. Effect of antituberculous calixarenes on phospholipase A₂ susceptibility and on fusion of phospholipid bilayers. *Biochemical Journal*. 1985. Vol. 227, N 3. P. 789-794.
71. Jin T., Kinjo M., Koyama T. et al. Selective Na⁺ Transport through Phospholipid Bilayer Membrane by a Synthetic Calix[4]arene Carrier. *Langmuir*. 1996. Vol. 12, N 11. P. 2684-2689.
72. Thallapally P.K., Lloyd G.O., Atwood J.L., Barbour L.J. Diffusion of water in a nonporous hydrophobic crystal. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*. 2005. Vol. 44, N 25. P. 3848-3851
73. Calixarene methylene bisphosphonic acids as promising effectors of biochemical processes / Komisarenko S [et al.] // *The Ukrainian Biochemical Journal*. – 2013. – Vol. 85, N 6. – P.106-128.
74. Consoli G.M.L., Galante E., Daquino C. et al. Hydroxycinnamic acid clustered by a calixareneplatform: radical scavenging and antioxidant activity. *Tetrahedron Letters*. 2006. Vol. 47, N 37. P. 6611-6614.
75. Applications of calixarenes in cancer chemotherapy: facts and perspectives / Abd Hamid S. [et al.] // *DDDT*. – 2015. – Vol. 9. – p. 2831-2838.

76. Viola S., Consoli G.M., Merlo S. et al. Inhibition of rat glioma cell migration and proliferation by a calix[8]arene scaffold exposing multiple GlcNAc and ureido functionalities. *Journal of Neurochemistry*. 2008. Vol. 107, N 4. P. 1047-1055.
77. Kondratuk T.P., Buchenuk S.F., Prichepa A.A., Babich L.H., Kurskiy M.D., Osipenko A.A. Allocation and characterization of membrane fraction plasma membrane myometrium. *Ukr. Biochem. J.* 1986;58(4):50-56. (In Ukrainian).
78. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analytical biochemistry*. – 1976. – Vol. 72. – P. 248-254.
79. Flynn E.R.M., Bradley K.N., Muir T.C., McCarron J.G. Functionally separate intracellular Ca^{2+} stores in smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(39): 36411-36418.
80. Valente R.C., Capella L.S., Monteiro R.Q. et al. Mechanisms of ouabain toxicity. *FASEB J.* 2003; 17(12): 1700-1702.
81. Wang H., Haas M., Liang M., Cai T., Tian J., Li S., Xie Z. Ouabain assembles signaling cascades through the caveolar Na^+/K^+ -ATPase. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(17): 17250-17259.
82. Veklich T.O., Kosterin S.O., Schinlova O.P. Cationic specificity of a Ca^{2+} -accumulating system in smooth muscle cell mitochondria. *Ukr. Biochem. J.* 2002;74(1):42-48. (In Ukrainian).
83. Rathbun W., Betlach V. Estimation of enzymically produced orthophosphate in the presence of cystein and adenosine triphosphate. *Anal. Biochem.* 1969; 28(1-3): 436-445.
84. Mikhailova M.V., Gontareva N.B., Nesterov V.P. The significance of adaptive modifications in the evolution. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 1992; 28(4): 447-453.
85. Magocsi M., Penniston J.T. Ca^{2+} or Mg^{2+} nucleotide phosphohydrolases in myometrium: two ecto-enzyme. *Biochim. Biophys. Acta.* 1991; 1070(1): 163-172.

86. Storn R, Price K (1997) Differential Evolution – A Simple and Efficient Heuristic for global Optimization over Continuous Spaces. *J Glob Optim* 11: 341–359.
87. Veklich T.O., Shkrabak A.A., Slinchenko N.N., Mazur I.I., Rodik R.V., Boyko V.I., Kalchenko V.I., Kosterin S.O. Calix[4]arene C-90 selectively inhibits Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase of myometrium cell plasma membrane. *Biochemistry (M)*. 2014; 79(5): 417-424.
88. Webb R. C. Smooth Muscle Contraction and Relaxation / R. C. Webb // *Advances in Physiology Education*. – 2003. – Vol. 27, № 4. – P. 201-206.