

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики

доц. Нипорко Олексій Юрійович

Протокол № \_\_\_\_ засідання кафедри

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

**ДОСЛІДЖЕННЯ МЕХАНІЗМІВ МОДУЛЯЦІЇ СКОРОЧУВАЛЬНОЇ  
АКТИВНОСТІ МІОМЕТРИЯ ЩУРІВ КАЛІКС[4]АРЕНОМ С-1193**

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра  
студента спеціальності 091 Біологія ОП:

«Біологія (високі технології)»

**Бондар Володимир Олександрович**

Науковий керівник

професор кафедри молекулярної

біотехнології та біоінформатики

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

Оцінка захисту роботи

---

Київ – 2024 р.

## ЗМІСТ

Анотація.....	2
Вступ.....	4
РОЗДІЛ I. Огляд літератури.....	6
1.1 Структурно-функціональні властивості тканини міометрія.....	6
1.2 Загальна характеристика $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФази плазматичної мембрани, її роль у функціонуванні клітин міометрія.....	9
1.3 Фізико-хімічні властивості калікс[4]аренів; калікс[4]арени-інгібітори $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФази – С-99 та С-107 .....	12
РОЗДІЛ II. Матеріали та методи досліджень.....	14
2.1 Тензометричні дослідження .....	14
2.2 Кінетичний аналіз викликаних скорочень.....	17
2.3 Кінетичний аналіз спонтанних скорочень.....	17
2.4 Статистична обробка.....	20
РОЗДІЛ III. Результати досліджень та їхнє обговорення.....	21
Висновки.....	31
Список використаних джерел.....	33

## Анотація

Бондар В.О. Дослідження механізмів модуляції скорочувальної активності міометрія щурів за блокування натрієвої помпи калікс[4]ареном С-1193. – Випускна кваліфікаційна робота бакалавра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Біологія (високі технології)».

Раніше дослідження відділу біохімії м'язів Інституту біохімії виявили, що калікс[4]арен С-1193 (аналог калікс[4]арену С-99) може інгібувати активність  $\text{Na}^+$  і  $\text{K}^+$ -АТФази плазматичної мембрани. У зв'язку з цим необхідно вивчити механізми регуляції скорочувальної активності міометрія щурів під впливом цієї сполуки. У дипломній роботі досліджували спонтанні та електро- та фармакомеханічні скорочення міометрія щурів, індуковані калікс[4]ареном С-1193 (10  $\mu\text{M}$ ), структурним аналогом калікс[4]арену С-99, який здатний блокувати  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазу мембрани. Було виявлено, що калікс[4]арен С-1193 сприяє спонтанному виникненню скорочень і підвищує індивідуальні характеристики максимальної сили, швидкості та імпульсу, які пов'язані з калікс[4]ареном С-1193. Виявлено, що зміни швидкості спонтанних скорочень не є специфічними для  $\text{Ca}^{2+}$  транспортних систем міоцитів, оскільки значення  $V_C$  і  $V_R$  нормалізовані на величину скорочень, то відмінності між ними та контрольними показниками є ліквідовано. Під час попередньої інкубації препаратів м'язів матки, які зберігалися подібним чином, як калікс[4]арен С-99, спостерігається подібне збільшення сили, швидкості та імпульсу. Калікс[4]арен С-1193 змінював параметри максимальної швидкості відповідей міометрія на ацетилхолін і окситоцин, на які не впливає амплітуда відповідей. Він зменшує тонічний компонент скорочення, спричинений гіперкаліємією, і збільшує типову максимальну швидкість фази скорочення ( $V_{nc}$ ). Результати дослідження вказують на те, що калікс[4]арен С-1193 має значний вплив на скоротливу поведінку міометрія, це може бути використано для розробки нових підходів до регуляції поведінки гладкої мускулатури.

**Ключові слова:** міометрій, калікс[4]арен С-1193,  $\text{Na}^+$  і  $\text{K}^+$ -АТФаза плазматичної мембрани, скорочення, механокінетичний аналіз.

## ВСТУП

Скорочувальна активність міометрія (м'язового шару матки) є важливим аспектом репродуктивного здоров'я, що впливає на такі процеси, як менструація, пологи та відновлення після пологів. Дисфункція міометрія може призвести до різноманітних станів, включаючи недоношеність, слабкість пологової діяльності та післяпологову кровотечу. Тому розуміння регуляторних механізмів скорочення міометрія має важливе клінічне значення. На сьогодні відомо, що  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-аза плазматичної мембрани відіграє ключову роль у підтримці іонного балансу та регуляції збудливості міоцитів матки. Інгібітори цього ферменту можуть впливати на скорочувальну активність міометрія, але механізм цього впливу до кінця не вивчений. Попередні дослідження відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України показали, що калікс[4]арен С-1193, який є аналогом калікс[4]арену С-99, володіє властивістю ефективного інгібітора  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази плазматичної мембрани. Це робить його перспективним інструментом для вивчення механізмів регуляції скорочувальної активності міометрія.

Вивчення регуляторних механізмів скоротливої активності міометрія за допомогою калікс[4]арену С-1193 є важливим з наступних причин:

1. Клінічне значення: Розуміння впливу інгібіторів  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази на скорочувальну активність міометрія допоможе розробити нові методи лікування репродуктивних патологій.

2. Наукова новизна: Вивчення впливу калікс[4]аренів на міометрій є новим напрямком у біохімії та фармакології, що відкриває можливості для нових наукових відкриттів. 3. Основне фундаментальне значення: Вивчення параметрів енергетичної та механічної динаміки скорочення міометрія під впливом калікс[4]арену С-1193 допоможе глибше зрозуміти фізіологію міометрія та механізм його регуляції.

**Метою** даної роботи було вивчення механізмів регуляції скоротливої активності міометрію щурів під впливом калікс[4]арену С-1193.

Для досягнення цієї мети було поставлено наступні **задачі**:

1. Дослідити спонтанну скорочувальну активність міометрія щурів за дії калікс[4]арену С-1193.

2. Здійснити повний механокінетичний аналіз динаміки спонтанних та індукованих скорочень міометрія.

3. В умовах блокування  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази плазматичної мембрани калікс[4]ареном С-1193 дослідити скорочення міометрія, спричинені деполяризацією плазматичної мембрани та агоністами збуджувальних рецепторів (окситоцином, ацетилхоліном).

## Розділ 1: ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Структурно-функціональні властивості тканини міометрія

#### 1.1.1. Теоретичні основи електроактивності та скоротливості міометрія

Скорочувальна здатність матки є прямим результатом електричної активності клітин міометрія. Спонтанна електрична активність м'язів матки складається з періодичних спалахів потенціалів дії. Об'єм матки (хронічне розширення) і гормони яєчників (переважно естроген) змінюють форму потенціалу дії, впливаючи на мембранний потенціал спокою. Один сплеск може спровокувати скорочення, але сильні та тривалі скорочення вимагають кількох, більш частотних, скоординованих спалахів. Потенціали дії в гладких м'язах матки виникають внаслідок залежних від мембранного потенціалу та часу змін іонної проникності мембрани. У поздовжніх і циркулярних м'язах матки фаза деполяризації спайок визначається внутрішніми струмами, що переносяться іонами  $\text{Ca}^{2+}$  і  $\text{Na}^{+}$ . У недоношених м'язах матки добре відоме «плато» потенціалу дії може бути наслідком комбінованих ефектів тривалих внутрішніх струмів  $\text{Ca}^{2+}$  або  $\text{Na}^{+}$  і знижених чутливих до напруги зовнішніх струмів. Основним механізмом підвищення рівня  $\text{Ca}^{2+}$  є канали L-типу, керовані потенціалом, які модулюються агоністами. Підвищення рівня  $\text{Ca}^{2+}$  призводить до утворення комплексу Ca-кальмодулін та активації кінази легкого ланцюга міозину. Він фосфорилує міозин і викликає скорочення. Na-Ca обмінник разом із Ca-АТФазою плазматичної мембрани видаляє  $\text{Ca}^{2+}$  з ефективністю 30% і 70% від загальної ефективності відповідно. Саркоплазматичний ретикулум сприяє релаксації, вивільняючи  $\text{Ca}^{2+}$  у вихідні іонні канали, а також збільшує швидкість цього процесу.

Вихідний струм, який викликає реполяризацію (детально вивчено поздовжньо та передбачено для циркулярного м'яза), переноситься іонами  $K^+$  і складається з швидкого (залежного від напруги) та повільного (активованого  $Ca^{2+}$ ) компонентів. Вважається, що саркоплазматичний ретикулум  $Ca^{2+}$  націлений на  $K^+$ -канали поверхневої мембрани, тим самим пригнічуючи збудливість і сприяючи розслабленню матки. Було також показано, що деякі білки контролюють електричні властивості міометрія.

Дослідження ізольованої м'язової тканини матки (з використанням мікроелектродів або позаклітинних електродів) продемонстрували зв'язок між електричними подіями та скороченнями. Частота, амплітуда і тривалість скорочень в основному визначаються частотою викиду матки, загальною кількістю клітин, одночасно активних під час викиду, і тривалістю викиду матки відповідно. Кожен спалах світла припиняється до того, як матка повністю розслабиться. Препарати, які безпосередньо стимулюють або пригнічують скорочення матки, змінюють електричні властивості, збудливість або провідність клітин міометрія.

### **1.1.2. Роль щілинних з'єднань у злагодженій діяльності міометрія**

Клітини міометрія електрично з'єднані одна з одною через щілинні з'єднання, що складаються з коннексинів. Ця група коннексинів забезпечує канали з низьким опором між клітинами, забезпечуючи шлях для ефективного проведення потенціалів дії. Протягом більшої частини вагітності у всіх досліджених видів ці міжклітинні канали або контакти розташовані низько, погано з'єднані та мають знижену провідність, що сприяє спокою м'язів і збереженню вагітності. Проте з початком вагітності клітинні зв'язки збільшуються та формується електросинцитій, який необхідний для координації ефективного скорочення клітин міометрія. Наявність впливу, здається, контролюється змінами рівнів естрогену та прогестерону в матці. Це було продемонстровано шляхом запису електричних подій (міоелектричних сигналів, або ЕМГ) від матки людини, отриманих з

поверхні живота під час вагітності. Протягом більшої частини вагітності матка відчуває помірну електричну активність, включаючи нечасті та низькоамплітудні електроміографічні спалахи. Коли припливи виникають перед пологами, вони зазвичай відповідають періоду, коли пацієнтка відчуває скорочення матки. Під час доношених і передчасних пологів спалахи активності ЕМГ є частими, великими за величиною та пов'язані зі значними змінами внутрішньоматкового тиску та відчуття болю.

### **1.1.3. Докази, що підтверджують клітини пейсмейкера**

Було проведено кілька досліджень, щоб спробувати знайти конкретні типи клітин, які могли б виконувати роль кардіостимуляторів у матці людини. Поки що їх не знайдено. Таким чином, було припущено, що спонтанна електрична поведінка міометрія є внутрішньою властивістю гладком'язових клітин міометрія. Хоча деякі останні електрофізіологічні дослідження кардіостимуляторів продемонстрували потенціал кардіостимуляторів, які, як видається, походять від імплантованих міоцитів, було проведено кілька прямих досліджень цієї гіпотези. Концепція змінного пейсмейкера матки обговорювалася протягом багатьох років і виникла внаслідок того, що конкретний кардіостимулятор ще не був виявлений. Мабуть, будь-яка м'язова клітина міометрія здатна виконувати роль пейсмейкера або пейсмейкера. Нещодавно ці ідеї були підтверджені, принаймні у віртуальному сенсі, завдяки успішному відтворенню спостережуваних дій матки за допомогою модельованої моделі міометрія, в якій можна було змінювати ступінь поширення електричного сигналу, а також струм пейсмейкера. Коли активність пейсмейкера генерується випадковим чином по всій моделі, виходять стійкі та сильні скорочення (схожі на скорочення матки, що почала пологи). Деякі ранні дослідження показують, що епілепсія може мати основний напрямок

поширення в матці людини. Через геометричні та фізичні причини вигнання плоду може бути полегшено, якщо сутички виникають під час активних пологів. Переважно поширюється від дна матки до перешийка. Це підтверджує ідею про те, що хоча окремі типи клітин пейсмейкера можуть бути відсутні, загальні сайти пейсмейкера можуть бути присутніми пізніше під час вагітності. Але наразі немає чітких прямих доказів того, що вони існують у людей, але, можливо, цю ідею слід переглянути за допомогою більших досліджень, які вивчатимуть дно матки та перешийок, шукаючи регіональні електрохімічні відмінності, такі як іонний струм, потенціал клітини спокою), як пороговий потенціал, щільність щілинного з'єднання тощо) і, можливо, навіть відмінності в концентраціях гормонів або білка в різних частинах матки можуть відповідати за явище спрямованого розмноження на пізніх термінах вагітності.

## **1.2. Загальна характеристика $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФази плазматичної мембрани, її роль у функціонуванні клітин міометрія**

$\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза (натрій-калієва аденозинтрифосфатаза) є ключовим ферментом плазматичної мембрани і відіграє важливу роль у підтримці іонного балансу та мембранного потенціалу клітин. Він активно транспортує іони натрію ( $\text{Na}^+$ ) і калію ( $\text{K}^+$ ) через плазматичну мембрану за рахунок енергії, що утворюється під час гідролізу АТФ.

Механізм дії  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази 1.

1. Структура:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза складається з двох основних субодиниць:  $\alpha$  і  $\beta$ .  $\alpha$ -субодиниця містить каталітичний центр, де відбувається гідроліз АТФ і транспорт іонів, а  $\beta$ -субодиниця відіграє роль у стабілізації комплексності та правильної функції ферменту.

2. Функція: у циклі гідролізу молекули АТФ фермент активно транспортує три іони натрію від клітини до клітини та два іони калію в

клітину, створюючи таким чином різні фізіологічні функції. Дуже важливий електрохімічний градієнт.

### **Роль у функціонуванні міоцитів матки**

1. Мембранний потенціал:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза може підтримувати мембранний потенціал, що є вирішальним для електричної збудливості клітин міометрія. Цей потенціал необхідний для ініціації та проведення електричних імпульсів, які контролюють скорочення гладкої мускулатури матки.

2. Регуляція об'єму клітин: ферменти відіграють важливу роль у контролі об'єму клітин і підтримці осмотичного балансу. Це особливо важливо для міоцитів матки, оскільки зміни об'єму клітин можуть впливати на їх функціональну активність.

3. Кальцієвий гомеостаз:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза впливає на роботу інших іонних насосів та обмінників, особливо  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  обмінника. Підтримка градієнта іонів  $\text{Na}^+$  важлива для ефективного видалення  $\text{Ca}^{2+}$  з клітин, що має вирішальне значення для регуляції концентрації кальцію, який відіграє ключову роль у скороченні м'язів.

4. Процес обміну речовин: активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази потребує споживання великої кількості енергії у вигляді АТФ. Це забезпечує тісний зв'язок між транспортом іонів і клітинним метаболізмом, дозволяючи метаболічним процесам адаптуватися до змін іонного гомеостазу

### **Вплив гормонів на функцію міометрія**

1. Прогестерон: прогестерон збільшує потенціал спокою та дезактивує насос  $\text{Na}^+$  (прогестеронова блокада). Інгібуючий ефект прогестерону на скорочення більший у невагітній матці та послаблюється під час вагітності.

2. Естроген: Естроген збільшує потенціал спокою м'язових клітин за рахунок збільшення внутрішньоклітинного  $K^+$  і в той же час підвищує концентрацію креатинфосфату, актину та міозину, а також активність АТФ-ази, тим самим збільшуючи швидкість передачі стимулу. Це готує міометрій до активного родового процесу в останньому триместрі вагітності.

3. Окситоцин: Окситоцин знижує потенціал спокою і підвищує здатність міометрія до стимуляції. Однак під впливом окситоцину швидкість подачі стимулу знижується.

4. Простагландини: простагландини, як і окситоцин, знижують потенціал спокою клітини, сприяючи транспорту іонів  $Ca^{2+}$  через клітинну мембрану, що призводить до деполяризації.

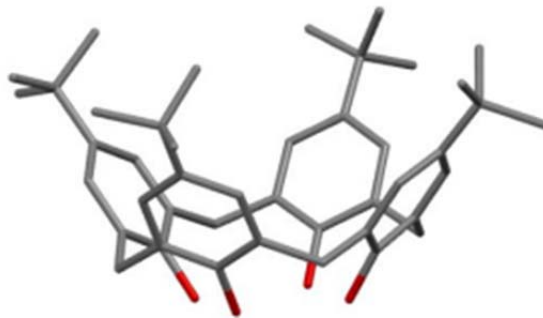
### **Перехід від розслабленого стану до скороченого**

Ближче до кінця вагітності матка переходить із стану спокою без скорочень у стан активного скорочення, щоб вигнати плід. Спокій матки залежить від підтримки мембранного потенціалу спокою гладком'язових клітин матки людини (hMSMC) на достатньо негативному рівні, щоб запобігти надходженню надлишку кальцію ( $Ca^{2+}$ ) через напругозалежні кальцієві канали (VDCC). Протягом більшої частини вагітності домінуючий вихідний струм  $K^+$  підтримує клітини на достатньо негативному мембранному потенціалі, щоб запобігти передчасним скороченням матки. Під час пізньої вагітності змінюється баланс струмів відтоку  $K^+$  і  $Na^+$ , що спричиняє деполяризацію та скорочення матки.

$Na^+$  і  $K^+$ -АТФаза є ключовими елементами підтримки нормальної функції міоцитів матки, забезпечуючи електрофізіологічні умови для їх активності, регуляції об'єму клітин і гомеостазу кальцію, в кінцевому підсумку впливаючи на скорочувальну здатність гладкої мускулатури матки.

### 1.3. Фізико-хімічні властивості калікс[4]аренів; калікс[4]арени-інгібітори $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФази – С-99 та С-107

Каліксарени - це хімічні сполуки, які складаються з макроциклічного каркасу та мають чашоподібну структуру. Ці сполуки отримують шляхом циклоконденсації пара-заміщених фенолів з формальдегідом. Вони складаються з фенольних компонентів, з'єднаних метиленовими зв'язками.



Схематична структура калікс[4]аренів

Склад каліксаренів має верхній капелюх, центральну частину ароматичного арена, який фрагментований, і нижній капелюх, який містить гідрокси- або алкокси-групи. Вони мають низьку токсичність і імуногенність і вже можуть бути отримані відомими методами. Крім того, каліксарени мають здатність проникати через плазматичні мембрани клітини, і вони здатні створювати нові селективні інгібітори та активатори внутрішніх хімічних процесів завдяки своїй здатності змінювати функціональність специфічних білків. Їх можна використовувати як замітники ферментів, які моделюють складні хімічні процеси.

Раніше було продемонстровано, що калікс[4]арени С-99 і С-107 ефективно блокують здатність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази відкачувати калорії, але не впливають на активність  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФази в плазматичній мембрані.

Дослідження показали, що ці сполуки зменшують активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази залежно від дози, і вони ефективніші за інші відомі інгібітори: значення  $\text{I}_{0,5}$  для цих сполук менше 0,1 мкМ. Виявлено, що структурні компоненти калікс[4]арена С-107 мають широкий діапазон концентрацій і майже не впливають на активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази та  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФази в плазмі мембрани. У результаті інгібуючу дію калікс[4]арену С-107 пояснюють спільною дією двох амінофосфонових груп, які орієнтовані на каліксаренову платформу, а не ізольованою присутністю тетрафенольного фрагмента чи окремого амінофосфонового залишку.

## РОЗДІЛ II. Матеріали та методи досліджень

Досліди проводили на щурах лінії Wistar (середня маса тварин 200-250 г). Тварин утримували в стандартних умовах середовища (температура  $20 \pm 2$  градуси Цельсія, відносна вологість повітря 50-70%, світловий режим світло:темрява = 12:12 годин), їх годівля була стандартною. Щурів умертвляли, зміщуючи шийні хребці для введення в наркоз, що призвело до евтаназії тварин. Усі дослідження проводились відповідно до вимог біоетики, зокрема Гельсінської декларації (Всесвітня медична асамблея, 1964 р.), Європейської конвенції про захист хребетних тварин для дослідницьких та інших наукових цілей (Страсбург, 1986 р.).

### 2.1. Тензометричні дослідження

Дослідження з використанням тензометра проводилися на вісцеральних гладких м'язах матки щурів. Щоб дослідити скорочувальну поведінку гладкої мускулатури рогів матки, використовували препарати, приготовані шляхом поздовжнього розрізання оваріальної частини рогів матки на смужки, залишаючи ендотеліальний шар недоторканим. М'язові смужки середнього розміру ( $2 \times 10$  мм) вставляли в 2-мл камеру, яка містила проточний розчин Кребса зі швидкістю потоку 5 мл/хв і підтримувалася при  $37^\circ\text{C}$ . До препарату застосовували пасивний тиск 10 мН і залишали на одну годину для досягнення відтворюваної картини спонтанних скорочень, після чого ці скорочення реєстрували та аналізували. Активність скорочувальних м'язів досліджували в ізометричному режимі за допомогою тензодатчика, підключеного до датчика сили, потім сигнали реєстрували за допомогою пристрою аналого-цифрового перетворювача (Рис. 2.1).

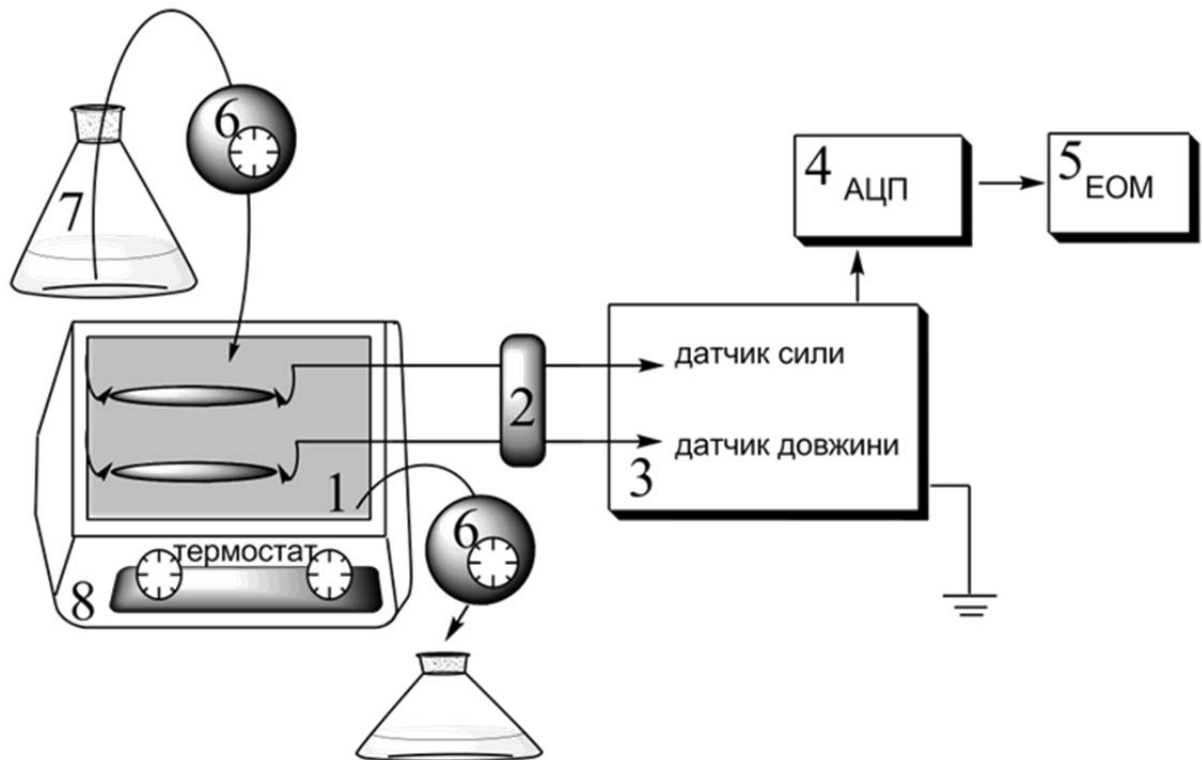


Рис. 2.1. Блок-схема устаткування для тензометричних експериментів на багатоклітинних препаратах гладеньких м'язів: 1 - робоча камера, заповнена робочим розчином, з гладеньком'язовими препаратами, які закріплено на гачках; 2 – датчики сили (за умови реєстрації в ізометричних умовах) та переміщення (за умови реєстрації в ізотонічних умовах); 3 – підсилювач; 4 – аналого-цифровий перетворювач (АЦП); 5 – комп'ютер (ЕОМ); 6 – перестальтичні насоси; 7 – набір робочих розчинів; 8 – рідинний термостат.

Препаративні процедури і тензометричні досліді проводили в розчині Кребса, до складу якого входили: 5,9 мМ КСl; 1,2 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 15,5 мМ  $\text{NaHCO}_3$ ; 120,4 мМ  $\text{NaCl}$ ; 2,5 мМ  $\text{CaCl}_2$ ; 1,2 мМ  $\text{MgCl}_2$ ; 11,5 мМ глюкози; рН розчину становив 7,4. Експерименти проводили відповідно до наступного протоколу: після 20-хвилинної попередньої інкубації з калікс[4]ареном С-1193 (10 мкМ) спонтанні скорочення спостерігали протягом 10-20 хвилин з метою механокінетичного аналізу.

Ацетилхолін («Sigma», США) використовували в концентрації 10 мкМ; його готували безпосередньо перед початком досліді в розчині Кребса. Щоб

мінімізувати вплив ацетилхолінестерази, перші два спонтанні скорочення після застосування ацетилхоліну були розглянуті для аналізу, механокінетичні властивості яких були усереднені та використані як одне значення даних у зразку.

Окситоцин («Гедеон Ріхтер», Угорщина) використовували у концентрації 0,1 МО.

Калікс[4]арен С-1193 був синтезований під керівництвом та за участі академіка НАНУ В.І. Кальченка у відділі хімії фосфоранів Інституту органічної хімії НАН України. Калікс[4]арен попередньо розчиняли в ДМСО та вносили в розчин Кребса так, щоб остаточною аліквота розчину органічного розчинника становила 0,1 % від загального об'єму розчину Кребса. Контрольні скорочення досліджували в розчинах, які містили 0,1 % ДМСО.

Експерименти були побудовані за схемою: після 10 хв передінкубації з калікс[4]ареном С-1193 (10 мкМ) упродовж 20 хв реєстрували спонтанні скорочення для механокінетичного аналізу, після чого активували скорочення агоністами.

Ми вивчали механокінетичні параметри скорочень міометрія щурів, використовуючи активатори скорочень з різними механізмами дії: деполяризацію плазматичної мембрани гладеньких м'язових клітин за допомогою гіперкалієвого розчину (80 мМ), активацію окситоцинових рецепторів — утеротоніком окситоцином (0,1 МО) та стимуляцію мускаринових холінорецепторів — нейротрансмітером ацетилхоліном ( $10^{-5}$  М). Важливо зазначити, що в цій тканині обидва згадані агоністи активують рецептори, пов'язані з Gq/11-білками, і викликають скорочення через ІТФ-залежний шлях.

Для дослідження з калікс[4]ареном С-1193, препарати міометрія щурів були піддані дії наступних активаторів:

1.  $K^+$ -індукована деполяризація (80 мМ) — для виклику скорочувальної відповіді.
2. Окситоцин (0,1 МО) — для активації окситоцинових рецепторів.

3. Ацетилхолін ( $10^{-5}$  М) — для стимуляції мускаринових холінорецепторів.

$K^+$ -індукована деполяризація (80 мМ) з калікс[4]ареном С-1193.

## 2.2. Кінетичний аналіз викликаних скорочень

Аналіз кінетичних властивостей викликаних скорочень здійснювали згідно з методом Костеріна-Бурдиги. У процесі аналізу розраховували незалежні від амплітуди скоротливих відповідей показники – нормовані на амплітуду максимальні швидкості фаз скорочення ( $V_{nc}$ ) та розслаблення ( $V_{nr}$ ). Для аналізу використовували викликані скорочення, зареєстровані у інтервалі 20-30 хв від початку аплікування тіакалікс[4]арену С-1193.

## 2.3. Кінетичний аналіз спонтанних скорочень

Аналіз кінетичних закономірностей скорочень здійснювали відповідно до методу Костеріна із розрахунком параметрів укорочення ( $\Delta L_{max}$ ,  $\Delta L_C$  та  $\Delta L_R$ ), часових ( $\tau_0$ ,  $\tau_C$  і  $\tau_R$ ), швидкісних ( $V_C$  і  $V_R$ ) та енергетичних ( $\Delta A\tau_C$ ,  $N_{max}$  і  $N_m$ ) параметрів.

Аналогічно до теоретичних основ методу багатопараметричного аналізу, попередньо апробованого до скорочувальних відповідей гладеньких м'язів (ГМ) за ізометричного режиму реєстрації, нами було прийнято, що в ізотонічному режимі реєстрації типова механокінетична крива зміни довжини  $\Delta L = \Delta L(t)$  процесу укорочення-розслаблення ГМ характеризується двома точками перегину на рівні фази укорочення (від початкового значення довжини препарату  $L_0$ ) – координати –  $\Delta L_C$ ;  $\tau_C$ , та фази розслаблення –  $\Delta L_R$ ;  $\tau_R$ , де  $\Delta L$  та  $\tau$  – відповідно значення зміни довжини  $\Delta L$  та часу  $t$  в точках перегину ( $(d^2\Delta L/dt^2)_{\tau_C, \tau_R} = 0$ ), а також точкою екстремуму – максимуму  $\Delta L_{max}$  довжини препарату в момент часу  $t=\tau_0$  ( $d\Delta L/dt)_{\tau_0}=0$ ) (рис. 2.2).

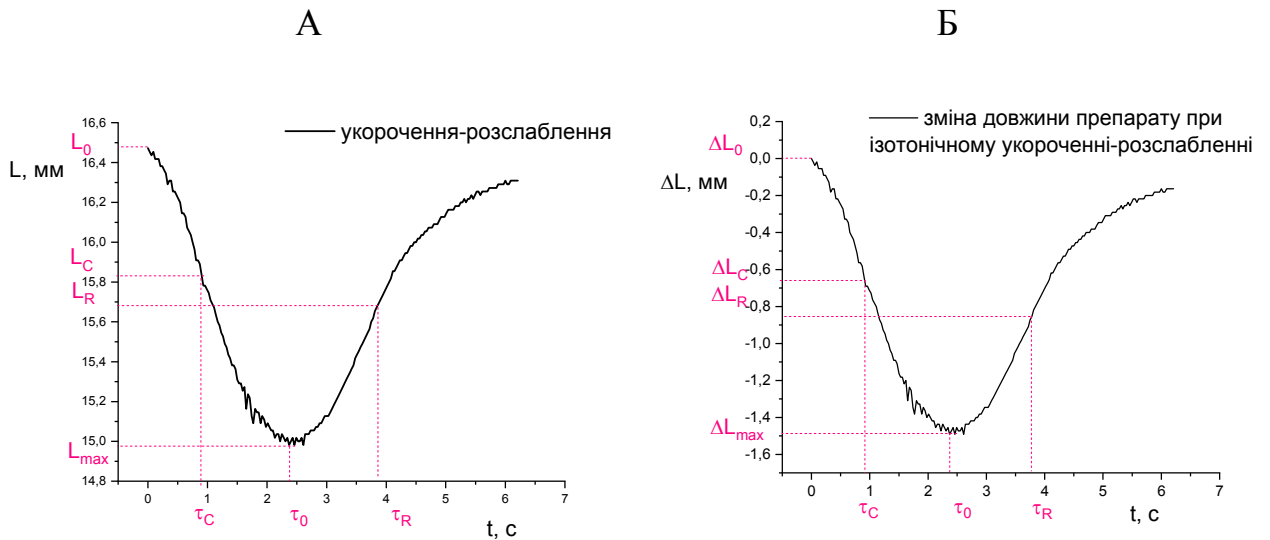


Рис. 2.2. А - типова повна ізотонічна механокінетична крива спонтанного процесу укорочення-розслаблення гладеньких м'язів *uterus* щурів. Тут  $L$  та  $t$  – миттєві значення довжини та часу на рівні циклу укорочення-розслаблення,  $L_0$  – початкове значення довжини м'язового препарату перед укороченням (за умови постійного навантаження препарату на рівні 10 мН),  $\Delta L_C$  та  $\Delta L_R$  – значення відносного укорочення препарату в точках перегину  $(d^2\Delta L/dt^2)_{\tau_C, \tau_R} = 0$  на рівні фаз укорочення та розслаблення в моменти часу  $\tau_C$  та  $\tau_R$ , відповідно,  $\Delta L_{max}$  – максимальне значення укорочення  $\Delta L$  в момент часу  $\tau_0$  ( $(d\Delta L/dt)_{\tau_0} = 0$ ). Б – та ж ізотонічна крива у координатах  $\{\Delta L ; t\}$ .

Експериментальні ізотонічні механокінетичні криві укорочення-розслаблення ГМ достовірно апроксимувались лінійною функцією у координатах  $\left[ \ln\left(\frac{\Delta L_R}{\Delta L_C}\right); \ln\left(1 + \frac{\Delta t}{t}\right) \right]$ . Так, для кривої, наведеної на рис.2.2, величина коефіцієнта  $R^2$  становить 0.99 (рис. 2.3).

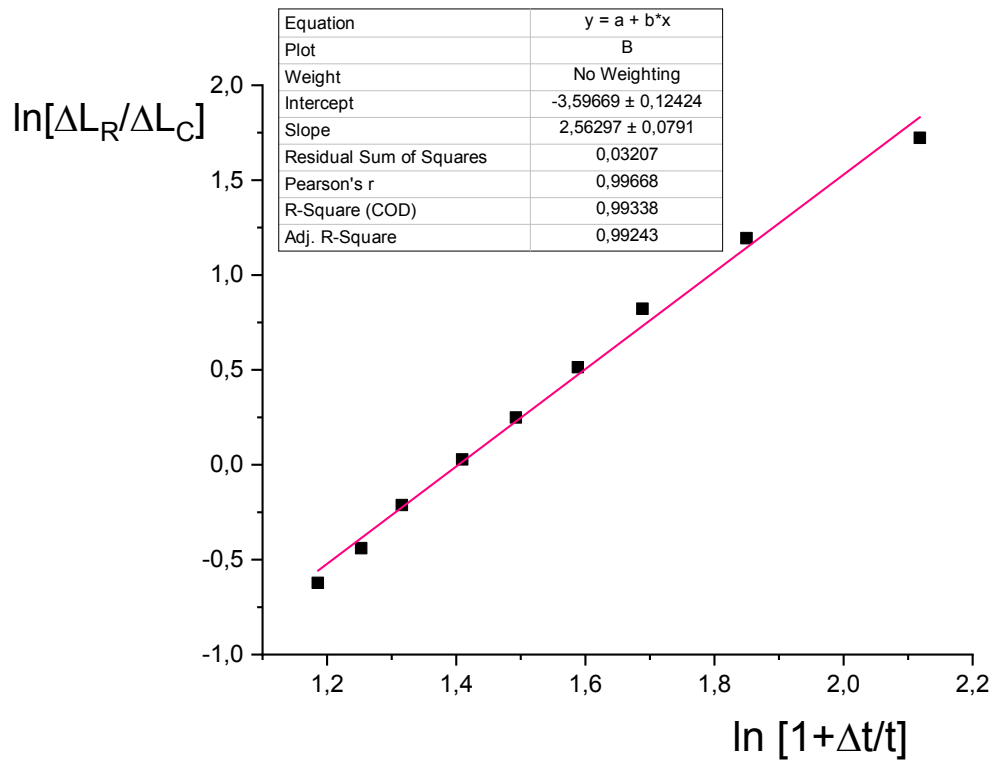


Рис. 2.3. Механокінетичний аналіз спонтанної ізотонічної скоротливої відповіді міометрія щурів (оригінальна механограма наведена на рис.2.2).

Таким чином, відповідно до результатів, наведених на рис. 2, можна стверджувати, що наступне рівняння (1) коректно описує також і повну ізотонічну механокінетичну криву укорочення-розслаблення ГМ:

$$\Delta L = \Delta L_{max} \cdot \left(\frac{kt}{n}\right)^n \cdot e^{n-kt} . \quad (1)$$

Було розраховано окремі параметри процесу спонтанного укорочення-розслаблення за формулами, адаптованими до ізотонічної механограми:

1) для значення часу  $\tau_0$ :

$$\tau_0 = \frac{n}{k} , \quad (2)$$

2) для значення часу  $\tau_C$ :

$$\tau_C = \frac{n-\sqrt{n}}{k} ; \quad (3)$$

3) для значення часу  $\tau_R$ :

$$\tau_R = \frac{n+\sqrt{n}}{k} ; \quad (4)$$

4) для фази укорочення  $\Delta L = \Delta L_C$  в точці перегину ( $t = \tau_C$ ):

$$\Delta L_C = \Delta L_{max} \cdot \left(\frac{n-\sqrt{n}}{n}\right)^n \cdot e^{\sqrt{n}} ; \quad (5)$$

5) для швидкості укорочення  $V=V_C$  в цій точці:

$$V_C = k \cdot \Delta L_{max} \cdot \left(\frac{n-\sqrt{n}}{n}\right)^{n-1} \cdot \frac{e^{\sqrt{n}}}{\sqrt{n}} ; \quad (6)$$

6) для сили  $\Delta L=\Delta L_R$  в точці перегину ( $t=\tau_R$ ) на рівні фази розслаблення ізотонічної кривої:

$$\Delta L_R = \Delta L_{max} \cdot \left(\frac{n+\sqrt{n}}{n}\right)^n \cdot e^{-\sqrt{n}} ; \quad (7)$$

7) для швидкості розслаблення  $V_R$  в цій точці:

$$V_R = -k \cdot \Delta L_{max} \cdot \left(\frac{n+\sqrt{n}}{n}\right)^{n-1} \cdot \frac{e^{-\sqrt{n}}}{\sqrt{n}} ; \quad (8)$$

## 2.4. Статистична обробка

Дані обробляли методами варіаційної статистики із використанням програми Origin 2018. Перевірку вибірок на їх приналежність до нормально розподілених генеральних сукупностей здійснювали за допомогою критерію Шапіро-Уїлка. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами вибірок використовували t-тест для залежних вибірок. У всіх випадках достовірними вважали результати за умови значення ймовірності  $p$ , менше 5% ( $p < 0.05$ ). Аналіз достовірності апроксимації даних лінійною функцією здійснювали із використанням F-критерію Фішера; коефіцієнти детермінації ( $R^2$ ) були не нижчими за 0,9. Результати представлені як середнє арифметичне  $\pm$  стандартна похибка середнього,  $n$  – кількість дослідів.

## РОЗДІЛ III. Результати досліджень та їхнє обговорення

### 3.1. Дослідження механокінетики ізотонічних спонтанних укорочень міометрія щурів за дії калікс[4]арену С-1193

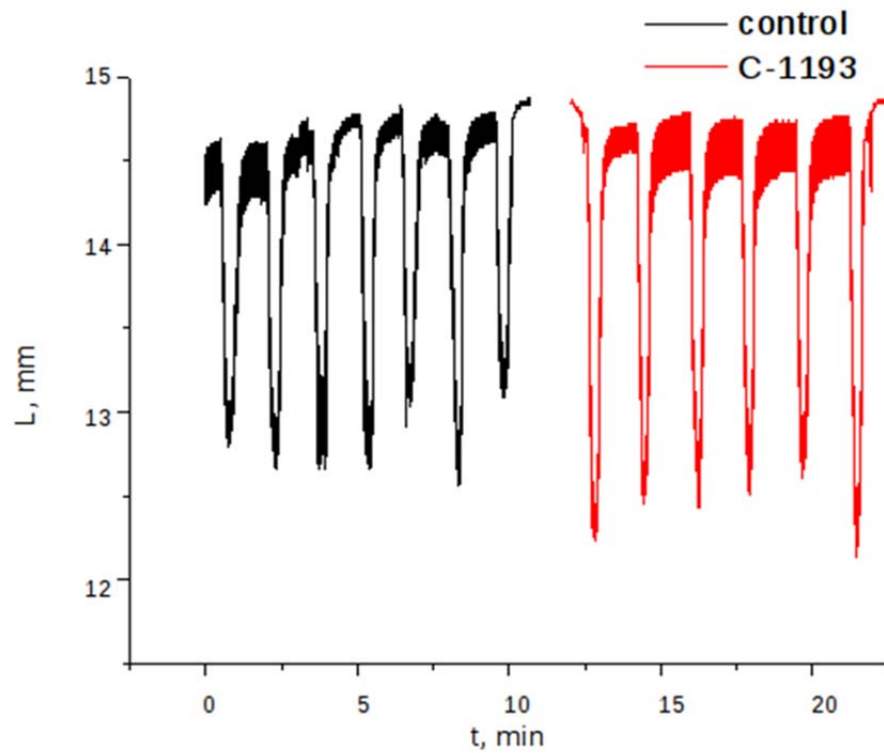
Виявлено, що високоселективний інгібітор  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази калікс[4]арен С-1193 зменшує амплітуду ізометричних спонтанних скорочень, змінюючи при цьому їх кінетику, зменшуються сила, швидкість та імпульсні параметри скорочення-розслаблення, збільшується частота двигуна. Метою цього дослідження є вивчення впливу калікс[4]арену С-1193 на механобіологію гладкої мускулатури матки щурів у фізіологічному діапазоні ізотонічності.

Спонтанно виникла активність гладкої мускулатури в маткових трубах щурів із збереженим ендометрієм задокументована в ізотонічному режимі при вазі 10 мН. Калікс[4]арен С-1193 використовували в концентрації 10  $\mu\text{M}$ . Кінетичний аналіз скорочень (10 хвилин застосування С-1193) включав час, швидкість, тривалість імпульсу та тривалість скорочення відповідно до методу множинного аналізу параметрів.

Виявлено, що на відміну від ізометричного режиму реєстрації скорочувальної активності, в ізотонічних умовах калікс[4]арен С-1193 суттєво впливає на спонтанне вкорочення препаратів міометрія (рис.3.1). У результаті середнє збільшення амплітуди вкорочення становило

$129,0 \pm 6,8 \%$  ( $n=5$ ,  $p<0,05$ ). Однак слід звернути увагу на тенденцію до спонтанного зменшення частоти скорочення в контексті С-1193.

А



Б

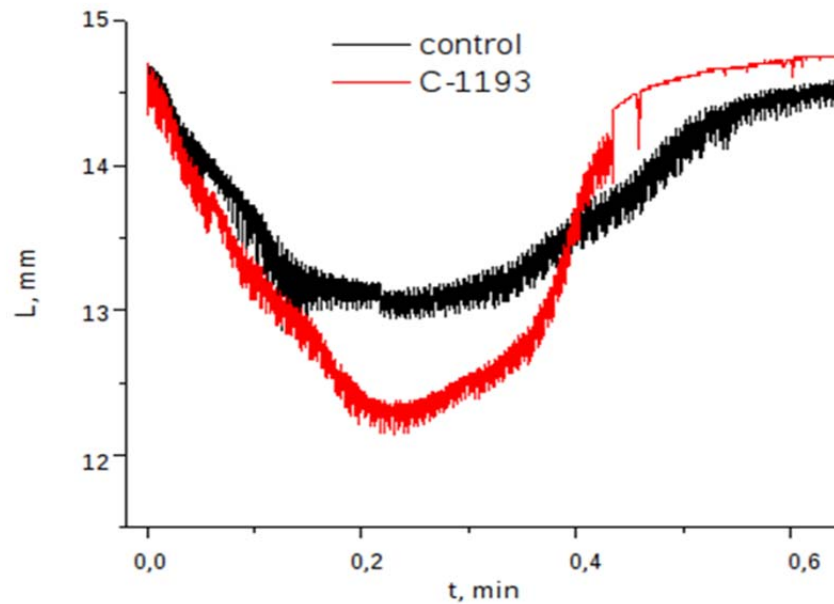


Рис. 3.1. Типові механограми спонтанних ізотонічних укорочень поздовжніх гладеньких м'язів рогів матки щурів у контролі та на тлі калікс[4]арену С-1193 (10  $\mu$ M): А – запис спонтанних активностей упродовж 10 хв; Б – співставлення трендів окремих укорочень-розслаблень у контролі та за дії С-1193.

Надалі до окремих циклів укорочення-розслаблення (у контролі та за дії С-1193) було застосовано метод комплексного механокінетичного аналізу. Встановлено, що за сполука С-1193 індукує збільшення параметрів укорочення: максимального укорочення ( $\Delta L_{\max}$ ) і укорочень в точках перегину  $\Delta L_C$  та  $\Delta L_R$  (Рис. 3.2 А).

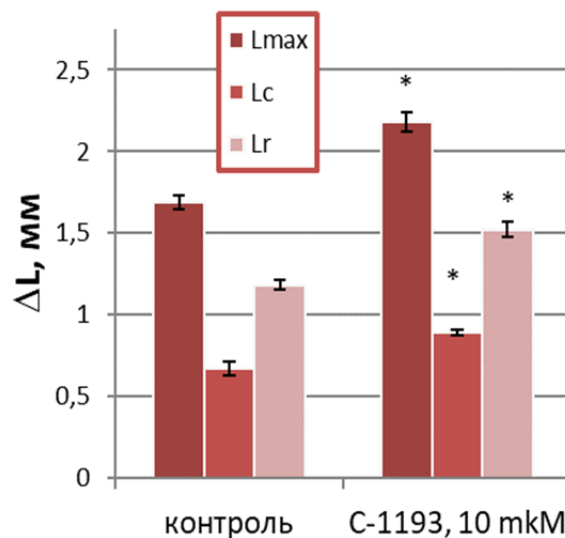


Рис. 3.2 А. – часові параметри ( $\tau_0$ ,  $\tau_C$  і  $\tau_R$ );

Так, за дії С-1193 параметри  $\Delta L_{\max}$ ,  $\Delta L_C$  та  $\Delta L_R$  у середньому склали відповідно:  $129,0 \pm 2,8$  %,  $132,8 \pm 2,3$  % та  $128,8 \pm 3,0$  % (у всіх випадках  $n=5$ ,  $p<0.05$ ).

За даних умов показники часових параметрів амплітуди ( $\tau_{\max}$ ) і характеристичних часів укорочення і розслаблення ( $\tau_C$  і  $\tau_R$ ) залишались на контрольному рівні та становили, відповідно:  $88,1 \pm 4,0$  %,  $92,5 \pm 5,4$  % і  $91,5 \pm 4,1$  % (у всіх випадках  $n=5$ ,  $p>0.05$ ) (Рис. 3.2 Б).

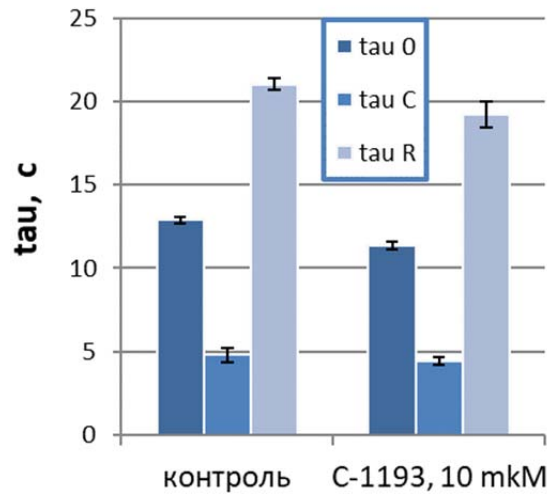


Рис. 3.2 Б - параметри укорочення ( $\Delta L_{\max}$ ,  $\Delta L_C$  та  $\Delta L_R$ )

Найбільших змін за дії калікс[4]арену С-1193 зазнавали параметри швидкості фаз скорочення ( $V_C$ ) і розслаблення ( $V_R$ ) (Рис. 3.2 В).

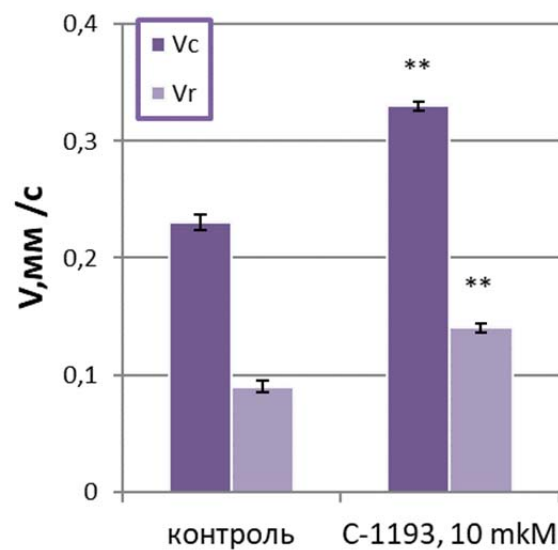


Рис. 3.2 В - швидкісні параметри ( $V_C$  і  $V_R$ )

Так, на тлі 10  $\mu\text{M}$  цієї сполуки параметри  $V_C$  і  $V_R$  у середньому склали  $143,5 \pm 3,1 \%$  та  $155,6 \pm 2,9 \%$  щодо контролю відповідно (у обох випадках  $n=5$ ,  $p<0.01$ ). Втім, важливо, що зміни обох параметрів максимальних швидкостей повністю (до статистично незначущих) нівелювалися нормуванням їх на амплітуду укорочень (Рис. 3.2 Г).

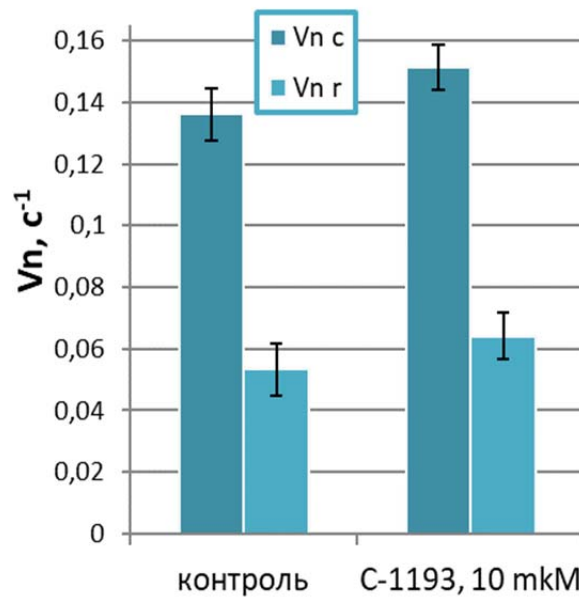


Рис. 3.2 Г – нормовані максимальні швидкості фаз скорочення і розслаблення ( $Vn_c$  і  $Vn_r$ ).  $n = 5$ ; \* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.01$  – різниця достовірна щодо контролю.

Зміни в рухливості міометрія, спричинені калікс[4]ареном С-1193, можна пояснити наступним чином. Спочатку амплітуда спонтанних скорочень зростала без зміни їх частоти. Це пов'язано з блокуванням  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФази, що, ймовірно, спричиняє активізацію  $Na^+/Ca^{2+}$  обміну, збільшуючи концентрацію  $Ca^{2+}$  у міоплазмі. Крім параметрів амплітуди, параметри швидкості ( $V_C$  і  $V_R$ ) продемонстрували значні зміни. Швидкість міоплазматичного скорочення пояснюється надходженням  $Ca^{2+}$  в міоплазму, тоді як швидкість міоплазматичного розслаблення зумовлена екструзією  $Ca^{2+}$  через плазматичну мембрану та секвестрацією  $Ca^{2+}$  в саркоплазматичний ретикулум і мітохондрії. Під впливом С-1193 обидві швидкості ( $V_C$  і  $V_R$ ) зростали з однаковою швидкістю, а амплітуда скорочень не відрізнялася від контрольної. Як наслідок, зміни параметрів швидкості, індуковані С-1193, не є специфічними для окремих систем транспорту  $Ca^{2+}$  в міоцитах.

### 3.2. Дослідження активованих гіперкалієвою деполяризацією плазматичної мембрани міоцитів ізотонічних укорочень міометрія щурів за дії калікс[4]арену С-1193

Попередні дослідження показали, що калікс[4]арен С-1193 активує спонтанну скорочувальну активність міометрія. Щоб дослідити його вплив на процеси спряження збудження-скорочення, ми тестували скорочення гладеньком'язових препаратів, активованих гіперкалієвим розчином (ГКР, 80 мМ).

Встановлено, що передінкубація м'язів з С-1193 протягом 30 хв збільшувала амплітуду фазного (до  $115,1 \pm 3,4 \%$ ,  $n=5$ ,  $p < 0.05$ ) і тонічного (до  $122,4 \pm 3,7 \%$ ,  $n=5$ ,  $p < 0.05$ ) компонентів ГКР-активованого укорочення.

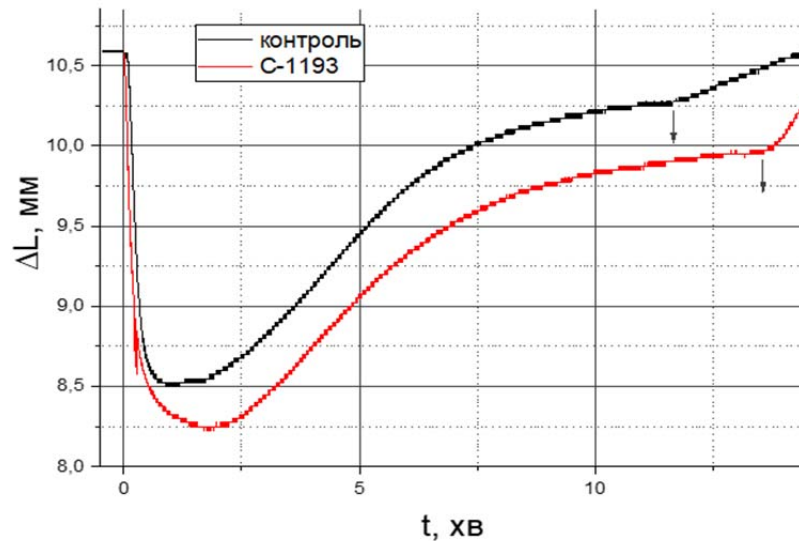


Рис. 3.3 Типові механограми ізотонічних укорочень поздовжніх гладеньких м'язів рогів матки щурів у контролі та на тлі калікс[4]арену С-1193 (10  $\mu$ М), активованих аплікуванням гіперкалієвого (80 мМ) розчину.

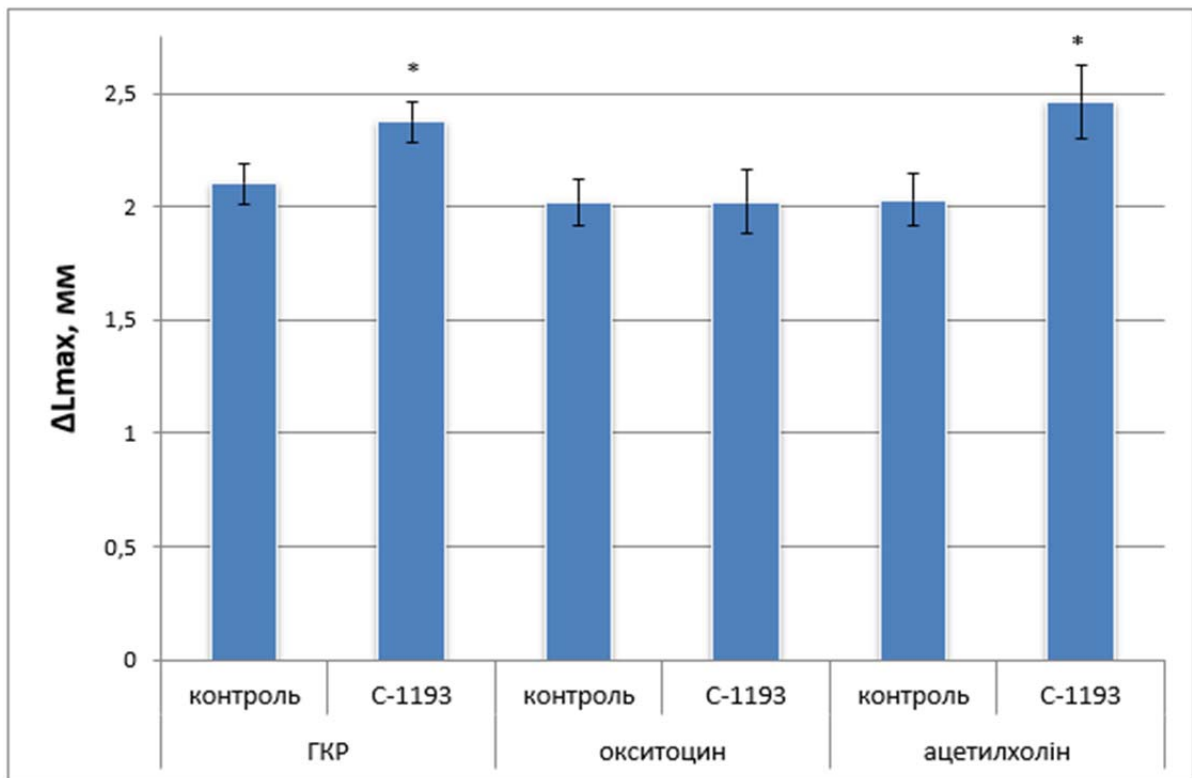


Рис. 3.4 Амплітуда фазних компонентів ізометричних укорочень міометрія щурів у контролі та за дії калікс[4]арену C-1193 (10  $\mu\text{M}$ ), викликаних аплікуванням гіперкалієвого розчину (ГКР, 80 мМ), окситоцину (0,1 МО) і ацетилхоліну (10  $\mu\text{M}$ ).

n = 5; \* - p<0.05 – різниця достовірна щодо контролю.

Механокінетичний аналіз за методом Костеріна-Бурдиги показав відсутність значущих відмінностей в нормованих максимальних швидкостях фаз скорочення ( $V_{nc}$ ) та розслаблення ( $V_{nr}$ ), які склали в середньому  $102,2 \pm 7,5 \%$  та  $89,5 \pm 7,6 \%$  відповідно (n=5, p>0.05).

Відсутність відмінностей у співвідношенні фаз і кінетики процесів укорочення-розслаблення при ГКР-індукованих скороченнях на тлі C-1193 вказує на те, що немає специфічних мішеней серед  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем. Це стосується як енергонезалежного надходження  $\text{Ca}^{2+}$  через потенціалкеровані  $\text{Ca}^{2+}$ -канали, так і енергозалежної екструзії  $\text{Ca}^{2+}$  з міоцитів.

### **3.3. Дослідження активованих за шляхами фармакомеханічного спряження збудження ізотонічних укорочень міометрія щурів за дії калікс[4]арену С-1193**

На попередньому етапі спостерігалось, що дія калікс[4]арену С-1193 сприяє скороченню міометрія, яке індукується ГКР, але цей ефект не є значущим щодо їх кінетики. Оскільки утеротонічні гормони окситоцин і парасимпатичні гормони ацетилхолін відіграють важливу роль у регуляції активності міометрія, на наступному етапі ми вивчали механокінетичні ефекти С-1193 на скорочення міометрія, які викликаються цими речовинами.

Встановлено, що калікс[4]арен С-1193 не змінює силу фазного і тонічного компонентів окситоцин-індукованих укорочень міометрія. Розрахунком нормованих максимальних швидкостей фаз скорочення і розслаблення цих механограм виявлено, що за присутності в омиваючому гладеньком'язові препарати розчині спостерігається збільшення  $V_{nc}$ , тоді як параметр  $V_{nr}$  залишався на контрольному рівні (Рис. 3.5).

На відміну від окситоцин-викликаних скорочень, фазні укорочення, індуковані ацетилхоліном, значно посилювалися в присутності калікс[4]арену С-1193. Аналіз показав, що цей інгібітор  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТРази плазматичної мембрани збільшує нормовані максимальні швидкості фаз укорочення і розслаблення.

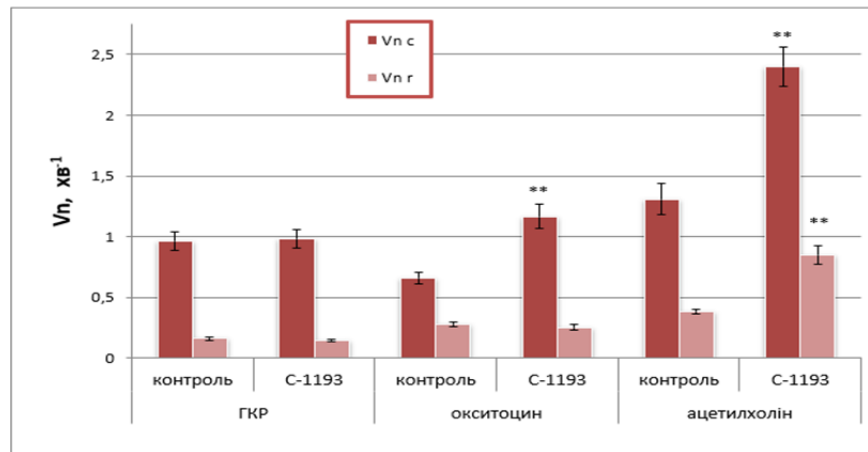


Рис. 3.5 Нормовані максимальні швидкості фаз скорочення і розслаблення ( $V_{nC}$  і  $V_{nR}$ ) викликаних аплікуванням гіперкалієвого розчину (ГКР, 80 мМ), окситоцину (0,1 МО) і ацетилхоліну (10  $\mu$ М) ізометричних укорочень міометрія щурів у контролі та за дії калікс[4]арену С-1193 (10  $\mu$ М).  $n = 5$ ; \*\* -  $p < 0.01$  – різниця достовірна щодо контролю.

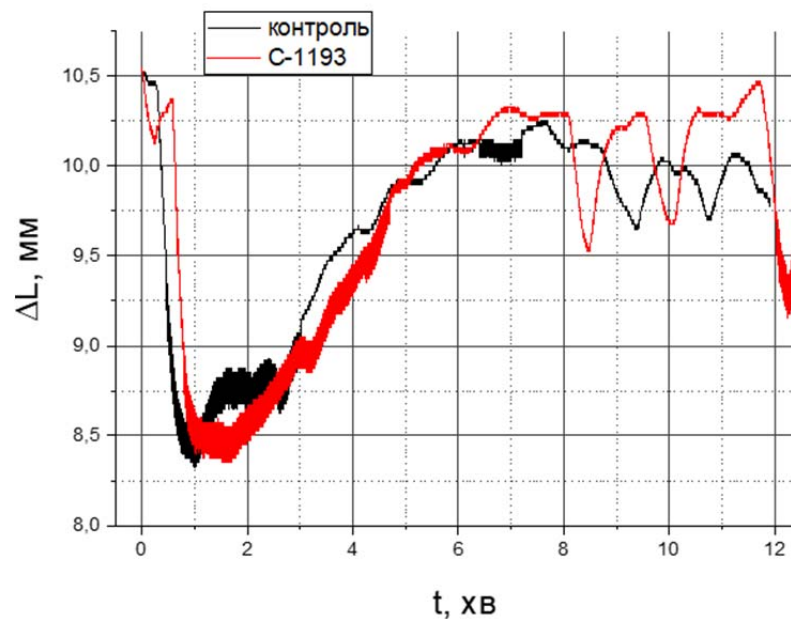


Рис. 3.6 Типові механограми ізотонічних укорочень поздовжніх гладеньких м'язів рогів матки щурів у контролі та на тлі калікс[4]арену С-1193 (10  $\mu$ М), активованих аплікуванням окситоцину (0,1 МО).

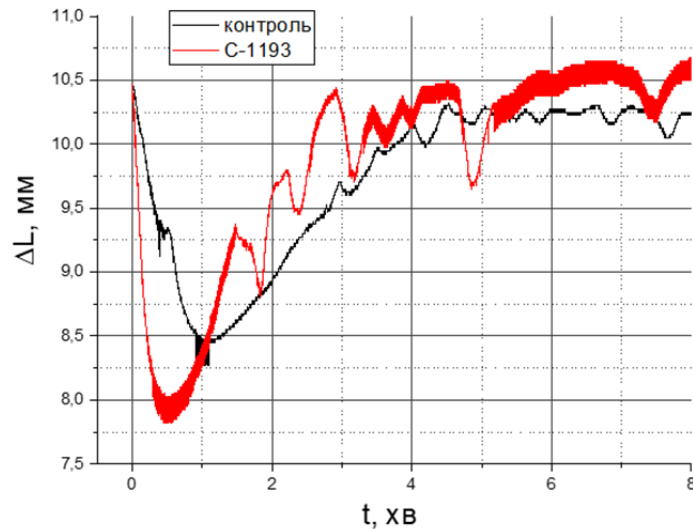


Рис. 3.7 Типові механограми ізотонічних укорочень поздовжніх гладеньких м'язів рогів матки щурів у контролі та на тлі калікс[4]арену С-1193 (10  $\mu\text{M}$ ), активованих аплікуванням ацетилхоліну (10  $\mu\text{M}$ ).

При аплікації С-1193 фазне скорочення міометрія, індуковане як окситоцином, так і ацетилхоліном, пов'язане з активацією рецепторів, що спряжені з Gq/11-протеїнами, і продукцією інозитол-1,4,5-трифосфату (ІТФ), який викликає викид  $\text{Ca}^{2+}$  з саркоплазматичного ретикулуму (СР). Це пояснює збільшення нормованої максимальної швидкості фази скорочення при стимуляції ацетилхоліном і окситоцином.

Різниця в модуляції кінетики агоніст-викликаних скорочень міометрія може бути пов'язана з тим, що ацетилхолін впливає через M2-підтип мускаринових рецепторів, тоді як окситоцин додатково пригнічує екструзію  $\text{Ca}^{2+}$  з міоплазми, блокуючи  $\text{Ca}^{2+}$ -помпу плазматичної мембрани. Ці відмінності можуть пояснити різні ефекти С-1193 на швидкість  $V_{nR}$ .

## Висновки

У дипломній роботі із використанням методу тензометрії (у ізометричному режимі реєстрації), механокінетичного аналізу викликаних скорочень за методом Костеріна-Бурдиги і механокінетичного аналізу спонтанних укорочень досліджено вплив калікс[4]арену С-1193 (у концентрації 10  $\mu\text{M}$ ) – селективного інгібітора  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-ази плазматичної мембрани.

1. Виявлено, що калікс[4]арен С-1193 активує скорочувальні реакції багатоклітинних препаратів міометрія, викликані за аплікуванням гіперкалієвого розчину, не впливаючи на параметри нормованих максимальних швидкостей фаз скорочення і розслаблення.
2. Встановлено, що калікс[4]арен С-1193 не впливає на амплітуду скорочень міометрія, за їх стимулювання утеротонічним гормоном окситоцином. Також за даного способу активації спостерігається підвищення нормованої максимальної швидкості фази скорочення.
3. Показано, що на тлі сполуки С-1193 зростає амплітуда ацетилхолін-викликаних скорочень, а також збільшуються нормовані максимальні швидкості фаз скорочення і розслаблення.
4. Також встановлено, що за дії С-1193 (10  $\mu\text{M}$ ) спостерігається збільшення амплітуди спонтанних скорочень, а також зростання механокінетичних параметрів: скорочення ( $\Delta L_{\text{max}}$ ,  $\Delta L_{\text{C}}$  та  $\Delta L_{\text{R}}$ ) і швидкостей ( $V_{\text{C}}$  і  $V_{\text{R}}$ ). Оскільки нормування  $V_{\text{C}}$  і  $V_{\text{R}}$  на амплітуду укорочень за дії С-1193 призводить до втрати статистично значущих відмінностей максимальних швидкостей фаз

скорочення і розслаблення від відповідних контрольних показників, тож ймовірно, що С-1193 не має специфічного впливу  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальні системи міоцитів матки, а його ефекти обумовлюються лише дією на  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азу.

Перспективи подальших досліджень: Подальші дослідження можуть бути спрямовані на вивчення молекулярних механізмів дії калікс[4]арену С-1193, а також на оцінку його впливу на інші типи м'язових клітин та тканин.

Застосування методів дослідження: Використані методи тензометрії та механокінетичного аналізу довели свою ефективність і можуть бути застосовані в інших дослідженнях скорочувальної активності м'язів.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Veklich T.O., Cherenok S.O., Tsymbaluk O.V. et al. A new affine inhibitor of sodium pump thiacalix[4]arene C-1193 increases the intracellular concentration of Ca ions and modifies myometrium contractility // Ukr. Biochem. J. – 2023. – V. 95, N 5. – P. 5-21.
2. Kosterin S., Tsymbalyuk O. Mechanokinetics and power of the spontaneous isotonic contraction of visceral smooth muscles // Series on Biomechanics. – 2023. – V. N 37(3). – P. 43-56.
3. Burdyga Th.V., Kosterin S.A. Kinetic analysis of smooth muscle relaxation // Gen. Physiol. Biophys. – 1991. – V. 10(6). P. 589-598.
4. Tsymbalyuk O.V., Vadzyuk O.B. Involvement of  $K_{ATP}$ -channels of plasma and mitochondrial membranes in maintaining the contractive function of myometrium of non-pregnant rat uterus // Studia Biologica. – 2020. – V.14(2). P. 3-16.
5. Векліч Т.О., Шкрабак О.А., Родік Р.В. та ін. Вплив каліксарену С-107 на кінетичні параметри  $Na^+, K^+$ -АТФ-ази плазматичної мембрани міоцитів матки // Укр. біохім. журн. – 2011. – Т. 83, №2. – С. 36-44.
6. Arner A., Löfgren M. Morano I. Smooth, slow and smart muscle motors // Journal of Muscle Research and Cell Motility. – 2003. – V. 24(2-3). P. 165-173.
7. Yang H., Choi K.C., Jung E.M. et al. Expression and regulation of sodium/calcium exchangers, NCX and NCKX, in reproductive tissues: do they play a critical role in calcium transport for reproduction and development? // Adv. Exp. Med. Biol. 2013. – V. 961. – P. 109-121.
8. Kim J.A., Yang H., Hwang I. et al. Expression patterns and potential action of the calcium transport genes *Trpv5*, *Trpv6*, *Ncx1* and *Pmcalb* in the canine duodenum, kidney and uterus. // In Vivo. – 2011. – V. 25(5). – P.773-80.

9. Matthew A, Shmygol A, Wray S.  $\text{Ca}^{2+}$  entry, efflux and release in smooth muscle. // *Biological Research*. – 2004. – V. 37(4). – P. 617-624.
10. Wray S. Insights from physiology into myometrial function and dysfunction. // *Exp. Physiol*. – 2015. – V. 100(12). – P. 1468-1476.
11. Wray S., Burdyga T., Noble D. et al. Progress in understanding electro-mechanical signalling in the myometrium. // *Acta Physiologica*. – 2015. –V. 213 (2). – P. 417-431.
12. Veklich T.O., Labyntseva R.D., Shkrabak O.A. et al. Inhibition of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATpase and activation of myosin atpase by calix[4]arene C-107 cause stimulation of isolated smooth muscle contractile activity // *Ukrainian Biochemical Journal*. – 2020. – V. 92(1). – P. 21-30.
13. Tsymbalyuk O.V., Naumenko A.M., Davidovska T.L. Influence of nano- $\text{TiO}_2$  on the functioning of gastric smooth muscles: an in vitro and in silico studies. // *Studia Biologica*. – 2019. – V. 13(1). – P. 3-26.
14. Munns M., Pennefather J.N. Pharmacological characterization of muscarinic receptors in the uterus of oestrogen-primed and pregnant rats. // *Br. J. Pharmacol*. – 1998. – V. 123(8). – P. 1639-1644.
15. Pennefather J.N., Gillman T.A., Mitchelson F. Muscarinic receptors in rat uterus. // *Eur. J. Pharmacol*. – 1994. – V. 262(3). – P. 297-300.
16. Shlykov S.H. Oxytocin and its role in the control of intracellular level of calcium ions in the myometrium. // *The Ukrainian Biochemical Journal*. – 2010. – V.82 (2). – P. 5-14.
17. Identification of uterine pacemaker regions at the myometrial–placental interface in the rat //E. Josiah Lutton, 1 ,\* Wim J. E. P. Lammers, 2 , 3 Sean James, 4 Hugo A. van den Berg, 5 and Andrew M. Blanksresponding author 1// 2018

## 18. Physiology and Electrical Activity of Uterine Contractions

// Robert E. Garfield and William L. Maner//2007

19. SLO2.1/NALCN a sodium signaling complex that regulates uterine activity//Juan J. Ferreira,1,2,3 Chinwendu Amazu,1,3 Lis C. Puga-Molina,1 Xiaofeng Ma,1 Sarah K. England,1,\* and Celia M. Santi1,2,4,\*\*//2021

20. Modeling and experimental approaches for elucidating multi-scale uterine smooth muscle electro- and mechano-physiology: A review//Amy S. Garrett, Shawn A. Means, Mathias W. Roesler, Kiara J. W. Miller, Leo K. Cheng, and Alys R. Clarkcorresponding author\*//2022

21. Na<sup>+</sup>-Leak Channel, Non-Selective (NALCN) Regulates Myometrial Excitability and Facilitates Successful Parturition

Erin L. Reinl, PhD,1 Peinan Zhao, PhD,2 Wenjie Wu, MS,1 Xiaofeng Ma, PhD,1 Chinwendu Amazu, BS,1 Rachael C. Bok, BS,3 K. Joseph Hurt, MD, PhD,3 Yong Wang, PhD,1 and Sarah K. ENGLAND, PhD1,\*//2018

22. Progesterone and estrogen regulate NALCN expression in human myometrial smooth muscle cells//Chinwendu Amazu,1,2 Xiaofeng Ma,1,2 Clara Henkes,1,2 Juan J. Ferreira,1,2,3 Celia M. Santi,1,2,3 and Sarah K. Englandcorresponding author1,2//2020

23. Oxytocin can regulate myometrial smooth muscle excitability by inhibiting the Na<sup>+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel, Slo2.1//Juan J. Ferreira, 1 ,\* Alice Butler, 2 Richard Stewart, 2 Ana Laura Gonzalez-Cota, 1 Pascale Lybaert, 1 , 3 Chinwendu Amazu,

- 1 Erin L. Reinl, 1 , 4 Monali Wakle□Prabakaran, 1 Lawrence Salkoff, 2 Sarah K. England, 1 and Celia M. Santicorresponding author 1 , 2//2018
24. Estradiol enhances T-type calcium channel activation in human myometrium telocytes//Lin ZHU, 1 Tao SHANGGUAN, 1 Penghui CHEN, 2 Ying WANG, 1 Lan XIAO, 1 Heying LIU, 3 and Wei HE 1//2023
25. Progress in understanding electro-mechanical signalling in the myometrium//S Wray 1, T Burdyga, D Noble, K Noble, L Borysova, S Arrowsmith//2014
26. Physiology and Pathology of Contractility of the Myometrium//antonios koutras,1 zacharias fasoulakis,1 athanasios syllaios,2 nikolaos garmpis,2 michail diakosavvas,1 athanasios pagkalos,3 thomas ntounis,1 and emmanuel n. kontomanolis4//2021
27. Calcium-Activated Chloride Channels in Myometrial and Vascular Smooth Muscle//Susan Wray, 1 Clodagh Prendergast, 1 , \* and Sarah Arrowsmith 2//2021
28. Gestation changes sodium pump isoform expression, leading to changes in ouabain sensitivity, contractility, and intracellular calcium in rat uterus//Rachel V. Floyd,corresponding author 1 Ali Mobasheri, 2 and Susan Wray 1//2017
29. Increased Constrictor Tone Induced by Ouabain-Treatment in Rats//Victor M. Pulgar, PhD,\*†‡ Anne B. Jeffers, MS,\* Hanadi M. Rashad, MS,\* Debra I. Diz, PhD,‡ and Azeez A. Aileru, PhD\*†//2014
30. A Computational Model of the Ionic Currents, Ca<sup>2+</sup> Dynamics and Action Potentials Underlying Contraction of Isolated Uterine Smooth Muscle//Wing-Chiu Tong, 1 , 2 Cecilia Y. Choi, 3 Sanjay Karche, 3 Arun V. Holden, 4 Henggui Zhang, 3 , \* and Michael J. Taggart 1 , 2//2011

31. Overview on solubilization and lipid reconstitution of Na,K-ATPase: enzyme kinetic and biophysical characterization//Juliana Sakamoto Yoneda, corresponding author #1 Heitor Gobbi Sebinelli, #2 Rosangela Itri, 1 and Pietro Ciancaglini 2 //2020

32. The Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase: A potential therapeutic target in cardiometabolic diseases//Milan Obradovic, 1 Emina Sudar-Milovanovic, 1 Zoran Gluovic, 2 Katarina Banjac, 1 Manfredi Rizzo, corresponding author 3 , \* and Esmā R. Isenovic 1 //2023

33. [The calixarenes C-97 and C-107 stimulate influence of ouabain on the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in plasmatic membrane of smooth muscle cells]//T O Veklich, O A Shkrabak, S O Kosterin, R V Rodik, S O Cherenok, S O Boïko, V I Boïko, V I Kal'chenko //2006

34. [Effect of calixarene-phosphonic acid on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in plasma membranes of the smooth-muscle cells]//T O Veklich, S O Kosterin, R V Rodik, S O Cherenok, V I Boïko, V I Kal'chenko //2006

35. [Spatial structure of the calixarene-aminophosphonic acids is important for their inhibition of the Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase activity in plasma membrane of smooth muscle cells]//T O Veklich, O A Shkrabak, R V Rodik, V I Boïko, V I Kal'chenko, S O Kosterin //2010

36. [The calix[4]arene C-107 is highly effective supramolecular inhibitor of the Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase of plasma membranes]//O V Bevza, T O Veklich, O A Shkrabak, R V Rodik, V I Kal'chenko, S O Kosterin //2013

37. [Comparative study of properties of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and Mg<sup>2+</sup>-ATPase of the myometrium plasma membrane]//T O Veklich, S O Kosterin //2005

38.[Comparative investigation of the effect of calix[4]arene C-99 and its analogs on Na<sup>+</sup>,K(+)-ATPase activity of uterus myocyte plasma membrane]//T O Veklich, O A Shkrabak, S O Cherenok, V I Kal'chenko, S O Kosterin//2012

39.[Effect of calixarene C-107 on kinetic parameters of Na<sup>+</sup>, K(+)-ATPase in the plasma membrane of the uterus myocytes]//T O Veklich, O A Shkrabak, R V Rodik, V I Kal'chenko, S O Kosterin//2011

40. [Changes in polarization of myometrial cells plasma and internal mitochondrial membranes under calixarenes action as inhibitors of plasma membrane Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase]//H V Danylovych, Iu V Danylovych, O V Kolomiets', S O Kosterin, R V Rodik, S O Cherenok, V I Kal'chenko, O Iu Chunikhin, V F Horchev, S O Karakhim//2012