

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

Інститут високих технологій

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики

доц. Олексій Юрійович Нипорко

Протокол № \_\_\_\_\_ засідання кафедри

від “ \_\_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2021 р.

**СЕЛЕКТИВНИЙ ІНГІБІТОР КАЛЬЦІЄВОЇ ПОМПИ  
ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ КАЛІКС[4]АРЕН С-956 МОДИФІКУЄ  
СКОРОТЛИВУ ВІДПОВІДЬ ГЛАДЕНЬКОГО М'ЯЗУ МАТКИ**

Дипломна робота бакалавра  
студентки 4 курсу денної форми навчання  
за спеціальністю 091 «Біологія»  
**Гольден Олександр Віталіївни**

Науковий керівник від кафедри  
**д. б. н. Цимбалюк О.В.**

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

Оцінка захисту роботи  
\_\_\_\_\_

**Київ – 2021 р.**

## РЕФЕРАТ

Дипломна робота бакалавра: 59 сторінок, 11 рисунків, 1 додаток, 91 джерело літератури.

У роботі досліджено вплив макроциклічної сполуки калікс[4]арену С-956 на гомеостаз іонів Са у міоцитах матки та скоротливу активність мультіклітинних м'язових препаратів міометрія. Встановлено, що калікс[4]арен С-956 селективно та з високим афінитетом інгібує активність Са<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-АТРази плазматичної мембрани, індукує підвищення внутрішньоклітинної концентрації Са<sup>2+</sup> та спричинює активацію спонтанної скорочувальної активності гладеньком'язових препаратів. Виявлено, що ефекти калікс[4]арену С-956 на спонтанну скорочувальну активність міометрія є суттєво більш вираженими в умовах блокування синтезу NO, що може бути пояснено структурно-функціональною взаємодією ензимів NO-синтази і Са<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-АТРази плазматичної мембрани.

Ключові слова: ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВІ КЛІТИНИ, КАЛІКС[4]АРЕНИ, МІОМЕТРІЙ, ПЛАЗМАТИЧНА МЕМБРАНА, Са<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-АТРаза, СКОРОЧУВАЛЬНА АКТИВНІСТЬ.

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

ГМ	–	гладенькі м'язи;
ГМК	–	гладеньком'язова клітина;
ПМ	–	плазматична мембрана;
СР	–	саркоплазматичний ретикулум;
АТР	–	аденозинтрифосфат;
P <sub>i</sub>	–	фосфат неорганічний;
ДМСО	–	диметилсульфоксид;
ЕГТА	–	етиленглікольдіамінтетраоцтова кислота;
fluo-4 AM	–	2- {[2-(2-{5-[біс(карбоксиметил)аміно]-2-метилфенокси} ето-кси)-4-(2,7-дифлуоро-6-гідрокси-3-оксо -3Н-ксантен-9-іл)феніл](карбоксі-метил)аміно} ацетова кислота;
Ноеchst	–	2'-(4-етоксифеніл)-6-(4-метил-1-піперазиніл)-1Н,3'Н-2,5'-бібензімідазол;
Нерес	–	Н-2-гідроксиетилпіперазин-Н-2-етансульфонова кислота;
Tris	–	трис(гідроксиметил)амінометан;
Tg	–	тапсигаргін.

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b> .....	6
<b>РОЗДІЛ 1.</b> Огляд літератури .....	8
1.1. Загальні уявлення про внутрішньоклітинний кальцієвий гомеостаз. Мембранні механізми регуляції концентрації $\text{Ca}^{2+}$ в гладеньком'язових клітинах.....	8
1.2. Структурна організація $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани	9
1.3. Молекулярна біологія $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ -АТРази.....	10
1.4. Функціональна роль $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ -АТРази.....	12
1.5. Специфіка локалізації $\text{Ca}^{2+}$ -помпи у клітинах .....	15
1.6. Каліксарени як ефектори ензимів.....	17
1.6.1. Загальна характеристика каліксаренів .....	18
1.6.2. Особливості ефекторної дії каліксаренів на деякі ензими.....	18
<b>РОЗДІЛ 2.</b> Матеріали та методи дослідження.....	21
2.1. Матеріали.....	21
2.2. Виділення фракцій плазматичних мембран ГМК матки .....	22
2.3. Ензимологічні дослідження .....	23
2.4. Виділення міоцитів матки.....	25
2.5. Визначення змін концентрації внутрішньоклітинного $\text{Ca}^{2+}$ з використанням конфокальної мікроскопії .....	26
2.6. Методи тензометричного дослідження .....	27
2.7. Використання багатопараметричного механокінетичного аналізу для вивчення дії калікс[4]арену С-956 на скорочення-розслаблення гладенького м'язу матки .....	27
<b>РОЗДІЛ 3.</b> Результати досліджень та обговорення.....	30
3.1. Дослідження впливу калікс[4]арену С-956 на $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ -залежну АТР-гідролазну активність плазматичної мембрани клітин міометрія .....	30
3.2. Дослідження впливу калікс[4]арену С-956 на концентрацію іонів Са в клітинах мометрія .....	32

3.3. Використання методу багатопараметричного механокінетичного аналізу для вивчення впливу калікс[4]арену С-956 на скорочення-розслаблення гладенького м'язу матки .....	34
<b>ВИСНОВКИ .....</b>	<b>41</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....</b>	<b>42</b>
<b>ДОДАТОК А.....</b>	<b>53</b>

## ВСТУП

Надзвичайно важливі процеси скорочення та розслаблення гладеньком'язових клітин (ГМК) матки можуть відбуватися виключно завдяки зміні концентрації вільного кальцію в міоцитах [1-4].

З огляду на те, що внутрішньоклітинна концентрація іонів кальцію  $[Ca^{2+}]_i$  в 10000 разів менша, ніж в позаклітинному середовищі, основний пул  $Ca^{2+}$  під час скорочення надходить у міоцит саме ззовні. У процесі розслаблення ГМК ключову роль у викиді іонів Ca з клітини відіграє саме  $Ca^{2+}, Mg^{2+}$ -АТРаза плазматичної мембрани (ПМ), яка за один каталітичний акт викидає один іон кальцію з клітини (за рахунок гідролізу молекули АТР) проти градієнта концентрації, який існує між зовнішньо- і внутрішньоклітинним середовищем [5-7]. Саме висока спорідненість  $Ca^{2+}$ -помпи до іонів Ca ( $K_{Ca^{2+}} = 0,3 - 0,5$  мкМ) зумовлює надзвичайно точну регуляцію концентрації даних іонів у клітині.

На сьогоднішній день значна кількість патологій скоротливої активності ГМ пов'язана саме з порушенням кальцієвого гомеостазу у міоцитах. Тому, зважаючи на велике регуляторне значення  $Mg^{2+}, ATP$ -залежної кальцієвої помпи ПМ ГМК міометрія, модифікація та контроль активності цієї помпи дали б вагомий внесок у лікування таких патологій, як викидні, спонтанні аборти, гіпо- та гіпертоус матки, тощо [8-10].

Тому наразі актуальним є пошук нових нетоксичних оборотних ефекторів – селективних регуляторів  $Ca^{2+}, Mg^{2+}$ -АТРази ПМ клітин матки, які в майбутньому могли б стати основою для створення нових фармпрепаратів.

Таким чином, **метою** цієї роботи було з'ясувати закономірності дії низькомолекулярного інгібітора  $Mg^{2+}, ATP$ -залежної кальцієвої помпи ПМ калікс[4]арену С-956 на гомеостаз іонів Ca у міоцитах матки.

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

1. проаналізувати вплив калікс[4]арену С-956 на питомі ензиматичні активності плазматичної мембрани  $Ca^{2+}, Mg^{2+}$ -АТРази,  $Na^+, K^+$ -

АТРази,  $Mg^{2+}$ -АТРази та  $Ca^{2+}$ -АТРази задля з'ясування селективності його дії;

2. дослідити ефективність інгібіторної дії калікс[4]арену С-956 на  $Ca^{2+}, Mg^{2+}$ -АТРазну активність ПМ та визначити кінетичні параметри (коефіцієнт інгібування, коефіцієнт Хілла);

3. вивчити характер зміни концентрації вільного кальцію в міоцитах під дією калікс[4]арену С-956;

4. дослідити вплив калікс[4]арену С-956 на процес скорочення-розслаблення гладенького м'язу матки використовуючи метод багатопараметричного механокінетичного аналізу.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Загальні уявлення про внутрішньоклітинний кальцієвий гомеостаз. Мембранні механізми регуляції концентрації $\text{Ca}^{2+}$ в гладеньком'язових клітинах

$\text{Ca}^{2+}$  є найбільш відомим та життєво важливим внутрішньоклітинним вторинним посередником, якому належить центральна роль у регуляції більшості клітинних процесів, таких як пригнічення або посилення активності ензимів, регуляція метаболізму, клітинного росту, а також скоротливої активності гладеньких м'язів (ГМ). Тому зміна концентрації іонів  $\text{Ca}$  у міоцитах є вирішальною для контролю процесів скорочення-розслаблення ГМ, зокрема міометрія. У стані спокою в цитоплазмі концентрація вільного  $\text{Ca}^{2+}$  зазвичай перебуває в діапазоні 10-100 нМ, проте за дії на клітину гормонів та нейромедіаторів концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  може зрости на декілька порядків (близько 1 мкМ) [11].

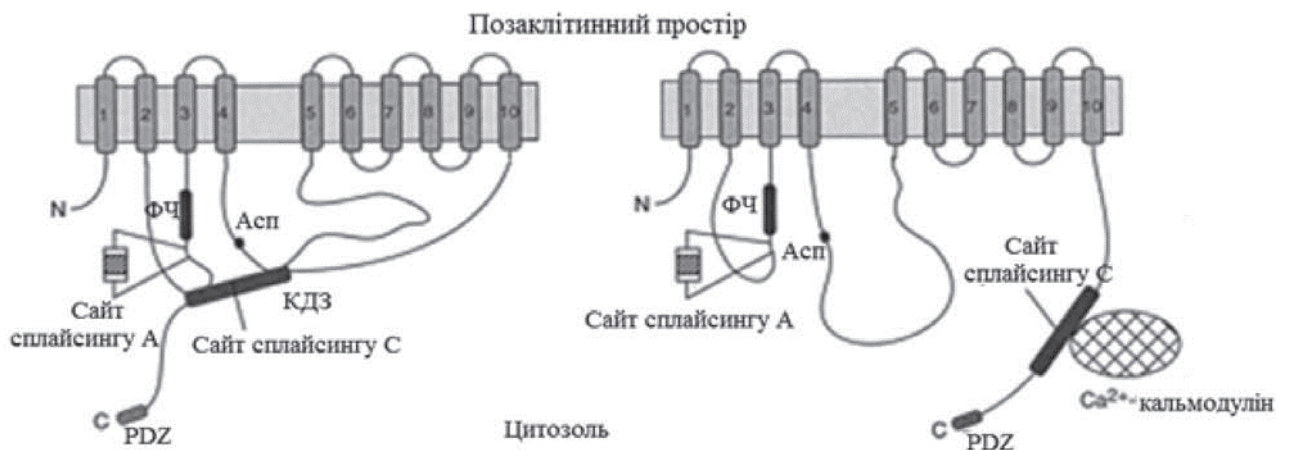
Після збудження іони кальцію надходять у клітину через  $\text{Ca}^{2+}$ -канали ПМ або саркоплазматичного ретикулула (СР) – головного внутрішньоклітинного кальцієвого депо.  $\text{Ca}^{2+}$ -канали, розташовані у ПМ, поділяються на три типи: потенціал-, ліганд-, та депокеровані; а ті, що знаходяться в біліпідному шарі СР – на два типи, причому обидва є лігандкерованими: ріанодинові та інозитол-1,4,5-трифосфатні [12, 13]. У ГМК інозитол-1,4,5-трифосфатні рецептори активуються дією на СР інозитол-1,4,5-трифосфату ( $\text{IP}_3$ ), який утворюється шляхом гідролізу фосфатидилінозитол-4,5-бісфосфату ( $\text{PIP}_2$ ) ферментом фосфоліпазою С. Підвищення концентрації цитоплазматичного кальцію  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  до певного рівня призводить до відкриття ріанодинових рецепторів СР. Також ріанодинові рецептори ГМК можуть бути активовані кофеїном та за перевантаження іонами  $\text{Ca}$  саркоплазматичного ретикулула [14].

За видалення іонів Ca з клітини головним чином відповідають  $Mg^{2+}$ , АТР-залежна кальцієва помпа ПМ,  $Ca^{2+}, Mg^{2+}$ -АТРаза СР,  $Na^+/Ca^{2+}$ -обмінник та  $Ca^{2+}$ -уніпортер мітохондрій [12–15].  $Ca^{2+}$ -помпи ПМ та СР в основному підтримують  $[Ca^{2+}]_c$  у стані спокою, а  $Na^+/Ca^{2+}$ -обмінник – є значущим за відносно високих концентрацій  $Ca^{2+}$  [16]. Насамперед, це пов'язано з різною кількістю обертів та спорідненістю даних систем до іонів Ca: якщо  $Na^+/Ca^{2+}$ -обмінник має низьку афінність до  $Ca^{2+}$  ( $K_{Ca} = 1$  мкМ) та високе число обертів, то  $Ca^{2+}, Mg^{2+}$ -АТРазама ПМ та СР властива висока спорідненість до іонів Ca ( $K_{Ca} = 0,1–0,3$  мкМ), та відносно невелика кількість обертів [16-18]. Проте відсотковий вклад цих систем відкачки  $Ca^{2+}$  з клітини в першу чергу залежить від типу тканини. Так, у ГМК міометрія більша частину викиду іонів Ca притаманна  $Ca^{2+}$ -помпі (70%), в той час як  $Na^+/Ca^{2+}$ -обмінник відповідає за інші 30% відкачаного  $Ca^{2+}$  [5].

## 1.2. Структурна організація $Ca^{2+}, Mg^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани

$Ca^{2+}, Mg^{2+}$ -АТРази є іон-транспортуючими АТРазама Р-типу і належать до підродини типу ПВ [15]. Структурна організація  $Ca^{2+}$ -помпи ПМ була встановлена на основі  $Mg^{2+}$ , АТР-залежної кальцієвої помпи СР. Вона має дві великі цитозольні петлі та 10 трансмембранних ділянок, причому N- та С-термінальні кінці розташовані з цитозольного боку ПМ (рис. 1.1). Більша частина помпи розташована у цитоплазмі і умовно поділяється на 3 частини – А-, N-, та Р-петлі [13]. Перша А-петля утворена переважно з  $\beta$ -складчастих шарів та знаходиться між другою та третьою трансмембранними ділянками. Її функція полягає у взаємному спряженні гідролізу молекули АТР з транслокацією іонів Ca, а також у передачі сигналу про структурні зміни під час реакційного циклу. Друга рухлива N-петля розташована між четвертим та п'ятим трансмембранними ділянками та відповідає за приєднання АТР та синтез проміжного продукту – аспартил-фосфату. Третя Р-петля утворена з  $\beta$ -складчастих шарів та  $\alpha$ -спіралей і є найбільш рінманітною серед  $Ca^{2+}$ -

помп. У  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи ПМ вона має великий  $\text{COOH}$ -кінець, а функція Р-петлі полягає у регуляції активності помпи (містить сайт зв'язування з кальмодуліном) [13, 19, 20]. У цілому, структурна організація  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ схожа на структуру інших АТРаз підродина типу ПВ, проте головна структура, яка відрізняє її від інших АТРаз є великий С-термінальний домен, що налічує 70-200 амінокислотних залишків, тоді як С-кінець  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи СР містить 20–50 амінокислотних залишків [20].



**Рис 1.1.** Структурна організація  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи плазматичної мембрани (адаптовано з [20]). Скорочення: КЗД – кальмодулін-зв'язуючий домен, ФЧ – фосфоліпідчутлива ділянка, ТМ – трансмембранні домени, Асп – сайт формування аспартилового залишку, PDZ – домен зв'язування postsynaptic density protein.

### 1.3. Молекулярна біологія $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази

У людини чотири основні ізоформи  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ кодуються окремими генами, які локалізовані на хромосомах 12q21.3, 3p25.3, Xq28, та 1q32.1 і кодують ізоформи 1-4  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи, відповідно [21-24]. Закодовані білки мають довжину від 1115 до 1258 амінокислотних залишків, з молекулярною масою в діапазоні 125-140 кДа [20, 25, 26]. Основні частини ізоформ дуже подібні – внутрішньоклітинні N- і С-термінальні кінці, 10

трансмембранних ділянок та дві великі цитозольні петлі, проте середній показник гомології послідовностей ізоформ 1-4 не перевищує 80%. Найбільшу відмінність між ізоформами виявляють N- та C-кінці, оскільки вони беруть участь у численних білок-білкових взаємодіях, що має функціональне значення [15]. Також різноманітність ізоформ підвищується за рахунок альтернативного сплайсингу первинних транскриптів, тому в протеомі ссавців існує понад 20 різних варіантів  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи. Альтернативний сплайсинг проходить в трьох регіонах – А, В та С [20].

Альтернативний сплайсинг у сайті А впливає на невеликий екзон довжиною близько 40 нт, який кодує частину першої внутрішньоклітинної петлі. Цей екзон може бути повністю видалений із зрілих транскриптів усіх ізоформ  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи, однак у ізоформи 1  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи він завжди наявний.  $\text{Ca}^{2+}$ -помпа 2 має три екзони в А-сайті, тому теоретично можливі 8 варіантів сплайсингу у цій ділянці, але наразі виявлено лише 4 з них.  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи 3 та 4 мають один екзон в А-сайті, проте він може бути виключений із зрілої мРНК. Альтернативний сплайсинг у сайті В виникає нечасто. Усі ізоформи в цій ділянці мають екзон довжиною близько 100 нт, але його вирізання спричиняє втрату останнього трансмембранного домену і напрямлений у позаклітинний простір С-термінальний кінець [20]. С-сайт альтернативного сплайсингу розташований у С-кінці і наявний у всіх ізоформ помпи [27]. Ізоформа 1  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи має 5 різних сплайс-варіантів (a, b, c, d, e) завдяки наявності одного 154 нт екзону. Ізоформа 2  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи має 2 екзони (можливо 3 сплайс-варіанти) довжиною 172 і 55 нт, відповідно.  $\text{Ca}^{2+}$ -помпа 3 має два екзони довжиною 68 і 154 нт (утворюють 6 сплайс-варіантів), відповідно, які підлягають альтернативному сплайсингу у С-сайті. Ізоформа 4 має один екзон, що призводить до утворення 4 сплайс-варіантів [20].

Як різні ізоформи  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи, так і різні сплайс-варіанти мають унікальний розподіл в організмі, що дозволяє їм регулювати необхідну для того чи іншого типу тканини  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Якщо ізоформи 1 та 4  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи є майже в усіх, то ізоформи 2 і 3 експресуються виключно в збудливих

тканинах (хоча деякі форми зустрічаються в клітинах нирок, печінки, молочних залоз). У випадку гладеньких м'язів можна стверджувати, що там експресуються лише 1 та 4 ізоформи, а ось в мозку наявні всі чотири [17]. Досить цікавим є і те, що  $\text{Ca}^{2+}$ -помпа 2 може активуватись без кальмодуліну [28].

Сплайс-варіанти а та б кожної  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи відрізняються довжиною та амінокислотною послідовністю С-кінцевого домену. Ці відмінності лежать в основі різних внутрішньомолекулярних взаємодій а- та б-сплайс-варіантів з каталітичним доменом помпи (важливого для автоінгібування), що впливає на ефективність зв'язування помпи з іншими регуляторними та сигнальними молекулами [15, 18]. Наприклад, сплайс-варіанти а та б  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи 4 відрізняються вставкою 178-нт послідовності у мРНК а-форми, внаслідок чого б-форма була більш чутливою до кальмодуліну та мала більшу афінність до іонів Са, ніж  $\text{Ca}^{2+}$ -помпа 4а. Таким чином, ці дві ізоформи по-різному регулюють внутрішньоклітинний кальцієвий гомеостаз, причому  $\text{Ca}^{2+}$ -помпа 4б є більш поширеною. Ізоформа 4а помпи часто зустрічається у збудливих тканинах – мозку, гладеньких м'язах, тощо; що може бути пов'язано з необхідною умовою підтримання в клітинах цих органів достатньо високої концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  та необхідністю швидко реагувати на кальцієві сигнали. Варто відмітити, що а-сплайс-варіант порівняно з б-формою має у 4 рази більшу швидкість активації та у 30 разів більшу швидкість інактивації ( $t_{1/2}=0,85$  та 23 хв, відповідно) [29-31].

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

Необхідність точного контролю клітинного  $\text{Ca}^{2+}$  обумовлена роллю цих іонів у модуляції важливих клітинних процесів. Наразі не знайдено селективних високоспецифічних інгібіторів  $\text{Mg}^{2+}$ , АТР-залежної кальцієвої помпи ПМ, тому, на жаль, досить складним є детальне її вивчення у функціональному та фізіологічному аспектах.

Оскільки  $\text{Ca}^{2+}$ -помпа має високу афінність до іонів  $\text{Ca}$  ( $K_{\text{Ca}^{2+}}=0,3-0,5$  мкМ) і відіграє головну роль в термінації кальцієвого сигналу, підтримуючи концентрацію цих іонів на рівні  $10^{-7}$  М, то вона має велике значення для контролю скоротливої активності ГМ [32-34].

Разом з  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінником ПМ,  $\text{Ca}^{2+}$ -помпа є основною системою відкачки  $\text{Ca}^{2+}$  з клітин ГМ, зокрема міометрія, сечового міхура та судин [17]. Так, спираючись на результати досліджень, проведених на мишах з нокаутованим геном ізоформи 4  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи (розслаблення ГМК матки відбувається вдвічі повільніше), можна стверджувати, що у міометрії найбільш поширена саме  $\text{Ca}^{2+}$ -помпа 4 [16]. При цьому внесок помпи у розслаблення міоцитів становить близько 70% [18, 35].

Досить суттєвим є те, що функція  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи у ГМ залежить від залучення окремої ізоформи. Якщо ізоформа 1  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи виконує більш загальну функцію викиду іонів  $\text{Ca}$ , то ізоформа 4 помпи має важливе значення для збільшення  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  та скорочувальної відповіді на шлях передачі сигналу, опосередкований ацетилхоліновим рецептором [36]. Крім того, видалення обох копій гена, що кодує ізоформу 1, має летальні наслідки на ранніх етапах ембріогенезу мишей, тоді як нульові мутанти по  $\text{Ca}^{2+}$ -помпі ПМ 4 не мали летальності і ззовні виглядали цілком нормальними (хоча ця помпа є більш розповсюдженою в ГМ). У дослідях *in vitro* втрата ізоформи 4 призводила до порушень фазових скорочень та викликала апоптоз у ГМ ворітної вени [37-38].

Окрім підтримання внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  на досить низькому рівні (100 нм),  $\text{Ca}^{2+}$ -помпа ПМ відіграє в клітині ряд важливих функцій [33, 39, 40]:

1) Вихід  $\text{Ca}^{2+}$ , опосередкований  $\text{Ca}^{2+}$ -помпою, відбувається за рахунок контртранспорту  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{H}^+$ . Отже, іони  $\text{H}$  можуть конкурувати з іонами  $\text{Ca}$  і погіршувати їх зв'язування з цитозольними білками. А підкислення цитоплазми може впливати на активність рН-залежних ферментів;

2) Пригнічення активності  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи ПМ впливає на відновлення кількості вільного  $\text{Ca}^{2+}$  у внутрішньоклітинних  $\text{Ca}^{2+}$ -депо, таких як ЕР та мітохондрії;

3)  $\text{Ca}^{2+}$ -помпа ПМ бере участь у регуляції клітинного росту. ГМК, що мають надекспресію  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи, властиві більш повільні темпи росту. Відповідно, зменшення активності помпи може змінити ріст міоцитів, що важливо для з'ясування причин виникнення патологій м'язевої системи;

4) Зміна частоти та амплітуди коливань  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  є важливим регулятором експресії генів;

5) Також помпа має велике значення у контролі вивільнення гормонів та нейромедіаторів, якій роботі органів чуття, проліферації клітин, тощо.

Відповідно, роль  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ охоплює значно більше, ніж просто підтримка низького рівня  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в ГМК у стані спокою. Ізоформи і сплайс-варіанти помпи нерівномірно експресуються у різних тканинах організму. Тому беззаперечним є те, що вони виконують різні функції у тій чи іншій клітині, оскільки мають різну активність та афінність до  $\text{Ca}^{2+}$ . Так, у клітинах ГМ присутні переважно 1 і 4 ізоформи (у міометрії наявна ще 2 ізоформа), а 2 і 3 ізоформи можна знайти у мозку, скелетних м'язах, молочних залозах.

Чисельні експерименти на трансгенних мишах з нокаутованим геном ізоформи 1 помпи підтверджують, що  $\text{Ca}^{2+}$ -помпа ПМ 1 виконує функції ведення «домашнього господарювання (housekeeping)» і відсутність обох копій гену помпи є летальною ще в ембріогенезі. Нуль-мутанти гену  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи 2 мали значні вади рівноваги та слуху, а гетерозиготи демонстрували прогресивну втрату слуху по мірі старіння. Нуль-мутанти по ізоформі 4 помпи не виявляли летальності, однак сумісно з гетерозиготністю по  $\text{Ca}^{2+}$ -помпі 1 спостерігалось порушення фазових скорочень та апоптоз ГМ ворітної вени *in vitro* [13, 41]. Цікаво, що проліферація міоцитів судин впливає на експресію інших сплайс-варіантів  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи ПМ, особливо підвищується рівень експресії мРНК ізоформи 4а помпи на фоні зменшення рівня експресії

сплайс-варіанту 4b [42]. Це пояснюється різною афінністю помп до іонів Ca та кальмодуліну: Ca<sup>2+</sup>-помпа ПМ 4a має нижчу споріденість до іонів Ca ніж помпу 4b, проте Ca<sup>2+</sup>-помпа 4b має високу активність при зв'язуванні з кальмодуліном. Отже, підвищення рівня сплайс-ізоформи 4a спричинить ріст концентрації Ca<sup>2+</sup> в міоциті, а ось Ca<sup>2+</sup>-помпа ПМ 4b призводить до утворення більш тривалого сигналу, оскільки є активною ще декілька хвилин після розсіяння Ca<sup>2+</sup>-сигналу, що призводить до більш швидкої відповіді на наступний сигнал [13, 43, 44].

Отже, Mg<sup>2+</sup>,АТР-залежна кальцієва помпа ПМ є ключовою системою транспорту іонів Ca з клітин і підтримки фізіологічно значущої [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Незважаючи на наявність внутрішньоклітинних кальцієвих депо, саме Ca<sup>2+</sup>,Mg<sup>2+</sup>-АТРаза ПМ є найголовнішою для відкачки цих життєво важливих іонів проти градієнта концентрації, що існує по обидва боки ПМ [45, 46]. Тому актуальним питанням є регуляція Ca<sup>2+</sup>-помпи ПМ, оскільки її функціональна роль обмежується не лише підтриманням кальцієвого гомеостазу в ГМК, але й контролем Ca<sup>2+</sup>-залежних сигнальних шляхів.

Більшість експериментів, спрямованих на дослідження функціональної ролі помпи, були проведені на генетично модифікованих об'єктах, що могло порушити чистоту експериментів та достовірність отриманих результатів. Тому пошук селективних ефекторів, які б могли цілеспрямовано модулювати активність Mg<sup>2+</sup>,АТР-залежної кальцієвої помпи ПМ є важливим етапом розвитку сучасної біохімії.

### **1.5. Специфіка локалізації Ca<sup>2+</sup>-помпи у клітинах**

Кількість Mg<sup>2+</sup>,АТР-залежної кальцієвої помпи у плазматичній мембрані не перевищує 0,1% від загальної кількості мембранних білків [47]. Роботами багатьох авторів була підтверджена локалізація Ca<sup>2+</sup>-помпи у кавеолах [18, 33, 48, 49]. Кавеоли є інвагінаціями ПМ, що мають діаметр 60-80 нм, збагачені сфінголіпідами та холестеролом і містять маркерний білок –

кавеолін. Багато рецепторів та транспортерів ПМ зосереджені саме в кавеолах, що свідчить про важливість їх локалізації для підтримання функціональної активності. При цьому вміст помпи у «некавеоларній» частині ПМ у 19-24 рази нижчий, ніж у кавеолах. Крім того, активність помпи *in vitro* зменшується зі зменшенням текучості мембрани, що свідчить про інгібіторний вплив кавеоларного оточення на  $\text{Ca}^{2+}$ -помпу. Проте досліди, проведені на живих клітинах вказують на стимуляторний вплив деяких ліпідів, зокрема фосфатидилсерину на активність помпи [48]. У деяких типах клітин, у тому числі і в ГМ, кавеоли перебувають у просторовій близькості з СР, що сприяє підсиленню викиду з клітини вільного кальцію, який надходить з СР [50]. Також кавеоли мають рецептори та деякі регуляторні білки (NOS,  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливі рецептори, ізоформи протеїнкінази С), що беруть участь у трансмісії  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналу, спричиненого зміною локальної концентрації іонів Са [51]. Отже, кавеоли можуть бути активаторними центрами  $\text{Ca}^{2+}$ -хвиль, що підсилює значення локалізації  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи в цих інвагінаціях, а також свідчить про їх ключову роль в передачі  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналу [33].

Фосфоліпаза С, розташована сумісно з  $\text{Ca}^{2+}$ -помпою у кавеолах, має непрямий вплив на її активність. Субстрат фосфоліпази С –  $\text{PIP}_2$  – має стимуляторний вплив на активність помпи, тому його гідроліз фосфоліпазою С призводить до пригнічення активності  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ [33, 48].

Проте молекули  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи виділяються в більшій кількості з фракції, розчиненої детергентом, тому за кількістю даний ензим переважає саме у «некавеоларній» частині ПМ, оскільки кавеоли містяться у фракції, не розчиненій детергентом [13, 21]. Крім того,  $\text{Ca}^{2+}$ -помпа орієнтована у ПМ специфічним чином, що спричинене взаємодією білків з родини MAGUK та PISP з PDZ-доменом ізоформ 2b та 4b  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи [52]. Взаємодія помпи з протеїнами цих родин (MAGUK [53, 54], NHERF2 [55] (апикально) або PISP [56] (базолатерально)) дає змогу регулювати орієнтацію і локалізацію потрібних ізоформ помпи в потрібних ділянках мембрани чи цитоскелету, що

має велике значення для підтримки апікобазолатеральної полярності клітин епітелію. Цікаво, що  $\text{Ca}^{2+}$ -помпа ПМ, позбавлена С-кінця в результаті дії каспази-3, не змінює свою специфічну локалізацію у базолатеральній частині мембрани [57].

Таким чином, дослідження структурних особливостей, молекулярної біології, функціональної ролі та регуляції  $\text{Mg}^{2+}$ , АТР-залежної кальцієвої помпи ПМ ГМК тривалий час є центральним об'єктом досліджень багатьох науковців. За цей час було застосовано багато методик та підходів, але результати численних досліджень сходились до одних висновків:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРаза ПМ виконує глобальні та різноманітні функції в ГМК – від підтримання внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу у стані спокою та під час скорочення до регуляції життєво значущих клітинних механізмів, таких як апоптоз, проліферативна активність тощо. З огляду на значну роль  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи у підтриманні нормальної життєдіяльності клітин, не менш важливим є вивчення порушень її роботи за патологічних станів ГМ. І, опираючись на це, важливим питанням є пошук ефективних і одночасно нетоксичних сполук, що дозволяли б селективно та з високою афінністю модифікувати активність  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ при різних патологіях гладеньких м'язів, зокрема міометрія.

### **1.6. Каліксарени як ефектори ензимів**

В останні роки предметом зацікавлення та вивчення багатьох вчених та дослідників з усього світу стали каліксарени – макроциклічні сполуки, які отримують шляхом циклоконденсації пара-заміщених фенолів і формальдегіду [58-62]. Дані сполуки мають численні біологічні ефекти: є інгібіторами та активаторами ферментів; мають мембранотропну дію; проявляють антитромботичну, протипухлинну та протитуберкульозну дії; впливають на функціонування рецепторних та транспортних білків, інших біохімічних систем тощо [61-65].

### **1.6.1. Загальна характеристика каліксаренів**

Каліксарени з їх унікальною тривимірною структурою, є одними з найвідоміших сполук (поряд з циклодекстринами, кукурбітурилами, криптанами, фулеренами), здатих розпізнавати та формувати стійкі комплекси «гість-господар» з неорганічними та органічними іонами, пептидами, полярними або нейтральними органічними молекулами та біомолекулами. Велика кількість публікацій, присвячених дослідженню властивостей та практичному застосуванню даних сполук, свідчать на користь застосування каліксаренів в біології, біотехнології, медицині, технології ДНК чипів, аналітичній хімії тощо [66-68].

Каліксарени – циклічні супрамолекулярні сполуки, тривимірна структура яких сформована центральними ареновими залишками – каліксаренова чаша – та замісниками, що утворюють верхній та нижній вінці. Саме чашоподібна структура зумовлює специфічні властивості та широкий діапазон застосування даних сполук, адже молекула каліксарену формує гідрофобну порожнину, що здатна «захоплювати» різноманітні органічні та неорганічні молекули [69]. Отже, можна створювати каліксарени з унікальними властивостями, змінюючи довжину та хімічну природу верхнього та нижнього вінців.

### **1.6.2. Особливості ефекторної дії каліксаренів на деякі ензими**

Хоча науці відома велика кількість прикладів застосування рецепторів на основі каліксаренів, доведення каталітичної та ефекторної функцій цих сполук є більш рідкісним явищем. Саме тому механізм інгібіторної або активаторної дії каліксаренів на ензими, для яких була показана така дія, залишається не повністю з'ясованим. Аналіз літературних даних показав, що

ензиматичною та/або ефекторною активністю володіють деякі представники калікс[4]аренів та калікс[6]аренів [70].

Приклади ефекторної дії каліксаренів на ензиматичні процеси наведені в роботі S. V. Komisarenko (2013), експериментальні дані якої підтверджують інгібіторний вплив 1) калікс[4]арену C-97 з однією метиленбісфосфоною групою на верхньому вінці (у концентрації 100 мкМ) на АТРазну активність субфрагменту-1 міозину міометрія ( $I_{0,5} = 83 \pm 7$  мкМ), а також 2) калікс[4]арену C-192 із чотирма метиленбісфосфовими групами на верхньому вінці (у концентрації 0,52 мкМ) на полімеризацію фібрину[71]. Можливо, визначальна роль метиленбісфосфових груп в інгібіторній дії каліксаренів обумовлена їх структурною подібністю до пірофосфату та фосфату, який є продуктом реакції гідролізу АТР субфрагментом міозину. Однак цікаво, що досліджуваний калікс[4]арен C-97 також інгібує  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТразу ПМ, причому її афінність до даного ефектора ( $I_{0,5} = 98 \pm 8$  нМ) на декілька порядків вища, ніж у випадку субфрагменту міозину. За допомогою методу фотон-кореляційної спектроскопії також було показано збільшення гідродинамічного діаметра субфрагменту-1 міозину під дією 100 мкМ калікс[4]арену C-97, що опосередковано вказує на формування комплексу між голівкою міозину та калікс[4]ареном. Ця гіпотеза була підтверджена результатами комп'ютерного моделювання, які засвідчили участь електростатичних і стеккінг-взаємодій у формуванні комплексу каліксарен-субфрагмент міозину, а також взаємодію каліксарену з АТР.

Ряд досліджень вказують на протипухлинну активність деяких каліксаренів та їх похідних. В аспекті цієї проблематики привертає увагу робота Karin Juliane Pelizzaro-Rocha (2013) [72]. Автор дослідив вплив шести каліксаренів, які відрізняються за розміром порожнини та функціональними групами на верхньому вінці, на життєздатність (за здатністю відновлювати тетразоліум до формазану) та інтенсивність проліферації (за здатністю включати 5-бром-2'-дезокиурин до зростаючого ланцюга ДНК під час реплікації) пухлинних клітин підшлункової залози лінії Panc-1. Результати

досліджень показали, що калікс[6]арен (на відміну від калікс[4]- і калікс[8]аренів та їх третбутильних похідних) в концентрації 50 мкМ знижував життєздатність клітин лінії Panc-1 на 67,3 %, а також дана сполука в концентрації 10 мкМ повністю інгібувала процес проліферації.

Нині відомий лише один протипухлинний препарат на основі каліксарену, який дійшов до стадії клінічних досліджень. Це сполука OTX008 (США), яка є інгібітором білка галектину-1, залученого у процесі проліферації та міжклітинної взаємодії [73]. Проте успіхи вищевказаних досліджень свідчать про наявність широкого спектра ензимів, які можуть бути мішенню різних за хімічною будовою каліксаренів, а отже, і про перспективність подальшого вивчення дії цих сполук.

Таким чином, проаналізовані літературні джерела засвідчують, з одного боку, широкий спектр застосування каліксаренів в різних галузях науки і техніки, а з іншого боку, обмеженість наших знань про механізм впливу цих сполук на ензиматичну активність. Проте, оскільки існують експериментальні підтвердження ефекторної дії каліксаренів на ряд ензимів, актуальним є подальше вивчення цієї проблеми. Важливо, що мішенню калікс[4]аренів є  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза ПМ, функціональне значення якої описане вище.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

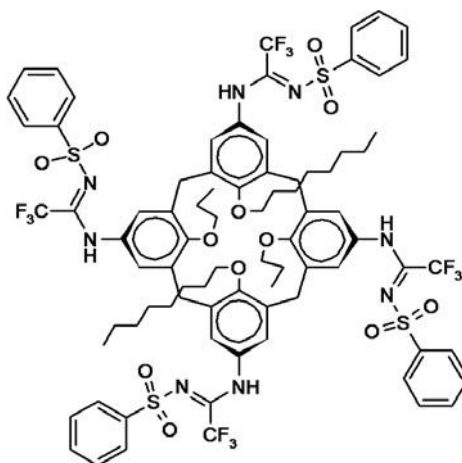
#### 2.1. Матеріали

В якості об'єкту вивчення інгібіторної дії калікс[4]арену C-956 на активність  $Mg^{2+}$ , АТР-залежної кальцієвої помпи ПМ використовували фракції плазматичних мембран, що були виділені з міометрія свині. Дослідження впливу зазначеної сполуки на зміну концентрації  $Ca^{2+}$  в міоцитах матки проводили на ГМК, що були виділені з матки невагітних щурів з віварію Інституту біохімії НАН України. Щурів піддавали випарам хлороформу, викликаючи стан наркозу, за деякий час тварин було вбито шляхом декапітації.

Роботу було виконано у відповідності до Хельсінської декларації (Всесвітня медична асамблея, 1964), Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), Декларації принципів толерантності (28 сесія ЮНЕСКО, 1995), Універсальної декларації по біоетиці та правах людини (ООН, 1997), норм Конвенції про захист прав людини у зв'язку з впровадженням нових біомедичних технологій, прийнятою у 1997 році у м. Ов'єдо (Іспанія) та підписаною Верховною Радою України у 2002 році, Закону України № 3447 ІV «Про захист тварин від жорстокого поводження».

У роботі були використані реактиви: Tris ("Reanal", Угорщина), ЕГТА ("Fluka", Швейцарія), Нерес, АТР, убаїн, тапсигаргін, ("Sigma", США), сахароза, ЕДТА, NaCl, KCl,  $KH_2PO_4$ ,  $NaHCO_3$ ,  $Na_2HPO_4$ ,  $CaCl_2$ ,  $MgCl_2$ ,  $MgSO_4$ , глюкоза, колагеназа, бичачий сироватковий альбумін, соєвий інгібітор трипсину, Кумасі G-250,  $NaN_3$ , натрій оцтовокислий, формальдегід, етанол, трихлороцтова кислота, ДМСО.

Калікс[4]арен С-956 (5,11,17,23-тетра(трифтор)метил(фенілсульфоніліміно)метиламіно-25,27-діоктилокси-26,28-дипропоксикалікс[4]арен) (рис. 2.1) був синтезований та охарактеризований у відділі хімії фосфоранів Інституту органічної хімії НАН України (зав. відділом – академік НАНУ проф. В.І. Кальченко).



**Рис. 2.1.** Структурна формула калікс[4]арену С-956.

## 2.2. Виділення фракцій плазматичних мембран ГМК матки

Виділення фракцій плазматичних мембран із міометрія свині було проведено згідно методики, описаній в роботі [74]. Середовище виділення складалось з наступних речовин: 20 мМ Tris-HCl (рН 7,4 при 8 °С), 250 мМ сахароза, 2 мМ ЕДТА, 600 мМ КСl. Щоб запобігти денатурації білків, виділення фракції ПМ було проведене за низьких температур за допомогою льоду.

Руйнування клітин та тканини проводили за допомогою гомогенізації: тканину міометрія подрібнювали ножицями та гомогенізували у середовищі виділення (співвідношення тканина:середовище виділення становить 1:4) (гомогенізатор типу «Політрон», 10000 тис. об/хв) 3 рази по 20 секунд з перервою у 20 секунд. Потім гомогенат центрифугували протягом 21 хв при 3000 g за температури +8 °С. Після цього відбирали надосадову рідину, в якій містилась мікросомальна фракція.

Для очищення мікросомальної фракції, використовували метод центрифугування у градієнті густини сахарози. Надосадову рідину нашаровували на градієнт густини у порядку: 6 мл 30 % розчину сахарози в 0,6 М КСІ – 5 мл 15 % розчину сахарози в 0,6 М КСІ – 20 мл супернатанту. Отриманий градієнт центрифугували на бекет-роторі при +8 °С протягом 90 хв при 105000 g. Потім відбирали фракцію ПМ, яка знаходиться у шарі між 15 % та 30 %-ими розчинами сахарози, після чого розводили її охолодженим бідистилятом і центрифугували на кутовому роторі протягом 1 год при 105000 g. Утворений осад ресуспендували у 3 мл середовища зберігання наступного складу: 20 мМ Tris-HCl (pH 7,4 при +8 °С), 300 мМ КСІ.

Концентрацію білка у фракції ПМ було визначено методом Bradford [75], в якості стандарту використано бичачий сироватковий альбумін. Оптичну густину вимірювали на СФ-2000 при довжині хвилі  $\lambda=595$  нм.

### 2.3. Ензимологічні дослідження

Загальну АТРазну активність визначали у фракції плазматичних мембран клітин міометрія при 37 °С у стандартному середовищі (об'єм – 0,4 мл), яке містило (мМ): 3 АТР, 3 MgCl<sub>2</sub>, 0,95 CaCl<sub>2</sub>, 25 NaCl, 125 КСІ, 1 ЕГТА, 20 Hepes-tris-буфер (pH 7,4), 1 NaN<sub>3</sub> (інгібітор АТРази мітохондрій [76]), 1 убаїн (селективний інгібітор Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТРази [77, 78]), 0,1 мкМ тапсигаргін (селективний інгібітор Ca<sup>2+</sup>,Mg<sup>2+</sup>-АТРази ендоплазматичного ретикулуму [76]) і 0,1 % дигітонін (фактор перфорації ПМ [79]). Розрахунки, виконані із використанням комп'ютерної програми «MAXCHEL», свідчать за наступне: за даних фізико-хімічних та концентраційних умов середовища інкубації, концентрація вільного Са становила 1 мкМ. При дослідженні впливу різних концентрацій Са<sup>2+</sup> на активність Mg<sup>2+</sup>,АТР-залежної кальцієвої помпи ПМ, необхідні концентрації іонів Са задавали шляхом комп'ютерного розрахунку із використанням зазначеної програми. Кількість протеїну мембранної фракції в пробі – 20-30 мкг. Час інкубації – 5 хв. Ензиматичну реакцію

ініціювали введенням до середовища інкубації аліквоти (50 мкл) суспензії ПМ, а зупиняли - додаванням до інкубаційної суміші 1 мл “стоп“-розчину наступного складу: 1,5 М натрій оцтовокислий, 3,7 % формальдегід, 14 % етанол, 5 % ТХУ, рН 4,3 (при 8 °С). Кількість продукту реакції  $P_i$  визначали за методом W. Rathbun et V. Betlach [80].

$Ca^{2+}, Mg^{2+}$ -АТРазну активність розраховували по різниці між величинами АТРазних активностей за присутності та відсутності в середовищі інкубації екзогенних іонів Са (на фоні присутності 1 мМ ЕГТА – специфічного хелатора іонів Са). У сарколемі міомерія свині питома ензиматична активність  $Ca^{2+}, Mg^{2+}$ -АТРази складає  $3,4 \pm 0,3$  мкмоль  $P_i$ /мг протеїну за 1 год відповідно ( $M \pm m$ ;  $n = 7$ ).

“Базальну”  $Mg^{2+}$ -АТРазну активність визначали у фракції ПМ клітин міомерія при 37 °С у середовищі (об’єм - 0,4 мл), яке містило (мМ): 1 АТР, 3  $MgCl_2$ , 125 NaCl, 25 KCl, 1 ЕГТА, 20 Hepes-tris-буфер (рН 7,4), 1  $NaN_3$ , 1 уабаїн, 0,1 мкМ тапсигаргін і 0,1 % дигітонін. “Базальну”  $Mg^{2+}$ -АТРазну активність розраховували як різницю між кількістю  $P_i$ , що утворився в середовищі інкубації в присутності та відсутності фракції ПМ, з урахуванням поправки на вміст ендogenous  $P_i$  в мембранному препараті.

$Na^+, K^+$ -АТРазну активність визначали в тому ж середовищі та розраховували по різниці між величинами АТРазних активностей за відсутності та присутності 1 мМ уабаїну.

У наших експериментах середнє значення питомих активностей  $Na^+, K^+$ -АТРази та “базальної”  $Mg^{2+}$ -АТРази ПМ становить  $10,2 \pm 0,7$  і  $18,1 \pm 1,2$  мкмоль  $P_i$ /мг протеїну за 1 год ( $M \pm m$ ;  $n = 7$ ) відповідно.

Необхідно відмітити, що у ПМ міоцитів матки виявлено також  $Ca^{2+}$ -АТРазу, яка за своїми властивостями є відмінною від  $Ca^{2+}, Mg^{2+}$ -АТРази. Адже її активність проявляється за наявності в середовищі інкубації  $Ca^{2+}$  і АТР у мілімолярних концентраціях, на тлі відсутності іонів Mg [81, 82].  $Ca^{2+}$ -АТРаза є низькоафінною до активуючого катіона – константа активації іонами Са  $K_{Ca}$  становить 1 мМ [82]. Низькоафінну  $Mg^{2+}$ -незалежну  $Ca^{2+}$ -

АТРазну активність визначали у фракції ПМ клітин міометрія при 37 °С у середовищі (об'єм - 0,4 мл), яке містило (мМ): 1 АТР, 3 CaCl<sub>2</sub>, 125 NaCl, 25 KCl, 1 EGTA, 20 HEPES-tris-буфер (рН 7,4), 1 NaN<sub>3</sub>, 1 уабаїн, 0,1 мкМ тапсигаргін і 0,1 % дигітонін. Дану Ca<sup>2+</sup>-АТРазну активність розраховували як різницю між кількістю P<sub>i</sub>, що утворився в середовищі інкубації в присутності та відсутності фракції ПМ, з урахуванням поправки на вміст ендogenous P<sub>i</sub> в мембранному препараті. У сарколемі міометрія свині питома ензиматична активність низькоафінної Mg<sup>2+</sup>-незалежної Ca<sup>2+</sup>-АТРази ПМ становить 12,7 ± 2,0 мкмоль P<sub>i</sub>/мг протеїну за 1 год відповідно (M ± m; n = 7).

У дослідах по вивченню впливу різних концентрацій калікс[4]арену С-956 (1-100 мкМ) на Ca<sup>2+</sup>,Mg<sup>2+</sup>-АТРазну активність використовували стандартне середовище інкубації, що було описане вище, до якого додавали аліквоту розчину калікс[4]арену у відповідній концентрації. У дослідах використовували концентрований (20 мМ) розчин калікс[4]арену С-956 в ДМСО, який потім розводили водою.

#### 2.4. Виділення міоцитів матки

Матку невагітних щурів відділяли від сполучної тканини та поміщали в розчин Б (розчин Хенкса, який не містить MgCl<sub>2</sub> і MgSO<sub>4</sub> та містить CaCl<sub>2</sub> в концентрації 0,03 мМ) наступного складу, мМ: 136,9 NaCl, 5,36 KCl, 0,44 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,26 NaHCO<sub>3</sub>, 0,26 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,03 CaCl<sub>2</sub>, 5,5 глюкоза, 10 HEPES (рН 7,4 при 37°С). Тканину подрібнювали на шматочки розміром приблизно 2×2 мм. Надалі інкубували міометрій протягом 20 хв (при 37 °С, режим постійного перемішування) у 2 мл середовища дисоціації тканини, яке має наступний склад: розчини колагенази типу ІА (0,1 %), бичачого сироваткового альбуміну (0,1 %) і соєвого інгібітору трипсину (0,01 %), виготовлені на розчині Б. Протягом цього часу відбувається розщеплення

міжклітинної речовини в тканині; для прискорення даного процесу тканину поміщають у розчин Б і піпетують скляною піпеткою протягом 5 хв.

Далі розчин Б, що містить дисоційовані клітини та залишки сполучної тканини, відбирали, а тканинний препарат знову переносили в нову порцію середовища дисоціації клітин та інкубували за вищезазначених умов. Дані кроки (інкубація в середовищі дисоціації та піпетування) проводились 5-6 разів.

Дві перші порції розчину Б, що використовуються для піпетування, відкидали через наявність фрагментів тканини та пошкоджених клітин. Остані 3-4 порції об'єднували, пропускали через нейлоновий фільтр і центрифугували 10 хв при 80 g для осадження клітин і відмивання від розчину колагенази. Осад ресуспендували в розчині Б. Центрифугування і фільтрування повторювали ще раз. Отриману суспензію зберігали в холодильнику при 8 °С.

## **2.5. Визначення змін концентрації внутрішньоклітинного $\text{Ca}^{2+}$ з використанням конфокальної мікроскопії**

Задля реєстрації зміни концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у гладеньком'язових клітинах суспензію міоцитів, отриманих модифікованим методом Молларда [83, 84], протягом 20 хв при кімнатній температурі навантажували  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливим зондом fluo-4 AM, після чого клітини осаджували шляхом центрифугування протягом 15 хв при 1000 g, розводили в ізотонічному середовищі зберігання (яке містило 25 мМ HEPES-KOH (pH=7,4; 8 °С), 150 мМ NaCl) та наносили на скляну поверхню з полі-L-лізином. Отриманий препарат іммобілізованих клітин досліджували за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопу LSM 510 «META». Для аналізу обирали клітини веретеноподібної форми з чітко окресленим, профарбованим ДНК-чутливим флуоресцентним зондом Hoechst ядром (наносили за 10 хвилин до початку реєстрації). Для реєстрації відносних змін концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у цитоплазмі

здійснювали серію послідовних знімків, під час якої вносили аліквоту розчину С-90 (у випадку проби) або С-150 (у випадку контролю) у концентрації 20 мкМ (5 мкл).

## **2.6. Методи тензометричного дослідження**

Тензометричні досліди проводили на препаратах вісцеральних гладеньких м'язів матки щурів. Скорочувальну активність гладеньких м'язів рогів матки досліджували на препаратах, для приготування яких оваріальну частину рогів матки розрізали у поздовжньому напрямку на смужки, залишаючи ендотеліальний шар інтактним.

М'язові препарати (смужки середнього розміру 2 x 10 мм) вміщували в робочу камеру (об'єм 2 мл) з проточним розчином Кребса (швидкість протікання - 5 мл/хв.), термостатовану при 37°C. Препарату надавали пасивний натяг на рівні 10 мН і залишали на 1 годину (до стабільної відтворюваності спонтанних скорочень), після цього спонтанні скорочення реєстрували і піддавали кінетичному аналізу. Скоротливу активність досліджували в ізометричному режимі за допомогою тензометричного датчика сили. Сигнали реєстрували, використовуючи аналого-цифровий перетворювач.

Препаративні процедури і тензометричні експерименти проводили у розчині Кребса (мМ): 120,4 NaCl; 5,9 KCl; 15,5 NaHCO<sub>3</sub>; 1,2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,2 MgCl<sub>2</sub>; 2,5 CaCl<sub>2</sub>; 11,5 глюкоза; значення рН розчину становило 7,4.

Експерименти були побудовані за схемою: після 20 хв передінкубації з калікс[4]ареном С-956 (10 мкМ) упродовж 10-20 хв реєстрували спонтанні скорочення для механокінетичного аналізу.

## **2.7. Використання багатопараметричного механокінетичного аналізу для вивчення дії калікс[4]арену С-956 на скорочення-розслаблення гладенького м'язу матки**

Повний профіль спонтанних циклів скорочення-розслаблення досліджували за допомогою розробленого нами емпіричного багатопараметричного методу комплексного механокінетичного аналізу (із розрахунком часових ( $\tau_0$ ,  $\tau_C$  і  $\tau_R$ ), силових ( $F_{\max}$ ,  $F_C$  та  $F_R$ ), швидкісних ( $V_C$  і  $V_R$ ), а також імпульсних параметрів ( $I_{\max}$ ,  $I_C$  та  $I_R$ ) (Додаток А). Відповідно до даного методу поодинокі спонтанні скорочення лінеаризували у координатах

$$\ln \frac{f}{f_c} + \Delta t \frac{df}{dt}$$

де  $f$  і  $t$  – миттєві значення сили та часу на рівні фаз скорочення (позначено індексом «С») і розслаблення (позначено індексом «R») скоротливого циклу.  $F_C$  і  $F_R$  – відповідно значення сили в точках перегину механограми на рівні фаз скорочення (від початку зростання сили до її максимального значення  $F_{\max}$ ) і розслаблення (від максимального значення сили  $F_{\max}$  і до її повернення на базальний рівень);  $\tau_C$  і  $\tau_R$  – показники характеристичного часу фази скорочення (час, в який реєструється  $F_C$ ) і фази розслаблення (час, в який реєструється  $F_R$ );  $\tau_0$  – характеристичний час амплітуди (час, в який реєструється  $F_{\max}$ );  $V_C$  і  $V_R$  – відповідно максимальні швидкості фаз скорочення і розслаблення;  $I_{\max}$  – імпульс сили на рівні амплітуди  $F_{\max}$ ;  $I_C$  і  $I_R$  – відповідно імпульс сили на рівні максимальних швидкостей скорочення і розслаблення.

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 або однофакторний дисперсійний аналіз (one-way ANOVA); апостеріорне порівняння здійснювали з використанням тесту Бонферроні. 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 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

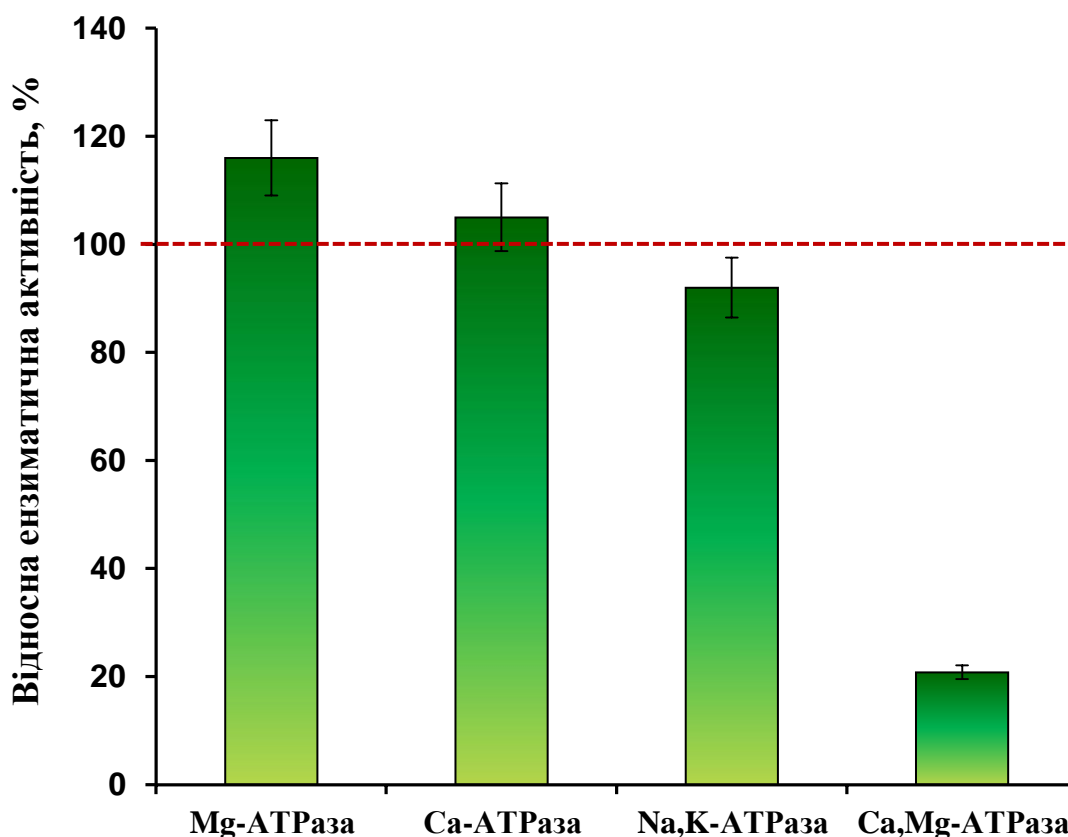
#### 3.1. Дослідження впливу калікс[4]арену С-956 на $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ - залежну АТР-гідролазну активність плазматичної мембрани клітин міометрія

У експериментах із з'ясування дії калікс[4]арену на  $\text{Mg}^{2+}$ -залежні АТР-гідролазні активності фракції ПМ ГМК ми встановили, що калікс[4]арен С-956 (5,11,17,23-тетра(трифтор)метил(фенілсульфо-ніліміно)метиламіно-25,27-діоктилокси-26,28-дипропоксикалікс[4]арен) у концентрації 100 мкМ селективно пригнічує  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРазну активність ПМ клітин міометрія до рівня  $20,8 \pm 0,4$  % відносно контрольного значення (прийнятого за 100 %) ( $M \pm m$ ;  $n = 5$ ) (рис. 3.1).

Втім, досліджувана сполука, взята у такій самій концентрації, майже не впливала на ензиматичні активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРази: спостерігалось незначне її інгібування до  $95,2 \pm 0,6$  %; “базальної”  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРази: відбувалась незначна активація до  $108,4 \pm 1,0$  %; та  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРази ПМ, яку вказаний калікс[4]арен незначно активував до  $104,3 \pm 0,9$  % щодо контрольного значення (рис. 3.1).

Необхідно зазначити, що суто каліксаренова «чаша» (калікс[4]арен С-150; 25,27-дипропоксикалікс[4]арен) практично не впливає на ензиматичну активність  $\text{Mg}^{2+}$ , АТР-залежної кальцієвої помпи ПМ (дані не наведені).

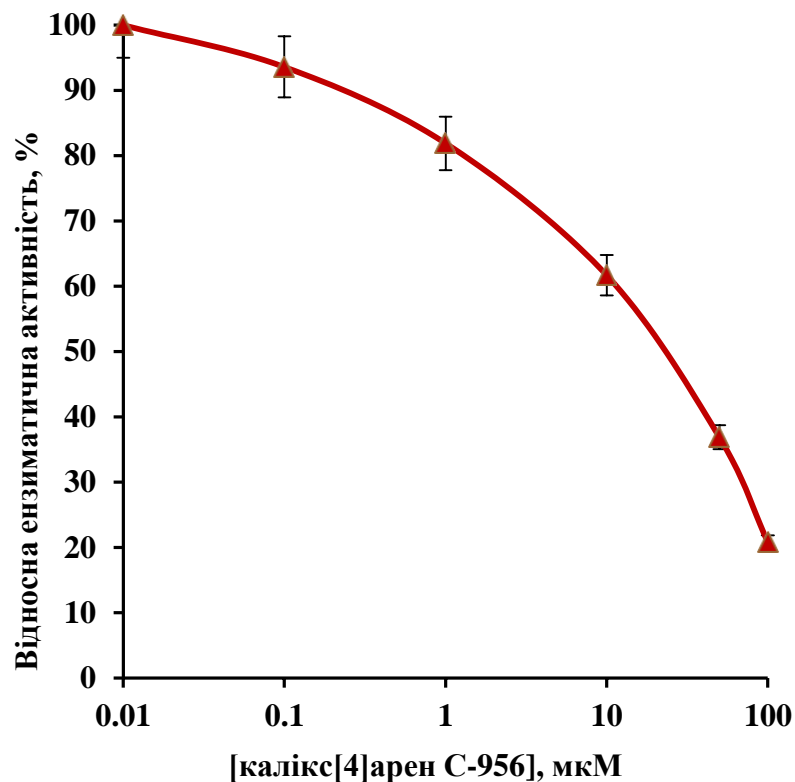
Отже, калікс[4]арен С-956 у концентрації 100 мкМ селективно та ефективно (на рівні ПМ) пригнічує активність  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ ГМК матки, не впливаючи на активність інших АТР-гідролаз ПМ, а саме  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРази,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРази і  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРази ПМ.



**Рис. 3.1.** Вплив калікс[4]арену С-956 (100 мкМ) на АТФ-гідролазні активності ПМ ГМК міометрія ( $M \pm m$ ,  $n = 5$ ). За 100 % прийнято значення питомих ензиматичних активностей за відсутності в середовищі інкубації калікс[4]арену С-956.

У наступних експериментах ми досліджували концентраційну залежність інгібуючої дії даного калікс[4]арену, взятого в інтервалі концентрацій від 0,1 до 100 мкМ на  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФазну активність ПМ.

Як можна побачити на рис.3.2, калікс[4]арен С-956 ефективно та дозозалежно пригнічує активність  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФази ПМ. Величина уявної константи інгібування  $I_{0,5}$  при цьому становить  $15,0 \pm 0,5$  мкМ, а значення коефіцієнта Хілла  $n_H$  складає  $0,55 \pm 0,01$  ( $M \pm m$ ;  $n = 5$ ). Варто зазначити, що величина  $I_{0,5}$  для калікс[4]арену С-956 є меншою, ніж для калікс[4]арену С-90 ( $I_{0,5}=20,2 \pm 0,5$  мкМ) [85], а величина коефіцієнта Хілла  $n_H$  при цьому практично однакова для обох калікс[4]аренів.

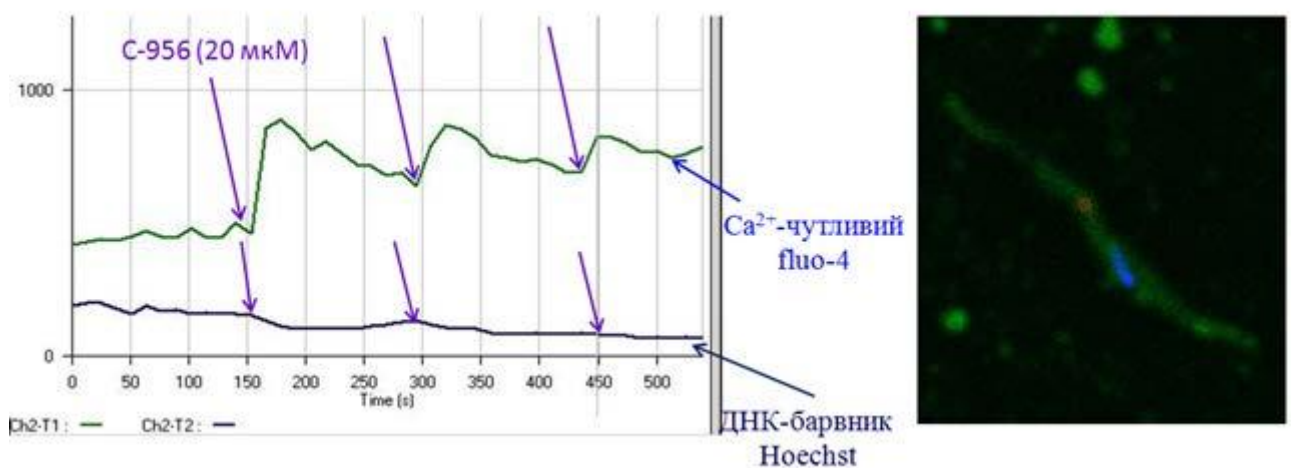


**Рис. 3.2.** Концентраційна залежність впливу калікс[4]арену С-956 на активність  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази у фракції плазматичних мембран клітин міометрія ( $M \pm m$ ,  $n = 5$ ). За 100 % прийнято значення питомої ензиматичної активності при відсутності калікс[4]арену С-956 у середовищі інкубації.

### 3.2. Дослідження впливу калікс[4]арену С-956 на концентрацію іонів Са в клітинах міометрія

Оскільки відомо, що  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза ПМ є ключовим ензимом, який забезпечує видалення і контроль концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у цитоплазмі ГМК міометрія, необхідно дослідити ефекти калікс[4]арену С-956 на зміну концентрації іонів Са у цитоплазмі гладеньком'язових клітин. Тому у наступних експериментах ми досліджували вплив даної сполуки на внутрішньоклітинну концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  за допомогою методу конфокальної

мікроскопії. Для цього було використано  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливий зонд fluo-4 АМ. Так, відповідно до зміни флуоресценції fluo-4, у ГМК під впливом калікс[4]арену С-956 у концентрації 20 мкМ спостерігалось тимчасове, але різке зростання концентрації іонів Са (рис. 3.3). Проте, впродовж наступних 2-2,5 хв концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  знижувалась до вихідного рівня, що вказує на видалення іонів Са іншими клітинними системами ( $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортер мітохондрій,  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник ПМ), що виконують роль компенсаторних механізмів. Після повторного додавання аліквоти калікс[4]арену С-956 спостерігалось не таке значне зростання концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ , як при першому внесенні. Таким чином, калікс[4]арен С-956 – інгібітор  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ – підвищує концентрацію іонів Са у ГМК матки.



**Рис. 3.3.** Зміна флуоресценції  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливого зонду fluo-4 АМ та ДНК-чутливого зонду Hoechst в ГМК міометрія при дії калікс[4]арену С-956, зареєстрована за допомогою конфокальної мікроскопії. Стрілками показано внесення аліквоти розчину калікс[4]арену С-956 (кінцева концентрація - 20 мкМ). Наведено результати типового експерименту.

У контролі із використанням калікс[4]аренової «чаші» С-150 у концентрації 20 мкМ, яка за нашими результатами не впливала на активність  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ (див. вище), підвищення флуоресцентного сигналу і, відповідно, концентрації іонів Са у ГМК не спостерігалось.

Отже, за отриманими результатами калікс[4]арен С-956 (20 мкМ) індукує різке підвищення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у клітині, що пояснюється інгібіторним впливом даної сполуки на  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаду ПМ та зниженням її базальної активності, відповідно. Поряд із цим протягом наступних 2-2,5 хв концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  знижується до початкового рівня внаслідок залучення компенсаторних систем, які мають нижчу афінність до  $\text{Ca}^{2+}$  та реагують на його високі концентрації в клітині.

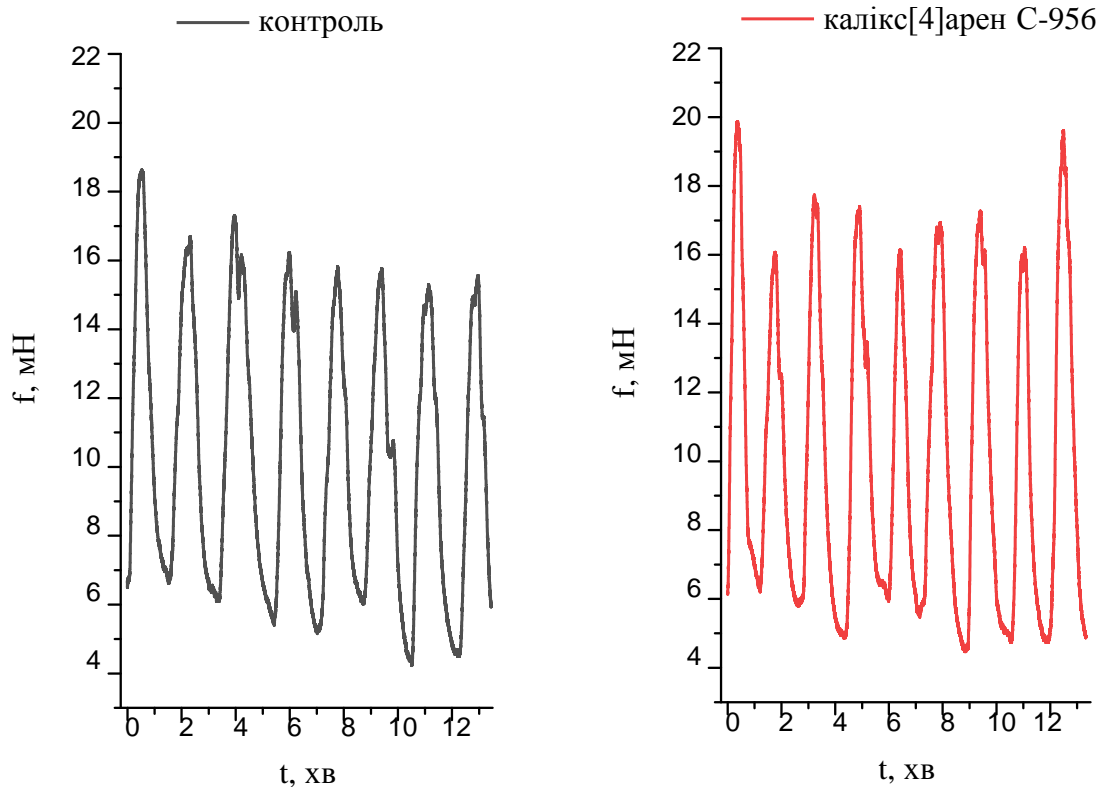
### **3.3. Використання методу багатопараметричного механокінетичного аналізу для вивчення впливу калікс[4]арену С-956 на скорочення-розслаблення гладенького м'язу матки**

Оскільки у досліджах *in vitro* на препаратах суспензії плазматичних мембран гладеньком'язових клітин міометрія свині переконливо доведено, що калікс[4]арен С-956 є високоафінним інгібітором  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи ПМ, надалі на багатоклітинних гладеньком'язових препаратах рогів матки щурів нами було досліджено ефекти цієї сполуки (за фіксованої концентрації  $10^{-5}$  М) на механокінетику скорочувальної активності.

Попередня інкубація препаратів міометрія з калікс[4]ареном С-956 упродовж 20-30 хв не супроводжувалась зміною тонузу ГМ, втім призводила до активації спонтанної скорочувальної активності, яка відображалась у підвищенні амплітуди і частоти (рис. 3.4, 3.5А).

Відомо, що зміни амплітуди фазних спонтанних скорочень міометрія корелюють із внутрішньоклітинною концентрацією іонів  $\text{Ca}^{2+}$ , транзйентне зростання якої спричиняє скорочувальну реакцію міоцитів [86]; варіювання частоти спонтанних скорочень міометрія обумовлюється змінами ефективності пейсмейкерних процесів у цій тканині [87]. Тож ми можемо передбачити, що підвищення амплітуди спонтанних скорочень за дії

калікс[4]арену C-956 пов'язано зі зростанням концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозолі за блокування  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи цією сполукою. Що стосується підвищення частоти спонтанних скорочень за дії C-956, можна припустити, що вона також спричинена  $\text{Ca}^{2+}$ -залежними процесами у тканині міометрія.

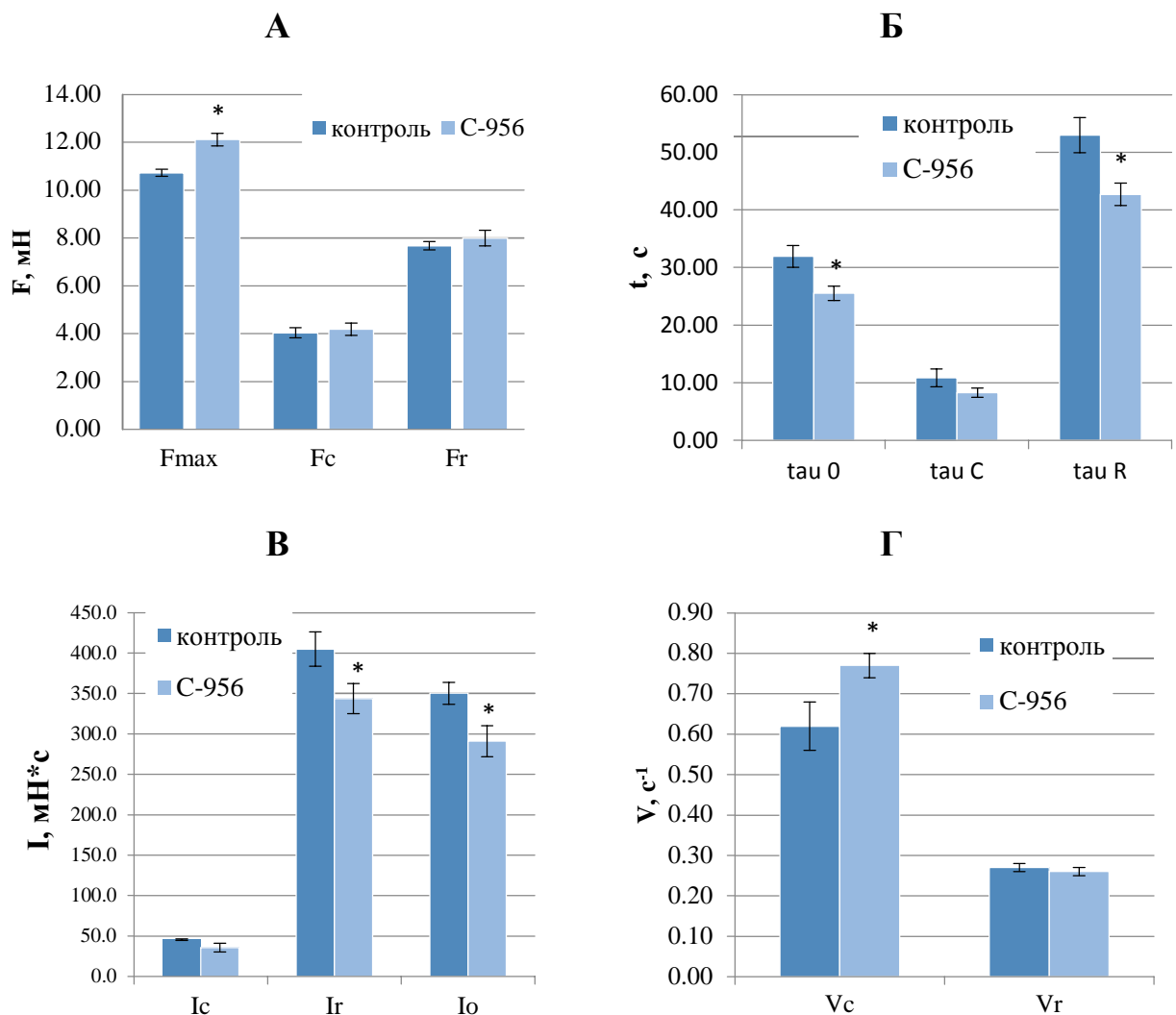


**Рис. 3.4.** Спонтанна скорочувальна активність міометрія щурів у контролі та на тлі дії калікс[4]арену C-956 (10 мкМ, тривалість перед інкубації 20 хв). Усі експерименти проведені на тлі дії розчинника DMSO (0,1%). Наведено типову механограму спонтанних скорочень.

Надалі поодинокі цикли спонтанних скорочень-розслаблень препаратів міометрія у контролі та за дії C-956 аналізували із застосуванням багатопараметричного методу комплексного механокінетичного аналізу. Нами було встановлено, що C-956 спричиняє суттєве зменшення часових показників: часу досягнення амплітуди скорочення ( $\tau_0$ ) та характеристичного часу фази розслаблення ( $\tau_R$ ).

Тривалість досягнення амплітуди скорочення ( $\tau_0$ ) безпосередньо залежить від ефективності процесів надходження іонів  $\text{Ca}^{2+}$  з позаклітинного простору через потенціалкеровані кальцієві канали [88]; тож ми можемо припустити, що передінкубація м'язових препаратів з С-956 активує ці процеси.

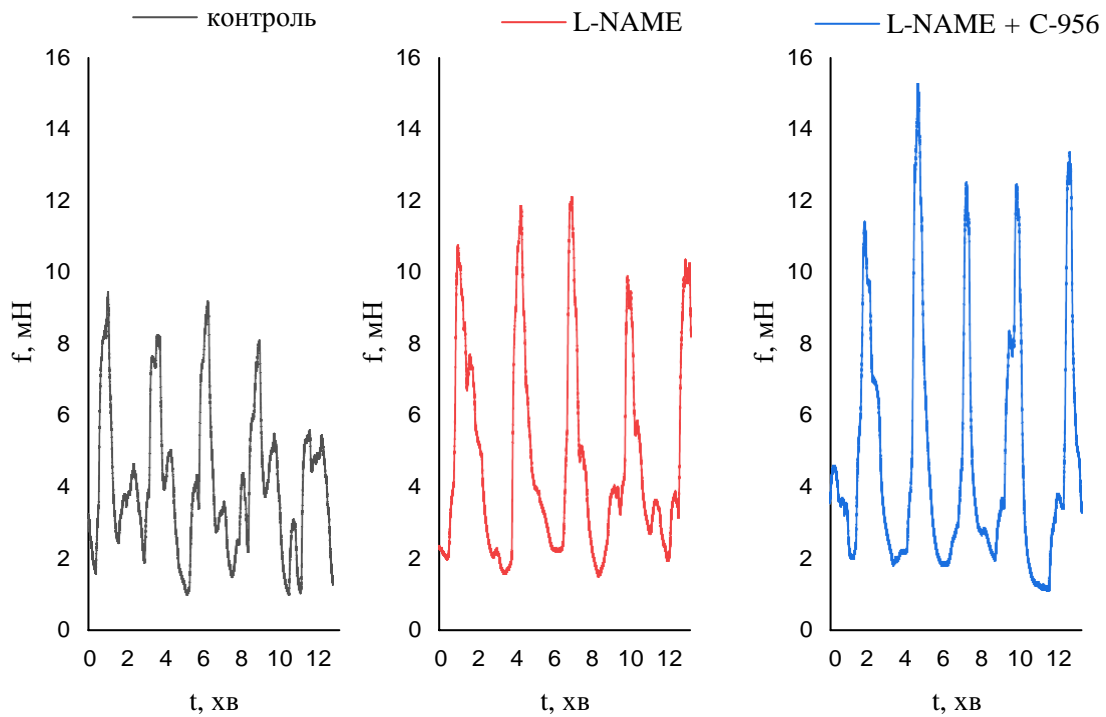
Оскільки попередньо біохімічними дослідженнями було переконливо доведено, що дана сполука пригнічує  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФазу ПМ, тож вона повинна суттєво змінювати процес розслаблення, який переважно залежить від процесів екструзії  $\text{Ca}^{2+}$  [89]. Тому наші подальші дослідження були акцентовані на механокінетичному аналізі процесів розслаблення спонтанних фазних скорочень препаратів міометрія.



**Рис. 3.5.** Параметри спонтанної скорочувальної активності міометрія щурів у контролі та за дії калікс[4]арену С-956 (10 мкМ, час перед інкубації 20 хв): А – силові параметри ( $F_{\max}$ ,  $F_C$  та  $F_R$ ); Б – часові параметри ( $\tau_0$ ,  $\tau_C$  і  $\tau_R$ ); В – імпульсні параметри ( $I_{\max}$ ,  $I_C$  та  $I_R$ ); Г – швидкісні параметри ( $V_C$  і  $V_R$ ).

За 100% прийнято відповідні показники спонтанної активності в контролі (n=6, \* - p<0.05 – різниця достовірна щодо контролю).

Калікс[4]арен С-956 у використаній нами концентрації 10 мкМ не впливав на показники параметрів, які характеризують процес розслаблення: значення сили, за якої спостерігається максимальна швидкість фази розслаблення ( $F_R$ ), а також значення максимальної швидкості фази розслаблення ( $V_R$ ) (рис. 3.5 А і Г). Ватро відзначити, що зафіксоване в наших дослідженнях зменшення характеристичного часу фази розслаблення ( $\tau_R$ ) також загалом протирічить передбаченню, що калікс[4]арен С-956, блокуючи викачування іонів  $Ca^{2+}$  з міоцитів, повинен уповільнювати процес розслаблення. Втім, відомо, що у міометрії щурів молекули Са-помпи концентруються в кавеолах, де приймають участь у формуванні специфічних сигналомних комплексів та пригнічують активність розташованих поряд  $Ca^{2+}$ -залежних ензимів, зокрема NO-синтази [90]. Відомо, що оксид азоту має виражену токолітичну дію, спричиняючи суттєве розслаблення міометрія, яке також супроводжується значним прискоренням релаксації спонтанних скорочень [91]. Тож у наступній серії експериментів ми дослідили ефекти калікс[4]арену С-956 на тлі блокування NO-синтази неселективним блокатором L-NAME (0,1 мМ).

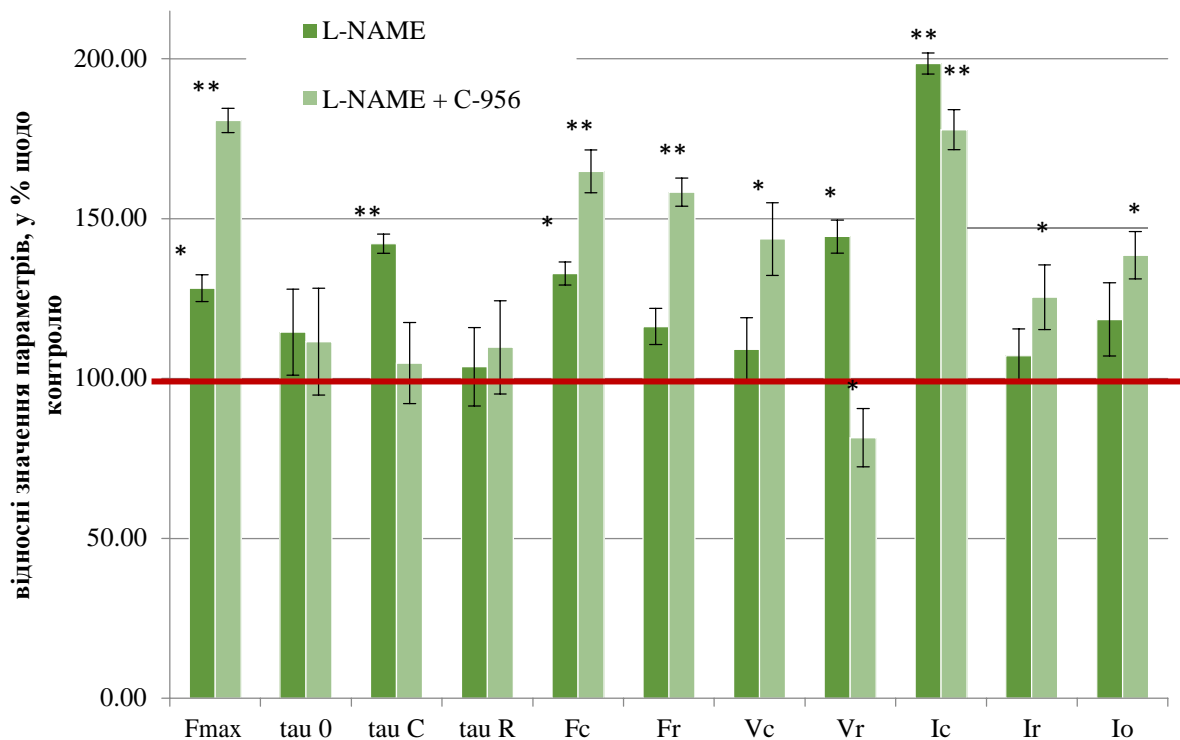


**Рис. 3.6.** Спонтанна скорочувальна активність міометрія щурів у контролі, за блокування NO-синтази L-NAME (100 мкМ, тривалість попередньої інкубації 20 хв), а також за дії калікс[4]арену C-956 (10 мкМ) на тлі L-NAME (100 мкМ). Наведено типові механограми.

Передінкубація препаратів міометрія з L-NAME (0,1 мМ) супроводжувалась активацією спонтанних скорочень, яка відображалась у підвищенні амплітуди у середньому до 128,3% щодо контролю (рис. 3.6). Також на тлі суттєво зростали значення параметрів, які характеризують фазу скорочення: характеристичний час фази скорочення ( $\tau_C$ ); сила, за якої спостерігається максимальна швидкість фази скорочення ( $F_C$ ); імпульс сили на рівні максимальної швидкості скорочення ( $I_C$ ) (рис. 3.7). Такі ефекти неселективного блокатора синтаз оксиду азоту, ймовірно, пов'язані з наявністю базального синтезу NO у тканинах матки, який є важливим регулятором збудливості.

На тлі L-NAME калікс[4]арен C-956 суттєво посилював спонтанну скорочувальну активність міометрія, підвищуючи амплітуду скорочень у середньому до 181% щодо контролю (рис. 3.7). В даних умовах значно

активувалися процеси фаз скорочення, про що свідчить зростання параметрів максимальної швидкості фази скорочення ( $V_C$ ) та сили, за якої спостерігається максимальна швидкість фази скорочення ( $F_C$ ). Також на тлі L-NAME калікс[4]арен C-956 спричиняв суттєве уповільнення процесу релаксації м'язових препаратів, що відобразилось на зниженні максимальної швидкості фази розслаблення ( $V_R$ ) у середньому до 81,5 % щодо контролю (та у середньому до 56,4% щодо максимальної швидкості релаксації за дії лише L-NAME).



**Рис. 3.7.** Відносні зміни механокінетичних параметрів спонтанних скорочень міометрія щурів за блокування NO-синтази неселективним блокатором L-NAME (100 мкМ) та дії калікс[4]арену C-956 (10 мкМ) на тлі L-NAME (100 мкМ). Позначення: силові параметри ( $F_{\max}$ ,  $F_C$  та  $F_R$ ), часові параметри ( $\tau_0$ ,  $\tau_C$  і  $\tau_R$ ), імпульсні параметри ( $I_{\max}$ ,  $I_C$  та  $I_R$ ) та швидкісні параметри ( $V_C$  і  $V_R$ ). Параметри представлені у % щодо відповідних контрольних значень, прийнятих за 100% (n=6, \* - p<0.05 та \*\* - p<0.01 – різниця достовірна щодо контролю).

Тож результати наших досліджень вказують на те, що калікс[4]арен С-956, здатен пригнічувати активність  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи плазматичної мембрани в умовах максимально наближених до інтактних – у випадку аплікації до багатоклітинних препаратів матки щурів. Ймовірно, що у випадку інтактних м'язових препаратів на ефекти С-956 щодо  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи накладаються також процеси, пов'язані з функціональним оточенням цього ензиму в міоцитах, зокрема,  $\text{Ca}^{2+}$ -регульованими протеїнами. Останнє припущення добре підтверджується дослідями з вивчення модуляції калікс[4]ареном С-956 спонтанної скорочувальної активності міометрія скорочень на тлі блокування NO-синтаз L-NAME.

Отже, результати наших експериментів підтверджують, що калікс[4]арен С-956 є інгібітором  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ та перспективною сполукою для помірної модуляції скорочувальної активності міометрія.

## ВИСНОВКИ

1. Калікс[4]арен С-956 селективно та афінно ( $I_{0,5} = 15$  мкМ) пригнічує активність транспортної  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани, не впливаючи на активності інших АТР-гідролаз -  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРази і  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРази.
2. У дослідах із використанням конфокальної мікроскопії показано, що калікс[4]арен С-956 індукує підвищення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в міоцитах матки.
3. Із використанням розробленого нами методу багатопараметричного аналізу повного циклу скоротливої відповіді була продемонстрована модулююча дія калікс[4]арену С-956 на процес скорочення-розслаблення міометрія.
4. Встановлено, що ефекти калікс[4]арену С-956 на спонтанну скорочувальну активність міометрія є суттєво більш вираженими в умовах блокування синтезу NO, що може бути пояснено структурно-функціональною взаємодією ензимів NO-синтази і  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани.

На основі отриманих результатів зроблено висновок про ефективність калікс[4]арену С-956 як нового модулятора  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази активності ПМ гладеньком'язових клітин міометрія.

## 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., Danylovych 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 acrivity. *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. Burdya 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  $\text{Ca}^{2+}$ -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.  $\text{Ca}^{2+}$  entry, efflux and release in smooth muscle // *Biol. Res.* – 2004. – 37, N 4. – P. 617–624.
17. Oloizia B., Paul R.J.  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  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., Gnarr 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  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ -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. Krebs J. The influence of calcium signaling on the regulation of alternative splicing // *BBA.* – 2009. – 1793, № 6. – P. 979 – 984.
28. Linde C.I., Di Leva F., Domi T., Tosatto S.C., Brini M., Carafoli E. Inhibitory interaction of the 14-3-3 proteins with ubiquitous (PMCA1) and tissue-specific (PMCA3) isoforms of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump // *Cell Calcium.* – 2008. – 43, N 6. – P. 550–61.
29. Enyedi A., Verma A.K., Heim R., Adamo H.P., Filoteo A.G., Strehler E.E., Penniston J.T. The  $\text{Ca}^{2+}$  affinity of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ - pump is controlled by alternative splicing // *J. Biol. Chem.* – 1994. – 269, N 1. – P. 41–43.
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  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase by arachidonic acid // *Prostagland. Lipid Mediators.* – 2008. – 87. – P. 47–53.
35. Cartwright E.J., Oceandy D., Austin C., Neyses L.  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$  efflux from rat sensory neurons via protein kinase C and the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump isoform 4 // *Neuron*. – 2002. – 33. – P. 113–122.
39. Ishida Y., Paul R.J.  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$ -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. Gomez-Pinilla P.J., Pozo M.J., Akemishi B., Matsuda T., Camello P.J.  $\text{Ca}^{2+}$  extrusion in aged smooth muscle cells // *Biochem. Pharmacol.* – 2007. – 74, N 6. – P. 860–869.
43. Padanyi R., Paszty K., Penheiter A.R., Filoteo A.G., Penniston J.T., Enyedi A. Intramolecular interactions of the regulatory region with the catalytic core in the plasma membrane calcium pump // *J. Biol. Chem.* – 2003. – 278. – P. 35798–35804.
44. Pande J., Mallhi K.K., Grover A.K. A novel plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -pump inhibitor: caloxin 1A1 // *Eur. J. Pharmacol.* – 2005. – 508, N 1–3. – P. 1–6.
45. Schuh K., Uldrijan S., Gambaryan S., Roethlein N., Neyses L. Interaction of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump 4b/CI with the  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent membrane-associated kinase CASK // *J. Biol. Chem.* – 2003. – 278, N 11. – P. 9778-83.
46. Kosterin S.O. Kinetics and energetics of  $\text{Mg}^{2+}$ ,ATP-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  transport in the plasma membrane of smooth muscle cells // *Neurophysiol.* – 2003. – 35, N 3/4. – P. 215–228.

47. Leva F.D., Domi T., Fedrizzi L., Lim D., Carafoli E. The plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of animal cells: Structure, function and regulation // Arch. Biochem. Biophys. – 2008. – 476, N 1. – P. 65 – 74.
48. Zhang J., Xiao P., Zhang X. Phosphatidylserine externalization in caveolae inhibits  $\text{Ca}^{2+}$  efflux through plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in ECV304 // Cell Calcium. – 2009. – 45. – P. 177–184.
49. Pang Y., Zhu H., Wu P., Chen J. The characterization of plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in rich sphingomyelin-cholesterol domains // FEBS Lett. – 2005. – 579, N 11. – P. 2397-403.
50. Brini M., Carafoli E. Calcium pump in health and disease // Physiol. Rev. – 2009. – 89. – P. 1341-1378.
51. 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.
52. 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.
53. DeMarco S.J., Strehler E.E. Plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -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.
54. Kim E., DeMarco S.J., Marfatia S.M., Chishti A.H., Sheng M., Strehler E.E. Plasma Membrane  $\text{Ca}^{2+}$  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.
55. DeMarco S.J., Chicka M.C., Strehler E.E. Plasma Membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Isoform 2b Interacts Preferentially with  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Exchanger Regulatory Factor 2 in Apical Plasma Membranes // J. Biol. Chem. – 2002. – 277. – P. 10506-10511.

56. Goellner G.M., DeMarco S.J., Strehler E.E. Characterization of PISP, a novel single-PDZ protein that binds to all plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase b-splice variants // *Ann. N. Y. Acad Sci.* –2003. – 986. – P.461-71.
57. 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  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 4b is activated and appropriately targeted // *Biochem. J.* – 2005. – 391, Pt 3. – P. 687-92.
58. 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.
59. 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.
60. Lalor R., Baillie-Johnsos H., Redshew C., Matthnews S.E., Mueller A. Cellular uptake of a fluorescent calix[4]arene derivative // *J. Am. Chem. Soc.* – 2008. – 130, N 10. – P. 2892–2893.
61. Paclet 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.
62. 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  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-азну активність у плазматичній мембрані міоцитів матки // *Укр. біохім. журн.* - 2012. - Т. 84, № 6. - С. 49-57.
63. 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.
64. Векліч Т.О., Шкрабак О.А., Родік Р.В., Кальченко В.І., Костерін С.О. Каліксарен С-107 збільшує спорідненість  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-ази плазматичної

- мембрани гладеньком`язових клітин до убаїну // Укр. біохім. журн. - 2011. - 83, № 1. - С. 38–44.
65. Векліч Т., Шкрабак О., Мазур Ю. Активність  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани гладеньком`язових клітин селективно пригнічується калікс[4]ареном С-90 // Вісник Львівського університету. - 2014. - вип. 68. - С. 337-347.
66. Dejun Xiong. Colorimetric detection of pesticides based on calixarene modified silver nanoparticles in water / Dejun Xiong, Haibing Li // Nanotechnology. – 2008. – Vol. 19, N 46. – P. 126-135.
67. Water-soluble calixarenes as new inverse phase-transfer catalysts. Nucleophilic substitution of alkyl and arylalkyl halides in aqueous media / Shimizu S. [et al.] // Chemical Communications. – Vol. 17. – P. 1629-1630.
68. Nimse S. Biological applications of functionalized calixarenes / Nimse S, Kim T. // Chem Soc Rev. – 2013. – Vol. 42. – N 1. – P. 366-386.
69. Фёгле Ф. Каликсарены // ХИМИЯ КОМПЛЕКСОВ «ГОСТЬ-ХОЗЯИН». Синтез, структуры и применения / Фёгле Ф., Вебер Э. – Пер. с англ. – М.: Мир, 1988. – С. 445-502.
70. Sartori A. Calix[4]arene metal complexes as nuclease and transacylase mimics / Sartori A // A thesis in chemistry. MA thesis. – 2004. - P.1-191.
71. 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.
72. Calix[6]arene bypasses human pancreatic cancer aggressiveness: Downregulation of receptor tyrosine kinases and induction of cell death by reticulum stress and autophagy / Pelizzaro-Rocha K. // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. – 2013. – Vol. 1833, N 12. – P. 2856-2865.
73. Applications of calixarenes in cancer chemotherapy: facts and perspectives / Abd Hamid S. [et al.] // DDDT. – 2015. – Vol. 9. – p. 2831-2838.

74. 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).
75. 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.
76. Flynn E.R.M., Bradley K.N., Muir T.C., McCarron J.G. Functionally separate intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores in smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(39): 36411-36418.
77. Valente R.C., Capella L.S., Monteiro R.Q. et al. Mechanisms of ouabain toxicity. *FASEB J.* 2003; 17(12): 1700-1702.
78. Wang H., Haas M., Liang M., Cai T., Tian J., Li S., Xie Z. Ouabain assembles signaling cascades through the caveolar  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(17): 17250-17259.
79. Veklich T.O., Kosterin S.O., Schinlova O.P. Cationic specificity of a  $\text{Ca}^{2+}$ -accumulating system in smooth muscle cell mitochondria. *Ukr. Biochem. J.* 2002;74(1):42-48. (In Ukrainian).
80. 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.
81. 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.
82. Magocsi M., Penniston J.T.  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Mg}^{2+}$  nucleotide phosphohydrolases in myometrium: two ecto-enzyme. *Biochim. Biophys. Acta.* 1991; 1070(1): 163-172.
83. Mollard P., Mironneau J., Amedee T., Mironneau C. Electrophysiological characterization of single pregnant rat myometrial cells in short-term primary culture. *Am. J. Physiol: Cell Physiology.* 1986; 19(1): C47-C54.

84. Amedee T., Mironneau Ch., Mironneau J. Isolation and contractile responses of single pregnant rat myometrial cells in short-term primary culture and the effects of pharmacological and electrical stimuli. *Br. J. Pharmac.* 1986; 88(4): 873-880.
85. 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  $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase of myometrium cell plasma membrane. *Biochemistry (M)*. 2014; 79(5): 417-424.
86. Bru-Mercier G, Gullam JE, Thornton S, Blanks AM, Shmygol A. Characterization of the tissue-level  $\text{Ca}^{2+}$  signals in spontaneously contracting human myometrium. *J Cell Mol Med*. 2012 Dec;16(12):2990-3000.
87. Hutchings G, Williams O, Cretoiu D, Ciontea SM. Myometrial interstitial cells and the coordination of myometrial contractility. *J Cell Mol Med*. 2009;13(10):4268-4282.
88. Xu J, Menon SN, Singh R, Garnier NB, Sinha S, Pumir A. The role of cellular coupling in the spontaneous generation of electrical activity in uterine tissue. *PLoS One*. 2015 Mar 20;10(3):e0118443.; Noble K, Matthew A, Burdyga T, Wray S. A review of recent insights into the role of the sarcoplasmic reticulum and  $\text{Ca}$  entry in uterine smooth muscle. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2009 May;144 Suppl 1:S11-9.
89. Matthew A, Shmygol A, Wray S.  $\text{Ca}^{2+}$  entry, efflux and release in smooth muscle. *Biol Res*. 2004;37(4):617-24. doi: 10.4067/s0716-97602004000400017. PMID: 15709690.
90. Schuh K, Uldrijan S, Telkamp M, Rothlein N, Neyses L. The plasmamembrane calmodulin-dependent calcium pump: a major regulator of nitric oxide synthase I. *J Cell Biol*. 2001 Oct 15;155(2):201-5.; Floyd R, Wray S. Calcium transporters and signalling in smooth muscles. *Cell Calcium*. 2007 Oct-Nov;42(4-5):467-76.
91. Malik M, Roh M, England SK. Uterine contractions in rodent models and humans. *Acta Physiol (Oxf)*. 2021 Apr;231(4):e13607; Tsybalyuk, O.V.,

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.

## ДОДАТОК А

Багатопараметричний аналіз механокінетики скоротливої відповіді  
вісцеральних гладеньких м'язів

Механокінетичний аналіз процесу скорочення-розслаблення гладеньких м'язів в модельних дослідах *in vitro* – важливий етап у з'ясуванні механізму електро- і фармакомеханічного спряження, вивченні дії фізіологічно активних та фармакологічних сполук на скоротливу активність. В ізометричному режимі реєстрації скоротливої активності (довжина м'язового препарату = *const*) типова механокінетична крива  $f = f(t)$  процесу скорочення-розслаблення гладенького м'язу – то є суперскладна крива, яка характеризується двома точками перегину на рівні фази скорочення – координати –  $F_C$ ;  $\tau_C$ , та фази розслаблення – координати  $F_R$ ;  $\tau_R$ , де  $F$  та  $\tau$  – відповідно значення сили  $f$  та часу  $t$  в точках перегину ( $(d^2f/dt^2)_{r_C}, r_R = 0$ ), а також точкою екстремуму – максимуму (амплітуди)  $F_{max}$  сили  $f$  в момент часу  $t = \tau_0$  ( $(df/dt)_{\tau_0} = 0$ ) (рис. 1).

Одне з найпростіших емпіричних рівнянь, що потенційно може задовольняти вищезазначеним кінетичним закономірностям, властивим для кривої скорочення-розслаблення гладенького м'язу (рис. 1), має наступний вигляд:

$$f = A \cdot t^n \cdot e^{-kt}, \quad (1)$$

де  $A$ ,  $n$  та  $k$  – деякі сталі.

Із співвідношення (1) безпосередньо випливає:

$$A = \frac{e^{-n} F_{max}}{c_0^n} = \frac{k e^{-n} F_{max}}{n}, \quad (2)$$

де:

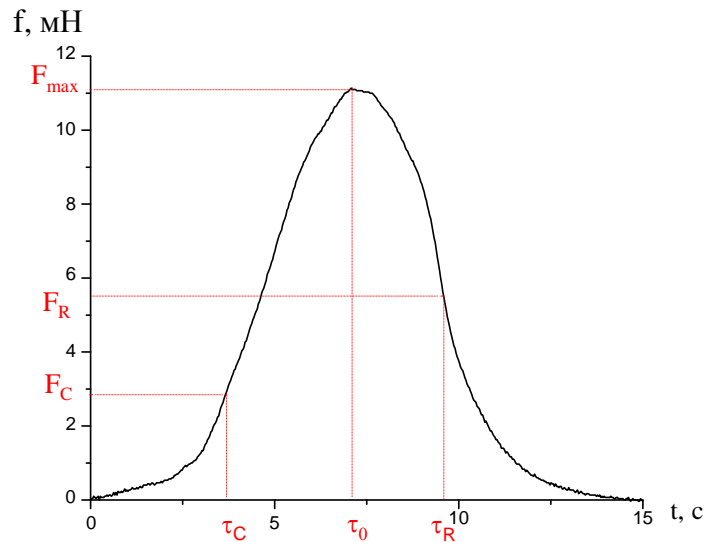
$$r_0 = \frac{c_C + c_R}{2} = \frac{n}{k}, \quad (3)$$

$$r_C = \frac{n - \sqrt{n}}{k}, \quad r_R = \frac{n + \sqrt{n}}{k},$$

звідки

$$r_0 - r_C = \frac{\sqrt{n}}{k}, \quad r_R - r_0 = \frac{\sqrt{n}}{k}, \quad r_C = 2 \frac{\sqrt{n}}{k}, \quad (4)$$

$$\frac{c_R - c_C}{c_R - c_0} = 2, \quad \frac{c_R - c_0}{c_0 - c_C} = 1.$$



**Рис. 1.** Типова повна ізометрична механокінетична крива процесу спонтанного скорочення-розслаблення гладенького м'язу антрального відділу шлунку (*antrum*) (наведено у якості прикладу). Тут  $f$  та  $t$  – миттєві значення сили та часу на рівні скоротливого циклу,  $F_C$  та  $F_R$  – значення сили в точках перегину ( $(d^2f/dt^2)r_C, r_R = 0$ ) на рівні фаз скорочення та розслаблення в моменти часу  $\tau_C$  та  $\tau_R$ , відповідно,  $F_{\max}$  – максимальне значення сили  $f$  в момент часу  $\tau_0$  ( $(df/dt)\tau_0 = 0$ ).

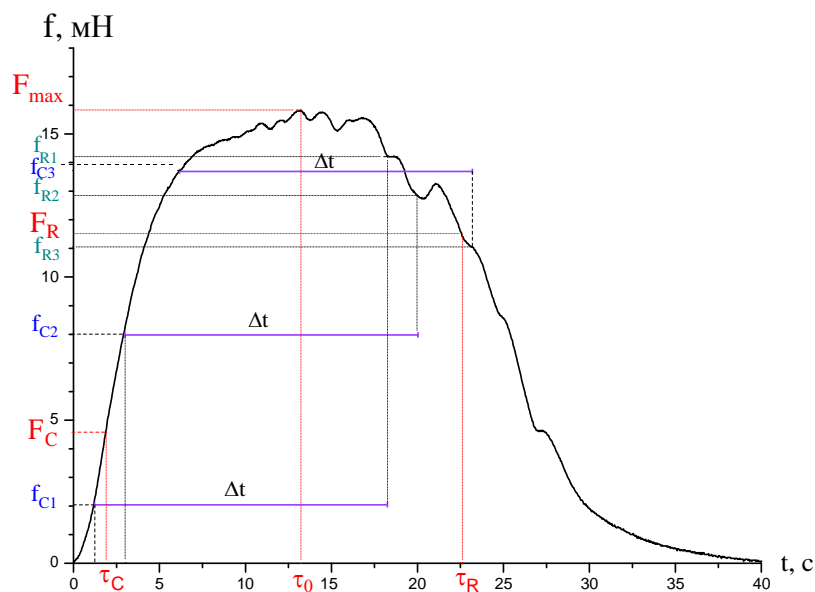
Втім, виникає принципове запитання: чи дійсно співвідношення (1) може коректно описувати механокінетику процесу скорочення-розслаблення гладенького м'язу на рівні повного циклу скоротливого процесу?

Якщо  $f_C$  – значення сили на рівні фази скорочення у момент часу  $t < \tau_0$ , а  $f_R$  – значення сили на рівні фази розслаблення в момент часу  $t + \Delta t > \tau_0$  ( $\Delta t =$

$const$ , що задається експериментатором) (рис. 2), то, відповідно до (1) та (2), можемо записати:

$$\ln \frac{f_c}{f_c} = -k \cdot \Delta t + n \cdot \ln \frac{f_c}{f_c} + \Delta t \quad (5)$$

Можна бачити, що експериментальні механокінетичні криві скорочення-розслаблення гладенького м'язу (рис. 3А) добре лінеаризуються відповідно до співвідношення (5), у координатах  $\ln \frac{f_c}{f_c} + \Delta t$  (для всіх випадків лінійних графіків – для м'язів сліпої кишки (*caecum*), антрального відділу шлунку (*antrum*) та міометрія (*uterus*) щурів величина  $R^2$  становить 0.99) (рис. 3В). Отже, можемо стверджувати, що співвідношення (5) та, відповідно, рівняння (1), абсолютно надійно описують механокінетику спонтанної контрактильної відповіді вісцеральних гладеньких м'язів на рівні повного циклу процесу ізометричного скорочення-розслаблення.



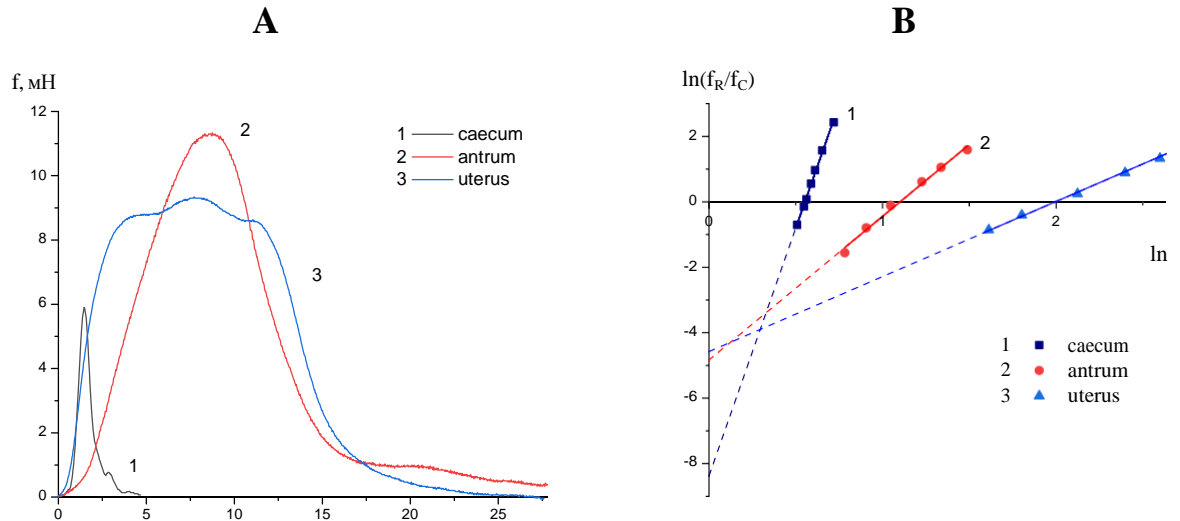
**Рис. 2.** До методології кількісного аналізу типової механокінетичної кривої процесу спонтанного скорочення-розслаблення гладенького м'язу *uterus* (наведено у якості прикладу) з метою використання лінеаризованого рівняння (5) для визначення параметрів  $n$  та  $k$ . Тут  $f_{c,1}$ ,  $f_{c,2}$  та т.і. – значення сили  $f$  на рівні фази скорочення ( $t < \tau_0$ ), а  $f_{R,1}$ ,  $f_{R,2}$  (та т.і.) – значення сили  $f$  на

рівні фази розслаблення ( $t > \tau_0$ ),  $\Delta t = 17$  с – заданий експериментатором фіксований інтервал часу,  $\tau_0$  – значення часу, при якому спостерігається максимальне значення сили  $F_{\max}$ .

Відповідно до лінеаризованого виразу (5) константа  $k$  (розмірність – «час<sup>-1</sup>») розраховується (при заданому значенні  $\Delta t = \text{const}$ ) за величиною відрізка, що відсікається при екстраполяції лінійного графіка на вісь ординат, а константа  $n$  (не має розмірності) – за значенням тангенсу кута нахилу цього графіку. У наших дослідах виявилось, що, у випадку спонтанної ізометричної активності вісцеральних гладеньких м'язів *caecum*, *antrum* та *uterus* (рис. 3), значення  $n$  складають 15,15, 4,39 та 2,29, а  $k$  – 10,4 с<sup>-1</sup>, 0,61 с<sup>-1</sup> та 0,40 с<sup>-1</sup>, відповідно (втім, треба відзначити, що величини  $n$  та  $k$ , скоріше за все, можуть залежати від віку та гормонального статусу тварин, фізико-хімічних умов проведення експерименту (температура та склад середовища) тощо)).

Отже, відповідно до результатів, наведених на рис. 3В, можна стверджувати, що співвідношення (1) дійсно коректно описує повну механокінетичну криву у випадку спонтанного скорочення-розслаблення вісцерального гладенького м'язу в реальних фізіологічних експериментах (рис. 3А). Остаточно, відповідно до співвідношень (1) та (2), можемо записати такий вираз для миттєвого значення сили  $f$  у будь-який час  $t$  у випадку механокінетичної кривої в ізометричному режимі:

$$f = F_{\max} \left( \frac{\tau_0}{n} \right)^k \cdot e^{n-kt} . \quad (6)$$



**Рис. 3.** Механокінетичний аналіз спонтанної ізометричної скоротливої відповіді вісцеральних гладеньких м'язів. 1 – сліпої кишки (*caecum*), 2 – антрального відділу шлунку (*antrum*) та 3 – міометрія (*uterus*) щурів. А – первинні експериментальні механокінетичні криві. В – лінеаризовані механокінетичні графіки у випадку використання співвідношення (5). У випадках 1, 2 та 3 значення  $\Delta t$  (задається експериментатором),  $n$  та  $k$  становлять 0,8 с, 8,0 с, 11,5 с; 15,15, 4,39, 2,29;  $10,4 \text{ с}^{-1}$ ,  $0,61 \text{ с}^{-1}$ ,  $0,40 \text{ с}^{-1}$  відповідно. Для всіх випадків лінійних графіків величина  $R^2$  становить 0.99.

Таким чином можна вважати, що рівняння (6) – базове механокінетичне рівняння, яке описує куполоподібну динаміку спонтанного скорочення-розслаблення вісцеральних гладеньких м'язів за ізометричних умов. По-суті, воно є інтегральним рівнянням, бо тлумачить динаміку скоротливої відповіді м'язу із залученням первинних експериментальних змінних  $f$ ;  $t$ .

З виразів (3) і (4) маємо співвідношення для емпіричних констант  $n$  і  $k$ , що входять в базове інтегральне механокінетичне рівняння (6):

$$n = \left( \frac{c_0}{c_R - c_0} \right)^2 = \left( \frac{c_0}{c_0 - c_C} \right)^2, \quad (7)$$

$$k = \frac{c_0}{(c_R - c_0)^2} = \frac{c_0}{(c_0 - c_C)^2} \quad . \quad (8)$$

Як можна бачити з виразів (7) та (8), значення констант  $n$  та  $k$ , що входять до базового інтегрального механокінетичного рівняння (6), і які розраховуються з використанням лінеаризованих, відповідно до рівняння (5), графіків, визначаються виключно характеристичними часовими параметрами повної механокінетичної кривої (рис. 1) –  $\tau_C$ ,  $\tau_R$  та  $\tau_0$ .

Миттєва швидкість зміни механічної напруги гладенького м'язу  $v = \frac{df}{dt}$ , у випадку процесу спонтанного скорочення-розслаблення, відповідно до виразу (6), дорівнює ( $v > 0$  при  $t < \tau_0$ ;  $v < 0$  при  $t > \tau_0$ ):

$$v = F_{max} \cdot \left(\frac{kt}{n}\right)^n \cdot e^{n-kt} \cdot \left(\frac{n}{t} - k\right) \quad . \quad (9)$$

Звідки, приймаючи до уваги вираз (6), маємо:

$$v = f \cdot \frac{n-kt}{t} \quad . \quad (10)$$

Універсалізм цього характеристичного рівняння полягає в тому, що воно дає можливість за ізометричного режиму розрахувати значення миттєвої швидкості  $v$  зміни механічної напруги вісцерального гладенького м'язу (у будь-який момент часу  $t$ ) у випадку повної механокінетичної кривої за вимірюваним значенням сили  $f$  та при певних величинах констант  $n$  та  $k$  (визначаються із лінеаризованих графіків) (рис. 3В). По-суті, рівняння (10) відображує диференціальну форму базового інтегрального механокінетичного рівняння (6), бо тлумачить динаміку скоротливої відповіді м'язу із залученням змінних  $v = df/dt$ ;  $f$ ;  $t$ . Не важко побачити, що інтегрування рівняння (10) призводить до базового інтегрального рівняння (6).

Із рівняння (10), яке, по суті, є головним узагальнюючим рівнянням скорочення-розслаблення вісцерального гладенького м'язу за ізометричних умов, випливає:

$$\frac{v}{f} = \frac{n}{t} - k \quad . \quad (11)$$

Звідси маємо ПЕРШИЙ закон спонтанного скорочення-розслаблення вісцерального гладенького м'язу у випадку ізометричного режиму: для повної механокінетичної кривої у будь-який момент часу  $t$  відношення миттєвої швидкості  $v$  зміни сили до миттєвого значення сили  $f$  змінюється обернено пропорційно часу скоротливого процесу.

Відповідно до рівнянь (6) та (4) для сили  $f=F_C$  в точці перегину ( $t=\tau_C$ ) на рівні фази скорочення механокінетичної кривої маємо:

$$F_C = F_{max} \cdot \left( \frac{n-\sqrt{n}}{n} - n \cdot e^{\sqrt{n}} \right) \quad (12)$$

Для швидкості скорочення  $V=V_C$  в цій точці, згідно співвідношенням (9) і (4), маємо:

$$V_C = k \cdot F_{max} \cdot \left( \frac{n-\sqrt{n}}{n} \right)^{n-1} \cdot \frac{e^{\sqrt{n}}}{\sqrt{n}} \quad (13)$$

Отже, маємо, згідно (12) та (13), такий зв'язок між  $V_C$  та  $F_C$ :

$$V_C = \frac{k}{\sqrt{n-1}} F_C > 0 \quad (14)$$

Аналогічно, відповідно до рівнянь (8) та (4), для сили  $f=F_R$  в точці перегину ( $t=\tau_R$ ) на рівні фази розслаблення механокінетичної кривої маємо:

$$F_R = F_{max} \cdot \left( \frac{n+\sqrt{n}}{n} - n \cdot e^{-\sqrt{n}} \right) \quad (15)$$

а для швидкості розслаблення  $V_R$  в цій точці, згідно (9) та (4):

$$V_R = -k \cdot F_{max} \cdot \left( \frac{n+\sqrt{n}}{n} \right)^{n-1} \cdot \frac{e^{-\sqrt{n}}}{\sqrt{n}} \quad (16)$$

Таким чином, маємо, згідно (15) та (16), наступний зв'язок між  $V_R$  та  $F_R$ :

$$V_R = -\frac{k}{\sqrt{n+1}} F_R < 0 \quad (17)$$

Отже, відповідно до співвідношень (14) та (17), значення максимальних швидкостей зміни м'язової напруги  $V_C$  та  $V_R$  в точках перегину повної механокінетичної кривої (при значеннях часу  $\tau_C$  та  $\tau_R$  відповідно) прямо пропорційні відповідним значенням сил  $F_C$  та  $F_R$  в цих точках. То є ДРУГИЙ закон спонтанного ізометричного скорочення-розслаблення вісцерального гладенького м'язу.

З рівнянь (14), (17) та (4) маємо:

$$\frac{F_C}{F_R} = \frac{c_C}{c_R} \cdot \frac{V_C}{|V_R|} \quad (18)$$

Очевидно, що завжди  $\tau_R > \tau_C$  (рис. 1), тобто  $(\tau_C/\tau_R) < 1$ . Відповідно до (18) ТРЕТІЙ закон спонтанного ізометричного скорочення-розслаблення вісцерального гладенького м'язу можна сформулювати так: у точках перегину  $\tau_C$  та  $\tau_R$  механокінетичної кривої відношення сили  $F_C$  на рівні фази скорочення до сили  $F_R$  на рівні фази розслаблення завжди менше, ніж відношення максимальної швидкості зміни механічної напруги  $V_C$  на рівні фази скорочення до максимальної швидкості зміни механічної напруги  $V_R$  на рівні фази розслаблення.

Корисними також можуть бути відносні параметри, що характеризують в точках перегину повної механокінетичної кривої  $\tau_C$  та  $\tau_R$  співвідношення сил  $F$  та максимальних швидкостей  $V$ , відповідно:  $F_C/F_R$  та  $V_C/V_R$ . З виразів (12) та (15) маємо:

$$\frac{F_C}{F_R} = \frac{n - \sqrt{n}}{n + \sqrt{n}} \cdot \frac{2\sqrt{n}}{n}, \quad (19)$$

а зі співвідношень (13) та (16):

$$\frac{V_C}{V_R} = - \frac{n - \sqrt{n}}{n + \sqrt{n}} \cdot e^{2\sqrt{n}}. \quad (20)$$

Як можна бачити, співвідношення  $F_C/F_R$  та  $V_C/V_R$  залежать виключно від значення емпіричної константи  $n$ .

В чому ж полягає значущість встановлених нами ПЕРШОГО (11), ДРУГОГО ((14) та (17)) ТА ТРЕТЬОГО (18) універсальних механокінетичних законів скорочення-розслаблення вісцерального гладенького м'язу? По-суті, ці закони є критеріями коректності визначення експериментатором кількісних механокінетичних характеристик. Безперечно, при коректному визначенні таких параметрів, як  $f$ ,  $v$ ,  $n$ ,  $k$ ,  $F_C$ ,  $F_R$ ,  $\tau_C$ ,  $\tau_R$ ,  $V_C$ ,  $V_R$ , їхня комбінація однозначно повинна задовольняти рівнянням (11), (14), (17) та (18) (див. нижче).

Для імпульсу сили  $I = f \cdot t$  у випадку повної механокінетичної кривої маємо зі співвідношення (6):

$$I = F_{max} \cdot \left( \frac{n}{n} \right)^k \cdot e^{n-kt} \cdot t \quad (21)$$

Згідно із залежностями (4) на рівні фаз скорочення та розслаблення вісцерального гладенького м'язу для значень імпульсів сили  $I_C$  та  $I_R$  у точках перегину з абсцисою  $\tau_C$  та  $\tau_R$  можна записати, відповідно:

$$I_C = F_{max} \cdot \left( \frac{n-\sqrt{n}}{n} \right)^{n+1} \cdot \frac{n}{k} \cdot e^{\sqrt{n}}, \quad (22)$$

$$I_R = F_{max} \cdot \left( \frac{n+\sqrt{n}}{n} \right)^{n+1} \cdot \frac{n}{k} \cdot e^{-\sqrt{n}}. \quad (23)$$

Згідно (22), (23) та (4) для відношення імпульсів сили  $I_C/I_R$  маємо вираз:

$$\frac{I_C}{I_R} = \left( \frac{n-\sqrt{n}}{n+\sqrt{n}} \right)^{n+1} \cdot e^{2\sqrt{n}},$$

тобто

$$\frac{I_C}{I_R} = \left( \frac{c_C}{c_R} \right)^{n+1} \cdot e^{2\sqrt{n}}. \quad (24)$$

В точці екстремуму ( $f = F_{max}$ ,  $t = \tau_0$ ) для імпульсу сили  $I_{c_0}$  маємо, згідно з (3):

$$I_{c_0} = F_{max} \cdot r_0 = F_{max} \cdot \frac{n}{k}. \quad (25)$$

По суті, імпульси сили  $I_C$ ,  $I_R$  та  $I_{c_0}$ , що рахуються за рівняннями (22), (23) та (25), є комплексними динамічними характеристичними параметрами циклу ізометричного скорочення-розслаблення вісцерального гладенького м'язу.