

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

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики  
к.б.н., доцент Нипорко О. Ю.  
Протокол № \_\_\_\_\_ засідання кафедри  
від «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 р.

**ВПЛИВ ТІАКАЛІКС[4]АРЕНУ С-1193 – АФІННОГО ІНГІБІТОРА  
Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТРази НА ВНУТРІШНЬОКЛІТИННУ КОНЦЕНТРАЦІЮ Ca<sup>2+</sup>  
ТА СКОРОТЛИВУ АКТИВНІСТЬ МІОМЕТРИЯ**

Випускна кваліфікаційна робота магістра  
студентки спеціальності

162 Біотехнологія та біоінженерія  
ОП «Високі технології (Біотехнологія)  
**Кардаш Олександри Олександрівни**

Науковий керівник від кафедри  
професор кафедри молекулярної  
біотехнології та біоінформатики  
д.б.н. **Солдаткін Олексій Петрович**

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

Оцінка захисту роботи

---

Київ – 2023 р.

## АНОТАЦІЯ

Кардаш О.О. Вплив тіакалікс[4]арену С-1193 – афінного інгібітора  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази на внутрішньоклітинну концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  та скоротливу активність міометрія. – Випускна кваліфікаційна робота магістра за спеціальністю 162 Біотехнологія та біоінженерія ОП «Високі технології (Біотехнологія)».

У роботі було переглянуто та систематизовано актуальну наукову літературу та загальні відомості щодо ферменту  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази, а також нових синтетичних біологічно активних сполук – каліксаренів. Проведено дослідження, спрямоване на вивчення впливу тіакалікс[4]арен-біс-гідроксиметилфосфонової кислоти С-1193 на систему  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази в плазматичній мембрані гладеньком'язових клітин. Методами ензиматичного та кінетичного аналізу встановлено, що тіакалікс[4]арен С-1193 більш ефективно інгібує  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРазну активність у плазматичній мембрані клітин міометрія порівняно з раніше вивченим калікс[4]ареном С-99, і практично не впливає на питомі активності інших АТРаз. З використанням методу конфокальної мікроскопії та  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливого флуоресцентного зонду fluo-4 продемонстровано, що тіакалікс[4]арен С-1193 зумовлює зростання внутрішньоклітинної концентрації іонів Са в іммобілізованих міоцитах матки. За допомогою тензометричних експериментів показано, що С-1193 модифікує механокінетику спонтанних ізометричних скорочень міометрія. На тлі використання С-1193 було помічено збільшення ізометричних фазних скорочень, викликаних за шляхами електромеханічного спряження (деполяризація гіперкалієвим розчином) та фармакомеханічного спряження (за умов дії утеротонічного гормону окситоцину, нейромедіатора ацетилхоліна та селективного агоніста мускаринових ацетилхолінових рецепторів М3-типу цевімеліна).

Отримані експериментальні дані мають неабияке значення для з'ясування мембранних механізмів катіоного обміну у гладеньких м'язах, зокрема, під час вивчення ролі плазматичної мембрани в забезпеченні електро- та фармакомеханічного спряження в них, а також в регуляції іонного гомеостазу в

міоцитах. Крім того, проведені дослідження є важливою та перспективною ланкою в пошуці селективних високоафінних ефекторів в якості таких потенційних фармакологічних препаратів, які могли б регулювати контрактильну активність, запобігаючи та протидіючи порушенням функціонування міомерія.

Ключові слова:  $Na^+, K^+$ -АТРаза, калікс[4]арени, ензиматична активність, плазматична мембрана, контрактильна активність, міомерій.

## ABSTRACT

Kardash O.O. Influence of Thiocalix[4]arene C-1193 - an Affinity Inhibitor of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, on Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  Concentration and Contractile Activity of Myometrium. – Master's Thesis in specialty 162 «Biotechnology and Bioengineering», under the Program «High Technologies (Biotechnology)».

The study reviewed and organized current scientific literature and general knowledge on the enzyme  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase and new synthetic biologically active compounds – calixarenes. The research aimed to investigate the influence of thiocalix[4]arene-bis-hydroxymethylphosphonate acid C-1193 on the  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase system in the plasma membrane of smooth muscle cells. Enzymatic and kinetic analysis methods revealed that thiocalix[4]arene C-1193 more effectively inhibits  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity in the plasma membrane of myometrial cells compared to the previously studied calix[4]arene C-99 and has negligible effects on specific activities of other ATPases. Confocal microscopy using the calcium-sensitive fluorescent probe fluo-4 demonstrated that thiocalix[4]arene C-1193 induces an increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in immobilized myometrial myocytes. Tensometric experiments showed that C-1193 modifies the mechanokinetics of spontaneous isometric contractions in myometrium. In the presence of C-1193, an enhancement of isometric phase contractions was observed, elicited through electromechanical coupling pathways (depolarization with high potassium solution) and pharmacomechanical coupling (under the influence of the uterotonic hormone oxytocin, the neurotransmitter acetylcholine, and the selective agonist of muscarinic acetylcholine receptors of the M3 subtype, cevimeline).

The obtained experimental data are of significant importance for elucidating the membrane mechanisms of cation exchange in smooth muscles, particularly in studying the role of the plasma membrane in electro- and pharmacomechanical coupling as well as in the regulation of ion homeostasis in myocytes. Furthermore, this research serves as an important and promising step in the search for selective

high-affinity effectors as potential pharmacological agents that could regulate contractile activity, preventing and counteracting dysfunctions of myometrium.

Keywords:  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, calix[4]arenes, enzymatic activity, plasma membrane, contractile activity, myometrium.

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b> .....	8
<b>РОЗДІЛ 1. Огляд літератури</b> .....	10
1.1. Структура та механізм дії $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази.....	10
1.1.2. Властивості та регуляція активності $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази.....	15
1.2. Каліксарени: структура, синтез та фізико-хімічні властивості.....	17
1.2.1. Біологічна активність каліксаренів.....	20
1.2.2. Токсичність та імуногенність каліксаренів.....	22
1.2.3. Перспективи використання каліксаренів.....	23
<b>РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень</b> .....	26
2.1. Препаративна біохімія.....	26
2.1.1. Реактиви.....	26
2.2. Ензимологічні дослідження.....	26
2.3. Конфокальна мікроскопія.....	28
2.4. Кінетичні розрахунки.....	29
2.5. Тензометричні експерименти.....	29
2.6. Механокінетичний аналіз результатів.....	30
2.7. Статистичний аналіз.....	31
<b>РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та їх обговорення</b> .....	32
3.1. Відмінності будови калікс[4]арену С-99 та тіакалікс[4]арену С-1193.....	32
3.2. Порівняння ефектів С-99 та С-1193 на АТР-гідролазні активності.....	34
3.3. Зміна внутрішньоклітинної концентрації іонів $\text{Ca}^{2+}$ під дією тіакалікс[4]арену С-1193 в іммобілізованих міоцитах матки.....	36
3.4. Вплив тіакалікс[4]арену С-1193 на функціональні властивості цілісної гладенько-м'язової тканини.....	38
3.5. Модуляція механокінетики скорочувальних реакцій тіакалікс[4]ареном С-1193.....	41
<b>ВИСНОВКИ</b> .....	47
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ</b> .....	48

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ГМК – гладеньком’язова клітина;

ПМ – плазматична мембрана;

ADP – аденозиндифосфат;

ATP – аденозинтрифосфат;

СТР – цитидинтрифосфат;

GTP – гуанозинтрифосфат;

P<sub>i</sub> – фосфат неорганічний;

КС – кардіоактивні стероїди;

I<sub>0,5</sub> – коефіцієнт інгібування (концентрація інгібітору, при якій рівень транспортувальної чи ензиматичної активності становить 50 % від контрольної величини);

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-3H-ксантен-9-іл)феніл](карбоксиметил)аміно}ацетова кислота;

Ноеchst – 2’-(4-етоксифеніл)-6-(4-метил-1-піперазиніл)-1H,3’H-2,5’-бібензimidазол;

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

Tris – трис(гідроксиметил)амінометан;

A<sub>max</sub>, A – питомі ензиматичні активності;

V<sub>nc</sub>, V<sub>nr</sub> – нормовані на амплітуду максимальні швидкості фаз скорочення та розслаблення;

V<sub>C</sub> і V<sub>R</sub> – швидкісні параметри;

τ<sub>0</sub>, τ<sub>C</sub> і τ<sub>R</sub> – часові параметри;

F<sub>max</sub>, F<sub>C</sub> та F<sub>R</sub> – силові параметри;

I<sub>max</sub>, I<sub>C</sub> та I<sub>R</sub> – імпульсні параметри;

n<sub>H</sub> – коефіцієнт Хілла;

n – кількість дослідів.

## ВСТУП

На сьогоднішній день дуже актуальною темою досліджень являється вивчення впливу регуляторів на плазматичну мембрану гладеньком'язових клітин, зокрема ефекторів  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази, оскільки цей фермент відіграє ключову роль у контролі контрактильної активності міометрія.  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза присутня у всіх тканинах, а її активність дуже чутлива до енергетичного стану клітини, в деякому розумінні можна навіть стверджувати, що каталітична та транспортна активність  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази характеризує енергетичний потенціал клітини [1]. Порушення функціонування  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази може призвести до різних патологічних станів, таких як передчасні пологи, спонтанні аборти, викидні, гіпо- та гіпертонус матки [2, 3, 4]. Ці ускладнення є небезпечними як для матері, так і для плода, тому вивчення та розуміння механізмів регуляції контрактильної активності міометрія є надважливим для розвитку нових стратегій лікування та профілактики порушень роботи матки. Наше дослідження включає пошук та аналіз селективних високоафінних ефекторів, які можуть змінювати активність окремих йон-транспортуючих систем, в якості потенційних фармакологічних препаратів, які могли б регулювати контрактильну активність міометрії; а також вивчення біохімічних механізмів електро- та фармакомеханічного спряження у гладеньких м'язах.

Одними з таких потенційних регуляторів є синтетичні макроциклічні олігомери фенолів, відомі як каліксарени. Ці сполуки можуть утворювати комплекси з біологічно важливими молекулами та йонами, що дозволяє їм впливати на біохімічні процеси [5, 6, 7]. Особливості будови та властивості каліксаренів надають можливість модифікувати їх структуру для досягнення певних функцій. Крім того, ці сполуки характеризуються низькою токсичністю [8] та імуногенністю [9, 10, 11], а також доступністю синтезу та низькою вартістю.

У попередніх дослідженнях нами було визначено, що каліксарен С-99 в концентрації 100 мкМ на 86 % відносно контролю інгібує активність  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази плазматичної мембрани міоцитів матки, практично не впливаючи на

«базальну»  $Mg^{2+}$ -АТРазну активність (зменшення активності лише до 91 % від контрольного значення). Тому в подальших експериментах нами була досліджена дія низки калікс[4]аренів, структурних аналогів калікс[4]арену С-99, на  $Na^+, K^+$ -АТРазну активність, і з'ясовано, що ще більшу інгібіторну активність має новий, більший за розмірами, тіакалікс[4]арен С-1193, котрий містить чотири атоми сірки в макроциклічній платформі [12, 13].

Отже, метою даної роботи являється вивчення закономірностей впливу тіакалікс[4]арену С-1193 – інгібітора  $Na^+, K^+$ -залежної АТР-гідролази плазматичної мембрани, на внутрішньоклітинну концентрацію іонів  $Ca^{2+}$  в міоцитах матки та механокінетику скоротливої активності.

Завдання:

1. Порівняти ефект калікс[4]арену С-99 та тіакалікс[4]арену С-1193 на АТР-гідролазні активності в плазматичних мембранах клітин міометрія;
2. Дослідити зміну внутрішньоклітинної концентрації іонів  $Ca^{2+}$  під дією тіакалікс[4]арену С-1193 в іммобілізованих міоцитах матки;
3. Визначити вплив тіакалікс[4]арену С-1193 на функціональні властивості цілісної гладенько-м'язової тканини.

Об'єкти дослідження – фракція ПМ гладеньком'язових клітин матки свині, гладеньком'язові клітини матки щура, мультиклітинні гладеньком'язові препарати рогів матки невагітних щурів, реакції ензиматичного ( $Na^+, K^+$ -,  $Ca^{2+}, Mg^{2+}$ - та  $Mg^{2+}$ -залежного) гідролізу АТР. Для досягнення поставленої мети використовувались методи препаративної біохімії, біохімічної мембранології, ензимології, конфокальної мікроскопії, тензометрії, хімічної та біохімічної кінетики, а також статистичного аналізу.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Структура та механізм дії $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази плазматичної мембрани

$\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза – є електрогенною транспортною системою плазматичної мембрани тваринних тканин, яка селективно виводить іони  $\text{Na}^+$  з клітини і накопичує іони  $\text{K}^+$  використовуючи енергію, отриману з гідролізу АТР. Згідно з класифікацією ферментів,  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза належить до сімейства транслоказ (ЕС 7.2.2.13) і є інтегральним білком, що має стехіометрію 1 АТР : 3 іони  $\text{Na}^+$  : 2 іони  $\text{K}^+$ . Загальна молекулярна маса ферменту становить приблизно 280 кДа, він існує у вигляді димеру і складається з двох нековалентно зв'язаних субодиниць  $\alpha$  і  $\beta$ , які відповідають чотирьом і трьом тканиноспецифічним ізоформам відповідно. В деяких тканинах присутня також регуляторна  $\gamma$ -субодиниця. [14, 15, 16, 17]. Під час роботи  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза здійснює конформаційні рухи, переходячи зі стану E1 в стан E2, що призводить до трансмембранного перенесення іонів і генерації активної компоненти мембранного потенціалу [18, 19, 20, 21].

$\alpha$ -субодиниця є ліпопротеїдом масою 100-113 кДа, що містить каталітичний центр, центри зв'язування  $\text{Na}^+$  та  $\text{K}^+$ , інгібіторів. Виділяють три функціональні домени в молекулі  $\alpha$ -субодиниці: А-домен (активаційний), Р-домен (фосфориляційний) та N-домен (нуклеотидзв'язуючий або нуклеотидний). Аналіз профілю гідрофобності показує, що поліпептидний ланцюг  $\alpha$ -субодиниці  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази містить від 6 до 10 трансмембранних фрагментів (4 нм кожен), які складаються з 17-25 амінокислот та утворюють конформацію  $\alpha$ -спіраль [23]. У N-кінцевій частині  $\alpha$ -субодиниці наявні 4 трансмембранні фрагменти (M1 - M4), а С-кінцевій частині – ще шість (M4 - M10). У зв'язуванні іонів беруть участь карбоксильні групи дикарбонових амінокислот, локалізованих на 3-му та 6-му трансмембранних сегментах [24]. N-кінцева частина являє собою гнучку, збагачену залишками лізину,

неспіралізовану ділянку, що бере участь у здійсненні конформаційних переходів та регуляції чутливості ферменту до катіонів.

$\beta$ -Субодиниця модифікує каталітичні характеристики  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРазного комплексу, впливаючи на афінитет іонів  $\text{K}^+$  та  $\text{Na}^+$  до їх зв'язувальних сайтів [25] та регулюючи рівень трансляції  $\alpha$ -субодиниці [26].  $\beta$ -Субодиниця – це лектин, або мембранний глікопротеїн, що має молекулярну масу 40-60 кДа (без вуглеводного ланцюга) та забезпечує правильну орієнтацію  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази в мембрані, супроводжуючи її транспорт з ендоплазматичного ретикулума до ПМ [15, 17, 27, 28]. Вона містить позаклітинний домен і одну трансмембранну спіраль, що взаємодіє з трансмембранними спіралями М7 та М10  $\alpha$ -субодиниці. Позаклітинний домен  $\beta$ -субодиниці включає три дисульфідні зв'язки та три сайти N-глікозилування [29, 30], в яких аспарагінові залишки глікозилуються олігосахаридами, що містять N-ацетилглюкозамін, маннозу і частково галактозу [31]. Рівень глікозилування  $\beta$ -субодиниці впливає на її складання та наступну транслокацію у плазматичну мембрану клітини [32]. Під час білкового синтезу обидві субодиниці вбудовуються в мембрану одночасно.

Незважаючи на те, що  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза зазвичай присутня у вигляді гетеродимеру  $\alpha$ -субодиниці і  $\beta$ -субодиниці, іноді клітини виробляють також додаткову  $\gamma$ -субодиницю (з найменшою молекулярною масою в 7-11 кДа), яку відносять до групи протеїнів FXYD і називають відповідно [33]. Субодиниця FXYD включає всього сім ізоформ, які у всіх випадках складаються з однієї  $\alpha$ -спіралі. Було встановлено, що значно збільшена експресія третьої ізоформи  $\gamma$ -субодиниці відбувається у гепатоцелюлярному [34], колоректальному [35], сечовому міхурі [36], а також раку молочної залози [37] та підшлункової залози [38]. Іншою роллю підодиниці FXYD є стабілізація  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази у плазматичній мембрані клітини шляхом взаємодії з фосфатидилсерином [39]. Окрема ізоформа підодиниці FXYD модулює активність  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази в залежності від афінитету до іонів  $\text{Na}^+$  та  $\text{K}^+$  до ферменту. Подібно до випадку з підодиницею  $\beta$ , п'ята ізоформа підодиниці FXYD також може бути глікозилувана. Однак, на відміну від підодиниці  $\beta$ , глікозилування підодиниці

FX<sub>YD</sub> знижує рівень клітинної адгезії, ускладнюючи трансдимеризацію підодиноць  $\beta$ , розташованих на сусідніх клітинах [40].

Загалом, у людей існує чотири  $\alpha$ -ізоформи ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  і  $\alpha 4$ ) та три  $\beta$ -ізоформи ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$  і  $\beta 3$ ), які зустрічаються в різних комбінаціях у всьому організмі в специфічний для тканини спосіб. Найпоширенішою комбінацією є  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  або  $\alpha 4$  з  $\beta 1$ .  $\alpha 1$  є універсально розповсюдженою в усіх тканинах, тоді як  $\alpha 2/\alpha 3$  зустрічаються переважно в мозку, серці і скелетних м'язах [41]. Ізоформа  $\alpha 4$  має високу експресію у яєчках та сперматозоїдах [42], але її також було знайдено у скелетних м'язових тканинах [43]. У людей кожна  $\alpha$ -ізоформа має високу ступінь ідентичності (~ 87%) між  $\alpha 1$  та  $\alpha 2/\alpha 3$  (наприклад,  $\alpha 1:\alpha 2$  ~ 87%;  $\alpha 1:\alpha 3$  ~ 88%), але трохи меншу послідовність гомології між  $\alpha 1$  та  $\alpha 4$  (~ 63%). Основні відмінності спостерігаються в домені N-терміналу, трансмембранному домені M4-M5 та позаклітинній петлі [41]. Саме ця структура включає важливий сайт зв'язування кардіоактивних стероїдів ензимного комплексу. Відомо, що генетичне видалення 50%  $\alpha 2$ -ізоформи в серці призводить до збільшення інотропного ефекту [44]. Вибіркове зв'язування кардіоактивних стероїдів з різними  $\alpha$ -ізоформами є важливим аспектом їх терапевтичного використання при серцевій недостатності [45]. Недавні звіти свідчать про високу експресію  $\alpha 1$  [46-50] і/або  $\alpha 3$  [51-53] ізоформ при деяких типах раку та про можливість використання вибіркового зв'язування з цими ізоформами при протираковій терапії [54-56].

Незважаючи на складність структурної організації, наявні дані дозволяють отримати відносно чітке уявлення про механізм роботи ферменту.  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза відноситься до АТРаз Р-типу (Р<sub>2</sub>-підтипу АТРаз) – сімейства ферментів, які фосфорилуються протягом транспортного процесу  $\gamma$ -фосфатною групою АТФ по залишку аспарагінової кислоти [57, 58]. Є дані, що  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза високо специфічна для АТФ і використання СТР забезпечує тільки 15 % активності [59, 60]. Проте інші автори вказують на те, що  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза не має абсолютної специфічності по відношенню до субстрату: крім АТФ, вона гідролізує й інші нуклеотиди – СТР, ІТР, ГТР, УТР. Але тільки АТФ та СТР, в

порівнянні з іншими нуклеотидами, збільшують спорідненість  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази до іонів  $\text{Na}$  [15]. Протягом одного циклу три внутрішні іони  $\text{Na}^+$  транспортуються в зовнішній простір, а два зовнішні іони  $\text{K}^+$  – в протилежному напрямку – відбувається гідроліз однієї молекули АТФ:



Як типова АТРаза Р-типу,  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза здатна перебувати у двох основних конформаціях, які мають високу спорідненість до іонів натрію ( $\text{E}_1$ ) або калію ( $\text{E}_2$ ). Вихідною конформацією можна вважати  $\text{E}_1$ , оскільки близько 70 % цих молекул у цій конформації в середовищі, де відсутній і натрій, і калій [61]. На внутрішній поверхні плазматичної мембрани відбувається активація ферменту у присутності іонів  $\text{Na}^+$  та  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза легко взаємодіє з АТФ, в результаті чого термінальний фосфат АТФ переноситься на карбоксильну групу аспарагінової кислоти поліпептидного ланцюга, утворюючи проміжний комплекс – фосфорильований фермент ( $\text{E-P}$ ), де  $\text{E}$  позначає молекулу білка-ферменту, а  $\text{P}$  – фосфорний залишок. Ця стадія не пригнічується убаїном, але інгібується іонами  $\text{Ca}^{2+}$ . Утворений фосфорильований продукт  $\text{EP}$  підлягає розпаду, що стимулюється іонами  $\text{K}^+$  на зовнішній поверхні мембрани. Водночас калій надходить усередину клітини, а натрій вивільняється у позаклітинне середовище. Ця стадія калій залежного гідролізу ферменту інгібується убаїном. Енергія, яка необхідна для транслокації  $\text{K}^+$  крізь мембрану в цитоплазму вивільняється при гідролізі фосфорильованого комплексу. Вважається, що фосфорильований фермент може перебувати у двох конформаційних станах:  $\text{E}_1\text{P}$  та  $\text{E}_2\text{P}$ , рівновага між яким контролюється іонами  $\text{Mg}^{2+}$ .



Отже, каталітичний цикл  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази складається з таких етапів:

- У стані  $\text{E}_1$  зі зв'язаною АТФ, місце зв'язування  $\text{Na}^+$  у  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази відкрите до внутрішньоклітинного простору, а сам фермент має високу афінність до  $\text{Na}^+$  у цьому стані.

- Фосфорилування  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази відбувається тільки тоді, коли всі місця зв'язування  $\text{Na}^+$  зайняті, оскільки зв'язування третього іону  $\text{Na}^+$  спричиняє конформаційну зміну ( $E_1$ -P) у трансмембранному домені, яка потім передається до домену зв'язування нуклеотиду [62].
- Після фосфорилування  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази відбувається ще одна конформаційна зміна, яка призводить до відкриття порожнини ферменту до зовнішнього простору, тобто до стану  $E_2$ , і вивільнення  $\text{Na}^+$  [63].
- У стані  $E_2$   $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза має вищу афінність до іонів  $\text{K}^+$ . Після їх зв'язування фермент дефосфорилується і зв'язує ще одну молекулу АТФ (утворення комплексу  $E_2P$ ), що сприяє відкриттю порожнини  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази до внутрішньоклітинного простору, конвертації в стан  $E_1$ , вивільненню іонів  $\text{K}^+$  та неорганічного фосфату у внутрішньоклітинне середовище [64, 65]. Остання стадія циклу одночасно підготовлює фермент для початку нового циклу [14, 15, 66].

За допомогою комп'ютерних симуляцій було показано, що афінність  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази до відповідних іонів регулюється в станах  $E_1$  і  $E_2$  за допомогою протонування амінокислот (L-Asp804, L-Asp808, L-Asp926, L-Glu327, L-Glu779, L-Glu954) в активному сайті ферменту [67]. Крім того, було виявлено, що каталітичний цикл  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази піддається впливу іонів  $\text{Mg}^{2+}$  таким чином, що в стані  $E_1$  іони  $\text{Mg}^{2+}$  викликають закриття порожнини, яке передуює автофосфорилуванню та переходу до стану  $E_2$  [68]. Ці дані додатково підтверджуються комп'ютерними симуляціями [69], в яких були використані молекулярне докування та симуляції молекулярної динаміки для демонстрації того, що  $\text{Mg}^{2+}$  сприяє переходу  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази від відкритої до замкненої конформації і наступного автофосфорилування.

Всього існує три місця зв'язування (I, II, III) для іонів  $\text{Na}^+$  і  $\text{K}^+$ , розташованих в трансмембранному домені  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази між наступними геліксами:  $\alpha M4$ ,  $\alpha M5$  і  $\alpha M6$  (I і II) і  $\alpha M5$ ,  $\alpha M6$  і  $\alpha M8$  (III). Місця зв'язування I і II однакові для  $\text{K}^+$  і  $\text{Na}^+$ . Однак місце зв'язування III високоселективне лише до іонів  $\text{Na}^+$  і виникає тільки в стані  $E_1$ . Як зазначено вище, селективність до іонів

досягається за рахунок відмінних протонувальних станів в окремих фазах каталітичного циклу [67]. Цікавим є той факт, що при низьких концентраціях  $\text{Na}^+$  і  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза може транспортувати  $\text{H}^+$  іони. У такому випадку активність ферменту залежить від значення рН, зростаючи зі зменшенням рН. Під час такого каталітичного циклу два іони  $\text{H}^+$  транспортуються до зовнішнього простору, а потім два іони  $\text{H}^+$  всередину клітини при гідролізі однієї молекули АТР [70].

### 1.1.2. Властивості та регуляція активності $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази

$\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза відіграє головну роль у підтримці гомеостазу концентрацій іонів  $\text{Na}^+$  і  $\text{K}^+$ , що значно сприяє осморегуляції та збереженню мембранного потенціалу спокою. Крім того, функція  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази пов'язана з клітинним сигналінгом, який виникає внаслідок взаємодії з кардіоактивними стероїдами (КС). КС – це речовини стероїдної природи, що природно виникають в різних рослинах, переважно з роду *Digitalis*. Однак існують також ендогенні КС, такі як убаїн та дигідроубаїн [71]. Ендогенні КС, ймовірно, є причиною того, що  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза містить у своїй структурі місце зв'язування для цих сполук, які наш організм виробляє в концентраціях від пікомолярних до наномолярних. Так, убаїн і строфантин є практично абсолютними селективними інгібіторами  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази. Фосфорилування ензиму і перехід в конформацію Р- $\text{E}_2$  полегшує зв'язування кардіоглікозидів з позаклітинного боку плазматичної мембрани. Вважають, що стероїди блокують фермент в стані Р- $\text{E}_2$  і, таким чином, унеможливають перехід  $\text{E}_2 \rightarrow \text{E}_1$ . Убаїн в інтервалі концентрацій  $10^{-6}$  -  $5 \cdot 10^{-3}$  М ефективно пригнічує загальну АТРазну активність сарколеми міометрія і при концентрації убаїну  $5 \cdot 10^{-4}$  М загальна АТРазна активність зменшується до 62,5 %. Значення уявної константи інгібування  $I_{0,5}$  для  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази складає  $21,3 \pm 1,5$  мкМ ( $M \pm m$ ;  $n=5$ ) [72].

В той же час наномолярні концентрації убаїну можуть викликати стимуляцію активності  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази, це явище спостерігали в кардіальних міоцитах людини, собаки та морської свинки. Стимуляцію активності  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -

АТРаза виявлено залежно від ізоформи, що означає, що найбільш чутливою до цієї стимуляції є  $\alpha 2$ -ізоформа [73]. При наномолярних концентраціях інгібіторів і відсутності значного порушення гомеостазу іонів  $\text{Na}^+$  та  $\text{K}^+$   $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза може виступати рецептором, пов'язаним з сім'єю не-рецепторних тирозинкіназ SrcK, утворюючи функціональний комплекс з кавеоліном та рецептором епідермального фактора росту, які разом утворюють сигналосому в кавеолах цитоплазматичної мембрани [74]. У такому випадку,  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза втрачає транспортну і набуває сигнальну функцію [75, 76]. SrcK неактивний у цьому комплексі, проте після взаємодії убаїну з  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРазою відбувається роз'єднання SrcK та ферменту. Після цього SrcK фосфорилує рецептор епідермального фактора росту [77, 78], і наступний каскад подій призводить до стимуляції проліферації клітин [79, 80, 81, 82, 83]. Залежно від типу клітин, після активації відповідним лігандом  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза може стимулювати проліферацію здорових клітин або, навпаки, інгібувати проліферацію пухлинних клітин [84, 85]. Завдяки селективному зниженню проліферації ракових клітин,  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза в даний час є актуальною молекулярною мішенню для протиракової терапії. Наразі вивчення точних механізмів взаємодії  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази з різними сигнальними компонентами продовжується, і дослідження на цю тему є активною областю фармацевтичних та біомедичних досліджень.

Отже, взаємодія між модуляторами  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази та самим ферментом призводить до двох різних механізмів дії. Один з них полягає в підвищенні систолічної функції серця шляхом інгібування  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази [86], тоді як інший викликає послідовну реакцію на кілька сигнальних шляхів після зв'язування ліганду з  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРазою.

До цього часу було повідомлено про багато інгібіторів цього ферменту, головним чином природного походження з родини кардіальних стероїдів. Два головні КС, дигоксин і дигітоксин, що спочатку використовувалися для лікування серцевих аритмій, наразі також перевіряються для застосування в інших випадках. Ортованадат в нано- та мікромольних концентраціях також

пригнічує активність  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази, на відміну від кардіоглікозидів він діє з цитоплазматичної сторони. Антибіотик олігоміцин – ще один інгібітор ензиму, проте він пригнічує  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаду не повністю: максимальне зниження активності у присутності олігоміцину складало приблизно 20 % [87].

Підтримка електрохімічних градієнтів іонів натрію (Na) і калію (K) через плазматичну мембрану клітини є необхідним процесом для виживання клітин ссавців. Ці градієнти мають важливе значення для електричної збудливості нервової та м'язової тканини, енергетичного забезпечення  $\text{Na}^+$ -залежного вторинного активного транспорту іонів кальцію (Ca) та протонів ( $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  та  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  обмін), а також для регуляції об'єму клітини та інших процесів. Підвищення концентрації внутрішньоклітинного  $\text{Na}^+$  призводить до активації  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмінника, який вбудований у плазматичну мембрану клітин різних тканин, включаючи нервові та м'язові клітини [88]. Це може призвести до збільшення концентрації внутрішньоклітинного  $\text{Ca}^{2+}$ , що в свою чергу спричиняє збільшення сили скорочення серцевого м'язу та тонуусу судин. Встановлено зв'язок між активністю  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази та апоптозом в клітинах судин: її активація сприяє розвитку апоптозу, тоді як її пригнічення уабаїном зменшує його прояви [89]. В даний час  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза широко вивчається як потенційна мішень для боротьби з раком. Доведено, що функціонування цього ферменту змінюється при різних патологіях, таких як рак, вади серця, порушення рівня тиреоїдних гормонів, гіпотиреоїдизм, тиреотоксикоз та цукровий діабет [90].

## **1.2. Каліксарени: структура, синтез та фізико-хімічні властивості.**

Каліксарени – це макроциклічні сполуки, які, разом з циклодекстрирами, нанотрубками, наночастинками, міцелями та коронаетерами, представляють третє покоління супрамолекулярних сполук. Термін «калікс[n]арен» був введений в наукову літературу Давідом Гютше (David Gutsche) [91, 92]. Каліксарени мають форму чаші (слово «калікс» з латини означає «чаша» або «кубок», а «арен» свідчить про наявність ароматичних циклів у макроциклі) і

отримуються шляхом циклоконденсації фенольних сполук з формальдегідом [93]. Каліксарени можна розглядати як циклічні поліфеноли через наявність різних фенольних одиниць, сполучених метиленовими містками, у їхній структурі [91, 94, 95]. Класичний каліксарен складається з верхнього, центрального кільцевого вінця та нижнього вінця, а об'єм внутрішньої порожнини молекули в середньому становить 10 кубічних ангстремів (рис. 1.1).

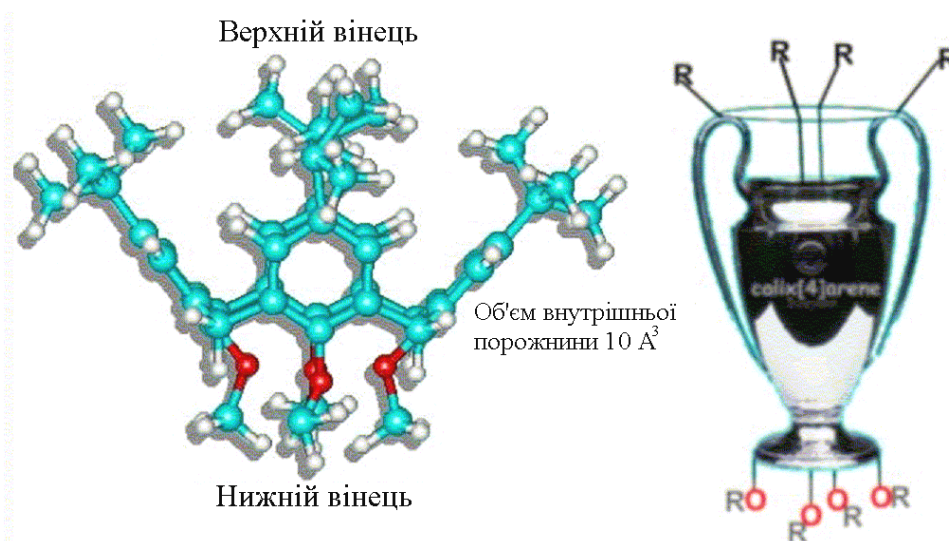


Рис. 1.1. Схематична структура калікс[4]аренів [92].

Існують два методи синтезу каліксаренів. Класичний метод отримання калікс[4]аренів включає каталізовану лугом циклоконденсацію пара-заміщених фенолів з формальдегідом, що призводить до утворення лінійних олігомерів, які подальше внутрішньомолекулярно циклізуються. Цей метод дозволяє отримати каліксарени з різною кількістю фенольних фрагментів у макроциклі. Найпоширенішими є каліксарени з 4, 6 і в окремих випадках 8 ареновими фрагментами. Встановлено, що похідні калікс- та тіокаліксаренів можуть мати чотири основні конформації: конусну, частково конусну, 1,2-альтернат та 1,3-альтернат (рис. 1.2) [96]. Вони відрізняються розташуванням ароматичних фрагментів відносно головної площини макроциклу, яка умовно проходить через метиленові зв'язки [97].

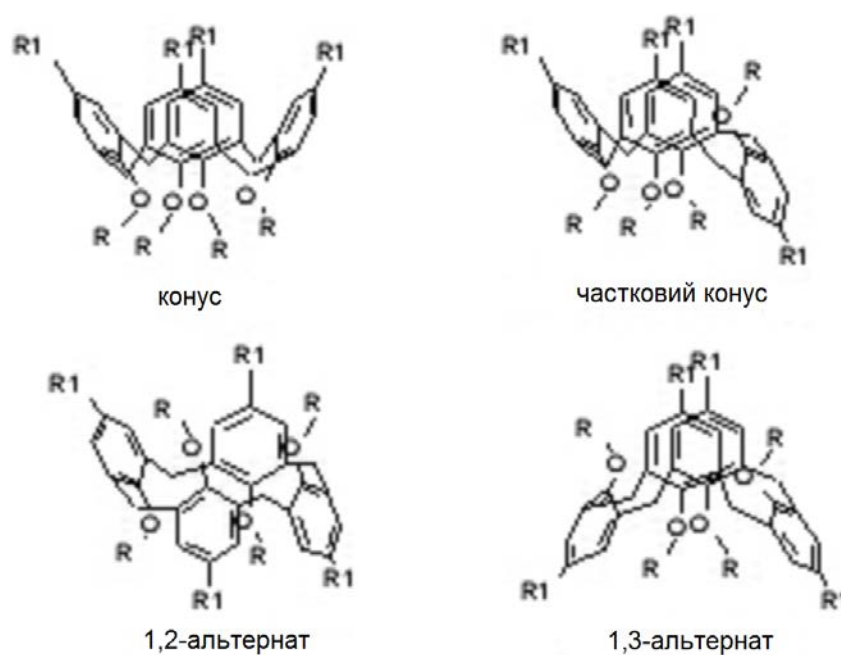


Рис. 1.2. Основні конформації калікс[4]аренів [96].

Каліксаренові молекули можуть пристосовуватися для створення найсприятливіших взаємодій з мікрооточенням завдяки їх гнучкості, яка проявляється на рівні ароматичного ядра. Особливості будови каліксаренів пояснюють їх здатність розпізнавати та утворювати стійкі комплекси типу «гість-господар» і розділяти близькі за властивостями катіони, аніони та нейтральні молекули [5]. Утворення такого комплексу залежить від супрамолекулярної комплементарності, яка охоплює відповідність розмірів, форм і зарядів молекул «гостя» і «господаря», а також різноманітні нековалентні взаємодії. Калікс[6]арени та калікс[8]арени можуть включати навіть дві або більше молекул, і завдяки великій кількості можливих конформацій вони можуть адаптувати свою структуру до зв'язаної речовини [98]. Каліксарени є унікальною макроциклічною платформою для створення нового покоління каталізаторів, які містять кілька активних центрів і моделюють ензими [99, 100].

У порівнянні з коронаетерами та циклодекстринами, функціоналізація каліксарену керованіша, що є додатковою перевагою. Каліксарени також можуть зв'язувати метал, металічні іони, неметалеві оксиди та органічні молекули, включаючи амінокислоти, амідни, аміни, спирти, естери, альдегіди та

алкільні похідні, утворюючи агрегати з різними морфологіями. Крім включення молекул у внутрішню порожнину, каліксарен може також створювати дітопічні ліганди з сайтами зв'язування на верхньому та нижньому вінцях, взаємодіючи з білками та нуклеїновими кислотами та модулюючи активність багатьох ферментів, проліферацію ракових клітин та метаболічні шляхи. Дослідження показують, що молекула каліксарену може бути функціоналізована з L-проліном, що призводить до клітинної смерті шляхом апоптозу та виявляє високу токсичність проти клітин раку кишківника та легенів.

На сьогоднішній день науковці все більше зацікавлені у розробці нових методів, які дозволять регіо- та стереоселективно вводити функціональні групи на каліксаренову платформу. Використання цих підходів дозволяє синтезувати внутрішньохірально каліксарени і знаходити серед отриманих сполук біологічно активні речовини, які можуть впливати на властивості та функціонування ензимів. Це відкриває нові перспективи для дослідження та розвитку каліксаренів як потенційних засобів в біології та медицині.

### **1.2.1. Біологічна активність каліксаренів**

Здатність каліксаренів зв'язувати нейтральні молекули, катіони та аніони має великі перспективи в дослідженні біохімічних процесів та їх регуляції. Використання каліксаренів з прикріпленими біоафінними групами на їх поверхні дозволяє створювати високоефективні та селективні ліганди або рецептори для біомолекул, що відкриває можливості для створення нових біоактивних речовин. Здатність каліксаренів вбудовуватися в біомембрани дозволяє впливати на функціонування аніонних і катіонних pomp у клітинах. На основі каліксаренів можна розробляти специфічні інгібітори ензимів. Додавання до структури каліксарену протонодонорних груп, таких як амідні або карбамідні, дозволяє створювати ефективні аніонні рецептори. За допомогою хіральних замісників можна регулювати енантіоселективність розпізнавання. Наприклад, пептидокаліксарени з фрагментами амінокислот L-ряду можуть селективно зв'язувати аніони D-амінокислот [5, 6, 7, 101, 102].

Каліксарени проявляють різноманітні біологічні ефекти, зокрема вони інгібують ензиматичну активність, зокрема активність АТР-гідролазних систем. Наші дослідження в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАНУ показали, що каліксарени С-97, С-99 та С-107 зумовлюють деполяризацію плазматичної мембрани та зростання мембранного потенціалу мітохондрій у клітинах. Каліксарен С-97 також інгібує АТРазну активність субфрагмента-1 міозину міометрія та збільшує гідродинамічний діаметр молекули субфрагмента-1, що свідчить про утворення міжмолекулярного комплексу. Каліксарентетрабісметиленбісфосфонова кислота С-192 є специфічним інгібітором полімеризації фібрину та зсідання крові і може використовуватися як антитромботичний препарат [103, 104, 105]. Описані ефекти каліксаренів свідчать про можливість їх використання для створення селективних інгібіторів (чи активаторів) активності АТР-гідролазних систем.

Каліксарени також проявляють потенціал як інгібітори різних ензимів, таких як І-лізиноксидаза, хімотрипсин, холінестераза, лужна фосфатаза, трипаза та інші [106, 107, 108, 109, 110]. Каліксарени з метиленбісфосфоновими або гідроксиметиленбісфосфоновими залишками використовуються як специфічні інгібітори тирозинової фосфатази людини 1В [111]. Було синтезовано каліксарен з чотирма пептидними петлями навколо калікс[4]аренового ядра, який інгібує ензим  $\alpha$ -хімотрипсин з високою селективністю [112]. Також було досліджено рецептор на основі водорозчинного комплексу  $Gd^{3+}$  з модифікованим калікс[4]ареном, що міцно зв'язується з сироватковим альбуміном людини і може бути використаний як контрастний агент у магнітно-резонансній томографії [113].

Досліджуються каліксарени і як аналоги ензимів, зокрема застосуванням технології молекулярного розпізнавання для розробки каталізаторів на основі каліксаренових платформ [114]. Каліксарени можуть впливати на фосфоліпідні бішари, модулюючи фазову рівновагу мембранних ліпідів та виявляючи антитуберкульозну та прототуберкульозну активність [115]. Деякі каліксарени можуть транспортувати катіони крізь мембрани та формувати канали [116, 117].

На сьогодні описано та запатентовано використання каліксаренів як сполук з бактерицидною, противірусною та фунгіцидною дією [102, 118, 119, 120, 121]. Каліксарени є перспективними сполуками як компоненти лікарських засобів антиракових препаратів, наприклад, глікокалікс[8]арен з експонованими залишками N-ацетилглюкозаміну інгібує міграцію та проліферацію клітин гліоми [122]. На основі каліксаренів знайдений селективний інгібітор зв'язування рецепторами тромбоцитарного фактору росту [123] та ендотеліального фактора росту судин [124], що приводить до сповільнення росту пухлин та їх голодування. Ще один підхід для створення антиракових засобів на основі каліксаренів передбачає стимуляцію імунної відповіді на пухлину: N-ацетилглюкозамінкалікс[4]арен, взаємодіючи з рецептором CD69, активує цитотоксичні клітини [125], а калікс[4]арен, поєднаний з чотирма пухлиноасоційованими глікоантигенами, стимулює продукування антипухлинних імуноглобулінів і тому може бути використаний як вакцина [126].

### **1.2.2. Токсичність та імуногенність каліксаренів**

Для використання каліксаренів у медицині важливо, щоб вони не викликали імунну відповідь та не були токсичними, не спричиняли агрегацію та гемоліз еритроцитів. Немодифіковані каліксарени виявили практично повністю безпечні результати в Еймс-тесті [127, 128, 129]. Каліксаренсульфонати не впливають на ріст фібробластів людини і мають такий самий рівень токсичності, як глюкоза [130]. Парасульфonatoкалікс[4]арени не є токсичними при дозах, що не перевищують 100 мг на 1 кг маси тіла мишей. Каліксарени швидко виділяються з організму через сечу і не накопичуються в печінці, селезінці або мозку [8]. Тверді ліпідні наночастинки на основі амфіфільних калікс[4]аренпохідних не мають гемолітичних ефектів при концентраціях до 300 мг/л [131]. У порівнянні з твердими ліпідними наночастинками на основі амфіфільних циклодекстринів, які проявляють значну гемолітичну активність, каліксарени не мають таких

ефектів [132].

Досліджено, що серія пара-сульфонат-калікс[4,6,8]аренів та їх монозаміщені похідні не спричиняють активацію нейтрофілів та не впливають на їх життєздатність [133]. Виявлено, що ДНК-трансфектовані каліксарени не виявляють токсичності щодо клітин (у яєчниках китайського хом'ячка та клітинних лініях нирок ембріонів людини) [134]. Каліксарени, які містять гуанідинові групи на нижньому макроциклічному вінці, проявляють низьку токсичність при їх трансфекції у клітини, що підтверджується 75-80% збереження їх життєздатності протягом 48 годин [135]. Самі каліксаренові матриці не мають імуногенної дії, хоча деякі каліксарени можуть стимулювати імунну відповідь. Експерименти, проведені на тваринах, показали, що антитіла проти калікс[4]аренів виявляються лише після імунізації каліксаренами, що кон'юговані з білками, і імунна відповідь залежить від природи кон'югованого переносника, дози та методу імунізації [136]. Отже, зважаючи на їх низьку токсичність, каліксарени є досить перспективними сполуками для застосування у біомедичній практиці.

### **1.2.3. Перспективи використання каліксаренів**

За останній час активно вивчається можливість використання каліксаренів у різних галузях науки, зокрема в фізико-хімічній біології, біотехнології та фармакології. Дослідження показали, що каліксарени можуть мати різні біологічні властивості, включаючи антикоагуляційну, гідролітичну, протитуберкульозну, антибактеріальну, противірусну, антитромботичну та протипухлинну активності. Це відкриває перспективи для використання каліксаренів у створенні антивірусних, антибактеріальних засобів та молекулярних носіїв для доставки ліків [137, 138, 139, 140]. Крім того, каліксарени здатні виявляти рецепторні властивості по відношенню до різних молекул та іонів, що дозволяє їх широке використання в аналітичних і діагностичних методах. Наприклад, глікокалікс[4]арен виявляє високу спорідненість до холерного токсину, що дозволяє його використання для

виявлення цього токсину [141]. Використання амфіфільних каліксаренових похідних дозволяє створювати сенсори, здатні визначати різні білки в наномолярному діапазоні. Також розроблені аналітичні системи на основі парасульфонат-каліксаренів, які можуть виявляти високопатогенні пріони та підвищувати їх імунологічне детектування [142, 143]. Каліксарени з іонофорними властивостями можуть бути використані для створення селективних детекторів на основі електродної техніки, наприклад, для визначення концентрації іонів натрію в клітинах рослин та плазмі крові [144, 145]. Крім того, розроблені сенсори на основі гексагомотріоксакалікс[3]аренів, які можуть виявляти допамін та інші катехоламіни з високою селективністю [146, 147].

Деякі каліксарени використовуються для поліпшення терапевтичних властивостей лікарських засобів. Наприклад, кон'югат моноклональних імуноглобулінів з калікс[4]ареном може хелатувати радіоактивний актиній, що використовується в радіотерапії [136]. Парасульфonatoкалікс[8]арен утворює стабільний комплекс з ніфедипіном, що збільшує його біодоступність при оральному застосуванні [148]. Калікс[4]арени демонструють ефективність у кристалізації фармацевтично активних сполук, що поліпшує їх характеристики та дозволяє контролювати конформацію лікарського засобу [98].

Було описано синтез нових неіонних амфіфільних сполук, які використовують калікс[4]арен, для підвищення розчинності гідрофобних ліків, таких як напроксен і ібупрофен. Виявлено, що довжина алкільного ланцюжка та циклічна природа структури каліксарену мають вплив на розчинність цих ліків. Це може сприяти підвищенню біодоступності лікарського засобу. Дослідження показали, що наногідрогель, створений на основі макроциклу калікс[4]арену, може бути використаний як носій для вивільнення куркуміну. Ефективність такого складу була досліджена на мишах в моделі псоріазу, де використання іміквімоду викликало запальний процес. Наногідрогель з калікс[4]ареном, який топічно застосовували, показав сильний протизапальний ефект без токсичних наслідків [5, 102, 104, 149].

Каліксарени використовуються в біоорганічній хімії та біотехнології для створення синтетичних рецепторів, які можуть розпізнавати молекули та іони, схожі на природні рецептори [5, 150, 151]. Також каліксарени можуть бути застосовані при розробці антивірусних та протигрибкових засобів. Наприклад, функціоналізація каліксаренової платформи може знизити токсичність антивірусних препаратів і підвищити їх ефективність [152].

Нещодавно було встановлено, що каліксарени можуть впливати на ензиматичні системи, зокрема на АТР-гідролази. Однак, потенціал каліксаренів як біологічно активних сполук ще повністю не розкритий, і необхідні подальші дослідження, зокрема дослідження взаємодії каліксаренів з мембранозв'язаними АТРазами, для встановлення їх можливих фармакологічних властивостей [139, 153].

Нарешті, каліксліки - це кластери, які складаються з калікс[4]арену та включених терапевтичних речовин, таких як пеніцилін, цефалоспорин, тирозол та карбоплатин. Ці кластери отримали назви каліксспенам, каліксцефем, калікстирозол та калікссплатин відповідно. Каліксареновий каркас є основою структури кластерних сполук і необхідною складовою частиною кожного кластера. Фактично, мономерні речовини укладаються в кластер у співвідношенні 1/4 від загального об'єму. Ймовірно, завдяки своїй багатоповерховості, просторовій організації та синергетичному ефекту чотирьох активних лікарських одиниць, каліксліки ефективніше взаємодіють з місцями призначення, порівняно з відповідними мономерами [154].

Отже, на сьогодні у світовій літературі накопичені вагомі експериментальні результати щодо сполук, створених на основі каліксаренів, які виявляють унікальні біохімічні властивості, що продемонстровано на клітинах та на рівні цілісного організму. Наразі є вагомі підстави стверджувати, що каліксарени можуть бути ефективними модуляторами різноманітних біологічних процесів. Це вкрай перспективно для подальшого розвитку біохімії, біофізики, молекулярної біології, а особливо в практичному аспекті біотехнології та медицини.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Препаративна біохімія

Фракцію ПМ гладеньком'язових клітин матки виділяли з міометрія свині, як було описано раніше [155, 156]. Вміст протеїну в цій фракції визначали за допомогою методу M. Bredford з використанням реактиву Кумасі-G250 [157]. Міоцити були виділені з матки невагітних лабораторних щурів з використанням колагенази та соєвого інгібітора трипсину за методом Моларда [158].

Робота була виконана відповідно до етичних стандартів і документів, зокрема Хельсінської декларації (Всесвітня медична асамблея, 1964), Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для досліджень та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), Декларації принципів толерантності (28 сесія ЮНЕСКО, 1995), Універсальної декларації з біоетики та прав людини (ООН, 1997), норм Конвенції про захист прав людини у зв'язку з впровадженням нових біомедичних технологій, яка була прийнята у 1997 році в Ов'єдо (Іспанія) та підписана Верховною Радою України у 2002 році, а також Закону України № 3447 IV "Про захист тварин від жорстокого поводження".

##### 2.1.1. Реактиви

В роботі застосовували наступні реактиви: АТР, Нерес, убаїн, тапсигаргін, Hoechst, fluo-4 AM, колагеназа, полі-L-лізин, ацетилхолін, цевімелін ("Sigma", США), Tris-гідроксиметил-амінометан ("Reanal", Угорщина), дигітонін ("Merck", Німеччина), ЕГТА ("Fluka", Швейцарія), окситоцин ("Гедеон Ріхтер", Угорщина). Інші реактиви вітчизняного виробництва класифікації ч.д.а. та х.ч.

#### 2.2. Ензимологічні дослідження

«Загальну» АТРазну активність визначали у фракції плазматичних мембран клітин міометрія, як описано раніше [155], при 37°C у стандартному середовищі

(об'єм – 0,4 мл), яке містило (мМ): 1 АТР, 3 MgCl<sub>2</sub>, 125 NaCl, 25 KCl, 1 ЕГТА, 20 Нерес-трис-буфер (рН 7,4), 1 NaN<sub>3</sub>, 0,1 мкМ тапсигаргін і 0,1 % дигітонін. Наявність Ca<sup>2+</sup>-хелатора ЕГТА у середовищі інкубації забезпечувало зв'язування ендogenous іонів Са у ньому. Кількість білку мембранної фракції в пробі – 20-30 мкг. Час інкубації при 37 °С – 4 хв. Ензиматичну реакцію ініціювали введенням до середовища інкубації аліквоти (50 мкл) суспензії фрагментів плазматичних мембран (8 °С), 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 (8 °С).

«Уабайнчутливу» Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТРазну активність розраховували по різниці між величинами «загальної» АТРазної активності та «базальної» Mg<sup>2+</sup>-АТРазної активності. «Базальну» Mg<sup>2+</sup>-АТРазну активність визначали в тому ж середовищі, але в присутності 1 мМ уабайну (селективний інгібітор Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТРази плазматичної мембрани [159, 160]).

Контролем на неензиматичний гідроліз АТР було середовище інкубації, що мало склад, аналогічний описаному вище, але не містило фрагменти плазматичних мембран. Контролем на кількість ендogenous неорганічного фосфору (P<sub>i</sub>) в мембранному препараті було середовище, що містило тільки суспензію мембранного препарату у водному розчині. «Базальну» АТРазну ензиматичну активність розраховували по різниці між кількістю P<sub>i</sub>, що утворився в середовищі інкубації в присутності та за відсутністю фрагментів плазматичної мембрани, з урахуванням поправки на неензиматичний гідроліз АТР та вміст ендogenous P<sub>i</sub> в мембранному препараті. Кількість продукту реакції P<sub>i</sub> визначали за методом W. Rathbun et V. Betlach [161].

У наших дослідях середнє значення питомих активностей Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТРази та «базальної» Mg<sup>2+</sup>-АТРази ПМ становить 10,2 ± 0,7 і 18,1 ± 1,2 мкмоль P<sub>i</sub>/мг протеїну за 1 год відповідно (n = 7).

Ca<sup>2+</sup>,Mg<sup>2+</sup>-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 Ca). У сарколемі міометрія свині питома ензиматична активність  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази складає  $3,4 \pm 0,3$  мкмоль  $\text{P}_i$ /мг протеїну за 1 год відповідно ( $n = 7$ ).

Необхідно відмітити, що у плазматичних мембранах міоцитів матки виявлено також  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРаза, яка за своїми властивостями є відмінною від  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази. Адже її активність проявляється за наявності в середовищі інкубації  $\text{Ca}^{2+}$  і АТР у мілімолярних концентраціях, на тлі відсутності іонів Mg [162, 163].  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРаза є низькоафінною до активуючого катіона – константа активації іонами Ca  $K_{\text{Ca}}$  становить 1 мМ [163]. Низькоафінну  $\text{Mg}^{2+}$ -незалежну  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРазну активність визначали у фракції ПМ клітин міометрія при 37 °C у середовищі (об'єм - 0,4 мл), яке містило (мМ): 1 АТР, 3  $\text{CaCl}_2$ , 125 NaCl, 25 KCl, 1 ЕГТА, 20 Hepes-tris-буфер (pH 7,4), 1  $\text{NaN}_3$ , 1 убаїн, 0,1 мкМ тапсигаргін і 0,1 % дигітонін. Зазначену  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРазну активність розраховували як різницю між кількістю  $\text{P}_i$ , що утворився в середовищі інкубації в присутності та відсутності фракції ПМ, з урахуванням поправки на вміст ендogenous  $\text{P}_i$  в мембранному препараті. У сарколемі міометрія свині питома ензиматична активність низькоафінної  $\text{Mg}^{2+}$ -незалежної  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРази ПМ становить  $12,7 \pm 2,0$  мкмоль  $\text{P}_i$ /мг протеїну за 1 год відповідно ( $n = 7$ ).

У дослідях по вивченню впливу різних концентрацій каліксаренових сполук С-99 та С-1193 (1-100 мкМ) на АТР-гідролазні активності використовували стандартне середовище інкубації, що було описане вище, до якого додавали аліквоту розчину калікс[4]арену у відповідній концентрації. У дослідях використовували концентрований (20 мМ) розчин сполук С-99 та С-1193 в ДМСО, який далі розводили водою.

### 2.3. Конфокальна мікроскопія

Задля реєстрації зміни концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у гладеньком'язових клітинах суспензії міоцитів, отриманих модифікованим методом Молларда [158], протягом 20 хв при кімнатній температурі навантажували  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливим зондом fluo-4 АМ, 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 при 8 °C, 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 «МЕТА». 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  $Ca^{2+}$  у цитоплазмі здійснювали серію послідовних знімків, під час якої вносили аліквоту розчину C-1193 у концентрації 20 мкМ (5 мкл).

#### 2.4. Кінетичні розрахунки

При вивченні концентраційної залежності дії калікс[4]аренів на ензиматичну активність, значення коефіцієнтів інгібування  $I_{0,5}$  та коефіцієнтів Хілла  $n_H$  розраховували із використанням лінеаризованих графіків Хілла відповідно до рівняння  $lg[(A_{max}-A)/A] = -n_H lg I_{0,5} + n_H lg [C-1193]$ , де  $A_{max}$  та  $A$  – питомі ензиматичні активності у відсутності («нульова точка») та у присутності в середовищі інкубації тіакалікс[4]арену C-1193.

#### 2.5. Тензометричні експерименти

Реєстрацію скорочувальної активності препаратів поздовжніх ГМ рогів матки зі збереженим ендотелієм здійснювали у ізометричному режимі. М'язові смужки (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. М'язовому препарату надавали пасивний натяг на рівні 10 мН та залишали на 1 годину до стабільної відтворюваності скорочень. Сигнали реєстрували, використовуючи аналого-цифровий перетворювач.

В досліджах використовували розчин Кребса (мМ): 120,4 NaCl; 5,9 KCl; 15,5  $NaHCO_3$ ; 1,2  $NaH_2PO_4$ ; 1,2  $MgCl_2$ ; 2,5  $CaCl_2$ ; 11,5 глюкоза; pH розчину становив 7,4. Гіперкалієвий розчин (ГКР), який містив іони  $K^+$  у концентрації 80 мМ,

готували шляхом ізотонічної заміни в вихідному розчині Кребса необхідної частини іонів  $\text{Na}^+$  на еквімолярну кількість іонів  $\text{K}^+$ . Також у роботі використовували ацетилхолін (застосована концентрація 10  $\mu\text{M}$ ), цевімелін (застосована концентрація 100  $\mu\text{M}$ ) і окситоцин (застосована активність 0,1 МО).

Тіакалікс[4]арен С-1193 застосовували у концентраціях 10 та 100  $\mu\text{M}$ ; його попередньо розчиняли в ДМСО і вносили в робочий розчин так, щоб остаточно аліквота розчину цього органічного розчинника становила 0,1 % від загального об'єму розчину. Контрольні скорочення реєстрували на тлі 0,1 % ДМСО.

## 2.6. Механокінетичний аналіз скорочень

Вивчення спонтанної скоротливої активності ГМ препаратів здійснювали відповідно до розробленого нами раніше методу емпіричного багатопараметричного аналізу комплексного механокінетичного аналізу [164]. Для аналізу повного профілю поодиноких спонтанних скорочень їх лінеаризували у координатах  $\left[ \ln\left(\frac{f_R}{f_C}\right); \ln\left(1 + \frac{\Delta t}{t}\right) \right]$ , де  $f$  і  $t$  – миттєві значення сили та часу на рівні скоротливого циклу (С та R – символіка фаз скорочення та розслаблення відповідно),  $F_C$  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  $F_{\max}$  в момент часу  $\tau_0$  і до її повернення на базальний рівень),  $\Delta t$  – заданий довільно фіксований інтервал часу (він варіював у межах 15-50 с). Із лінеаризованих графіків визначали характеристичні константи  $k$  і  $n$ , які надалі використовували для розрахунку параметрів: часових ( $\tau_0$ ,  $\tau_C$  і  $\tau_R$ ), силових ( $F_{\max}$ ,  $F_C$  та  $F_R$ ), швидкісних ( $V_C$  і  $V_R$ ) та імпульсних ( $I_{\max}$ ,  $I_C$  та  $I_R$ ) параметрів. Тут  $V_C$  і  $V_R$  – максимальні швидкості фаз скорочення і розслаблення відповідно,  $I_{\max}$ ,  $I_C$  та  $I_R$  – імпульси сили на рівні амплітуди та максимальних швидкостей скорочення і розслаблення відповідно. Для аналізу використовували спонтанні скорочення, зареєстровані у інтервалі 10-30 хв від початку аплікування тіакалікс[4]арену С-1193.

Аналіз кінетичних властивостей викликаних скорочень здійснювали згідно з методом Костеріна-Бурдиги, описаним раніше [165]. У процесі аналізу розраховували незалежні від амплітуди скоротливих відповідей показники – нормовані на амплітуду максимальні швидкості фаз скорочення ( $V_{nc}$ ) та розслаблення ( $V_{nr}$ ). Для аналізу використовували викликані скорочення, зареєстровані у інтервалі 20-30 хв від початку аплікування тіакалікс[4]арену С-1193.

## 2.7. Статистичний аналіз

Статистичний аналіз одержаних даних проводили із залученням методів варіаційної статистики. Кінетичні та статистичні розрахунки здійснювали з використанням програмного забезпечення MS Exel та Origin 2018.

Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами вибірок використовували t-критерій Стьюдента. У всіх випадках достовірними вважали результати за умови  $p < 0.05$ . Аналіз достовірності апроксимації даних лінійною функцією здійснювали із використанням F-критерію Фішера; у всіх випадках значення коефіцієнта детермінації ( $R^2$ ) було не нижчим за 0,96. Результати представлені як середнє арифметичне  $\pm$  стандартна похибка середнього,  $n$  – кількість дослідів.

### РОЗДІЛ 3.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

### 3.1. Відмінності будови калікс[4]арену С-99 та тіакалікс[4]арену С-1193

У попередніх дослідженнях [12, 13] ми визначили, що каліксарен С-99 в концентрації 100 мкМ на 86 % відносно контролю інгібує активність  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази плазматичної мембрани міоцитів матки, тому в подальших експериментах нами була досліджена дія цілого ряду калікс[4]аренів, структурних аналогів калікс[4]арену С-99, на  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРазну активність, і з'ясовано, що ще більшу інгібіторну активність має новий, більший за розмірами, тіакалікс[4]арен С-1193, котрий містить чотири атоми сірки в макроциклічній платформі.

Калікс[4]арен С-99 та тіакалікс[4]арен С-1193, які були отримані однореакторним синтезом з використанням кількох хімічних стадій, мають макроциклічну конусоподібну конформацію. Для кислоти С-99 конусоподібна конформація підтверджується наявністю двох дублетів спінової системи АВ аксіальних та екваторіальних протонів групи  $\text{ArCH}_2\text{Ar}$ , які мають хімічні зсуви 3.37 м.ч. і 4.24 м.ч. відповідно. У тіакаліксарен-біс-гідроксиметилфосфоновій кислоті С-1193 значення хімічних зсувів протонів групи  $\text{OCH}_2$  при 4.40 м.ч. свідчать про конусоподібну конформацію. У випадку конформації 1,3-альтернат, сигнали цих груп будуть значно зсунуті в сильне поле, в діапазоні 3.81 - 3.86 м.ч., через вплив екрануючих конусів, утворених двома син-орієнтованими фенільними кільцями макроциклічного кістяка [166, 167].

Конусоподібна конформація С-99 та С-1193 підтверджується також даними молекулярного моделювання за програмою HyperChem (рис. 3.1).

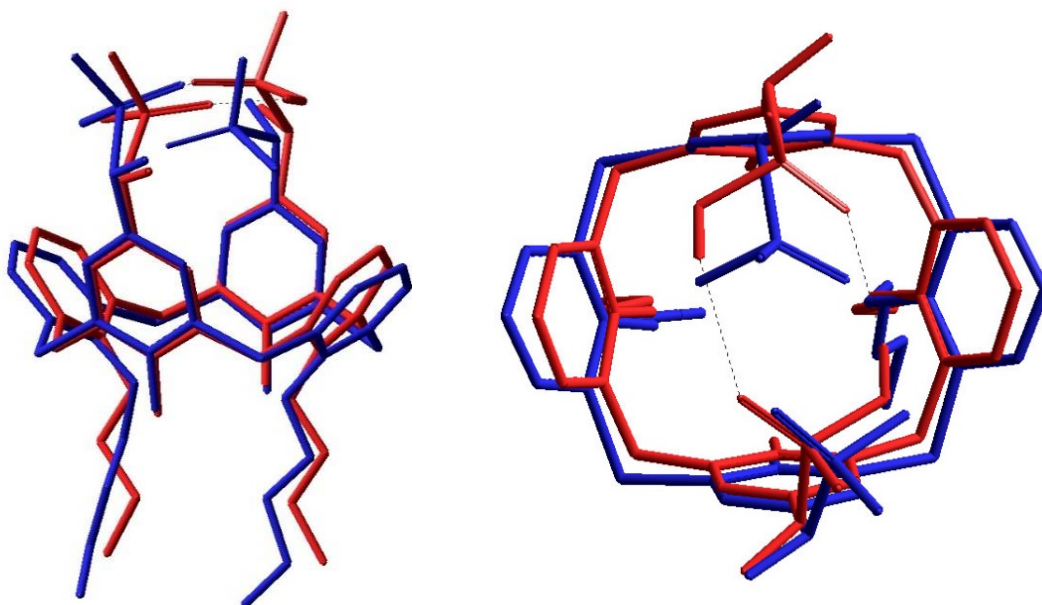
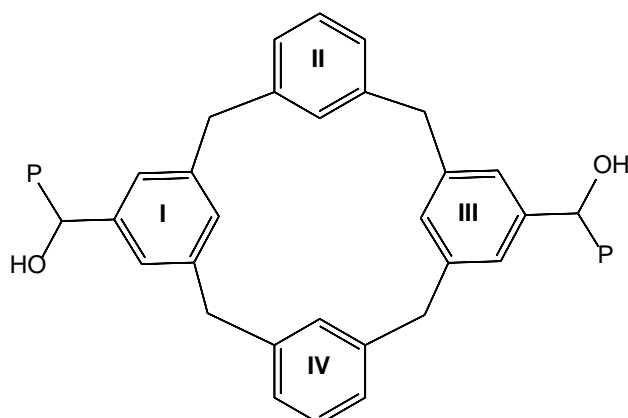


Рис. 3.1. Енергетично мінімізовані структури каліксарену **C-99** (червоний колір) та тіакаліксарену **C-1193** (синій колір) (HyperChem).

В отриманих моделях фосфорильовані бензольні кільця мають «копланарну» а пара-незаміщені бензольні кільця «перпендикулярну» орієнтацію відносно головної площини макроциклу, утвореної лінкерним атомами вуглецю або сірки. При цьому геометричні параметри енергетично мінімізованих структур **C-99**, **C-1193**, а саме: відстані між атомами фосфору (5.09 Å і 4.14 Å відповідно), відстані між діаметральними лінкерними атомами вуглецю (7.21 Å) і сірки (8.04 Å) та дієдральні кути утворені бензеновими кільцями з головною площиною макроциклу (таблиця 1) відрізняються між собою.

Табл. 1. Дієдральні кути (°) утворені бензеновими кільцями I,II,III,IV з головною площиною макроциклу в каліксарені **C-99** та тіакаліксарені **C-1193**.



Структура	I	II	III	IV
<b>C-99</b>	105	124	105	118
<b>C-1193</b>	108	132	64	135

Таким чином, заміна метиленових лінкерів в макроциклічній платформі **C-99** на атоми сірки (молекула **C-1193**) змінює геометричні параметри макроциклу і впливає на біологічну активність молекули.

### 3.2. Порівняння ефектів **C-99** та **C-1193** на АТР-гідролазні активності

У попередніх наших експериментах було продемонстровано, що каліксарен **C-99** в концентрації 100 мкМ на 86 % відносно контролю інгібує активність  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази плазматичної мембрани міоцитів матки [12]. При цьому він практично не впливає на «базальну»  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРазну активність (зменшення активності лише до 91 % від контрольного значення) (рис. 3.2).

Нами була досліджена дія низки калікс[4]аренів, структурних аналогів калікс[4]арену **C-99**, на  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРазну активність плазматичної мембрани [13], і достовірно встановлено, що ще більшу інгібіторну ефективність має тіакалікс[4]арен **C-1193**. Далі ми намагалися з'ясувати селективність дії тіакалікс[4]арену **C-1193** на АТР-гідролазні активності ПМ міоцитів та показали, що тіакалікс[4]арен **C-1193** в концентрації 100 мкМ ефективно пригнічує  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРазну активність ПМ клітин міометрія до рівня  $5,2 \pm 0,8$  % відносно контрольного значення (прийнятого за 100 %) ( $n = 5$ ) (рис. 3.2).

У той же час ця сполука, що була використана у такій ж самій концентрації, практично не впливала на ензиматичні активності «базальної»  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРази,  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРази і  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ: відповідні активності становили  $97,1 \pm 0,8$ ;  $95,2 \pm 0,9$  і  $93,1 \pm 1,1$  % щодо контрольного значення ( $n = 5$ ) (рис. 3.2). Таким чином, тіакалікс[4]арен **C-1193**, використаний у концентрації 100 мкМ, ефективно інгібував активність  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази у фракції ПМ міоцитів матки. При цьому він майже не впливав на активність інших АТР-гідролаз плазматичної мембрани. Отже, тіакалікс[4]арен **C-1193** селективно (на

рівні ПМ) пригнічує активність  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази ПМ, не впливаючи на активності  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРази,  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРази і  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ.

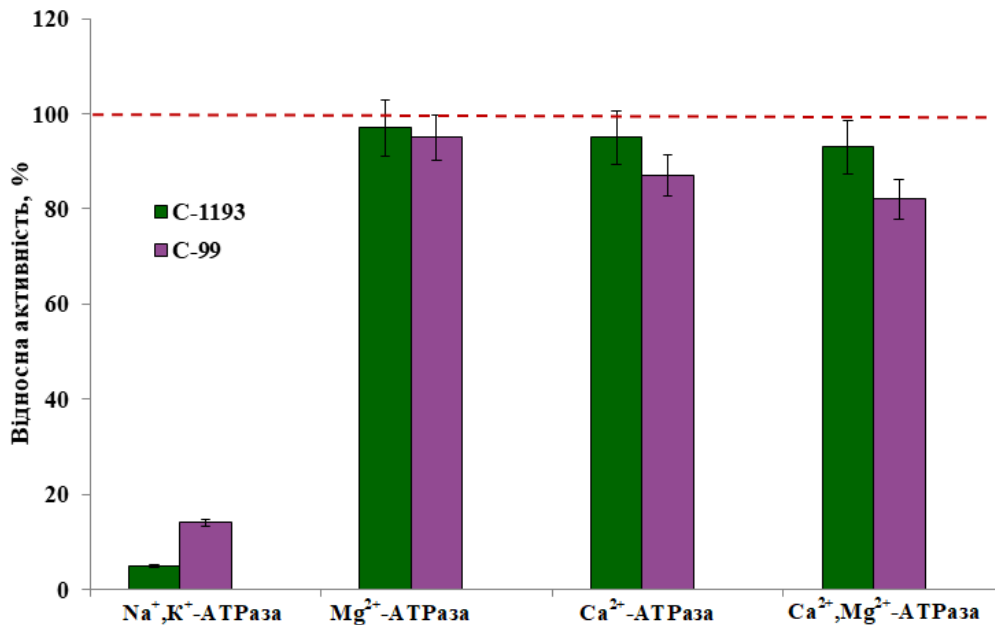


Рис. 3.2. Результати вивчення порівняльного впливу калікс[4]арену С-99 та тіакалікс[4]арену С-1193 (100 мкМ) на АТР-гідролазні активності в плазматичних мембранах клітин міометрія ( $n = 5$ ). За 100 % прийнято значення питомих ензиматичних активностей у відсутності калікс[4]аренів у середовищі інкубації.

У подальших дослідженнях ми вивчали концентраційну залежність інгібуючої дії калікс[4]арену С-99 та тіакалікс[4]арену С-1193 ( $10^{-8} - 10^{-4}$  М) на активність  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази ПМ. Як видно з рис. 3.3, обидві сполуки дозозалежно пригнічують  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРазну активність ПМ. Втім, тіакалікс[4]арен С-1193 діє з більшою ефективністю ніж калікс[4]арен С-99. Розраховані величини коефіцієнта інгібування  $I_{0,5}$  складають  $98 \pm 8$  нМ та  $42,1 \pm 0,6$  нМ, значення коефіцієнта Хілла  $n_H$  становить  $0,27 \pm 0,03$  і  $0,36 \pm 0,05$  для калікс[4]арену С-99 та тіакалікс[4]арену С-1193 відповідно ( $n = 5$ ).

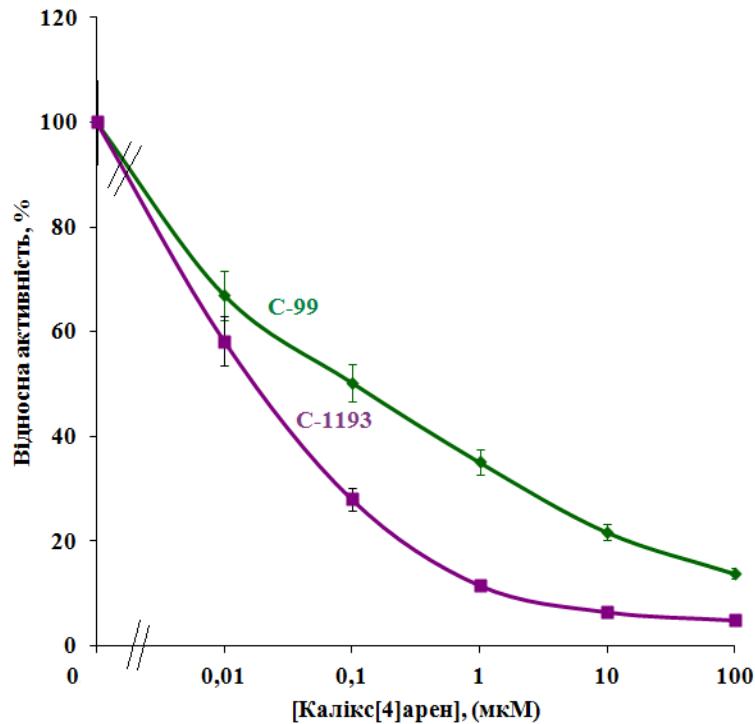


Рис. 3.3. Концентраційні залежності впливу калікс[4]арену С-99 та тіакалікс[4]арену С-1193 на активність  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази плазматичних мембран клітин міометрія ( $n = 5$ ). За 100 % прийнято значення питомої ензиматичної активності у відсутності калікс[4]аренів у середовищі інкубації.

Отже, з результатів експериментів випливає, що досліджений тіакалікс[4]арен С-1193 дозозалежно та з високою ефективністю ( $I_{0,5} = 42,1 \pm 0,6$  нМ) пригнічує ензиматичну активність  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази ПМ, при цьому він не впливає на активності  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРази,  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРази і  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ.

### 3.3. Зміна внутрішньоклітинної концентрації іонів $\text{Ca}^{2+}$ під дією тіакалікс[4]арену С-1193 в іммобілізованих міоцитах матки

Як відомо, в ПМ міоцитів матки функціонує енергозалежна система  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обміну, цей антипортний катіонний обмін забезпечується енергією трансмембранного натрієвого градієнту, що створюється за рахунок функціонування натрієвої помпи [168, 169, 170]. У зв'язку з тим, що тіакалікс[4]арен С-1193 ефективно інгібував активність  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази плазматичної мембрани, слід було очікувати, що зазначений інгібувальний

ефект буде супроводжуватися підвищенням концентрації іонів Ca в міоплазмі внаслідок пригнічення Na<sup>+</sup>-залежного викиду Ca<sup>2+</sup> з міоцитів. Тому у наступних експериментах ми намагалися з'ясувати, чи буде тіакалікс[4]арен С-1193 впливати на внутрішньоклітинну концентрацію Ca<sup>2+</sup> гладеньком'язових клітин.

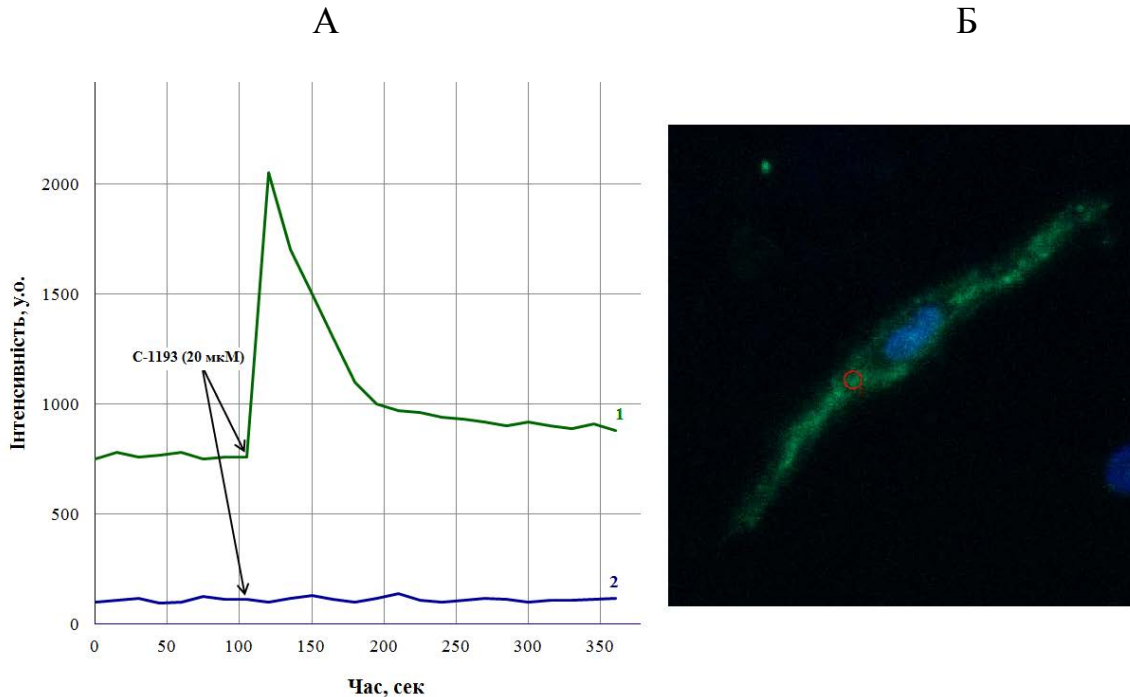


Рис. 3.4. А. Інтесивність флуоресценції зондів Ca<sup>2+</sup>-чутливого fluo-4 АМ (1) та ДНК-чутливого Hoechst (2) у ГМ за дії тіакалікс[4]арену С-1193. Б. Зображення гладеньком'язової клітини матки, отримане за допомогою скануючого лазерного конфокального мікроскопу. Стрілками показано внесення аліквоти розчину тіакалікс[4]арену С-1193 (кінцева концентрація - 20 мкМ). Наведено результати типового експерименту.

В наших досліджах ми оцінювали зміни концентрації Ca<sup>2+</sup> в міоплазмі під впливом тіакалікс[4]арену С-1193 методом конфокальної мікроскопії із використанням Ca<sup>2+</sup>-чутливого зонду fluo-4. Було показано, що під дією тіакалікс[4]арену С-1193 (20 мкМ) відбувається різке зростання флуоресцентної відповіді Ca<sup>2+</sup>-чутливого зонду fluo-4 АМ у клітині (рис. 3.4 та рис. 3.5). Протягом наступних 2 хв концентрація Ca<sup>2+</sup> знижується, що свідчить про залучення інших енергозалежних механізмів регуляції гомеостазу концентрації Ca<sup>2+</sup> (Ca<sup>2+</sup>,Mg<sup>2+</sup>-АТРази ПМ та саркоплазматичного ретикулуму, Ca<sup>2+</sup>-уніпортер

мітохондрій). Незмінним лишався рівень флуоресценції ДНК-чутливого зонду Hoechst, який був локалізований в основному в ядрі ГМК. Отже, тіакалікс[4]арен С-1193 – селективний інгібітор  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази ПМ підвищує концентрацію цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  у ГМК.

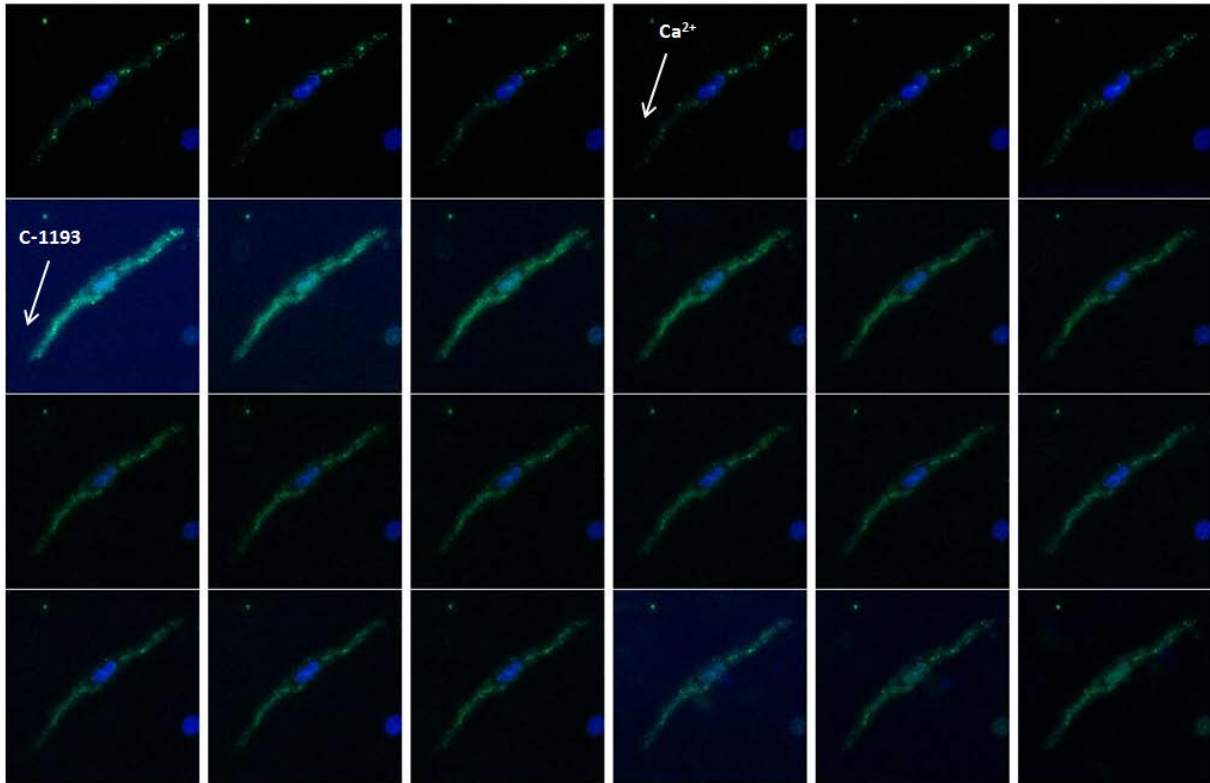


Рис. 3.5. Серія послідовних знімків ГМК з використанням скануючого конфокального мікроскопу. Стрілками позначено моменти внесення  $\text{Ca}^{2+}$  (1 мкМ) та тіакалікс[4]арену С-1193 (20 мкМ). Наведено результати типового експерименту.

### 3.4. Вплив тіакалікс[4]арену С-1193 на функціональні властивості цілісної гладенько-м'язової тканини

Оскільки, як переконливо показано у попередніх серіях експериментів, тіакалікс[4]арен С-1193 спричиняв пригнічення  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази плазматичної мембрани і суттєві зміни гомеостазу іонів  $\text{Ca}^{2+}$  у міоцитах, імовірно було припустити, що він здатен також змінювати функціональні властивості цілісної тканини ГМ. Тож наші наступні дослідження стосувалися вивчення спонтанної

та викликаної скорочувальної активності мультиклітинних гладеньком'язових препаратів рогів матки невагітних щурів.

Тіакалікс[4]арен С-1193 спричиняв дозо-залежне пригнічення спонтанних скорочень міометрія. Так, за дії цієї сполуки у концентрації 100 мкМ спостерігалось зниження амплітуди скорочень у середньому до  $72,3 \pm 9,1 \%$  ( $n=6, p<0.05$ ); на тлі підвищення концентрації С-1193 до 100 мкМ амплітуда у середньому становила  $63,1 \pm 8,4\%$  ( $n=6, p<0.05$ ) (рис. 3.6). Також на тлі С-1193 мали місце зміни поодиноких спонтанних скорочень – посилення вираженості складних скорочень зі збільшенням концентрації зазначеної сполуки.

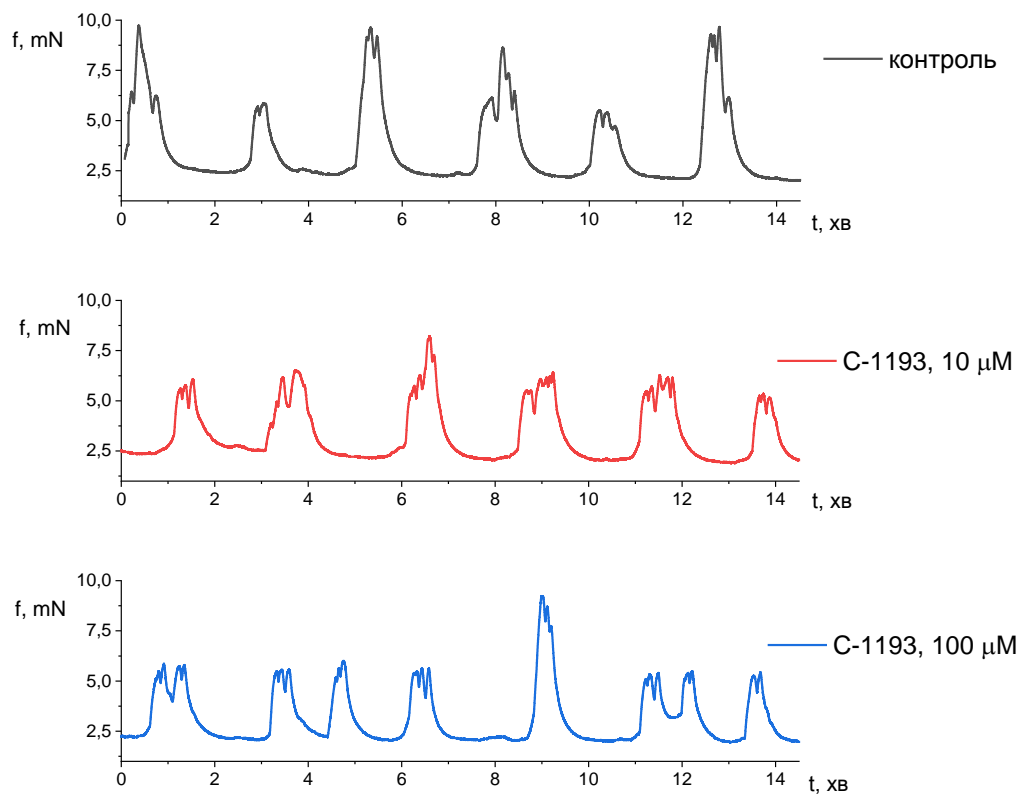
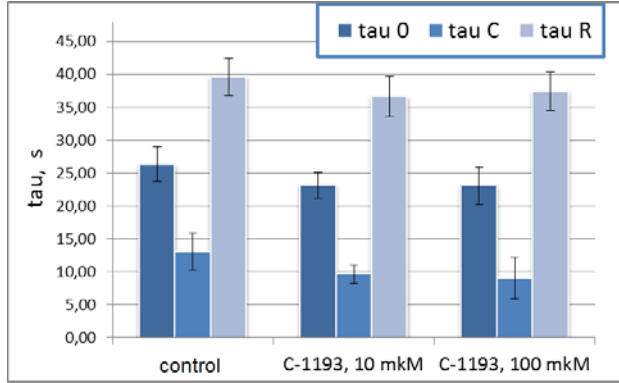


Рис. 3.6. Спонтанна скорочувальна активність поздовжніх гладеньких м'язів рогів матки щурів у контролі та за дії тіакалікс[4]арену С-1193 (10 та 100 мкМ). Наведено типові ізометричні механограми.

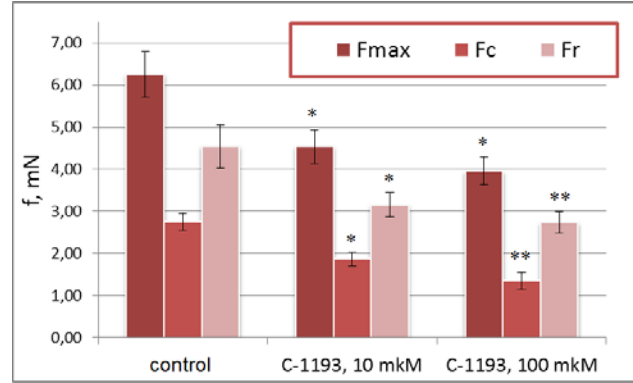
До окремих спонтанних скорочень (у контролі та за дії С-1193) було застосовано метод комплексного механокінетичного аналізу [164]. Було виявлено, що на тлі обох досліджених концентрацій тіакалікс[4]арену С-1193 показники часових параметрів амплітуди ( $\tau_{max}$ ) і часу механограми, за якого

спостерігається максимальна швидкість розслаблення ( $\tau_R$ ), залишаються на рівні контролю (рис. 3.7А), тоді як часовий параметр досягнення максимальної швидкості скорочення ( $\tau_C$ ) достовірно знижується.

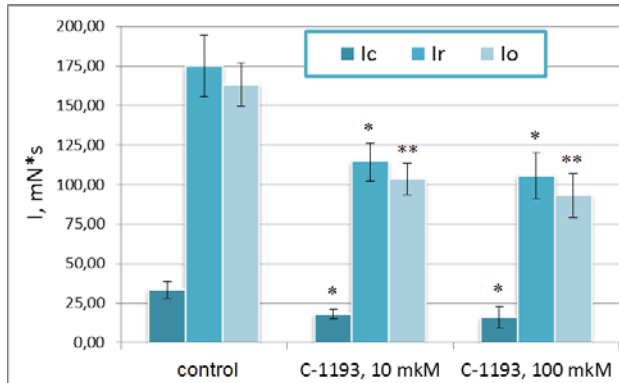
А



Б



В



Г

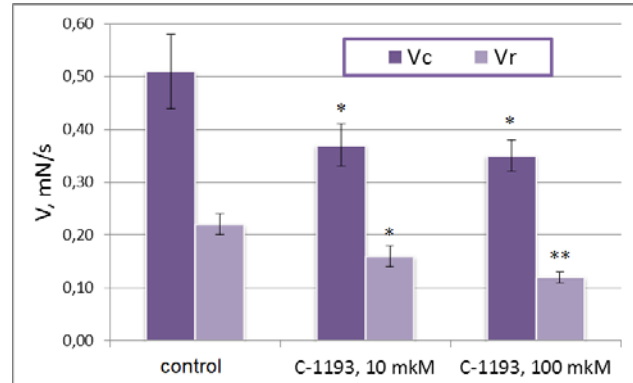


Рис. 3.7. Параметри спонтанної скорочувальної активності міометрія щурів в контролі та за дії тіакалікс[4]арену C-1193 (10 та 100  $\mu\text{M}$ ): А – часові параметри ( $\tau_0$ ,  $\tau_C$  і  $\tau_R$ ); Б – силові параметри ( $F_{\text{max}}$ ,  $F_C$  та  $F_R$ ); В – імпульсні параметри ( $I_{\text{max}}$ ,  $I_C$  та  $I_R$ ); Г – швидкісні параметри ( $V_C$  і  $V_R$ ). За 100% прийнято відповідні показники спонтанної активності в контролі.  $n = 6$ ; \* -  $p < 0.05$  та \*\* -  $p < 0.01$  – різниця достовірна щодо контролю.

Також встановлено, що на тлі дії C-1193 суттєво та в однаковій мірі знижуються силові ( $F_{\text{max}}$ ,  $F_C$  та  $F_R$ ) параметри (рис. 3.7Б): так, у випадку присутності у омиваючому розчині C-1193 у концентрації 10  $\mu\text{M}$  вони у середньому становили 72,3 %, 68,0 % та 69,4 % щодо відповідних контрольних параметрів, прийнятих за 100 %. За збільшення концентрації C-1193 на порядок

(до 100  $\mu\text{M}$ ) ці показники мали тенденції до подальшого зниження, становлячи: 63,1 %, 49,0% та 60,2%, відповідно.

Із застосуванням механокінетичного аналізу виявлено, що імпульсні параметри за дії тіакалікс[4]арену С-1193 суттєво зменшуються, виявляючи тенденції до дозо-залежності (рис. 3.7В). Так, на тлі 10 мкМ С-1193 імпульсні параметри  $I_C$ ,  $I_R$  та  $I_{\max}$  відповідно становили 54,1 %, 65,5 % і 63,3 % щодо контрольних значень, тоді як за дії 100 мкМ цієї сполуки середні значення цих показників були: 47,7 %, 60,4 % та 57,1%, відповідно.

Також за дії С-1193 значно і з тенденціями до дозо-залежності знижувались швидкості фаз скорочення ( $V_C$ ) і розслаблення ( $V_R$ ) (рис. 3.7Г). Так, на тлі 10 мкМ цієї сполуки параметри  $V_C$  і  $V_R$  у середньому складали 72,1 % та 70,0 % відповідно, тоді як за дії 100 мкМ С-1193 відповідні показники у середньому становили 69,3 % і 55,4 % щодо контролю.

Варто зауважити, що зниження швидкісних параметрів спонтанних скорочень не можна вважати специфічним щодо  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем міоцитів, адже нормування  $V_C$  і  $V_R$  на амплітуду скорочень не має статистично значущих відмінностей від нормованих максимальних швидкостей фаз скорочення і розслаблення у контролі.

### **3.5. Модуляція механокінетики скорочувальних реакцій тіакалікс[4]ареном С-1193**

У наступній серії експериментів нами було досліджено вплив тіакалікс[4]арену С-1193 на викликані за шляхами електро- і фармакомеханічного спряження збудження-скорочення скорочувальні реакції міометрія щурів. У якості адекватної моделі електромеханічного спряження збудження-скорочення було використано деполяризацію ПМ ГМК гіперкалієвим розчином (80 мМ); фармакомеханічне спряження вивчали на прикладі скорочень, індукованих утеротонічним гормоном окситоцином (0.1 МО), нейромедіатором парасимпатичної нервової системи ацетилхоліном (10

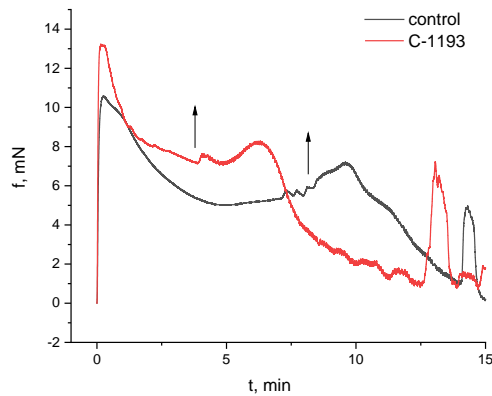
мкМ) та селективним агоністом мускаринових ацетилхолінових рецепторів  $M_3$ -типу цевімеліном (100 мкМ).

На тлі калікс[4]арену С-1193 (10 мкМ) спостерігалось збільшення амплітуди скорочень, активованих гіперкалієвою деполяризацією ПМ ГМК (рис. 3.8А). За даних умов величина фазного компоненту у середньому зростала до 126.1 % ( $p < 0.05$ ,  $n=6$ ), також мали місце тенденції до зростання тонічного компоненту скорочень. Із застосуванням методу кінетичного аналізу Костеріна-Бурдиги [165] встановлено, що тіакалікс[4]арен С-1193 суттєво активує процес наростання сили скорочень, індукованих аплікуванням гіперкалієвого розчину: параметр  $V_{nc}$  у середньому складав 165.9 % ( $p < 0.01$ ,  $n=6$ ). Також, не зважаючи на підвищений тонічний компонент, спостерігалось значне зростання нормованої максимальної швидкості фази розслаблення  $V_{nr}$  (у середньому до 155.9% щодо контролю,  $p < 0.01$ ,  $n=6$ ) (рис. 3.8А і рис. 3.9).

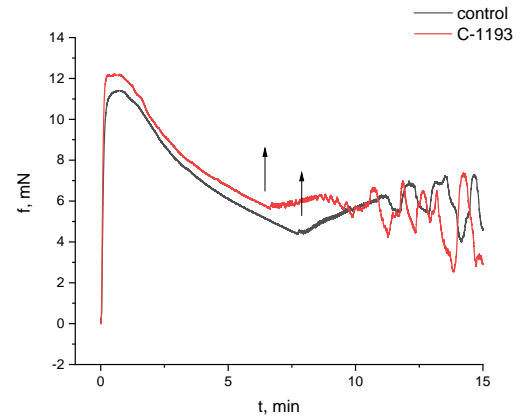
Також за передінкубації гладеньком'язових препаратів матки шурів з тіакалікс[4]ареном С-1193 спостерігались зміни скорочень, активованих окситоцином: амплітуда фазних скорочень мала тенденції до зростання, а їх тонічні компоненти суттєво зростали у середньому до 121.8% ( $p < 0.05$ ,  $n=6$ ) (рис. 3.8Б). Варто відзначити суттєві зміни кінетики окситоцин-індукованих скорочень, які спричиняв тіакалікс[4]арен С-1193 (10 мкМ): як і у випадку гіперкалієвої контрактури, у даному випадку спостерігалось значне збільшення нормованої максимальної швидкості фази скорочення  $V_{nc}$  (у середньому до 177.5 %,  $p < 0.01$ ,  $n=6$ ). У випадку ж нормованої максимальної швидкості фази розслаблення  $V_{nr}$  відбувалось зниження у середньому до 88.6 % щодо контролю,  $p < 0.05$ ,  $n=6$ ) (рис. 3.8Б, рис. 3.9).

На тлі дії тіакалікс[4]арену С-1193 (10 мкМ) спостерігалось збільшення амплітуди скорочень, активованих екзогенною аплікацією нейромедіатора ацетилхоліну (рис. 3.8В). На тлі С-1193 ці скорочення характеризувались збільшенням фазного компоненту у середньому до 130.2 % ( $p < 0.05$ ,  $n=6$ ); мали місце тенденції до зростання тонічного компоненту.

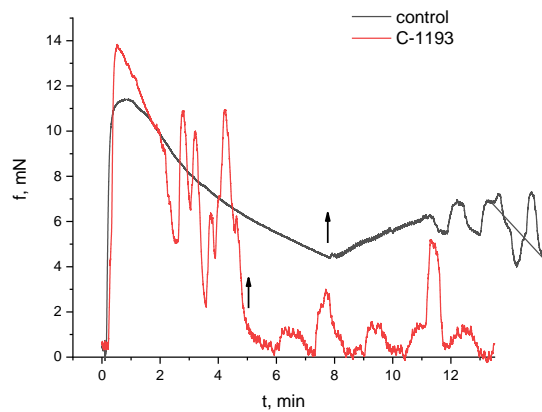
А



Б



В



Г

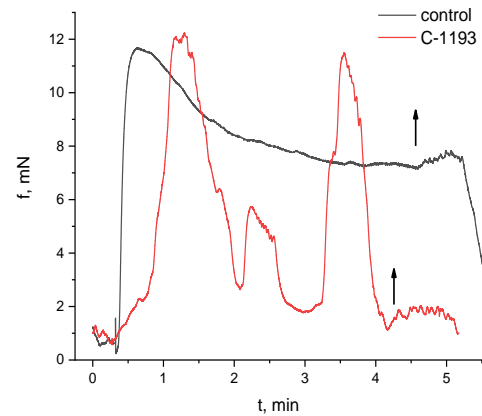


Рис. 3.8. Викликані ізометричні скорочення поздовжніх гладеньких м'язів матки щурів у контролі та на тлі дії тіакалікс[4]арену С-1193 (10 мкМ, тривалість попередньої інкубації 30 хв): А – скорочення, активовані гіперкалієвим розчином (80 мМ); Б – скорочення, активовані окситоцином (0.1 МО); В – скорочення, активовані ацетилхоліном (10 мкМ); Г – скорочення, активовані цевімеліном (100 мкМ); Стрілками показано момент відмивання м'язових препаратів нормальним розчином Кребса. Наведено типові механограми.

Із застосуванням методу кінетичного аналізу Костеріна-Бурдиги встановлено, що тіакалікс[4]арен С-1193 активує процес наростання сили скорочень, індукованих ацетилхоліном: параметр  $V_{nc}$  у середньому складав 119.5 % ( $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ). Також за даних умов спостерігалось зменшення

нормованої максимальної швидкості фази розслаблення  $V_{nr}$  (у середньому до 72.4 % щодо контролю,  $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ). Тож за активації скорочень міометрія ацетилхоліном на тлі С-1193 загалом спостерігались аналогічні ефекти до ефектів, які мали місце у випадку активації скорочень окситоцином (рис. 3.9).

На наступному етапі було досліджено скорочувальну активність міометрія, активовану селективним агоністом мускаринових  $M_3$ -холінорецепторів цевімеліном (100 мкМ). За передінкубації гладеньком'язових препаратів матки шурів з тіакалікс[4]ареном С-1193 спостерігалось значне збільшення фазних скорочень (у середньому до 190.2 %,  $p < 0.01$ ,  $n = 6$ ) (рис. 3.8Г). За даних умов, на відміну від ацетилхолінових скорочень, спостерігалось зменшення нормованої максимальної швидкості фази скорочення  $V_{nc}$  (у середньому до 76.3 %,  $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ), тоді як нормована максимальна швидкість фази розслаблення  $V_{nr}$  залишалась на рівні контролю (104.2% щодо контролю,  $p > 0.05$ ,  $n = 6$ ) (рис. 3.9).

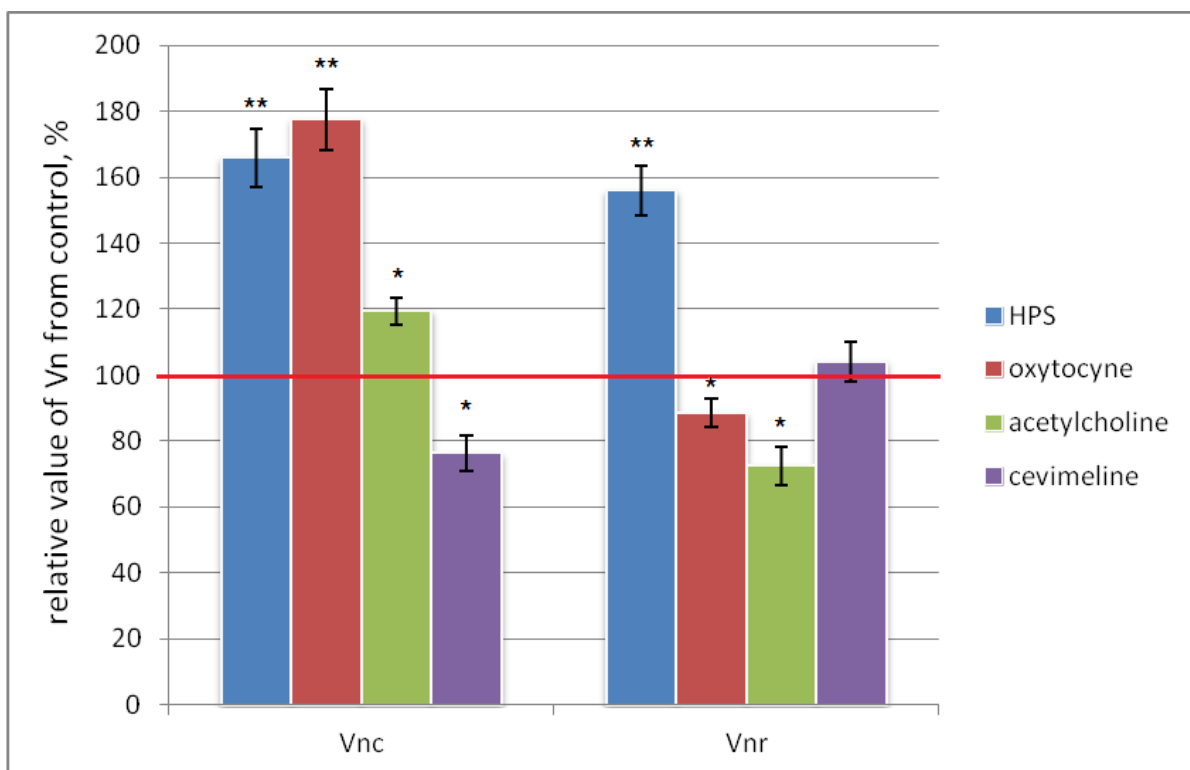


Рис. 3.9. Модуляція тіакалікс[4]ареном С-1193 (10  $\mu\text{M}$ ) нормованих максимальних швидкостей фаз скорочення ( $V_{nc}$ ) і розслаблення ( $V_{nr}$ ) ізометричних скорочень міометрія, активованих гіперкалієвим розчином (HPS,

80 мМ), окситоцином (0,1 МО), ацетилхоліном (10 мкМ) та цевімеліном (100 мкМ). За 100% прийнято відповідні показники скорочень у контролі.

n = 6; \* - p<0.05 та \*\* - p<0.01 – різниця достовірна щодо контролю.

Наразі можна передбачити клітинні механізми, за якими блокування  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази тіакалікс[4]ареном С-1193 призводить до підвищення внутрішньоклітинної концентрації іонів  $\text{Ca}^{2+}$  в міоцитах, а також змін скорочувальної активності мультіклітинних препаратів поздовжніх ГМ матки щурів. Сьогодні не викликає сумніву, що у збудливих тканинах функціонування  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази плазматичної мембрани здійснює функцію підтримки збудливості [171]. У міоцитах матки цей ензим створює градієнти іонів  $\text{Na}^+$  і  $\text{K}^+$ , а також і  $\text{Ca}^{2+}$  (за рахунок формування градієнту  $\text{Na}^+$ , який є рушійною силою для системи вторинного активного іонного транспорту –  $\text{Na}^+, \text{Ca}^{2+}$ -обмінника) [172, 173, 174]. У міометрії невагітних щурів експресуються ізоформи усіх трьох типів субодиноць:  $\alpha_1$  (домінує) і  $\alpha_2$ ;  $\beta_1$  і  $\beta_3$ ; FXVD1 [38]. Важливо, що рівень експресії окремих ізоформ  $\alpha$ - і  $\beta$ -субодиноць в тканині міометрія упродовж вагітності суттєво змінюється, забезпечуючи таким чином оптимальний рівень збудливості для виношування плоду і пологів [172, 175].

Відомий інгібітор  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази ПМ убаїн, який зв'язується з  $\alpha$ -субодиноцею ензиму, демонструє ефекти на рівні цілісної тканини міометрія, змінюючи скорочувальну функцію, спричиняючи зростання частоти і, в окремих випадках, сили спонтанних скорочень [172, 176]. Для розуміння концентраційних ефектів убаїну (а також і інших блокаторів  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази ПМ) важливим є той факт, що чутливість до інгібування різних ізоформ  $\alpha$ -субодиноць  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази суттєво відрізняється; зокрема, для низько чутливої  $\alpha_1$ -ізоформи ефективною концентрацією убаїну вважають 100 мкМ, тоді як для  $\alpha_2$ -ізоформи – 10 мкМ [177, 178]. Також важливо, що  $\alpha_2$ -ізоформа убаїн-чутливо та опосередковано Src-кіназою виконує сигнальну функцію,

модулюючи реакцію ГМК на аплікування агоністів метаботропних рецепторів [177, 178, 179].

У попередніх дослідженнях ми показали, що, подібно до убаїну, калікс[4]арен С-99 (обидва у концентрації 10 мкМ) спричиняє активацію спонтанних скорочень міометрія щурів, а також модулює механокінетику скорочувальних реакцій на гіперкалієву деполяризацію ПМ і аплікацію агоністів метаботропних рецепторів (окситоцину і ацетилхоліну) [176].

У даній же роботі нами виявлено, що тіакалікс[4]арен С-1193 (10 мкМ) обумовлює збільшення частоти на тлі зниження амплітуди спонтанних скорочень міометрія та модуляцію викликаних скорочувальних реакцій. Слід зазначити, що у багатьох випадках (щодо збільшення частоти спонтанних скорочень, напрямку зміни параметрів нормованих максимальних швидкостей фаз скорочення і розслаблення викликаних ацетилхоліном і окситоцином) ефекти, попередньо зафіксовані нами на тлі С-99 та С-1193 узгоджуються між собою [176].

Разом з тим, звертає на себе увагу той факт, що за присутності в омиваючому розчині тіакалікс[4]арену С-1193 (10 та 100 мкМ) він спричиняв суттєве зменшення амплітуди спонтанних скорочень (рис. 3.6). Імовірно, що така відмінність може бути пояснена з урахуванням даних постійного підвищення рівня цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  у міоцитах за аплікування С-1193 (рис. 3.4 і рис. 3.5). Адже відомо, що за підвищення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у примембранному просторі ГМК відбувається активація  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливих іонних каналів, зокрема,  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливих  $\text{K}^+$ -каналів великої провідності ( $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$ ), які експресуються в міоцитах матки щурів [180, 181, 182]. Таке імовірне посилення вихідного  $\text{K}^+$ -струму може обумовлювати зменшення амплітуди спонтанних скорочень міометрія за дії С-1193.

## ВИСНОВКИ

Відповідно до мети та завдань даної роботи був ретельно досліджений та вивчений вплив тіакалікс[4]арену С-1193 – інгібітора  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -залежної АТР-гідролази плазматичної мембрани, на внутрішньоклітинну концентрацію іонів  $\text{Ca}^{2+}$  в міоцитах матки та механокінетику скоротливої активності. В результаті опрацювання експериментальних даних зроблені такі висновки:

1. Тіакалікс[4]арен С-1193 має більш ефективну інгібіторну дію на  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРазну активність плазматичної мембрани клітин міометрія порівняно з калікс[4]ареном С-99, і практично не впливає на питомі активності  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРази,  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРази і  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази, що вказує на його високу селективність.
2. Тіакалікс[4]арен С-1193 зумовлює зростання внутрішньоклітинної концентрації іонів  $\text{Ca}^{2+}$  в міоцитах матки, що обумовлено пригніченням функції  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази.
3. Тіакалікс[4]арен С-1193 модифікує механокінетику спонтанних ізометричних скорочень міометрія, обумовлюючи збільшення частоти на тлі зниження амплітуди спонтанних скорочень та модуляцію викликаних скорочувальних реакцій.

Отримані нами експериментальні дані мають значення для вивчення мембранних механізмів катіонного обміну, зокрема в контексті електро- та фармакомеханічного спряження у гладеньких м'язах та регуляції іонного гомеостазу. Беручи до уваги наведені вище результати ми можемо зробити висновок, що тіакалікс[4]арен С-1193 є цікавою та перспективною молекулярною платформою для розробки таких фармакологічних препаратів, що могли б протидіяти та запобігати порушенням функціонування  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази плазматичної мембрани, а отже і контрактильної активності міометрія в цілому. Ми плануємо продовжити дослідження тіакалікс[4]арену С-1193 - потужного та селективного інгібітора  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази, з метою докладнішого розуміння його впливу на гладенькі м'язи.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. І. М. Алексеева, М. С. Книш, М. С. Пономаренко, В. О. Шаповалова, О. А. Рижов, О. Г. Алексеев, Т. М. Краснянська, А. А. Бабський // Запорожский медицинский журнал. - 2009. - Т. 11, № 6. - С. 87-90.
2. Buxton I.L. Regulation of uterine function: a biochemical conundrum in the regulation of smooth muscle relaxation // *Mol. Pharmacol.* – 2004. – V.65, N.5. – P.1051-1059.
3. N.A. Woodcock, C.W. Taylor . Effect of an oxytocin receptor antagonist and rho kinase inhibitor on the  $[Ca^{2+}]_I$  sensitivity of human myometrium // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2004. – V.190, N.1. – P.222-228.
4. T.K. Arakawa, M. Mlynarczyk, K.M. Kaushal et al. Long-term hypoxia alters calcium regulation in near-term ovine myometrium // *Biol. Reprod.* – 2004. – V.71, N.1. – P.156-162.
5. Кальченко В.І., Родік Р.В., Бойко В.І. Каліксарени. Перспективи медико-біологічного застосування. Журнал органічної та фармацевтичної хімії. 2006, 3(4):13-29.
6. Matthews S.E., Beer P.D. Calixarene-Based Anion Receptors. *Calixarenes: [eds. Z. Asfari et al.]. 2001, 421-439.*
7. Geide I., Soldatov D., Kramarenko O. et al. Novel ditopic receptor based on tetrakis-aminosulfonyl-calix[4]arene. *Journal of Structural Chemistry.* 2005, 466: 28-32.
8. Coleman A.W., Jebors S., Cecillon S. et al. Toxicity and biodistribution of para-sulfonato-calix[4]arene in mice. *New J. Chem.* 2008. 32: 780-782.
9. Кальченко В.И. Функциональные каликсареновые наноструктуры. Теоретическая и экспериментальная химия. 2018, 54(2): 69-76.
10. Kosterin S.O., Kalchenko V.I., Veklich T.O., Babich L.G., Shlykov S.G. Calixarenes as modulators of ATP-hydrilizing systems of smooth muscles. K.: Science opinion, 2019. 256p.
11. Rodik R.V., Boyko V.I., Kalchenko V.I. Calixarenes in Biotechnology and Bio-Medical Researches *Front. Med. Chem.* 2016; 8: 206-301.

12. Векліч Т.О., Костерін С.О., Родік Р.В., Черенок С.О., Бойко В.І., Кальченко В.І. Вплив каліксаренфосфонових кислот на  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-азну активність в плазматичній мембрані гладеньком'язових клітин. Укр. біохім. журн. 2006, 78(1): 70-86.
13. Векліч Т.О., Шкрабак О.А., Черенок С.О., Кальченко В.І., Костерін С.О. Порівняльне дослідження впливу калікс[4]арену С-99 та його аналогів на  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -азну активність у плазматичній мембрані міоцитів матки. Укр. біохім. журн. 2012, 84(6): 49-57.
14. Болдырев А.А.  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-аза как олигомерный ансамбль. Биохимия. 2001, 66(6):1013-1025.
15. Лопина О.Д.  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-аза: структура, механизм и регуляция активности. Биологические мембраны. 1999, 16(6): 584-603.
16. Цимбалюк О.В., Костерін С.О.  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-аза, ендогенні кардіостероїди та їхня трансдукторна роль. Український біохімічний журнал. 2012, 84(1): 5-17.
17. Lingrel J.B., Kuntzweiler T.  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. The Journal of Biological Chemistry. 1994, 269(31): 19659-19662.
18. Edwards, I.A.; Bruce, G.; Lawrenson, C.; Howe, L.; Clapcote, S.J.; Deuchars, S.A.; Deuchars, J.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase  $\alpha 1$  and  $\alpha 3$  isoforms are differentially expressed in  $\alpha$ - and  $\gamma$ -motoneurons. J. Neurosci. 2013, 33, 9913–9919.
19. Radzyukevich, T.L.; Neumann, J.C.; Rindler, T.N.; Oshiro, N.; Goldhamer, D.J.; Lingrel, J.B.; Heiny, J.A. Tissue-specific role of the  $\text{Na}, \text{K}$ -ATPase  $\alpha 2$  isozyme in skeletal muscle. J. Biol. Chem. 2013, 288, 1226–1237.
20. Sanchez, G.; Nguyen, A.N.T.; Timmerberg, B.; Tash, J.S.; Blanco, G. The  $\text{Na}, \text{K}$ -ATPase  $\alpha 4$  isoform from humans has distinct enzymatic properties and is important for sperm motility. Mol. Hum. Reprod. 2006, 12, 565–576.
21. Hundal, H.S.; Marette, A.; Ramlal, T.; Liu, Z.; Klip, A. Expression of beta subunit isoforms of the  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase is muscle type-specific. FEBS Lett. 1993, 328, 253–258.

22. Arystarkhova, E.; Sweadner, K.J. Tissue-specific expression of the Na,K-ATPase beta3 subunit. The presence of beta3 in lung and liver addresses the problem of the missing subunit. *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 22405–22408.
23. Poulsen H., Khandelia H., Morth J. P., Bublitz M., Mouritsen O. G., Egebjerg J., Nissen P. Neurological disease mutations compromise a C-terminal ion pathway in the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. // *Nature*. V. 467. P. 99–102. 02 September 2010.
24. Санагурський Д. І. Об'єкти біофізики: Монографія. Львів. Видавничий центра ЛНУ імені Івана Франка, 2008. 522 с.
25. Hilbers, F.; Kopec, W.; Isaksen, T.J.; Holm, T.H.; Lykke-Hartmann, K.; Nissen, P.; Khandelia, H.; Poulsen, H. Tuning of the Na,K-ATPase by the beta subunit. *Sci. Rep.* 2016, 6, 20442.
26. Rajasekaran, S.A.; Gopal, J.; Willis, D.; Espineda, C.; Twiss, J.L.; Rajasekaran, A.K. Na,K-ATPase β1-subunit increases the translation efficiency of the α1-Subunit in MSV-MDCK cells. *Mol. Biol. Cell* 2004, 15, 3005–3508.
27. Владимірова Н.М., Сауткіна Е.Н., Муравьева Т.И. и др. Структурные особенности изоферментов Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-азы мозга телят. *Биоорганическая химия*. 2003, 29(2):146-158.
28. Burdyga T., Richard J. P. Chapter 86 – Calcium Homeostasis and Signaling in Smooth Muscle Muscle, Joseph Hill, Boston/ Waltham. 2012: 1155-1171.
29. Miller, R.P.; Farley, R.A. All three potential N-glycosylation sites of the dog kidney (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup> )-ATPase beta-subunit contain oligosaccharide. *Biochim. Biophys. Acta* 1988, 954, 50–57.
30. Beggah, A.T.; Jaunin, P.; Geering, K. Role of glycosylation and disulfide bond formation in the beta subunit in the folding and functional expression of Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 10318–10326.
31. Kanagawa, M.; Matsumoto, K.; Iwasaki, N.; Hayashi, Y.; Yamaguchi, Y. Structural analysis of N-glycans attached to pig kidney Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> -ATPase. *J. Glyc. Lip.* 2013, S5, 005. [CrossRef]

32. Tokhtaeva, E.; Munson, K.; Sachs, G.; Vagin, O. N-Glycan-dependent quality control of the Na,K-ATPase  $\beta$ 2 subunit. *Biochemistry* 2010, 49, 3116–3128.
33. Wang, P.J.; Lin, C.H.; Hwang, H.H.; Lee, T.H. Branchial FXYD protein expression in response to salinity change and its interaction with Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> - ATPase of the euryhaline teleost *Tetraodon nigroviridis*. *J. Exp. Biol.* 2008, 211, 3750–3758.
34. Wang, L.J.; Li, Q.J.; Le, Y.; Ouyang, H.Y.; He, M.K.; Yu, Z.S.; Zhang, Y.F.; Shi, M. Prognostic significance of sodium-potassium ATPase regulator, FXYD3, in human hepatocellular. *Carcinoma Oncol. Lett.* 2018, 15, 3024–3030.
35. Widegren, E.; Önneshj, S.; Arbman, G.; Kayed, H.; Zentgraf, H.; Kleeff, J.; Zhang, H.; Sun, X.-F. Expression of FXYD3 protein in relation to biological and clinicopathological variables in colorectal cancers. *Chemotherapy* 2009, 55, 407–413.
36. Zhang, Z.; Pang, S.T.; Kasper, K.A.; Luan, C.; Wondergem, B.; Lin, F.; Chuang, C.K.; Teh, B.T.; Yang, X.J. FXYD3: A promising biomarker for urothelial carcinoma. *Biomark Insights* 2011, 6, 17–26.
37. Herrmann, P.; Aronica, S.M. Estrogen and tamoxifen up-regulate FXYD3 on breast cancer cells: Assessing the differential roles of ER  $\alpha$  and ZEB1. *Springerplus* 2015, 4, 245.
38. Kayed, H.; Kleeff, J.; Kolb, A.; Ketterer, K.; Keleg, S.; Felix, K.; Giese, T.; Penzel, R.; Zentgraf, H.; Büchler, M.W.; et al. FXYD3 is overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma and influences pancreatic cancer cell growth. *Int. J. Cancer* 2006, 118, 43–54.
39. Mishra, N.K.; Peleg, Y.; Cirri, E.; Belogus, T.; Lifshitz, Y.; Voelker, D.R.; Apell, H.J.; Garty, H.; Karlisch, S.J.D. FXYD proteins stabilize Na,K-ATPase: Amplification of specific phosphatidylserine-protein interactions. *J. Biol. Chem.* 2011, 286, 9699–9712.
40. Tokhtaeva, E.; Sun, H.; Deiss-Yehiely, N.; Wen, Y.; Soni, P.N.; Gabrielli, N.M.; Marcus, E.A.; Ridge, K.M.; Sachs, G.; Vazquez-Levin, M.; et al. The O-

glycosylated ectodomain of FXYD5 impairs adhesion by disrupting cell-cell trans-dimerization of Na,K-ATPase  $\beta$ 1 subunits. *J. Cell Sci.* 2016, 129, 2394–2406.

41. Blanco G. Na,K-ATPase subunit heterogeneity as a mechanism for tissue-specific ion regulation. *Semin Neurol* 2005;25:292-303
42. Shamraj OI, Lingrel JB. A putative fourth Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ -subunit gene is expressed in testis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:12952-6
43. Keryanov S, Gardner KL. Physical mapping and characterization of the human Na,K-ATPase isoform, ATP1A4. *Gene* 2002;292:151-66
44. James PF, Grupp IL, Grupp G, et al. Identification of a specific role for the Na,K-ATPase  $\alpha$  2 isoform as a regulator of calcium in the heart. *Mol Cell* 1999;3:555-63
45. Katz A, Lifshitz Y, Bab-Dinitz E, et al. Selectivity of digitalis glycosides for isoforms of human Na,K-ATPase. *J Biol Chem* 2010;285:19582-92
46. Mathieu V, Pirker C, De Lassalle EM, et al. The sodium pump  $\alpha$ 1 subunit: a disease progression-related target for metastatic melanoma treatment. *J Cell Mol Med* 2009;13:3960-72
47. Xu ZW, Wang FM, Gao MJ, et al. Targeting the Na/K-ATPase  $\alpha$ 1 subunit of hepatoma HepG2 cell line to induce apoptosis and cell cycle arresting. *Biol Pharm Bull* 2010;33:743-51
48. Mijatovic T, Roland I, Van Quaquebeke E, et al. The  $\alpha$ 1 subunit of the sodium pump could represent a novel target to combat non-small cell lung cancers. *J Pathol* 2007;212:170-9
49. Lefranc F, Kiss R. The sodium pump  $\alpha$ 1 subunit as a potential target to combat apoptosis-resistant glioblastomas. *Neoplasia* 2008;10:198-206
50. Seligson DB, Rajasekaran SA, Yu H, et al. Na,K-adenosine triphosphatase  $\alpha$ 1-subunit predicts survival of renal clear cell carcinoma. *J Urol* 2008;179:338-45

51. Shibuya K, Fukuoka J, Fujii T, et al. Increase in ouabain-sensitive K-ATPase activity in hepatocellular carcinoma by overexpression of Na,K-ATPase alpha3-isoform. *Eur J Pharmacol* 2010;638:42-6
52. Yang P, Menter DG, Cartwright C, et al. Oleandrin-mediated inhibition of human tumor cell proliferation: importance of Na,K-ATPase alpha subunit as drug targets. *Mol Cancer Ther* 2009;8:2319-28
53. Sakai H, Suzuki T, Mizuki M, et al. Up-regulation of Na,K-ATPase alpha3-isoform and down-regulation of the alpha1-isoform in human colorectal cancer. *FEBS Lett* 2004; 563:151-4
54. Mijatovic T, Van Quaquebeke E, Delest B, et al. Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 2007;1776:32-57
55. Mijatovic T, Ingrassia L, Facchini V, et al. Na/K-ATPase alpha subunits as new targets in anticancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2008;12:1403-17
56. Unibioscreen SA. Targeting alpha-1 or alpha-3 subunit of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in the treatment of proliferative diseases. 2008; WO2008055530
57. Gregersen, J.L.; Mattle, D.; Fedosova, N.U.; Nissen, P.; Reinhard, L. Isolation, crystallization and crystal structure determination of bovine kidney Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.* 2016, 72, 282–287.
58. Sørensen, L.M.T.; Møller, J.V.; Nissen, P. Phosphoryl transfer and calcium ion occlusion in the calcium pump. *Science* 2004, 304, 1672–1675.
59. Kotyk A. Transport adenosinetriphosphatases. *Cell. Molec. Biol. Letters.* 1997, 2(1): 131-144.
60. Кравцов А.В., Алексеенко И.Р. Механизмы регуляции векторных ферментов биомембран. К.: Наук. думка, 1990. 175 с.
61. Бабич Л.Г., Фомин В.П., Костерин С.А. Влияние мембранного потенциала на Mg<sup>2+</sup>, АТФ-зависимый транспорт Ca<sup>2+</sup> через гладкомышечную сарколему. *Биохимия.* 1990, 55: 1890-1901.

62. Schneeberger, A.; Apell, H.J. Ion selectivity of the cytoplasmic binding sites of the Na,K-ATPase: I. sodium binding is associated with a conformational rearrangement. *J. Membr. Biol.* 1999, 168, 221–228.
63. Stolz, M.; Lewitzki, E.; Bergbauer, R.; Mäntele, W.; Grell, E.; Barth, A. Structural changes in the catalytic cycle of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> - ATPase studied by infrared spectroscopy. *Biophys. J.* 2009, 96, 3433–3442.
64. Castillo, J.P.; Rui, H.; Basilio, D.; Das, A.; Roux, B.; Latorre, R.; Bezanilla, F.; Holmgren, M. Mechanism of potassium ion uptake by the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> - ATPase. *Nat. Commun.* 2015, 6, 7622.
65. Leone, F.A.; Furriel, R.P.M.; McNamara, J.C.; Horisberger, J.D.; Borin, I.A. Cation transport coupled to ATP hydrolysis by the (Na, K)-ATPase: An integrated, animated model. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 2010, 38, 276–279.
66. Павлов К.В., Соколов В.С. Электрогенный транспорт ионов Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> - АТФазой. *Биологические мембраны.* 1999, 16(6): 604-637.
67. Rui, H.; Artigas, P.; Roux, B. The selectivity of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> -pump is controlled by binding site protonation and self-correcting occlusion. *eLife* 2016, 5, e16616.
68. Grycova, L.; Sklenovsky, P.; Lansky, Z.; Janovska, M.; Otyepka, M.; Amler, E.; Teisinger, J.; Kubalac, M. ATP and magnesium drive conformational changes of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> -ATPase cytoplasmic headpiece. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* 2009, 1788, 1081–1091.
69. Tejral, G.; Sopko, B.; Necas, A.; Schoner, W.; Amler, E. Computer modelling reveals new conformers of the ATP binding loop of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> -ATPase involved in the transphosphorylation process of the sodium pump. *PeerJ* 2017, 5, e3087.
70. Apell, H.J.; Benz, G.; Sauerbrunn, D. Proton diet for the sodium pump. *Biochemistry* 2011, 50, 409–418.
71. el-Masri, M.A.; Clark, B.J.; Qazzaz, H.M.; Valdes, R. Human adrenal cells in culture produce both ouabain-like and dihydroouabain-like factors. *Jr. Clin. Chem.* 2002, 48, 1720–1730.

72. Векліч Т.О., Костерін С.О. Порівняльне дослідження властивостей  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТРази та  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани клітин міометрія. Український біохімічний журнал. 2004, 76(3): 5-17.
73. Gao, J.; Wymore, R.S.; Wang, Y.; Gaudette, G.R.; Krukenkamp, I.B.; Cohen, I.S.; Mathias, R.T. Isoform-specific stimulation of cardiac  $\text{Na}/\text{K}$  pumps by nanomolar concentrations of glycosides. *J. Gen. Physiol.* 2002, 119, 297–312. [CrossRef]
74. Tian, J.; Cai, T.; Yuan, Z.; Wang, H.; Liu, L.; Haas, M.; Maksimova, E.; Huang, X.Y.; Xie, Z.J. Binding of Src to  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  -ATPase forms a functional signaling complex. *Mol. Biol. Cell* 2006, 17, 317–326. [CrossRef]
75. 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, 17250–17259.
76. Liang, M.; Tian, J.; Liu, L.; Pierre, S.; Liu, J.; Shapiro, J.; Xie, Z.J. Identification of a pool of non-pumping  $\text{Na}/\text{K}$ -ATPase. *J. Biol. Chem.* 2007, 282, 10585–10593.
77. Haas, M.; Askari, A.; Xie, Z. Involvement of Src and epidermal growth factor receptor in the signal-transducing function of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  -ATPase. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 27832–27837.
78. Haas, M.; Wang, H.; Tian, J.; Xie, Z. Src-mediated inter-receptor cross-talk between the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  -ATPase and the epidermal growth factor receptor relays the signal from ouabain to mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 18694–18702.
79. Aydemir-Koksoy, A.; Abramowitz, J.; Allen, J.C. Ouabain-induced signaling and vascular smooth muscle cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 2021, 276, 46605–46611.
80. Chen, L.; Jiang, P.; Li, J.; Xie, Z.; Xu, Y.; Qu, W.; Feng, F.; Liu, W. Periplocin promotes wound healing through the activation of Src/ERK and PI3K/Akt pathways mediated by  $\text{Na}/\text{K}$ -ATPase. *Phytomedicine* 2019, 57, 72–83.

81. Nguyen, A.N.T.; Jansson, K.; Sánchez, G.; Sharma, M.; Reif, G.A.; Blanco, G. Ouabain activates the Na-K-ATPase signalosome to induce autosomal dominant polycystic kidney disease cell proliferation. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2011, 301, F897–F906.
82. Tverskoi, A.M.; Sidorenko, S.V.; Klimanova, E.A.; Akimova, O.A.; Smolyaninova, L.V.; Lopina, O.D.; Orlov, S.N. Effects of ouabain on proliferation of human endothelial cells correlate with Na,K-ATPase activity and intracellular ratio of Na and K. *Biochemistry* 2016, 81, 876–883.
83. Banerjee, G.M.; Cui, X.; Li, Z.; Yu, H.; Cai, L.; Jia, X.; He, D.; Wang, C.; Gao, T.; Xie, Z. Na/K-ATPase Y260 phosphorylation– mediated Src regulation in control of aerobic glycolysis and tumor. *Sci. Rep.* 2018, 8, 12322.
84. Prassas, I.; Karagiannis, G.S.; Batruch, I.; Dimitromanolakis, A.; Datti, A.; Diamandis, E.P. Digitoxin-induced cytotoxicity in cancer cells is mediated through distinct kinase and interferon signaling networks. *Mol. Cancer Ther.* 2011, 10, 2083–2093.
85. Khajah, M.A.; Mathew, P.M.; Luqmani, Y.A. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase activity promotes invasion of endocrine resistant breast cancer cells. *PLoS ONE* 2018, 13, e0193779.
86. Manunta, P.; Messaggio, E.; Ballabeni, C.; Sciarrone, M.T.; Lanzani, C.; Ferrandi, M.; Hamlyn, J.M.; Cusi, D.; Galletti, F.; Bianchi, G. Salt sensitivity study group of the Italian society of hypertension. Plasma ouabain-like factor during acute and chronic changes in sodium balance in essential hypertension. *Hypertension* 2001, 38, 198–203.
87. Павлов К.В., Соколов В.С. Электрогенный транспорт ионов Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> - АТФазой. *Биологические мембраны.* 1999, 16(6): 604-637.
88. Лопина О.Д. Взаимодействие каталитической субъединицы Na,K-АТФазы с клеточными белками и другими эндогенными регуляторами. *Биохимия.* 2001, 66(вып. 6): 1389-1400.

89. Orlov S.N., Pchejetski D., Taurin S. et al. Apoptosis in serum-deprived vascular smooth muscle cells: evidence for cell volume-independent mechanism. *Apoptosis*. 2004, 9(1): 55-66.
90. Blaustein M.P. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores and cell responsiveness. *American Journal of Physiology*. 1993, 264(6 (Pt 1)): C1367-C1387.
91. Гютше Ч.Д. Каликсарены. ХИМИЯ КОМПЛЕКСОВ «ГОСТЬ-ХОЗЯИН». / Под ред. Фегтле Ф. и Вебера В. М.: Мир, 1988, 445с.
92. Gutsche C.D., Alam I. Calixarenes 23. Complexation and Catalytic Properties of Water Soluble Calixarenes. *Tetrahedron*. 1988, 44: 4689 – 4694.
93. Luo Z., Zhao Y., Maa C. et al. Synthesis and anti-integrase evaluation of novel calix[4]arene derivatives containing the triazolyl 1,3-diketo moiety. *Chinese Chemical Letters*. 2014, 25(5): 737–740.
94. Bohmer V. Calixarenes, Macrocycles with (Almost) Unlimited Possibilities. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1995, 34: 713-745.
95. Neri P., Sessler J.L., Wang M-X. *Calixarenes and Beyond*. Springer International Publishing Switzerland. 2016, 1062 p.
96. Gutsche C.D. Calixarenes: Synthesis and Historical Perspectives. *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry*. New York. 2004, 1: 153 – 160.
97. Gutsche C.D., Dhawan B., Levine J.A. et al. Conformational Isomers of The Ethers and Esters of Calix[4]arenes. *Tetrahedron*. 1983, 39(3): 409 – 426.
98. Danylyuk O. Solid-state complexes of water-soluble calixarenes with biorelevant molecules: Dissertation within International Ph.D Studies. Warsaw, 2007: 160p.
99. Cherenok S., Dutasta J.P., Kalchenko V. Phosphorus-containing chiral macrocycles. *Current Org. Chem.* 2006, 10: 2307–2331.
100. Tairov M., Kalchenko V. Chiral Calixarenes. *Ukrainian Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2004, 29(2): 3-19.
101. Cherenok S., Kalchenko V. Phosphorus-containing calixarenes. *Topics Heterocyclic Chemistry*. 2009, 20: 229-273.

102. Rodik R.V., Boyko V.I., Kalchenko V.I. Calixarenes in bio-medical researches. *Curr. Med. Chem.* 2009,16(13):1630 – 1655.
103. Данилович Г.В., Данилович Ю.В., Коломієць О.В. та ін. Зміни поляризації плазматичної та внутрішньої мітохондріальної мембран клітин міометрія за дії каліксаренів – інгібіторів Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТРази плазматичної мембрани. *Український біохімічний журнал.* 2012, 84(6): 37-48.
104. Komisarenko S.V., Kosterin S.O., Lugovskoy E.V., Kalchenko V.I. Calixarene methylene bisphosphonic acids as promising effectors of biochemical processes. *Український біохімічний журнал.* 2013, 85(6): 106-128.
105. Лабинцева Р.Д., Бевза О.В., Бевза А.А. та ін. Захисний вплив тіакалікс[4]арентетрасульфонату на інгібування АТФ-гідролазної активності субфрагмента А-1 міозину міометрія катіонами важких металів. *Український біохімічний журнал.* 2014, 86(6): 154-166.
106. Park H.S., Lin Q., Hamilton A.D. Modulation of protein-protein interactions by synthetic receptors: design of molecules that disrupt serine protease-protenaceous inhibitors interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002, 99(8): 5105-5109.
107. Stoikova E.E., Evtugyn G.A., Belyakova S.V. et al. 1,3-Disubstituted p-tert-butylcalix[4]arenes as cholinesterase inhibitors. *J. Inclusion Phenom. Macrocycl. Chem.* 2001, 39(3-4): 339-346.
108. Cherenok S., Vovk A., Muravyova I. et al. Calix[4]arene  $\alpha$ -aminophosphonic acids: asymmetric synthesis and enantioselective inhibition of an alkaline phosphatases. *Org. Lett.* 2006, 8(4): 549-552.
109. Mecca T., Consoli G.M.L., Geraci C., Cunsolo F. Designed calix[8]arene-based ligands for selective tryptase surface recognition. *Bioorg. Med. Chem.* 2004, 12(19): 5057-5062.

110. Francese S., Cozzolino A., Caputo I. et al. Transglutaminase surface recognition by peptidocalix[4]arene diversomers. *Tetrahedron Lett.* 2005, 46(10): 1611-1615.
111. Trush V.V, Cherenok S.O., Tanchuk V.Yu. et al. Calix[4]arene methylenebisphosphonic acids as inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2013, 23(20): 5619-5623.
112. Park H.S., Lin Q., Hamilton A.D. J. Protein Surface Recognition by Synthetic Receptors: A Route to Novel Submicromolar Inhibitors for  $\alpha$ -Chymotrypsin. *Am. Chem. Soc.* 1999, 121: 8-13.
113. Aime S., Barge A., Botta M. et al. A Calix[4]arene GdIII Complex Endowed with High Stability, Relaxivity, and Binding Affinity to Serum Albumin. *Angew Chem. Int. Ed.* 2001, 40: 4737-4739.
114. Караханов Э.А., Максимов А.Л., Рунова Е.А. Создание супрамолекулярных металлокомплексных каталитических систем для органического и нефтехимического синтеза. *Успехи химии.* 2005, 74(1): 104-119.
115. Jain M.K., Jahagirdar D.V. Effect of antituberculous calixarenes on phospholipase A2 susceptibility and on fusion of phospholipid bilayers. *Biochem. J.* 1985, 227(3): 789-794.
116. Jin T., Kinjo M., Koyama T. et al. Selective Na<sup>+</sup> Transport through Phospholipid Bilayer Membrane by a Synthetic Calix[4]arene Carrier. *Langmuir.* 1996, 12(11): 2684-2689.
117. De Mendoza J., Cuevas F., Prados P. et al. Synthetic Cation-Transporting Calix[4]arene Derivative Active in Phospholipid Bilayers. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998, 37: 1534-1537.
118. Balasahe S., Nimsea T. Kim. Biological applications of functionalized calixarenes. *Chem. Soc. Rev.* 2013, 42: 366-386 .
119. De Fatima A., Fernandes S. A., Sabino A. A. Calixarenes as new platforms for drug design. *Curr. Drug Disc. Tech.* 2009, 6: 151-170.

120. Hoskins C., Curtis A. Simple. Calix[n]arenes and Calix[4]resorcinarenes as Drug Solubilizing Agents. *Journal of Nanomedicine Research*. 2015, 2(Issue 3): 1-8.
121. Родік Р.В. Антимікробна та противірусна активність каліксаренів. *Журнал органічної та фармацевтичної хімії*. 2015, 13(1): 67-78.
122. Viola S., Consoli G.M., Merlo S. et al. Inhibition of rat glioma cell migration and proliferation by a calix[8]arene scaffold exposing multiple GlcNAc and ureido functionalities. *J. Neurochem*. 2008, 107(4): 1047-1055.
123. Zhou H., Wang D.A., Baldini L. et al. Structure-activity studies on a library of potent calix[4]arene-based PDGF antagonists that inhibit PDGF-stimulated PDGFR tyrosine phosphorylation. *Org. Biomol. Chem*. 2006, 4(12): 2376-2386.
124. Sun J., Blaskovich M.A., Jain R.K. et al. Blocking angiogenesis and tumorigenesis with GFA-116, a synthetic molecule that inhibits binding of vascular endothelial growth factor to its receptor. *Cancer Res*. 2004, 64(10): 586-592.
125. Krenek K., Kuldová M., Hulíková K. et al. N-Acetyl-d-glucosamine substituted calix[4]arenes as stimulators of NK cell-mediated antitumor immune response. *Carbohydr. Res*. 2007, 342(12-13): 1781-1792.
126. Geraci C., Consoli G.M., Galante E. et al. Calix[4]arene decorated with four Tn antigen glycomimetic units and P3CS immunoadjuvant: synthesis, characterization, and anticancer immunological evaluation. *Bioconjug. Chem*. 2008, 19(3): 751-758. *Chem*. 2008, 19(3): 751-758.
127. Consoli G.M.L., Galante E., Daquino C. et al. Hydroxycinnamic acid clustered by a calixareneplatform: radical scavenging and antioxidant activity. *Tetrahedron Lett*. 2006, 47(37): 6611-6614.
128. Gutsche C.D. Calixarenes. In *Host Guest Complex Chemistry Macrocycles; Synthesis, Structures, Applications* / Eds be Weber E.,Vögtle F. –Springer: Tokyo. 1985, 421 p.

129. Xue Y., Guan Y., Zheng A., Xiao H. Amphoteric calix[8]arene-based complex for pH-triggered drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013, 101: 55- 60.
130. Perret F., Mazzorana M., Shahgaldian P. et al. First step in the study of the cellular toxicity of the calixarene. *ISSC XI, Fukuoka*. 2000, PB-26: 387.
131. Shahgaldian P., Da Silva E., Coleman A.W. A first approach to the study of calixarene solid lipid nanoparticle (SLN) toxicity. *J. Incl. Phenom*. 2003, 46: 175 – 177.
132. Memisoglu E., Bochot A., Oezalp M. et al. Direct formation of nanospheres from amphiphilic-cyclodextrin inclusion complexes. *Pharm. Res*. 2003, 20: 117-125.
133. Paclet M-H., Rousseau C.F., Yannick C. et al. An Absence of Non-specific Immune Response towards para-Sulphonato-calix[n]arenes. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 2006, 55(3-4): 353-357.
134. Lalor R., DiGesso J.L., Mueller A. et al. Efficient gene transfection with functionalized multicalixarenes. *Chem. Commun*. 2007, 4907 – 4909.
135. Bagnacani V., Sansone F., Donofrio G. et al. Macrocyclic nonviral vectors: High cell transfection efficiency and low toxicity in a lower rim guanidinium calix[4]arene. *Org. Lett*. 2008, 10: 3953 - 3956.
136. Grote Gansey M.H., de Haan A.S., Bos E.S. et al. Conjugation, immunoreactivity, and immunogenicity of calix[4]arenes; model study to potential calix[4]arene-based  $\text{Ac}^3+$  chelators. *Bioconjug. Chem*. 1999, 10(4): 613-623.
137. Khadra K., Mizyed S., Marji D. et al. Synthesis of novel p-tert-butylcalix[4]arene Schiff bases and their complexes with C<sub>60</sub>, potential HIV-Protease inhibitors. *Spectrochimica Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc*. 2015, 136: 1869-1874.
138. Lamartine R., Tsukada M., Wilson D., Shirata A. Antimicrobial activity of calix[n]arene. *C. R. Chimie*. 2002, 5(3): 163-169.

139. Mourer M., Psychogios N., Laumond G. et al. Synthesis and anti-HIV evaluation of water-soluble calixarene-based bithiazolyl podands. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2010, 18(1): 36-45.
140. Tsou L.K., Dutschman G.E., Gullen E.A. et al. Discovery of a synthetic dual inhibitor of HIV and HCV infection based on a tetrabutoxy-calix[4]arene scaffold. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2010, 20(7): 2137-2139.
141. Arosio D., Fontanella M., Baldini L. et al. A synthetic divalent cholera toxin glycolix[4]arene ligand having higher affinity than natural GM1 oligosaccharide. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127(11): 3660-3661.
142. Coleman A.W., Perret F., Cecillon S. et al. Enhanced detection of the pathogenic prion protein by its supramolecular association with para-sulfonato-calix[n]arene derivatives. *New J. Chem.* 2007, 31: 711-717.
143. Coleman A.W., Perret F., Moussa A. et al. Calix[n]arenes as Protein Sensors. *Top. Curr. Chem.* 2007, 277: 31-88.
144. Carden D.E., Diamond D., Miller A.J. An improved Na<sup>+</sup>-selective microelectrode for intracellular measurements in plant cells. *J. Exp. Bot.* 2001, 52(359): 1353-1359.
145. Telting-Diaz M., Regan F., Diamond D., Smyth M.R. Comparison of a calixarene-based ion-selective electrode with two automated analyzers for the clinical determination of sodium in blood plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1990, 8(8-12): 695-700.
146. Saijo R., Murakami H., Tsunekawa S. et al. The effects of O-substituents of hexahomotrioxacalix[3]arene on potentiometric discrimination between dopamine and biological organic/inorganic cations. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 2007, 55(3): 417-421.
147. Saijo R., Tsunekawa S., Murakami H. et al. Dopamine-selective potentiometric responses by new ditopic sensory elements based on a hexahomotrioxacalix[3]arene. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007, 17(3): 767-771.
148. Yang W., Otto D.P., Liebenberg W., de Villiers M.M. Effect of para-sulfonato-calix[n]arenes on the solubility, chemical stability, and

- bioavailability of a water insoluble drug nifedipine. *Curr. Drug. Discov. Technol.* 2008, 5(2): 129-139.
149. Rodik R., Boiko V., Danylyuk O. et al. Calix[4]arenesulfonylamidines. Synthesis, structure and influence on  $Mg^{2+}$ ,ATP-dependent calcium pumps. *Tetrahedron Lett.* 2005, 46(43): 7459-7462.
150. Budka J., Lhotak P., Michlova V., Stibor I. Urea derivatives of calix[4]arene 1,3-alternate: An anion receptor with profound negative allosteric effect. *Tetrahedron Lett.* 2001, 42: 1583-1586.
151. Talanova G.G., Hwang H.S., Talanov V.S. et al. Calixarenes with a novel proton ionizable group: synthesis and metal ion separation. *Chem. Commun.* 1998, 9: 419-420.
152. Geller C., Fontanay S., Mourer M. et al. Antiseptic properties of two calix[4]arenes derivatives on the human coronavirus 229E. *Antiviral Res.* 2010, 88(3): 343-346.
153. Motornaya A.E., Alimbarova L.M., Shokova E.A., Kovalev V.V. Synthesis and antiherpetic activity of N-(3-amino-1-adamantyl)calix[4]arene. *Pharm. Chem. J.* 2006, 40(2): 68-72.
154. Fazel Nasuhi Pur. Calixdrugs: calixarene-based clusters of established therapeutic drug agents. *Mol Divers.* 2016 Aug;20(3):781-7.
155. Veklich T.O., Kosterin S.O. Comparative study of properties of  $Na^+,K^+$ -ATPase and  $Mg^{2+}$ -ATPase of the myometrium plasma membrane. *Ukr. Biochem. J.* 2005; 77(2): 66-75.
156. 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.
157. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72(1-2): 248-282.
158. 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.
159. Valente R.C., Capella L.S., Monteiro R.Q. et al. // *FASEB J.* – 2003. – 17, N 12. – P. 1700-1702.
160. Wang H., Haas M., Liang M. et al. // *J. Biol/ Chem.* – 2004. – 279, N 17. – P. 17250-17259.
161. 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.
162. 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.
163. 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.
164. S. Kosterin, O. Tsybalyuk, O. Holden Multiparameter analysis of mechanokinetics of the contractile response of smooth muscles. *Series on Biomechanics, Vol.35 No.1 (2021),*14-30.
165. Burdyga Th.V., Kosterin S.A. Kinetic analysis of smooth muscle relaxation. *Gen Physiol Biophys*, 1991; 10(6): 589–598.
166. N. Iki, F. Narumi, T. Fujimoto, N. Morohashi, and S. Miyano: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2745 (1998). J. Lang, H. Dvorčakova, I. Bartosčova, P. Lhotak, I. Stibor, and R. Hrabal: *Tetrahedron Lett.* 40, 373 (1999).
167. Kasyan O., Healey E.R., Drapailo A., Zaworotko M., Cecillon S., Coleman A.W., Kalchenko V. Synthesis, structure and selective upper rim functionalization of long chained alkoxythiacalix[4]arenes.J. *Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry.* – 2007. – V. 58, Issue 1-2. – P. 127-132.
168. Костерін С.О., Бабіч Л.Г., Шликов С.Г., Данилович Ю.В., Векліч Т.О., Мазур Ю.Ю. Біохімічні властивості та регуляція  $\text{Ca}^{2+}$ -

- транспортувальних систем мембранних структур гладеньком'язових клітин. Монографія. Київ: Наукова Думка. 2016, 210 с.
169. Noblel D., A. Herchuelz. Role of Na/Ca exchange and the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in cell function. *EMBO Rep.* 2007; 8(3): 228-232.
170. Манько В.В. Методологічні підходи до дослідження  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обміну в екзокринних секреторних клітинах. Укр. біохім. журн., 2006, т. 78, № 1. С. 43-62.
171. Clausen T.  $\text{Na}^{+}$ - $\text{K}^{+}$  Pump Regulation and Skeletal Muscle Contractility // *Physiological Reviews* 2003 Vol. 83, No. 4, 1269 –1324.
172. Floyd RV, Mobasher A, Wray S. Gestation changes sodium pump isoform expression, leading to changes in ouabain sensitivity, contractility, and intracellular calcium in rat uterus. *Physiol Rep.* 2017 Dec;5(23):e13527.
173. Blaustein, M. P. , Juhaszova M., Golovina V. A., Church P. J., and Stanley E. F.. 2002. Na/Ca exchanger and PMCA localization in neurons and astrocytes: functional implications. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 976:356–366.
174. Golovina, V. A. , Song H., James P. F., Lingrel J. B., and Blaustein M. P.. 2003.  $\text{Na}^{+}$  pump alpha 2-subunit expression modulates  $\text{Ca}^{2+}$  signaling. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 284:C475–C486.
175. Floyd, R. , Mobasher A., Martin-Vasallo P., and Wray S. 2003. Na, K-ATPase isoforms in pregnant and nonpregnant rat uterus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 986:614–616.
176. Цимбалюк О.В. Порівняльний аналіз механокінетики скоротливої активності гладеньких м'язів міометрія шурів за дії каліксарену С-99 та убаїну. *Studia Biologica.* 2014; 8 (1): 63-72.
177. Matchkov VV, Moeller-Nielsen N, Dam VS, Nourian Z, Briggs Boedtkjer DM, Aalkjaer C. The  $\alpha 2$  isoform of the Na,K-pump is important for intercellular communication, agonist-induced contraction, and EDHF-like response in rat mesenteric arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012 Jul;303(1):H36-46.

178. Hangaard L, Bouzinova EV, Staehr C, Dam VS, Kim S, Xie Z, Aalkjaer C, Matchkov VV. Na-K-ATPase regulates intercellular communication in the vascular wall via cSrc kinase-dependent connexin43 phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2017 Apr 1;312(4):C385-C397.
179. Zhang L, Aalkjaer C, Matchkov VV. The Na,K-ATPase-Dependent Src Kinase Signaling Changes with Mesenteric Artery Diameter. *Int J Mol Sci*. 2018 Aug 23;19(9):2489.
180. Novakovic R, Ilic B, Beleslin-Cokic B, Radunovic N, Heinle H, Scepanovic R, Gojkovic-Bukarica L. The effect of resveratrol on contractility of non-pregnant rat uterus: the contribution of K(+) channels. *J Physiol Pharmacol*. 2013 Dec;64(6):795-805.
181. Piedras-Rentería E, Stefani E, Toro L. Potassium currents in freshly dispersed myometrial cells. *Am J Physiol*. 1991 Aug;261(2 Pt 1):C278-84.
182. Shmygol A, Noble K, Wray S. Depletion of membrane cholesterol eliminates the Ca<sup>2+</sup>-activated component of outward potassium current and decreases membrane capacitance in rat uterine myocytes. *J Physiol*. 2007 Jun 1;581(Pt 2):445-56.