

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
Інститут високих технологій

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики
доц. Олексій Юрійович Нипорко
Протокол № _____ засідання кафедри
від “ _____ ” _____ 2021 р.

ВПЛИВ КАЛІКСАРЕНФОСФОНОВИХ КИСЛОТ НА Na^+ , K^+ -АТРазну
АКТИВНІСТЬ В ПЛАЗМАТИЧНІЙ МЕМБРАНІ
ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВИХ КЛІТИН

Дипломна робота бакалавра
студентки 4 курсу денної форми навчання
спеціальності 091 «Біологія»

Кардаш Олександри Олександрівни

Науковий керівник від кафедри:
професор **Цимбалюк О. В.**

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

Оцінка захисту роботи

Київ – 2021 р.

АНОТАЦІЯ

Дипломна робота бакалавра: 63 сторінки, 19 рисунків, 1 таблиця, 121 джерел.

Систематизована наукова література та загальні відомості відносно активності ферменту плазматичної мембрани Na^+, K^+ -АТРази та нових синтетичних біологічно активних сполук – каліксаренів. Проведене дослідження щодо впливу обраних калікс[4]аренів (С-97, С-99, С-107) на Na^+, K^+ -АТРазну систему плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин. З'ясовані основні закономірності дії каліксаренів на активність натрієвої помпи. Експериментально встановлено та доведено, що досліджувані калікс[4]арени С-97, С-99 та С-107 є ефективними селективними інгібіторами Na^+, K^+ -АТРази на основі порівняння дії калікс[4]аренів та відомого інгібітора досліджуваної ферментної системи – убаїна. Окремими дослідженнями калікс[4]арену С-107 був показаний вплив даної сполуки на спорідненість Na^+, K^+ -АТРази до убаїну та АТР; здатність калікс[4]арену проникати в гладеньком'язові клітини, а також вивчений вплив окремих структурних компонентів калікс[4]арену С-107 на прояв його інгібувальної дії.

Ключові слова: Na^+, K^+ -АТРаза, калікс[4]арени, плазматична мембрана, міометрій, інгібування, конфокальна мікроскопія.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ГМ – гладенькі м'язи;

ГМК – гладеньком'язова клітина;

ДМСО – диметилсульфоксид;

ЕГТА – етиленглікольдіамінтетраоцтова кислота;

ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота;

ПМ – плазматична мембрана;

ADP – аденозиндифосфат;

ATP – аденозинтрифосфат;

СТР – цитидинтрифосфат;

GTP – гуанозинтрифосфат;

P_i – фосфат неорганічний;

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;

Hoechst – 2'-(4-етоксифеніл)-6-(4-метил-1-піперазиніл)-1H,3'H-2,5'-бібензімідазол;

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

DiOC₆(3) – 3,3'-дігексилוקсакарбоцианінйодит;

Tris – трис(гідроксиметил)амінометан;

I_{0,5} – коефіцієнт інгібування (концентрація інгібітору, при якій рівень транспортувальної чи ензиматичної активності становить 50 % від контрольної величини);

K_a – уявна константа активації;

K_i – уявна константа інгібування;

K_m – уявна константа Міхаеліса;

V_{max} – максимальна початкова швидкість реакції гідролізу ATP;

n_H – коефіцієнт Хілла;

n – кількість дослідів.

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. Огляд літератури	
1.1. Структурна організація, властивості та регуляція активності Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани.....	7
1.2. Каліксарени та їхня біологічна активність	
1.2.1. Структура, синтез та фізико-хімічні властивості каліксареннів.....	12
1.2.2. Прояви біологічної активності каліксаренів.....	14
1.2.3. Токсичність та імуногенність каліксаренів.....	18
1.2.4. Перспективи використання каліксаренів.....	19
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень	
2.1. Тварини та тканини, які було використано в дослідженнях.....	22
2.2. Виділення міоцитів матки з матки щурів.....	22
2.3. Виділення фракції плазматичних мембран клітин міометрія.....	25
2.4. Флуорисцентні методи.....	27
2.5. Визначення АТР-гідролазних активностей у фракції плазматичних мембран клітин міометрія та швидкості неензиматичного гідролізу АТР.....	28
2.6. Статистична обробка результатів.....	31
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та їх обговорення	
3.1. Порівняння ефективності інгібувальної дії калікс[4]аренів С-97, С-99, С-107 та убаїну на активність Na^+, K^+ -АТРази.....	32
3.2. Вплив структурних компонентів калікс[4]арену С-107 на активність Na^+, K^+ -АТРази.....	38
3.3. Особливості дії калікс[4]арену С-107 на активність Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани гладеньком`язових клітин.....	42
3.4. Дослідження проникнення калікс[4]арену С-107 у гладеньком`язові клітини матки.....	47
ВИСНОВКИ	51
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	52

ВСТУП

Na^+, K^+ -АТРаза – електроензим, що має фундаментальне значення у функціонуванні міометрія, підтримуючи у цитоплазмі високі концентрації K^+ та низькі концентрації Na^+ і тим самим забезпечуючи збудливість клітини. В деякому розумінні можна навіть стверджувати, що транспортна та каталітична активність цього ферменту є характеристикою енергетичного потенціалу клітини, оскільки його активність є дуже чутливою до її енергетичного стану. Na^+, K^+ -АТРаза присутня у плазматичній мембрані всіх гладеньком'язових клітин і є мішенню для дії як фізіологічних регуляторів, так і фармакологічних засобів.

На один з етапів пошуку таких засобів і націлена дана робота, оскільки загальновідомо, що порушення контрактильної активності міометрія є основою виникнення різноманітних патологій, пов'язаних, зокрема, з виношуванням плоду та пологамі. Отже, пошук селективних високоафінних оборотних ефекторів, що здатні модифікувати активність окремих йон-транспортуючих систем, має доволі багато перспектив у практичному сенсі, зокрема для подальшого вивчення біохімічних механізмів електро- та фармакомеханічного спряження у гладеньких м'язах та створення нових фармакологічних препаратів, що могли б запобігати та протидіяти порушенням функціонування міометрія.

Останнім часом в якості перспективних молекулярних «платформ» для дизайну нових фізіологічно активних сполук дедалі частіше розглядають синтетичні макроциклічні олігомери фенолів – каліксарени, що завдяки своїй здатності утворювати комплекси з біологічно важливими молекулами та йонами можуть впливати на перебіг біохімічних процесів. На сьогодні існують численні експериментальні докази того, що каліксаренам притаманні бактерицидна, антивірусна, антитромботична, протипухлинна активність та інші біологічні властивості [1, 2]. Однак потенціал каліксаренів як біологічно активних сполук наразі розкритий далеко не повністю: в літературі майже відсутні уявлення щодо цих сполук в якості потенційних ефекторів

мембранозв'язаних іон-транспортуючих АТРазних систем, в той час як каліксарени завдяки своїм властивостям дедалі більше використовуються при створенні супрамолекулярних каталізаторів, які можуть імітувати дію ферментів. Зважаючи на вищевикладене, дослідження закономірностей впливу каліксаренів на АТР-гідролазні ензиматичні системи, зокрема на Na^+, K^+ -АТразу, є актуальним та перспективним як з фундаментальної, так і з прикладної точки зору.

Мета роботи: вивчити вплив калікс[4]аренів на Na^+, K^+ -АТРазну систему плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин.

Завдання:

1. З'ясувати закономірності дії каліксаренів на активність Na^+, K^+ -АТрази.
2. Порівняти ефективність інгібувальної дії калікс[4]аренів С-97, С-99, С-107 та уабаїну на активність Na^+, K^+ -АТрази.
3. Вивчити вплив структурних компонентів калікс[4]арену С-107 на активність Na^+, K^+ -АТрази.
4. Дослідити проникнення калікс[4]арену С-107 у гладеньком'язові клітини матки.

Об'єкти дослідження – фракція ПМ гладеньком'язових клітин матки свині та щура, реакції ензиматичного (Na^+, K^+ - та Mg^{2+} -залежного) гідролізу АТР.

Предмет дослідження – дія каліксаренів на Na^+, K^+ -АТРазну активність ПМ клітин міометрія.

Для досягнення поставленої мети використовувались методи препаративної біохімії, біохімічної мембранології, ензимології, спектрофотометрії, конфокальної мікроскопії, хімічної та біохімічної кінетики, а також статистичного аналізу.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Структурна організація, властивості та регуляція активності Na^+ , K^+ -АТРази плазматичної мембрани.

Na^+ , K^+ -АТРаза ПМ (натрієва помпа, КФ 3.6.3.9) – електрогенна Ca^{2+} -незалежна Mg^{2+} , Na^+ , K^+ -АТР-залежна транспортна система ПМ тканин тварин, що вибірково виводить із клітини іони Na і акумулює у ній іони K , використовуючи для цієї роботи енергію АТР (стехіометрія: 1 АТР : 3 іони Na : 2 іони K). Натрієва помпа складається із двох нековалентно зв'язаних субодиниць α та β , а в деяких тканинах є ще і регуляторна γ -субодиниця [3, 4, 5, 6, 7]. Загальна молекулярна маса помпи близько 280 кДа. У процесі роботи АТРаза здійснює певні конформаційні рухи, переходячи зі стану E_1 в стан E_2 , у результаті чого відбувається трансмембранне перенесення іонів і створення активної компоненти мембранного потенціалу [8].

α -субодиниця має молекулярну масу 100-113 кДа та являє собою ліпопротеїд, що містить каталітичний центр, центри зв'язування Na^+ та K^+ , інгібіторів. Виділяють три функціональні домени в молекулі α -субодиниці: А-домен (активаційний), Р-домен (фосфориляційний) та N-домен (нуклеотидзв'язуючий або нуклеотидний). Аналіз профілю гідрофобності показує, що поліпептидний ланцюг α -субодиниці Na^+ , K^+ -АТРази містить від 6 до 10 трансмембранних фрагментів (4 нм кожен), які складаються з 17-25 амінокислот та утворюють конформацію α -спіраль [9]. У N-кінцевій частині α -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 [10]. N-кінцева частина являє собою гнучку, збагачену залишками лізину, неспіралізовану ділянку, що бере участь у здійсненні конформаційних переходів та регуляції чутливості ферменту до катіонів (рис. 1.1).

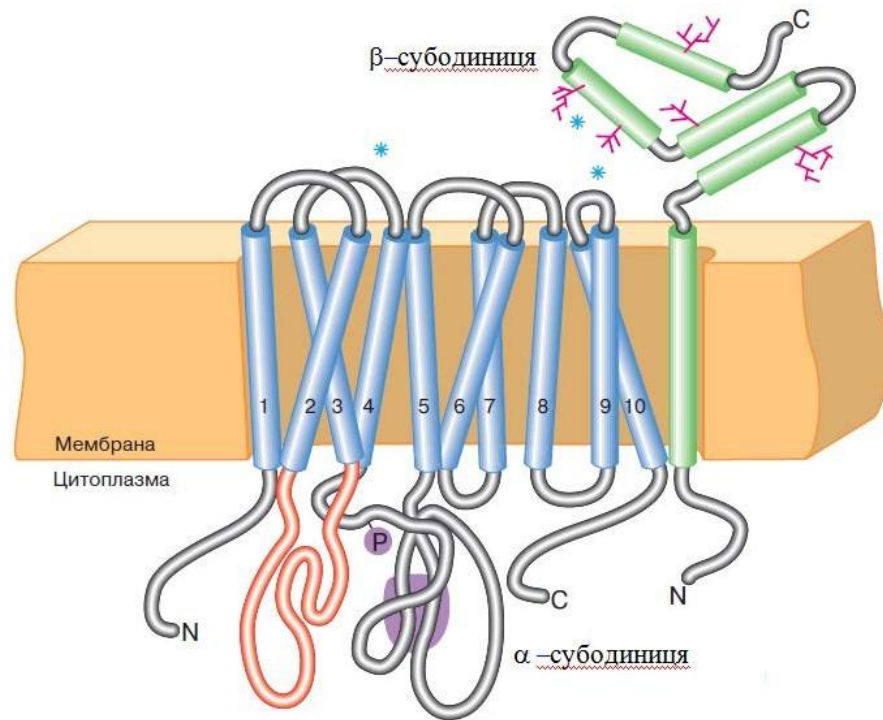


Рис. 1.1. Схема розташування Na^+, K^+ -АТРази у клітинній мембрані [5].

β -Субодиниця – це лектин, або мембранний глікопротеїн, що має молекулярну масу 40-60 кДа (без вуглеводного ланцюга) та забезпечує правильну орієнтацію Na^+, K^+ -АТРази в мембрані, супроводжуючи її транспорт з ендоплазматичного ретикулума до ПМ [4, 5, 7, 11]. Вона перетинає мембрану 1 раз і її N-кінцевий домен розташований у цитоплазмі. На зовнішній частині β -субодиниці утворюються три дисульфідні зв'язки та знаходяться три ділянки N-глікозилування, до яких прикріплені розгалужені вуглеводні фрагменти [5, 12]. β -субодиниця модифікує каталітичні характеристики Na^+, K^+ -АТРазного комплексу (забезпечуючим модуляцію спорідненості ферменту до іонів K^+ та Na^+), відповідає за його антигенні властивості, бере участь в нейрогліальній адгезії, важлива для забезпечення гідролізу АТР, іонного транспорту та зв'язування інгібіторів, таких як убаїн. Зона контакту субодиниць, що локалізована поряд із 7- та 8-им трансмембранними сегментами, є необхідною для здійснення транспорту іонів [6]. Під час білкового синтезу обидві субодиниці вбудовуються в мембрану одночасно.

Ідентифікована також третя γ -субодиниця (з найменшою молекулярною масою в 7-11 кДа). Являє собою невеликий протеїн, який відносять до групи протеїнів FXYD, та регулює активність натрієвої помпи у тканиноспецифічний спосіб, знижуючи або підвищуючи її [13, 14, 15, 16].

Na^+, K^+ -АТРаза відноситься до АТРаза Р-типу (P_2 -підтипу АТРаза) – сімейства ферментів, які фосфорилуються протягом транспортного процесу γ -фосфатною групою АТР по залишку аспарагінової кислоти [12, 15, 17]. Na^+, K^+ -АТРаза гідролізує АТР в широкому діапазоні концентрацій: від 1-2 мкМ до 2-3 мМ [5]. Є дані, що Na^+, K^+ -АТРаза високо специфічна для АТР і використання СТР забезпечує тільки 15 % активності [17, 18]. Проте інші автори вказують на те, що Na^+, K^+ -АТРаза не має абсолютної специфічності по відношенню до субстрату: крім АТР, вона гідролізує й інші нуклеотиди – СТР, ІТР, ГТР, УТР. Але тільки АТР та СТР, в порівнянні з іншими нуклеотидами, збільшують спорідненість Na^+, K^+ -АТРази до іонів Na [5]. Як типова АТРаза Р-типу, Na^+, K^+ -АТРаза здатна перебувати у двох основних конформаціях, які мають високу спорідненість до іонів натрію (E_1) або калію (E_2). Вихідною конформацією можна вважати E_1 , оскільки близько 70 % цих молекул у цій конформації в середовищі, де відсутній і натрій, і калій [19].

Гідроліз АТР цією ферментною системою відбувається у відповідності з наступним рівнянням:



де $\text{Na}^+_{\text{в}}$ і $2\text{K}^+_{\text{зв}}$ – являють собою внутрішньоклітинні іони, а $\text{Na}^+_{\text{зв}} + 2\text{K}^+_{\text{в}}$ – іони, що знаходяться із зовнішнього боку клітини.

Ще в перших експериментах було встановлено, що в присутності натрію Na^+, K^+ -АТРаза легко взаємодіє з АТР, в результаті чого термінальний фосфат АТР переноситься на карбоксильну групу аспарагінової кислоти поліпептидного ланцюга, утворюючи фосфорильований фермент (E-P), де E позначає молекулу білка-ферменту, а P – фосфорний залишок. Було показано, що гідроліз зв'язку з цим (дефосфорилування ферменту) активується калієм, і

перша схема гідролізу АТР, що каталізується Na^+, K^+ -АТРазою (P_i - неорганічний фосфат):



Загалом, основні стадії реакційного циклу Na^+, K^+ -АТРази можна описати наступним чином [20].

1. Коли фермент знаходиться у стані E_1 він взаємодіє з іонами Na та АТР і в результаті утворюється $\text{E}_1\text{-P}$.
2. Фосфорильований білок переходить у стан, коли іони Na не доступні для обміну (оклюдовані).
3. Фермент переходить із конформації E_1 в конформацію E_2 , внаслідок чого іони Na переносяться через мембрану.
4. Фермент здійснює перенесення іонів K через мембрану.
5. Комплекс E_2P стає більш гідрофільним, відбувається гідроліз E-P і вивільняється неорганічний фосфат у внутрішньоклітинне середовище.
6. Після цього іони K також дисоціюють від центру зв'язування, вивільнюючись при цьому в цитоплазму. Їх місце займає натрій. Остання стадія циклу одночасно підготовляє фермент для початку нового циклу [5, 14, 20].

На внутрішній поверхні плазматичної мембрани відбувається активація ферменту у присутності іонів Na^+ та Mg^{2+} , це викликає фосфорилування ферменту за рахунок кінцевої γ -фосфатної групи АТР з утворенням проміжного комплексу EP . Ця стадія не пригнічується убаїном, але інгібується іонами Ca^{2+} . Утворений фосфорильований продукт EP підлягає розпаду, що стимулюється іонами 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 K^+ крізь мембрану в цитоплазму вивільняється при гідролізі фосфорильованого комплексу. Вважається, що фосфорильований фермент може перебувати у двох конформаційних станах: E_1P та E_2P , рівновага

між яким контролюється іонами Mg^{2+} , причому перша форма має більшу спорідненість з ADP, а друга – з K^+ .

Кардіоактивні стероїди убаїн і строфантин є практично абсолютними селективними інгібіторами Na^+,K^+ -АТРази. Кардіоглікозиди зв'язуються з білком з позаклітинного боку плазматичної мембрани. Фосфорилування ензиму і перехід в конформацію P- E_2 полегшує зв'язування кардіоглікозидів. Вважають, що стероїди блокують фермент в стані P- E_2 і, таким чином, унеможливають перехід $E_2 \rightarrow E_1$. Убаїн в інтервалі концентрацій 10^{-6} - $5 \cdot 10^{-3}$ М ефективно пригнічує загальну АТРазну активність сарколеми міомерія і при концентрації убаїну $5 \cdot 10^{-4}$ М загальна АТРазна активність зменшується до 62,5 %. Значення уявної константи інгібування $I_{0,5}$ для Na^+,K^+ -АТРази складає $21,3 \pm 1,5$ мкМ ($M \pm m$; $n=5$) [21]. Ортованадат в нано- та мікромолярних концентраціях також пригнічує активність Na^+,K^+ -АТРази, на відміну від кардіоглікозидів він діє з цитоплазматичної сторони. Антибіотик олігоміцин – ще один інгібітор ензиму, проте він пригнічує Na^+,K^+ -АТРазу не повністю: максимальне зниження активності у присутності олігоміцину складало приблизно 20 % [14].

Na^+,K^+ -АТРаза ПМ підтримує електрохімічні градієнти іонів Na і K, що є необхідним для нормального функціонування клітини (забезпечення електричної збудливості нервової і м'язової тканин, енергозабезпечення Na^+ -залежного вторинного активного транспорту іонів Ca та протонів – Na^+-Ca^{2+} та Na^+-H^+ обміну, регуляція клітинного об'єму тощо) [4, 22, 23, 24, 25, 26, 27]. У багатьох клітинах натрієвий градієнт використовується при функціонуванні різних іонообмінних транспортних систем. Підвищення концентрації внутрішньоклітинного Na^+ приводить до активації Na^+-Ca^{2+} -обмінника, вбудованого у ПМ клітин різноманітних тканин, включаючи нервові клітини, а також клітини серцевого і гладенького м'язу [12]. Це може привести до підвищення внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} , що у свою чергу викликає збільшення сили скорочення серцевого м'язу і тонуусу судин. Шляхом білок-білкових взаємодій з месенжерними білками Na^+,K^+ -АТРаза передає сигнали до

ядра клітини [28, 29]. Встановлений зв'язок між апоптозом і активністю Na^+, K^+ -АТРази у клітин ГМ судин: її активація стимулює розвиток апоптозу, в той час як, блокування убаїном – його пригнічує [30]. Функціонування натрієвої помпи змінюється також і при інших патологіях, таких як порушення вмісту тиреоїдних гормонів, гіпотиреоїдизм, тиреотоксикози та цукровий діабет [31].

1.2. Каліксарени та їхня біологічна активність.

1.2.1. Структура, синтез та фізико-хімічні властивості каліксаренів.

Каліксарени – це макроциклічні сполуки з чашоподібною будовою, які отримують циклоконденсацією паразаміщених фенолів з формальдегідом [32]. Вони побудовані з фенольних фрагментів, які сполучені метиленовими містками [33, 34, 35].

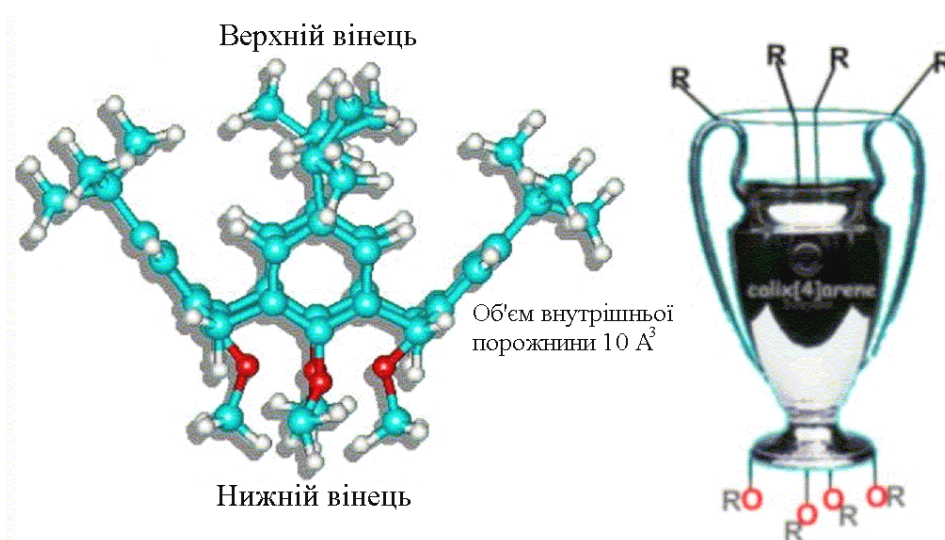


Рис. 1.2. Схематична структура калікс[4]аренів [36].

Термін – «калікс[n]арен» був введений в літературу Давидом Гютше (David Gutsche) [33, 36]. «Калікс» походить від латинського «чаша, кубок» – говорить про специфічну, чашеподібну форму молекули (рис. 1.2) та «арен» свідчить про наявність ароматичних циклів в макроциклічному ансамблі. У складі класичних каліксаренів можна виділити верхній, центральний кільцевий вінець та нижній вінець. Об'єм внутрішньої порожнини молекули каліксарену в середньому становить 10 кубічних ангстремів.

Каліксарени можна синтезувати двома методами. Класичним методом отримання калікс[4]аренів є каталізована лугом циклоконденсація *para*-заміщених фенолів з формальдегідом у лінійні олігомери та подальша їх внутрішньомолекулярна циклізація. Так можна отримати каліксарени з різною кількістю фенольних фрагментів у макроциклі. Найбільше застосування отримали каліксаренові й тіакаліксаренові платформи з 4, 6, і в деяких випадках з 8 ареновими фрагментами. Показано, що похідні тіокалікс- та калікс[4]аренів можуть знаходитися в чотирьох основних конформаціях: конус, частковий конус, 1,2-альтернат та 1,3-альтернат (рис. 1.3) [37]. Відмінність конформацій полягає у розміщенні ароматичних фрагментів відносно головної площини макроциклу, яка умовно проходить по метиленовим зв'язкам[38].

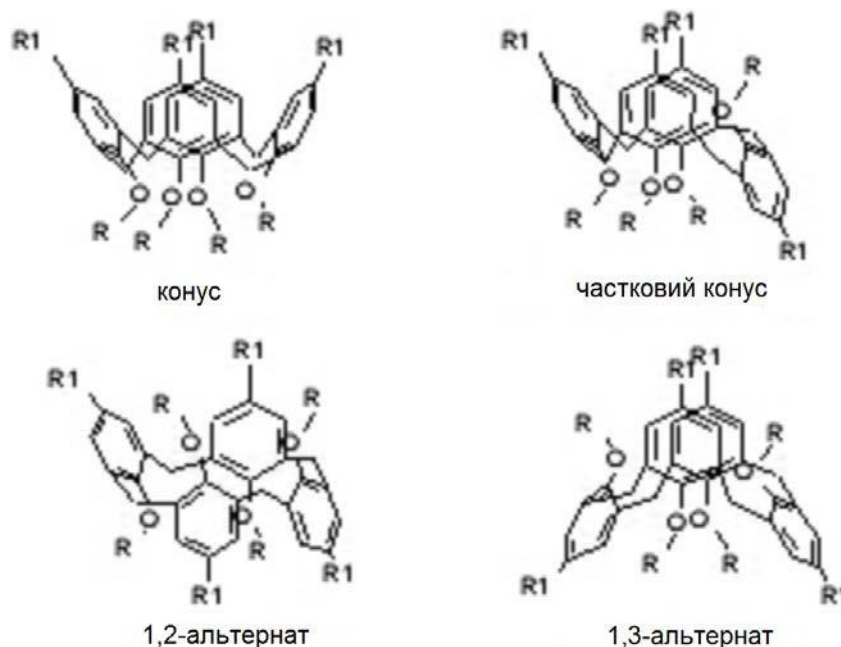


Рис. 1.3. Основні конформації калікс[4]аренів [37].

Молекули каліксаренів можуть адаптуватися до створення найбільш сприятливих взаємодій з мікрооточенням, що пояснюється їх гнучкістю, яка присутня на рівні ароматичного ядра. Здатність розпізнавати та зв'язувати в стійкі комплекси типу «гість-господар», а також розділяти близькі за властивостями катіони, аніони та нейтральні молекули [1], впливає із особливостей будови каліксаренів. Супрамолекулярна комплементарність, тобто комплементарність розмірів, форм та зарядів молекул «гостя» та

«господаря», а також різні нековалентні взаємодії, відіграють істотну роль у створенні такого комплексу. Калікс[6]арени та калікс[8]арени можуть включати навіть дві або більше молекул та завдяки великій кількості можливих конформацій адаптувати свою структуру до будови зв'язаної речовини [39]. Каліксарени є унікальною макроциклічною платформою для створення нового покоління каталізаторів, які містять декілька активних центрів і моделюють ензими [40, 41].

У наш час науковці все більше уваги приділяють створенню нових методів регіо- та стереоселективного введення функціональних груп на каліксаренову платформу, використанню цих підходів для синтезу внутрішньохіральных каліксаренів та пошуку серед синтезованих сполук біологічно активних речовин, здатних впливати на властивості та функціонування ензимів.

1.2.2. Прояви біологічної активності каліксаренів

Здатність зв'язувати нейтральні молекули, катіони, аніони, відкриває широкі можливості для використання каліксаренів при вивченні біохімічних процесів та їх регуляції. Попереднє фіксування біоафінних груп на поверхні молекулярної платформи каліксаренів використовують для створення високоефективних і селективних лігандів або рецепторів біомолекул, і, таким чином, ця технологія може бути застосована для створення нових біоактивних речовин. Завдяки здатності вбудовуватись у біомембрани каліксарени впливають на функціонування аніонних і катіонних pomp у клітинах. На їх платформах можна розробляти специфічні інгібітори ензимів. Введення в структуру макроциклу протонодонорних груп, наприклад, амідних або карбамідних, дає можливість створювати ефективні аніонні рецептори. Якщо структуру каліксарену модифікувати хіральними замісниками, то можна регулювати енантіоселективність розпізнавання. Наприклад, пептидокаліксарени з фрагментами амінокислот *L*-ряду здатні до енантіоселективного зв'язування аніонів *D*-амінокислот [1, 42, 43, 44, 45].

У широкому діапазоні можливостей проявів біологічної дії каліксаренів, ми звернули увагу на ефекти, пов'язані з їх інгібувальною дією на ензиматичну активність, зокрема на активність АТР-гідролазних систем. Так, в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАНУ за допомогою методу протокової цитофлуориметрії та $\text{DiOC}_6(3)$ було показано, що калікс[4]арени С-97, С-99 та С-107 зумовлюють деполяризацію ПМ в умовах штучного колапсу мітохондріального потенціалу в разі передінкубації міоцитів у присутності натрію [46]. В умовах штучної деполяризації сарколеми убаїном калікс[4]арени С-97, С-99 та С-107 у концентрації 100 нМ зумовлюють транзйентне зростання мембранного потенціалу мітохондрій, яке сягає 45 % від контрольного рівня і триває близько 5 хв. Продемонстровано, що калікс[4]арен С-97 ефективно інгібує АТРазну активність субфрагмента-1 міозину міометрія і водночас істотно збільшує гідродинамічний діаметр молекули субфрагмента-1, що опосередковано вказує на утворення міжмолекулярного комплексу між каліксареном та голівкою міозину [47]. Показано також, що тіакалікс[4]арен-тетрасульфонат відновлює до контрольного рівня АТРазну активність субфрагмента-1 міозину за наявності катіонів важких металів (Ni^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+}). Механізм відновлення АТРазної активності може бути пов'язаний з можливістю хелатувати важкі метали та вилучати їх з середовища інкубації [48]. Також було встановлено, що калікс[4]арентетра-бісметиленбісфосфонова кислота С-192 є специфічним інгібітором полімеризації фібрину та зсідання крові і може бути використаний для розробки нового класу антитромботичних препаратів [47]. Описані ефекти каліксаренів свідчать про можливість їх використання для створення селективних інгібіторів (чи активаторів) активності АТР-гідролазних систем.

Дуже сучасним напрямком у медичній хімії та фармакології є синтез нових біоактивних сполук на основі інформації про структуру біомішеней. Застосовуючи відносно недорогий синтез, можна отримати фармакологічні засоби з високою ефективністю і селективністю дії. З цією метою

використовують широкий спектр сполук як молекулярних платформ, зокрема: пептиди, вуглеводи, циклодекстрини та каліксарени.

Синтезовано каліксарен з чотирма пептидними петлями розміщеними навколо калікс[4]аренового ядра, який зв'язується з цитохромом *c* і є ефективним селективним інгібітором ензиму α -хімотрипсину [49]. Досліджено рецептор на основі водорозчинного комплексу Gd^{3+} з калікс[4]ареном модифікованим на нижньому вінці, що міцно зв'язується з сироватковим альбуміном людини (константа дисоціації комплексу 41,6 мкМ), завдяки високій водорозчинності та стійкості каліксареновий металокомплекс запропоновано використовувати як контрастний агент у магнітно-резонансній томографії [50]. У літературі описані також каліксарени, які є потенційними інгібіторами L-лізиноксидази, хімотрипсину [51], холінестерази [52], лужної фосфатази [53], трипази [54], трансклутамінази [55]. Синтезовано каліксарени з високим афінітетом до центрів металів, вони здатні ефективно пригнічувати фосфатази, що містить Zn^{2+} у своїх активних сайтах, за рахунок блокування доступу до субстрату [56]. Інгібування L-лізил оксидази парасульфonatoкалікс[6]ареном було запатентовано як спосіб лікування та заживлення шкіри, оскільки цей ензим відповідає за створення ковалентних зв'язків між макромолекулами міжклітинного матриксу, такі сіткоподібні утворення є важливим фактором у разі фібролітичних захворюваннях [57]. Калікс[4]арени з метиленбісфосфоновими або гідроксиметиленбісфосфоновими залишками використовували як специфічний інгібітор тирозинової фосфатази людини 1B [58].

У фокусі уваги біоорганічної та органічної хімії знаходиться також створення та вивчення каліксаренів, як аналогів ензимів [1]. Застосування технології молекулярного розпізнавання дає змогу розробляти каталізатори на основі макроциклічних каліксаренових платформ, для яких активність і селективність визначається міжмолекулярними взаємодіями між субстратом та каталізатором [59], - простими прикладами таких синтетичних ензимів є

сульфокалікс[6]арени [60]. Показано, що деякі каліксарени впливають на чутливість фосфоліпідних бішарів до фосфоліпази A_2 та їх агрегацію і злиття шляхом модуляції фазової рівноваги мембранних ліпідів. Залежно від структури каліксаренових сполук вони здатні інгібувати або активувати вказані процеси, що корелює також з антитуберкульозною та прототуберкульозною активністю цих сполук відповідно [61]. Здатність каліксаренів проникати або вбудовуватись в мембрани в поєднанні з їх комплексоутворювальними властивостями дає змогу транспортувати крізь мембрану різні речовини: так, трет-бутилкалікс[4]арен був досліджений як селективний транспортер катіонів Na [62]. Крім того, каліксарени можуть зв'язуватись із мембраною і формувати в ній канали [63]. Таким чином, можна стверджувати, що на основі каліксаренів, які виявляють іонофорні властивості, можна моделювати і відповідно вивчати транспортні процеси в мембранах, а також розробляти ефективні антибіотики, подібні до природних, механізм дії яких полягає в порушенні трансмембранного потенціалу в клітинах та організмах.

На сьогодні описано та запатентовано використання каліксаренів як сполук з бактерицидною, противірусною та фунгіцидною дією [45, 64, 65, 66, 67]. 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 [2]. Галактозо-/глюкозопрезентувальні калікс[n]арени ($n = 4,6,8$) здатні селективно зв'язуватися кожен з окремим галектином людини, які відповідають за адгезію та регуляцію росту клітин і є факторам прогресування пухлин [68]. На основі каліксаренів знайдений селективний інгібітор зв'язування рецепторами тромбоцитарного фактору росту [69] та ендотеліального фактору росту судин [70], 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 [71], а калікс[4]арен, поєднаний з чотирма пухлиноасоційованими глікоантигенами, стимулює продукування антипухлинних імуноглобулінів і тому може бути використаний як вакцина [72].

1.2.3. Токсичність та імуногенність каліксаренів

Для потенційного застосування каліксаренів у медицині необхідно, щоб вони були нездатними викликати імунну відповідь і виражену токсичність, агрегацію та гемоліз еритроцитів. Найпростіші немодифіковані сполуки каліксаренів практично безпечні, про що свідчать результати Еймс-тесту [73, 74, 75]. Доведено, що каліксаренсульфонати не впливають на ріст фібробластів людини і мають той же рівень токсичності, що і глюкоза [76], а пара-сульфонатокалікс[4]арени не проявляють токсичності у дозах, що не перевищують 100 мг на 1 кг маси тіла мишей. При цьому каліксарени швидко виводяться з сечею та не накопичуються в печінці, селезінці, або мозку [77]. Встановлено, що тверді ліпідні наночастинки на основі амфифільних калікс[4]аренпохідних показують відсутність гемолітичних ефектів при концентраціях в межах до 300 мг/л [78], на відміну від поведінки твердих ліпідних наночастинок на основі амфифільних циклодекстринів, які проявляють значні гемолітичні ефекти [79].

Знайдено, що серія пара-сульфонат-калікс[4,6,8]аренів та їх монозаміщені похідні не індукують активацію нейтрофілів та не впливають на їх життєздатність [80]. Показано, що ДНК-трансфектовані каліксарени не проявляють токсичність по відношенню до клітин (у яєчниках китайського хом'ячка і клітинних ліній нирок ембріонів людини) [81]. Каліксарени, що містили на нижньому макроциклічному вінці гуанідінові групи, проявляли низьку токсичність при їх трансфекції у клітини, що підтверджувалося 75-80 % їх життєздатністю на протязі 48 годин [82]. Самі каліксаренові матриці не мають імуногенної дії, хоча деякі каліксарени здатні стимулювати імунну відповідь. Експерименти, проведені на тваринах показали, що антитіла проти

калікс[4]аренів виявляються лише при імунізації каліксаренами, кон'югованими з білками, а іmunна відповідь залежить від природи кон'югованого переносника, дози та способу імунізації [83].

Отже, каліксарени є перспективними сполуками для застосування у біомедичній практиці, зважаючи на їх низьку токсичність.

1.2.4. Перспективи використання каліксаренів

У наш час активно визначається можливість використання каліксаренів у різних галузях науки, зокрема у фізико-хімічній біології, біотехнології та фармакології. В літературі часто можна зустріти згадки про різноманітні властивості каліксаренів, у тому числі і про їх біологічну активність. Вчені досліджують утворення інклюзивних комплексів, прояви антикоагуляційної, гідролітичної, протитуберкульозної, антибактеріальної, противірусної, антитромботичної, протипухлинної активності, тощо. Проведено низку досліджень, на підставі результатів яких можна розглядати каліксарени як кандидати для створення антивірусних та антибактеріальних засобів і молекулярних носіїв доставки ліків [84, 85, 86, 87]. Обговорюється також можливість створення пероральних протидіабетичних засобів з використанням каліксаренів у якості переносників крізь мембрану [1, 45].

Оскільки певні каліксарени мають рецепторні властивості по відношенню до різних молекул та іонів, їх широко використовують в аналітичних і діагностичних методах детектування різних біохімічних речовин. Так, глікокалікс[4]арен унаслідок мультивалентного експонування природних лігандів холерного токсину на каліксареновій основі виявляє високу спорідненість до цього токсину, що можна використати для його виявлення [88]. Використання амфіфільних каліксаренових похідних уможливило створення сенсорів здатних визначати різні білки у наномолярному діапазоні. Зокрема, описані аналітичні системи на основі парасульфonatoкаліксаренів, здатних до супрамолекулярної взаємодії з високопатогенними пріонами, що дає змогу ампліфікувати їх імунологічне детектування методами Western Blot та

ELISA [89, 90]. Каліксарени з іонофорними властивостями придатні для створення селективних детекторів на основі електродної техніки. Так були розроблені потенціометричні методи на основі ефірних похідних бутілкалікс[4]аренових сполук для реєстрації концентрації іонів Na селективно відносно іонів K у рослинних клітинах [91] та в плазмі крові [92]. Використовуючи вбудовані у полівінілхлоридні мембрани гексагомотріоксакалікс[3]арени були створені сенсори для допаміну та інших катехоламінів з високою селективністю не тільки відносно неорганічних катіонів, але й відносно інших катехоламінів і четвертинних амінів [93, 94].

При створенні лікарських засобів деякі каліксарени дають змогу поліпшити їх терапевтичні властивості. Зокрема, кон'югат моноклональних імуноглобулінів та калікс[4]арену, здатного хелатувати радіоактивний актиній ($^{225}\text{Ac}^{3+}$), є основою радіотерапевтичних агентів [83]. Водорозчинний парасульфonatoкалікс[8]арен унаслідок утворення стабільного комплексу з практично не розчинним у воді ніфедипіном істотно збільшує його біодоступність при оральному застосуванні [95]. Показано, що парасульфonatoкалікс[4]арен та калікс[4]арендифосфат є ефективними агентами для кристалізації низки фармацевтичноактивних сполук, що дає змогу поліпшити їх характеристики, змінювати й контролювати конформацію лікарського засобу [39]. Можливість функціоналізації каліксаренової платформи дає змогу знизити токсичність дії вже відомого антивірусного лікарського засобу і при цьому підвищити ефективність, наприклад, як у випадку хлоргексидину та корона вірусу 229E [96]; вірусу простого герпесу [86, 97]. Подібним чином використовують каліксаренову платформу і при розробці протигрибкових засобів. У літературі описано синтез гібридів з амотерицину В та калікс[4]арену [98].

Каліксарени також застосовують у біоорганічній хімії та біотехнології з метою створення синтетичних рецепторів, здатних, подібно до природних рецепторів, розпізнавати близькі за властивостями молекули та іони [1, 99, 100].

Показано, що каліксарени можуть бути ефекторами ензиматичних систем, включаючи АТР-гідролази. Втім потенціал каліксаренів як біологічно активних сполук ще повністю не розкритий. Необхідні подальші пошуки та дослідження каліксаренових похідних здатних впливати на АТР-гідролазні системи, зокрема на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазу, Na^+ , K^+ -АТРазу та інші мембранозв'язані АТРози. У випадку гладеньких м'язів це може бути перспективним для подальшого з'ясування механізмів і закономірностей електро- та фармакологічного спряження, порушення цього феномену за патологічних станів.

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 [1, 45, 47, 101]. 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. Тварини та тканини, які було використано в дослідженнях.

У досліджах було використано препарат ГМ матки невагітних свиней та щурів. Матку свиней одержували на Дарницькому м'ясокомбінаті (м. Київ), видаляли невдовзі після забою тварини, очищали від жиру, зачищали від ендометрія, промивали у фізіологічному розчині та зберігали у рідкому азоті. Лабораторних тварин (щурів) утримували на стандартному раціоні віварію. Невагітних щурів вводили в стан наркозу, шляхом витримування у камері збагаченій парами хлороформу, після чого забивали методом декапітації та видаляли матку для подальшої роботи. Роботу було виконано у відповідності до Хельсінської декларації (Всесвітня медична асамблея, 1964), Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), Декларації принципів толерантності (28 сесія ЮНЕСКО, 1995), Універсальної декларації по біоетиці та правах людини (ООН, 1997), норм Конвенції про захист прав людини у зв'язку з впровадженням нових біомедичних технологій, прийнятою у 1997 році у м. Ов'єдо (Іспанія) та підписаним Верховною Радою України у 2002 році, Закону України № 3447 IV «Про захист тварин від жорстокого поводження».

2.2. Виділення міоцитів матки з матки щурів

Суспензію ГМК матки невагітних щурів, естрогенізованих за 16 годин до забору тканини, одержували з використанням колагенази і соєвого інгібітору трипсину за допомогою методу Молларда та співр. [102, 103], який використовували в деякій модифікації. Естрогенізацію проводили з метою збільшення розмірів матки наступним шляхом: внутрішньом'язово вводили 50 мкл 0,1 % розчину естрадіолу. Під впливом естрогенів в міометрії відбувається посилений синтез актоміозину, збільшується число мітозів в м'язових клітинах.

Наркоз тварин викликали інгаляцією хлороформу, після чого вони підлягали декапітації. При цьому дотримувались усіх вимог щодо роботи з лабораторними тваринами згідно Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), Закону України № 3447 IV «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Основні етапи одержання клітинної суспензії. Після видалення матки її очищали від жиру і сполучної тканини та переносили в розчин Хенкса (розчин А) слідуючого складу, (мМ): NaCl – 136,9; KCl – 5,36; KH_2PO_4 – 0,44; NaHCO_3 – 0,26; Na_2HPO_4 – 0,26; CaCl_2 – 1,26; MgCl_2 – 0,4; MgSO_4 – 0,4; глюкоза – 5,5; HEPES (pH = 7,4, 37 °C) – 10. Потім тканину подрібнювали ножицями на невеликі шматочки (середній розмір – 2 на 2 мм) і відмивали від крові та високих концентрацій іонів Ca (3 рази по 5 хв) в 5 мл розчину Б (розчин Хенкса вищеприведеного складу, який не містить MgCl_2 і MgSO_4 , а містить CaCl_2 в концентрації 0,03 мМ). Після цього шматочки тканини інкубували протягом 20 хв (37 °C, режим постійного перемішування) у 2 мл середовища дисоціації тканини, яке являє собою розчин колагенази (0,1%), бичого сивороточного альбуміна (0,1%) і соєвого інгібітора трипсину (0,01%), що був приготований на розчині Б. Через 20 хв середовище дисоціації тканини відбирали, а тканину переносили у вільний від ензиматичного препарату розчин Б. Для прискорення дисоціації клітин тканинний препарат 15-20 разів акуратно піпетували за допомогою скляної піпетки на протязі 1-2 хв. Розчин Б, який містить дисоційовані клітини, відбирали, а тканинний препарат знову переносили в нову порцію середовища дисоціації клітин, що містить колагеназу та соєвий інгібітор трипсину. Цю процедуру повторювали 5-6 разів. Дві перші порції розчину Б, що використовувався для піпетування (не містив колагенази та соєвого інгібітору трипсину) і містив дисоційовані клітини, відкидали, в зв'язку з тим, що вони містили фрагменти тканини і пошкоджені клітини. Останні 3-4 порції збирали, об'єднували і центрифугували 10 хв при 80g. Отриманий осад

клітин промивали розчином, який містить 25 мМ НЕРЕС-КОН (рН=7,4; 8 °С), 150 мМ NaCl і 0,4% бичачого сироваточного альбуміну, і знову центрифугували у вказаному вище режимі. Потім клітини переносили в середовище зберігання, яке містило 25 мМ НЕРЕС-КОН (рН=7,4; 8 °С), 150 мМ NaCl, і зберігали при низькій температурі (ставили на лід) та проводили запланований дослід.

В 1 мл отриманої клітинної суспензії містилось в середньому $6,58 \cdot 10^6$ міоцитів; кількість життєздатних клітин – 90-95% від загальної кількості клітин (цю характеристику визначали при фарбуванні клітинного препарату вітальним барвником трипановим синім). Підрахунок загальної кількості клітин і кількості життєздатних клітин проводили з використанням гемоцитометра (камери Горяєва). Для цього до клітинної суспензії додавали рівний об'єм фарбуючого розчину (тобто до 5 частин суспензії клітин додавали 4^ш частини 0,2% розчину трипанового синього та 1 частину 4,25% розчину NaCl). Потім частину забарвленої суспензії клітин вносили у лічильну камеру Горяєва (гемоцитометр) з покривним склом, використовуючи ефект капілярного присмоктування. Кількість клітин підраховували за допомогою світлового мікроскопу, користувалися малим збільшенням. Кількість життєздатних клітин, що виштовхують трипановий синій, оцінювали, підраховуючи середню кількість незабарвлених міоцитів у квадраті площею 1 мм². Кількість клітин у 1 мл вихідної суспензії (С) визначали за формулою:

$$C = k * n * p \text{ клітин/мл,}$$

де n – кількість підрахованих клітин/1 мм², k – коефіцієнт розведення, p – перерахувний коефіцієнт, рівний 10⁴/мм. Кількість клітин у пробі (метод протокової цитофлуориметрії) становила 500 тис./ 2 мл.

В наших дослідях кількість клітин, що містилась в 1 мл суспензії, в середньому складала 6,5 млн. Отже, з однієї матки в процесі виділення ми отримували від 10 до 30 млн клітин. Мікроскопічне дослідження показало, що поодинокі гладеньком'язові клітини матки мали веретеноподібну форму, їх

довжина і ширина в середньому складали 80-100 і 10-20 мкм відповідно [104, 105]. Згідно із проведеним аналізом одержаний препарат суспензії містив від 90 до 95% клітин, які виштовхували трипановий синій, що свідчить про те, що плазматичну мембрану не було пошкоджено у процесі отримання ізольованих клітин [106].

Нами також було візуалізовано препарат гладеньком'язованих клітин за допомогою методу скануючої конфокальної мікроскопії (прилад LSM 510 META («Carl Zeiss», Німеччина)). Клітини були забарвлені зондом Hoerst та Ca^{2+} -чутливим зондом fluo-4 AM (рис. 2.1).

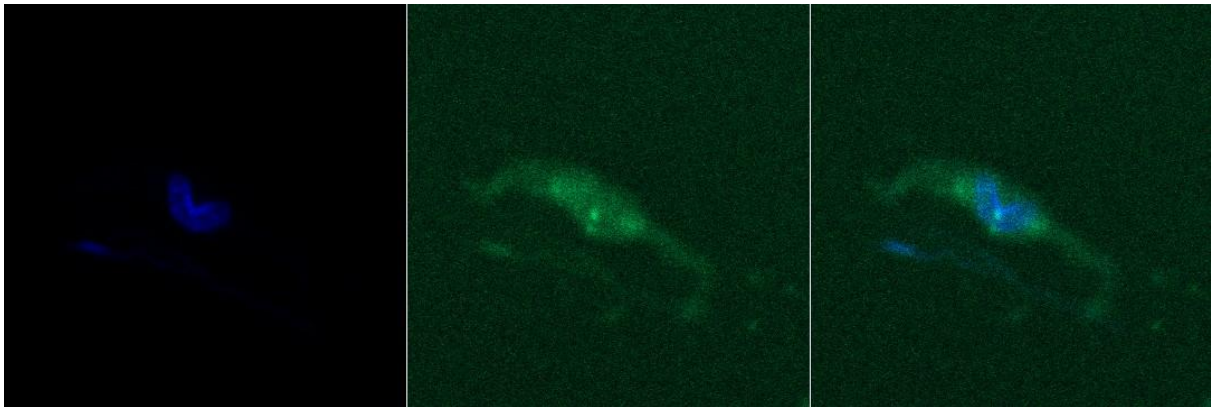


Рис. 2.1. Зображення ГМК міометрія, отримане скануючим лазерним конфокальним мікроскопом.

Проведене дослідження свідчить про те, що клітини мали характерну гладеньком'язову морфологію, веретеноподібну форму. Для експериментів використовувалися клітини, які не відповідали зростанням флуоресценції на аплікацію Ca^{2+} (2-3 мМ) у препарат.

Методом M. Bredford із використанням реакції з реактивом Кумасі – G250 визначали вміст білка в суспензії міоцитів.

2.3. Виділення фракції плазматичних мембран клітин міометрія

ПМ ГМК виділяли з міометрія свині за методикою, що описана в роботі [107]. Для цього матку свині вирізали через 10-20 хв. після забою тварини, очищали від жиру, видаляли ендометрій, промивали у фізіологічному розчині

та зберігали у вигляді порцій по 10-20 г в рідкому азоті. Всі операції виконувалися на льоду. Безпосередньо у день постановки експерименту 15 г тканини подрібнювали спочатку ножицями, потім за допомогою ножового гомогенізатора типу «Політрон» при 10000 об/хв. 3 рази по 20 сек (з перервами по 2 хвилини для охолодження) у 60 мл середовища гомогенізації. Співвідношення тканина:середовище гомогенізації становило 1:4. Середовище гомогенізації мало наступний склад, мМ: 20 трис-НСl (рН=7,4 при 8 °С), 250 сахароза, 2 етилендіамінтетраоцтова кислота, 600 КСl. Усі операції проводили при 4 °С. Отриманий гомогенат центрифугували протягом 18 хв при 3000 g. Під час цього центрифугування видаляли обривки тканини, ядра та мітохондрії. Надосадову рідину нашаровували на ступінчатий градієнт сахарози у наступному порядку і співвідношенні – 30% сахароза з 0,6 М КСl : 15% сахароза з 0,6 М КСl : надосадова рідина = 6 мл : 5 мл : 20 мл. Три пробірки із системою ступінчатого градієнта центрифугували у бакет-роторі 90 хв. при 105000 g на бакет-роторі при +8°С. Інтерфазну зону між двох розчинів сахарози відбирали пастерівською піпеткою. Отриману суспензію мембран розводили охолодженим бідистилятом до 2,5% сахарози і осаджували протягом 1 години при 105000 g на кутовому роторі. Осад, що являв собою везикули плазматичних мембран суспендували в 3 мл середовища наступного складу, мМ: 20 Tris-НСl (рН=7,4 при 8 °С), 150 мМ КСl. Суспензію препарату ПМ зберігали в скрапленому азоті.

Використання вищезначеного методу одержання плазматичних мембран з міометрія, відповідно до даних літератури [107], гарантує одержання фракції ПМ міометрія, яка збагачена везикульованими фрагментами мембран, що замкнені внутрішньою стороною назовні (інвертовані).

Кількість білка в мембранному препараті визначали методом Bradford за його реакцією з реактивом Кумасі G250. Серед переваг методу слід назвати такі: висока чутливість при визначенні концентрацій білка в межах 2-120 мкг/мл, розвиток стійкого забарвлення розчину білка, що не зникає протягом

години. На відміну від методу Лоурі визначенню білка за допомогою Кумасі G250 не заважають іони натрію, калію, магнію, наявність у розчині ЕДТА та Tris. Метод заснований на реакції аніонної форми Кумасі з позитивно зарядженими амінокислотами білка. При цьому колір барвника змінюється з червоно-коричневого на синій з максимумом поглинання при 595 нм [108].

2.4. Флуоресцентні методи

Клітини для проведення конфокально-мікроскопічних досліджень (об'єм суспензії 100 мкл) іммобілізували протягом 2 год на предметному склі, обробленому полі-L-лізином (200 мкл), при температурі 25 °С. Неприкріплені міоцити відмивали розчином В (див. вище), після чого до іммобілізованих клітин додавали 100 мкл розчину В та обробляли зондами.

Для визначення змін $[Ca^{2+}]_i$ міоцити обробляли зондами Hoechst 33342 (тестує ядро клітини) та fluo-4 AM (тестує зміну концентрації Ca^{2+} у клітині) для покращення навантаження у розчині також був 0,2 % Pluronic, чекали 20 хв та проводили вимірювання у режимі Multi Track на лазерному скануючому конфокальному мікроскопі LSM 510 META («Carl Zeiss», Німеччина). Вимірювання проводили як послідовні знімки клітин (time series) впродовж 5 хв по 15-20 с кожен, під час яких вносили Ca^{2+} (2 мМ) для перевірки цілісності ПМ. Після чого вносили ДМСО (2 мкл) або аліквоту калікс[4]арену **C-150** (20 мкМ) у випадку контролю, чи калікс[4]арен **C-90** (20 мкМ) у випадку проби. Флуоресценцію збуджували діодним лазером на 405 нм для Hoechst 33342, реєстрували за допомогою світлофільтра BP 420-480 нм, флуоресценцію fluo-4 AM збуджували аргоновим лазером на 488 нм, реєстрували в діапазоні 505-530 нм (світлофільтр BP 505-530).

Для визначення проникності калікс[4]арену **C-107** у міоцити міометрія до іммобілізованих клітин додавали Hoechst 33342 та, як і в попередньому випадку, проводили серію послідовних знімків, під час яких вносили калікс[4]арен **C-107** (50 мкМ) та реєстрували появу автофлуоресценції у регіоні

цитоплазми міоцита. Флуоресценцію збуджували на 405 нм, реєстрували за допомогою світлофільтра ВР 420-480 нм.

Кількісний аналіз проводили з використанням функції ROI (Region of Interest), яка дозволяє отримувати графіки залежностей інтенсивностей флуоресценції від часу, усереднену по виділеній області

2.5. Визначення АТР-гідролазних активностей у фракції плазматичних мембран клітин міомерія та швидкості неензиматичного гідролізу АТР

Загальну $\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазну активність визначали при 37 °С у фракції плазматичних мембран клітин міомерія [109] в середовищі інкубації (об'єм 0,4 мл), яке містило (в мМ): 1 АТР, 3 MgCl_2 , 125 NaCl , 25 KCl , 1 ЕГТА, 20 *Hepes-Tris*-буфер (рН 7,4), 1 NaN_3 , а також 0,1 мкМ тапсигаргін та 0,1% дигітонін. Кількість білка в мембранній фракції проби становила 20-30 мкг, тривалість інкубації – 4 хв.

Ензиматичну реакцію ініціювали введенням до середовища інкубації аліквоти суспензії ПМ, а зупиняли шляхом додаванням до інкубаційної суміші 1 мл «стоп»-розчину наступного складу: 1,5 М натрій оцтовокислий, 3,7 % формальдегід, 14 % етанол, 5 % трихлороцтова кислота (рН=4,3 при 8 °С), як описано в роботі [110].

Контролем на неензиматичний гідроліз АТР слугувало середовище інкубації аналогічне за складом, але за відсутності в ньому фрагментів плазматичних мембран. Контролем на кількість ендogenous P_i в мембранному препараті була аліквота мембран у воді. Таким чином, загальну АТРазну активність обчислювали як різницю між кількістю P_i , що утворився в середовищі інкубації у присутності й за відсутності фрагментів плазматичних мембран. При цьому було враховано поправку на вміст ендogenous P_i в мембранному препараті. Кількість продукту реакції P_i визначали методом W. Rathbun et V. Betlach [111]. До проби додавали 0,05 мл 2%-ого MoNH_4 й після інтенсивного перемішування вносили 0,1 мл 6,75 мМ $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Через 15 хв

реєстрували оптичну густину розчину за допомогою спектрофотометра SPECORD UV VIS при довжині хвилі 660 нм [110, 111].

Базальну Mg^{2+} -АТРазну активність визначали в такому ж середовищі інкубації, як і загальну АТРазну активність, але у присутності 1 мМ убаїну (селективний інгібітор Na^+, K^+ -АТРази). У наших дослідах середнє значення питомої ензиматичної активності «базальної» Mg^{2+} -АТРази складає $18,1 \pm 1,2$ мкмоль P_i /мг білка за 1 год ($M \pm m$; $n=7$).

Убаїнчутливу Na^+, K^+ -АТРазну активність обчислювали як різницю між величиною загальної Mg^{2+}, Na^+, K^+ -АТРазної і базальної (убаїн не чутливої) Mg^{2+} -АТР-азної активності. У наших дослідах середнє значення питомої ензиматичної активності Na^+, K^+ -АТРази складає $10,2 \pm 0,7$ мкмоль P_i /мг білка за 1 год ($M \pm m$; $n=7$).

У дослідах по вивченню впливу калікс[4]аренів та сполук **М-3** (структурний фрагмент калікс[4]арену **С-107**) на питому активність Na^+, K^+ -АТРази та Mg^{2+} -АТРази використовували середовище інкубації, що було описане вище, до якого додавали аліквоти розчину калікс[4]арену або сполуки **М-3** у відповідній початковій концентрації. В експериментах використовували початкові концентровані розчини калікс[4]аренів (4 мМ) в ДМСО, які розводили водою до потрібної концентрації. Сполуку **М-3** використовували у водному розчині. За 100% («нульова точка») приймали значення АТР-гідролазної активності, яке визначали за відсутності калікс[4]аренів у середовищі інкубації.

В наших дослідженнях використовувались наступні калікс[4]арени (рис. 2.2, під структурними формулами зазначені шифри):

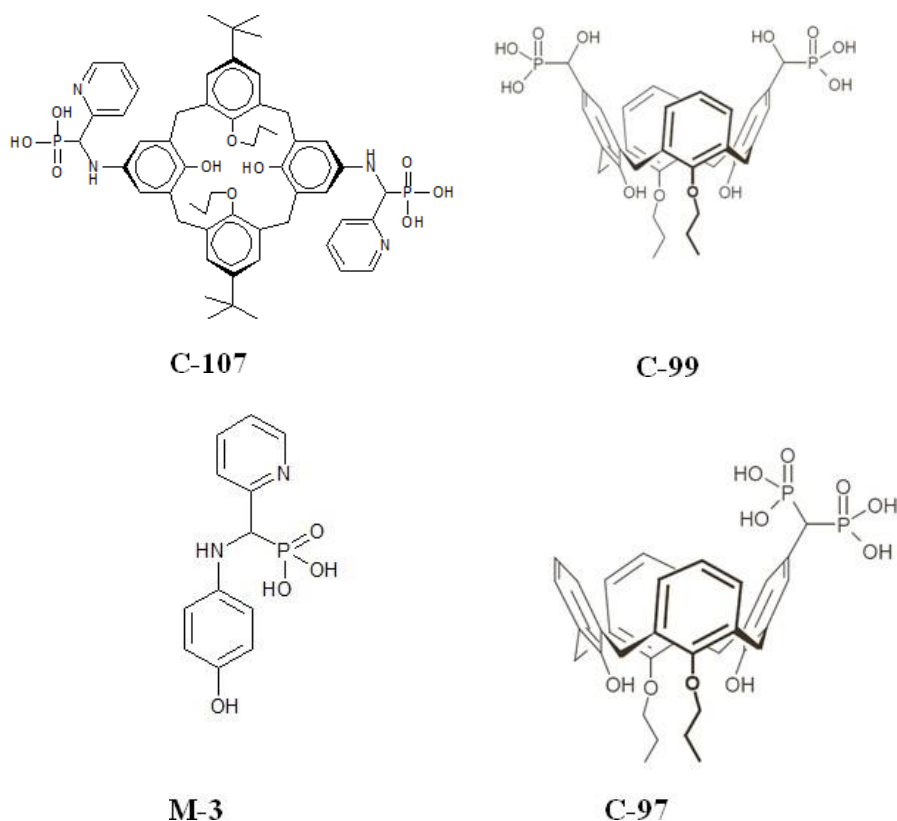


Рис. 2.2. Структурні формули калікс[4]аренів, інгібіторів Na^+, K^+ -АТРази, та сполуки М-3.

Повні хімічні назви калікс[4]аренів, інгібіторів Na^+, K^+ -АТРази, та сполуки **М-3**:

С-97 (5-біс(дигідроксифосфорил)метил-26,28-дигідрокси-25,27-дипропоксикалікс[4]арен);

С-99 (5,17-біс(дигідроксифосфонілметилол)-26,28-дигідрокси-25,27-дипропоксикалікс[4]арен);

С-107 (5,17-ди(фосфоно-2-піридил-метил)аміно-11,23-ди-трет-бутил-26,28-дигідрокси-25,27-дипропоксикалікс[4]арен);

М-3 (4-гідроксианіліно(2-піридил)метилфосфонова кислота).

Всі досліджені нами калікс[4]арени та модельна сполука **М-3** були синтезовані та охарактеризовані із використанням методів ядерно-магнітного резонансу та інфрачервоної спектроскопії у відділі хімії фосфоранів Інституту органічної хімії НАН України (під керівництвом зав. відділу – академіком НАН України проф. В.І. Кальченко).

Значення уявних констант активації іонами (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) та констант Міхаеліса, а також коефіцієнтів Хілла n_H розраховували з використанням концентраційних залежностей, побудованих у логарифмічних координатах відповідно до лінеаризованого рівняння Хілла [112]:

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

де V – питома ензиматична активність V_{\max} – максимальна питома ензиматична активність у присутності в середовищі інкубації субстрату або іона-активатора, K – уявна константа Міхаеліса або уявна константа активації для субстрату реакції або іонів-активаторів відповідно, S – концентрація субстрату або іона-активатора в середовищі інкубації.

Значення уявної константи інгібування K_i та коефіцієнтів Хілла розраховували із використанням лінеаризованих графіків Хілла відповідно до рівняння:

$$\lg[(V_{\max} - V)/V] = n_H \cdot \lg I - n_H \cdot \lg K_i,$$

де I – концентрація інгібітору в середовищі інкубації.

2.6. Статистична обробка результатів

Експериментальні дані обробляли загальноприйнятими методами варіаційної статистики [113, 114]. Середнє арифметичне (M) обчислювали за формулою:

$$M = \sum x_i / n,$$

де \sum - знак суми, x_i – варіанта, n – кількість варіант.

Похибку середнього арифметичного (m) визначали за формулою:

$$m = \sigma / \sqrt{n-1},$$

де σ – середнє квадратичне відхилення, n – кількість варіант.

Вірогідність різниці середнього арифметичного за критерієм Стюдента (t) обчислювали за формулою:

$$t = M_1 - M_2 / \sqrt{m_1^2 + m_2^2}$$

Розрахунки проводились за допомогою стандартного програмного забезпечення “MS Office” на персональному комп’ютері IBM PC/AT.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Порівняння ефективності інгібувальної дії калікс[4]аренів С-97, С-99, С-107 та убаїну на активність Na⁺,K⁺-АТРази

Як відомо, кардіоактивні стероїди убаїн (рис. 3.1) і строфантидин є селективними інгібіторами Na⁺,K⁺-АТРази [14, 115, 116]. Кардіоглікозиди зв'язуються з білком з позаклітинного зовнішнього боку ПМ клітини. Фосфорилування ензиму і перехід в конформацію Р-Е₂ полегшує зв'язування глікозидів.

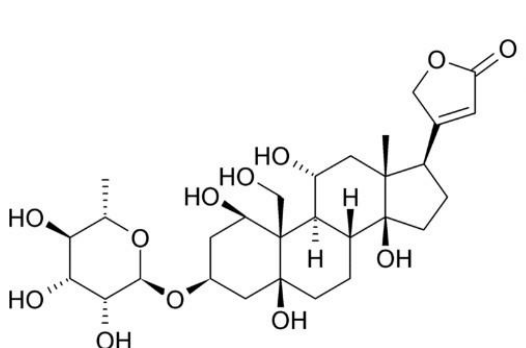


Рис. 3.1. Убаїн.

Вважають, що стероїди блокують ензим в стані Р-Е₂ і, тим самим, гальмують перехід на рівні конформерів Е₂→Е₁. Як можна бачити (рис. 3.2.а), убаїн в діапазоні концентрацій 10⁻⁶ - 5*10⁻³ М ефективно пригнічує “загальну” Mg²⁺,Na⁺,K⁺-АТРази активність сарколеми міометрія, при концентрації убаїну 5*10⁻⁴ - 5*10⁻³ М ця активність зменшується до 63 % відносно контролю (за нього приймається так звана „нульова точка”, яка тестується у відсутності інгібітора: 28,7±1,4 мкмоль Р_i/год на 1 мг білка; (M±m; n=7)). Таким чином, абсолютне значення убаїнчутливої Na⁺,K⁺-АТРази активності становить 10,6±0,9 мкмоль Р_i/год на 1 мг білка (M±m; n=7). „Залишок” ензиматичної активності, нечутливої до дії убаїну, свідчить про наявність у ПМ так званої „базальної” Mg²⁺-залежної АТРази (18,1±1,2 мкмоль Р_i/год на 1 мг білка відповідно; (M±m; n=7)).

Значення уявної константи $I_{0,5}$ інгібування Na^+, K^+ -АТРази убаїном складає $21,3 \pm 1,5$ мкМ ($M \pm m$; $n=5$) (рис. 3.2.б). Для порівняння зазначимо, що, за літературними даними, величина $I_{0,5}$ для серцевого м'яза собаки становить 0,1-0,3 мкМ, а для серцевого м'яза пацюків – 75-93 мкМ. Взагалі ж найбільш чутливим до убаїну є ензим, який був виділений із тканин людини, корів, собак і ярчуків. Менш чутливою до убаїну є Na^+, K^+ -АТРаза мурчаків, щурів і кроликів [117].

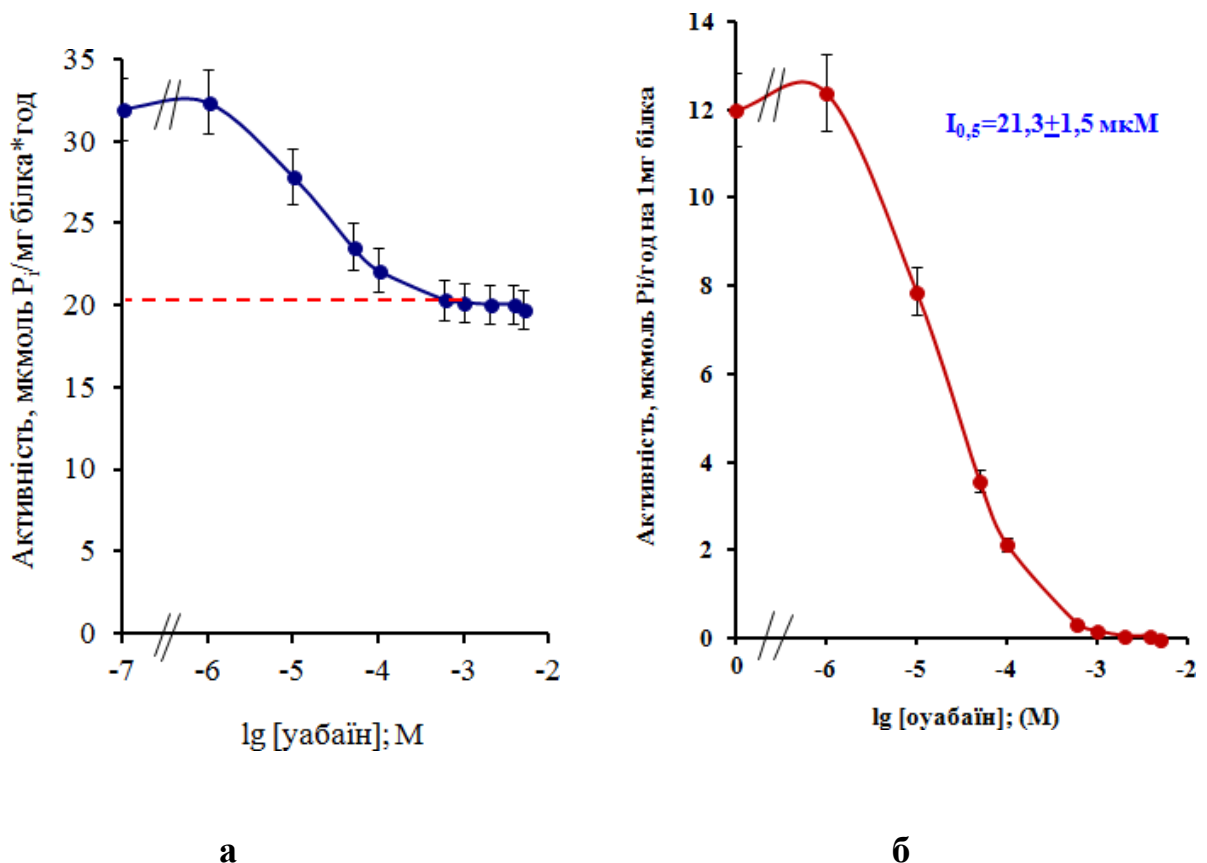


Рис. 3.2. Концентраційні залежності впливу убаїну на $\text{Mg}^{2+}, \text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРазну (“загальну”) (а) та убаїнчутливу Na^+, K^+ -АТРазну (б) активність у фракції ПМ клітин міометрія ($M \pm m$; $n = 5$).

У випадку (а) пунктиром вказано рівень „базальної” (убаїн не чутливої) питомої Mg^{2+} -АТРазної активності.

В наших експериментах ми зосередили свою увагу на деяких вибраних у попередніх досліджах калікс[4]аренах, а саме - **С-97**, **С-99** та **С-107**. Вони, використані у концентрації 100 мкМ, пригнічують активність Na^+, K^+ -АТРази на

98 %, 86 % та 97 % відповідно для калікс[4]аренів **C-97**, **C-99** та **C-107** (рис. 3.3). При цьому ці сполуки майже не впливали на активність Mg^{2+} -АТРази (гальмівний ефект – лише на 9 – 11 %).

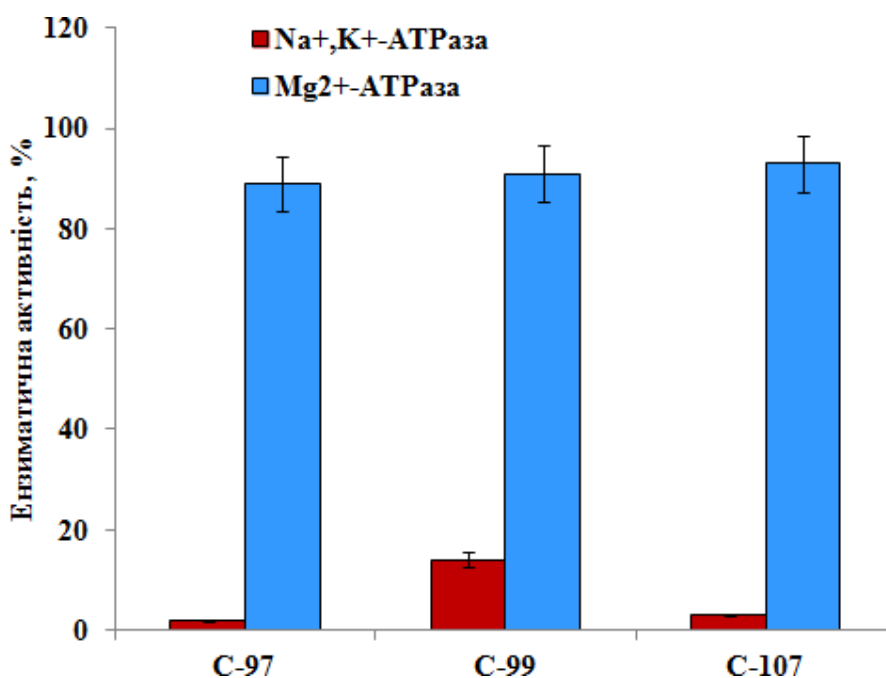


Рис. 3.3. Вплив калікс[4]аренів C-97, C-99, C-107 (100 мкМ) на активності Na^+,K^+ -АТРази та базальної Mg^{2+} -АТРази ПМ клітин міометрія ($M \pm m, n = 7$).

За 100 % прийнято значення активності ензимів за відсутності калікс[4]аренів у середовищі інкубації.

Також ми показали, що відібрані калікс[4]арени **C-97**, **C-99** та **C-107**, які використовували в інтервалі концентрацій від 10^{-8} до 10^{-4} М, дозозалежно та значно ефективніше, ніж убаїн, пригнічують активність Na^+,K^+ -АТРази (рис. 3.4.а).

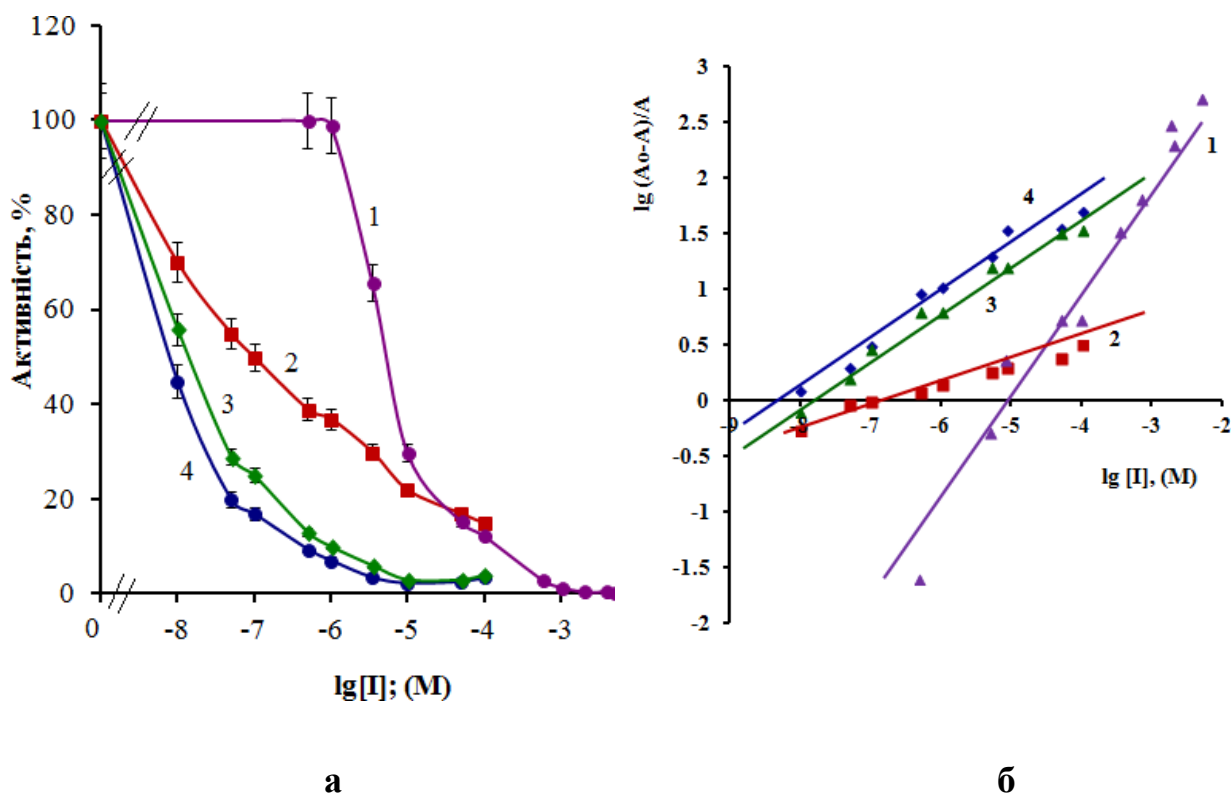


Рис. 3.4. Каталітичне титрування калікс[4]аренами **C-97**, **C-99**, **C-107** та убаїном Na^+, K^+ -АТРази у фракції ПМ клітин міометрія ($M_{\pm t}$; $n = 6$).

У всіх випадках графіки 1 та 2, 3, 4 – дія убаїну та калікс[4]аренів **C-99**, **C-107** та **C-97** відповідно.

а – концентраційні залежності інгібіторної дії калікс[4]аренів та убаїну. За 100 % прийнято значення питомої ензиматичної активності у відсутності калікс[4]аренів та убаїну у середовищі інкубації;

б – лінеаризовані у координатах Хілла усереднені ($n = 6$) криві каталітичного титрування. Типові значення коефіцієнту кореляції r становили 0,98-0,99.

Лінеаризовані у координатах Хілла $\{\lg[(A_0-A)/A]; \lg[I]\}$ графіки наведених на рис. 3.4.а концентраційних залежностей, були використані з метою розрахунку кількісних показників (константа інгібування $I_{0,5}$, коефіцієнта Хілла n_H) інгібуючої дії трьох зазначених калікс[4]аренів порівняльно до дії убаїну (рис. 3.4.б, табл. 3.1). Отже, калікс[4]арени **C-97** та **C-107** вже у концентрації 10^{-5} М гальмують активність Na^+, K^+ -АТРази повністю (залишкова

активність – до 2% відносно контрольного значення). Величини уявних констант інгібування $I_{0,5}$ для цих калікс[4]аренів становлять 33 ± 4 та 54 ± 6 нМ відповідно, значення коефіцієнта Хілла n_H складають $0,38 \pm 0,06$ та $0,4 \pm 0,08$. З меншою ефективністю пригнічує каталітичну активність Na^+, K^+ -АТРази калікс[4]арен **С-99**: при використанні його у концентрації 100 мкМ активність ензиму інгібувалась лише на 80 %, а її повне гальмування спостерігалось при концентрації 1 мМ, при цьому $I_{0,5} = 98 \pm 8$ нМ, $n_H = 0,12 \pm 0,03$. При дії ж уабаїну повне інгібування активності Na^+, K^+ -АТази також спостерігається при концентрації 1 мМ, у цьому випадку $I_{0,5} = 21 \pm 5$ мкМ, $n_H = 0,54 \pm 0,07$ (табл. 3.1).

Табл. 3.1. Кількісні показники дії калікс[4]аренів С-97, С-99, С-107 та уабаїну на питому ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази ПМ клітин міометрія ($M \pm m$; $n = 6$).

Каліксарени, уабаїн	Концентрація, при якій спостерігається повне інгібування активності	Уявна константа інгібування, $I_{0,5}$	Коефіцієнт Хілла, n_H
С-97	~ 10 мкМ	33 ± 4 нМ	$0,38 \pm 0,06$
С-99	1 мМ	98 ± 8 нМ	$0,12 \pm 0,03$
С-107	~ 10 мкМ	54 ± 6 нМ	$0,40 \pm 0,08$
Уабаїн	1 мМ	21 ± 5 мкМ	$0,54 \pm 0,07$

Додаток: При дослідженні концентраційних залежностей дії калікс[4]аренів та уабаїну на ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази значення уявних констант інгібування $I_{0,5}$ та коефіцієнтів Хілла n_H розраховували із використанням лінеаризованих графіків Хілла (значення коефіцієнтів кореляції становили 0,98-0,99).

Для порівняльної наочності на рис. 3.5 наведені результати, що були одержані при каталітичному титруванні Mg^{2+} -АТРази ПМ клітин міометрія калікс[4]аренами **С-97, С-99, С-107**: як бачимо, при використанні цих речовин в діапазоні від 10^{-8} до 10^{-7} М інгібування ензиматичної активності Mg^{2+} -АТРази

не спостерігалось, при подальшому збільшенні концентрації цих речовин до 10^{-4} М гальмівний ефект не перевищував 5 – 10 %.

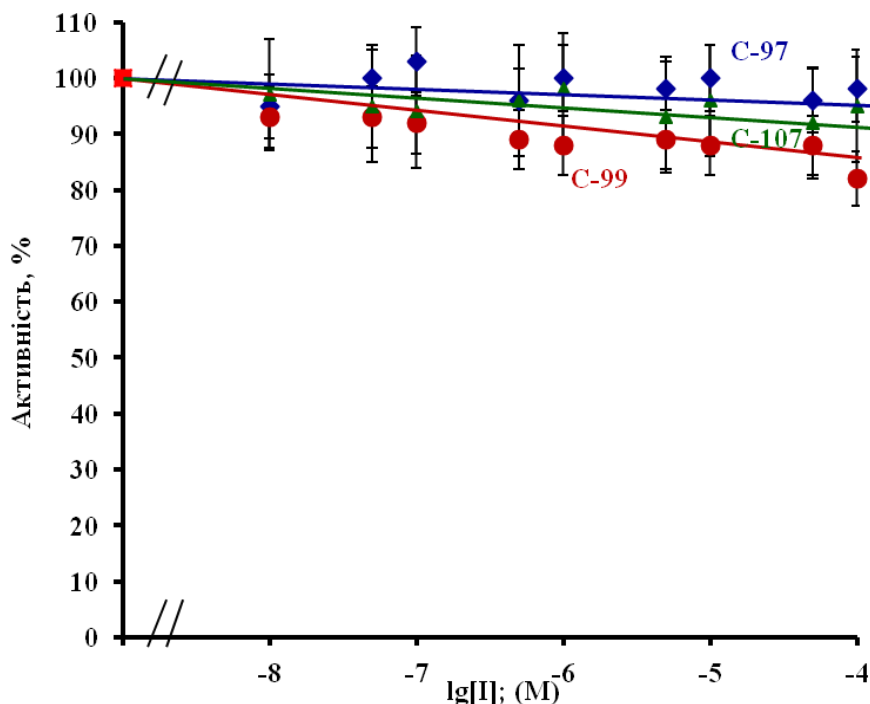


Рис. 3.5. Каталітичне титрування калікс[4]аренами C- 97, C-99 та C-107 Mg^{2+} -АТРази у фракції ПМ клітин міометрія ($M \pm m$; $n = 6$).

За 100 % (контроль) прийнято значення питомої ензиматичної активності у відсутності калікс[4]аренів у середовищі інкубації.

Таким чином, результати вищенаведених порівняльних експериментів із каталітичного титрування відібраними калікс[4]аренами C-97, C-99 та C-107, а також убаїном, Na^+, K^+ -АТРази ПМ клітин міометрія (рис. 3.4, 3.5; табл. 3.1), вказують на наступне.

По-перше, калікс[4]арени C-97, C-107 та C-99 значно більш ефективно, ніж убаїн, гальмують ензиматичну активність натрієвої помпи у діапазоні концентрації цих ефекторів 0 – 10 мкМ: у випадку дії цих калікс[4]аренів величина уявної константи інгібування $I_{0,5} < 0,1$ мкМ, а у випадку дії убаїну це значення у середньому на два – три порядки більше і становить 20 – 30 мкМ. Саме калікс[4]арени – C-97 та C-107 є найбільш ефективними інгібіторами ($I_{0,5} \approx 30 - 60$ нМ): адже використання їх у концентрації 10 мкМ гарантує повне

пригнічення активності Na^+, K^+ -АТРази. У той же час калікс[4]арен **C-99** ($I_{0,5} \approx 100$ нМ) та убаїн ($I_{0,5} \approx 20$ мкМ) повністю гальмують активність ензиму у концентрації 1 мМ.

По-друге, можна стверджувати, що серед усіх трьох калікс[4]аренів найбільш ефективна гальмівна дія на Na^+, K^+ -АТРази властива, судячи за значенням уявної константи інгібування $I_{0,5}$, саме для калікс[4]арену **C-97**: $I_{0,5} = 33 \pm 4$ нМ.

По-третє, для інгібуючої дії як зазначених калікс[4]аренів, так і убаїну, є притаманним явище від'ємної кооперативності: в усіх випадках величина уявного коефіцієнта Хілла $n_H < 1$. Це може вказувати на те, що інгібіторний вплив однієї молекули кожного з трьох калікс[4]аренів чи убаїну опосередковується взаємодією з декількома молекулярними комплексами Na^+, K^+ -АТРази. Найбільш кооперативним є інгібіторний ефект калікс[4]арену **C-99**: $n_H \approx 0,1$, менш кооперативним – ефект калікс[4]аренів **C-97** та **C-107**: $n_H \approx 0,4$, і, особливо, ефект убаїну: $n_H \approx 0,5$.

По-четверте, навіть у концентрації 100 мкМ зазначені калікс[4]арени не впливають на активність Mg^{2+} -АТРази.

У подальших дослідженнях ми намагалися дослідити деякі закономірності інгібіторного впливу калікс[4]арену **C-107**.

3.2. Вплив структурних компонентів калікс[4]арену C-107 на активність Na^+, K^+ -АТРази

Для вивчення впливу структурних чинників, ми провели дослідження інгібувальної дії на Na^+, K^+ -АТРази ПМ клітин міометрія калікс[4]арен-1,3-бісамінофосфонової кислоти – калікс[4]арену **C-107**, її проксимального 1,2-регіоізомеру – калікс[4]арену **C-160**, а також модельних сполук – незаміщеного дипропоксикалікс[4]арену **C-150**, та N-(4-гідроксифеніл)-2-піридил-амінофосфонової кислоти **M-3** (структурні формули наведені на рис. 3.6).

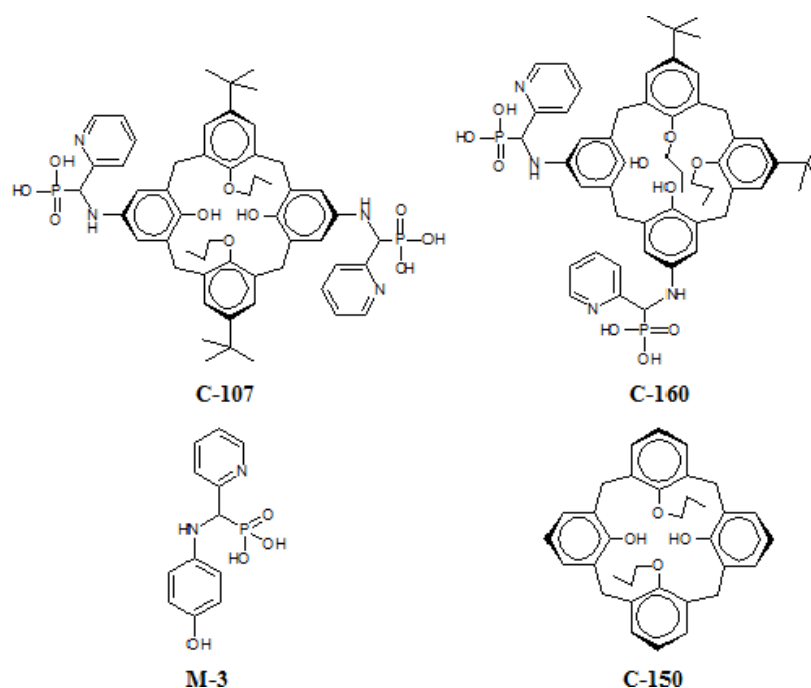


Рис. 3.6. Структурні формули калікс[4]аренів **C-107**, **C-160**, **C-150** та модельної сполуки **M-3**.

Зазначимо, що калікс[4]арен **C-107** складається як би із 3-х частин: каліксаренової “чаші” (макроциклічна основа із 4-х бензольних кілець, зв’язаних метиленовими групами) (еквівалент – сполука **C-150**), і двох амінофосфонових груп, пов’язаних з фенольними фрагментами (еквівалент – сполука **M-3**).

Як видно із структурних формул каліксаренів (рис. 3.6), калікс[4]арен **C-150** не містить жодних додаткових хімічних угруповань на верхньому вінці макроциклу, тобто по відношенню до досліджуваних каліксаренів він є суто каліксареновою “чашею”. Сполука **M-3** містить один фенольний фрагмент та амінофосфонове угруповання аналогічне до такого ж у складі молекули калікс[4]арену **C-107**.

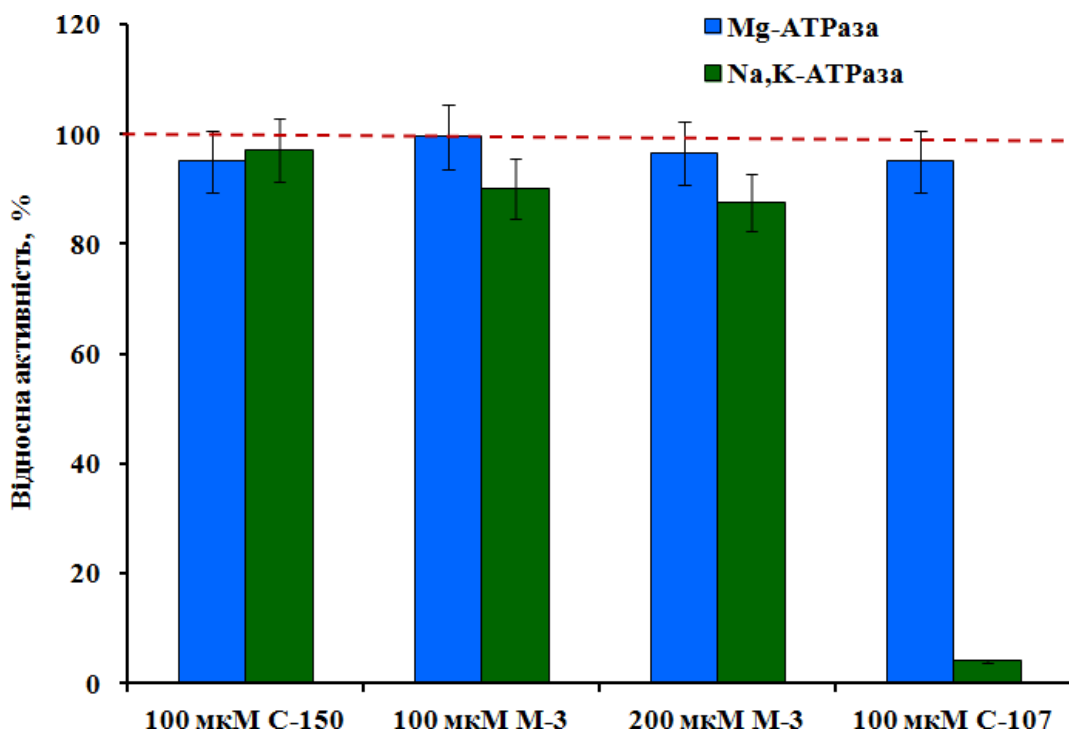


Рис. 3.7. Активність Na^+, K^+ -АТРази та Mg^{2+} -АТРази ПМ за дії калікс[4]аренів С-107, С-150 та модельної сполуки М-3 ($M \pm m$, $n = 5$).

За 100 % прийнято значення ензиматичної активності у відсутності калікс[4]аренів та сполуки М-3 у середовищі інкубації.

Показано, що калікс[4]арен **С-107** лише при концентрації 100 мкМ здатний незначно (на 5 %) інгібувати Mg^{2+} -АТРазну активність. Структурні фрагменти цього калікс[4]арену **С-150** (100 мкМ) та **М-3** (100 та 200 мкМ) практично не впливали на досліджувані ензиматичні системи (рис. 3.7). Хоча треба відзначити, що сполука **М-3** у концентрації 200 мкМ здійснювала незначний (приблизно на 15 %) інгібувальний ефект на Na^+, K^+ -АТРазну (але не на Mg^{2+} -АТРазну) активність.

Отже, інгібувальна дія калікс[4]арену **С-107** на активність Na^+, K^+ -АТРази насамперед пов'язана саме з кооперативним впливом двох просторово орієнтованих на каліксареновій платформі амінофосфонових груп, а не з дією тетрафенольного макроциклу як такого, або дією окремого амінофосфонового залишку.

Для подальшого визначення ролі структури макроциклічної платформи калікс[4]арену **C-107** та взаємного розташування амінофосфонових угруповань на ній у проявленні інгібувальної дії на Na^+, K^+ -АТРазну активність ПМ ГМК матки був досліджений калікс[4]арен **C-160**, що є регіоізомером калікс[4]арену **C-107**. Дані калікс[4]арени відрізняються один від одного положенням амінофосфонових та трет-бутильних залишків на верхньому вінці каліксаренової чаші та положенням пропокси залишків на нижньому вінці макроциклу: у випадку калікс[4]арену **C-160** вказані залишки, розташовані у проксимальних положеннях каліксаренової основи, на відміну від калікс[4]арену **C-107**, у якого ці ж залишки знаходяться у дистальних положеннях. Проведені дослідження вказують на те, що зміна положення замісників каліксаренової чаші дуже важлива, так як це призводить до повної втрати інгібувальних властивостей калікс[4]арену **C-160** щодо Na^+, K^+ -АТРази порівняно з калікс[4]ареном **C-107**. Поряд з цим, калікс[4]арен **C-160** не впливає на активність Mg^{2+} -АТРази, калікс[4]арен **C-107** інгібує її лише на 20 % (рис. 3.8).

Отже, проаналізувавши отримані експериментальні дані, можна припустити, що головну роль у подібній відмінності між властивостями калікс[4]аренів **C-107** та **C-160** відіграє саме відмінність у розташуванні амінофосфонових замісників цих калікс[4]аренів (у випадку калікс[4]арену **C-107** вони знаходяться в положеннях 5,17, а у випадку калікс[4]арену **C-160** – в положеннях 5,11). При цьому, зміни положення трет-бутильних та пропокси залишків можна вважати несуттєвими для інгібування Na^+, K^+ -АТРази, тому що пропокси залишки на нижньому вінці макроциклу присутні також у складі молекули калікс[4]арену **C-150**, який не здатний інгібувати АТР-гідролазну реакцію (рис. 3.8), а трет-бутильні замісники взагалі відсутні у таких калікс[4]аренів, як **C-97** та **C-99**, які, подібно до калікс[4]арену **C-107**, є високоефективними інгібіторами Na^+, K^+ -АТРазної активності ПМ клітин міометрія.

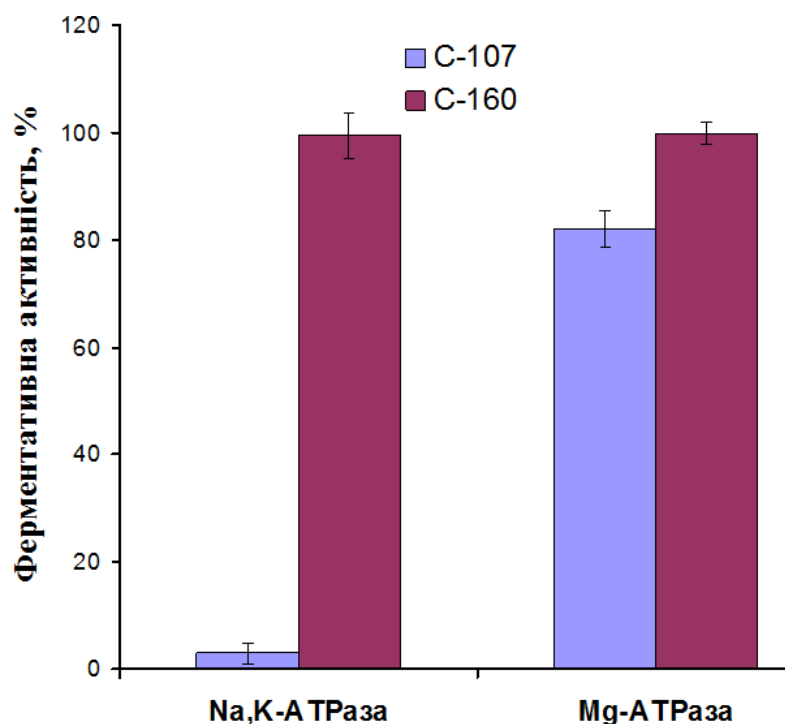


Рис. 3.8. Порівняльне дослідження впливу калікс[4]аренів C-107 та C-160 (100 мкМ) на Na^+, K^+ -АТРазу та Mg^{2+} -АТРазу активності ПМ клітин міометрія ($M \pm m$; $n = 5$).

За 100 % прийнято значення ензиматичної активності у відсутності калікс[4]аренів у середовищі інкубації.

Таким чином, інгібіторний ефект калікс[4]арену **C-107** на активність Na^+, K^+ -АТРази ПМ обумовлений кооперативним ефектом двох амінофосфонових залишків, розташованих на певній відстані на каліксареновій чаші.

3.3. Особливості дії калікс[4]арену C-107 на активність Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин

Ми дослідили вплив калікс[4]арену **C-107** у різних концентраціях (відповідно 10, 25, 50, 75 та 100 нМ) на залежність активності Na^+, K^+ -АТРази від концентрації убаїну (рис. 3.9).

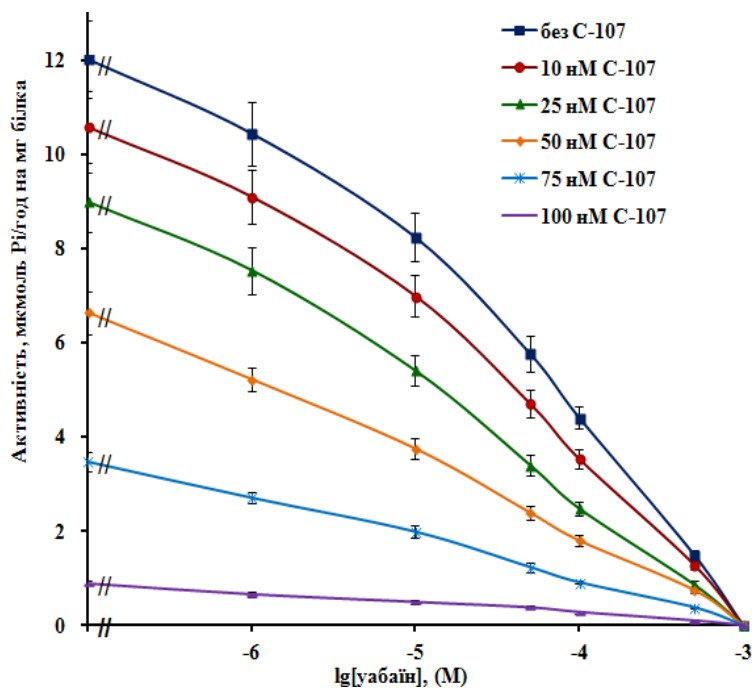


Рис. 3.9. Вплив калікс[4]арену **C-107** у різних концентраціях на залежність ензиматичної активності Na^+, K^+ -АТРази у фракції ПМ клітин міометрія від концентрації уабаїну ($M \pm m; n = 5$).

Спостерігається зниження активності Na^+, K^+ -АТРази у всіх випадках з різним ступенем ефективності. Знайдено, що при зростанні концентрації калікс[4]арену **C-107** відбувається зниження ефективності інгібування ($I_{0,5}$) Na^+, K^+ -АТРази уабаїном (рис. 3.10).

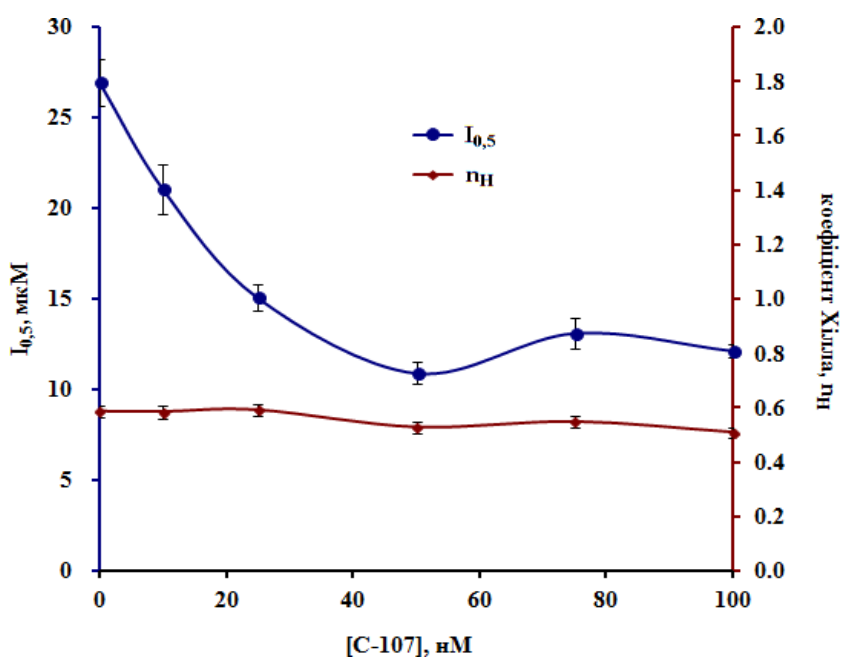


Рис. 3.10. Вплив калікс[4]арену С-107 на кінетичні параметри (константу гальмування $I_{0,5}$ і коефіцієнт Хілла n_H) дії убаїну на активність Na^+, K^+ -АТРази у фракції ПМ клітин міометрія ($M \pm m; n = 5$).

Отже, калікс[4]арен С-107, призводячи до гальмування активності Na^+, K^+ -АТРази стосовно контролю, збільшує спорідненість ензиму до серцевого глікозиду. Значення коефіцієнта Хілла при цьому не змінюється ($n_H \approx 0,5$). Таким чином кооперативність інгібувальної дії убаїну не залежить від наявності калікс[4]арену С-107, залишаючись від'ємною ($n_H < 1$) в діапазоні концентрацій калікс[4]арену до 10-100 нМ.

На відміну від цього, використання різних концентрацій убаїну не впливає на константу гальмування $I_{0,5}$ і коефіцієнт Хілла n_H для калікс[4]арену С-107.

Отже, можна стверджувати, що у присутності калікс[4]арену С-107 збільшується спорідненість Na^+, K^+ -АТРази ПМ клітин міометрія до убаїну, при цьому не змінюється величина коефіцієнта Хілла інгібуючої дії серцевого глікозиду на цей ензим. Проте, кооперативність дії калікс[4]арену С-107 на активність Na^+, K^+ -АТРази є позитивною ($n_H = 1,4-1,8$). Таким чином можна припустити, що збільшення афінитету убаїну до Na^+, K^+ -АТРази викликане підсилюючим впливом калікс[4]арену С-107 на взаємодію “убаїн – убаїновий рецептор”.

Для подальшої кінетичної інтерпретації впливу калікс[4]арену С-107 на ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази ПМ міометрія ми дослідили його дію на характер концентраційних залежностей даної активності від АТР та іонів Mg.

Підвищення концентрації АТР в середовищі інкубації в діапазоні від 0,01 до 1 мМ призводило до підвищення ензиматичної активності Na^+, K^+ -АТРази (рис. 3.11, без С-107) за умов фіксованої концентрації $MgCl_2$ (3 мМ) в інкубаційному середовищі.

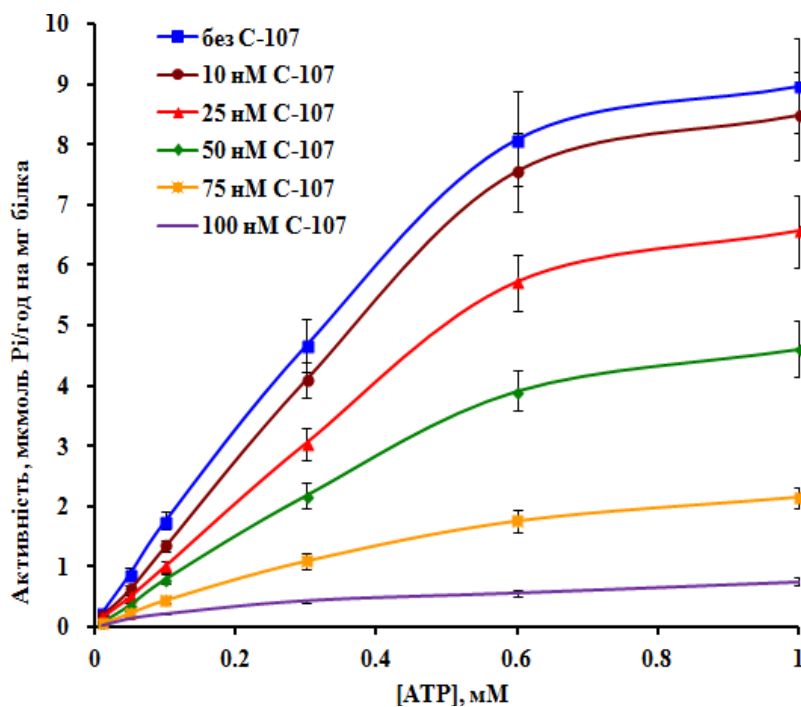


Рис. 3.11. Вплив калікс[4]арену **C-107** у різних концентраціях на залежність питомої ензиматичної активності Na^+, K^+ -АТРази у фракції ПМ клітин міометрія від концентрації АТФ ($M \pm m$; $n = 5$).

Концентрація MgCl_2 – 3 мМ.

Методом Хілла були розраховані уявна константа Міхаеліса K_m по нуклеозидтрифосфату АТФ та коефіцієнт Хілла n_H , які становлять $204,6 \pm 11,1$ мкМ та $1,38 \pm 0,15$ відповідно ($n = 5$) (рис. 3.12). Отримане нами значення K_m за АТФ для Na^+, K^+ -АТРази корелює з даними літератури. Величина K_m реакції гідролізу АТФ у нервовій тканині пацюків складає 260 мкМ [118].

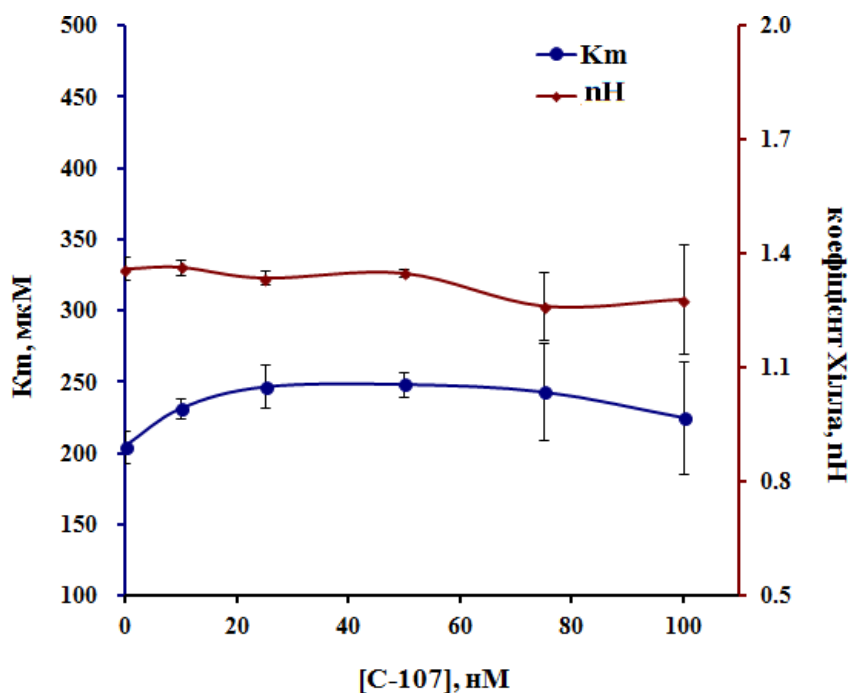


Рис. 3.12. Вплив калікс[4]арену **C-107** на кінетичні параметри (константу Міхаеліса K_m і коефіцієнт Хілла n_H) дії АТФ на активність Na^+, K^+ -АТРази у фракції ПМ клітин міометрія ($M \pm m$; $n = 5$).

Концентрація [C-107] = 0 мМ – контроль. Концентрація $MgCl_2$ – 3 мМ.

Нами вивчався вплив калікс[4]арену **C-107** на кінетичні параметри, що характеризують спорідненість ензиму до АТФ. Було досліджено вплив 5-ти концентрацій калікс[4]арену **C-107** (відповідно 10, 25, 50, 75 та 100 нМ) на концентраційну залежність від АТФ. В усіх випадках спостерігається зниження з різним ступенем ефективності активності Na^+, K^+ -АТРази, при цьому залежність ензиматичної активності від АТФ виявляє характер, подібний до відповідної контрольної залежності без калікс[4]арену **C-107**, але платовий рівень активності зі зростанням концентрації калікс[4]арену знижується. Розраховані середні значення уявної константи Міхаеліса K_m та коефіцієнти Хілла n_H за присутності різних концентрацій калікс[4]арену **C-107** достовірно не відрізняються від контрольних значень даних кінетичних параметрів у відсутності ефектору в середовищі інкубації (рис. 3.12). Величина коефіцієнту Хілла n_H вказує на позитивний кооперативний ефект залежності ензиматичної

активності Na^+, K^+ -АТРази від концентрації АТР, який майже не змінюється за присутності калікс[4]арену **C-107** у різних концентраціях (рис. 3.12).

Отже, калікс[4]арен **C-107**, призводячи до гальмування активності Na^+, K^+ -АТРази стосовно контролю, практично не змінює уявної спорідненості ензиму до АТР, а також кооперативність ензиматичної реакції по АТР. Очевидно, що в такому випадку інгібування калікс[4]ареном **C-107** відбувається за рахунок зниження числа обертів ензиму, тобто V_{\max} АТРазної реакції.

Таким чином, інгібувальний ефект калікс[4]арену **C-107** на питому ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази не залежить від кількості АТР у середовищі інкубації, що вказує на відсутність конкуренції між АТР та калікс[4]ареном **C-107**. Тому можна припустити, що субстратний центр Na^+, K^+ -АТРази та гіпотетичний сайт взаємодії калікс[4]арену **C-107** не перекриваються на поверхні ензиму. Зростання коефіцієнта Хілла дії калікс[4]арену **C-107** може свідчити про зміну субодиничного складу ензиму у разі підвищенні концентрації АТР.

3.4. Дослідження проникнення калікс[4]арену C-107 у гладеньком'язові клітини матки

Важливим питанням для нас є можливість проникнення калікс[4]аренів у клітину. Згідно з нашими спостереженнями деяким калікс[4]аренам властива автофлуоресценція. Тому для вивчення проникності калікс[4]аренів крізь мембрани клітин ми використали метод конфокальної мікроскопії.

Спочатку досліджували флуоресцентні характеристики двох калікс[4]аренів – **C-90** та **C-107**. Лазерний скануючий конфокальний мікроскоп LSM 510 META, який ми використали, здатен опромінювати препарат на 405 нм (діодний лазер). Тому ми опромінювали калікс[4]арени на цій довжині хвилі. На жаль, при опроміненні на 405 нм квантовий вихід калікс[4]арену **C-90** був не значним і не достатнім для реєстрації сигналу, а також суттєво перекривався з автофлуоресценцією власне суспензії клітин [119].

Тому для подальших досліджень проникності калікс[4]аренів у ГМК матки ми обрали калікс[4]арен **C-107**. Він мав більш високий рівень флуоресцентного сигналу порівняно з калікс[4]ареном **C-90** при збудженні хвилями видимого спектру, і його піки флуоресценції збудження та емісії були зміщені у спектр видимого світла (рис. 3.13). Це дозволило нам використати калікс[4]арен **C-107** для проведення подальших експериментальних робіт на конфокальному мікроскопі.

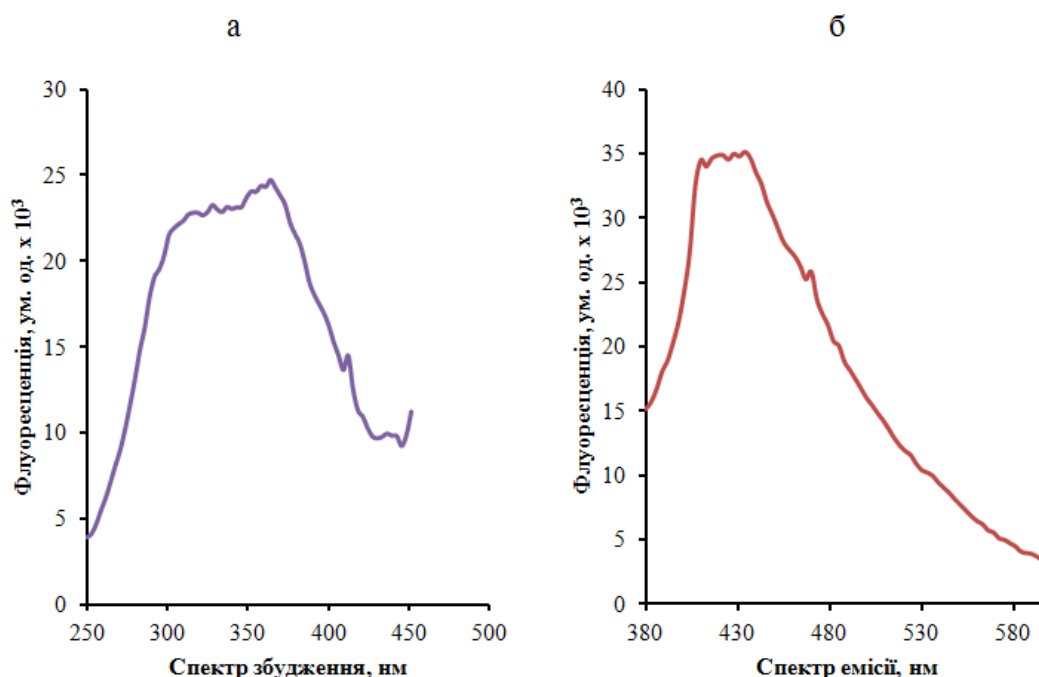


Рис. 3.13. Спектр збудження та емісії калікс[4]арену **C-107**: (а) – при збудженні на довжині хвилі 363 нм, (б) – при емісії на 470 нм.

Ми проводили експерименти на іммобілізованих на полі-L-лізині ГМК клітинах. Конфокальну мікроскопію було застосовано в динаміці, фіксуючи зображення через кожні 15 с (див розділ «Матеріали та методи досліджень»), адже кінетика проникнення калікс[4]арену **C-107** крізь мембрану та накопичення в клітинах не була відома. Спочатку протягом перших 20-30 с фіксували фоновий рівень флуоресценції клітин, після чого вносили калікс[4]арен **C-107** (кінцева концентрація 50 мкМ). Після аплікації калікс[4]арену **C-107** одразу було помітне суттєве збільшення флуоресценції як

в середині клітин, так і у полі об'єктиву. Тобто на рис. 3.5 спостерігаємо флуоресценцію калікс[4]арену **C-107**, який знаходиться в середовищі інкубації та протягом 15 с вимірювання проникає в клітини. У ГМК флуоресценція калікс[4]арену **C-107** накладається на автофлуоресценцію міоцитів, що призводить до суттєвого підвищення квантового виходу всередині клітин. Далі спостерігається зниження рівня флуоресценції як всередині клітин, так і в середовищі інкубації, що, можливо, пов'язано з вигоранням калікс[4]арену **C-107** під впливом лазерного опромінення.

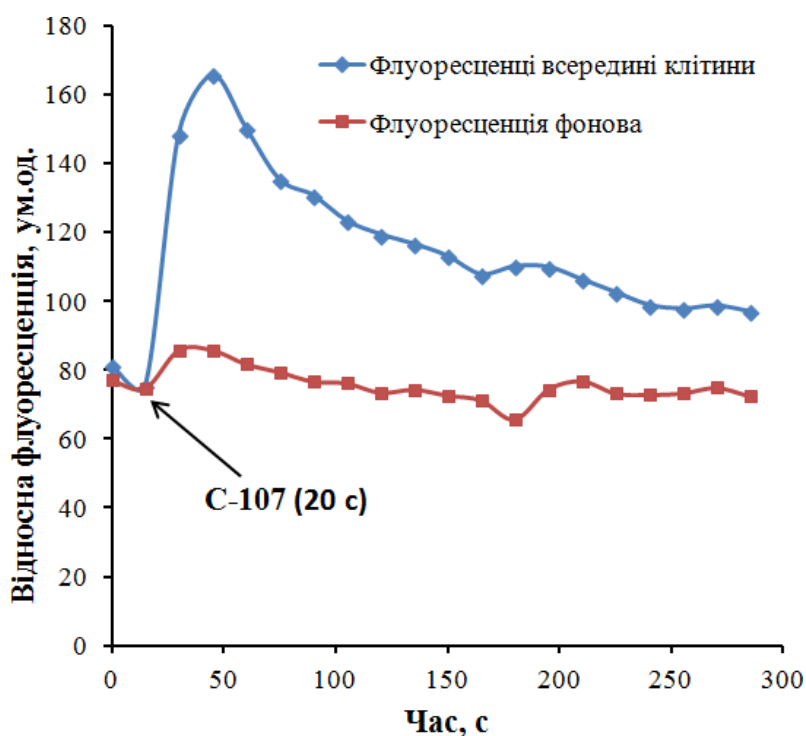


Рис. 3.14. Кінетика флуоресценції ГМК на конфокальних зображеннях до та після додавання 50 мкМ калікс[4]арену **C-107** (30 с, позначено стрілкою). $\lambda_{zb} = 405$ нм., $\lambda_{fl} = 420$ нм. Наведено результати типового експерименту.

Ми вважаємо, що швидке підвищення флуоресценції в середині ГМК, порівняно з фоновою флуоресценцією (рис. 3.14), після внесення калікс[4]арену **C-107** свідчить про вільне надходження зазначеної сполуки через ПМ. Зважаючи на швидку кінетику накопичення калікс[4]арену **C-107** всередині клітин, можна висловити припущення, що вказана молекула зв'язується з мембранами завдяки своїм амфифільним властивостям. До того ж саме

взаємодія з мембранними структурами може призводити до суттєвого підвищення квантового виходу, оскільки флуоресценція калікс[4]аренів в органічних розчинниках суттєво підсилюється [120], у той час як водні розчини гасять флуоресценцію [121]. Таким чином, калікс[4]арен **C-107** може не тільки проникати крізь мембрани, а також вбудовуватись та накопичуватись в них.

Так як фізико-хімічні властивості калікс[4]аренів **C-107** та **C-90** є дуже подібними, то можна умовно екстраполювати дані, отримані в експериментах з калікс[4]ареном **C-107**, на калікс[4]арен **C-90** та припустити, що він також здатен проникати крізь ПМ, накопичуватися всередині мембран. Варто зазначити, що ефективність цих процесів для вказаних калікс[4]аренів може відрізнятись.

ВИСНОВКИ

Отже, відповідно до мети та завдань даної роботи був ретельно досліджений та вивчений вплив обраних у минулих дослідженнях калікс[4]аренів (С-97, С-99, С-107) на Na^+, K^+ -АТРази систему плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин. В результаті опрацювання експериментальних даних зроблені такі висновки:

1. Калікс[4]арени С-97, С-99 та С-107 ефективніше ніж убаїн, пригнічують ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази і не впливають на активність Mg^{2+} -АТРази ПМ.
2. Калікс[4]арен С-107 збільшує спорідненість Na^+, K^+ -АТРази до убаїну та не впливає на спорідненість до АТР.
3. В прояві інгібувальної дії калікс[4]арену С-107 на активність Na^+, K^+ -АТРази важливе значення мають:
 - А. сукупний ефект «чаші» С-150 та фрагменту М-3;
 - Б. взаємне розташування амінофосфонових груп у молекулі калікс[4]арену;
4. Калікс[4]арен С-107 може не тільки вбудовуватись та накопичуватись в плазматичній мембрані, але й проникати в міоцити.

Беручи до уваги вищезазначені результати, можна сказати, що вивчені калікс[4]арени являються вельми перспективними молекулярними платформами для створення таких фармакологічних препаратів, що могли б запобігати та протидіяти порушенням контрактильної активності міометрія.

Наразі у відділі біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАНУ ми продовжуємо працювати над дослідженням закономірностей впливу каліксаренів на АТР-гідролазні ензиматичні системи, зокрема на активність Na^+, K^+ -АТРази, маючи на меті якомога більше розкрити потенціал калікс[4]аренів у якості потенційних ефекторів мембранозв'язаних іон-транспортуючих АТРази систем.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Кальченко В.І., Родік Р.В., Бойко В.І. Каліксарени. Перспективи медико-біологічного застосування. Журнал органічної та фармацевтичної хімії. 2006, 3(4):13-29.
2. 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.
3. Болдырев А.А. Na^+, K^+ -АТРаза как олигомерный ансамбль. *Биохимия.* 2001, 66(6):1013-1025.
4. Владимирова Н.М., Сауткина Е.Н., Муравьева Т.И. и др. Структурные особенности изоферментов Na^+, K^+ -АТР-азы мозга теленка. *Биоорганическая химия.* 2003, 29(2):146-158.
5. Лопина О.Д. Na^+, K^+ -АТР-аза: структура, механизм и регуляция активности. *Биологические мембраны.* 1999, 16(6): 584-603.
6. Цимбалюк О.В., Костерін С.О. Na^+, K^+ -АТРаза, ендогенні кардіостероїди та їхня трансдукторна роль. *Український біохімічний журнал.* 2012, 84(1): 5-17.
7. Lingrel J.B., Kuntzweiler T. Na^+, K^+ -АТPase. *The Journal of Biological Chemistry.* 1994, 269(31): 19659-19662.
8. Репин В.С. Критические факторы химической регуляции развития. М.: Медицина, 1980. 244 с.
9. 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^+/K^+ -АТPase. // *Nature.* V. 467. P. 99–102. 02 September 2010.
10. Санагурський Д. І. Об'єкти біофізики: Монографія. Львів. Видавничий центра ЛНУ імені Івана Франка, 2008. 522 с.
11. Burdyga T., Richard J. P. Chapter 86 – Calcium Homeostasis and Signaling in Smooth Muscle. *Joseph Hill, Boston/ Waltham.* 2012: 1155-1171.

12. Лопина О.Д. Взаимодействие каталитической субъединицы Na,K-АТФазы с клеточными белками и другими эндогенными регуляторами. Биохимия. 2001, 66(вып. 6): 1389-1400.
13. Кравцов А.В., Кравцова В.В. Регуляция Na⁺,K⁺-АТФазы: эффекты ионов Mg и Ca. Український біохімічний журнал. 2001, 73(2): 5-27.
14. Павлов К.В., Соколов В.С. Электрогенный транспорт ионов Na⁺,K⁺ - АТФазой. Биологические мембраны. 1999, 16(6): 604-637.
15. Scheiner-Bobis G., The sodium pump. Its molecular properties and mechanics of ion transport. Eur. J. Biochem. 2002, 269: 2424-2433.
16. Therien A.G., Blostein R. Mechanisms of sodium pump regulation. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2000, 279: C541–C566.
17. Kotyk A. Transport adenosinetriposphatases. Cell. Molec. Biol. Letters. 1997, 2(1): 131-144.
18. Кравцов А.В., Алексеенко И.Р. Механизмы регуляции векторных ферментов биомембран. К.: Наук. думка, 1990. 175 с.
19. Бабич Л.Г., Фомин В.П., Костерин С.А. Влияние мембранного потенциала на Mg²⁺ ,АТФ-зависимый транспорт Ca²⁺ через гладкомышечную сарколему. Биохимия. 1990, 55: 1890-1901.
20. Болдырев А.А. Na⁺,K⁺-АТФаза – свойства и биологическая роль. Соросовский образовательный журнал. 1998, 4: 2-9.
21. Веклич Т.О., Костерин С.О. Порівняльне дослідження властивостей Na⁺,K⁺-АТФази та Mg²⁺-АТФази плазматичної мембрани клітин міометрія. Український біохімічний журнал. 2004, 76(3): 5-17.
22. Geering K. FXYD proteins: new regulators of Na-K-ATPase. American Journal of Physiology - Renal Physiology. 2006, 290: 241-250.
23. Cheng Y., Zhou M., Wang Y. Arctigenin antagonizes mineralocorticoid receptor to inhibit the transcription of Na⁺/K⁺-ATPase. J. Recept Signal Transduct Res. 2016, 36(2): 181-188.

24. Drummond C.A., Hill M.C., Shi H. et al. Na/K-ATPase signaling regulates collagen synthesis through microRNA-29b-3p in cardiac fibroblasts. *Physiol Genomics*. 2016, 48(3): 220-229.
25. Huang H., Chen Y.M., Zhu F. et al. Down-regulated Na⁺/K⁺-ATPase activity in ischemic penumbra after focal cerebral ischemia/reperfusion in rats. *INT. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015, 8(10): 12708-12717.
26. Rajasekaran A.K., Rajasekaran S.A. Role of Na-K-ATPase in the assembly of tight junctions. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2003, 285: F388-F396.
27. Singh P., Kesharwani R.K., Misra K., Rizvi S.I. The modulation of erythrocyte Na⁺/K⁺-ATPase activity by curcumin. *J. Adv. Res.* 2015, 6(6): 1023-1030.
28. Xie Z., Askari A. Na⁺/K⁺-ATPase as a signal transducer. *Eur. J. Biochem.* 2002, 269: 2434-2439.
29. Schoner W. Sodium pump and steroid hormone receptor Na⁺/K⁺-ATPase. *Eur. J. Biochem.* 2002, 269: 2423.
30. 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.
31. Blaustein M.P. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca²⁺ stores and cell responsiveness. *American Journal of Physiology*. 1993, 264(6 (Pt 1)): C1367-C1387.
32. 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.
33. Гютше Ч.Д. Каликсарены. Химия комплексов “гость-хозяин”. / Под ред. Фегтле Ф. и Вебера В. М.: Мир, 1988, 445с.
34. Bohmer V. Calixarenes, Macrocycles with (Almost) Unlimited Possibilities. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1995, 34: 713-745.
35. Neri P., Sessler J.L., Wang M-X. *Calixarenes and Beyond*. Springer International Publishing Switzerland. 2016, 1062 p.

36. Gutsche C.D., Alam I. Calixarenes 23. Complexation and Catalytic Properties of Water Soluble Calixarenes. *Tetrahedron*. 1988, 44: 4689 – 4694.
37. Gutsche C.D. Calixarenes: Synthesis and Historical Perspectives. *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry*. New York. 2004, 1: 153 – 160.
38. 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.
39. Danylyuk O. Solid-state complexes of water-soluble calixarenes with biorelevant molecules: Dissertation within International Ph.D Studies. Warsaw, 2007: 160p.
40. Cherenok S., Dutasta J.P., Kalchenko V. Phosphorus-containing chiral macrocycles. *Current Org. Chem*. 2006, 10: 2307–2331.
41. Tairov M., Kalchenko V. Chiral Calixarenes. *Ukrainian Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2004, 29(2): 3-19.
42. Cherenok S., Kalchenko V. Phosphorus-containing calixarenes. *Topics Heterocyclic Chemistry*. 2009, 20: 229-273.
43. 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.
44. Matthews S.E., Beer P.D. Calixarene-Based Anion Receptors. *Calixarenes* : [eds. Z. Asfari et al.]. 2001, 421-439.
45. Rodik R.V., Boyko V.I., Kalchenko V.I. Calixarenes in bio-medical researches. *Curr. Med. Chem*. 2009, 16(13): 1630 – 1655.
46. Данилович Г.В., Данилович Ю.В., Коломієць О.В. та ін. Зміни поляризації плазматичної та внутрішньої мітохондріальної мембран клітин міомеріа за дії каліксаренів – інгібіторів Na^+ , K^+ -АТРази плазматичної мембрани. *Український біохімічний журнал*. 2012, 84(6): 37-48.
47. 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.

- 48.Лабинцева Р.Д., Бевза О.В., Бевза А.А. та ін. Захисний вплив тіакалікс[4]арентетрасульфону на інгібування АТР-гідролазної активності субфрагмента А-1 міозину міометрія катіонами важких металів. Український біохімічний журнал. 2014, 86(6): 154-166.
- 49.Park H.S., Lin Q., Hamilton A.D. J. Protein Surface Recognition by Synthetic Receptors: A Route to Novel Submicromolar Inhibitors for α -Chymotrypsin. Am. Chem. Soc. 1999, 121: 8-13.
- 50.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.
- 51.Park H.S., Lin Q., Hamilton A.D. Modulation of protein-protein interactions by synthetic receptors: design of molecules that disrupt serine protease-proteinaceous inhibitors interaction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002, 99(8): 5105-5109.
- 52.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.
- 53.Cherenok S., Vovk A., Muravyova I. et al. Calix[4]arene α -aminophosphonic acids: asymmetric synthesis and enantioselective inhibition of an alkaline phosphatases. Org. Lett. 2006, 8(4): 549-552.
- 54.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.
- 55.Francesc S., Cozzolino A., Caputo I. et al. Transglutaminase surface recognition by peptidocalix[4]arene diversomers. Tetrahedron Lett. 2005, 46(10): 1611-1615.
- 56.Schühlea D.T., Petersa J.A., Schatz J. Metal binding calixarenes with potential biomimetic and biomedical applications. Coordination Chemistry Rev. 2011, 255(23-24): 2727-2745.
- 57.Perret F., Lazar A., Coleman A. Biochemistry of the para-sulfonato-calix[n]arenes. Chem. Commun. 2006, 2435-2438.

58. 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.
59. 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.
60. Shinkai S., Mori S., Koreishi H. et al. Hexasulfonated Calix[6]arene Derivatives: A New Class of Catalysts, Surfactants, and Host Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 1986, 108: 2409-2416.
61. 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.
62. Jin T., Kinjo M., Koyama T. et al. Selective Na⁺ Transport through Phospholipid Bilayer Membrane by a Synthetic Calix[4]arene Carrier. *Langmuir*. 1996, 12(11): 2684-2689.
63. 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.
64. Balasahe S., Nimsea T. Kim. Biological applications of functionalized calixarenes. *Chem. Soc. Rev.* 2013, 42: 366-386 .
65. De Fatima A., Fernandes S. A., Sabino A. A. Calixarenes as new platforms for drug design. *Curr. Drug Disc. Tech.* 2009, 6: 151-170.
66. 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.
67. Родік Р.В. Антимікробна та протівірусна активність каліксаренів. *Журнал органічної та фармацевтичної хімії*. 2015, 13(1): 67-78.
68. André S., Sansone F., Kaltner H. et al. Calix[n]arene-based glycoclusters: bioactivity of thiourea-linked galactose/lactose moieties as inhibitors of binding of medically relevant lectins to a glycoprotein and cell-surface glycoconjugates and

- selectivity among human adhesion/growth-regulatory galectins. *Chembiochem.* 2008, 9(10): 1649-1661.
69. 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.
70. 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.
71. 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.
72. 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.
73. 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.
74. Gutsche C.D. Calixarenes. In *Host Guest Complex Chemistry Macrocycles; Synthesis, Structures, Applications* / Eds by Weber E., Vögtle F. –Springer: Tokyo. 1985, 421 p.
75. 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.
76. 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.
77. 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.

78. 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.
79. Memisoglu E., Bochot A., Oezalp M. et al. Direct formation of nanospheres from amphiphilic-cyclodextrin inclusion complexes. *Pharm. Res.* 2003, 20: 117-125.
80. 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.
81. Lalor R., DiGesso J.L., Mueller A. et al. Efficient gene transfection with functionalized multicalixarenes. *Chem. Commun.* 2007, 4907 – 4909.
82. 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.
83. 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 Ac³⁺ chelators. *Bioconjug. Chem.* 1999, 10(4): 613-623.
84. Khadra K., Mizyed S., Marji D. et al. Synthesis of novel p-tert-butylcalix[4]arene Schiff bases and their complexes with C₆₀, potential HIV-Protease inhibitors. *Spectrochimica Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 2015, 136: 1869-1874.
85. Lamartine R., Tsukada M., Wilson D., Shirata A. Antimicrobial activity of calix[n]arene. *C. R. Chimie.* 2002, 5(3): 163-169.
86. 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.
87. 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.

88. Arosio D., Fontanella M., Baldini L. et al. A synthetic divalent cholera toxin glycoligand having higher affinity than natural GM1 oligosaccharide. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127(11): 3660-3661.
89. 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.
90. Coleman A.W., Perret F., Moussa A. et al. Calix[n]arenes as Protein Sensors. *Top. Curr. Chem.* 2007, 277: 31-88.
91. Carden D.E., Diamond D., Miller A.J. An improved Na⁺-selective microelectrode for intracellular measurements in plant cells. *J. Exp. Bot.* 2001, 52(359): 1353-1359.
92. 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.
93. 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.
94. 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.
95. 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.
96. 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.

97. 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.
98. Paquet V., Zumbuehl A., Carreira E.M. Biologically active amphoterecin B-calix[4]arene conjugates. *Bioconjugate Chem.* 2006, 17(6): 1460-1463.
99. 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.
100. 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.
101. 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.
102. Amedee T., Mironneau Ch., Mironneau J. Isolation and contractile responses of single pregnant rat myometrial cells in short-term primary culture and the effects of pharmacological and electrical stimuli. *British Journal of Pharmacology.* 1986, 88(4): 873-880.
103. Mollard P., Mironneau J., Amedee T., Mironneau C. Electrophysiological characterization of single pregnant rat myometrial cells in short-term primary culture. *American Journal of Physiology: Cell Physiology.* 1986, 19(1): C47-C54.
104. Кондратюк Т.П., Курский М.Д. Системы вторичных посредников и функция гладких мышц. К.: Наук. Думка, 1992. 260 с.
105. Костерин С.А. Транспорт кальция в гладких мышцах. К.: Наук. думка, 1990. 216с.
106. Word R.A., Kamm K.E. Regulation of smooth muscle contraction by myosin phosphorylation // *Cellular aspects of smooth muscle function* / Ed. Kao C.Y., Carsten M.E. – Cambridge, University Press. 1997, 209-252.

107. Кондратюк Т.П., Быченко С.Ф., Прищепя Л.А. та ін. Выделение и характеристика фракции плазматических мембран миомерия свинки. Украинский биохимический журнал. 1986, 58(4): 50-56.
108. 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): 248-282.
109. Flynn E.R.M., Bradley K.N., Muir T.C., McCarron J.G. Functionally separate intracellular Ca²⁺ stores in smooth muscle. The Journal of Biological Chemistry. 2001, 276(39): 36411-36418.
110. Веклич Т.О., Костерин С.О., Шинлова О.П. Катіонна специфічність системи акумуляції Ca²⁺ в мітохондріях клітин гладенького м'яза. Український біохімічний журнал. 2002, 74(1): 42-48.
111. 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.
112. Курганов В.И. Аллостерические ферменты. М.: Наука, 1978. 248 с.
113. Кокунин В.А. Статистическая обработка данных при малом числе опытов. Украинский биохимический журнал. 1975, 47(6): 776-791.
114. Костерин С.А., Бурчинская Н.Ф. Метод определения кинетических характеристик Ca²⁺ - транспортирующих систем субклеточных структур гладких мышц. Украинский биохимический журнал. 1987, 59(2): 66-69.
115. Valente R.C., Capella L.S., Monteiro R.Q. et al. Mechanisms of ouabain toxicity. FASEB J. 2003, 17(12): 1700-1702.
116. Wang H., Haas M., Liang M. et al. Ouabain assembles signaling cascades through the caveolar Na⁺/K⁺-ATPase. The Journal of Biological Chemistry. 2004, 279(17): 17250-17259.
117. Boldyrev A.A. Na⁺,K⁺-ATPase: 40 years of investigations. Membr. Cell. Biol. 2000, 13(6): 715-719.

118. Введение в биомембранологию. Под. ред. Болдырева А.А. М.: Изд-во МГУ. 1990. 280 с.
119. Ladokhin A.S., Jayasinghe S., White S.H. How to measure and analyze tryptophan fluorescence in membranes properly, and why bother. *Anal. Biochem.* 2000, 285(2): 235–245.
120. Kim J.S., Quang D.T. Calixarene-derived fluorescent probes. *Chem. Rev.* 2007, 107(9): 3780–3799.
121. Kapoor R.G., Mirshra V.N. Enhancement in the fluorescence intensity of rhodamine B by some surfactants. *J.Indian Chem. Soc.* 1976, 53: 965-967.