

**+НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О.В. ПАЛЛАДІНА**

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ВЕКЛІЧ ТЕТЯНА ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК 577.152.3.

ДИСЕРТАЦІЯ

**МЕХАНІЗМИ ДІЇ КАЛІКСАРЕНІВ НА КАТІОН-ТРАНСПОРТУВАЛЬНІ
АТР-ГІДРОЛАЗИ ТА КАЛЬЦІЄВИЙ ГОМЕОСТАЗ В МІОМЕТРІЇ**

Спеціальність 03.00.04 – Біохімія

Галузь знань 091 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Векліч Т.О.

Науковий консультант: КОСТЕРІН СЕРГІЙ ОЛЕКСІЙОВИЧ
академік НАН України, доктор біологічних наук, професор

Київ-2021

АНОТАЦІЯ

Векліч Т.О. Механізми дії каліксаренів на катіон-транспортувальні АТР-гідролази та кальцієвий гомеостаз в міометрії. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. Київ, 2021.

Дисертаційна робота присвячена з'ясуванню біохімічних та фізико-хімічних механізмів дії каліксаренів на мембранозв'язані катіон-транспортувальні електроензими гладеньком'язових клітин та на неензиматичний гідроліз АТР.

Гладенькі м'язи відіграють важливу роль для нормального функціонування внутрішніх органів, вони забезпечують скорочення та розслаблення уrogenітальної системи, шлунково-кишкового тракту, кровоносних та лімфатичних судин, сфінктера зіниці ока, дихальних шляхів. Для реалізації процесів скорочення/розслаблення гладеньких м'язів, зокрема, міометрія, необхідно, щоб рівень цитоплазматичного Ca^{2+} у міоплазмі динамічно та оборотно змінювався в діапазоні концентрацій від наближено 100 нМ до 1 мкМ. Іони кальцію є критично необхідними для реалізації широкого спектру клітинних функцій. Вони є важливими внутрішньоклітинними месенджерами і саме під контролем Ca^{2+} -залежних сигнальних шляхів відбувається більшість біохімічних та фізіологічних процесів, наприклад: скорочення м'язів (скелетних, гладеньких, міокарду), запліднення, проліферація, секреція, нейротрансмісія, клітинний ріст, а також апоптоз та некроз. Проте, незважаючи на значну кількість експериментальних біохімічних та біофізичних робіт, присвячених дослідженню внутрішньоклітинних кальцієвих сигналів в міометрії, маємо вельми обмежені дані щодо механізмів підтримання фізіологічно значущої концентрації іонів Са та її спрямованої регуляції у міоцитах матки в нормі та за патологічних станів.

На сьогодні немає сумнівів, що деякі патології скоротливої функції гладеньких м'язів, наприклад, гіпо- та гіпертонус матки, невиношування плоду, гіпо- та гіпертензія, астма, атонія кишкового тракту та інші патології його моторики пов'язані з порушенням кальцієвого гомеостазу в міоцитах.

У міоцити гладеньких м'язів Ca^{2+} потрапляє з позаклітинного простору крізь плазматичну мембрану через різноманітні кальцієві канали або з внутрішньоклітинних Ca^{2+} депо внаслідок його пасивного транспорту за хімічним градієнтом. Основними системами енергозалежного видалення Ca^{2+} з цитозолу є кальцієві помпи плазматичної мембрани та саркоплазматичного ретикулума, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник плазматичної мембрани, а також Ca^{2+} -уніпортер мітохондрій. Важливу роль у забезпеченні контролю скорочення - розслаблення м'язових клітин, зокрема гладеньком'язових, відіграють мембранозв'язані електроензими – Mg^{2+} , АТР-залежні електрогенні іонні помпи: Ca^{2+} -транспортувальна та Na^+, K^+ -транспортувальна. У плазматичній мембрані, яка має селективну проникність для різноманітних речовин, міститься низка Mg^{2+} -залежних АТРаз, котрі забезпечують внутрішньоклітинний іонний гомеостаз. До них належать: електроензим транспортна $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза, яка забезпечує електрогенний активний Mg^{2+} , АТР-залежний транспорт Ca^{2+} у позаклітинне середовище; електроензим уабічутлива Na^+, K^+ -АТРаза, яка здійснює енергозалежне електрогенне протилежно спрямоване перенесення іонів Na та K із клітини та в клітину відповідно; уабічрезистентна “базальна” Mg^{2+} -АТРаза, яка, як вважають, причетна до регуляції концентрації протонів H^+ у позаклітинному та внутрішньоклітинному просторах.

Порушення Ca^{2+} -залежної скоротливої функції міометрія у жінок часто стає причиною різноманітних патологій: слабкості пологової діяльності, спонтанних абортів, передчасних пологів, викиднеї, атонії, гіпо- і гіпертонусу матки. Частота передчасних пологів у світі за середніми даними становить 9,6 %. Зазвичай такі патології обумовлені порушеннями у функціонуванні мембранозв'язаних систем перенесення катіонів. Тому актуальним є пошук сполук, які були б здатні модифікувати Ca^{2+} -залежну скоротливу функцію

міометрія у випадку її порушення за вищезазначених патологічних станів і водночас були б малотоксичними для організму.

Спрямований синтез і вивчення властивостей ефекторів, які здатні взаємодіяти з плазматичною мембраною та оборотно з високою спорідненістю і селективністю змінювати ензиматичну чи транспортну активність окремих мембранозв'язаних і цитоплазматичних білків – одне з найважливіших завдань сучасної біологічної, біофізичної та біоорганічної хімії. Дійсно, створення нових високоефективних малотоксичних селективних інгібіторів та активаторів ензимів є вкрай необхідним, зокрема, для подальшого дослідження іонних, молекулярних і мембранних механізмів внутрішньоклітинної сигналізації. В практичному ж аспекті такі розробки є основою для пошуку нових фармакологічних засобів, здатних ефективно модифікувати функціональну активність конкретних білків у випадку її порушення за патологічних станів.

У цьому аспекті, зокрема, перспективними є каліксарени – чашоподібні макроциклічні сполуки, котрі отримують циклоконденсацією паразаміщених фенолів і формальдегіду. Вибрані каліксарени мають противірусні, бактерицидні, протипухлинні та антитромботичні властивості і можуть бути ефективними інгібіторами й активаторами ензиматичних, рецепторних і транспортних мембранозв'язаних білків. Властивості каліксаренів як інгібіторів ензимів із початку XXI ст привертають дедалі більшу увагу вчених. У науковій літературі є приклади, які доводять ефективність інгібування каліксаренами потенціалозалежних аніонних каналів, лужної фосфатази. Є дані про те, що каліксарени здатні проникати в клітину через плазматичну мембрану. Унікальна будова та властивості молекул каліксаренів дають змогу модифікувати їх структуру, використовуючи різні функціональні групи на верхньому й нижньому вінцях молекули. Отже, пошук нових каліксаренових ефекторів ензимів тільки розпочато. Слід зазначити, що каліксарени характеризуються низькими токсичністю та імуногенністю, а їх синтез є доступним і низько вартісним. На початок виконання роботи попередні дані літератури вказували на те, що окремі калікс[4]арени можуть утворювати

комплекси з АТР. Втім, на початку проведення біохімічних досліджень, що були описані в цій дисертації, результати щодо використання каліксаренів як модуляторів енергозалежних Ca^{2+} -транспортувальних систем та АТР-гідролаз практично були відсутні у світовій літературі.

Отже, дослідження впливу калікс[4]аренів на ензиматичну активність мембранозв'язаних електроензимів - Mg^{2+} ,АТР-залежних кальцієвих pomp плазматичної мембрани і саркоплазматичного ретикулула, Mg^{2+} ,АТР-залежної натрієвої помпи, а також Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани, і на неензиматичний гідроліз АТР, є важливим як у теоретичному, так і практичному аспектах.

У досліджах проведених на фракції плазматичних мембран гладеньком'язових клітин міометрія свині, оброблених розчином дигітоніну (0,1 мг/мл) та суспензії міоцитів щура, було досліджено дію калікс[4]аренів на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазну, Na^+ , K^+ -АТРазну та Mg^{2+} -АТРазну активність плазматичної мембрани і Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазну активність саркоплазматичного ретикулула клітин міометрія, на Ca^{2+} -транспортну активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани, Ca^{2+} -гомеостаз у міоцитах матки та на неензиматичний гідроліз АТР. Встановлено, що калікс[4]арени С-99 та С-107 проявляють мембранотропні ефекти і впливають на мембранні ензими. Доведено, що калікс[4]арен С-107 може вбудовуватись в мембрану і проникати через мембрану. Виявлено, що калікс[4]арен С-90 селективно та ефективно ($I_{0,5} = 20,2 \pm 0,5$ мкМ) пригнічує активність транспортної Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани, не впливаючи на активність Na^+ , K^+ -АТРази, Mg^{2+} -АТРази і Ca^{2+} -АТРази плазматичної мембрани. Встановлено, що структурний фрагмент **С-150** (суто «калікс[4]аренова чаша») та модельна сполука **М-1** (N-(4-етоксифеніл)-N'-(фенілсульфоніл)-трифторометилацетімідоамід) недостовірно пригнічували Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазну активність плазматичної мембрани. Ефективність інгібування Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази калікс[4]аренами залежить від кількості та розташування фенілсульфоніламідинових груп на їх верхньому вінці. Модифікація нижнього вінця калікс[4]аренової «чаші» двома октанольними

залишками (**C-956**) замість залишків пропанолу (**C-90**) призводить до збільшення ефективності інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани.

Показано, що калікс[4]арен **C-90** не впливає на коефіцієнти активації для іонів Ca та Mg, уявну константу Міхаеліса K_m за АТР, проте ця сполука зменшує максимальну початкову швидкість V_{\max} реакції гідролізу АТР. Таким чином, калікс[4]арен **C-90** діє як повний неконкурентний інгібітор $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани. Із використанням флуоресцентного методу та Ca^{2+} -чутливого зонда встановлено, що під дією калікс[4]арену **C-90** пригнічується Mg^{2+} , АТР-залежна акумуляція Ca^{2+} у везикулах плазматичної мембрани міоцитів матки. Згідно з результатами математичного моделювання калікс[4]арен **C-90** (1-25 мкМ) має збільшувати концентрацію Ca^{2+} в незбуджених міоцитах міометрія. Ці дані підтверджено результатами, одержаними за допомогою конфокальної мікроскопії, згідно яким ця сполука підвищує концентрацію Ca^{2+} у міоцитах. За допомогою методу лазерно-кореляційної спектроскопії показано, що калікс[4]арен **C-90** зменшує гідродинамічний діаметр міоцитів міометрія.

Показано, що калікс[4]арени **C-97**, **C-99** та **C-107** ефективно інгібували ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази у фракції ПМ та не впливали на активність Mg^{2+} -АТРази. Встановлено, що ці сполуки дозозалежно та значно ефективніше, ніж убаїн, пригнічують активність Na^+, K^+ -АТРази: значення уявних коефіцієнтів інгібування $I_{0,5}$ для цих калікс[4]аренів $< 0,1$ мкМ, а значення $I_{0,5}$ для убаїну складає 20 – 30 мкМ. Встановлено, що структурні фрагменти калікс[4]арену **C-107** (**C-150** та **M-3**) у широкому діапазоні концентрацій практично не впливали на ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази та Mg^{2+} -АТРази ПМ. Отже, пригнічувальна дія калікс[4]арену **C-107** пов'язана з спільним впливом двох просторово орієнтованих на каліксареновій платформі амінофосфонових груп, а не з дією тетрафенольного макроциклу як такого, або дією окремого амінофосфонового залишку.

Калікс[4]арен **C-97** зменшує спорідненість ензиму до іону Na (катіон, що активує Na⁺,K⁺-АТРази з цитоплазматичного боку мембрани), але збільшує до убаїну (специфічний інгібітор, що діє з зовнішньоклітинного боку мембрани). У той же час цей калікс[4]арен не впливає на спорідненість ензиму до іншого одновалентного активуючого катіона – іона K, який стимулює активність ензиму з зовнішнього боку клітини.

Показано, що калікс[4]арени **C-97** та **C-107** (використані у концентрації 100 мкМ) майже повністю пригнічують ензиматичну активність Na⁺,K⁺-АТРази суспензії сперматозоїдів чоловіків (інгібування до 1-2 % відносно контролю), а калікс[4]арен **C-99** практично не впливає на неї, знижуючи ензиматичну активність лише до 80-85 % відносно контрольного значення ($M \pm m$; n=7-10).

Результати отримані при вивченні впливу калікс[4]аренів на ензиматичну активність Na⁺,K⁺-АТРази суспензії сперматозоїдів показали, що калікс[4]арени **C-97** та **C-107** також повністю інгібують Na⁺,K⁺-АТРазну активність (залишкова активність – 1-2 % відносно контролю), проте калікс[4]арен **C-99** практично не впливає на неї, знижуючи ензиматичну активність лише до 80-85 % відносно контрольного значення ($M \pm m$; n=7-10). Всі три калікс[4]арени практично не впливають на “базальну” Mg²⁺-АТРазну активність у суспензії сперматозоїдів (мало місце зменшення активності лише до 90-95 % від контрольного значення).

Результати докінгу калікс[4]арену **C-107** в ліганд-зв'язуючих ділянках Na⁺,K⁺-АТРази свідчать про те, що цей калікс[4]арен може розміщуватися у просторі декількох областей ліганд-зв'язувальних ділянок ензиму. Важливу участь у взаємодії каліксаренової чаші **C-107** із ензимом відіграють гідрофобні (стеричні) взаємодії. Тобто залишки ароматичних амінокислот «фіксують» каліксарен в області зв'язування із білком. В той же час залишки негативно та позитивно заряджених амінокислот формують водневі зв'язки із NH-групами аміно-фосфонових фрагментів та атомами кисню метиленбісфосфонатних фрагментів каліксарену **C-107**. Таким чином гідрофільні фрагменти каліксарену як би задають “вектор напрямку”, у якому фіксується молекула **C-107** в області взаємодії із ензимом.

Встановлено, що калікс[4]арени (С-107, С-91 та С-106) здатні стимулювати неензиматичний гідроліз АТР. Досліджено кінетичні та концентраційні залежності реакції гідролізу АТР: крива процесу гідролізу не підпорядковується закономірностям реакцій низьких порядків (нульового, першого) і є негіперболічною (у часі), а сам гідроліз протікає вельми повільно.

Одержані результати є суттєвими для розуміння біохімічних та фізико-хімічних властивостей Ca^{2+} -транспортувальних АТРазних систем плазматичної мембрани і саркоплазматичного ретикулума гладеньком'язових клітин та регуляції активності цих систем. Вони поглиблюють відомості стосовно іонних, молекулярних та мембранних механізмів кальцієвого обміну у гладеньких м'язах, зокрема, ролі плазматичної мембрани у забезпеченні електро- та фармакомеханічного спряження в них.

Відповідно, одержані дані свідчать на користь того, що вибрані калікс[4]арени можуть бути успішно використані в лабораторній практиці як селективні афінні інгібітори Mg^{2+} , АТР-залежних катіон-транспортувальних електроензимів при вивченні однієї з нагальних проблем біохімії, біофізики та клітинної біології – з'ясуванні мембранних механізмів внутрішньоклітинної кальцієвої сигналізації.

Ми сподіваємося, що калікс[4]арени, що були вивчені нами, є перспективними для розбудови ліків нового покоління – селективних модуляторів функціонування АТР-залежних мембранозв'язаних ензиматичних систем катіонного (Ca^{2+} , Na^{+}) транспорту. Це важливо для подальшого прогресу у боротьбі з патологічними станами, пов'язаними із порушеннями внутрішньоклітинного іонного (перш за все кальцієвого) гомеостазу (слабкість пологової діяльності, викидні, гіпертензія, ішемія/гіпоксія, діабет, різноманітні нейропатії тощо).

Ключові слова: Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза, плазматична мембрана, ензиматичний гідроліз АТР, гладенькі м'язи, міометрій, калікс[4]арени.

SUMMARY

Veklich T.O. The mechanisms of effects of calixarenes on cation-transporting ATP hydrolases and calcium homeostasis of the myometrium. - Qualifying scientific research with the manuscript rights.

Thesis for Doctor of Science degree on specialty 03.00.04 – biochemistry. O.V. Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2021.

The thesis is devoted to the study of biochemical and physicochemical mechanisms of effects of calix[4]arenes on membrane-bound cation-transporting electroenzymes of smooth muscle cells and on non-enzymatic hydrolysis of ATP.

Smooth muscles play an important role in the normal functioning of internal organs; they provide contraction and relaxation of the urogenital system, gastrointestinal tract, blood and lymphatic vessels, pupillary sphincter, respiratory tract. To perform smooth muscle contraction/relaxation processes, in particular, of the myometrium, the level of cytoplasmic Ca^{2+} have to be fast and reversibly changed in the range of concentrations from approximately 100 nM to 1 μM . Calcium ions are crucial for a wide range of cellular functions. It is important intracellular messenger and the most biochemical and physiological processes, such as muscle contraction (skeletal, smooth, myocardial), fertilization, proliferation, secretion, neurotransmission, cell growth, apoptosis and also necrosis take place under the control of Ca^{2+} -dependent signaling pathways. However, despite the significant amount of experimental biochemical and biophysical researches devoted to intracellular calcium signals in the myometrium, we have very limited data about the mechanisms of maintaining of Ca ion physiological concentration in uterine myocytes and about its targeted regulation in normal and pathological conditions.

Today we have no doubts that some pathologies of contractile function of smooth muscles are connected with disturbance of a calcium homeostasis in myocytes, for example, a hypotonia and a hypertonia of a uterus, miscarriages, a

hypo- and hypertension, atony of an intestine and other pathologies of its motility, asthma.

Ca^{2+} gets in smooth muscle cells from extracellular space through various plasma membrane calcium channels or from intracellular Ca^{2+} depots using passive transport of chemical gradient. The main systems of energy-dependent removing of Ca^{2+} from the cytosol are calcium pumps of plasma membrane and sarcoplasmic reticulum, plasma membrane $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger and mitochondria Ca^{2+} -uniporter. Membrane-bound electroenzymes, such as Mg^{2+} ,ATP-dependent electrogenic Ca^{2+} -transporting and Na^+,K^+ -transporting pumps, play an important role in control of muscle cell contraction and relaxation, in particular in smooth muscle cells. The plasma membrane, which has selective permeability for various substances, contains a number of Mg^{2+} -dependent ATPases, which provide intracellular ion homeostasis. These include: transport $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -ATPase electroenzyme, which provides electrogenic active Mg^{2+} ,ATP-dependent transport of Ca^{2+} in the extracellular space; ouabain-sensitive Na^+,K^+ -ATPase electroenzyme, which carries out energy-dependent electrogenic converely directed transfer of Na and K ions from the cells and into the cells, respectively; ouabain-resistant “basal” Mg^{2+} -ATPase, which is thought to be involved in regulating the concentration of H^+ protons in the extracellular and intracellular spaces.

Violation of Ca^{2+} -dependent contractile function of the woman myometrium often causes a variety of pathologies: weakness of labor, miscarriage, premature birth, atony, uterine hypotension and hypertension. The incidence of premature birth in the world is 9.6 % on average. Usually such pathologies are caused by disturbances of functioning of membrane-connected systems of cation transport. Therefore, searching for compounds, which can modify the Ca^{2+} -dependent contractile function of myometrium in case of abovementioned pathological conditions, and which would be low-toxic, is very important.

Directed synthesis and study of the properties of effectors, which can penetrate the plasma membrane and which can reversibly, high affinitively and selectively change the enzymatic or transport activity of individual intracellular membrane-

bound and cytoplasmic proteins, is one of the most important tasks of modern biological, biophysical and bioorganic chemistry. Indeed, the development of new highly effective low-toxic selective inhibitors and activators is essential, in particular, for the further study of ionic, molecular and membrane mechanisms of intracellular signaling. In the field of muscle biochemistry and biophysics, it is essential to elucidate the mechanisms of such unique biological phenomenon as electro- and pharmacomechanical coupling, and to study the role of Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , H^+ in mentioned processes. In practical terms, such investigations are the basis for finding new pharmacological agents capable effectively to modify the functional activity of specific proteins in case of pathological conditions.

Taking into consideration all mentioned above, high interest was paid, in particular, on calixarenes which are bowl-shaped macrocyclic compounds obtained by cyclocondensation of para-substituted phenols and formaldehyde. Some calixarenes have antiviral, bactericidal, antitumor, antithrombotic properties and are effective inhibitors and activators of enzymatic, receptor and transport membrane-bound proteins. From the beginning of the XXI century the properties of calixarenes capable to inhibit enzymes are have being attract more and more attention of scientists. There are a lot of data which confirm the possibility of creating receptors, ion channels, DNA microarrays, artificial enzymes and other developments based on calixarenes. Regarding the blocking effect of calixarenes, there are examples in the scientific literature, which prove the efficiency of inhibition by calixarenes of potential-dependent anion channels, alkaline phosphatase. There are evidences that calixarenes can penetrate into cells through the plasma membrane. The unique structure and properties of calixarene molecules allow to modify their structure (using different functional groups on the upper and lower rims of the macrocycle), and therefore, the searching for new calixarene enzyme effectors has only just begun. It should be noted that calixarenes are characterized by low toxicity and immunogenicity, as well as available synthesis and low cost. At the beginning of the work, preliminary literature data indicated that the selected calix[4]arenes can form complexes with ATP. However, at the beginning of the biochemical studies described

in this dissertation, the results about the use of calixarenes as modulators of energy-dependent Ca^{2+} transport systems and ATP hydrolases were virtually absent in the world literature.

Therefore, the study of the effects of calix[4]arenes on the enzymatic activities of membrane-bound electroenzymes: Mg^{2+} ,ATP-dependent calcium pumps of the plasma membrane and sarcoplasmic reticulum, Mg^{2+} ,ATP-dependent sodium pump of the plasma membrane, and on non-enzymatic hydrolysis of ATP, are considerably interesting in both theoretical and practical aspects.

In experiments carried out with the plasma membrane fraction of pig smooth muscle cells treated with a solution of digitonin (0.1 mg / ml) and with a suspension of rat myocytes, the effects of calix[4]arenes on Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase, Na^+ , K^+ -ATPase and Mg^{2+} -ATPase activities in the plasma membrane, Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity of the sarcoplasmic reticulum of myometrial cells, on Ca^{2+} -transport activity of Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase of the plasma membrane, Ca^{2+} homeostasis in myocytes and on non-enzymatic hydrolysis were investigated. It was found that calix[4]arenes C-99 and C-107 had membranotropic properties and could indirectly affect membrane enzymes. It was shown that calix[4]arene C-107 could be built into membrane and penetrate through the membrane. It was found that calix[4]arene C-90 selectively and effectively ($I_{0.5} = 20.2 \pm 0.5 \mu\text{M}$) inhibited the activity of transport Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase of the plasma membrane, without affecting the activities of Na^+ , K^+ -ATPase, Mg^{2+} -ATPase and Ca^{2+} -ATPase of the plasma membrane. It was shown that the structural fragment C-150 (purely "calix[4]arene bowl") and the model compound M-1 (N-(4-ethoxyphenyl)-N'-(phenylsulfonyl)-trifluoromethylacetimidoamide) slightly inhibited the Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase plasma membrane activity. The efficiency of inhibition of Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase by calix[4]arenes depends on the number and location of phenylsulfonylamidine groups on the upper rim of their molecules. Modification of the lower rim of the calix[4]arene "bowl" with two octanol residues (C-956) instead of propanol residues (C-90) leads to a slight increase of efficiency of the plasma membrane Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase inhibition.

It was shown that calix[4]arene C-90 did not affect the coefficients of plasma membrane $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activation by Ca and Mg ions, the apparent Michaelis constant K_m , but this compound in all cases reduced the maximal initial velocity V_{\max} of the ATP hydrolysis reaction. Thus, calix[4]arenes C-90 acts as a complete non-competitive inhibitor of the plasma membrane $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -ATPase. Using the fluorimetric method and the Ca^{2+} -sensitive probe, it was found that calix[4]arene C-90 inhibited Mg^{2+} ,ATP-dependent accumulation of Ca^{2+} in the vesicles of plasma membrane of uterine myocytes. According to the results of mathematical modeling, calix[4]arene C-90 (1-25 μM) should increase the concentration of Ca^{2+} in unexcited myometrial cells. These data were confirmed by the results obtained using confocal microscopy, according to which this compound increases the concentration of Ca^{2+} in myocytes. Using the method of dynamic light scattering, it was shown that calix[4]arene C-90 reduced the hydrodynamic diameter of myometrial cells.

It was found that some calix[4]arenes (C-107, C-91 and C-106) are able to stimulate non-enzymatic hydrolysis of ATP. The kinetic and concentration dependences of the ATP hydrolysis reaction have been studied: the kinetic curve of the hydrolytic process does not accord to the regularities of low-order reactions (zero, first) and is non-hyperbolic (in time), the ATP hydrolysis is very slow.

The obtained results are essential for understanding the biochemical and physicochemical properties of Ca^{2+} -transporting ATPase systems of the plasma membrane and sarcoplasmic reticulum of smooth muscle cells and their regulation. They also deepen knowledge about the ionic, molecular and membrane mechanisms of calcium metabolism in smooth muscles, in particular, the role of the plasma membrane in providing electro- and pharmacomechanical coupling in that tissue.

Key words: $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -ATPase, plasma membrane, enzymatic hydrolysis ATP, smooth muscle cell, myometrium, calix[4]arene.

Список публікацій здобувача за темою дисертації:

1. Костерін С.О., Кальченко В.І., **Векліч Т.О.**, Бабіч Л.Г., Шликов С.Г. Калікс[4]арени як модулятори АТР-гідролазних систем гладеньком'язових клітин. Монографія. Київ: Наукова Думка. 2019, 266 с. *(Особистий внесок: спільно з співавторами сформульовано ідею роботи, проведено дослідження, здійснено узагальнення отриманих результатів, підготовлено публікацію).*

2. Костерін С.О., Бабіч Л.Г., Шликов С.Г., Данилович Ю.В., **Векліч Т.О.**, Мазур Ю.Ю. Біохімічні властивості та регуляція Ca^{2+} -транспортувальних систем мембранних структур гладеньком'язових клітин. Монографія. Київ: Наукова Думка. 2016, 210 с. *(Особистий внесок: спільно з співавторами сформульовано ідею роботи, проведено дослідження, здійснено узагальнення отриманих результатів, підготовлено публікацію).*

3. **Veklich T.O.**, Shkrabak A.A., Slinchenko N.N., Mazur I.I., Rodik R.V., Boyko V.I., Kalchenko V.I., Kosterin S.O. Calix[4]arene C-90 selectively inhibits Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase of myometrium cell plasma membrane. Biochemistry (M). 2014, 79(5): 417-424. *(Особистий внесок: сформульовано ідею роботи, спільно з співавторами проведено дослідження, узагальнення та аналіз результатів, написано та оформлено публікацію).*

4. Mazur Iu.Iu., **Veklich T.O.**, Shkrabak O.A., Mohart M.A., Demchenko A.M., Gerashchenko I.V., Rodik R.V., Boyko V.I., Kalchenko V.I., Kosterin S.O. Selective inhibition of smooth muscle plasma membrane transport Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase by calix[4]arene C-90 and its activation by IFT-35 compound. General Physiology and Biophysics. 2018, 37: 223-231. *(Особистий внесок: сформульовано наукову задачу, спільно з співавторами проведено дослідження, здійснено узагальнення отриманих результатів, проведено статистичний аналіз, підготовлено рукопис).*

5. Mazur I., Kosterin S., **Veklich T.** Gibbs-Donnan potential as a tool for membrane vesicles polarization. Journal of Biophysical Chemistry. 2014, 5(2): 78-89. *(Особистий внесок: спільно з співавторами сформульовано наукову задачу та*

проведено дослідження, узагальнення та аналіз результатів, написано та оформлено публікацію).

6. Shatursky O.Ya., Kasatkina L.A., Rodik R.V., Cherenok S.O., Shkrabak A.A., **Veklich T.O.**, Borisova T.O., Kosterin S.O., Kalchenko V.I. Anion carrier formation by calix[4]arene - bis-hydroxymethylphosphonic acid in bilayer membranes. Organic Biomolecular Chemistry. 2014, 12: 9881-9821. (Особистий внесок: спільно з співавторами проведено дослідження, здійснено аналіз та узагальнення отриманих результатів, оформлено публікацію).

7. **Veklich T.**, Shkrabak O., Kosterin S. A comparative study of influence of the calixarenes on the activity Na^+, K^+ -ATPase and Mg^{2+} -ATPase in smooth muscle sarcolemma. Annales universitatis Mariae Curie-Sclodowska. Lublin, Polonia. 2008, XXI(1, 45): 253-255. (Особистий внесок: сформульовано ідею роботи, спільно з співавторами проведено дослідження, узагальнення та аналіз результатів, написано та оформлено публікацію).

8. **Veklich Tetyana.** Comparative research on the influence of some inhibitors on activity Na^+, K^+ -ATPase and Mg^{2+} -ATPase carcolemma smooth muscle. Annales universitatis Mariae Curie-Sclodowska. Lublin, Polonia. 2006, XIX(2, 32): 203-206.

9. **Veklich T.O.** Inhibitory peculiarities of calix[4]arenes C-90 action on the activity of plasma membrane $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase of smooth muscle cells. Monograph: Modern directions in chemistry, biology, pharmacy and biotechnology. Lviv.: Lviv Polytecnic Publishing House. 2015, 200-204.

10. **Веклич Т.О.**, Шкрабак О.А., Костерін С.О., Родік Р.В., Бойко В.І., Кальченко В.І. Патент на винахід № 24293/3А/18 від 10.10.2018 «5,11,17,23-тетра(трифтор)-метил(фенілсульфоніліміно)-метиламіно-25,27-діоктилокси-26,28-дипропоксикалікс[4]арен (калікс[4]арен С-956) як селективний інгібітор $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани клітин міомерія». (Особистий внесок: сформульовано ідею роботи, спільно з співавторами проведено дослідження, здійснено аналіз та узагальнення отриманих результатів).

11. Кальченко В.І., Костерин С.А., **Веклич Т.А.**, Родик Р.В., Шкрабак А.А., Мазур Ю.Ю., Слинченко Н.Н. Синтез новых перспективных

утеростимуляторів на основі каліксаренсульфоніламідинів і їх біохімічна активність. Монографія: Фундаментальні проблеми створення нових речовин і матеріалів хімічного виробництва. Київ: Академперіодика. 2016, 224-235. *(Особистий внесок: спільно з співавторами проведено дослідження, здійснено аналіз та узагальнення отриманих результатів, оформлено публікацію).*

12. **Veklich T.O.** The comparative study of the inhibitory influence of calix[4]arene C-90 on the activity of $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPases in plasma membrane and sarcoplasmic reticulum in myometrium cells. The Ukrainian Biochemical Journal. 2016, 88(2): 5-15.

13. **Veklich T.O.**, Shkrabak O.A., Nikonishyna Yu.U., Rodik R.V., Kalchenko V.I., Kosterin S.O. Calix[4]arene C-956 selectively inhibits plasma membrane $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase in myometrial cells. The Ukrainian Biochemical Journal. 2018, 90(5): 35-43. *(Особистий внесок: сформульовано ідею роботи, спільно з співавторами проведено дослідження, узагальнення та аналіз результатів, написано та оформлено публікацію).*

14. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Мазур Ю.Ю., Родік Р.В., Бойко В.І., Кальченко В.І., Костерін С.О. Кінетичні закономірності дії калікс[4]арену С-90 на $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазну активність плазматичної мембрани та на концентрацію Ca^{2+} в незбуджених клітинах міометрія. Укр. біохім. журн. 2013, 85(4): 20-29. *(Особистий внесок: сформульовано ідею роботи, спільно з співавторами проведено дослідження, узагальнення та аналіз результатів, написано та оформлено публікацію).*

15. **Векліч Т.О.**, Мазур Ю.Ю., Костерін С.О. Mg^{2+} , АТР-залежна кальцієва помпа плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин. I. Структурна організація та властивості. Укр. біохім. журн. 2015, 87(1): 5-20. *(Особистий внесок: підбір та узагальнення літературних даних, участь в оформленні публікації).*

16. **Векліч Т.О.**, Мазур Ю.Ю., Костерін С.О. Mg^{2+} , АТР-залежна кальцієва помпа плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин. II. Регуляція

активності. Укр. біохім. журн. 2015, 87(2): 5-25. *(Особистий внесок: підбір та узагальнення літературних даних, участь в оформленні публікації).*

17. **Veklich T.O.**, Nikonishyna Y.U., Kosterin S.O. Pathways and mechanisms of transmembrane calcium ions exchange in the cell nucleus. The Ukrainian Biochemical Journal. 2018, 90(4): 5-24. *(Особистий внесок: підбір та узагальнення літературних даних, участь в оформленні публікації).*

18. Шкрабак О.А., Кальченко О.І., Родік Р.В., **Векліч Т.О.**, Кальченко В.І., Костерін С.О. Каліксарензалежний гідроліз АТР. I. Кінетика реакції та комплексоутворення між каліксареном С-107 та нуклеозидтрифосфатом. Укр. біохім. журн. 2008, 80(2): 90-100. *(Особистий внесок: спільно з співавторами проведено дослідження, здійснено аналіз та узагальнення отриманих результатів, оформлено публікацію).*

19. Шкрабак О.А., **Векліч Т.О.**, Родік Р.В., Бойко В.І., Костерін С.О. Каліксарензалежний гідроліз АТР. II. Каталітичні властивості реакції, стимульованої каліксареном С-107. Укр. біохім. журн. 2008, 80(3): 55-64. *(Особистий внесок: спільно з співавторами проведено дослідження, здійснено аналіз та узагальнення отриманих результатів, оформлено публікацію).*

20. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Родік Р.В., Бойко В.І., Кальченко В.І., Костерін С.О. Просторова будова каліксарен-амінофосфонових кислот є суттєвою для прояву їхньої інгібуючої дії на Na^+, K^+ -АТР-азну активність у плазматичних мембран гладеньком'язових клітин. Укр. біохім. журн. 2010, 82(1): 21-33. *(Особистий внесок: сформульовано ідею роботи, спільно з співавторами проведено дослідження, узагальнення та аналіз результатів, написано та оформлено публікацію).*

21. **Векліч Т.О.**, Костерін С.О., Родік Р.В., Черенок С.О., Бойко В.І., Кальченко В.І. Вплив каліксаренфосфонових кислот на Na^+, K^+ -АТР-азну активність в плазматичній мембрані гладеньком'язових клітин. Укр. біохім. журн. 2006, 78(1): 70-86. *(Особистий внесок: сформульовано ідею роботи, спільно з співавторами проведено дослідження, узагальнення та аналіз результатів, написано та оформлено публікацію).*

22. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Костерін С.О., Родік Р.В., Черенок С.О., Бойко В.І., Кальченко В.І. Каліксарени С-97 та С-107 стимулюють вплив убаїну на Na^+, K^+ -АТР-азну активність у плазматичній мембрані гладеньком'язових клітин. Укр. біохім. журн. 2006, 78(6): 53-63. *(Особистий внесок: сформульовано ідею роботи, спільно з співавторами проведено дослідження, узагальнення та аналіз результатів, написано та оформлено публікацію).*

23. **Векліч Т.О.**, Костерін С.О. Порівняльне дослідження властивостей Na^+, K^+ -АТР-ази та Mg^{2+} -АТР-ази плазматичної мембрани міомеріа. Укр. біохім. журн. 2005, 77(2): 66-75. *(Особистий внесок: спільно з консультантом сформульовано ідею роботи, проведено дослідження, здійснено аналіз та узагальнення отриманих результатів, оформлено публікацію).*

24. **Векліч Т.О.**, Кочешкова Н.С., Родік Р.В., Бойко В.І., Воробець З.Д., Костерін С.О. Порівняльне дослідження впливу каліксаренів на Na^+, K^+ -АТРазну активність в плазматичній мембрані скоротливих та рухливих клітин. Укр. біохім. журн. 2007, 79(3): 19-28. *(Особистий внесок: сформульовано ідею роботи, спільно з співавторами проведено дослідження, здійснено узагальнення отриманих результатів, підготовлено публікацію).*

25. Лабинцева Р.Д., Слінченко Н.М., **Векліч Т.О.**, Родік Р.В., Черенок С.О., Бойко В.І., Кальченко В.І., Костерін С.О. Порівняльне дослідження впливу каліксаренів на Mg^{2+} -залежні АТР-гідролазні ферментативні системи гладеньком'язових клітин матки. Укр. біохім. журн. 2007, 79(3): 44-54. *(Особистий внесок: спільно з співавторами проведено дослідження, здійснено аналіз та узагальнення отриманих результатів, оформлено публікацію).*

26. **Т.О. Векліч**, Шкрабак О.А., Родік Р.В., Кальченко В.І., Костерін С.О. Каліксарен С-107 збільшує спорідненість Na^+, K^+ -АТР-ази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин до убаїну. Укр. біохім. журн. 2011, 83(1): 38-44. *(Особистий внесок: сформульовано ідею роботи, спільно з співавторами проведено дослідження, узагальнення та аналіз результатів, написано та оформлено публікацію).*

27. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Родік Р.В., Кальченко В.І., Костерін С.О. Вплив каліксарену С-107 на кінетичні параметри Na^+, K^+ -АТР-ази плазматичної мембрани міоцитів матки. Укр. біохім. журн. 2011, 83(2): 36-44. *(Особистий внесок: сформульовано ідею роботи, спільно з співавторами проведено дослідження, узагальнення та аналіз результатів, написано та оформлено публікацію).*

28. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Черенок С.О., Кальченко В.І., Костерін С.О. Порівняльне дослідження впливу калікс[4]арену С-99 та його аналогів на Na^+, K^+ -азну активність у плазматичній мембрані міоцитів матки. Укр. біохім. журн. 2012, 84(6): 49-57. *(Особистий внесок: сформульовано ідею роботи, спільно з співавторами проведено дослідження, узагальнення та аналіз результатів, написано та оформлено публікацію).*

29. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Мазур Ю.Ю., Родік Р.В., Кальченко В.І., Костерін С.О. Кінетика інгібіторної дії калікс[4]арену С-90 на активність транспортної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТР-ази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин. Укр. біохім. журн. 2014, 86(5): 37-46. *(Особистий внесок: сформульовано ідею роботи, спільно з співавторами проведено дослідження, узагальнення та аналіз результатів, написано та оформлено публікацію).*

30. **Векліч Т.О.**, Костерін С.О. Дослідження властивостей Na^+, K^+ -АТР-ази плазматичної мембрани клітин міометрія. Буковинський медичний вісник. 2005, 9(2): 36-38. *(Особистий внесок: спільно з консультантом сформульовано ідею роботи, проведено дослідження, здійснено аналіз та узагальнення отриманих результатів, оформлено публікацію).*

31. Цимбалюк О.В., Онуфрійчук О.В., **Векліч Т.О.**, Черенок С.О., Кальченко В.І., Мірошніченко М.С., Костерін С.О. Порівняльне дослідження впливу оубаїну і каліксарен біс-гідроксиметилфосфонової кислоти на активність Na^+, K^+ -АТР-ази та механокінетику процесу „скорочення - розслаблення” гладенького м'язу. Physics of the Alive. 2006, 14(1): 53-72. *(Особистий внесок: спільно з співавторами проведено дослідження, здійснено аналіз та узагальнення отриманих результатів, оформлено публікацію).*

32. Бевза О.В., **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Родік Р.В., Кальченко В.І., Костерін С.О. Калікс[4]арен С-107 як високоафінний супрамолекулярний інгібітор Na^+, K^+ -АТР-ази плазматичної мембрани. Укр. біохім. журн. 2013, 85(2): 5-19. *(Особистий внесок: спільно з співавторами проведено дослідження, здійснено аналіз та узагальнення отриманих результатів, оформлено публікацію).*

33. **Векліч Т.**, Шкрабак О., Мазур Ю. Активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТР-ази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин селективно пригнічується калікс[4]ареном С-90. Вісник Львівського університету. 2014, вип. 68: 337-347. *(Особистий внесок: сформульовано ідею роботи, спільно з співавторами проведено дослідження, узагальнення та аналіз результатів, написано та оформлено публікацію).*

34. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Ніконішина Ю.В., Родік Р.В., Кальченко В.І., Костерін С.О. Калікс[4]арен С-90 як перспективна супрамолекулярна сполука для регуляції активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТР-ази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин. Збірник наукових праць «Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології». 2017, 15(2): 373-380. *(Особистий внесок: сформульовано ідею роботи, спільно з співавторами проведено дослідження, узагальнення та аналіз результатів, написано та оформлено публікацію).*

35. **Veklich T.O.**, Labyntseva R.D., Shkrabak O.A., Tsymbaluk O.V., Rodik R.V., Kalchenko V.I., Kosterin S.O. Inhibition of Na^+, K^+ -ATPase and activation of myosin ATPase by calix[4]arene C-107 cause stimulation of isolated smooth muscle contractile activity. Ukr. Biochem. J. 2020, 92(1): 21-30. *(Особистий внесок: сформульовано ідею роботи, спільно з співавторами проведено дослідження, узагальнення та аналіз результатів, написано та оформлено публікацію).*

36. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Родік Р.В., Кальченко В.І., Костерін С.О. Калікс[4]арени С-107 та С-90 вбудовуються у ліпідний бішар плазматичних мембран та змінюють її структуру. Збірник наукових праць «Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології». 2020, 15(3): 373-380. *(Особистий внесок:*

сформульовано ідею роботи, спільно з співавторами проведено дослідження, узагальнення та аналіз результатів, написано та оформлено публікацію).

37. **Veklich T.O.**, Kosterin S.O. Comparative research of properties of Na^+, K^+ -ATPase and Mg^{2+} -ATPase of the plasma membrane of the myometrium. Укр. біохім. журн. 2005, 77(2 (спецвипуск)): 83.

38. **Веклич Т.О.** Na^+, K^+ -АТРазна активність сарколеми міометрія та вплив каліксаренів на неї. Матеріали ІХ Укр. біохім. з'їзду. Харків. 2006, 1: С. 106-107.

39. **Veklich T.**, Shkrabak A., Kosterin S. The effect of the calixarenes C-97 and C-107 on the Na^+, K^+ -ATPase activity in plasmatic membrane of smooth muscle cells. Acta Biochimica Polonica. Abstracts 6th Parnas Conference "Molecular Mechanisms of Cellular Signalling". Krakow, Poland. 2007, 54(2): 29.

40. Шкрабак О.А., **Веклич Т.О.** Каліксарен С-107 стимулює неферментативний гідроліз АТФ. Тези доповідей ІІ міжнародної конференції молодих учених „Біологія від молекули до біосфери”. Харків. 2007: 49-50.

41. Шкрабак О.А., **Веклич Т.О.** Дія каліксарену С-107 на Na^+, K^+ -залежний ферментативний та неферментативний гідроліз АТФ. Тези доповідей конференції молодих учених „Актуальні проблеми біохімії та біотехнології - 2007”. Київ. Укр. біохім. журн. 2007, 79(4): 137.

42. Родик Р.В., Кальченко О.І., Бойко В.І., Кальченко В.І., Шкрабак А.А., **Веклич Т.А.**, Костерин С.А. Синтез и АТФ-гидролазная активность каліксарен-аминометилфосфоновых кислот. Тезисы докладов XV международной конференции по химии соединений фосфора, посвященной 100-летию со дня рождения М.И. Кабачника. Санкт-Петербург. 2008: 211, 425.

43. Rodik R.V., Kalchenko O.I., Boyko V.I., Kalchenko V.I., Shkrabak A.A., **Veklich T.A.**, Kosterin S.A. Calixarene-amino-methylphosphonic acids. Synthesis and ATP-hydrolase activity. First international symposium "Supramolecular and nanochemistry: toward applications": Abstracts book. Kharkov, Ukraine. 2008: 123.

44. Rodik R.V., Kalchenko O.I., Boyko V.I., Kalchenko V.I., Shkrabak A.A., **Veklich T.A.**, Kosterin S.A. Synthesis and ATP-hydrolase properties of calixarene-

aminomethylphosphonic acids. IV International Summer School "Supramolecular Systems in Chemistry and Biology": Abstracts book. Tuapse, Russia. 2008: 112.

45. Shkrabak A.A., Rodik R.V., **Veklich T.O.** The influence of the calixarene C-91 on ATP-hydrolyzing systems in the plasma membrane of smooth muscle cells and nonenzymatic hydrolysis of ATP. Vth International symposium "Supramolecular Systems in Chemistry and Biology". Kyiv. 2009: 179.

46. Rodik R.V., Kalchenko O.I., Boyko V.I., Shkrabak A.A., **Veklich T.O.**, Kosterin S.O., Kalchenko V.I. Influence of the calixarene-aminomethyl-phosphonic acids on ATP hydrolysis. Vth International symposium "Supramolecular Systems in Chemistry and Biology". Kyiv. 2009: 171.

47. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Данилович Г.В. Дослідження мембранотропних ефектів інгібіторів Na^+ , K^+ -АТРази – каліксаренів С-99 та С-107 / // Тезиси докладов Научно-практической конференции „Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения”. Новый Свет, Крым, Украина. 2009: 439-440.

48. **Veklich T.**, Shkrabak O. Specific features of calixarene **C-107** influence on Na^+ , K^+ -ATPase activity in the plasma membrane of smooth muscle cells. VII Parnas conference on Biochemistry and Molecular Biology. Укр. біохім. журн. 2009, 81(4 (спеціальний випуск)): 133.

49. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А. Дослідження впливу каліксарену С-107 на активність Na^+ , K^+ -АТРази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин. Тезиси докладов VI Международной научно-практической конференции „Актуальные вопросы теоретической и прикладной биофизики, физики и химии”. Севастополь, Крым, Украина. 2010, 2: 213-215.

50. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А. Вплив каліксаренів на АТРа-гідролазні системи плазматичної мембрани міометрія. Матеріали X Укр. біохім. з'їзду. Одеса. Укр. біохім. журн. 2010, 82(4 (додаток 1)): 21-22.

51. Кальченко О.І., Родік Р.В., Шкрабак О.А., **Векліч Т.О.**, Кальченко В.І. Хроматографічне дослідження та молекулярне моделювання процесу комплексоутворення біс(фосфоно-2-піридилметил)аміно-калік[4]сарену з

аденозинтрифосфатом та аденозиндифосфатом. Матеріали X Укр. біохім. з'їзду. Одеса. Укр. біохім. журн. 2010, 82(4 (додаток 1)): 68.

52. Shkrabak A.A., Rodik R.V., **Veklich T.O.** The influence of spatial structure of the calixarene-aminosphonic acids on their property to inhibit the Na^+, K^+ -ATPase activity in plasmatic membrane of smooth muscle cells. III International Summer School "Supramolecular Systems in Chemistry and Biology": Abstracts book. Lviv, Ukraine. 2010: 156.

53. **Веклич Т.О.**, Шкрабак О.А. Вплив каліксаарену С-107 на кінетику залежності Na^+, K^+ -АТРазної активності плазматичної мембрани клітин міометрія від уабаїну. Тезиси докладов Научно-практической конференции „Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения”. Новый Свет, Крым, Украина. 2011: 651-652.

54. Shkrabak A.A., **Veklich T.O.**, A.V. Bevza Inhibitory properties of calixarenes relative to ion-transporting ATPase of myometrium cells plasma membrane. Kinetic and structural analysis. Abstracts 8th Parnas Conference. Warsaw, Poland. 2011: 87.

55. Shkrabak A.A., **Veklich T.O.**, Rodik R.V. The effect of calixarene C-107 on kinetic characteristics of Na^+, K^+ -ATPase of myometrium plasma membrane. IV International Summer School "Supramolecular Systems in Chemistry and Biology": Abstracts book. Regensburg, Germany. 2011: ST 6.

56. **Веклич Т.А.**, Шкрабак А.А., Костерин С.А. Каликс[4]арен С-90 как ингибитор $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазы плазматической мембраны гладкомышечных клеток. Тезиси докладов VIII Международной научно-технической конференции „Актуальные вопросы биологической физики и химии”. Севастополь, Крым, Украина. 2012: 156-157.

57. **Veklich T.**, Shkrabak A., Kosterin S. Comparative analysis of structure of calix[4]arenephosphonic acids and their inhibitory properties towards smooth muscle Na^+, K^+ -ATPase. International Symposium "Biological motility: Fundamental and Applied Science". Pushchino. Russia. 2012, 2: 241-242.

58. **Veklich T.**, Shkrabak A., Rodik R., Kalchenko V., Kosterin S. Calixarenes as inhibitors of ion-transporting ATPases of smooth muscle cell plasma membrane. III International Symposium "Intracellular Signaling and Bioactive Molecules Design": Abstracts book. Lviv, Ukraine. 2012: 163.

59. Shkrabak A., **Veklich T.**, Bevza A., Cherenok S., Rodik R., Kalchenko V., Kosterin S. Na^+, K^+ -ATP-ase of myometrium cell plasma membrane and calixarenes. III International Symposium "Intracellular Signaling and Bioactive Molecules Design": Abstracts book. Lviv, Ukraine. 2012: 51.

60. Shkrabak A., **Veklich T.**, Cherenok S. The structure features and inhibitory properties of calixarenes relative to Na^+, K^+ -ATP-ase of myometrium cell plasma membrane. VI International Summer School "Supramolecular Systems in Chemistry and Biology": Abstracts book. Strasbourg, France. 2012: SL 5.

61. Родік Р.В., Черенок С.О., Кальченко В.І., Шкрабак О.А., **Веклич Т.О.**, Костерін С.О. Молекулярний дизайн, синтез та біологічні дослідження каліксаренових регуляторів внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу в гладеньких м'язах в нормі та у випадку порушень скоротливої функції. Тези доповідей наукової звітної сесії „Фундаментальні проблеми створення нових речовин і матеріалів хімічного виробництва”. Київ. 2012: 58-59.

62. **Веклич Т.О.**, Шкрабак О.А., Мазур Ю.Ю. Дослідження впливу каліксарену С-90 на активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин. Тезиси докладов Научно-практической конференции „Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения”. Новый Свет, Крым, Украина. 2013, 2: 325-326.

63. Костерин С.А., Бабич Л.Г., Шлыков С.Г., **Веклич Т.А.**, Лабынцева Р.Д., Цымбалюк О.В., Шкрабак А.А., Бевза А.В., Бевза А.А., Родик Р.В., Черенок С.О., Кальченко О.И., Кальченко В.И. Каликсарены как эффекторы АТФ-гидролаз. Тезиси докладов Научно-практической конференции „Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения”. Новый Свет, Крым, Украина. 2013, 2: 175-176.

64. Shkrabak O.A., **Veklich T.O.**, Bevza O.V. Calixaren C-90 selectively inhibits Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase of myometrium cell plasma membrane / // Abstracts 9th Parnas Conference. Jerusalem, Israel. 2013: 84.

65. Мазур Ю.Ю., **Веклич Т.О.**, Шкрабак О.А., Бевза О.В. Інгібітор Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани калікс[4]арен С-90 як модулятор концентрації Ca^{2+} в міоцитах матки. Тези доповідей конференції молодих учених „Актуальні проблеми біохімії та біотехнології”. Київ. Укр. біохім. журн. 2013, 85(4): 141.

66. Мазур Ю.Ю., **Веклич Т.А.**, Шкрабак А.А., Бевза А.В. Каликс[4]арен С-90 как ингибитор Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза плазматической мембраны. Тезисы докладов международной конференции молодых ученых „Экспериментальная и теоретическая биофизика”. Пушино, Россия. 2013: 58-59.

67. Мазур Ю.Ю., **Веклич Т.О.**, Шкрабак О.А. Калікс[4]арен С-90 пригнічує кальцієві помпи субклітинних структур міометрія за механізмом повного неконкурентного інгібування. Матеріали конференції “Youth nanobiotech – 2014”. Київ. Український науково-медичний молодіжний журнал. 2014, 80(3): 63.

68. Мазур Ю.Ю., **Веклич Т.О.**, Шкрабак О.А., Цимбалюк О.В. Селективний інгібітор Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани – калікс[4]арен С-90 – підвищує концентрацію Ca^{2+} у міоцитах матки та пригнічує релаксацію м’язевого скорочення. Тези доповідей конференції молодих учених „Актуальні проблеми біохімії та біотехнології - 2014”. Київ. Укр. біохім. журн. 2014, 86(4): 209.

69. Shkrabak O., **Veklich.T.**, Masur Iu., Kosterin S. Kinetic mechanism of smooth muscle cell plasma membrane Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase selective inhibition by calixarene C-90. Матеріали конференції “Youth Scientist Forum: Abstracts book. Paris, France. 2014: 57.

70. Shkrabak O., **Veklich.T.**, Masur Iu., Kosterin S. Kinetic mechanism of smooth muscle cell plasma membrane Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase selective inhibition by

calixarene C-90. Abstracts of The FEBS EMBO 2014 Conference, FEBS Journal. 2014, 281 (Suppl. 1): 579.

71. Mazur Iuliia, **Veklich Tetyana**, Shkrabak Oleksandr, Tsybalyuk Olga. Calix[4]arene C-90 as selective inhibitor of plasma membrane calcium pump and new myometrium contraction agent. Матеріали конгресу “1 st Congress of the Polish Biochemistry, Cell Biology, Biophysics and Bioinformatics: Abstracts book. Warsaw, Poland. 2014: 153.

72. **Векліч Тетяна**, Шкрабак Олександр, Мазур Юлія, Костерін Сергій. Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза плазматичної мембрани міоцитів матки та дія калікс[4]аренів на неї. Тези доповідей 4-го з'їзду Українського товариства клітинної біології. Ужгород, Україна. 2014: 10.

73. Mazur Iuliia, **Veklich Tetyana**, Shkrabak Oleksandr. The new smooth muscle cell contraction agent - calix[4]arene C-90. Тези доповідей 4-го з'їзду Українського товариства клітинної біології. Ужгород, Україна. 2014: 7.

74. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Мазур Ю.Ю. Калікс[4]арени як селективні інгітори АТР-гідролазних систем плазматичної мембрани гладеньких м'язів. Матеріали XI Укр. біохім. з'їзду. Київ. Укр. біохім. журн. 2014, 86(5 (додаток 1)): 96-97.

75. Мазур Ю.Ю., **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А. Інгібітор Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани - калікс[4]арен C-90 викликає зміну концентрації Ca^{2+} у гладеньком'язових клітинах матки. Матеріали XI Укр. біохім. з'їзду. Київ. Укр. біохім. журн. 2014, 86(5 (додаток 1)): 174-175.

76. Костерін С.О., Черенок С.О., **Векліч Т.О.**, Родік Р.В., Шкрабак О.А., Лабинцева Р.Д., Бевза О.В., Кальченко В.І. Каліксарени як ефектори АТР-гідролазних систем. Тези доповідей наукової звітної сесії „Фундаментальні проблеми створення нових речовин і матеріалів хімічного виробництва”. Київ. 2014: 61-63.

77. Mazur Iu.Iu, **Veklich T.O.**, Shkrabak O.A., Tsybalyuk O.V. Plasma membrane Ca^{2+} -pump new inhibitor and suppressor of myometrium spontaneous

relaxation. Матеріали 10-ї конференції «Bridges in Life Sciences». Wroclaw, Poland. 2015: 93.

78. Мазур Ю.Ю., **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А. Трансмембранний потенціал не впливає на інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани клітин міометрія калікс[4]ареном С-90. Тези доповідей VI-го з'їзду Українського біофізичного товариства. Луцьк, Україна. 2015: 70-71.

79. Шкрабак О.А., **Векліч Т.О.**, Мазур Ю.Ю., Костерін С.О. Структурні особливості каліксарену С-90, що визначають ефективність інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани клітин міометрія. Тези доповідей VI-го з'їзду Українського біофізичного товариства. Луцьк, Україна. 2015: 80-81.

80. Masur Iuliia, **Veklich Tetyana**, Shkrabak Alexander, Kosterin Sergiy. New myometrium plasma membrane calcium pump suppressor - calix[4]arene C-90 and its structural peculiarities which determine efficiency of its action. Матеріали 44-ї конференції «Muscle Research in Health and Disease». Warsaw, Poland. 2015: 62.

81. Shkrabak Alexander, **Veklich Tetyana**, Masur Iuliia, Kosterin Sergiy. Calix[4]arene C-90 selectively inhibits $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase of miometrium cell plasma membrane. Матеріали 44-ї конференції «Muscle Research in Health and Disease». Warsaw, Poland. 2015: 63.

82. Кальченко В.І., Костерін С.О., Родік Р.В., **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Черенок С.О. Одержання каліксаренів як ефекторів АТР-гідролазних систем для потреб медицини. Тези доповідей наукової звітної сесії „Фундаментальні проблеми створення нових речовин і матеріалів хімічного виробництва”. Київ. 2015: 60-61.

83. Ніконішина Ю., Мазур Ю., Шкрабак О., **Векліч Т.** Кінетичний механізм інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза плазматичної мембрани та саркоплазматичного ретикулуму калікс[4]ареном С-90. Тези доповідей міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів „Молодь і поступ біології”. Львів. 2016: 45-46.

84. Mazur Iu.Iu., Shkrabak O.A., **Veklich T.O.** Plasma membrane Ca^{2+} -pump in smooth muscle cells: its role, regulation, and new artificial inhibitor. Abstracts 10th

Parnas Conference. Wroclaw, Poland. 2016: 19.

85. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Геращенко І.В., Мохорт М.А., Костерін С.О. ІФТ-35 (похідне циклопента[*d*]піримідину) як селективний активатор Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани міоцитів матки. Тези доповідей VIII-го національного з'їзду фармацевтів України. Харків, Україна. 2016, 2: 15.

86. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Мазур Ю., Костерін С.О. Порівняльне дослідження впливу калікс[4]арену С-90 та його аналогів на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазну активність у плазматичній мембрані міоцитів матки. Тези доповідей 5-го з'їзду Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом. - Одеса, Україна. 2016: 16.

87. Mazur Iu.Iu., **Veklich T.O.**, Shkrabak O.A., Mohart M.A., Demchenko A.M., Gerashchenko I.V., Rodik R.V., Boyko V.I., Kalchenko V.I., Kosterin S.O. Selective inhibition of smooth muscle plasma membrane transport Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase by calix[4]arene C-90 and its activation by IPT-35 compound. Тези доповідей 7th TriNet Meeting - RECOOP. Budapest, Hungary. 2016: 94..

88. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Родік Р.В., Кальченко В.І., Костерін С.О. Калікс[4]арен С-90 як перспективна супрамолекулярна сполука для регуляції активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин. Тези V наукової конференції «Нанорозмірні системи: будова, властивості, технології». Київ, Україна. 2016: 144.

89. Ніконішина Ю., Шкрабак О., **Векліч Т.** Інгібіторний вплив калікс[4]арену С-956 на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазу плазматичної мембрани клітин міометрія. Тези доповідей міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів „Молодь і поступ біології”. Львів. 2017: 43-44.

90. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Ніконішина Ю.В. Супрамолекулярні сполуки калікс[4]арени як перспективні селективні інгітори АТР-гідролазних систем плазматичної мембрани гладеньких м'язів. Тези доповідей всеукраїнської наукової конференції «Актуальні задачі хімії: дослідження та перспективи». Житомир, Україна. 2017: 139-142.

91. **Векліч Тетяна**, Шкрабак Олександр, Ніконішина Юлія Калікс[4]арен

C-956 селективно інгібує $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани. Тези доповідей 4-ї Міжнародної наукової конференції “Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології”. Дніпро, Україна. 2017: 233-234.

92. Nikonishyna Yu., Shkrabak O., **Veklich T.** The inhibitory effect of calix[4]arene C-956 on the plasma membrane $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase of uterine myocytes. Theses of reports of the 25th Annual Conference “Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology”. Kyiv, Ukraine. Ukr. Biochem. J. 2017, 89(3): 72.

93. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Ніконішина Ю.В. Вплив структурних аналогів калікс[4]арену С-90 на активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани гладеньких м'язів. Збірник матеріалів всеукраїнської наукової конференції «Актуальні задачі хімії: дослідження та перспективи». Житомир, Україна. 2018: 221-223.

94. **Veklich T.O.**, Shkrabak O.A., Nikonishyna Yu.V., Kosterin S.O. The new smooth muscle cell contraction agent - calix[4]arene C-956. FEBS3+Meeting-XI Parnas conference on Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine. Ukr. Biochem. J. 2018, 90: 55.

95. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Ніконішина Ю.В. Вплив каліксарену С-956 на кінетичні параметри $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани міоцитів матки. Тези доповідей міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні проблеми сучасної біології, тваринництва та ветеринарної медицини». Львів, Україна. 2018: 102.

96. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А. Кінетична інтерпретація дії калікс[4]арену С-956 на активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани міоцитів матки. Тези доповідей VII-го з'їзду Українського біофізичного товариства. Київ-Луцьк, Україна. 2018: 19.

97. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Гольден О.В. Кінетичний механізм інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани міоцитів матки калікс[4]ареном С-956. Збірник матеріалів всеукраїнської наукової конференції «Актуальні задачі хімії: дослідження та перспективи». Житомир, Україна. 2019: 225-257.

98. **Veklich T.**, Shkrabak O., Kosterin S. Calix[4]arene C-956 as a promising supra-molecular compound to regulate the activity of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase of smooth muscle cells. Abstracts 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation. Yaremche, Ukraine. 2019: 15.

99. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Костерін С.О. Дослідження інгібіторного впливу аналогів калікс[4]арену С-90 на Ca^{2+} -помпу плазматичної мембрани гладеньких м'язів. Тези доповідей XXV української конференції з органічної та біоорганічної хімії. Луцьк, Україна. 2019: 163.

100. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А. Супрамолекулярні сполуки калікс[4]арени як перспективні селективні інгібітори кальцієвої помпи плазматичної мембрани гладеньких м'язів. Матеріали XII Укр. біохім. конгресу. Тернопіль, Україна. Медична та клінічна хімія. 2019, 21(3 (додаток)): 67-68.

101. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Родік Р.В., Кальченко В.І., Костерін С.О. Калікс[4]арени С-107 та С-90 впливають на рідинно-кристалічний стан плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин // Тези VI наукової конференції «Нанорозмірні системи: будова, властивості, технології» - Київ, Україна. – 2019. – С. 198.

102. **Veklich T.O.**, Shkrabak O.A., Golden O.V., Kardash O.O., Kosterin S.O. Calix[4]arene C-956 inhibitory action kinetic on plasma membrane Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity of smooth muscle cell // Materials of the International Meeting «Clusters and nanostructured materials (CNM-6)» - Uzhgorod, Ukraine. – 2020. – P. 320-322.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	38
ВСТУП	40
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	53
1.1. Мембранні механізми регуляції концентрації Ca^{2+} в гладеньком'язових клітинах	53
1.2. Mg^{2+} ,АТР-залежна кальцієва помпа плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин. Структурна організація, властивості та регуляція ..	56
1.2.1. Структурно-функціональні властивості Mg^{2+} ,АТР-залежної кальцієвої помпи плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин	57
1.2.2. Регуляція та модифікація активності Mg^{2+} ,АТР-залежної кальцієвої помпи плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин	69
1.2.3. Mg^{2+} ,АТР-залежна кальцієва помпа плазматичної мембрани та патології скоротливої функції гладеньких м'язів	86
1.2.4. Mg^{2+} ,АТР-залежна кальцієва помпа плазматичної мембрани та фармакологія гладеньких м'язів	87
1.2.5. Узагальнення до підрозділу 1.2	88
1.3. Інші Mg^{2+} -залежні АТР-гідролазні системи плазматичної мембрани та саркоплазматичного ретикулуму гладеньком'язових клітин	90
1.3.1. Структурна організація, властивості та регуляція активності Na^+ , K^+ -АТРazi плазматичної мембрани	90
1.3.2. Структурна організація, властивості та регуляція активності Mg^{2+} -АТРazi плазматичної мембрани	96
1.3.3. Структурна організація, властивості та регуляція активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРazi саркоплазматичного ретикулума	101
1.3.4. Узагальнення до підрозділу 1.3	106
1.4. Каліксарени та їхня біологічна активність	108
1.4.1. Структура та синтез каліксаренів	108
1.4.2. Фізико-хімічні властивості каліксаренів	110

1.4.3. Прояви біологічної активності каліксаренів	112
1.4.4. Токсичність та імуногенність каліксаренів	126
1.4.5. Перспективи використання каліксаренів у фізико-хімічній біології, біотехнології та фармакології	128
1.4.6. Узагальнення до підрозділу 1.4	131
Узагальнення до розділу 1.....	131
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	132
2.1. Тварини та тканини, які було використано в дослідженнях	132
2.2. Методи препаративної біохімії	132
2.2.1. Виділення суспензії гладеньком`язових клітин з матки щурів	132
2.2.1.1. Одержання суспензії гладеньком`язових клітин	132
2.2.1.2. Характеристика клітинної суспензії	134
2.2.2. Виділення та тестування фракції плазматичних мембран клітин міометрія	137
2.2.2. 1. Одержання фракції плазматичних мембран	137
2.2.2.2. Характеристика фракції плазматичних мембран	138
2.3. Флуоресцентні методи	142
2.3.1. Визначення Ca^{2+} -транспортувальної активності везикул плазматичних мембран	142
2.3.2. Дослідження міоцитів методом лазерної скануючої конфокальної мікроскопії	143
2.3.3. Дослідження мембранотропних ефектів калікс[4]арену C-99 з використанням потенціалчутливого флуоресцентного зонда DiOC ₆ (3) методом протокової цитометрії	144
2.4. Методи ензимології	145
2.4.1. Визначення АТР-гідролазних активностей у фракції плазматичних мембран клітин та швидкості неензиматичного гідролізу АТР	145

2.4.1.1. Визначення $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності у фракції плазматичних мембран	146
2.4.1.2. Визначення Na^+, K^+ -АТРазної та Mg^{2+} -АТРазної активності у фракції плазматичних мембран	147
2.4.1.3. Очищення та реконструкція $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичних мембран клітин міометрія	148
2.4.1.4. Визначення активності очищеної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичних мембран клітин	148
2.4.1.5. Визначення ензиматичної АТРазної активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази саркоплазматичного ретикулума	149
2.4.2. Вивчення впливу калікс[4]аренів та сполук М-1 і М-3 на АТР-гідролазні активності плазматичної мембрани	149
2.4.3. Вивчення впливу калікс[4]аренів на неензиматичний гідроліз АТР.....	150
2.5. Структурні формули, синтез та характеристика досліджуваних калікс[4]аренів	151
2.6. Спектрофотометричні дослідження розчинів калікс[4]аренів	154
2.7. Дослідження взаємодії калікс[4]арену С-107 з мембранними фрагментами із використанням методу лазерно-кореляційної спектроскопії	155
2.8. Дослідження мембранотропних ефектів калікс[4]аренів з використанням 8-анілінонафтален-1-сульфонової кислоти	155
2.9. Молекулярне моделювання комплексу “калікс[4]арен С-107 -АТР”	156
2.10. Методи тензометрії	157
2.11. Методи математичного моделювання	158
2.12. Методи кінетичного аналізу	159
2.12.1. Аналіз залежностей ензиматичних активностей від концентрації субстрату, іонів-активаторів та ефекторів	159
2.12.2. Аналіз кінетики реакції калікс[4]арен-індукованого гідролізу АТР.....	160

2.13. Комп'ютерне моделювання взаємодії калікс[4]арену C-107 і його модельних сполук з ліганд-зв'язуючими ділянками Na^+ , K^+ -АТРази плазматичної мембрани	162
2.14. Методи статистичного аналізу	163
2.15. Матеріали і реактиви	164
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	165
РОЗДІЛ 3. ДОСЛІДЖЕННЯ МЕМБРАНОТРОПНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ КАЛІКС[4]АРЕНІВ	165
3.1. Дія калікс[4]арену C-107 на гідродинамічний радіус везикул плазматичних мембран	165
3.2. Дія калікс[4]арену C-99 на K^+ -дифузійний трансмембранний потенціал у системі “ K^+ /валіноміцин – везикули плазматичних мембран”	167
3.3. Дослідження проникнення калікс[4]арену C-107 у гладеньком'язові клітини матки	170
3.4. Рідинно-кристалічний стан плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин за дії калікс[4]аренів C-107 та C-90	173
РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ КАЛІКС[4]АРЕНІВ НА ЕНЗИМАТИЧНУ АКТИВНІСТЬ Ca^{2+}, Mg^{2+}-АТРази ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ КЛІТИН МІОМЕТРІЯ	178
4.1. Дія калікс[4]арену C-90 на активність АТР-гідролаз плазматичної мембрани	178
4.2. Дія структурних компонентів калікс[4]арену C-90 на активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани	181
4.3. Залежність інгібіторної дії аналогів калікс[4]арену C-90 на активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани від їхньої структури	183
4.4. Кінетика інгібіторної дії калікс[4]арену C-90 на активність транспортної Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани	200
4.4.1. Концентраційна залежність активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази від іонів Са за дії калікс[4]арену C-90	200
4.4.2. Концентраційна залежність активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази від іонів	

Mg за дії калікс[4]арену C-90	203
4.4.3. Концентраційна залежність активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази від АТР за дії калікс[4]арену C-90	206
4.5. Вплив калікс[4]арену C-90 на Ca^{2+} -транспортувальну активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани	209
4.5.1. Характеристика Mg^{2+} , АТР-залежного Ca^{2+} -транспорту у везикулах плазматичної мембрани	210
4.5.2. Mg^{2+} , АТР-залежний Ca^{2+} -транспорт у везикулах плазматичної мембрани за дії калікс[4]арену C-90	213
4.6. Математичне моделювання впливу калікс[4]арену C-90 на вміст іонів Са у незбуджених гладеньком'язових клітинах	214
4.7. Вплив калікс[4]арену C-90 на концентрацію Ca^{2+} у клітинах гладеньких м'язів	218
4.8. Вплив калікс[4]арену C-90 на гідродинамічний діаметр гладеньком'язових клітин	220
4.9. Молекулярний докінг взаємодії калікс[4]арену C-90 і його модельних сполук з ліганд-зв'язувальними ділянками Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани	222
4.10. Вплив калікс[4]арену C-90 на активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази саркоплазматичного ретикулула	227
4.11. Дія калікс[4]арену C-90 на скоротливу активність міометрія	234
4.12. Дія сполуки ІФТ-35 – антагоністу калікс[4]арену C-90 на активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин	237
РОЗДІЛ 5. ВПЛИВ КАЛІКС[4]АРЕНІВ НА ЕНЗИМАТИЧНУ АКТИВНІСТЬ Na^+, K^+-АТРази ТА Mg^{2+}-АТРази ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ КЛІТИН МІОМЕТРІЯ	243
5.1. Дія калікс[4]аренів на активність Na^+ , K^+ -АТРази та Mg^{2+} -АТРази	243
5.2. Порівняння ефективності інгібувальної дії калікс[4]аренів C-97 , C-99 , C-	

107 та убаїну на активність Na^+, K^+ -АТРази	246
5.3. Вплив структурних компонентів калікс[4]арену C-107 на активність Na^+, K^+ -АТРази	253
5.4. Порівняльне дослідження впливу калікс[4]арену C-99 та його структурних аналогів на Na^+, K^+ -АТРази активність	260
5.5. Особливості дії калікс[4]арену C-97 на активність Na^+, K^+ -АТРази	269
5.5.1. Дія калікс[4]арену C-97 на концентраційну залежність активності Na^+, K^+ -АТРази від іонів Mg	269
5.5.2. Дія калікс[4]арену C-97 на концентраційну залежність активності Na^+, K^+ -АТРази від АТР	270
5.5.3. Дія калікс[4]арену C-97 на концентраційну залежність активності Na^+, K^+ -АТРази від співвідношень концентрацій $[\text{Na}^+]/[\text{K}^+]$	272
5.5.4. Дія калікс[4]арену C-97 на концентраційну залежність активності Na^+, K^+ -АТРази від убаїну	274
5.6. Особливості дії калікс[4]арену C-107 на активність Na^+, K^+ -АТРази	276
5.6.1. Дія калікс[4]арену C-107 на концентраційну залежність активності Na^+, K^+ -АТРази від убаїну	276
5.6.2. Дія калікс[4]арену C-107 на концентраційну залежність активності Na^+, K^+ -АТРази від АТР	280
5.6.3. Дія калікс[4]арену C-107 на концентраційну залежність активності Na^+, K^+ -АТРази від іонів Mg	283
5.7. Калікс[4]арени C-97 та C-107 підсилюють інгібувальну дію убаїну на активність Na^+, K^+ -АТРази	288
5.8. Порівняльна дія калікс[4]аренів C-97 , C-99 та C-107 на активність Na^+, K^+ -АТРази у плазматичній мембрані скоротливих (міометрій) та рухливих (сперматозоїди) клітин	290
5.9. Молекулярний докінг взаємодії калікс[4]арену C-107 і його модельних сполук з ліганд-зв'язувальними ділянками Na^+, K^+ -АТРази	294
5.10. Порівняльне дослідження дії калікс[4]арену C-99 та убаїну на механокінетику процесу «скорочення-розслаблення» ГМ саесум щурів	307

РОЗДІЛ 6. ДОСЛІДЖЕННЯ ДІЇ КАЛІКС[4]АРЕНІВ НА НЕЕНЗИМАТИЧНИЙ ГІДРОЛІЗ АТР	312
6.1. Гідроліз АТР, який стимулюється деякими калікс[4]аренами	312
6.2. Дослідження кінетики гідролізу АТР, який індукується калікс[4]ареном С-107	314
6.3. Комплексоутворення між калікс[4]ареном С-107 та АТР	317
6.4. Дослідження властивостей реакції гідролізу АТР, який індукується калікс[4]ареном С-107	323
ЗАКЛЮЧНИЙ РОЗДІЛ	330
ВИСНОВКИ	348
ПЕРЕЛІК ЦИТОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	352

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АХЕ – ацетилхолін естераза

БСА – бичачий сироватковий альбумін

ГМ – гладенькі м'язи

ГМК – гладеньком'язова клітина

ДМСО – диметилсульфоксид

ЕГТА – етиленглікольдіамінтетраоцтова кислота

ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота

ЛЗД – ліганд-зв'язувальні ділянки

МХ – мітохондрія

ПКА – протеїнкаіаза А

ПКС – протеїнкаіаза С

ПМ – плазматична мембрана

СР – саркоплазматичний ретикулум

ЛКС – лазерно-кореляційна спектроскопія

АДР – аденозиндифосфат

АТР – аденозинтрифосфат

СТР – цитидинтрифосфат

ГТР – гуанозинтрифосфат

$[Ca^{2+}]_e$ – зовнішньоклітинна концентрація кальцію

$[Ca^{2+}]_i$ – внутрішньоклітинна концентрація кальцію

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

Ноеchst – 2'-(4-етоксифеніл)-6-(4-метил-1-піперазиніл)-1Н,3'Н-2,5'-бібензimidазол

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

DiOC₆(3) – 3,3'-дігексилוקсакарбоцианінйодит

SDS – натрій додецилсульфат

Tris – трис(гідроксиметил)амінометан

Tg – тапсигаргін

Ca^{2+} -помпа – Mg^{2+} , АТР-залежна Ca^{2+} -транспортувальна система плазматичної мембрани та саркоплазматичного ретикулуму

Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза – Mg^{2+} -залежна АТРаза, що активується іонами Са (К.Ф. 3.6.3.8)

Na^+ , K^+ -АТРаза – Mg^{2+} -залежна АТРаза, що активується іонами Na і K (К.Ф. 3.6.3.9)

Mg^{2+} -АТРаза – “базальна” Mg^{2+} -АТРаза, Ca^{2+} -незалежна Mg^{2+} -залежна АТРаза, визначається в присутності Mg^{2+} (мМ), але за відсутності Ca^{2+} в середовищі інкубації

Ca^{2+} -АТРаза – низькоафінна щодо іонів Са, Mg^{2+} -незалежна АТРаза, визначається в присутності Ca^{2+} (мМ), але за відсутності Mg^{2+} в середовищі інкубації

$I_{0,5}$ – 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 АТР

n_H – коефіцієнт Хілла

n – кількість дослідів

ВСТУП

Актуальність теми

Важливу роль у функціонуванні внутрішніх органів та систем органів відіграють гладенькі м'язи (ГМ), які забезпечують діяльність уrogenітальної системи, шлунково-кишкового тракту, кровоносних та лімфатичних судин, сфінктера зіниці ока, дихальних шляхів [116, 260].

Іони кальцію (Ca^{2+}) є критично необхідними для реалізації широкого спектру клітинних функцій. Вони є важливими внутрішньоклітинними месенджерами і саме під контролем Ca^{2+} -залежних сигнальних шляхів відбувається більшість біохімічних та фізіологічних процесів, наприклад: скорочення м'язів (скелетних, гладеньких, міокарду), запліднення, проліферація, секреція, нейротрансмісія, клітинний ріст, а також апоптоз та некроз [68, 85, 89, 140, 423, 433]. Для реалізації процесів скорочення/розслаблення ГМ, зокрема, міометрія, необхідно, щоб рівень цитоплазматичного Ca^{2+} у міоплазмі динамічно та оборотно змінювався в діапазоні концентрацій від наближено 100 нМ (стан спокою, релаксація механічної напруги) до 1 мкМ (скорочення) [2, 63, 74, 260, 397, 435, 505]. За дії іонів Ca відбувається зміна конформації білків м'язових фібрил, в результаті чого стає можливим приєднання міозину до актинових ланцюжків [142]. Проте, незважаючи на значну кількість експериментальних біохімічних та біофізичних робіт, присвячених дослідженню внутрішньоклітинних кальцієвих сигналів в ГМ матки, маємо вельми обмежені дані щодо механізмів підтримання фізіологічно значущої концентрації іонів Ca та її спрямованої регуляції у міоцитах матки в нормі та за патологічних станів.

На сьогодні немає сумнівів, що деякі патології скоротливої функції ГМ пов'язані з порушенням кальцієвого гомеостазу в міоцитах, наприклад, гіпо- та гіпертонус матки, невиношування плоду, гіпо- та гіпертензія, атонія кишкового тракту та інші патології його моторики, астма.

У міоцити ГМ Ca^{2+} потрапляє з позаклітинного простору крізь плазматичну мембрану (ПМ) через різноманітні кальцієві канали або звільняється з внутрішньоклітинних Ca^{2+} депо внаслідок його пасивного транспорту за електрохімічним градієнтом. Основними системами енергозалежного видалення Ca^{2+} з цитозолу є кальцієві помпи ПМ та саркоплазматичного ретикулума (СР), $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник ПМ а також Ca^{2+} -уніпортер мітохондрій (МХ) [158, 174, 402, 468].

Важливу роль у забезпеченні контролю скорочення - розслаблення м'язових клітин, зокрема гладеньком'язових, відіграють мембранозв'язані електроензими – Mg^{2+} ,АТР-залежні електрогенні іонні помпи: Ca^{2+} -транспортувальна та Na^+,K^+ -транспортувальна [5, 158, 199, 205, 331, 402, 457, 468].

У ПМ, яка має селективну проникність для різноманітних речовин, міститься низка Mg^{2+} -залежних АТРаза, котрі забезпечують внутрішньоклітинний іонний гомеостаз. До них належать: електроензим транспортна $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -АТРаза (КФ 3.6.3.8), яка забезпечує електрогенний активний Mg^{2+} ,АТР-залежний транспорт Ca^{2+} з клітини у позаклітинне середовище [63, 65, 251, 467, 469]; електроензим убаїнчутлива Na^+,K^+ -АТРаза (КФ 3.6.3.9), яка здійснює енергозалежне електрогенне протилежно спрямоване перенесення іонів Na та K (співвідношення 3:1) із клітини та в клітину відповідно [146, 246, 285, 436]; убаїнрезистентна “базальна” Mg^{2+} -АТРаза, яка, як вважають, причетна до регуляції концентрації протонів H^+ у позаклітинному та внутрішньоклітинному просторах [72, 212, 352, 446].

Порушення Ca^{2+} -залежної скоротливої функції міометрія у жінок часто стає причиною різноманітних патологій: слабкості пологової діяльності, спонтанних абортів, передчасних пологів, викидней, атонії, гіпо- і гіпертонусу матки [46, 122, 125, 161, 273, 523]. Частота передчасних пологів у світі за середніми даними становить 9,6 % [1, 155, 214]. Зазвичай такі патології обумовлені порушеннями у функціонуванні мембранозв'язаних систем перенесення катіонів. Тому актуальним є пошук сполук, які були б здатні

нормалізувати Ca^{2+} -залежну скоротливу функцію міометрія у випадку її порушення за вищезазначених патологічних станів і водночас були б малотоксичними для організму.

Спрямований синтез і вивчення властивостей ефекторів, які здатні проникати через ПМ та оборотно з високою спорідненістю і селективністю змінювати ензиматичну чи транспортну активність окремих внутрішньоклітинних мембранозв'язаних і цитоплазматичних білків – одне з найважливіших завдань сучасної біологічної, біофізичної та біоорганічної хімії. Справді, створення нових високоефективних малотоксичних селективних інгібіторів та активаторів ензимів є вкрай необхідним, зокрема, для подальшого дослідження іонних, молекулярних і мембранних механізмів внутрішньоклітинної сигналізації. У галузі біохімії та біофізики м'язів це істотно для з'ясування закономірностей та механізмів такого унікального біологічного феномену, як електро- та фармакомеханічне спряження, вивчення ролі Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , а також протонів H^+ у його забезпеченні. В практичному ж аспекті такі розробки є основою для пошуку нових фармакологічних засобів, здатних ефективно модифікувати функціональну активність конкретних білків у випадку її порушення за патологічних станів.

У цьому аспекті, зокрема, цікавими є каліксарени – чашоподібні макроциклічні сполуки, які отримують циклоконденсацією паразаміщених фенолів і формальдегіду. Деякі каліксарени, зокрема, калікс[4]арени, мають противірусні, бактерицидні, протипухлинні та антитромботичні властивості і, як вважають, можуть бути ефективними інгібіторами й активаторами ензиматичних, рецепторних і транспортних мембранозв'язаних білків [47, 50, 98, 183, 198, 309, 345, 424, 512, 49]. Властивості каліксаренів як інгібіторів ензимів із початку XXI ст привертають дедалі більшу увагу вчених (хоча історія хімії цих супрамолекулярних сполук налічує понад 50 років). Існує велика кількість даних, які підтверджують можливість створення на основі каліксаренів рецепторів, іонних каналів, ДНК-чипів, штучних ензимів тощо. Щодо блокуючої дії каліксаренів, в науковій літературі є приклади, які

доводять ефективність інгібування каліксаренами потенціалозалежних аніонних каналів, активності лужної фосфатази [511]. Є дані про те, що каліксарени здатні проникати в клітину через ПМ [328]. Унікальна будова та властивості молекул каліксаренів дають змогу модифікувати їх структуру (використовуючи різні функціональні групи на верхньому й нижньому вінцях молекули), а отже, пошук нових каліксаренових ефекторів ензимів тільки розпочато. Слід зазначити, що каліксаренам притаманні низькі токсичність [186, 190, 202, 529] та імуногенність [258, 396], а також доступний синтез і низька вартість. На початок виконання нашої роботи попередні дані літератури вказували на те, що окремі калікс[4]арени можуть утворювати комплекси з АТР [485].

В Україні існує відома в світі наукова школа під керівництвом академіка НАН України В.І. Кальченка, яка має суттєві досягнення у галузі синтезу та вивчення хімічних та біологічних властивостей каліксаренів (Інститут органічної хімії НАН України).

Втім, на початку проведення власних біохімічних досліджень (2004 рік), що були описані в цій дисертації, результати щодо використання каліксаренів як модуляторів енергозалежних Ca^{2+} -транспортувальних систем та АТР-гідролаз практично були відсутні у світовій літературі.

В цілому ж можна стверджувати, що дослідження впливу каліксаренів на ензиматичні активності мембранозв'язаних електроензимів - Mg^{2+} , АТР-залежних кальцієвих помп ПМ і СР, Mg^{2+} , АТР-залежної натрієвої помпи ПМ, а також Mg^{2+} -АТРази ПМ, і на неензиматичний гідроліз АТР, являють значний інтерес як в теоретичному, так і практичному аспектах.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Експериментальна частина роботи виконувалась у 2004-2021 рр.

Дисертація відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (зав. – академік НАН України, професор Костерін С.О.), проблема “Біохімія тварин та

людини”: тема № 5, № держреєстрації 0104U003281, “Вивчення властивостей та регуляції АТР-залежних кальцієвих pomp мембранних структур ГМ” (2004-2008 рр.); тема № 5, № держреєстрації 0109U001589, “Вивчення біохімічних механізмів регуляції концентрації іонів Са в ГМК” (2009-2013 рр.); тема № 5, № держреєстрації 0114U003213, “Вивчення біохімічних механізмів спряження збудження та скорочення в гладеньком’язових клітинах” (2014-2018 рр.); тема № 5, № держреєстрації 0119U002508, “Вивчення біохімічних механізмів функціонування ГМК як Са²⁺-залежної тензоелектрохімічної рецепторної системи” (2019-2023 рр.).

Фінансова підтримка роботи відбувалась також за рахунок проектів ДФФД України за темами: – тема № 18, № держреєстрації 0104U006073, “Розроблення біохімічних технологій для пошуку, вивчення властивостей та механізму дії нових біологічно-активних речовин – регуляторів скорочення-розслаблення ГМ” (2004-2006 рр.); – тема № 18, № держреєстрації 0107U007194, “Вивчення впливу та механізмів дії каліксаренів на системи іонного транспорту в субклітинних мембранних структурах ГМ” (2007-2009 рр.); – тема № 14, № держреєстрації 0110U000988 “Супрамолекулярні системи в хімії та біології. Каліксарени як модулятори активності ензиматичних та транспортних білків ГМ” (2010-2012 рр.); – тема № 22, № держреєстрації 0110U005970, “З’ясування закономірностей та біофізикохімічних механізмів дії каліксаренів на функціонування каталітичних і транспортних білків біологічних мембран” (2010-2014 рр.); – тема № 15, № держреєстрації 0112U002624, “Вивчення біохімічних механізмів Са²⁺-залежного контролю скоротливої активності ГМК як складної кооперативної тензоелектрохімічної рецепторної системи. Розробка молекулярно-динамічної моделі регуляції концентрації іонізованого Са в міоцитах” (2012-2016 рр.); – тема № 22, № держреєстрації 0115U003638, “Об’єднаний проект: Фізико-хімічні та біологічні властивості каліксаренів. Розділ 2. Розробка нових нанорозмірних каліксаренових ефекторів АТР-залежних ензиматичних та катіон-транспортуючих систем” (2015-2019 рр.).

Мета і завдання дослідження

Мета роботи: з'ясувати біохімічні та фізико-хімічні механізми дії калікс[4]аренів на мембранозв'язані катіон-транспортувальні Mg^{2+} , АТР-залежні електроензими гладеньком'язових клітин (ГМК) та кальцієвий гомеостаз в міометрії.

Для реалізації поставленої мети вирішувалися наступні **завдання**:

1. Дослідити мембранотропні властивості калікс[4]аренів.
2. Вивчити вплив калікс[4]аренів на ензиматичну та транспортну активність Mg^{2+} , АТР-залежних кальцієвих pomp плазматичної мембрани та саркоплазматичного ретикулула.
3. Дослідити вплив калікс[4]аренів на ензиматичну активність Na^+ , K^+ -АТРази та Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани.
4. З'ясувати закономірності дії калікс[4]аренів на неензиматичний гідроліз АТР.

Об'єкти дослідження: фракція ПМ гладеньком'язових клітин матки свині; суспензія міоцитів міометрія щурів; реакції ензиматичного (Na^+ , K^+ -, Ca^{2+} , Mg^{2+} - та Mg^{2+} -залежного) у ПМ та СР та неензиматичного гідролізу АТР; транспорт Ca^{2+} крізь ПМ, концентрація Ca^{2+} у клітинах ГМ.

Предмет дослідження: закономірності дії калікс[4]аренів на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазну, Na^+ , K^+ -АТРазну та Mg^{2+} -АТРазну активності ПМ і Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазну активність СР клітин міометрія. Дослідження дії зазначених сполук на Mg^{2+} -АТР-залежну кальцієву помпу ПМ та Ca^{2+} -гомеостаз у міоцитах матки. Вивчення калікс[4]арен-індукованого неензиматичного гідролізу АТР.

Методи дослідження: препаративної та аналітичної біохімії, біохімічної мембранології, ензимології, спектрофотометрії, спектрофлуориметрії, протокової цитофлуориметрії, конфокальної мікроскопії, лазерно-кореляційної спектроскопії (ЛКС), світлової та електронної мікроскопії, обернено-фазової

високоєфективної рідинної хроматографії (у співпраці з Інститутом органічної хімії НАН України), кондуктометрії, тензометрії (у співпраці з кафедрою біофізики та медичної інформатики, Інститутом Високих Технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Інститутом фармакології та токсикології НАМН України), хімічної та біохімічної кінетики, математичного моделювання, комп'ютерного моделювання, молекулярної динаміки та докінг-аналізу, а також статистичного аналізу.

Наукова новизна одержаних результатів

В представленій роботі наведено результати комплексних досліджень біохімічних властивостей та фізико-хімічних закономірностей функціонування АТРазних систем в ГМ матки та особливостей модуляції їхньої активності калікс[4]аренами. У науково-теоретичному аспекті значення цієї роботи полягає у тому, що в ній наведені докази доцільності використання каліксаренових платформ для спрямованої модуляції активності катіон-транспортуювальних Mg^{2+} -АТР-залежних електроензимів.

Показано, що калікс[4]арен **C-107** здатний до високоафінної взаємодії з фрагментами ПМ і, формуючи комплекси з мембранними везикулами, сприяє їхній агрегації між собою або з мікрочастинками калікс[4]арену. Встановлено, що калікс[4]арен **C-90** може не тільки вбудовуватись в мембрану, але й проникати крізь неї.

Вперше встановлено, що калікс[4]арени **C-90** та **C-107** проявляють мембранотропні ефекти і опосередковано впливають на мембранні ензими.

Вперше знайдено низькомолекулярний селективний (на рівні ПМ) органічний афінний інгібітор Mg^{2+} -АТР-залежної Ca^{2+} -помпи ПМ - калікс[4]арен **C-90**.

Цей калікс[4]арен селективно інгібує активність Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази у випадку як ПМ міометрія, так і препарату очищеної солубілізованої Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази, коефіцієнти інгібування $I_{0,5}$ складають $20,2 \pm 0,5$ і $34,6 \pm 6,4$ мкМ відповідно. Встановлено, що структурний фрагмент **C-150** (суто

«калікс[4]аренова чаша») та модельна сполука **M-1** (у складі молекули калікс[4]арену **C-90** маємо 4 фрагменти **M-1**) незначно пригнічують $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазну активність ПМ. Ефективність інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази калікс[4]аренами залежить від кількості та розташування фенілсульфоніламідинних груп на верхньому вінці даних калікс[4]аренів. Модифікація нижнього вінця калікс[4]аренової «чаші» двома октанольними залишками (**C-956**), замість залишків пропанолу (**C-90**), призводить до незначного збільшення ефективності інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ.

Доведено, що калікс[4]арен **C-90** діє як повний неконкурентний інгібітор $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ, він не впливав на коефіцієнти активації для іонів Ca та Mg, уявну константу Міхаеліса K_m за АТР, але у всіх випадках зменшує максимальну початкову швидкість V_{\max} реакції гідролізу АТР.

Під дією калікс[4]арену **C-90** пригнічується Mg^{2+} , АТР-залежна акумуляція Ca^{2+} у везикулах ПМ міометрія. Результати математичного моделювання передбачили, що калікс[4]арен **C-90** має збільшувати концентрацію Ca^{2+} в незбуджених міоцитах. Дані конфокальної мікроскопії підтверджують це припущення: з використанням Ca^{2+} -чутливого флуоресцентного зонда fluo-4 AM вперше показано, що калікс[4]арен **C-90** транзійтно підвищує $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у міоцитах міометрія. Калікс[4]арен **C-90** зменшує ефективний гідродинамічний діаметр міоцитів міометрія. Він пригнічує швидкість релаксації м'язевого скорочення (у випадку реєстрації спонтанної активності смужок міометрія). Ця сполука також збільшує нормовану швидкість скорочення міометрія у відповідь на стимуляцію його утеротоніком окситоцином.

Вперше встановлено, що калікс[4]арени **C-97**, **C-99** і **C-107** селективно та значно ефективніше, ніж уабайн, пригнічують активність Na^+, K^+ -АТРази ПМ ($I_{0,5} < 100$ нМ). Ефективність їхнього інгібування залежить від взаємного розташування амінофосфонових груп та від хімічної модифікації верхнього та нижнього вінця молекули калікс[4]арену. Калікс[4]арени **C-97** та **C-107** не впливають на коефіцієнт активації для іонів Mg, уявну константу Міхаеліса K_m за АТР, але зменшують спорідненість Na^+, K^+ -АТРази до іонів Na.

Вперше показано, що деякі калікс[4]арени (**C-107** та **C-106**) стимулюють неензиматичний гідроліз АТР. Калікс[4]арен-індукований гідроліз АТР характеризується складною кінетикою та не підпорядковується закономірностям реакцій низьких порядків (нульового, першого). Величина енергії активації цього процесу становить $50,7 \pm 8,9$ кДж/моль.

Практичне значення одержаних результатів

Одержані результати є перспективними для подальшого з'ясування фізико-хімічних та біологічних властивостей каліксаренів як потенційних молекулярних “наноплатформ” для створення вискоелективних ліків нового покоління – селективних модуляторів функціонування АТР-залежних мембранозв'язаних систем катіонного (Ca^{2+} , Na^{+}) транспорту: це є необхідним для подальшого прогресу у боротьбі з небезпечними патологіями, пов'язаними із порушенням внутрішньоклітинного іонного (перш за все кальцієвого) гомеостазу (зокрема, мова йде за гіпертензію, діабет, ішемію/гіпоксію, різні нейропатії, слабкість пологової діяльності, викидні тощо).

Такі властивості калікс[4]арену **C-90**, як здатність підвищувати $[\text{Ca}^{2+}]_i$, зменшувати швидкість релаксації міометрія, свідчать на користь того, що ця сполука може бути використана у клінічній практиці у якості препарату для стимуляції пологової активності та/або для підвищення базального тонуусу ГМ матки, зокрема, на етапі виведення посліду після пологів. Калікс[4]арен **C-90** може бути перспективним фармакологічним препаратом у медичній практиці з огляду на його низьку токсичність.

Калікс[4]арени **C-97** і **C-107** (інгібітори $\text{Na}^{+}, \text{K}^{+}$ -АТРази ПМ), а також калікс[4]арен **C-90** (інгібітор транспортної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ) можуть бути корисними у біохімічній лабораторній практиці при експериментальному дослідженні функціонування катіон-транспортувальних Mg^{2+} -АТР-залежних електроензимів та іонного гомеостазу у ГМ.

Одержані в роботі експериментальні докази можливості деяких калікс[4]аренів утворювати комплекси з АТР та гідролізувати цей

нуклеозидтрифосфат можуть слугувати основою для подальших розробок нових аналітичних методів кількісного визначення вмісту АТФ на основі каліксаренів.

За матеріалами експериментальних досліджень дії калікс[4]арену **C-956** (найефективніший аналог калікс[4]арену **C-90**) був виданий патент на винахід (Векліч Т.О., Шкрабак О.А., Костерін С.О., Родік Р.В., Бойко В.І., Кальченко В.І. 5,11,17,23-тетра(трифтор)метил(фенілсульфоніліміно)-метиламіно-25,27-діоктилокси-26,28-дипропоксикалікс[4]арен (калікс[4]арен **C-956**), як селективний інгібітор Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани клітин міометрія // Патент на винахід № а201611842, МПК(2016.01): С07С 15/16, С07С 311/51, А61Р 15/04. Рішення про видачу патенту на винахід від 10.10.2018 № 24293/ЗА/18).

Достовірність одержаних результатів підтверджується несуперечністю застосованих експериментальних методик, результатами аналізу точності та похибок вимірювань, відтворюваністю одержаних даних, а також їх узгодженістю з існуючими експериментальними результатами інших авторів.

Особистий внесок здобувача

Дисертаційна робота – завершене комплексне біохімічне дослідження, що було самостійно виконане автором відповідно до програм експериментальних досліджень відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, спланованих, проведених і узагальнених протягом 2004-2021 рр.

Дисертанткою особисто обґрунтована концепція роботи, розроблена методологія експериментальних досліджень, зроблений пошук та аналіз даних літератури, проведений аналіз експериментальних даних. Автор зробив основний особистий внесок у цю роботу на всіх етапах її практичного виконання, формулювання висновків та написання статей.

Основні положення і висновки дисертаційної роботи, сформульовані автором особисто, обговорені разом з науковим консультантом – академіком

НАН України, проф. Костеріним С.О. (завідувачем відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України).

Всі експериментальні дослідження, результати яких наведені у роботі, проведені автором власноручно (у деяких з них брали участь к.б.н. Шкрабак О.А., к.б.н. Мазур Ю.Ю.). Результати досліджень структури комплексу “калікс[4]арен **C-107** – АТР” були люб'язно надані співробітниками відділу хімії фосфоранів (зав. – академік НАН України, проф. Кальченко В.І.) Інституту органічної хімії НАН України. Кінетичний і статистичний аналіз експериментальних результатів було здійснено автором дисертації.

В дослідженнях, результати яких представлені у цій роботі, брали участь співавтори публікацій.

Всі розділи дисертаційної роботи та її автореферат написані самостійно дисертанткою.

Апробація результатів дисертації

Результати досліджень, що викладені в дисертації, були представлені та обговорені на таких наукових форумах: IX-му Українському біохімічному з'їзді (Харків, Україна, 2006); Львівсько-Люблінській конференції „Сучасні аспекти експериментальної та клінічної біохімії” (Люблін, Польща, 2006, 2008); 6th Parnas Conference “Molecular Mechanisms of Cellular Signalling” (Krakow, Poland, 2007); Vth International symposium “Supramolecular Systems in Chemistry and Biology” (Kyiv, Ukraine, 2009); Научно-практическая конференция “Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения” (Новый Свет, Украина, 2009, 2011, 2013); VII Parnas Conference on biochemistry and molecular biology (Yalta, Ukraine, 2009); международной научно-практической конференции „Актуальные вопросы теоретической и прикладной биофизики, физики и химии” (Севастополь, Украина, 2010, 2012), X-му Українському біохімічному з'їзді (Одеса, Україна, 2010); III International Summer School “Supramolecular Systems in Chemistry and Biology” (Lviv, Ukraine, 2010); 8th Parnas Conference (Warsaw, Poland, 2011); IV

International Summer School “Supramolecular Systems in Chemistry and Biology” (Regensburg, Germany, 2011, 2012); International Symposium “Biological motility: Fundamental and Applied Science” (Pushchino, Russia, 2012); III International Symposium “Intracellular Signaling and Bioactive Molecules Design” (Lviv, Ukraine, 2012); Наукова звітна сесія „Фундаментальні проблеми створення нових речовин і матеріалів хімічного виробництва” (Київ, Україна, 2012); 9th Parnas Conference (Jerusalem, Israel, 2013); Міжнародна наукова конференція «Актуальні проблеми біофізики» (Львів, Україна, 2014); 1st Congress of the Polish Biochemistry, Cell Biology, Biophysics and Bioinformatics (Warsaw, Poland, 2014); з'їзді Українського товариства клітинної біології (Україна, 2014, 2016, 2019); XI-му Українському біохімічному конгресі (Київ, Україна, 2014), 10-тій конференції «Bridges in Life Sciences» (Wroclaw, Poland, 2015); VI-му з'їзді Українського біофізичного товариства (Луцьк, Україна, 2015); 44-тій конференції «Muscle Research in Health and Disease» (Warsaw, Poland, 2015); 10th Parnas Conference (Wroclaw, Poland, 2016); VIII-й національний з'їзд фармацевтів України (Харків, Україна, 2016); 7th TriNet Meeting – RECOOP (Budapest, Hungary, 2016); науковій конференції «Нанорозмірні системи: будова, властивості, технології» (Київ, Україна, 2016, 2019); науковій конференції «Актуальні задачі хімії: дослідження та перспективи» (Житомир, Україна, 2017, 2018, 2019, 2020; 2021); 4-ій міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» (Дніпро, Україна, 2017); VII-му з'їзді Українського біофізичного товариства (Київ-Луцьк, Україна, 2018); FEBS3+Meeting-XI Parnas conference on Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine (Київ, Україна, 2018); міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми сучасної біології, тваринництва та ветеринарної медицини» (Львів, Україна, 2018); XXV українській конференції з органічної та біоорганічної хімії (Луцьк, Україна, 2019); XII-му Українському біохімічному конгресі (Тернопіль, Україна, 2019); International Meeting «Clusters and nanostructured materials» (Ужгород, Україна, 2020).

Результати експериментів систематично доповідались та обговорювались на наукових семінарах відділу біохімії м'язів, наукових семінарах та засіданнях Вченої Ради Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (2004-2021 рр.).

Публікації

За результатами дисертації опубліковано **102** наукові праці, з них **36** статей (у тому числі 2 монографії, 2 статті у колективній монографії, 6 статей у міжнародних наукових журналах та 1 патент) у фахових наукових журналах, які включені до міжнародних наукометричних баз, та **66** тез доповідей у матеріалах міжнародних та всеукраїнських наукових конференціях та з'їздах. Монографію «Калікс[4]арени як модулятори АТР-гідролазних систем гладеньком'язових клітин» було визнано кращою за результатами конкурсу на краще книжкове видання НАН України у 2020 р. за хіміко-біологічним напрямом.

Структура та об'єм дисертації

Дисертація складається зі Вступу, Огляду літератури, Розділів, в яких описані основні методи досліджень, експериментальні результати та їх обговорення, Заключного розділу, Висновків та Списку використаних джерел (537 найменувань). Роботу викладено на 403 сторінках (основна частина на 314 сторінках), ілюстрована 114 рисунками та 9 таблицями.

Дисертантка висловлює щирю подяку колегам по: – Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (к.б.н. О.А. Шкрабаку, к.б.н. Ю.Ю. Мазур, к.б.н. О.В. Бевзі, к.х.н. С.О. Карахіму, к.т.н. О.Ю. Чуніхіну); – Інституту органічної хімії НАН України (акад. НАН України В.І. Кальченку, к.х.н. О.І. Кальченко, к.х.н. Р.В. Родіку, к.х.н. С.О. Черенку); – Інституту Високих Технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка (д.б.н. О.В. Цимбалюк); – Інституту фармакології та токсикології НАН України (проф., д.м.н. М.А. Мохарту, к.б.н. Геращенко І.В.) за творчу наукову співпрацю.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Мембранні механізми регуляції концентрації Ca^{2+} в гладеньком'язових клітинах.

Інформація, наведена у цьому та підрозділі 1.2, була опублікована дисертанткою в двох оглядах УБЖ (1. Векліч Т.О., Мазур Ю.Ю., Костерін С.О. Mg^{2+} , АТР-залежна кальцієва помпа плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин. I. Структурна організація та властивості // Укр. біохім. журн. - 2015. - Т. 87, № 1. - С. 5-20. 2. Векліч Т.О., Мазур Ю.Ю., Костерін С.О. Mg^{2+} , АТР-залежна кальцієва помпа плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин. II. Регуляція активності // Укр. біохім. журн. - 2015. - Т. 87, № 2. - С. 5-25).

Ca^{2+} є універсальним клітинним неорганічним месенджером і саме під контролем Ca^{2+} -залежних сигнальних шляхів відбувається більшість клітинних процесів: скорочення м'язів, проліферація, секреція, а також апоптоз. Кальцієві сигнали значною мірою визначаються системами підтримання концентрації цитозольного Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_c$), у чому суттєву роль відіграють як енергонезалежні системи транспорту Ca^{2+} у клітину, так і енергозалежні системи викиду іону з цитозолу.

У ГМ Ca^{2+} потрапляє до цитоплазми з позаклітинного простору через ПМ або з внутрішньоклітинних Ca^{2+} депо, в основному з СР. За надходження Ca^{2+} у цитоплазму відповідають Ca^{2+} -канали, розташовані на ПМ та СР. У ПМ знаходяться 3 типи Ca^{2+} -каналів: потенціал-, ліганд- і депо-керовані Ca^{2+} -канали; тоді як на мембрані СР – 2 типи ліганд-керованих: ріанодинові та інозитол-1,4,5-трифосфатні-чутливі [158, 402]. Інозитол-1,4,5-трифосфатні рецептори на СР ГМ відкриваються під впливом інозитол-1,4,5-трифосфату (IP_3), що утворюється фосфоліпазою С. Ріанодинові рецептори активуються кофеїном, підвищенням $[\text{Ca}^{2+}]_c$ та перевантаженням Ca^{2+} СР [174]. Джерела входу Ca^{2+} взаємопов'язані між собою. Наприклад, вивільнення Ca^{2+} з СР може

змінювати активність іонних каналів, що знаходяться на ПМ та впливають на мембранний потенціал, і, таким чином, обумовлювати вхід Ca^{2+} через потенціал-залежні Ca^{2+} -канали [174], у той же час зменшення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в СР активує депо-керовані Ca^{2+} -канали ПМ (TRP) (рис. 1.1) [386].

Основними системами видалення Ca^{2+} з цитозолу є $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза ПМ, $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза СР, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник та Ca^{2+} -уніпортер МХ (рис. 1.1) [5, 158, 167, 205, 402, 468]. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник є низькоафінним щодо Ca^{2+} ($K_{\text{Ca}}=1$ мкМ), але має значну ємність та характеризується високим числом обертів; тоді як Ca^{2+} -помпи СР та ПМ, хоч і мають вищий афінитет до Ca^{2+} ($K_{\text{Ca}}=0,1-0,3$ мкМ), але їм притаманна значно менша кількість обертів [233, 355, 392]. Таким чином, $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ та СР відповідають за підтримання рівня $[\text{Ca}^{2+}]_c$ у спокої, тоді як $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник відіграє роль за регуляції високих, стимуляторних концентрацій Ca^{2+} [355]. Внесок кожної з зазначених систем в усунення Ca^{2+} з цитоплазми залежить від типу ГМК, але загалом $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник відповідає наближено за 60 % усунення Ca^{2+} з цитозолу, а на роль кожної з pomp відводиться по 20-30 % [392]. Результати досліджень [166] вказують на те, що МХ також можуть діяти як система зниження $[\text{Ca}^{2+}]_c$. У такому випадку енергія дихального ланцюга, яка зазвичай використовується для синтезу АТР, іде на транспорт Ca^{2+} (рис 1.1).

Афінність МХ до Ca^{2+} у такому процесі незначна ($K_{\text{Ca}}=10-20$ мкМ) [392], тому раніше вважалося, що такий шлях не може використовуватися для регуляції гомеостазу Ca^{2+} у цитоплазмі в умовах низьких концентрацій $[\text{Ca}^{2+}]_c$, хоча експериментально було показано можливість накопичення Ca^{2+} ізольованими МХ. Сьогодні доведено, що такий шлях має місце за рахунок близької асоціації СР і МХ, що зближує домени з високою концентрацією Ca^{2+} , утворені внаслідок вивільнення Ca^{2+} з ретикулума, з низькоафінним мітохондріальним уніпортером [166].

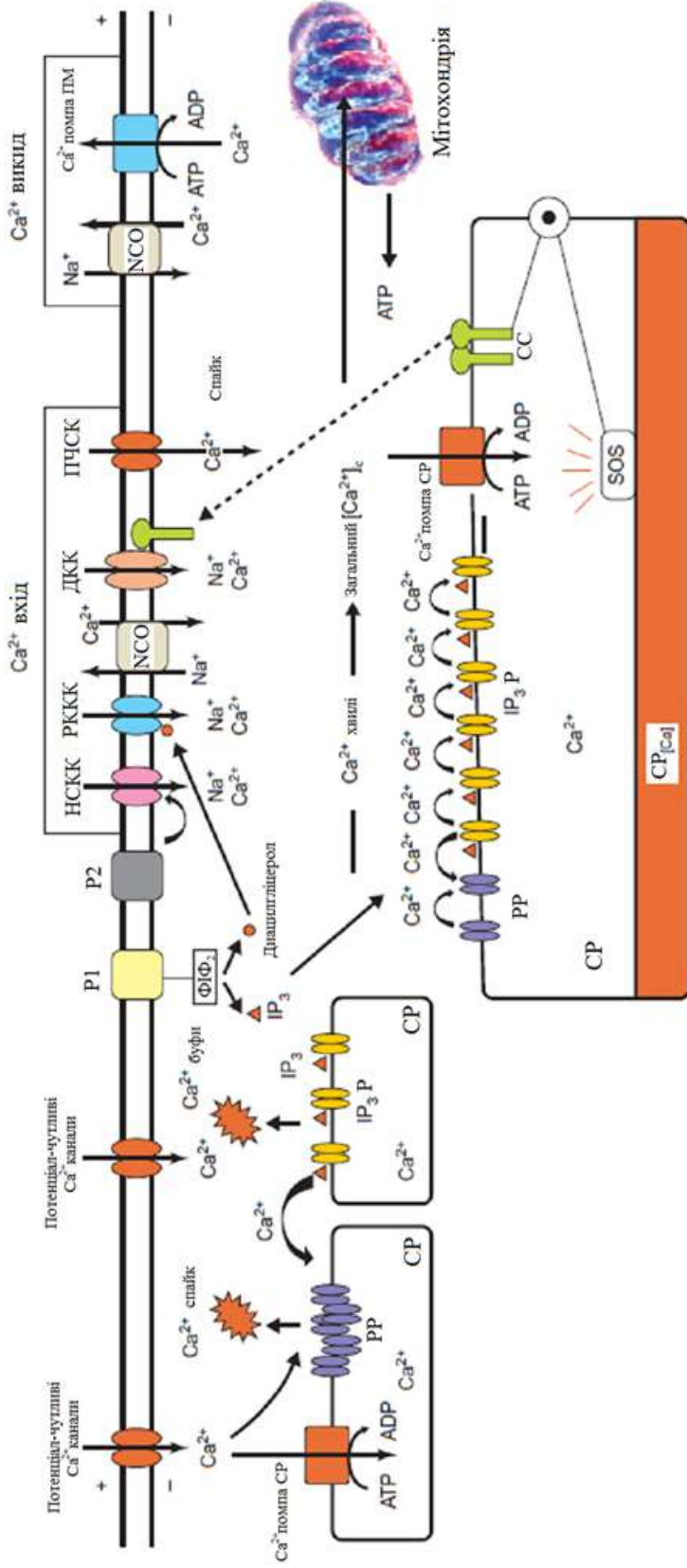


Рис. 1.1. Шляхи та механізми транспорту Ca²⁺ у ГМК (адаптована з [201]). Скорочення: ПМ-плазматична мембрана, СР – саркоплазматичний ретикулум, Р – рецептор, NCO – Na⁺/Ca²⁺-обмінник, РР – ріанодинові рецептори, ІР₃ – інозитолтрифосфат, ІР₃Р – інозитолтрифосфатний рецептор, ФІФ₂ – фосфатидиліофосфат, СС – Ca²⁺ сенсор у СР (STIM1), НСКК – неселективні катіонні канали, РККК – рецепторкервовані катіонні канали, ДКК – депокеровані канали, ПЧСК – потенціалчутливі Ca²⁺-канали.

Накопичення Ca^{2+} мітохондріями стимулює утворення АТР, оскільки Ca^{2+} є позитивним регулятором кількох ензимів циклу Кребса. Зростання рівня АТР опосередковано впливає на $[\text{Ca}^{2+}]_c$, бо АТР є джерелом енергії для функціонування pomp, які усувають Ca^{2+} з цитоплазми [174].

Основним джерелом надходження Ca^{2+} у ГМК під час скорочення є позаклітинне середовище, тому вихід вказаного іону також повинен відбуватися поза межі клітини, саме через це головна роль у видаленні Ca^{2+} з клітини належить саме структурам ПМ. $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -АТРаза, разом з $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінником ПМ становлять основну транспортну систему ГМК, відповідальну за довготривалу регуляцію концентрації Ca^{2+} у спокої, тобто за обмін Ca^{2+} між внутрішньоклітинним та позаклітинним середовищем [392]. Парціальний внесок обмінника та помпи залежить від типу тканини. Наприклад, у ГМ матки саме $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -АТРаза ПМ відповідає за значну частину викиду Ca^{2+} : за допомогою методу фіксації напруги [453] встановлено, що від активності цього ензиму залежить 70 % відкачаного Ca^{2+} , тоді як на роль $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмінника припадають інші 30 %. Зважаючи на експресію зазначеної помпи у всіх тканинах та її низьку транспортну здатність, висунуто припущення, що роль цієї системи полягає у встановленні та підтриманні фізіологічно значущого рівня $[\text{Ca}^{2+}]_c$ [468].

Зважаючи на важливу роль $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -АТРази у підтриманні фізіологічної концентрації іонів Ca^{2+} у ГМК у стані спокою, у наступному підрозділі ми акцентуємо увагу на властивостях кальцієвої помпи ПМ, її структурній організації, регуляції та модифікації активності, а також її функціональному значенні.

1.2. Mg^{2+} ,АТР-залежна кальцієва помпа плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин. Структурна організація, властивості та регуляція.

1.2.1. Структурно-функціональні властивості Mg^{2+} , АТР-залежної кальцієвої помпи плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин

Структурна організація Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазиди ПМ. Перші уявлення про первинну будову Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазиди ПМ були отримані у 1988 з використанням структури комплементарної ДНК. Топологія помпи була розроблена на основі будови pomp, які також належать до R_{2B} -типу [468], беручи за основу Ca^{2+} -помпу СР. Загальна схематична модель структурної організації показана на рис. 1.2.

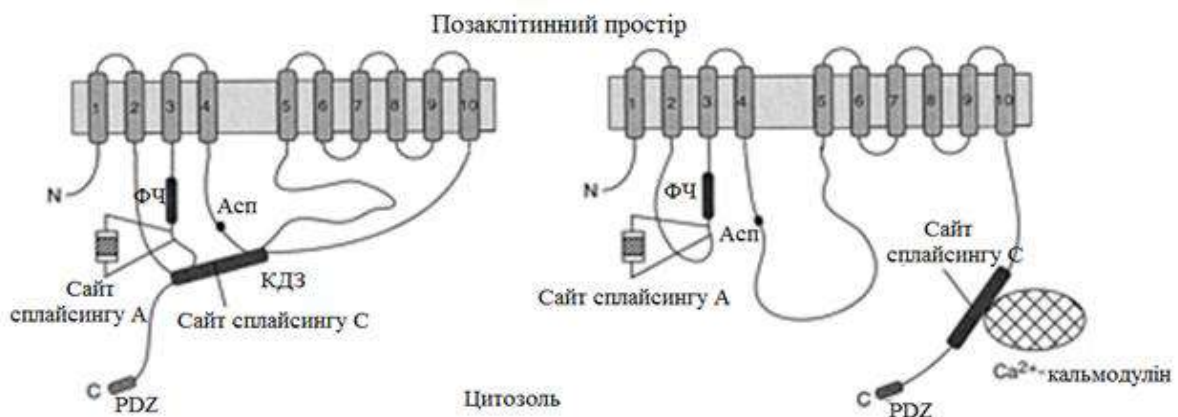


Рис 1.2. Структурна організація Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани (адаптовано з [470]). Скорочення: КЗД – кальмодулін-зв'язуючий домен, ФЧ – фосфоліпідчутлива ділянка, ТМ – трансмембранні домени, Асп – сайт формування аспартилового залишку, PDZ – домен зв'язування postsynaptic density protein.

Ca^{2+} -помпа ПМ містить 10 трансмембранних ділянок, NH_2 - та $COOH$ -кінці локалізовані з цитоплазматичного боку мембрани. Основна маса білка (близько 80 %) знаходиться в цитозолі та складається з трьох основних частин [402]. Перша (А-петля) складається із внутрішньоклітинної петлі між трансмембранними сегментами 2 та 3, що в основному сформована з β -складчатих шарів. Ця ділянка бере участь у спряженні гідролізу АТР та транслокації Ca^{2+} , передає інформацію щодо конформаційних змін, які виникають під час реакційного циклу, та містить одну з послідовностей, що

формують відповідь на кислі фосфоліпіди. Друга частина (N-петля) знаходиться в петлі між трансмембранними сегментами 4 та 5, де міститься сайт утворення проміжного аспартил-фосфату та сайт приєднання АТР. Зазначені дві частини білка характерні для всіх АТРаз Р-типу, але третя (Р-петля) є особливою структурою, характерною лише для Ca^{2+} -помпи ПМ, та складається з видовженого COOH -хвоста, який містить як β -складчаті шари, так і α -спіралі. На цій ділянці розміщені сайти регуляції активності помпи, у тому числі сайт зв'язування з кальмодуліном [165, 402, 470]. Загалом, структура Ca^{2+} -помпи ПМ дуже подібна до структури інших АТРаз Р₂-типу, у тому числі Ca^{2+} -помпи СР. Але основна відмінність полягає у наявності COOH -хвоста, який у Ca^{2+} -помпи СР (20-50 залишків) значно менший за такий у Ca^{2+} -помпи ПМ (70-200 залишків) [470].

Молекулярна біологія Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ. У геномі ссавців Ca^{2+} -помпа ПМ кодується 4 неалельними генами [404]. Відомо локуси генів людини: 12q21-q23 для Ca^{2+} -помпи 1 [393], 3p25-p26 для Ca^{2+} -помпи 2, Xq28 для Ca^{2+} -помпи 3 [325], 1q25-q32 для Ca^{2+} -помпи 4 [393]. Гени Ca^{2+} -помпи ПМ ссавців мають подібну екзон-інтронну структуру та консервативне розташування інтронів [470]. За розміром гени великі, їхній розмір коливається від 70 кб (для 3 ізоформи миші) [160] до більш ніж 100 кб для Ca^{2+} -помпи ізоформ 1 та 2 людини [255, 470]. Ізоформи мають 80 % амінокислотної гомології, N- та С-кінці мають найменший ступінь подібності і відповідають за структурні відмінності між ізоформами [468].

Розподіл ізоформ Ca^{2+} -помпи ПМ у клітинах залежить від потреб клітин у підтриманні цитозольної концентрації Ca^{2+} . Ca^{2+} -помпи 1 та 4 містяться у всіх тканинах і є єдиними ізоформами, які присутні у ГМ [392]. Ca^{2+} -помпа 3 у дорослих людей міститься тільки в мозку (7,5 кб мРНК) та посмугованих м'язах (4,5 кб мРНК), а Ca^{2+} -помпа 2 – у клітинах Пуркін'є мозочка та волоскових клітинах завитка равлика, хоча може бути присутня і у матці, нирках, печінці, міокарді, і має досить високий локальний рівень у молочних залозах [160, 392,

470]. Важливо, що Ca^{2+} -помпа 2 функціонує ефективно без стимуляції кальмодуліном [338].

Кінетичні та каталітичні властивості $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ. На теперішній час накопичена значна кількість експериментальних даних із вивчення кінетичних та каталітичних властивостей $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ, у тому числі й ГМК.

У ГМ активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази у фракції ПМ низька (одиниці мкмоль P_i / за 1 год на мг білка) [63, 88, 103]. Вона майже у 10 разів менша, ніж активність “базальної” Mg^{2+} -АТРази, яка маскує $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази [526]. Очищена методом афінної хроматографії на кальмодулін-сефарозі «4Б» у присутності азолектину солюбілізована $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза з ПМ клітин міометрія має питому активність до 80 мкмоль P_i /за 1 год на мг білка [81, 84].

Показник активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази змінюється залежно від фізіологічного стану м'язу матки. Наприклад, протягом вагітності активність солюбілізованої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази суттєво зменшується: з $87,2 \pm 6,3$ ($n=6$) до $34,1 \pm 3,1$ ($n=5$) мкмоль P_i /за 1 год на мг білка. Як у стані фізіологічного спокою, так і під час вагітності рівень накопичення Ca^{2+} у фракції везикул ПМ істотно домінує над рівнем, встановленим для інших фракцій [52].

Спорідненість $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази до Mg^{2+} є невисокою у сарколемі для тканин коронарної артерії та товстої кишки. Значення коефіцієнту активації іонами Mg $A_{0,5}$ дорівнюють 0,2 і 1,2 мМ [63] відповідно. Значення константи спорідненості (K_{MgATP}) для суто субстратної ензиматичної реакції MgATP^{2-} у випадку очищеної солюбілізованої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ клітин міометрія становило 0,56 мМ [88].

Після перевірки у якості субстратів очищеної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ клітин міометрія АТР, ГТР, УТР, СТР, було показано, що ензим є дуже специфічним відносно АТР та гідролізує виключно цей нуклеозидтрифосфат [63]. Максимальна активність ензиму спостерігається за концентрації іонів Ca 5-29 мкМ (значення K_{Ca} становить 0,17 мкМ у випадку очищеного ензиму) [88].

Оптимальне значення рН для солубілізованого ензиму — 7,5-8,0, для $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази в мембранному препараті — 6,4-7,0 [70, 88]. Ця різниця в оптимумі рН, імовірно, є наслідком різної просторової конфігурації ензиму, а отже, і доступності активного центру молекули ензиму в солубілізованому стані і в мембрані. Температурний оптимум для солубілізованої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ еритроцитів спостерігався при 37–41 °С, а, для $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ клітин міометрія – при 40–45 °С. Підвищення температури до 50 °С призводило до значного зниження активності очищеного ензиму. Енергія активації E_a АТР-гідролазної реакції, що каталізується цим ензимом, рівна 56,4 кДж/моль [73].

$\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза та Mg^{2+} , АТР-залежний транспорт Ca^{2+} . Результати, отримані С.О. Костеріним та співавторами [63], свідчать про те, що функціонування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ ГМК забезпечує трансмембранне активне перенесення Ca^{2+} із внутрішньоклітинного простору у зовнішньоклітинне середовище.

Так, максимальна активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази і Mg^{2+} , АТР-залежного накопичення Ca^{2+} в міоцитах матки спостерігаються за тієї ж самої концентрації Mg^{2+} – 3-5 мМ (концентрація АТР в середовищі інкубації – 3 мМ). Величини K_{Mg} і V_{max} по Mg^{2+} , відповідно, складають: у випадку $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази активності – 0,18 мМ і 7,7 мкмоль P_i /за год на мг білка за год; у випадку Mg^{2+} , АТР-залежного накопичення Ca^{2+} у клітинах міометрія – 0,39 мМ і 17,4 нмоль Ca^{2+} /за 15 хв на мг білка [70]. Як видно, величини констант активації за Mg^{2+} (K_{Mg}) практично однакові. У випадку міометрія їх значення відповідають тим, що були отримані для $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази сарколеми ГМ коронарної артерії і товстої кишки (0,2 і 1,2 мМ відповідно) [414].

Величини $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази активності і Mg^{2+} , АТР-залежного накопичення Ca^{2+} у клітинах міометрія максимальні за концентрації АТР 1 мМ (концентрація MgCl_2 в середовищі інкубації – 5 мМ). Значення K_{Mg} і V_{max} по Mg^{2+} відповідно складають: 0,16 мМ і 8,0 мкмоль P_i /за год на мг білка (для $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази активності) та 0,25 мМ і 18,0 нмоль Ca^{2+} /мг білка за 15 хв

(для Mg^{2+} , АТР-залежного накопичення Ca^{2+} у міоцитах матки). І у цьому випадку значення K_{Mg} для Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРазної реакції і Mg^{2+} , АТР-залежного накопичення Ca^{2+} також практично однакові [70]. Також для обох випадків має місце висока субстратна специфічність відносно АТР та абсолютна необхідність присутності Mg^{2+} у середовищі інкубації [63].

Вивчення впливу величини рН на активність Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази і рівень накопичення Ca^{2+} у фракції сарколеми міомерія показало, що у випадку 50 мМ тріс-малеат/NaOH буферного розчину оптимальним є значення рН 6,4-7,0 (при 37 °С) [63].

Важливо відзначити, що Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРаза, очищена з ПМ клітин міомерія з використанням методу афінної хроматографії на кальмодулін-сефарозі «4Б», була реконструйована в азолектинових ліпосомах (з використанням методу холайного діалізу), і одержані протеоліпосоми були здатні активно накопичувати іони Са у Mg^{2+} , АТР-залежному процесі [104].

Вищенаведені результати однозначно вказують на той факт, що саме Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРаза є «молекулярною машиною», яка забезпечує Mg^{2+} , АТР-залежний активний транспорт іонів Са через ПМ ГМК.

Молекулярний механізм спряження Ca^{2+}, Mg^{2+} -залежного ензиматичного гідролізу АТР та Mg^{2+} , АТР-залежного активного транспорту іонів Са через ПМ. Енергетика кальцієвої помпи. Ca^{2+} -помпа ПМ ГМ належить до АТРаза Р-типу, підродини P_2 , які утворюють проміжний фосфорильований ензим, що пов'язано з процесом перенесення іону [402, 532]: γ -фосфат молекули АТР переноситься на аспартатний залишок ензиму [392, 404]. Також для Ca^{2+} -помпи ПМ характерний контртранспорт протону, що може призводити до змін рН навколо ГМК, впливаючи на активність Ca^{2+} -помпи ПМ та на внутрішньоклітинний рН [355, 382].

Точний механізм активного перенесення іонів Са Ca^{2+} -помпою ПМ невідомий, однак уявлення щодо нього були розбудовані на прикладі Ca^{2+} -помпи СР, що також належить до АТРаза Р-типу. Проміжні етапи реакції було сформульовано у 4-етапній схемі (рис. 1.3) [306, 402].

Вважають, що у E_1 конформації Ca^{2+} -помпа ПМ має високу спорідненість до Ca^{2+} з цитоплазматичного боку ($K_{Ca} \sim 10^{-7} - 10^{-6}$ М). Приєднання Ca^{2+} та АТР до E_1 конформеру призводить до структурних змін, які обумовлюють переміщення Ca^{2+} у позаклітинне середовище (E_2 стан). У результаті відбувається вивільнення Ca^{2+} після гідролітичного розщеплення фосфорильованого проміжного продукту, оскільки фосфорильована форма помпи має низьку афінність до Ca^{2+} ($K_{Ca} \sim 10^{-3}$ М). Після вивільнення Ca^{2+} помпа повертається до початкової конформації (E_1) (рис. 1.3) [240, 490]. Етап дефосфорилування прискорюється K^+ або приєднанням АТР до регуляторного, низькоафінного сайту. Кальмодулін підвищує прискорення відщеплення АТР на етапі дефосфорилування. Перехід з E_2 до E_1 конформації інгібується у присутності Ca^{2+} у мілімолярних концентраціях, а кальмодулін та K^+ прискорюють E_2 - E_1 трансформацію. Також присутність Ca^{2+} та кальмодуліну призводить до утворення більш гнучкої конформації СООН-кінця у стані повної активації [401].

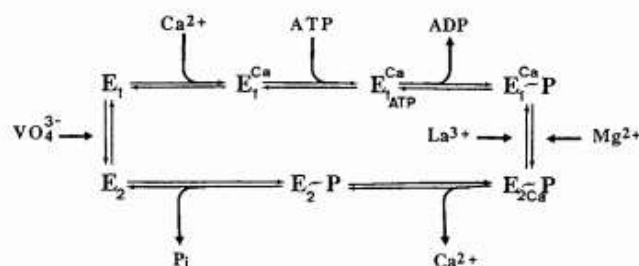


Рис 1.3. Схема каталітичного циклу Mg^{2+} , АТР-залежної Ca^{2+} -помпи ПМ [315]. E_1 , E_2 – конформаційні стани Ca^{2+} -помпи ПМ, La^{3+} – лантан, VO_4^{3-} – ортованадат.

Показано, що у випадку очищеної Ca^{2+} -помпи ПМ найбільша питома активність виявляється при $40^\circ C$ [73]. Розраховані із графіків Арреніуса величини енергії активації E_a гідролізу АТР солубілізованою, реконструйованою в азолектинових ліпосомах Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазою, а також Mg^{2+} , АТР-залежного транспорту Ca^{2+} вказаним реконструйованим ензимом, складають $56,4 \pm 1,5$; $68,0 \pm 5,1$ та $63,1 \pm 2,9$ кДж/моль відповідно [73].

Функціональна роль Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази ПМ. До теперішнього часу відсутність специфічних інгібіторів кальцієвої помпи ПМ значно обмежує вивчення її фізіологічної ролі, тому більшість уявлень про участь помпи у тих чи інших процесах сформовані на результатах, отриманих на генетично модифікованих організмах.

Численні дослідження вказують на те, що Ca^{2+} -помпа ПМ необхідна для підтримання внутрішньоклітинного Ca^{2+} -гомостазу та функціонування ГМК [233]. Висока афінність Ca^{2+} -помпи до Ca^{2+} ($K_{Ca} \sim 0,3-0,6$ мкМ) робить її ідеальною системою для підтримання низької сталої концентрації вільного Ca^{2+} (80-100 нМ) у цитозолі в умовах спокою [262, 376, 391].

Домінування того чи іншого шляху викиду Ca^{2+} з клітини залежить від концентрації Ca^{2+} у цитоплазмі: як вже було зазначено, Ca^{2+} -помпа ПМ має високу афінність, але низьку максимальну швидкість, тому вона важлива саме для підтримання $[Ca^{2+}]_c$ у стані спокою [375]. В ізольованих міоцитах ГМ судин, сечового міхура, матки [392] викид значної частини іонів Ca^{2+} , які надійшли до клітини при скороченні, відбувається через Ca^{2+} -помпу та Na^+/Ca^{2+} -обмінник ПМ. Інгібування обох механізмів повністю блокувало б вихід Ca^{2+} з клітини. Зокрема, у ГМ матки, незалежно від походження $[Ca^{2+}]_c$, основна роль у його викиді належить Ca^{2+} -помпі ПМ 4. Це підтверджується результатами експериментів на нокаутуваних по Ca^{2+} -помпі ПМ 4 мишах, де релаксація м'язевого скорочення уповільнюється на 50 % [355], тому припускається, що у ГМ матки внесок Ca^{2+} -помпи ПМ у релаксацію м'яза складає 65 – 85 % [355, 392], а у видалення Ca^{2+} з цитоплазми - 70 % [170, 233, 355]. У дослідженнях, виконаних на сечовому міхурі, значення Na^+/Ca^{2+} -обмінника ПМ у видаленні Ca^{2+} з клітини зростає: вказаний білок відповідає за 56-75 % викиду Ca^{2+} , Ca^{2+} -помпа ПМ – за 25-27%, Ca^{2+} -помпа СР – до 31 % [170, 233, 253, 286]. З використанням мишей з мутантними генами Ca^{2+} -помпи ПМ розраховано, що внесок Ca^{2+} -помпи ПМ у розслаблення ГМ сечового міхура становить 25 - 30 % [343]. На ГМ аорти показано, що загалом Ca^{2+} -помпи СР та ПМ відповідають за 60-70 % розслаблення [417].

Важливо відмітити, що ізоформи мають різне значення як для контролю $[Ca^{2+}]_c$ у різних тканинах, так і для глобальних змін $[Ca^{2+}]_c$ [286, 495]. Було продемонстровано, що Ca^{2+} -помпа ПМ 1 залучена до загальної системи видалення Ca^{2+} [342], і повне видалення гену помпи є летальним на етапі ембріогенезу [390].

Активність помпи включає антипорт протонів, який, за інтенсивної активності, призводить до значного закислення внутрішньоклітинного середовища. Такий ефект, одночасно з відкачуванням $[Ca^{2+}]_c$, сприяє релаксації ГМ, оскільки низьке значення рН зменшує активність Ca^{2+} -каналів L-типу. Отже, рН-індуковане інгібування електричної активності синхронізоване з $[Ca^{2+}]_c$ -залежною механічною релаксацією. Оскільки зміни внутрішньоклітинного рН пов'язані із силою скорочення, то чим сильніше скорочення – тим більші зміни рН і більше розслаблення. У ГМ матки завдяки одночасному закисленню цитоплазми та скороченню етап розслаблення є пролонгованим, що дозволяє запобігати гіпоксичному ушкодженню тканин матки та плоду. Водночас внутрішньоклітинне зменшення рН корелює з позаклітинним підвищенням рН, яке призводить до зростання амплітуди коливань $[Ca^{2+}]_c$ та сили скорочення [382].

Хоча Ca^{2+} -помпа ПМ відіграє важливу роль у підтриманні низької $[Ca^{2+}]_c$ [388], її значення не обмежене тільки цим [253, 375, 376]. Антипорт протонів під час викиду Ca^{2+} може призводити до закислення клітин та змінювати спорідненість Ca^{2+} -зв'язуючих білків до Ca^{2+} , оскільки протони можуть конкурувати з Ca^{2+} за зв'язування з білками. Також, зниження активності Ca^{2+} -помпи ПМ сприяє відновленню пулу Ca^{2+} у внутрішньоклітинних Ca^{2+} -депо. Може мати місце опосередкована стимуляція Ca^{2+} -помпи СР, оскільки рН оптимум її активності становить 6,8. Спостерігається асоціація між Ca^{2+} -помпою ПМ та регуляцією росту ГМК: надекспресія Ca^{2+} -помпи ПМ призводить до уповільнення росту клітин. І навпаки: зменшення активності Ca^{2+} -помпи ПМ збільшує проліферативну активність ГМК судин; цей процес важливий в етіології серцевосудинних захворювань. Важливим є контроль

примембранної концентрації Ca^{2+} , що суттєво для ендокринної секреції, вивільнення нейротрансмітерів, клітинної проліферації, скорочення ГМ. Згідно даних літератури, існує припущення, що порушення викиду Ca^{2+} з клітин внаслідок зменшення активності Ca^{2+} -помпи ПМ пов'язано з процесом старіння.

Останнім часом все більшого визнання набуває думка, що різні ізоформи Ca^{2+} -помпи ПМ, більше того – різні сплайс-варіанти, відіграють різну роль в клітинах [117,176, 403, 416]. У ГМК переважно знаходять ізоформи Ca^{2+} -помпи ПМ 1 та 4, які експресуються у всіх тканинах, тоді як ізоформи 2 та 3 зустрічаються значно рідше.

Для сплайс-ізоформ b властива низка взаємодій через PDZ-домен, які характерні в основному для нервових тканин, хоча деякі взаємодії (MAGUS, PISP) можуть бути властивими і для ГМ. Також показана взаємодія RASSF1 з ізоформою Ca^{2+} -помпи ПМ 4b, що призводить до інгібування EGF-залежної активації мітоген-активованої ПК Erk [129]. Це дає підстави вважати, що Ca^{2+} -помпа ПМ бере участь у регуляції апоптозу, що також підтверджується результатами, за якими інгібування Ca^{2+} -помпи ПМ призводить до активації процесу апоптозу в ГМ судин [437].

З використанням трансгенних мишей [402, 440], які мали суперекспресію Ca^{2+} -помпи ПМ 4b в ГМ судин, було встановлено, що за таких умов спостерігається підвищення кров'яного тиску при збереженні ендотелін-залежної релаксації та зростання скорочення судин у відповідь на деполяризацію. Такі результати корелюють з гіпотезою, що участь Ca^{2+} -помпи ПМ у регуляції тону м'язів не обмежується безпосередньою регуляцією скорочення, а відбувається і завдяки регуляції передачі сигналів у клітині. Через PDZ-зв'язуючий домен Ca^{2+} -помпа ПМ взаємодіє з нейрональною синтазою оксиду азоту (nNOS) у кавеолах (рис. 1.3) і інгібує активність останнього в залежності від рівня комплексу « Ca^{2+} -кальмодулін» [441].

Також Ca^{2+} -помпа ПМ 4 може бути важливою при регуляції кальциневрин/NFAT сигнального шляху (рис. 1.4). Ці два білки безпосередньо

приєднуються до внутрішньоклітинної петлі між трансмембранними доменами 4 та 5. Кальциневрин (серин/треонінова фосфатаза) активується при підвищенні $[Ca^{2+}]_c$ та дефосфорилує NFAT (ядерний фактор активованих Т-клітин), який переміщується в ядро та активує гени гіпертрофії [170]. Суперекспресія Ca^{2+} -помпи ПМ 4 супроводжується інгібуванням кальциневрину, що в результаті має протекторну дію при розвитку патологічної гіпертрофії серцевого м'язу.

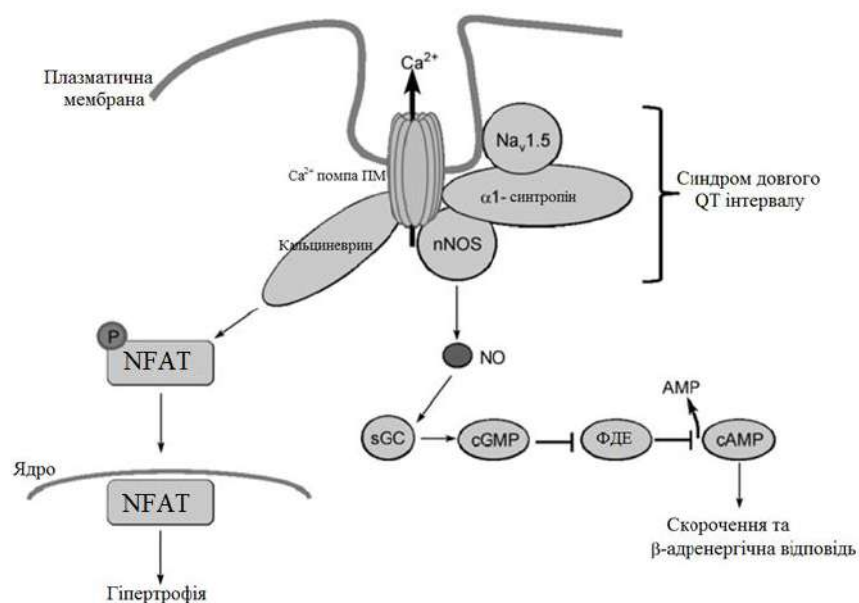


Рис. 1.4. Участь Mg^{2+} , АТФ-залежної Ca^{2+} -помпи ПМ у регуляції сигнальних шляхів із залученням кальциневрину та pNOS [170].

Скорочення: ПМ – плазматична мембрана, NFAT – ядерний фактор активованих Т-клітин, pNOS – нейрональна NO-синтаза, sGC – розчинна гуанілатциклаза, ФДЕ – фосфодіестераза.

В іншому дослідженні трансгенні миші, що містили ген Ca^{2+} -помпи ПМ 4 в міокарді під керованием промотором, не мали змін у скороченні/розслабленні м'язу, хоча змінювалася амплітуда α - та β -адренергічного сигналу, оскільки в кавеолах відповідні рецептори та Ca^{2+} -помпи ПМ розміщені надзвичайно близько, що доведено за колокалізацією з кавеоліном-3. Тому роль Ca^{2+} -помпи ПМ 4 у міокарді може полягати навіть не в регуляції серцевих скорочень, а в регуляції росту міокарду завдяки модуляції передачі сигналів у кавеолах [269].

Окрім взаємодії з pNOS, показаний вплив на функціонування eNOS, NOS-3, кальциневрин А через зв'язування відповідних ензимів з

внутрішньоклітинною петлею між трансмембранними доменами 4 та 5 Ca^{2+} -помпи ПМ. Зменшення Ca^{2+} у мікрооточенні зазначених сигнальних білків призводить до інгібування їх активності [467].

Таким чином, транспортна $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза ПМ є важливою у підтримці фізіологічної концентрації Ca^{2+} в міоцитах ГМ, компенсуючи пасивний потік іонів Са в клітину, який відбувається у стані спокою. У зв'язку із тим, що внутрішньоклітинні пули Ca^{2+} (перш за все, СР) розвинені слабо, розслаблення ГМ відбувається в основному за рахунок викиду іонів Са у позаклітинний простір [312]. Тому таргетна регуляція Ca^{2+} -помпи ПМ має важливе значення у забезпеченні контролю розслаблення ГМ, а саме – у зниженні концентрації Ca^{2+} до його фізіологічного рівня в клітині, а також в регуляції багатьох Ca^{2+} -залежних сигнальних шляхів, що може сприяти як проліферації клітин, так і апоптозу.

На жаль, багато свідчень про роль Ca^{2+} -помпи ПМ у ГМ отримано на генетично модифікованих організмах, що суттєво порушує чистоту результатів, оскільки зниження чи підвищення експресії помпи може викликати зміну експресії компенсаторних систем щодо надходження чи викиду Ca^{2+} . Саме тому важливим є пошук селективних низькомолекулярних ефекторів, які з високим афінітетом дозволяли б модифікувати активність Ca^{2+} -помпи ПМ. Використання таких ефекторів дозволило б розширити існуючі уявлення про функціональну роль Ca^{2+} -помпи ПМ у клітинах.

Специфіка локалізації $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ у клітинах. Вміст Ca^{2+} -помпи ПМ у мембрані не є високим – 0,1% від усіх мембранних білків [334]. Отже, існування ділянок у мембрані, де існувала б підвищена концентрація білка помпи, дозволяла б створити мікродомени з чітко регульованою концентрацією Ca^{2+} . Такими ділянками можуть бути кавеоли, оскільки низкою авторів була продемонстрована асоціація з кавеолами Ca^{2+} -помп ПМ [208, 376, 406, 534]. Так, у кавеолах вміст цього Ca^{2+} -транспортуючого білка у 18-25 рази вищий, ніж в інших частинах мембрани. Кавеоли є мембранними інвагінаціями, діаметром 50-100 нм, збагачені сфінголіпідами, холестеролом,

фосфатидилсерином, та є стійкими до дії детергентів [534]. Оскільки вищеперелічені сполуки підвищують активність Ca^{2+} -помпи ПМ, то локалізація помпи у кавеолах підвищує загальний викид Ca^{2+} , хоча ці результати не підтверджуються *in vitro* [534]. Локалізація помпи в кавеолах має функціональне значення, оскільки кавеоли (наприклад, у ГМ) знаходяться у тісному контакті з СР і підсилюють викид Ca^{2+} , спричинений ним [153], та містять рецептори, транспортери, інші білки, які залучені в передачу сигналу, пов'язаного зі зміною локальної концентрації Ca^{2+} : Ca^{2+} -чутливі рецептори, ізоформи ПК [376]. Таким чином, кавеоли можуть слугувати ініціаторними точками Ca^{2+} -хвиль, що дозволяє припустити важливу роль цих структур в сигнальній трансдукції [376].

Отже, вивчення структурної організації, функціональної активності та функції Ca^{2+} -помпи ПМ ГМК вже протягом кількох десятиріч знаходиться у фокусі уваги дослідників. Було використано різноманіття методів та підходів, які незалежно підтверджують результати один одного: Ca^{2+} -помпа ПМ відіграє різнопланову та широкомасштабну роль у функціонуванні ГМК; це як підтримання цитоплазматичної концентрації Ca^{2+} на фізіологічному рівні та регуляція процесу скорочення/розслаблення, так і контроль базових клітинних процесів, наприклад, проліферативної активності. Беручи до уваги важливий внесок помпи у функціонування клітин, необхідно розглянути порушення її функціонування за різноманітних патологічних станів гладеньких м'язів. Також, зважаючи на це, важливим аспектом є питання регуляції активності помпи, в першу чергу ендogenousними сполуками, а також пошук специфічних ефекторів, які можна було б спрямовано використовувати для зміни активності Ca^{2+} -помпи ПМ та корекції дисфункції ГМ за різних патологій. Тому надалі ми розглянемо питання регуляції та модифікації активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ ГМК.

1.2.2. Регуляція та модифікація активності Mg^{2+} , АТР-залежної кальцієвої помпи плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин.

Виконуючи у клітинах роль регуляторної системи концентрації іонів Ca , Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза ПМ сама є мішенню для дії великої кількості регуляторів. Її активність та спорідненість до Ca^{2+} можуть значною мірою модулюватися фізико-хімічними та багатьма білковими та небілковими факторами - кальмодуліном, кислими фосфоліпідами ПМ, двохвалентними іонами, сАМР-залежною ПК та ПКС, процесом обмеженого протеолізу тощо.

Фізико-хімічні фактори, що впливають на активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ. Мембранний потенціал. У дослідях на фракції везикул ПМ міометрія було показано, що електричний потенціал, створений за допомогою градієнта K^+ (система " K^+ -валіноміцин"), стимулює енергозалежне (тобто спричинене активністю Mg^{2+} , АТР-залежної Ca^{2+} -помпи ПМ) перенесення Ca^{2+} . Електричний потенціал у діапазоні від 0 до -80 мВ впливав на початкову швидкість акумуляції Ca^{2+} , але не на максимальну кількість накопиченого Ca^{2+} . Тобто від'ємний потенціал активує Ca^{2+} -помпу ПМ ГМК. При цьому мало місце збільшення числа обертів ензиму, але без зміни спорідненості до субстрату переносу. Можна припустити, що залежність активності Ca^{2+} -помпи ПМ від електричного потенціалу має значення для реалізації дії медіаторів і фізіологічно активних речовин, які деполяризують сарколему [8, 63].

Концентрація протонів. Активність помпи підвищується при деполяризації, що призводить до підвищення рН позаклітинного простору [484]. При цьому функціонування помпи залежить від рН, оскільки Ca^{2+} транспорт потребує контртранспорту протону, тому при підвищенні зовнішньоклітинного рН (до рН=8,8) [342] та при закисленні внутрішньоклітинного середовища [493] відбувається практично повне інгібування транспорту Ca^{2+} .

Іони металів. Досить багато іонів важких металів є потенційними неспецифічними інгібіторами Ca^{2+} -помпи ПМ. Величина $I_{0,5}$ залежить від

іонного радіусу, ентальпії гідратації, константи стабільності комплексу іону з оксиген-вмісними біолігандами. На ізольованій Ca^{2+} -помпі ПМ зі шлунку мурчаків було досліджено вплив металів на зазначену помпу. $I_{0,5}$ (мМ) змінюється в такому порядку: Ba^{2+} (0,336) < Sr^{2+} (0,251) < Mn^{2+} (0,099) < Co^{2+} (0,029) < Cd^{2+} (0,016) [44].

Залежно від температури та концентрації La^{3+} (має радіус близький до радіусу іонів Ca) також неспецифічно інгібує викид Ca^{2+} -помпою ПМ [253, 402]. Причому його дія є досить незвичною, оскільки серед інших помп Р-типу La^{3+} тільки у випадку Ca^{2+} -помпи ПМ блокує конформаційний перехід фосфорильованої проміжної сполуки від $E_1\text{-P}$ до $E_2\text{-P}$ стану. Це дозволяє ідентифікувати La^{3+} -чутливу Ca^{2+} -помпу в ПМ, в якій міститься багато інших помп Р-типу [168].

Eu^{3+} – представник лантаноїдів, також дуже близький за іонним радіусом до Ca^{2+} . Він здатний електростатично взаємодіяти з тими ж ділянками білка, що й Ca^{2+} (переважно з атомами кисню карбоксильних та гідроксильних груп). Тому лантаноїди здатні заміщати Ca^{2+} у Ca^{2+} -зв'язуючих ділянках білків. Встановлено, що Eu^{3+} гальмує Ca^{2+} -АТРази СР міоцитів серця [294], скелетних м'язів, Ca^{2+} -транспортуючу активність АТРази ПМ клітин міометрія [241]. При концентрації вказаного іону $5 \cdot 10^{-5}$ М гальмування досягало майже 100 %, коефіцієнт інгібування ($I_{0,5}$) Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ клітин міометрія іонами Eu становив $8,7 \pm 2,7$ мкМ [63]. Гальмування активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ іонами Eu може бути обумовлене декількома факторами: по-перше, Eu^{3+} може зв'язуватись з Ca^{2+} -зв'язуючими ділянками високої спорідненості, важливими для функціонування ферменту; по-друге, іони Eu , подібно до Mg^{2+} , можуть зв'язуватись з β - та γ -фосфатами АТР, при цьому іони европію зв'язуються з АТР у розчині значно сильніше, ніж іони Mg (константи зв'язування різняться більше, ніж на порядок [294]).

Цікавими є результати вивчення інгібування Ca^{2+} -помпи ПМ іонами Cd , який є дуже ефективним неспецифічним інгібітором ($I_{0,5} = 2$ нМ); хоч природа інгібування є предметом дискусій: механізм інтерпретується як

неконкурентний з Ca^{2+} [510], або ж як конкурентний [499]. При використанні інтактних клітин ефект Cd^{2+} доволі слабкий ($I_{0,5}=1,5$ мМ при рН 7,2 і 0,35 мМ при рН 8,1) [486], отже, іони Cd здатні пригнічувати Ca^{2+} -помпу ПМ, діючи тільки зі сторони цитоплазми [96].

Інгібіторний вплив іонів інших металів на Ca^{2+} -помпу ПМ викликає дещо менший інтерес. Іони Ni^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} пригнічують АТРазну активність Ca^{2+} -помпи ПМ конкурентно з Ca^{2+} [96]. Доведено також інгібування Ca^{2+} -помпи ПМ солями свинцю [96].

Інші фактори (вільні радикали, електромагнітні поля, органічні розчинники). *In vivo* на активність помпи впливають вільні радикали, що відбувається як через безпосередній вплив на Ca^{2+} -помпу ПМ, так і через окиснення жирних кислот, які входять до складу мембрани. Наприклад, Ca^{2+} -помпа ПМ еритроцитів інгібується активованими нейтрофілами внаслідок пошкодження вільними радикалами. Аналогічно, в альвеолярних макрофагах *t*-бутил гідропероксид-керований оксидативний стрес спричиняє підвищення концентрації цитоплазматичного Ca^{2+} , що асоційовано з інгібуванням Ca^{2+} -помпи ПМ [370]. Ca^{2+} -помпа також чутлива до пероксинітриду (ONOO^-). Так, радикали у хронічних мікромолярних дозах призводять до утворення похідного нітротирозину Ca^{2+} -помпи ПМ, що знижує термостабільність та незворотно інгібує функціонування помпи на 75 %: зменшується V_{max} , майже у 2 рази збільшується K_{Ca} (з $0,11 \pm 0,01$ мкМ до $0,18 \pm 0,01$ мкМ) та у 5 разів збільшується K_{MgATP} (від 49 ± 5 мкМ до 231 ± 15 мкМ); у результаті $[\text{Ca}^{2+}]_c$ зростає до 400 нМ [262]. Окрім того, оксидативний стрес та антиоксидантні системи захисту призводять до перекисного окиснення ліпідів, що зменшує активність Ca^{2+} -помпи ПМ [445]. Натомість супероксидний радикал (O^{2*-}) підвищує активність Ca^{2+} -помпи ПМ ГМК судин бичачих легень.

Є результати, за якими низькочастотне електромагнітне поле стабілізує мембрану, що сприятливо впливає на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазну активність [445].

Органічні розчинники характеризуються різним значенням діелектричної проникності, яка впливає на функціонування Ca^{2+} -помпи ПМ. Так, зростання

величини діелектричної проникності середовища інкубації повинно підсилювати притягування протилежно і відштовхування однойменно заряджених іонів. При цьому буде полегшуватися взаємодія Mg^{2+} з ATP^{4-} , що призведе до збільшення концентрації істинного субстрату АТР-гідролазної ензиматичної реакції – хелатного комплексу $MgATP^{2-}$, а також полегшення зв'язування аніонного субстрату $MgATP^{2-}$ з позитивно зарядженим активним центром Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРази та преципітації катіонів Ca, які акумулюються у внутрішньовезикулярному об'ємі, з фосфат-аніонами. Натомість зниження діелектричної проникності середовища зменшує відштовхування внаслідок електростатичних взаємодій між позитивно зарядженим активним центром ензима і продуктом АТР-гідролазної реакції – аніонним хелатним комплексом $MgATP$. Доведено, що зменшення показника діелектричної проникності на одиницю призводить до зниження активності Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРази ПМ ГМК матки на 10-15 %. Зниження діелектричної проникності від 73,05 до 68,8 спричиняло зменшення максимальної швидкості гідролізу АТР у два рази та збільшення K_m у 2,8 разів, таким чином, каталітична ефективність Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРази за гідролізом АТР загалом зменшується у 5-6 разів. Отже, електростатичні іон-іонні взаємодії між активним центром ензиму та продуктами реакції мають важливе значення у забезпеченні АТР-гідролазної реакції [61].

Органічні розчинники (діоксан, ацетон, етанол, ДМСО) у концентрації до 10 % інгібують активність Ca^{2+} -помпи ПМ ГМК матки, при цьому за константою напівінгібування ($I_{0,5}$) їх можна розташувати у такий ряд (від найбільш ефективного до найменш): діоксан>ацетон=етанол>ДМСО. При цьому зниження початкової максимальної активності Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРази, хоча і залежало від хімічної природи органічних розчинників, але лімітувалося величиною діелектричної проникності середовища інкубації [61].

Етанол впливає на активність Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРази дозозалежно. У низьких концентраціях зазначений розчинник стимулював активність реконструйованої Ca^{2+} -помпи ПМ. Причому найбільш ефективна стимуляція (до 74 % від

максимальної активності Ca^{2+} -помпи ПМ) була досягнена з використанням 5 % етанолу [447]. Транспортну активність солюбілізованого ензиму найбільш ефективно (на 20 %) стимулював етанол у концентрації 2 % [6]. Етанол, використаний у високих концентраціях, може порушувати гідрофобні контакти та водневі зв'язки у структурі молекули, знижувати полярність середовища інкубації та величину діелектричної проникності [6]. Концентрації етанолу вище 5 % інгібують помпу, що може відбуватися внаслідок порушення структури ліпідного бішару [447], а саме перекисного впливу етанолу на мембранні ліпіди, поверхневі властивості та базальну Ca^{2+} -проникність ПМ. Окрім того, не слід виключати зниження діелектричної проникності середовища (ефект від чого описано вище) та зменшення концентрації H_2O , що є одним з компонентів АТР-гідролазної реакції [6]. Таким чином, інтоксикація етанолом може впливати на активність Ca^{2+} -помпи ПМ, що змінює внутрішньоклітинний гомеостаз Ca^{2+} .

Низькомолекулярні ефектори. Останнім часом особлива увага приділяється пошуку низькомолекулярних сполук, які б дозволяли специфічно змінювати (в основному знижувати) активність Ca^{2+} -помпи ПМ. Давно відомими є неспецифічні інгібітори Ca^{2+} -помпи ПМ, тобто ті, які впливають також і на активність інших мембранозв'язаних АТРаз. Такими інгібіторами є еозин (тетрабромовфлуоресцеїн), ортованадат, п-хлормеркурібензоат, а також перелічені вище іони важких металів (перш за все – La^{3+} , Eu^{3+} , Cd^{2+}). Звичайно проводиться скринінг препаратів, які могли б селективно змінювати активність Ca^{2+} -помпи ПМ, і, таким чином, дозволили б ізольовано вивчати внесок зазначеної помпи у загальний обмін Ca^{2+} у клітині, та роль у формуванні різноманітних патологій. На сьогодні у якості специфічних інгібіторів використовують лише калоксини.

Неспецифічні інгібітори. Еозин Y (тетрабромовфлуоресцеїн) – найпотужніший з відомих неспецифічних інгібіторів Ca^{2+} -помпи ПМ: його константи інгібування ($I_{0,5}$) для pomp кардіоміоцитів та еритроцитів становлять 1,00 та 0,04 мкМ відповідно [233, 242, 243, 315]. Причому еозин Y,

оборотно гальмуючи Ca^{2+} -помпу ПМ, навіть у концентраціях 20-100 мкМ не впливав на іншу Ca^{2+} -транспортувальну систему ПМ – Na^+ - Ca^{2+} обмінник [102, 242]. Отже, на рівні ПМ цей інгібітор селективно (щодо Na^+ / Ca^{2+} -обмінника) інгібує Ca^{2+} -помпу. Значення уявної константи інгібування еозином Y ($I_{0,5}$) для Ca^{2+} -помпи ПМ міоцитів матки становить 1 мкМ [104]. Проте у нього є одний вагомий недолік: низька проникність до інтактних клітин, що є необхідним для впливу на Ca^{2+} -помпу ПМ, оскільки приєднання до ензиму відбувається до АТР-зв'язуючої ділянки, яка знаходиться з цитоплазматичного боку [376]. Тому часто використовується проникний сукцимідиловий естер – карбоксиеозин, що дозволяє блокувати Ca^{2+} -помпу в інтактних клітинах [376].

Класичним неспецифічним інгібітором катіон транспортувальних АТРаз Р-типу є ортованадат [14, 141, 167]. Ця сполука гальмує Ca^{2+} -помпи СР та ПМ, але чутливість цих систем до нього відрізняється [167, 402, 516]. Припускають, що ванадат (п'ятивалентний стеричний аналог фосфату) пригнічує активність АТРази, зв'язуючись з аспарагіновою кислотою, яка бере участь в утворенні проміжного фосфоризованого продукту $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази [167]. Ортованадат блокує гідроліз АТР в активному центрі і знижує спорідненість ензиму до АТР у АТР-регуляторній ділянці [104, 136]. У результаті цей інгібітор уможливорює кристалізацію транспортної АТРази і стабілізує її у E_2 -конформації [14, 193]. Ортованадат натрію у концентрації 0,1-100 мкМ неспецифічно інгібує активність Ca^{2+} -помпи ПМ на 95 % відносно контрольного рівня, $I_{0,5}$ дорівнює 4,7 мкМ [104]. У ГМ ортованадат стимулює звільнення Ca^{2+} із внутрішньоклітинних депо [68].

Основними неспецифічними необоротними інгібіторами транспортної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ є п-хлормеркурібензоат (значення $I_{0,5}$ дорівнює 3,2 мкМ, повне інгібування помпи відбувається за концентрації 10^{-5} М) та іони La ($I_{0,5}$ дорівнює 1 мкМ).

З *Grevillea striata* було отримано синтетичний аналог стріатолу, що є біс-фенольною сполукою, яка інгібує РМСА-залежний викид Ca^{2+} з інтактних

еритроцитів та ГМК аорти. Але його селективність є дозо-залежною, а на ефективність дії значною мірою впливає якісний склад мембрани [376].

Зважаючи на те, що специфічний інгібітор для Ca^{2+} -помпи ПМ відсутній, у дослідженнях активності вищезазначеної АТРази, використовують специфічні інгібітори інших Ca^{2+} -транспортувальних систем, що дозволяє визначати залишкову, не чутливу до дії цих інгібіторів, АТР-гідролазну або Ca^{2+} -транспортуючу активність Ca^{2+} -помпи ПМ. Так, терпеновий лактон тапсигаргін – селективний інгібітор Ca^{2+} -помпи СР ($I_{0,5} \sim 1 - 10$ нМ), використаний у інтервалі концентрацій 5-100 нМ, зменшує активність очищеної транспортної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази, солюбілізованої із ПМ клітин міометрія, лише не більше, ніж на 10 % по відношенню до контрольного значення. Також циклопіазонієва кислота, використана у діапазоні концентрації 0,05-1 мкМ, – інший селективний інгібітор Ca^{2+} -помпи СР ($I_{0,5} \sim 1$ мкМ), абсолютно не впливає на активність очищеної транспортної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази, солюбілізованої із ПМ клітин міометрія, але при збільшенні концентрації інгібітора від 1 до 10 мкМ ця активність зменшується на 20 % відносно контрольного рівня [473]. Рутенієвий червоний у концентраціях, які повністю гальмують Ca^{2+} -помпу СР та енергозалежне транспортування Ca^{2+} у мітохондріях, на $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ ГМК практично не впливає. 10 мМ азид натрію, який використовують для повного блокування транспортування Ca^{2+} у мітохондріях, спричиняє незначне інгібування (до 14 %) активності Ca^{2+} -транспортувальної АТРази ПМ [104].

Таким чином, перелічені сполуки можна використовувати для опосередкованого встановлення активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ, оскільки специфічний інгібітор на сьогодні не відомий.

Специфічні інгібітори на основі пептидів. Для пошуку селективного інгібітора для Ca^{2+} -помпи ПМ було використано пептиди завдяки їх здатності специфічно розпізнавати окремі ділянки на поверхні білків. Отже, було знайдено пептиди, які мімікрували дію автокаталітичного домену, але їх використання було обмеженим у випадку інтактних клітин, оскільки

приєднання таких пептидів до Ca^{2+} -помпи ПМ відбувається з боку цитоплазми [532]. Таким чином, подібний тип інгібіторів не набув широкого використання.

У літературі з'явилися повідомлення про використання специфічних інгібіторів $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ – синтетичних пептидів класу калоксинів 1A1, 2A1 та 3A1, які зв'язуються з першим, другим та третім зовнішньоклітинними доменами ензиму відповідно [99, 177, 230, 256, 403, 474, 532]. Калоксини приєднуються до позаклітинного домену помпи та можуть використовуватися для інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ в інтактних клітинних системах [153, 405]. Калоксин 1A1, зв'язуючись з першим зовнішньоклітинним доменом, стабілізує Ca^{2+} -залежне утворення ацилфосфату (140 кДа). Константа інгібування $I_{0,5}$ дорівнює 100 мкМ. Цей калоксин також незначною мірою інгібує $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР [403]. Найбільший інтерес викликає пептидний інгібітор калоксин 2A1, який селективно зв'язується з другим зовнішньоклітинним доменом $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ, амінокислотна послідовність якого є подібною для різних ізоформ Ca^{2+} -помпи ПМ. Калоксин 2A1 інгібує $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ($I_{0,5}=0,4\pm 0,1$ мкМ), не впливаючи на Mg^{2+} -АТРази, Na^+, K^+ -АТРази ПМ та на $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР. Його інгібування є неконкурентним по відношенню до Ca^{2+} , АТР, кальмодуліну. Також він інгібує утворення ацилфосфату, таким чином впливаючи на конформаційні переходи протягом реакційного циклу Ca^{2+} -помпи [179, 277]. Використання калоксинів обмежує висока K_i для 2A1, тоді як підвищення спорідненості призводить до втрати селективності [403].

Метаболічна регуляція $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ. Кальмодулін. Позитивним модулятором $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ є кальмодулін. Перші відомості про регуляцію $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ кальмодуліном були отримані на початку 70-х років Бондом та Клау [239]. Було показано, що для переведення ензиму з менш активної форми А в більш активну форму В було необхідним додавання до виділених мембран не лише іонів Ca^{2+} для моделювання реакції накопичення іонів Ca^{2+} , а також внутрішньоклітинного вмісту, який, напевно, містив “фактор активації”. Пізніше цей фактор було виділено,

охарактеризовано та названо кальмодуліном. Взаємодія $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази з кальмодуліном призводить до підвищення спорідненості ензиму до іонів Са, кальмодулін також підвищує швидкість гідролізу АТР та транспорту катіонів [153, 225, 315]. $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза ПМ внаслідок гідролізу однієї молекули АТР транспортує один іон Са. Так, для Ca^{2+} -помпи ПМ міометрія щурів встановлено, що кальмодулін удвічі збільшував максимальну швидкість транспортувального процесу у везикулах ПМ та на порядок підвищував спорідненість цієї системи до Ca^{2+} [227].

За умов низької концентрації Ca^{2+} -помпа перебуває у стані аутоінгібування, оскільки її СООН-термінальний регіон, локалізованого на 40 залишків нижче останнього трансмембранного домену, перешкоджає функціонуванню каталітичного циклу. Якщо концентрація Са зростає, утворюється комплекс « Ca^{2+} -кальмодулін», який приєднується до аутоінгібіторного домену Ca^{2+} -помпи ПМ, звільняючи її від інгібування та відновлюючи її активність [470]. Було виявлено, що Ca^{2+} -помпа ПМ має дві ділянки зв'язування з кальмодуліном: у С-термінальному хвості довжиною 25 залишків та біля фосфоліпід-зв'язуючого домену в другій цитозольній петлі, локалізованій між сайтами фосфорилування та зв'язування АТР – 537-544 залишки для ізоформи Ca^{2+} -помпи ПМ 4 (рис. 1.5) [227]. Кристалографічні дослідження ензиму в стані аутоінгібування вказують, що СООН-термінальний регуляторний домен запобігає доступу субстрату та зв'язуванню АТР за відсутності Ca^{2+} -кальмодуліну [470]. Оскільки кальмодулін має високу Ca^{2+} -афінність, імовірно, він насичується Ca^{2+} навіть за низької концентрації Ca^{2+} у клітині, тобто у стані спокою. Таким чином, кальмодулін може взаємодіяти з кальмодулін-зв'язувачим доменом, підтримуючи Ca^{2+} -помпу в достатній активності навіть за низької концентрації $[\text{Ca}^{2+}]_c$ [315].

Ізоформи Ca^{2+} -помпи ПМ мають певні особливості в регуляції кальмодуліном: у них різна базальна активність, різна афінність до кальмодуліну, швидкість активації та інактивації у відповідь на приєднання та дисоціацію кальмодуліну [402].

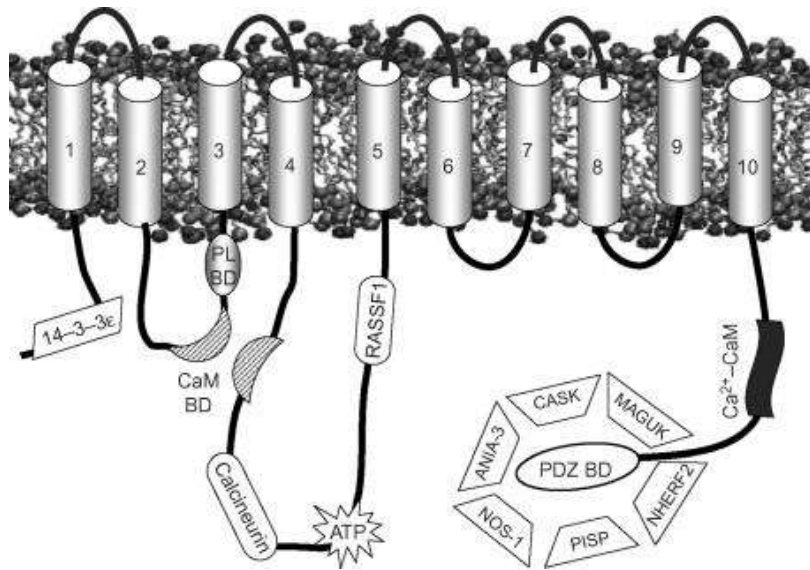


Рис 1.5. Загальне розміщення регуляторних доменів Ca^{2+} -помпи ПМ для метаболічних сполук [168].

Ліпідне оточення. Стимуляція Ca^{2+} -помпи ПМ відбувається під впливом кислих фосfolіпідів та поліненасичених жирних кислот. Кислі фосfolіпиди, такі як: фосфатидилсерин, фосфатидилінозитол, фосфатидна кислота, - збільшують афінність помпи до Ca^{2+} , швидкість транспорту, кооперативність щодо Ca^{2+} . Важливо, що концентрація ліпідів *in vivo* у мембрані достатня для напівмаксимальної активації помпи. До того ж кислі фосfolіпиди є більш ефективними активаторами помпи, ніж кальмодулін [402], що призвело до припущення, за яким кальмодулін та кислі фосfolіпиди активують Ca^{2+} -АТразу за різними механізмами із залученням різних зв'язуючих сайтів [208, 224]. Робота з різними протеолітичними фрагментами Ca^{2+} -помпи ПМ та з синтетичними пептидами дозволила відкрити два окремих фосfolіпід-зв'язуючих домени у помпі: один є кальмодулін-зв'язуючим доменом, а інший – розташований у цитозольній петлі між 2 та 3 трансмембранним доменом та містить 40 основних амінокислот [315, 153, 393]. Істотна стимуляція активності Ca^{2+} -помпи ПМ фосfolіпидами відбувається завдяки зміні конформації кальмодулін-зв'язуючого домену [208, 315], що ймовірно підвищує доступність

кальмодуліну для зв'язування з послідовністю Ca^{2+} -помпи ПМ. Також у АТРаз Р-типу відбуваються значні конформаційні зміни при переході від E1 до E2 стану, і ліпідне оточення може впливати на транспорт Ca^{2+} завдяки впливу на конформаційні перебудови [208].

Активація кислими фосфоліпідами має значення для функціонування Ca^{2+} -помпи ПМ *in vivo*, оскільки вони є одним з компонентів мембранного оточення помпи [153]. Саме завдяки ліпідному оточенню помпа є постійно активованою. В експериментах з реконструйованою Ca^{2+} -помпою ПМ було показано, що фосфоліпіди мембрани забезпечують 50 % максимальної швидкості Ca^{2+} -помпи ПМ [153, 229, 315]. Причому різні фосфоліпіди мають різне значення в умовах *in vivo*. Так, концентрація фосфатидилсерину та подібних до нього кислих фосфоліпідів у ПМ незмінна для кожного окремого типу клітин, натомість концентрація фосфатидилінозиту та його фосфорильованих продуктів ($\text{PIP}_{1,2}$) у мембрані змінюється під впливом регуляторних систем клітини, що робить їх більш імовірними модуляторами активності Ca^{2+} -помпи ПМ [315]. Загалом, з-поміж перелічених сполук фосфатидилінозитол-4,5-бісфосфат є найефективнішим стимулятором помпи [175, 402]. Таким чином, PIP_2 важливий для збереження активності Ca^{2+} -помпи ПМ у клітинах у стані спокою, коли концентрація вільного Ca^{2+} є низькою та стимуляція кальмодуліном є мінімальною [175, 352, 402]. Варто зазначити, що концентрація $\text{PIP}_{1,2}$ залежить від Ca^{2+} -споріднених сигнальних процесів, тому можливий зворотній цикл регуляції Ca^{2+} -помпи ПМ [153].

Важливими компонентами ПМ є сфінгомієлін та холестерол, які, як і Ca^{2+} -помпа, переважно знаходяться у ліпідних рафтах. Вміст зазначених сполук у мембрані обернено пропорційно корелює з активністю Ca^{2+} -помпи ПМ [406].

Іншим ефективними стимуляторами та невід'ємними компонентами мембран є жирні кислоти. Загалом, насичені жирні кислоти не впливають на активність помпи, а у випадку ненасичених жирних кислот важливим є співвідношення між кількістю подвійних зв'язків, довжиною аліфатичного ланцюга та впорядкованістю ацильних залишків, оскільки у повністю

впорядкованому оточенні ацильних залишків Ca^{2+} -помпа ПМ сильніше асоціюється з фосфатидилсерином, ніж з фосфатидилхоліном, а в невпорядкованому оточенні – навпаки [477]. Серед жирних кислот найбільш виражений вплив на Ca^{2+} -помпу ПМ має арахідонова кислота ($\text{C}_{20:4}$). Помічена кореляція між внутрішньоклітинним рівнем Ca^{2+} та вмістом арахідонової кислоти в ПМ: підвищення концентрації останньої одразу ж спричиняє збільшення рівня внутрішньоклітинного Ca^{2+} , що може відбуватися через стимуляцію зазначеною кислотою виходу Ca^{2+} з внутрішньоклітинних депо. Вплив на Ca^{2+} -помпу ПМ арахідонової кислоти є концентраційнозалежним. За її концентрації 5 мкМ відбувається максимальна активація Ca^{2+} -помпи ПМ арахідоновою кислотою: хоча спорідненість до Ca^{2+} практично не змінюється, але прискорюється етап дефосфорилування ензиму (перехід з E2 в E1 конформацію). Такий ефект також спостерігається під дією олеїнової та ліноленої кислоти. Але при підвищенні концентрації до 50 мкМ арахідонова кислота має інгібіторний вплив на активність помпи, що, можливо, пов'язано з неспецифічним та нефізіологічним впливом жирних кислот з довгим ланцюгом на АТРаду Р-типу: зменшується спорідненість до Ca^{2+} та зменшується стабільність фосфоензиму. Також існує припущення, що за цих обставин відбувається роз'єднання гідролізу АТР та транспорту Ca^{2+} . Сайти приєднання арахідонової кислоти локалізовані внутрішньоклітинно, незалежно від кальмодулін-зв'язуючого домену та сайтів приєднання кислих фосфоліпідів [391]. Продукти перекисного окиснення ліпідів мають негативний вплив на активність Ca^{2+} -помпи ПМ, N-гліцерований фосфоетанол зменшує спорідненість помпи до фосфоліпідів мембрани та зменшується її термостабільність [44], також 4-ОН-2,3-транс-ноненаль інгібує активність Ca^{2+} -помпи ПМ. Такий механізм інгібування активності Ca^{2+} -помпи може мати місце, наприклад, при серцево-судинних захворюваннях [376].

Оскільки на активність Ca^{2+} -помпи ПМ впливає склад та композиція ліпідів мембрани, то зміни в ліпідній композиції, у зв'язку зі старінням або

захворюванням, можуть впливати на функціонування помпи, і відповідно, на $[Ca^{2+}]_c$.

Спермін. Полікатіон спермін належить до ендогенних поліамінів, які виконують важливу роль у регуляції процесів росту та диференціації клітин. Регуляторну роль спермін відіграє у функціонуванні такого репродуктивного органу, як матка, оскільки під час розвитку вагітності в матці підвищується вміст поліамінів. Ці показники досягають максимуму в середині вагітності і знижуються з наближенням пологів [104].

Вплив поліаміну сперміну на активність очищеної Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази ПМ є двофазним: за концентрації поліаміну 0,1-0,5 мМ спостерігається тенденція до активації ензиму ($\sim 10\%$), подальше підвищення його концентрації призводить до зниження активності. Коефіцієнт інгібування становить $5,5 \pm 0,3$ мМ ($n=4$). Спермін, зв'язуючись із кислими фосфоліпідами, може зменшувати необхідну їх кількість в оточенні Ca^{2+} -помпи ПМ і в такий спосіб знижувати її активність. Можливість такого зв'язування доведено експериментально [104]. Інгібіторний ефект полікатіонів включає взаємодію з негативно зарядженими групами амінокислот на петлях ензиму, орієнтованих у цитозоль, утворення між ними містків та блокування доступу субстрату [402].

Міnorні ліпіди. Сполуки ряду N-ацилетаноламінів легко вбудовуються у ПМ та викликають зміни її ліпідного складу. Наприклад, N-пальмітоїлетаноламін модифікував фосфоліпідний склад ПМ: зростав відсотковий вміст фосфатидінозитулу (на 20,2%), що активує функціонування помпи, та лізофосфатидилхоліну (у 2,7 разів). Оскільки на солюбілізованій формі Ca^{2+} -помпи активуючого впливу N-пальмітоїлетаноламін не мав, логічно припустити, що активуючий ефект пов'язаний з впливом на ліпідний склад ПМ і, можливо, є важливою ланкою у механізмі скорочення-розслаблення міометрія. На фоні цих результатів N-пальмітоїлетаноламін знижує амплітуду та тривалість спонтанних скорочень смужок міометрія [36].

Фосфорилування. Кіназа-кероване фосфорилування також впливає на активність Ca^{2+} -помпи ПМ [342]. Це вперше було показано на помпі з

мембрани сарколеми серця та пов'язано з сАМР-залежною ПК [315]. Вважається, що саме сАМР-залежна ПК є основним білком, який фосфорилує Ca^{2+} -помпу ПМ, сайт фосфорилування знаходиться на сериновому залишку між COOH -кінцем та кальмодулін-зв'язуючим доменом [375]. Але такий шлях активації властивий лише для ізоформ Ca^{2+} -помпи 1 [375], оскільки лише Ca^{2+} -помпа 1b містить залишок Ser, описаний вище [402]. Фосфорилування призводить до зменшення K_{Ca} до 1 мкМ [315], також спостерігається підвищення максимальної швидкості процесу у 2 рази. Стимуляція кальмодуліном та ПКА не є адитивною [402], що свідчить про єдиний механізм активації та спільні центри взаємодії кальмодуліну та ПК.

Активація протеїнкіназою С (ПКС) є більш складною, оскільки може як активувати, так і інгібувати активність Ca^{2+} -помпи ПМ. Фосфорилування помпи зазначеною кіназою описано кількома авторами [238, 240, 317, 323, 418, 495, 525]. ПКС підвищує значення V_{max} , хоча менш ефективно, ніж ПКА. Фосфорилування Ca^{2+} -помпи ПМ ПКС відбувається по треоніновим та сериновим залишкам, які знаходяться в COOH -кінці, нижче кальмодулін-зв'язуючого домену [315]. Значно рідше відбувається фосфорилування в інших ділянках С-кінця, один з таких – треонін у кальмодулін-зв'язуючому домені, і фосфорилування в такому випадку аналогічне дії кальмодуліну, оскільки звільняє помпу від аутоінгібування.

Цікавим є вплив кальмодуліну на фосфорильовану Ca^{2+} -помпу ПМ. У деяких випадках після фосфорилування приєднання кальмодуліну ще більше стимулює помпу. Послідовність підвищення V_{max} кальмодуліном можна розташувати у такому порядку: ПКС-фосфорильований ензим > ПКА-фосфорильований ензим > нативний ензим. Окрім того, фосфорилування впливає на швидкість зв'язування кальмодуліну: фосфорилування ПКА зменшує цей показник, а ПКС – збільшує. Але присутність кальмодуліну на ензимі до фосфорилування запобігає дії як ПКА, так і ПКС, оскільки зменшує кількість сайтів, доступних кіназам. Таким чином, ПКА та ПКС можуть мати різну функціональну роль у процесі фосфорилування.

Простагландини. Простагландини – гормоноподібні регуляторні молекули, похідні арахідонової та інших поліненасичених жирних кислот, які досить широко використовуються у медичній практиці. Механізм дії простагландинів, що призводить до стимуляції скорочень міометрія, майже не досліджений, але існує думка, що однією з причин стимуляції скоротливої активності ГМ матки під впливом цих сполук може бути підвищення концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} внаслідок інгібування простагландинами Ca^{2+} -помпи ПМ.

Дослідження, проведені на очищеній $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ, показали, що простагландини E_2 та $\text{F}_{2\alpha}$ у широкому діапазоні концентрацій ($10^{-8} - 10^{-4}$ М) абсолютно не впливають на її активність [88]. Поряд з цим, Попеску і співавтори показали, що ці ж простагландини гальмують Ca^{2+} -помпу ПМ міометрія вагітних жінок [414]. Такі дані очевидно пояснюються тим, що простагландини впливають на активність Ca^{2+} -транспортної АТРази ПМ не безпосередньо, а через рецептор та системи, що забезпечують спряження останнього з Ca^{2+} -транспортуючим ензимом.

Пептидні гормони. Окситоцин – пептидний нейрогормон, який впливає на різні функціональні системи організму людини і тварин. Введення окситоцину викликає скорочення міоепітеліальних клітин молочних залоз та ГМ матки, а останнє стимулює пологову активність. Дія окситоцину пов'язана з активацією Ca^{2+} -каналів ПМ та викидом Ca^{2+} з СР, а також з інгібуванням активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ та СР. При використанні насичуючих концентрацій окситоцину (10^{-7} М) активність помпи повністю не пригнічується [55, 106, 112].

Брадикініни – є больовими пептидами, які утворюються в місці ушкодження тканин та запалення. Вони, як наприклад, і АТР, активують метаботропні рецептори (P2Y_1 або V_2) в нейронах. Стимуляція метаботропних рецепторів також призводить до активації фосфоліпази С, утворення диацилгліцеролу та IP_3 . Оскільки Ca^{2+} -помпа ПМ стимулюється ПКС і

брадикініни підвищують вихід Ca^{2+} з клітин [495], цей викид відбувається завдяки активації Ca^{2+} -помпи ПМ.

Інші фактори. На додаток до регуляції кальмодуліном, на С-термінальний регіон Ca^{2+} -помпи ПМ впливає незворотній активатор кальпаїн та PDZ (Postsynaptic density protein) білки (рис. 4) [315]. Селективний протеоліз ізольованої помпи кальпаїном призводить до від'єднання кальмодулін-зв'язуючого домену, залишаючи 124 кД фрагмент з Ca^{2+} -залежною активністю [375]. Найбільш чутливою до такого типу регуляції є Ca^{2+} -помпа 1 [261]. Така взаємодія може бути корисною для локальної організації Ca^{2+} -сигнальних доменів у ПМ або в умовах патологічного перенасичення Ca^{2+} , що вимагає підвищення експорту Ca^{2+} [153] та для закорювання Ca^{2+} -регуляторних комплексів у цитоскелет [315].

На додаток до СООН-термінального домену й інші регіони помпи взаємодіють з білковими партнерами. Основна внутрішньоклітинна петля, яка з'єднує трансмембранні домени 4 та 5, приєднує RASSF1 (супресор пухлин RAS-асоційований фактор 1) (рис. 1.5), що інгібує активацію помпи під впливом епідермального фактору росту, у сигнальному шляху RAS [153]. Також приєднання Ras-споріднених білків призводить до інгібування активності Ca^{2+} -помпи ПМ. Так, Rap1 GTP-зв'язуючий білок регулює викид Ca^{2+} з клітин ГМ [375]. Також основна внутрішньоклітинна петля взаємодіє з α -синтропіном, що пригнічує активність Ca^{2+} -помпи ПМ.

Нарешті Ca^{2+} -помпа ПМ інгібується глюкозою, що свідчить про те, що помпа бере участь у контролі гомеостазу Ca^{2+} у β -клітинах [153].

Гепарин, глікозамінглікан, який має антикоагуляційні властивості, інгібує як гідроліз АТФ, так і транспорт Ca^{2+} -помпою, приєднуючись до вказаного транспортного білка в E_2 конформації, антагоністом у цьому процесі є K^+ . $I_{0,5}$ гепарину практично не залежить від присутності кальмодуліну ($I_{0,5}=0,47\pm 0,26$ мкг/мл за наявності кальмодуліну, $I_{0,5}=0,2\pm 0,04$ за відсутності). Інші сульфурильовані глікозамінглікани також інгібують Ca^{2+} -помпу ПМ: фукозильований хондроїтинсульфат має значення $I_{0,5}$, близьке до такого у

випадку гепарину ($I_{0,5}=0,2$ мкг/мл), хондроїтинсульфат з нижчим вмістом сульфатів також інгібує активність Ca^{2+} -помпи, але $I_{0,5}$ підвищується у 1000 разів. Запропоновано, що сульфонільовані полісахариди фізіологічно підвищують $[Ca^{2+}]_c$ у стані спокою, блокуючи Ca^{2+} -помпу [229].

Показано, що стероїдні гормони також змінюють активність Ca^{2+} -помпи ПМ. Так, 17β -естрадіол та дигідротестостерон, у концентраціях 10^{-10} М та 10^{-11} М відповідно у 1,5 рази стимулювали активність помпи у ниркових дистальних трубочках, подальше збільшення концентрації естрадіолу не збільшувало активність [210].

АТРазна активність Ca^{2+} -помпи ПМ залежить від концентрації білків в мембрані: її активність зростає в 1,5-5 разів при зменшенні концентрації білків у мембрані від 50 до 1 мкг/мл. Існує гіпотеза, що зміна активності пов'язана із взаємодією з білками цитоскелету, в першу чергу актину [498]. Інший білок цитоскелету, ацетильований тубулін, також змінює активність Ca^{2+} -помпи ПМ, але ефект залежить від концентрації та оточення: в оточенні кислих ліпідів тубулін має активуючий вплив завжди, а в оточенні нейтральних ліпідів при концентрації до 50 мкг/мл тубуліну помпа активується, при більшій концентрації – інгібується (при концентрації 300 мкг/мл АТРазна активність знижується на 80 %) [374].

Існує припущення, що у ГМ судин Ca^{2+} -помпа ПМ може підлягати S-глутатіонілюванню, оскільки діамід підвищував $[Ca^{2+}]_c$ та синхронні осциляції Ca^{2+} , за умов інгібуванням фосфоліпази С та IP3 рецептора [344].

Очевидно, що кількісний вміст Ca^{2+} -помпи у ПМ буде впливати на швидкість зменшення $[Ca^{2+}]_c$ після збудження клітини, а також на $[Ca^{2+}]_c$ у стані спокою. Тому регуляція на етапі транскрипції відіграє важливу роль у регуляції Ca^{2+} -сигналів, але вона не є достатньо дослідженою. У В-лімфоцитах та β -клітинах панкреатичної залози показано, що транскрипційний фактор *c-myc* репресує експресію Ca^{2+} -помпи ПМ 4 та Ca^{2+} -помпи ПМ 1,2 відповідно. Швидше за все подібний механізм регуляції характерний і для інших клітин. У клітинах епітелію нирок, остеобластах, клітинах дванадцятипалої кишки

вітамін D3 індукував експресію Ca^{2+} -помпи ПМ 1, також індукція в клітинах дванадцятипалої кишки спостерігалася під впливом синтетичних протизапальних стероїдів [422]. Беручи до уваги, що зміна експресії Ca^{2+} -помпи ПМ відбувається при багатьох захворюваннях (діабет, пухлини, остеопороз) дослідження регуляції транскрипції гену цієї помпи потребує більшої уваги.

1.2.3. Mg^{2+} , АТФ-залежна кальцієва помпа плазматичної мембрани та патології скоротливої функції гладеньких м'язів

Дослідження, виконані на ізольованих клітинах та тканинах свідчать, що дисфункція Ca^{2+} -помпи ПМ пов'язана з багатьма захворюваннями, включаючи діабет, остеопороз, гіпертензія, рак, нейродегенеративні захворювання. Це дозволяє припустити, що Ca^{2+} -помпа ПМ відіграє центральну роль у формуванні патологій, хоча у більшості випадків змінена експресія/активність швидше є наслідком, а не причиною хвороби [257, 466]. Більшість з того, що відомо про патофізіологічні функції Ca^{2+} -помпи ПМ, отримано з експериментів на генетично модифікованих мишах. Наприклад, нокаутовані за геном Ca^{2+} -помпи ПМ 1 миші вмирають протягом раннього ембріонального розвитку, за геном Ca^{2+} -помпи ПМ 2 – мають атаксію та глухоту; видалення Ca^{2+} -помпи ПМ 4 призводить до знерухомлення сперматозоїдів та подальшої стерильності, змін функціонування тромбоцитів та їх агрегації [170], але основне те, що у нуль-мутантів спостерігаються зміни скоротливої активності та схильність до апоптозу у ГМ [334]. Відомо, що поліморфізм нуклеотидів у гені Ca^{2+} -помпи ПМ 1 має чітку кореляцію з варіаціями кров'яного тиску, гіпертензії та ризиком серцево-судинних захворювань [466]. Суперекспресія Ca^{2+} -помпи 4 посилює міогенну відповідь та підвищує чутливість до вазоконстрикторів, що супроводжується значним зростанням кров'яного тиску, хоча змін $[\text{Ca}^{2+}]_c$ не спостерігалася [257]. Таким чином, зміна функціональної активності Ca^{2+} -помпи ПМ є підґрунтям формування судинних патофізіологічних процесів.

Гетерозиготні по гену Ca^{2+} -помпи ПМ 1 миші порівняно з диким типом мали підвищену силу скоротливої відповіді ГМ сечового міхура (на 150-190 %) на K^+ -залежну деполяризацію та збільшення концентрації $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (130-180 %) під час стимуляції як карбахолом, так і K^+ [342].

Хоча у серцевому м'язі Ca^{2+} -помпа ПМ не має значного внеску у підтриманні сталої концентрації Ca^{2+} , оскільки основна роль належить електрогенному $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обміннику ПМ та Ca^{2+} -помпі СР, але саме у серцевому м'язі Ca^{2+} -помпа ПМ має значення при регуляції сигнальних шляхів, пов'язаних зі зміною $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Так, порушення функціонування Ca^{2+} -помпи ПМ 4 призводить до гіпертрофії серця, що опосередковано регуляцією кальциневрин/ NFAT сигнального шляху. Також руйнування комплексу між Ca^{2+} -помпою ПМ 4, nNOS, $\alpha 1$ -синтропіном та потенціал-керованими натрієвими каналами (Nav1.5) асоційовано з синдромом подовженого періоду QT, оскільки порушується негативна регуляція Ca^{2+} -помпою ПМ активності nNOS [170, 388, 466].

1.2.4. Mg^{2+} , АТР-залежна кальцієва помпа плазматичної мембрани та фармакологія гладеньких м'язів

Сигетин (сіль мезо-3,4-ді(п-сульфофеніл)-гексану) – це лікарський препарат, який у свій час знайшов застосування в акушерській практиці для стимуляції пологової активності і підсилення скорочення міометрія. Показано, що механізм його дії пов'язаний, перш за все, з активацією електрокерованих Ca^{2+} -каналів, по яким Ca^{2+} входить всередину міоциту. Але, поряд з тим, сигетин (5 мМ) інгібує Mg^{2+} , АТР-залежний викид Ca^{2+} з клітин, причому ступінь інгібування активного транспорту Ca^{2+} вищий, ніж у випадку окситоцина [90]. Під впливом зазначеної сполуки відбувається зменшення V_0 (нмоль Ca^{2+} за 1 хв на 1 мг білка) Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази з $2,5 \pm 0,6$ до $0,8 \pm 0,2$ (n=4) та зменшення ензиматичної активності на 80 % та 30 % у випадку сольобілізованої та реконструйованої в ліпосоми Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази відповідно [115]. Ca^{2+} -помпа

ПМ пригнічується інгаляційними анестетиками типу галотану, закисом азоту і ксеноном [96]. Один еквівалент мінімальної ефективної дози галотану інгібує активність Ca^{2+} -помпи ПМ синапсом щурів на 30 %, а ксенону і закису азоту – на 20 %. Важливо, що не спостерігалось аналогічного ефекту на Ca^{2+} -помпу СР і Na^+, K^+ -АТРаду. Місцеві анестетики (дибукаїн та лідокаїн) також інгібують активність Ca^{2+} -помпи ПМ синаптичних мембран за неконкурентним механізмом щодо субстрату [96].

Нейролептики фенотіазинового ряду пригнічують активацію Ca^{2+} -помпи ПМ не тільки кальмодуліном, але і кислими фосфоліпідами, і обмеженим протеолізом [96]. Тому був зроблений висновок, що фенотіазіни неспецифічно зв'язуються і з ліпідами, і безпосередньо з Ca^{2+} -помпою ПМ.

Втім, як вже відзначалося, при оцінці ролі Ca^{2+} -помпи ПМ в підтриманні Ca^{2+} -гомеостазу в міоцитах та функціонуванні ГМ проблематичним є відсутність специфічних інгібіторів зазначеної помпи [45, 402].

1.2.5. Узагальнення до підрозділу 1.2.

Безперечно ми повинні розглядати сьогодні ГМК як складну рецепторну тензоелектрохімічну систему, для якої (щодо внутрішньоклітинного Ca^{2+} гомеостазу), притаманні такі властивості як: неадитивність, нелінійність, синергістичність, кооперативність, наявність мережі «позитивних» та «негативних» зворотніх зв'язків, феномен градієнту спорідненості до іонів Са (на рівні різних енергозалежних Ca^{2+} -транспортуючих систем).

Отже, зважаючи на те, що Ca^{2+} є важливим внутрішньоклітинним неорганічним месенджером, який бере участь у фармакомеханічному спряженні в ГМК, біохімічні системи та механізми, які підтримують або регулюють його концентрацію у цитоплазмі, заслуговують на особливу увагу. Одним з таких механізмів є $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРада ПМ, яка є суттєво важливою для підтримання гомеостазу Ca^{2+} у гладеньком'язових клітинах. Ca^{2+} -помпи ПМ, як і інші помпи Р-типу, складається з 10 трансмембранних доменів та трьох цитоплазматичних петель. Основна відмінність Ca^{2+} -помпи ПМ від такої у випадку СР полягає у

нааявності COOH-хвоста, що містить послідовності приєднання до кальмодуліну, характеризується відповіддю на кислі фосфоліпиди, має сайти фосфорилування та PDZ домен. Процес перенесення Ca^{2+} крізь мембрану ПМ подібний до такого у Ca^{2+} -помпи CP: це 4-х етапна схема, в якій відбувається зміна спорідненості помпи до Ca^{2+} внаслідок зміни конформації та гідролізу АТР. У геномі ген Ca^{2+} -помпи ПМ представлений 4 ізоформами, які до того ж підлягають подальшому альтернативному сплайсингу. Важливим є факт, що сплайсізоформи характеризуються різною спорідненістю до Ca^{2+} та до модуляторів активності помпи (наприклад, кальмодулін, фосфорилування) та їх патерн розташування є унікальним для багатьох типів тканин та клітин. Таким чином сплайсізоформи можуть виконувати різні функції: підтримання базальної концентрації Ca^{2+} у цитоплазмі, релаксація м'язової напруги, зміна сили м'язового скорочення завдяки закисненню внутрішньоклітинного середовища, регуляція проліферативної активності, апоптозу, а також Ca^{2+} -помпи ПМ є одним з компонентів сигнальних систем, оскільки регулюють активність таких білків як pNOS, кальциневрин, особливо у кавеолах, де концентрація помпи підвищена.

Ca^{2+} -помпи ПМ регулюються багатьма природними чинниками, наприклад, це такі фізико-хімічні фактори, як: мембранний потенціал, рН, вільні радикали; так і внутрішньоклітинні метаболіти: кальмодулін, кислі фосфоліпиди, жирні кислоти, протеїнкінази різних типів; також відбувається регуляція за допомогою гормонів: простагландинів, окситоцину, брадикінінів, вазопресину, глюкагону, стероїдних гормонів. Показано, що деякі захворювання серцево-судинної системи пов'язані з генетичними дефектами Ca^{2+} -помпи ПМ. Але не зважаючи на широко планову інформацію, отриману на сьогодні, на жаль, не існує специфічного, афінного, низькомолекулярного інгібітора Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ. Використання такого інгібітора дозволило б у повній мірі охарактеризувати роль помпи ПМ у ГМК у підтриманні концентрації Ca^{2+} або її участі у формуванні сигнальних каскадів та взаємодії з сигнальними білками, а також роль у формуванні патологічних станів.

1.3. Інші Mg^{2+} -залежні АТР-гідролазні системи плазматичної мембрани та саркоплазматичного ретикулуру гладеньком'язових клітин.

1.3.1. 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 [10, 34, 87, 110, 340].

Найбільшою є α -субодиниця з молекулярною масою 100-113 кДа, вона 10 разів перетинає ліпідний матрикс мембрани та несе на собі каталітичний центр, центри зв'язування Na^+ та K^+ , інгібіторів. β -Субодиниця є глікопротеїном з молекулярною масою 50-60 кДа (без вуглеводного ланцюга), який забезпечує правильну орієнтацію Na^+, K^+ -АТРази в мембрані, супроводжуючи її транспорт з ЕПР до ПМ [34, 87, 158, 340]. Вона перетинає мембрану 1 раз і її N-кінець розташований у цитоплазмі. Ця субодиниця забезпечує тонку регуляцію каталітичних властивостей ензиму, важлива для забезпечення гідролізу АТР, іонного транспорту, зв'язування інгібіторів, таких як уабаїн. За відсутності контакту з β -субодиницею, зона якого локалізована поряд із 7- та 8-им трансмембранними сегментами, α -субодиниця нездатна здійснювати транспорт іонів [110]. В очищених препаратах ензиму α - та β -субодиниці присутні в еквімолярному співвідношенні [86, 247]. Ідентифікована також найменша - третя γ -субодиниця (молекулярна маса 7-11 кДа). Це невеликий білок, який належить до групи білків FXYD. На цей час виявлено декілька ізоформ γ -субодиниці. γ -Субодиниця регулює активність натрієвої

помпи у тканиноспецифічний спосіб, знижуючи або підвищуючи її [78, 95, 438, 482].

Поліпептидний ланцюг α -субодиниці Na^+, K^+ -АТРази складається з 10 трансмембранних α -спіральных фрагментів, N- та С-кінцеві фрагменти ланцюгу розташовані в цитозолі (рис. 1.6). Виділяють три функціональні домени в молекулі α -субодиниці: А-домен (активаційний), Р-домен (фосфориляційний) та N-домен (нуклеотидзв'язуючий або нуклеотидний). В цитоплазмі знаходиться більша частина амінокислотних залишків ланцюгу, яка утворює великий цитоплазматичний домен. На зовнішній частині β -субодиниці утворюються три дисульфідні зв'язки та знаходяться три ділянки N-глікозилування, до яких прикріплені розгалужені вуглеводні фрагменти [86, 87].

У клітинах ссавців експресуються чотири ізоформи α -субодиниці ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ та $\alpha 4$) та три ізоформи β -субодиниці ($\beta 1$, $\beta 2$ та $\beta 3$) Na^+, K^+ -АТРази [110, 351, 419]. Ці субодиниці можуть поєднуватись в $\alpha\beta$ -димер у різних сполученнях. Ізоферменти, які при цьому утворюються, характеризуються особливостями кінетичних властивостей і по-різному розподілені між тканинами чи в одній тканині в процесі онтогенезу [34, 86, 87, 365, 438]. Ізоформи відрізняються між собою за чутливістю до кардіоглікозидів: наприклад, $\alpha 1$ -субодиниця, що експресується в нирках, є нечутливою до дії убаїну, $\alpha 2$ - та $\alpha 3$ -субодиниці з нервових та м'язових клітин, навпаки, є дуже чутливими до даного інгібітору. Встановлено, що ізоформа $\alpha 1$ щура є мало чутливою до убаїну, тоді як інші ізоформи є високочутливими (константа дисоціації K_d убаїну для $\alpha 1$ становить 48 тис. нМ, а для $\alpha 2$, $\alpha 3$ та $\alpha 4$, відповідно 115, 1,6 та 312 нМ) [110, 339].

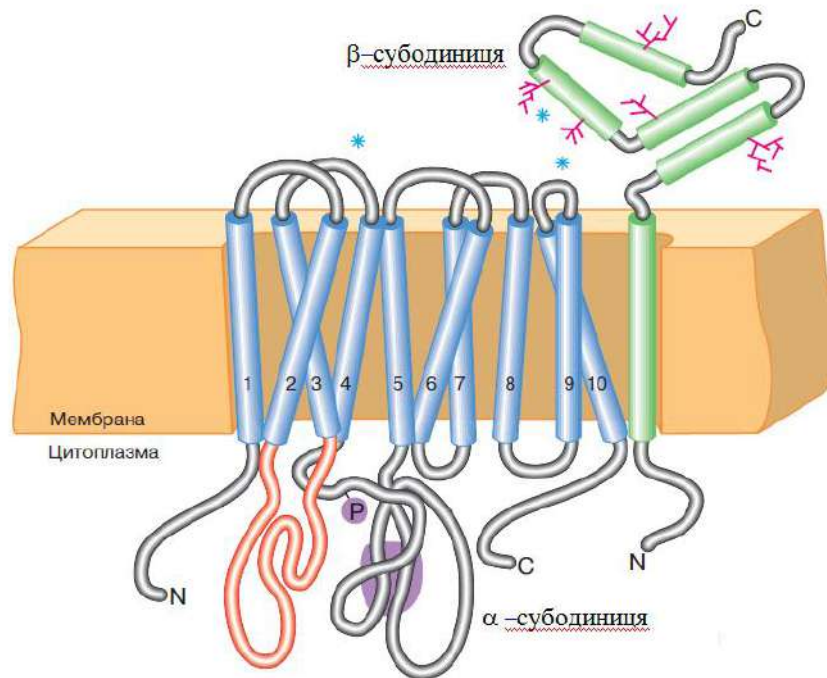


Рис. 1.6. Схема розташування Na^+, K^+ -АТРази у клітинній мембрані [87].

Ізоформи також різняться за спорідненістю до АТР, Na^+ , чутливістю до інгібування іонами Ca^{2+} , стійкістю до дії оксидантів, радикалів, ендогенних протеїназ, а також механізмами регуляції їх біосинтезу та клітинної активності [34, 51]. Чисельні дані вказують на те, що Na^+, K^+ -АТРаза являє собою олігомер, скоріш за все асиметричний тетрамер, який складається з чотирьох $\alpha\beta$ -протомерів з від'ємними та позитивними кооперативними взаємодіями між протомерами [10, 34, 86, 194, 340].

Отже, Na^+, K^+ -АТРаза має складну структурну організацію в мембрані, яка безпосередньо пов'язана з особливостями функціонування цього ензиму в мембранах клітин організму.

Na^+, K^+ -АТРаза відноситься до АТРаз Р-типу (P_2 -підтипу АТРаз) – сімейству ензимів, які фосфорилуються протягом транспортного процесу γ -фосфатною групою АТР по залишку аспарагінової кислоти [86, 314, 438]. Іони магнію, котрі діють як кофактор, необхідні для роботи Na^+, K^+ -АТРази. Вони утворюють комплекс MgATP^{2-} , який є субстратом АТР-гідролазної реакції [12,

95]. Окрім того, Mg^{2+} зв'язується з регуляторним центром АТРази [95]. Визначена для Na^+,K^+ -АТРази ГМК міометрія константа активації іонами Mg (K_{Mg}) становить 0,5 мМ. У високих (десятки мМ) концентраціях Mg^{2+} виявляє інгібувальну дію [795]. Na^+,K^+ -АТРаза гідролізує АТР в широкому діапазоні концентрацій: від 1-2 мкМ до 2-3 мМ [87]. Є дані, що Na^+,K^+ -АТРаза високо специфічна для АТР і використання СТР забезпечує тільки 15 % активності [60, 314]. 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 [87].

Активність Na^+,K^+ -АТРази максимально проявляється за умов одночасної присутності іонів Na і K , при цьому потреба у Na^+ строго специфічна, в той час як K^+ може бути замінений іншими катіонами: $Rb^+ > Cs^+ > NH_4^+ > Li^+ > Na^+ > H^+$ [82, 95, 304, 438]. Активність Na^+,K^+ -АТРази в спокої складає лише декілька процентів від максимально можливої, так як вона лімітується внутрішньоклітинною концентрацією іонів Na [95]. В присутності тільки одного Na^+ або K^+ швидкість гідролізу АТР Na^+,K^+ -АТРазою дуже низька. Кінетичного аналізу процесу активації Na^+,K^+ -АТРази свідчить на користь існування двох різних центрів зв'язування для Na^+ та K^+ , а для максимальної активації Na^+,K^+ -АТРази потрібно оптимальне співвідношення $[Na^+]/[K^+]$, при якому ензим насичений обома катіонами [12, 77, 95].

Гідролізуючи АТР, щоб забезпечити енергією активний транспорт іонів, Na^+,K^+ -АТРаза здійснює складну багатостадійну реакцію, в котрій приймають участь іони натрію, калію і магнію, а також АТР. Na^+,K^+ -АТРаза може перебувати у двох основних конформаційних станах E_1 та E_2 . В конформації E_1 ензим має високу спорідненість до АТР та іонів Na .

Основні стадії реакційного циклу Na^+,K^+ -АТРази можна описати наступним чином (рис. 1.7) [11].

1. Коли ензим знаходиться у стані E_1 він взаємодіє з іонами Na та ATP і в результаті утворюється E_1-P .

2. Фосфорильований білок переходить у стан, коли іони Na не доступні для обміну (оклюдовані).

3. Ензим переходить із конформації E_1 в конформацію E_2 , внаслідок чого іони Na переносяться через мембрану.

4. Ензим 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, вивільняючись при цьому в цитоплазму. Їх місце займає натрій. Остання стадія циклу одночасно підготовляє ензим для початку нового циклу [11, 87, 95].

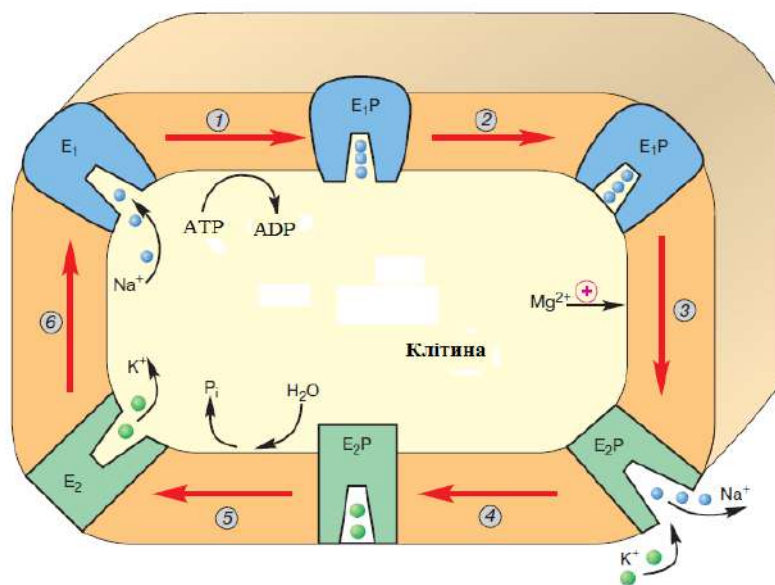


Рис. 1.7. Реакційний цикл Na^+,K^+ -АТРази ПМ [11].

Кардіоактивні стероїди, або серцеві глікозиди (похідні циклопентанпергідрофенантрону), серед яких найбільш широко поширені убаїн (строфантин-Г) і строфантин, володіють практично абсолютною селективністю як інгібітори Na^+,K^+ -АТРази [95, 121, 308]. Ще до специфічних інгібіторів Na^+,K^+ -АТРази відносять палітоксин та сингуарін [78, 86]. Кардіоглікозиди зв'язуються з білком із зовнішньої сторони клітинної

мембрани у специфічному центрі для зв'язування уабаїну. Для ефективного пригнічення спряженого транспорту Na^+ та K^+ і повного інгібування Na^+, K^+ -АТРазної активності достатньо уабаїну у концентрації 10^{-5} М [77]. Фосфорилування ензиму і перехід в конформацію Р- E_2 полегшує зв'язування кардіоглікозидів. Припускають, що вони блокують ензим в стані Р- E_2 , змінюючи конформацію цитоплазматичних доменів Na^+, K^+ -АТРази і, таким чином, унеможливають перехід $\text{E}_2 \rightarrow \text{E}_1$ [53, 95].

Ортованадат в нано- та мікромолярних концентраціях пригнічує активність Na^+, K^+ -АТРази [95]. На відміну від кардіоглікозидів він діє з цитоплазматичної сторони. Описаний ще один інгібітор ензиму, це антибіотик олігоміцин. Втім він пригнічує Na^+, K^+ -АТразу не повністю: максимальне зниження активності у присутності олігоміцину складало приблизно 20 % [95].

Na^+, K^+ -АТРаза є мішенню для двох клітинних протеїнкіназ: сАМР-залежної ПКА та Ca^{2+} , фосфоліпід-залежної протеїнкінази С. В залежності від умов досліду спостерігається як інгібування, так і активація АТРази після її фосфорилування ПКА [10, 342]. Очевидно, що фосфорилування ензиму є молекулярною основою для швидкої модуляції активності як відповідь на гормональні стимули [191].

Na^+, K^+ -АТРаза ПМ здійснює активне перенесення одновалентних іонів Na і K (співвідношення 3:1) і тим самим підтримує їх електрохімічні градієнти, які є необхідними для нормального функціонування клітини (забезпечення електричної збудливості нервової і м'язової тканин, енергозабезпечення Na^+ -залежного вторинного активного транспорту іонів Ca та протонів – $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ та $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ обміну, регуляція клітинного об'єму тощо) [812, 179, 218, 246, 279, 281, 420, 455]. У багатьох клітинах натрієвий градієнт використовується при функціонуванні різних іонообмінних транспортних систем. Підвищення концентрації внутрішньоклітинного Na^+ приводить до активації $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмінника, вбудованого у ПМ клітин різноманітних тканин, включаючи нервові клітини, а також клітини серцевого і гладенького м'язу [86]. Це може привести

до підвищення внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} , що у свою чергу викликає збільшення сили скорочення серцевого м'язу і тонуусу судин. Важливу роль в регуляції рН у серцевому м'язі, а також в епітелії нефрона і інших клітин відіграє Na^+ - H^+ -обмінник, який забезпечує обмін внутрішньоклітинного H^+ на позаклітинний Na^+ [86].

Перебіг багатьох біохімічних процесів залежить від активності цього ензиму. Шляхом білок-білкових взаємодій з месенжерними білками Na^+ , K^+ -АТРаза передає сигнали до ядра клітини [439, 527]. При зв'язуванні уабаїну та уабаїн-подібних гормонів здійснюється активація протоонкогенів, транскрипційних факторів і стимулюється синтез білків клітини. Також, за цим механізмом індукується розвиток гіпертрофії м'язової тканини серця і судин при блокуванні ензиму уабаїном. Гіпертензія, імовірно, є макроефектом гіпертрофії ГМ судин [132, 320, 527]. Встановлений зв'язок між апоптозом і активністю Na^+ , K^+ -АТРази у клітин ГМ судин: її активація стимулює розвиток апоптозу, в той час як, блокування уабаїном – його пригнічує [394]. Функціонування натрієвої помпи змінюється також і при інших патологіях, таких як порушення вмісту тиреоїдних гормонів, гіпотиреоїдизм, тиреотоксикози та цукровий діабет [148].

Отже, Na^+ , K^+ -АТРаза є надзвичайно важливим ензимом ПМ. Вона бере участь не лише у підтриманні високої концентрації K^+ та низької Na^+ в клітині, а також сприяє підтримці мембранного потенціалу клітини, забезпечує основу для взаємодії клітин (нейронів) і осмотичну регуляцію об'єму клітини.

1.3.2. Структурна організація, властивості та регуляція активності “базальної” Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани.

В ПМ ГМК показана наявність “базальної” Mg^{2+} -АТРази, питома активність якої в десятки разів перевищує активність Na^+ , K^+ -АТРази та Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази [40, 63, 77, 178, 494]. “Базальна” Mg^{2+} -АТРаза активність тестується у присутності іонів Mg і АТР, використаних у мілімолярних

концентраціях, та за відсутності в середовищі інкубації іонів Са [92, 197, 276, 384, 493, 535]. Цю активність виявлено в ПМ ГМК матки щурів, шлунка свині, бичачої аорти, вушної артерії кроля тощо [368]. “Базальна” Mg^{2+} -АТРазна активність виявлена також в ПМ цілого ряду інших тканин — в ПМ серцевого м’яза [301, 493, 535, 536], ТТ-системі скелетного м’яза [92, 143, 197], мембранах щіткової облямівки кишечника [310].

На теперішній час структурні особливості Mg^{2+} -АТРази ПМ ГМ недостатньо досліджені, хоч дослідники і виділили та очистили білок, який проявляє Mg^{2+} -АТРазну активність.

Два білки з молекулярною масою 102 кДа були виділені з ПМ грудного м’язу курки, вони виявляли одна Mg^{2+} -АТРазну активність, інша Ca^{2+} -АТРазну активність [92]. Білок з масою 50 кДа типово з’являється у фракціях, збагачених Mg^{2+} -АТРазною активністю, протягом виділення Mg^{2+} -АТРази мозку бика [276]. Також було показано, що у мембранних фракціях мозку, легень, селезінки, скелетних м’язів та ГМ був знайдений білок з молекулярною масою 85 кДа, у серці – 95 кДа, а ГМ додатково мали білкову смугу 105 кДа, якої не було в інших досліджуваних тканинах. Деглікозилування показало, що кожний білок має своєрідне ядро з однаковою молекулярною масою. Встановлено також, що будова Mg^{2+} -АТРаз з різних організмів може мати значні відмінності. Але показано існування ензиматично і структурно єдиної Mg^{2+} -АТРази в ряді тканин одного курячого організму [197].

Із використанням специфічних антитіл проти А-субодиниці V-АТРази, була показана присутність V-АТРази, що характеризується Mg^{2+} -АТРазною активністю, у фракції ПМ ГМ тканини трахеї [398]. Антитіла до N-кінцевої ділянки Mg^{2+} -АТРази мозку щура виявили імунореакційну білкову смугу з масою близько 70 кДа [384]. Був виділений білок (90 кДа) з ПМ щітинкової облямівки нирок, який також мав Mg^{2+} -АТРазну активність [497]. З мембран *Natronococcus occultus* було виділено Mg^{2+} -АТРазу (130 кДа), яка складалась з субодиниць з молекулярними масами 74 та 61 кДа, з цитоплазматичної

мембрани одноклітинного організму *Tetrahymena thermophila* виділена екто-АТРаза, маса якої становить 66 чи 69 кДа (визначена різними методами) [458].

Необхідно відмітити, що білки Mg^{2+} -АТРази були виділені з багатьох інших тканин, проте їх характеристики теж відрізняються. Mg^{2+} -АТРаза є інтегральним білком ПМ, а його молекулярна маса коливається переважно в межах 50-100 кДа. Отже, молекулярні властивості Mg^{2+} -АТРази змінюються між тканинами, або ж існує декілька різних за молекулярними характеристиками ензимів, що володіють Mg^{2+} -АТРазною активністю [276].

Встановлено, що спорідненість до Mg^{2+} є невисокою (уявна константа активації іонами Mg^{2+} K_{Mg} становить 0,2-0,9 мМ) в сарколемі серцевого м'язу, ПМ холінергічних нервових закінчень, електричного органу *Torpedo* та мозку [384, 493, 535]. Для очищеного ензиму сарколеми кардіоміоцитів щура константа активації K_{Mg} становила 2,51 мМ [536]. Mg^{2+} -АТРаза мембран щіткової облямівки кишківника щура має два сайти спорідненості ензиму до катіона-активатора: показано різні K_a іонами Mg і Ca . При високих концентраціях спостерігалась подібна спорідненість для обох катіонів $K_a = 0,35$ мМ, при низьких концентраціях для Mg^{2+} $K_a = 0,02$ мМ, а для Ca^{2+} $K_a = 0,07$ мМ [513]. Для Mg^{2+} -АТРази ПМ сарколеми міометрія шурів також показано дві константи спорідненості до Mg^{2+} – 0,15 та 1,12 мМ [348].

Розраховані величини уявних констант спорідненості до нуклеозидтрифосфату АТР (K_m) для різних типів тканин [321]: 0,33 мМ для Mg^{2+} -АТРази серця щура, для очищеного ензиму значення K_m складало 0,48 мМ [536], 0,053 мМ для Mg^{2+} -АТРази холінергічних нервових закінчень електричного органу *Torpedo* та 0,153 мМ – для ензиму мозку бика [535], для мембран еритроцитів встановлено дві уявні константи ($K_{0,5} \approx 20$ і 400 мкМ) [139, 377].

Катіонна специфічність Mg^{2+} -АТРази ПМ міометрія свиней задовольняє послідовності: $Ca^{2+} > Mg^{2+} > Co^{2+} > Cd^{2+} > Mn^{2+} \approx Zn^{2+} \approx Ni^{2+} > Sr^{2+}$, яка загалом відповідає ряду, який було одержано для Me^{2+} -залежної АТРази ПМ ГМК

трахеї [399]. На очищеному ензимі з мозку бика катіонна специфічність для АТРазної активності задовольняє наступній послідовності: $Mg^{2+} > Co^{2+} > Mn^{2+} > Ca^{2+} > Ni^{2+} > Cr^{3+} > Fe^{3+} > La^{3+} > Sr^{2+} > Zn^{2+} > Cu^{2+} > Li^{+} > Sn^{2+}$ [276].

Встановлено, що базальна Mg^{2+} -АТРаза ПМ може гідролізувати АТР, ГТР, ІТР, УТР, СТР [38, 56, 276, 536]. Також вона не є чутливою до наявності одновалентних катіонів, зокрема, Na^{+} і K^{+} [40, 493, 535]. Mg^{2+} -АТРаза ГМ трахеї стимулювалась моновалентними аніонами, такими як Cl^{-} (найкращий стимулятор), Br^{-} та I^{-} , а F^{-} був неефективним [394]. Mg^{2+} -АТРаза ПМ мозку ляща також активується аніонами в наступній послідовності: $Cl^{-} > Br^{-} > I^{-}$ [91].

Показано, що рН-залежність ензиматичної активності Mg^{2+} -АТРази в ПМ клітин міометрія свині не є типовою куполоподібною, а характеризується лінійністю у діапазоні рН 6,0-8,0 [38, 72]. Отже, Mg^{2+} -АТРаза ПМ клітин міометрія може виступати своєрідним ензиматичним рН-сенсором в ГМК: адже зменшення концентрації протонів H^{+} (перш за все у примембранних шарах) буде активувати каталітичну активність базальної Mg^{2+} -АТРази, що сприятиме підвищенню швидкості реакції Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР та активнішого продукування протонів (зниженню рН) та виведення із ГМК [38, 72]. Згідно даних інших авторів базальна Mg^{2+} -АТРаза активність має чітко виражений оптимум при фізіологічних значеннях рН – 7,5-8,5 в ПМ клітин кишківника, серця, мозку, кортексу нирок. Вищі та нижчі значення рН суттєво гальмують гідроліз АТР [276, 310, 513, 536]. Таким чином, проаналізовані нами дані не дозволяють зробити однозначних висновків, тому що властивості Mg^{2+} -АТРазної активності відрізняються між тканинами.

Доведено пригнічення Mg^{2+} -АТРази іонами Ca (10^{-5} М) в присутності кальмодуліна для міометрія щурів [369].

Mg^{2+} -АТРаза активність має дві складові: лабільну та стабільну компоненти, так як початкове високе значення швидкості гідролізу АТР Mg^{2+} -АТРазою знижується експоненціально, як функція від часу, наближуючись до постійного значення [348, 354, 368, 369].

Показано, що бенфлурон зменшує Mg^{2+} -АТРазну активність Mg^{2+} -АТРази сарколеми серця щура [219]. Продукт перекисного окислення ліпідів 4-гідроксінонілон селективно інгібує Mg^{2+} - або Ca^{2+} -активуючу екто-АТРазу синаптичних мембран мозку щура [235]. Піридин підвищував Mg^{2+} -АТРазну активність шляхом взаємодії з компонентами нейрональної мембрани та зміни мікрооточення ензиму [387]. У літературі є дані, що пропранолол пригнічує Mg^{2+} -АТРазу синапсом мозку щура, що може свідчити про можливі зміни в синаптичній передачі β -блокатором пропранололом [254].

Таким чином, активність Mg^{2+} -АТРази ПМ модулюється різними речовинами, але при цьому сполуки можуть впливати на одні тканини, і зовсім не проявляти своєї дії на інших тканинах. Це може свідчити про те, що функції Mg^{2+} -АТРази в різних тканинах можуть відрізнятися. Всі вищенаведені речовини не проявляють селективності дії. Отже є потреба у пошуку селективного інгібітора базальної Mg^{2+} -АТРази ПМ.

На теперішній час в літературі не достатньо інформації про функціональну роль Mg^{2+} -АТРази ПМ: мало даних стосовно її чутливості до дії фізіологічно активних і фармакологічних речовин, невідомий специфічний інгібітор даного ензиму. Активність Mg^{2+} -АТРази пов'язують з регуляцією пуринергічного сигналу в м'язових клітинах та синаптичних щілинах нервових закінчень [165, 206, 493], а також з транспортом протонів у клітинах печінки, меланоми, трахеї [144, 346, 398]. Існує думка, що у ГМК міометрія Mg^{2+} -АТРаза виконує роль рН-чутливого ензиматичного сенсора і, таким чином, є фактором контролю концентрації протонів H^+ у міоплазмі [62, 67]. Отже, Mg^{2+} -АТРаза ПМ ГМК міометрія за умов ендорієнтації може брати участь в контролі концентрації H^+ в міоплазмі, а також Ca^{2+} - H^+ обміні мітохондрій, запобігаючи кальцієвому перенавантаженню останніх за нормальних фізіологічних умов [62, 67, 69]. Якщо базальна Mg^{2+} -АТРази розташована назовні ПМ, то вона може брати участь у підтримці рН міжклітинного простору [107].

У літературі є дані, що Mg^{2+} -АТРаза може брати участь у метаболізмі нуклеотидів на клітинній поверхні та включатися в регуляцію доступності АТР

до пуринергічних рецепторів у ГМ [348, 369]. Подібна гіпотеза запропонована для Mg^{2+} -АТРази скелетного м'язу та нервових клітин [322]. Отже, базальна Mg^{2+} -АТРаза може включатися в цикл скорочення розслаблення м'язу, так як позаклітинний АТР в скелетних м'язах через P_2 -пуринорецептори регулює рівень внутрішньоклітинного вільного Ca^{2+} [197].

Mg^{2+} -АТРаза може мати асоціацію з H^+ -помпою ПМ ГМ трахеї [398, 399], в клітинах меланоми, гепатоцитах, одноклітинних організмах *Leishmania* та *Plasmodium falciparum* [144, 221, 222, 352, 381]. Також Mg^{2+} -АТРаза, разом із транспортом H^+ , може впливати на мобілізацію Ca^{2+} в гепатоцитах [328].

Показано, що Mg^{2+} -АТРаза мембран еритроцитів може регулювати фосфоліпідний розподіл в мембрані функціонуючи, як фосфоліпаза [268]. Mg^{2+} -АТРаза може контролювати форму червоних кров'яних тілець, шляхом транслокації фосфатидилсерину та фосфатидилетаноламіну із поверхневого шару ліпідів мембрани у внутрішній [131, 139, 377].

Отже, як свідчать чисельні літературні дані, "базальна" Mg^{2+} -АТРаза активність ПМ притаманна клітинам різного типу тканин і можливо є проявом кількох відмінних ензимів, що мають різне фізіологічне значення. Необхідно відмітити, що незважаючи на широкий спектр досліджень Mg^{2+} -залежної АТРази активності є досить суттєві розбіжності у визначенні активності ензиму, каталітичних та кінетичних властивостей Mg^{2+} -АТРази. Тому для подальшого тлумачення функціональної ролі базальної Mg^{2+} -АТРази необхідним є вивчення біохімічних особливостей Mg^{2+} -залежної АТР-гідролазної активності ПМ, а також пошук селективних ефекторів.

1.3.3. Структурна організація, властивості та регуляція активності Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази саркоплазматичного ретикулума.

Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРаза СР відноситься до великого сімейства іон транспортуючих АТРаз Р-типу (або Е1- Е2-типу), до якого належать також Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРаза ПМ, Na^+, K^+ -АТРаза, H^+, K^+ -АТРаза слизової оболонки

шлунка, а також деякі АТРази безхребетних, грибів, рослин і бактерій. Цей ензим транспортує іони Са з цитоплазми до СР проти їх електрохімічного градієнта. Са²⁺, Mg²⁺-АТРаза СР є високомолекулярним білком з молекулярною масою приблизно 115 кДа [33, 81, 314, 416]. Дані літератури свідчать про те, що СР є одним з найбільших клітинних депо кальцію [236]. Так як внутрішній простір СР налічує велику кількість кальційзв'язувальних білків (кальсеквестрин та кальретикулін), сумарна концентрація катіона може перевищити 1 мМ. Поряд з тим його вільна концентрація лежить у діапазоні 100-700 мкМ [123, 138, 162, 413, 500].

Са²⁺, Mg²⁺-АТРаза СР являє собою один поліпептидний ланцюг, який пронизує мембрану 11-ма α-спіральними ділянками, більша частина яких з'єднана зовні короткими поліпептидними зв'язками, окрім двох довгих гідрофільних петель на стороні цитоплазми (рис. 1.8) [33].

Більш коротка петля розташована поміж α-спіралями М2 і М3, більш довга – між α-спіралями М4 і М5. Довга петля містить АТР-зв'язуючий участок, який включає залишок аспарагінової кислоти, до якого приєднується фосфат. Зв'язування іонів Са відбувається на фрагменті, що утворюється малою петлею (між α-спіралями М2 і М3), можливо з участю амінокислотних залишків, які належать до спіралей М1 і М4 [33, 79, 332, 472]. Виявлено декілька ізоформ Са²⁺, Mg²⁺-АТРази СР SERCA. В ГМК переважно експресується SERCA2b та SERCA3 ізоформи ензиму [303, 526]. Ці ізоформи ензиму зв'язані у мембрані СР з регуляторним білком фосфоламбаном, який в нормі пригнічує активність Са²⁺, Mg²⁺-АТРази.

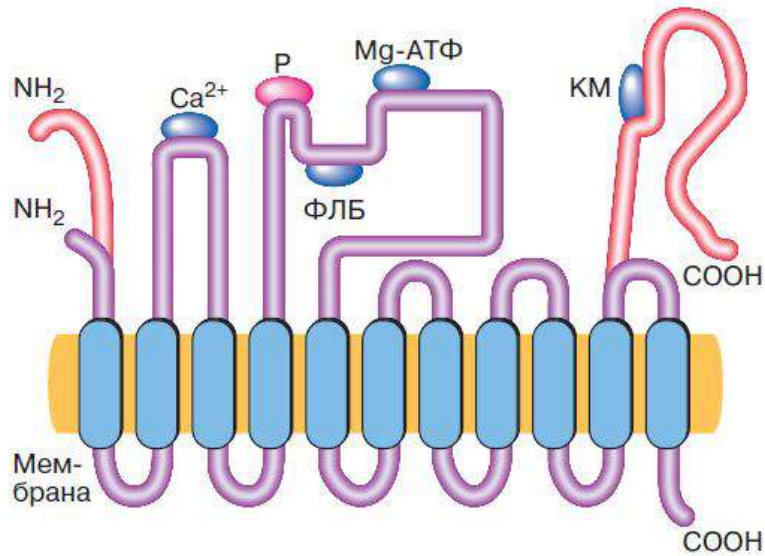


Рис. 1.8. Схема будови $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР [33].

Фіалкова лінія – поліпептидний ланцюг $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР, червона – ділянки ланцюга $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази цитоплазматичної мембрани. Блакитні циліндри – α -спіральні ділянки, які принизують мембрану, NH_2 – N-кінець поліпептидного ланцюга, COOH – C-кінець. Сині овали позначають ділянки зв'язування: Ca^{2+} - іонів кальцію, Mg-ATP – молекули АТР, ФЛБ – фосфоламбана, КМ – кальмодуліна, Р – ділянка фосфорилування.

Механізм дії $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР пов'язаний з переходом ензиму з одного стану Е1 в Е2. В Е1 конформації АТРаза має два високоафінних сайти зв'язування Ca^{2+} , котрі знаходяться на цитоплазматичному боці.

Зусиллями багатьох вчених була розшифрована послідовність стадій при роботі $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР (рис. 1.9):

- 1) зв'язування 2-ох іонів Са на поверхні АТРази, яка повернена у цитоплазму;
- 2) зв'язування на тій же поверхні молекули АТР;
- 3) фосфорилування білку (утворення фосфо-ензиму) і вивільнення АDP;
- 4) вивільнення іонів Са з поверхні АТРази, зв'язування іонів Mg;
- 5) гідроліз фосфатного зв'язку і вивільнення іонів Mg;
- 6) перехід молекули ензиму у вихідний стан.

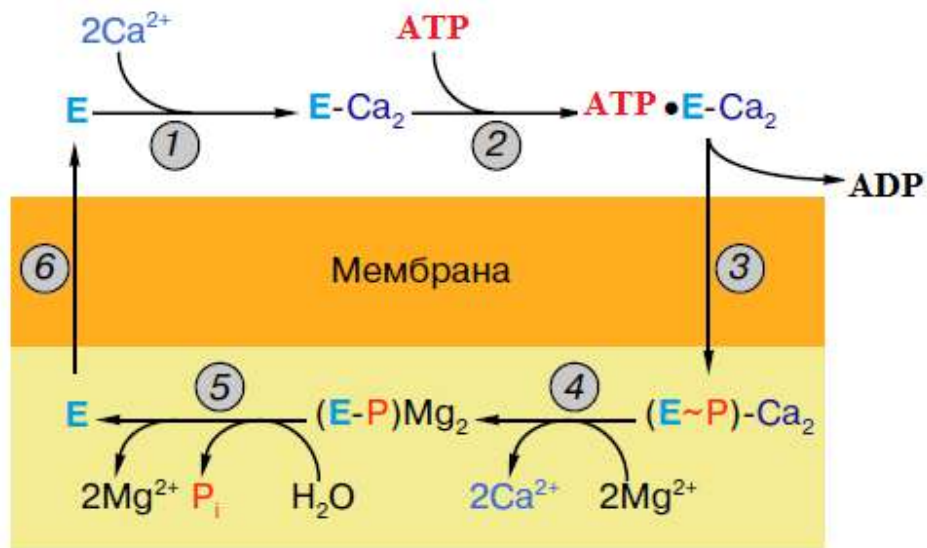


Рис. 1.9. Послідовність стадій роботи $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР [33].

1 – зв'язування іонів Ca, 2 – зв'язування АТР, 3 – утворення фосфо-ензиму, 4 – вивільнення іонів Ca, 5 – гідроліз фосфо-ензиму, 6 – повернення ензиму у вихідний стан.

Хоч субстратом АТРазної реакції є MgATP^{2-} , проте Mg^{2+} і АТР можуть зв'язуватись і дисоціювати з каталітичного сайту незалежно або як комплекс MgATP^{2-} [33].

Показано, що гідроліз АТР і транспорт Ca^{2+} в ензимі спряжені один з одним. Втім, є дані, за відсутності MgATP^{2-} відбувається транспорт іонів Ca до СР, хоча швидкість транспорту утричі менша за швидкість транспорту в присутності MgATP [465], а інкубація $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР з неорганічним фосфатом P_i за відсутності цитоплазматичного Ca^{2+} та в присутності Mg^{2+} призводить до фосфорилювання ензиму, рівень якого знижується із зростанням рН [326]. Отже, каталітична та транспортна активності локалізовані в різних доменах $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР [77].

Катіонна специфічність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР відносно Mg^{2+} відповідає ряду: $\text{Mg}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Co}^{2+} \gg \text{Ni}^{2+}$, при використанні Zn^{2+} та Cu^{2+} акумуляція Ca^{2+} не спостерігалась.

Активність кальцієвої АТРази СР серцевого м'язу регулюється особливим білком – фосфоламбаном, який зв'язує ділянку пептидного ланцюга АТРази

неподалік від місця фосфорилування (рис. 1.8) і гальмує роботу ензима за рахунок зменшення спорідненості ділянок зв'язування Ca^{2+} до цього іона. Фосфоламбан – олігомерний комплекс, який складається з п'яти однакових поліпептидних ланцюгів з молекулярною масою 5 кДа кожна. Фосфоламбан включає в себе гідрофільний N-кінцевий домен та гідрофобний C-кінцевий домен, котрий формує трансмембранну α -спіраль. За необхідності внутрішньоклітинні регуляторні системи відчепляють фосфоламбан від АТРази, і її робота відновлюється. Це відбувається за рахунок фосфорилування фосфоламбана протеїнкіназами. Фосфорильований фосфоламбан не може зв'язуватися з $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазою і знижувати її активність [4, 33, 79, 314, 332, 333, 357].

Показано також, що активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ГМ інгібується Ca^{2+} -зв'язуючим білком кальретикуліном [100, 228, 333, 516]. Припускають, що зниження транспортної функції ензиму може відбуватися в результаті його прямої взаємодії з кальретикуліном [100].

Специфічними інгібіторами $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР є терпеновий лактон Тг та мікотоксин циклопіазонієва кислота [137, 278, 303, 430, 444, 480].

Перший та найефективніший на сьогодні інгібітор кальцієвої помпи СР – промотор пухлинного росту нефорболової природи терпеновий лактон тапсигаргін, похідне бензогідрохінона, одержаний з кореневища зонтичної рослини *Tarpsia garganica* [184], ефективно інгібує Mg^{2+} , АТР-залежну кальцієву помпу СР клітин різних тканин [75, 145, 164, 234, 278, 306, 347]. Наприкінці 80-х років було показано, що тапсигаргін сприяє підвищенню цитоплазматичної концентрації Ca^{2+} [481] та спустошенню внутрішньоклітинних Ca^{2+} -пулів [289]. Тапсигаргін зв'язується з трансмембранним сегментом М3. В основі інгібуючої дії Тг лежить його міцне зв'язування із вільною від іонів Са формою транспортної системи ретикулуму (конформація E_2), в результаті чого утворюється каталітично

неактивна конформація помпи — блокується і зв'язування Ca^{2+} і фосфорилювання [234, 283, 306, 521].

Встановлено, що мікотоксин циклопіазонієва кислота – один із токсичних метаболітів, що продукуються грибами *Penicillium cyclospium* і *Aspergillus flavus*, - стехіометрично пригнічує Mg^{2+} , АТР-залежну кальцієву помпу СР [66, 159, 209, 283, 367]. Циклопіазонієва кислота інгібує конформаційні переходи ензима $\text{E1} \leftrightarrow \text{E2}$, що відповідає інгібуванню конформаційних змін, пов'язаних з гідролізом АТР та транспортом Ca^{2+} . Було показано, що циклопіазонієва кислота є досить потужним інгібітором акумуляції Ca^{2+} та АТР-азної активності СР клітин скелетного м'яза щурів, що і є основою токсичної дії циклопіазонієвої кислоти [252]. Обидва інгібітори мають високу спорідненість до ензима, так як константи інгібування K_i для Ca^{2+} -помпи СР ГМК матки становлять 2 нМ та 0,3 мкМ для Тg та циклопіазонієвої кислоти відповідно [7, 68].

Отже, Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза СР забезпечує підтримання концентрації іонів Са в клітині на фізіологічно низькому рівні.

1.3.4. Узагальнення до підрозділу 1.3.

Отже, на теперішній час в літературі накопичені змістовні експериментальні результати щодо структурної організації, властивостей та регуляції активності Na^+ , K^+ -АТРази ПМ, Mg^{2+} -АТРази ПМ та Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази СР.

Проте, для подальшого тлумачення функціональної ролі описаних АТРаз, в гладеньком'язових клітинах зокрема, необхідним є використання специфічних інгібіторів ензимів. Спрямований синтез і вивчення властивостей ефекторів, які здатні проникати через ПМ та оборотно з високою спорідненістю і селективністю змінювати ензиматичну чи транспортну активність окремих внутрішньоклітинних мембранозв'язаних і цитоплазматичних білків – одне з найважливіших завдань сучасної біологічної, біофізичної та біоорганічної хімії.

Справді, створення нових високоефективних селективних інгібіторів та активаторів є вкрай необхідним, зокрема, для подальшого дослідження іонних, молекулярних та мембранних механізмів внутрішньоклітинної сигналізації. У галузі біохімії та біофізики м'язів це істотно для з'ясування закономірностей та механізмів такого унікального біологічного феномену, як електро- та фармакомеханічне спряження, вивчення ролі Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , а також протонів H^+ у його забезпеченні. В практичному ж аспекті такі розробки є основою для пошуку нових фармакологічних засобів, здатних ефективно модифікувати функціональну активність конкретних білків у випадку її порушення за патологічних станів.

У контексті вищезазначеного в останній час все більше уваги біохіміків, біофізиків та біотехнологів приділяється супрамолекулярним сполукам каліксаренам – циклічним олігомерам фенолів, які мають широкий спектр біологічної активності. Наступний розділ “огляду літератури” присвячений саме цьому питанню.

1.4. Каліксарени та їхня біологічна активність.

1.4.1. Структура та синтез каліксаренів.

Каліксарени – макроциклічні сполуки, що мають чашоподібну будову, які отримують циклоконденсацією паразаміщених фенолів з формальдегідом [345]. Вони побудовані з фенольних фрагментів, які сполучені метиленовими містками [37, 149, 385].

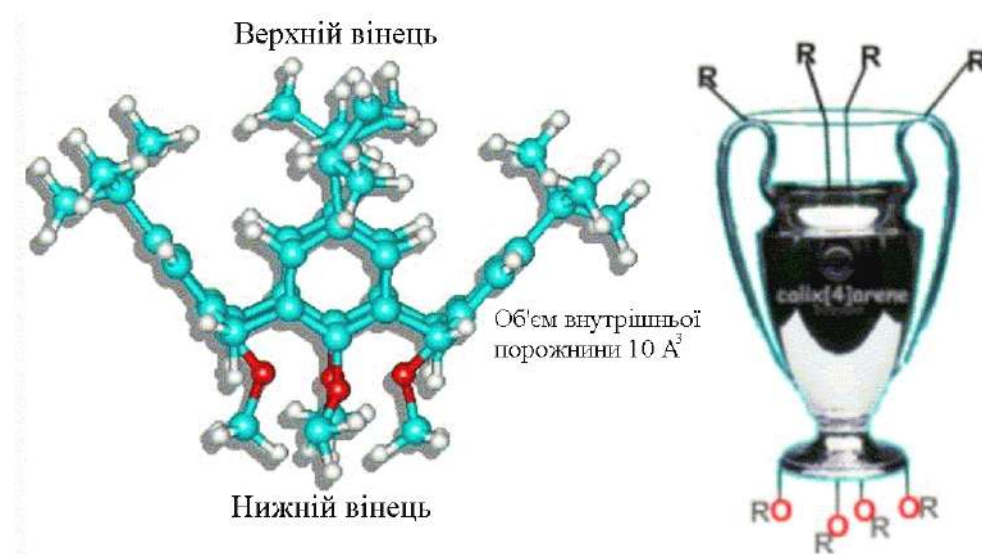


Рис. 1.10. Схематична структура калікс[4]аренів [265].

Термін –"калікс[n]арен" був введений в літературу Давидом Гютше (David Gutsche) [149, 265]. "Калікс" походить від латинського "чаша, кубок" – говорить про специфічну, чашеподібну форму молекули (рис. 1.10) 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 (рис. 1.11). Так можна отримати каліксарени з різною кількістю фенольних фрагментів у макроциклі.

Згодом були розроблені методи синтезу калікс[4,6,8]аренів з високим виходом (до 50-80 %), із застосуванням темплатного ефекту, що забезпечує відповідність між розмірами катіона лужного металу, який застосовується, та розмірами утвореного макроциклу. Результат реакції циклізації, таким чином, залежить від типу використаного лужного металу та температури перебігу реакції [263]. На даний час доступні методи синтезу похідних каліксаренів з різними містковими групами (C, S, Se) та різною кількістю від 3 до 20 структурних блоків (аренових фрагментів) [463].

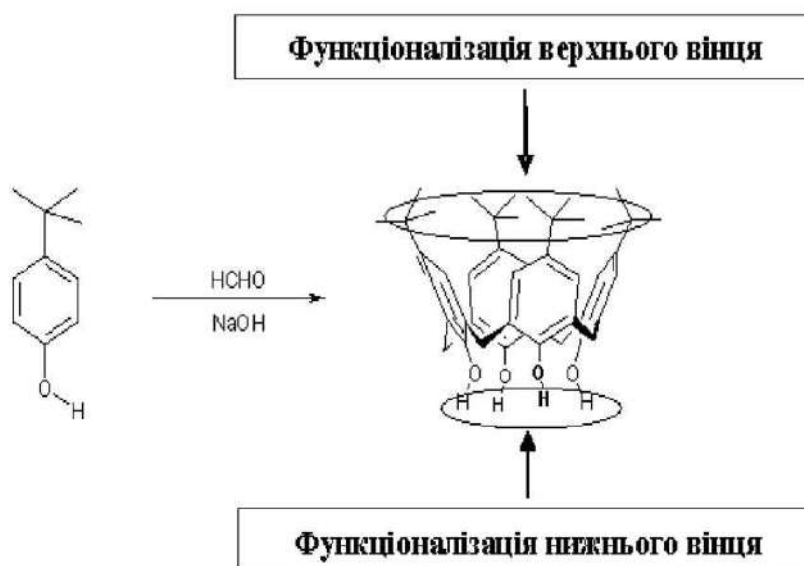


Рис.1.11. Схема синтезу калікс[4]аренів [64].

В подальшому, за допомогою простих, добре розроблених методів органічної хімії, каліксарени можна функціоналізувати різними хімічними групами. Зокрема, гідроксильні групи нижнього вінця безпосередньо конвертуються в етери та естери. Часто присутні на верхньому вінці каліксаренів у процесі їх синтезу трет-бутильні групи заміщуються іншими групами після обробки $AlCl_3$ [263, 266]. Проте, незважаючи на таку велику різноманітність похідних каліксаренів, найбільше застосування отримали

каліксаренові й тіакаліксаренові платформи з 4, 6, і в деяких випадках з 8 ареновими фрагментами [64].

1.4.2. Фізико-хімічні властивості каліксаренів

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. 1.12) [263]. Відмінність конформацій полягає у розміщенні ароматичних фрагментів відносно головної площини макроциклу, яка умовно проходить по метиленовим зв'язкам[266].

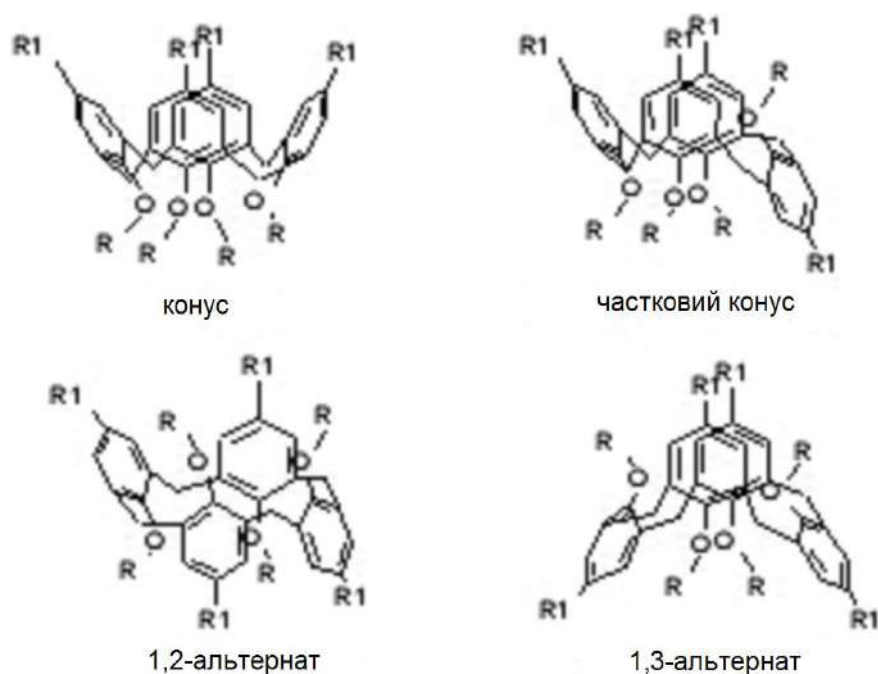


Рис. 1.12. Основні конформації калікс[4]аренів [263].

Каліксарени з більшими макроциклами можуть мати більшу кількість можливих конформацій відповідно до кількості фенольних фрагментів. У розчині каліксарени знаходяться головним чином в конформації конус (рис. 1.13) і містять внутрішньомолекулярні високовпорядковані ліпофільні порожнини, утворені ароматичними фрагментами макроциклічного кістяка, що показано методом ЯМР. Подібна конформація досить жорстка, і в основному стабілізується внутрішньомолекулярними водневими зв'язками

між фенольними групами нижнього вінця [266, 267].

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 [50], виникає із особливостей будови каліксаренів.

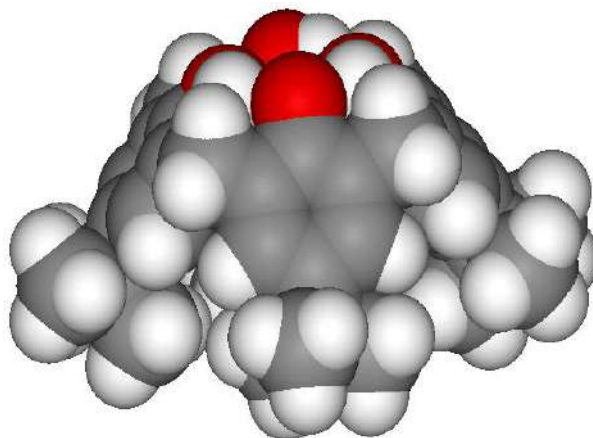


Рис. 1.13. Конформація конус у 3D вигляді [263].

Супрамолекулярна комплементарність, тобто комплементарність розмірів, форм та зарядів молекул “гостя” та “господаря”, а також різні нековалентні взаємодії, відіграють істотну роль у створенні такого комплексу [200]. 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 [200]. Каліксарени є унікальною макроциклічною платформою для створення нового покоління каталізаторів, які містять декілька активних центрів і моделюють ензими [180, 475].

Зараз вчені все більше уваги звертають на створення нових методів регіо- та стереоселективного введення функціональних груп на каліксаренову платформу, використання цих підходів для синтезу внутрішньохіральних каліксаренів та пошуку серед синтезованих сполук рецепторів іонів та нейтральних молекул, біологічно активних речовин, здатних впливати на

властивості та функціонування ензимів.

1.4.3. Прояви біологічної активності каліксаренів

На сьогодні описано багато результатів дослідження дії каліксаренів на біохімічні процеси. Нижче наведено експериментальні дані щодо впливу зазначених супрамолекулярних сполук на перебіг біохімічних перетворень.

Така особливість каліксаренів, як здатність зв'язувати нейтральні молекули, катіони, аніони, відкриває широкі можливості для їх використання при вивченні біохімічних процесів та їх регуляції. Попереднє фіксування кількох 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 [50, 181, 248, 356, 424].

Перш за все акцентуємо увагу на ефектах, пов'язаних з інгібувальною дією каліксаренів на ензиматичну активність.

В останні роки значна увага дослідників зосереджена на використанні каліксаренів як інгібіторів АТР-гідролазних систем. Наведемо деякі приклади.

У Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАНУ за допомогою методу протокової цитофлуориметрії та DiOC₆(3) 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 [39]. В умовах штучної деполаризації 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 [309]. 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 [83].

Описані ефекти каліксаренів свідчать про можливість їх використання для створення селективних інгібіторів (чи активаторів) активності АТР-гідролазних систем.

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 [309].

Дуже сучасним напрямком у медичній хімії та фармакології є синтез нових біоактивних сполук на основі інформації про структуру біомішеней. Застосувавши 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. У контексті зазначеного на сьогодні описано багато експериментальних досліджень різних рецепторів для розпізнавання поверхні певних білків.

Наприклад, розробка одного з таких рецепторів ґрунтується на приєднанні чотирьох сконструйованих пептидних петель на центральній каліксареновій платформі. За допомогою гель фільтрації та афінної хроматографії показано міцне зв'язування одним з таких рецепторів цитохрому *c* [270]. Взаємодія імовірно відбувається біля гемової групи білка, що містить кілька заряджених лізинових залишків, подібно до його взаємодії з цитохром *c* оксидазою та цитохром *c* пероксидазою, адже показана їх конкуренція за сайти зв'язування та здатність каліксарену витіснити ключовий продукт апоптозу Араф-1 з відповідного комплексу з цитохромом *c*. Таке зв'язування з каліксареном аналогічно до цитохром *c* пероксидази порушує наближення відновлювальних агентів до гемової групи та на порядок зменшує швидкість реакції відновлення трьохвалентного заліза цитохрому *c* до двовалентного аскорбат-іоном. Виявлена взаємодія залежить від замісників на нижньому вінці каліксарену, що можна пояснити різною конформацією по різному модифікованих рецепторів. Важливість координованого розміщення чотирьох пептидних петель на каліксареновій платформі була продемонстрована мінімальним впливом навіть у перевищених концентраціях окремої петлі на відновлення цитохрому *c* аскорбатом [337, 519]. Показано також, що цитохром *c* здатний зв'язувати карбоксильні похідні калікс[6]аренів та калікс[8]аренів. При цьому цитохром *c* був стабільний і демонстрував пероксидазну активність у хлороформі, а калікс[6]арен також виявляв селективність і до інших збагачених лізином білків [395, 396].

Синтезовано каліксарен з чотирма пептидними петлями розміщеними навколо калікс[4]аренового ядра, який зв'язується з цитохромом *c* і є ефективним інгібітором ензиму α -хімотрипсину (на 90 % зменшується швидкість гідролізу хромогенного субстрату N-бензоїлтірозин-п-нітроаніліду α -хімотрипсином за його наявності). Водночас цей каліксарен не впливав на активність іншої протеази – еластази, що є проявом його селективності [408]. Детальний кінетичний аналіз дав змогу з'ясувати, що ця сполука є конкурентним інгібітором і відбувається так зване повільне інгібування подібно

до декількох природних інгібіторів протеїнази. Спочатку інгібітор сполучається з ензимом, який не втрачає при цьому своєї активності. Потім відбувається повільна ізомеризація білка і він стає неактивним. Конкуrentне інгібування свідчить на користь припущення щодо зв'язування рецептора з активним центром ензиму. Несподіваною виявилась здатність каліксарену витіснити соєвий інгібітор трипсину з комплексу α -хімотрипсин-інгібітор та утворювати з α -хімотрипсином більш стійкий продукт. Це вказує на зв'язування до спільного регіону біля щілини активного центра. При цьому пептидні зв'язки каліксаренового кон'югату є хімічно-стійкими до α -хімотрипсину і не гідролізуються за його наявності, тобто прямий контакт з активним центром відсутній [408].

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 такого комплексу становить 41,6 мкМ. Утворення комплексу каліксарен-сироватковий альбумін людини пояснюють гідрофобною взаємодією ароматичних кілець макроциклу з відповідними фрагментами амінокислот (можливо аспарагіну й глутаміну) та координацією катіоном гадолінію. Завдяки високій водорозчинності та стійкості каліксареновий металокомплекс запропоновано використовувати як контрастний агент у магнітно-резонансній томографії [119]. За допомогою різних оптичних методів було продемонстровано комплексоутворення сульфonatoкаліксаренів з БСА. Виявлено один афінний та два менш афінні сайти зв'язування з сульфonatoкалікс[4]ареном та сітко утворювальну взаємодію на поверхні тонкої плівки осаду БСА, що утворює по суті планарну систему [364]. Подібними методами показано, що тверді ліпідні наночастинки, утворені амфіфільними калікс[4]аренами, також можуть взаємодіяти з сироватковим альбуміном, який формує захисний шар на поверхні каліксаренових наночастинок товщиною до 17 нм. Відсутність агрегації твердих ліпідних наночастинок навіть за високих концентрацій БСА відкриває перспективи їх застосування як інтравенозних транспортерів [236].

Описана серія синтезованих калікс[4]арен похідних сполук, здатних приєднуватись до трипетлевого регіону тромбоцитарного фактора росту. Досліджений вплив різних модифікацій хімічними групами каліксаренової основи на спорідненість цього фактора до відповідних рецепторів та на клітинну відповідь. Ці сполуки розглядають як потенційні антагоністи тромбоцитарного фактора росту та ефектів його дії в організмі [537].

Синтезований калікс[8]ареновий рецептор для розпізнавання основних амінокислот на поверхні триптази. Просторове розміщення та розподіл негативних зарядів мультифункціонального рецептора комплементарні до активного сайту ензиму, тому відбувається його зв'язування з білком, що перешкоджає доступності субстрату до ензиму. Кінетичний аналіз інгібування рекомбінантної триптази легень показав залежне від часу конкурентне інгібування з відповідною константою у наномолярному діапазоні [362].

У літературі описані також каліксарени, які є потенційними інгібіторами І-лізиноксидази, хімотрипсину [407], холінестерази [464], лужної фосфатази [182], триптази [362], трансглутамінази [237]. 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 [443].

Інгібування L-лізил оксидази парасульфonatoкалікс[6]ареном було запатентовано як спосіб лікування та заживлення шкіри, адже цей ензим відповідає за створення ковалентних зв'язків між макромолекулами міжклітинного матриксу, такі сіткоподібні утворення є важливим фактором у разі фібролітичних захворюваннях. Інгібування ензиму пояснили автори взаємодією латеральних ланцюгів основних амінокислот активного центра та сульфонатних груп каліксарену [412].

Калікс[4]арени, які містять одну або дві групи метиленбісфосфонової кислоти, інгібують дію лужної фосфатази кишківника телят [50]. Автори досліджували вплив каліксарен-біс-фосфонових кислот, а також їх немакроциклічних аналогів, на процес гідролізу п-нітрофенилфосфату під дією

лужної фосфатази. Найефективнішим інгібітором виявився каліксарен, який містить два фрагменти метиленбісфосфонової кислоти. За ефективністю інгібування цей каліксарен значно перевищує аналогічний каліксарен з одним залишком метиленбісфосфонової кислоти, метиленбісфосфонову і п-гідроксифенілбісфосфонову кислоти, що використані як модельні сполуки. Високу ефективність пояснюють здатністю обох метиленбісфосфонових угруповань одночасно зв'язувати два катіони металів (Zn та Mg), розміщених на відстані 3,9 Å один від одного в активному центрі фосфатази. Комплекс може також додатково стабілізуватись за рахунок фізичних (електростатичних, ван-дер-ваальсових, гідрофобних) взаємодій з фрагментами амінокислот на поверхні ензиму [511]. Наступні дослідження інгібувального впливу на лужну фосфатазу свійських тварин були проведені з хіральними ізомерами каліксаренамінофосфонових кислот. Ці речовини мають майже однакову спорідненість до лужної фосфатази кишківника телят. Проте інгібування такого ж ензиму свиней залежить від абсолютної конфігурації α -амінофосфонової кислоти, оскільки константи інгібування для оптичних ізомерів відрізняються в два рази. Селективність до енантіомерів значно зростає у біс-амінофосфонових кислот, а саме їх *R,R*-ізомер зв'язується з ензимом свиней в п'ятдесят разів сильніше, ніж *S,S*-ізомер. Отже, ефективність взаємодії інгібітора з ензимом визначається кооперативним ефектом і відповідністю хіральної конфігурації інгібітора до просторової конформації сайту зв'язування [182]. Вивчали також інгібування лужних фосфатаз з нирок бика та *E. coli* калікс[4]аренами, функціоналізованими на верхньому ободі макроциклу одним та двома залишками метиленбісфосфонової кислоти. При цьому обидві сполуки виявляли приблизно однаковий рівень інгібування. За допомогою комп'ютерного докінгу досліджувани метиленбісфосфонати були розміщені в активному центрі лужної фосфатази *E. coli*. та проаналізовані можливі способи зв'язування досліджуваних інгібіторів з відповідним ензимом [94].

Синтезовано каліксарени, які є інгібіторами тирозинових фосфатаз. Тести на бактеріях *Yersinia* дали змогу ідентифікувати каліксарен, що досить

ефективно інгібував зазначений ензим ($I_{0,5} = 0,92$ мкМ) [443]. Тіакалікс[4]арен пригнічував активність тирозинової фосфатази ($I_{0,5} = 0,22$ мкМ) за типом конкурентного інгібування, хоча при цьому не виявляв достатньої селективності щодо тирозинової фосфатази людини [510]. Калікс[4]арени з метиленбісфосфоновими або гідроксиметиленбісфосфоновими залишками використовували як специфічний інгібітор тирозинової фосфатази людини 1В [491].

Каліксарени, завдяки їх комплексоутворювальним властивостям й широким можливостям щодо функціоналізації різними групами, можуть утворювати супрамолекулярні системи, які формуються й утримуються міжмолекулярними нековалентними взаємодіями. Механізми утворення і функціонування супрамолекулярних систем подібні до механізмів організації та дії біологічних об'єктів, таких як клітинні мембрани, ензими, білки та нуклеїнові кислоти. Тому каліксарени також досліджували як аналоги біологічних структур та систем, за допомогою яких можна моделювати складні біохімічні процеси.

В останні роки був досягнутий значний прогрес у створенні протеоміметиків на основі каліксаренів, молекули яких імітують структуру та функції різних регіонів поверхні білків. Такі сполуки здатні успішно модулювати білок-білкові взаємодії, які є привабливими і важливими мішенями впливу через їх ключову роль у численних біологічних процесах [230]. Один із таких протеоміметиків має чотири пептидні петлі, розміщені на центральній каліксареновій платформі. Таке розміщення подібне до гіперваріабельних петель антитіл і формує значну площу поверхні (приблизно 400 Å) для зв'язування комплементарного оточення на зовнішній поверхні білка-мішені [270]. Описаний також комплекс гуанідинового похідного пентаметоксикалікс[6]арену з діоктаноїлфосфатидилхоліном – фосфоліпідом мембрани. Згідно аналізу кристалічної структури в комплексі спостерігаються такі самі види взаємодій, як і в природному комплексі антитіла McPC603 із фосфорилхоліном та дуже близькими є значенням вільних енергій ΔG

утворення цих комплексів [349]. Взявши до уваги рецепторні властивості каліксаренів можна констатувати, що вони є зручною молекулярною платформою для дизайну штучних антитіл і рецепторів.

Водорозчинна модель активного сайту гемовмісних білків була створена на основі самоскладання катіонних порфіринів та тетрасульфonatoкалікс[4]арену. Цинковмісний порфіриновий комплекс зв'язує ліганди через координаційні взаємодії з металом як у порожнині каліксаренової “чаші” для малих молекул, так і ззовні для більш об'ємних сполук, таких як кофеїн. Кобальтовмісний комплекс може бути переносником кисню [231].

Дуже широко каліксарени вивчаються як аналоги ензимів. Адже створення каталізаторів, які здатні зв'язувати субстрат аналогічно ензимам і за селективністю й ефективністю наближаються до ензимів, знаходиться у фокусі уваги біоорганічної та органічної хімії [50]. 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. При цьому каталітичні системи, що включають некоординовані макроциклічні рецептори, можна розглядати як “мікрореактори”, які стабілізують перехідний стан реакції або впливають на регіо- та стереоселективність процесу внаслідок специфічної орієнтації субстрату, що уможливорює перенесення електронів, протонів чи інших груп іполегшує атаку реагента на субстрат [54].

Простими прикладами синтетичних ензимів є сульфокалікс[6]арени. Вони виявились ефективними кислими каталізаторами гідратації 1,4-дигідронікотинамідів – синтетичних аналогів НАД·Н. Вважають, що в процесі ензиматичної реакції за участю гліцераль-3-фосфатдегідрогенази 1,4-дигідронікотинамідний фрагмент протонується ензимом, а утворений катіонний інтермедіат зв'язується з негативно зарядженими групами ензиму електростатичними взаємодіями. Тому каліксарени з негативно зарядженими сульфогрупами на верхньому вінці макроциклу, що в перехідному стані внаслідок електростатичної взаємодії можуть зв'язувати катіонний інтермедіат,

та протондонорними гідроксильними групами на нижньому вінці, розглядають як моделі ензимів. Вони істотно збільшують швидкість реакції, що в 426-1220 разів більше, ніж у випадку їх нециклічних аналогів, а у більш кислому середовищі швидкість зростає ще на порядок, як наслідок зменшення ступеню дисоціації карбоксильних груп [451]. Карбоксиметильовані калікс[n]арени (n = 5-8) теж мають аніонні та протондонорні центри. Хоча вони виявляють нижчу каталітичну активність, ніж сульфокалікс[6]арени, що пояснюється меншою кислотністю карбоксильної групи порівняно з сульфогрупою та конформаційною рухливістю метиленкарбоксильного фрагмента у реакції гідратації нікотинаміду. Порівняння калікс[n]аренів із різними розмірами циклу дає підстави вважати, що ефективніший каталізатор гідратації нікотинамідів можна створити на основі саме калікс[6]арену [265].

Каліксарени подібно ензімам каталізують також гідроліз естерів карбонових кислот. Для виявлення пептидокалікс[4]аренів, здатних гідролізувати нітрофенілацетат, було синтезовано бібліотеку зі 120 сполук. Лише три з них каталізували гідролітичну реакцію, а найефективнішим був His-Ser-His-каліксарен, який збільшував швидкість реакції на 1520 % порівняно з некаталітичною реакцією та на 30 % порівняно з реакцією за наявності трипептиду His-Ser-His [152]. Ще одним прикладом штучної гідролази або естерази 4-нітрофенілових естерів $\text{RCOO-C}_6\text{H}_4\text{-NO}_2$ є калікс[4]резорциноларен. Константа швидкості гідролізу залежить від природи замісника R, а процес гідролізу відбувається у дві стадії: перша стадія – утворення комплексу каліксарен-субстрат у 2,5-25 разів швидше, ніж друга – гідроліз субстрату. Це підтверджує високі комплексоутворювальні властивості каліксарену щодо естерів і ставить його в один ряд з ензімами [50]. Гуанідинові похідні пентаметоксикалікс[6]арену можуть розщеплювати п-нітрофенілхолінкарбонат – модель ацетилхоліну у хлороформі з 1 % метанолом. Цим каліксаренам властива константа швидкості метанолізу п-нітрофенілхолінкарбонату у 8-15 разів вища ніж у випадку відповідної безкаліксаренової моделі, при цьому вони прискорювали метаноліз у 80-150

разів, тобто збільшення швидкості гідролізу значно менше, ніж притаманне ацетилхолінестеразі [196]. Пара-сульфонато-каліксарени каталізують алкоголіз N-ацетил-похідних основних амінокислот за наявності метанолу відповідно до кінетики Міхаеліса-Ментен. За допомогою методу ядерно-магнітного резонансу продемонстровано, що каталітична активність передбачає формування комплексу каліксаренів зі специфічним субстратом подібно до ензимів [255].

Уже зазначалося, каліксарени є зручною молекулярною платформою для створення моделей ензимів. При цьому особливу увагу дослідників привертають каталізатори, представлені металевим центром та лігандом. Отже, зв'язування субстрату порожниною ліганда-рецептора визначає його орієнтацію по відношенню до металевого центра, що істотно впливає на розподіл продуктів та субстратну селективність реакції [54]. Перш за все створюються моделі окисно-відновних ензимів, які містять скоординований атом металу змінної валентності та названі "редокс калікс-зимами" [287]. Такі водорозчинні комплексні сполуки часто містять атом міді, а калікс[6]аренова чаша формує гідрофобну ліганд-зв'язувальну кишеню, або канал для доступу субстрату до металевого центра подібно до активного сайту металоензимів [287, 426, 427]. Наявність різних хімічних замісників на каліксареновій основі, що формує координаційний сайт для атома міді, імітує залишки певних амінокислот активного центру ензимів [427]. Супрамолекулярна організація координації атому металу регулює Cu(II)/Cu(I) окисно-відновний процес так само, як білкові матриці контролюють цей процес у Cu-вмісних ензимах завдяки фолдингу білка, а також механізму його індукованих змін, стеричним та алостеричним ефектам [415]. Такі моноядерні Cu-калікс[6]арени за наявності молекулярного кисню здатні продукувати супероксидрадикали або руйнувати C-H зв'язки молекул лігандів із включенням у них кисню [288].

Металовмісні каліксарени здатні також каталізувати гідроліз та трансестерифікацію ефірів фосфорних кислот. При цьому моноядерні комплекси виявляли слабку каталітичну активність через відсутність кооперативної дії двох атомів металу, у той час як диядерні комплекси з

оптимальним розміщенням двох металів були ефективнішими. Адже в біохімічних перетвореннях естерів фосфорної кислоти, які каталізуються металоензимами, беруть участь одночасно два іони металу (Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} та Fe^{3+}), що розміщені на відстані 3-5 Å один від одного в активному центрі ензиму [50]. Так, дицинковий комплекс дипіридинокаліксарену ефективно каталізує внутрішньомолекулярну переестерифікацію РНК-модельного субстрату – 2-гідроксипропіл-п-нітрофенілфосфат з 23000-разовим пришвидшенням цього процесу порівняно з некаталітичною реакцією та 50-разовим порівняно з моноядерним цинковим комплексом даного каліксарену, що свідчить про важливість синергізму в ефектах двох катіонів цинку. Найімовірніше, що один з іонів цинку виступає як активуюча кислота Льюїса, а інший активує нуклеофільну β -гідроксильну групу, в результаті чого відбувається швидка внутрішньомолекулярна реакція [370].

Перевага каліксаренів як молекулярної основи штучного ензиму, що містить два перехідних метали, полягає в тому, що каліксареновий кістяк у розчині має достатню конформаційну рухливість і це дає йому змогу ефективно зв'язуватись із субстратом і чинити каталітичну дію. Адже більш структурно жорсткий аналог дицинкового комплексу дипіридинокаліксарену, що конформаційностабілізований діетиленглікольним фрагментом по нижньому вінцю макроциклу, виявляв нижчу каталітичну активність. Це вказує на необхідність певної гнучкості між кооперативними центрами [371].

Аналогічна властивість гідролізувати 2-гідроксипропіл-п-нітрофенілфосфати, ди- та олігорибонуклеотиди характерна для диядерних калікс[4]аренових комплексів з іонами міді(II) як металевих центрів. При цьому такі моделі ензимів мають певну селективність щодо нуклеозидів, між якими гідролізуються фосфодієфірні зв'язки, подібною до селективності рибонуклеази А [163].

Крім цього, синтезовані також калікс[4]арени з трьома та чотирма діамінними або піридиламінними групами на верхньому вінці для моделювання активних центрів мультіядерних металоензимів [461]. Введення третього

металевого центра у випадку з тримідним каліксареновим комплексом не впливає на каталітичну ефективність каліксаренів порівняно з димідним комплексом [163], а в разі цинкових комплексів та змішаних цинк-мідних комплексів відбувалося підсилення каталітичної активності ензиматичних моделей рибонуклеази, що пояснюється стабілізуючою дією третього катіону Zn^{2+} на групу, яка відщеплюється [372]. Однак в усіх випадках ефективність каталізу по відношенню до різних динуклеотидів, тобто відносна субстратна селективність, була різною.

Показано також, що водорозчинний калікс[4]арентетрасульфонат, що не містить ніяких металів, каталізує гідроліз АТР. Методами лазерного фотолізу та імпульсного радіолізу було доведена супрамолекулярна взаємодія між АТР та каліксареном, що необхідна для каталітичного ефекту каліксарену на гідроліз АТР [531].

Отже, синтетичні сполуки на основі каліксаренів здатні каталізувати досить широкий спектр біохімічних реакцій та можуть розглядатися в якості аналогів природних ензимів.

Каліксарени завдяки ароматичним блокам в їх будові мають гідрофобні властивості, тому можуть взаємодіяти з клітинними мембранами. Дослідження такої взаємодії та проникаючої здатності каліксаренів крізь мембрани є важливим з огляду на біологічні ефекти каліксаренів та можливе використання їх в медицині. Перш за все мембранна інкорпорація та/або транслокація каліксаренових похідних залежить від замісників на верхньому та нижньому вінцях, що продемонстровано на прикладі різних пеніцилін-похідних третбутилкалікс[4]аренів та штучних ліпідних мембранах [311]. 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 [290].

Здатність каліксаренів проникати або вбудовуватись в мембрани в поєднанні з їх комплексоутворювальними властивостями дає змогу транспортувати крізь мембрану різні речовини. Наприклад, трет-бутилкалікс[4]арен був досліджений як селективний транспортер катіонів Na крізь штучну мембрану з соєвих фосфоліпідів, хоча таке транспортування в 4 рази повільніше порівняно з природнім іонофором моненсином. Кінетика такого процесу вказує на модель полегшеної дифузії, відповідно до якої каліксарен на поверхні мембрани Na⁺ формує комплекс зі стехіометрією 1:1. Цей комплекс далі дифундує до іншого боку мембрани, де розпадається, й каліксарен знов переходить до сторони мембрани, яка межує з більш концентрованим розчином Na⁺ [291]. При цьому величина олігофенольного макроциклу трет-бутилкалікс[4]аренових похідних впливає на селективність до транспортування певних катіонів лужних металів. Найбільшою селективністю для Na⁺ володіє калікс[4]арен, в той час як калікс[5]арен найкраще переносить K⁺, а калікс[6]арен та калікс[7]арен селективні щодо іону Cs. Калікс[8]арен взагалі не виявив іонофорних властивостей щодо катіонів лужних металів [292]. Знайдені також каліксарени, що селективно транспортують іони ртуті у дифузійно-залежному процесі [226].

Крім того, каліксарени можуть зв'язуватись із мембраною і формувати в ній канали [207]. Так, тетраметокси(тіа)каліксарен може бути аналогом білка аквопорину для моделювання транспорту води через мембрану [479], а трет-бутилкалікс[4]арен поєднаний з чотирма трипептидами, характерними для калієвих каналів, моделює селективний фільтр останнього для іонів K та їх транслокацію [353].

Запропонований механізм вбудовування у ліпідний бішар каліксаренів, що транспортують іони Na та імітують таким чином іонні канали. При цьому амфіфільні каліксарени завдяки гідрофобному ефекту формують у розчині міцели, які зливаються з мембранами утворюючи мультіканали [284].

Каліксарени виявляють також мембранотропні властивості на рівні катіонотранспортувальних систем нативних мембран. Зокрема, знайдено, що

парасульфonatoкаліксарени є сильними блокаторами потенціал-керованих хлоридних каналів з субнанолярною константою інгібування та винятково тривалим часом блокування [442, 454]. Тетрасульфonatoкаліксарени індують також швидке інгібування потенціал-залежних аніонних каналів ендотеліальних клітин за позитивного потенціалу, але вони виявились неефективними за негативного потенціалу. Вплив рН на блокування каналів вказує на залежність ефекту від протонування сайту зв'язування. Потенціал-залежне інгібування калікс[4]ареном вірогідно відбувається через закупорення каналу за помірно позитивного потенціалу, яке ослаблюється за більш позитивного потенціалу внаслідок проходження негативно зарядженого калікс[4]арену через канал [216]. Тетрасульфonatoкалікс[6]арен та калікс[8]арен були більш ефективними за високого позитивного потенціалу, оскільки вони не проникають через канал. Структурні відмінності цих каліксаренів дали змогу оцінити ліміти площі каналу в поперечному зрізі. Такі блокатори можуть бути корисними у подальших дослідженнях властивостей аніонних каналів у відкритому стані [217].

На основі каліксаренів вже створені сполуки, з різноманітними біологічними властивостями, що продемонстровано на клітинах та на рівні цілісного організму. Широко застосовуються кон'югати каліксаренів із вуглеводами [487].

На сьогодні описано та запатентовано використання каліксаренів як сполук з бактерицидною, противірусною та фунгіцидною дією [64, 98, 135, 204, 280, 424]. Показано, що пептидокаліксарени виявляють антибактеріальну активність відносно пеніциліночутливих і пеніциліностійких грампозитивних бактерій і не діють на грамнегативні. За механізмом дії ці речовини близькі до природного антибіотика ванкоміцину, тобто зв'язуються глікопептидними будівельними блоками клітинної стінки бактерій і тим самим унеможливають формування нормальної клітинної стінки [171].

Створено також калікс[8]аренові сполуки, які опосередковано через імунні клітини здатні контролювати інфекцію *Mycobacterium tuberculosis*.

Залежно від довжини поліоксиетиленового ланцюга на нижньому вінці макроциклу каліксарени інгібують або активують ріст туберкульозної палички всередині макрофагів, тим самим вони впливають на метаболізм ліпідів та активність індукцйбельної NO-синтази цих клітин. Цей механізм повністю відрізняється від механізму дії інших протитуберкульозних ліків, тому ці речовини є перспективними, оскільки стійкість бактерій до сучасних хіміотерапевтичних агентів зростає [98, 189, 271].

Каліксарени є перспективними сполуками як компоненти лікарських засобів антиракових препаратів, наприклад, глікокалікс[8]арен з експонованими залишками N-ацетилглюкозаміну інгібують міграцію та проліферацію клітин гліоми [509]. На основі каліксаренів знайдений селективний інгібітор зв'язування рецепторами тромбоцитарного фактору росту [537] та ендотеліального фактору росту судин [471], 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 [318]. Калікс[4]арен, що поєднаний з чотирма пухлиноасоційованими глікоантигенами, стимулює продукування антипухлинних імуноглобулінів і тому може бути використаний як вакцина [250].

1.4.4. Токсичність та імуногенність каліксаренів

Для безпечного використання 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 [190, 264, 529]. Доведено, що каліксаренсульфонати не впливають на ріст фібробластів людини і мають той же рівень токсичності, що і глюкоза [411], 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 [186]. Встановлено, що тверді ліпідні наночастинки на основі амфифільних калікс[4]аренпохідних показують відсутність гемолітичних ефектів при концентраціях в межах до 300 мг/л [454], на відміну від поведінки твердих ліпідних наночастинок на основі амфифільних циклодекстринів, які проявляють значні гемолітичні ефекти [363].

Знайдено, що для серії пара-сульфонат-калікс[4,6,8]аренів та їх монозаміщених похідних спостерігається гемолітична дія в такому порядку: пара-сульфонат-калікс[8]арен > пара-сульфонат-калікс[6]арен > пара-сульфонат-калікс[4]арен, з 5% гемолізом при концентрації 20, 50 і 200 мМ відповідно [202]. Вони не індукують активацію нейтрофілів та не впливають на їх життєздатність [400]. Показано також, що непептидні тетрааміно- та дигуанідинкалікс[4]арени не викликали спостерігаємої токсичної дії на піддослідних мишах [211].

Показано, що ДНК-трансфектовані каліксарени не проявляють токсичність по відношенню до клітин (у яєчниках китайського хом'ячка і клітинних ліній нирок ембріонів людини) [329]. Каліксарени, що містили на нижньому макроциклічному вінці гуанідинові групи, проявляли низьку токсичність при їх трансфекції у клітини, що підтверджувалося 75-80 % їх життєздатністю на протязі 48 годин [134].

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 імунна відповідь залежить від природи кон'югованого переносника, дози та способу імунізації [258].

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

1.4.5. Перспективи використання каліксаренів у фізико-хімічній біології, біотехнології та фармакології

Сьогодні широко вивчається можливість використання каліксаренів у суміжних галузях науки. В літературі трапляється досить багато згадок про різноманітні властивості каліксаренів, у тому числі і про їх біологічну активність, яка активно досліджується у біомедицині. Вчені досліджують утворення інклюзивних комплексів, прояви антикоагуляційної, гідролітичної, протитуберкульозної, антибактеріальної, протівірусної, 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 [304, 330, 380, 492]. Обговорюється також можливість створення пероральних протидіабетичних засобів з використанням каліксаренів у якості переносників крізь мембрану [50, 424].

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 [130]. Використання амфіфільних каліксаренових похідних уможливило створення сенсорів здатних визначати різні білки у наномольному діапазоні. Зокрема, описані аналітичні системи на основі парасульфوناتокаліксаренів, здатних до супрамолекулярної взаємодії з високопатогенними пріонами, що дає змогу ампліфікувати їх імунологічне детектування методами Western Blot та ELISA [187, 188].

Каліксарени з іонофорними властивостями придатні для створення селективних детекторів на основі електродної техніки. Так були розроблені потенціометричні методи на основі ефірних похідних бутилкалікс[4]аренових

сполук для реєстрації концентрації іонів Na селективно відносно іонів K у рослинних клітинах [169] та в плазмі крові [478]. 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 [431, 432]. Аналогічним чином розроблені також методи аналізу широкого кола інших речовин.

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, є основою радіотерапевтичних агентів. При цьому імунореактивність антитіл не ослаблюється приєднанням до 6 молекул каліксарену і дає змогу цілеспрямовано доставляти радіоактивну сполуку до клітин-мішеней [258]. Водорозчинний парасульфonatoкалікс[8]арен унаслідок утворення стабільного комплексу з практично не розчинним у воді ніфедипіном істотно збільшує його біодоступність при оральному застосуванні [543]. Показано, що парасульфonatoкалікс[4]арен та калікс[4]арендифосфат є ефективними агентами для кристалізації низки фармацевтичноактивних сполук, Кристалізація за допомогою водорозчинних каліксаренів дає змогу поліпшити їх характеристики, змінювати й контролювати конформацію лікарського засобу [200].

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 [249]; вірусу простого герпесу [379, 380]. Подібним чином використовують каліксаренову платформу і при розробці протигрибкових засобів. У літературі описано синтез гібридів з амотерицину В та калікс[4]арену [409]. Отримані комплекси володіли такою ж протигрибковою активністю, але при цьому гібриди були в 10 разів менш гемотоксичні за амфотерицин В. Отримані комплекси з калікс[4]ареном більш селективні до мембран, які

містять ергостерол, що зазвичай трапляється у мембрані дріжджів, ніж до холестеролвмісних, що є характерним для клітин ссавців. Відомо засоби на основі калікс[4]аренів з протигрибковою активністю (на культурах *Candida albicans*), що мають низьку гепатотоксичність [459].

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 [50, 156, 476].

Описано каліксарени, які зменшують кров'яний і тканинний оксидативний стрес у щурів, спричинений введенням свинцю. Це відбувається внаслідок того, що каліксарен зв'язується з цистеїновими залишками у пептидах, а це, в свою чергу, перешкоджає зв'язуванню свинцю [443]. Також, з використанням з 2,2-дифеніл-1-пікрілгідразилу, описано антиоксидантні властивості каваоліл- та синапіл-калікс[4]аренів (похідні гідроксикоричної кислоти) [190].

Таким чином, 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. Це вкрай перспективно для подальшого розвитку біохімії, біофізики, молекулярної біології, а особливо в практичному аспекті біотехнології та медицини.

Отже, проаналізувавши літературні дані, ми маємо вагомі підстави стверджувати, що каліксарени можуть бути ефективними модуляторами різноманітних біологічних процесів [50, 309, 424, 425]. Каліксарени можна використовувати в багатьох суміжних галузях науки, зокрема у них великий потенціал для застосування у біомедицині.

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+} -АТРази, Na^+ , K^+ -АТРази та інші мембранозв'язані АТРази. 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. Водночас, як впливає з вищенаведеного, каліксарени самі можуть бути аналогами ензимів, у тому числі й АТР-гідролаз. Тому цікавим є подальше вивчення АТР-гідролітичних властивостей каліксаренів.

1.4.6. Узагальнення до підрозділу 1.4.

Отже, проаналізувавши літературні дані, ми можемо стверджувати, що наразі є вагомими підстави стверджувати, що каліксарени можуть бути ефективними модуляторами різноманітних біологічних процесів [50, 309, 424, 425]. Каліксарени можна використовувати в багатьох суміжних галузях науки, зокрема у них великий потенціал для застосування у біомедицині.

Втім, потенціал каліксаренів як біологічно активних сполук ще повністю далеко не розкритий. Так, в літературі практично відсутні дані щодо каліксаренів як потенційних ефекторів Mg^{2+} , АТР-залежних катіон-транспортуючих pomp м'язів, зокрема, гладеньких.

Узагальнення до розділу 1

Таким чином, у Розділі I "Огляд літератури" продемонстровано сучасні дані щодо властивостей та регуляції АТРази ПМ та СР, а також, акцентовано увагу на каліксаренах, як перспективних штучних модуляторів біохімічних процесів.

В експериментальній частині роботи будуть наведені власні експериментальні дані щодо закономірностей дії калікс[4]аренів на АТРази системи ПМ і СР гладеньком'язових клітин та на неензиматичний гідроліз АТР.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

РОЗДІЛ 2

2.1. Тварини та тканини, які було використано в дослідженнях.

У дослідах використовували препарат ГМ матки невагітних свиней та щурів. Матку свиней одержували на Дарницькому м'ясокомбінаті (м. Київ). Матку свині 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 витримання 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 підписаною Верховною Радою України у 2002 році, Закону України № 3447 IV «Про захист тварин від жорстокого поводження».

2.2. Методи препаративної біохімії

2.2.1. Виділення суспензії гладеньком'язових клітин з матки щурів

2.2.1.1. Одержання суспензії гладеньком'язових клітин.

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. [124, 367], 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 звільняли 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 (рН = 7,4, 37 °С) - 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 °С, 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 приготовлений на розчині Б. Через 20 хв середовище дисоціації тканини відбирали, а тканину переносили в 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 HEPES-KOH (pH=7,4; 8°C), 150 мМ NaCl і 0,4% бичого сивороточного альбуміну, і знову центрифугували у вказаному вище режимі. Потім клітини переносили в середовище зберігання, яке містило 25 мМ HEPES-KOH (pH=7,4; 8 °C), 150 мМ NaCl, і зберігали при низькій температурі (ставили на лід) та проводили запланований дослід.

2.2.1.2. Характеристика клітинної суспензії

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^и 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 (1). Кількість клітин у 1 мл вихідної суспензії (С) визначали за формулою:

$$C = k * n * p \text{ клітин/мл,} \quad (1)$$

де n - кількість підрахованих клітин/1 мм²,

k - коефіцієнт розведення,

p - перерахувний коефіцієнт, рівний $10^4/\text{мм}$.

Кількість клітин у пробі (метод протокової цитофлуориметрії) становила 500 тис./ 2 мл.

В наших дослідах кількість клітин, що містилась в 1 мл суспензії, в середньому складала 6,5 млн. Отже, з однієї матки в процесі виділення 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 складала 80-100 і 10-20 мкм відповідно [59, 63]. 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 [524].

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).

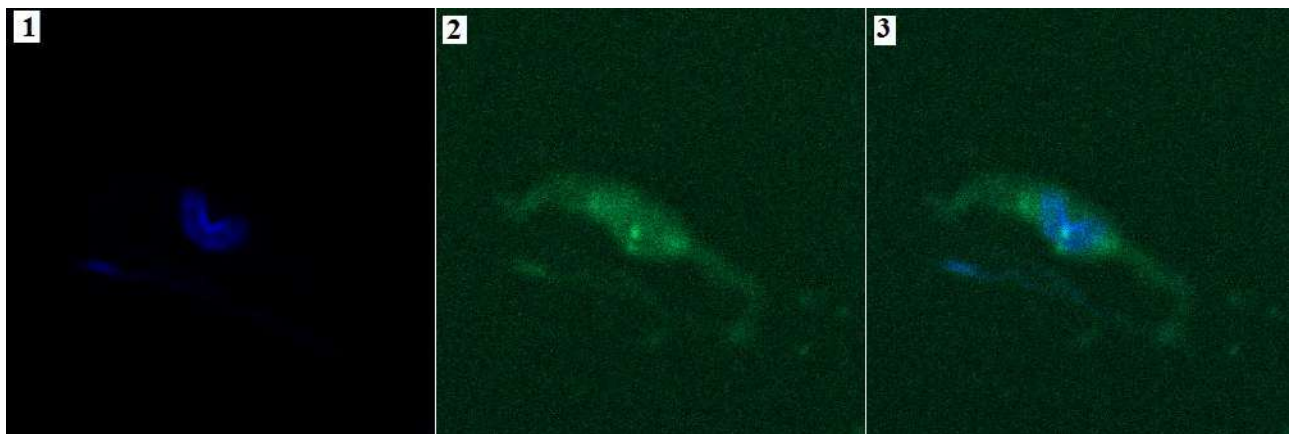


Рис. 2.1. Зображення гладеньком'язованих клітин міометрія, отримане скануючим лазерним конфокальним мікроскопом (1- забарвлення зондом Hoerst, 2 - забарвлення зондом fluo-4 AM, 3 - забарвлення зондом Hoerst та fluo-4 AM).

Проведене дослідження свідчить, 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.

Суспензію міоцитів було охарактеризовано за допомогою лазерного кореляційного спектрометра. Вимірювання проводили аналогічно з везикулами ПМ. Розподіл ГМК за їх гідродинамічним діаметром показано на рис 2.2. Пікове значення за об'ємом становило 15-16 тис нм. Кількість клітин у пробі 500 тис/мл.

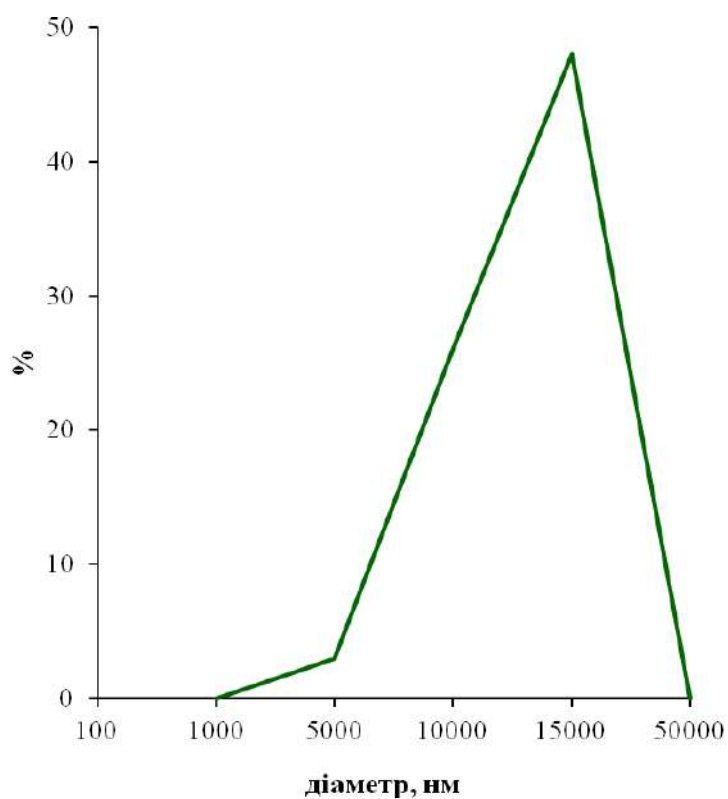


Рис. 2.2. Розподіл ГМК у відсотковому співвідношенні за діаметром.

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

Пермеабілізацію ПМ проводили при концентрації дигітоніну 0,1 мг/мл. Цю мінімальну та ефективну концентрацію дигітоніну було підібрано експериментально, спираючись на дані Фіскум з співробітниками [205]. Із літератури відомо, що в основі дії дигітоніну на біологічні мембрани лежить

його здатність утворювати низькорозчинні еквімолярні комплекси з холестерином (дигітоніди), що призводить до порушення цілісності поверхневих мембран [232]. Дигітонін у невеликих концентраціях використовують для селективної взаємодії з ПМ без деструкції мембран внутрішньоклітинних утворень (ендоплазматичного ретикулуму, мітохондрій). Причина цього полягає в тому, що вміст холестерину в ПМ значно більший, ніж у мембранах внутрішньоклітинних структур. Тому деструктивний ефект детергенту на ендоплазматичний ретикулум і мітохондрії виявляється при концентраціях, що в 10-100 разів перевищують величину мінімальної концентрації (0,05 мг/мл), необхідної для руйнування ПМ [63, 232].

2.2.2. Виділення та тестування фракції плазматичних мембран клітин міометрія

2.2.2.1. Одержання фракції плазматичних мембран.

ПМ ГМК виділяли з міометрія свині за методикою, що описана в роботі [58]. 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-НСІ (рН 7,4 при 8 °С), 250 сахароза, 2 етилендіамінтетраоцтова кислота, 600 КСІ. 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 поміж 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-HCl (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 [58], гарантує одержання фракції ПМ міометрія, яка збагачена везикульованими фрагментами мембран, що замкнені внутрішньою стороною назовні (інвертовані).

Кількість білка в мембранному препараті визначали методом Bradford [151] 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 [151].

2.2.2.2. Характеристика фракції плазматичних мембран.

Характеристика із використанням методу електронної мікроскопії.

Дані дослідження проводили у творчій співпраці з к.б.н. Чернишовим В.І. Для електронно-мікроскопічних досліджень осад ПМ фіксували в розчині глутарового альдегіду та чотириокису осмію, обезводнювали в ацетоні.

Препарати просочували та полімеризували в епоксидній смолі Епон-Аралдит. Ультратонкі зрізи забарвлювали ураніл ацетатом, а потім свинцевим барвником за Рейнольдсом [428]. Зрізи переглядали та фотографували з допомогою просвічувального електронного мікроскопа Н-600 (Японія).

Відповідно до одержаних даних (рис. 2.3) середній діаметр везикул ПМ становив від 50 до 500 нм., що відповідає літературним даним [41, 63] та корелює з результатами досліджень плазматичних мембран за допомогою лазерно-кореляційної спектроскопії (див. наступний підпункт). На фотографії зустрічаються також везикули з подвійною мембраною і везикули заповнені залишками клітинного вмісту.

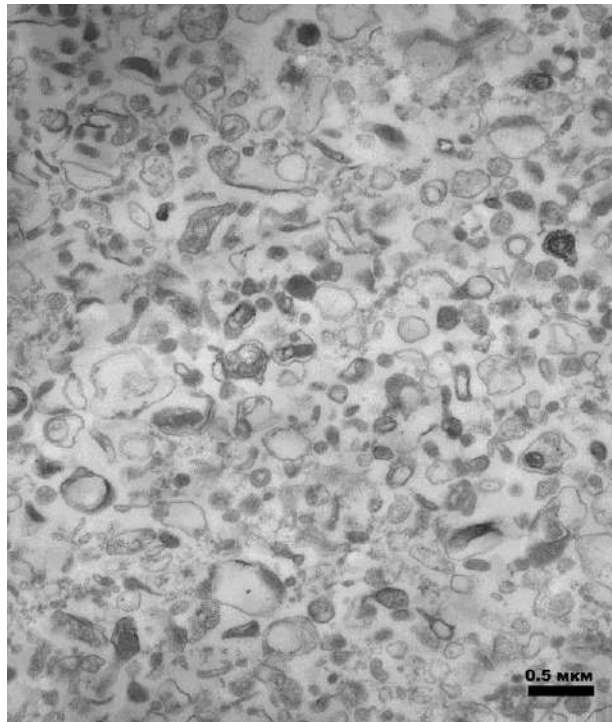


Рис. 2.3. Електронно-мікроскопічний фотознімок фракції ПМ сарколеми міомерія. Збільшення у 20 тис разів.

Характеристика із використанням методу лазерно-кореляційної спектроскопії.

Дані дослідження проводили у творчій співпраці з к.ф.-м.н. Чунініним О.Ю. Метод динамічного розсіяння світла [56] полягає в реєстрації спектрів

часових залежностей флуктуацій інтенсивності розсіяного монохроматичного світла на певному проміжку часу завислими частками в об'ємі рідини, та подальшою побудовою часової автокореляційної функції за результатами вимірювань. Дослідження проводили за допомогою лазерного кореляційного спектрометру “ZetaSizer-3” (Malvern Instruments, Великобританія), який був обладнаний He-Ne лазером ЛГН-111 ($P = 25$ мВт, $\lambda = 633$ нм). Діапазон вимірювання приладу становить від 1 нм до 20 мкм. Робота даного спектрометру основана на аналізі кореляційних характеристик флуктуації інтенсивності динамічно розсіяного світла при проходженні лазерного променя через середовище [56]. Вимірювання кореляційної функції флуктуацій інтенсивності розсіяного світла і інтегральної інтенсивності розсіювання дозволяє визначити коефіцієнт трансляційної дифузії дисперсних часток в рідинах і за рівнянням Стокса-Эйнштейна визначити розподілення частинок в рідинах за розміром. Коефіцієнт трансляційної дифузії D частинок пов'язаний з тривалістю кореляції τ_c співвідношенням:

$$Dq^2 = 1/\tau_c \quad (2.2.1)$$

Хвильової вектор флуктуацій концентрації q описується виразом:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin \frac{\theta}{2} \quad (2.2.2)$$

де n – показник заломлення середовища (рідини), λ_0 – довжина хвилі випромінювання, θ - кут розсіювання.

Використовуючи формулу Стокса-Эйнштейна, яка пов'язує розмір частинок з їх коефіцієнтом трансляційної дифузії і в'язкістю рідини, можна розрахувати розмір сферичних частинок:

$$d(H) = \frac{k_B \cdot T}{3\pi\eta D}, \quad (2.2.3)$$

де k_B - стала Больцмана, T – абсолютна температура, η – зсувна в'язкість середовища, в якому суспендовані частинки, D – коефіцієнт трансляційної дифузії.

Реєстрацію та статистичну обробку лазерного випромінювання, розсіяного від водної ($n=1,33$) суспензії частинок, проводили 5-разово протягом 60 с при температурі $+22\text{ }^{\circ}\text{C}$ під кутом розсіювання 90° .

Отримані результати вимірювань обробляли за допомогою сервісної комп'ютерної програми PCS-Size mode v1.61.

Дослідження зразків (об'єм 1 мл) проводили за кімнатної температури. Суспензія плазматичних мембран знаходилась у середовищі наступного складу: мМ: 50 NaCl, 100 KCl, 1 ЕГТА, 20 Hepes-Tris (pH 7,4 25°C). Кількість білка у пробі становила 100 мкг.

Везикули (до 90 %) мали характерний розмір 400-410 нм та дуже низький полііндекс ($0,30\pm 0,03$, $n=5$, $M\pm m$), що свідчить про незначний розкид частинок по формі [366], тобто зразок є однорідним (рис. 2.4).

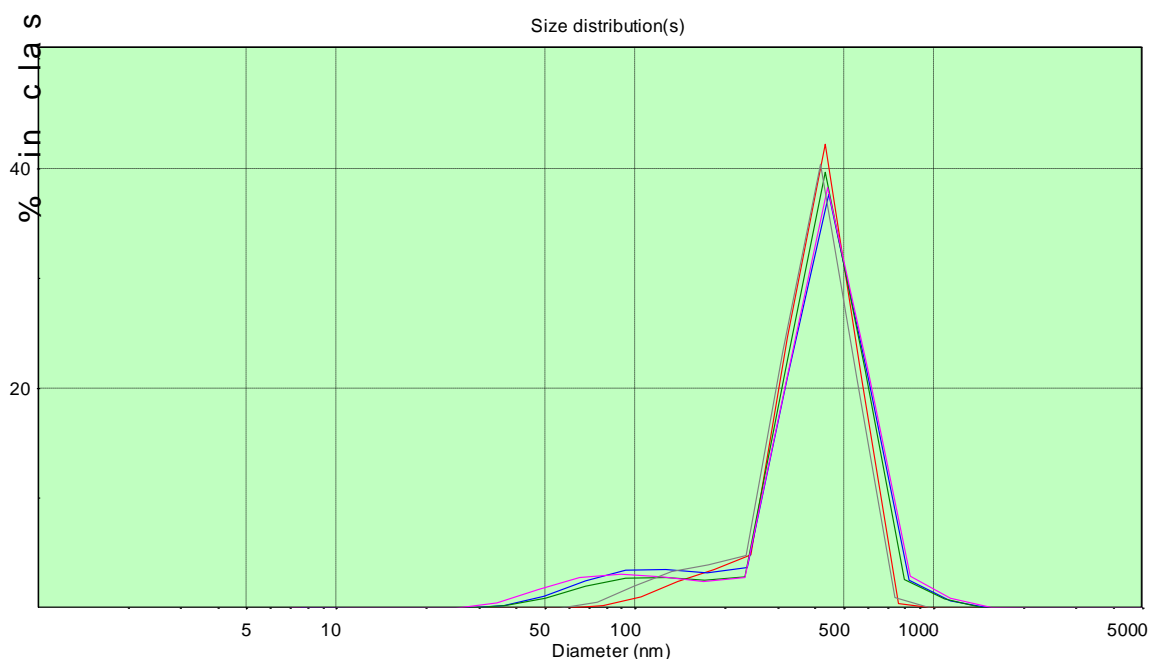


Рис. 2.4. Розподіл везикул ПМ у відсотковому співвідношенні за об'ємом у середовищі зберігання.

Як виявилось, результати щодо розмірів мембранних везикул, що були одержані методом лазерно-кореляційної спектроскопії цілком відповідають даним, які були отримані із залученням методу електронної мікроскопії.

Характеристика за активністю маркерних ензимів.

Визначались активності ацетилхолін естерази (АХЕ), Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази, Na^+ , K^+ -АТРази та базальної Mg^{2+} -АТРази.

Активність АХЕ оцінювали по кількості утвореного тіохоліну методом Елмана [223]. Використовували середовище інкубації об'ємом 1,5 мл такого складу, мМ: 50 Tris-HCl pH 7,4, 0,5 5,5-дитіобіс-2-нітробензойна кислота, 2,5 ацетилтіохолінбромід та 0,1 % дигітонін. Кількість білка в пробі становила 40-50 мкг. Реакцію ініціювали внесенням аліквоти (50 мкл) суспензії мембран, зупиняли внесенням 0,5 мл 1 % SDS. Час інкубації 10 хв. при 37 °С. Контролем на кількість сульфгідрильних груп білка та неензиматичне утворення тіохоліна слугувало середовище інкубації з попередньо інактивованим мембранним препаратом.

Визначення активностей Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази, Na^+ , K^+ -АТРази та Mg^{2+} -АТРази описано в наступних підрозділах.

2.3. Флуоресцентні методи

2.3.1. Визначення Ca^{2+} -транспортувальної активності везикул плазматичних мембран

Для визначення Ca^{2+} -транспортувальної активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази використовували Ca^{2+} -чутливий флуоресцентний зонд fluo-4 AM (рис. 2.5). Вказаний зонд використовується для вимірювання Ca^{2+} концентрації всередині живих клітин. У дослідженнях використовувалася не флуоресцентна форма – ацетоксиметильний естер (fluo-4 AM), який всередині клітини розщеплюється неспецифічними естеразами і утворює вільну флуоресцентну (кислотну) форму (fluo-4) [244].

Зондом (10 мкМ) навантажували протягом 30 хв (25 °С) везикули ПМ середовищі наступного складу: 300 мМ KCl, 20 мМ HEPES-Tris (pH=7,4; 8 °С). Для покращення процесу навантаження змішували зонд із Pluronic F-127 (0,02 %). Наступним етапом центрифугували протягом 1 год при 105000 g на

кутовому роторі, щоб відмити зонд, який не потрапив у везикули. Для ресуспендування використовували середовище вищеописаного складу.

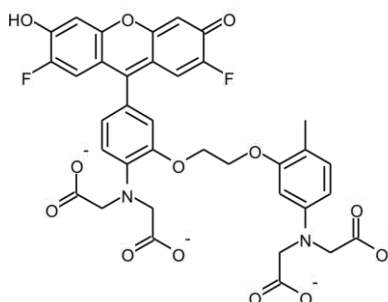


Рис. 2.5. Структурна формула Ca^{2+} -чутливого зонда fluo-4.

Реєстрацію зміни концентрації Ca^{2+} у везикулах визначали за допомогою флуоресцентної відповіді fluo-4 AM, спектрофлуориметр Quanta Master 40 РТІ (Канада) із програмним забезпеченням FelixGX 4.1.0.3096 ($\lambda_{\text{зб.}}$ = 495 нм, $\lambda_{\text{фл.}}$ = 520 нм). Робоче середовище, з якого здійснювалась енергозалежна акумуляція Ca^{2+} везикулами ПМ, мало склад (в мМ): 20 HEPES-Tris (pH 7,4; 37 °C), 300 KCl, 3 MgCl₂, 2 АТР, 0,95 CaCl₂. Кількість білка у пробі становила 100 мкг.

Для підтвердження накопичення Ca^{2+} саме Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазою ПМ використовували середовище вищеописаного складу, але з варіантами: без АТР, без Mg^{2+} , з різними концентраціями K^{+} -фосфатного буферу (20, 60 мМ), з тапсигаргіном (100 нМ), з NaN₃ (1 мМ). В кінці вимірювань вносили EGTA (10 мкМ) з A-23187 (2,5 мкМ). Для реєстрації саме Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази компоненти транспорту Ca^{2+} використовували інгібітор калікс[4]арен **C-90** (100 мкМ).

2.3.2. Дослідження міоцитів методом лазерної скануючої конфокальної мікроскопії.

Суспензію ГМК 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 °C. Неприкріплені

міоцити відмивали розчином В, після чого до іммобілізованих клітин додавали 100 мкл розчину В.

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 BP 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.

2.3.3. Дослідження мембранотропних ефектів калікс[4]арену C-99 з використанням потенціалчутливого флуоресцентного зонда DiOC₆(3) методом протокової цитометрії.

Квазірівноважний K^+ -дифузійний мембранний потенціал реєстрували по зміні флуоресценції потенціал-чутливого зонда $DiOC_6(3)$ (3,3-дігексилосакарбоціанін) за допомогою протокового цитофлуориметра COULTER EPICS XLTM (“Beckman Coulter”, США) з аргонним лазером при $\lambda_{зб} = 488$ нм, $\lambda_{фл} = 506$ нм.

Везикули сарколеми попередньо врівноважували в середовищі, що містило 300 мМ KCl, 20 мМ Hepes-Tris (pH 7,4) протягом 15-18 год при 4 °С. Флуоресцентну відповідь зонда вивчали в середовищі (об’єм 2 мл), що містило 5 мкМ $DiOC_6(3)$, 20 мМ Hepes-Tris (pH 7,4 при 23 °С), 150-200 мкг/мл білка. Градієнт концентрацій створювали внесенням різних концентрацій KCl відповідно до розрахунку за рівнянням Нернста, а йонну силу компенсували (до 300 мМ) додаванням холін-хлориду (ChCl): 300 мМ K_i^+ /300 мМ K_e^+ ($\Delta\phi = 0$ мВ), 300 мМ K_i^+ /250 мМ K_e^+ + 50 мМ Ch_e^+ ($\Delta\phi = -4,6$ мВ), 300 мМ K_i^+ /200 мМ K_e^+ + 100 мМ Ch_e^+ ($\Delta\phi = -10,3$ мВ), 300 мМ K_i^+ /150 мМ K_e^+ + 150 мМ Ch_e^+ ($\Delta\phi = -17,5$ мВ), 300 мМ K_i^+ /100 мМ K_e^+ + 200 мМ Ch_e^+ ($\Delta\phi = -27,8$ мВ), 300 мМ K_i^+ /50 мМ K_e^+ + 250 мМ Ch_e^+ ($\Delta\phi = -45,3$ мВ), 300 мМ K_i^+ /30 мМ K_e^+ + 270 мМ Ch_e^+ ($\Delta\phi = -58,3$ мВ). Встановлення K^+ -дифузійного потенціалу в системі забезпечувалось в присутності 0,5 мкМ валіноміцина. Значення K^+ -рівноважного потенціалу розраховували за рівнянням Нернста:

$$\Delta\phi = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K^+]_e}{[K^+]_i}, \quad (2.1)$$

де $[K^+]_e$ та $[K^+]_i$ – концентрація K^+ поза та в середині везикул відповідно, R – універсальна газова стала, T – абсолютна температура, F – константа Фарадея.

2.4. Методи ензимології

2.4.1. Визначення АТФ-гідролазних активностей у фракції плазматичних мембран клітин міомерія та швидкості неензиматичного гідролізу АТФ.

2.4.1.1. Визначення Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазної активності у фракції плазматичних мембран.

“Загальну” АТРазну активність визначали у фракції ПМ клітин міометрія при 37 °С у стандартному середовищі (об’єм – 0,4 мл), яке містило (мМ): 3 АТР, 3 MgCl_2 , 0,95 CaCl_2 , 25 NaCl , 125 KCl , 1 ЕГТА, 20 Нерес-tris-буфер (рН 7,4), 1 NaN_3 (інгібітор АТРази мітохондрій [234]), 1 убаїн (селективний інгібітор Na^+ , K^+ -АТРази [496, 514]), 0,1 мкМ тапсигаргін (селективний інгібітор Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ендо(сарко)-плазматичного ретикулума [234]) і 0,1 % дигітонін (фактор перфорації ПМ [18]). Кількість білка мембранної фракції в пробі – 20-30 мкг. Час інкубації – 5 хв.

Ензиматичну реакцію ініціювали введенням до середовища інкубації аліквоти (50 мкл) суспензії фрагментів ПМ (8 °С), а зупиняли - додаванням до інкубаційної суміші 1 мл “стоп“-розчину наступного складу: 1,5 М натрій оцтовокислий, 3,7 % формальдегід, 14 % етанол, 5 % трихлороцтова кислота, (рН 4,3 при 8 °С).

Контролем на неензиматичний гідроліз АТР слугувало середовище інкубації аналогічне за складом, але за відсутності в ньому фрагментів плазматичних мембран. Контролем на кількість ендогенного P_i в мембранному препараті була аліквота мембран у воді. Отже, загальну АТРазну активність обчислювали як різницю між кількістю P_i , що утворився в середовищі інкубації у присутності й за відсутності фрагментів ПМ. При цьому було враховано поправку на вміст ендогенного P_i в мембранному препараті. Кількість продукту реакції P_i визначали методом W. Rathbun et V. Betlach [421]. 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 [101, 421].

„Базальну” Mg^{2+} -АТРазну активність у фракції ПМ визначали у тому ж середовищі інкубації, але при відсутності в середовищі інкубації іонів Ca^{2+} .

Ca²⁺,Mg²⁺-АТРазну активність розраховували як різницю між величиною “загальної” АТРазної і „базальної” Mg²⁺-АТРазної активностями.

У наших дослідах середнє значення питомої активності Ca²⁺,Mg²⁺-АТРази ПМ становить $3,4 \pm 0,3$ мкмоль P_i/мг білка за 1 год (M ± m; n = 7).

2.4.1.2. Визначення Na⁺,K⁺-АТРазної та Mg²⁺-АТРазної активності у фракції плазматичних мембран.

Загальну Na⁺,K⁺,Mg²⁺-АТРазну активність визначали при 37 °С у фракції плазматичних мембран клітин міометрія [234] в середовищі інкубації (об’єм 0,4 мл), яке містило (в мМ): 1 АТР, 3 MgCl₂, 125 NaCl, 25 KCl, 1 ЕГТА, 20 Нерес-Трис-буфер (рН 7,4), 1 NaN₃, 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 [18].

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. Отже, 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 [421]. До проби додавали 0,05 мл 2 %-ого MoNH₄ й після інтенсивного перемішування вносили 0,1 мл 6,75 мМ SnCl₂*2H₂O. Через 15 хв реєстрували

оптичну густину розчину за допомогою спектрофотометра SPECORD UV VIS при довжині хвилі 660 нм [18, 421].

Базальну Mg^{2+} -АТРазну активність визначали в такому ж середовищі інкубації, як і загальну АТРазну активність (див. вище пункт 2.2.1), але у присутності 1 мМ убаїну (селективний інгібітор Na^+, K^+ -АТРази [101, 223]).

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 (убаїннечутливої) 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 ($M \pm m$; $n=7$).

2.4.1.3. Очищення та реконструкція Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази плазматичних мембран клітин міомерія.

Дані дослідження проводили у співпраці з к.б.н. Слінченко Н.М. Препарат очищеної транспортної Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази було одержано із плазматичних мембран клітин міомерія свині за допомогою методу афінної хроматографії на кальмодулін-сефарозі 4В, як описано [103]. Реконструкцію очищеного та солюбілізованого ензиму до азолектинових ліпосом проводили методом холатного діалізу [81].

2.4.1.4. Визначення активності очищеної Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази плазматичних мембран клітин міомерія.

АТРазну активність очищеного та солюбілізованого ензиму вивчали в середовищі інкубації наступного складу (мМ): 50 трис-НСІ буфер (рН 7,4), 125 КСІ, 25 NaСІ, 3 АТР, 3 $MgCl_2$, 0,1 $CaCl_2$, 0,1 ЕГТА, 1,5-2,0 мкг білка.

Тривалість інкубації 10 хв. Кількість продукту реакції P_i визначали методом W. Rathbun et V. Betlach [421]. По результатам DS-Na-електрофорезу в ПААГ препарат очищеного та солубілізованого ензиму містив два поліпептиди з молекулярними масами 130 і 205 кДа, для них характерне Ca^{2+} -залежне автофосфорилування [103]. Виходячи із значення середньої питомої активності солубілізованої Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази ($83,8 \pm 7,4$ мкмоль P_i /мг білка за 1 год; $M \pm m$; $n = 7$) цей метод дозволив досягнути 52-кратного очищення ензиму. Ензиматична активність “базальної” Ca^{2+} -незалежної Mg^{2+} -АТРази у препараті очищеної Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази не виявлялася.

2.4.1.5. Визначення ензиматичної АТРазної активності Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази саркоплазматичного ретикулума.

АТРазну активність визначали у суспензії міоцитів при 37 °С у стандартному середовищі (об’єм – 0,4 мл), яке містило (мМ): 3 АТР, 3 $MgCl_2$, 0,95 $CaCl_2$, 25 NaCl, 125 KCl, 1 ЕГТА, 20 Hepes-Tris (pH 7,4 37°C), 1 NaN_3 , 1 убаїн і 0,1 % дигітонін. Кількість білка мембранної фракції в пробі – 20-30 мкг. Час інкубації – 5 хв. Ензиматичну реакцію ініціювали введенням до середовища інкубації аліквоти (50 мкл) суспензії міоцитів, а зупиняли - додаванням до інкубаційної суміші 1 мл “стоп“-розчину наступного складу: 1,5 М натрій оцтовокислий, 3,7 % формальдегід, 14 % етанол, 5 % трихлороцетова кислота, pH 4,3 (при 8 °С).

Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРазну активність розраховували по різниці між величинами АТРазної активності за присутності та відсутності в середовищі інкубації (див. вище) 0,1 мкМ тапсигаргіну. Кількість продукту реакції P_i визначали за методом W. Rathbun et V. Betlach [421].

2.4.2. Вивчення впливу калікс[4]аренів та сполук М-1 і М-3 на АТР-гідролазні активності плазматичної мембрани.

У дослідях по вивченню впливу калікс[4]аренів та сполук **М-1** (структурний фрагмент каліксарену **С-90**) і **М-3** (структурний фрагмент калікс[4]арену **С-107**) на питому активність Na^+, K^+ -АТРази, Mg^{2+} -АТРази та $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази використовували середовище інкубації, що було описане вище, до якого додавали аліквоти розчину калікс[4]арену або речовин **М-1** чи **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. Сполуки **М-1** і **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.

2.4.3. Вивчення впливу калікс[4]аренів на неензиматичний гідроліз АТР.

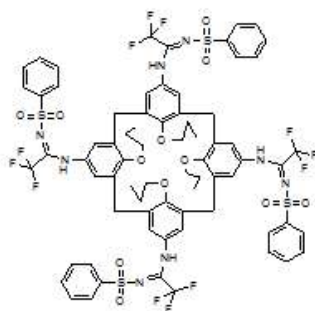
Реакцію неензиматичного гідролізу АТР тестували при 37 °С у середовищі інкубації (об'єм – 0,4 мл), яке містило (мМ): 1 АТР, 3 MgCl_2 , 50 NaCl , 100 KCl , 1 ЕГТА, 20 Непер-Tris-буфер (рН 7,4). Концентрація калікс[4]арену становила 100 мкМ, тривалість інкубації – 20 хв. Реакцію ініціювали введенням до середовища інкубації 40 мкл розчину каліксарену, а зупиняли – додаванням до інкубаційної суміші 1 мл “стоп”-розчину склад якого описаний у пункті 2.2.1. В експериментах використовували початкові концентровані розчини калікс[4]арену **С-107** (4 мМ) в ДМСО, які розводили дистильованою водою до необхідної концентрації.

У цих дослідях використовували три контролі на вміст неорганічного фосфату P_i у середовищі інкубації: 1) на вміст P_i , що був привнесений у середовище інкубації з реактивами (але за умов відсутності АТР та калікс[4]арену в ньому), 2) на вивільнення P_i внаслідок спонтанного гідролізу АТР (у відсутності калікс[4]арену) під час інкубації та 3) на вивільнення P_i при можливому спонтанному розкладі калікс[4]арену (при відсутності АТР) під час

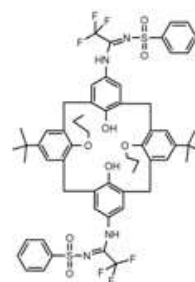
інкубації. Отже, гідроліз АТФ, що стимулювався калікс[4]ареном, розраховували за кількістю P_i , що утворився в середовищі інкубації у присутності калікс[4]арену враховуючи поправку на вміст ендogenous P_i у компонентах середовища інкубації та звільнення фосфату при спонтанному гідролізі АТФ та можливому спонтанному розкладі калікс[4]арену. Кількість продукту реакції P_i визначали методом W. Rathbun et V. Betluch [421].

2.5. Структурні формули, синтез та характеристика досліджуваних калікс[4]аренів.

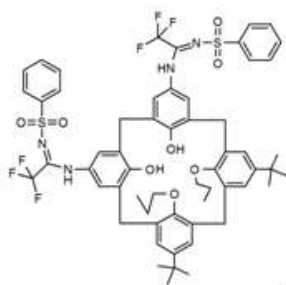
В наших дослідженнях використовувались наступні калікс[4]арени (рис. 2.6, під структурними формулами зазначені шифри):



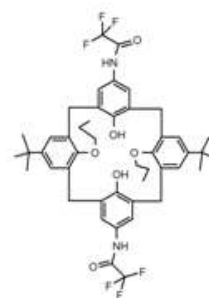
C-90



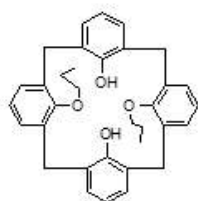
C-716



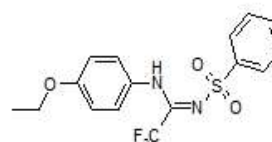
C-772



C-715



«Калікс[4]аренова чаша»
C-150



Сполука М-1

Рис. 2.6. Структурні формули калікс[4]аренів, інгібіторів Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази, та сполуки **М-1**.

Повні хімічні назви калікс[4]аренів, інгібіторів Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази, та сполуки **М-1** (наведених на рис. 2.6):

С-90 (5,11,17,23-тетра(трифторометил(фенілсульфоніліміно)-метиламіно)-25,26,27,28-тетрапропоксикалікс[4]арен);

С-715 (5,17-ди(трифтороацетамідо)-11,23-ди-*трет*-бутил-25,27-дипропокси-калікс[4]арен);

С-716 (5,17-ди(трифторометил(фенілсульфоніліміно)метиламіно)-11,23-ди-*трет*-бутил-25,27-дипропоксикалікс[4]арен);

С-772 (5,11-ди(трифторометил(фенілсульфоніліміно)метиламіно)-17,23-ди-*трет*-бутил-26,27-дипропоксикалікс[4]арен);

С-150 (26,28-дигідрокси-25,27-дипропоксикалікс[4]арен);

М-1 (*N*-(4-етоксифеніл)-*N'*-(фенілсульфоніл)трифторометилацетімідо-амід).

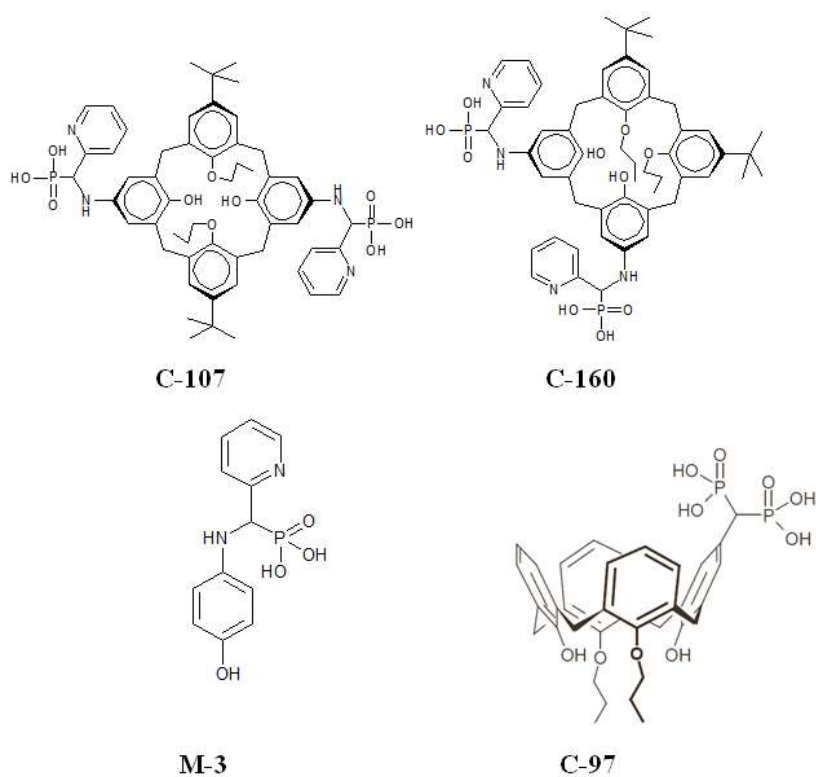


Рис. 2.7. Структурні формули калікс[4]аренів, інгібіторів Na^+, K^+ -АТРази, та сполуки **М-3**.

Повні хімічні назви калікс[4]аренів, інгібіторів Na^+, K^+ -АТРази, та сполуки **М-3** (наведених на рис. 2.7).

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

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

С-160 (5,11-ди(фосфоно-2-піриділметил)аміно-17,23-ди-*трет*-бутил-26,27-дигідрокси-25,28-дипропоксикалікс[4]арен);

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

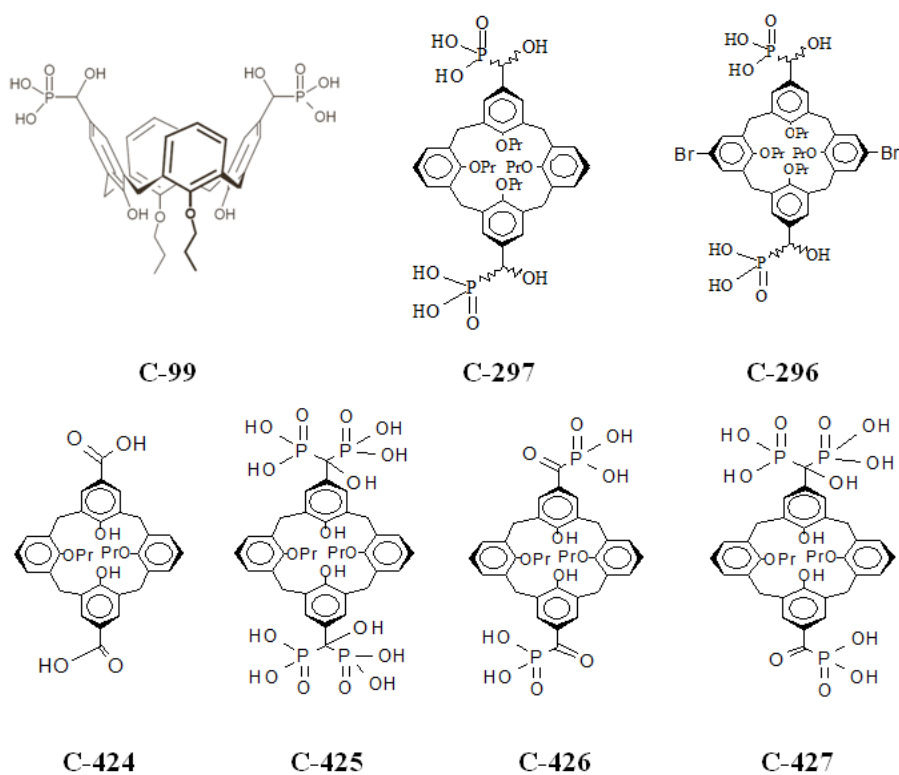


Рис. 2.8. Структурні формули калікс[4]арену **С-99** та його аналогів.

Повні хімічні назви калікс[4]аренів, інгібіторів $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази, та сполуки **М-1** (наведених на рис. 2.8).

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

C-296 (5,17-біс(дигідроксифосфонілметилол)-11,23-дибром-25,26,27,28-тетрапропосикалікс[4]арен);

C-297 (5,17-біс(дигідроксифосфонілметилол)-25,26,27,28-тетрапропосикалікс[4]арен);

C-424 (5,17-дікарбоксил-25,27-дипропосикалікс[4]арен);

C-425 (5,17-біс(1-гідроксиметил-1,1-біс(дигідроксифосфорил)-25,27-дипропосикалікс[4]арен);

C-426 (5,17-біс(1-кето-1-дигідроксифосфорилметил)-25,27-дипропосикалікс[4]арен);

C-427 (5-(1-гідрокси-метил-1,1-біс(дигідроксифосфорил)-17-(1-кето-1-дигідроксифосфорил-метил)-25,27-дипропосикалікс[4]арен).

Всі досліджені нами калікс[4]арени та модельні сполуки **M-1** і **M-3** були синтезовані та охарактеризовані із використанням методів ЯМР та інфрачервоної спектроскопії у відділі хімії фосфоранів Інституту органічної хімії НАН України (під керівництвом зав. відділу – академіком НАН України проф. В.І. Кальченко).

Детальний опис методів синтезу та підтвердження структурної будови всіх калікс[4]аренів методами ядерного магнітного резонансу та інфрачервоної спектроскопії викладений у відповідних роботах: **C-97** – у роботі [460], **C-99** – у роботі [460, 511], **C-107** – у роботі [17], **C-150** – у роботі [267]. Завдяки хіральним атомам вуглецю в обох гідроксиметилфосфонових фрагментах калікс[4]арен **C-99** існує як суміш рацемічної та мезо форми в співвідношенні 50:50.

2.6. Спектрофотометричні дослідження розчинів калікс[4]аренів.

Дослідження проводились на спектрофотометрі СФ-2000 в діапазоні довжин хвиль 190-1100 нм. Так як калікс[4]арен **C-107** погано розчиняється у воді, то спочатку готували його концентрований розчин в ДМСО (4 мМ), який

потім розводили водою до необхідної концентрації калікс[4]арену. Тому спектр поглинання калікс[4]арену **C-107** вимірювали, використовуючи в якості контролю водний розчин ДМСО з концентрацією, аналогічною до концентрації ДМСО у розчині калікс[4]арену **C-107**.

2.7. Дослідження взаємодії калікс[4]арену C-107 з мембранними фрагментами із використанням методу лазерно-кореляційної спектроскопії.

Дані дослідження проводили у творчій співпраці з к.ф.-м.н. Горчевим В.Ф. За допомогою лазерно-кореляційної спектроскопії визначали середні гідродинамічні діаметри та функцію розподілу за розміром везикул плазматичної мембрани міомерія, мікрочастинок утворених калікс[4]ареном **C-107**, а також частинок, що утворюються в результаті взаємодії калікс[4]арену **C-107** з везикулами ПМ. Дослідження калікс[4]арену **C-107** проводили за концентрації 100 мкМ в 2,5 % ДМСО.

2.8. Дослідження мембранотропних ефектів калікс[4]аренів з використанням 8-анілінонафтален-1-сульфонової кислоти.

Інтенсивність флуоресценції зонда АНС визначали на спектрофлуориметрі Quanta Master 40 РТІ (Канада) при 37 °С у середовищі (об'єм – 2 мл), яке містило, мМ: 1 АТФ, 3 MgCl₂, 25 NaCl, 125 KCl, 1 ЕГТА, 20 Нерес-Tris буфер (рН 7,4), 1 NaN₃. Кількість білка мембранної фракції в пробі – 75-150 мкг.

Характеристичними параметрами взаємодії АНС з ліпідними мембранами є спектри флуоресценції за різних концентрацій АНС, уявна константа дисоціації K_d , яка демонструє спорідненість зонда до мембран, та максимальна флуоресценція F_{max} , яка вказує на максимальну кількість сайтів зв'язування АНС з мембранною поверхнею.

Спочатку були визначені довжини хвиль максимумів на спектрах збудження та флуоресценції АНС. Максимум спектру емісії АНС у водному середовищі становив 520 нм, а збудження – 380 нм. Аплікація мембранної фракції суттєво збільшувала квантовий вихід флуоресценції зонда та призводила до зсуву максимумів спектрів поглинання та збудження до 485 нм та 394 нм відповідно, що узгоджується з літературним даними [43]. Оскільки у подальших експериментальних дослідженнях необхідна флуоресцентна відповідь зонда, зв'язаного з мембраною, для подальшого аналізу було використано значення інтенсивності флуоресценції 394 нм та 485 нм для збудження і поглинання відповідно.

Відомо, що для всіх типів клітин характерна автофлуоресценція, яка обумовлена переважно флуоресценцією амінокислотних залишків з ароматичними групами [327], але вона суттєво відрізняється своїми максимумами спектрів та є слабкою, порівняно з флуоресценцією зонда АНС. Натомість калікс[4]арени **C-90** та **C-107** також мають власну флуоресценцію, яка перекривається з спектрами збудження та випромінювання АНС. До того ж у середовищі інкубації за відсутності як мембран, так і калікс[4]аренів, фіксується фоновий рівень флуоресценції. Тому у всіх експериментальних дослідженнях флуоресценція досліджуваного зразка до внесення зонда АНС приймалася за фонову флуоресценцію, і в подальшому її вираховували з флуоресцентної відповіді зонда АНС.

2.9. Молекулярне моделювання комплексу “калікс[4]арен C-107 – АТР”.

Моделювання конформації комплексу між калікс[4]ареном **C-107** та АТР проводили у відділі хімії фосфоранів Інституту органічної хімії НАН України з використанням програми “NupurChem 7.01” [97]. При цьому, виходили з того, що молекула калікс[4]арену **C-107** існує у формі дицвітерйону з протонованими амінними азотами і двома депротонованими гідроксилами фосфонових

фрагментів, а молекула АТР існує у формі тетрааніону. Методом молекулярної механіки (силове поле ММ+) був проведений конформаційний пошук оптимальної геометрії “Господаря”–каліксарену та “Гостя”–АТР. Потім довільним шляхом зближували “Господаря” і “Гостя” і розраховували оптимальну геометрію утворених комплексів. В результаті був відібраний ряд структур комплексів з найменшою загальною енергією. Для порівняння значення загальних енергій цих комплексів, вони також були перераховані напівемпіричним методом (поле CNDO), після чого було вибрано три структури з найменшими загальними енергіями.

2.10. Методи тензометрії.

Вивчення впливу калікс[4]арену **C-90** на процес розслаблення ГМ було виконано у творчій співпраці з д.б.н. О.В. Цимбалюк (Інститут Високих Технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка). Вивчення міотропної спазмолітичної активності калікс[4]арену **C-90** проводили в умовах *in vitro* на поздовжніх смужках рогів матки лабораторних щурів у співпраці з к.б.н. І. Геращенко (відділ фармакології серцево-судинних засобів ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України»).

Використовували смужки міометрія, які омивалися розчином Кребса. Препарат лишали на певний період часу з постійним натягом до появи спонтанних скорочень постійної амплітуди і частоти. Скорочення ініціювали гіперкалієвим розчином.

Калікс[4]арен **C-90** використовували у концентрації 10 мкМ, у розчин вносили з розрахунку введення зазначеної речовини як 1 % від кінцевого об'єму розчину. В інших дослідженнях здійснювали аплікацію досліджуваних сполук в концентрації 100 мкМ/л протягом 15 хв., після чого додавали окситоцин (0,1 МО/мл).

Вивчення механокінетики процесу скорочення-розслаблення м'язових препаратів здійснювали відповідно до методу, описаного раніше [157, 111]. В

цьому методі використовується незалежний від амплітуди скорочення показник – нормована максимальна швидкість розслаблення.

2.11. Методи математичного моделювання.

Враховуючи визначені у вищеописаних дослідях кінетичні параметри чутливості Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ до інгібуючої дії калікс[4]арену **C-90** та використовуючи метод математичного моделювання ми розбудували кількісну модель (в стаціонарному режимі) впливу калікс[4]ареном **C-90** на базальну концентрацію іонів Са в міоцитах матки.

Швидкість роботи (V) Mg^{2+} , АТР-залежної Ca^{2+} -помпи ПМ описується рівнянням Хілла (1):

$$V = \frac{\langle V_{max} \rangle [Ca^{2+}]_e^n}{\langle K_{Ca} \rangle^n + [Ca^{2+}]_i^n}, \quad (1)$$

де $\langle V_{max} \rangle$ – уявна максимальна швидкість транссарколемального викиду іонів Са із клітини, $[Ca^{2+}]_i$ – концентрація внутрішньоклітинного Ca^{2+} , $\langle K_{Ca} \rangle$ – уявна константа активації для іонів Са, n_{Ca} – коефіцієнт Хілла для іонів Са.

Приймаючи до уваги, що за нашими експериментальними результатами коефіцієнт Хілла n_{Ca} наближено рівний 2 (див далі), зміну цитозольної концентрації Ca^{2+} у незбуджених міоцитах матки у часі можна описати рівнянням (2):

$$\frac{d[Ca^{2+}]_i}{dt} = \gamma([Ca^{2+}]_e - [Ca^{2+}]_i) - \frac{\langle V_{max} \rangle \times [Ca^{2+}]_e^2}{\langle K_{Ca} \rangle^2 + [Ca^{2+}]_i^2}, \quad (2)$$

де зменшуване описує базальне надходження іонів Са у клітину через ПМ, спричинене наявністю градієнту ($[Ca^{2+}]_e - [Ca^{2+}]_i$) в залежності від константи швидкості проникності мембрани в даному випадку для іонів Са γ , а від'ємник – це швидкість роботи Mg^{2+} , АТР-залежної Ca^{2+} -помпи ПМ. За стаціонарних умов концентрація Ca^{2+} у клітині не змінюється, тобто

$\frac{d[Ca^{2+}]_i}{dt} = 0$. У цьому випадку рівняння (2) перетворюється на кубічне рівняння

(3):

$$\gamma [Ca^{2+}]_i^3 + (<V_{max} > - \gamma [Ca^{2+}]_e) \times [Ca^{2+}]_i^2 + \gamma <K_{Ca} >^2 [Ca^{2+}]_i - \gamma <K_{Ca} >^2 [Ca^{2+}]_e = 0. \quad (3)$$

Таким чином, розв'язавши це рівняння (3) відносно $[Ca^{2+}]_i$, ми отримаємо залежність базальної концентрації кальцію $[Ca^{2+}]_i$ від константи швидкості проникності мембрани γ , позаклітинної концентрації іонів Ca $[Ca^{2+}]_e$, константи активації для іонів Ca K_{Ca} , та максимальної швидкості роботи помпи V_{max} . Розглянуте нами кубічне рівняння мало три корені, один з яких мав від'ємне значення, два інші були спряженими – значення позитивного кореню співпадало з очікуваним значенням внутрішньоклітинної концентрації кальцію (≈ 100 нМ).

При обчисленні математичної моделі була створена комп'ютерна програма (мова «Groovy»), що виконувала розрахунки із заданим значенням точності. Обрахунок здійснювався на комп'ютері з процесором 2.5 GHz Intel Core i5 (4-ядерний) з пам'яттю 8 GB 1333 MHz DDR3.

2.12. Методи кінетичного аналізу

2.12.1. Аналіз залежностей ензиматичних активностей від концентрації субстрату, іонів-активаторів та ефektorів.

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 [80]:

$$\lg[(V_{max}-V)/V] = n_H \cdot \lg K - n_H \cdot \lg S, \quad (2.2)$$

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 активації K_a (калікс[4]ареном **C-91**) та коефіцієнтів Хілла розраховували із використанням лінеаризованих графіків Хілла відповідно до рівняння:

$$\lg[(V_{\max}-V)/(V-V_0)] = n_H \cdot \lg K_a - n_H \cdot \lg A, \quad (2.3)$$

де V_0 – питома ензиматична активність у відсутності в середовищі інкубації активатора, A – концентрація активатора в середовищі інкубації.

Значення уявної константи інгібування K_i (калікс[4]аренами **C-91** та **C-107**) та коефіцієнтів Хілла розраховували із використанням лінеаризованих графіків Хілла відповідно до рівняння:

$$\lg[(V_{\max} - V)/V] = n_H \cdot \lg I - n_H \cdot \lg K_i, \quad (2.4)$$

де I – концентрація інгібітору в середовищі інкубації.

2.12.2. Аналіз кінетики реакції каліксарен-індукованого гідролізу АТР.

Для аналізу складних кінетичних кривих у відділі біохімії м'язів раніше було запропоновано та апробовано у досліджах метод емпіричного аналізу, що був застосований для кількісної інтерпретації нелінійних біофізичних процесів – скорочення-розслаблення м'язів та внутрішньоклітинної кальцієвої сигналізації [157]. Зазначений метод може бути використаний також для опису динамічних кривих у хімічній кінетиці, які не підпорядковуються закономірностям, що є властивими для реакцій низьких порядків – нульового, першого та другого. Ідея методу полягає у тому, що монотонна кінетична крива, яка, у випадку складних хімічних та фізико-хімічних процесів, часто густо є S-подібною і має тенденцію до виходу на плато (у часі), може бути успішно лінеаризована у координатах $\{\ln[p/(p_{\max} - p)]; \ln t\}$ відповідно до емпіричного рівняння:

$$\ln[p/(p_{\max} - p)] = n \cdot \ln t - n \cdot \ln \tau, \quad (2.5)$$

де p та p_{\max} – миттєва (у момент часу t) та максимальна (“платова”) кількість продукту реакції відповідно, $n = d \ln[p/(p_{\max} - p)] / d \ln t$ – логарифмічний декремент крутизни кінетичної кривої (характеризує відхилення її ходу від гіперболічного, у випадку якого $n = 1$), τ – характеристичний час (“період напівнасичення”) реакції. Величина $\ln t$ розраховується із значення відрізка, що перетинається лінеаризованим графіком на вісі абсцис, а параметр n визначається за тангенсом кута нахилу цього графіка. Згідно з виразом 2.5 для миттєвої швидкості реакції $v = (dp/dt)$ після диференціювання будемо мати для будь-якого моменту часу t :

$$v = p_{\max} [n \cdot \tau^n \cdot t^{n-1} / (\tau^n + t^n)^2]. \quad (2.6)$$

Часова точка $t = \theta$, яка відповідає “точці перегину” кінетичної кривої (координати цієї точки – $[p_\theta; \theta]$), може бути визначена відповідно до умови: $(dv/dt)_{t=\theta} = 0$. Тоді, згідно рівняння (2.6), для значення часової абсциси “точки перегину” θ (відповідає максимальній величині миттєвої швидкості $V = v_{t=\theta}$) будемо мати:

$$\theta = [(n-1)/(n+1)]^{1/n} \cdot \tau. \quad (2.7)$$

Підставляючи вираз для θ замість t в рівняння (2.6) можемо одержати співвідношення для максимальної миттєвої швидкості $V = (dp/dt)_{t=\theta}$ хімічного процесу:

$$V = (p_{\max}/4n \cdot \tau) \cdot [(n-1)^{(n-1)/n} \cdot (n+1)^{(n+1)/n}]. \quad (2.8)$$

Таким чином, використання вищеописаного методу, відповідно до рівнянь (2.5), (2.7) та (2.8), дає змогу визначити низку важливих емпіричних параметрів реакції: платове значення накопичення продукту реакції p_{\max} , логарифмічний декремент крутизни кінетичної кривої n , характеристичний час реакції τ , θ – час, в який спостерігається максимальне значення миттєвої швидкості реакції, V – максимальну миттєву швидкість реакції; ці параметри вичерпно характеризують кінетику хімічного перетворення, що описується монотонною кривою, яка не відповідає закономірностям хімічних процесів низьких порядків і для якої є властивою тенденція виходу “на плато” (у часі). Серед цих параметрів слід вважати найбільш важливими і зручними у

користуванні саме платове (максимальне) значення p_{\max} накопичення продукту та максимальну миттєву швидкість реакції.

Кінетичні розрахунки проводили з допомогою програмного забезпечення “MS Office” на персональному комп’ютері IBM PC. Стандартні значення показника достовірності апроксимації лінеаризованих графіків становили 0,90-0,99.

2.13. Комп’ютерне моделювання взаємодії калікс[4]сарену C-107 і його модельних сполук з ліганд-зв’язувальними ділянками Na^+ , K^+ -АТРази плазматичної мембрани.

Дані дослідження проводили у співпраці з к.б.н. Бевзою О.В. Комп’ютерне моделювання взаємодії лігандів (C-107 та модельних сполук) з рецептором (Na^+ , K^+ -АТРаза) виконано за допомогою програми AutoDock, версія 4.1 [173].

У дослідженнях використовували просторову структуру Na^+ , K^+ -АТРази з ідентифікатором 3A3Y в RSCB PDB [452], яка відповідає структурі ензиму в трансмембранному положенні в конформації P-E₂.

Для попередньої “підготовки” молекул застосовували також AutoDockTools. Проводили по 100 запусків ламарківського генетичного алгоритму за розміру покоління 100 і максимальної кількості оцінок енергії 1000 000. Для аналізу результатів та підготовки рисунків із результатами докінгу використовували програми “Chimera” [335] та “Yasara” [319].

Для з’ясування можливих механізмів пригнічувальної дії інгібіторів (калікс[4]арену C-107 та модельних сполук) було проведено комп’ютерне моделювання їх взаємодії з ліганд-зв’язувальними ділянками (ЛЗД) Na^+ , K^+ -АТРази ПМ. Процедуру докінгу в ЛЗД ензиму було виконано для лігандів із повністю іонізованими фосфонатними залишками. Конформації макроциклів зберігалися у вигляді конуса. Як параметри іонів металів оцінювали стандартні характеристики силового поля AMBER. За моделювання взаємодії між лігандами (калікс[4]арен C-107 і модельні залишки) та рецептором (Na^+ , K^+ -

АТРаза) здійснювали т.з. “напівгнучкий докінг”, тобто програма докінгу враховувала рухливість молекули ліганда, а не рецептору.

При розрахунку мінімальної енергії зв'язування враховувались ван-дер-ваальсові та електростатичні взаємодії, водневі зв'язки, гідрофобні взаємодії, а також внесок енергії десольватації. Відбір оптимальних результатів проводили за визначенням положення ліганда в комплексі “рецептор - ліганд”, та за енергетичними показниками, використовуючи вбудовані в програмі докінгу функції розрахунку енергії зв'язування в комплексі “рецептор – ліганд”. В результаті був відібраний ряд комплексів з найменшою загальною енергією, і далі розраховували оптимальну геометрію утворених комплексів. При цьому визначали найбільш енергетично вигідне розташування лігандів (інгібіторів) у просторі ЛЗД макромолекули Na^+, K^+ -АТРази.

2.14. Методи статистичного аналізу

Експериментальні дані обробляли загальноприйнятими методами варіаційної статистики [57, 71].

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 Стьюдента (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.

2.15. Матеріали і реактиви

В роботі були використані такі реактиви: DMSO, АТР, Нерес, убаїн, тапсигаргін, CaCl_2 , бичачий сироватковий альбумін, дигітонін (“Sigma”, США), Tris (“Reanal”, Угорщина), ЕГТА, $\text{DiOC}_6(3)$ (“Fluka”, Швейцарія). Інші реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації ч.д.а. та х.ч.

Препарати калікс[4]аренів та сполук М-1 і М-3 були синтезовані та люб’язно надані акад. НАНУ Кальченком В.І. та його колегами (Інститут органічної хімії НАН України).

Розчини сполук, що використовували у дослідах, готували на бідистильованій воді, яка мала питому електропровідність не більше 1,5 мкСм/см. Електропровідність води реєстрували за допомогою кондуктометра ОК-102/1 (Угорщина).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

РОЗДІЛ 3. ДОСЛІДЖЕННЯ МЕМБРАНОТРОПНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ КАЛІКС[4]АРЕНІВ

На початку наших досліджень ми вивчали деякі мембранотропні властивості калікс[4]аренів в системі “калікс[4]арени – везикули ПМ ГМК”. Адже калікс[4]арени, що ми вивчали, мають гідрофобні властивості. Тому можливо, що їхні ефекти частково або повністю опосередковуються взаємодією з мембранами.

3.1. Дія калікс[4]арену С-107 на гідродинамічний радіус везикул плазматичних мембран.

Спочатку, за допомогою методу ЛКС, ми охарактеризували фракцію ПМ за розмірами везикул (див. розділ методи дослідження). Потім за допомогою цього методу досліджували дію калікс[4]арену **С-107** на гідродинамічні показники везикул ПМ у суспензії. У контрольних дослідах перевіряли наявність у розчинах ДМСО та калікс[4]арену **С-107** мікрочастинок, що розсіюють світло. Як показали результати експериментів, 100 мкМ розчин калікс[4]арену **С-107** в 2,5 % ДМСО містить мікрочастинки з різними розмірами від 100 нм до 10 мкм (рис. 3.1). У 2,5 % розчині ДМСО світлорозсіюючих частинок не виявлено (дані не наведено).

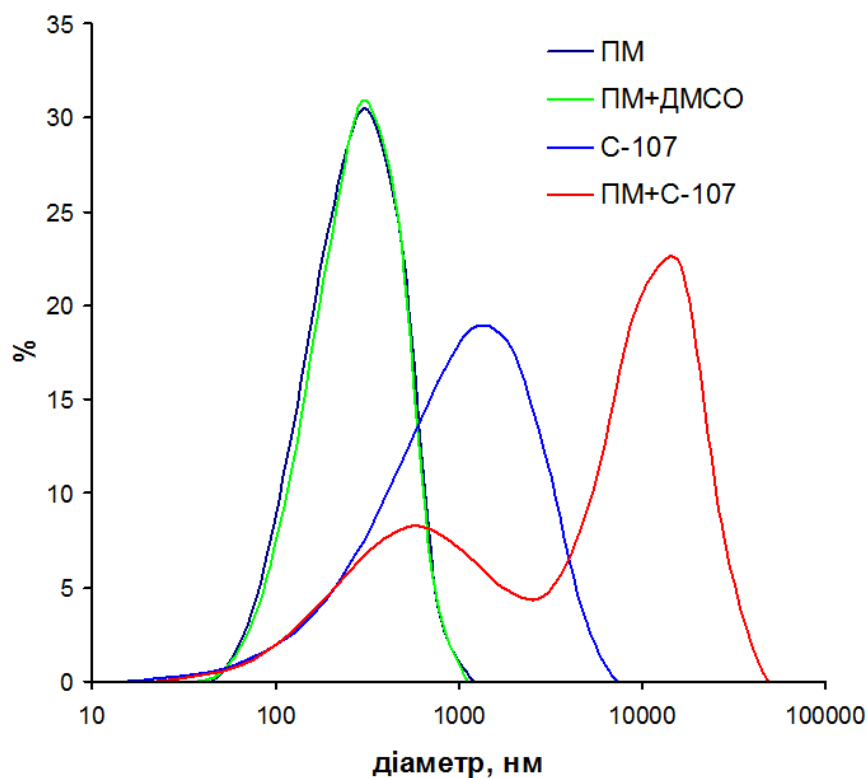


Рис. 3.1. Розподіл за гідродинамічним діаметром везикул ПМ оброблених розчином калікс[4]арену **C-107** (100 мкМ) (типові результати).

Згідно з даними літератури, деякі амфіфільні каліксарени, розчинені в органічному розчиннику, при подальшому розчиненні у воді утворюють мікрочастинки, розміри яких залежать від складу розчину. Такі системи розглядаються дослідниками як транспортна форма каліксаренів при інтравенозному їх застосуванні в якості можливих фармакологічних агентів [259]. Звичайно ж присутність таких частинок ускладнює аналіз результатів взаємодії каліксарену із мембранами в цьому діапазоні розмірів, але можна стверджувати, що після такої взаємодії утворюється певна кількість частинок з розмірами більше 10 мкм (рис. 3.1). Таким чином, у присутності каліксаренів відбувається агрегація везикул між собою або з мікрочастинками каліксарену. У літературі описано також злиття міцел каліксаренів з ліпідними мембранами [284], тому такий шлях збільшення гідродинамічного діаметру везикул також можливий.

3.2. Дія калікс[4]арену С-99 на K^+ -дифузійний трансмембранний потенціал у системі “ K^+ /валіноміцин – везикули плазматичних мембран”.

Згідно даним літератури, Na^+, K^+ -АТРаза бере участь в генерації трансмембранного потенціалу [86], а Mg^{2+} -АТРаза - у транспортуванні H^+ та регуляції провідності іонів Cl [398]. Описані також іонофорні властивості деяких каліксаренів, які тим самим опосередковують транспорт іонів крізь мембрану канальним [207], або човниковим механізмом [291], а також впливають на функціонування каналів [443, 454]. Приймаючи до уваги, що такі сполуки будуть впливати на величину трансмембранного потенціалу та активності ензимів, що залежать від потенціалу, ми провели дослідження можливого мембранотропного впливу калікс[4]аренів на везикулах ПМ з штучно створеним K^+ -дифузійним трансмембранним потенціалом у системі K^+ /валіноміцин – везикули ПМ. Ми реєстрували потенціал з допомогою потенціалчутливого флуоресцентного зонда $DiOC_6(3)$ і насамперед дослідили спектральні характеристики даного зонда та вплив калікс[4]аренів на його спектри збудження та флуоресценції. Показано, що цей зонд має два максимуми спектру збудження – 450-455 та 488 нм, максимум спектру флуоресценції 500 нм. При внесенні до інкубаційного середовища суспензії везикул сарколеми міометрія та валіноміцину відбувається значне зростання флуоресценції та зсув максимуму флуоресценції зонда до 506 нм (рис. 3.2 б).

Тому дослідження на протоковому цитофлуориметрі проводили при $\lambda_{зб} = 488$ нм, $\lambda_{фл} = 506$ нм. При внесенні калікс[4]аренів **С-99** та **С-107** (100 мкМ) спостерігалось гасіння флуоресценції зонда за умов відсутності трансмембранного потенціалу. При цьому зміни положення піків довжини хвилі збудження та флуоресценції не відбувається (рис. 3.2).

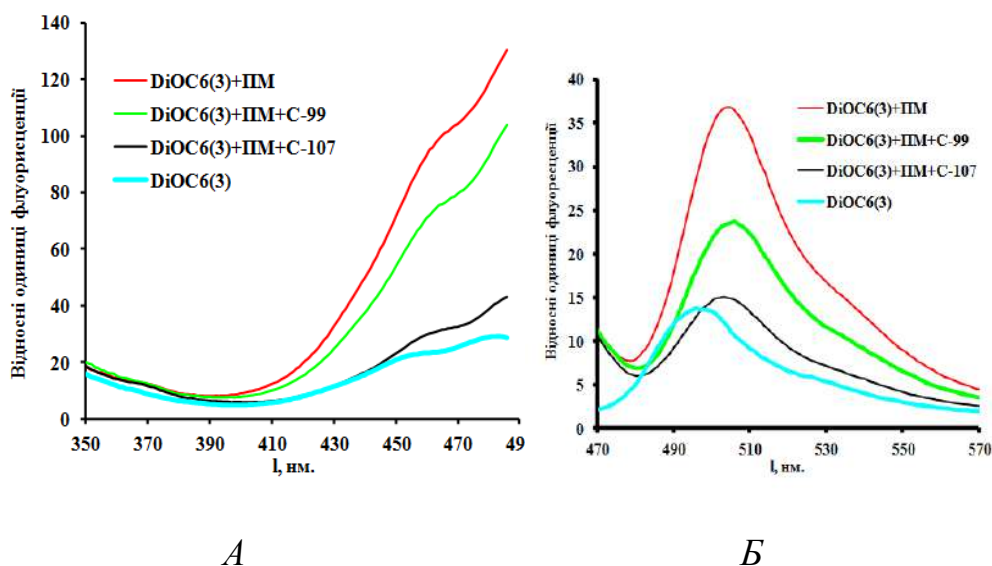


Рис. 3.2. Спектр збудження (А, $\lambda_{\text{фл}} = 506$ нм) та спектр флуоресценції (Б, $\lambda_{\text{зб}} = 450$ нм) зонда DiOC₆(3) за дії 100 мкМ калікс[4]аренів **C-99** та **C-107**.

Далі ми за допомогою методу протокової цитометрії вивчали вплив калікс[4]аренів на K⁺-дифузійний трансмембранний потенціал у системі “K⁺/валіноміцин – везикули ПМ” ($\lambda_{\text{зб}} = 488$ нм, $\lambda_{\text{фл}} = 506$ нм). Так як гасіння інтенсивності флуоресценції зонда калікс[4]ареном **C-99** було меншим порівняно з гасінням калікс[4]ареном **C-107**, дослідження на протоковому цитофлуориметрі проводили лише з калікс[4]ареном **C-99**. Ефект значного зниження інтенсивності флуоресценції також спостерігали за умов відсутності градієнту іонів К ($[K^+]_i/[K^+]_e=300\text{мМ}/300\text{мМ}$), тобто відсутності трансмембранного потенціалу (рис. 3.3, а). По мірі зростання потенціалу вплив калікс[4]арену **C-99** на інтенсивність флуоресценції DiOC₆(3) відображався зменшенням гасіння флуоресценції зонда, а за умов десятикратного градієнту концентрації іонів К ($[K^+]_i/[K^+]_e=300\text{мМ}/30\text{мМ}$), що відповідає розрахунковому потенціалу -58 мВ, ефект гасіння не спостерігався (рис. 3.3, б).

З наведених даних видно, що після додавання калікс[4]арену **C-99** профіль флуоресценції не зазнає значних змін, а у випадку представленому на рис. 3.3, б профіль флуоресцентної відповіді зонда не змінюється взагалі.

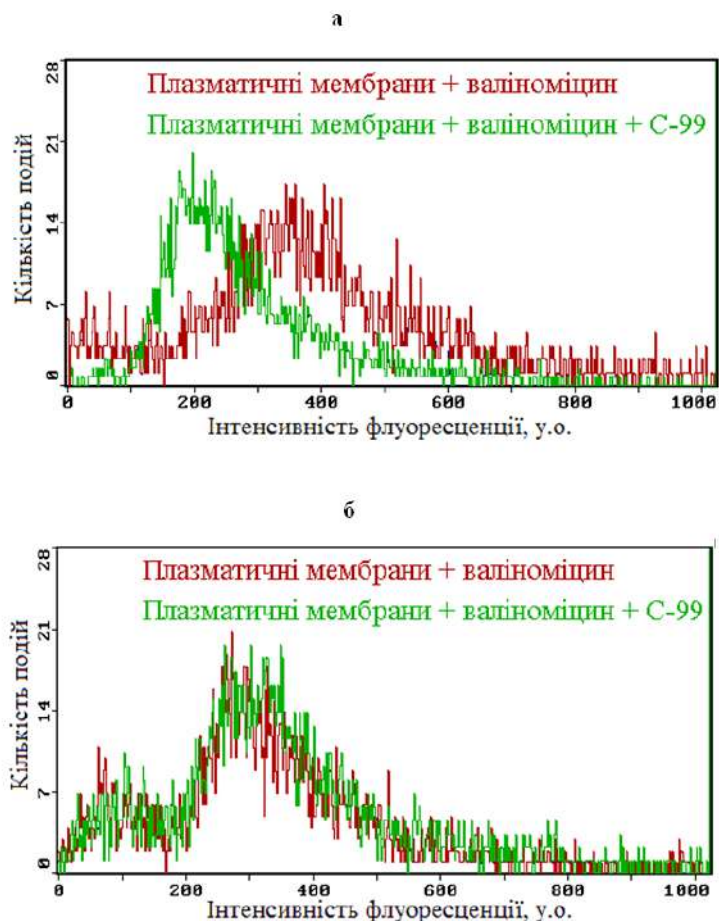


Рис. 3.3. Вплив калікс[4]арену С-99 на інтенсивність флуоресценції потенціалчутливого зонда $DiOC_6(3)$ за відсутності (а) та наявності (а) трансмембранного потенціалу (-58 мВ) на везикулах ПМ (типові експерименти).

Беручи до уваги ефект гасіння флуоресценції зонда калікс[4]аренами, ми не можемо відкалібрувати флуоресцентну відповідь зонда за потенціалом, а можемо стверджувати лише про якісні зміни в системі K^+ /валіноміцин – ПМ. Якщо порівнювати лише абсолютні значення флуоресценції зонда після додавання калікс[4]арену **С-99**, то у випадку відсутності впливу калікс[4]арену **С-99** на мембранний потенціал слід було б очікувати аналогічне зниження флуоресцентної відповіді зонда за умов наявності потенціалу. Проте, як ми можемо відмітити, при створенні на мембранних везикулах штучного потенціалу абсолютне значення пікової інтенсивності флуоресценції зростає (рис. 3.3), що вказує на зниження потенціалу, адже $DiOC_6(3)$ належить до ціанових зондів, флуоресцентна відповідь яких знижується із зростанням

трансмембранного потенціалу внаслідок концентрування в середині везикул, що в свою чергу приводить до гасіння флуоресценції [60]. Тобто можна припустити, що зниження ефекту гасіння флуоресценції калікс[4]ареном **C-99** свідчить про зниження мембранного потенціалу можливо завдяки відомим з літератури іонофорним властивостям каліксаренів [207, 291]. Але ефект гасіння флуоресценції зонда за відсутності потенціалу не дає змоги однозначно оцінити взаємодію калікс[4]арену **C-99** з везикулами ПМ, і тому можна лише впевнено стверджувати, що вплив калікс[4]арену **C-99** на флуоресцентну відповідь потенціалчутливого зонда DiOC₆(3) залежить від поляризації мембрани.

Отже, калікс[4]арени **C-99** та **C-107** здатні проявляти мембранотропні ефекти і, таким чином, опосередковано впливати на АТФ-гідролазні мембранозв'язані ензими, активність яких залежить від структурно-функціонального стану мембран. Na⁺,K⁺-АТРаза є саме таким ензимом [93], тому не виключається, що такий вплив дає певний внесок у модифікування її активності.

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

Важливим питанням для нас є вивчення можливості 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 при довжині хвилі 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 (дані

не наведено), а також суттєво перекривався з автофлуоресценцією власне суспензії клітин [327].

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. 3.4). Це дозволило нам використати калікс[4]арен **C-107** для проведення подальших експериментальних робіт на конфокальному мікроскопі.

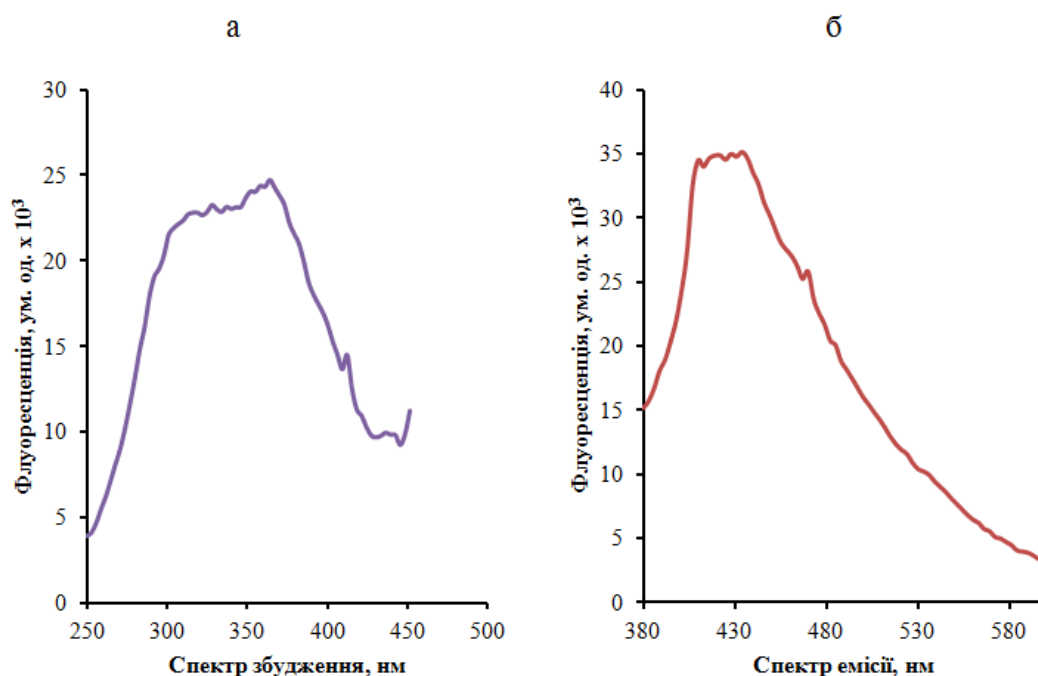


Рис. 3.4. Спектр збудження та емісії калікс[4]арену C-107: (а) – при збудженні на довжині хвилі 363 нм, (б) – при емісії на 470 нм.

Експерименти проводили на іммобілізованих на полі-L-лізині 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.

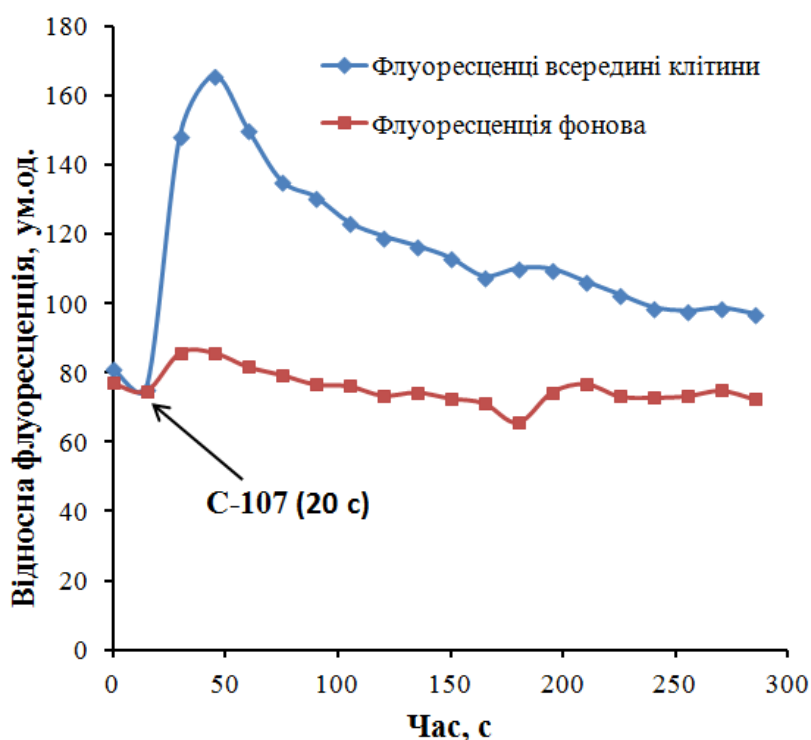


Рис. 3.5. Кінетика флуоресценції ГМК на конфокальних зображеннях до та після додавання 50 мкМ калікс[4]арену **C-107** (30 с, позначено стрілкою). $\lambda_{зб} = 405$ нм., $\lambda_{фл} = 420$ нм. Наведено результати типового експерименту.

Ми вважаємо, що швидке підвищення флуоресценції в середині ГМК, порівняно з фоною флуоресценцією (рис. 3.5), 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 амфіфільним 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 [305], у той час як водні розчини гасять флуоресценцію [302]. Таким чином, калікс[4]арен **C-107** може проникати крізь мембрани.

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. Варто зазначити, що ефективність цих процесів для вказаних калікс[4]аренів може відрізнятися.

3.4. Рідинно-кристалічний стан плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин за дії калікс[4]аренів C-107 та C-90.

На функціонування Na^+, K^+ -АТРази може суттєво впливати рідинно-кристалічний стан мембран і склад аннулярних ліпідів [35]. Тому мембранотропні ефекти калікс[4]арену **C-107**, який є високоефективним та селективним інгібітором Na^+, K^+ -АТРадної активності [64], може бути суттєвим фактором впливу на активність зазначеного трансмембранного білка.

Для того, щоб дослідити мембранотропний вплив калікс[4]аренів ми використали флуоресцентний зонд АНС, котрий, згідно даних літератури даних, добре розчиний у буферних розчинах, легко взаємодіє із ліпопротеїдами і може використовуватися для вивчення поверхневих властивостей мембрани [108].

АНС використовується для дослідження поверхонь мембран і білків, та флуоресціює тільки за присутності у розчині фосфоліпідних везикул або білків [293]. Зазначений зонд нековалентно зв'язується з полярними голівками фосфатидилхоліну, при цьому не суттєво порушуючи структуру мембрани.

Флуоресценція АНС зворотньопропорційна до негативного поверхневого потенціалу на мембрані, тобто його зменшення покращує зв'язування АНС та його флуоресценцію [456]. Таким чином, зміни флуоресцентного сигналу вказують на можливі зміни композиції мембрани або її поверхневого потенціалу. До того ж відомо, що АНС використовують для вивчення взаємодії цільових молекул з мембранною поверхнею, що визначають за зміною рівня флуоресценції (F_{max}) [361].

Вивчення мембранотропного впливу калікс[4]аренів за допомогою флуоресцентних зондів є непрямим методом дослідження і тому не можна виключати безпосереднього впливу калікс[4]аренів на флуоресценцію зонда. З огляду на те, що для калікс[4]аренів характерна автофлуоресценція, важливим етапом проведення експериментальних дослідження є визначення впливу калікс[4]арену **C-107** на флуоресценцію зонда за умов відсутності мембран у середовищі інкубації. Як видно на рис. 3.6а флуоресценція зонда за відсутності та присутності каліксарену **C-107** в концентраціях 50 та 100 мкМ майже однакова у широкому діапазоні концентрацій АНС. Тобто, калікс[4]арен **C-107** безпосередньо не впливає на флуоресценцію АНС за вищевказаних умов і тому зазначений зонд придатний для використаний для дослідження мембранотропного впливу калікс[4]арену **C-107**.

Для того, щоб охарактеризувати взаємодію АНС з мембранами та вплив калікс[4]аренів на таку взаємодію ми визначали спектри флуоресценції за різних концентрацій АНС та розраховували характеристичні параметри, а саме уявну константу дисоціації K_d , що демонструє спорідненість зонда до мембран, та максимальну флуоресценцію F_{max} , що вказує на максимальну кількість сайтів зв'язування АНС на поверхні мембрани.

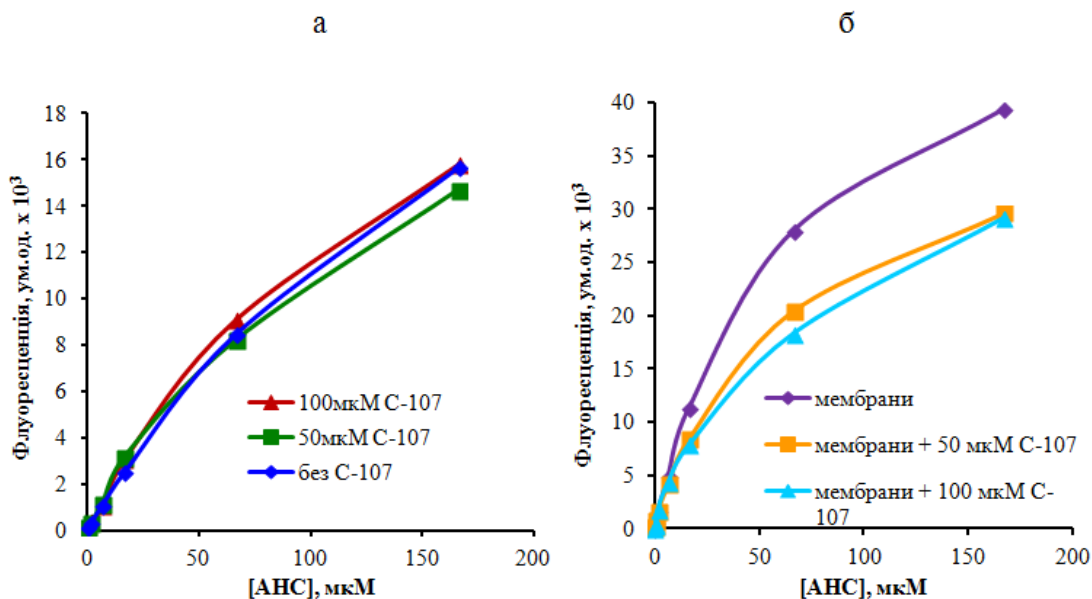


Рис. 3.6. Вплив калікс[4]арену **C-107** на залежність флуоресценції зонда АНС від його концентрації за присутності (а) та відсутності (б) мембранної фракції. Наведено результати типового експерименту.

При внесенні везикул ПМ за присутності калікс[4]арену **C-107** відбувається гасіння флуоресценції зонда АНС, використаного за різних концентрацій (рис. 3.6б) – максимум флуоресценції (F_{max}) зонда 55698, 39265, 36536 ум. од. при застосуванні калікс[4]арену **C-107** у концентрації 0, 50 та 100 мкМ відповідно. При цьому використання двох концентрацій 50 та 100 мкМ калікс[4]арену **C-107** зумовлювало майже однаковий ефект. Криві залежностей флуоресценції АНС від його концентрації мають тенденцію до насичення та добре лінеаризуються в координатах Скетчарда, на основі чого було розраховано параметр K_d .

Отримані значення уявної константи дисоціації K_d (67, 58 а 54 мкМ для 0, 50 та 100 мкМ **C-107** відповідно) вказують на несуттєві зміни спорідненості мембран до АНС у присутності **C-107**. Натомість максимальний рівень флуоресценції зонда знижується за присутності калікс[4]арену **C-107** у 1,5 рази: від 67 мкМ за відсутності калікс[4]арену **C-107** до 58 та 54 у випадку 50 і 100 мкМ відповідно. Відмічені зміни вказують на зниження кількості центрів взаємодії з зондом на поверхні ПМ. Це може бути зумовлено перебудовою

мембранної структури таким чином, що змінюється доступ кількості сайтів взаємодії мембрани з АНС, без зміни спорідненості інших сайтів до зонда. Тому можна припустити, що під впливом калікс[4]арену **C-107** змінюється полярність та/або поверхневий заряд ПМ.

Аналогічним чином були проведені дослідження мембранотропних властивостей калікс[4]арену **C-90**. Оскільки вплив калікс[4]арену **C-107** у різних концентраціях на флуоресценцію був майже однаковим, у випадку калікс[4]арену **C-90** ми вирішили використати у його дослідженнях лише одну максимальну концентрацію 100 мкМ. На відміну від калікс[4]арену **C-107**, калікс[4]арен **C-90** здатен безпосередньо впливати на флуоресценцію АНС за відсутності мембранної фракції у середовищі інкубації (рис. 3.7).

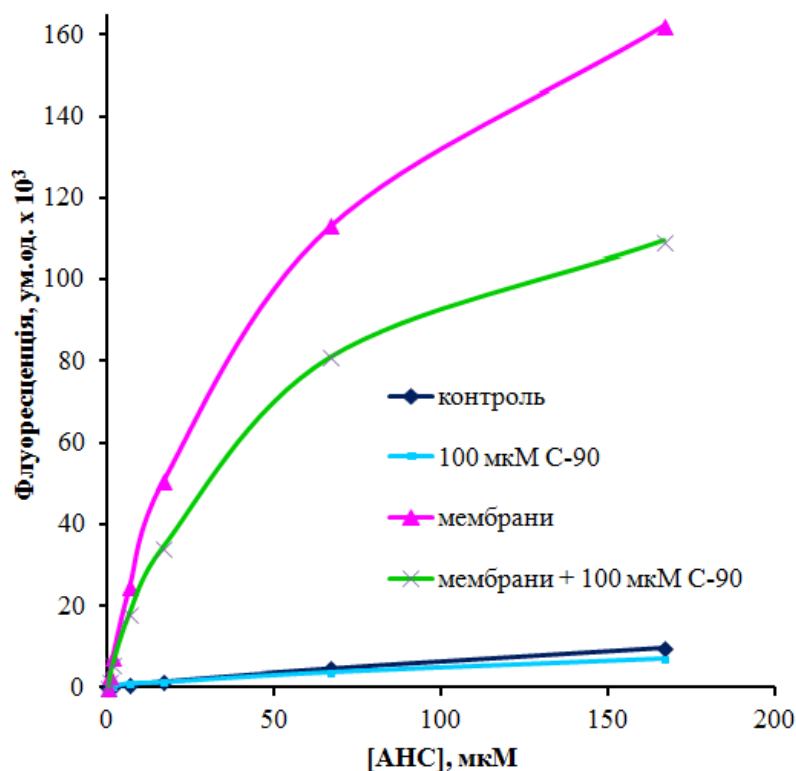


Рис. 3.7. Ізотерми Ленгмюра у випадку процесу зв'язування зонда АНС з ПМ міоцитів. Вплив калікс[4]арену C-90 на флуоресценцію зонда АНС в залежності від його концентрації. Вплив калікс[4]арену C-90 на флуоресценцію зонда АНС, залежно від його концентрації. Наведено результати типового експерименту.

Для підсилення різниці у флуоресценції зв'язаного та вільного зонда було

збільшено вдвічі кількість мембранної фракції у досліджуваних зразках (з 75 мкг до 150 мкг білка у пробі).

Як видно з рис. 3.7 вплив калікс[4]арену **C-90** на флуоресценцію АНС є досить подібним до впливу калікс[4]арену **C-107** (рис. 3.6б). При цьому зміни уявної константи дисоціації K_d відсутні (38 мкМ як за відсутності, так і за умов аплікації 100 мкМ калікс[4]арену **C-90**), а максимальна флуоресценція зонда F_{max} знижується також у 1,5 рази під впливом калікс[4]арену **C-90** (з 186053 ум. од у контролі до 128479 ум. од у випадку внесення 100 мкМ калікс[4]арену **C-90**). Тому однаковий ефект у калікс[4]арену **C-107** та **C-90** дозволяє висловити такі ж припущення і щодо змін мембранного мікрооточення.

Отже, отримані результати вказують на можливі зміни як рідинно-кристалічного стану мембран, так і їх поверхневого заряду під впливом калікс[4]аренів **C-107** та **C-90**, що в свою чергу, може опосередковано впливати на Na^+, K^+ -АТРазну та Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРазну активність відповідно.

Приймаючи до уваги те, що Mg^{2+} , АТР-залежна Ca^{2+} -помпа ПМ є високоафінним щодо Ca^{2+} білком, що видаляє його з цитоплазми, а також відіграє ключову роль, у випадку ГМК, в регуляції процесів скорочення/розслаблення м'язів, у подальшому ми вивчали дію калікс[4]аренів на ензиматичну та транспортну активність цієї помпи.

Результати, викладені у розділі, опубліковано в наступних роботах: [30, 64].

РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ КАЛІКС[4]АРЕНІВ НА ЕНЗИМАТИЧНУ АКТИВНІСТЬ $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ КЛІТИН МІОМЕТРІЯ

4.1. Дія калікс[4]арену С-90 на активність АТР-гідролаз плазматичної мембрани.

У результаті попередніх скрінінгових досліджень щодо впливу калікс[4]аренів на Mg^{2+} -залежні АТР-гідролазні активності у фракції ПМ клітин міометрія ми встановили, що саме калікс[4]арен **С-90** (5,11,17,23-тетра(трифтор)метил-(фенілсульфоніліміно)метиламіно-25,26,27,28-тетра-пропоксикалікс[4]арен) в концентрації 100 мкМ ефективно пригнічує $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазну активність ПМ клітин міометрія до рівня $25,1 \pm 0,5$ % відносно контрольного значення (прийнятого за 100 %) ($M \pm m$; $n = 5$) (рис. 4.1).

На препараті очищеної солюбілізованої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази показано інгібування її активності цим калікс[4]ареном до $32,2 \pm 2,3$ % ($M \pm m$; $n = 5$).

Водночас ця сполука, використана в такій ж самій концентрації, практично не впливала на ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази і “базальної” Mg^{2+} -АТРази ПМ: відповідні активності становили $94,2 \pm 0,6$ і $107,7 \pm 1,0$ % щодо контрольного значення (рис. 4.1). Тобто на рівні ПМ калікс[4]арен С-90 є селективним інгібітором транспортної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази. Чутлива до дії протонифору СССР акумуляція іонів Са в мітохондріях міометрія виявилась практично резистентною до дії зазначеного калікс[4]арену [425].

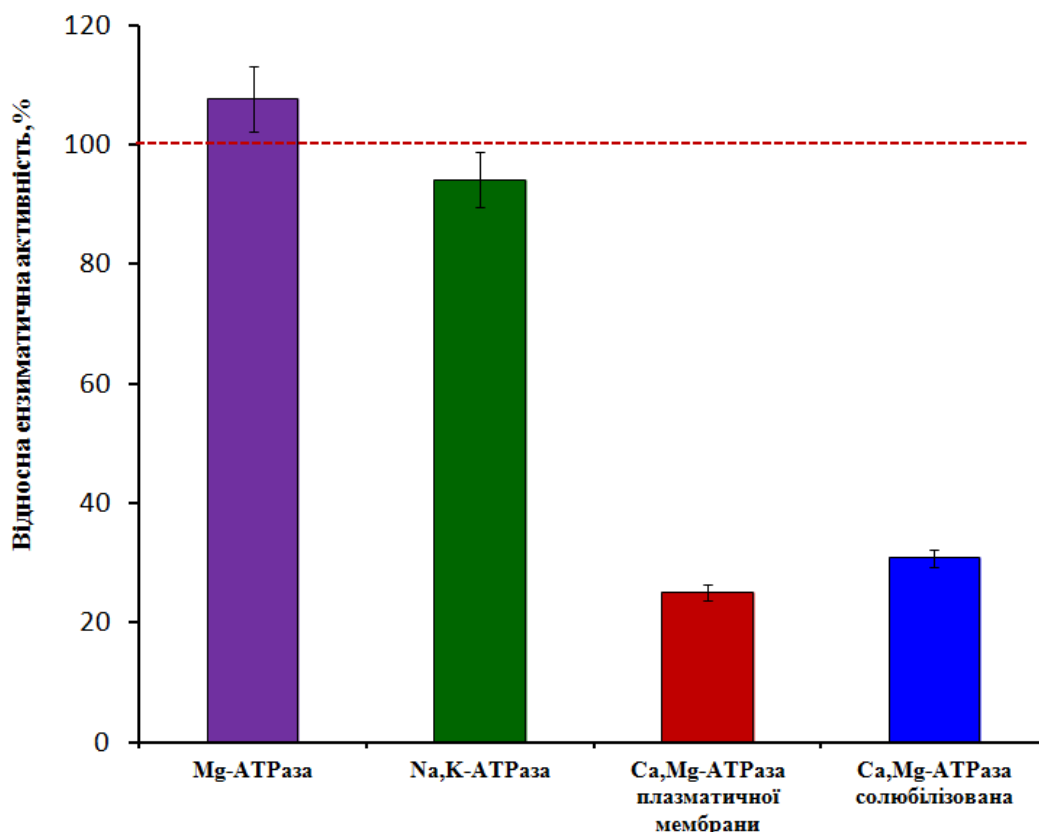


Рис. 4.1. Вплив калікс[4]арену **C-90** (100 мкМ) на АТФ-гідролазну активність фракції ПМ клітин міометрія ($M \pm t$, $n = 5$).

За 100 % прийнято значення питомої ензиматичної активності за відсутності калікс[4]арену **C-90** у середовищі інкубації.

Отже, калікс[4]арен **C-90** використаний у концентрації 100 мкМ ефективно інгібував активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази як у фракції ПМ міоцитів матки, так і в препараті очищеної солюбілізованої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази. При цьому він не впливав на активність інших АТФ-гідролаз ПМ. Отже, калікс[4]арен **C-90** селективно пригнічує активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ і не впливає на активність Na^+, K^+ -АТРази, Mg^{2+} -АТРази ПМ.

У наших подальших дослідженнях, ми вивчали концентраційну залежність інгібувальної дії калікс[4]арену **C-90** ($10^{-8} - 10^{-4}$ М) на активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази у фракції ПМ (рис. 4.2А).

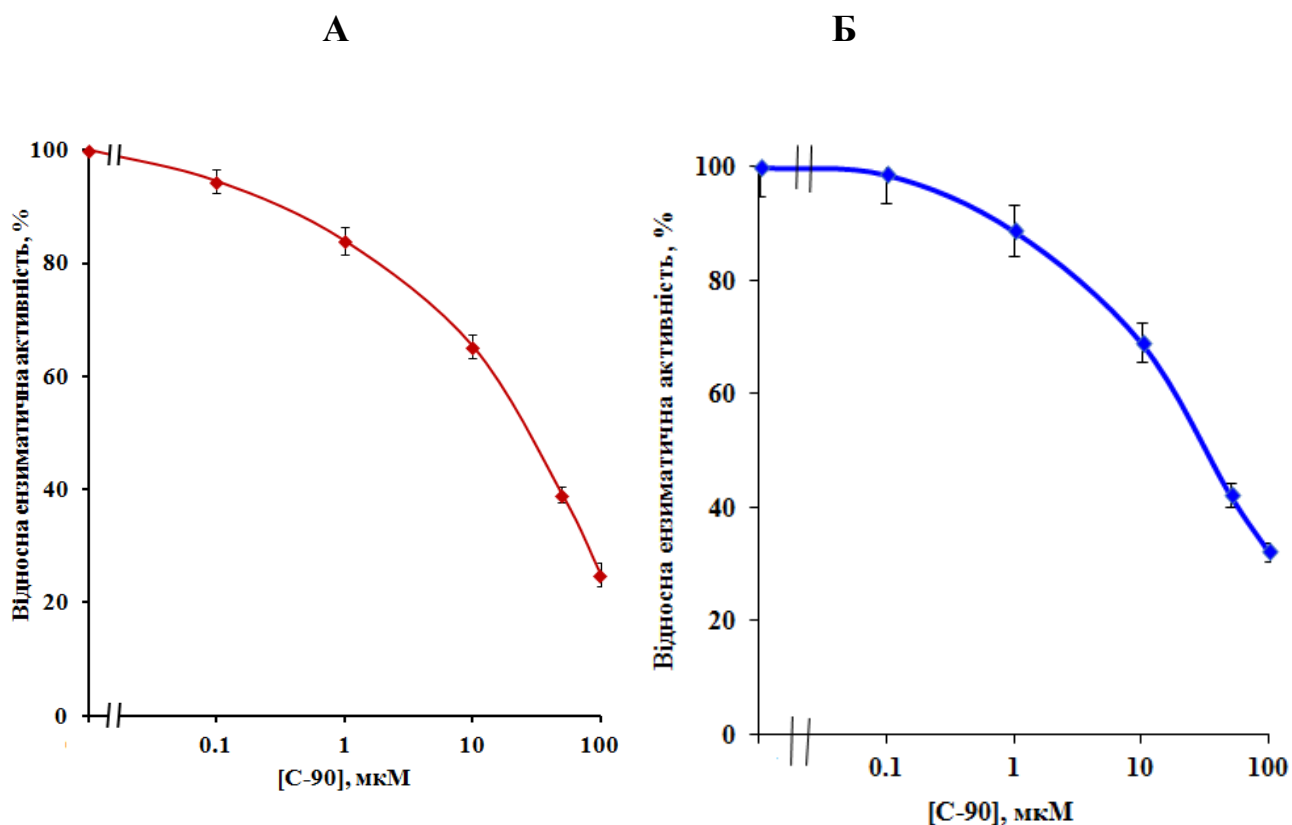


Рис. 4.2. Дія калікс[4]арену **C-90** на $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазну активність фракції ПМ клітин міометрія (А) та препарату очищеного солюбілізованого ензиму(Б) ($M \pm m$, $n = 5$).

За 100 % прийнято значення питомої ензиматичної активності у відсутності калікс[4]арену **C-90** у середовищі інкубації.

Показано, що калікс[4]арен **C-90** ефективно та дозозалежно пригнічує $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазну активність, величина коефіцієнта інгібування $I_{0,5}$ становить $20,2 \pm 0,5$ мкМ, значення коефіцієнта Хілла n_H становило $0,55 \pm 0,02$ ($M \pm m$; $n = 5$) (таблиця 4.1). Аналогічно калікс[4]арен **C-90** дозозалежно пригнічував АТР-гідролазну активність у випадку препарату очищеної солюбілізованої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази (рис. 4.2Б), величина $I_{0,5}$ становила $34,6 \pm 6,4$ мкМ, значення $n_H = 0,67 \pm 0,05$ ($M \pm m$; $n = 5$) (таблиця 4.1).

Табл. 4.1. Кінетичні характеристики дії калікс[4]арену С-90 на питому ензиматичну активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази у фракції плазматичних мембран клітин міометрія та препарату очищеного солюбілізованого ензиму ($M \pm m; n = 5$).

	Уявна константа інгібування, $I_{0,5}$	Коефіцієнт Хіла, n_H	% інгібування при концентрації С-90 (100 мкМ)
$\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза ПМ	$20,2 \pm 0,5$ мкМ	$0,55 \pm 0,02$	$74,9 \pm 0,5$
$\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза солюбілізована	$34,6 \pm 6,4$ мкМ	$0,67 \pm 0,05$	$67,8 \pm 0,7$

Додаток: При дослідженні концентраційних залежностей впливу калікс[4]арену С-90 на питому ензиматичну активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази у фракції плазматичних мембран і препарату очищеного солюбілізованого ензиму значення коефіцієнтів інгібування $I_{0,5}$ і коефіцієнтів Хіла n_H розраховували з використанням лінеаризованих графіків Хіла (значення коефіцієнтів кореляції становили 0,98-0,99).

Отже, калікс[4]арен С-90 селективно пригнічує активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази у фракції ПМ і препарату очищеного солюбілізованого ензиму, не впливаючи на активності Na^+, K^+ -АТРази і Mg^{2+} -АТРази ПМ.

4.2. Дія структурних компонентів калікс[4]арену С-90 на активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани.

Для визначення ролі різних функціональних груп у складі молекули калікс[4]арену С-90 в інгібуванні активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази було досліджено дві модельні сполуки: «калікс[4]аренова чаша» калікс[4]арен С-150 (25,27-дипропоксикалікс[4]арен) та модельний сульфониламідин – сполука М-1 (*N*-(4-етоксифеніл)-*N'*-(фенілсульфонил)-трифторометилацетімідоамід).

Зі структурних формул калікс[4]аренів (рис. 4.3) видно, що калікс[4]арен С-150 не містить жодних додаткових хімічних угруповань на верхньому вінці

макроциклу, тобто, по відношенню до досліджуваного калікс[4]арену **C-90**, він справді є суто “каліксареновою чашею”.

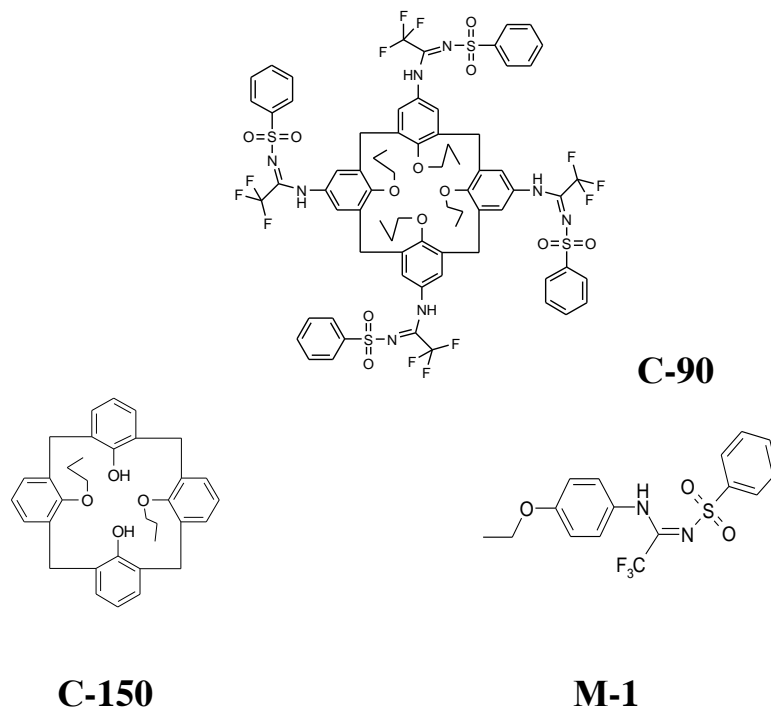


Рис. 4.3. Структурні формули калікс[4]аренів **C-90**, **C-150** та модельної сполуки **M-1**.

Сполука **M-1** містить один фенольний фрагмент та сульфоніламідинову групу, аналогічну наявним на верхньому вінці молекули калікс[4]арену **C-90**.

З'ясовано, що структурний фрагмент **C-150** (суто «каліксаренова чаша»), використаний у концентрації 100 мкМ, здатний незначно (на $13,0 \pm 1,8$ %) знижувати Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазну активність ($M \pm m$; $n = 5$). Модельна сполука **M-1** у концентрації 100 мкМ пригнічує Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазну активність на $9,3 \pm 2,4$ %, а цей фрагмент у концентрації 400 мкМ (адже у складі молекули калікс[4]арену **C-90** маємо 4 фрагменти **M-1**) інгібує Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазну активність також незначно - на $12,5 \pm 1,7$ % відносно контрольного значення ($M \pm m$; $n = 5$) (рис. 4.4).

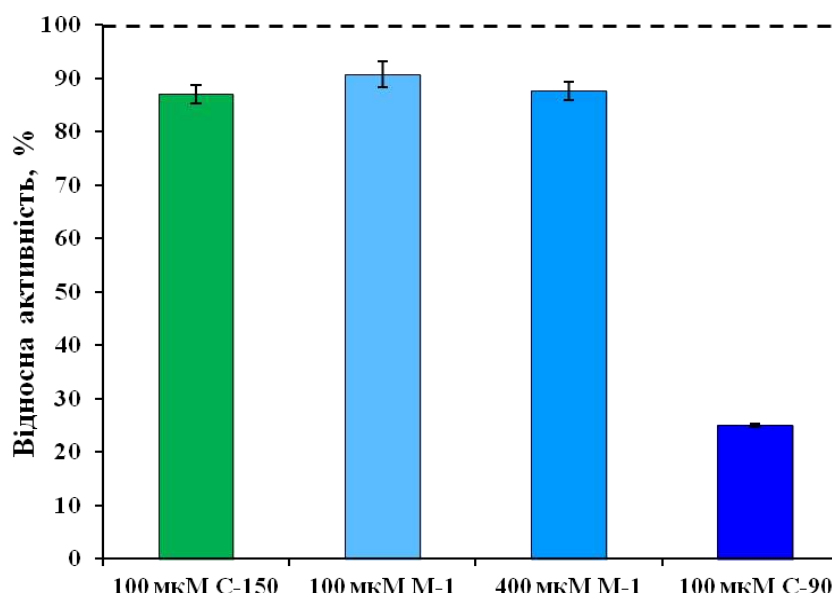


Рис. 4.4. Активність транспортної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази у фракції ПМ клітин міометрія при за дії калікс[4]аренів **C-90**, **C-150** і модельної сполуки **M-1** ($M \pm m$, $n = 5$).

За 100 % прийнято значення питомої ензиматичної активності у відсутності калікс[4]аренів та сполуки **M-1** у середовищі інкубації.

Отже, інгібувальна дія калікс[4]арену **C-90** на $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазну активність передусім пов'язана саме з кооперативним впливом чотирьох просторово орієнтованих на калікс[4]ареновій платформі сульфоніламідинових груп, а не з дією тетрафенольного макроциклу як такого чи з дією окремої фармакофорної групи.

4.3. Залежність інгібіторної дії аналогів калікс[4]арену **C-90** на активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани від їхньої структури.

Враховуючи, що калікс[4]арен **C-90** є селективним і афінним інгібітором $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності ПМ клітин міометрія, він є перспективним для застосування у якості селективного інгібітора $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ. Саме тому у подальшому ми детально вивчали структурні особливості калікс[4]арену **C-90**, які важливі для формування інгібіторного впливу на ензиматичну активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ. Дослідження ролі тих

чи інших угруповань у структурі зазначеного калікс[4]арену дозволить у подальшому підвищувати ефективність інгібування та селективність дії на рівні клітинних структур.

Щоб з'ясувати значення для інгібіторного ефекту кількості та розміщення фенілсульфоніламідинних груп верхнього вінця молекули калікс[4]арену **C-90** ми вивчили дію калікс[4]аренів **C-716**, **C-772** та **C-957** на ензиматичну активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ. Ці три аналоги подібні за своєю структурою до калікс[4]арену **C-90**. Як видно зі структурних формул, калікс[4]арен **C-957** має три фенілсульфоніламідинні групи на верхньому вінці калікс[4]аренової чаші, а на четвертому фенольному кільці міститься *трет*-бутильна група (рис. 4.5).

Калікс[4]арени **C-716** та **C-772**, на відміну від калікс[4]арена **C-90**, мають лише по дві фенілсульфоніламідинні групи на верхньому вінці (рис. 4.5). Ці 2 сполуки є регіоізомерами. У випадку калікс[4]арена **C-716** фенілсульфоніламідинні групи знаходяться на протилежних фенольних кільцях калікс[4]аренової «чаші», тоді як у калікс[4]арені **C-772** фенілсульфоніламідинні групи знаходяться на сусідніх. У *пара*-положеннях інших фенольних кілець калікс[4]аренів **C-716** та **C-772** замість фенілсульфоніламідинних груп, розміщені *трет*-бутильні залишки.

Слід зазначити, що структури нижнього вінця калікс[4]аренів **C-716**, **C-772** та **C-90** також відрізняються за кількістю і взаємним розміщенням пропоксигруп, проте, як ми показали, визначальною для прояву інгібіторних властивостей щодо Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ є саме модифікація верхнього вінця калікс[4]арену.

Ми встановили, що калікс[4]арени **C-772**, **C-716**, **C-957** та **C-90** (використані в концентрації 100 мкМ) з різним ступенем ефективності пригнічують ензиматичну активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ: на $45,9 \pm 0,6$, $61,5 \pm 1,9$, $68,8 \pm 0,6$ та $75,0 \pm 0,9$ % відносно контрольного значення відповідно ($M \pm m$; $n = 5$) (рис. 4.6).

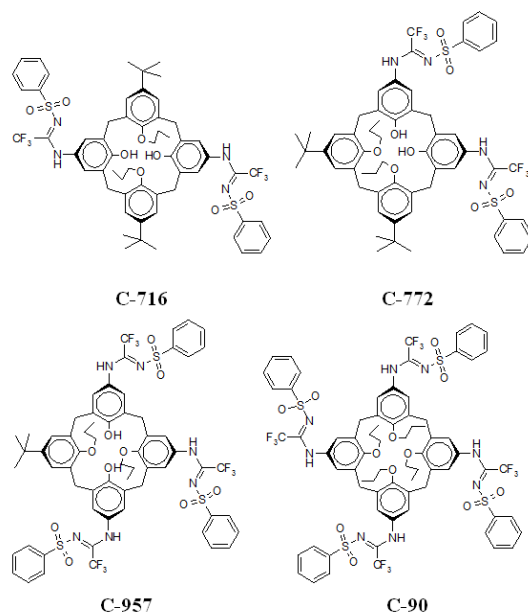


Рис. 4.5. Структурні формули калікс[4]арену **C-90** та його структурних аналогів: **C-716**, **C-772** та **C-957**.

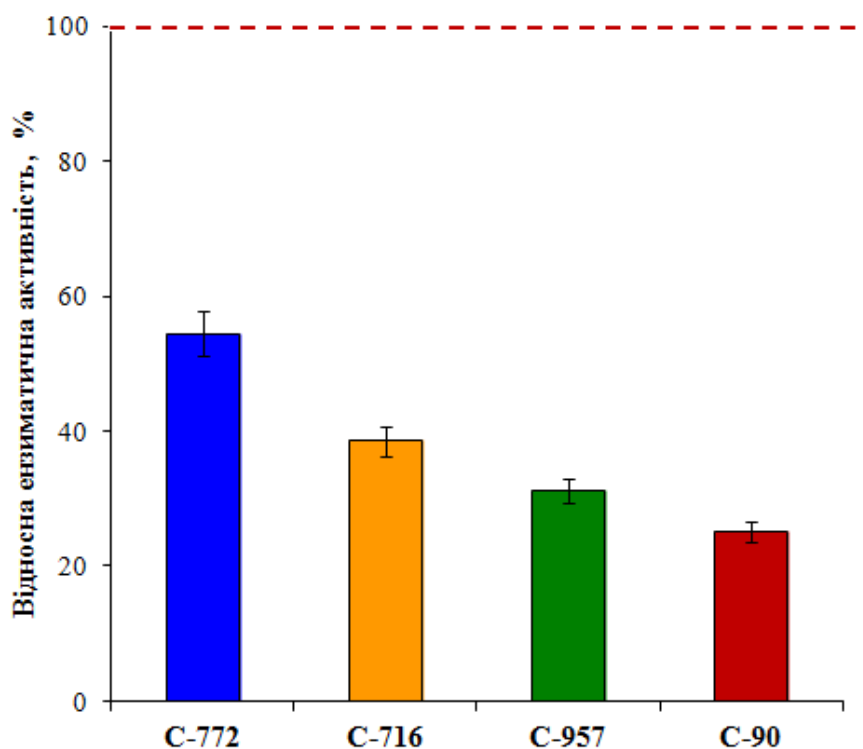


Рис. 4.6. Вплив калікс[4]аренів **C-772**, **C-716**, **C-957** і **C-90** (100 мкМ) на питому ензиматичну активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази у фракції ПМ клітин міомерія ($M \pm m$; $n = 5$).

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

Таким чином, інгібіторний ефект калікс[4]аренів **C-772**, **C-716**, **C-957** і **C-90** зростає із збільшенням кількості фенілсульфоніламідинних груп на верхньому вінці калікс[4]аренової чаші. Для визначення кінетичних параметрів, а саме коефіцієнта інгібування $I_{0,5}$ та коефіцієнта Хілла n_H , ми дослідили дію цих каліксаренів у широкому діапазоні концентрацій: від 10^{-8} до 10^{-4} М. Встановлено, що калікс[4]арени **C-772**, **C-716**, **C-957** і **C-90** дозозалежно гальмують ензиматичну активність Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРази ПМ з різною ефективністю (рис. 4.7).

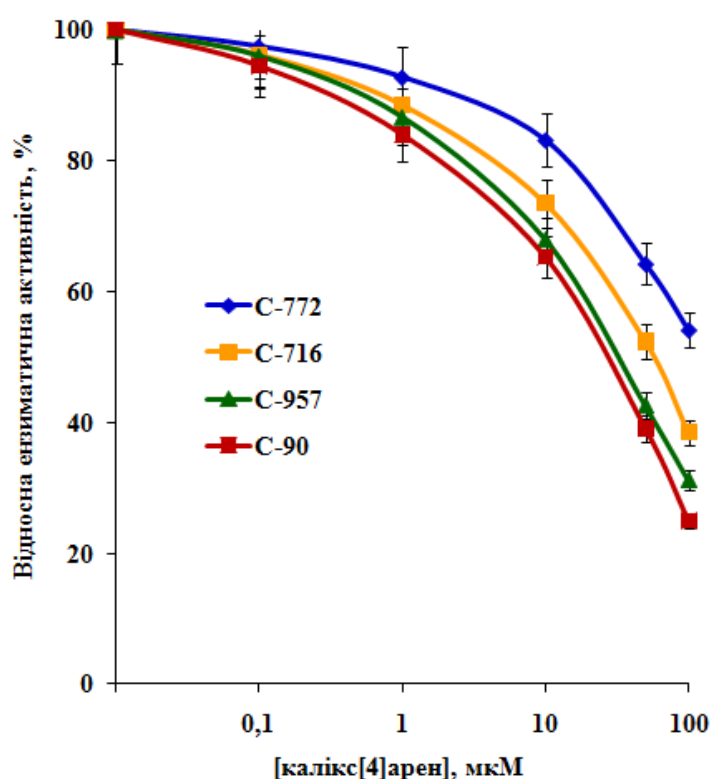


Рис. 4.7. Концентраційні залежності впливу калікс[4]аренів **C-772**, **C-716**, **C-957** та **C-90** на активність Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРази у фракції ПМ клітин міометрія ($M \pm m$, $n = 5$).

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

За отриманими концентраційними залежностями розраховані кінетичні параметри, що характеризують ефективність інгібування Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРази активності відповідними калікс[4]аренами (таб. 4.2).

Таб. 4.2. Кінетичні параметри інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності ПМ калікс[4]аренами – структурними аналогами калікс[4]арену **C-90** ($M \pm m, n = 5$).

Калікс[4]арен	Коефіцієнт інгібування $I_{0,5}$, мкМ	Коефіцієнт Хілла n_H	Залишкова ензиматична активність за концентрації 100 мкМ
C-956	$15,0 \pm 0,5$	$0,55 \pm 0,01$	$20,8 \pm 0,4$
C-90	$20,2 \pm 0,5$	$0,55 \pm 0,02$	$25,0 \pm 0,3$
C-975	$26,8 \pm 0,9$	$0,57 \pm 0,02$	$29,7 \pm 0,9$
C-957	$29,2 \pm 0,9$	$0,57 \pm 0,02$	$31,2 \pm 0,6$
C-716	$53,4 \pm 3,6$	$0,52 \pm 0,02$	$38,5 \pm 1,9$
C-960	$50,0 \pm 0,5$	$0,54 \pm 0,01$	$40,3 \pm 0,5$
C-772	165 ± 20	$0,51 \pm 0,04$	$54,1 \pm 0,6$
C-715			$79,3 \pm 0,9$

Згідно з результатами, наведеними в таблиці 4.2, калікс[4]арен **C-957**, в якому наявні три фенілсульфоніламідінові групи, має коефіцієнт інгібування $29,2 \pm 0,9$ мкМ, тобто вищий за відповідний коефіцієнт для калікс[4]арена **C-90**. А калікс[4]арени **C-716** та **C-772**, що містять по дві фенілсульфоніламідінові групи, є ще менш ефективними інгібіторами $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності ПМ, оскільки їхні коефіцієнти інгібування ($53,4 \pm 3,6$ мкМ та 165 ± 20 мкМ) ще вищі ніж у випадку калікс[4]арену **C-957**. Отже, порівнюючи кінетичні параметри інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності вказаними чотирма калікс[4]аренами, можна зробити наступний висновок: ефективність інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази калікс[4]аренами зростає зі збільшенням кількості фенілсульфоніламідінових груп на верхньому вінці цих калікс[4]аренів.

Втім, необхідно зазначити, що на підставі порівняння структури калікс[4]аренів **C-716** та **C-772**, які є регіоізомерами і відрізняються за

положенням фенілсульфоніламідінових груп, та їх інгібіторної ефективності, логічно стверджувати: розміщення цих груп на верхньому вінці калікс[4]аренів також відіграє істотну роль в інгібуванні $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності (таб. 4.2, рис. 4.5). У разі розміщення фенілсульфоніламідінових груп на протилежних фенольних циклах калікс[4]арену **C-716** ефективність інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності є більшою, ніж у разі їх розміщення на сусідніх фенольних кільцях калікс[4]арену **C-772**. Можливо, у цьому випадку важливою є відстань між фенілсульфоніламідіновими залишками для забезпечення комплементарної взаємодії з чітко детермінованими хімічними групами відповідного сайту взаємодії з $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазною ПМ на її поверхні.

Оскільки калікс[4]арени **C-957**, **C-716** та **C-772**, на відміну від калікс[4]арену **C-90**, містять *трет*-бутильні групи, не можна нехтувати припущенням, що існує можливість зниження ефективності інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності саме за рахунок впливу цих груп. Тому ми використали калікс[4]арен **C-960** з меншою кількістю фенілсульфоніламідінових груп, але без *трет*-бутильних залишків на верхньому вінці калікс[4]аренового макроциклу для визначення впливу на активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ.

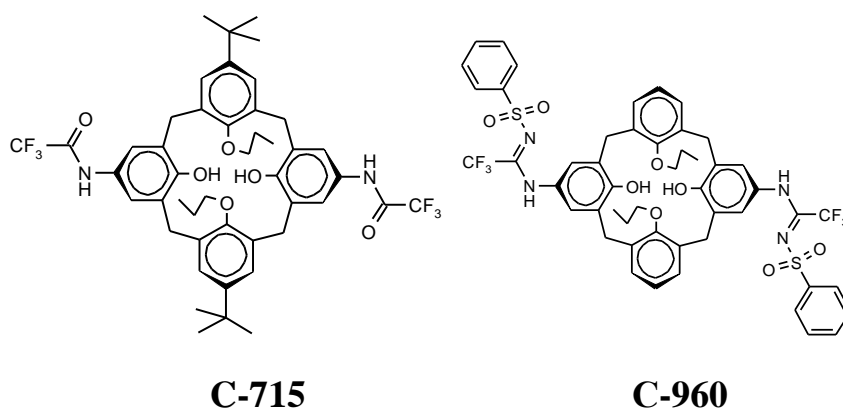


Рис. 4.8. Структурні формули калікс[4]аренів **C-715** та **C-960**.

Цей калікс[4]арен містить два фенілсульфоніламідінові залишки на протилежних фенольних фрагментах верхнього вінця, і відрізняється від калікс[4]арену **C-716** лише відсутністю *трет*-бутильних груп (рис. 4.8).

Згідно з результатами експериментів, калікс[4]арени **C-715**, **C-716** та **C-960**, використані у концентрації 100 мкМ, пригнічують активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ на $20,7 \pm 0,9$, $61,9 \pm 1,9$ та $59,7 \pm 0,5$ % відносно контрольного значення відповідно ($M \pm m$; $n = 5$) (рис. 4.9). Усі три аналоги слабкіше пригнічують досліджувану активність, ніж калікс[4]арен **C-90** (пригнічує на $75,0 \pm 0,9$ % відносно контрольного значення).

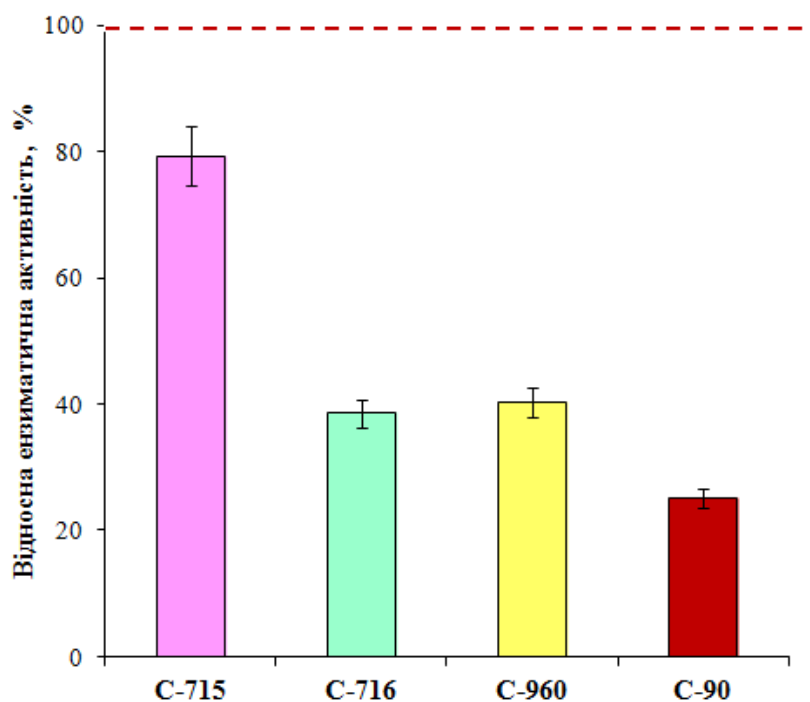


Рис. 4.9. Вплив калікс[4]аренів **C-715**, **C-716**, **C-960** і **C-90** (100 мкМ) на питому ензиматичну активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази у фракції ПМ клітин міометрія ($M \pm m$; $n = 5$).

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

Надалі ми досліджували дію зазначених вище калікс[4]аренів у більш широкому діапазоні концентрацій: від 10^{-8} до 10^{-4} М. Встановлено, що калікс[4]арени **C-715**, **C-716**, **C-960** і **C-90** дозозалежно гальмують ензиматичну активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ з різною ефективністю (рис. 4.10). Слід зазначити, що дія калікс[4]аренів **C-716** та **C-960** на активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ практично не відрізняється. Більше того – коефіцієнти інгібування вказаного ензиму ($53,4 \pm 3,6$ мкМ та $50,0 \pm 0,5$ мкМ відповідно для калікс[4]аренів **C-716** і

C-960) не мають статистично вірогідної різниці (таб. 4.2) ($M \pm m$; $n = 5$). Це означає, що наявність *трет*-бутильних залишків не впливає на ефективність інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ за використання калікс[4]аренів **C-716** та **C-960**.

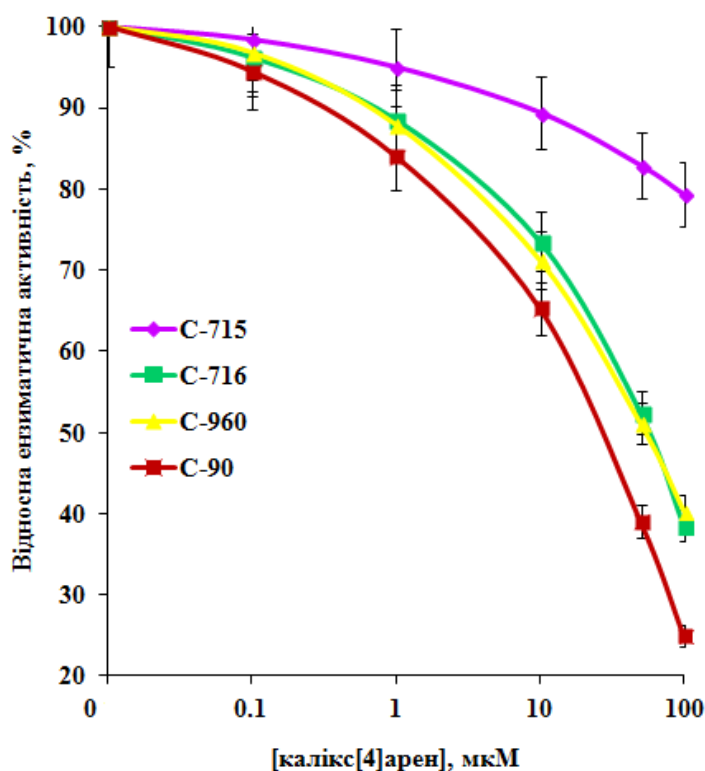


Рис. 4.10. Концентраційні залежності впливу калікс[4]аренів **C-715**, **C-716**, **C-960** та **C-90** на активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази у фракції ПМ клітин міометрія ($M \pm m$, $n = 5$).

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

Отже, найвірогідніше, що саме фенілсульфоніламідинові групи є визначальними для інгібування активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ. Щоб перевірити це припущення, ми використали калікс[4]арен **C-715**. Цей калікс[4]арен містить дві трифтометилацетамідні групи на верхньому вінці калікс[4]аренової чаші (рис. 4.8). Тобто за своєю структурою він найбільш подібний до калікс[4]арену **C-716**, але замість фенілсульфонілімінних фрагментів в його молекулі містяться карбонільні фрагменти, які є меншими за

розмірами та площею поверхні і мають меншу полярність. Тому ми порівнювали вплив на активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ саме цих калікс[4]аренів (рис. 4.10).

Згідно з отриманими результатами експериментів, калікс[4]арен **C-715**, використаний у всьому інтервалі концентрацій від 10^{-8} до 10^{-4} М, лише частково неефективно пригнічує активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ (рис. 4.10). При застосуванні максимальної концентрації калікс[4]арену **C-715** 100 мкМ $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза активність становить $79,3 \pm 0,8$ % від контрольного значення (таб. 4.2) ($M \pm m$; $n = 5$). Звичайно, що за такого низького рівня інгібування визначити відповідні кінетичні параметри, як для інших калікс[4]аренів, не можливо. Втім такий результат дає нам підставу дійти однозначного висновку, що саме фенілсульфоніламіні групи на верхньому вінці як калікс[4]арену **C-716**, так і калікс[4]арену **C-90**, безпосередньо залучені у механізмі інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ.

Залишається не з'ясованим механізм інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази калікс[4]ареном **C-90**, а саме не ідентифіковано сайт його взаємодії з відповідним ензимом. Цікавим також є питання і стосовного того, як саме калікс[4]арен взаємодіє з ензимом: з водного оточення, чи з ліпідного оточення мембрани, та у якому з цих середовищ він переважно концентрується. Всі досліджені калікс[4]арени є гідрофобними сполуками, проте для зручнішого використання препаратів у якості інгібіторів ензимів чи як фармакологічних засобів, краще щоб вони були гідрофільними сполуками. Тому ми дослідили аналоги калікс[4]арену **C-90**, які відрізняються за наявністю гідрофобних груп (рис. 4.11).

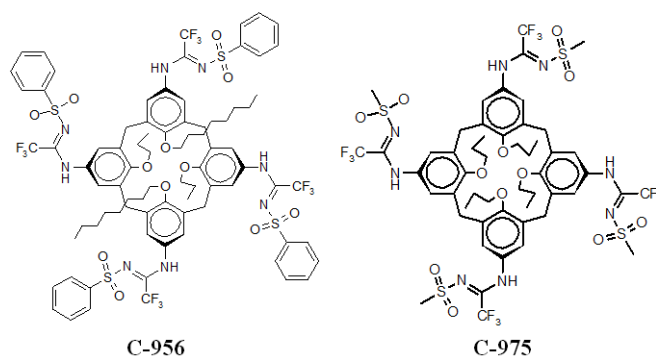


Рис. 4.11. Структурні формули калікс[4]аренів C-956 та C-975.

Окрім калікс[4]аренового макроциклу у складі молекули калікс[4]арену **C-90** значною гідрофобністю характеризуються фенільні залишки у складі фенілсульфоніламідинових груп. Тому було синтезовано аналог калікс[4]арену **C-90** – калікс[4]арен **C-975**, у якого ці фенільні групи заміщені на метильні, з утворенням метилсульфоніламідинових груп. Калікс[4]арен **C-975**, використаний у концентрації 100 мкМ, ефективно пригнічує активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ до $29,7 \pm 0,9$ % відносно контрольного значення (рис. 4.12). З концентраційної залежності інгібування калікс[4]ареном **C-975** Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазної активності (рис. 4.13) були розраховані кінетичні параметри, що характеризують ефективність інгібування, а саме коефіцієнт інгібування $I_{0,5}$ ($26,8 \pm 0,9$ мкМ) та коефіцієнт Хілла n_H ($0,57 \pm 0,02$) (таб. 4.2) ($M \pm m$; $n = 5$). Отже, калікс[4]арен **C-975** має досить високий інгібіторний потенціал стосовно Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ.

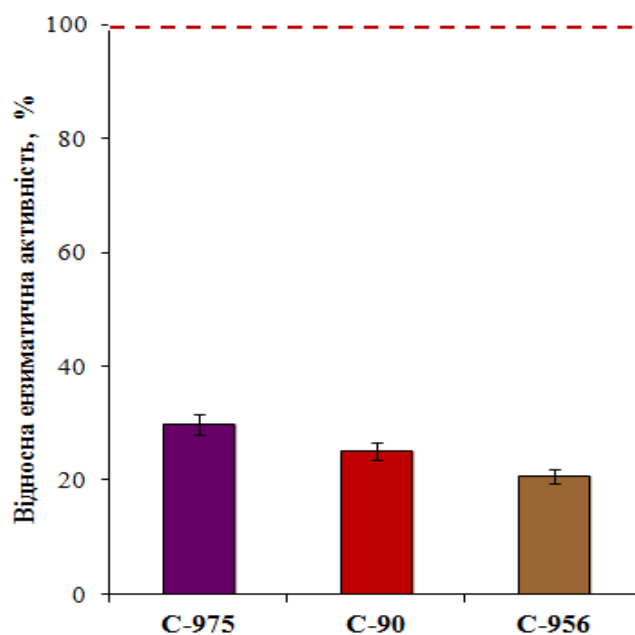


Рис. 4.12. Вплив калікс[4]аренів **C-975**, **C-90** та **C-956** (100 мкМ) на питому ензиматичну активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази у фракції ПМ клітин міометрія ($M \pm m$, $n = 5$).

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

Таким чином, калікс[4]арен **C-975** ($I_{0,5}=26,8 \pm 0,9$ мкМ) менш ефективно, ніж калікс[4]арен **C-90** ($I_{0,5}=20,2 \pm 0,5$ мкМ), інгібує Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ.

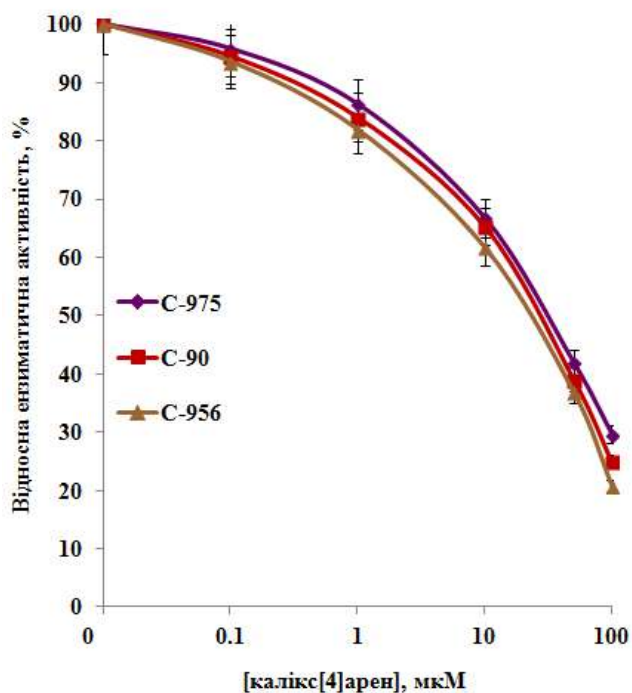


Рис. 4.13. Концентраційні залежності впливу калікс[4]аренів С-975, С-90 та С-956 на активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази у фракції ПМ клітин міометрія ($M \pm m, n = 5$).

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

Оскільки, на прикладі калікс[4]аренів **С-715** та **С-716**, показана провідна роль фенілсульфонілімінових груп калікс[4]аренів у інгібуванні активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ та з урахуванням істотного інгібіторного ефекту навіть за відсутності фенільних залишків у складі функціональних груп на верхньому вінці макроциклу, важливим висновком є те, що саме сульфонілімінові угруповання визначають інгібіторні властивості калікс[4]арену **С-90** та його аналогів. Водночас фенільні залишки або не беруть участі у взаємодії з ензимом, або ж така взаємодія слабка й істотно не позначається на функціонуванні ензиму.

Зміна рівня гідрофобності молекули калікс[4]арену може впливати на його інгібіторні властивості стосовно $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази. Оскільки відомо, що калікс[4]арени здатні вбудовуватись в ліпідні мембрани [368, 449], такі зміни можуть відображатися на розподілі молекул калікс[4]аренів між мембраною та водним середовищем. Порівняння калікс[4]аренів, які містять фенільні залишки, не дозволяє нам зробити висновок щодо впливу саме гідрофобності, оскільки ці залишки знаходяться у складі фенілсульфонілімінових груп верхнього вінця калікс[4]аренів, що детермінують взаємодію з відповідним комплементарним сайтом на поверхні ензиму.

Як вже зазначали, калікс[4]аренова чаша та пропільні залишки молекули калікс[4]арену **С-90** не відграють істотної ролі у вияві його інгібіторних властивостей, а лише слугують основою для взаємного розміщення фенілсульфоніламідинових груп, хоча не з'ясованим залишалось питання впливу функціональних груп у структурі нижнього вінця макроциклу. В зв'язку з цим ми використали аналог калікс[4]арену **С-90**, який відрізняється за структурою нижнього вінця, калікс[4]арен **С-956**, що містить на нижньому

вінці калікс[4]аренового макроциклу більш ліпофільні октильні залишки замість пропільних. Подібна модифікація істотно не впливає на інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності (рис. 4.13), хоча дещо підвищувала спорідненість інгібітора до $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ: коефіцієнт інгібування $I_{0,5}$ становив $15 \pm 0,5$ мкМ (таб. 4.2) ($M \pm m; n = 5$).

Отже, серед всіх досліджених калікс[4]аренів саме калікс[4]арен **C-956** виявився найефективнішим інгібітором $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ. Подібний результат є також опосередкованим свідченням того, що гідрофобність калікс[4]аренів або їх амфіфільність та, відповідно, їх спорідненість до мембранного оточення відіграють певну роль у взаємодії з ензимом. Раніше ми довели, що пригнічувальний вплив калікс[4]арену **C-90** реалізується також і на нативному ензимі, очищеній $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазі ПМ з коефіцієнтом інгібування $I_{0,5}$, який становить $34,6 \pm 6,4$ мкМ, з чого було зроблено висновок, що мембранне оточення не відіграє суттєвої ролі у реалізації інгібіторного ефекту вказаного калікс[4]арену на ензиматичну активність трансмембранного білка. Поряд з тим можна припустити, що калікс[4]арени, які інгібують $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазу ПМ, діють з мембранного оточення на ензим, а сайт взаємодії з калікс[4]ареном **C-90** та його аналогами знаходиться на трансмембранній ділянці білкової молекули. В цьому разі ступінь гідрофобності каліксарену буде корелювати із ступенем його вбудовування в мембрану та доступністю для нього трансмембранних доменів $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази. Подібність коефіцієнтів інгібування $I_{0,5}$ у випадку солубілізованої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази та $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ у фракції везикул можна пояснити тим, що навіть солубілізований білок існує у розчині разом з детергентом, який оточує його трансмембранні ділянки і забезпечує збереження нативної структури. Тому можна припустити, що для реалізації інгібіторного впливу калікс[4]аренів на $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазну активність не має значення саме склад мембранного оточення, але швидше за все інгібування АТРазної активності включає взаємодію калікс[4]аренів з мембранним оточенням.

Ми припускаємо, що всі досліджувані калікс[4]арени діють на цей ензим за подібним механізмом. На це опосередковано вказують також дуже близькі значення коефіцієнтів Хілла для всіх калікс[4]аренів (таб. 4.2).

Взявши до уваги, що найбільш ефективним інгібітором $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ виявився калікс[4]арен **C-956**, ми вирішили детальніше дослідити його дію.

Вплив калікс[4]аренів на іон-транспортні системи міоцитів може детермінувати їх дію на форму клітин. Зміну форми ГМК через модифікації водно-осмотичного балансу допомагає встановлювати лазерна кореляційна спектроскопія, за допомогою якої можливо фіксувати зміни ефективного гідродинамічного діаметру ГМК.

Згідно даних літератури фактори, які підвищують скоротливу відповідь ГМ, так само змінюють ефективний гідродинамічний діаметр ГМК.

Результати експериментів показали, що в разі внесення утеротоніка окситоцину (100 нМ) ефективний гідродинамічний діаметр у суспензії ГМК зменшувався на $28,73 \pm 4,49$ % ($M \pm m$, $n = 6$) відносно контрольного значення (рис 4.14, синій стовпчик).

У контролі середнє значення ефективного гідродинамічного діаметру міоцитів становить близько 9 мкм. Ми вимірювали гідродинамічний діаметр ГМК протягом 1 хв 5 разів, звідки розраховували середнє значення. Так, у якості контролю на розчинник аплікація аліквоти ДМСО не призводила до істотних змін досліджуваного параметру – гідродинамічний діаметр змінювався на $3,5 \pm 1,6$ % ($M \pm m$, $n = 6$) відносно контролю (рис. 4.14, зелений стовпчик). Водночас використання інгібітора $\text{Mg}^{2+}, \text{ATP}$ -залежної Ca^{2+} -помпи ПМ ГМК калікс[4]арену **C-956** (50 мкМ) призводить до зменшення гідродинамічного діаметру на $45,54 \pm 9,38$ % ($M \pm m$, $n = 6$) відносно контрольного значення, причому такі зміни корелювали з подібними, отриманими за дії окситоцину (100 нМ) – рис. 4.14 (червоний стовпчик).

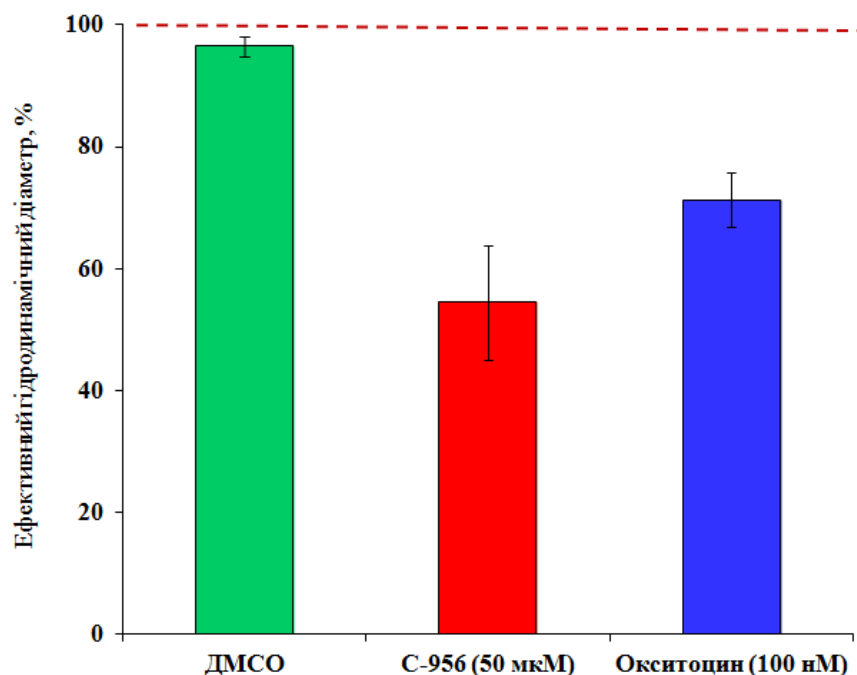


Рис. 4.14. Зміна гідродинамічного діаметру ГМК за дії різних ефекторів ($M \pm m$, $n = 6$).

За 100 % прийнято контрольне значення гідродинамічного діаметру ГМК за відсутності дії ефекторів.

Отже, калікс[4]арен **C-956** зменшує ефективний гідродинамічний діаметр ГМК подібно до дії утеротоніка окситоцину. Подібна зміна гідродинамічного діаметру може трактуватися як сукупність подій, які супроводжують процеси скорочення/розслаблення ГМК, а саме зміну водно-осмотичного балансу, перебудови елементів цитоскелету. Оскільки раніше було показано, що зміна гідродинамічного діаметру ГМК під впливом скоротливих агентів корелює з станом скорочення ГМ [42], то подібні результати свідчать про перспективні можливості використання калікс[4]арену **C-956** як регулятора скоротливої активності ГМ матки.

Зважаючи на те, що Ca^{2+} -помпа ПМ відіграє важливу роль у контролі концентрації іонів Ca у цитозолі ГМ важливо з'ясувати, чи буде впливати калікс[4]арен **C-956** на внутрішньоклітинну концентрацію Ca^{2+} у ГМК. У своїх подальших експериментах ми використали конфокальну мікроскопію.

За допомогою Ca^{2+} -чутливого зонда fluo-4 була встановлена зміна внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} під впливом калікс[4]арену **C-956**. Було показано, що під дією калікс[4]арену **C-956** (20 мкМ) відбувається транзйентне різке зростання флуоресцентної відповіді Ca^{2+} -чутливого зонда fluo-4 АМ у клітині (рис. 4.15). Протягом 2,5 хв концентрація Ca^{2+} знижується, що свідчить про залучення компенсаторних механізмів (типу мітохондрії, натрій-кальцієвого обмінника ПМ). За повторного внесення аліквоти калікс[4]арену **C-956** концентрація Ca^{2+} у клітині зростала менше. Отже, калікс[4]арен **C-956** зумовлює підвищення концентрації Ca^{2+} у ГМК.

У контролі, де використовувалася калікс[4]аренова «чаша» **C-150** (20 мкМ), яка згідно з нашими результатами не мала вираженого впливу на активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ, такого підвищення флуоресцентного сигналу fluo-4 не спостерігалось (результати не наведено). Також незмінним лишався рівень флуоресценції Hoechst, який був локалізований в основному в ядрі ГМК, та фоні.

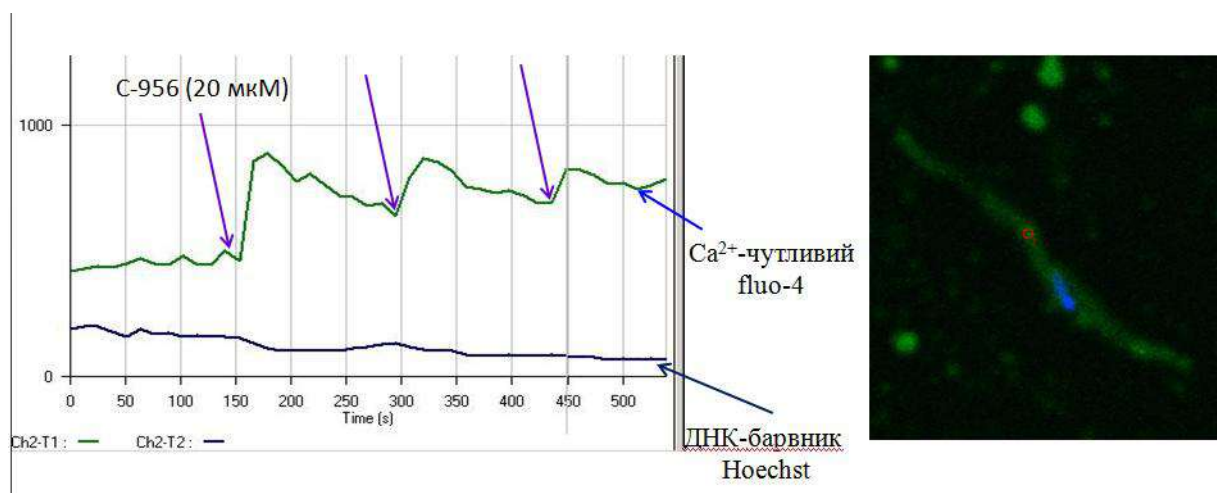


Рис. 4.15. Динаміка флуоресценції зондів у клітинах міометрія, зареєстрована за допомогою конфокальної мікроскопії: ДНК-чутливого Hoechst та Ca^{2+} -чутливого fluo-4 АМ. На 150 сек було внесено аліквоту розчину **C-956** (кінцева концентрація - 20 мкМ). Наведено результати типового експерименту.

Ці результати підтвердили, що під впливом калікс[4]арену **C-956** (20 мкМ) відбувається різке підвищення концентрації Ca^{2+} у клітині, яке пов'язане зі зниження базальної активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ та СР. Разом з тим протягом наступних 100 сек концентрація Ca^{2+} знижувалась до початкового рівня, що свідчить про залучення компенсаторних Ca^{2+} -транспортувальних систем в міоцитах до релаксації кальцієвого сигналу, які мають нижчу афінність до Ca^{2+} та реагують, головним чином, на його високі концентрації в клітині (Ca^{2+} -уніпортер мітохондрій, Na^+ - Ca^{2+} -обмінник ПМ).

Отримані результати важливі для розуміння механізмів інгібування Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ калікс[4]ареном **C-90** та його аналогами та можуть стати основою для створення нових більш ефективних інгібіторів зазначеного ензиму на основі калікс[4]аренів.

4.4. Кінетика інгібіторної дії калікс[4]арену C-90 на активність транспортної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани.

4.4.1. Концентраційна залежність активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази від іонів Ca за дії калікс[4]арену C-90.

Ми вивчали залежність питомої активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази від концентрації Ca^{2+} в інкубаційному середовищі при різних концентраціях калікс[4]арену C-90 (відповідно 1, 10, 30, 60 та 100 мкМ). В даному випадку ми розраховували концентрацію іонів Ca, враховуючи концентрацію ЕГТА та його спорідненість до Ca^{2+} .

Ензиматична активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ міометрія зростає по мірі збільшення концентрації іонів Ca від 100 до 1000 нМ, однак монотонно зменшується при збільшенні концентрації інгібітора (рис. 4.14).

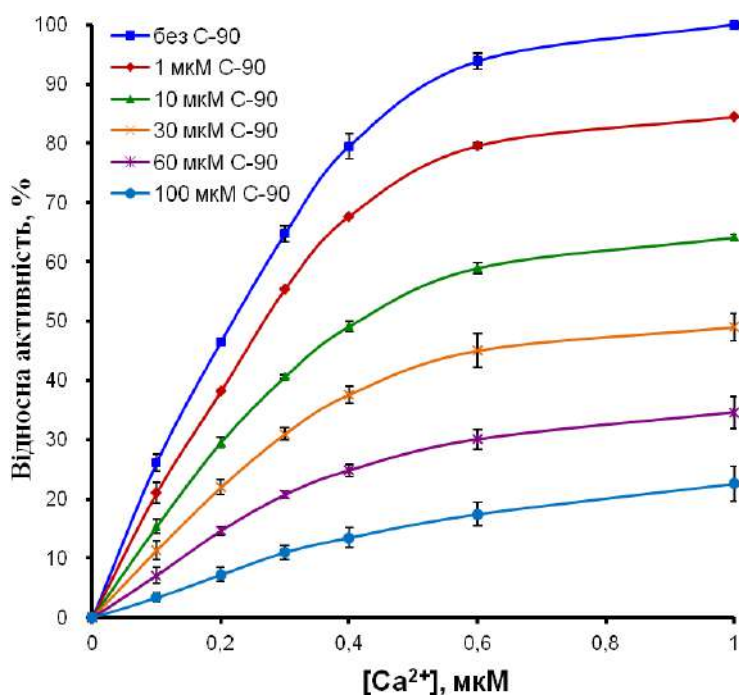


Рис. 4.14. Вплив збільшення концентрації калікс[4]арену C-90 на залежність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази від концентрації іонів Ca ($M \pm m, n = 5$).

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

Було розраховано кінетичні параметри активації іонами Ca та вплив на них калікс[4]арену **C-90** (рис. 4.15А,Б).

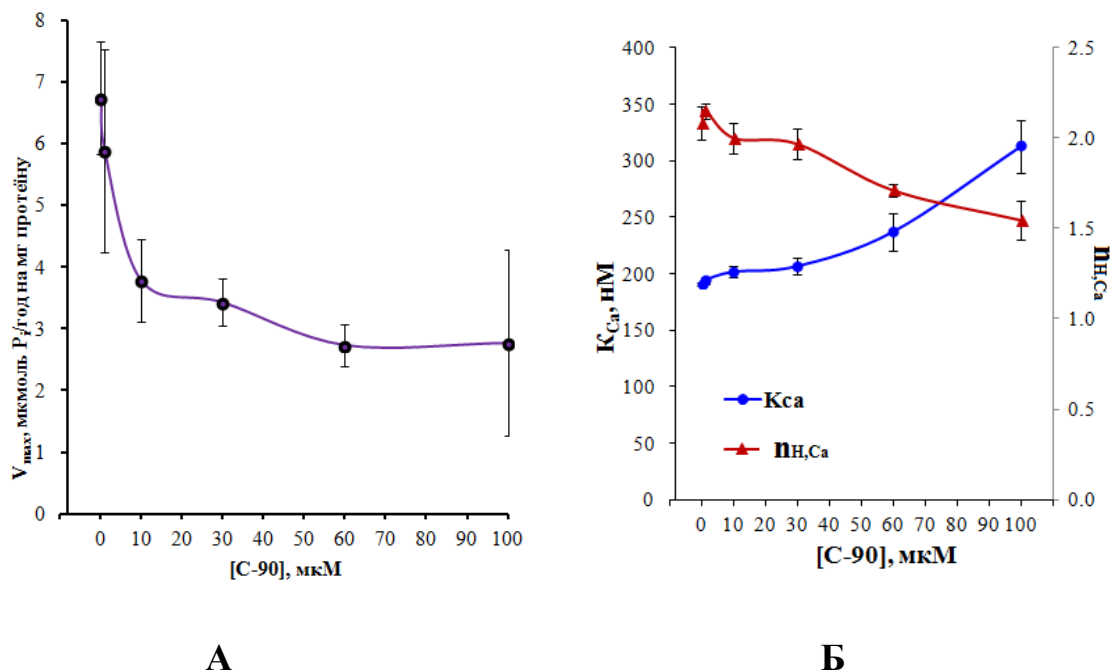


Рис. 4.15. Вплив калікс[4]арену **C-90** в різних концентраціях на кінетичні параметри реакції гідролізу АТФ по Ca^{2+} (V_{\max} (А), K_{Ca} $n_{\text{H,Ca}}$ (Б)), що каталізується Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазою ПМ клітин міомерія ($M \pm m$, $n = 5$).

Величина V_{\max} зменшувалася, при збільшенні концентрації калікс[4]арену **C-90** (рис. 4.15А). Значення коефіцієнту активації Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази K_{Ca} за відсутності калікс[4]арену **C-90** становило 190 ± 1 нМ, величина коефіцієнта Хілла n_{H} – $2,1 \pm 0,1$ ($M \pm m$; $n=5$) (рис. 4.15Б). Внесення в середовище інкубації калікс[4]арену **C-90** збільшувало коефіцієнт активації іонами Ca до 312 ± 23 нМ (в присутності 100 мкМ **C-90**). При цьому величина коефіцієнта Хілла знижувалася до $1,5 \pm 0,1$ ($M \pm m$; $n=5$).

Отже, в діапазоні концентрації до 50 мкМ калікс[4]арен **C-90** практично не впливає на спорідненість Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази до іонів Ca, та на кооперативний ефект активації ензиму вказаними іонами.

Ми також побудували криві інгібування Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРадної активності за різних концентрацій іонів Ca (рис. 4.16А).

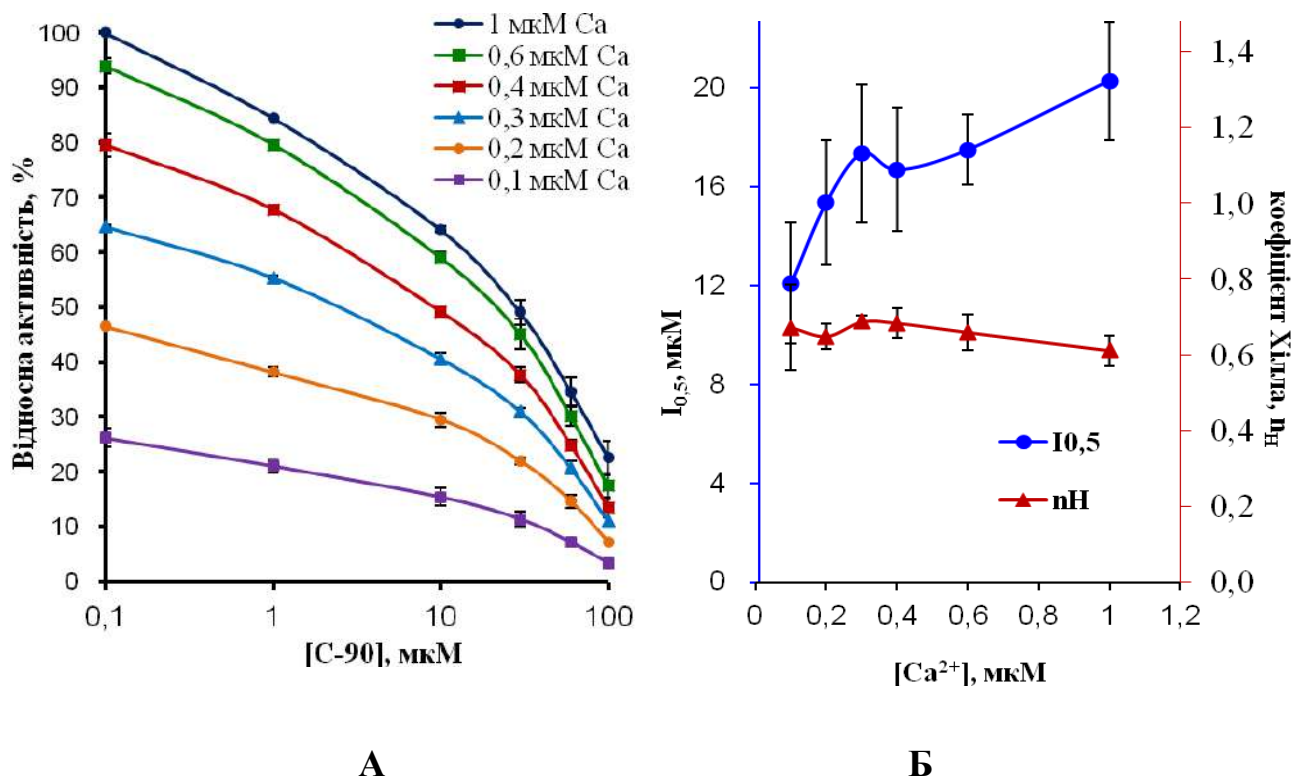


Рис. 4.16. Вплив іонів Ca на залежність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності у ПМ клітин міометрія від концентрації калікс[4]арену **C-90** (А) та на коефіцієнт Хілла і коефіцієнт інгібування (Б) даної активності ($M \pm m, n = 5$).

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

За отриманими залежностями розраховано кінетичні параметри інгібування калікс[4]ареном **C-90** за різних концентрацій Ca^{2+} (рис. 4.16Б). Як бачимо, коефіцієнт Хілла майже не змінюється за різних концентрацій Ca^{2+} та становить 0,6-0,7. Проте зі зниженням концентрації Ca^{2+} знижується коефіцієнт інгібування $I_{0,5}$, тобто збільшується ефективність інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності. Не виключено, що такі кінетичні ефекти можуть бути зумовлені конкуренцією між калікс[4]ареном **C-90** та іонами Ca за сайти зв'язування на поверхні ензиму. Зважаючи на здатність каліксаренів до комплексоутворення з іонами металів [33], можливо, що у механізм інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності залучена також взаємодія між калікс[4]ареном **C-90** та Ca^{2+} у складі потрійного комплексу з ензимом.

4.4.2. Концентраційна залежність активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази від іонів Mg за дії калікс[4]арену **C-90**.

Відомо багато Mg^{2+} -залежних ензимів, де роль Mg^{2+} не обмежується активацією субстрату, а пов'язана із формуванням активних (каталітичних) центрів. Проте більш відома роль Mg^{2+} в утворенні хелатного комплексу з АТР – субстратом аденозинтрифосфатазних реакцій. Вважають, що іони Mg^{2+} вступають у взаємодію із фосфатними зарядженими групами АТР, поляризують їх і підвищують реакційну здатність системи, полегшуючи нуклеофільну атаку на термінальний фосфатний залишок АТР [10].

Досліджено вплив 5-ти концентрацій калікс[4]арену **C-90** (1, 10, 30, 60 та 100 мкМ) на концентраційну залежність АТР-гідролазної активності від MgCl_2 (рис. 4.17).

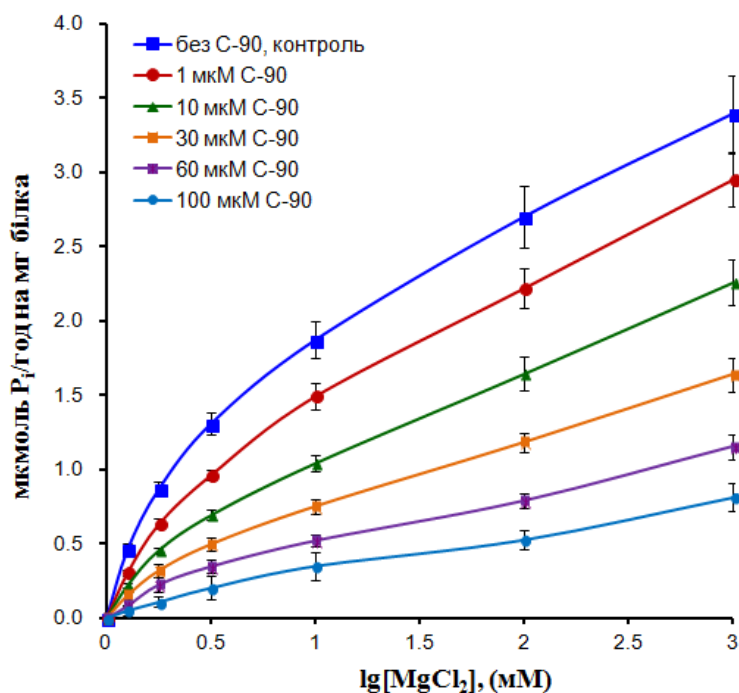


Рис. 4.17. Вплив збільшення концентрації калікс[4]арену **C-90** на залежність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності ПМ клітин міометрія від концентрації MgCl_2 ($M \pm m$, $n = 5$).

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

Ензиматична активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ міометрія зростає з підвищенням концентрації MgCl_2 від 0,1 до 3 мМ за умови фіксованих концентрацій АТФ (3 мМ) в інкубаційному середовищі та монотонно пригнічується при збільшенні концентрації **С-90**.

Значення уявної константи активації $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази K_{Mg} становить $0,70 \pm 0,08$ мМ, величина коефіцієнта Хілла $n_{\text{H}} - 1,0 \pm 0,1$ ($M \pm m; n=5$).

В усіх випадках у разі внесення до середовища інкубації калікс[4]арену **С-90** активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази знижується з різним ступенем ефективності.

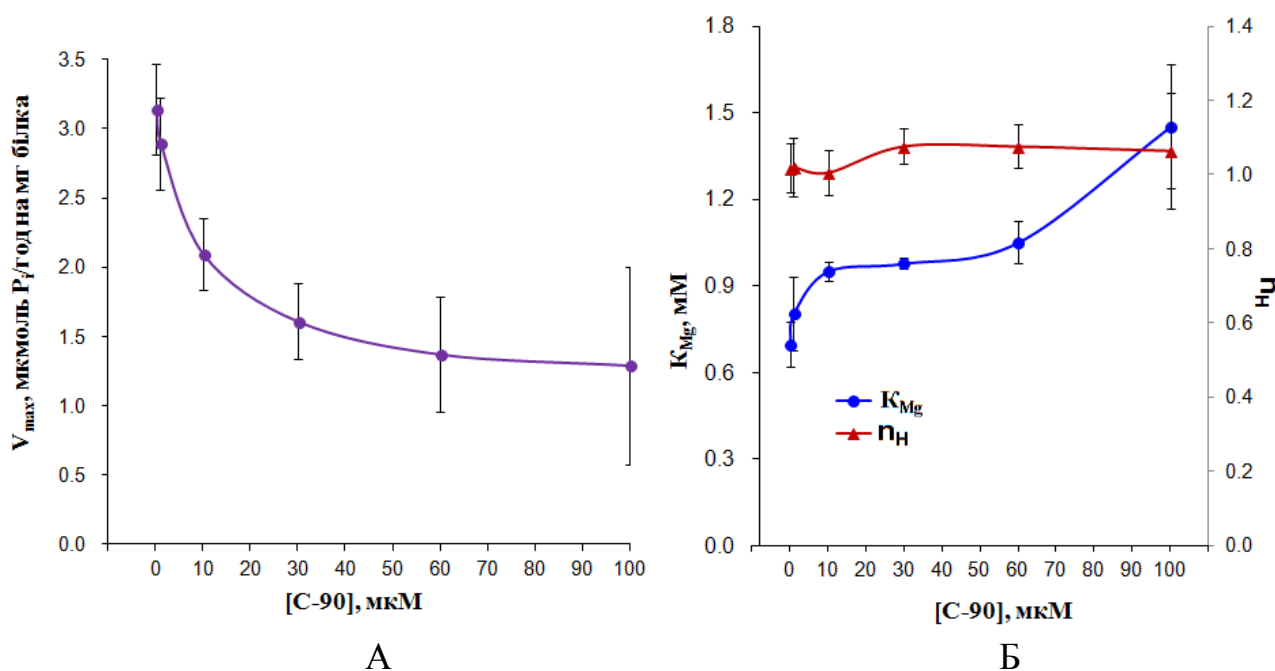


Рис. 4.18. Вплив калікс[4]арену **С-90** в різних концентраціях на кінетичні параметри гідролізу АТФ по Mg^{2+} (V_{max} (А), K_{Mg} і n_{H} , Mg (Б)), що каталізується $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазою ПМ клітин міометрія ($M \pm m, n = 5$).

Величина V_{max} зменшувалася зі збільшенням концентрації калікс[4]арену **С-90** (рис. 4.18А). Продемонстровано, що під впливом калікс[4]арену **С-90** (до 50 мкМ), спостерігається зростання коефіцієнта активації $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази хлоридом магнію K_{Mg} до $1,4 \pm 0,2$ мМ (за присутності 100 мкМ **С-90**), тобто у 2 рази. При цьому величина коефіцієнта Хілла практично не змінюється (рис. 4.18 А, Б).

Втім варто зазначити, що спеціальної уваги потребує аналіз концентраційних (щодо калікс[4]арену **C-90**) залежностей K_{Ca} та $p_{H,Ca}$ (рис. 4.16Б) і K_{Mg} (рис. 4.18Б) за високих концентраціях цього інгібітора.

Аналогічно до попередніх кінетичних досліджень ми побудували залежність інгібування Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРазної активності за різних концентрацій $MgCl_2$ (рис. 4.19А).

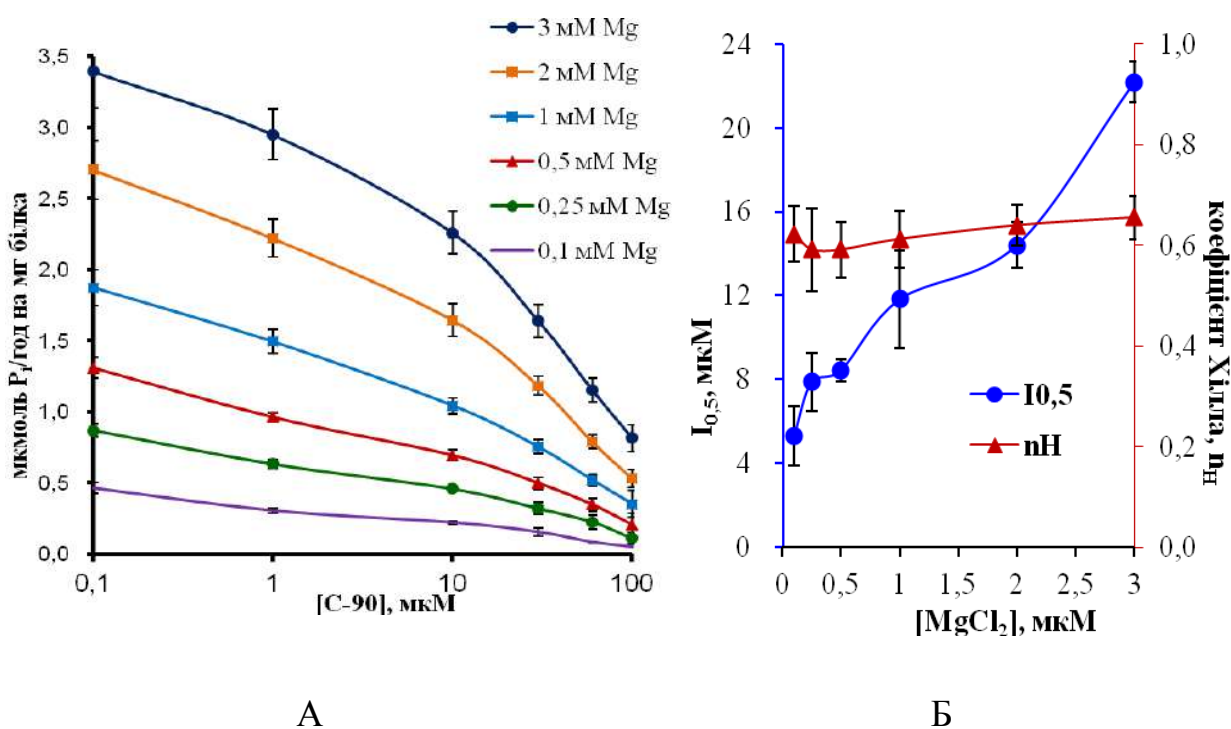


Рис. 4.19. Вплив $MgCl_2$ на залежність Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРазної активності у ПМ клітин міометрія від концентрації калікс[4]арену **C-90** (А) та на коефіцієнт Хілла і коефіцієнт інгібування (Б) даної активності ($M \pm m$, $n = 5$).

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

Далі ми розрахували відповідні кінетичні параметри, що характеризують ефективність інгібування Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРазної активності калікс[4]ареном **C-90** за різних концентрацій $MgCl_2$ (рис. 4.19 Б). З представлених результатів видно, що зі зниженням концентрації $MgCl_2$ істотно зменшується коефіцієнт інгібування калікс[4]ареном **C-90** та не змінюється коефіцієнт Хілла. Отже, за малих концентрацій $MgCl_2$ ефективність інгібування Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРазної активності калікс[4]ареном **C-90** є більшою. Подібна ситуація спостерігалась

також і при дослідженні впливу калікс[4]арену **C-90** на кінетику активації $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази іонами Ca, що описана вище, тому можливо, що вона може бути зумовлена аналогічними причинами, але за участю іонів Mg. Проте відомо, що субстратом АТРазної реакції є саме комплекс MgАТР, і саме тому Mg проявляє активуючу дію на $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазну активність [348], тобто в цьому випадку відрізняються механізми активації іонами Mg та Ca і тому представлені кінетичні ефекти, вірогідно, мають різні механізми. Потрібно також підкреслити, що ми аналізували кінетичні ефекти впливу на $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазну активність саме MgCl_2 , а не іонів Mg, тому ефекти саме Mg^{2+} можуть бути відмінними від описаних.

4.4.3. Концентраційна залежність активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази від АТР за дії калікс[4]арену C-90.

Підвищення концентрації АТР в середовищі інкубації в діапазоні від 0,01 до 3 мМ у відсутності **C-90** призводило до збільшення ензиматичної активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази (рис. 4.20, контроль) за умов фіксованої концентрації MgCl_2 (3 мМ) в інкубаційному середовищі. Методом Хілла були розраховані уявна константа Міхаеліса K_m та коефіцієнт Хілла n_H для АТР, які становлять $56,3 \pm 4,3$ мкМ та $1,32 \pm 0,14$ відповідно ($M \pm m; n = 5$) (рис. 4.21Б).

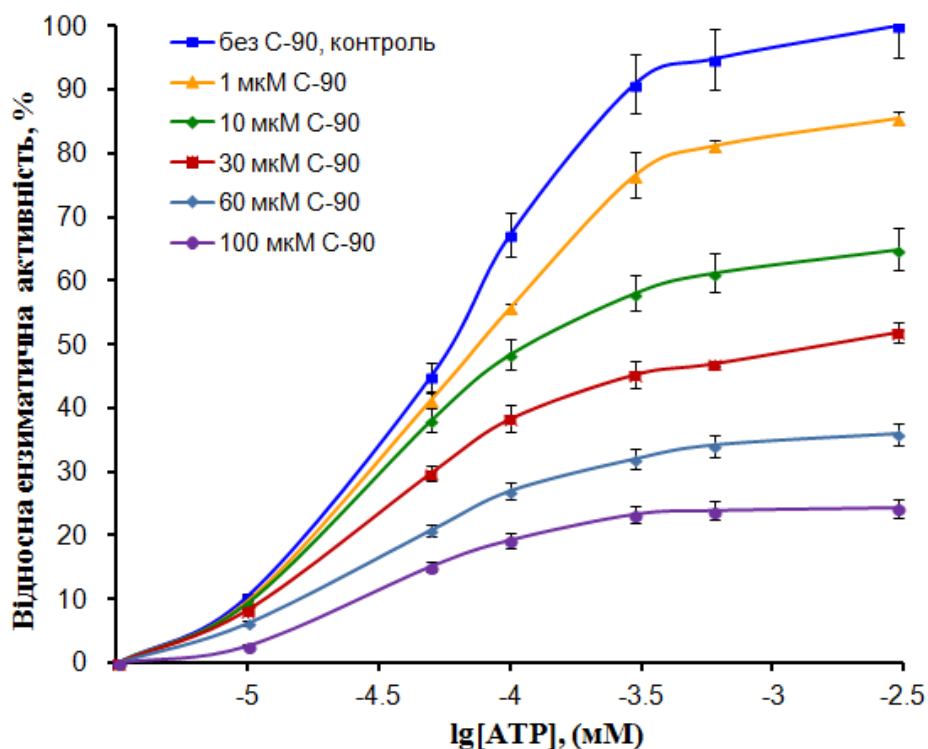


Рис. 4.20. Вплив збільшення концентрації калікс[4]арену **C-90** на залежність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази від концентрації АТР ($M \pm m, n=5$).

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

Ми вивчили, як впливає калікс[4]арен **C-90** на спорідненість ензиму до АТР. Було досліджено вплив 5-ти концентрацій калікс[4]арену **C-90** (відповідно 1, 10, 30, 60 та 100 мкМ) на концентраційну залежність від АТР (рис. 4.20). В усіх випадках спостерігається монотонне зниження активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази, при цьому залежність ензиматичної активності від АТР виявляє характер, подібний до відповідної контрольної залежності без калікс[4]арену **C-90**, але відбувається зниження платоного рівня активності зі зростанням концентрації калікс[4]арену.

З отриманих залежностей ми розрахували максимальну початкову швидкість V_{max} реакції гідролізу АТР, що каталізується $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазою плазматичної мембрани, за відсутності та наявності калікс[4]арену **C-90** у різних концентраціях (рис. 4.21А). Як видно з графіку, калікс[4]арен **C-90**

знижує V_{\max} реакції, що свідчить про зниження числа обертів ензиму за його дії. Нами були також розраховані уявні константи Міхаеліса K_m та коефіцієнти Хілла $n_{H,ATP}$ за відсутності та наявності калікс[4]арену **C-90** у різних концентраціях (рис. 4.21Б). Представлені результати можна інтерпретувати, як відсутність такого впливу. Тобто, вплив калікс[4]арену **C-90** є неконкурентним відносно АТР.

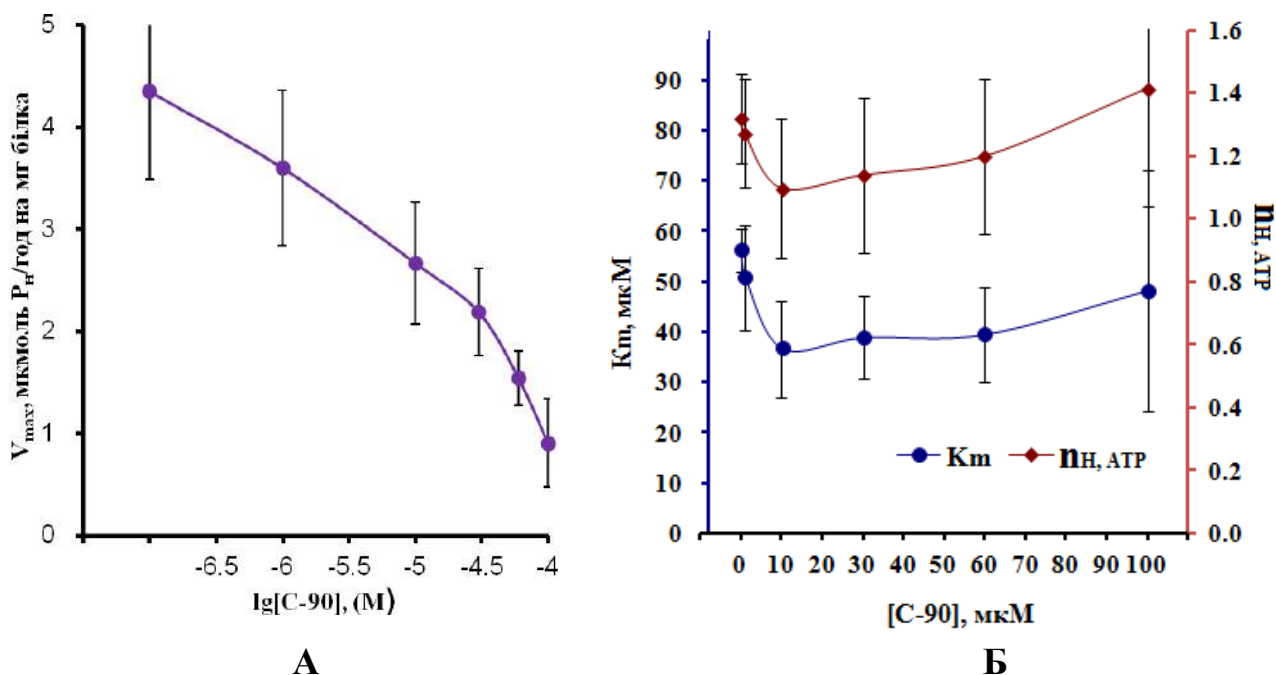
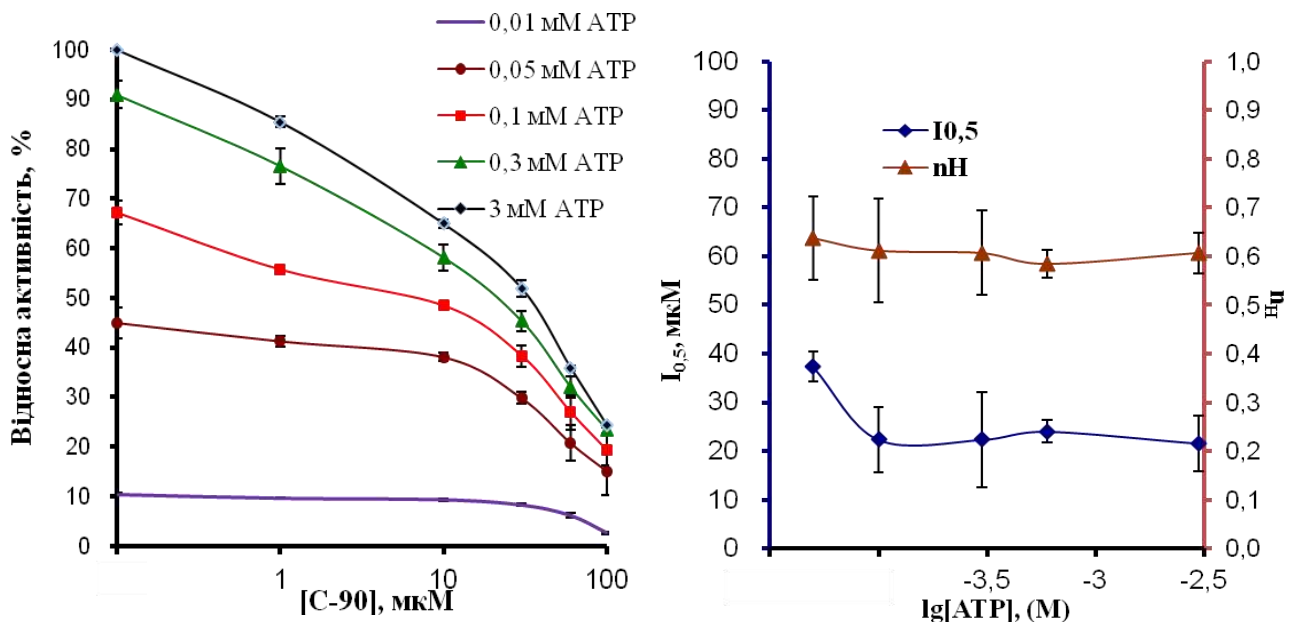


Рис. 4.21. Вплив калікс[4]арену **C-90** на максимальну початкову швидкість (А) та на уявну константу Міхаеліса і коефіцієнт Хілла (Б) реакції гідролізу АТР, що каталізується $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазою ПМ ($M \pm m, n = 5$).

Ми також побудували залежність інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності калікс[4]ареном **C-90** за різних концентрації АТР (рис. 4.22 А), що дало нам змогу розрахувати коефіцієнти інгібування та коефіцієнти Хілла за різних концентрацій АТР (рис. 4.22 Б). З наведених результатів видно, що використання різних концентрацій АТР ніяк не впливає на коефіцієнт інгібування і коефіцієнт Хілла для калікс[4]арену **C-90**, тобто, інгібувальний ефект калікс[4]арену **C-90** на питому ензиматичну активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази не залежить від спорідненості ензиму до АТР.



А **Б**
 Рис. 4.22. Вплив АТР на залежність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності у ПМ клітин міометрія від концентрації калікс[4]арену **C-90** (А) та на коефіцієнт Хілла і коефіцієнт інгібування (Б) даної активності ($M \pm m, n=5$).

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

Таким чином, ефект зменшення активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази під впливом калікс[4]арену **C-90** не залежить від кількості АТР у середовищі інкубації, що вказує на відсутність конкуренції між АТР та калікс[4]ареном **C-90**. Тому можна припустити, що субстратний центр $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази та гіпотетичний сайт взаємодії калікс[4]арену **C-90** не перекриваються на поверхні ензиму.

4.5. Вплив калікс[4]арену **C-90** на Ca^{2+} -транспортувальну активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани.

Якщо калікс[4]арен **C-90** інгібує активність Ca^{2+} -транспортувальної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ, то слід очікувати, що під дією цієї сполуки Mg^{2+} , АТР-залежний транспорт іонів Са через ПМ буде пригнічуватись і, відповідно, концентрація цих іонів у міоплазмі підвищуватись. Подальші дослідження були

спрямовані на з'ясування цих питань.

4.5.1. Характеристика Mg^{2+} , АТФ-залежного Ca^{2+} -транспорту у везикулах плазматичної мембрани.

Щоб дослідити транспортну активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ ми застосували Ca^{2+} -чутливий флуоресцентний зонд fluo-4 АМ, яким попередньо навантажували везикули ПМ (методика описана у розділі «Матеріали та методи досліджень»).

Повний гідроліз ацетоксиметильних форм дуже важливий для того, щоб уникнути артефактів. Якщо починати експеримент до початку повного гідролізу, зростаюча флуоресценція під час гідролізу етерифікованої форми зонда fluo-4 АМ у неетерифіковану fluo-4 у ході виконання експерименту може інтерпретуватися невірно (як відповідь зонда на зміну концентрації Ca^{2+}). Тому важливо було попередньо підібрати концентрацію та час навантаження везикул ацетоксиметильною формою зонда. На рис. 4.23 зображена флуоресцентна відповідь зонда, збудженого на хвилі 488 нм [244], яка зростає впродовж інкубації ПМ з fluo-4 АМ (1 мкМ).

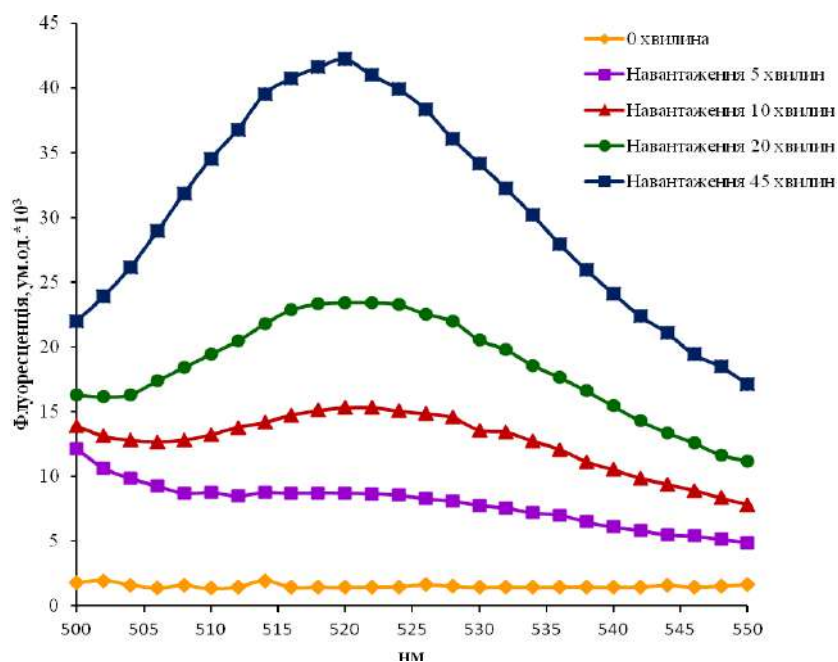


Рис. 4.23. Зростання флуоресцентної відповіді fluo-4 при збільшенні часу інкубації зонда з везикулами ПМ. Наведено результат типового експерименту.

Згідно з результатами експериментів, збільшення тривалості навантаження зондом призводило до зростання квантового виходу флуоресценції fluo-4 АМ ($\lambda_{\text{зб}} = 488 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{фл}} = 520 \text{ нм}$) (рис. 4.23), що свідчить про розщеплення естеразами ацетоксиметильного естеру зонда у вільну флуоресцентну (деацетоксиметильну кислоту) форму. Також ми довели, що препарат везикул із зондом позитивно реагував на зміну концентрації вільного Ca^{2+} у середовищі інкубації: чим більша ця концентрація, тим більшою була флуоресцентна відповідь.

Для коректного визначення транспортної активності Ca^{2+} -помпи ПМ необхідно знати топологію мембранних фрагментів фракції ПМ. Згідно з даними праці [63] метод отримання везикул ПМ, який був застосований, характеризується наявністю переважної більшості фрагментів, які замкнені цитоплазматичним боком назовні («inside out»), на користь чого свідчить АТР-залежне накопичення $^{45}\text{Ca}^{2+}$, що пригнічується окситоцином тільки у випадку його попереднього навантаження у везикули. Нами за допомогою визначення питомої активності ензимів-маркерів ПМ (Na^+, K^+ -АТРази та «базальної» Mg^{2+} -АТРази) встановлено, що фракція ПМ приблизно на 50 % складається з везикул, які замкнені «inside out», інша половина складається з незамкнених фрагментів та закнених «outside out». Отже, везикульовані мембранні фрагменти є зручним інструментом для дослідження систем активного транспорту Ca^{2+} , які забезпечують перенесення катіону з міоплазми у позаклітинний простір.

Транспортну активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ ініціювали внесенням 2 мкМ CaCl_2 після стабілізації флуоресцентної відповіді зонда (близько 5-10 хв). Внесення Ca^{2+} у середовище інкубації призводило до поступового зростання квантового виходу зонда (рис. 4.24). Подібне збільшення квантового виходу характеризувалося відсутністю чутливості до 100 нМ тапсигаргіну

(специфічний інгібітор $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР [201]), 1 мМ азиду натрія (інгібітор дихання мітохондрій [209]), але повністю пригнічувалося внесенням еозину Y (дані не наведено) (неспецифічний інгібітор АТРаз ПМ [242, 243]). За відсутності Mg^{2+} та АТР у середовищі інкубації зростання флуоресцентної відповіді практично не спостерігалось (рис. 4.24). Внесення у середовище інкубації аліквоти розчину ЕГТА (2 мМ) разом з Ca^{2+} іонофором А-23187 (2,5 мкМ) зменшувало флуоресцентний сигнал fluo-4 і призводило до припинення подальшого зростання квантового виходу зонда (рис. 4.24, 450 с).

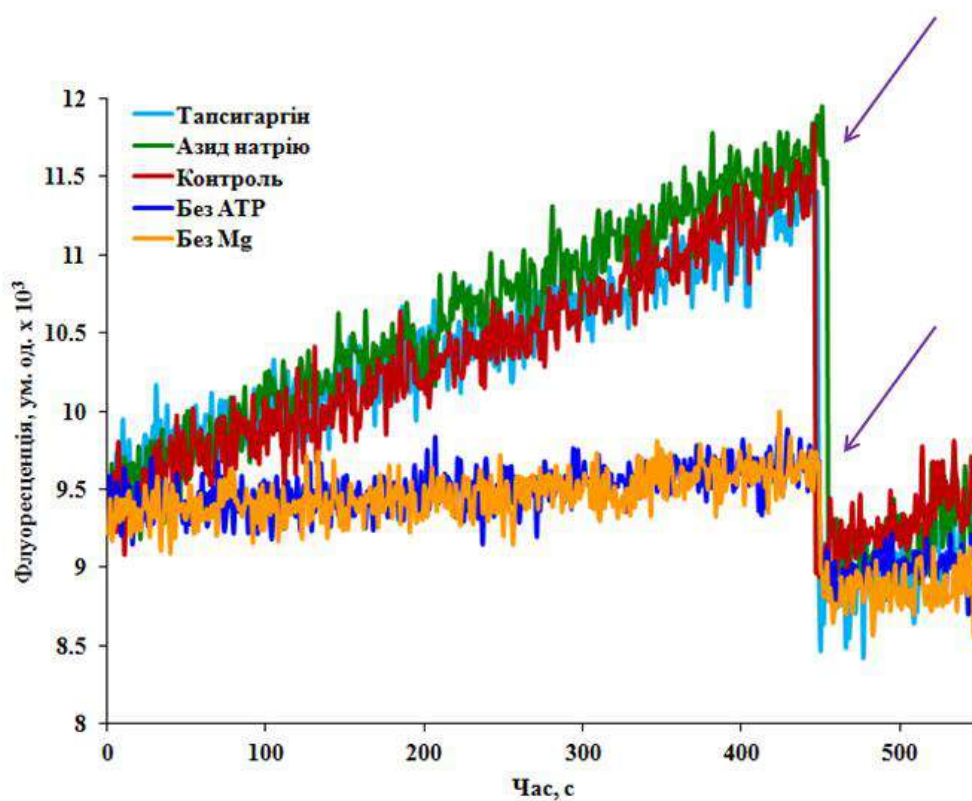


Рис. 4.24. Кінетика флуоресценції Ca^{2+} -чутливого зонду fluo-4 за умов моделювання Mg^{2+} -АТР-залежної акумуляції іонів Ca^{2+} в везикулах («inside out») ПМ клітин міометрія.

Стрілкою позначено момент внесення аліквоти розчину кальцієвого іонофору А-23187 разом з ЕГТА (кінцеві концентрації у середовищі інкубації 5 мкМ та 2 мМ відповідно). Наведено результат типового експерименту.

Отже, згідно з отриманими результатами, запропонована нами система дає змогу реєструвати Ca^{2+} транспорт у везикули ПМ, основна компонента якого обумовлена саме активністю Ca^{2+} -помпи ПМ.

4.5.2. Mg^{2+} , АТР-залежний Ca^{2+} -транспорт у везикулах плазматичної мембрани за дії калікс[4]арену С-90.

У подальших експериментах, ми вивчали вплив калікс[4]арену С-90 на транспортну активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ із використанням розробленої нами моделі.

Ми показали, що калікс[4]арен С-90, у концентрації 100 мкМ ефективно пригнічує транспортну активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ, оскільки накопичення іонів Са всередині везикул не спостерігалось (рис. 4.25).

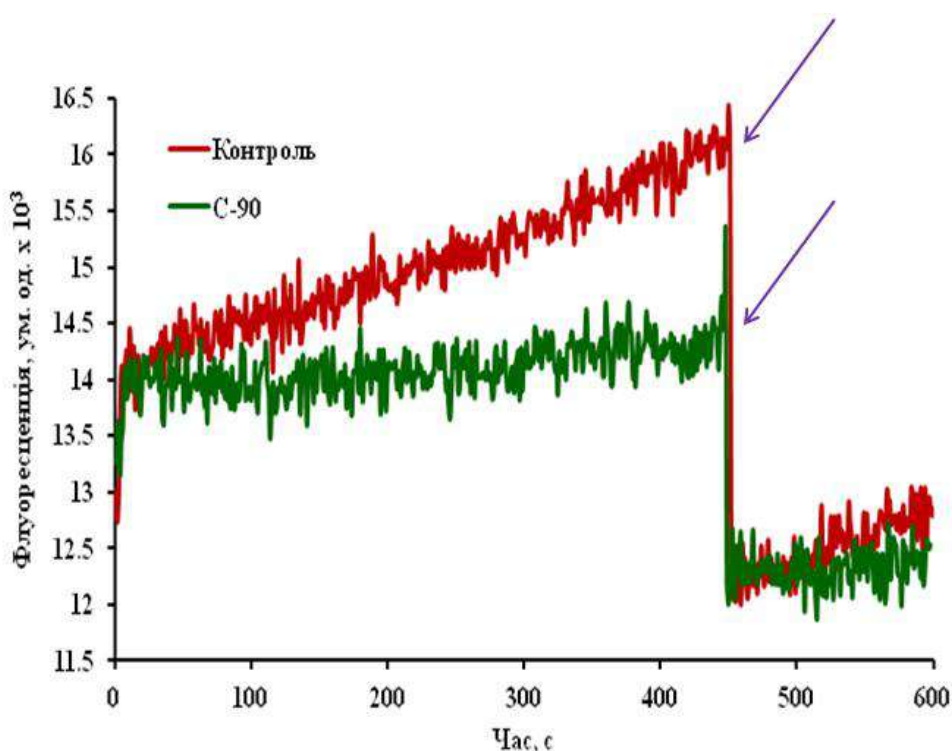


Рис. 4.25. Вплив калікс[4]арену С-90 (100 мкМ) на Mg^{2+} -АТР-залежний транспорт Ca^{2+} у фракції ПМ міометрія.

Стрілкою позначено момент внесення аліквоти розчину кальцієвого іонофору А-23187 разом з ЕГТА (кінцеві концентрації у середовищі інкубації 5 мкМ та 2 мМ відповідно). Наведено результат типового експерименту.

Слід зазначити, що за умов сукупного внесення ЕГТА та іонофору А-23187, відбувається падіння флуоресцентного сигналу нижче початкового рівня. Це можна пояснити тим, що ще до активації транспорту іонів кальція Ca^{2+} -помпою ПМ у везикулах ПМ міститься певна кількість вільного Ca^{2+} , що і

підвищує флуоресцентний сигнал fluo-4. Після внесення ЕГТА весь вільний Ca^{2+} зв'язується, і це, в свою чергу, призводить до зниження флуоресценції зонда нижче за початковий рівень сигналу.

Ми раніше показали, що калікс[4]арен **C-90** пригнічує АТР-гідролазну активність Ca^{2+} -помпи ПМ. Але інгібування ензиматичного гідролізу АТР неоднозначно вказує на пригнічення і транспортної активності. Виконані нами дослідження і отриманий результат (рис. 4.25) дійсно підтверджує те, що **C-90** інгібує не тільки АТР-гідролазну активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази, але і транспортну функцію Ca^{2+} -помпи ПМ у міоцитах матки.

Оскільки Ca^{2+} -помпа ПМ є трансмембранним білком, активність якого залежить від потенціалу (як було показано на системі штучного потенціалу « K^+ -валіноміцин»), а для калікс[4]арену **C-90** характерні мембранотропні властивості, було перевірено чутливість дії **C-90** до поляризації ПМ. Потенціал створювали з використанням принципів рівноваги Гіббса-Доннана. Спочатку ми перевірили вплив поляризації на транспортну функцію Ca^{2+} -помпи ПМ. Показано, що негативний заряд на внутрішній поверхні везикул ПМ гальмує активність помпи. Зворотня ситуація стимулює її активність (дані не наведено). Ми показали, що інгібіторні властивості **C-90** покращуються за наявності негативного потенціалу на внутрішньому боці везикул ПМ і зменшуються, якщо на внутрішній поверхні позитивний заряд [358].

4.6. Математичне моделювання впливу калікс[4]арену C-90 на вміст іонів Са у незбуджених гладеньком'язових клітинах.

Загальновідомо, що концентрація іонів Са поза клітиною у 10^4 - 10^3 разів вища за його внутрішньоклітинну концентрацію [63], і відповідно, це призводить до появи істотного електрохімічного градієнта за кальцієм, спрямованого в цитозоль (вільна енергія Гіббса $\Delta G = RT \ln \{ [Ca^{2+}]_o / [Ca^{2+}]_i \} + 2F\Delta\psi = 40$ кДж/моль). Унаслідок такого електрохімічного градієнта іонів Са стає можливим надходження у незбуджені

клітини стаціонарного «базального» потоку іонів Ca, величина якого становить $10^{-15} - 10^{-14}$ моль Ca^{2+}/cm^2 за 1 сек [392]. Проте, у стані спокою у цитозолі концентрація Ca^{2+} підтримується на сталому рівні – $10^{-7}-10^{-8}$ М. Припускають, що основна роль у підтриманні базальної концентрації іонів Ca (концентрація Ca^{2+} до збудження) у цитозолі відіграє саме Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРази ПМ [63], оскільки Ca^{2+} -уніпортер мітохондрій та Na^+/Ca^{2+} -обмінник мають (порівняно з помпою) нижчу спорідненість до Ca^{2+} (значення K_{Ca} рівне 0,1 – 0,3 мкМ, 1 мкМ та 10 – 20 мкМ відповідно [360]).

Ми припустили, що пригнічення активності саме Mg^{2+} ,АТР-залежної Ca^{2+} -помпи ПМ призведе до зростання базальної концентрації Ca^{2+} в клітинах міометрія і, отже, до збільшення базального тонуусу матки. Справді, з даних літератури відомо, що використання тапсигаргіну (специфічного інгібітора Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРази CP) призводить до незначного зростання внутрішньоклітинної концентрації кальцію [203]. Водночас у випадку ГМ саркоплазматичний ретикулум є, порівняно з іншими м'язами, слабкорозвиненим, займає близько 5 % внутрішньоклітинного об'єму та має нижчу ємність щодо іонів Ca порівняно з цитозолем, тому, відповідно, блокування Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРази CP не може використовуватися для підвищення стаціонарної (нетранз'єнтної) цитозольної концентрації Ca^{2+} [313, 392].

Отже, взявши до уваги визначені нами у дослідях кінетичні параметри чутливості Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРази ПМ до пригнічувальної дії калікс[4]арену **C-90** та використавши метод математичного моделювання ми розбудували кількісну модель (в стаціонарному режимі) індукції зазначеним калікс[4]ареном збільшення базальної концентрації іонів Ca в міоцитах матки.

Швидкість функціонування (V) Mg^{2+} ,АТР-залежної Ca^{2+} -помпи ПМ описується рівнянням Хілла (1):

$$V = \frac{\langle V_{\max} \rangle [Ca^{2+}]_e^n}{\langle K_{Ca} \rangle^n + [Ca^{2+}]_e^n}, \quad (1)$$

де $\langle V_{max} \rangle$ – уявна максимальна швидкість транссарколемального викиду іонів Са із клітини, $[Ca^{2+}]_i$ – концентрація внутрішньоклітинного Ca^{2+} , $\langle K_{Ca} \rangle$ – уявна константа активації для іонів Са, n_{Ca} – коефіцієнт Хілла для іонів Са.

Згідно з отриманими нами експериментальними результатами коефіцієнт Хілла n_{Ca} наближено рівний 2 (рис. 4.15б), зміну цитозольної концентрації Ca^{2+} у незбуджених міоцитах матки у часі можна описати рівнянням (2):

$$\frac{d[Ca^{2+}]_i}{dt} = \gamma([Ca^{2+}]_e - [Ca^{2+}]_i) - \frac{\langle V_{max} \rangle \times [Ca^{2+}]_e^2}{\langle K_{Ca} \rangle^2 + [Ca^{2+}]_i^2}, \quad (2)$$

де зменшуване описує базальне надходження іонів Са у клітину через ПМ, спричинене наявністю градієнту ($[Ca^{2+}]_e - [Ca^{2+}]_i$) в залежності від константи швидкості проникності мембрани в даному випадку для іонів Са γ , а від'ємник – це швидкість роботи Mg^{2+} , АТР-залежної Ca^{2+} -помпи ПМ. За стаціонарних умов концентрація Ca^{2+} у клітині не змінюється, тобто $\frac{d[Ca^{2+}]_i}{dt} = 0$. У цьому разі наведене вище рівняння (2) перетворюється на кубічне рівняння (3):

$$\gamma[Ca^{2+}]_i^3 + (\langle V_{max} \rangle - \gamma[Ca^{2+}]_e) \times [Ca^{2+}]_i^2 + \gamma \langle K_{Ca} \rangle^2 [Ca^{2+}]_i - \gamma \langle K_{Ca} \rangle^2 [Ca^{2+}]_e = 0. \quad (3)$$

Розв'язавши це рівняння (3) відносно $[Ca^{2+}]_i$, ми отримаємо залежність базальної концентрації кальцію $[Ca^{2+}]_i$ від константи швидкості проникності мембрани γ , позаклітинної концентрації іонів Са $[Ca^{2+}]_e$, константи активації для іонів Са K_{Ca} , та максимальної швидкості роботи помпи V_{max} . Розглянуте нами кубічне рівняння мало три корені, один з яких був від'ємним, два інші були спряженими – значення позитивного кореня збігалось з очікуваним значенням внутрішньоклітинної концентрації кальцію (≈ 100 нМ).

Згідно з результатами експериментів при концентрації калікс[4]арену С-90 0,1-50 мкМ значення K_{Ca} практично не змінюється (тобто $\langle K_{Ca} \rangle = K_{Ca}$), а змінюється лише V_{max} , що свідчить про механізм повного неконкурентного інгібування в заданих межах концентрації калікс[4]арену С-90. У випадку ж повного неконкурентного інгібування величина $I_{0,5} = K_i$. Тоді, відповідно до

відомих положень ензиматичної кінетики, для $\langle V_{max} \rangle$ (рис. 3а) маємо рівняння (4):

$$\langle V_{max} \rangle = \frac{K_i}{K_i + [C - 90]} V_{max} \cdot \quad (4)$$

За отриманими попередніми результатами є підстави припустити, що за фізіологічних концентрацій іонів Ca ($< 0,1$ мкМ) величина $I_{0,5} = K_i$ практично не залежить від концентрації Ca^{2+} .

Використовуючи сталі значення $\gamma = 10^{-3} \text{ см}^{-1}$ [207], $[Ca^{2+}]_i = 1 \cdot 10^{-3} \text{ М}$ [63], $K_{Ca} = 1,8 \cdot 10^{-7} \text{ М}$, $I_{0,5} = 2 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ (рис. 3) та симулюючи значення V_{max} , що початково становило $4,6 \cdot 10^{-6} \text{ М/хв}$ [392], ми, відповідно до рівнянь (3) та (4), отримали модельну залежність базальної рівноважної концентрації іонів Ca у незбуджених міоцитах матки за умов зміни концентрації калікс[4]арену C-90 – селективного інгібітора Mg^{2+} , АТР-залежної Ca^{2+} -помпи ПМ (рис. 4.26).

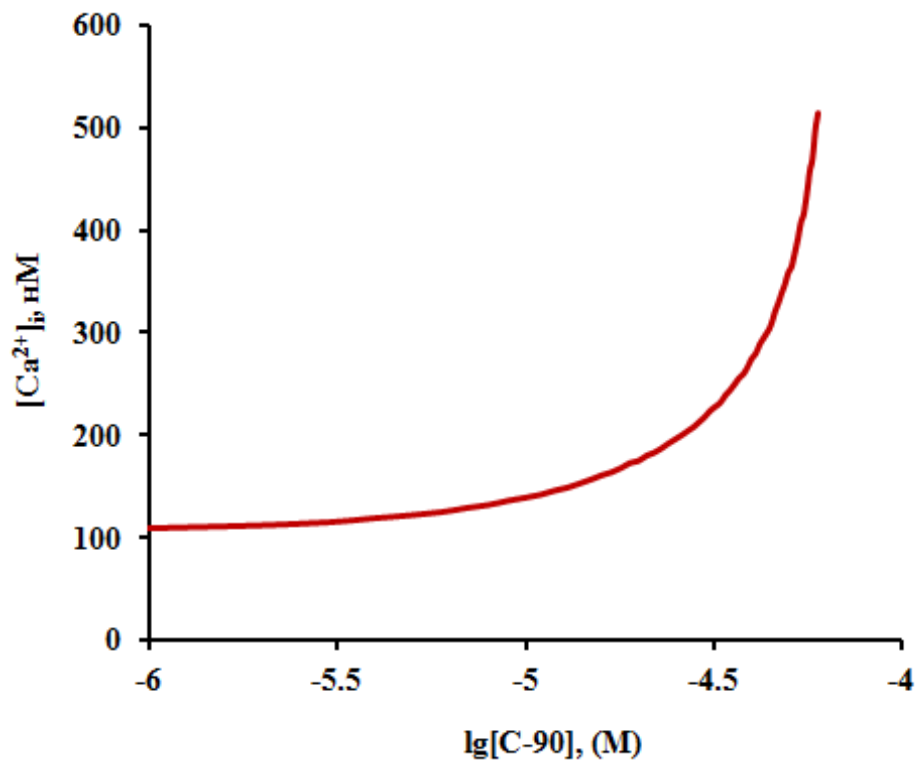


Рис. 4.26. Математична модель залежності рівноважної базальної концентрації іонів Ca в клітинах міометрія від концентрації калікс[4]арену C-90.

Отже, згідно з результатами модельних розрахунків маємо таке: за концентрації селективного інгібітора Mg^{2+} , АТР-залежної Ca^{2+} -помпи ПМ калікс[4]арену **C-90** 10^{-6} - $2 \cdot 10^{-5}$ М хід кривої зміни цитозольної концентрації Ca^{2+} у незбуджених міоцитах є досить пологим, а за концентрації калікс[4]арену **C-90** вищої за $2 \cdot 10^{-5}$ М крива наближається до експоненціальної залежності. Як бачимо, застосування калікс[4]арену **C-90** у низьких концентраціях ($< 10 - 20$ мкМ) має перевагу через помірний вплив на внутрішньоклітинну концентрацію Ca^{2+} , а саме: цитоплазматична концентрація іонів Са зростає не більш як у 2 рази відносно початкової (100 нМ), що не повинно призводити до контрактури матки, а дасть змогу керувати базальним тонусом її м'язів.

4.7. Вплив калікс[4]арену C-90 на концентрацію Ca^{2+} у клітинах гладеньких м'язів.

Зважаючи на те, що Ca^{2+} -помпа ПМ відіграє важливу роль у контролі концентрації іонів Са у цитозолі ГМ та взявши до уваги результати математичного моделювання, важливо з'ясувати експериментально, чи впливатиме калікс[4]арен **C-90** на внутрішньоклітинну концентрацію Ca^{2+} у ГМК. У зв'язку з цим у своїх подальших експериментах ми використали конфокальну мікроскопію.

Із застосуванням Ca^{2+} -чутливого зонда fluo-4 була встановлена зміна внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} під впливом калікс[4]арену **C-90**. Було показано, що під дією калікс[4]арену **C-90** (20 мкМ) відбувається транзйентне (протягом 2-2,5 хв) різке зростання флуоресцентної відповіді Ca^{2+} -чутливого зонда fluo-4 на 45 ± 9 % ($M \pm m, n = 7$) у клітині (рис. 4.27 та рис. 4.28).

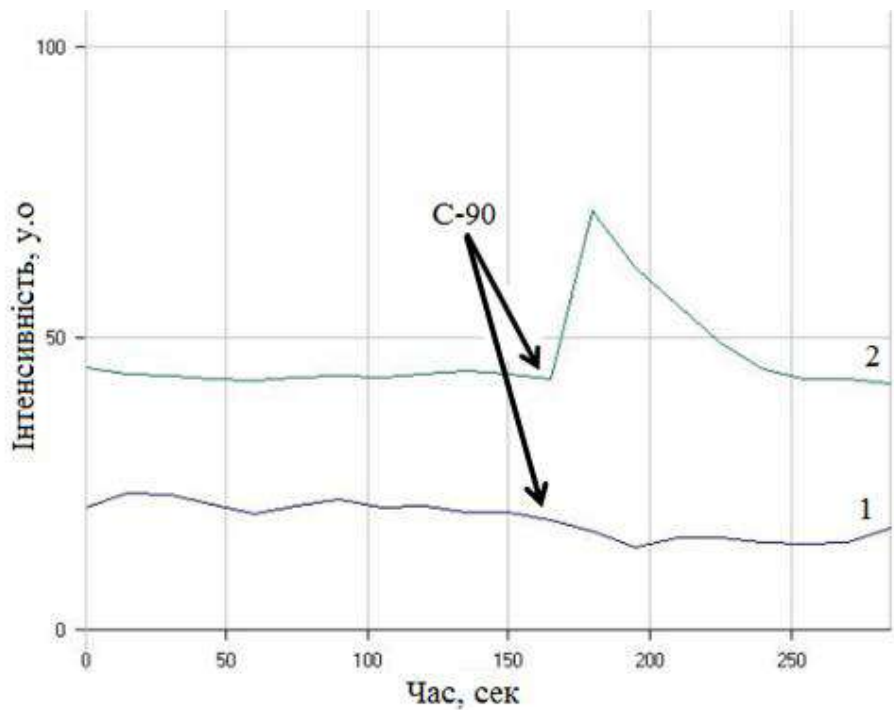


Рис. 4.27. Зміна флуоресценції зондів в міоциті матки, зареєстрована за допомогою конфокальної мікроскопії: ДНК-чутливого Hoechst (1) та Ca^{2+} -чутливого fura-2 AM (2). На 160 сек було внесено аліквоту розчину **C-90** (кінцева концентрація - 20 мкМ). Наведено результати типового експерименту.

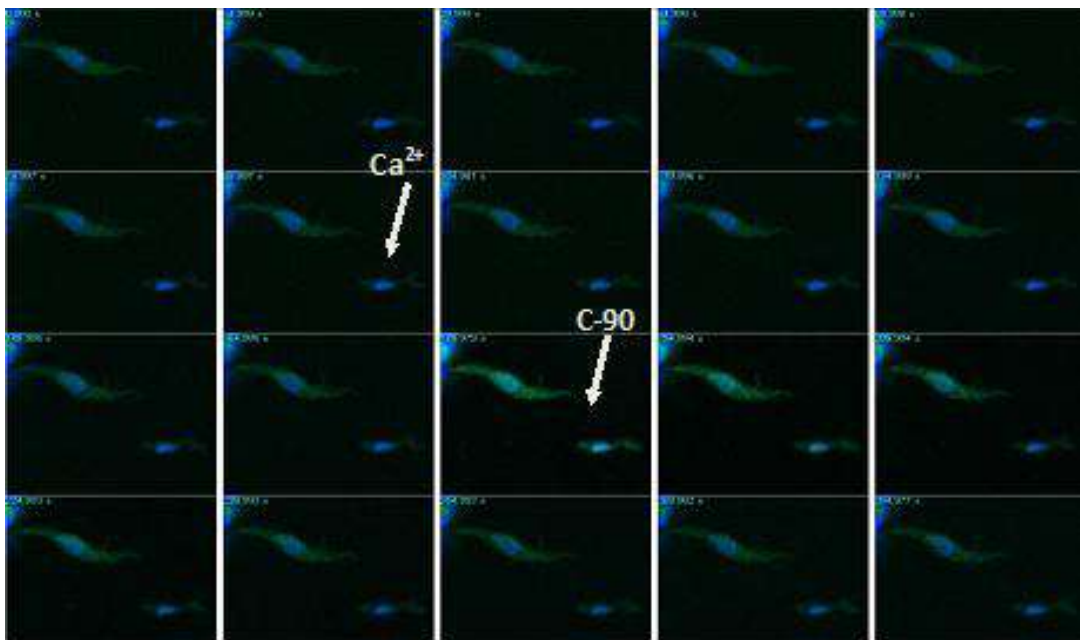


Рис. 4.28. Серія послідовних знімків ГМК з використанням скануючого конфокального мікроскопу. Стрілками позначено моменти внесення Ca^{2+} (3 мкМ) та калікс[4]арену **C-90** (20 мкМ). Наведено результати типового експерименту.

Отримані дані підтвердили, що під впливом селективного інгібітора $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ – калікс[4]арену С-90 справді зростає концентрація іонізованого Ca^{2+} у міоцитах. Після цього квантовий вихід зонда зменшується й інтенсивність флуоресценції повертається до початкового рівня.

У контролі, де використовувалася калікс[4]аренова «чаша» **С-150** (20 мкМ), яка за нашими даними не чинила вираженого впливу на активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ, підвищення флуоресцентного сигналу fluo-4 не спостерігали (результати не наведено). Також незмінним лишився рівень флуоресценції Hoechst, який був локалізований в основному в ядрі ГМК і фону.

Ці результати свідчать про те, що під впливом калікс[4]арену **С-90** (20 мкМ) відбувається підвищення концентрації Ca^{2+} у клітині, яке пов'язано зі зниженням базальної активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ. Разом з тим протягом наступних 100 сек концентрація Ca^{2+} знижується до початкового рівня, що може бути пов'язано з залученням компенсаторних Ca^{2+} -транспортувальних систем у міоцитах до релаксації кальцієвого сигналу, які мають нижчу афінність до Ca^{2+} і реагують, головним чином, на його високі концентрації в клітині (Ca^{2+} -уніпортер мітохондрій, Na^+ - Ca^{2+} -обмінник ПМ).

4.8. Вплив калікс[4]арену С-90 на гідродинамічний діаметр гладеньком'язових клітин.

Вплив калікс[4]аренів на іон-транспортувальні системи міоцитів може детермінувати їх вплив на форму клітин. Зміну форми ГМК через їх скорочення та модифікацію водно-осмотичного балансу дає змогу встановлювати лазерна кореляційна спектроскопія, за допомогою якої можливо фіксувати зміни ефективного гідродинамічного діаметру ГМК.

Згідно даних літератури показано, що чинники, які підвищують скоротливу відповідь ГМ, так само наочно змінюють ефективний гідродинамічний діаметр ГМК [42].

Як показали результати експериментів, внесення утеротоніка окситоцину (100 нМ) призводило до зменшення ефективного гідродинамічного діаметру у випадку суспензії ГМК на $23,3 \pm 3,2$ % ($M \pm m$, $n = 6$) відносно контрольного значення (рис 4.29, синій стовпчик).

У випадку контролю середнє значення ефективного гідродинамічного діаметру міоцитів становить близько 8-9 мкм. Ми вимірювали гідродинамічний діаметр ГМК протягом 1 хв 5 разів, за отриманими даними розраховували середнє значення. У якості контролю на розчинник аплікація аліквоти розчину ДМСО не призводила до істотних змін досліджуваного параметру – гідродинамічний діаметр змінювався лише на $3,5 \pm 1,6$ % ($M \pm m$, $n = 6$) відносно контролю (рис. 4.29, зелений стовпчик). У той же час використання інгібітору Mg^{2+} , АТР-залежної Ca^{2+} -помпи ПМ ГМК калікс[4]арену **C-90** (50 мкМ) зумовлювала, аналогічно до дії окситоцину, зменшення гідродинамічного діаметра на $27,8 \pm 3,8$ % ($M \pm m$, $n = 6$) відносно контрольного значення (рис. 4.29, червоний стовпчик).

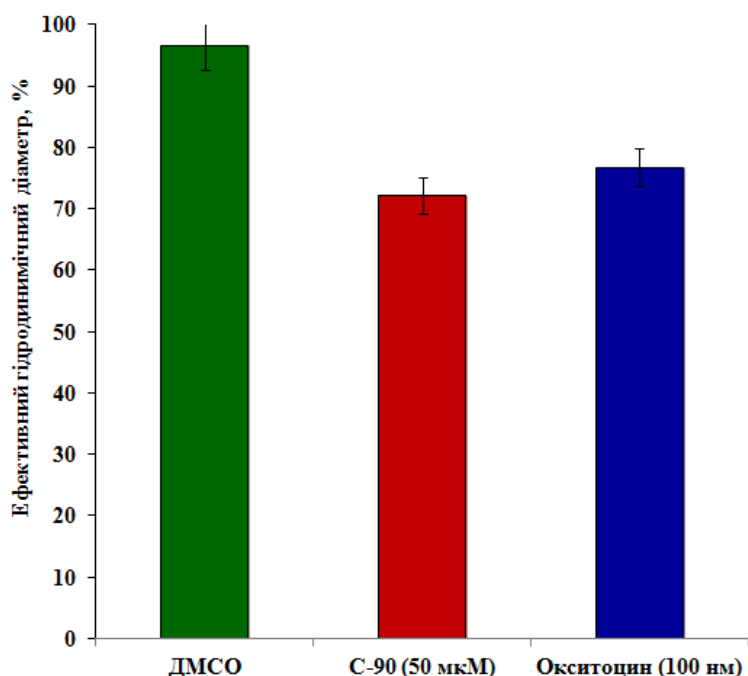


Рис. 4.29. Зміна гідродинамічного діаметру ГМК за дії різних ефекторів ($M \pm m$, $n = 6$).

За 100 % прийнято контрольне значення гідродинамічного діаметру ГМК за відсутності дії ефектів.

За даними літератури [39] зміна гідродинамічного діаметра ГМК корелює з тензометричними дослідженнями на ГМ. Так, оскільки наші дослідження було проведено на суспензії міоцитів, коли клітини мають округлу форму, зміну гідродинамічного діаметру не можна трактувати як скорочення/подовження, але це можна пояснити з погляду перебудови елементів цитоскелета [195, 462], які супроводжують процес скоротливої активності, що в свою чергу призводить до зміни морфології ГМК. Крім того зміни активного транспорту іонів можуть спричинити модифікації водно-осмотичного балансу між клітинами та середовищем інкубації, що також впливатиме на об'єм клітин.

Отже, калікс[4]арен **C-90** зменшує ефективний гідродинамічний діаметр ГМК ідентично до дії утеротоніка окситоцину. Подібна зміна гідродинамічного діаметру може трактуватися як сукупність подій, які супроводжують процеси скорочення/розслаблення ГМК, зміни водно-осмотичного балансу. Оскільки раніше було показано, що зміна гідродинамічного діаметру ГМК під впливом скоротливих агентів корелює з станом скорочення ГМ, то подібні результати свідчать про перспективні можливості використання калікс[4]арену **C-90** у якості регулятора скоротливої активності ГМ матки.

4.9. Молекулярний докінг взаємодії калікс[4]арену **C-90 і його модельних сполук з ліганд-зв'язувальними ділянками Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани.**

З метою дослідження структурних особливостей калікс[4]арену **C-90** ми провели молекулярне моделювання його конформації.

Ми виходили з того, що в молекулі калікс[4]арену **C-90** присутні по чотири N-сульфоніламідинові і третбутильні групи з протонованими амінними

атомами азоту і двома депротонованими гідроксилами різних фосфонових фрагментів. Щоб запобігти проблемі локальних мінімумів енергії при розрахунках, ми провели конформаційний пошук оптимальної геометрії молекули, використовуючи метод молекулярної механіки (силове поле MM+) [275]. При цьому були відібрані декілька енергетично мінімізованих конформерів. Загальні енергії цих структур також перерахували напівемпіричним методом (поле CNDO), після чого вибрали одну структуру з найменшою вільною енергією. При цьому, загальна енергія після мінімізації енергії становила близько 300 ккал/моль.

Після проведення “мінімізації” енергії калікс[4]арен **C-90** мав конусовидну конформацію (рис. 4.30). Відстань між сусідніми атомами кисню на нижньому вінці макроциклу у випадку трет-бутильних залишків складають біля 0,3 нм. Фенольні фрагменти бокових залишків були розташовані дистально відносно трифторметильних залишків. Причому дані залишки локалізуються майже ортогонально відносно площини макроциклу і просторово доступні для міжмолекулярних взаємодій (рис. 4.30).

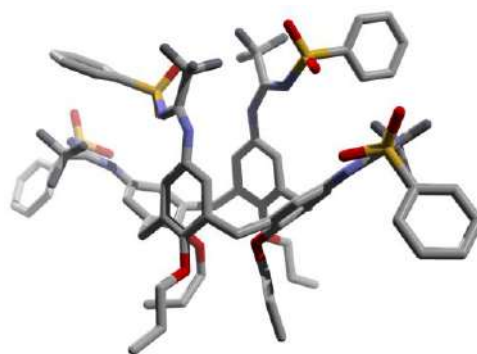


Рис. 4.30. Енергетично мінімізована структура калікс[4]арену C-90. Мінімізація енергії здійснена за допомогою методу MM2 (molecular mechanics 2).

Виходячи із даних комп'ютерного моделювання і порівняння амінокислотних послідовностей, можна припустити, що загальна структура $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ подібна іншим типам P_2 -АТРаз, в особливості $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -

АТРази сарко(ендо)плазматичного ретикулума [154, 209, 470]. Основні “глобальні” відмінності між двома типами кальцієвих pomp зводяться до відмінності в СООН-кінцевому “хвості”, який, як правило, менше у випадку АТРази ретикулума (від 20 до 50 залишків), ніж у випадку АТРази ПМ (від 70 до 200 залишків). Зокрема показаний трохи більший розмір цитоплазматичної петлі між 2 і 3 трансмембранною ділянкою і С-кінцевий домен, в яких знаходяться ділянки зв'язування кислих фосфоліпідів і кальмодуліна відповідно. Тому моделювання взаємодії лігандів з Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазою ПМ здійснювали з використанням моделі АТРази ретикулума в якості шаблону, після проведення вирівнювання амінокислотної послідовності деяких (функціонально важливих) не гомологічних ділянок Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ на шаблоні АТРази ретикулума.

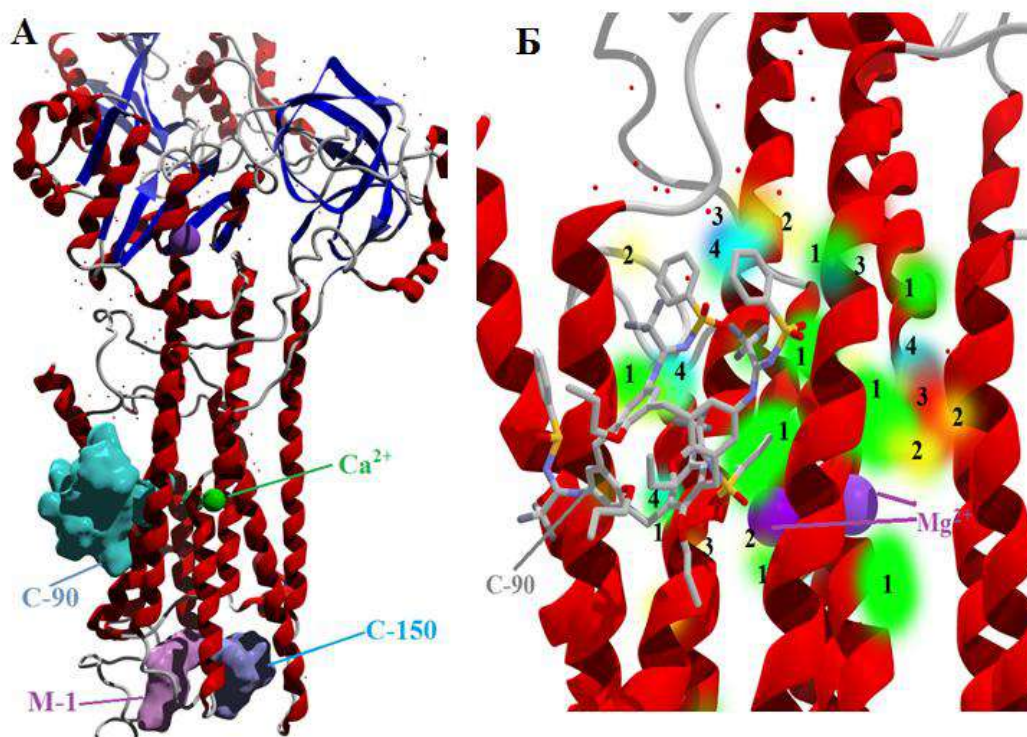


Рис. 4.31. А. Найбільш імовірні місця зв'язування різних лігандів функціонально-активними ділянками Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази (отримано методом докінгу для калікс[4]аренів С-90 і С-150, а також для фрагменту М-1). Б. Карта різноманітних типів взаємодій, які приймають участь у стабілізації С-90 з Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазою плазматичної мембрани.

Зелений (1) – стеричні взаємодії; жовтий (2) – донори водню; червоно-синій (3) – електростатичні взаємодії; синьо-зелений (4) – акцептори водню.

Ми визначали потенційні сайти взаємодії лігандів з ліганд-зв'язувальними ділянками Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази (рис. 4.31 А), наявність яких підтверджується значеннями мінімальної енергії зв'язування і амінокислотним оточенням ліганд-зв'язуючих ділянок. Із врахуванням розмірів і геометричної конформації слід було очікувати, що калікс[4]арен **C-90** і його модельні сполуки (**C-150**, **M-1**) будуть мати різну спорідненість до ділянок зв'язування Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази. Причиною цього можуть бути відмінності в організації оточення ліганд-зв'язуючих ділянок помпи для цих інгібіторів. На рис. 4.31 Б приведена карта різних типів взаємодій, які беруть участь в утворенні комплексу ензиму з калікс[4]ареном **C-90**.

Визначення найбільш імовірних місць взаємодії калікс[4]арену **C-90** з Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазою показало, що вона може утворювати з ним комплекс в області, структурно наближеної до зони зв'язування з високою спорідненістю до Ca^{2+} , котра знаходиться в області петлі між спіралями М4-М6 (ділянка між трансмембранними доменами 4 і 5, що включає основний каталітичний домен, в том числі сайт зв'язування АТФ) і спіралі М-8 (рис. 4.32). При цьому дана петля модулює функціональні властивості Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази, в том числі спорідненість до катіонів.

Ми не виключаємо, що зв'язування молекули калікс[4]арену **C-90** в області, безпосередньо наближеної до ділянки між доменами 4 і 5, може спричинити пошкодження його конформаційної рухливості шляхом зміни структури ензиму, і тим самим впливати на реакційний цикл Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази и спорідненість до іонів, які беруть участь у реакції.

Результати комп'ютерного моделювання свідчать про те, що гідрофобну “кишенню”, яка взаємодіє з гідрофобною “чашею” калікс[4]арену **C-90**, формують залишки Phe256, Phe776, Phe834, Phe835 і Tyr837.

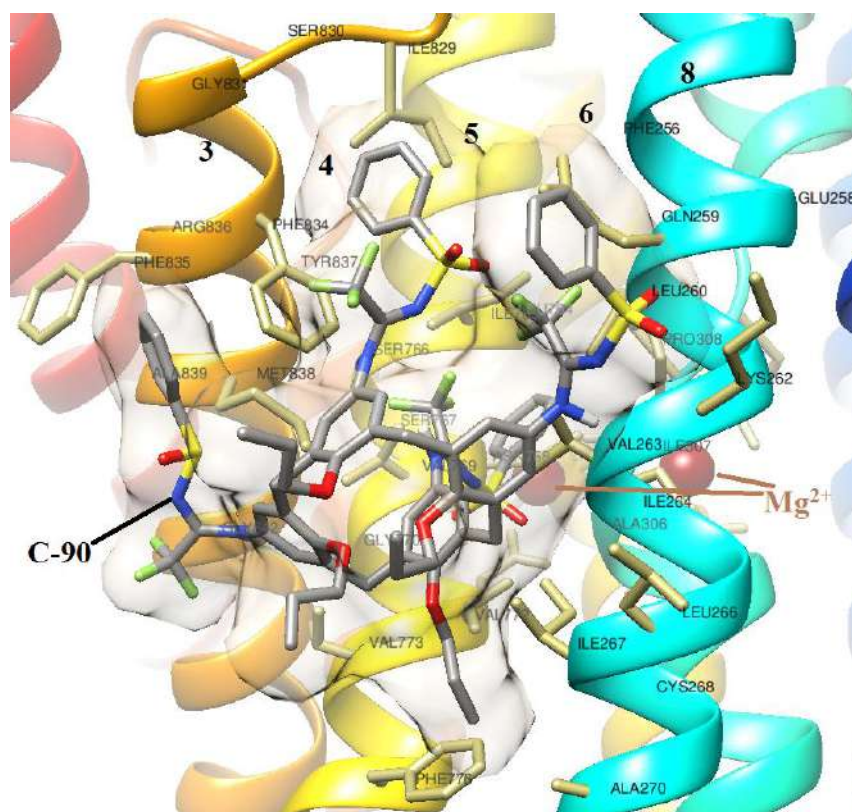


Рис. 4.32. Амінокислотне оточення комплексу “Калікс[4]арен **C-90** - Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРаза ПМ”.

Цифрами позначено номери трансмембраних доменів Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази.

Крім того бічні фенольні залишки калікс[4]арену формують “стекинґ-зв’язок” з амінокислотами Phe256, Phe776, Phe834. Сульфоніламідинові групи калікс[4]арену взаємодіють з такими залишками: Gln259, Leu260, Val263, Ile 264, Leu266, Ile 267, Ala306, Val772, Val773, Val769, Ile765, Ile829, Met838 (рис. 3).

Також нами було проведено комп’ютерне моделювання взаємодії фрагментів калікс[4]арену **C-90** – **C-150** (“калікс[4]аренова чаша”) і фрагмент **M-1** з ліганд-зв’язуючими ділянками Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази.

Встановлено, що калікс[4]арен **C-150** з найбільшою імовірністю може взаємодіяти з ензимом у примембраній ділянці (ділянки α -спіралі: 73-84, 284-294). Модельна сполука **M-1** може зв’язуватися з амінокислотними залишками ензиму на зовнішній стороні мембрани (ділянка α -спіралі: 863-887). Місця зв’язування модельних сполук істотно відрізняються від області зв’язування

калікс[4]арену **C-90**, що пояснює їх незначний інгібувальний вплив на активність ензиму.

При проведенні комп'ютерного моделювання були встановлені типи взаємодій, що беруть участь в утворенні комплексу калікс[4]арену **C-90** з ліганд-зв'язуючими ділянками Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази. Найбільш характерними є гідрофобні (стеричні) і електростатичні взаємодії. При цьому у більшості випадків спостерігається гідрофобний контакт між ліпофільною макроциклічною структурою калікс[4]арену і аліфатичними або ароматичними боковими ланцюгами амінокислотних залишків ензиму. На противагу цьому, друга частина молекули **C-90** – гідрофільні кислотні залишки, контактують з позитивно- і негативно зарядженими R-групами амінокислот ензиму. Також відмічено стекінг-взаємодію фенольних фрагментів макроциклічної структури калікс[4]арену **C-90** з ароматичними боковими ланцюгами амінокислотних залишків Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази. В результаті відбувається стабілізація конформації калікс[4]арену **C-90** в ліганд-зв'язуючих “карманах” ензиму.

Отже, отримані нами результати комп'ютерного моделювання відповідають експериментальним даним щодо здатності калікс[4]арену **C-90** пригнічувати ензиматичну активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази.

4.10. Вплив калікс[4]арену C-90 на активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази саркоплазматичного ретикулума.

У попередньому підрозділі (див. розд. 4.1) ми встановили, що калікс[4]арен **C-90**, використаний у концентрації 100 мкМ, ефективно (на 75 % стосовно контрольного значення) інгібував ензиматичну активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази у фракції ПМ міоцитів матки, практично не впливаючи на активність Mg^{2+} -незалежної Ca^{2+} -залежної АТРази, Na^+ , K^+ -АТРази та Mg^{2+} -АТРази, локалізованих у тій самій мембранній структурі. Чутлива до дії протонофору СССР акумуляція іонів Са в МХ міометрія виявилася практично резистентною до дії зазначеного каліксарену.

$\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза СР забезпечує зниження внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} внаслідок акумуляції цього катіона в ретикулярному пулі. Сучасні дані літератури свідчать, що СР є важливим внутрішньоклітинним депо кальцію у м'язах [236, 434].

Взявши до уваги, що Ca^{2+} -помпа СР має високий афінитет до іонів Са, та зважаючи на структурну подібність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ і СР, доцільно було перевірити, чи впливає калікс[4]арен **C-90** на Ca^{2+} -помпу СР.

У наших дослідах було встановлено, що питома ензиматична активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР для міометрія щурів складає $2,5 \pm 0,5$ мкмоль P_i /мг білка за 1 год ($M \pm m$; $n = 5$).

Ми показали, що калікс[4]арен **C-90** (10^{-8} - 10^{-4} М) дозозалежно пригнічує $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази активність СР, величина коефіцієнта інгібування $I_{0,5}$ складає $57 \pm 1,46$ мкМ, значення коефіцієнта Хілла n_H становило $0,60 \pm 0,02$ (рис. 4.33) ($M \pm m$; $n = 5$). У концентрації 100 мкМ калікс[4]арен **C-90** зменшує активність на $58,5 \pm 1,46$ % відносно контрольного значення.

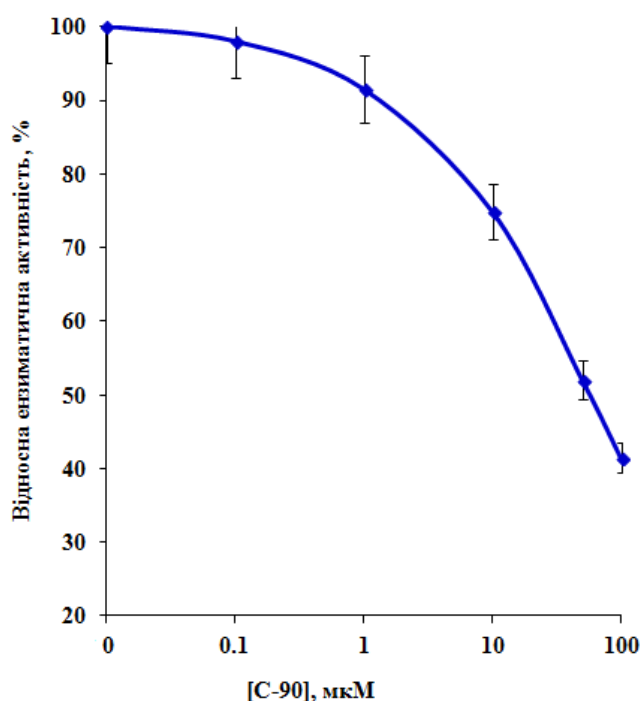


Рис. 4.33. Концентраційна залежність інгібіторної дії калікс[4]арену **C-90** на ензиматичну активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР ($M \pm m$, $n = 5$).

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

Встановлено, що вплив калікс[4]арену **C-90** на активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР, порівняно з його впливом на активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ, менш ефективний та характеризується меншим афінітетом до ензиму (коефіцієнт напівінгібування $I_{0,5}$ у 3 рази вищий у випадку Ca^{2+} -помпи СР, ніж Ca^{2+} -помпи ПМ).

Незначна зміна спорідненості може відбуватися внаслідок деяких відмінностей у структурі $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ та СР, а саме через наявність регуляторного COOH -кінця у структурі $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ [470]. Певна відмінність у реалізації інгібіторного ефекту калікс[4]арену **C-90** можлива також через різний склад мембран, де локалізовані вищезазначені ензими, оскільки ПМ містить вищий рівень фосфатидилхоліну та фосфатидилетаноламіну, що впливають на активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ [477]. Окрім того, мембрани СР містять менше холестеролу, концентрація якого негативно корелює з активністю $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ [406, 477].

Для встановлення кінетичного механізму інгібування калікс[4]ареном **C-90** ми перевірили чи змінюється спорідненість $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ і СР до субстратів їх реакції під впливом інгібітора.

При підвищенні концентрації АТР в середовищі інкубації в діапазоні від 0,01 до 3 мМ (рис. 4.34, контроль) спостерігалось збільшення ензиматичної активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР за умов фіксованої концентрації MgCl_2 (3 мМ) в інкубаційному середовищі. Використовуючи метод Хілла, ми розрахували уявну константу Міхаеліса K_m та коефіцієнт Хілла $n_{\text{н,АТР}}$ для АТР, які становлять $132,1 \pm 5,1$ мкМ та $0,96 \pm 0,01$ для $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР відповідно ($M \pm m$; $n = 5$). Отримане нами значення уявної константи Міхаеліса для $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР виявилось удвічі більшим ніж таке для $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ.

Надалі ми досліджували дію калікс[4]арену **C-90** на спорідненість ензиму до АТР. Було досліджено вплив калікс[4]арену **C-90** (концентрація 50 мкМ) на концентраційну залежність від АТР. У присутності калікс[4]арену **C-90**

спостерігається зниження активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР. Залежність ензиматичної активності від АТР виявляє характер, подібний до відповідної контрольної залежності без калікс[4]арену **C-90**, але відбувається зниження платового рівня активності під впливом калікс[4]арену **C-90** (рис. 4.34).

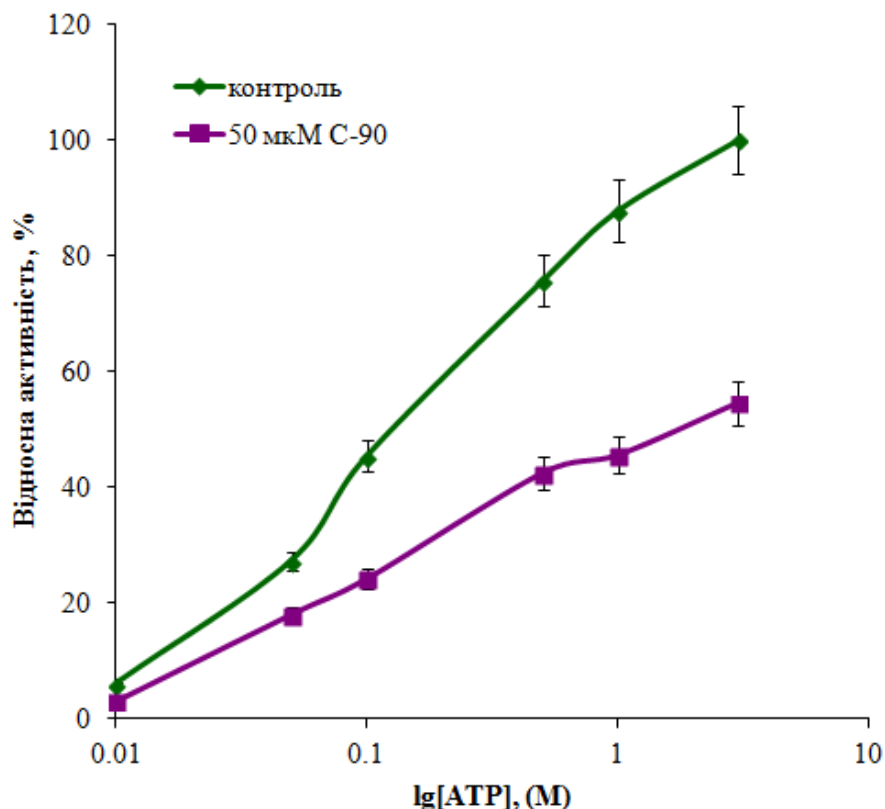


Рис. 4.34. Вплив калікс[4]арену **C-90** на залежність ензиматичної активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР від концентрації АТР ($M \pm m$, $n = 5$).

Показане нами зниження швидкості ензиматичного гідролізу АТР $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР під впливом калікс[4]арену **C-90**, свідчить про зменшення числа обертів ензиму за його дії. Також були розраховані уявна константа Міхаеліса K_m та коефіцієнт Хілла $n_{\text{н, АТР}}$ за наявності калікс[4]арену **C-90**, які становлять $141,4 \pm 8,6$ мкМ та $0,92 \pm 0,04$ відповідно ($M \pm m$; $n = 5$).

Таким чином, отримані результати можна інтерпретувати, як відсутність впливу калікс[4]арену **C-90** на вказані параметри. Тобто, вплив калікс[4]арену **C-90** на $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТразу СР є неконкурентним відносно АТР, так як атака **C-90** йде виключно на V_{max} .

Отже, спорідненість $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР до АТР практично не залежить від наявності калікс[4]арену **C-90** у середовищі інкубації, що вказує на відсутність конкуренції між АТР та інгібітором. У зв'язку з цим можна припустити, що субстратні центри $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР і гіпотетичний сайт взаємодії калікс[4]арену **C-90** не перекриваються на поверхні ензиму.

У подальших наших експериментах ми вивчали залежність ензиматичної активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР від концентрації Ca^{2+} в інкубаційному середовищі. Було розраховано концентрацію іонів Са, враховуючи концентрацію ЕГТА і АТР та їх спорідненість до Ca^{2+} . Розрахунки, що були виконані із використанням комп'ютерної програми «МАКСЧЕЛ», свідчать за наступне: за даних фізико-хімічних та концентраційних умов середовища інкубації концентрація вільного Са (суто Ca^{2+}) становила 1 мкМ.

Ензиматична активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР клітин міометрія зростає при збільшенні концентрації іонів Са від 100 до 1000 нМ (рис. 4.35, контроль). Використовуючи метод Хілла, ми розрахували уявну константу активації K_{Ca} та коефіцієнт Хілла $n_{\text{н,АТР}}$ для Ca^{2+} , які становлять 376 ± 11 нМ та $1,90 \pm 0,06$ для $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР відповідно ($M \pm m; n = 5$). Необхідно відмітити, що спорідненість $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ до іонів Са у 2 рази вища ніж для $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР.

Дослідження впливу калікс[4]арену **C-90** (50 мкМ) на спорідненість $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР до Ca^{2+} показало, що ензиматична активність вказаної АТРази знижується, але при цьому її залежність від концентрації Ca^{2+} виявляє характер, подібний до відповідної контрольної залежності без калікс[4]арену **C-90**. Проте спостерігається зниження платового рівня активності під дією калікс[4]арену **C-90**, тобто зменшується V_{max} (рис. 4.35). Розраховані нами уявна константа активації K_{Ca} та коефіцієнт Хілла $n_{\text{н,Са}}$ за наявності калікс[4]арену **C-90** становили 394 ± 29 нМ та $1,90 \pm 0,15$ для $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР відповідно ($M \pm m; n = 5$).

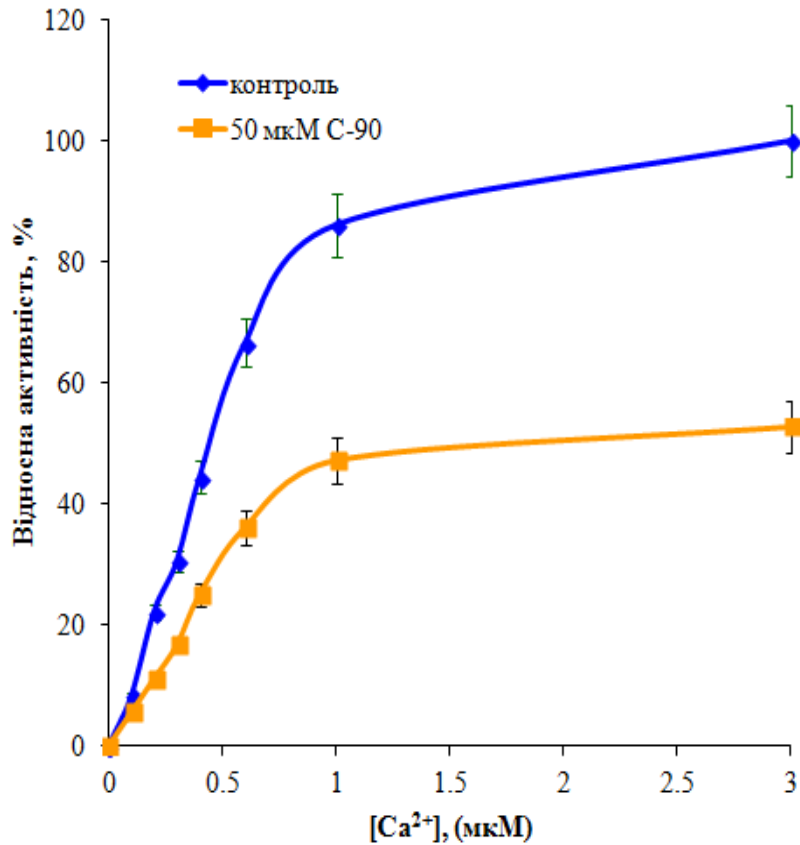


Рис. 4.35. Вплив калікс[4]арену **C-90** на залежність ензиматичної активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР від концентрації іонів Ca ($M \pm m, n=5$).

Як показують значення величини уявної константи активації K_{Ca} та коефіцієнта Хілла $n_{\text{H,Ca}}$, калікс[4]арен **C-90** практично не впливає на спорідненість $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР до іонів Ca, та на кооперативний ефект активації ензиму вказаними іонами.

Надалі ми досліджували залежність активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР від концентрації MgCl_2 в інкубаційному середовищі. Ензиматична активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаз СР зростає при збільшенні концентрації MgCl_2 від 0,1 до 3 мМ за умови фіксованих концентрацій АТР (3 мМ) в інкубаційному середовищі (рис. 4.36, контроль).

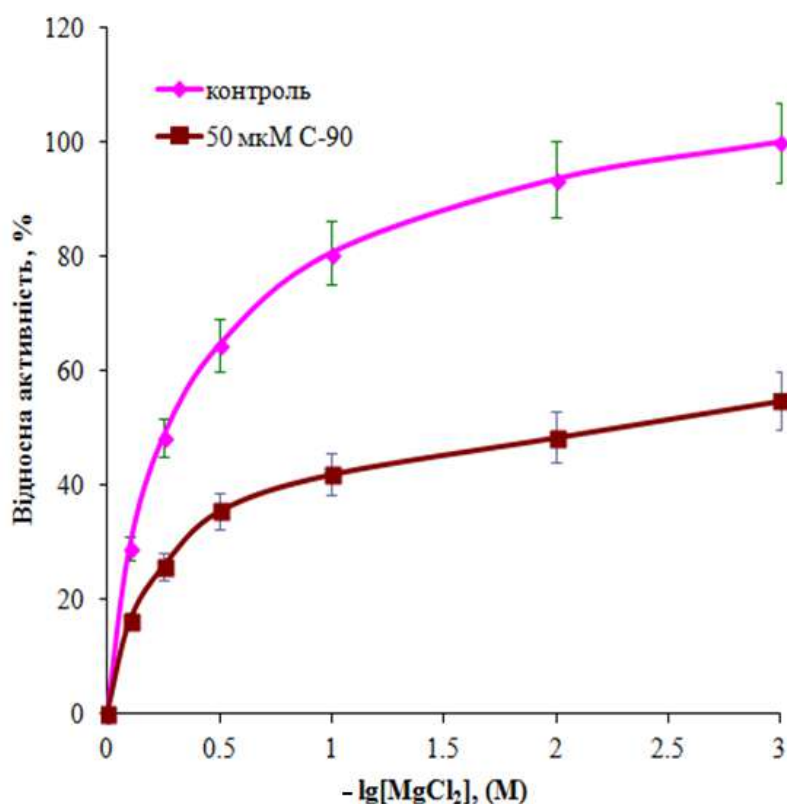


Рис. 4.36. Вплив калікс[4]арену **C-90** на залежність ензиматичної активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР від концентрації іонів Mg ($M \pm m$, $n=5$).

Значення уявної константи активації $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР хлоридом магнію K_{Mg} складає $259,2 \pm 2,2$ мкМ, величина коефіцієнта Хілла $n_{\text{H}, \text{Mg}}$ становить $1,10 \pm 0,03$ ($M \pm m$; $n=5$).

Для вивчення впливу калікс[4]арену **C-90** на спорідненість $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР до Mg^{2+} було оцінено його дію (концентрація 50 мкМ) на концентраційну залежність АТР-гідролазної активності від MgCl_2 . Тут також спостерігається зниження активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР відносно контролю, але зберігається характер залежності ензиматичної активності від концентрації MgCl_2 , як у контролі без калікс[4]арену **C-90**. Тобто під дією калікс[4]арену **C-90** знижується платовий рівень активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР (рис. 4.36). Показано, що під впливом калікс[4]арену **C-90** (50 мкМ), спостерігається незначне зростання коефіцієнту активації хлоридом магнію K_{Mg} до $304,7 \pm 14,9$ мкМ ($M \pm m$; $n=5$). При цьому величина коефіцієнта Хілла практично не змінюється ($1,00 \pm 0,04$ у присутності **C-90** ($M \pm m$; $n=5$)).

Таким чином, спорідненість $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази СР до MgCl_2 майже не залежить від наявності калікс[4]арену **С-90** у середовищі інкубації, що вказує на відсутність конкуренції між MgCl_2 та **С-90**.

Отримані нами дані вказують на те, що калікс[4]арен **С-90** діє на помпу СР за механізмом повного неконкуретного інгібування.

4.11. Дія калікс[4]арену **С-90** на скоротливу активність міометрія.

Маючи результати по інгібуванню калікс[4]ареном **С-90** активності кальцієвої помпи ПМ і вказівки на збільшення концентрації іонів Ca у клітині під дією калікс[4]арену **С-90**, цікаво було подивитися, як він діє на спонтанну активність міометрія.

Наведені нижче результати отримані у творчій співпраці з д.б.н. О.В. Цимбалюк.

Аналіз зміни механокінетичних параметрів скоротливої відповіді ГМ матки при гіперкалієвій деполяризації за умов застосування калікс[4]арену **С-90** проводили за умов гіперкалієвої контрактури, де застосовується фізіологічний розчин з підвищеною (за ізотонічних умов) концентрацією K^+ .

Смужки міометрія були попередньо інкубовані в розчині Кребса разом з калікс[4]ареном **С-90**. Скорочення, що були ініційовані аплікацією гіперкалієвого розчину (80 мМ), характеризувалися зниженням амплітуди f_m , та швидкості розслаблення (рис. 4.37).

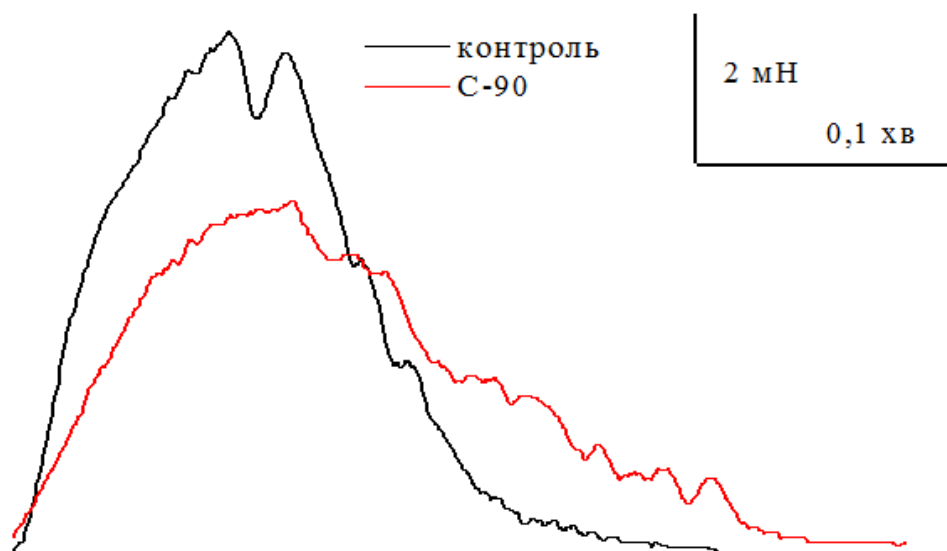


Рис. 4.37. Механокінетика скорочень ГМ в контролі та за дії калікс[4]арену **C-90** (10 мкМ). Наведено результати типового експерименту.

Щоб можна було кількісно охарактеризувати зміни скоротливої відповіді ГМ під впливом калікс[4]арену **C-90** ми провели лінеаризацію механокінетичних кривих фази розслаблення гіперкалієвих скорочень. Розрахунки показують, що в при дії калікс[4]арену **C-90** (10 мкМ) значення нормованої максимальної швидкості $V_{n,r}$ у випадку фази розслаблення знижувалося порівняно з контролем (рис. 4.37) на 25 % (зміни статистично достовірні, $p < 0,05$).

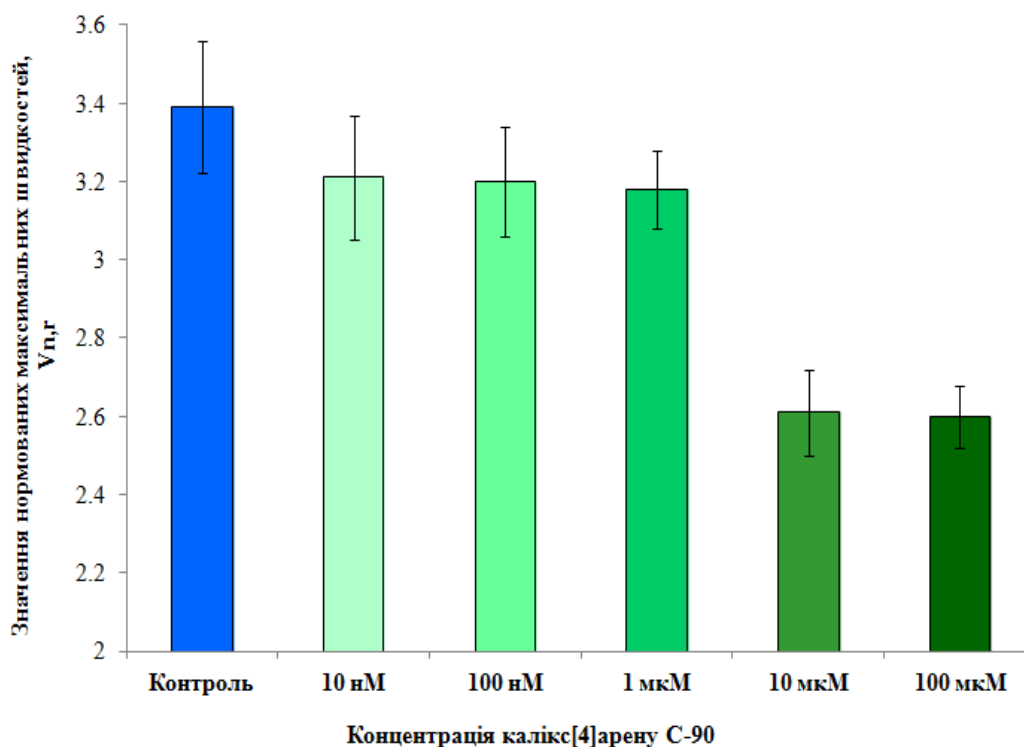


Рис. 4.38. Вплив калікс[4]арену **C-90** на нормовану максимальну швидкість фази розслаблення ГМ матки щура $V_{n,r}$ с^{-1} ($M \pm m$, $n = 5$).

У таких дослідах важливим є визначення мінімальної діючої концентрації калікс[4]арену **C-90**, за якої реалізується його фізіологічний вплив. Ми показали, що мінімальною діючою концентрацією калікс[4]арену **C-90** є – 10 мкМ (рис. 4.38), так як при меншій концентрації аплікація калікс[4]арену **C-90**

(0,01-1 мкМ) практично не призводила до достовірно відмінних змін максимальної нормованої швидкості розслаблення ГМ.

Ми проводили дослідження дії калікс[4]арену **C-90** на швидкість скорочення ГМ при їх спонтанній активності, у тому числі за умов впливу окситоцину. Наведені нижче результати отримані у творчій співпраці з І. Геращенко та проф. М.А. Мохортом (Інститут фармакології та токсикології НАМН України).

В дослідженнях *in vitro* на ізольованих поздовжніх смужках міометрія щурів було встановлено, що нормована швидкість скорочення V_{nc} у відповідь на утеротонік окситоцин (0,1 МО/мл) (контроль) складає $0,0205 \pm 0,0024 \text{ c}^{-1}$ (рис. 4.39) ($M \pm m, n = 10$).

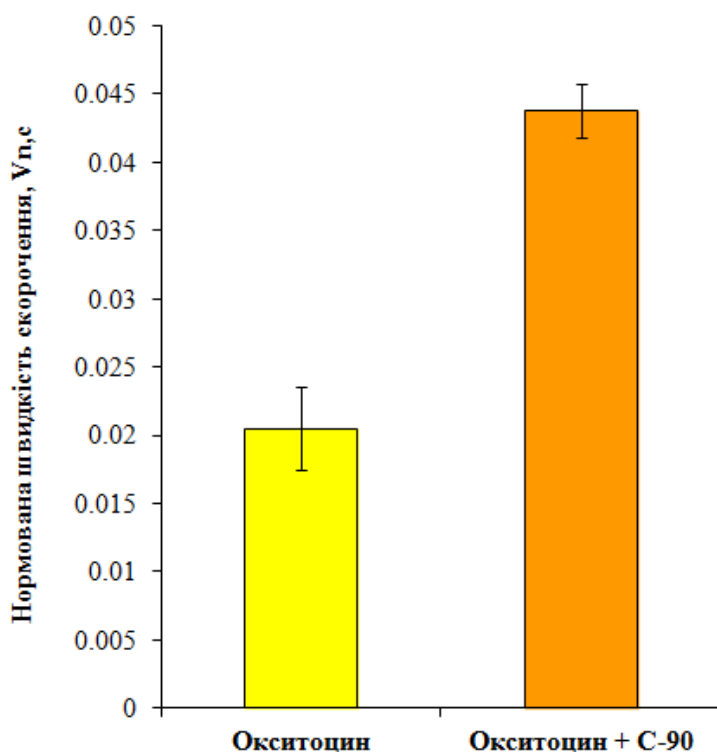


Рис. 4.39. Зміна нормованої швидкості V_{nc} скорочень міометрія щурів *in vitro* при дії окситоцину (0,1 МО/мл) за умов впливу калікс[4]арену **C-90** (100 мкМ) ($M \pm m, n = 7$).

За умов попередньої аплікації на ізольований міометрій селективного інгібітора $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ калікс[4]арену **C-90** (100 мкМ) нормована

максимальна швидкість окситоцин-індукованого скорочення V_{nc} збільшувалася більше ніж в два рази – до $0,0438 \pm 0,0014 \text{ c}^{-1}$ ($M \pm m$, $n = 18$). Одержані *in vitro* результати (рис. 4.39) цілком відповідають тлумаченню дії калікс[4]арену **C-90** як, інгібітора Mg^{2+} , АТР-залежної кальцієвої помпи ПМ міоцитів.

Отже, калікс[4]арен **C-90** підсилює швидкість скорочення міометрія у відповідь на його стимуляцію утеротоніком окситоцином.

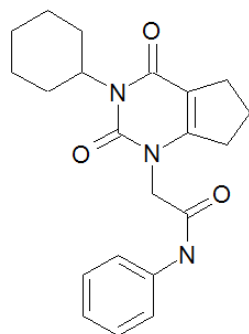
В клінічній практиці для стимуляції пологової активності уже досить давно використовують пептидний гормон окситоцин [185, 220]. Це дозволяє зменшити тривалість пологів в середньому на 1,5 год за рахунок підвищення частоти та інтенсивності скорочення матки [518]. Показано також, що стимуляція пологів високими дозами окситоцину може призводити до виникнення ряду побічних ефектів, таких як розвиток аутизму у дітей [520], брадикардія та асфіксія, геморагії [220], аномалії серця [280]. Отже, актуальним для клінічної практики є розробка нових підходів, які б дозволили залишити стимулюючий ефект дії окситоцину, але зменшити його побічні наслідки.

Таким чином, отримані нами дані показують, що калікс[4]арен **C-90** потенційно підвищує скоротливу активність міометрія. Ця сполука позитивно впливає на кінетичні параметри скоротливої активності міометрія, що підсилюється його синергічним ефектом з окситоцином. Те, що аплікація калікс[4]арену **C-90** призводить до зростання тонусу матки, дозволяє розглядати нам калікс[4]арен як препарат, придатний не тільки для стимуляції пологової активності, а також для корекції патологічних станів, пов'язаних зі слабким тонусом ГМ, як маткового, так і інших типів.

4.12. Активаційна дія сполуки ІФТ-35 на активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин.

Проте нас зацікавили не лише можливі низькомолекулярні селективні інгібітори Са-помпи ПМ, а ще й можливі її активатори. Ми довели, що на роль таких активаторів може претендувати сполука ІФТ-35.

Структурна формула похідного імідазо[1,2-а]азепінію ІФТ-35, що був синтезований та охарактеризований у відділі синтезу фізіологічно активних речовин ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», представлена нижче:



ІФТ-35

Дана сполука відноситься до похідних імідазо[1,2-а]азепінію, які належать до групи міотропних спазмолітиків - блокаторів Ca^{2+} -каналів чи активаторів АТР-залежних K^+ -каналів. Вона була надана нам співробітниками відділу фармакології серцево-судинних засобів Інституту фармакології та токсикології НАМН України. Колеги із ІФТ в дослідженнях *in vitro* на ізольованих поздовжніх смужках міометрія щурів було встановлено, що нормована швидкість скорочення при дії окситоцину складає $0,0205 \pm 0,00244 \text{ хв}^{-1}$ ($M \pm m$, $n=10$). Попередня аплікація на ізольований міометрій розчину ІФТ-35 (100 мкМ) призводила до статистично достовірного зменшення нормованої максимальної швидкості скорочення у відповідь на окситоцин $0,0135 \pm 0,0005 \text{ хв}^{-1}$ ($M \pm m$, $n=10$) (рис. 4.40). Отже, сполука ІФТ-35 здатна до прояву спазмолітичного ефекту на фоні ефекту окситоцину на скорочення матки.

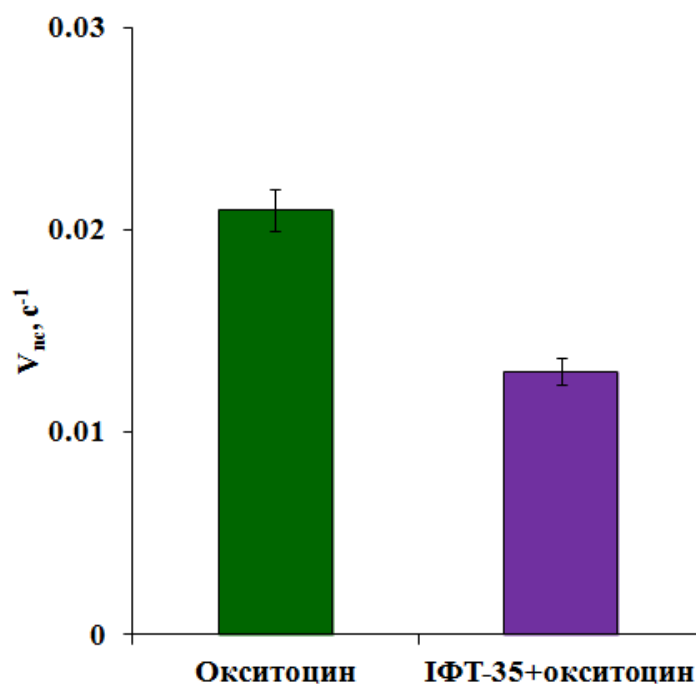


Рис. 4.40. Зміна нормованої швидкості V_{nc} скорочень міометрія щурів *in vitro* при дії окситоцину (0,1 МО/мл) за умов впливу С-90 (100 мкМ) та ІФТ-35 (100 мкМ) ($M \pm m$, $n = 7$).

У своїх попередніх експериментах ми досліджували дію низки сполук, похідних імідазо[1,2-а]азепінію, які володіли токолітичною активністю: ІФТ-35, ІФТ-176, ІФТ-208, ІФТ-221, на ензиматичну активність “базальної” Mg^{2+} -АТРази, Na^+, K^+ -АТРази, Ca^{2+} -АТРази та Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази ПМ (дані не наведені). Серед них особливо нашу увагу привернула сполука ІФТ-35, яка за результатами наших експериментів, селективно, на рівні ПМ, активує Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази на $40,90 \pm 0,37$ % (рис. 4.41). Поряд з цим, ця сполука практично не впливає на інші ензиматичні активності ПМ: значення активностей для “базальної” Mg^{2+} -АТРази, Ca^{2+} -АТРази і Na^+, K^+ -АТРази склали $105,5 \pm 1,0$ %, $95,0 \pm 1,5$ % і $96,8 \pm 0,6$ % відносно контролю (рис. 4.41).

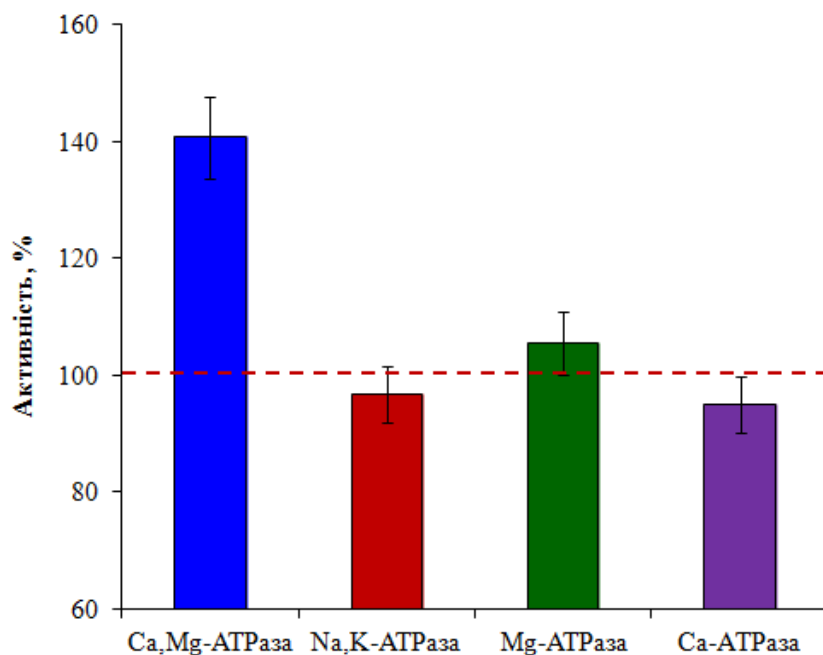


Рис. 4.41. Сполука ІФТ-35 (100 мкМ) селективно збільшує активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази в плазматичній мембрані клітин міометрія ($M \pm m$, $n = 5$).

За 100 % прийнято значення питомої ензиматичної активності у відсутності сполуки ІФТ-35 у середовищі інкубації.

У подальших наших експериментах ми дослідили концентраційну залежність інгібуючої дії сполуки ІФТ-35 ($10^{-8} - 10^{-4}$ М) на активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ (рис. 4.42). Було показано, що сполука ІФТ-35 дозозалежно підвищує $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазну активність. Константа активації для ІФТ-35 $A_{0,5} = 6,4 \pm 0,45$ мкМ та коефіцієнт Хілла $n_H = 0,7 \pm 0,04$ ($M \pm m$; $n = 5$).

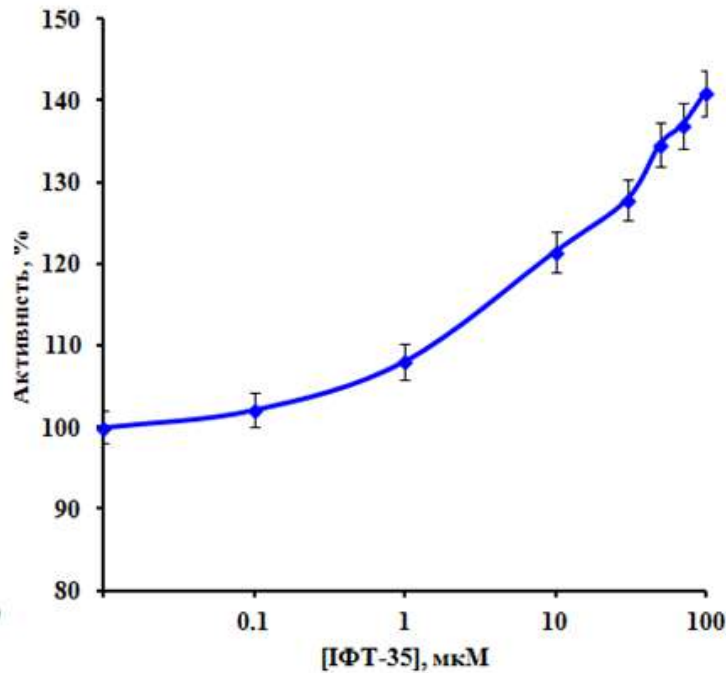


Рис. 4.42. Концентраційна залежність ензиматичної активності Ca^{2+} -транспортної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази в плазматичній мембрані клітин міометрія за дії сполуки ІФТ-35 ($M \pm m$, $n = 5$).

За 100 % прийнято значення питомої ензиматичної активності у відсутності сполуки ІФТ-35 у середовищі інкубації.

Порівняно з калікс[4]ареном **С-90**, активатор кальцієвої помпи ПМ сполука **ІФТ-35** є досить м'яким ефектором, за допомогою якого не можливо суттєво змінити базальну концентрацію Ca^{2+} у міоцитах (рис. 4.43). Дія на базальну концентрацію Ca^{2+} у клітині при дії сполуки ІФТ-35 нагадує сигмоїдну криву: найбільш ефективною є концентрація 0,3-3 мкМ.

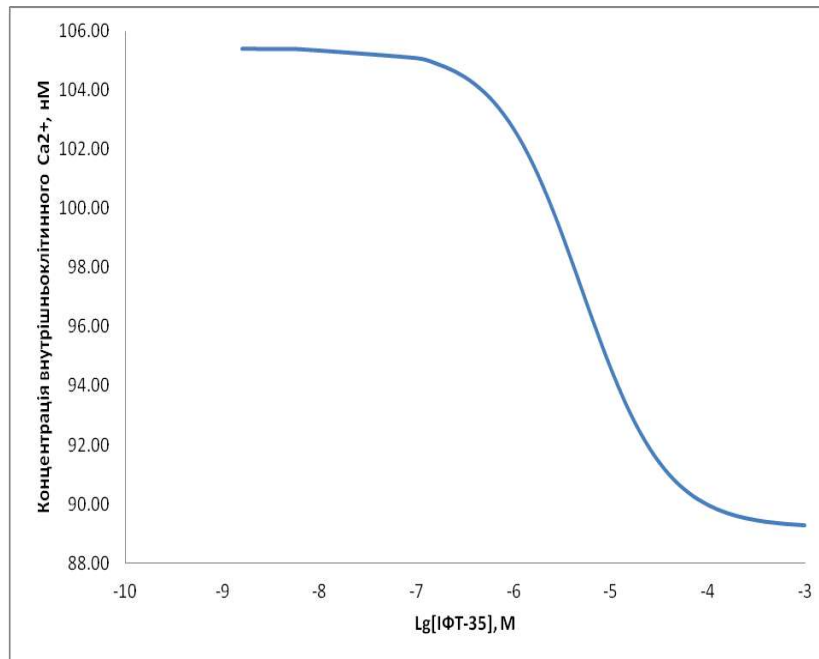


Рис. 4.43. Модельна залежність рівноважної базальної концентрації іонів Ca у незбуджених клітинах міометрія від концентрації сполуки ІФТ-35.

Сукупно вищенаведені дані вказують на наступне: сполука ІФТ-35 є перспективною для використання у фармакологічній практиці, оскільки помірна активація Ca²⁺,Mg²⁺-АТРази ПМ, яка досягається за порівняно невисоких концентрацій ефектора, дозволить корегувати патологічні стани, пов'язані з надмірною активністю ГМ матки і які потребують застосування міорекласанта.

Результати, викладені у розділі, опубліковано в наступних роботах: [20, 21, 24-27, 64, 65, 358, 502, 503, 507, 508].

РОЗДІЛ 5. ВПЛИВ КАЛІКС[4]АРЕНІВ НА ЕНЗИМАТИЧНУ АКТИВНІСТЬ Na^+, K^+ -АТРази ТА Mg^{2+} -АТРази ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ КЛІТИН МІОМЕТРІЯ

5.1. Дія калікс[4]аренів на активність Na^+, K^+ -АТРази та Mg^{2+} -АТРази

Взявши до уваги, що каліксарени, завдяки їх здатності утворювати супрамолекулярні комплекси з біологічно важливими молекулами та іонами, можуть впливати на перебіг біохімічних процесів і, відповідно, розглядатися як перспективні молекулярні платформи для дизайну фізіологічно активних сполук [201, 213], ми поставили перед собою за мету вивчити їхній вплив також на активність іншого електроензиму Na^+, K^+ -АТРази ПМ міоцитів матки.

У дослідах, які були проведені із використанням широкого загалу калікс[4]аренів (14 сполук), було знайдено (рис. 5.1), що їхній гальмівний ефект на питому ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази ПМ клітин міометрія задовольняє послідовності: **C-97** \approx **C-107** > **C-99** > **CIP-45** > **ID-30** \approx **C-100** \approx **C-98** \approx **YA-038** \approx **ID-17** > **C-54** \approx **YA-024** > **AS-1** \approx **C-90**. Дійсно, як можна бачити, найбільш ефективну гальмівну дію на активність Na^+, K^+ -АТРази виявляють калікс[4]арени **C-97** та **C-107** (майже повне інгібування: зменшення активності до 2 - 3 % відносно контролю), трохи меншу гальмівну дію демонстрував калікс[4]арен **C-99** (до 14 %). Менш ефективно (до 28 %) Na^+, K^+ -залежний ензиматичний гідроліз АТР гальмує калікс[4]арен **CIP-45** (ФГ = $\text{P}(\text{O})\text{Et}_2$). Калікс[4]арени **ID-30**, **C-100**, **C-98**, **YA-038** та **ID-17** (ФГ = $\text{tetrakis-P}(\text{O})(\text{OH})_2$, $\text{tetrakis-tetrazole}$, $\text{bis-CH}(\text{P}(\text{O})(\text{OH})\text{ONa})_2$, tetrakis-COOH , $\text{tetrakis-P}(\text{O})\text{Ph}_2$ відповідно) інгібують Na^+, K^+ -АТРази майже однаково: вони пригнічують її активність лише до 40 – 50 %. Малоефективно гальмують цей ензим калікс[4]арени **C-54** (ФГ = $\text{tetrakis-}(\text{CH}_3)_2\text{N}^+\text{C}_2\text{H}_4\text{OH Cl}^-$) та **YA-024** (ФГ = bis-COOH) - до 65 - 70 %. Калікс[4]арени **AS-1** (ФГ = $\text{tetrakis-}i\text{-PrNH}_2^+ \text{Cl}^-$) та **C-90** (ФГ = $\text{tetrakis-HN-C}(\text{CF}_3)=\text{NSO}_2\text{Ph}$) не інгібують Na^+, K^+ -АТРази – залишкова ензиматична активність становить 90 – 95 %.

C-91 (ФГ = bis-HN-C(O)CH₂OC₆H₄F-*p*), то він виявляв активуючу дію на активність Na⁺,K⁺-АТРази – до 119 % від контрольного значення.

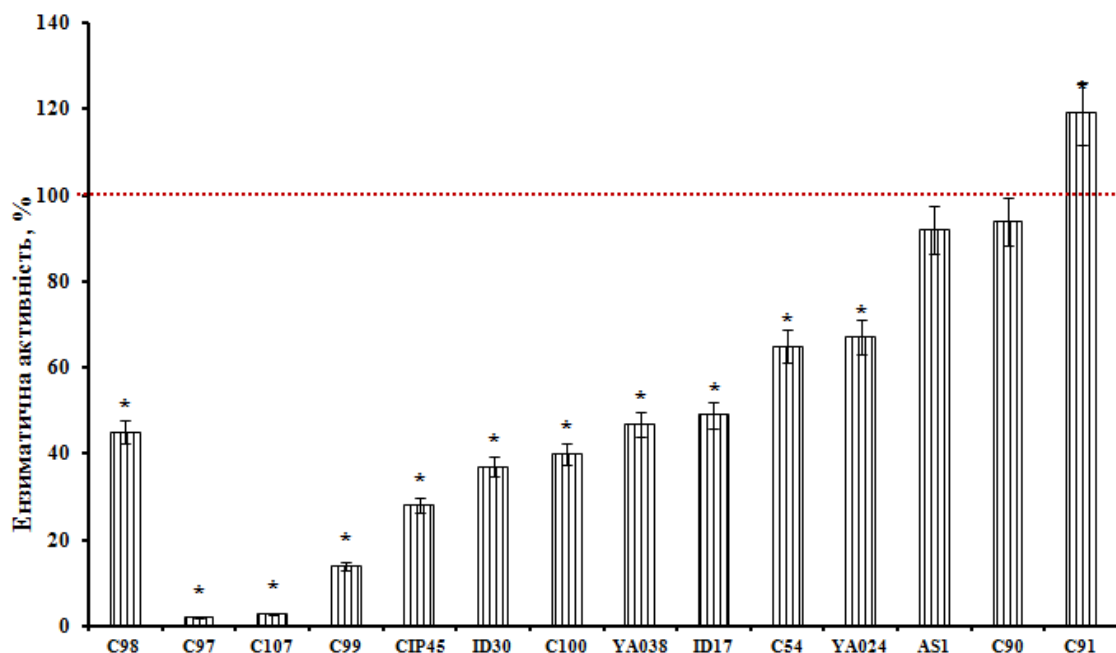


Рис. 5.1. Вплив калікс[4]аренів (100 мкМ) на ензиматичну активність Na⁺,K⁺-АТРази у фракції ПМ клітин міометрія (M±m; n = 7).

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

* - відмінність щодо контролю є достовірною (p ≤ 0,05, M±m; n = 7).

Як вже відзначалося вище (див. розділ 3), убаїнчутливу Na⁺,K⁺-АТРазну активність розраховували по різниці між величинами “загальної” Mg²⁺,Na⁺,K⁺-АТРазної і “базальної” (убаїннечутливої) Mg²⁺-АТРазної активностей. Тому при пошуку ефекторів, здатних модифікувати активність Na⁺,K⁺-АТРази, важливим є наступне: дуже бажано, щоб ці ефектори не впливали на активність “базальної” Mg²⁺-АТРази.

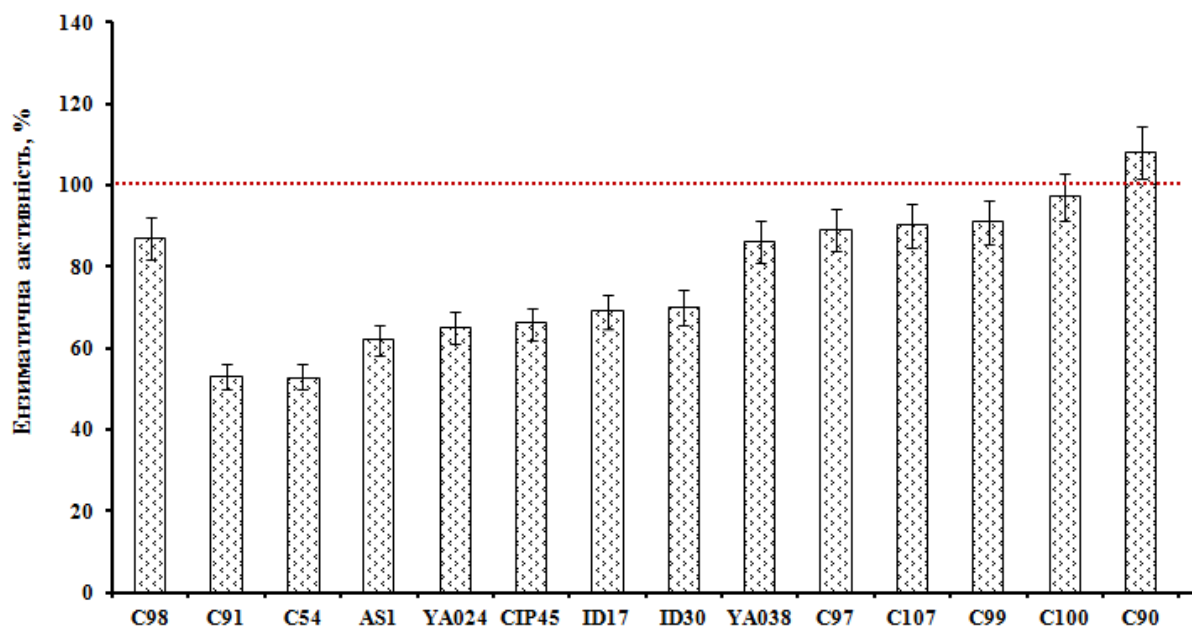


Рис. 5.2. Вплив калікс[4]аренів (100 мкМ) на ензиматичну активність „базальної” Mg^{2+} -АТРази у фракції ПМ клітин міометрія ($M \pm m$; $n = 7$).

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

* - відмінність щодо контролю є достовірною ($p \leq 0,05$, $M \pm m$; $n = 7$).

Отже, ми вивчили вплив досліджуваних калікс[4]аренів на питому ензиматичну активність Mg^{2+} -АТРази (рис. 5.2). З'ясувалось, що гальмівна дія калікс[4]аренів на питому ензиматичну активність Mg^{2+} -АТРази ПМ клітин міометрія задовільняє послідовності: **C-91** \approx **C-54** > **AS-1** \approx **YA-024** \approx **CIP-45** \approx **ID-17** \approx **ID-30** > **YA-038** \approx **C-97** \approx **C-98** \approx **C-107** \approx **C-99** > **C-100**. Отже, майже вдвічі зменшують активність Mg^{2+} -АТРази калікс[4]арени **C-91** та **C-54** - до 53 – 55 % відносно контрольного значення, прийнятого за 100 %. Калікс[4]арени **AS-1**, **YA-024**, **CIP-45**, **ID-17**, **ID-30** майже однаково пригнічують активність Mg^{2+} -АТРази - до 60 – 70 %. Менш ефективно гальмують зазначену ензиматичну активність калікс[4]арени **YA-038**, **C-97**, **C-98**, **C-107** та **C-99** – до 85 - 90 %. Майже не впливає на ензиматичну активність Mg^{2+} -АТРази

калікс[4]арен **C-100** та **C-90**: в їх присутності рівень активності зазначеної АТРази становив 97 та 108 % від контрольного значення відповідно.

Таким чином, із вищенаведених даних (рис. 5.1 та 5.2) можна зробити наступний висновок: серед усієї сукупності досліджених калікс[4]аренів водорозчинні калікс[4]арени **C-97**, **C-99** та **C-107**, що були використані у концентрації 100 мкМ, ефективно (на 86 – 98 % стосовно контрольного значення) інгібували ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази у фракції ПМ, не впливаючи на активність Mg^{2+} -АТРази (гальмівний ефект – лише на 9 – 11 %).

Саме тому у подальших дослідженнях особливу нашу увагу привернули калікс[4]арени **C-97**, **C-99** та **C-107**. Аналіз дії інших калікс[4]аренів на активність Na^+, K^+ -АТРази навряд чи був доцільним внаслідок того, що деякі з них: а) не впливали на цей ензим взагалі (**AS-1** та **C-90**); б) низькоефективно впливали на активність Na^+, K^+ -АТРази навіть за умов відсутності ефективного впливу на активність Mg^{2+} -АТРази (**C-100**, **YA-038**); в) гальмували одночасно обидві ензиматичні активності – і Na^+, K^+ -АТРази і Mg^{2+} -АТРази (**CIP-45**, **ID-30**, **ID-17**, **C-54**, **YA-024**).

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

Як відомо, кардіоактивні стероїди убаїн (рис. 5.3) і строфантидин є селективними інгібіторами Na^+, K^+ -АТРази [95, 496, 514]. Кардіоглікозиди зв'язуються з білком з позаклітинного зовнішнього боку ПМ клітини. Фосфорилування ензиму і перехід в конформацію P-E_2 полегшує зв'язування глікозидів.

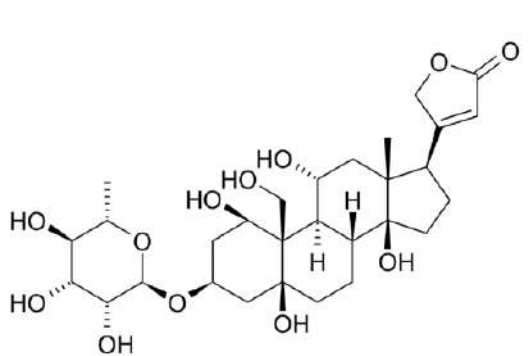
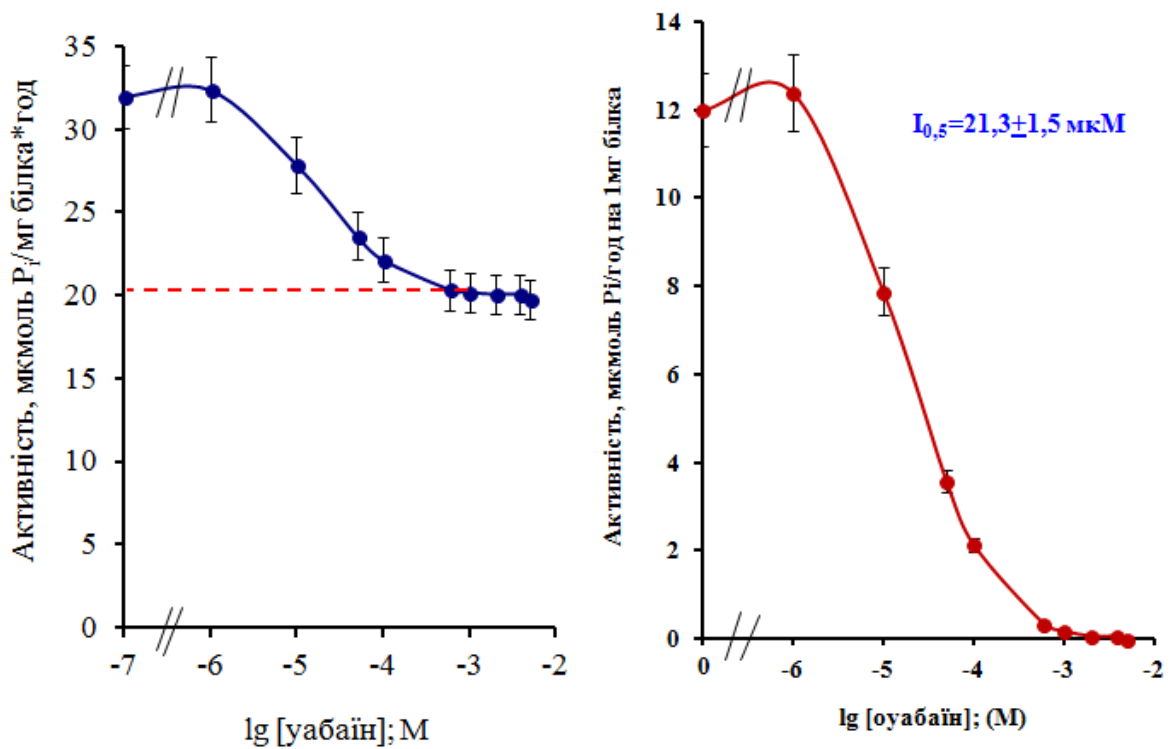


Рис. 5.3. Убаїн.

Вважають, що стероїди блокують ензим в стані Р-Е₂ і, тим самим, гальмують перехід на рівні конформерів Е₂→Е₁. Як можна бачити (рис. 5.4а), убаїн в діапазоні концентрацій 10⁻⁶ - 5*10⁻³ М ефективно пригнічує “загальну” Mg²⁺,Na⁺,K⁺-АТРазну 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⁺-АТРазної 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±1,5 мкМ (M±m; n=5) (рис. 5.4.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 [150]. 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 [150].



а

б

Рис. 5.4. Концентраційні залежності впливу убаїну на Mg^{2+}, Na^+, K^+ -АТРазу (“загальну”) (а) та убаїнчутливу Na^+, K^+ -АТРазу (б) активність у фракції ПМ клітин міометрія ($M_{\pm t}$; $n = 5$).

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

В подальших експериментах ми зосередили свою увагу на деяких вибраних калікс[4]аренах, а саме - **C-97**, **C-99** та **C-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. 5.5). При цьому ці сполуки майже не впливали на активність Mg^{2+} -АТРази (гальмівний ефект – лише на 9 – 11 %).

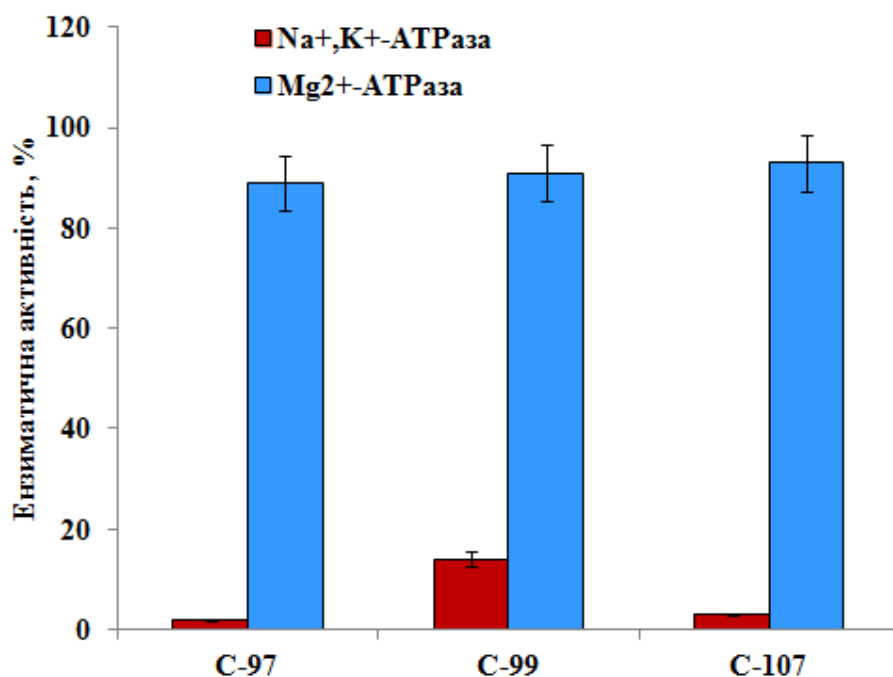
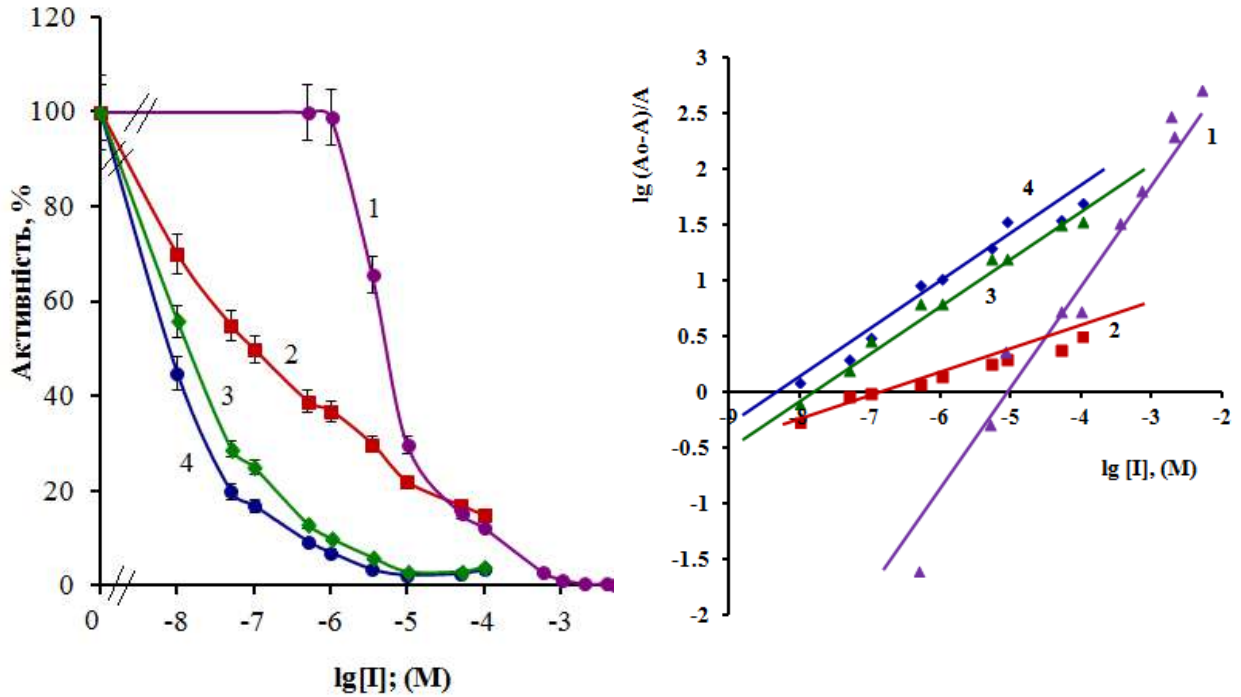


Рис. 5.5. Вплив калікс[4]аренів **C-97**, **C-99**, **C-107** (100 мкМ) на активності Na⁺,K⁺-АТРази та базальної Mg²⁺-АТРази ПМ клітин міометрія ($M \pm m$, $n = 7$).

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. 5.6а).



а

б

Рис. 5.6. 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 (див. рис. 5.2.4а). 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. 5.6а 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. 5.5б, табл. 5.1). 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 **C-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^+ -АТРази також спостерігається при концентрації 1 мМ, у цьому випадку $I_{0,5} = 21 \pm 5$ мкМ, $n_H = 0,54 \pm 0,07$ (табл. 5.1).

Табл. 5.1. Кількісні показники дії калікс[4]аренів C-97, C-99, C-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
C-97	~ 10 мкМ	33 ± 4 нМ	$0,38 \pm 0,06$
C-99	1 мМ	98 ± 8 нМ	$0,12 \pm 0,03$
C-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. 5.7 наведені результати, що були одержані при каталітичному титруванні Mg^{2+} -АТРази ПМ клітин міометрія калікс[4]аренами **C-97, C-99, C-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 %.

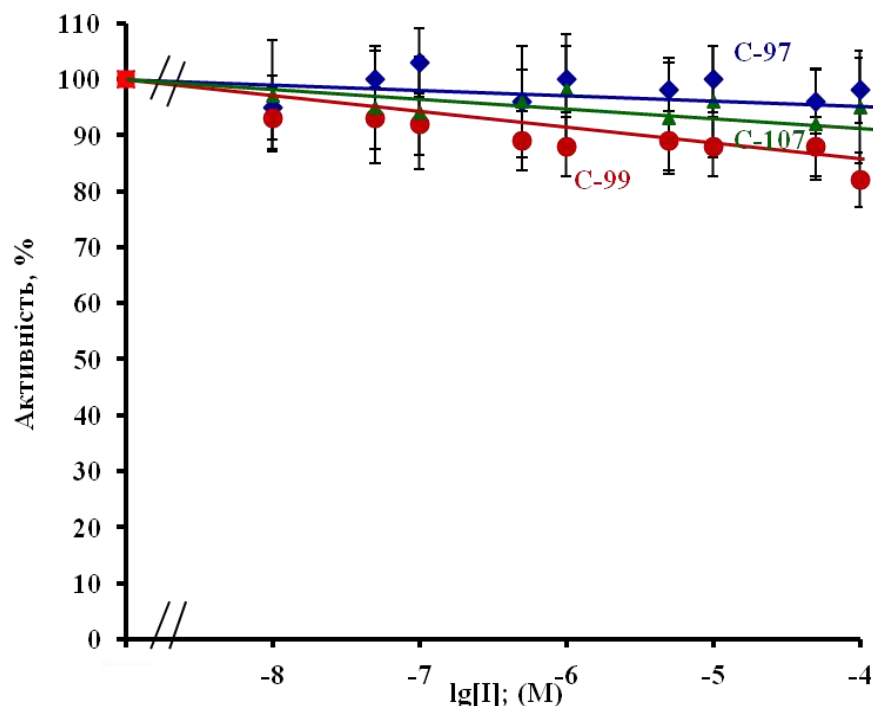


Рис. 5.7. Каталітичне титрування калікс[4]аренами **C-97**, **C-99** та **C-107** Mg^{2+} -АТРази у фракції ПМ клітин міометрія ($M \pm m$; $n = 6$).

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. 5.6, 5.7; табл. 5.1), 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.

Взявши до уваги факт найбільш ефективного, за значенням величини параметру $I_{0,5}$, інгібіторного впливу саме калікс[4]аренів **C-97**, **C-99** та **C-107** на Na^+, K^+ -АТРазну активність у ПМ, у подальших дослідженнях ми намагалися дослідити деякі закономірності такої їх дії.

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

У попередніх дослідках, що були проведені із використанням 14 калікс[4]аренів, нами було знайдено, що 5,17-ди(фосфоно-2-піридил-метил)аміно-11,23-ди-*трет*-бутил-26,28-дигідрокси-25,27-дипропоксикалікс[4]-арен (калікс[4]арен **C-107**) здатен ефективно інгібувати активність Na^+, K^+ -АТРази ПМ гладеньком'язових клітин матки. Проте властивості інгібувальної дії зазначеного калікс[4]арену на Na^+, K^+ -АТРазну активність, зокрема, залежність цієї дії від структурної організації каліксаренової молекули, не з'ясовані.

Тому у подальших експериментах, для вивчення впливу структурних компонентів калікс[4]аренової молекули на ензиматичну активність ми провели дослідження інгібувальної дії на Na^+, K^+ -АТФазу 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 дипропосикалікс[4]арену **C-150**, та N-(4-гідроксифеніл)-2-піридил-амінофосфонової кислоти **M-3** (структурні формули наведені на рис. 5.3).

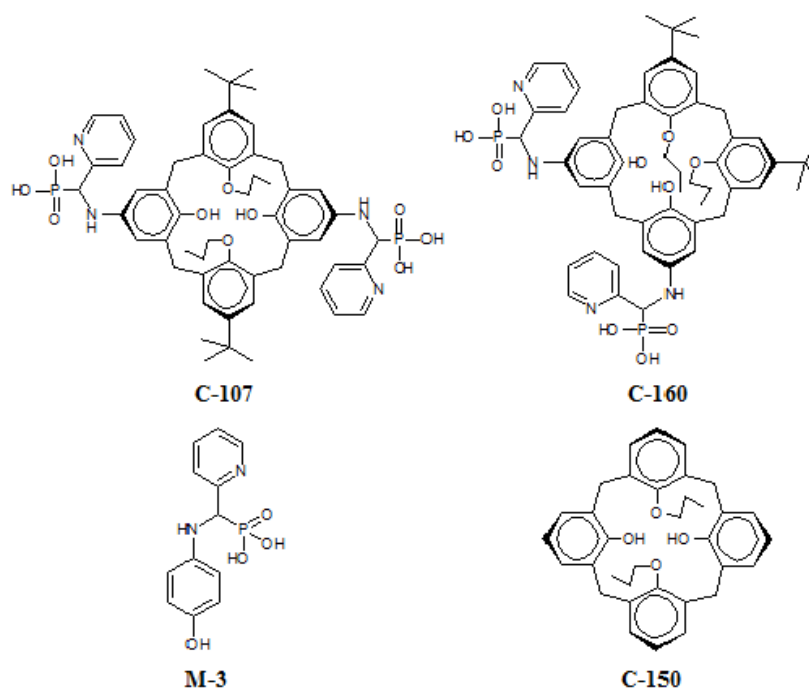


Рис. 5.8. Структурні формули калікс[4]аренів **C-107**, **C-160**, **C-150** та модельної сполуки **M-3**.

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. 5.8), 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 **М-3** містить один фенольний фрагмент та амінофосфонове угруповання аналогічне до такого ж у складі молекули калікс[4]арену **С-107**.

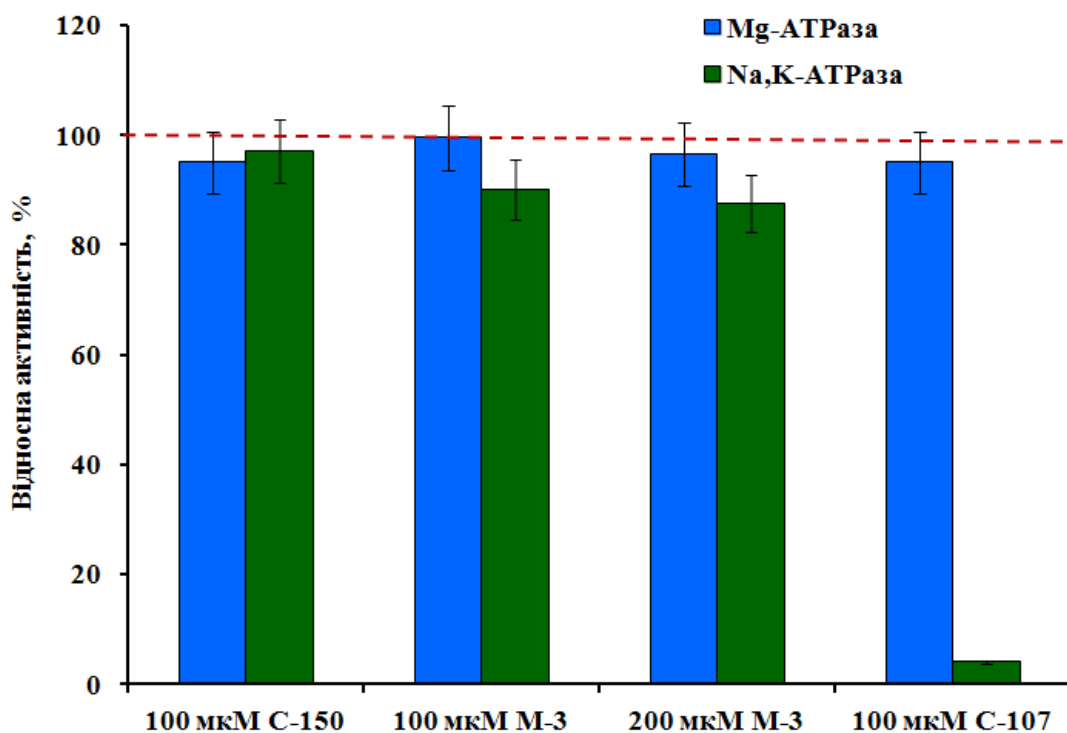


Рис. 5.9. Активність Na^+,K^+ -АТРази та Mg^{2+} -АТРази ПМ за дії калікс[4]аренів С-107, С-150 та модельної сполуки М-3 ($M \pm m, n = 5$).

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. 5.9). 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 макроциклическої 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. 5.10).

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. 5.10), 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.

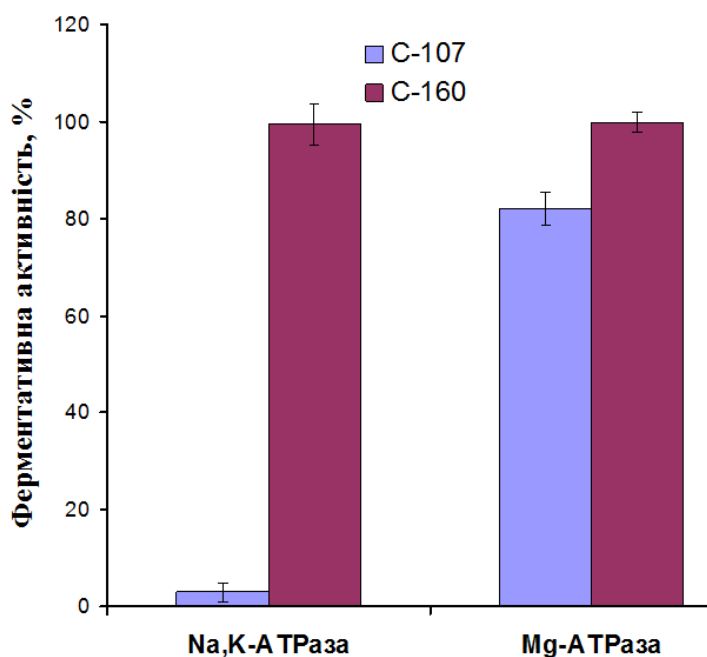


Рис. 5.10. Порівняльне дослідження впливу калікс[4]аренів C-107 та C-160 (100 мкМ) на Na^+, K^+ -АТРазну та Mg^{2+} -АТРазну активності ПМ клітин міометрія ($M \pm m$; $n = 5$).

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.

З метою вивчення структурних особливостей калікс[4]аренів **C-107** та **C-160** ми провели їх молекулярне моделювання з використанням програми «HyperChem 7.01» [97]. Молекулярне моделювання проводили у відділі хімії фосфоранів Інституту органічної хімії НАН України. При цьому виходили з того, що молекули каліксаренів є ди-цвітеріонами із протонованими амінними атомами азоту та двома депротонованими гідроксилами різних фосфонових фрагментів. З метою уникнення проблеми локальних мінімумів енергії при

розрахунках ми провели конформаційний пошук оптимальної геометрії молекули, використавши метод молекулярної механіки (силове поле ММ+). Для кожного калікс[4]арену були відібрані по 5 енергетично-мінімізованих конформерів. Загальні енергії цих структур також перерахували напівемпіричним методом (поле CNDO), після чого вибрали по одній структурі з найменшими загальними енергіями (рис. 5.11). Різниця в енергіях калікс[4]аренів **C-107** та **C-160** склала 0,1 %.

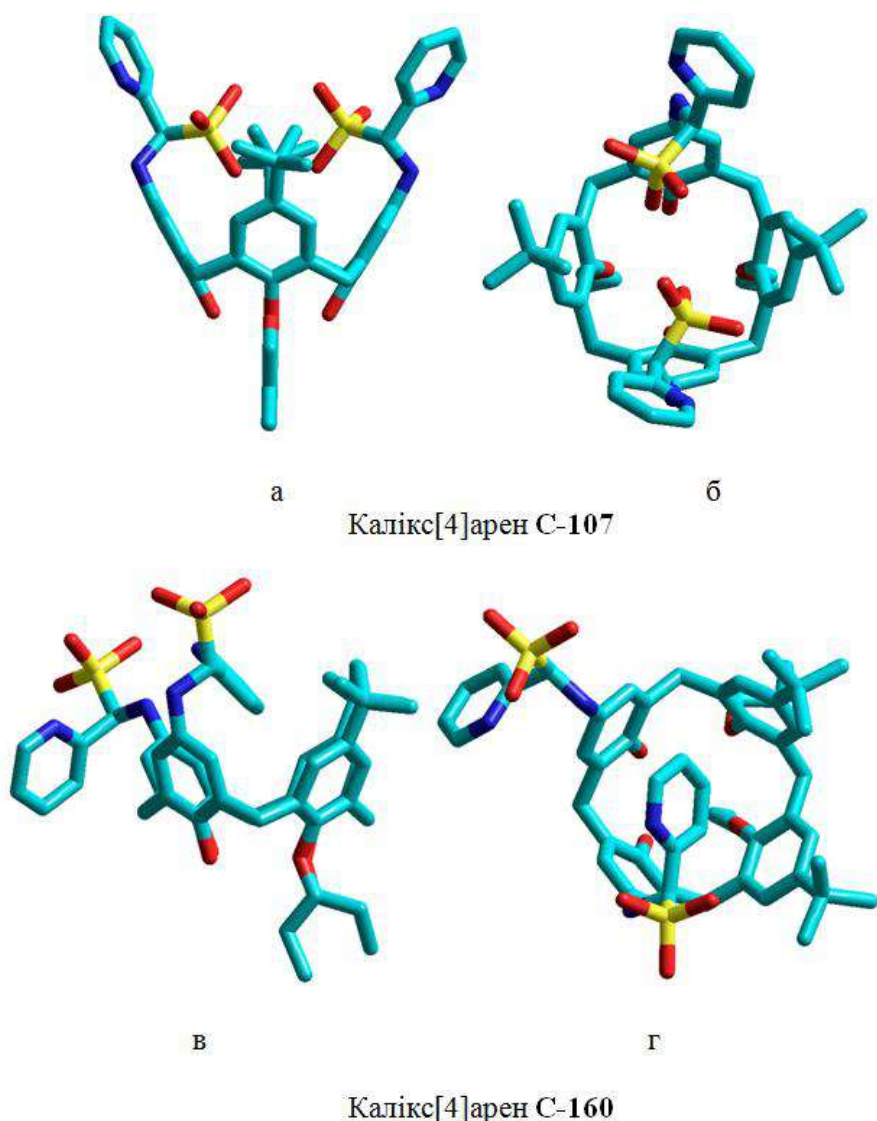


Рис. 5.11. Розраховані конформації калікс[4]аренів C-107 та C-160, бокові (а, в) та верхні (б, г) проєкції. (атоми вуглецю показані зеленим, кисню – червоним, азоту – синім, фосфору – жовтим, атоми водню не показані).

Таблиця 5.2. Характеристичні відстані між дистальними та проксимальними фрагментами N–C–P калікс[4]аренів C-107 та C-160.

Міжатомні відстані (<i>l</i>), Å			Δl , Å
	C-107	C-160	
N...N	9.43	6.73	2.70
C...C	7.75	8.09	0.34
P...P	4.85	9.40	4.55

Згідно розрахунків обидва калікс[4]арени **C-107** та **C-160** мають практично однакову конформацію *регулярний* конус. Разом з тим відстані N...N, C...C, P...P (*l*) між амінофосфоновими фрагментами N–C–P суттєво різняться (табл. 5.2). Наприклад, значення Δl для атомів фосфору сягає 4.55 Å. При цьому в дистально-заміщеному калікс[4]арені **C-107** обидві фосфонові групи орієнтовані всередину макроциклічної порожнини. В проксимально-заміщеному калікс[4]арені **C-160** фосфонові групи орієнтовані на периферію. Молекулярна порожнина даного макроциклу заповнена одним із піридилних фрагментів.

Отже, логічно стверджувати, що вплив калікс[4]арену **C-107** на Na^+, K^+ -АТРазну активність визначається оптимальним просторовим розташуванням амінофосфонових груп на каліксареновій платформі, що вірогідно є комплементарним до сайту взаємодії з Na^+, K^+ -АТРазою.

Отже, слід вважати, що в цілому біофізикохімічні ефекти в системі “каліксарен – мембранні фрагменти” є вельми складними. Проте для інгібувальної дії калікс[4]арену **C-107** на Na^+, K^+ -АТРазну активність, що визначається у зазначеній гетерогенній системі, суттєвим є саме відносне розташування амінофосфонових груп на поверхневому вінці макроциклу.

5.4. Порівняльне дослідження впливу калікс[4]арену C-99 та його аналогів на Na^+, K^+ -АТРазу активність.

З метою визначення ролі структурної організації молекули калікс[4]арену C-99 у проявленні інгібіторної дії на Na^+, K^+ -АТРазу ПМ клітин міометрія, ми вивчали дію структурно подібних до нього калікс[4]аренів - C-296, C-297, C-424, C-425, C-426, C-427 на активність даного ензиму.

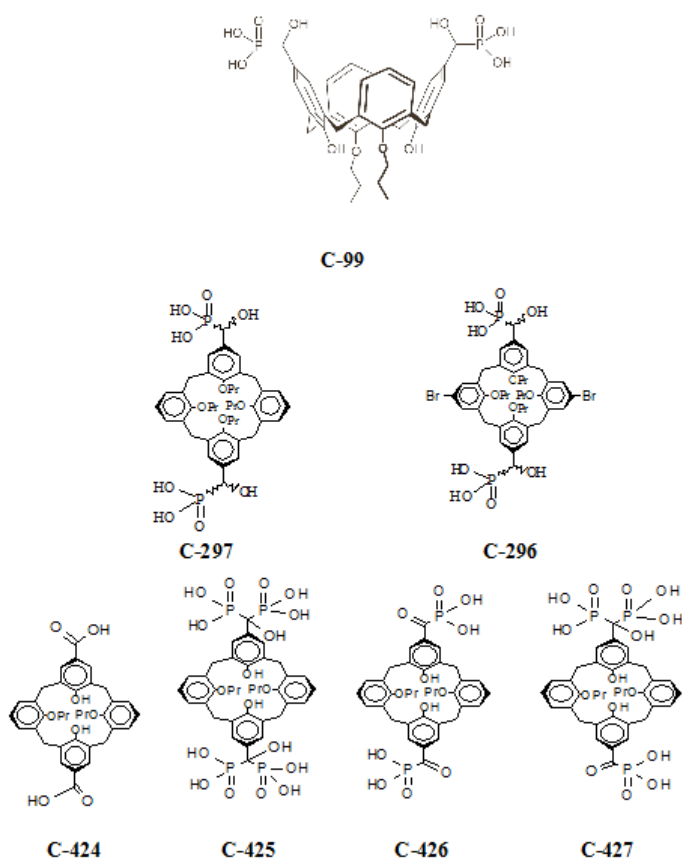


Рис. 5.12. Структурні формули калікс[4]арену C-99 та його аналогів.

Спочатку ми досліджували дію калікс[4]аренів C-296 і C-297, що є структурними аналогами калікс[4]арену C-99 (рис. 5.12). У цих калікс[4]аренів нижній вінець відрізняється від калікс[4]арену C-99 наявністю ще двох додаткових пропоксильних груп. Замісники по верхньому вінці макроциклу калікс[4]арену C-297 такі ж як і у C-99, а калікс[4]арен C-296 має ще два атоми брома у положеннях 11 та 23 на верхньому вінці макроциклу.

Як показали результати досліджень, калікс[4]арени **C-296** і **C-297**, що були використані у концентрації 100 мкМ, з однаковим ступенем ефективності чинять інгібувальну дію на питому ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази: має місце зниження активності на $63,5 \pm 4,3$ % та $61,5 \pm 1,9$ % відповідно відносно контрольного значення (рис. 5.13). При цьому обидва калікс[4]арени майже не впливають на активність “базальної” Mg^{2+} -АТРази (зменшення активності лише до 91 % від контрольного значення).

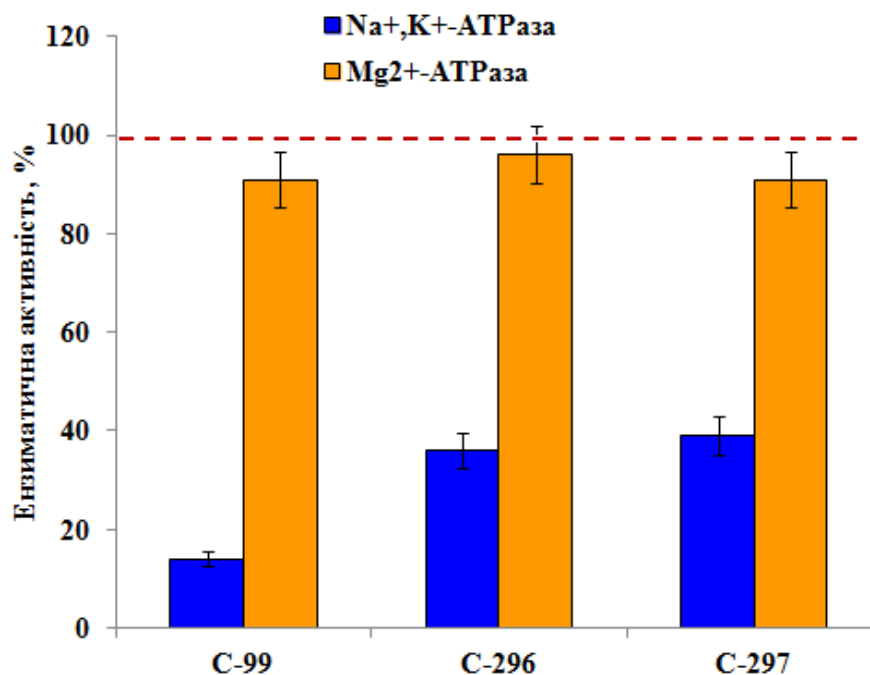


Рис. 5.13. Вплив калікс[4]аренів **C-99**, **C-296** і **C-297** (100 мкМ) на питому ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази та “базальної” Mg^{2+} -АТРази у фракції ПМ клітин міометрія ($M \pm m$; $n = 5$).

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

Також ми показали, що калікс[4]арени **C-296** та **C-297**, які використовували в інтервалі концентрацій від 10^{-8} до 10^{-4} М, ефективно та дозозалежно гальмують активність Na^+, K^+ -АТРази (рис. 5.14). Величини уявних констант інгібування $I_{0,5}$ для цих калікс[4]аренів становлять $4,90 \pm 0,31$ та $15,21 \pm 1,92$ мкМ відповідно (табл. 5.11). Значення коефіцієнта Хілла (η_H) для калікс[4]аренів **C-296** та **C-297** практично однакові: $0,33 \pm 0,02$ і $0,35 \pm 0,06$ відповідно.

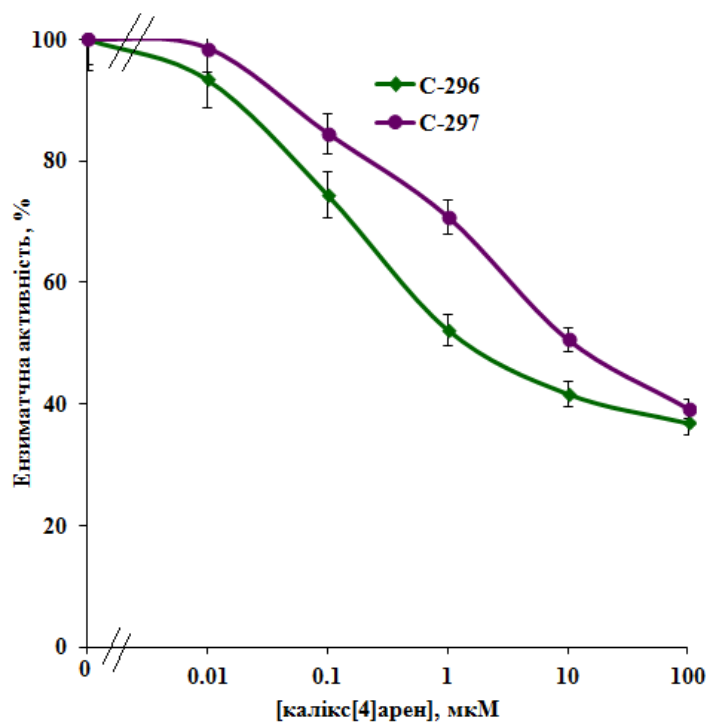


Рис. 5.14. Концентраційна залежність впливу калікс[4]аренів **C-296** і **C-297** на активність Na^+, K^+ -АТРази у фракції ПМ клітин міометрія ($M \pm m$; $n = 5$).

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

Таблиця 5.3. Кінетичні параметри інгібування калікс[4]аренами активності Na^+, K^+ -АТРази ПМ клітин міометрія.

Калікс[4]арен	Коефіцієнт інгібування, $I_{0,5}$	Коефіцієнт Хілла, n_H
C-99	98 ± 8 нМ	$0,12 \pm 0,03$
C-296	$4,90 \pm 0,31$ мкМ	$0,33 \pm 0,02$
C-297	$15,21 \pm 1,92$ мкМ	$0,35 \pm 0,06$
C-425	$1,20 \pm 0,10$ мкМ	$0,36 \pm 0,01$
C-427	$2,80 \pm 0,18$ мкМ	$0,38 \pm 0,01$

Отже, калікс[4]арени **C-296** та **C-297** є менш ефективними інгібіторами Na^+, K^+ -АТРази порівняно з калікс[4]ареном **C-99**, уявна константа інгібування якого наведена у таблиці 5.3. Очевидно, що інгібіторні властивості вказаних

калікс[4]аренів визначаються структурою верхнього вінця макроциклу. Проте дві додаткові пропоксильні групи на нижньому вінці калікс[4]аренів **C-296** та **C-297** зумовлюють більшу гідрофобність цих сполук порівняно з калікс[4]ареном **C-99**, що може бути причиною зниження ефективності інгібування Na^+, K^+ -АТРази. Крім цього, наявність на нижньому вінці макроциклу калікс[4]аренів **C-296** та **C-297** чотирьох пропоксильних груп зумовлює відмінності у конформаційній поведінці цих калікс[4]аренів, а саме калікс[4]арени **C-296** та **C-297** в розчинах перебувають у мобільній конформації *конус*. В той же час калікс[4]арен **C-99** знаходиться в жорсткій конформації *сплощений конус*, яка стабілізується завдяки утворенню водневих зв'язків між проксимальними групами $\text{OH} \cdots \text{OPr}$.

Наявність двох атомів бром у молекулі калікс[4]арену **C-296**, порівняно з калікс[4]ареном **C-297**, може призводити до екранування залишків гідроксиметилфосфонові кислоти верхнього вінця макроциклу, але дана обставина суттєво не впливає на ефективність інгібування Na^+, K^+ -АТРази, адже уявна константа інгібування калікс[4]ареном **C-296** навіть нижча (4,9 мкМ) від аналогічної константи для калікс[4]арену **C-297** (15,2 мкМ). Тобто, можна припустити, що модифікування верхнього вінця калікс[4]арену **C-99** у положеннях 11 та 23 атомами бром можливо дозволить збільшити ефективність інгібування Na^+, K^+ -АТРази.

В наших подальших експериментах ми досліджували дію калікс[4]аренів **C-424**, **C-425**, **C-426**, **C-427** (рис. 5.15). Дані речовини за своєю структурою подібні до калікс[4]арену **C-99**. Структурні відмінності цих сполук знаходяться на верхньому вінці каліксаренового макроциклу. Як каліксаренова чаша, так і хімічна будова нижнього вінця є однаковими для всіх вказаних калікс[4]аренів. Найпростішу структуру має калікс[4]арен **C-424**. На його верхньому вінці знаходяться лише два залишки карбонової кислоти у *пара*-положенні. Тобто, порівняно з калікс[4]ареном **C-99**, калікс[4]арен **C-424** позбавлений залишків фосфонові кислоти. Натомість калікс[4]арен **C-425**, на відміну від калікс[4]арену **C-99**, має ще дві додаткові фосфонатні групи, що приєднані до

атому вуглецю гідроксиметилфосфонатних залишків, тобто це фрагменти α -гідроксиметилбісфосфонової кислоти. Калікс[4]арен **C-426** на верхньому вінці макроциклу має залишки кетометилфосфонової кислоти, на відміну від гідроксиметилфосфонатних залишків калікс[4]арену **C-99**, а калікс[4]арен **C-427** має один залишок гідроксиметилбісфосфонату, як у калікс[4]арена **C-425**, та один залишок кетометилфосфонової кислоти, як у випадку калікс[4]арена **C-426**. Розташування замісників на верхньому вінці усіх калікс[4]аренів однакове.

Як показали результати проведених досліджень калікс[4]арен **C-424** (концентрація 100 мкМ) не впливає на активність Na^+, K^+ -АТРази та “базальної” Mg^{2+} -АТРази (рис. 5.15). Відсутність інгібіторної дії калікс[4]арену **C-424** була очікувана, оскільки дана сполука не має залишків фосфонових кислот у своєму складі, які є відомими комплексоутворювачами. Вірогідно, що саме фосфонатні групи відіграють вирішальну роль у взаємодії калікс[4]арену **C-99**, а також інших фосфонатвмісних калікс[4]аренів (**C-97**, **C-107**), з ензимом та його ігібуванні.

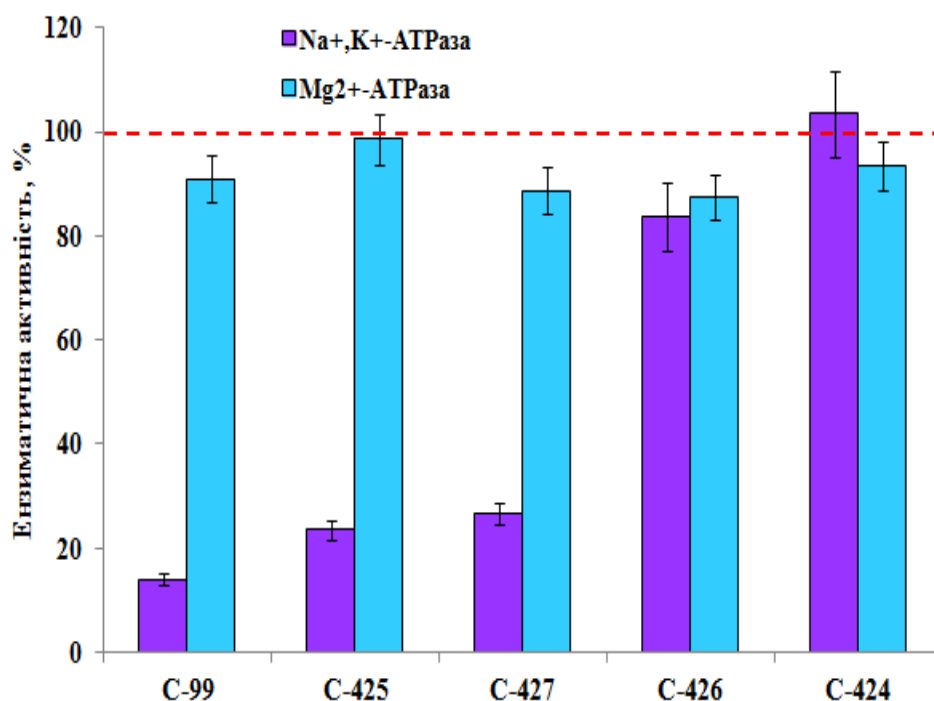


Рис. 5.15. Вплив калікс[4]аренів **C-99**, **C-424** і **C-425**, **C-426** та **C-427** (100 мкМ) на питому ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази та “базальної” Mg^{2+} -АТРази у фракції ПМ клітин міометрія ($M \pm m$; $n = 5$).

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

Калікс[4]арен **C-426** у концентрації 100 мкМ, пригнічує активність обох досліджених АТРаЗ лише на 16 % від контрольного значення (рис. 5.14). Тобто, даний аналог калікс[4]арену **C-99** не чинить інгібіторної дії на Na^+, K^+ -АТРазу. На перший погляд цей результат є несподіваним, адже калікс[4]арен **C-426** за хімічною структурою дуже подібний до калікс[4]арену **C-99**, а кетофосфонові кислоти, які є у молекулі калікс[4]арену **C-426**, у наших експериментах діють як інгібітори ензимів. Можливо декілька припущень щодо пояснення причин такої відмінності у інгібіторних властивостях цих сполук. По-перше, калікс[4]арен **C-426** містить кетогрупи на метилфосфонатних замісниках замість гідроксильної групи калікс[4]арена **C-99**, яка здатна утворювати водневі зв'язки з різними хімічними групами на поверхні молекули ензиму. Тобто, можливо саме такі водневі зв'язки є необхідними для утворення інгібіторного комплексу калікс[4]арену **C-99** з Na^+, K^+ -АТРазою. По-друге, атоми вуглецю у метилфосфонатних груп калікс[4]арену **C-426** мають вищу ступінь окислення та знаходяться у sp^2 -гібридизованому стані, порівняно з sp^3 -гібридизацією аналогічних атомів калікс[4]арену **C-99**. Відповідно атоми кетометилфосфонатної групи знаходяться у одній площині з фенольним залишком макроциклу та жорстко закріплені на ньому, в той час як зв'язки атому вуглецю гідроксиметилфосфонові кислоти мають тетраедричну будову та здатні до обертання. Тобто метилфосфонові замісники калікс[4]арену **C-99** є конформаційно рухливими, що допомагає їм ліпше “прилаштуватися” до взаємодії з ензимом. Вірогідно, що більш жорстка “конформація” залишків кетофосфонові кислоти калікс[4]арену **C-426** не здатна до ефективної взаємодії з Na^+, K^+ -АТРазою.

Калікс[4]арени **C-425** і **C-427**, що були використані у концентрація 100 мкМ, виявили подібну дію на активність Na^+, K^+ -АТРази: спостерігається пригнічення активності на $76,7 \pm 0,3$ % та $74,5 \pm 0,5$ % відповідно відносно

контролю (рис. 5.15). Поряд з цим калікс[4]арен **C-425** зовсім не впливає на питому ензиматичну активність “базальної” Mg^{2+} -АТРази, а калікс[4]арен **C-427** пригнічує її на $11,70 \pm 0,66$ %. Приймаючи до уваги значну інгібіторну дію калікс[4]аренів **C-425** і **C-427** на натрієву помпу, ми дослідили концентраційну залежність їх дії. Було показано, що калікс[4]арени **C-425** та **C-427**, які використовували в інтервалі концентрацій від 10^{-8} до 10^{-4} М, ефективно та дозозалежно гальмують активність Na^+,K^+ -АТРази (рис. 5.16). Величини уявних констант інгібування $I_{0,5}$ для цих калікс[4]аренів становлять $1,20 \pm 0,10$ та $2,80 \pm 0,18$ мкМ відповідно (таб. 5.3). Значення коефіцієнта Хілла (n_H) для калікс[4]аренів **C-425** та **C-427** практично однакові: $0,36 \pm 0,01$ і $0,38 \pm 0,01$ відповідно.

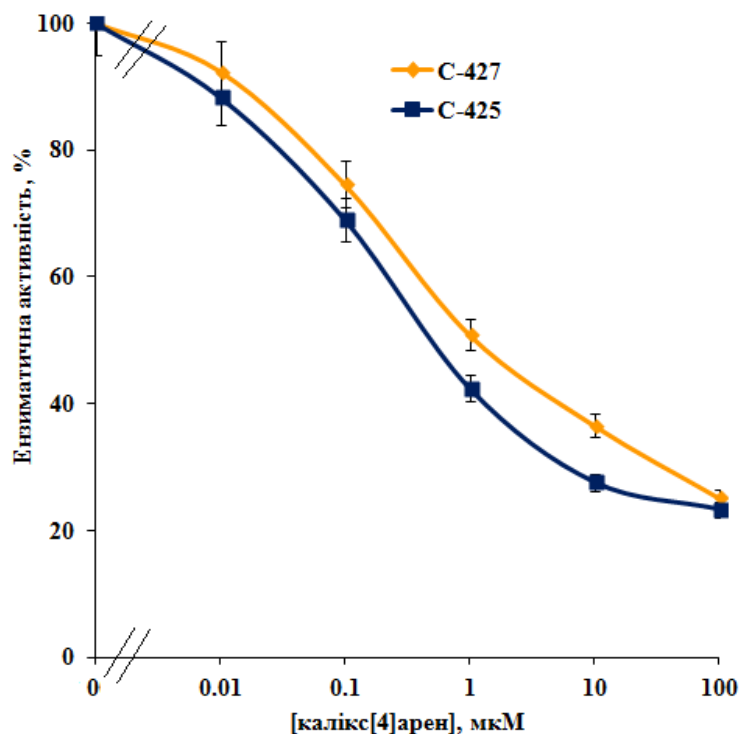


Рис. 5.16. Концентраційна залежність впливу калікс[4]аренів **C-425** та **C-427** на активність Na^+,K^+ -АТРази у фракції ПМ клітин міометрія ($M \pm m$; $n = 5$).

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

Калікс[4]арен **C-425** має 4 фосфонатні залишки на верхньому вінці макроциклу, проте його ефективність інгібування менша від калікс[4]арену **C-**

99 ($I_{0,5} = 98 \pm 8$ нМ), який має два фосфонатні залишки. Очевидно, що для ефективного інгібування Na^+, K^+ -АТРазної активності необхідна взаємодія з ензимом саме двух фосфонатних груп. Крім цього калікс[4]арен **C-425** має більший негативний заряд, що можливо створює електростатичні перешкоди для його ефективної взаємодії з Na^+, K^+ -АТРазою. Калікс[4]арен **C-427** має три фосфонатні залишки, але його ефективність інгібування Na^+, K^+ -АТРази ще нижча, ніж у випадку калікс[4]арену **C-425**. Один з замісників калікс[4]арену **C-427** аналогічний до замісників калікс[4]арену **C-426**, який практично не інгібує ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази, тобто можна припустити, що дана кетометилфосфонатна група не бере участі у інгібувальній взаємодії з ензимом. Вірогідно, що саме друга гідроксиметилбісфосфонатна група калікс[4]арену **C-427** взаємодіє з відповідними амінокислотними залишками на поверхні ензиму та відповідно саме така взаємодія зумовлює інгібування Na^+, K^+ -АТРази. Синтезування та перевірка інгібіторних властивостей калікс[4]арену, який би містив одну гідроксиметилбісфосфонатну групу на верхньому вінці макроциклу, дозволить нам перевірити вказане припущення. Даний гіпотетичний калікс[4]арен буде також подібним до калікс[4]арену **C-97**, який має одну метиленбісфосфонатну групу на верхньому вінці макроциклу та є дуже ефективним інгібітором Na^+, K^+ -АТРази ($I_{0,5} = 33 \pm 4$ нМ). Тому не виключено, що вказаний гіпотетичний калікс[4]арен буде мати також високу ефективність інгібування.

Отже, порівнявши вплив досліджених калікс[4]аренів, які є структурно подібними, на Na^+, K^+ -АТРазу активність ПМ міоцитів матки, ми можемо визначати, які хімічні групи калікс[4]аренів зумовлюють їхні інгібіторні властивості щодо зазначеного ензиму. Крім того такий аналіз дозволяє нам припускати структуру нових гіпотетичних калікс[4]аренів, що будуть здатні інгібувати Na^+, K^+ -АТРазу. Тобто, дані цієї роботи можуть слугувати підґрунтям для подальшої розробки, на основі досліджуваних калікс[4]аренів, ефективних інгібіторів Na^+, K^+ -АТРази.

Втім, по суті ми можемо розглядати транспортну Na^+, K^+ -АТФазу як Mg^{2+} , АТФ-залежний електрогенний $3\text{Na}^+-2\text{K}^+$ -антипортер; відповідно, ензиматична та транспортна активність такого мембранозв'язаного електроензиму повинна втрачатися, якщо одночасно з активним електрогенним контртранспортом Na^+ та K^+ буде мати місце незалежний від нього симпорт додаткового аніону (наприклад, Cl^-) з катіонами Na , чи незалежний від зазначеного контртранспорту антипорт додаткового носія позитивного заряду (наприклад, протону H^+). Іншими словами, втручання в баланс носіїв електричного заряду, який контролюється електроензимом, повинно, скоріше за все, приводити до гальмування його функціонування.

І тут важливо відзначити, що у експериментах, виконаних на пласких ліпідних мембранах, нами у співпраці з О.Я. Шатурським було доведено, що інгібітор натрієвої помпи калікс[4]арен **C-99** справді здатний вбудовуватися в пласку мембрану та формувати в ній струмопровідну, щодо аніонів Cl^- , структуру.

Аналіз кінетичних та енергетичних (енергія активації $E_a=7.20\pm 0.96$ ккал/мол) характеристик зазначеного аніонного транспорту свідчить на користь того, що мова може йти за полегшену трансмембранну дифузію Cl^- через штучну пласку мембрану [246] (рис. 5.17).

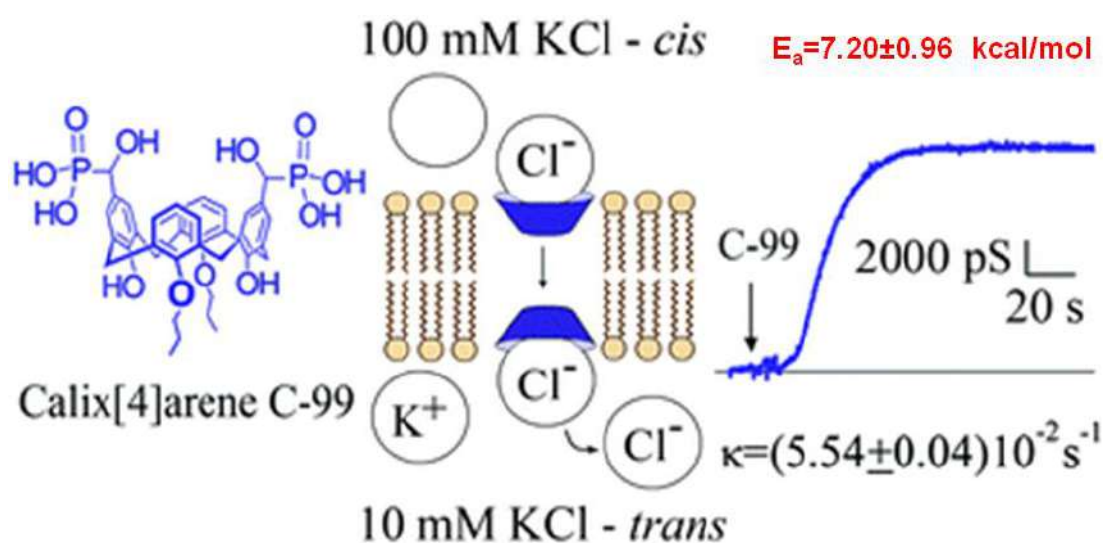


Рис. 5.17. Схематичне формування Cl^- -провідних структур калікс[4]ареном **C-99**, у штучній пласкій мембрані.

Отже, високоафінний інгібітор транспортної Na^+, K^+ -АТРази калікс[4]арен **C-99**, вбудований у штучну пласку мембрану, здатний формувати СГ-провідні структури, які забезпечують полегшену дифузію зазначеного аніона.

5.5. Особливості дії калікс[4]арену C-97 на активність Na^+, K^+ -АТРази.

5.5.1. Дія калікс[4]арену C-97 на концентраційну залежність активності Na^+, K^+ -АТРази від іонів Mg.

Реагентами в Na^+, K^+ -залежній АТР-гідролазній реакції, що каталізується Na^+, K^+ -АТРазою, є не лише іони Na та K, але й, іони Mg та нуклеозидтрифосфат АТР. Дійсно, у цій реакції Mg^{2+} діє як кофактор, який зв'язується з регуляторним центром Na^+, K^+ -АТРази [95, 429]. Окрім того, Mg^{2+} утворює з ATP^{4-} хелатний комплекс MgATP^{2-} , який слугує істинним субстратом в реакції фосфорилування ензимного білка [78]. І, нарешті, у високих концентраціях (десятки мМ) магній проявляє інгібуєчий вплив на Na^+, K^+ -АТРази [95].

Нами було показано, що каталітична активність Na^+, K^+ -АТРази зростає по мірі збільшення концентрації іонів Mg від 0,01 до 5 мМ за умов фіксованих концентрацій АТР (1 мМ) в інкубаційному середовищі. Значення оптимальної концентрації Mg^{2+} для Na^+, K^+ -АТРази складає 1 мМ, (рис. 5.18, крива контроль). Значення константи активації по Mg^{2+} $K_{\text{Mg}^{2+}}$ для Na^+, K^+ -АТРази становить 430 ± 22 мкМ ($M \pm m$; $n = 6$). При подальшому рості концентрації іонів Mg ми спостерігаємо вихід графіка на плато.

При внесенні до середовища інкубації калікс[4]арену **C-97** (10 нМ) спостерігається зниження ензиматичної активності Na^+, K^+ -АТРази приблизно у 2 рази (рис. 5.17, крива **C-97**). Як видно з графіка, калікс[4]арен **C-97** не модифікує характер залежності активності Na^+, K^+ -АТРази від концентрації іонів Mg (0,01 – 5 мМ, концентрація АТР - 1 мМ). Наші розрахунки свідчать, що калікс[4]арен **C-97** не призводить до вірогідної зміни величин константи

активації за іонами Mg K_{Mg}^{2+} (430 ± 22 та 413 ± 19 мкМ в контролі та у присутності калікс[4]арену **C-97** відповідно; $M \pm m$; $n = 6$).

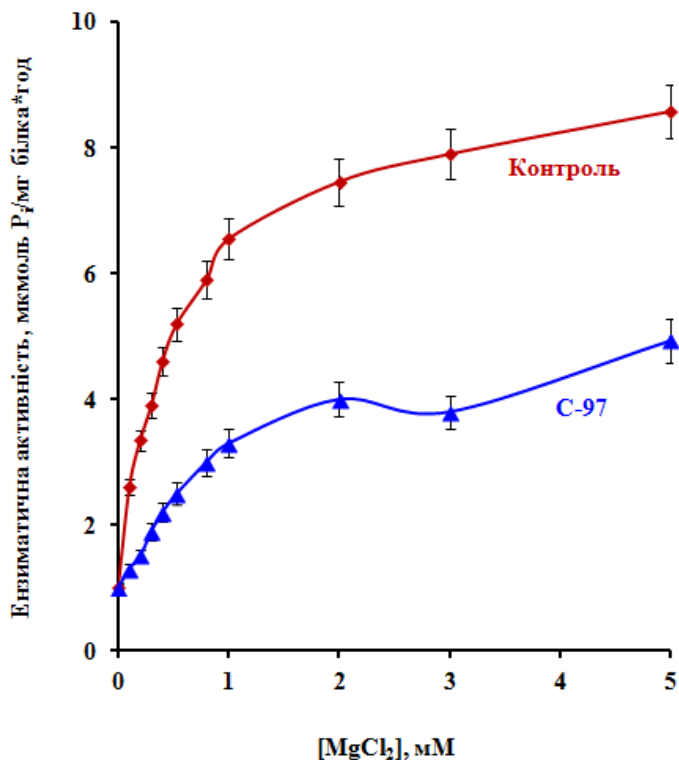


Рис. 5.18. Каталітичне титрування іонами Mg (концентрація АТР - 1 мМ) Na^+, K^+ -АТРази у фракції ПМ клітин міометрія у відсутності (контроль) та у присутності калікс[4]арену **C-97** (10 нМ) ($M \pm m$; $n = 6$).

Таким чином, є підстави вважати, що інгібуючий ефект калікс[4]арену **C-97** на Na^+, K^+ -АТРази ПМ не може бути пов'язаний із зменшенням, під дією цієї речовини, спорідненості ензиму до іонів Mg .

5.5.2. Дія калікс[4]арену **C-97** на концентраційну залежність активності Na^+, K^+ -АТРази від АТР.

Для подальшої кінетичної інтерпретації впливу калікс[4]арену **C-97** на ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази ПМ міометрія ми дослідили його дію на характер концентраційної залежності цієї активності від АТР.

Підвищення концентрації АТР в середовищі інкубації в діапазоні від 0,01 до 1 мМ супроводжувалось зростанням ензиматичної активності Na^+, K^+ -АТРази

(рис. 5.19, контроль) за умов фіксованої концентрації $MgCl_2$ (3 мМ) в інкубаційному середовищі. При подальшому зростанні концентрації АТР до 5 мМ спостерігається пригнічення активності. Значення оптимальної концентрації АТР складає 0,5 - 1 мМ. Методом Ейзенталя-Корніш-Боуден були розраховані уявна константа Міхаеліса K_m по нуклеозидтрифосфату АТР та коефіцієнт Хілла n_H , які становлять 115 ± 12 мкМ та $1,4 \pm 0,2$ відповідно ($M \pm m$; $n = 7$).

Отримане нами значення K_m за АТР Na^+, K^+ -АТРази корелює з даними літератури. Дійсно, величина K_m за АТР по Na^+, K^+ -АТРази для сольових залоз качки – 70 мкМ, для мозку пацюків – 260 мкМ [10].

У дослідях із каталітичного титрування Na^+, K^+ -АТРази ПМ АТР (концентрація Mg^{2+} - 3 мМ) (рис. 5.19, **C-97**) було знайдено, що калікс[4]арен **C-97** (10 нМ) гальмує ензиматичну активність в середньому у 2 рази, проте це, як з'ясувалось, не призводить до вірогідної зміни величин константи Міхаеліса за АТР K_m (115 ± 12 та 127 ± 16 мкМ в контролі та у присутності калікс[4]арену відповідно; $M \pm m$; $n=7$) (величини K_m розраховували методом Ейзенталя-Корніш-Боуден [13]).

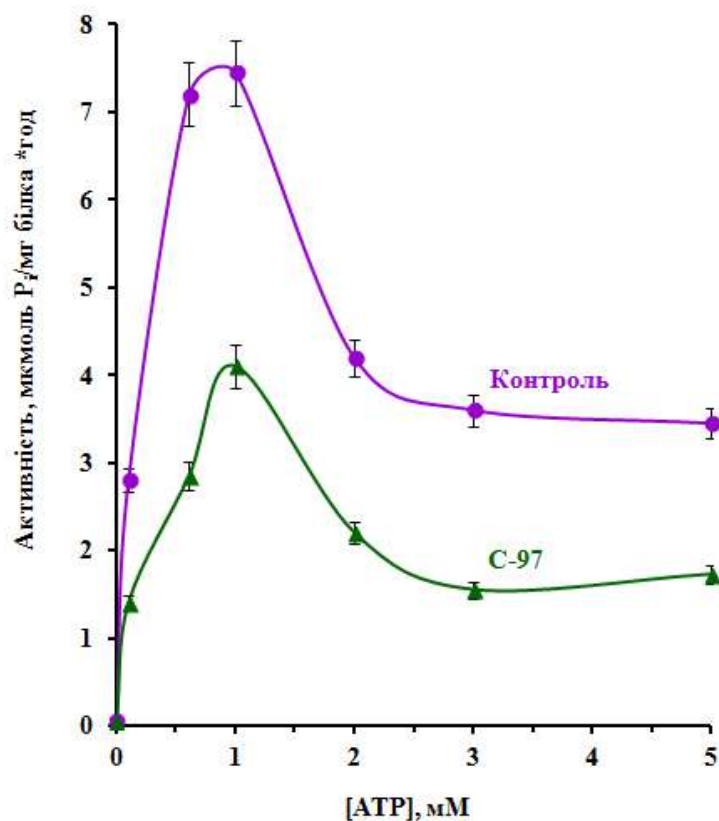


Рис. 5.19. Каталітичне титрування АТФ (концентрація Mg^{2+} - 3 мМ мМ) Na^+,K^+ -АТРази у фракції ПМ клітин міометрія у відсутності (контроль) та у присутності калікс[4]арену С-97 (10 нМ) ($M \pm m$; $n = 7$).

Таким чином, можна зробити висновок, що пригнічувальний ефект калікс[4]арену С-97 на Na^+,K^+ -АТРази не може бути пов'язаний із зменшенням, під дією цієї речовини, спорідненості ензиму до АТФ.

5.5.3. Дія калікс[4]арену С-97 на концентраційну залежність активності Na^+,K^+ -АТРази від співвідношень концентрацій $[Na^+]/[K^+]$.

Графік залежності ензиматичної активності Na^+,K^+ -АТРази від співвідношень концентрацій $[Na^+]/[K^+]$ (за умов сталої сумарної концентрації одновалентних катіонів $[Na^+] + [K^+] = 150$ мМ) має типовий куполоподібний вигляд (ліва та права гілки – “натрієва” та “калієва” відповідно); при відсутності

ж в середовищі інкубації іонів Na^+ чи K^+ ензиматична активність Na^+, K^+ -АТРази не тестується взагалі (рис. 5.20), що є властивим для даного ензиму [86, 150].

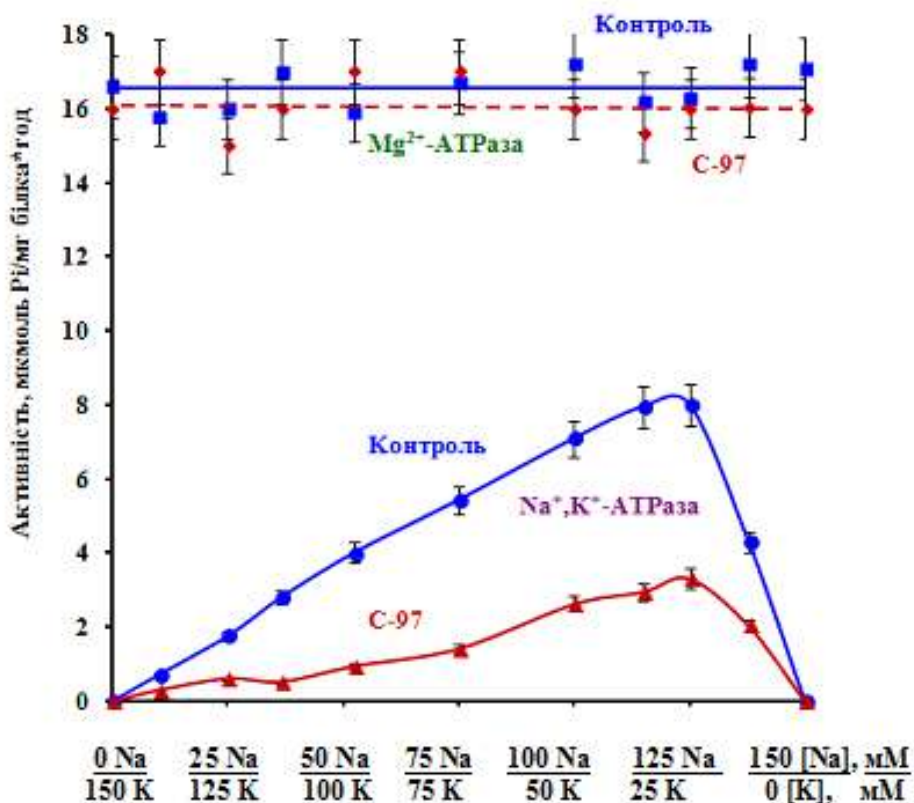


Рис. 5.20. Вплив калікс[4]арену **C-97** (10 нМ) на залежність питомої активності Na^+, K^+ -АТРази та Mg^{2+} -АТРази у фракції ПМ клітин міометрія від співвідношення $[\text{Na}^+]/[\text{K}^+]$ ($M \pm m$; $n = 6$).

Досліди проводились за умови збереження ізотонічності середовища інкубації: $[\text{Na}^+] + [\text{K}^+] = 150 \text{ мМ}$.

Отже, за цих умов оптимальним співвідношенням концентрацій $[\text{Na}^+]/[\text{K}^+]$ для функціонування Na^+, K^+ -АТРази є 115-125 мМ NaCl і 35-25 мМ KCl. Значення константи активації K_{Na^+} для іонів Na для уабічутливої Na^+, K^+ -АТРази становить 50 ± 4 мМ (“натрієва гілка” контрольного графіка на рис. 5.20) ($M \pm m$; $n=6$). Значення константи активації K_{K^+} для іонів K становить 136 ± 12 мМ (“калієва гілка” контрольного графіка на рис. 5.19) ($M \pm m$; $n=6$). Втім, на відміну від Na^+, K^+ -АТРази, величина питомої Mg^{2+} -залежної АТР-гідролазної ензиматичної активності взагалі не змінюється в залежності від зміни

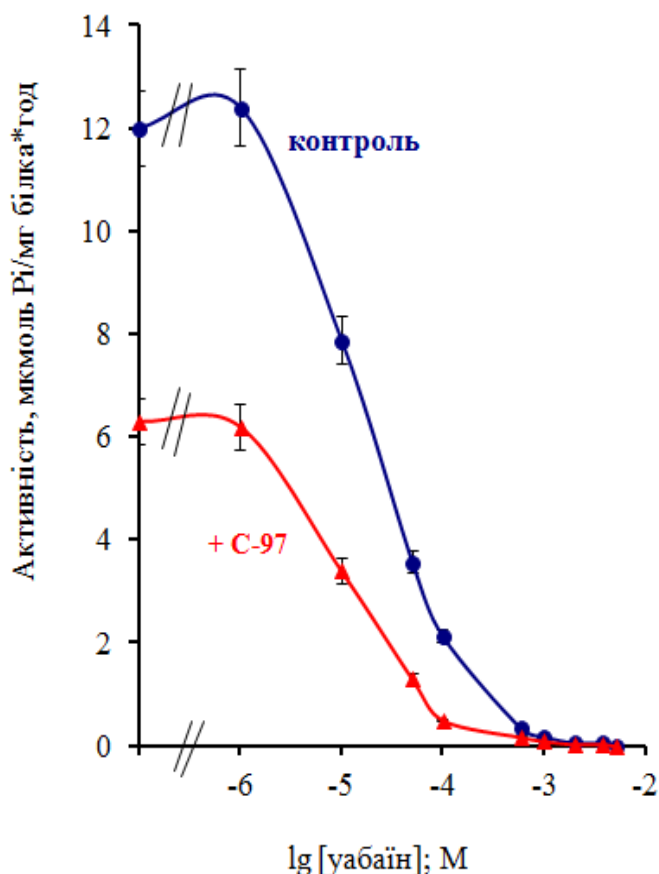
співвідношення $[Na^+]/[K^+]$ за умов сталої іонної сили ($[Na^+] + [K^+] = 150$ мМ) (рис. 5.20).

Встановлено, що калікс[4]арен **C-97**, внесений у середовище інкубації в концентрації 10 нМ, зменшував ензиматичну активність Na^+,K^+ -АТРази, не порушуючи характер її куполоподібної залежності від співвідношення $[Na^+]/[K^+]$ за ізотонічних умов, та практично не впливав на активність Mg^{2+} -АТРази. У той же час цей калікс[4]арен (10 нМ) за ізотонічних умов вірогідно збільшував величину константи активації K_{Na^+} іонами Na уабайнчутливої Na^+,K^+ -АТРази: від 50 ± 4 мМ (контроль) до 76 ± 6 мМ (у присутності калікс[4]арену **C-97**) ($p < 0,05$; $M \pm m$; $n=6$). При цьому не спостерігалось змін у спорідненості зазначеного ензиму до іонів K – величина константи активації для цих іонів K_K^+ становила 136 ± 12 мМ (контроль) та 140 ± 15 мМ (у присутності калікс[4]арену) ($M \pm m$; $n=6$).

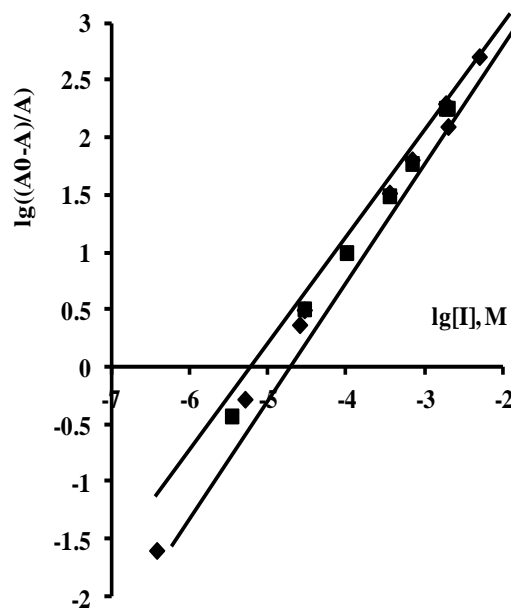
Таким чином, можна припустити, що одна із причин інгібіторної дії калікс[4]арену **C-97** на Na^+,K^+ -АТРази може бути пов'язана із зменшенням, під дією цієї речовини, спорідненості ензиму до іонів Na (рис. 5.20).

5.5.4. Дія калікс[4]арену C-97 на концентраційну залежність активності Na^+,K^+ -АТРази від уабайну.

Як показали результати експериментів, калікс[4]арен **C-97**, внесений у середовище інкубації в концентрації 10 нМ, призводить до гальмування активності Na^+,K^+ -АТРази стосовно контролю ($12,0 \pm 1,3$ та $6,1 \pm 0,8$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка у контролі та при дії зазначеної речовини відповідно; $M \pm m$; $n=6$), але одночасно збільшує спорідненість ензиму до серцевого глікозиду: дійсно, величини уявної константи інгібування $I_{0,5}$ становлять $21,5 \pm 1,5$ мкМ та $5,3 \pm 0,7$ мкМ у контролі та при дії калікс[4]арену **C-97** відповідно (рис. 5.21, табл. 5.4).



а



б

Рис. 5.21. Вплив калікс[4]арену **C-97** (10 нМ) на залежність питомої ензиматичної активності Na^+, K^+ -АТРази у фракції ПМ клітин міометрія від концентрації уабаїну ($M_{\pm t}$; $n = 6$).

За 100 % (контроль) прийнято значення питомої ензиматичної активності у відсутності уабаїну у середовищі інкубації. Лінеаризацію кривих здійснювали згідно з емпіричним рівнянням Хілла $\lg[(A_0-A)/A] = -n_H \lg I_{0,5} + n_H \lg [I]$, де A_0 та A – питомі ензиматичні активності у відсутності („нульова точка”) та в присутності в середовищі інкубації калікс[4]арену в концентрації 10 нМ, $I_{0,5}$ та n_H – уявні константа інгібування та коефіцієнт Хілла відповідно. Типові значення коефіцієнту кореляції r становили 0,98-0,99.

Що ж стосується коефіцієнта Хілла n_H , то відповідні значення цього параметра були: $0,54 \pm 0,07$ та $0,45 \pm 0,05$ у контролі та при дії калікс[4]арену **C-97** відповідно (негативна кооперативність) (рис. 5.21, табл. 5.4) (у цих дослідах величини $I_{0,5}$ та n_H розраховували із використанням лінеаризованих графіків Хілла відповідно до рівняння Хілла $\lg[(A_0-A)/A] = -n_H \lg I_{0,5} + n_H \lg [I]$, де A_0 та A

– питомі ензиматичні активності у відсутності („нульова точка”) та в присутності в середовищі інкубації калікс[4]арену в концентрації 10 нМ.

Табл. 5.4. Кінетичні характеристики дії калікс[4]арену С-97 на концентраційну залежність інгібіторної дії убаїну на ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази ПМ клітин міометрія ($M \pm m$; $n = 6$).

Умови досліджу	Уявна константа інгібування, $I_{0,5}$	Коефіцієнт Хілла, n_H	Концентрація убаїну, при якій спостерігається повне інгібування ензиматичної активності
Контроль	21 ± 5 мкМ	0.54 ± 0.07	1 мМ
Контроль +С-97 (10 нМ)	5.3 ± 0.7 мкМ	0.45 ± 0.05	~0.1 мМ

Отже, можна стверджувати, що калікс[4]арен **С-97** збільшує спорідненість убаїну до Na^+, K^+ -АТРази ПМ клітин міометрія, не впливаючи на характер кооперативності інгібуючої дії серцевого глікозиду на цей ензим. Логічно, припускати, що виявлене явище збільшення афінітету убаїну до Na^+, K^+ -АТРази опосередковується впливом калікс[4]арену на взаємодію „убаїн – убаїновий рецептор”, що призводить до її полегшення.

5.6. Особливості дії калікс[4]арену С-107 на активність Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани гладеньком`язових клітин.

5.6.1. Дія калікс[4]арену С-107 на концентраційну залежність активності Na^+, K^+ -АТРази від убаїну.

Ми дослідили вплив калікс[4]арену **С-107** у різних концентраціях (відповідно 10, 25, 50, 75 та 100 нМ) на залежність активності Na^+, K^+ -АТРази від концентрації убаїну (рис. 5.22).

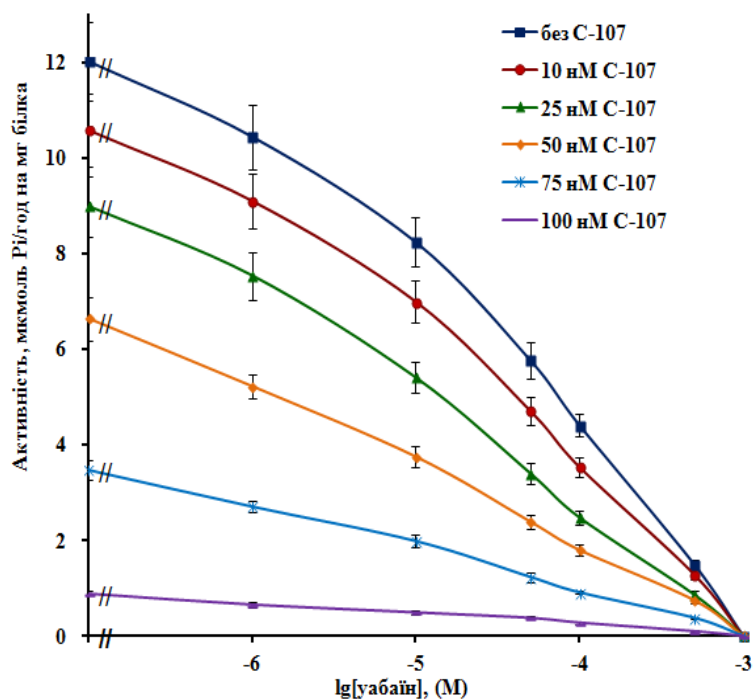


Рис. 5.22. Вплив калікс[4]арену **C-107** у різних концентраціях на залежність ензиматичної активності Na^+, K^+ -АТРази у фракції ПМ клітин міометрія від концентрації уабаїну ($M \pm m; n = 5$).

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. 5.23).

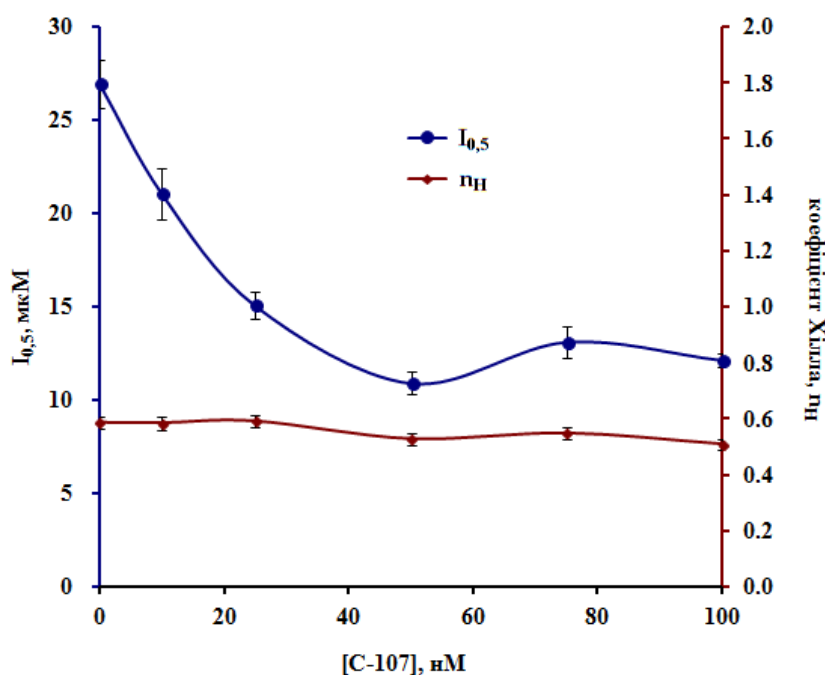


Рис. 5.23. Вплив калікс[4]арену **C-107** на кінетичні параметри (константу гальмування $I_{0,5}$ і коефіцієнт Хілла n_H) дії убаїну на активність Na^+, K^+ -АТРази у фракції ПМ клітин міометрія ($M \pm m$; $n = 5$).

Отже, калікс[4]арен **C-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 **C-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 (рис. 5.24) не впливає на константу гальмування $I_{0,5}$ і коефіцієнт Хілла n_H для калікс[4]арену **C-107**.

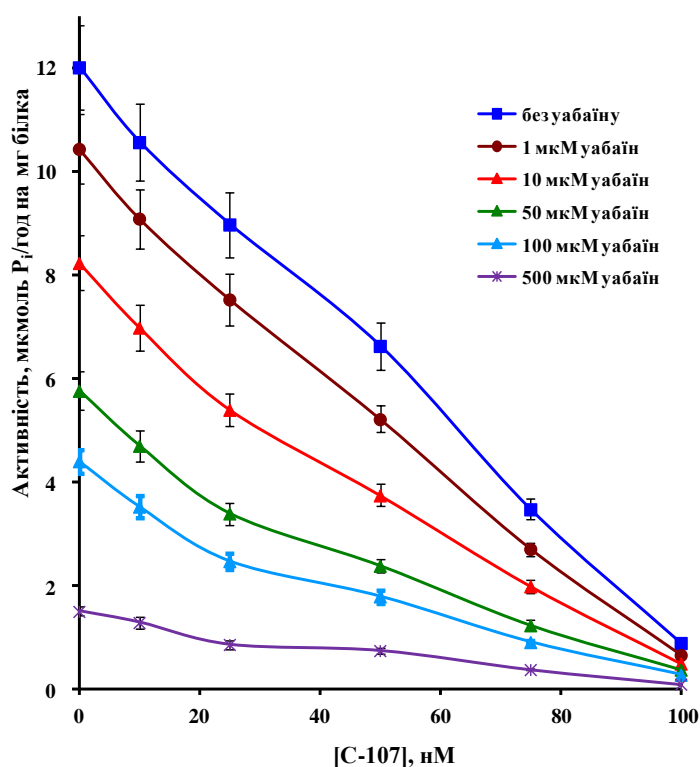


Рис. 5.24. Вплив убаїну у різних концентраціях на залежність питомої ензиматичної активності Na^+, K^+ -АТРази у фракції ПМ клітин міометрія від концентрації калікс[4]арену **C-107** ($M \pm m$; $n = 5$).

Значення коефіцієнта Хілла $n_H = 1,4-1,8$, що відповідає позитивній кооперативності ензиматичної реакції по калікс[4]арену **C-107** (рис. 5.25). Різниця у значеннях коефіцієнтів кооперативності дії калікс[4]арену **C-107** та убаїну вказує на різні механізми інгібування Na^+, K^+ -АТРази даними речовинами.

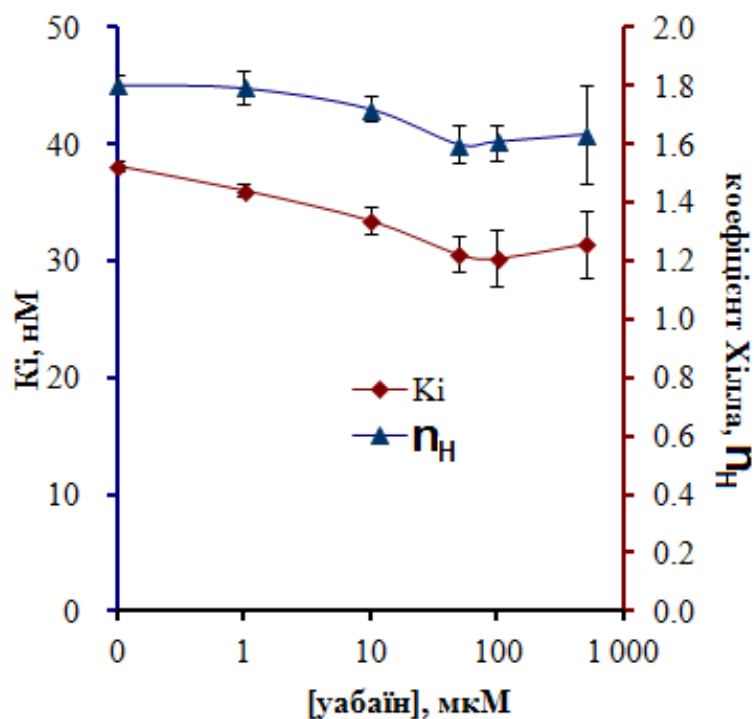


Рис. 5.25. Вплив убаїну на кінетичні параметри (константу гальмування K_i і коефіцієнт Хілла n_H) дії калікс[4]арену **C-107** на активність Na^+, K^+ -АТРази у фракції ПМ клітин міомерія ($M \pm m$; $n = 5$).

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

5.6.2. Дія калікс[4]арену C-107 на концентраційну залежність активності Na^+, K^+ -АТРази від АТР.

Для подальшої кінетичної інтерпретації впливу калікс[4]арену C-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. 5.26, без C-107) за умов фіксованої концентрації MgCl_2 (3 мМ) в інкубаційному середовищі.

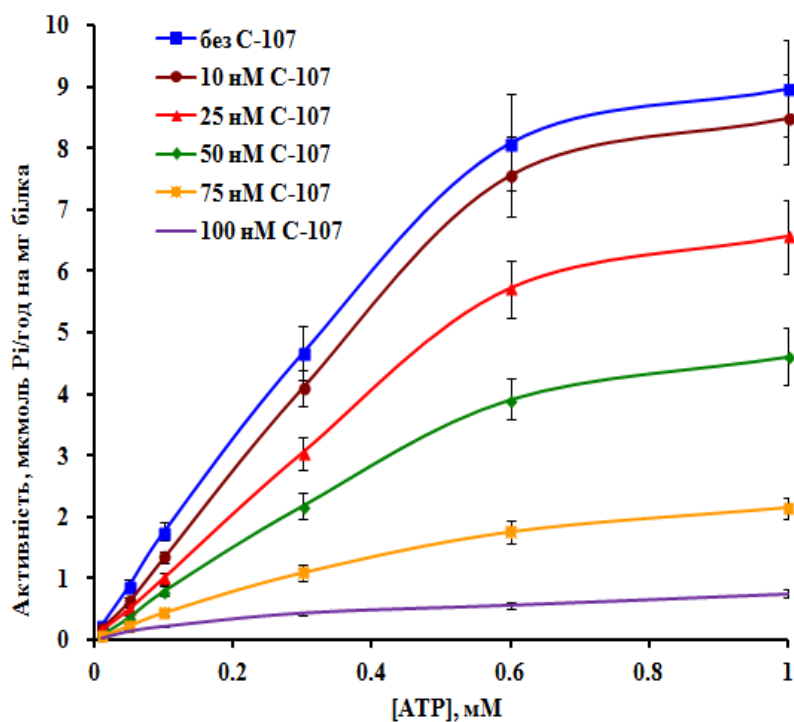


Рис. 5.26. Вплив калікс[4]арену C-107 у різних концентраціях на залежність питомої ензиматичної активності Na^+, K^+ -АТРази у фракції ПМ клітин міометрія від концентрації АТР ($M \pm m$; $n = 5$).

Концентрація MgCl_2 – 3 мМ.

Методом Хілла були розраховані уявна константа Міхаеліса K_m по нуклеозидтрифосфату АТР та коефіцієнт Хілла n_H , які становлять $204,6 \pm 11,1$ мкМ та $1,38 \pm 0,15$ відповідно ($n = 5$) (рис. 5.27). Отримане нами значення K_m за

АТР для Na^+, K^+ -АТРазі корелює з даними літератури. Величина K_m реакції гідролізу АТР у нервовій тканині пацюків складає 260 мкМ [14].

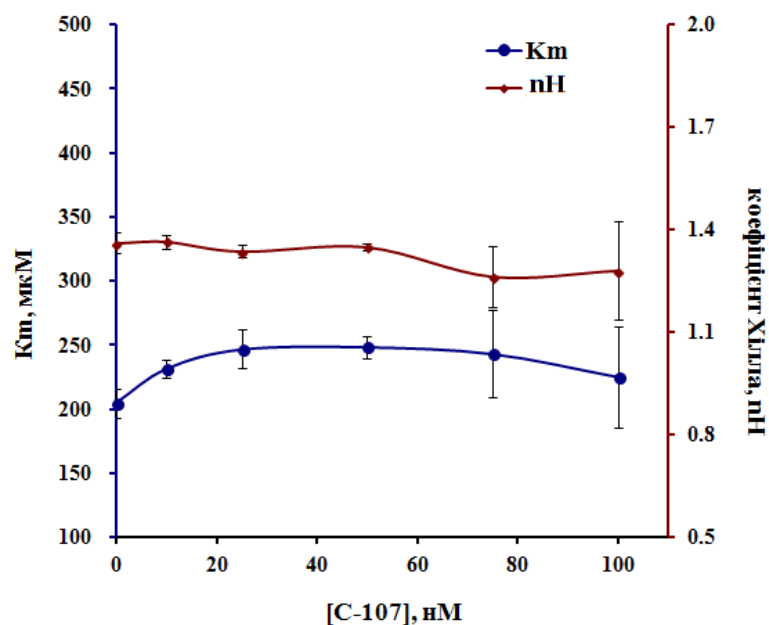


Рис. 5.27. Вплив калікс[4]арену **C-107** на кінетичні параметри (константу Міхаеліса K_m і коефіцієнт Хілла n_H) дії АТР на активність Na^+, K^+ -АТРазі у фракції ПМ клітин міомерія ($M \pm m$; $n = 5$).

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 АТР. Було досліджено вплив 5-ти концентрацій калікс[4]арену **C-107** (відповідно 10, 25, 50, 75 та 100 нМ) на концентраційну залежність від АТР. В усіх випадках спостерігається зниження з різним ступенем ефективності активності Na^+, K^+ -АТРазі, при цьому залежність ензиматичної активності від АТР виявляє характер, подібний до відповідної контрольної залежності без калікс[4]арену **C-107**, але платовий рівень активності зі зростанням концентрації калікс[4]арену знижується (рис. 5.25). 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. 5.27). 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. 5.27).

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.

Нами також були розраховані кінетичні параметри дії калікс[4]арену **C-107** за присутності різних концентрацій субстрату АТРазної реакції. Показано, що використання різних концентрацій АТР (рис. 5.28) слабо впливає на константу гальмування K_i калікс[4]ареном **C-107**; поряд з цим з графіка видно, що зростання концентрації АТР приводить до збільшення коефіцієнта Хілла n_H з $1,38 \pm 0,15$ до $2,18 \pm 0,11$ інгібувальної дії калікс[4]арену **C-107** (рис. 5.29).

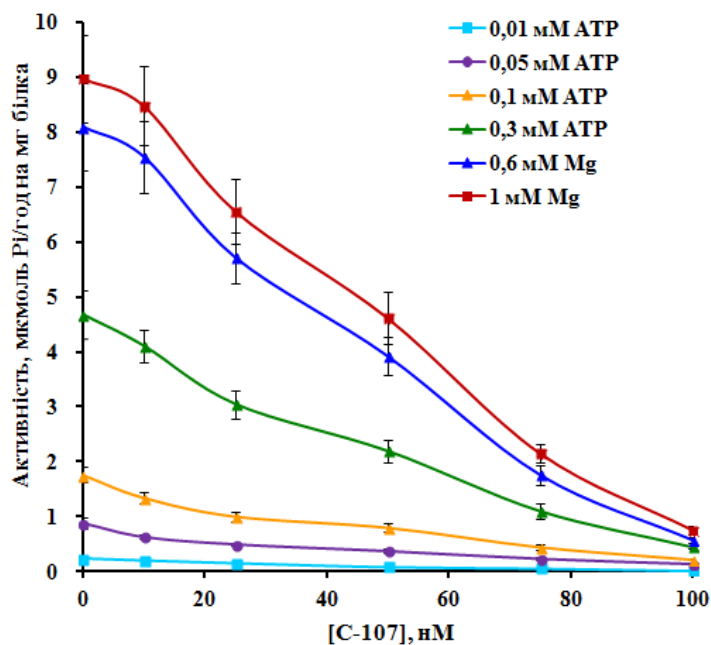


Рис. 5.28. Вплив АТР у різних концентраціях на залежність питомої ензиматичної активності Na^+, K^+ -АТРази у фракції ПМ клітин міометрія від концентрації калікс[4]арену **C-107** ($M \pm m$; $n = 5$).

Концентрація MgCl_2 – 3 мМ.

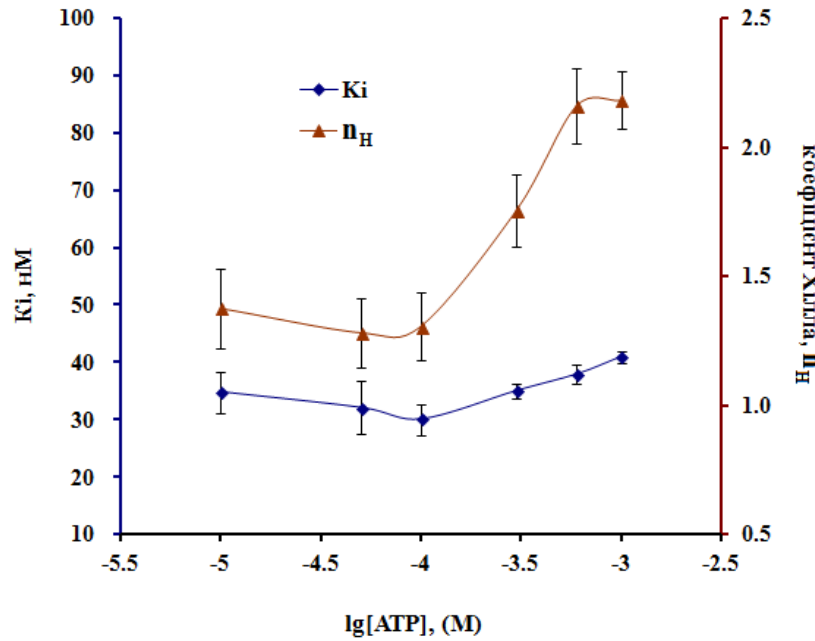


Рис. 5.29. Вплив АТФ на кінетичні параметри (константу гальмування K_i і коефіцієнт Хілла n_H) дії калікс[4]арену **C-107** на активність Na^+, K^+ -АТРази у фракції ПМ клітин міомерія ($M \pm m$; $n = 5$).

Концентрація MgCl_2 – 3 мМ.

Таким чином, інгібувальний ефект калікс[4]арену **C-107** на питому ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази не залежить від кількості АТФ у середовищі інкубації, що вказує на відсутність конкуренції між АТФ 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 субдинічного складу ензиму у разі підвищенні концентрації АТФ.

5.6.3. Дія калікс[4]арену **C-107** на концентраційну залежність активності Na^+, K^+ -АТРази від іонів Mg .

Відомо, що значення Mg^{2+} для метаболізму пояснюється його властивостями як промотора структури макромолекул, субстратв'язуючого іона і переносника електронів. Відомий цілий ряд Mg^{2+} -залежних ензимів, де

роль Mg^{2+} не обмежується активацією субстрату, а пов'язана із формуванням активного (каталітичного) центру. Проте найбільш широко відома роль Mg^{2+} в утворенні хелатного комплексу з АТР – субстратом аденозинтрифосфатазних реакцій. Вважають, що іони Mg^{2+} вступають у взаємодію із фосфатними зарядженими групами АТР, поляризують їх і підвищують реакційну здатність системи, полегшуючи нуклеофільну атаку на термінальний фосфат АТР [10].

Ензиматична активність Na^+,K^+ -АТРазі ПМ міомерія зростає по мірі збільшення концентрації $MgCl_2$ від 0,01 до 3 мМ за умов фіксованих концентрацій АТР (1 мМ) в інкубаційному середовищі (рис. 5.29, контроль). Значення уявної константи активації Na^+,K^+ -АТРази K_{Mg} становить $173 \pm 4,5$ мкМ, величина коефіцієнта Хілла $n_H - 0,99 \pm 0,03$ ($M \pm m; n = 5$) (рис. 5.30, контроль) ($M \pm m; n = 5$). Необхідно відмітити, що концентрація вільних іонів Mg^{2+} в середовищі інкубації може суттєво відрізнятися та не лінійно залежати від концентрації $MgCl_2$, тому представлені кінетичні параметри були розраховані саме для $MgCl_2$, а не для Mg^{2+}

Ми дослідили вплив калікс[4]арену **C-107** на кінетичні параметри дії $MgCl_2$. Було досліджено концентраційну залежність від $MgCl_2$ за присутності калікс[4]арену **C-107** в різних концентраціях (рис. 5.30).

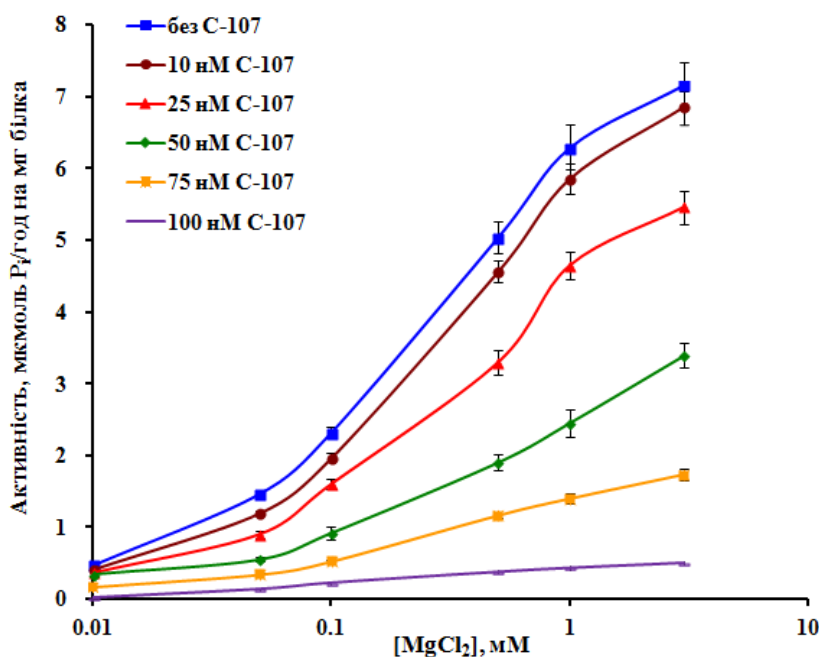


Рис. 5.30. Вплив калікс[4]арену **C-107** у різних концентраціях на залежність питомої ензиматичної активності Na^+, K^+ -АТРази у фракції ПМ клітин міомерія від концентрації MgCl_2 ($M \pm m$; $n = 5$).

Концентрація АТР – 1 мМ.

В усіх випадках у разі внесення до середовища інкубації калікс[4]арену **C-107**, спостерігається зниження активності Na^+, K^+ -АТРази з різним ступенем ефективності.

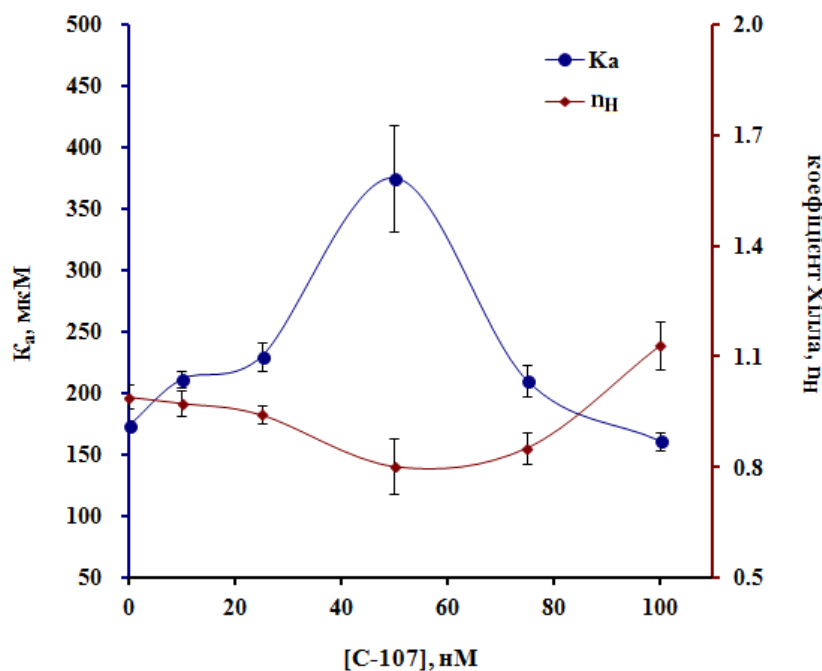


Рис. 5.31. Вплив калікс[4]арену **C-107** на кінетичні параметри (константу активації K_a і коефіцієнт Хілла n_H) дії MgCl_2 на активність Na^+, K^+ -АТРази у фракції ПМ клітин міомерія ($M \pm m$; $n = 5$).

Концентрація [C-107] = 0 мМ – контроль. Концентрація АТР – 1 мМ.

Продемонстровано, що залежність константи активації хлоридом магнію від концентрації калікс[4]арену **C-107** має складний двофазний характер та підвищується до 375 ± 43 мкМ із ростом концентрації калікс[4]арену **C-107** до 50 нМ, при подальшому збільшенні концентрації калікс[4]арену – K_{Mg} знижується до майже контрольного рівня (при концентрації калікс[4]арену **C-107** 100 нМ) (рис. 5.31) ($M \pm m$; $n = 5$). При цьому величина коефіцієнта Хілла n_H практично не змінюється за присутності калікс[4]арену **C-107** у різних концентраціях ($n_H = 0,99 \pm 0,032 - 1,13 \pm 0,065$) ($M \pm m$; $n = 5$).

На відміну від цього, використання різних концентрацій $MgCl_2$ (рис. 5.32) суттєво не впливає на константу гальмування K_i калікс[4]ареном **C-107**.

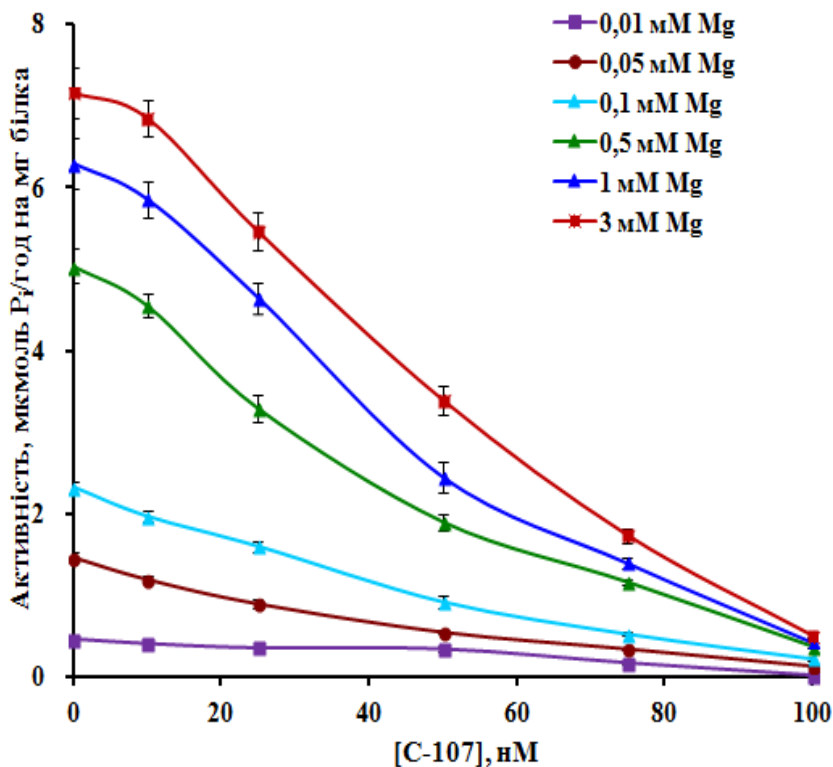


Рис. 5.32. Вплив $MgCl_2$ у різних концентраціях на залежність питомої ензиматичної активності Na^+,K^+ -АТРази у фракції ПМ клітин міометрія від концентрації калікс[4]арену **C-107** ($M \pm m$; $n = 5$).

Концентрація АТФ – 1 мМ.

Значення коефіцієнта Хілла зростає з $1,55 \pm 0,039$ до $2,39 \pm 0,212$, що вказує на зростання позитивної кооперативності дії калікс[4]арену **C-107** на ензим (рис. 5.33) ($M \pm m$; $n = 5$). Тобто в даному випадку зростання концентрації $MgCl_2$ можливо змінює субдиничний склад Na^+,K^+ -АТРази.

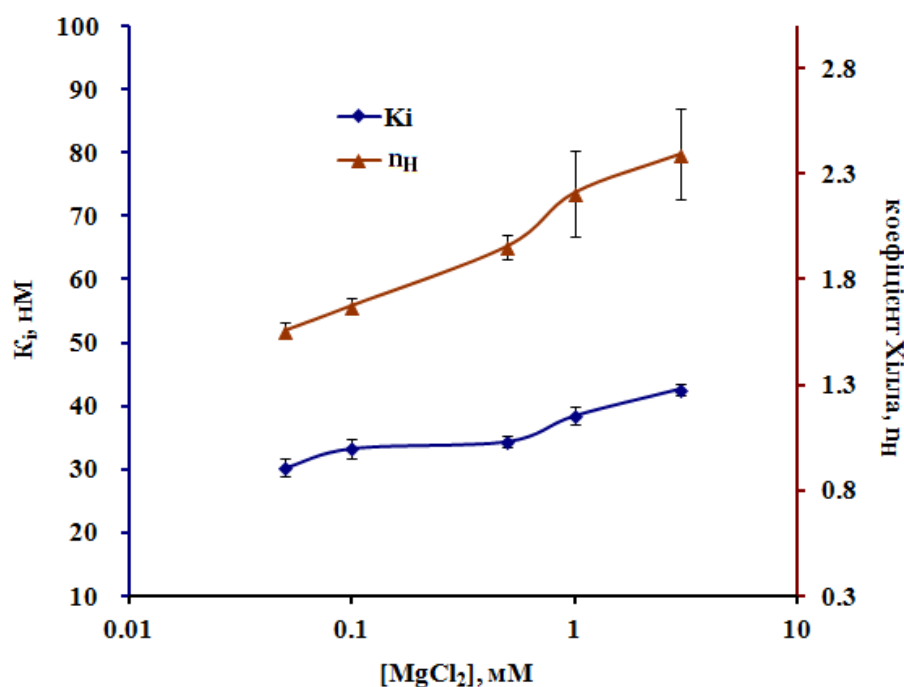


Рис. 5.33. Вплив $MgCl_2$ на кінетичні параметри (константу гальмування K_i і коефіцієнт Хілла n_H) дії калікс[4]арену **C-107** на активність Na^+, K^+ -АТРази у фракції ПМ клітин міомерія ($M \pm m$; $n = 5$).

Концентрація АТР – 1 мМ.

Отже, встановлені взаємні залежності кінетичних характеристик дії калікс[4]арену **C-107** та $MgCl_2$ вказують на складні механізми взаємодії цих речовин з ензимом у досліджуваній модельній системі. Дійсно, іони Mg можуть утворювати хелатні комплекси як з ензимом та АТР, так і з присутньою в середовищі інкубації ЕГТА та і з самим калікс[4]ареном **C-107**. Тому кінетика дії $MgCl_2$ на ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази є сумарним результатом кінетик окремих вказаних взаємодій іонів Mg з АТР, ЕГТА, ензимом, іншими компонентами фракції ПМ та калікс[4]ареном **C-107**.

5.7. Калікс[4]арени С-97 та С-107 підсилюють інгібувальну дію убаїну на активність Na^+, K^+ -АТРази

Зважаючи на те, що калікс[4]арени **С-97** та **С-107** з високою ефективністю інгібували ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази у фракції ПМ, при цьому практично не впливали на активність Mg^{2+} -АТРази, а також беручи до уваги той факт, що у їх присутності збільшується спорідненість Na^+, K^+ -АТРази до убаїну, нам було цікаво з'ясувати як змінюється її активність за умов сукупної дії калікс[4]аренів та убаїну.

Як показали результати експериментів, калікс[4]арени **С-97** та **С-107**, які були використані у концентраціях, що відповідали значенням $I_{0.5}$ (40 та 60 нМ відповідно), суттєво підсилювали гальмівну дію убаїна на питому активність Na^+, K^+ -АТРази у фракції ПМ клітин міометрія. Дійсно, як виявилось, 10 мкМ убаїн пригнічував активність Na^+, K^+ -АТРази в середньому на 49 %, а калікс[4]арени **С-97** та **С-107** – на 47 та 49 % відповідно. У той же час у присутності 40 нМ **С-97** та 60 нМ **С-107** пригнічувальний ефект 10 мкМ убаїну суттєво підвищувався і становив у середньому 82 та 78 % відповідно; натомість 100 мкМ **С-97** та 100 мкМ **С-107** повністю пригнічували активність Na^+, K^+ -АТРази у відсутності убаїну (рис. 5.34).

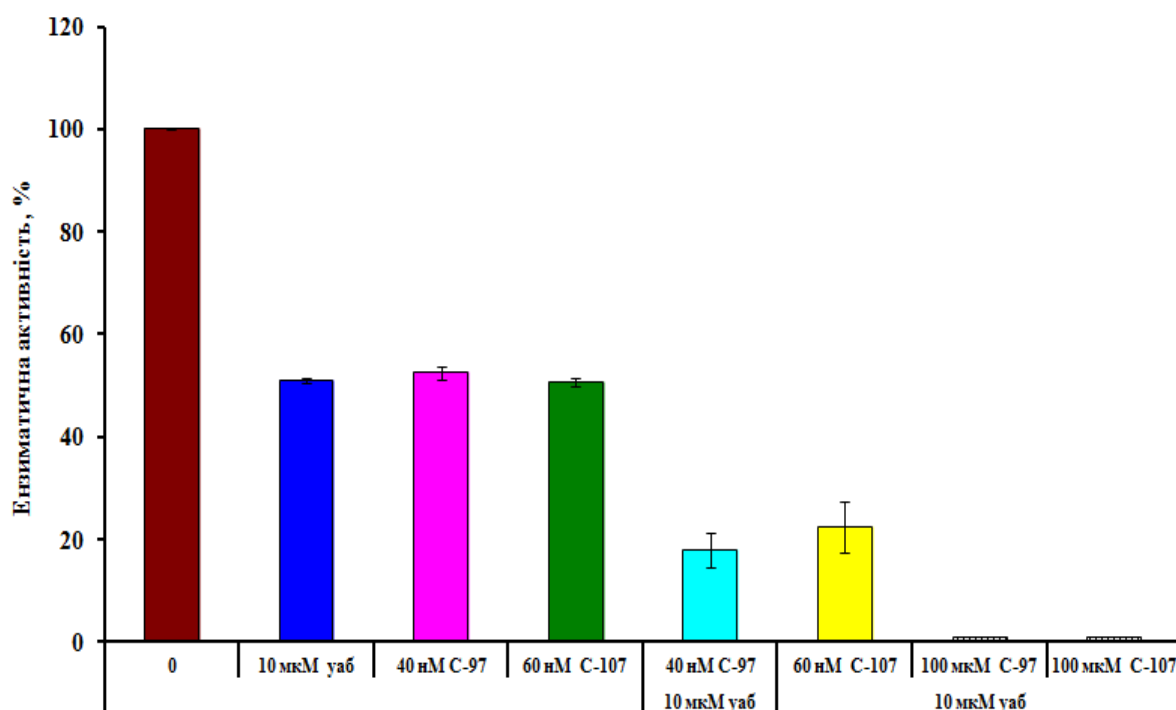


Рис. 5.34. Стимуляція калікс[4]аренами **C-97** та **C-107** інгібувальної дії убаїну на активність Na^+, K^+ -АТРази у фракції ПМ клітин міометрія ($M \pm m$; $n = 6$).

За 100 % (контроль) прийнято значення питомої ензиматичної активності у відсутності убаїну та калікс[4]аренів у середовище інкубації. Значення концентрацій калікс[4]аренів **C-97** та **C-107** були обрані такими, що відповідали відповідним величинам $I_{0,5}$.

Ці дані вказують також на наступне: за умов сукупного використання убаїну з калікс[4]ареном **C-97** чи **C-107** має місце наочний неадитивний ефект у дії цих інгібіторів на Na^+, K^+ -АТРазну активність. Дійсно, якщо кожний з них за зазначених концентраційних режимів гальмує АТРазну активність приблизно на 50 %, то за умов парного використання убаїну з будь-яким із калікс[4]аренів тестується залишкова Na^+, K^+ -АТРазна активність, що становить приблизно 20 % від контрольної величини. Отже, дані, що були одержані, свідчать за те, що калікс[4]арени **C-97** і **C-107** не лише самі по собі гальмують ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази, але й є також активаторами інгібіторного ефекту глікозиду на цей ензим (рис. 5.34).

Отже, ми показали що, високоефективні інгібітори Na^+, K^+ -АТРазної активності калікс[4]арени **C-97** чи **C-107** здатні підсилювати ефект класичного інгібітора натрієвої помпи убаїну, збільшуючи її спорідненість до серцевого глікозиду.

5.8. Порівняльна дія калікс[4]аренів C-97, C-99 та C-107 на активність Na^+, K^+ -АТРази у плазматичній мембрані скоротливих (міометрій) та рухливих (сперматозоїди) клітин.

Відомо, що Na^+, K^+ -АТРази належить важлива роль у забезпеченні функціональної активності скоротливих та рухливих клітин репродуктивної системи, зокрема міоцитів матки та сперматозоїдів [3, 40, 69, 147, 517, 522]. Так, енергія натрієвого градієнта, який створюється Na^+, K^+ -АТРазою, використовується для функціонування $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмінника, локалізованого в плазматичній мембрані клітин міометрія та сперматозоїдів [3, 76, 120, 150]. У структурі Na^+, K^+ -АТРази сперматозоїдів ідентифіковано унікальну $\alpha 4$ субодиницю, інгібування експресії якої призводить до пригнічення їхньої рухливості [522]. Втім, Na^+, K^+ -АТРаза сперматозоїдів відіграє ключову роль не лише у забезпеченні їх рухливості [522], але й здатності до запліднення [147]; Na^+, K^+ -АТРазна активність позитивно корелює з густиною сперми (концентрацією сперматозоїдів в 1 мл еякуляту) [517]. Пригнічення активності Na^+, K^+ -АТРази призводить до астенозооспермії (зменшення рухливості сперматозоїдів), олігозооспермії (зниження густини сперми до рівня менше 60 млн/мл) і навіть азооспермії (відсутності сперматозоїдів в еякуляті). Отже, активність Na^+, K^+ -АТРази може бути важливим діагностичним показником функціонального стану клітин, що досліджувалися (гладеньких м'язів матки та сперматозоїдів).

Зважаючи на отримані нами дані стосовно ефективнішого ніж убаїн пригнічення ензиматичної активності Na^+, K^+ -АТРази ПМ клітин ГМ матки каліксаренами **C-97**, **C-99** та **C-107**, було важливо провести порівняльне

вивчення впливу зазначених каліксаренів на Na^+, K^+ -АТРазну активність у ПМ скоротливих (міометрій) та рухливих (сперматозоїди) клітин.

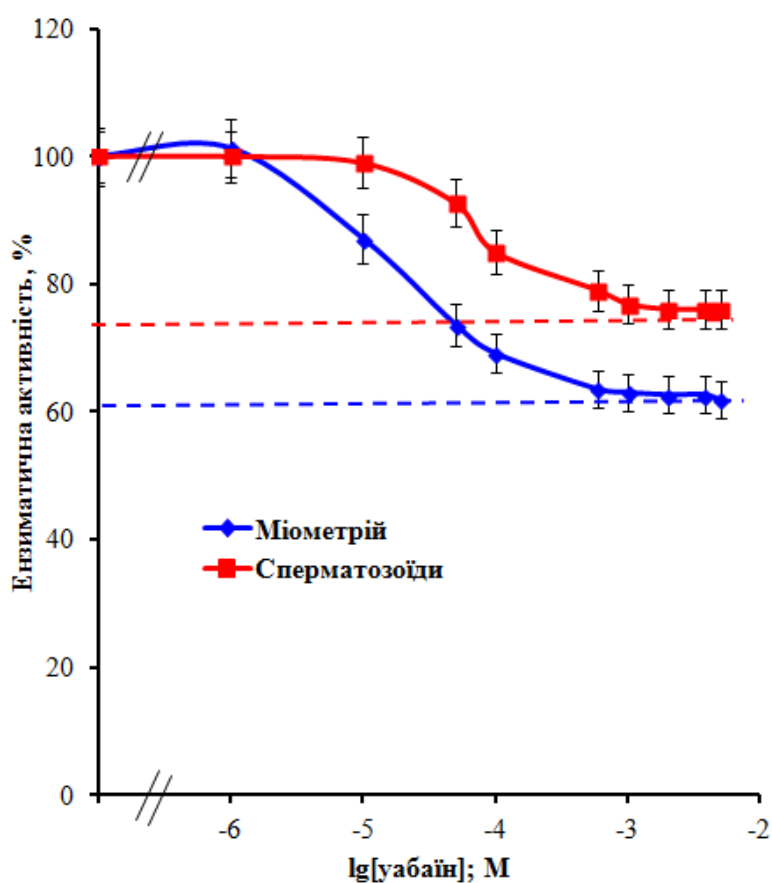


Рис. 5.35. Концентраційні залежності впливу убаїну на $\text{Mg}^{2+}, \text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРазну (“загальну”) активність у суспензії ПМ клітин міометрія та сперматозоїдів ($M \pm m$; $n = 7$).

В обох випадках за 100 % прийнято значення питомої ензиматичної активності за відсутності убаїну у середовищі інкубації („нульова точка”, контроль), а пунктиром вказано рівень „базальної” (убаїн-нечутливої) питомої Mg^{2+} -АТРазної активності.

Як добре відомо, кардіоактивні стероїди убаїн, строфантин та інші є селективними інгібіторами Na^+, K^+ -АТРази. Кардіоглікозиди зв’язуються з білком з позаклітинного зовнішнього боку ПМ клітини. Фосфорилування ензиму і перехід в конформацію Р- E_2 полегшує зв’язування глікозидів. Вважають, що стероїди блокують ензим в стані Р- E_2 і, таким чином, гальмують перехід на рівні конформерів $\text{E}_2 \rightarrow \text{E}_1$ [95, 496, 514].

Як можна бачити (рис. 5.35), убаїн в діапазоні концентрацій $10^{-6} - 5 \cdot 10^{-3}$ М ефективно пригнічує так звану “загальну” Mg^{2+}, Na^+, K^+ -АТРазну активність у фракції ПМ міометрія: при концентрації убаїну $5 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-3}$ М ця активність зменшується до 63 % відносно контролю (за нього приймається так звана „нульова точка”, яка тестується у відсутності інгібітора та характеризується значенням ензиматичної активності $478,3 \pm 23,3$ нмоль P_i /хв на 1 мг білка ($M \pm m$; $n=7$)). Таким чином, абсолютне значення убаїнчутливої Na^+, K^+ -АТРазної активності у ПМ ГМК становить $176,7 \pm 15,0$ нмоль P_i /хв на 1 мг білка ($M \pm m$; $n=7$)). „Залишок” ензиматичної активності, нечутливої до дії убаїну (60 % відносно контролю), свідчить про наявність у ПМ міоцитів так званої „базальної” Mg^{2+} -залежної АТРази ($301,7 \pm 20,0$ нмоль P_i /хв на 1 мг білка ($M \pm m$; $n=7$)). Значення уявної константи $I_{0,5}$ інгібування Na^+, K^+ -АТРази міоцитів матки убаїном складає $21,3 \pm 1,5$ мкМ ($M \pm m$; $n=7$). Аналогічно убаїн дозозалежно та ефективно в діапазоні концентрацій $10^{-5} - 10^{-3}$ М інгібує “загальну” Mg^{2+}, Na^+, K^+ -АТРазну активність у суспензії сперматозоїдів (рис. 5.35) – до 76 % відносно контролю (тестується за відсутності убаїну), ензиматична активність становить $32,6 \pm 3,6$ нмоль P_i /хв на 1 мг білка ($M \pm m$; $n=7$). Величина убаїнчутливої Na^+, K^+ -АТРазної активності у цьому об’єкті досліджень становить $8,6 \pm 0,5$ нмоль P_i /хв на 1 мг білка, убаїн-нечутлива ензиматична активність – так звана „базальна” Mg^{2+} -залежна АТРаза, рівна $24,0 \pm 1,2$ нмоль P_i /хв на 1 мг білка ($M \pm m$; $n=7$). Значення уявної константи $I_{0,5}$ інгібування Na^+, K^+ -АТРази мембрани сперматозоїдів убаїном складає $18,8 \pm 2,3$ мкМ ($M \pm m$; $n=7$)).

Отже, вищенаведені дані (рис. 5.35) вказують на те, що, у випадку клітин міометрія питомий внесок убаїнчутливої Na^+, K^+ -АТРазної активності в „загальну” Mg^{2+}, Na^+, K^+ -АТРазну активність більше, ніж у випадку сперматозоїдів (40 та 24 % відповідно).

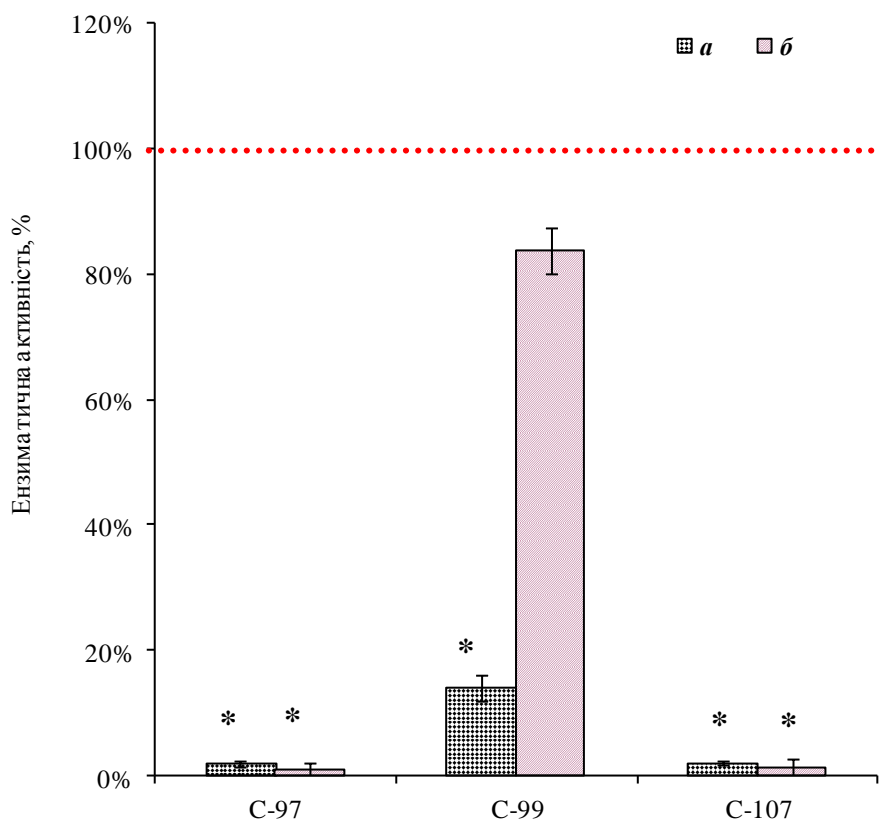


Рис. 5.36. Вплив калікс[4]аренів **C-97**, **C-99** та **C-107** (100 мкМ) на Na^+ , K^+ -АТРазну активність у суспензії ПМ міометрія (**a**) та сперматозоїдів (**б**) ($M \pm m$, $n = 7-10$).

За 100 % прийнято значення питомої ензиматичної активності за відсутності калікс[4]аренів у середовищі інкубації („нульова точка”, контроль);

*/- відмінність щодо контролю є достовірною ($p \leq 0,05$, $M \pm m$, $n = 7-10$)

В подальших експериментах ми порівняли вплив калікс[4]аренів **C-97**, **C-99** та **C-107** на ензиматичну активність Na^+ , K^+ -АТРази ПМ міоцитів матки та сперматозоїдів.

Було знайдено (рис. 5.36), що гальмівний ефект калікс[4]аренів (100 мкМ) на питому ензиматичну активність Na^+ , K^+ -АТРази суспензії ПМ клітин міометрія задовольняє послідовності: **C-97** \approx **C-107** > **C-99**. Дійсно, як можна бачити, найбільш ефективну гальмівну дію на активність Na^+ , K^+ -АТРази виявляють калікс[4]арени **C-97** та **C-107** (майже повне інгібування: зменшення активності до 2-3 % відносно контролю), трохи меншу гальмівну дію демонстрував калікс[4]арен **C-99** (інгібування до 14 % відносно контролю). У випадку

вивчення впливу калікс[4]аренів на ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази суспензії сперматозоїдів ми показали (рис. 5.36), що калікс[4]арени **C-97** та **C-107** також повністю інгібують Na^+, K^+ -АТРазну активність (залишкова активність – 1-2 % відносно контролю), проте калікс[4]арен **C-99**, який є більш гідрофільним, ніж калікс[4]арени **C-97** та **C-107**, практично не впливає на неї, знижуючи ензиматичну активність лише до 80-85 % відносно контрольного значення ($n=7-10$).

Також ми вивчили вплив досліджуваних калікс[4]аренів на питому ензиматичну активність Mg^{2+} -АТРази міометрія та сперматозоїдів (дані не наведені). Було знайдено, що в обох випадках всі калікс[4]арени практично не впливають на “базальну” Mg^{2+} -АТРазну активність (мало місце зменшення активності лише до 90-95 % від контрольного значення).

Таким чином із вищенаведених даних можна зробити наступний висновок: калікс[4]арени **C-97** та **C-107**, що були використані у концентрації 100 мкМ, ефективно (на 97-99 % стосовно контрольного значення) інгібують ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази ПМ міометрія та сперматозоїдів, практично не впливаючи на активність Mg^{2+} -АТРази (гальмівний ефект – лише на 5-10 %). Менш ефективним виявився калікс[4]арен **C-99**, який у концентрації 100 мкМ знижував Na^+, K^+ -АТРазну активність у суспензії ПМ міометрія – на 80-85 %, але вельми слабо - на 15-20 % у випадку суспензії сперматозоїдів, аналогічно не впливаючи на активність Mg^{2+} -АТРази (гальмівний ефект – на 5-8 %).

5.9. Молекулярний докінг взаємодії калікс[4]арену C-107 і його модельних сполук з ліганд-зв'язувальними ділянками Na^+, K^+ -АТРази.

Відповідно до літературних даних слід очікувати, що деякі каліксарени можуть транспортувати катіони металів через біомембрани за механізмом переносників [410] завдяки утворенню міцних комплексів катіонів із залишками α -аміно- та метиленбісфосфонових кислот [156], та вбудовуватися в ліпідні біомембрани, утворюючи канали для транспортування катіонів завдяки

амфільному характеру, обумовленому просторовим розділенням гідрофільних кислотних угруповань та ліпофільного макроциклічного кістяка із алкільними залишками [50, 128, 412]. Також, завдяки гідрофільним залишкам, калікс[4]арен **C-107** може зв'язуватися з аміно-кислотними фрагментами іонтранспортуючих білків [202]. Тобто, калікс[4]арен **C-107**, інгібуючи функціонування натрієвої помпи, може впливати на транссарколемальний іонний обмін в клітинах ГМК.

На теперішній час чітко, експериментально підтверджене уявлення про природу взаємодії між Na^+, K^+ -АТРазою ПМ та її природними лігандами або синтетичними препаратами практично відсутнє. Це зумовлено, в першу чергу, значною утрудненістю у проведенні рентгеноструктурного аналізу Na^+, K^+ -АТРази, оскільки при кристалізації ензим втрачає свою нативну конформацію, стабілізовану в організмі клітинною мембраною. Відносно достовірні експериментальні моделі даного ензиму почали з'являтися нещодавно, із вдосконаленням методів аналізу структур мембранозв'язаних ензимів [378, 389, 452]. Необхідно зауважити, що доступні в базах даних кристалічні структури для Na^+, K^+ -АТРази відносяться до конформації Р-Е₂. При цьому фосфорилування ензиму і перехід в конформацію Р-Е₂ полегшує зв'язування уабаїну. Вважають, що стероїди блокують ензим в стані Р-Е₂ і, таким чином, гальмують перехід на рівні конформерів Е₂→Е₁. Тому дослідження взаємодії калікс[4]арену **C-107** із Na^+, K^+ -АТРазою проводили із структурою ензиму саме в цій конформації. Можливо, що фосфорилування внутрішньо-мембранної частини Na^+, K^+ -АТРази викликає конформаційні зміни ензиму, що сприяє інгібуючому впливу калікс[4]арену на активні внутрішньоклітинні ділянки ензиму.

Реагентами в Na^+, K^+ -залежній АТР-гідролазній реакції є іони Na, K, Mg та АТР. У даній реакції Mg^{2+} діє як кофактор, який зв'язується з регуляторним центром Na^+, K^+ -АТРази, та утворює з ATP^{4-} хелатний комплекс MgATP^{2-} , який слугує істинним субстратом в реакції фосфорилування ензиму (рис. 5.37).

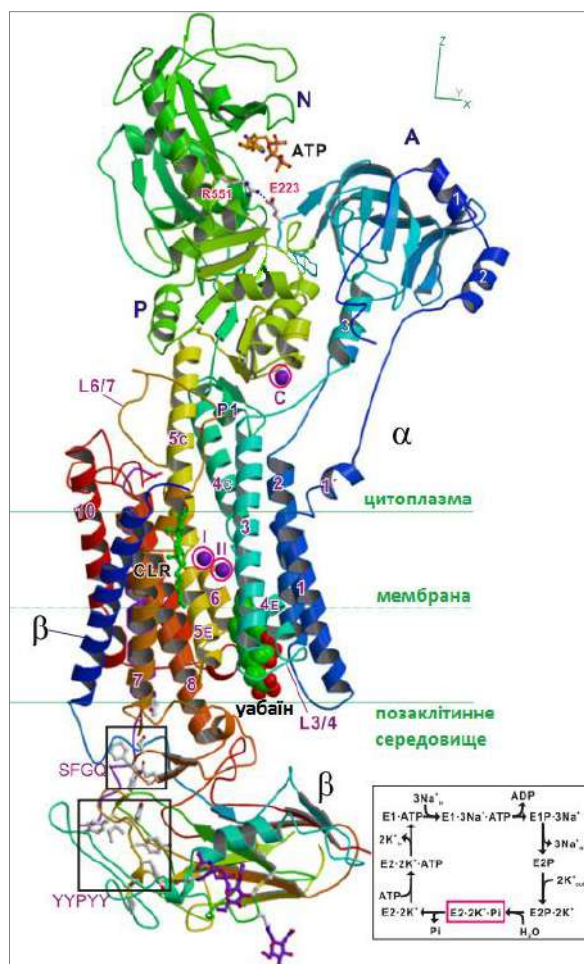


Рис. 5.37. Схема структурної організації Na^+, K^+ -АТРази у комплексі з убаїном та АТР (PDB ID: 3A3Y) [381, 488]. Колір поступово змінюється від N-кінця (синій) до С-кінця (червоний). Зв'язані іони K^+ відмічені символами – I, II і C і обведені колом. А – активаторний домен; N – нуклеотид-зв'язуючий домен; P – фосфорильований домен. α – β – субодиниці Na^+, K^+ -АТРази. L – петлі між спіралями α – субодиниці, які позначені цифрами. У вставці показана спрощена схема Поста-Альбертса.

Раніше нами було показано [113], що калікс[4]арен **C-107** може ефективно утворювати комплекси з АТР у розчинах. Важливо і те, що при стехіометричному комплексоутворенні **C-107** з АТР γ -атом фосфору в молекулі нуклеозидтрифосфату набуває більшої електрофільності внаслідок утворення водневих зв'язків. Молекула калікс[4]арену **C-107** є дицвітеріоном із протонуваними амініними атомами азоту та двома депротонуваними гідроксилами фосфонових фрагментів, тому NH^{2+} групи аміно(2піридил)метил-фосфонових фрагментів молекули **C-107** можуть взаємодіяти із негативно

зарядженими амінокислотними залишками ензиму. Відповідно, РОНгрупи даних фрагментів можуть утворювати комплекс із позитивно зарядженими амінокислотними залишками.

Необхідно відмітити, що ми визначали потенційні сайти взаємодії ензиму із калікс[4]ареном **C-107**. Точна локалізація **C-107** в ліганд-зв'язувальних ділянках ензиму ускладнена у зв'язку з тим, що натрієвий насос – мембрано-зв'язаний ензим і в літературі наведені дані стосовно досить значних переміщень цитоплазматичних доменів АТРаз Р-типу один відносно одного у ензиматичному циклі [489, 528]. Тому ми визначили найбільш вірогідні області взаємодії каліксарену із ензимом, які підтверджуються значеннями мінімальної енергії зв'язування та амінокислотним оточенням ліганд-зв'язувальних ділянок (рис. 5.37).

Калікс[4]арен **C-107** та убаїн мають різну спорідненість по відношенню до Na^+, K^+ -АТРази [22]. Причиною цього може бути відмінність в організації оточення ліганд-зв'язувальних ділянок Na^+, K^+ -АТРази для даних інгібіторів. З даних літератури доступні відомості про можливі місця зв'язування АТР [245] та убаїну [339, 533] на ліганд-зв'язувальних ділянках Na^+, K^+ -АТРази. Отже, виходячи із структурних особливостей калікс[4]арену **C-107**, ми проаналізували отримані методом докінгу дані зв'язування даного калікс[4]арену та його модельних сполук для встановлення механізму дії досліджуваних сполук на роботу ензиму. При цьому, за допомогою методу докінгу визначено можливі місця приєднання (“впадини”) досліджуваних лігандів до ліганд-зв'язувальних ділянок Na^+, K^+ -АТРази (рис. 5.38.А), та досліджено їх взаємодію з рецептором, в результаті був відібраний ряд комплексів із найменшою загальною енергією.

Попереднє визначення найбільш вірогідних місць приєднання калікс[4]арену **C-107** до Na^+, K^+ -АТРази, за отриманими значеннями мінімальної енергії зв'язування, показало, що він може утворювати комплекс із ензимом в областях 1 та 4 (рис. 5.38).

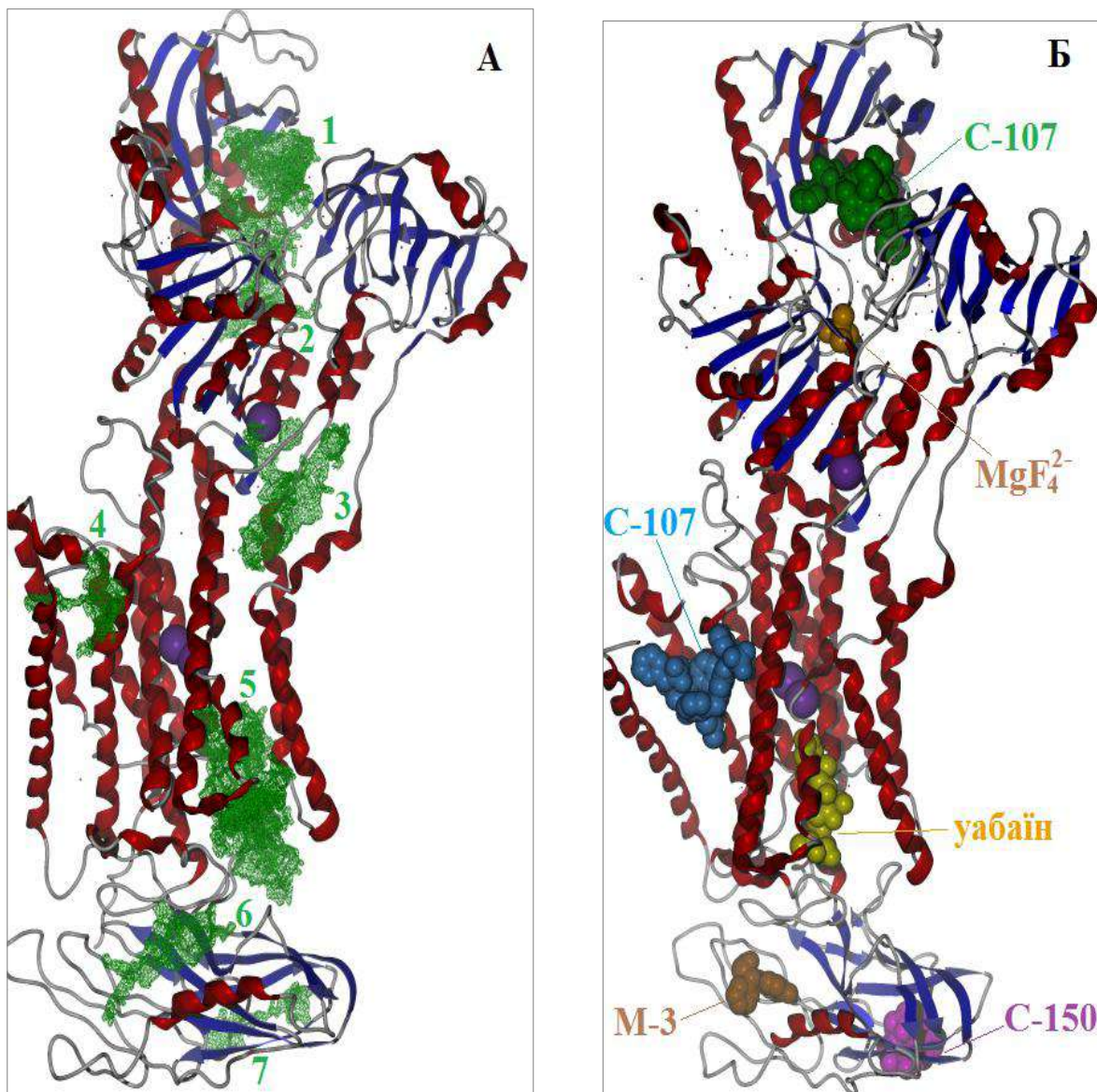


Рис. 5.38. Аналіз димера (α - та β -субодиниця) Na^+, K^+ -АТРази ПМ на наявність впадин (cavities) - функціонально активних ділянок, які виділені зеленим кольором: А – впадини; Б - найбільш вірогідні місця зв'язування різних лігандів функціонально-активними ділянками Na^+, K^+ -АТРази, отримані методом докінга (для C-107, C-150 та M-3).

До суттєвих структурних особливостей Na^+, K^+ -АТРази можна віднести організацію додаткової ділянки зв'язування субстрату, віддаленої від активного центру [118, 488]. Дані про Na^+, K^+ -АТРази свідчать також про наявність, поруч з активним центром, залишків амінокислот, що не беруть безпосередню участь у механізмах каталізу, але просторово закривають доступ до центру зв'язування субстрату [192]. У молекулі Na^+, K^+ -АТРази N-домен менше ($\sim 20^\circ$) повернутий

до А-області на відміну від Ca^{2+} -помпи саркоплазматичного ретикулуму, і між ними є тільки один зв'язок: сольовий місток між Arg551 в N-області і Glu223 в А-доміні [133]. Залишок Arg551, як очікується, взаємодіє з β -фосфатом АТР, і для прискорення відкриття реакційної голівки ензиму необхідно розірвати зв'язок із АТР/АДР. Даний процес може бути ключовою подією, необхідною для переходу у стан Е1. Враховуючи здатність **C-107** проникати через мембрану не виключена можливість його взаємодії із цитоплазматичними фрагментами ензиму.

Так, нами встановлено, що **C-107** із великою вірогідністю може утворювати комплекс із ензимом в області 1 (між N- та А-доменами Na^+, K^+ -АТРази), близько до сольового містка між Arg551 в N-області і Glu223 в А-доміні (рис. 5.39). Таким чином, взаємодія **C-107** із амінокислотними залишками в даній області може впливати на розташування субстрату і гідроліз ковалентного ензимсубстратного інтермедіату. При цьому встановлено, що у взаємодії із фосфонатними групами калікс[4]арену можуть бути задіяні залишки Lys212.A, Arg240.A і Arg551.A. NH^{2+} групи аміно-фосфонових фрагментів молекули С-107 взаємодіють із залишками Glu223.A і Glu489.A (А, у позначеннях амінокислотних залишків, означає α -домен, а Б – відповідно β -домен ензиму) (рис. 5.38). Калікс[4]аренові фрагменти облаштовуються у простір, утворений залишками Lys212.A, Pro224.A, Gln225.A, Met380.A, Gly449.A, Asp450.A, Ala451.A, Ser452.A та Ser484.A. При цьому фенольні кільця каліксаренової чаші знаходяться у гідрофобній та стекінг взаємодії із залишками ароматичних амінокислот – Phe482.A, Tyr488.A та Tyr542.A.

При здійсненні комп'ютерного моделювання було отримано значення вільної енергії зв'язування та різних типів взаємодій, які характеризують взаємодію калікс[4]арену **C-107** з ліганд - зв'язуючою ділянкою Na^+, K^+ -АТРази в області зв'язування 1 (табл. 5.5).

Таблиця 5.5. Величини загальної вільної енергії зв'язування (відносні одиниці ОФ, E_{score}) при різних типах взаємодій калікс[4]арену С-107 з ліганд - зв'язуючою ділянкою Na^+, K^+ -АТРази в області зв'язування 1.

C-107	Значення	MolDock Score, E_{score}
Загальна енергія		-109.776
Взаємодія із зовнішнім лігандом		-154,824
Білок - ліганд взаємодія		-154,367
Стерична взаємодія (по PLP)	-145,417	-145,417
Стерична взаємодія (по LJ12-6)	-0,376	
Водневі зв'язки	-7,088	-7,088
Водневі зв'язки (непрямі)	-8,949	

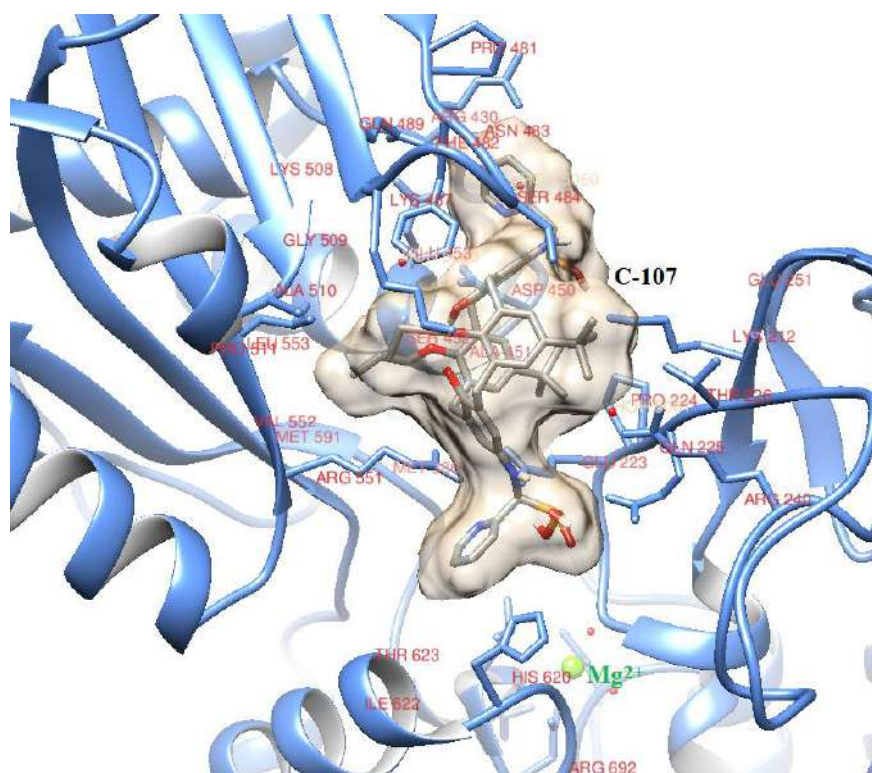


Рис. 5.39. Амінокислотне оточення комплексу калікс[4]арен “C-107 – Na^+ , K^+ -АТРази”, в області зв’язування 1.

Також нас цікавило, які саме взаємодії приймають участь при утворенні комплексу калікс[4]арену **C-107** з ліганд - зв’язуючою ділянкою Na^+ , K^+ -АТРази в області зв’язування 1. На рис. 5.40 ідентифіковані гідрофобні (А) та електростатичні взаємодії (Б).

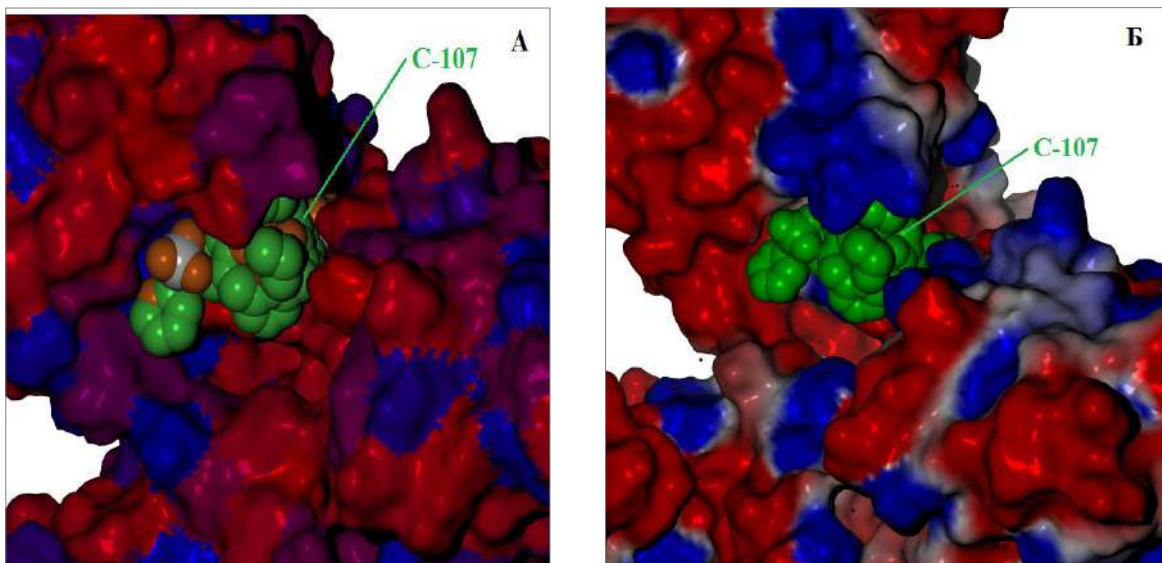


Рис. 5.40. Ідентифікація гідрофобних (А) та електростатичних (Б) взаємодій калікс[4]арену C-107 з ліганд - зв'язуючою ділянкою Na^+, K^+ -АТРази в області зв'язування 1. Зони гідрофобних (червоний) і гідрофільних (синій) властивостей ензиму. Та відповідно негативно (синій) та позитивно (червоний) заряджені зони ензиму.

Область 4 знаходиться в тій частині молекули Na^+, K^+ -АТРази, де присутній сегмент, пов'язаний з трансмембранною спіраллю М5 і петлею L6/7 (рис. 5.38), що зв'язує спіралі М6 і М7 (L6/7), який може рухатися під час реакційного циклу і впливати на спорідненість до іонів, які приймають участь у реакції. При цьому в конформації бічного ланцюга Asn783 фіксується водневим зв'язком з Tyr854 на вигнутій частині спіралі М7. Спіраль М5 α -субодиниці також частково розкручена і вигнута. Цей вигин, причиною якого є Pro785, має вирішальне значення для створення простору та забезпечення здатності карбоксилу Thr799 основного ланцюгу для координування K^+ . Спіраль М7 α -субодиниці стабілізується водневим зв'язком між Tyr44 на β -субодиниці з карбоксилем Gly855 α -субодиниці.

Встановлено, що у взаємодії із фосфонатними групами каліксарену можуть бути задіяні залишки Arg28.В і Arg848.А. NH^{2+} групи аміно-фосфонових фрагментів молекули C-107 взаємодіють із залишками Glu847.А і Glu1020.А.

Калікс[4]аренові фрагменти облаштовуються у простір, утворений залишками Trp33.Б, Ile36.В, Tyr40.Б, Tyr44.Б, Val298.А, Phe301.А, Leu302.А, Ser851.А, Tyr854.А, Gly855.А та Gln856. А. При цьому каліксаренова чаша розміщується у гідрофобному кластері, утвореному залишками ароматичних амінокислот – Phe37.Б, Phe39.Б, Tyr40.Б, Tyr44.Б, Phe301.А та Tyr854.А. Дані залишки можуть утворювати гідрофобні та стекінг-взаємодії із фенольними кільцями каліксаренової чаші (рис. 5.41).

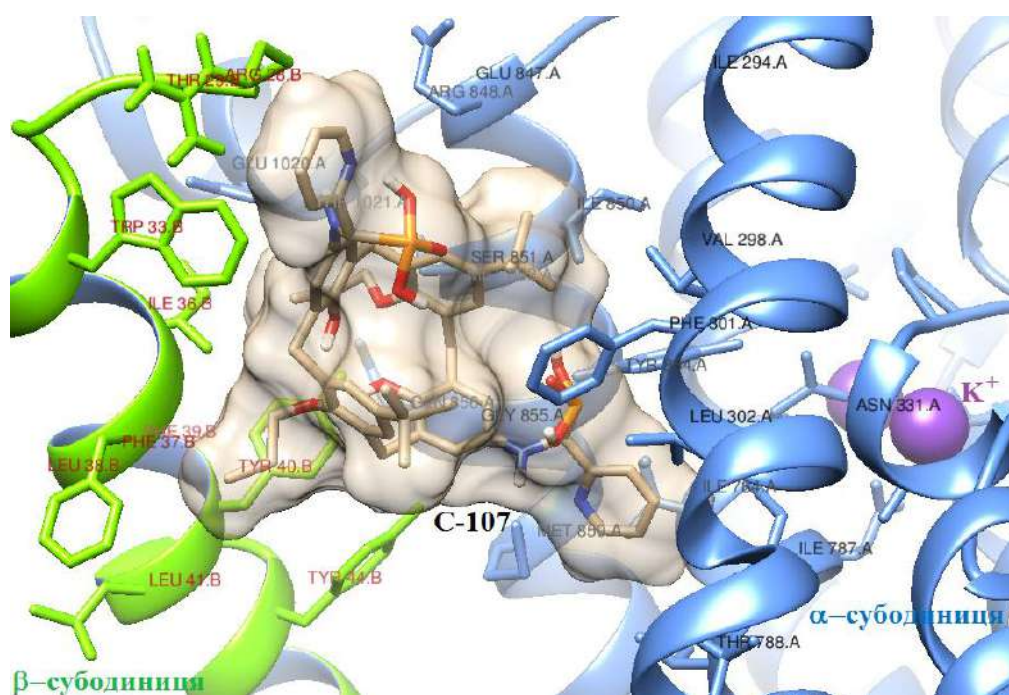


Рис. 5.41. Амінокислотне оточення комплексу каліксарен C-107 – ензим, в області зв'язування 4.

Необхідно відмітити, що в області 4 молекула калікс[4]арену формує стекінг-зв'язки із залишками ароматичних амінокислот α - та β -субодиниці одночасно. Зокрема, калікс[4]арен C-107 взаємодіє із Tyr44.Б бічного ланцюга β -субодиниці.

Очевидно, що зв'язування молекули калікс[4]арену C-107 в області, наближеній до даного сегменту, може викликати порушення конформаційної рухливості даного сегменту, і таким чином, впливати на реакційний цикл ензиму та спорідненість до іонів, які приймають участь у реакції, що підтверджується нашими експериментальними даними [113]. При цьому

утворення комплексу калікс[4]арену **C-107** із ензимом у даній області може викликати конформаційні зміни структури ензиму, що, в свою чергу, може також пояснити вплив калікс[4]арену на вірогідність підвищення спорідненості убаїну до ензиму, оскільки сайт зв'язування убаїну з помпою знаходяться неподалік (рис. 5.37.Б), кільце лактона убаїну знаходиться близько до частково розкрученої M4 спіралі α -субодиниці, а залишок рамнози взаємодіє з L7/8 петлею α -субодиниці [532].

При здійсненні комп'ютерного моделювання було отримано значення загальної вільної енергії зв'язування та різних типів взаємодій, які характеризують взаємодію калікс[4]арену **C-107** з ліганд - зв'язуючою ділянкою Na^+, K^+ -АТРази в області зв'язування 1 (таб. 5.6).

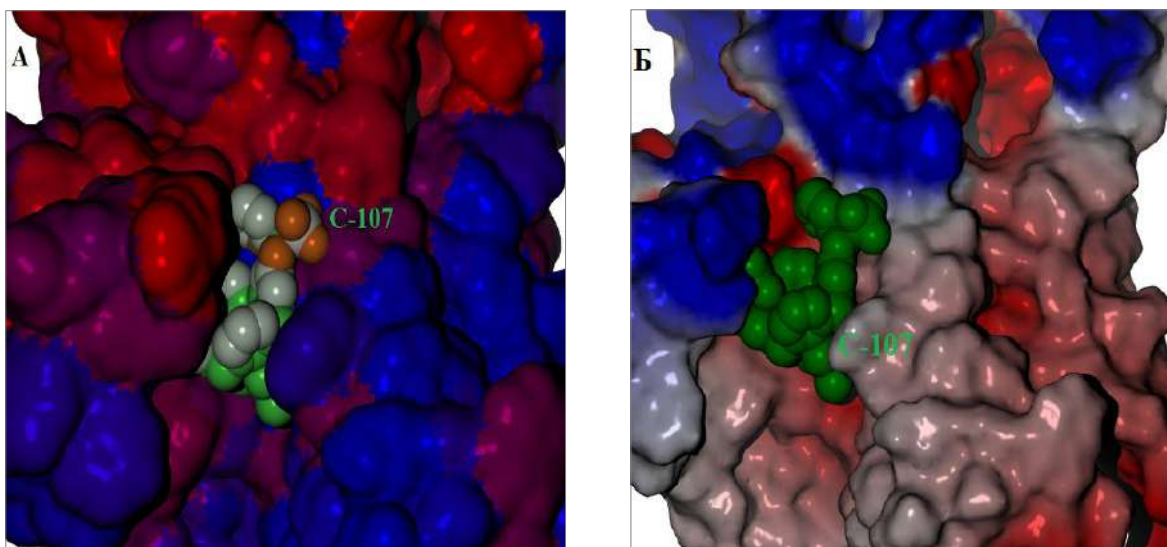
Таблиця 5.6. Величини загальної вільної енергії зв'язування (відносні одиниці ОФ, E_{score}) при різних типах взаємодій калікс[4]арену C-107 з ліганд - зв'язуючою ділянкою Na^+, K^+ -АТРази в області зв'язування 1.

C-107	Значення	MolDock Score , E_{score}
Загальна енергія		-152,537
Взаємодія із зовнішнім лігандом		-155,125
Білок - ліганд взаємодія		-155,227
Стерична взаємодія (по PLP)	-153,188	-153,188
Стерична взаємодія (по LJ12-6)	-10,890	
Водневі зв'язки	-1,926	-1,926
Водневі зв'язки (непрямі)	-5,804	

Також для порівняння із дослідженням області 1 ми провели визначення взаємодій, які приймають участь при утворенні комплексу калікс[4]арену **C-107**

з ліганд - зв'язувальною ділянкою Na^+, K^+ -АТРази в області зв'язування 4. На рис. 5.42, ідентифіковані гідрофобні (А) та електростатичні (Б) взаємодії.

Отже, як показують результати докінг-аналізу взаємодії калікс[4]арену **C-107** із ліганд - зв'язувальною ділянкою ензиму, в переважній більшості випадків спостерігається гідрофобний контакт між ліпофільною макроциклічною структурою калікс[4]арену і аліфатичними або ароматичними бічними ланцюгами амінокислотних залишків ензиму.



*Рис. 5.42. Гідрофобні (А) та електростатичні (Б) взаємодії калікс[4]арену **C-107** з ліганд - зв'язуючою ділянкою Na^+, K^+ -АТРази в області зв'язування 4. Зони гідрофобних (червоний) і гідрофільних (синій) властивостей ензиму. Та відповідно негативно (синій) та позитивно (червоний) заряджені зони ензиму.*

На противагу цьому, інша частина молекули **C-107** - гідрофільні кислотні залишки, контактують із позитивно- та негативно зарядженими R-групами амінокислот ензиму. При цьому, також відмічено стекінг-взаємодію фенольних фрагментів макроциклічної структури **C-107** з ароматичними бічними ланцюгами залишків. В результаті відбувається стабілізація конформації калікс[4]арену у ліганд-зв'язуючих кишнях ензиму.

Також були досліджені міжмолекулярні водневі зв'язки у системі “калікс[4]арен – білок”. Найбільш характерним є водневий зв'язок, в якому беруть участь фосфатна та аміногрупа бічних залишків калікс[4]арену. Менш

характерні водневі зв'язки, в яких беруть участь інші атоми бічних залишків калікс[4]арену. Для каліксаренової чаші водневі зв'язки з атомами білка не характерні.

Таким чином отримані нами результати комп'ютерного моделювання відповідають експериментальним даним стосовно здатності калікс[4]арену впливати на ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази.

Також нами було проведено комп'ютерне моделювання взаємодії модельних фрагментів калікс[4]арену **C-107** (**C-150** та **M-3**) із ліганд-зв'язувальними ділянками Na^+, K^+ -АТРази (рис. 5.38).

Встановлено, що **C-150** з найбільшою вірогідністю може взаємодіяти із ензимом в області скупчення ароматичних залишків β - субодиниці (область 7), яка знаходиться у позаклітинному боці, що добре корелює із особливістю структури **C-150**, яка являє собою гідрофобну тетрафенольну «корзину» (рис. 5.38 А). Необхідно відмітити, що місце зв'язування даного модельного фрагменту істотно відрізняється від області зв'язування калікс[4]арену **C-107**, і фактично знаходиться в області білку, яка не містить функціонально важливих амінокислотних залишків. Що добре підтверджується отриманими експериментальними результатами про практичну відсутність впливу **C-150** на роботу ензиму.

Модельний фрагмент **M-3**, як показують результати комп'ютерного моделювання, також може зв'язуватися з амінокислотними залишками ензиму на позаклітинному боці мембрани (область 6) у зоні між α – та β – субодиницями (рис. 5.38 А). Показаний експериментально незначний вплив фрагменту **M-3** за концентрації $4 \cdot 10^{-4}$ М (~15 % інгібувальний ефект) може пояснюватися зв'язуванням даного фрагменту у невеликій впадині із амінокислотними залишками білку в області зв'язування 6 (рис. 5.38 Б) неподалік від області, де спіраль β -субодиниці утворює численні зв'язки з петлею, яка зв'язує спіралі **M7** і **M8** (**L7/8**) α -субодиниці (рис. 5.37). Для даної області характерна комплексна взаємодія α і β субодиниць. При цьому, β -

субодиниця модулює функціональні властивості Na^+, K^+ -АТРази, в тому числі спорідненість до катіонів і захоплення K^+ [533].

Отже, результати докінгу калікс[4]арену **C-107** в ліганд-зв'язувальних ділянках Na^+, K^+ -АТРази свідчать про те, що цей калікс[4]арен може розміщуватися у просторі декількох областей ліганд-зв'язувальних ділянок ензиму (рис. 5.38). При цьому встановлені деякі особливості у взаємодії ліганду з ензимом. Зокрема, важливу участь у взаємодії каліксаренової чаші **C-107** із ензимом відіграють гідрофобні (стеричні) взаємодії. Тобто залишки ароматичних амінокислот «фіксують» калікс[4]арен в області зв'язування із білком. В той же час залишки негативно та позитивно заряджених амінокислот формують водневі зв'язки із NH_2^+ групами аміно-фосфонових фрагментів та атомами кисню метиленбісфосфонатних фрагментів калікс[4]арену **C-107**. Таким чином гідрофільні фрагменти калікс[4]арену задають “вектор напрямку” у якому фіксується молекула **C-107** в області взаємодії із ензимом.

Результати нашого дослідження демонструють особливості застосування макроциклічної платформи для цілеспрямованого конструювання інгібіторів активності Na^+, K^+ -АТРази. Перевагою таких макроциклічних інгібіторів може бути можливість введення в їхню структуру біоізостеричних груп, певним чином орієнтованих у просторі і здатних, в окремих випадках, суттєво підвищувати спорідненість інгібітора до ензиму. Очевидно, наявність гідрофобної платформи функціоналізованих калікс[4]аренів може сприяти закріпленню їх на гідрофобних ділянках у центрі зв'язування субстрату. Калікс[4]арен **C-107** є ефективним інгібітором Na^+, K^+ -АТРази ПМ міометрія, що можна пояснити додатковою фіксацією фосфонатних залишків та гідрофобним контактом макроциклічної платформи. Очевидно, що у взаємодії **C-107** із ліганд - зв'язуючим ділянками Na^+, K^+ -АТРази важливу роль відіграють гідрофобні зв'язки.

Таким чином механізм дії калікс[4]арену **C-107** на Na^+, K^+ -АТРази відрізняється від дії убаїну. Враховуючи складну структуру даної АТРази, яка у біологічній мембрані складається із двох спарених α і β субодиниць, **C-107**

скоріше за все може не тільки зменшувати спорідненість іонів Na до натрієвої помпи, а також безпосередньо впливати на макроструктуру Na⁺,K⁺-АТРази, на відміну від дії убаїну, що фактично підтверджується більшою інгібуючою дією калікс[4]арену **C-107** у порівнянні із убаїном [22].

Отже, у цій роботі із використанням методів докінг-аналізу проведено комп'ютерне моделювання міжмолекулярних взаємодій, характерних для комплексів “ліганд (калікс[4]арен **C-107** та модельні сполуки) – рецептор (ліганд-зв'язуючі ділянки Na⁺,K⁺-АТРази)”. На основі одержаних результатів проаналізовані амінокислотні залишки, які взаємодіють з даними лігандами, і досліджено тип їх взаємодій.

5.10. Порівняльне дослідження дії калікс[4]арену C-99 та убаїну на механокінетику процесу «скорочення-розслаблення» ГМ саесум щурів.

В фізіологічних умовах головним індуктором скорочень ГМ є позаклітинний Ca²⁺, зростання концентрації якого в міоцитах може спричинятися через потенціал- та рецепторкеровані кальцієві канали [324].

Відповідно ми вивчили вплив убаїну та калікс[4]арену **C-99** на скоротливі відповіді гладеньком'язових препаратів саесум щурів у випадках активації проведення збуджуючого сигналу по шляхам електро- та фармакомеханічного спряження збудження-скорочення.

Наведені нижче результати отримані у творчій співпраці з д.б.н. О.В. Цимбалюк.

Класичною моделю у вивченні ефективності електромеханічного шляху спряження при скороченні ГМ є гіперкалієва контрактура: фізіологічний розчин зі збільшеною (за ізотонічних умов) концентрацією іонів K⁺ викликає деполяризацію ПМ ГМК і, як наслідок, вхід в міоцити позаклітинного Ca²⁺ через потенціалкеровані Ca²⁺-канали [324].

Як ми показали раніше, у випадку ПМ ГМК калікс[4]арен **C-99** ефективно (I_{0.5} = 98±8 нМ) інгібував ензиматичну активність убаїнчутливої

Na⁺,K⁺АТРази ($I_{0,5} = 21 \pm 5$ мкМ), не впливаючи при цьому на активність “базальної” Mg²⁺-АТРази ($M \pm m$; $n = 5$). Відповідно логічним було припущення щодо можливої односпрямованості впливу убаїну та зазначеного калікс[4]арену й на параметри скоротливої активності ГМ.

Саме тому ми вивчили в порівняльному аспекті зміни механокінетичних параметрів скоротливих відповідей ГМ саесит при калієвій деполяризації за умов використання убаїну та калікс[4]арену **C-99** ($M \pm m$; $n = 6 - 7$) (рис 5.43).

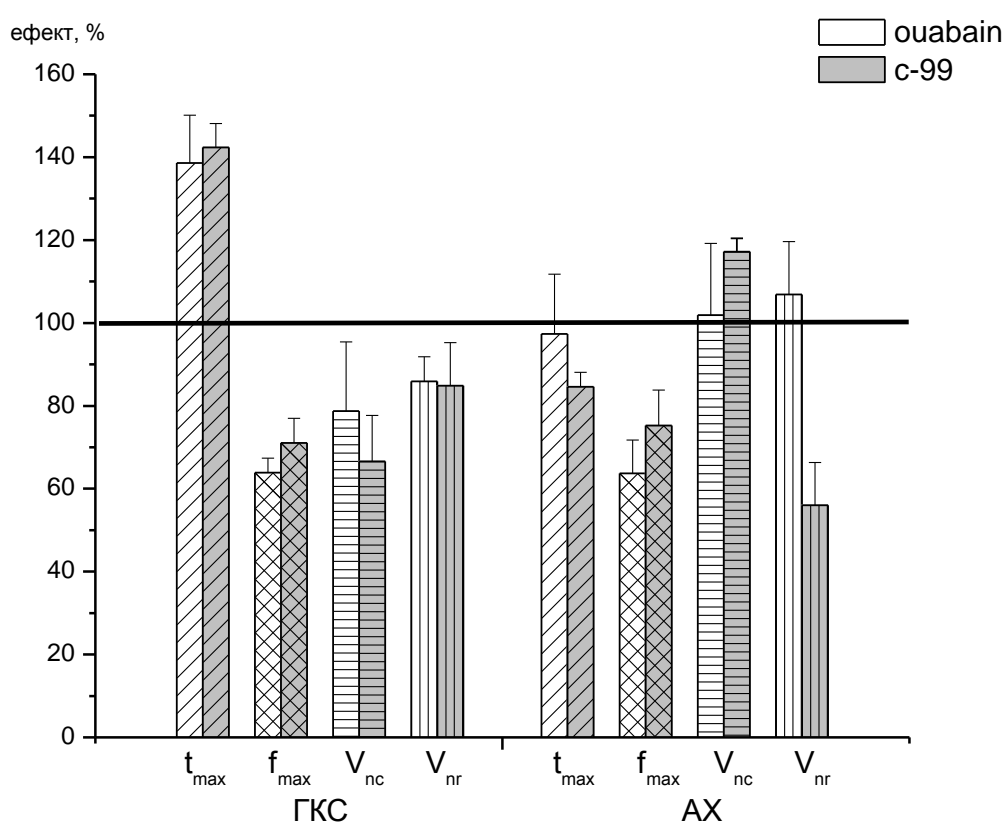


Рис. 5.43. Дія калікс[4]арену **C-99** та убаїну (у % порівняно з контролем, прийнятим за 100 %) на ізометричне скорочення ГМ саесит, викликаних аплікацією гіперкалієвого розчину (ГКР, 80 мМ) та ацетилхоліну (АХ, 10 мкМ) в нормальному розчині Кребса.

Тут: t_m – час досягнення амплітудного значення сили скорочення, f_m – амплітуда скорочення, V_{nc} - максимальна нормована швидкість фази скорочення, V_{nr} - максимальна нормована швидкість фази розслаблення.

Аплікація гіперкалієвого розчину (80 мМ) після 30 хв попередньої інкубації препаратів в розчині Кребса з убаїном (10 мкМ) супроводжувалась вірогідним зниженням амплітуди скорочень f_m у середньому на 30 – 40 % порівняно з контролем, прийнятим за 100 %. В аналогічних умовах калікс[4]арен **C-99** (10 мкМ) спричиняв вірогідне зниження амплітуди скорочень приблизно на таку ж саму величину - на 25 – 35 % відносно контролю. Що ж стосується часу досягнення t_m амплітудного значення сили скорочення f_m , то цей параметр вірогідно збільшувався стосовно контролю в середньому на 30 – 50 % у випадку дії обох речовин ($P \leq 0,05$). В умовах дії убаїну і калікс[4]арену **C-99** значення нормованих максимальних швидкостей V_n у випадку фаз скорочення та розслаблення зменшувались порівняно з контролем. Так, середнє значення максимальної нормованої швидкості скорочення V_{nc} у випадку дії убаїну та калікс[4]арену **C-99** зменшувалось на 20 - 30 % (відміни були вірогідними щодо контролю, $P \leq 0,05$). Середнє ж значення максимальної нормованої швидкості розслаблення V_{nr} зменшувалось на 10 - 20 % як під дією убаїну, так і калікс[4]арену **C-99** ($P \leq 0,05$) (рис. 5.42).

Одержані результати добре узгоджуються з даними літератури, за якими убаїн пригнічував скоротливі відповіді за умов аплікації розчинів з підвищеною концентрацією іонів K^+ у випадку гладеньком'язових препаратів ileum та taenia coli мурчаків [307, 383, 450].

Також здійснювали перевірку можливої модифікації убаїном та калікс[4]ареном **C-99** рецепторкерованих механізмів регуляції внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca^{2+} в ГМ саесум щурів. З цією метою реєстрували скорочення препаратів під дією агоніста мускаринових рецепторів ацетилхоліну (10^{-5} М) (рис. 5.43).

Як було встановлено, обидві досліджувані речовини справляють вірогідний пригнічуючий вплив на амплітуду початкового фазного компоненту ацетилхолінових скорочень. Під дією калікс[4]арену **C-99** спостерігалось вірогідне пригнічення фазного компоненту, тоді як амплітуда тонічного компоненту залишалась на рівні контрольних значень. У випадку убаїну було

отримано пригнічення одного порядку обох компонентів ацетилхолін-викликаного скорочення. Такі зміни співвідношення фазного і тонічного компонентів ацетилхолінових скорочень зумовили відповідні зміни в кінетиці фаз розслаблення.

У досліджах по вивченню скоротливої активності препаратів саесум, спричиненої ацетилхоліном (10 мкМ) в нормальному розчині Кребса (рис. 5.43), було встановлено, що убаїн (10 мкМ) та калікс[4]арен **C-99** (10 мкМ) вірогідно стосовно контролю знижують амплітуду скорочень f_m відповідно на 20 - 40 % ($P \leq 0,05$). Що ж стосується часу досягнення t_m амплітудного значення сили скорочення f_m , то цей параметр у випадку дії убаїну практично не змінювався стосовно контролю, але мав тенденцію до зменшення (в середньому – на 10 -15 %) у випадку дії калікс[4]арену **C-99**. При порівнянні нормованих максимальних швидкостей V_{nc} фаз скорочення в контролі та за умови модифікації м'язів калікс[4]ареном **C-99** було виявлено, на відміну від результатів експериментів з убаїном, вірогідне зростання цього показника на 15 - 20 % ($P \leq 0,05$). В той же час, нормовані максимальні швидкості V_{nr} фази розслаблення під дією калікс[4]арену **C-99** вірогідно зменшувались – в середньому на 30 - 50 % ($P \leq 0,05$), а в присутності убаїну залишались практично на контрольному рівні.

Отже, убаїн (10 мкМ) та калікс[4]арен **C-99** (10 мкМ) вірогідно пригнічували амплітуду скоротливих відповідей індукованих як калієвою деполяризацією, так і аплікацією ацетилхоліну. Виявилось, що за деякими механокінетичними показниками убаїн та калікс[4]арен **C-99** як в якісному, так і в кількісному відношенні, односпрямовано змінюють скоротливі відповіді, які були викликані гіперкалієвою деполяризацією та аплікацією ацетилхоліну в нормальному та номінально безкальцієвому розчині Кребса. Втім, у випадку скорочень, індукованих ацетилхоліном, вплив ефекторних речовин на максимальну нормовану швидкість розслаблення ГМ V_{nr} суттєвим чином відрізняється: ефективне гальмування цієї швидкості спостерігається в присутності калікс[4]арену **C-99**, тоді як за наявності убаїну цей показник

залишається на рівні контролю. В цілому ж дані, які були одержані, дають підставу припускати, що дія високоефективного інгібітора Na^+, K^+ -АТРази ПМ калікс[4]арену **C-99** на механокінетику ізометричних скорочень ГМ саесум є подібною до дії убаїну.

В наступних експериментах [109] було встановлено, що в умовах попереднього повного блокування натрієвої помпи убаїном (100 мкМ) калікс[4]арен C-99 (100 мкМ) спричиняє активацію спонтанних скорочень гладеньких м'язів. Також виявлено, що цей калікс[4]арен в умовах попередньої дії убаїну змінює механокінетичні параметри скоротливих реакцій на деполяризацію плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин гіперкалієвим розчином (80 мМ) і на аплікацію агоніста мускаринових холінорецепторів ацетилхоліну (10 мкМ). Виявлено, що калікс[4]арен C-99 не змінює мобілізацію іонів Ca^{2+} із саркоплазматичного ретикулула.

Результати, викладені у розділі, опубліковано в наступних роботах: [9, 15-17, 19, 22, 28, 29, 31, 32, 64, 111, 449, 501, 504, 506].

РОЗДІЛ 6. ДОСЛІДЖЕННЯ ДІЇ КАЛІКС[4]АРЕНІВ НА НЕЕНЗИМАТИЧНИЙ ГІДРОЛІЗ АТР

При виконанні досліджень ми звернули увагу на те, що калікс[4]арен **C-107** має цікаву здатність – гідролізувати АТР у відсутності субклітинних мембранних структур у середовищі інкубації (процес гідролізу нуклеозидтрифосфату тестувався за звільненням одного з продуктів зазначеної реакції – неорганічного фосфату P_i).

Зважаючи на дані літератури, які свідчать, що деякі каліксарени здатні каталізувати реакцію гідролізу АТР подібно до ензимів [485], ми намагалися дослідити дію калікс[4]арену **C-107** на неензиматичний гідроліз АТР.

6.1. Гідроліз АТР, який стимулюється деякими калікс[4]аренами.

Для перевірки можливості неензиматичного гідролізу АТР ми досліджували 8 каліксаренових сполук, які використовували у концентрації 100 мкМ. Було показано, що найбільш ефективно стимулює неензиматичний гідроліз АТР калікс[4]арен **C-107** за умов використання середовища інкубації, яке містило 1 мМ АТР та 3 мМ $MgCl_2$ (температура – 37 °С) (дані не наведено). Тому у подальших дослідженнях ми вивчали дію саме калікс[4]арену **C-107**.

Важливо відзначити, що при проведенні цих дослідів нами були прийняті до уваги три контрольні проби на вміст неорганічного фосфату P_i у середовищі інкубації: суто середовище інкубації (за відсутності в ньому АТР та **C-107**); середовище інкубації з АТР; середовище інкубації з **C-107**. Ми показали, що при вказаних вище концентраційних умовах з урахуванням відповідних контролів рівень гідролізу АТР, що був індукований калікс[4]ареном **C-107**, становив $17,3 \pm 1,3$ нмоль P_i за 20 хв. інкубації; сукупний же контрольний рівень вивільнення неорганічного фосфату складав не більше 8-9 нмоль P_i за 20 хв. інкубації ($M \pm m$; $n = 6$) (рис. 6.1).

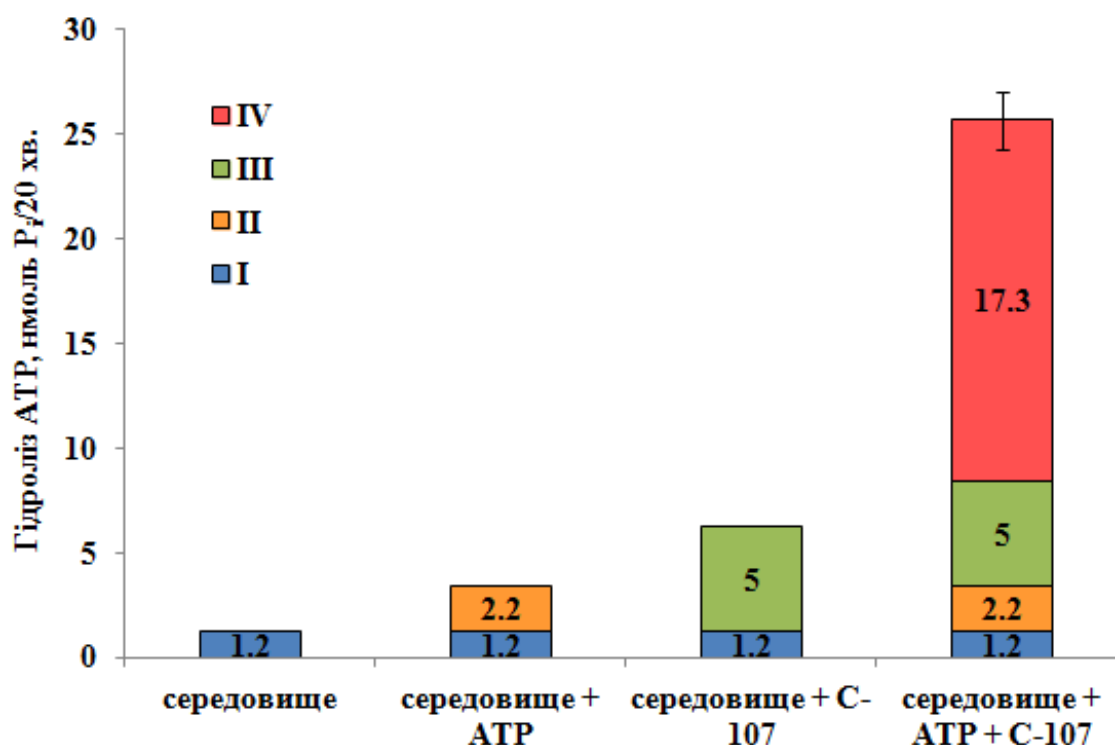


Рис. 6.1. Індукція калікс[4]ареном **C-107** реакції гідролізу АТР ($M \pm t$; $n = 6$).

Тут: I, II та III – позначки “контролів” на вміст фосфату P_i у середовищі інкубації (за умов відсутності АТР та калікс[4]арену; в середньому – 1,2-1,5 нмоль P_i), на вивільнення P_i при спонтанному гідролізі АТР та при можливому розкладі калікс[4]арену під час інкубації відповідно, IV – суто калікс[4]арен-залежний гідроліз АТР. Цифрами на стовпчиках I-IV зазначені абсолютні середні значення кількості P_i (нмоль/20 хв.) у випадку відповідних контролів та суто реакції калікс[4]арен-залежного гідролізу АТР. Концентрація калікс[4]арену, АТР та $MgCl_2$ – 100 мкМ, 1 та 3 мМ відповідно.

З метою з’ясування ролі олігофенольного макроциклу у забезпеченні каталітичного ефекту калікс[4]арену **C-107** були проведені дослідження дії калікс[4]аренів **C-160** та **C-150** на неензиматичний гідроліз АТР. Як було зазначено у розділі 5.3, калікс[4]арен **C-160** є проксимальним 1,2-регіоізомером – калікс[4]арену **C-107**, а калікс[4]арен **C-150** є суто калікс[4]ареновою чашею без жодних додаткових хімічних угруповань на верхньому вінці макроциклу.

Ми показали, що калікс[4]арен **C-160** значно менш ефективно здатний прискорювати реакцію гідролізу АТР, а калікс[4]арен **C-150** зовсім не здатний каталізувати гідроліз АТР (рис. 6.2). Це вказує на те, що для протікання реакції гідролізу АТР зміна взаємного положення замісників на каліксареновій чаші відображається лише в зміні швидкості реакції.

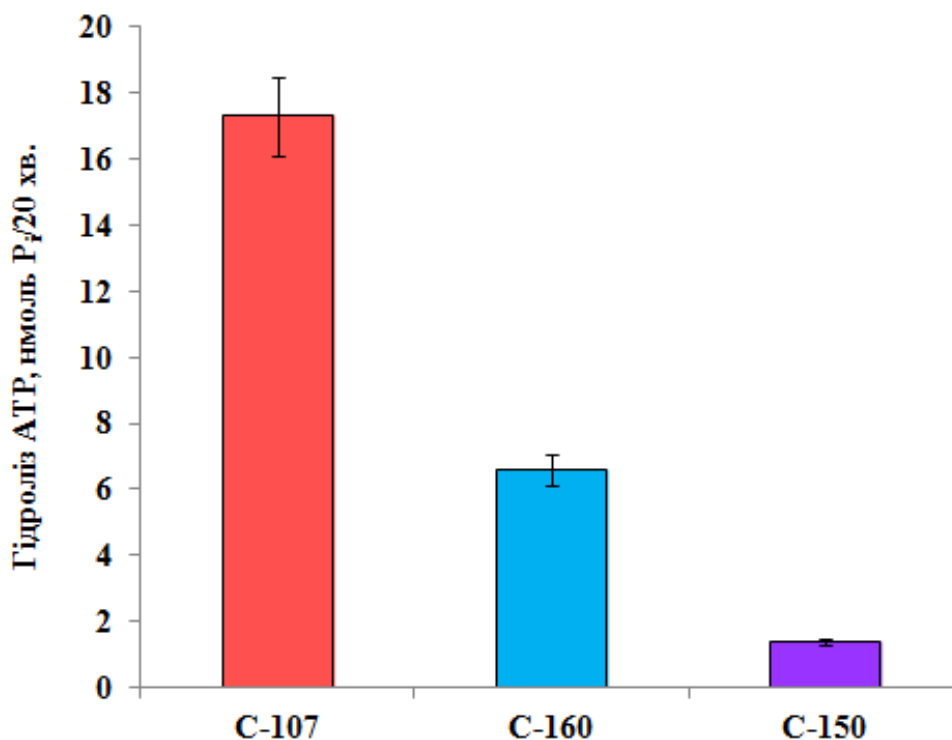


Рис. 6.2. Прискорення реакції гідролізу АТР калікс[4]аренами C-107, C-160 та C-150 ($M \pm m$, $n = 6$).

Отже, каліксаренова чаша не приймає безпосередньої участі в каталітичних процесах, що зумовлюють гідролітичне розщеплення фосфоангідридних зв'язків у молекулі АТР.

У подальших дослідженнях ми вивчили деякі кінетичні закономірності реакції гідролізу АТР, індукованого калікс[4]ареном **C-107**.

6.2. Дослідження кінетики гідролізу АТР, який індукується калікс[4]ареном C-107.

Аналіз кінетики гідролізу АТР, індукованого калікс[4]ареном **C-107**, показав, що крива характеризується монотонною ходою, яка має тенденцію до виходу на плато (у часі). За даних умов протікання процесу (100 мкМ **C-107**, 1 мМ АТР, 3 мМ MgCl₂; температура – 37 °С) платове значення p_{\max} накопичення

неорганічного фосфату спостерігається приблизно з 45-60⁰¹ хв. інкубації, коли реакція практично завершується (рис. 6.3).

При первинному кінетичному аналізі цієї залежності виявилось, що закономірності її протікання не підпорядковуються властивостям хімічних процесів низьких порядків (нульового, першого), що свідчить про складність даної реакції. Щоб кількісно охарактеризувати кінетику реакції каліксарен-залежного гідролізу АТР (рис. 6.3) ми обрали метод емпіричного аналізу для опису складних кінетичних кривих [141], що був розроблений раніше колегами з нашого відділу. Отримана нами усереднена кінетична крива гідролізу АТР, що була наведена на рис. 6.3, добре лінеаризувалася (типові значення коефіцієнта кореляції становить 0,94-0,99) і це дало нам можливість розрахувати необхідні емпіричні кінетичні параметри: логарифмічний декремент крутизни кінетичної кривої n ($2,20 \pm 0,05$), характеристичний час реакції τ (“період напівнасичення”) ($10,82 \pm 0,39$ хв), час θ , в який спостерігається максимальне значення миттєвої швидкості реакції ($6,89 \pm 0,26$ хв), максимальну миттєву швидкість реакції V ($1,46 \pm 0,06$ нмоль P_i /хв) ($M \pm m$; $n = 5$).

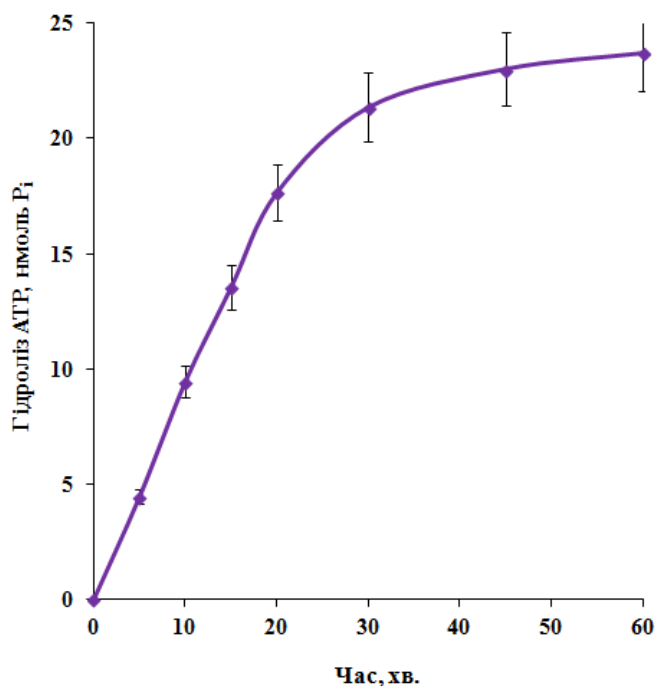


Рис. 6.3. Кінетична крива неензиматичного гідролізу АТР калікс[4]ареном С-107 ($M \pm m$, $n = 5$).

Концентрація калікс[4]арену **C-107**, АТР та $MgCl_2$ – 100 мкМ, 1 мМ та 3 мМ відповідно.

Отримані нами дані вказують на наступне:

1. Максимальна (“платова”) кількість неорганічного фосфату p_{max} , який звільняється внаслідок каліксарен-залежного гідролізу АТР (рис. 6.3), значно менша, ніж початкова кількість субстрату реакції (a_0) (початкова концентрація АТР – 1 мМ, об’єм середовища інкубації становить 0,4 мл). Обрахунки показують, що середнє значення відношення $p_{max}/a_0 \approx 23 \text{ нмоль}/400 \text{ нмоль} \approx 6 \cdot 10^{-2}$. Отже, кількість P_i , що звільняється у ході каліксарен-залежної реакції гідролізу АТР, не перевищує 6 % від початкової кількості АТР у середовищі інкубації. Таким чином, ми припустили, що припинення (практично з 45^{ої} хвилини інкубації) гідролізу АТР, індукованого калікс[4]ареном **C-107** (рис. 6.2), не може бути пов’язане з можливим повним вичерпанням субстрату в ході реакції, а обмежується якимось іншим фактором. Це питання потребує подальшого з’ясування.

2. Процес каліксарен-залежного гідролізу АТР є дуже повільним: характеристичний час реакції τ (“період напівнасичення”) в середньому становить 10,82 хв. Кінетична крива (рис. 6.2.1) реакції каліксарен-залежного гідролізу АТР є негіперболічною (у часі) – адже логарифмічний декремент її крутизни n має середнє значення 2,2, тобто не дорівнює 1. За своєю величиною час $\theta = 6,89$ хв, в який спостерігається максимальне значення миттєвої швидкості V реакції, приблизно на 4 хв. менший за величину характеристичного часу реакції τ .

3. Середнє значення максимальної миттєвої швидкості V реакції каліксарен-залежного гідролізу АТР становить 1,46 нмоль P_i /хв. У контрольних дослідах ми показали, що середня швидкість спонтанного гідролізу АТР у відсутності калікс[4]арену **C-107** не перевищує 0,1 нмоль P_i /хв. (у складі середовища інкубації – 1 мМ АТР, 3 мМ $MgCl_2$; температура – 37 °С). Отже, за даних експериментальних умов швидкість каліксарен-залежного гідролізу АТР

перевищує швидкість спонтанного гідролізу цього нуклеозидтрифосфату приблизно в 14-15 разів.

Як вже відзначалося, одним із етапів каліксарен-залежної реакції гідролізу АТР є утворення комплексу каліксарену з нуклеозидтрифосфатом [435]. З метою подальшого вивчення механізму каталізу гідролітичного розщеплення АТР у присутності калікс[4]арену **C-107** було досліджено взаємодію останнього з нуклеозидтрифосфатом та визначено константу дисоціації утвореного комплексу.

6.3. Комплексоутворення між калікс[4]ареном C-107 та АТР.

Дані дослідження виконані у творчій співпраці з академіком НАН України Кальченком В.І. та його колегами (Інститут органічної хімії НАН України).

Константи дисоціації K_d каліксаренових комплексів з органічними сполуками в розчинах зазвичай визначають методом ЯМР [126, 127, 282]. Однак нами, як вже відзначалося вище, для вивчення комплексоутворюючих властивостей каліксаренів [296, 298-300, 341] був розроблений та успішно використаний метод, заснований на застосуванні обернено-фазної високоефективної рідинної хроматографії. Цей метод дозволяє оперувати низькими концентраціями досліджуваних сполук у полярних розчинниках та їх сумішах. Для підвищення достовірності результатів дослідження нами було використано два типи хроматографічних насадок різної полярності (“Zorbax CN” та “LiChrosorb RP 18”), вибір яких був зумовлений будовою та хімічними властивостями калікс[4]арену **C-107** і АТР, а також відомими даними літератури [105] з аналізу подібних сполук. Комплексоутворення вивчалось у розчині ацетонітрил/вода (47/53 за об'ємом) в якості рухомої фази. При хроматографічному аналізі АТР, додавання до складу рухомої фази калікс[4]арену **C-107** приводить до утворення комплексу “Господар-Гість” і спричиняє зниження значень основних хроматографічних характеристик АТР:

часу утримання t_R та коефіцієнта ємкості k' . Значення основних хроматографічних характеристик: часу утримання t_R та коефіцієнту ємкості k' для калікс[4]арену **C-107** та АТР наведені в табл. 6.1, а значення величини $1/k'$ в залежності від концентрації калікс[4]арену **C-107** у складі рухомої фази – в табл. 6.2 та на рис. 6.4 та 6.5.

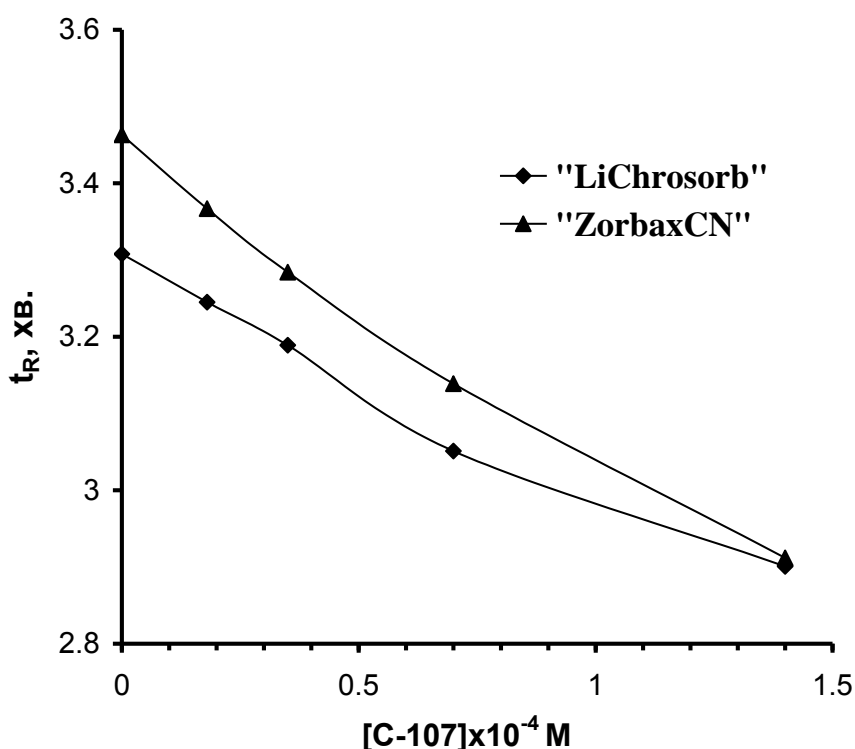


Рис. 6.4. Залежність часу утримання t_R для АТР хроматографічними насадками "LiChrosorb RP 18" і "Zorbax CN" від концентрації калікс[4]арену **C-107** в рухомій фазі.

Таблиця 6.1. Основні хроматографічні характеристики: час утримання (t_R) та коефіцієнт ємкості (k') калікс[4]арену **C-107** та субстрату АТР, що були одержані із використанням насадок "Zorbax CN" і "LiChrosorb RP 18" в потоці ацетонітрил/вода (47/53 за об'ємом).

Сполука	Насадка "Zorbax CN"		Насадка "LiChrosorb RP 18"	
	t_R , хв	k'	t_R , хв	k'
C-107	7,520	2,384	10,834	3,706
АТР	3,463	0,559	3,308	0,437

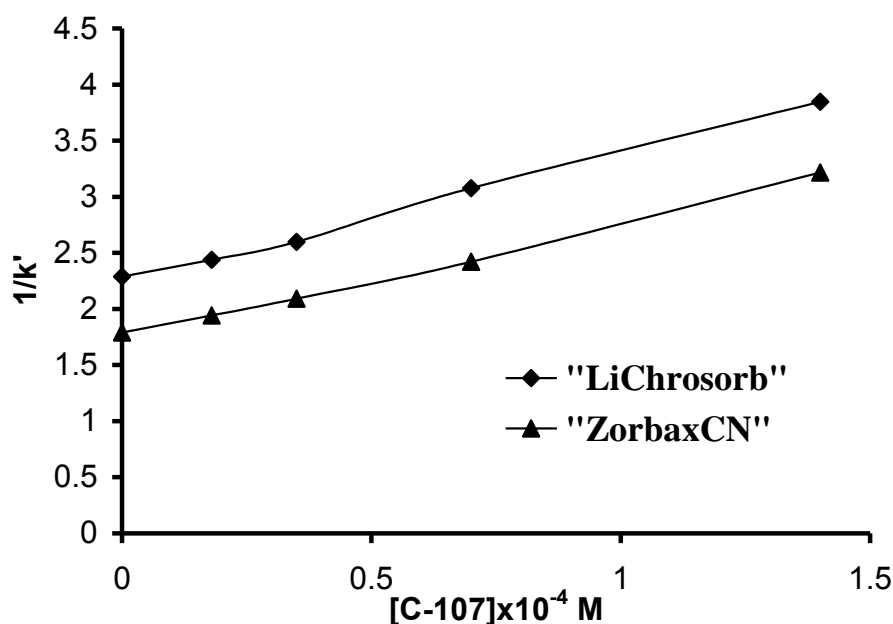


Рис. 6.5. Залежність величини $1/k'$ для АТФ від концентрації калікс[4]арену **C-107** у рухомій фазі для насадок “LiChrosorb RP 18” та “Zorbax CN”.

Таблиця 6.2. Коефіцієнт ємкості субстрату АТФ (k'), що визначався в залежності від концентрації калікс[4]арену **C-107** у рухомій фазі, та значення константи дисоціації комплексу “Калікс[4]арен **C-107**-АТФ”.

Концентрація C-107 , *10 ⁻⁴ М	Насадка					
	“Zorbax CN”			“LiChrosorb RP 18”		
	k'	$1/k'$	K_d , мкМ (RSD,%)	k'	$1/k'$	K_d , мкМ (RSD,%)
0	0,559	1,789	197 (8 %)	0,437	2,288	231 (15 %)
0,18	0,515	1,942		0,410	2,439	
0,35	0,478	2,092		0,385	2,597	
0,70	0,413	2,421		0,325	3,077	
1,40	0,311	3,215		0,260	3,846	

У випадку застосування обох насадок “LiChrosorb RP 18” та “Zorbax CN” характер лінійної залежності (рис. 6.5) величини $1/k'$ від концентрації каліксаренової добавки у рухомій фазі (коефіцієнт кореляції 0,98-0,99) вказує

на стехіометрію калікс[4]арену **C-107** і АТР в комплексі, що відповідає співвідношенню 1:1.

На підставі лінійної залежності величин $1/k'$ від концентрації калікс[4]арену **C-107** у рухомій фазі, одержаних з експериментальних даних, були розраховані константи дисоціації K_d комплексу “калікс[4]арен **C-107** – АТР” за рівнянням (1) [297]:

$$1/k' = 1/k_0' + (1/K_d) \cdot [C-107]/k_0' \quad (1)$$

де k_0' і k' – коефіцієнти ємкості, що були визначені у відсутності та у присутності калікс[4]арену **C-107** у рухомій фазі. Детальна процедура таких обчислень викладена у роботі [297]. Значення констант дисоціації K_d , що були розраховані із використанням цього методу у випадку насадок “LiChrosorb RP 18” і “Zorbax CN”, становлять 231 та 197 мкМ відповідно (табл. 6.2).

Визначивши стехіометрію комплексоутворення (1:1), ми провели моделювання комплексу “калікс[4]арен **C-107** – АТР” з використанням програми “HyperChem 7.01”. При цьому виходили з того, що молекула калікс[4]арену **C-107** існує у формі дицвіттеріону з протонованими амініними атомами азоту і двома депротонованими гідроксилами фосфонових фрагментів, а молекула АТР існує у формі тетрааніону. Методом молекулярної механіки (“силове поле ММ+”) був проведений конформаційний пошук оптимальної геометрії “Господаря” – калікс[4]арену **C-107** та “Гостя” – АТР. Потім довільним шляхом зближували “Господаря” і “Гостя” і розраховували оптимальну геометрію утворених комплексів. В результаті був відібраний ряд структур комплексів з найменшою загальною енергією E . Для порівняння значення загальних енергій цих комплексів вони також були перераховані напівемпіричним методом (“поле CNDO”), після чого було вибрано три структури **I-III** (рис. 6.6) з найменшими загальними енергіями E . Відносні значення розрахованих загальних енергій комплексу “калікс[4]арен **C-107**-АТР” (**I-III**) приведені в таблиці 6.3.

Таблиця 6.3. Відносні значення розрахованих загальних енергій E комплексів “С-107–АТР” (I-III).

Комплекс	Молекулярна механіка, “силове поле ММ+”		Напівемпіричний метод, “поле CNDO”	
	Загальна енергія E , відносні од.	Різниця, %	Загальна енергія E , відносні од.	Різниця, %
I	103,82	3,82	100,00	0
II	100,00	0	100,02	0,02
III	100,87	0,87	100,06	0,06

Примітка: У випадку методу молекулярної механіки “силове поле ММ+” та напівемпіричного методу “поле CNDO” значення загальної енергії E прийнято за умовний нуль для комплексів **II** та **I**, відповідно.

Як маємо з даних, що наведені в табл. 6.3, загальні енергії комплексів E відрізняються між собою не більше, ніж на 4 %, тобто вони практично є рівновірогідними.

Слід відмітити, що у випадку комплексів **I** та **II** (рис. 6.6) спостерігається самовключення одного фосфонового залишку каліксарену в його молекулярну порожнину. При такому самовключенні (структури **I** та **II**) мають місце внутрішньомолекулярні водневі зв'язки $P=O \cdots H-N$ між амінофосфовими фрагментами. В комплексі **III** подібні водневі зв'язки не утворюються, при цьому спостерігається більш повне включення молекули АТР в порожнину каліксаренового макроциклу, ніж у випадку структур **I** та **II**.

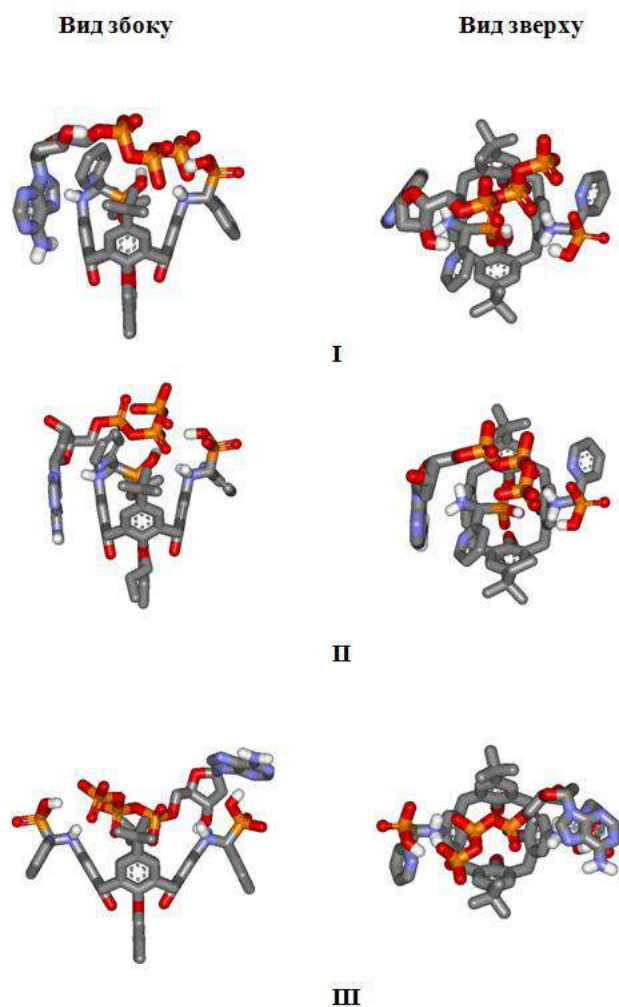


Рис. 6.6. Структури комплексів “С-107 – АТР” (I-III) (бічний та апікальний вигляд).

У наведених “стрижневих” моделях атоми вуглецю позначені сірим кольором, азоту – синім, кисню – червоним, фосфору – помаранчевим, водню – білим кольорами. Атоми водню, які не беруть участі у міжмолекулярних водневих зв’язках, для спрощення не зазначені.

Взагалі ж між калікс[4]ареном С-107 та АТР утворюються міжмолекулярні водневі зв’язки різних типів, які стабілізують утворені комплекси (рис. 6.6), а саме:

1. У всіх трьох структурах NH_2^+ -групи одного аміно-(2-піридил)метилфосфонового фрагменту молекули С-107 взаємодіють з γ - та β -фосфорильними залишками молекули АТР.

2. Разом з тим NH_2^+ -групи другого аміно-(2-піридил)метилфосфонового фрагменту молекули С-107 взаємодіють з α -фосфорильним залишком та гідроксилом дезоксирибози молекули АТР.

3. Р-ОН-групи одного аміно-(2-піридил)метилфосфонового фрагменту молекули **C-107** зв'язуються з γ -фосфорильним залишком молекули АТР; в той же час Р-ОН-групи другого аміно-(2-піридил)метилфосфонового фрагменту молекули **C-107** зв'язані з β - або α -фосфорильним залишком молекули АТР.

Таким чином, проаналізувавши одержані дані можна припустити, що калікс[4]арен **C-107** є ефективним комплексоутворювачем для АТР у розчинах.

Очевидно, що явища комплексоутворення каліксаренів з АТР, а також каліксарен-залежного гідролізу цього нуклеозидтрифосфату, становлять безперечний інтерес як з точки зору біоорганічної хімії та біохімії, так і біотехнології та фармакології.

У своїх подальших дослідженнях ми вивчали каталітичні властивості реакції гідролізу АТР, індукованого калікс[4]ареном **C-107**.

6.4. Дослідження властивостей реакції гідролізу АТР, який індукується калікс[4]ареном C-107.

Як вже відзначалося, середовище інкубації, яке ми використовували для дослідження неензиматичного гідролізу АТР, містило 3 мМ $MgCl_2$. Проте, як показали експерименти, гідроліз АТР (1 мМ), що був індукований калікс[4]ареном **C-107** (100 мкМ), не залежав від присутності іонів Mg: за присутності зазначених іонів кількість P_i , що звільнявся, була практично такою ж, як і у відсутності Mg^{2+} ("контроль"). Еквімолярна заміна іонів Mg на іони Ca також не впливала на рівень гідролізу АТР стосовно "контролю". Проте іони Co, Mn, Zn, Ni, Sr, Pb та Ba пригнічували каліксарен-залежний гідроліз АТР; в присутності ж іонів Cu він практично не спостерігався. В цілому ж при дії іонів двовалентних металів на цей гідроліз має місце наступна послідовність щодо ефективності їхньої гальмівного впливу на каліксарен-залежну гідролітичну реакцію: $Cu^{2+} > Ba^{2+} > Pb^{2+} > Sr^{2+} > Ni^{2+} = Zn^{2+} > Mn^{2+} > Co^{2+} > Ca^{2+} = Mg^{2+} =$ "контроль" (тобто у відсутності катіонів двовалентних металів Me^{2+}) (рис. 6.7).

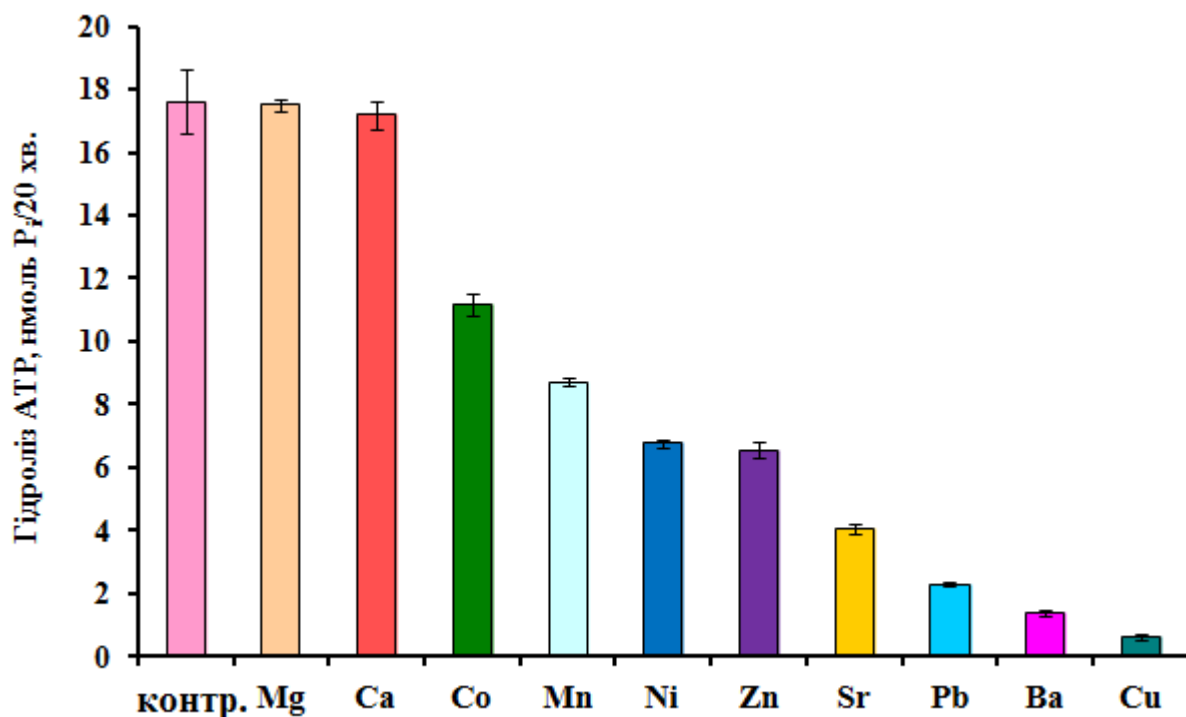


Рис. 6.7. Вплив іонів двовалентних металів на індуковану калікс[4]ареном **C-107** реакцію гідролізу АТР ($M \pm m$; $n = 5$).

Концентрація калікс[4]арену **C-107**, АТР та двовалентних катіонів (Me) – 100 мкМ, 1 та 3 мМ відповідно.

У наступних експериментах ми вивчали вплив одновалентних катіонів та іонної сили на реакцію гідролізу АТР, індукованого калікс[4]ареном **C-107**.

Ми показали, що наявність у середовищі інкубації 150 мМ NaCl, KCl, LiCl чи холінхлориду призводила до невеликого однакового за величиною пригнічення (не більше, ніж на 10-15 %) каліксарен-залежного гідролізу АТР стосовно контролю (за умов відсутності зазначених хлоридів у середовищі, прийнято за 100 %) (дані не наведені). За концентраційних умов $[NaCl] + [KCl] = 150$ мМ зміна співвідношення концентрацій зазначених хлоридів не призводила до зміни швидкості цього гідролізу (дані не наведені). У випадку відсутності у середовищі інкубації солей одновалентних металів, але використання сахарози в ізотонічній концентрації (300 мМ, “контроль” на можливий ефект іонної сили), цей гідроліз також практично не змінювався (дані не наведені). Таким чином, одновалентні катіони різної хімічної природи (Na^+ , K^+ , Li^+ , холін⁺), не є

критично необхідними для протікання каліксарен-залежного гідролізу АТР. Імовірно також, що електростатичним взаємодіям між калікс[4]ареном **C-107** та АТР навряд чи належить суттєве значення у забезпеченні реакції гідролізу цього нуклеозидтрифосфату, так як ця реакція не була чутливою до зміни іонної сили. Втім, у випадку вивчення комплексоутворення між АТР та калікс[4]арен-5,11,17,23-тетрасульфоновим, викладеною у роботі [485], електростатичні взаємодії припускаються.

Також ми вивчали вплив рН на реакцію гідролізу АТР, індукованого калікс[4]ареном **C-107**. Показано, що залуження середовища інкубації в діапазоні рН від 6,0 до 8,0 підсилює каліксарен-залежний гідроліз АТР: рН-залежність при підвищенні рН від 6,0 до 7,4 була майже лінійною, при подальшому ж збільшенні водневого показника вона виходила на стійке плато (рис. 6.8).

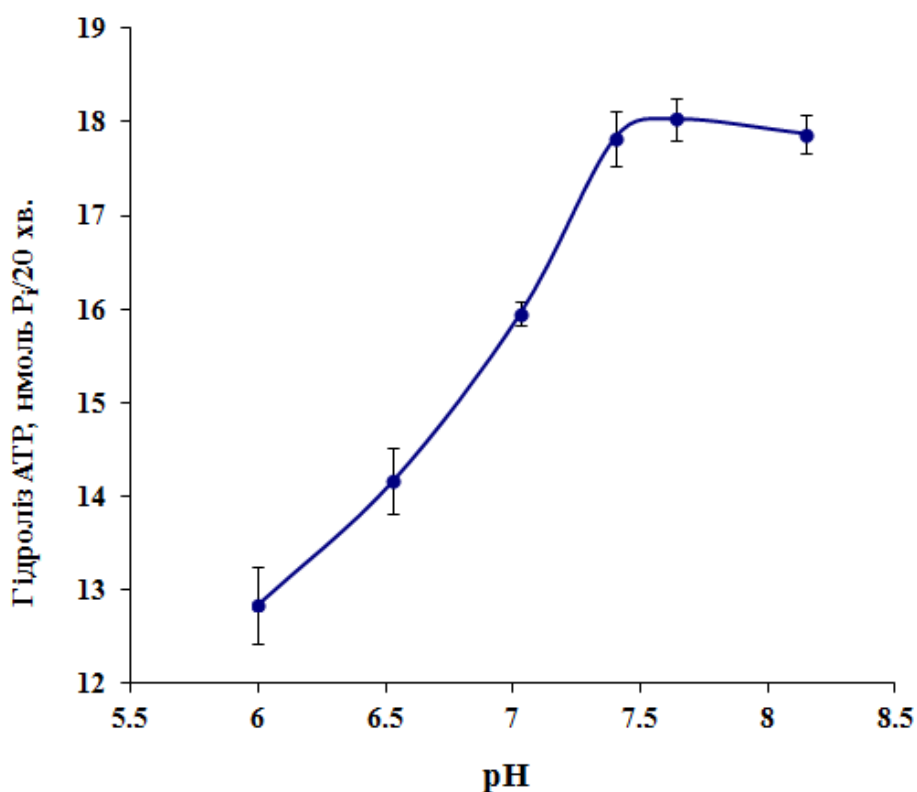


Рис. 6.8. Вплив рН на індуковану калікс[4]ареном **C-107** реакцію гідролізу АТР ($M \pm m$; $n = 5$).

Концентрація калікс[4]арену **C-107**, АТР та MgCl₂ – 100 мкМ, 1 мМ та 3 мМ відповідно.

Таким чином, при зниженні концентрації протонів від 1 до 0,01 мкМ підсилюється реакція гідролізу АТР, індукованого калікс[4]ареном **C-107**, що свідчить про важливість для реалізації гідролізу нуклеозидтрифосфату ефектів “протонування-депротонування” функціональних груп в системі “калікс[4]арен **C-107** – АТР”.

Дослідження енергетики реакції гідролізу АТР, індукованого калікс[4]ареном **C-107**, показують, що при підвищенні температури середовища інкубації в діапазоні від 6 до 37 °С має місце експоненціальне зростання швидкості каліксарен-залежного гідролізу АТР, подальше підвищення температури (до 47 °С) призводило до незначного пригнічення цієї реакції (дані не наведені). Використавши метод Вант-Гоффа для розрахунку уявної енергії активації E_a реакції (діапазон температур 6-37 °С) ми розраховували значення цієї величини, що становило $50,7 \pm 8,9$ кДж/моль ($M \pm m$; $n = 6$). Необхідно відзначити, що це значення не дуже сильно відрізняється від типових значень E_a , які є властивими для ензиматисних АТР-гідролізних реакцій, зокрема, для реакції Ca^{2+}, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР, що каталізується Ca^{2+} -транспортуючою АТРазою ПМ клітин (55-63 кДж/моль) [312].

При вивченні субстратної специфічності реакції гідролізу АТР, індукованого калікс[4]ареном **C-107**, ми показали, що еквімолярна заміна АТР (1 мМ) на інші нуклеозидтрифосфати, зокрема, на GTP та UTP, не впливала на рівень їхнього каліксарен-залежного гідролізу, який у середньому становив 17-18 нмоль P_i за 20 хв.; еквімолярна заміна АТР (1 мМ) на ADP, призводила до зменшення на 30 % рівня гідролізу стосовно контролю, який тестується у присутності АТР (дані не наведені). Отже, реакції індукованого калікс[4]ареном **C-107** гідролізу фосфоангідридних зв'язків мононуклеотиду не притаманна субстратна специфічність: у її ході успішно гідролізується не лише АТР, але й інші нуклеозидтрифосфати, а також й ADP (хоча і менш ефективно, ніж АТР). Втім, зараз вже синтезовані уридин-похідні калікс[4]арену, що специфічно

зв'язуються з АТР за участю взаємодій, аналогічних таким, які існують між парами основ у ДНК та РНК [336]

Надалі ми досліджували залежність кінетичних параметрів реакції гідролізу АТР від концентрації калікс[4]арену **C-107**. Як показують результати експериментів, підвищення концентрації калікс[4]арену **C-107** від 20 до 100 мкМ підсилює реакцію гідролізу АТР (1 мМ) (рис. 6.9). Ми проаналізували одержані криві за допомогою методу емпіричного кінетичного аналізу [157]. Проведені розрахунки показали, що максимальний рівень p_{\max} вивільненого продукту реакції – неорганічного фосфату P_i та максимальна миттєва швидкість реакції V лінійно збільшувались із зростанням концентрації калікс[4]арену **C-107**; характеристичний час реакції τ навпаки нелінійно зменшувався (головним чином в діапазоні концентрації калікс[4]арену **C-107** 20-40 мкМ).

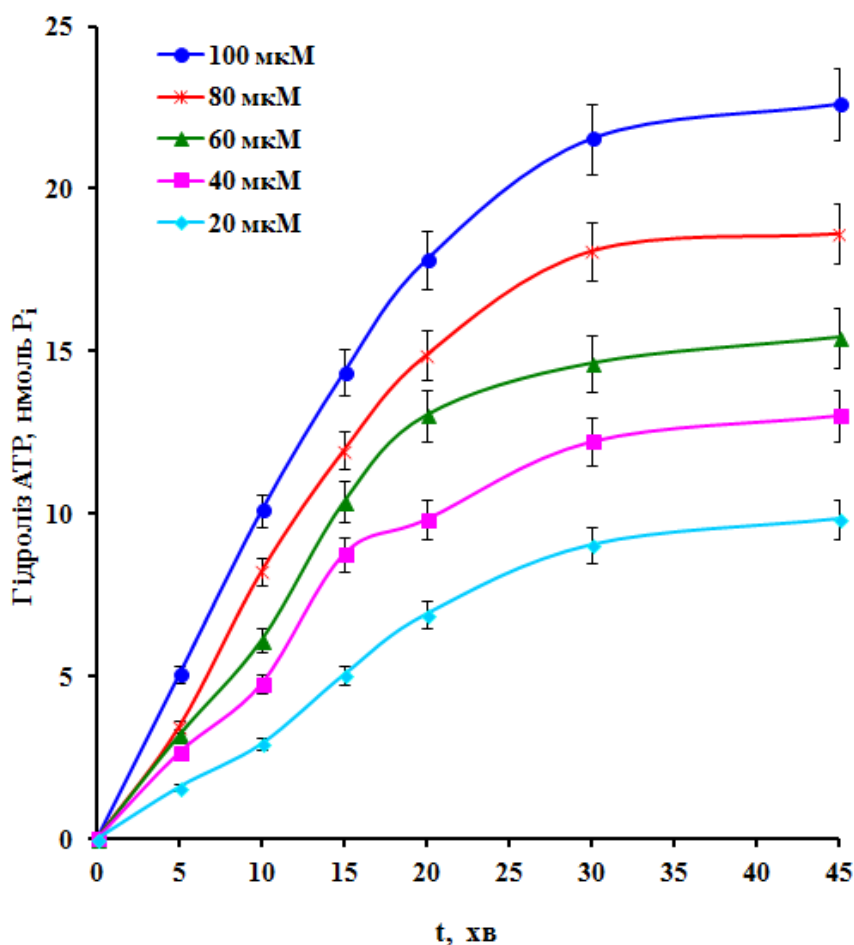


Рис. 6.9. Вплив різних концентрацій калікс[4]арену **C-107** на кінетику реакції гідролізу АТР ($M \pm m$; $n = 5$).

Концентрація АТР – 1 мМ, концентрація MgCl₂ – 3 мМ.

Як ми продемонстрували вище (див. розділ 6.3), значення констант дисоціації K_d комплексу “С-107 – АТР”, що були розраховані із використанням методу ОФ ВЕРХ у системі “ацетонітрил/вода” у випадку двох хроматографічних насадок різної полярності “LiChrosorb RP 18” і “Zorbax CN”, становлять 231 та 197 мкМ відповідно (табл. 6.2). Якщо порівняти вказані величини K_d із реальною концентрацією АТР у клітинах ($\sim 5 \cdot 10^{-4}$ - $5 \cdot 10^{-3}$ М), то можна стверджувати, що калікс[4]арен С-107 має відносно високу спорідненість до зазначеного нуклеозидтрифосфату. Було знайдено, що підвищення концентрації АТР від 1 до 5 мМ стимулює реакцію гідролізу нуклеозидтрифосфату (концентрація калікс[4]арену С-107 – 100 мкМ) (рис. 6.10). Одержані криві також були проаналізовані із використанням вищенаведеного методу кінетичного аналізу [141]. Розрахунки показали, що платовий рівень p_{\max} звільнення продукту реакції – неорганічного фосфату P_i не залежить від концентрації АТР, максимальна миттєва швидкість V нелінійно збільшується із зростанням концентрації нуклеозидтрифосфату; характеристичний час реакції τ – лінійно зменшується.

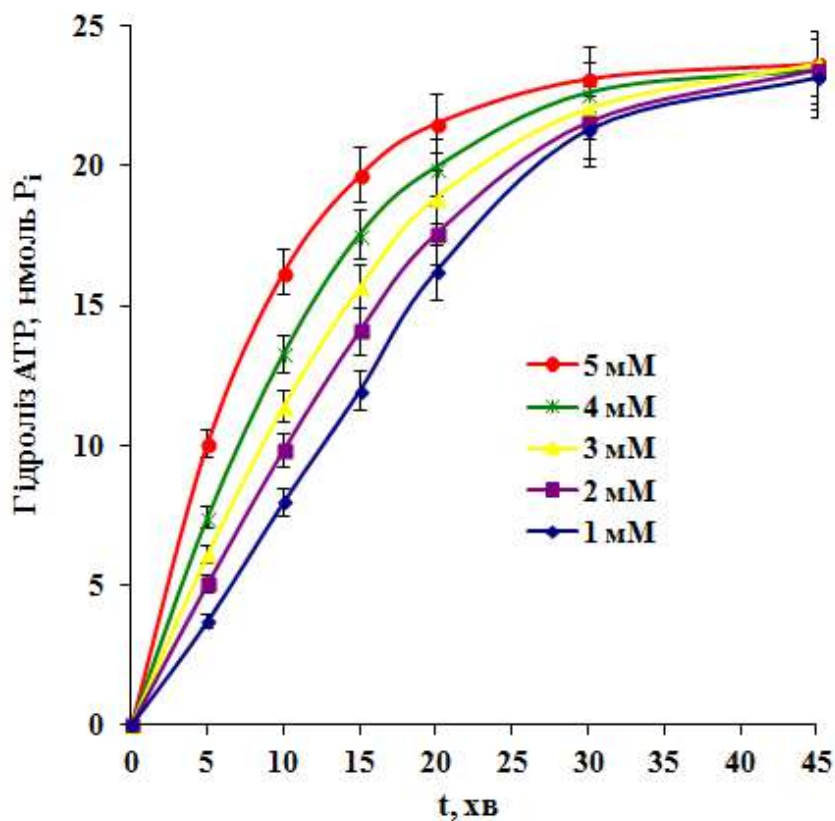


Рис. 6.10. Вплив різних концентрацій АТР на кінетику індукованої калікс[4]ареном **C-107** реакції гідролізу нуклеозидтрифосфату ($M \pm m$; $n=5$). Концентрація калікс[4]арену **C-107** – 100 мкМ, концентрація $MgCl_2$ – 3 мМ.

Отже, при фіксованій концентрації калікс[4]арену **C-107** величина p_{\max} взагалі не залежала від концентрації АТР, а величина V нелінійно збільшувалась із зростанням концентрації цього нуклеозидтрифосфату, але без виходу на “плато” (рис. 6.10). Таким чином, при сталій концентрації калікс[4]арену **C-107** значення p_{\max} накопичення неорганічного фосфату не визначається концентрацією АТР, а значення V визначається.

Результати, викладені у розділі, опубліковано в наступних роботах: [64, 113].

ЗАКЛЮЧНИЙ РОЗДІЛ

На початку наших досліджень ми вивчали деякі мембранотропні властивості калікс[4]аренів в системі “калікс[4]арени – везикули ПМ ГМК”. Адже калікс[4]арени, що ми вивчали, мають гідрофобні властивості. Тому можливо, що їхні ефекти частково або повністю опосередковуються взаємодією з мембранами

За допомогою методів лазерно-кореляційної спектроскопії та електронної мікроскопії ми показали, що у присутності калікс[4]арену **C-107** відбувається агрегація везикул між собою та/або з мікрочастинками калікс[4]арену. Показане нами збільшення гідродинамічного діаметру везикул підтверджується даними літератури, де мова іде за злиття каліксаренів з ліпідами мембран [284].

Деякі з каліксаренів можуть взаємодіяти з біологічними мембранами, при цьому вони здатні забезпечувати пасивний транспорт іонів, або ж навпаки – блокувати його. Таким чином, вони мають впливати на величину трансмембранного потенціалу, а також на активність електроензимів, яка залежить від цього потенціалу. За допомогою методу протокової цитометрії ми дослідили вплив калікс[4]арену **C-99** на K^+ -дифузійний трансмембранний потенціал у системі “ K^+ /валіноміцин – везикули ПМ”. Нами було показано, що вплив калікс[4]арену **C-99** на флуоресцентну відповідь потенціалчутливого зонда DiOC₆(3) залежить від поляризації мембрани. Таким чином, калікс[4]арен **C-99** може проявляти мембранотропні ефекти і опосередковано впливати на АТР-гідролазні мембранозв’язані ензими, активність яких залежить від структурно-функціонального стану мембран. Ми допускаємо, що вплив цього калікс[4]арену на активність Na^+,K^+ -АТРази ПМ деякою мірою реалізується внаслідок мембранотропних ефектів.

В процесі дослідження флуоресцентних характеристик калікс[4]аренів ми з’ясували, що двом калікс[4]аренам (**C-90** та **C-107**) властива автофлуоресценція. Тому ми за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопу вивчали можливість проникнення калікс[4]аренів у

клітину. Результати свідчать на користь того, що калікс[4]арен **C-107** може не лише вбудовуватись та накопичуватись в біологічних мембранах, але й проникати крізь них.

Відомо, що рідинно-кристалічний стан мембран і склад ліпідів впливає на функціонування Na^+, K^+ -АТРази та $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани. Щоб дослідити мембранотропний вплив калікс[4]аренів ми використали флуоресцентний зонд АНС, який використовується для вивчення поверхневих властивостей мембрани. При внесенні у середовище інкубації везикул ПМ за присутності калікс[4]арену **C-107** відбувається гасіння флуоресценції зонда АНС. Максимально рівень флуоресценції зонда знижується за присутності калікс[4]арену **C-107** у 1,5 рази, що вказує на зниження кількості центрів взаємодії з зондом на поверхні ПМ. Можна припустити, що під впливом калікс[4]арену **C-107** змінюється полярність та/або поверхневий заряд ПМ.

Отже, отримані результати вказують на можливі зміни як рідинно-кристалічного стану мембран, так і їх поверхневого заряду під впливом калікс[4]аренів **C-107** та **C-90**, що в свою чергу, може опосередковано впливати на Na^+, K^+ -АТРазу та $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазу активність відповідно.

Приймаючи до уваги те, що Mg^{2+} , АТР-залежна Ca^{2+} -помпа ПМ є високоафінним білком, що видаляє Ca^{2+} із цитоплазми, а також відіграє ключову роль, у випадку ГМК, в регуляції процесів скорочення/розслаблення м'язів на другому етапі досліджень ми вивчали дію калікс[4]аренів на її активність.

Було показано, що калікс[4]арен **C-90** є афінним і селективним, на рівні плазматичної мембрани, інгібітором $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази як у фракції ПМ міоцитів матки, так і у випадку препарату очищеної солюбілізованої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази. Він не впливав на інші АТР-гідролазні ензиматичні активності ПМ: Na^+, K^+ -АТРазу і “базальну” Mg^{2+} -АТРазу. Значення коефіцієнта інгібування $I_{0,5}$ складало $20,2 \pm 0,5$ та $34,6 \pm 6,4$ мкМ ($M \pm m$; $n = 5$); величина коефіцієнта Хілла n_H становила $0,55 \pm 0,02$ і $0,67 \pm 0,05$ ($M \pm m$; $n = 5$) відповідно для $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази у фракції ПМ та у випадку препарату очищеної

солубілізованої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази.

Структурні компоненти молекули калікс[4]арену **C-90**, а саме модельні сполуки калікс[4]арен **C-150** (суто «калікс[4]аренова чаша») та сполука **M-1** (четверта частина молекули **C-90**) незначно пригнічують $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазну активність. Таким чином, для ефективного прояву інгібувальної дії калікс[4]арену **C-90** на $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазну активність необхідна сукупна наявність чотирьох просторово орієнтованих на калікс[4]ареновій платформі сульфониламідних груп.

Також ми вивчали, які структурні особливості калікс[4]арену **C-90** важливі для інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ. Ці дослідження проводились з метою підвищення ефективності інгібування та селективності дії калікс[4]арену на рівні клітинних структур. Показано, що інгібіторний ефект калікс[4]аренів зростає із збільшенням кількості фенілсульфониламідних груп на верхньому вінці калікс[4]аренової чаші. Разом з тим має суттєве значення і положення фенілсульфонил-амідних груп на верхньому вінці калікс[4]аренів: якщо вказані групи знаходяться на протилежних фенольних циклах калікс[4]арену ефективність інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази є більшою, ніж у випадку їх розташування на сусідніх фенольних кільцях. Ми встановили, що на ефективність інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ не впливає наявність *трет*-бутильних залишків. Якщо зі складу фенільсульфониламідної групи калікс[4]арену видалити фенольний фрагмент, то це суттєво не змінить спорідненості каліксаренового інгібітора до $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ. Отже, саме сульфониламідні групи на верхньому вінці макроциклу мають вирішальне значення у прояві інгібіторного ефекту.

Калікс[4]арени, які ми досліджували, є гідрофобними сполуками. Якщо намагатися їх використовувати у якості інгібіторів ензимів чи як фармакологічних засобів, ця обставина може бути суттєвою. Тому ми дослідили структурні аналоги калікс[4]арену **C-90**, які відрізнялися за наявністю гідрофобних груп. Показано, що підвищення гідрофобності калікс[4]аренів покращує їх мембранотропні ефекти та взаємодію з ПМ, що, в

свою чергу, полегшує умови взаємодії трансмембранних доменів з інгібітором. Модифікація нижнього вінця калікс[4]аренового макроциклу більш ліпофільними октильними залишками замість пропільних привела до деякого збільшення спорідненості інгібітора до Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ.

В подальших експериментах ми досліджували кінетичні закономірності інгібуючого впливу калікс[4]арену **C-90**. Розраховані нами уявна константа Міхаеліса K_m , коефіцієнти активації іонами Ca та Mg (K_{Ca} , K_{Mg}), також відповідні коефіцієнти Хілла ($n_{\text{H,ATP}}$, $n_{\text{H,Ca}}$, $n_{\text{H,Mg}}$) свідчать на користь того, що калікс[4]арен **C-90** діє як повний неконкурентний інгібітор. У концентрації до 50 мкМ калікс[4]арен **C-90** практично не впливає на вказані коефіцієнти. При цьому дозозалежно від концентрації **C-90** зменшується максимальна швидкість ензиматичного гідролізу АТФ V_{max} .

Аналіз даних літератури свідчить на користь того, що функціонування Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ ГМК забезпечує трансмембранне активне перенесення Ca^{2+} із внутрішньоклітинного простору у зовнішньоклітинне середовище [63]. Тому ми припустили, що зниження активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ під впливом калікс[4]арену **C-90** має бути асоційованим зі зменшенням ефективності транспортної функції кальцієвої помпи ПМ. Для дослідження транспорту Ca^{2+} була запропонована модель: везикули ПМ, навантажені Ca^{2+} -чутливим зондом fluo-4 АМ. Наші експерименти показали, що накопичення Ca^{2+} везикулами ПМ відбувається у присутності в середовищі АТФ та іонів Ca і Mg, а специфічні інгібітори інших Ca^{2+} -транспортувальних систем (тапсигаргін, азид) не впливають на цей процес. Доведено, що калікс[4]арен **C-90** практично повністю блокує акумуляцію Ca^{2+} у везикулах ПМ. Отже, цей калікс[4]арен не лише пригнічує активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази, але й інгібує спряжений з цією активністю транспорт Ca^{2+} у везикулах.

Беручи до уваги те, що калікс[4]арен **C-90** ефективно впливає на гомеостаз Ca^{2+} у ГМК, ми припустили, що він має впливати і на скоротливу активність ГМ. Ми використали метод математичного моделювання і розбудували кількісну модель (в стаціонарному режимі) індукції

калікс[4]ареном **C-90** збільшення базальної концентрації іонів Ca у незбуджених міоцитах матки. Результати моделювання показують, що калікс[4]арен **C-90** повинен помірно підвищувати внутрішньоклітинну концентрацію Ca^{2+} у ГМК.

Ці дані підтверджуються експериментальними результатами з використанням конфокальної мікроскопії. Було показано, що під впливом калікс[4]арену **C-90** дійсно зростає концентрація іонізованого Ca^{2+} у міоцитах.

За допомогою методу лазерно-кореляційної спектроскопії було продемонстровано, що калікс[4]арен **C-90**, подібно до дії утеротоніка окситоцину, зменшує ефективний гідродинамічний діаметр міоцитів у випадку суспензії ГМК. Імовірно, що зміни гідродинамічного діаметру віддзеркалюють перебудови цитоскелету та зміни водно-осмотичного балансу, які відбуваються під час м'язового скорочення.

За допомогою молекулярного докінгу було визначено найбільш вірогідні місця зв'язування калікс[4]арену **C-90** з Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазою: ділянка, структурно близька до зони зв'язування з високою спорідненістю до Ca^{2+} (петля між спіралями М4-М6 і спіраль М8). При цьому дана петля модулює функціональні властивості Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази, в том числі спорідненість до катіонів. Було встановлено, що в утворенні комплексу ензиму з калікс[4]ареном **C-90** найбільш важливими є гідрофобні (стеричні), стекінг- та електростатичні взаємодії. Отже наші результати по комп'ютерному моделюванню підтверджують експериментальні дані щодо здатності калікс[4]арену **C-90** знижувати активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ.

Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза СР, як і Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза ПМ, належить до АТРаз Р-типу і має високий ступінь структурної та амінокислотної подібності до Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ. Тому було важливо перевірити дію калікс[4]арену **C-90** на активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази СР. Ми продемонстрували, що калікс[4]арен **C-90** пригнічує Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазну активність СР, проте величина коефіцієнта інгібування $I_{0,5}$ була у 3 рази вища порівняно з Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазою ПМ. Спорідненість Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази СР до АТР практично не залежить від

наявності калікс[4]арену **C-90** у середовищі інкубації, що вказує на відсутність конкуренції між АТР та інгібітором. Цей каліксарен також не впливав на коефіцієнти інгібування ($I_{0,5}$) та на їх кооперативність (n_H) для іонів Ca та Mg. Отримані нами дані вказують на те, що калікс[4]арен **C-90** діє на помпу CP за механізмом повного неконкуретного інгібування.

Також ми встановили, що калікс[4]арен **C-90** у якості селективного інгібітора Ca^{2+} -помпи ПМ пригнічує релаксацію м'язевого скорочення в режимі реєстрації спонтанної активності смужок міометрія. Показано, що він стимулює базальний тонус міометрія. В дослідженнях *in vitro* на ізольованих поздовжніх смужках міометрія щурів було встановлено, що у присутності калікс[4]арену **C-90** підсилюється швидкість скорочення міометрія у відповідь на стимуляцію утеротоніком окситоцином. Встановлений ефект підсилення дії окситоцину під впливом калікс[4]арену **C-90** дає можливість розробляти нові підходи з використанням **C-90**, які б дозволили залишити стимулюючий ефект дії окситоцину, але зменшити його побічні наслідки.



Рис.1. Узагальнююча схема дії калікс[4]арену **C-90** на клітини міометрія (власні та літературні [64] дані).

Натрієва помпа (Na^+, K^+ -АТРаза ПМ) – ензим, який енергозалежно та електрогенно транспортує іони Na^+ і K^+ , залученна у підтримання трансмембранного потенціалу, іонного гомеостазу, у передачу сигналів до клітини і регуляцію експресії багатьох генів, які кодують важливі внутрішньоклітинні білки [109]. Порушення її функціонування є ключовою ланкою в розвитку таких поширених патологій, як артеріальна гіпертензія, цукровий діабет зі супутнім пригніченням моторики кишечника, ниркова та серцева недостатність, прееклампсія вагітних тощо [110, 272].

Під час пошуку ефекторів, здатних модифікувати ензиматичну активність важливо щоб їх дія була специфічною та селективною. На початку нашої роботи з калікс[4]аренами ми протестували більше 14 сполук, проте лише деякі з них нас зацікавили у відповідному аспекті. У подальших дослідженнях особливу увагу привернули калікс[4]арени **C-97**, **C-99** та **C-107**, які ефективно інгібували ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази у фракції ПМ, не впливаючи на активність Mg^{2+} -АТРази. Встановлено, що ці сполуки дозозалежно та значно ефективніше, ніж убаїн, пригнічують активність Na^+, K^+ -АТРази: значення уявних коефіцієнтів інгібування $I_{0,5}$ для цих калікс[4]аренів $< 0,1$ мкМ, а значення $I_{0,5}$ для убаїну складає 20 – 30 мкМ. Важливо, що навіть у концентрації 100 мкМ зазначені калікс[4]арени не впливають на активність Mg^{2+} -АТРази.

Приймаючи до уваги високу ефективність дії калікс[4]аренів **C-97**, **C-99** та **C-107** важливо було дослідити залежність цієї дії від структурної організації каліксаренової молекули. Для цього було проведене дослідження дії структурних компонентів молекули калікс[4]арену, модельних сполук – незаміщеного дипропоксикалікс[4]арену **C-150**, та N-(4-гідроксифеніл)-2-піридил-амінофосфонової кислоти **M-3**. Молекула калікс[4]арену **C-107** складається як би із 3-х частин: каліксаренової “чаші” (еквівалент – сполука **C-150**), і двох амінофосфонових груп, пов’язаних з фенольними фрагментами (еквівалент – сполука **M-3**). Показано, що структурні фрагменти цього калікс[4]арену **C-150** та **M-3** у широкому діапазоні концентрацій практично не

впливали на ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази та Mg^{2+} -АТРази ПМ. Отже, пригнічувальна дія калікс[4]арену **C-107** пов'язана з спільним впливом двох просторово орієнтованих на каліксареновій платформі амінофосфонових груп, а не з дією тетрафенольного макроциклу як такого, або дією окремого амінофосфонового залишку.

Також ми вивчали дію калікс[4]арену **C-160**, який є регіоізомером калікс[4]арену **C-107**. Ці калікс[4]арени відрізняються один від одного різним положенням замісників каліксаренової чаші на верхньому вінці макроциклу (у випадку калікс[4]арену **C-160** вказані залишки розташовані у проксимальних положеннях, на відміну від калікс[4]арену **C-107**, у якого ці ж залишки знаходяться у дистальних положеннях). Виявилося, 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**. Для з'ясування структурних особливостей калікс[4]аренів **C-107** та **C-160** було проведене їх молекулярне моделювання з використанням програми «HyperChem 7.01». Проведені розрахунки показують що обидва калікс[4]арени **C-107** та **C-160** мають практично однакову конформацію *регулярний* конус, проте відстані N...N, C...C, P...P між амінофосфоновими фрагментами N-C-P суттєво відрізняються. Отже, вплив калікс[4]арену **C-107** на Na^+, K^+ -АТРази ПМ визначається оптимальним просторовим розташуванням амінофосфонових груп на каліксареновій платформі, що вірогідно є комплементарним до сайту взаємодії з Na^+, K^+ -АТРазою.

Щоб з'ясувати, яку роль відіграє структурна організація молекули калікс[4]арену **C-99** у прояві пригнічувальної дії на Na^+, K^+ -АТРази ПМ, були досліджені калікс[4]арени **C-296**, **C-297**, **C-424**, **C-425**, **C-426**, **C-427**. Ці сполуки є структурними аналогами калікс[4]арену **C-99**. Було показано, що калікс[4]арени **C-296** і **C-297**, у яких нижній вінець відрізняється від калікс[4]арену **C-99** наявністю ще двох додаткових пропоксильних груп, є менш ефективними інгібіторами Na^+, K^+ -АТРази порівняно з калікс[4]ареном **C-**

99. Калікс[4]арени **C-424, C-425, C-426, C-427** відрізняються від калікс[4]арену **C-99** замісниками на верхньому вінці каліксаренового макроциклу. Показано, що калікс[4]арен **C-424**, який не містить залишків фосфонові кислоти, не впливає на активність Na^+, K^+ -АТРази та “базальної” Mg^{2+} -АТРази ПМ. Калікс[4]арен **C-425** та **C-427**, які мають 4 та 3 фосфонатні залишки на верхньому вінці макроциклу відповідно, з меншою ефективністю, у порівнянні з калікс[4]ареном **C-99**, інгібують Na^+, K^+ -АТРазну активність ПМ.

Таким чином, проведенні дослідження впливу низки калікс[4]аренів, які є структурно подібними до **C-99**, на Na^+, K^+ -АТРазну активність ПМ ГМК дозволяють зрозуміти, які саме хімічні групи калікс[4]аренів зумовлюють їхні інгібіторні властивості щодо вказаного ензиму.

Транспортна Na^+, K^+ -АТРаза по суті є енергозалежним електрогенним $3\text{Na}^+ - 2\text{K}^+$ -антипортером і ми припустили, що її активність буде втрачатися, якщо одночасно з активним контртранспортом Na^+ та K^+ буде мати місце незалежний від нього симпорт додаткового аніону (наприклад, Cl^-) з катіонами Na^+ , чи незалежний від зазначеного контртранспорту антипорт додаткового носія позитивного заряду (наприклад, протону H^+). Наше припущення було підтвержене у експериментах, котрі були виконані на плоских ліпідних мембранах, згідно яким калікс[4]арен **C-99** дійсно здатний вбудовуватися в пласку мембрану та формувати в ній струмопровідну, щодо аніонів Cl^- , структуру.

Як добре відомо, для такого мембранозв’язаного електрогенного ензиму як Na^+, K^+ -АТРаза, властивий складний рівень структурної організації та регуляції, перш за все – за участі іманентних реагентів (іонів Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , а також АТР), при цьому суттєве значення має стан та властивості фосфоліпідного матриксу ПМ, який впливає не лише на каталітичну активність, але й на чутливість ензиму до специфічного інгібітора убаїну [78, 86]. Відповідно, складним є питання щодо механізму дії калікс[4]арену **C-97** на активність мембранозв’язаної натрієвої помпи. Ми продемонстрували, що такий механізм не може бути зумовленим зв’язуванням зазначеним калікс[4]ареном іонів Mg^{2+}

(чи) його впливом на взаємодію Mg^{2+} з ATP^{4-} у середовищі інкубації. Інгібуючий ефект калікс[4]арену **C-97** на Na^+,K^+ -АТРази не може бути пов'язаний також із можливим зменшенням спорідненості ензиму до іонів Mg чи АТР - внутрішньоклітинних реагентів АТР-гідролазної реакції. Проте, як з'ясувалось, калікс[4]арен **C-97** зменшує спорідненість ензиму до іону Na (катіон, що активує Na^+,K^+ -АТРази з цитоплазматичного боку мембрани), але збільшує до убаїну (специфічний інгібітор, що діє з зовнішньоклітинного боку мембрани). У той же час цей калікс[4]арен не впливає на спорідненість ензиму до іншого одновалентного активуючого катіона – іона K , який стимулює активність ензиму з зовнішнього боку клітини. В цілому ж необхідно підкреслити, що питання щодо іонних та мембранних механізмів дії калікс[4]арену **C-97** на натрієву помпу ПМ потребує подальшого з'ясування.

Отже, ми стверджуємо, що калікс[4]арен **C-97** є високоефективним ($I_{0,5} = 33 \pm 4$ нМ) порівняно з убаїном селективним (щодо відсутності впливу на “базальну” Mg^{2+} -АТРази) інгібітором Na^+,K^+ -АТРази ПМ. В практичному аспекті він у концентрації 1 – 10 мкМ може бути використаний у біохімічній мембранології при тестуванні та вивченні кінетичних та каталітичних властивостей натрієвої помпи у випадку такої експериментальної моделі, як фрагменти ПМ.

Приймаючи до уваги високу ефективність інгібіторної дії калікс[4]арену **C-107** на активність Na^+,K^+ -АТРази ми в подальших дослідженнях вивчали деякі закономірності його впливу на цей ензим. Було показано, що у присутності калікс[4]арену **C-107** в середовищі інкубації підвищується спорідненість Na^+,K^+ -АТРази ПМ до убаїну. Поряд з цим не змінюється величина коефіцієнта Хілла інгібуючої дії убаїну на цей ензим.

Також було досліджено вплив калікс[4]арену **C-107** на кінетичні параметри, що характеризують спорідненість ензиму до АТР та іонів Mg . Показано, що в обох випадках із ростом концентрації калікс[4]арену **C-107** спостерігається зниження, з різним ступенем ефективності, платового рівня активності Na^+,K^+ -АТРази ПМ.

При цьому калікс[4]арен **C-107** достовірно не впливає на значення уявної константи Міхаеліса K_m та коефіцієнта Хілла n_H . Таким чином, калікс[4]арен **C-107** не змінює уявної спорідненості ензиму до АТР, а також кооперативності ензиматичної реакції по АТР.

В подальших експериментах вивчали вплив калікс[4]арену **C-107** на кінетичні параметри дії $MgCl_2$. Ми показали, що із ростом концентрації калікс[4]арену **C-107** в середовищі інкубації до 50 нМ константа активації хлоридом магнію підвищується від $173 \pm 4,5$ мкМ (в контролі) до 375 ± 43 мкМ, при подальшому збільшенні концентрації калікс[4]арену – константа активації знижується до майже контрольного рівня (при концентрації калікс[4]арену **C-107** 100 нМ) ($M \pm m$; $n = 5$). Поряд з цим не змінюється величина коефіцієнта Хілла під дією калікс[4]арену **C-107**.

Приймаючи до уваги той факт, що два калікс[4]арени, а саме **C-97** та **C-107**, дуже ефективно пригнічують активність Na^+, K^+ -АТРази ПМ і збільшують її спорідненість до убаїну, ми дослідили як буде змінюватися Na^+, K^+ -АТРазна активність за умов сукупної дії калікс[4]аренів та убаїну. Було встановлено, що ці калікс[4]арени підвищують інгібувальну дію убаїну на активність Na^+, K^+ -АТРази ПМ шляхом збільшення її спорідненості до серцевого глікозиду.

Важливу роль відіграє Na^+, K^+ -АТРаза у забезпеченні функціональної активності скоротливих та рухливих клітин репродуктивної системи, зокрема міоцитів матки та сперматозоїдів. Тому ми провели порівняльне дослідження дії каліксаренів **C-97**, **C-99** та **C-107** на Na^+, K^+ -АТРазну активність у ПМ скоротливих (міометрій) та рухливих (сперматозоїди) клітин. Ми показали, що убаїн в діапазоні концентрацій $10^{-6} - 5 \cdot 10^{-3}$ М ефективно пригнічує “загальну” Mg^{2+}, Na^+, K^+ -АТРазну активність у фракції ПМ міометрія та сперматозоїдів, значення уявної константи $I_{0,5}$ інгібування Na^+, K^+ -АТРази міоцитів матки та сперматозоїдів убаїном становить $21,3 \pm 1,5$ мкМ і $18,8 \pm 2,3$ мкМ відповідно ($M \pm m$; $n=7$).

В подальших дослідженнях ми вивчали дію калікс[4]аренів **C-97**, **C-99** та **C-107** на активність Na^+, K^+ -АТРази ПМ міоцитів матки та сперматозоїдів. Одержані дані свідчать, що калікс[4]арени **C-97** та **C-107** (використані у концентрації 100 мкМ) майже повністю пригнічують ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази ПМ міоцитів матки (інгібування до 2-3 % відносно контролю), а калікс[4]арен **C-99** з меншою ефективністю проявляє пригнічувальну дію (інгібування до 14 % відносно контролю). Результати отримані при вивченні впливу калікс[4]аренів на ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази сперматозоїдів показали, що калікс[4]арени **C-97** та **C-107** також повністю інгібують Na^+, K^+ -АТРазну активність (залишкова активність – 1-2 % відносно контролю), проте калікс[4]арен **C-99** практично не впливає на неї, знижуючи ензиматичну активність лише до 80-85 % відносно контрольного значення ($M \pm m$; $n=7-10$). Всі три калікс[4]арени практично не впливають на “базальну” Mg^{2+} -АТРазну активність у суспензії ПМ міометрія та сперматозоїдів (мало місце зменшення активності лише до 90-95 % від контрольного значення).

Ми провели комп'ютерне моделювання взаємодії калікс[4]сарену **C-107** і його модельних сполук з ліганд-зв'язуючими ділянками Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани. Результати докінгу калікс[4]арену **C-107** в ліганд-зв'язуючих ділянках Na^+, K^+ -АТРази свідчать про те, що цей каліксарен може розміщуватися у просторі декількох областей ліганд-зв'язувальних ділянок ензиму. При цьому встановлені деякі особливості у взаємодії ліганду з ензимом. Зокрема, важливу участь у взаємодії каліксаренової чаші **C-107** із ензимом відіграють гідрофобні (стеричні) взаємодії. Тобто залишки ароматичних амінокислот «фіксують» каліксарен в області зв'язування із білком. В той же час залишки негативної та позитивної заряджені амінокислот формують водневі зв'язки із NH -групами аміно-фосфонових фрагментів та атомами кисню метиленбісфосфонатних фрагментів каліксарену **C-107**. Таким чином гідрофільні фрагменти каліксарену як би задають “вектор напрямку”, у якому фіксується молекула **C-107** в області взаємодії із ензимом. Вивчалися і міжмолекулярні водневі зв'язки у системі “калікс[4]арен – білок”.

характерним є водневий зв'язок, в якому беруть участь фосфатна та аміногрупа бічних залишків калікс[4]арену. Менш характерні водневі зв'язки, в яких беруть участь інші атоми бічних залишків калікс[4]арену. Для каліксаренової чаші водневі зв'язки з атомами білка не характерні.

Отже отримані нами результати комп'ютерного моделювання відповідають експериментальним даним стосовно здатності калікс[4]арену **C-107** впливати на ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази.

Ми вивчали механокінетику процесу «скорочення-розслаблення» ГМ сліпої кишки (саесум) щурів у випадку дії калікс[4]арену **C-99** та убаїну. Скорочення ГМ відбувається внаслідок зростання концентрації Ca^{2+} в міоцитах, яке відбувається за рахунок входу позаклітинного Ca^{2+} у цитоплазму через потенціал- та рецепторкеровані кальцієві канали. Беручи до уваги, що калікс[4]арен **C-99** і убаїн інгібували ензиматичну активність Na^+, K^+ АТРази, ми припустили, що їхній вплив на параметри скоротливої активності ГМ має бути подібним.

В умовах дії убаїну і калікс[4]арену **C-99** значення нормованих максимальних швидкостей V_n у випадку фаз скорочення та розслаблення зменшувались порівняно з контролем. Ми показали, що убаїн (10 мкМ) та калікс[4]арен **C-99** (10 мкМ) вірогідно пригнічували амплітуду скоротливих відповідей індукованих як калієвою деполяризацією, так і аплікацією ацетилхоліну. За деякими механокінетичними показниками ці сполуки як в якісному, так і в кількісному відношенні, односпрямовано змінюють скоротливі відповіді, які були викликані гіперкалієвою деполяризацією та аплікацією ацетилхоліну в нормальному та номінально безкальцієвому розчині Кребса. Проте, у випадку скорочень, індукованих ацетилхоліном, вплив ефекторних речовин на максимальну нормовану швидкість розслаблення ГМ V_{nr} суттєвим чином відрізняється: ефективне гальмування цієї швидкості спостерігається в присутності калікс[4]арену **C-99**, тоді як за наявності убаїну цей показник залишається на рівні контролю.

I, нарешті, на останньому етапі наших досліджень було продемонстровано, що калікс[4]арен-діамінометилфосфонова кислота (калікс[4]арен **C-107**) здатна, як така, гідролізувати АТР.

Виявилось, що кінетична крива процесу гідролізу не підпорядковується закономірностям реакцій низьких порядків (нульового, першого) і є негіперболічною (у часі), а максимальна кількість продукту реакції – неорганічного фосфату P_i , не перевищує 6 % від початкової кількості АТР у середовищі інкубації.

Процес каліксарен-залежного гідролізу АТР є вельми повільним: характеристичний час реакції τ (“період напівнасичення”) становить 10-11 хв. Швидкість каліксарен-залежного гідролізу АТР перевищує швидкість спонтанного гідролізу нуклеозидтрифосфату щонайменше в 14-15 разів.

Методом обернено-фазної вискоєфективної рідинної хроматографії було досліджено процес комплексоутворення калікс[4]арену **C-107** з АТР у системі “ацетонітрил/вода”. За допомогою методів молекулярного моделювання була розрахована оптимальна геометрія 3^{ox} можливих варіантів структури комплексу **C-107** з АТР. Ці структури стабілізуються міжмолекулярними водневими зв'язками різних типів, а також, можливо, більш слабкими взаємодіями: π - π , ОН- π , NH_2^+ - π .

Були досліджені залежності кінетичних характеристик реакції від концентрації реагентів: максимальне значення вивільненого P_i не залежить від концентрації АТР та лінійно збільшується із підвищенням концентрації калікс[4]арену **C-107**, крім цього з підвищенням концентрації АТР або калікс[4]арену максимальна миттєва швидкість реакції зростає, а характеристичний час реакції зменшується.

Середовище інкубації, яке ми використовували для дослідження неензиматичного гідролізу АТР, містило 3 мМ MgCl_2 . Проте, як показали експерименти, гідроліз АТР (1 мМ), що був індукований калікс[4]ареном **C-107** (100 мкМ), не залежав від присутності іонів Mg: за присутності зазначених іонів кількість P_i , що звільнявся, була практично такою ж, як і у відсутності

Mg^{2+} (“контроль”). Еквімолярна заміна іонів Mg на іони Ca також не впливала на рівень гідролізу АТР стосовно “контролю”. Проте іони Co, Mn, Zn, Ni, Sr, Pb та Ba (3 мМ) пригнічували каліксарен-залежний гідроліз АТР; в присутності ж іонів Cu (3 мМ) він практично не спостерігався.

Був вивчений вплив рН на реакцію гідролізу АТР, індукованого калікс[4]ареном **C-107**. Показано, що залуження середовища інкубації в діапазоні рН від 6,0 до 8,0 підсилює каліксарен-залежний гідроліз АТР: рН-залежність при підвищенні рН від 6,0 до 7,4 була майже лінійною, при подальшому ж збільшенні водневого показника вона виходила на стійке плато.

Величина енергії активації калікс[4]арен-індукованого гідролізу АТР, що була визначена методом Вант-Гоффа, становила $50,7 \pm 8,9$ кДж/моль. Цей показник близький до такого, що є властивим для реакцій ензиматичного гідролізу АТР транспортною Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРазою [313].

Калікс[4]арен **C-107**-індукований гідроліз АТР не чутливий до зміни в'язкості та іонної сили середовища інкубації.

Ми припускаємо, що результати, які були одержані нами при вивченні впливу калікс[4]арену **C-107** на гідроліз АТР, можуть бути перспективними для більш кращого розуміння молекулярних механізмів реакцій як супрамолекулярного неензиматичного, так і ензиматичного (зокрема, Ca^{2+}, Mg^{2+} -залежного та Na^+, K^+ -залежного) гідролізу АТР, процесів АТР-залежного транспорту іонів Ca у субклітинних мембранних структурах, а також з точки зору спрямованої розробки своєрідних “молекулярних платформ” на основі каліксаренів для створення штучних (“абіогенних”) каталізаторів, здатних гідролізувати АТР. З іншого боку, у зв'язку з тим, що для каліксаренів є притаманною бактерицидна, антивірусна, протипухлинна та антитромботична активність, вони практично не проявляють токсичної дії на клітини, у випадку розробки ліків на основі даних макроциклів треба, очевидно, мати на увазі, що, принаймні, деякі з них можуть утворювати комплекси з АТР (та іншими нуклеозидтри- та нуклеозиддифосфатами) та гідролізувати цей метаболіт.

Таким чином, проаналізувавши одержані дані можна припустити, що калікс[4]арен **C-107** дійсно є комплексоутворювачем для АТР.

З формально-кінетичної точки зору усі ці дані вказують на складність механізму каліксарен-залежної реакції гідролізу АТР. Очевидно, що питання з'ясування цього механізму потребує подальшої розробки. Проте на основі отриманих результатів можна стверджувати, що такий кінетичний параметр, реакції гідролізу АТР, як наприклад, характеристичний час реакції, лінійно спадає із збільшенням залежить від концентрації АТР; отже, цей параметр може бути використаний для визначення концентрації АТР в біологічних рідинах, що є актуальним для аналітичної біохімії. Очевидно, що явища комплексоутворення каліксаренів з АТР, а також каліксарен-залежного гідролізу цього нуклеозидтрифосфату, становлять безперечний інтерес як з точки зору біоорганічної хімії та біохімії, так і біотехнології та фармакології.

На основі одержаних результатів та даних літератури ми пропонуємо узагальнюючу схему, на якій представлені потенційні мішені впливу калікс[4]аренів на АТР-гідролази ГМК (рис. 2).

Отже, доведено, що калікс[4]арен **C-90** пригнічує активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ і СР, не впливає на активність Na^+ , K^+ -АТРази ПМ та транспорт Са в МХ, а також активує АТРази міозину. Калікс[4]арен **C-107** інгібує активність Na^+ , K^+ -АТРази ПМ, а також підвищує активність АТРази міозину (дані Р.Д. Лабинцевої). Обидва калікс[4]арени не впливають на активність «базальної» Mg^{2+} -АТРази.

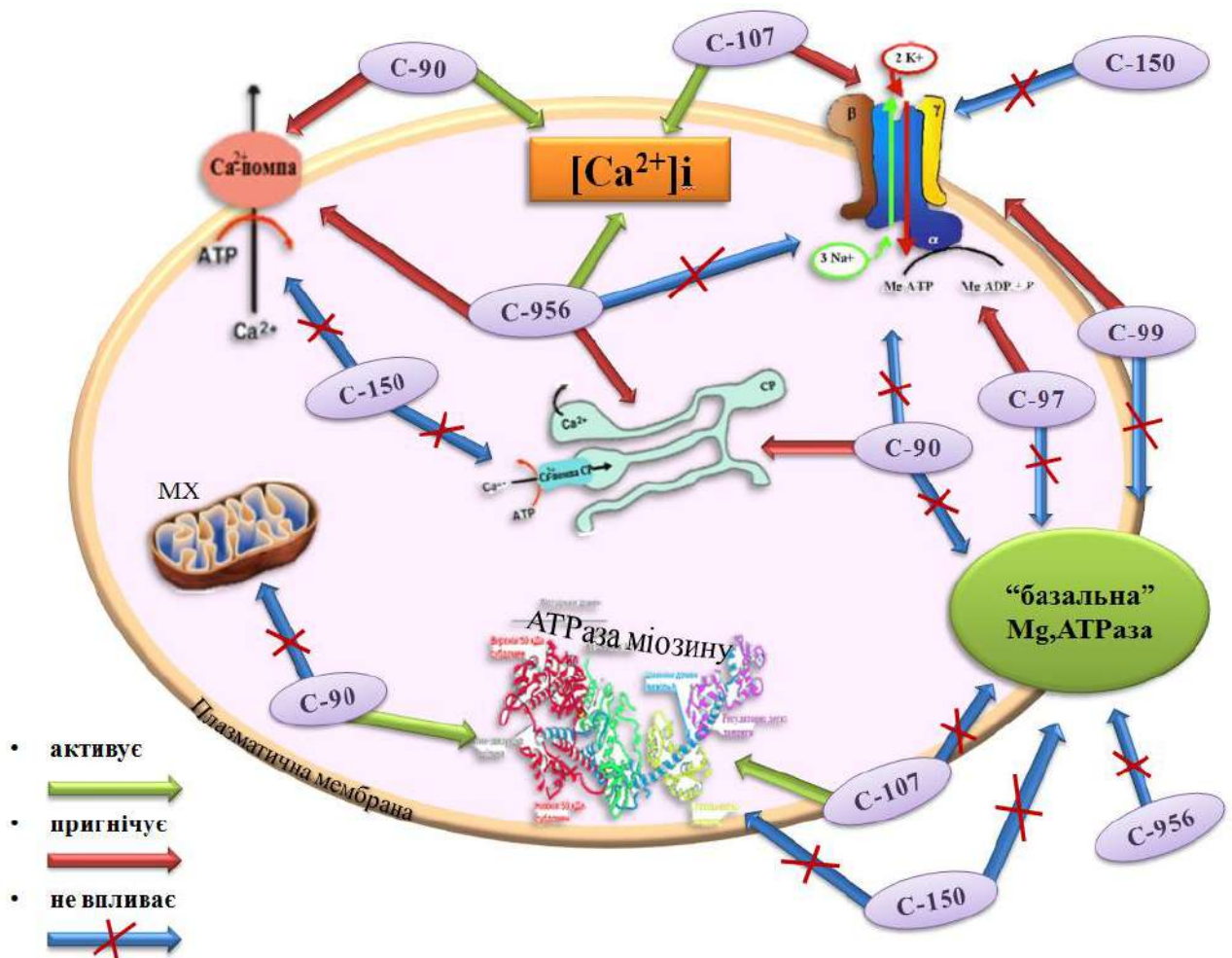


Рис. 2. Потенційні мішені впливу циклічних олігомерів фенолів (калікс[4]аренів) на АТР-гідролази гладеньком'язових клітин.

Представлені в роботі результати мають значення для більш глибокого розуміння біохімічних та фізико-хімічних властивостей транспортувальних електроензимів - Ca^{2+} - та Na^+, K^+ -транспортувальних Mg^{2+} , АТРазних систем ПМ і СР гладеньком'язових клітин, та механізмів спрямованої регуляції функціональної активності цих систем. Вони поглиблюють відомості стосовно іонних, молекулярних та мембранних механізмів внутрішньоклітинного кальцієвого обміну в ГМ, зокрема, щодо ролі ПМ у забезпеченні електро- та фармакомеханічного спряження в них.

Відповідно, одержані дані свідчать на користь того, що вибрані калікс[4]арени можуть бути успішно використані в лабораторній практиці як

селективні афінні інгібітори Mg^{2+} , АТФ-залежних катіон-транспортувальних електроензимів при вивченні однієї з нагальних проблем біохімії, біофізики та клітинної біології – з'ясуванні мембранних механізмів внутрішньоклітинної кальцієвої сигналізації.

Ми сподіваємося, що калікс[4]арени, що були вивчені нами, є перспективними для розбудови ліків нового покоління – селективних модуляторів функціонування АТФ-залежних мембранозв'язаних ензиматичних систем катіонного (Ca^{2+} , Na^{+}) транспорту. Це важливо для подальшого прогресу у боротьбі з патологічними станами, пов'язаними із порушеннями внутрішньоклітинного іонного (перш за все кальцієвого) гомеостазу (слабкість пологової діяльності, викидні, гіпертензія, ішемія/гіпоксія, діабет, різноманітні нейропатії тощо).

ВИСНОВКИ

Дисертацію присвячено комплексному біохімічному дослідженню закономірностей та механізмів впливу каліксаренів – циклічних олігомерів фенолів на каталітичну та транспортувальну активності Mg^{2+} -АТР-залежних електроензимів (кальцієва та натрієва помпи) плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин матки та на внутрішньоклітинний кальцієвий гомеостаз. Роботу виконано на міждисциплінарному рівні («Біохімія (ензимологія, біохімічна мембранологія)» + «Біофізична хімія» + «Органічна хімія» + «Супрамолекулярна хімія»).

Одержані в роботі дані дають підстави зробити наступні висновки:

1. Показано, що калікс[4]арен **C-107** здатен до взаємодії з мембранними фрагментами і, формуючи комплекси з декількома мембранними везикулами, сприяє їхній агрегації між собою або з мікрочастинками калікс[4]арену. Встановлено, що цей калікс[4]арен може не тільки вбудовуватись та накопичуватись в мембрані, а також проникати крізь неї.

2. Доведено, що калікс[4]арени **C-99** та **C-107** здатні проявляти мембранотропні ефекти. Під впливом калікс[4]арену **C-107** знижується кількість центрів взаємодії з зондом АНС на поверхні плазматичної мембрани, що свідчить про зміни полярності та поверхневого заряду мембрани.

3. Вперше встановлено, що калікс[4]арен **C-90** селективно та ефективно ($I_{0,5} = 20,2 \pm 0,5$ мкМ) пригнічує активність транспортної Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани, не впливаючи на активності Na^+, K^+ -АТРази, Mg^{2+} -АТРази і Ca^{2+} -АТРази. Інгібувальна дія калікс[4]арену **C-90** на Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРазну активність передусім пов'язана саме з кооперативним впливом чотирьох просторово орієнтованих на калікс[4]ареновій платформі сульфониламідинних груп, але не з дією тетрафенольного макроциклу як такого чи з дією окремої фармакофорної групи.

4. Показано, що, у випадку транспортної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани, калікс[4]арен **C-90** зменшує максимальну початкову швидкість V_{\max} реакції гідролізу АТР, але не впливає на коефіцієнти активації для іонів Ca та Mg, уявну константу Міхаеліса K_m за АТР. Таким чином, калікс[4]арен **C-90** діє як повний неконкурентний інгібітор $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази.

5. Вперше встановлено, що калікс[4]арен **C-90** (100 мкМ) пригнічує транспортну функцію Mg^{2+} -АТР-залежної Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани у міоцитах матки. Згідно з результатами математичного моделювання калікс[4]арен **C-90** (1-25 мкМ) має збільшувати концентрацію Ca^{2+} в незбуджених міоцитах міометрія. Ці дані підтверджуються експериментальними результатами, одержаними за допомогою флуоресцентної конфокальної мікроскопії, згідно з якими ця сполука дійсно підвищує концентрацію Ca^{2+} у міоцитах.

6. Показано, що калікс[4]арен **C-90** (50 мкМ), подібно до дії утеротоніка окситоцину (100 нМ), призводив до зменшення гідродинамічного діаметру міоцитів на 27 ± 4 % відносно контрольного значення. Цей калікс[4]арен підсилює швидкість скорочення міометрія у відповідь на стимуляцію утеротоніком окситоцином, а також пригнічує релаксацію м'язевого скорочення в режимі реєстрації спонтанної активності смужок міометрія.

7. Вперше показано, що калікс[4]арени **C-97**, **C-99** та **C-107** селективно інгібують ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази у плазматичній мембрані, не впливаючи на активність Mg^{2+} -АТРази. Ці калікс[4]арени дозозалежно та значно ефективніше, ніж кардіоактивний стероїд убаїн, пригнічують активність Na^+, K^+ -АТРази (значення уявних коефіцієнтів інгібування становить 33 ± 4 нМ, 98 ± 8 нМ, 54 ± 6 нМ та 21 ± 5 мкМ, відповідно для калікс[4]аренів **C-97**, **C-99**, **C-107** та убаїну). В прояві інгібуючої дії калікс[4]арену **C-107** на активність Na^+, K^+ -АТРази важливе значення мають: сукупний ефект каліксаренової чаші та фрагменту **M-3**; взаємне розташування

амінофосфонових груп у молекулі калікс[4]арену; модифікація верхнього та нижнього вінця молекули калікс[4]арену.

8. Калікс[4]арени **C-97** та **C-107** зменшують спорідненість Na^+, K^+ -АТРази до іонів Na та не впливають на спорідненість до іонів Mg та АТР, а також підсилюють інгібувальну дію убаїну на Na^+, K^+ -АТРазну активність. Із залученням методів докінг-аналізу проведено комп'ютерне моделювання міжмолекулярних взаємодій, характерних для комплексів “ліганд (калікс[4]арен **C-107** та модельні сполуки) – рецептор (ліганд-зв’язувальні ділянки Na^+, K^+ -АТРази)”. На основі одержаних результатів ідентифіковані амінокислотні залишки, які взаємодіють з даними лігандами, визначено силові зв’язки, що стабілізують комплекс.

9. Встановлено, що деякі калікс[4]арени (**C-107** та **C-160**) здатні стимулювати неензиматичний гідроліз АТР. На прикладі калікс[4]арену **C-107** досліджено кінетичні та концентраційні залежності реакції гідролізу АТР: крива процесу гідролізу не підпорядковується закономірностям реакцій низьких порядків.

10. Одновалентні катіони, а також Ca^{2+} та Mg^{2+} , не впливають на калікс[4]арен-індукований неензиматичний гідроліз АТР, а Cu^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} та Sr^{2+} пригнічують цей процес. Цей гідроліз чутливий до зміни рН та температури (збільшується при підвищенні рН та зростанні температури, $E_a \sim 50$ - 60 кДж/моль), і не чутливий до зміни в’язкості та іонної сили середовища інкубації.

11. У фундаментальному аспекті одержані результати є суттєвими для тлумачення біохімічних та фізико-хімічних властивостей катіон-залежних АТРазних систем плазматичної мембрани і саркоплазматичного ретикулуму гладеньком’язових клітин та регуляції транспортної активності цих систем. Вони поглиблюють відомості стосовно іонних, молекулярних та мембранних механізмів кальцієвого обміну у гладеньких м’язах, зокрема, щодо вивчення

ролі плазматичної мембрани у забезпеченні електро- та фармакомеханічного спряження в них.

В практичному аспекті одержані результати можуть бути корисними для подальшої розбудови високоафінних, низькомолекулярних, нетоксичних та селективних фармакологічних препаратів – регуляторів функціональної активності енергозалежних Ca^{2+} -транспортувальних систем міометрія. Приймаючи до уваги низьку токсичність калікс[4]арену **C-90**, він є перспективним для клінічної практики у якості препаратів для стимуляції пологів під час їх ускладнень або для підвищення базального тону міометрія.

ПЕРЕЛІК ЦИТОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Абрамян Р. А., Григорян В. Ф. Анализ структуры преждевременных родов и связанных с ними перинатальных потерь (2006-2010 гг.). Неонатология, хірургія та перинатальна медицина. 2011, 1(1): 26-29.
2. Авдонин П.В., Ткачук В.А. Рецепторы и внутриклеточный кальций. М.: Наука, 1994. 288с.
3. Андрология. Мужское здоровье и дисфункция репродуктивной системы. Под ред. Э. Нишлага, Г.М. Бере. Перевод с англ. под ред. И.И. Дедова. Москва: МИА. 2005. 551 с.
4. Бабіч Л.Г. Мембранні механізми регуляції концентрації іонів Са у гладеньком'язових клітинах. Укр. біохім. журн. 1999, 71(5): 10-22.
5. Бабіч Л.Г., Шликов С.Г., Костерін С.О. Транспорт Са²⁺ в мітохондріях гладеньких м'язів. Український біохімічний журнал. 2014, 86(6): 18-30.
6. Бабич Л.Г., Шликов С.Г., Борисова Л.А. та ін. Влияние этанола на активность энергозависимых Са²⁺-транспортирующих систем клеток миометрия. Украинский биохимический журнал. 2000, 72(1): 32-41.
7. Бабич Л.Г., Шлыков С.Г., Борисова Л.А., Костерин С.А. Энергозависимый транспорт Са²⁺ во внутриклеточных структурах гладкой мышцы. Биохимия. 1994, 59(8): 1218-1229.
8. Бабич Л.Г., Фомин В.П., Костерин С.А. Влияние мембранного потенциала на Mg²⁺, АТР-зависимый транспорт Са²⁺ через гладкомышечную сарколему. Биохимия. 1990, 55: 1890-1901.
9. Бевза О.В., Векліч Т.О., Шкрабак О.А., Родік Р.В., Кальченко В.І., Костерін С.О. Калікс[4]арен С-107 як високоафінний супрамолекулярний інгібітор Na⁺,K⁺-АТР-ази плазматичної мембрани. Укр. біохім. журн. 2013, 85(2): 5-19.
10. Болдырев А.А. Na⁺,K⁺-АТР-аза как олигомерный ансамбль. Биохимия. 2001, 66(6):1013-1025.
11. Болдырев А.А. Na⁺,K⁺-АТР-аза – свойства и биологическая роль. Соросовский образовательный журнал. 1998, 4: 2-9.

12. Болдырев А. Функциональная активность Na, K-АТФ-азы тканей в норме и при патологиях. Украинский биохимический журнал. 1992, 64(5): 3-10.
13. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. Биокинетика: практический курс. М.: ФАИР-ПРЕСС, 1999. 720 с.
14. Введение в биомембранологию. Под. ред. Болдырева А.А. М.: Изд-во МГУ. 1990. 280 с.
15. Векліч Т.О., Костерін С.О. Дослідження властивостей Na^+, K^+ -АТФ-ази плазматичної мембрани клітин міомеріа. Буковинський медичний вісник. 2005, 9(2): 36-38.
16. Векліч Т.О., Костерін С.О. Порівняльне дослідження властивостей Na^+, K^+ -АТФ-ази та Mg^{2+} -АТФ-ази плазматичної мембрани міомеріа. Укр. біохім. журн. 2005, 77(2): 66-75.
17. Векліч Т.О., Костерін С.О., Родік Р.В. та ін. Вплив каліксаренфосфонової кислоти на Na^+, K^+ -АТФ-азну активність у плазматичній мембрані гладеньком'язових клітин. Український біохімічний журнал. 2006, 78(1): 70-86.
18. Векліч Т.О., Костерін С.О., Шинлова О.П. Катіонна специфічність системи акумуляції Ca^{2+} в мітохондріях клітин гладенького м'яза. Український біохімічний журнал. 2002, 74(1): 42-48.
19. Векліч Т.О., Кочешкова Н.С., Родік Р.В., Бойко В.І., Воробець З.Д., Костерін С.О. Порівняльне дослідження впливу каліксаренів на Na^+, K^+ -АТФазну активність в плазматичній мембрані скоротливих та рухливих клітин. Укр. біохім. журн. 2007, 79(3): 19-28.
20. Векліч Т.О., Мазур Ю.Ю., Костерін С.О. Mg^{2+} , АТФ-залежна кальцієва помпа плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин. I. Структурна організація та властивості. Укр. біохім. журн. 2015, 87(1): 5-20.
21. Векліч Т.О., Мазур Ю.Ю., Костерін С.О. Mg^{2+} , АТФ-залежна кальцієва помпа плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин. II. Регуляція активності. Укр. біохім. журн. 2015, 87(2): 5-25.
22. Векліч Т.О., Шкрабак О.А., Костерін С.О. та ін. Каліксарени С-97 та С-107 стимулюють вплив убаїну на Na^+, K^+ -АТФазну активність у плазматичній

мембрані гладеньком'язових клітин. Український біохімічний журнал. 2006, 78(6): 53-63.

23. Векліч Т.О., Шкрабак О.А., Костерін С.О., Родік Р.В., Бойко В.І., Кальченко В.І. Патент на винахід № а201611842, МПК(2016.01): С07С 15/16, С07С 311/51, А61Р 15/04. 5,11,17,23-тетра(трифтор)-метил(фенілсульфоніліміно)метиламіно-25,27-діоктилокси-26,28-дипропоксикалікс[4]арен (калікс[4]арен С-956) як селективний інгібітор Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани клітин міометрія. Рішення про видачу патенту на винахід від 10.10.2018 № 24293/3А/18.

24. Векліч Т.О., Шкрабак О.А., Мазур Ю.Ю., Родік Р.В., Бойко В.І., Кальченко В.І., Костерін С.О. Кінетичні закономірності дії калікс[4]арену С-90 на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазну активність плазматичної мембрани та на концентрацію Ca^{2+} в незбуджених клітинах міометрія. Укр. біохім. журн. 2013, 85(4): 20-29.

25. Векліч Т., Шкрабак О., Мазур Ю. Активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин селективно пригнічується калікс[4]ареном С-90. Вісник Львівського університету. 2014, вип. 68: 337-347.

26. Векліч Т.О., Шкрабак О.А., Мазур Ю.Ю., Родік Р.В., Кальченко В.І., Костерін С.О. Кінетика інгібіторної дії калікс[4]арену С-90 на активність транспортної Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин. Укр. біохім. журн. 2014, 86(5): 37-46.

27. Векліч Т.О., Шкрабак О.А., Ніконішина Ю.В., Родік Р.В., Кальченко В.І., Костерін С.О. Калікс[4]арен С-90 як перспективна супрамолекулярна сполука для регуляції активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин. Збірник наукових праць «Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології». 2017, 15(2): 373-380.

28. Векліч Т.О., Шкрабак О.А., Родік Р.В., Бойко В.І., Кальченко В.І., Костерін С.О. Просторова будова каліксарен-амінофосфонових кислот є суттєвою для прояву їхньої інгібуючої дії на Na^+ , K^+ -АТР-азну активність у плазматичних мембран гладеньком'язових клітин. Укр. біохім. журн. 2010, 82(1): 21-33.

29. Векліч Т.О., Шкрабак О.А., Родік Р.В., Кальченко В.І., Костерін С.О. Вплив

каліксарену С-107 на кінетичні параметри Na^+, K^+ -АТР-ази плазматичної мембрани міоцитів матки. Укр. біохім. журн. 2011, 83(2): 36-44.

30. Векліч Т.О., Шкрабак О.А., Родік Р.В., Кальченко В.І., Костерін С.О. Калікс[4]арени С-107 та С-90 вбудовуються у ліпідний бішар плазматичних мембран та змінюють її структуру. Збірник наукових праць «Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології». 2020, 15(3): 373-380.

31. Т.О. Векліч, Шкрабак О.А., Родік Р.В., Кальченко В.І., Костерін С.О. Каліксарен С-107 збільшує спорідненість Na^+, K^+ -АТР-ази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин до убаїну. Укр. біохім. журн. 2011, 83(1): 38-44.

32. Векліч Т.О., Шкрабак О.А., Черенок С.О., Кальченко В.І., Костерін С.О. Порівняльне дослідження впливу калікс[4]арену С-99 та його аналогів на Na^+, K^+ -азну активність у плазматичній мембрані міоцитів матки. Укр. біохім. журн. 2012, 84(6): 49-57.

33. Владимиров Ю.А. Кальциевые насосы живой клетки. Соросовский образовательный журнал. 1998, 3: 20-27.

34. 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.

35. Гринштейн С.В., Кост О.А. Структурно–функциональные особенности мембранных белков. Успехи биологической химии. 2001, 41: 77-104.

36. Гулая Н.М., Бабич Л.Г., Шлыков С.Г. и др. Влияние N-пальмитоилэтаноламина на энергозависимый транспорт Ca^{2+} в везикулах сарколемы миомерия и их фосфолипидный состав. Украинский биохимический журнал. 1997, 69(4-5): 64-73.

37. Гютше Ч.Д. Каликсарены. Химия комплексов “гость-хозяин”. / Под ред. Фегтле Ф. и Вебера В. М.: Мир, 1988, 445с.

38. Данилович Г.В. Кінетичні властивості Mg^{2+} -залежної АТР-ази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : спец. 03.00.04 “біохімія”. Київ. 2005. 20 с.

39. Данилович Г.В., Данилович Ю.В., Коломієць О.В. та ін. Зміни поляризації плазматичної та внутрішньої мітохондріальної мембран клітин міометрія за дії каліксаренів – інгібіторів Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани. Український біохімічний журнал. 2012, 84(6): 37-48.
40. Данилович Г.В., Костерін С.О. Ідентифікація та характеристика «базальної» Ca^{2+} -незалежної Mg^{2+} -залежної АТР-гідролазної ферментативної активності у фракції плазматичних мембран гладеньком'язових клітин. Український біохімічний журнал. 2001, 73(6): 30-40.
41. Данилович Ю.В., Карахім С.О. Дія нітрит-аніонів і пероксиду водню на поверхневій властивості плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин. Український біохімічний журнал. 2008, 80(5): 52-61.
42. Данилович Ю.В., Чуніхін О.Ю., Данилович Г.В. Тестування змін розмірів міоцитів матки за діх модуляторів її скоротливої активності методом лазерної кореляційної спектроскопії. Український біохімічний журнал. 2013, 59(1): 32-39.
43. Добрецов Г.Е., Владимиров Ю.А. Исследование белков и мембран с помощью флуоресцентных зондов. Успехи биологической химии. 1975, 16: 115-134.
44. Дубицький Л.О. Вовканич Л.С. Interaction of metal cations with Ca^{2+} -transport sites of the plasma membrane Ca^{2+} pump of secretory cells of gastric glands. Український біохімічний журнал. 2003, 75(2): 39-46.
45. Зварич Е.И. Кальциевая АТРаза плазматической мембраны. Структура и функции. Биологические мембраны. 1991, 8(6): 565-584.
46. Золотухін М.С., Дабіжа Л.П., Мациніп О.М. Профілактика невиношування вагітності. МК-14І. Збірник наукових праць «Невиношування вагітності». 2007: 145-148.
47. Кальченко В.И. Функциональные каликсареновые наноструктуры. Теоретическая и экспериментальная химия. 2018, 54(2): 69-76.
48. Кальченко В.И., Костерин С.А., Веклич Т.А., Родик Р.В., Шкрабак А.А., Мазур Ю.Ю., Слинченко Н.Н. Синтез новых перспективных

утеростимуляторов на основе каликсаренсульфониламидинов и их биохимическая активность. Монография: Фундаментальные проблемы создания новых веществ и материалов химического производства. Киев: Академперіодика. 2016, 224-235.

49. Кальченко В.І., Родік Р.В. Супрамолекулярні наномашини та старт-матеріали. *Visn. Nac. Acad. Nauk. Ukr.* 2017, 1:82-88.

50. Кальченко В.І., Родік Р.В., Бойко В.І. Каліксарени. Перспективи медико-біологічного застосування. *Журнал органічної та фармацевтичної хімії.* 2006, 3(4):13-29.

51. Капля А.А. Структурная организация и функциональная роль изоферментов Na^+, K^+ -АТФ-азы. К.: "Киевский университет". 1998, 162 с.

52. Капля А.А., Костерин С.А., Курский М.Д. АТФазная активность и аккумуляция кальция во фракции плазматических мембран миомерия крольчих в состоянии функционального покоя и при беременности. *Биохимия.* 1982, 47(9): 1499-1503.

53. Капля А.А., Кравцов А.В. Молекулярные механизмы рецепции сердечных гликозидов Na^+, K^+ -АТФазой. *Успехи современной биологии.* 1999, 119(1): 84-94.

54. 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.

55. Карбовська Л.С., Горенко З.А., Лисай І.П. та ін. Вплив окситоцину на рівень жовчоутворення і хімічний склад жовчі у щурів. *Фізика живого.* 2010, 18(2): 70-74.

56. Клюева А.В., Левчук Ю.Н., Набока Ю.Н. Фотон-корреляционная спектроскопия белков. *Український біохімічний журнал.* 2002, 74(5): 12-26.

57. Кокунин В.А. Статистическая обработка данных при малом числе опытов. *Украинский биохимический журнал.* 1975, 47(6): 776-791.

58. Кондратюк Т.П., Быченко С.Ф., Прищепа Л.А. та ін. Выделение и характеристика фракции плазматических мембран миомерия свинки. *Украинский биохимический журнал.* 1986, 58(4): 50-56.

59. Кондратюк Т.П., Курский М.Д. Системы вторичных посредников и функция гладких мышц. К.: Наук. Думка, 1992. 260 с.
60. Косников В.В. Методы измерения трансмембранных электрических потенциалов в клетке. Український біохімічний журнал. 1990, 62(1): 3-16.
61. Костерін С.О. Кінетичні та енергетичні аспекти впливу діелектричної проникності середовища інкубації на каталітичну та транспортну активність Mg^{2+} , АТР-залежної кальцієвої помпи плазматичної мембрани. Український біохімічний журнал. 2000, 72(4): 44-60.
62. Костерин С. А. О возможной H^+ -зависимой функциональной связи между плазматической мембраной и митохондриями в гладкомышечных клетках. Украинский биохимический журнал. 1998, 70(6): 152-160.
63. Костерин С.А. Транспорт кальция в гладких мышцах. К.: Наук. думка, 1990. 216с.
64. Костерін С.О., Кальченко В.І., Векліч Т.О. та ін. Калікс[4]арени як модулятори АТР-гідролазних систем гладеньком'язових клітин. Київ: Наукова Думка, 2019. 266 с.
65. Костерін С.О., Бабіч Л.Г., Шликов С.Г. та ін. Біохімічні властивості та регуляція Ca^{2+} -транспортувальних систем мембранних структур гладеньком'язових клітин. Київ: Наукова Думка, 2016. 210 с.
66. Костерин С.А., Бабич Л.Г., Шлыков С.Г., Ровенец Н.А. Mg^{2+} , АТР-зависимый транспорт Ca^{2+} в эндоплазматическом ретикулуме клеток миометрия. Биохимия. 1996, 61(1): 73-81.
67. Костерин С.А., Браткова Н.Ф. Mg^{2+} -АТРаза плазматической мембраны гладкомышечных клеток как рН-чувствительный ферментативный сенсор. Докл. академ. наук. (Россия). 1995, 342(5): 696-699.
68. Костерин С.А., Браткова Н.Ф., Бабич Л.Г. и др. Влияние ингибиторов энергозависимых Ca^{2+} -транспортирующих систем на кальциевые насосы гладкомышечной клетки. Украинский биохимический журнал. 1996, 68(6): 50-61.

69. Костерин С.А., Браткова Н.Ф., Зимина В.П. Кинетические закономерности реакции гидролиза АТФ, катализируемой Mg^{2+} -АТФазой плазматической мембраны гладкомышечных клеток. Биохимия. 1995, 60(9): 1450-1459.
70. Костерин С.А., Браткова Н.Ф., Курский М.Д., Зимина В.П. Свойства системы АТФ-зависимого транспорта Ca^{2+} во фракции плазматических мембран клеток миометрия. Биохимия. 1983, 48(2): 244-253.
71. Костерин С.А., Бурчинская Н.Ф. Метод определения кинетических характеристик Ca^{2+} - транспортирующих систем субклеточных структур гладких мышц. Украинский биохимический журнал. 1987, 59(2): 66-69.
72. Костерин С.О., Веклич Т.О., Прилуцкий Ю.І., Бориско П.О. Кінетичне тлумачення своєрідної рН-залежності ферментативної активності „базальної” Mg^{2+} -АТФазы сарколеми гладенького м'язу. Український біохімічний журнал. 2005, 77(6): 37-45.
73. Костерин С.А., Слинченко Н.Н., Гергалова Г.Л. Энергетические характеристики АТФ-гидролазной реакции, катализируемой сольбилизированной Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТФазой плазматической мембраны гладкомышечных клеток. Биохимия. 1994, 59(6): 889-904.
74. Костюк П.Г. Кальций и клеточная возбудимость. М.: Наука, 1986. 255 с.
75. Кочегаров А.А., Бейлина С.И., Матвеева Н.Б., Леонтьева Г.А. Эффекты ингибиторов Ca^{2+} -АТФаз, иономицина и фармакологических модуляторов рианодинового рецептора на выход кальция из внутриклеточных пулов и сократительную активность в *Physarum polycephalum*. Биохимия. 2000, 65(6): 779-789.
76. Кочешкова Н.С., Воробець З.Д. Системи транспортування Ca^{2+} у сперматозоїдах. Біохімічні механізми капацитації та акросомної реакції. Український біохімічний журнал. 2006, 78(4): 67-79.
77. Кравцов А.В., Алексеенко И.Р. Механизмы регуляции векторных ферментов биомембран. К.: Наук. думка, 1990. 175 с.
78. Кравцов А.В., Кравцова В.В. Регуляция Na^+, K^+ -АТФазы: эффекты ионов Mg и Ca. Український біохімічний журнал. 2001, 73(2): 5-27.

79. Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Курилова Л.С. Механизмы внутриклеточной сигнализации. Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский Гос. Ун-т. 2003. 208 с.
80. Курганов В.И. Аллостерические ферменты. М.: Наука, 1978. 248 с.
81. Курский М.Д., Слинченко Н.Н., Любаковская Л.А. Реконструкция очищенной Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы сарколемы миометрия в липосомы и ее каталитические свойства. Украинский биохимический журнал. 1990, 62(3): 66-71.
82. Кушкевич М.В., Влізло В.В., Мартин Ю.В. Фізіологічний пріон і активність Na^+ , K^+ - та Ca^{2+} -АТФаз плазматичної мембрани клітин довгастого мозку щурів різного віку. Укр. біохім. журн. 2013, 85(2): 52-58.
83. Лабинцева Р.Д., Бевза О.В., Бевза А.А. та ін. Захисний вплив тіакалікс[4]арентетрасульфонату на інгібування АТФ-гідролазної активності субфрагмента А-1 міозину міометрія катіонами важких металів. Український біохімічний журнал. 2014, 86(6): 154-166.
84. Лабинцева Р.Д., Слінченко Н.М., Векліч Т.О. та ін. Порівняльне дослідження впливу каліксаренів на Mg^{2+} -залежні АТФ-гідролазні ферментативні системи гладеньком'язових клітин матки. Український біохімічний журнал. 2007, 79(3): 44-54.
85. Левицкий Д.О. Кальций и биологические мембраны. М.: Высш. Шк., 1990. 127 с.
86. Лопина О.Д. Взаимодействие каталитической субъединицы Na , K -АТФазы с клеточными белками и другими эндогенными регуляторами. Биохимия. 2001, 66(вып. 6): 1389-1400.
87. Лопина О.Д. Na^+ , K^+ -АТФ-аза: структура, механизм и регуляция активности. Биологические мембраны. 1999, 16(6): 584-603.
88. Любаковская Л.А., Слинченко Н.Н., Бурчинская Н.Ф., Курский М.Д. Каталитические свойства очищенной Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы сарколемы миометрия. Биохимия. 1990, 55(7): 1237-1243.
89. Маршал В.Дж. Клиническая биохимия. Москва: Издательство БИНОМ, 2015. 408с.

90. Мензиков С.А., Мензикова О.В. Влияние ионов хлора и бикарбоната на чувствительную к ГАМК_a-эргическим соединениям Mg²⁺-АТФазу плазматических мембран мозга леща (*Abramis brama* L.). Украинский биохимический журнал. 2004, 76(2): 53-58.
91. Мензиков С.А., Ружинская Н.Н., Мензикова О.В. Mg²⁺-АТФаза в мозгу рыб и ее ультраструктурная локализация. Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2000, 36(3): 263-267.
92. Михайлова М.В., Гонтарева Н.Б., Нестеров В.П. Распределение и свойства Mg²⁺-АТФазы в мембранах функционально различных мышц куры. Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 1992, 28(4): 447-453.
93. Мищук Д.О., Капля А.А., Зимина В.П. Чувствительность Na⁺,K⁺-АТФазы коры головного мозга крыс к этанолу при нарушении мембранной структуры додецилсульфатом натрия. Украинский биохимический журнал. 2002, 74(5): 55-61.
94. Музичка О.В., Тяньчук В.Ю., Вовк А.І. та ін. Калікс[4]аренметиленбісфосфонові кислоти: особливості інгібування лужних фосфатаз. Укр. биохим. журн. 2007, 79(6): 26-33.
95. Павлов К.В., Соколов В.С. Электрогенный транспорт ионов Na⁺,K⁺ - АТФазой. Биологические мембраны. 1999, 16(6): 604-637.
96. Пестов Н.Б., Дмитриев Р.И., Шахпаронов М.И. Регуляция Ca²⁺-АТФазы плазматических мембран. Успехи биологической химии. 2003, 43: 99-138.
97. Програма HyperChem:
<http://www.hyper.com/Download/AllDownloads/tabid/470/Default.aspx>.
98. Родік Р.В. Антимікробна та противірусна активність каліксаренів. Журнал органічної та фармацевтичної хімії. 2015, 13(1): 67-78.
99. Родік Р.В. Застосування каліксаренів для трансфекції ДНК у клітини. Український біохімічний журнал. 2012, 84(5): 5-15.
100. Рубцов А.М. Са-АТФаза саркоплазматического ретикулума: молекулярная организация, механизм функционирования и особенности регуляции активности. Успехи биологической химии. 2005, 45: 235-268.

101. Рыбальченко В.К., Коганов М.М. Структура и функции мембран: Практикум – К.: Вища шк. 1988, 312 с.
102. Слинченко Н.Н., Браткова Н.Ф., Костерин С.А. и др. Влияние эозина Y на каталитическую и функциональную активность Mg^{2+} -АТФ-зависимого кальциевого насоса плазматической мембраны гладкомышечных клеток. Биохимия. 1998, 63(вып. 6): 812-819.
103. Слинченко Н.Н., Любаковская Л.А., Курский М.Д., Сопель Л.В. Выделение и очистка Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТФазы плазматических мембран миомерия. Украинский биохимический журнал. 1990, 62(3): 60-65.
104. Слінченко Н.М., Черниш І.Г., Костерін С.О. Використання очищеної Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТФазы плазматичної мембрани клітин міомерія для порівняльної оцінки ефективності дії інгібіторів енергозалежного транспортування іонів кальцію. Український біохімічний журнал. 2003, 75(2): 33-38.
105. Современное состояние жидкостной хроматографии. Под ред. Дж. Киркланда. М.: “Мир”, 1974, 309 с.
106. Степанковская Г.К., Шинлова О.П., Фомин В.П. и др. Влияние окситоцина и сигеритина на транспорт Ca^{2+} во фракции плазматических мембран клеток миомерия. Украинский биохимический журнал. 1989, 61(5): 109-112.
107. Тугай В.А. Регуляторная роль протона в мембранных процессах мышечной клетки. К.: Наукова думка, 1993, 183 с.
108. Формазюк В.Е., Добрецов Г.Е., Деев А.И. и др. Оценка плотности поверхностного заряда липопротеидов плазмы крови человека. Вопр. Мед. химии. 1982, 28(вып. 1): 119-122.
109. Цимбалюк О.В. Влив каліксарену С-99 на скоротливу активність м'язів товстого кишечника щурів. Біологічні студії / Studia Biologica. 2016, 10(3-4): 33-46.
110. Цимбалюк О.В., Костерін С.О. Na^+, K^+ -АТФаза, ендогенні кардіостероїди та їхня трансдукторна роль. Український біохімічний журнал. 2012, 84(1): 5-17.
111. Цимбалюк О.В., Онуфрийчук О.В., Векліч Т.О. та ін. Порівняльне дослідження впливу оубаїну і каліксарен біс-гідроксиметилфосфонової

кислоти на активність Na^+, K^+ -АТР-ази та механокінетику процесу „скорочення - розслаблення” гладенького м'язу. Фізика живого. 2006, 14(1): 53-72.

112. Шинлова О.П., Фомин В.П., Костерин С.А. Влияние окситоцина на кальциевый насос сарколеммы миометрия. Украинский биохимический журнал. 1987, 59(2): 75-79.

113. Шкрабак О.А., Кальченко О.І., Родік Р.В. та ін. Каліксарензалежний гідроліз АТР. I. Кінетика реакції та комплексоутворення між каліксареном С-107 та нуклеозидтрифосфатом. Український біохімічний журнал. 2008, 80(2): 90-100.

114. Шкрабак О.А., Векліч Т.О., Родік Р.В., Бойко В.І., Костерін С.О. Каліксарензалежний гідроліз АТР. II. Каталітичні властивості реакції, стимульованої каліксареном С-107. Укр. біохім. журн. 2008, 80(3): 55-64.

115. Шлыков С.Г., Слинченко Н.Н., Бурдыга Ф.В., Костерин С.А. Утеротоническое действие сигетина и его влияние на Mg^{2+} , АТР-зависимый транспорт и стационарный обмен Ca^{2+} через сарколемму миометрия. Украинский биохимический журнал. 1993, 65(3): 57-65.

116. Шмидт Р., Тевса Г. (Ред.). Физиология человека. Пер. с англ., 3-е изд. М.: Мир, 2005, Т. 1. 323 с.

117. Abramowitz J., Aydemir-Koksoy A., Helgason T. et al. Expression of plasma membrane calcium ATPases in phenotypically distinct canine vascular smooth muscle cells. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 2000, 32(5): 777-789.

118. Adamian L., Naveed H., Liang J. Lipid - binding surfaces of membrane proteins: evidence from evolutionary and structural analysis. Biochimica et Biophysica Acta. 2011, 1808: 1092–1102.

119. Aime S., Barge A., Botta M. et al. A Calix[4]arene Gd^{III} Complex Endowed with High Stability, Relaxivity, and Binding Affinity to Serum Albumin. Angew Chem. Int. Ed. 2001, 40: 4737-4739.

120. Aitken R.J. Molecular mechanisms regulating human sperm functions. Mol. Hum. Reprod. 1997, 3(3): 169-173.

121. Akimova O.A., Tverskoi A.M., Smolyaninova L.V. et al. Critical role of the $\alpha 1$ -Na⁺,K⁺-ATPase subunit in insensitivity of rodent cells to cytotoxic action of ouabain. *Apoptosis*. 2015, 20(9): 1200-1210.
122. Al-Nijji J., Andolf E., Laurini R., Batra S. Nitric oxide synthase activity in human trophoblast, term placenta and pregnant myometrium. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2003, 1(1): 51-58.
123. Alvarez J., Montero M. Measuring [Ca²⁺] in endoplasmic reticulum with aequorin. *Cell Calcium*. 2002, 32: 251-260.
124. 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.
125. Arakawa T.K., Mlynarczyk M., Kaushal K.M. et al. Long-term hypoxia alters calcium regulation in near-term ovine myometrium. *Biol. Reprod.* 2004, 71(1): 156-162.
126. Arduini A., Fabbi M., Mantovani M. et al. Calix[4]arenes Blocked in a Rigid Cone Conformation by Selective Functionalization at the Lower Rim. *J. Org. Chem.* 1995, 60(5): 1454-1457.
127. Arduini A., McGregor W., Paganuzzi D. et al. Rigid cone calix4.arenas as 7i-donor systems: complexation of organic molecules and ammonium ions in organic media. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*. 1996: 839-846.
128. Arena G., Contino A., Gulino F.G. et al. Complexation of small neutral organic molecules by water soluble calix[4]arenes. *Tetrahedron Lett.* 2000, 41: 9327-9330.
129. Armesilla A.L., Williams J.C., Buch M.H. et al. Novel functional interaction between the plasma membrane Ca²⁺-pump 4b and the proapoptotic tumor suppressor Ras-associated factor 1 (RASSF1). *The Journal of Biological Chemistry*. 2004, 279(30): 31318-31328.
130. Arosio D., Fontanella M., Baldini L. et al. A synthetic divalent cholera toxin glycolix[4]arene ligand having higher affinity than natural GM1 oligosaccharide. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127(11): 3660-3661.

131. Auland M.E., Morris M.B., Roufogalis B.D. Separation and characterization of two Mg^{2+} -ATPase activities from the human erythrocyte membrane. *Arch. Biochem. Biophys.* 1994, 312(1): 272-274.
132. Aydemir-Koksoy A., Abramowitz J., Allen J.C. Ouabain-induced signaling and vascular smooth muscle cell proliferation. *The Journal of Biological Chemistry.* 2001, 276(49): 46605-46611.
133. Bab-Dinitz E., Albeck S., Peleg Y. et al. A C-terminal lobe of the beta subunit of Na,K-ATPase and H,K-ATPase resembles cell adhesion molecules. *Biochemistry.* 2009, 48: 8684-8691.
134. 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.
135. Balasahe S., Nimsea T. Kim. Biological applications of functionalized calixarenes. *Chem. Soc. Rev.* 2013, 42: 366-386 .
136. Barrabin H., Garrahan P.J., Rega A.F. Vanadate inhibition of the Ca^{2+} -ATPase from human red cell membranes. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1980, 600(3): 796-804.
137. Bassani R.A., Bassani J.W. Inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump with thapsigargin to estimate the contribution of Na^{+} - Ca^{2+} exchange to ventricular myocyte relaxation. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2003, 36(12): 1717-1723.
138. Bassik M.C., Scorrano L., Oakes S.A. et al. Phosphorylation of Bcl-2 regulates ER Ca^{2+} homeostasis and apoptosis. *EMBO J.* 2004, 23: 1207-1216.
139. Beleznyay Z., Zachowski A., Devaux P.F. et al. Characterization of the correlation between ATP-dependent aminophospholipid translocation and Mg^{2+} -ATPase activity in red blood cell membranes. *Eur. J. Biochem.* 1997, 143(1-2): 58-65.
140. Berchtold M.W., Brinkmeier H., Muntener M. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *American Physiological Society.* 2000, 80(3): 1215-1265.
141. Berridge M.I. Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers.

Biochemical Journal. 1984, 220: 345-360.

142. Bers D.M. Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature*. 2002, 415(6868): 198–205.

143. Betto R., Senter L., Ceoldo S. et al. Ecto-ATPase Activity of α -Sarcoglycan (Adhalin). *The Journal of Biological Chemistry*. 1999, 274(12): 7907-7912.

144. Bhatnagar V., Ramalah A. Characterization of Mg^{2+} -ATPase activity in isolated B16 murine melanoma melanosomes. *Mol. Cell. Biochem*. 1998, 189(1-2): 99-106.

145. Bian J., Chosh T.K., Wang J.-C., Gill D.L. Identification of intracellular calcium pools. Selective modification by thapsigargin. *J. Biol. Chem*. 1991, 266(14): 8801-8806.

146. Biser P.S., Thayne K.A., Fleming W.W., Taylor D.A. Na^+,K^+ -ATPase alpha-subunit isoform distribution and abundance in guinea-pig longitudinal muscle/myenteric plexus after exposure to morphine. *Brain Res*. 2002, 931(2): 186-193.

1471. Blanco G., Sanchez G., Melton R.J. et al. The α_4 isoform of the Na,K -ATPase is expressed in the germ cells of the testes. *J. Histochem Cytochem*. 2000, 48(8): 1023-1032.

148. Blaustein M.P. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca^{2+} stores and cell responsiveness. *American Journal of Physiology*. 1993, 264(6 (Pt 1)): C1367-C1387.

149. Bohmer V. Calixarenes, Macrocycles with (Almost) Unlimited Possibilities. *Angew. Chem. Int. Ed*. 1995, 34: 713-745.

150. Boldyrev A.A. Na^+,K^+ -ATPase: 40 years of investigations. *Membr. Cell. Biol*. 2000, 13(6): 715-719.

151. 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.

152. Brewster R.E., Dalton B.G.A., Shuker S.B. Synthesis of a peptidocalix[4]arene library and identification of compounds with hydrolytic activity. *Bioorganic Chemistry*. 2005, 33: 16-21.
153. Brini M., Carafoli E. Calcium pump in health and disease. *Physiological Reviews*. 2009, 89: 1341-1378.
154. Brini M., Carafoli E. The plasma membrane Ca^{2+} ATPase and the plasma membrane sodium calcium exchanger cooperate in the regulation of cell calcium. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2011: 1-15.
155. Brown H. K., Speechley K. N., Macnab J. et al. Biological determinants of spontaneous late preterm and early term birth: a retrospective cohort study. *BJOG*. 2015, 122(4): P. 491-499.
156. 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.
157. Burdyga T.V., Kosterin S.A. Kinetic analysis of smooth muscle relaxation. *Gen. Physiol. Biophys.* 1991, 10: 589-598.
158. Burdyga T., Richard J. P. Chapter 86 – Calcium Homeostasis and Signaling in Smooth Muscle Muscle, Joseph Hill, Boston/ Waltham. 2012: 1155-1171.
159. Burdyga Th.V., Wray S. The effect of cyclopiazonic acid on excitation contraction coupling in guinea-pig ureteric smooth muscle: role of the sarcoplasmic reticulum. *J. Physiol.* 1999, 517(3): 855-865.
160. Burk S.E., Shull G.E. Structure of the rat plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isoform 3 gene and characterization of alternative splicing and transcription products. *The Journal of Biological Chemistry*. 1992, 267: 19683-19690.
161. Buxton I.L. Regulation of uterine function: a biochemical conundrum in the regulation of smooth muscle relaxation *Mol. Pharmacol.* 2004, 65(5): 1051-1059.
162. Bygrave F.L., Benedetti A. What is the concentration of calcium ions in the endoplasmic reticulum? *Cell Calcium*. 1996, 19: 547-551.

163. Cacciapaglia R., Casnati A., Mandolini L. et al. Catalysis of diribonucleoside monophosphate cleavage by water soluble copper(II) complexes of calix[4]arene based nitrogen ligands. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128(37): 12322-12330.
164. Camello-Almaraz C., Pariente J.A., Salido G., Camello P.J. Differential involvement of vacuolar H⁺-ATPase in the refilling of thapsigargin- and agonist – mobilized Ca²⁺ stores. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 2000, 271(2): 311-317.
165. Carafoli E. Biogenesis: plasma membrane calcium ATPase: 15 years of work on the purified enzyme. *FASEB Journal.* 1994, 13: 993-1002.
166. Carafoli E. Mitochondrial Calcium Transport: Historical Aspects / *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)*, Editors-in-Chief: William J. Lennarz and M. Daniel Lane, Waltham. 2013: 118-126.
167. Carafoli E. The Ca²⁺-pump of the plasma membrane. *The Journal of Biological Chemistry.* 1992, 267(4): 2115-2118.
168. Carafoli E., Fedrizzi L., Domi T. et al. Chapter 132 – Calcium Pumps. *Handbook of Cell Signaling (Second Edition)*, Ralph A. Bradshaw and Edward A. Dennis, San Diego. 2010: 57-61.
169. 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.
170. Cartwright E.J., Oceandy D., Austin C., Neyses L. Ca²⁺ signalling in cardiovascular disease: the role of the plasma membrane calcium pumps. *Science China.* 2011, 54(8): 691-698.
171. Casnati A., Fabbi M., Pelizzi N. et al. Synthesis, antimicrobial activity and binding properties of calix[4]arene based vancomycin mimics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 1996, 6(22): 2699-2704.
172. Casnati A., Sansone F., Ungaro R. Peptido- and glycolixarenes: playing with hydrogen bonds around hydrophobic cavities. *Acc. Chem. Res.* 2003, 36: 246 – 254.
173. Cassidy C. E., Setzer W.N. Cancer-relevant biochemical targets of cytotoxic Lonchocarpus flavonoids: A molecular docking analysis. *J. Mol. Model.* 2010, 16: 311-326.

174. Chalmers S., Olson M.L., Mac Millan D. et al. Ion channels in smooth muscle: Regulation by the sarcoplasmic reticulum and mitochondria. *Cell Calcium*. 2007, 42(4-5): 447-466.
175. Chaudhary J., Walia M., Matharu J. et al. Caloxin: a novel plasma membrane Ca^{2+} -pump inhibitor. *American Journal of Physiology*. 2001, 280(4): C1027-C1030.
176. Chen Y.F., Cao J., Zhong J.N. et al. Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase regulates Ca^{2+} signaling and the proliferation of airway smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.* 2014, 740: 733-741.
177. Chen H.H., Lin Y.R., Peng Q.G., Chan M.H. Effects of trichloroethylene and perchloroethylene on muscle contractile responses and epithelial prostaglandin release and acetylcholinesterase activity in swine trachea. *Toxicol. Sci.* 2005, 83(1): 149-154.
178. Chen H., Tang Z.Y., Yang J.X. et al. Effects of caldesmon, calponin, and tropomyosin on the Mg^{2+} -ATPase activities of smooth muscle myosin. *Chin. Med. Sci. J.* 2004, 19(4): 286-289.
179. 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.
180. Cherenok S., Dutasta J.P., Kalchenko V. Phosphorus-containing chiral macrocycles. *Current Org. Chem.* 2006, 10: 2307–2331.
181. Cherenok S., Kalchenko V. Phosphorus-containing calixarenes. *Topics Heterocyclic Chemistry*. 2009, 20: 229-273.
182. 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.
183. Chernyshenko V.O., Savchuk O.V., Cherenok S.O. et al. Haemostasis modulation by calix[4]arene methylenebisphosphonic acid C-145 and its sulfur-containing analogue. *Ukr. Biochem. J.* 2018, 90(6): 21-30.
184. Christensen S.B. Interpretation of NMR and circular dichroic data of the sesquiterpene lactone thapsigargin. *Acta Chemica Scandinavica*. 1988, B42: 623-628.

185. Clark S.L., Simpson K.R., Knox G.E., Garite T.J. Oxytocin: new perspectives on an old drug. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2009, 200(1): 35.e1–35.e6.
186. 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.
187. 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.
188. Coleman A.W., Perret F., Moussa A. et al. Calix[n]arenes as Protein Sensors. *Top. Curr. Chem.* 2007, 277: 31-88.
189. Colston M.J., Hailes H.C., Stavropoulos E. et al. Antimycobacterial calixarenes enhance innate defense mechanisms in murine macrophages and induce control of *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Infect. Immun.* 2004, 72(11): 6318-6323.
190. 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.
191. Cornelius F., Mahmmoud Y.A., Christensen H.R. Modulation of Na,K-ATPase by associated small transmembrane regulatory proteins and by lipids. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2001, 33: 415-423.
192. Cornelius F., Mahmmoud Y.A., Toyoshima C. Characterization of fluoride-stabilized phosphoenzyme analogues and their interaction with cardiotonic steroids. *The Journal of Biological Chemistry.* 2011, 286(34): 29882–29892.
193. Cortijo J., Villagrasa V., Marti-Cabrera M. et al. The spasmogenic effects of vanadate in human isolated bronchus. *Brit. J. Pharmacol.* 1997, 121(70): 1339-1349.
194. Crambert G., Hasler U., Beggah A.T et al. Transport and pharmacological properties of nine different human Na,K-ATPase isozymes. *The Journal of Biological Chemistry.* 2000, 275(3): 1976-1986.
195. Crotty T.P. Contraction in the smooth muscle cell. *Medical Hypotheses.* 1999, 53(5): 432–446.

196. Cuevas F., Di Stefano S., Magrans J.O. et al. Toward an Artificial Acetylcholinesterase. *Chem. Eur. J.* 2000, 6: 3228-3234.
197. Cunningham H.B., Yazaki P.J., Domingo R.C. et al. The skeletal muscle transverse tubular Mg^{2+} -ATPase: identity with Mg^{2+} -ATPase of smooth muscle and brain. *Arch. Biochem. Biophys.* 1993, 303(1): 32-43.
198. Danylovyh G.V., Kolomiets` O.V., Danylovyh Iu.V. et al. Calix[4]arene C-956 is effective inhibitor of H^+ - Ca^{2+} -exchanger in smooth muscle mitochondria. *The Ukrainian Biochemical Journal.* 2018, 90(1): 25-33.
199. Danylovyh Iu.V., Karakhim S.O., Danylovich H.V. et al. Electrochemical potential of the inner mitochondrial membrane and Ca^{2+} homeostasis of myometrium cells. *The Ukrainian Biochemical Journal.* 2014, 87(5): 61-71.
200. Danylyuk O. Solid-state complexes of water-soluble calixarenes with biorelevant molecules: Dissertation within International Ph.D Studies. Warsaw, 2007: 160p.
201. Darbost U., Rager M.N., Petit S. et al. Polarizing a hydrophobic cavity for the efficient binding of organic guests: the case of calix[6]tren, a highly efficient and versatile receptor for neutral or cationic species. *J Am Chem Soc.* 2005, 127(23): 8517-8525.
202. Da Silva E., Lazar A.N., Coleman A.W. Biopharmaceutical applications of calixarenes. *Journal of Drug Delivery Science and Technology.* 2004, 14(1): 3-20.
203. Daub B., Ganitkevich V. An estimate of rapid cytoplasmic calcium buffering in a single smooth muscle cell. *Cell Calcium.* 2000, 27(1): 3-13.
204. De Fatima A., Fernandes S. A., Sabino A. A. Calixarenes as new platforms for drug design. *Curr. Drug Disc. Tech.* 2009, 6: 151-170.
205. De Juan-Sanz J., Nunez E., Zafra F. et al. Presynaptic control of glycine transporter 2 (GlyT2) by physical and functional association with plasma membrane Ca^{2+} -ATPase (PMCA) and Na^+ - Ca^{2+} exchanger (NCX). *The Journal of Biological Chemistry.* 2014, 289(49): 34308-34324.

206. Delgado J., Moro G., Saborido A., Medias A. T-tubule membranes from chicken skeletal muscle possess an enzymic cascade for degradation of extracellular ATP. *Biochem. J.* 1997, 327(3): 899-907.
207. 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.
208. Denninga E. J., Beckstein O. Influence of lipids on protein-mediated transmembrane transport. *Chemistry and Physics of Lipids.* 2013, 165(6): 638-647.
209. Di Leva F., Domi T., Fedrizzi L. et al. The plasma membrane Ca^{2+} -ATPase of animal cells: Structure, function and regulation. Di Leva F., Domi T., Fedrizzi L. et al. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2008, 476: 65–74.
210. Dick I.M., Glendenning J.L.P., Prince R.L. Estrogen and androgen regulation of plasma membrane calcium pump activity in immortalized distal tubule kidney cells. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2003, 212(1-2): 11-18.
211. Dings R.P.M., Chen X., Hellebrekers D.M.E.I. et al. Design of nonpeptidic topomimetics of antiangiogenic proteins with antitumor activities. *J. Natl. Cancer Inst.* 2006, 98: 932 – 936.
212. Djemli-Shipkolye A., Raccach D., Pieroni G. et al. Differential effect of omega3 PUFA supplementations on Na,K-ATPase and Mg-ATPase activities: possible role of the membrane omega6/omega3 ratio. *J. Membr. Biol.* 2003, 191(1): 37-47.
213. Dodds F., Garcia F., Kowenicki R.A. et al. Synthesis and structure of the calixarene-like phosph(III)azane macrocycle $[\{\text{P}(\mu\text{-N}(\text{t})\text{Bu})\}_2\{1,5\text{-(NH)}_2\text{C}_{10}\text{H}_6\}]_3$. *Chem Commun (Camb).* 2005, 29: 3733-3735.
214. Doyle J., Silber A. Preterm labor: role of the nurse practitioner. *Nurse Pract.* 2015, 40(3): 49-54.
215. Drew D.P., Krichau N., Reichwald K., Simonsen H.T. Guaianolides in apiaceae: perspectives on pharmacology and biosynthesis. *Phytochemistry Reviews.* 2009, 8(3): 581-599.

216. Droogmans G., Maertens C., Prenen J., Nilius B. Sulphonic acid derivatives as probes of pore properties of volume-regulated anion channels in endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 1999, 128(1): 35-40.
217. Droogmans G., Prenen J., Eggermont J. et al. Voltage-dependent block of endothelial volume-regulated anion channels by calix[4]arenes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 1998, 275: 646-652.
218. 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.
219. Dzurba A., Vrbjar N., Breier A. et al. The membrane effect of benfluron: modulation of the heart sarcolemmal Na⁺,K⁺-ATPase and Mg²⁺-ATPase activities. *Gen. Physiol. Biophys.* 1996, 15(1): 71-75.
220. Ekelin M., Svensson J., Evehammar S., Kvist L.J. Sense and sensibility: Swedish midwives' ambiguity to the use of synthetic oxytocin for labour augmentation. *Midwifery.* 2015, 31(3): e36–e42.
221. Elandalloussi L.M., Adams B., Smith P.J. ATPase activity of purified plasma membranes and digestive vacuoles from *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2005, 141(1): 49-56.
222. Elandalloussi L.M., Smith P.J. Preparation of pure and intact *Plasmodium falciparum* plasma membrane vesicles and partial characterisation of the plasma membrane ATPase. *Malar J.* 2002, 26(1): 1-7.
223. Ellman G.L., Courtney K.D., Valentino A.V. Feather-Stone R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacology.* 1961, 7: 88-95.
224. Enyedi A., Flura M., Sarkadi B. et al. The maximal velocity and the calcium affinity of the red cell calcium pump may be regulated independently. *The Journal of Biological Chemistry.* 1987, 13(263), 6425-6430.
225. Enyedi A., Minami J., Caride A.J., Penniston J.T. Characteristics of the Ca²⁺ pump and Ca²⁺-ATPase in plasma membrane of rat myometrium. *Biochem. J.* 1988, 252(1): 215-220.

226. Ersoz M. Transport of mercury through liquid membranes containing calixarene carriers. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2007, 134-135: 96-104.
227. Falchetto R., Vorherr T., Brunner J., Carafoli E. The plasma membrane Ca^{2+} pump contains a site that interacts with its calmodulin-binding domain. *The Journal of Biological Chemistry.* 1991, 266: 2930-2936.
228. Faustino R.S., Behfar A., Groenendyk J. et al. Calreticulin secures calcium-dependent nuclear pore competency required for cardiogenesis. *J Mol Cell Cardiol.* 2016, 92: 63-74.
229. Felix C.F., Oliveira V.H., Moreira O.C. et al. Inhibition of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase by heparin is modulated by potassium. *Internation. J. Biochem. Cell Biol.* 2007, 39: 586-596.
230. Ferdek P.E., Gerasimenko J.V., Peng S. et al. A novel role for Bcl-2 in regulation of cellular calcium extrusion. *Curr. Biol.* 2012, 22(13): 1241-1246.
231. Fiammengo R., Wojciechowski K., Crego-Calama M. et al. Heme-protein active site models via self-assembly in water. *Org. Lett.* 2003,5(19): 3367-3370.
232. Fiskum G. Intracellular levels and distribution of Ca^{2+} in digitonin-permeabilised cells. *Cell Calcium.* 1985, 6(1-2): 25-27.
233. Floyd R. Calcium transporters and signalling in smooth muscles / Floyd R., Wray S. // *Cell Calcium.* – 2007. – V. 42, N 4-5. – P. 467-476.
234. Flynn E.R.M., Bradley K.N., Muir T.C., McCarron J.G. Functionally separate intracellular Ca^{2+} stores in smooth muscle. *The Journal of Biological Chemistry.* 2001, 276(39): 36411-36418.
235. Foley T.D. The lipid proxidation product 4-hydroxynonenal potently and selectively inhibits synaptic plasma membrane ecto-ATPase activity, a putative regulator of synaptic ATP and adenosine. *Neurochem. Res.* 1999, 24(10): 1241-1248.
236. Foskett J.K., White C., Cheung King-Ho, MAK Don-On D. Inositol Trisphosphate Receptor Ca^{2+} Release Channels. *Physiological Reviews.* 2007, 87: 593-658.
237. Francese S., Cozzolino A., Caputo I. et al. Transglutaminase surface recognition by peptidocalix[4]arene diversomers. *Tetrahedron Lett.* 2005, 46(10): 1611-1615.

238. Fukuda T., Ogurusu T., Furukawa K., Shigekawa M. Protein kinase C-dependent phosphorylation of sarcolemmal Ca^{2+} -ATPase isolated from bovine aortic smooth muscle. *Biochemistry (Tokyo)*. 1990, 108: 629-634.
239. Furukawa R.-J., Nakamura H. Characterization of the $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -ATPase purified by calmodulin-affinity chromatography from bovine aortic smooth muscle. *J. Biochem.* 1984, 96(5): 1343-1350.
240. Furukawa K., Tawada Y., Shigekawa M. Protein kinase C activation stimulates plasma membrane Ca^{2+} -pump in cultured vascular smooth muscle cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 1989, 264: 4844-4849.
241. Gangola P., Shamoo A.E. Characterization of $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -ATPase of sarcoplasmic reticulum by laser-excited europium luminescence. *Eur. J. Biochem.* 1987, 162(2): 357-363.
242. Gatto C., Hale C.C., Xu W., Milanick M.A. Eosin, a potent inhibitor of the plasma membrane Ca pump, does not inhibit the cardiac Na-Ca exchanger. *Biochemistry*. 1995, 34(3): 965-972.
243. Gatto C., Milanick M.A. Inhibition of the red blood cell calcium pump by eosin and other fluorescein analogues. *American Journal of Physiology*. 1993, 264(6): 1577-1586.
244. Gee K.R., Brown K.A., Chen W.N. et al. Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca^{2+} -indicator dyes. *Cell Calcium*. 2000, 27(2): 97-106.
245. Geering K. Functional roles of Na,K-ATPase subunits. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2008, 17: 526-532.
246. Geering K. FXYD proteins: new regulators of Na-K-ATPase. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 2006, 290: 241-250.
247. Geering K. The functional role of β -subunits in oligomeric P-type ATPases. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2001, 33: 425-438.
248. 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.

249. 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.
250. 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.
251. Giacomello M., Mario A., Scarlatti C. et al. Plasma membrane calcium ATPase and related disorders. *Internat. J. Biochem Cell Biol.* 2012, 45(3): 753-762.
252. Goeger D.E., Riley R.T., Dorner J.W. Cyclopiazonic acid inhibition of the Ca^{2+} -transport ATPase in rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochem. Pharmacol.* 1988, 37(5): 978-981.
253. Gomez-Pinilla P.J., Pozo M.J., Akemishi B. et al. Ca^{2+} extrusion in aged smooth muscle cells. *Biochem. Pharmacol.* 2007, 74(6): 860-869.
254. Gopaldaswamy U.V., Satav J.G., Katyare S.S. et al. Effect of propranolol on rat brain synaptosomal Na^+, K^+ -ATPase, Mg^{2+} -ATPase and Ca^{2+} -ATPase. *Chem. Biol. Interact.* 1997, 103(1): 51-58.
255. Goto K., Yano Y., Okada E. et al. Catalytic specificity exhibited by p-sulfonatocalix[n]arenes in the methanolysis of N-acetyl-l-amino acids. *J. Org. Chem.* 2003, 68(3): 865-870.
256. Griff E.R., Kleene N.K., Kleene S.L. A selective PMCA inhibitor does not prolong the electroolfactogram in mouse. *PloS One.* 2012, 7(5): e37148.
257. Gros R., Afroze T., You X.-M. et al. Plasma membrane calcium ATPase overexpression in arterial smooth muscle increases vasomotor responsiveness and blood pressure. *Circulation Research.* 2003, 93(7): 614-621.
258. 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 Ac^{3+} chelators. *Bioconjug. Chem.* 1999, 10(4): 613-623.
259. Gualbert J., Shahgaldian P., Coleman A.W. Interactions of amphiphilic calix[4]arene-based Solid Lipid Nanoparticles with bovine serum albumin. *Int J Pharm.* 2003, 257(1-2): 69-73.

260. Guibert C., Ducret T., Savineau J.P. Expression and physiological roles of TRP channels in smooth muscle cells. *Adv Exp Med Biol.* 2011, 704: 687-706.
261. Guerini D., Pan B., Carafoli E. Expression, purification, and characterization of isoform 1 of the plasma membrane Ca^{2+} pump: focus on calpain sensitivity. *The Journal of Biological Chemistry.* 2003, 278(40): 38141-38148.
262. Gutierrez-Martin Y., Martin-Romero F. J., Henao F., Gutierrez-Merino C. Syptosomal plasma membrane Ca^{2+} pump activity inhibition by repetitive micromolar ONOO-pulses. *Free Radical Biol. Med.* 2002, 32(1): 46-55.
263. Gutsche C.D. Calixarenes: Synthesis and Historical Perspectives. *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry.* New York. 2004, 1: 153 – 160.
264. Gutsche C.D. Calixarenes. In *Host Guest Complex Chemistry Macrocycles; Synthesis, Structures, Applications* / Eds be Weber E.,Vögtle F. –Springer: Tokyo. 1985, 421 p.
265. Gutsche C.D., Alam I. Calixarenes 23. Complexation and Catalytic Properties of Water Soluble Calixarenes. *Tetrahedron.* 1988, 44: 4689 – 4694.
266. 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.
267. Gutsche C.D. Calixarenes Revisited. *Monographs in supramolecular chemistry* / ed. J.F. Stoddart. – Cambridge, U.K.: The Royal Society of Chemistry. 1998, 233 p.
268. Haag M., Vermeulen F., Magada O. et al. Polyunsaturated fatty acids inhibit Mg^{2+} -ATPase in basolateral membranes from rat enterocytes. *Prostaglandins Leukot and Essent Fatty Acids.* 1999, 61(1): 25-27.
- 269 258. Hammes A., Oberdorf-Maass S., Rother T. et al. Overexpression of the sarcolemmal calcium pump in the myocardium of transgenic rats. *Circ. Res.* 1998, 83(9): 877-888.
270. Hamuro Y., Calama M.C., Park H.S., Hamilton A.D. Calixarene with Four Peptide Loops: An Antibody Mimic for Recognition of Protein Surfaces. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1997, 36: 2680-2683.

271. Hart P.D., Armstrong J.A., Brodaty E. Calixarenes with host-mediated potency in experimental tuberculosis: further evidence that macrophage lipids are involved in their mechanism of action. *Infect. Immun.* 1996, 64(4): 1491-1493.
272. Hauck C., Frishman W.H. Systemic hypertension: the roles of salt, vascular Na^+, K^+ -ATPase and the endogenous glycosides, ouabain and marinobufagenin. *Cardio. Rev.* 2012, 20(3): 130-138.
273. Hertelendy F., Zakar T. Regulation of myometrial smooth muscle functions. *Curr. Pharm. Des.* 2004, 10(20); 2499-2517.
274. Hilfiker H., Strehler-Page M.A., Stauffer T.P. et al. Structure of the gene encoding the human plasma membrane calcium pump isoform 1. *The Journal of Biological Chemistry.* 1993, 268: 19717-19725.
275. Hocquet A., Langgard M. An evaluation of the mm^+ force field. *Molecular modeling annual.* 1998, 4(3): 94-11.
276. Hohmann J., Kowalewski H., Vogel M., Zimmermann H. Isolation of Ca^{2+} - or Mg^{2+} -activated ATPase (ecto-ATPase) from bovin brain synaptic membranes. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1993, 1152(1): 146-154.
277. Holmes M.E., Chaudhary J., Grover A.K. Mechanism of action of the novel plasma membrane Ca^{2+} -pump inhibitor caloxin. *Cell Calcium.* 2003, 33(4): 241-245.
278. Hong S.J., Liang H.C., Shen C.J. Dependence of cyclopiazonic-acid-induced muscle contractures on extracellular Ca^{2+} . *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2003, 81(12): 1101-1109.
279. Horisberger J.D. Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. *Physiology.* (Bethesda). 2004, 19: 377-387.
280. 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.
281. 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.
282. Ikeda A., Tsuzuki H., Shinkai S. NMR spectroscopic and X-ray crystallographic studies of calix[4]arene- Ag^+ complexes. Influence of bound Ag^+ on $C_{2v}-C_{2v}$

- interconversion in *cone*-calix[4]arenes. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2. 1994: 2073-2080.
283. Inesi G., Sagara Y. Specific inhibitors of intracellular Ca^{2+} transport ATPases. J. Membrane. Biol. 1994, 141: 1-6.
284. Iqbal K.S., Allen M.C., Fucassi F., Cragg P.J. Artificial transmembrane ion channels from commercial surfactants. Chem. Commun. (Camb). 2007, 38: 3951-3953.
285. Isenovic E.R., Jacobs D.B., Kedees M.N. et al. // Angiotensin II regulation of the Na^+ pump involves the phosphatidylinositol-3 kinase and p42/44 mitogen-activated protein kinase signaling pathways in vascular smooth muscle cells. Endocrinology. 2004, 145(3): 1151-1160.
286. Ishida Y., Paul R.J. Ca^{2+} clearance in smooth muscle: lessons from gene-altered mice. J. Smooth Muscle Res. 2005, 41(5): 235-45.
287. Izzet G., Douziech B., Prange T. et al. Calix[6]tren and copper(II): a third generation of funnel complexes on the way to redox calix-zymes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005, 102(19): 6831-6836.
288. Izzet G., Zeitouny J., Akdas-Killig H. et al. Dioxygen Activation at a Mononuclear Cu(I) Center Embedded in the Calix[6]arene-Tren Core. J. Am. Chem. Soc. 2008, 130(29): 9514-9523.
289. Jackson T.R., Ratterson S.I., Thastrup O., Hanley M.R. A novel tumour promoter, thapsigargin, transiently increases cytoplasmic free Ca^{2+} without generation of inositol phosphates in NG115-401L neuronal cells. Biochem J. 1988, 253(1): 81-86.
290. Jain M.K., Jahagirdar D.V. Effect of antituberculous calixarenes on phospholipase A_2 susceptibility and on fusion of phospholipid bilayers. Biochem. J. 1985, 227(3): 789-794.
291. 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.

292. Jin T., Kinjo M., Kobayashi Y., Hirata H. Ion Transport Activity of Calix[n]arene (n = 4, 5, 6, 7, 8) Esters toward Alkali-metal Cations in a Phospholipid Bilayer Membrane. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1998, 94: 3135-3140.
293. Johnson I. *The Molecular probes handbook, a guide to fluorescent probes and labeling technologies.* Life Technologies Corporation. 2010, 1060 p.
294. Joshi N.B., Shamo A.E. Binding of Eu^{3+} to cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase - laser excited Eu^{3+} spectroscopic studies. *Biophys. J.* 1987, 51(2): 185-191.
295. Kajiwara K., Kuniaki O., Miura Y. et al. Study on cardiocogram abnormalities due to oxytocin-induced labor and perinatal prognosis. *Intern. J. Gynecol. & Obstetric.* 2012, 119(3): S383.
296. Kalchenko O.I., Lipkowski J., Kalchenko V.I. et al. Effect of octakis(diethoxyphosphoryloxy)-tert-butyl-calix[8]arene in mobile phase on the reversed-phase retention behavior of aromatic compounds. Host-guest complexes formation and the stability constants determination. *J. Chrom. Sci.* 1998, 36: 269-273.
297. Kalchenko O., Poznanski J., Marcinowicz A. et al. Complexation of tetrapropoxycalix[4]arene with uracil and adenine derivatives in water-containing solution. *J.Phys.Org.Chem.* 2003, 16: 246-252.
298. Kalchenko O.I., Solovyov A.V., Lipkowski J., Kalchenko V.I. RP HPLC study of the complexation of benzene derivatives guest molecules with 5,17-bis(N-tolylmethyleneimino)-25,27-iprocoxycalix[4]arene in acetonitrile-water solution. *J. Chem. Res. (S).* 1999: 60-61.
299. Kalchenko O.I., Solovyov A.V., Lipkowski J., Kalchenko V.I. Study of the complexation of octakis(diethoxyphosphoryloxy)-tetramethyl-calix[4]-resorcinarene with benzene derivatives by RP HPLC method. *J. Incl. Phenom.* 1999, 34: 259-266.
300. Kalchenko O.I., Perret F., Coleman A.W. A comparative study of the determination of the stability constants of inclusion complexes of p-sulphonato-calix[4]arene with aminoacids by RP HPLC and ^1H NMR. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2.* 2001, 258-263.

301. Kannan S., Elimban V., Fandrich R.R. et al. Immunolocalization of sarcolemmal $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ecto-ATPase (myoglein) in rat myocardium. *Mol. Cell Biochem.* 1999, 197(1-2): 187-194.
302. 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.
303. Karaki H., Ozaki H., Hori M. et al. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol. Rev.* 1997, 49(2): 157-230.
304. Khadra K., Mizyed S., Marji D. et al. Synthesis of novel p-tert-butylcalix[4]arene Schiff bases and their complexes with C_{60} , potential HIV-Protease inhibitors. *Spectrochimica Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 2015, 136: 1869-1874.
305. Kim J.S., Quang D.T. Calixarene-derived fluorescent probes. *Chem. Rev.* 2007, 107(9): 3780–3799.
306. Kirby M.S., Sagara Y., Gaa S., Inesi G. Thapsigargin inhibits contraction and Ca^{2+} transient in cardiac cells by specific inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump. *J. Biol. Chem.* 1992, 267(18): 12545-12551.
307. Kishimoto T., Urakawa N. Effects of ouabain on high-K induced contractions of various smooth muscle tissues in the guinea-pig. *Jpn. J. Pharmacol.* 1982, 32(3): 551 – 561.
308. Klimanova E.A., Petrushanko I.Y., Mitkevich V.A. et al. Binding of ouabain and marinobufagenin leads to different structural changes in Na,K-ATPase and depends on the enzyme conformation. *FEBS Letters.* 2015, 589(19 PtB): 2668-2674.
309. 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.
310. Konno Y., Kato K., Dairaku N. et al. Expression Mg^{2+} -dependent HCO_3^- -stimulated adenine triphosphatase in the human duodenum. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2004, 19(1): 18-23.
311. Korchowiec B., Ben Salem A., Corvis Y. et al. Calixarenes in a membrane environment: a monolayer study on the miscibility of three p-tert-butylcalix[4]arene

- beta-lactam derivatives with 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine. *J. Phys. Chem B.* 2007, 111(46): 13231-13242.
312. Kosterin S.O. Kinetics and energetics of Mg^{2+} ,ATP-dependent Ca^{2+} transport in the plasma membrane of smooth muscle cells. *Neurophysiol.* 2003, 35(3/4): 215-228.
313. Kosterin S.A., Burdyga Th.V., Fomin V.P., Grover A.K. Control of Uterine Contractility. – Eds. R.E. Garfield, T.N. Tabb. – CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, 1994, 129-153.
314. Kotyk A. Transport adenosinetriposphatases. *Cell. Molec. Biol. Letters.* 1997, 2(1): 131-144.
315. Krebs. Calcium: A Matter of Life or Death. - Elsevier. The plasma membrane calcium pump. Ortega C., Ortolano S., Carafoli E. 2009, 179-197.
316. Krebs J. The influence of calcium signaling on the regulation of alternative splicing . *Biochimica et Biophysica Acta.* 2009, 1793(6): 979-984.
317. Krebs J., Guerini D. The calcium pump of plasma membranes Biomembranes. A Multi-Volume Treatise. 1996, 5: 101-131.
318. 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.
319. Krieger E., Koraimann G., Vriend G. Increasing the hrecision of comparative models with YASARA NOVA – a self-parameterizing force field. *Proteins.* 2002, 47(3): 393-402.
320. Krug L.M., Berk B.C. Na^+ , K^+ -adenosine triphosphatase regulation in hypertrophied vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 1992, 20(2): 144-150.
321. Kukulski F., Komoszynski M. Purification and characterization of NTPDase1 (ecto-apyrase) and NTPDase2 (ecto-ATPase) from porcine brain cortex synaptosomes. *European Journal of Biochemistry.* 2003, 270(16): 3447-3454.
322. Kukulski F., Levesque S.A., Lavoie E.G. et al. Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic Signalling.* 2005, 1(2): 193-204.

323. Kuo T.H., Wang K.K., Carlock L. et al. Phorbol ester induces both the gene expression and phosphorylation of the plasma membrane Ca^{2+} -pump. *The Journal of Biological Chemistry*. 1991, 266: 2520-2525.
324. Kuriyama H., Kitamura K., Itoh T., Inoue R. Physiological Features of Visceral Smooth Muscle Cells, With Special Reference to Receptors and Ion Channels. *Physiological Reviews*. 1998, 78(3): 812-920.
325. Kuzmin I., Stackhouse T., Latif F. et al. One-megabase yeast artificial chromosome and 400-kilobase cosmid-phage contigs containing the von Hippel-Lindau tumor suppressor and Ca^{2+} -transporting adenosine triphosphatase isoform 2 genes. *Cancer Res*. 1994, 54: 2486-2491.
326. Lacapere J.-J., Gingold M.P., Champeil P., Guillain F. Sarcoplasmic reticulum ATPase phosphorylation from inorganic phosphate in the absence of a calcium gradient. *J. Biol. Chem*. 1981, 256(5): 2302-2306.
327. 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.
328. Lalor R., Johnson Baillie-H., Redshaw C. et al. Cellular uptake of a fluorescent calix[4]arene derivative. *J Am Chem Soc*. 2008, 130(10): 2892 – 2893.
329. Lalor R., DiGesso J.L., Mueller A. et al. Efficient gene transfection with functionalized multicalixarenes. *Chem. Commun*. 2007, 4907 – 4909.
330. Lamartine R., Tsukada M., Wilson D., Shirata A. Antimicrobial activity of calix[n]arene. *C. R. Chimie*. 2002, 5(3): 163-169.
331. Lauger P. *Electrogenic Ion Pumps*. Sinauer Associates, Inc. USA. 1991, 5: 313 pp.
332. Lee A.G., East J.M. What the structure of a calcium pump tells us about its mechanism. *Biochem. J*. 2001, 356(3): 665-683.
333. Lee D., Oka T., Hunter B. et al. Calreticulin induces dilated cardiomyopathy. *PLoS One*. 2013, 8(2): e56387.

334. Leva F.D., Domi T., Fedrizzi L. et al. The plasma membrane Ca^{2+} -ATPase of animal cells: Structure, function and regulation. *Arch. Biochem. Biophys.* 2008, 476(1): 65-74.
335. Li L., Jose J., Xiang Y., Kuhn R.J., Rossmann M.G. Structural changes of envelope proteins during alphavirus fusion. *Nature.* 2010, 468(7324): 705-708.
336. Liang Jian, Fu Haiying, Liu Yu et al. Synthesis and molecular recognition of the uridine-containing derivative of *p*-tertbutylcalix[4]arene. *Can. J. Chem.* 2003, 81: 1019-1024.
337. Lin S.H., Russel W.E. Two Ca^{2+} -dependent ATPase in rat liver plasma membrane. The previously purified (Ca^{2+} - Mg^{2+})-ATPase is not a Ca^{2+} -pump but an ecto-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry.* 1988, 263(25): 12253-12258.
338. Linde C.I., Di Leva F., Domi T. et al. Inhibitory interaction of the 14-3-3 proteins with ubiquitous (PMCA1) and tissue-specific (PMCA3) isoforms of the plasma membrane Ca^{2+} pump. *Cell Calcium.* 2008, 43(6): 550-61.
339. Lingrel J.B. The physiological significance of the cardiotonic steroid/ouabain-binding site of the Na,K-ATPase. *Annu. Rev. Physiol.* 2010, 72: 395–412.
340. Lingrel J.B., Kuntzweiler T. Na^+ , K^+ -ATPase. *The Journal of Biological Chemistry.* 1994, 269(31): 19659-19662.
341. Lipkowski J, Kalchenko O.I., Slowikowska J. et al. Host-guest interactions of calix[4]-resorcinarenes with benzene derivatives 1 in conditions of reversed-phase high-performance liquid chromatography. Stability constants determination. *J. Phys. Org. Chem.* 1998, 11: 426-435.
342. Liu L., Ishida Y., Okunade G. et al. Distinct roles of PMCA isoforms in Ca^{2+} homeostasis of bladder smooth muscle: evidence from PMCA gene-ablated mice. *American Journal of Physiology. Cell Physiology.* 2007, 292(1): C423-431.
343. Liu L., Ishida Y., Okunade G. et al. Role of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in contraction-relaxation processes of the bladder: evidence from PMCA gene-ablated mice. *American Journal of Physiology Cell Physiology.* 2006, 290(4): C1239-C1247.

344. Lock J.T., Sinkins W.G., Schilling W.P. Effect of protein S-glutathionylation on Ca^{2+} homeostasis in cultured aortic endothelial cells. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 2011, 300(2): 493-506.
345. 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.
346. Luu-The V., Goffeau A., Thines-Sempoux D. Rat liver plasma membrane Ca^{2+} - or Mg^{2+} -activated ATPase. Evidence for proton movement in reconstituted vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*. 1987, 904(2): 251-258.
347. Lytton J., Westlin M., Hanley M.R. Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *Ibid.* 1991, 266(26): 17067-17071.
348. Magocsi M., Penniston J.T. Ca^{2+} or Mg^{2+} nucleotide phosphohydrolases in myometrium: two ecto-enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*. 1991, 1070(1): 163-172.
349. Magrans J.O., Ortiz A.R., Molins M.A. et al. A Designed Non-Peptidic Receptor that Mimics the Phosphocholine Binding Site of the McPC603 Antibody. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1996, 35: 1712-1715.
350. Mahmmoud Y.A., Cornelius F. Protein Kinase C Phosphorylation of Purified Na,K-ATPase: C-Terminal Phosphorylation Sites at the α - and γ -Subunits Close to the Inner Face of the Plasma Membrane. *Biophysical Journal*. 2002, 82: 1907-1919.
351. Manoharan P., Radzyukevich T.L., Hakim Javadi H. et al. Phospholemman is not required for the acute stimulation of Na^+ - K^+ -ATPase $\alpha 2$ -activity during skeletal muscle fatigue. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 2015, 309(12): 813-822.
352. Marchesini N., Docampo R. A plasma membrane P-type H(+)-ATPase regulates intracellular pH in *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2002, 119(2): 225-36.
353. Mareque-Rivas J.C., Schwalbe H., Lippard S.J. Interchain hydrogen-bonding interactions may facilitate translocation of K^+ ions across the potassium channel

- selectivity filter, as suggested by synthetic modeling chemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001, 98(17): 9478-9483.
354. Martin-Romero F.J., Garcia-Martin E., Gutierrez-Merino C. Inactivation of ecto-ATPase activity of rat brain synaptosomes. *Biochim. Biophys. Acta*. 1996, 1283(1): 51-59.
355. Matthew A., Shmygol A., Wray S. Ca^{2+} entry, efflux and release in smooth muscle. *Biol. Res*. 2004, 37(4): 617-624.
356. Matthews S.E., Beer P.D. Calixarene-Based Anion Receptors. *Calixarenes* : [eds. Z. Asfari et al.]. 2001, 421-439.
357. Mattiazzi A., Mundina-Weilenmann C., Vittone L., Said M. Phosphorylation of phospholamban in ischemia-reperfusion injury: functional role of Thr17 residue. *Mol. Cell Biochem*. 2004, 263(1-2): 131-136.
358. Mazur I., Kosterin S., Veklich T. Gibbs-Donnan potential as a tool for membrane vesicles polarization. *Journal of Biophysical Chemistry*. 2014, 5(2): 78-89.
359. Mazur Iu.Iu., Veklich T.O., Shkrabak O.A., Mohart M.A., Demchenko A.M., Gerashchenko I.V., Rodik R.V., Boyko V.I., Kalchenko V.I., Kosterin S.O. Selective inhibition of smooth muscle plasma membrane transport Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase by calix[4]arene C-90 and its activation by IFT-35 compound. *General Physiology and Biophysics*. 2018, 37: 223-231.
360. McFadzean I., Gibson A. The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. *Br. J. Pharmacol*. 2002, 135(1): 1-13.
361. McLure J.A., Birkett D.J., Elliot D.J. et al. Application of the fluorescent probe 1-anilinonaphthalene-8-sulfonate to the measurement of the nonspecific binding of drugs to human liver microsomes. *Drug Metabolism and disposition*. 2011, 39(9): 1711–1717.
362. 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.

363. Memisoglu E., Bochot A., Oezalp M. et al. Direct formation of nanospheres from amphiphilic-cyclodextrin inclusion complexes. *Pharm. Res.* 2003, 20: 117-125.
364. Memmi L., Lazar A., Brioude A. et al. Protein-calixarene interactions: complexation of Bovine Serum Albumin by sulfonatocalix[n]arenes. *Chem. Commun. (Camb.)*. 2001, 7(23): 2474-2475.
365. Mercer R.W., Schneider J.W., Benz E.J. Molecular cloning and characterization of α -subunit isoforms of the Na^+, K^+ -ATPase. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1988, 268B: 119-126.
366. Merkus H.G. Particle size measurement. Springer science. 2009, 186 p.
367. Missiaen L., Wuytack F., Raeymaekers L.O., De Shmedt H. Ca^{2+} extrusion across plasma membrane and Ca^{2+} uptake by intracellular stores. *Pharmac. Ther.* 1991, 50: 191-232.
368. Missiaen L., Wuytack F., Casteels R. Characterization of the Mg^{2+} -activated ATPase activity in smooth-muscle membranes. NADH oxidase and adenylate kinase interfere with the NADN-coupled enzyme assay. *Biochem. J.* 1988, 250(2): 579-588.
369. Missiaen L., Wuytack F., Casteels R. Effect of ovarian steroids on membrane ATPase activities in microsomes (microsomal fractions) from rat myometrium. Inhibition of a component of the Mg^{2+} -activated ATPase by Ca^{2+} -calmodulin and by oxytocin. *Biochem. J.* 1988, 250: 571-577.
370. Molenveld P., Kapsabelis S., Engbersen J.F.J., Reinhoudt D.N. Highly Efficient Phosphate Diester Transesterification by a Calix[4]arene-Based Dinuclear Zinc(II) Catalyst. *J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119: 2948-2949.
371. Molenveld P., Stikvoort W.M.G., Kooijman H. et al. Dinuclear and Trinuclear Zn(II) Calix[4]arene Complexes as Models for Hydrolytic Metallo-Enzymes. Synthesis and Catalytic Activity in Phosphate Diester Transesterification. *J. Org. Chem.* 1999, 64: 3896-3906.
372. Molenveld P., Engbersen J.F.J., Reinhoudt D.N. Specific RNA Dinuclear Cleavage by a Synthetic Calix[4]arene-Based Trinuclear Metallo(II)-phosphodiesterase. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999, 38: 3189-3192.

373. 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.
374. Monesterolo N.E., Amaiden M.R., Campetelli A.N. et al. Regulation of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase activity by acetylated tubulin: influence of the lipid environment. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012, 1818(3): 601-608.
375. Monteith G.R., Roufogalis B.D. The plasma membrane calcium pump a physiological perspective on its regulation. *Cell Calcium*. 1995, 18: 459-470.
376. Monteith G. R., Wanigasekara Y., Roufogalis B. D. The plasma membrane calcium pump, its role and regulation: new complexities and possibilities. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*. 1998, 40: 183-190.
377. Morris M.B., Auland M.E., Xu Y.H. et al. Characterization of the Mg^{2+} -ATPase activity of the human erythrocyte membrane. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1993, 31(5): 823-832.
378. Morth J.P., Pedersen B.P., Toustrup-Jensen M.S. et al. Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature*. 2007, 450: 1043-1049.
379. 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.
380. 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.
381. Mukherjee T., Mandal D., Bhaduri A. Leishmania plasma membrane Mg^{2+} -ATPase is a H^+/K^+ -antiporter involved in glucose symport. Studies with sealed ghosts and vesicles of opposite polarity. *J. Biol. Chem.* 2001, 276: 5563-5569.
382. Naderali E.K., Buttell N., Taggart M.J. et al. The role of the sarcolemmal Ca^{2+} -ATPase in the pH transients associated with contraction in rat smooth muscle. *J. Physiol. Lond. S.* 1997, 505: 329-336.

383. Nasu T., Zakimi S., Shibata H. The recovery from the relaxant effect by ouabain and metabolic dependency of K^+ contractions in guinea-pig taenia coli. *Comp. Biochem. Physiol.* 1991, 99(3): 467 – 473.
384. Nedeljkovic N., Nikezic G., Horvat A. et al. Properties of Mg^{2+} -ATPase in rat brain synaptic plasma membranes. *Gen. Physiol. Biophys.* 1998, 17(1): 3-13.
385. Neri P., Sessler J.L., Wang M-X. *Calixarenes and Beyond*. Springer International Publishing Switzerland. 2016, 1062 p.
386. Ng L.C., Gurney A.M. Store-operated channels mediate Ca^{2+} influx and contraction in rat pulmonary artery. *Circulation Research*. 2001, 89: 923-929.
387. Nikezic G., Horvat A., Nedeljkovic N. et al. Influence of pyridine and urea on the rat brain ATPase activity. *Gen. Physiol. Biophys.* 1998, 17(1): 15-23.
388. Noble D., Herchuelz A. Role of Na/Ca exchange and the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in cell function. *EMBO reports*. 2007, 8(3): 228-232.
389. Ogawa H., Shinoda T., Cornelius F., Toyoshima C. Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na^+,K^+ -ATPase) with bound potassium and ouabain. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 2009, 106: 13742-13747.
390. Okunade G.W., Miller M.L., Pyne G.J. et al. Targeted ablation of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase (PMCA) 1 and 4 indicates a major housekeeping function for PMCA1 and a critical role in hyperactivated sperm motility and male fertility for PMCA4. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004, 279(32): 33742-33750.
391. Oliveira V. H., Nascimento K. S. O., Freire M. M. et al. Mechanism of modulation of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase by arachidonic acid. *Prostagland. Lipid Mediators*. 2008, 87: 47-53.
392. Oloizia B., Paul R.J. Ca^{2+} Clearance and contractility in vascular smooth muscle: Evidence from gene-altered murine models. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2008, 45(3): 347-362.
393. Olson S., Wang M.G., Carafoli E. et al. Localization of two genes encoding plasma membrane Ca^{2+} transporting ATPases to human chromosomes 1q25–32 and 12q21–23 // *Genomics*. 1991, 9: 629-641.

394. 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.
395. Oshima T., Baba Y., Shimojo K., Goto M. Recognition of lysine residues on protein surfaces using calixarenes and its application. *Curr. Drug Discov. Technol.* 2007, 4(4): 220-228.
396. Oshima T., Goto M., Furusaki S. Complex formation of cytochrome C with a calixarene carboxylic acid derivative: a novel solubilization method for biomolecules in organic media. *Biomacromolecules*. 2002, 3(3): 438-444.
397. Otaibi M.A. The physiological mechanism of uterine contraction with emphasis on calcium ion. *Calcium Signaling*. 2014, 1(2): 70-75.
398. Pacheco G., Lippo de Becemberg I., Gonzalez de Alfonzo R. et al. Biochemical characterization of a V-ATPase of tracheal smooth muscle plasma membrane fraction. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1996, 12829(2): 182-192.
399. Pacheco G., de Alfonzo R.G., de Becemberg I.L., Alfonzo M.J. Pole of H⁺-ATPase in plasma membranes of airway smooth muscle. *Acta Cient. Venez.* 1993, 44(2): 111-119.
400. Pacllet 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.
401. Padanyi R., Paszty K., Penheiter A.R. et al. Intramolecular interactions of the regulatory region with the catalytic core in the plasma membrane calcium pump. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003, 278: 35798-35804.
402. Pande J., Grover A.K. Plasma membrane calcium pumps in smooth muscle: from fictional molecules to novel inhibitors. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2005, 83: 743-754.
403. Pande J., Mallhi K.K., Grover A.K. A novel plasma membrane Ca²⁺-pump inhibitor: caloxin 1A1. *Eur. J. Pharmacol.* 2005, 508(1-3): 1-6.

404. Pande J., Mallhi K.K., Grover A.K. Role of third extracellular domen of plasma membrane Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase based on novel inhibitor caloxin 3A1. *Cell Calcium*. 2005, 37(3): 245-250.
405. Pande J., Szewczyk M., Grover A.K. Allosteric inhibitors of plasma membrane Ca^{2+} pumps: Invention and applications of caloxins. *World J. Biol Chem*. 2011, 26: 39–47.
406. Pang Y., Zhu H., Wu P., Chen J. The characterization of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in rich sphingomyelin-cholesterol domains. *FEBS Lett*. 2005, 579(11): 2397-2403.
407. Park H.S., Lin Q., Hamilton A.D. Modulation of protein-protein interactions by synthetic receptors: design of molecules that disrupt serine protease-protenaceous inhibitors interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002, 99(8): 5105-5109.
408. Park H.S., Lin Q., Hamilton A.D. J. Protein Surface Recognition by Synthetic Receptors: A Route to Novel Submicromolar Inhibitors for α -Chymotripsin. *Am. Chem. Soc*. 1999, 121: 8-13.
409. Paquet V., Zumbuehl A., Carreira E.M. Biologically active amphoterecin B-calix[4]arene conjugates. *Bioconjugate Chem*. 2006, 17(6): 1460-1463.
410. Pelizzi N., Casnati A., Friggeri A., Ungaro R. Synthesis and properties of new calixarene-based ditopic receptors for the simultaneous complexation of cations and carboxylate anions. *J. Chem. Soc., Perkin Trans*. 1998, (6): 1307 – 1312.
411. 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.
412. Perret F., Lazar A., Coleman A. Biochemistry of the para-sulfonato-calix[n]arenes. *Chem. Commun*. 2006, 2435-2438.
413. Pinton P., Pozzan T., Rizzuto R. The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. *EMBO J*. 1998, 17: 5298-5308.
414. Popescu L.M., Foril C.P., Hinescu M. et al. Nitroglycerin stimulates the sarcolemmal Ca^{2+} -extrusion ATPase of coronary smooth muscle cells. *Biochemm. Pharmacol*. 1985, 34(10): 1857-1860.

415. Poul N.L., Campion M., Douziech B. et al. Monocopper center embedded in a biomimetic cavity: from supramolecular control of copper coordination to redox regulation. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129(28): 8801-8810.
416. Prasad V., Okunade G.W., Miller M.L., Shull G.E. Phenotypes of SERCA and PMCA knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, 322: 1192-1203.
417. Pritchard T.J., Bowman P.S, Jefferson A. et al. $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ and Ca^{2+} clearance proteins in smooth muscle: a functional unit. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology.* 2010, 299(2): 548 - 556.
418. Qu Y., Torchia J., Sen A. K. Protein kinase C mediated activation and phosphorylation of Ca^{2+} -pump in cardiac sarcolemma. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1992, 9(70): 1230-1235.
419. Radzyukevich T.L., Neumann J.C., Rindler T.N. et al. Tissue-specific role of the $\text{Na,K-ATPase } \alpha 2$ isozyme in skeletal muscle. *The Journal of Biological Chemistry.* 2013, 288(2): 1226-1237.
420. 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.
421. 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.
422. Ritchie M.F., Zhou Y., Soboloff J. Transcriptional mechanisms regulating Ca^{2+} homeostasis. *Cell Calcium.* 2011, 49(5): 314-321.
423. Rizzuto R., Pinton P., Carrington W., Fay F.S. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca^{2+} responses. *Science.* 1998, 280(5370): 1763-1766.
424. Rodik R.V., Boyko V.I., Kalchenko V.I. Calixarenes in bio-medical researches. *Curr. Med. Chem.* 2009,16(13):1630 – 1655.
425. 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.

426. Rondelez Y., Bertho G., Reinaud O. The first water-soluble copper(I) calix[6]arene complex presenting a hydrophobic ligand binding pocket: a remarkable model for active sites in metalloenzymes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2002, 41(6): 1044-1046.
427. Rondelez Y., Rager M.N., Duprat A., Reinaud O. Calix[6]arene-based cuprous "funnel complexes": a mimic for the substrate access channel to metalloenzyme active sites. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124(7): 1334-1340.
428. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. of Cell Biology.* 1963, 17: 208-212.
429. Sachs J.R. Interaction of Magnesium with the Sodium-Pump of the Human Red-Cell. *J. Physiol. -London* 1988, 400: 575-591.
430. Sagara Y., Inesi G. Inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} transport ATPase by thapsigargin at subnanomolar concentrations. *J. Biol. Chem.* 1991, 266(21): 13503-13506.
431. 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.
432. 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.
433. Sanborn B.M. Hormonal signaling and signal pathway crosstalk in the control of myometryal calcium dynamics. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2007, 18(3): 305-314.
434. Sankaranarayanan R., Greensmith D.J., Eisner D.A., Venetucci L. Biphasic decay of the Ca transient results from increased sarcoplasmic reticulum Ca leak. *J. Physiol.* 2016, 594(3): 611-623.
435. Santo-Domingo J., Demaurex N. Calcium uptake mechanisms of mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 2010, 1797(6-7): 907-912.

436. Santos L., Xavier F.E., Vassallo D.V., Rossoni L.V. Cyclooxygenase pathway is involved in the vascular reactivity and inhibition of the Na^+/K^+ -ATPase activity in the tail artery from L-NAME-treated rats. *Life Science*. 2003, 74(5): 613-627.
437. Sasamura S., Furukawa K., Shiratori M. et al. Antisense-inhibition of plasma membrane Ca^{2+} pump induces apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Jpn. J. Pharmacol.* 2002, 90(2): 164-172.
438. Scheiner-Bobis G., The sodium pump. Its molecular properties and mechanics of ion transport. *Eur. J. Biochem.* 2002, 269: 2424-2433.
439. Schoner W. Sodium pump and steroid hormone receptor Na^+/K^+ -ATPase. *Eur.J.Biochem.* 2002, 269: 2423.
440. Schuh K., Uldrijan S., Gambaryan S. et al. Interaction of the plasma membrane Ca^{2+} pump 4b/CI with the Ca^{2+} /calmodulin-dependent membrane-associated kinase CASK. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003, 278(11): 9778-9783.
441. Schuh K., Uldrijan S., Telkamp M., Röthlein N., Neyses L. The plasmamembrane calmodulin-dependent calcium pump a major regulator of nitric oxide synthase I // *J. Cell Biol.* –2001. – 155, N 2. – P. 201-5.
442. Schultz B.D., Singh A.K., Devor D.C., Bridges R.J. Pharmacology of 443 CFTR Chloride Channel Activity. *Physiol. Rev.* 1999, 79(1): 109-144.
443. 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.
444. Seidler N. W., Jona I., Vegh M., Martonosi A. Ciclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 1989, 264(30): 17816-17823.
445. Selvam R., Ganesan K., Raju N. et al. Low frequency and low intensity pulsed electromagnetic field exerts its antiinflammatory effect through restoration of plasma membrane calcium ATPase activity. *Life Sciences*. 2007, 80: 2403-2410.
446. Selvendiran K., Sakthisekaran D. Chemopreventive effect of piperine on modulating lipid peroxidation and membrane bound enzymes in benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis. *Biomed. Pharmacother.* 2004, 58(4): 264-267.

447. Sepulveda M.R., Mata A.M. The interaction of ethanol with reconstituted synaptosomal plasma membrane Ca^{2+} -ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2004, 1665: 75-80.
448. 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.
449. Shatursky O.Ya., Kasatkina L.A., Rodik R.V. et al. Anion carrier formation by calix[4]arene - bis-hydroxymethylphosphonic acid in bilayer membranes. *Organic Biomolecular Chemistry*. 2014, 12: 9811-9821.
450. Shimizu K., Nakajvo S., Urakawa N. Species differences in the inhibitory effect of ouabain on high K-induced contraction in the ileal longitudinal muscle. *Jpn. J. Pharmacol*. 1985, 39(1): 67 – 75.
451. 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.
452. Shinoda T., Ogawa H., Cornelius F., Toyoshima C. Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution. *Nature*. 2009, 459: 446-450.
453. Shmigol A., Eisner D.A., Wray S. Carboxyeosin decreases the rate of decay of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient in uterine smooth muscle cells isolated from pregnant rats. *Pflugers Arch*. 1998, 437: 158-160.
454. Singh A.K., Venglarik C.J., Bridges R.J. Development of chloride channel modulators. *Kidney. Int*. 1995, 48: 985-993.
455. 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.
456. Slavík I. Anilino-naphthalene sulfonate as a probe of membrane composition and function. *BBA – Rev. Biomembr*. 1982, 694(1): 1-25.
457. Slayman C.L., Sanders D. Steady-state kinetic analysis of an electroenzyme. *Biochem. Soc. Symp*. 1985, 50: 11-29.
458. Smith T.S., Bennett J.P. Mitochondrial toxins in models of neurodegenerative disease. I: In vivo brain hydroxyl radical production during systemic MPTP treatment

or following microdialysis infusion of methylpyridinium or azide ions. *Brain Res.* 1997, 765(2): 183-188.

459. Soares M.N., Gáscon T.M., Fonseca F.L.A. et al. Evaluation of the biological effects of 5-Cl-8-oxyquinolinepropoxycalix[4]arene and 8-oxyquinolinepropoxycalix[4]arene *in vitro* and *in vivo*. *Materials Science and Engineering: C.* 2014, 40(1): 260-266.

460. Solovyov A.V., Cherenok S., Tsymbal I. et al. Calix[4]arenes bearing alpha-amino- or alpha-hydroxy-phosphonic acid fragments at the upper rim. *Heteroatom Chemistry.* 2001, 12: 58-67.

461. Spencer D.J., Johnson B.J., Tolman W.B. Calix[4]arenes linked to multiple bidentate N-donors: potential ligands for synthetic modeling of multinuclear metalloenzymes. *Org. Lett.* 2002, 4(8): 1391-1393.

462. Stamenović D. Cytoskeletal mechanics in airway smooth muscle cells. *Respiratory Physiology & Neurobiology.* 2008, 163(1-3): 25-32.

463. Stewart D.R., Gutsche C.D. Isolation Characterization and Conformational Characteristics of p-tert-Butylcalix[9-20]arenes. *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121: 4136 - 4146.

464. 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.

465. Stout M.A. Calcium transport by sarcoplasmic reticulum of vascular smooth muscle: 1. MgATP-dependent and MgATP-independent calcium uptake. *J. Cell. Physiol.* 1991, 149: 393-395.

466. Strehler E.E. Plasma membrane calcium ATPases as novel candidates for therapeutic agent development. *J Pharm Pharm Sci.* 2013, 16(2): 190-206.

467. Strehler E.E. Plasma membrane calcium ATPase proteins as novel regulators of signal transduction pathways. *World J. Biol. Chem.* 2010, 1(6): 201-208.

468. Strehler E.E., Adelaida G.F., Penniston J.T., Caride A.J. Plasma membrane Ca^{2+} -pumps: structural diversity as basis for functional versatility. *Biochem. Soc. Trans.* 2007, 35(Pt 5): 919-922.

469. Strehler E.E., Caride A.J., Filoteo A.G. et al. Plasma membrane Ca^{2+} ATPases as dynamic regulators of cellular calcium handling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007, 1099: 226–236.
470. Strehler E.E., Zacharias D.A. Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiol. Rev.* 2001, 81(1): 21-50.
471. 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.
472. Sweadner K.J., Donnet C. Structural similarities of Na,K-ATPase and SERCA, the Ca^{2+} -ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Biochem. J.* 2001, 356(3): 685-704.
473. Szewczyk M.M., Pande J., Akolkar G., Grover A.K. Caloxin 1b3: a novel plasma membrane Ca^{2+} -pump isoform 1 selective inhibitor that increases cytosolic Ca^{2+} in endothelial cells. *Cell Calcium.* 2010, 48(6): 352-357.
474. Szewczyk M., Pande J., Grover A.K. Caloxins: a novel class of selective plasma membrane Ca^{2+} pump inhibitors obtained using biotechnology. *Pflügers Arch.* 2007, 456: 255-266.
475. Tairov M., Kalchenko V. Chiral Calixarenes. *Ukrainian Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry.* 2004, 29(2): 3-19.
476. 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.
477. Tang D., Dean W.L., Borchman D., Paterson C.A. The influence of membrane lipid structure on plasma membrane Ca^{2+} -ATPase activity. *Cell Calcium.* 2006, 39(3): 209-216.
478. 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.

479. Thallapally P.K., Lloyd G.O., Atwood J.L., Barbour L.J. Diffusion of water in a nonporous hydrophobic crystal. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*. 2005, 44(25): 3848-3851.
480. Thastrup O., Cullen R.J., Drobak B.K. et al. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1990, 87(7): 2466-2470.
481. Thastrup O., Foder B., Scharff O. The calcium mobilizing and tumour promoting agent, thapsigargin, elevates the platelet cytoplasmic free calcium concentration to a higher steady state level. A possible mechanism of action for tumour promotion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1987, 142(3): 654-660.
482. Therien A.G., Blostein R. Mechanisms of sodium pump regulation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2000, 279: C541–C566.
483. Thomas R.G. The $\text{Ca}^{2+}:\text{H}^{+}$ coupling ratio of the plasma membrane calcium ATPase in neurones is little sensitive to changes in external or internal pH. *Cell Calcium*. 2011, 49: 357-364.
484. Thomas R.C. The plasma membrane calcium ATPase (PMCA) of neurones is electroneutral and exchanges 2 H^{+} for each Ca^{2+} or Ba^{2+} ion extruded. *J. Physiol.* 2009, 587: 315-327.
485. Tian-Ming Y., Zhi-Feng Y., Li W. et al. Supramolecular interaction between water-soluble calix[4]arene and ATP--the catalysis of calix[4]arene for hydrolysis of ATP. *Spectrochimica Acta Part A Mol Biomol Spectrosc.* 2002, 58(14): 3033-3038.
486. Toledo-Maciel A., Goncalves-Gomes S., Castex M., Vieyra A. Progressive Inactivation of Plasma Membrane $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -ATPase by Cd^{2+} in the Absence of ATP and Reversible Inhibition during Catalysis. *Biochemistry*. 1998, 37(44): 15261-15265.
487. Tomita N., Sando S., Sera T., Aoyama Y. Macrocyclic proteoglycan mimics. Potent inhibition of cell adhesion by a bundle of chondroitin sulfate chains assembled on the calix[4]resorcarene platform. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004, 14(9): 2087-2090.
488. Toyoshima C., Kanai R., Cornelius F. First Crystal Structures of $\text{Na}^{+},\text{K}^{+}$ -

- ATPase: New Light on the Oldest Ion Pump. *Structure*. Elsevier. 2011, 19: 1732-1738.
489. Toyoshima C., Nakasako M., Nomura H., Ogawa H. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature*. 2000, 405: 647-655.
490. Triphan J., Aumuller G., Brandenburger T., Wilhelm B. Localization and regulation of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in bovine spermatozoa. *Europ. J. Cell Biol.* 2007, 86: 265-273.
491. 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.
492. 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.
493. Tuana B.S., Dhalla N.S. Purification and characterization of a $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ecto-ATPase from rat heart sarcolemma. *Mol. Cell. Biochem.* 1988, 81(1): 75-88.
494. Turi A., Torok K. Myometrial ($\text{Na}^{+}+\text{K}^{+}$)-activated ATPase and its Ca^{2+} sensitivity. *Biochim. Biophys. Acta*. 1985, 818(2): 123-131.
495. Usachev Y.M., DeMarco S.J., Campbell C. et al. Bradykinin and ATP accelerate Ca^{2+} efflux from rat sensory neurons via protein kinase C and the plasma membrane Ca^{2+} pump isoform 4. *Neuron*. 2002, 33: 113-122.
496. Valente R.C., Capella L.S., Monteiro R.Q. et al. Mechanisms of ouabain toxicity. *FASEB J.* 2003, 17(12): 1700-1702.
497. Van Erum M., Lemmens R., Berden J. et al. Identification and partial purification of (Ca^{2+} or Mg^{2+})-ATPase in renal brush-border membranes. *Eur. J. Biochem.* 1995, 227(1-2): 150-160.
498. Vanagas L., Rossi R.C., Caride A.J. et al. Plasma membrane calcium pump activity is affected by the membrane protein concentration. Evidence for the involvement of the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta*. 2007, 1768(6): 1641-1649.

499. Verbost P.M., Flik G., Pang P.K.T. et al. Cadmium inhibition of the erythrocyte Ca^{2+} pump: a molecular interpretation. *The Journal of Biological Chemistry*. 1989, 264: 5613-5615.
500. Verkhatsky A. Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons. *Physiol. Rev.* 2005, 85: 201-279.
501. Veklich Tetyana. Comparative research on the influence of some inhibitors on activity Na^+, K^+ -ATPase and Mg^{2+} -ATPase sarcolemma smooth muscle. *Annales universitatis Mariae Curie-Sclodowska*. Lublin, Polonia. 2006, XIX(2, 32): 203-206.
502. Veklich T.O. Inhibitory peculiarities of calix[4]arenes C-90 action on the activity of plasma membrane $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase of smooth muscle cells. Monograph: Modern directions in chemistry, biology, pharmacy and biotechnology. Lviv.: Lviv Polytechnic Publishing House. 2015, 200-204.
503. Veklich T.O. The comparative study of the inhibitory influence of calix[4]arene C-90 on the activity of $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPases in plasma membrane and sarcoplasmic reticulum in myometrium cells. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2016, 88(2): 5-15.
504. Veklich T.O., Labyntseva R.D., Shkrabak O.A., Tsymbaluk O.V., Rodik R.V., Kalchenko V.I., Kosterin S.O. Inhibition of Na^+, K^+ -ATPase and activation of myosin ATPase by calix[4]arene C-107 cause stimulation of isolated smooth muscle contractile activity. *Ukr. Biochem. J.* 2020, 92(1): 21-30.
505. Veklich T.O., Nikonishyna Y.U., Kosterin S.O. Pathways and mechanisms of transmembrane calcium ions exchange in the cell nucleus. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2018, 90(4): 5-24.
506. Veklich T., Shkrabak O., Kosterin S. A comparative study of influence of the calixarenes on the activity Na^+, K^+ -ATPase and Mg^{2+} -ATPase in smooth muscle sarcolemma. *Annales universitatis Mariae Curie-Sclodowska*. Lublin, Polonia. 2008, XXI(1, 45): 253-255.
507. Veklich T.O., Shkrabak O.A., Nikonishyna Yu.U., Rodik R.V., Kalchenko V.I., Kosterin S.O. Calix[4]arene C-956 selectively inhibits plasma membrane $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase in myometrial cells. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2018, 90(5): 35-43.

508. Veklich T.O., Shkrabak A.A., Slinchenko N.N. et al. Calix[4]arene C-90 selectively inhibits $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -ATPase of myometrium cell plasma membrane. *Biochemistry (M)*. 2014, 79(5): 417-424.
509. 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.
510. Visser G.J., Peters P.H., Theuvenet A.P. Cadmium ion is a non-competitive inhibitor of red cell Ca^{2+} -ATPase activity. *Biochim. Biophys. Acta*. 1993, 1152: 26-34.
511. Vovk A.I., Kalchenko V.I., Cherenok S.A. et al. Calix[4]arene methylenebisphosphonic acids as calf intestine alkaline phosphatase inhibitors. *Org. Biomol. Chem*. 2004, 2: 3162-3166.
512. Vovk A.I., Kononetsa L.A., Tanchuka V.Yu. et al. Inhibition of *Yersinia* protein tyrosine phosphatase by phosphonate derivatives of calixarenes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2010, 20(2): 483–487.
513. Wang H., Gilles-Baillien M. Ca^{2+} -ATPase and Mg^{2+} -ATPase activities distinct from alkaline phosphatase in rat jejunal brush-border membranes. *Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys*. 1993, 101(6): 387-393.
514. 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.
515. Wang T., Tsai L.-I., Solaro J. et al. Effects of potassium on vanadate inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase from dog cardiac and rabbit skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1979, 91(1): 356-361.
516. Wang W.A., Groenendyk J., Michalak M. Calreticulin signaling in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012, 44(6): 842-846.
517. Wang Z.S., Zhao X.J., Li Y. The influence of vasectomy and vasovasostomy on testicular ATPases, cAMP, ABP and androgen receptor in rabbits. *Contraception*. 1994, 50(5): 491-500.

518. Wei S., Luo Z., Qi H. et al. High-dose vs low-dose oxytocin for labor augmentation: a systematic review. *American J. Obstetrics and Gynecology*. 2010, 203(4): 296-304.
519. Wei Y., McLendon G.L., Hamilton A.D. et al. Disruption of Protein-protein Interactions: Design of a Synthetic Receptor that Blocks the Binding of Cytochrome C to Cytochrome C Peroxidase. *Chem. Commun.* 2001, 1580-1581.
520. Weisman O., Agerbo E., Carter C.S. et al. Oxytocin-augmented labor and risk for autism in males. *Behavioural Brain Res.* 2015, 284(1): 207-212.
521. Willems P.H., Dejong M.D., De Pont J.J., Van Os C.H. Ca^{2+} -sensitivity of inositol 1,4,5,-triphosphate – mediated Ca^{2+} release in permeabilized pancreatic acinar cells. *Biochem. J.* 1990, 265(3): 681-687.
522. Woo A.L., James P.F., Lingrel J.B. Sperm Motility Is Dependent on a Unique Isoform of the Na,K-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*. 2000, 275(27): 20693-20699.
523. Woodcock N.A., Taylor C.W., Thornton S. Effect of an oxytocin receptor antagonist and rho kinase inhibitor on the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sensitivity of human myometrium. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2004, 190(1): 222-228.
524. 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.
525. Wright L.C., Chen S., Roufogalis B.D. Regulation of the activity and phosphorylation of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase by protein kinase C in intact human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 1993, 306: 277-284.
526. Wuytack F., De Schutter G., Casteels R. Partial purification of Ca^{2+} , Mg^{2+} -dependent ATPase from pig smooth muscle and reconstitution of the ATP-dependent Ca^{2+} -transport system. *Biochem. J.* 1981, 198(2): 265-271.
527. Xie Z., Askari A. Na^+/K^+ -ATPase as a signal transducer. *Eur. J. Biochem.* 2002, 269: 2434-2439.
528. Xu C., Rice W. J., He W., Stokes D. L. A structural model for the catalytic cycle of Ca^{2+} -ATPase. *J. Mol. Biol.* 2002, 316: 201-211.

529. 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.
530. 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.
531. Yao Tian-Ming, Ye Zhi-Feng, Wang Li et al. Supramolecular interaction between water-soluble calix[4]arene and ATP – the catalysis of calix[4]arene for hydrolysis of ATP. *Spectrochimica Acta. Part A*. 2002, 58: 3033-3038.
532. Yatime L., Buch-Pedersen M.J., Musgaard M. et al. P-type ATPases as drug targets: Tools for medicine and science. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009, 1787: 207-220.
533. Yatime L., Laursen M., Morth J.P. et al. Structural insights into the high affinity binding of cardiotonic steroids to the Na⁺,K⁺-ATPase. *J. Struct. Biol.* 2011, 174: 296–306.
534. Zhang J., Xiao P., Zhang X. Phosphatidylserine externalization in caveolae inhibits Ca²⁺ efflux through plasma membrane Ca²⁺-ATPase in ECV304. *Cell Calcium*. 2009, 45: 177-184.
535. Zhao D., Dhalla N.S. Characterization of rat heart plasma membrane Ca²⁺/Mg²⁺-ATPase. *Arch. Biochem. Biophys.* 1988, 263(2): 281-292.
536. Zhao D., Elimban V., Dhalla N.S. Characterization of the purified rat heart plasma membrane Ca²⁺/Mg²⁺-ATPase. *Mol. Cell. Biochem.* 1991, 107(2): 151-160.
537. 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.

ДОДАТКИ

ДОДАТОК А

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:

– статті у наукових періодичних фахових виданнях України, у т.ч., які входять до міжнародних наукометричних баз:

1. **Веклич Т.О.**, Шкрабак О.А., Костерін С.О., Родік Р.В., Бойко В.І., Кальченко В.І. Патент на винахід № 24293/ЗА/18 від 10.10.2018 «5,11,17,23-тетра(трифтор)-метил(фенілсульфоніліміно)-метиламіно-25,27-діоктилокси-26,28-дипропоксикалікс[4]арен (калікс[4]арен С-956) як селективний інгібітор Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани клітин міометрія». *(Особистий внесок: сформульовано ідею роботи, спільно з співавторами проведено дослідження, здійснено аналіз та узагальнення отриманих результатів).*

2. Кальченко В.І., Костерін С.А., **Веклич Т.А.**, Родик Р.В., Шкрабак А.А., Мазур Ю.Ю., Слинченко Н.Н. Синтез новых перспективных утеростимуляторов на основе каликсаренсульфониламидинов и их биохимическая активность. Монография: Фундаментальные проблемы создания новых веществ и материалов химического производства. Киев: Академперіодика. 2016, 224-235. *(Особистий внесок: спільно з співавторами проведено дослідження, здійснено аналіз та узагальнення отриманих результатів, оформлено публікацію).*

3. **Veklich T.O.** The comparative study of the inhibitory influence of calix[4]arene C-90 on the activity of Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPases in plasma membrane and sarcoplasmic reticulum in myometrium cells. The Ukrainian Biochemical Journal. 2016, 88(2): 5-15.

4. **Veklich T.O.**, Shkrabak O.A., Nikonishyna Yu.U., Rodik R.V., Kalchenko V.I., Kosterin S.O. Calix[4]arene C-956 selectively inhibits plasma membrane Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase in myometrial cells. The Ukrainian Biochemical Journal. 2018, 90(5): 35-43. *(Особистий внесок: сформульовано ідею роботи, спільно з*

співавторами проведено дослідження, узагальнення та аналіз результатів, написано та оформлено публікацію).

5. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Мазур Ю.Ю., Родік Р.В., Бойко В.І., Кальченко В.І., Костерін С.О. Кінетичні закономірності дії калікс[4]арену C-90 на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазну активність плазматичної мембрани та на концентрацію Ca^{2+} в незбуджених клітинах міометрія. Укр. біохім. журн. 2013, 85(4): 20-29. *(Особистий внесок: сформульовано ідею роботи, спільно з співавторами проведено дослідження, узагальнення та аналіз результатів, написано та оформлено публікацію).*

6. **Векліч Т.О.**, Мазур Ю.Ю., Костерін С.О. Mg^{2+} , АТР-залежна кальцієва помпа плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин. I. Структурна організація та властивості. Укр. біохім. журн. 2015, 87(1): 5-20. *(Особистий внесок: підбір та узагальнення літературних даних, участь в оформленні публікації).*

7. **Векліч Т.О.**, Мазур Ю.Ю., Костерін С.О. Mg^{2+} , АТР-залежна кальцієва помпа плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин. II. Регуляція активності. Укр. біохім. журн. 2015, 87(2): 5-25. *(Особистий внесок: підбір та узагальнення літературних даних, участь в оформленні публікації).*

8. **Veklich T.O.**, Nikonishyna Y.U., Kosterin S.O. Pathways and mechanisms of transmembrane calcium ions exchange in the cell nucleus. The Ukrainian Biochemical Journal. 2018, 90(4): 5-24. *(Особистий внесок: підбір та узагальнення літературних даних, участь в оформленні публікації).*

9. Шкрабак О.А., Кальченко О.І., Родік Р.В., **Векліч Т.О.**, Кальченко В.І., Костерін С.О. Каліксарензалежний гідроліз АТР. I. Кінетика реакції та комплексоутворення між каліксареном C-107 та нуклеозидтрифосфатом. Укр. біохім. журн. 2008, 80(2): 90-100. *(Особистий внесок: спільно з співавторами проведено дослідження, здійснено аналіз та узагальнення отриманих результатів, оформлено публікацію).*

10. Шкрабак О.А., **Векліч Т.О.**, Родік Р.В., Бойко В.І., Костерін С.О. Каліксарензалежний гідроліз АТР. II. Каталітичні властивості реакції,

стимульованої каліксареном С-107. Укр. біохім. журн. 2008, 80(3): 55-64. *(Особистий внесок: спільно з співавторами проведено дослідження, здійснено аналіз та узагальнення отриманих результатів, оформлено публікацію).*

11. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Родік Р.В., Бойко В.І., Кальченко В.І., Костерін С.О. Просторова будова каліксарен-амінофосфонових кислот є суттєвою для прояву їхньої інгібуючої дії на Na^+, K^+ -АТР-азну активність у плазматичних мембран гладеньком'язових клітин. Укр. біохім. журн. 2010, 82(1): 21-33. *(Особистий внесок: сформульовано ідею роботи, спільно з співавторами проведено дослідження, узагальнення та аналіз результатів, написано та оформлено публікацію).*

12. **Векліч Т.О.**, Костерін С.О., Родік Р.В., Черенок С.О., Бойко В.І., Кальченко В.І. Вплив каліксаренфосфонових кислот на Na^+, K^+ -АТР-азну активність в плазматичній мембрані гладеньком'язових клітин. Укр. біохім. журн. 2006, 78(1): 70-86. *(Особистий внесок: сформульовано ідею роботи, спільно з співавторами проведено дослідження, узагальнення та аналіз результатів, написано та оформлено публікацію).*

13. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Костерін С.О., Родік Р.В., Черенок С.О., Бойко В.І., Кальченко В.І. Каліксарени С-97 та С-107 стимулюють вплив убаїну на Na^+, K^+ -АТР-азну активність у плазматичній мембрані гладеньком'язових клітин. Укр. біохім. журн. 2006, 78(6): 53-63. *(Особистий внесок: сформульовано ідею роботи, спільно з співавторами проведено дослідження, узагальнення та аналіз результатів, написано та оформлено публікацію).*

14. **Векліч Т.О.**, Костерін С.О. Порівняльне дослідження властивостей Na^+, K^+ -АТР-ази та Mg^{2+} -АТР-ази плазматичної мембрани міометрія. Укр. біохім. журн. 2005, 77(2): 66-75. *(Особистий внесок: спільно з консультантом сформульовано ідею роботи, проведено дослідження, здійснено аналіз та узагальнення отриманих результатів, оформлено публікацію).*

15. **Векліч Т.О.**, Кочешкова Н.С., Родік Р.В., Бойко В.І., Воробець З.Д., Костерін С.О. Порівняльне дослідження впливу каліксаренів на Na^+, K^+ -

АТРазну активність в плазматичній мембрані скоротливих та рухливих клітин. Укр. біохім. журн. 2007, 79(3): 19-28. *(Особистий внесок: сформульовано ідею роботи, спільно з співавторами проведено дослідження, здійснено узагальнення отриманих результатів, підготовлено публікацію).*

16. Лабинцева Р.Д., Слінченко Н.М., **Векліч Т.О.**, Родік Р.В., Черенок С.О., Бойко В.І., Кальченко В.І., Костерін С.О. Порівняльне дослідження впливу каліксаренів на Mg^{2+} -залежні АТР-гідролазні ферментативні системи гладеньком'язових клітин матки. Укр. біохім. журн. 2007, 79(3): 44-54. *(Особистий внесок: спільно з співавторами проведено дослідження, здійснено аналіз та узагальнення отриманих результатів, оформлено публікацію).*

17. **Т.О. Векліч**, Шкрабак О.А., Родік Р.В., Кальченко В.І., Костерін С.О. Каліксарен С-107 збільшує спорідненість Na^+, K^+ -АТР-ази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин до убаїну. Укр. біохім. журн. 2011, 83(1): 38-44. *(Особистий внесок: сформульовано ідею роботи, спільно з співавторами проведено дослідження, узагальнення та аналіз результатів, написано та оформлено публікацію).*

18. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Родік Р.В., Кальченко В.І., Костерін С.О. Вплив каліксарену С-107 на кінетичні параметри Na^+, K^+ -АТР-ази плазматичної мембрани міоцитів матки. Укр. біохім. журн. 2011, 83(2): 36-44. *(Особистий внесок: сформульовано ідею роботи, спільно з співавторами проведено дослідження, узагальнення та аналіз результатів, написано та оформлено публікацію).*

19. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Черенок С.О., Кальченко В.І., Костерін С.О. Порівняльне дослідження впливу калікс[4]арену С-99 та його аналогів на Na^+, K^+ -азну активність у плазматичній мембрані міоцитів матки. Укр. біохім. журн. 2012, 84(6): 49-57. *(Особистий внесок: сформульовано ідею роботи, спільно з співавторами проведено дослідження, узагальнення та аналіз результатів, написано та оформлено публікацію).*

20. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Мазур Ю.Ю., Родік Р.В., Кальченко В.І., Костерін С.О. Кінетика інгібіторної дії калікс[4]арену С-90 на активність

транспортної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин. Укр. біохім. журн. 2014, 86(5): 37-46. *(Особистий внесок: сформульовано ідею роботи, спільно з співавторами проведено дослідження, узагальнення та аналіз результатів, написано та оформлено публікацію).*

21. **Векліч Т.О.**, Костерін С.О. Дослідження властивостей Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани клітин міометрія. Буковинський медичний вісник. 2005, 9(2): 36-38. *(Особистий внесок: спільно з консультантом сформульовано ідею роботи, проведено дослідження, здійснено аналіз та узагальнення отриманих результатів, оформлено публікацію).*

22. Цимбалюк О.В., Онуфрійчук О.В., **Векліч Т.О.**, Черенок С.О., Кальченко В.І., Мірошніченко М.С., Костерін С.О. Порівняльне дослідження впливу оубаїну і каліксарен біс-гідроксиметилфосфонової кислоти на активність Na^+, K^+ -АТРази та механокінетику процесу „скорочення - розслаблення” гладенького м'язу. Physics of the Alive. 2006, 14(1): 53-72. *(Особистий внесок: спільно з співавторами проведено дослідження, здійснено аналіз та узагальнення отриманих результатів, оформлено публікацію).*

23. Бевза О.В., **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Родік Р.В., Кальченко В.І., Костерін С.О. Калікс[4]арен С-107 як високоафінний супрамолекулярний інгібітор Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани. Укр. біохім. журн. 2013, 85(2): 5-19. *(Особистий внесок: спільно з співавторами проведено дослідження, здійснено аналіз та узагальнення отриманих результатів, оформлено публікацію).*

24. **Векліч Т.**, Шкрабак О., Мазур Ю. Активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин селективно пригнічується калікс[4]ареном С-90. Вісник Львівського університету. 2014, вип. 68: 337-347. *(Особистий внесок: сформульовано ідею роботи, спільно з співавторами проведено дослідження, узагальнення та аналіз результатів, написано та оформлено публікацію).*

25. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Ніконішина Ю.В., Родік Р.В., Кальченко В.І., Костерін С.О. Калікс[4]арен С-90 як перспективна супрамолекулярна

сполука для регуляції активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин. Збірник наукових праць «Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології». 2017, 15(2): 373-380. *(Особистий внесок: сформульовано ідею роботи, спільно з співавторами проведено дослідження, узагальнення та аналіз результатів, написано та оформлено публікацію).*

26. **Veklich T.O.**, Labyntseva R.D., Shkrabak O.A., Tsymbaluk O.V., Rodik R.V., Kalchenko V.I., Kosterin S.O. Inhibition of Na^+, K^+ -ATPase and activation of myosin ATPase by calix[4]arene C-107 cause stimulation of isolated smooth muscle contractile activity. Ukr. Biochem. J. 2020, 92(1): 21-30. *(Особистий внесок: сформульовано ідею роботи, спільно з співавторами проведено дослідження, узагальнення та аналіз результатів, написано та оформлено публікацію).*

27. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Родік Р.В., Кальченко В.І., Костерін С.О. Калікс[4]арени C-107 та C-90 вбудовуються у ліпідний бішар плазматичних мембран та змінюють її структуру. Збірник наукових праць «Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології». 2020, 15(3): 373-380. *(Особистий внесок: сформульовано ідею роботи, спільно з співавторами проведено дослідження, узагальнення та аналіз результатів, написано та оформлено публікацію).*

– статті у наукових періодичних виданнях інших держав, в т.ч., що входять до міжнародних наукометричних баз:

28. **Veklich T.O.**, Shkrabak A.A., Slinchenko N.N., Mazur I.I., Rodik R.V., Boyko V.I., Kalchenko V.I., Kosterin S.O. Calix[4]arene C-90 selectively inhibits $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase of myometrium cell plasma membrane. Biochemistry (M). 2014, 79(5): 417-424. *(Особистий внесок: сформульовано ідею роботи, спільно з співавторами проведено дослідження, узагальнення та аналіз результатів, написано та оформлено публікацію).*

29. Mazur Iu.Iu., **Veklich T.O.**, Shkrabak O.A., Mohart M.A., Demchenko A.M., Gerashchenko I.V., Rodik R.V., Boyko V.I., Kalchenko V.I., Kosterin S.O. Selective inhibition of smooth muscle plasma membrane transport $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -

ATPase by calix[4]arene C-90 and its activation by IFT-35 compound. General Physiology and Biophysics. 2018, 37: 223-231. *(Особистий внесок: сформульовано наукову задачу, спільно з співавторами проведено дослідження, здійснено узагальнення отриманих результатів, проведено статистичний аналіз, підготовлено рукопис).*

30. Mazur I., Kosterin S., **Veklich T.** Gibbs-Donnan potential as a tool for membrane vesicles polarization. Journal of Biophysical Chemistry. 2014, 5(2): 78-89. *(Особистий внесок: спільно з співавторами сформульовано наукову задачу та проведено дослідження, узагальнення та аналіз результатів, написано та оформлено публікацію).*

31. Shatursky O.Ya., Kasatkina L.A., Rodik R.V., Cherenok S.O., Shkrabak A.A., **Veklich T.O.**, Borisova T.O., Kosterin S.O., Kalchenko V.I. Anion carrier formation by calix[4]arene - bis-hydroxymethylphosphonic acid in bilayer membranes. Organic Biomolecular Chemistry. 2014, 12: 9881-9821. *(Особистий внесок: спільно з співавторами проведено дослідження, здійснено аналіз та узагальнення отриманих результатів, оформлено публікацію).*

32. **Veklich T.**, Shkrabak O., Kosterin S. A comparative study of influence of the calixarenes on the activity Na^+, K^+ -ATPase and Mg^{2+} -ATPase in smooth muscle sarcolemma. Annales universitatis Mariae Curie-Sclodowska. Lublin, Polonia. 2008, XXI(1, 45): 253-255. *(Особистий внесок: сформульовано ідею роботи, спільно з співавторами проведено дослідження, узагальнення та аналіз результатів, написано та оформлено публікацію).*

33. **Veklich Tetyana.** Comparative research on the influence of some inhibitors on activity Na^+, K^+ -ATPase and Mg^{2+} -ATPase carcolemma smooth muscle. Annales universitatis Mariae Curie-Sclodowska. Lublin, Polonia. 2006, XIX(2, 32): 203-206.

34. **Veklich T.O.** Inhibitory peculiarities of calix[4]arenes C-90 action on the activity of plasma membrane $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase of smooth muscle cells. Monograph: Modern directions in chemistry, biology, pharmacy and biotechnology. Lviv.: Lviv Polytecnic Publishing House. 2015, 200-204.

***Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації
– монографії:***

35. Костерін С.О., Кальченко В.І., **Векліч Т.О.**, Бабіч Л.Г., Шликов С.Г. Калікс[4]арени як модулятори АТР-гідролазних систем гладеньком'язових клітин. Монографія. Київ: Наукова Думка. 2019, 266 с. *(Особистий внесок: спільно з співавторами сформульовано ідею роботи, проведено дослідження, здійснено узагальнення отриманих результатів, підготовлено публікацію).*

36. Костерін С.О., Бабіч Л.Г., Шликов С.Г., Данилович Ю.В., **Векліч Т.О.**, Мазур Ю.Ю. Біохімічні властивості та регуляція Ca^{2+} -транспортувальних систем мембранних структур гладеньком'язових клітин. Монографія. Київ: Наукова Думка. 2016, 210 с. *(Особистий внесок: спільно з співавторами сформульовано ідею роботи, проведено дослідження, здійснено узагальнення отриманих результатів, підготовлено публікацію).*

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

– тези та матеріали конференцій:

37. **Veklich T.O.**, Kosterin S.O. Comparative research of properties of Na^+ , K^+ -ATPase and Mg^{2+} -ATPase of the plasma membrane of the myometrium. Укр. біохім. журн. 2005, 77(2 (спецвипуск)): 83.

38. **Векліч Т.О.** Na^+ , K^+ -АТРазна активність сарколеми міометрія та вплив каліксаренів на неї. Матеріали ІХ Укр. біохім. з'їзду. Харків. 2006, 1: С. 106-107.

39. **Veklich T.**, Shkrabak A., Kosterin S. The effect of the calixarenes C-97 and C-107 on the Na^+ , K^+ -ATPase activity in plasmatic membrane of smooth muscle cells. Acta Biochimica Polonica. Abstracts 6th Parnas Conference "Molecular Mechanisms of Cellular Signalling". Krakow, Poland. 2007, 54(2): 29.

40. Шкрабак О.А., **Веклич Т.О.** Каліксарен С-107 стимулює неферментативний гідроліз АТФ. Тези доповідей II міжнародної конференції молодих учених „Біологія від молекули до біосфери”. Харків. 2007: 49-50.

41. Шкрабак О.А., **Веклич Т.О.** Дія каліксарену С-107 на Na^+, K^+ -залежний ферментативний та неферментативний гідроліз АТФ. Тези доповідей конференції молодих учених „Актуальні проблеми біохімії та біотехнології - 2007”. Київ. Укр. біохім. журн. 2007, 79(4): 137.

42. Родик Р.В., Кальченко О.И., Бойко В.И., Кальченко В.И., Шкрабак А.А., **Веклич Т.А.**, Костерин С.А. Синтез и АТФ-гидролазная активность каліксарен-аминометилфосфоновых кислот. Тезисы докладов XV международной конференции по химии соединений фосфора, посвященной 100-летию со дня рождения М.И. Кабачника. Санкт-Петербург. 2008: 211, 425.

43. Rodik R.V., Kalchenko O.I., Boyko V.I., Kalchenko V.I., Shkrabak A.A., **Veklich T.A.**, Kosterin S.A. Calixarene-amino-methylphosphonic acids. Synthesis and ATP-hydrolase activity. First international symposium “Supramolecular and nanochemistry: toward applications”: Abstracts book. Kharkov, Ukraine. 2008: 123.

44. Rodik R.V., Kalchenko O.I., Boyko V.I., Kalchenko V.I., Shkrabak A.A., **Veklich T.A.**, Kosterin S.A. Synthesis and ATP-hydrolase properties of calixarene-aminomethylphosphonic acids. IV International Summer School “Supramolecular Systems in Chemistry and Biology”: Abstracts book. Tuapse, Russia. 2008: 112.

45. Shkrabak A.A., Rodik R.V., **Veklich T.O.** The influence of the calixarene C-91 on ATP-hydrolyzing systems in the plasma membrane of smooth muscle cells and nonenzymatic hydrolysis of ATP. Vth International symposium “Supramolecular Systems in Chemistry and Biology”. Kyiv. 2009: 179.

46. Rodik R.V., Kalchenko O.I., Boyko V.I., Shkrabak A.A., **Veklich T.O.**, Kosterin S.O., Kalchenko V.I. Influence of the calixarene-aminomethyl-phosphonic acids on ATP hydrolysis. Vth International symposium “Supramolecular Systems in Chemistry and Biology”. Kyiv. 2009: 171.

47. **Веклич Т.О.**, Шкрабак О.А., Данилович Г.В. Дослідження мембранотропних ефектів інгібіторів Na^+, K^+ -АТРази – каліксаренів С-99 та С-

107 / // Тезисы докладов Научно-практической конференции „Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения”. Новый Свет, Крым, Украина. 2009: 439-440.

48. **Veklich T.**, Shkrabak O. Specific features of calixarene **C-107** influence on Na^+, K^+ -ATPase activity in the plasma membrane of smooth muscle cells. VII Parnas conference on Biochemistry and Molecular Biology. Укр. біохім. журн. 2009, 81(4 (спеціальний випуск)): 133.

49. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А. Дослідження впливу каліксарену С-107 на активність Na^+, K^+ -АТР-ази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин. Тезиси докладов VI Международной научно-практической конференции „Актуальне вопросы теоретической и прикладной биофизики, физики и химии”. Севастополь, Крым, Украина. 2010, 2: 213-215.

50. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А. Вплив каліксаренів на АТР-гідролазні системи плазматичної мембрани міометрія. Матеріали X Укр. біохім. з'їзду. Одеса. Укр. біохім. журн. 2010, 82(4 (додаток 1)): 21-22.

51. Кальченко О.І., Родік Р.В., Шкрабак О.А., **Векліч Т.О.**, Кальченко В.І. Хроматографічне дослідження та молекулярне моделювання процесу комплексоутворення біс(фосфоно-2-піридилметил)аміно-калік[4]сарену з аденозинтрифосфатом та аденозиндифосфатом. Матеріали X Укр. біохім. з'їзду. Одеса. Укр. біохім. журн. 2010, 82(4 (додаток 1)): 68.

52. Shkrabak A.A., Rodik R.V., **Veklich T.O.** The influence of spatial structure of the calixarene-aminosphonic acids on their property to inhibit the Na^+, K^+ -ATPase activity in plasmatic membrane of smooth muscle cells. III International Summer School “Supramolecular Systems in Chemistry and Biology”: Abstracts book. Lviv, Ukraine. 2010: 156.

53. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А. Вплив каліксарену С-107 на кінетику залежності Na^+, K^+ -АТРазної активності плазматичної мембрани клітин міометрія від убаїну. Тезиси докладов Научно-практической конференции „Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения”. Новый Свет, Крым, Украина. 2011: 651-652.

54. Shkrabak A.A., **Veklich T.O.**, A.V. Bevza Inhibitory properties of calixarenes relative to ion-transporting ATPase of myometrium cells plasma membrane. Kinetic and structural analysis. Abstracts 8th Parnas Conference. Warsaw, Poland. 2011: 87.

55. Shkrabak A.A., **Veklich T.O.**, Rodik R.V. The effect of calixarene C-107 on kinetic characteristics of Na⁺,K⁺-ATPase of myometrium plasma membrane. IV International Summer School “Supramolecular Systems in Chemistry and Biology”: Abstracts book. Regensburg, Germany. 2011: ST 6.

56. **Веклич Т.А.**, Шкрабак А.А., Костерин С.А. Каликс[4]арен С-90 как ингибитор Ca²⁺,Mg²⁺-АТФазы плазматической мембраны гладкомышечных клеток. Тезисы докладов VIII Международной научно-технической конференции „Актуальные вопросы биологической физики и химии”. Севастополь, Крым, Украина. 2012: 156-157.

57. **Veklich T.**, Shkrabak A., Kosterin S. Comparative analysis of structure of calix[4]arenephosphonic acids and their inhibitory properties towards smooth muscle Na⁺,K⁺-ATPase. International Symposium “Biological motility: Fundamental and Applied Science”. Pushchino. Russia. 2012, 2: 241-242.

58. **Veklich T.**, Shkrabak A., Rodik R., Kalchenko V., Kosterin S. Calixarenes as inhibitors of ion-transporting ATPases of smooth muscle cell plasma membrane. III International Symposium “Intracellular Signaling and Bioactive Molecules Design”: Abstracts book. Lviv, Ukraine. 2012: 163.

59. Shkrabak A., **Veklich T.**, Bevza A., Cherenok S., Rodik R., Kalchenko V., Kosterin S. Na⁺,K⁺-ATPase of myometrium cell plasma membrane and calixarenes. III International Symposium “Intracellular Signaling and Bioactive Molecules Design”: Abstracts book. Lviv, Ukraine. 2012: 51.

60. Shkrabak A., **Veklich T.**, Cherenok S. The structure features and inhibitory properties of calixarenes relative to Na⁺,K⁺-ATPase of myometrium cell plasma membrane. VI International Summer School “Supramolecular Systems in Chemistry and Biology”: Abstracts book. Strasbourg, France. 2012: SL 5.

61. Родік Р.В., Черенок С.О., Кальченко В.І., Шкрабак О.А., **Векліч Т.О.**, Костерін С.О. Молекулярний дизайн, синтез та біологічні дослідження каліксаренових регуляторів внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу в гладеньких м'язях в нормі та у випадку порушень скоротливої функції. Тези доповідей наукової звітної сесії „Фундаментальні проблеми створення нових речовин і матеріалів хімічного виробництва”. Київ. 2012: 58-59.

62. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Мазур Ю.Ю. Дослідження впливу каліксарену С-90 на активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин. Тезиси докладов Научно-практической конференции „Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения”. Новый Свет, Крым, Украина. 2013, 2: 325-326.

63. Костерин С.А., Бабич Л.Г., Шлыков С.Г., **Веклич Т.А.**, Лабынцева Р.Д., Цымбалюк О.В., Шкрабак А.А., Бевза А.В., Бевза А.А., Родик Р.В., Черенок С.О., Кальченко О.И., Кальченко В.И. Каликсарены как эффекторы АТР-гидролаз. Тезиси докладов Научно-практической конференции „Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения”. Новый Свет, Крым, Украина. 2013, 2: 175-176.

64. Shkrabak O.A., **Veklich T.O.**, Bevza O.V. Calixaren C-90 selectively inhibits $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase of myometrium cell plasma membrane / // Abstracts 9th Parnas Conference. Jerusalem, Israel. 2013: 84.

65. Мазур Ю.Ю., **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Бевза О.В. Інгібітор $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани калікс[4]арен С-90 як модулятор концентрації Ca^{2+} в міоцитах матки. Тези доповідей конференції молодих учених „Актуальні проблеми біохімії та біотехнології”. Київ. Укр. біохім. журн. 2013, 85(4): 141.

66. Мазур Ю.Ю., **Веклич Т.А.**, Шкрабак А.А., Бевза А.В. Каликс[4]арен С-90 как ингибитор $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматической мембраны. Тезиси докладов международной конференции молодых учених „Экспериментальная и теоретическая биофизика”. Пушино, Россия. 2013: 58-59.

67. Мазур Ю.Ю., **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А. Калікс[4]арен С-90 пригнічує кальцієві помпи субклітинних структур міометрія за механізмом повного неконкурентного інгібування. Матеріали конференції “Youth nanobiotech – 2014”. Київ. Український науково-медичний молодіжний журнал. 2014, 80(3): 63.

68. Мазур Ю.Ю., **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Цимбалюк О.В. Селективний інгібітор Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани – калікс[4]арен С-90 – підвищує концентрацію Ca^{2+} у міоцитах матки та пригнічує релаксацію м'язевого скорочення. Тези доповідей конференції молодих учених „Актуальні проблеми біохімії та біотехнології - 2014”. Київ. Укр. біохім. журн. 2014, 86(4): 209.

69. Shkrabak O., **Veklich.T.**, Masur Iu., Kosterin S. Kinetic mechanism of smooth muscle cell plasma membrane $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase selective inhibition by calixarene C-90. Матеріали конференції “Youth Scientist Forum: Abstracts book. Paris, France. 2014: 57.

70. Shkrabak O., **Veklich.T.**, Masur Iu., Kosterin S. Kinetic mechanism of smooth muscle cell plasma membrane $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase selective inhibition by calixarene C-90. Abstracts of The FEBS EMBO 2014 Conference, FEBS Journal. 2014, 281 (Suppl. 1): 579.

71. Mazur Iuliia, **Veklich Tetyana**, Shkrabak Oleksandr, Tymbalyuk Olga. Calix[4]arene C-90 as selective inhibitor of plasma membrane calcium pump and new myometrium contraction agent. Матеріали конгресу “1 st Congress of the Polish Biochemistry, Cell Biology, Biophysics and Bioinformatics: Abstracts book. Warsaw, Poland. 2014: 153.

72. **Векліч Тетяна**, Шкрабак Олександр, Мазур Юлія, Костерін Сергій. $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза плазматичної мембрани міоцитів матки та дія калікс[4]аренів на неї. Тези доповідей 4-го з'їзду Українського товариства клітинної біології. Ужгород, Україна. 2014: 10.

73. Mazur Iuliia, **Veklich Tetyana**, Shkrabak Oleksandr. The new smooth muscle cell contraction agent - calix[4]arene C-90. Тези доповідей 4-го з'їзду

Українського товариства клітинної біології. Ужгород, Україна. 2014: 7.

74. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Мазур Ю.Ю. Калікс[4]арени як селективні інгітори АТР-гідролазних систем плазматичної мембрани гладеньких м'язів. Матеріали XI Укр. біохім. з'їзду. Київ. Укр. біохім. журн. 2014, 86(5 (додаток 1)): 96-97.

75. Мазур Ю.Ю., **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А. Інгібітор Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани - калікс[4]арен С-90 викликає зміну концентрації Ca^{2+} у гладеньком'язових клітинах матки. Матеріали XI Укр. біохім. з'їзду. Київ. Укр. біохім. журн. 2014, 86(5 (додаток 1)): 174-175.

76. Костерін С.О., Черенок С.О., **Векліч Т.О.**, Родік Р.В., Шкрабак О.А., Лабинцева Р.Д., Бевза О.В., Кальченко В.І. Каліксарени як ефектори АТР-гідролазних систем. Тези доповідей наукової звітної сесії „Фундаментальні проблеми створення нових речовин і матеріалів хімічного виробництва”. Київ. 2014: 61-63.

77. Mazur Ju.Ju, **Veklich T.O.**, Shkrabak O.A., Tsybalyuk O.V. Plasma membrane Ca^{2+} -pump new inhibitor and suppressor of myometrium spontaneous relaxation. Матеріали 10-ї конференції «Bridges in Life Sciences». Wroclaw, Poland. 2015: 93.

78. Мазур Ю.Ю., **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А. Трансмембранний потенціал не впливає на інгібування Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани клітин міометрія калікс[4]ареном С-90. Тези доповідей VI-го з'їзду Українського біофізичного товариства. Луцьк, Україна. 2015: 70-71.

79. Шкрабак О.А., **Векліч Т.О.**, Мазур Ю.Ю., Костерін С.О. Структурні особливості каліксарену С-90, що визначають ефективність інгібування Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани клітин міометрія. Тези доповідей VI-го з'їзду Українського біофізичного товариства. Луцьк, Україна. 2015: 80-81.

80. Masur Iuliia, **Veklich Tetyana**, Shkrabak Alexander, Kosterin Sergiy. New myometrium plasma membrane calcium pump suppressor - calix[4]arene С-90 and its structural peculiarities which determine efficiency of its action. Матеріали 44-ї конференції «Muscle Research in Health and Disease». Warsaw, Poland. 2015: 62.

81. Shkrabak Alexander, **Veklich Tetyana**, Masur Iuliia, Kosterin Sergiy Calix[4]arene C-90 selectively inhibits $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase of miometrium cell plasma membrane. Матеріали 44-ї конференції «Muscle Research in Health and Disease». Warsaw, Poland. 2015: 63.

82. Кальченко В.І., Костерін С.О., Родік Р.В., **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Черенок С.О. Одержання каліксаренів як ефекторів АТР-гідролазних систем для потреб медицини. Тези доповідей наукової звітної сесії „Фундаментальні проблеми створення нових речовин і матеріалів хімічного виробництва”. Київ. 2015: 60-61.

83. Ніконішина Ю., Мазур Ю., Шкрабак О., **Векліч Т.** Кінетичний механізм інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза плазматичної мембрани та саркоплазматичного ретикулулу калікс[4]ареном С-90. Тези доповідей міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів „Молодь і поступ біології”. Львів. 2016: 45-46.

84. Mazur Iu.Iu., Shkrabak O.A., **Veklich T.O.** Plasma membrane Ca^{2+} -pump in smooth muscle cells: its role, regulation, and new artificial inhibitor. Abstracts 10th Parnas Conference. Wroclaw, Poland. 2016: 19.

85. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Геращенко І.В., Мохорт М.А., Костерін С.О. ІФТ-35 (похідне циклопента[*d*]піримідину) як селективний активатор $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани міоцитів матки. Тези доповідей VIII-го національного з'їзду фармацевтів України. Харків, Україна. 2016, 2: 15.

86. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Мазур Ю., Костерін С.О. Порівняльне дослідження впливу калікс[4]арену С-90 та його аналогів на $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза активність у плазматичній мембрані міоцитів матки. Тези доповідей 5-го з'їзду Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом. - Одеса, Україна. 2016: 16.

87. Mazur Iu.Iu., **Veklich T.O.**, Shkrabak O.A., Mohart M.A., Demchenko A.M., Gerashchenko I.V., Rodik R.V., Boyko V.I., Kalchenko V.I., Kosterin S.O. Selective inhibition of smooth muscle plasma membrane transport $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase

by calix[4]arene C-90 and its activation by IPT-35 compound. Тези доповідей 7th TriNet Meeting - RECOOP. Budapest, Hungary. 2016: 94..

88. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Родік Р.В., Кальченко В.І., Костерін С.О. Калікс[4]арен С-90 як перспективна супрамолекулярна сполука для регуляції активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин. Тези V наукової конференції «Нанорозмірні системи: будова, властивості, технології». Київ, Україна. 2016: 144.

89. Ніконішина Ю., Шкрабак О., **Векліч Т.** Інгібіторний вплив калікс[4]арену С-956 на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани клітин міометрія. Тези доповідей міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів „Молодь і поступ біології”. Львів. 2017: 43-44.

90. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Ніконішина Ю.В. Супрамолекулярні сполуки калікс[4]арени як перспективні селективні інгітори АТР-гідролазних систем плазматичної мембрани гладеньких м'язів. Тези доповідей всеукраїнської наукової конференції «Актуальні задачі хімії: дослідження та перспективи». Житомир, Україна. 2017: 139-142.

91. **Векліч Тетяна**, Шкрабак Олександр, Ніконішина Юлія Калікс[4]арен С-956 селективно інгібує Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани. Тези доповідей 4-ї Міжнародної наукової конференції “Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології”. Дніпро, Україна. 2017: 233-234.

92. Nikonishyna Yu., Shkrabak O., **Veklich T.** The inhibitory effect of calix[4]arene C-956 on the plasma membrane Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase of uterine myocytes. Theses of reports of the 25th Annual Conference “Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology”. Kyiv, Ukraine. Ukr. Biochem. J. 2017, 89(3): 72.

93. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Ніконішина Ю.В. Вплив структурних аналогів калікс[4]арену С-90 на активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани гладеньких м'язів. Збірник матеріалів всеукраїнської наукової конференції «Актуальні задачі хімії: дослідження та перспективи». Житомир, Україна. 2018: 221-223.

94. **Veklich T.O.**, Shkrabak O.A., Nikonishyna Yu.V., Kosterin S.O. The new smooth muscle cell contraction agent - calix[4]arene C-956. FEBS3+Meeting-XI Parnas conference on Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine. Ukr. Biochem. J. 2018, 90: 55.

95. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Ніконішина Ю.В. Вплив каліксарену С-956 на кінетичні параметри Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани міоцитів матки. Тези доповідей міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні проблеми сучасної біології, тваринництва та ветеринарної медицини». Львів, Україна. 2018: 102.

96. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А. Кінетична інтерпретація дії калікс[4]арену С-956 на активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани міоцитів матки. Тези доповідей VII-го з'їзду Українського біофізичного товариства. Київ-Луцьк, Україна. 2018: 19.

97. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Гольден О.В. Кінетичний механізм інгібування Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани міоцитів матки калікс[4]ареном С-956. Збірник матеріалів всеукраїнської наукової конференції «Актуальні задачі хімії: дослідження та перспективи». Житомир, Україна. 2019: 225-257.

98. **Veklich T.**, Shkrabak O., Kosterin S. Calix[4]arene C-956 as a promising supra-molecular compound to regulate the activity of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase of smooth muscle cells. Abstracts 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation. Yaremche, Ukraine. 2019: 15.

99. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Костерін С.О. Дослідження інгібіторного впливу аналогів калікс[4]арену С-90 на Ca^{2+} -помпу плазматичної мембрани гладеньких м'язів. Тези доповідей XXV української конференції з органічної та біоорганічної хімії. Луцьк, Україна. 2019: 163.

100. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А. Супрамолекулярні сполуки калікс[4]арени як перспективні селективні інгітори кальцієвої помпи плазматичної мембрани гладеньких м'язів. Матеріали XII Укр. біохім. конгресу. Тернопіль, Україна. Медична та клінічна хімія. 2019, 21(3 (додаток)):

67-68.

101. **Векліч Т.О.**, Шкрабак О.А., Родік Р.В., Кальченко В.І., Костерін С.О. Калікс[4]арени C-107 та C-90 впливають на рідинно-кристалічний стан плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин // Тези VI наукової конференції «Нанорозмірні системи: будова, властивості, технології» - Київ, Україна. – 2019. – С. 198.

102. **Veklich T.O.**, Shkrabak O.A., Golden O.V., Kardash O.O., Kosterin S.O. Calix[4]arene C-956 inhibitory action kinetic on plasma membrane Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity of smooth muscle cell // Materials of the International Meeting «Clusters and nanostructured materials (CNM-6)» - Uzhgorod, Ukraine. – 2020. – P. 320-322.

ДОДАТОК Б

АПРОБАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

Основні положення дисертаційної роботи представлені та обговорені на міжнародних і вітчизняних конференціях і конгресах різного рівня:

1. IX-му Українському біохімічному з'їзді (Харків, 24-27 жовтня 2006 р., форма участі – усна доповідь).
2. Львівсько-Люблінській конференції „Сучасні аспекти експериментальної та клінічної біохімії” (Люблін, Польща, 11-13 травня 2006, форма участі – усна доповідь).
3. 6th Parnas Conference “Molecular Mechanisms of Cellular Signalling” (Краків, Польща, 30 травня – 2 червня 2007 р., форма участі – стендова доповідь).
4. Vth International symposium “Supramolecular Systems in Chemistry and Biology” (Київ, 12-16 травня 2009 р., форма участі – стендова доповідь).
5. X-му Українському біохімічному з'їзді (Одеса, 13-17 вересня 2010 р., форма участі – усна доповідь).

6. International Symposium “Biological motility: Fundamental and Applied Science” (Пушино, Російська Федерація, 11-15 травня 2012 р., форма участі – усна доповідь).
7. Научно-практической конференции “Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения” (Новий Світ, 27 травня – 1 червня 2013 р., форма участі – усна доповідь).
8. XI-му Українському біохімічному конгресі (Київ, 6-10 жовтня 2014 р., форма участі – усна доповідь).
9. 4-й Міжнародній науковій конференції “Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології” (Дніпро, 5-6 жовтня 2017 р., форма участі – усна доповідь).
10. Міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми сучасної біології, тваринництва та ветеринарної медицини» (Львів, 4-5 жовтня 2018 р., форма участі – усна доповідь).
11. 6-му з'їзді Українського товариства клітинної біології (Яремче, 18-21 червня 2019 р., форма участі – усна доповідь).
12. XXV українській конференції з органічної та біоорганічної хімії (Луцьк, 16-20 вересня 2019 р., форма участі – усна доповідь).
13. XII-му Українському біохімічному конгресі (Тернопіль, 30 вересня – 4 жовтня 2019 р., форма участі – усна доповідь).
14. International Meeting «Clusters and nanostructured materials» (Ужгород, 5-9 жовтня 2020 р., форма участі – усна доповідь).