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

ВЕКЛІЧ Тетяна Олександрівна

УДК 577.152.3

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

03.00.04 – біохімія

Галузь знань 091 – Біологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Київ - 2021

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України.

Науковий консультант – академік НАН України,
доктор біологічних наук, професор
КОСТЕРІН Сергій Олексійович,
Інститут біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України,
заступник директора з наукової роботи,
завідувач відділу біохімії м`язів

Офіційні опоненти: член-кореспондент НАН України
доктор хімічних наук, професор
ВОВК Андрій Іванович,
Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України,
директор, завідувач відділу механізмів біоорганічних реакцій;

доктор біологічних наук, професор
СИБІРНА Наталія Олександрівна,
Львівський національний університет імені Івана Франка,
завідувач кафедри біохімії;

доктор біологічних наук, професор
Жолос Олександр Вікторович,
ННЦ "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка,
завідувач кафедри біофізики та медичної інформатики.

Захист відбудеться "27" вересня 2021 року о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.240.01 в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України за адресою: 01601, Київ - 30, вул. Леонтовича, 9.

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (Київ, вул. Леонтовича, 9).

Автореферат дисертації розісланий "17" серпня 2021 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук Карлова Н.П.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Важливу роль у функціонуванні внутрішніх органів та систем органів відіграють гладенькі м`язи (ГМ), які забезпечують діяльність урогенітальної системи, шлунково-кишкового тракту, кровоносних та лімфатичних судин, сфінктера зіниці ока, дихальних шляхів.

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 [Sanborn B.M., 2007; Маршал В.Дж., 2015]. Для реалізації процесів скорочення/розслаблення ГМ, зокрема, міометрія, необхідно, щоб рівень цитоплазматичного Ca^{2+} у міоплазмі динамічно та оборотньо змінювався в діапазоні концентрацій від наближено 100 нМ (стан спокою, релаксація механічної напруги) до 1 мкМ (скорочення) [Шуба М.Ф., 1981; Костерин С.А., 1990; Otaibi M.A., 2014]. За дії іонів Са відбувається зміна конформації білків м'язових фібрил, в результаті чого стає можливим приєднання міозину до актинових ланцюжків [Bers D.M., 2002]. 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 Са 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 цитозолю є кальцієві помпи ПМ та саркоплазматичного ретикулума (СР), Na^+/Ca^{2+}-обмінник ПМ а також Ca^{2+}-уніпортер мітохондрій (МХ) [Burdyga T., 2012; Babich L.G., 2018].

Важливу роль у забезпеченні контроля 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 [Цимбалюк О.В., 2012; Lopina O.D., 2017].

У ПМ, яка має селективну проникність для різноманітних речовин, міститься низка Mg^{2+}-залежних АТРаз, котрі забезпечують внутрішньоклітинний іонний гомеостаз. До них належать: електроензим транспортна Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРаза (КФ 3.6.3.8), яка забезпечує електрогенний активний Mg^{2+},АТР-залежний транспорт Ca^{2+} з клітини у позаклітинне середовище [Strehler E.E., 2010; Костерін С.О., 2019]; електроензим

уабаїнчутлива 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 [Geering K., 2006; Цимбалюк О.В., 2012]; уабаїнрезистентна "базальна" Mg^{2+}-АТРаза, яка, як вважають, причетна до регуляції концентрації протонів H^+ у позаклітинному та внутрішньоклітинному просторах [Djemli-Shipkolye A., 2003; Selvendiran K., 2004].

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 [Buxton I.L., 2004; Hertelendy F., 2004; Золотухін М.С., 2007]. Частота передчасних пологів у світі за середніми даними становить 9,6 % [Brown H.K., 2015; Doyle J., 2015]. 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 (К[4]А), мають противірусні, бактерицидні, протипухлинні та антитромботичні властивості і, як вважають, можуть бути ефективними інгібіторами й активаторами ензиматичних, рецепторних і транспортних мембранозв'язаних білків [Vovk A.I., 2010; Chernyshenko V.O., 2018; Кальченко В.И., 2018; Костерін С.О., 2019]. 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, штучних ензимів тощо. Щодо блокуючої дії каліксаренів, в науковій літературі є приклади, які доводять ефективність інгібування каліксаренами потенціалозалежних аніонних каналів, активності

лужної фосфатази. Є дані про те, що каліксарени здатні проникати в клітину через ПМ [Lalor R., 2008]. 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 [Xue Y., 2013] та імуногенність [Paclet M-H., 2006], а також доступний синтез і низька вартість. На початок виконання нашої роботи попередні дані літератури вказували на те, що вибрані К[4]А можуть утворювати комплекси з АТР [Tian-Ming Y., 2002].

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 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 помп 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 Ca^{2+}-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 Ca^{2+}-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 помп плазматичної мембрани та саркоплазматичного ретикулума.

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 К[4]А 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 К[4]А-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 високоефективної рідинної хроматографії (у співпраці з Інститутом органічної хімії НАН України), кондуктометрії, тензометрії (у співпраці з 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 К[4]А. У науково-теоретичному аспекті значення цієї роботи полягає у тому, що в ній наведені докази доцільності використання каліксаренових платформ для спрямованої модуляції активності катіон-транспортувальних Mg^{2+}-АТР-залежних електроензимів.

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

Вперше встановлено, що калікс[4]арени С-90 та С-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 - К[4]А С-90.

Цей К[4]А селективно інгібує активність Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази у випадку як ПМ міометрія, так і препарату очищеної солюбілізованої Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази, коефіцієнти інгібування $I_{0,5}$ складають 20,2 ± 0,5 і 34,6 ± 6,4 мкМ відповідно. Встановлено, що структурний фрагмент С-150 (суто «калікс[4]аренова чаша») та модельна сполука М-1 (у складі молекули К[4]А С-90 маємо 4 фрагменти М-1) незначно пригнічують Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРазну активність ПМ. Ефективність інгібування Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази К[4]А залежить від кількості та розташування фенілсульфониламідинових груп на верхньому вінці даних К[4]А. Модифікація нижнього вінця калікс[4]аренової «чаші» двома октанольними залишками (С-956), замість залишків пропанолу (С-90), призводить до незначного збільшення ефективності інгібування Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази ПМ.

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

Під дією К[4]А С-90 пригнічується Mg^{2+},АТР-залежна акумуляція Ca^{2+} у везикулах ПМ міометрія. Результати математичного моделювання передбачили, що К[4]А С-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 К[4]А С-90 транзієнтно підвищує $[Ca^{2+}]_i$ у міоцитах матки. К[4]А С-90 зменшує ефективний гідродинамічний діаметр клітин 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 К[4]А С-97, С-99 та С-107 селективно та значно ефективніше, ніж уабаїн, 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. К[4]А С-97 та С-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 К[4]А (С-107 та С-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 ± 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 високоефективних 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 К[4]А С-90, як здатність підвищувати $[Ca^{2+}]_i$, 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 тонусу ГМ матки, зокрема, на етапі виведення посліду після пологів. К[4]А С-90 може бути перспективним фармакологічним препаратом у медичній практиці з огляду на його низьку токсичність.

К[4]А С-97 і С-107 (інгібітори Na^{+},K^{+}-АТРази ПМ), а також К[4]А С-90 (інгібітор транспортної Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази) 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 К[4]А утворювати комплекси з АТР та гідролізувати цей нуклеозидтрифосфат можуть слугувати основою для подальших розробок нових аналітичних методів кількісного визначення вмісту АТР на основі каліксаренів.

За матеріалами експериментальних досліджень дії К[4]А С-956 був виданий 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 (К[4]А С-956) як селективний інгібітор Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази ПМ клітин міометрія».

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 приймали участь к.б.н. Шкрабак О.А., к.б.н. Мазур Ю.Ю.). Результати досліджень структури комплексу " К[4]А С-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, приймали 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 „Актуальне 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 "Intracelular 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); 1 st 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** статтей (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 ГМК» 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 щиру 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.

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Огляд літератури складається з одного розділу. Він присвячений загальним уявленням щодо сучасного стану розвитку досліджень із вивчення мембранних механізмів регуляції концентрації Ca^{2+} в ГМК, структурної організації, властивостей та регуляції катіон-транспортувальних ензимів – АТР-гідролаз ПМ та СР, а також каліксаренам та їх біологічної активності.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Методи препаративної біохімії. У дослідах використовували матку невагітних тварин (нелінійні білі щури, свині). Роботу було виконано у відповідності до Закону України № 3447 IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» та Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та наукових цілей (Страсбург, 1986). Суспензію ГМК матки невагітних щурів одержували із використанням колагенази і соєвого інгібітору трипсину за допомогою методу [Mollard P., 1986] з деякими модифікаціями. Виділення фракції ПМ міометрія здійснювали із використанням диференційного центрифугування у градієнті густини сахарози [Кондратюк Т.П., 1986]. Кількість білка в мембранному препараті визначали за методом M. Bradford [Bradford, 1976].

Флуоресцентні методи. Для дослідження мембранотропних властивостей К[4]А було використано зонд АНС, спектрофлуориметр Quanta Master 40 PTI. Для визначення Ca^{2+}-транспортувальної активності Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази використовували Ca^{2+}-чутливий флуоресцентний зонд fluo-4 AM [Gee, 2000], спектрофлуориметр Quanta Master 40 PTI (Канада) із програмним забезпеченням FelixGX 4.1.0.3096. Метод конфокальної мікроскопії було використано для реєстрації зміни концентрації Ca^{2+} у міоцитах. Міоцити обробляли флуоресцентними зондами fluo-4 AM та Hoechst 33342. Вимірювання проводили на лазерному скануючому конфокальному мікроскопі LSM 510 META. Кількісний аналіз здійснювали з використанням функції ROI (Region of Interest).

Методи ензимології. Загальну АТРазну активність визначали у фракції ПМ клітин міометрія при 37 ^{o}C 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-буфер (pH 7,4), 1 NaN_3, 1 уабаїн, 0,1 мкМ тапсигаргін 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 фрагментів ПМ, а зупиняли - додаванням до інкубаційної суміші 1 мл “стоп“-розчину наступного складу: 1,5 М натрій оцтовокислий, 3,7 % формальдегід, 14 % етанол, 5 % ТХУ, pH 4,3 (при 8 ^{o}C). Кількість продукту реакції P_i визначали за методом W. Rathbun et V. Betlach [Rathbun, 1969].

Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРазну активність у суспензії ПМ розраховували по різниці між величинами АТРазних активностей за присутності та відсутності в середовищі інкубації екзогенних іонів Са. Розрахунки, що були виконані із використанням комп’ютерної програми «MAXCHEL», свідчать за наступне: за даних фізико-хімічних та концентраційних умов середовища інкубації концентрація вільного Са (суто Ca^{2+}) становила 1 мкМ.

Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРазну активність у СР розраховували по різниці між

величинами АТРазних активностей за присутності та відсутності в середовищі інкубації 0,1 мкМ тапсигаргіну.

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

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

За 100 % прийнято значення питомої ензиматичної активності у відсутності К[4]А чи сполук М-1, М-3, ІФТ-35 у середовищі інкубації.

Структурні формули досліджуваних калікс[4]аренів.

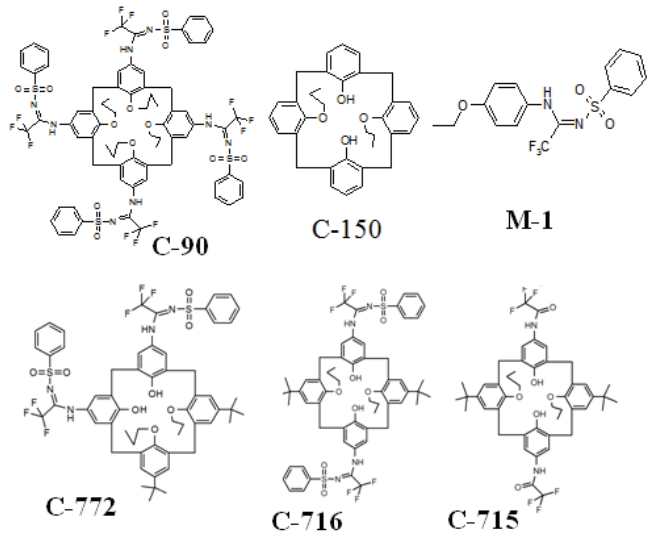


Рис. 1. Структурні формули калікс[4]арену С-90, його аналогів та сполуки М-1.

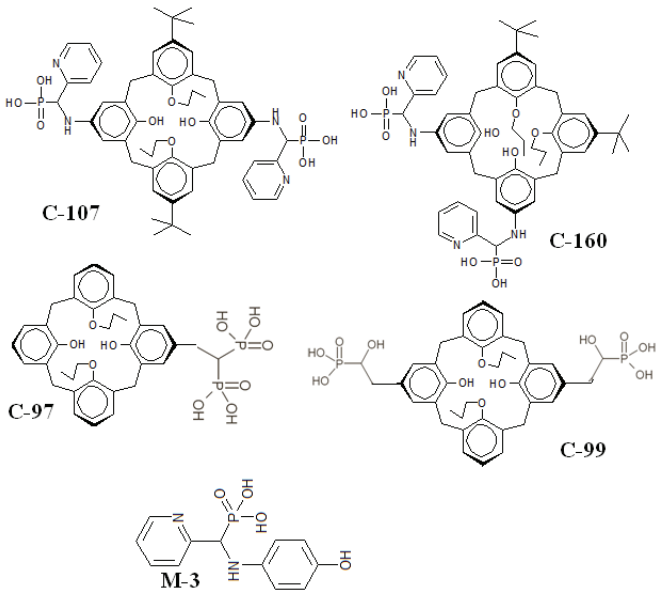


Рис. 2. Структурні формули калікс[4]арену С-107, його аналогів та сполуки М-3.

Синтез та дослідження структури і властивостей К[4]А проводили у відділі хімії фосфоранів Інституту органічної хімії НАН України (під керівництвом зав. відділу та директора – академіка НАН України проф. В.І. Кальченка). Структура К[4]А була підтверджена із використанням методів інфрачервоної спектроскопії та ядерного магнітного резонансу. Детальний опис методів синтезу К[4]А викладений у роботі [Rodik, 2005].

Повні хімічні назви К[4]А С-90, його аналогів та сполуки М-1 (наведених на рис. 1): 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-дипропоксикалікс[4]-арен); С-716 (5,17-ди(трифторо-метил(фенілсульфоніліміно)ме-тиламіно)-11,23-ди-*трет*-бутил-25,27-дипропоксикалікс[4]арен); С-772 (5,11-ди(трифтор)метил-(фенілсульфоніліміно)метиламіно)-17,23-ди-*трет*-бутил-26,27-ди-пропоксикалікс[4]арен); С-150 (26,28-

дигідрокси-25,27-дипропоксикалікс[4]а-рен); М-1 (*N*-(4-етоксифеніл)-*N*'-(фенілсульфоніл)трифторометилацетімідоамід).

Повні хімічні назви К[4]А С-107, його аналогів та сполуки М-3 (наведених на рис. 2): 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).

Інші методи. Ефективний гідродинамічний діаметр міоцитів визначали за допомогою лазерно-кореляційного спектрометра "ZetaSizer-3" (Malvern Instruments, Великобританія). Для аналізу результатів та підготовки рисунків із результатами докінгу використовували програми "Chimera" [Li L., 2010] та "Yasara" [Krieger E., 2002]. Метод математичного моделювання було використано для аналізу гомеостазу Ca^{2+} у незбуджених ГМК та впливу К[4]А С-90 на нього.

Вивчення впливу К[4]А С-90 на процес розслаблення ГМ проводили на смужках міометрія (разом з д.б.н. О.В. Цимбалюк, каф. молекулярної біотехнології та біоінформатики Інституту високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка; та к.б.н. І. Геращенко, відділ фармакології серцево-судинних засобів, Інститут фармакології та токсикології НАМН України).

Значення уявних констант активації іонами (Ca^{2+}, Mg^{2+}) K_{Ca}, K_{Mg} та констант Міхаеліса K_m, а також коефіцієнтів Хілла n_H розраховували з використанням концентраційних залежностей, побудованих у подвійних логарифмічних координатах відповідно до лінеаризованого рівняння Хілла [Курганов В.И., 1978]. Кінетичні характеристики реакції неензиматичного К[4]А -індукованого гідролізу АТР визначали за методом [Burdyga T.V., 1991].

Експериментальні дані були оброблені із застосуванням загальноприйнятих методів кінетичного аналізу та варіаційної статистики із використанням персонального комп`ютера типу IBM PC/AT за спеціально складеними програмами [Варфоломеев С.Д., 1999]. Графіки побудовано за допомогою програми Excel. Значення коефіцієнтів кореляції r лінеаризованих графіків становили 0,96 - 0,99.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Завдання 1. Дослідити мембранотропні властивості окремих калікс[4]аренів.

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

Згідно з даними літератури, деякі амфіфільні каліксарени, розчинені в органічному розчиннику, при подальшому розчинені 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. За допомогою методу ЛКС ми показали, що у присутності К[4]А С-107 відбувається агрегація везикул між собою та/або з мікрочастинками К[4]А.

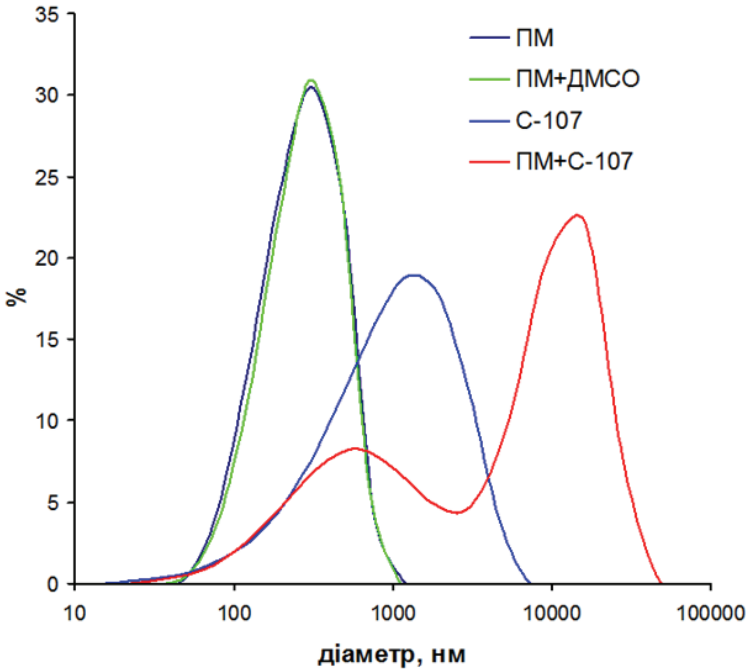


Рис. 3. Розподіл за гідродинамічним діаметром везикул ПМ оброблених розчином К[4]А С-107 (100 мкМ) (типові результати).

Спочатку ми охарактеризували фракцію ПМ за розмірами везикул (рис. 3). Потім досліджували дію К[4]А С-107 на гідродинамічні показники везикул ПМ у суспензії. У контрольних дослідах перевіряли наявність у розчинах ДМСО та К[4]А С-107 мікрочастинок, що розсіюють світло. Як показали результати експериментів, 100 мкМ розчин К[4]А С-107 в 2,5 % ДМСО містить мікрочастинки з різними розмірами від 100 нм до 10 мкм (рис. 3). У 2,5 % розчині ДМСО світло-розсіюючих частинок не виявлено (дані не наведено). Таким чином, у присутності К[4]А відбувається агрегація везикул між собою або з мікро-частинками К[4]А. У літературі описано також злиття міцел каліксаренів з ліпідними мембранами [Iqbal K.S., 2007], тому такий шлях збільшення гідродинамічного діаметру везикул також можливий.

1.2. Дослідження проникнення калікс[4]арену С-107 у гладеньком`язові клітини матки.

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

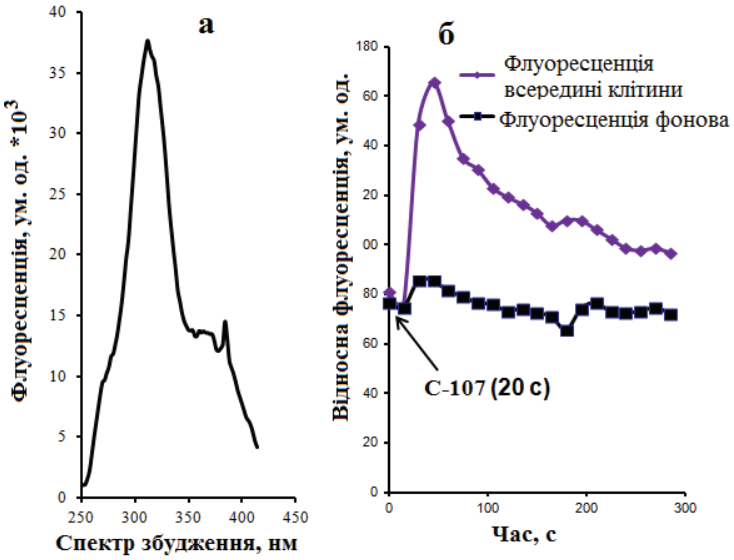


Рис. 4. Спектр збудження К[4]А С-107 (а) та кінетика флуоресценції ГМК (б) на конфокальних зображеннях до та після додавання 50 мкМ С-107.

Спочатку дослідили флуоресцентні характеристики К[4]А С-107. Лазерний скануючий конфокальний мікроскоп LSM 510 META, який ми використали, здатен опромінювати препарат при довжині хвилі 405 нм (діодний лазер). Тому ми опромінювали К[4]А на цій довжині хвилі, на рис. 4а наведений спектр збудження К[4]А С-107. Експерименти проводили на іммобілізованих на полі-L-лізині клітинах. Конфокальну мікроскопію було

застосовано в динаміці, фіксуючи зображення через кожні 15 с, адже дані щодо кінетики проникнення К[4]А С-107 крізь мембрану та накопичення в клітинах не були відомі. Спочатку протягом перших 20-30 с фіксували фоновий рівень флуоресценції клітин, після чого у середовище вносили К[4]А С-107 (кінцева концентрація 50 мкМ). Після аплікації К[4]А С-107 одразу було помітне суттєве збільшення флуоресценції як в середині клітин, так і у полі об'єктиву. Тобто на рис. 4б спостерігаємо флуоресценцію К[4]А С-107, який знаходиться в середовищі інкубації та протягом 15 с вимірювання проникає в клітини. У ГМК флуоресценція К[4]А С-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 К[4]А С-107 під впливом лазерного опромінення.

Ми вважаємо, що швидке підвищення флуоресценції в середині ГМК, порівняно з фоновою флуоресценцією (рис. 4б), після внесення К[4]А С-107, свідчить про вільне надходження зазначеної сполуки через ПМ. Зважаючи на швидку кінетику накопичення К[4]А С-107 всередині клітин, можна висловити припущення, що вказана молекула зв'язується з мембранами завдяки своїм амфіфільним властивостям. Таким чином, К[4]А С-107 може проникати крізь мембрани.

1.3. Рідинно-кристалічний стан плазматичної мембрани гладенькоm'язових клітин за дії калікс[4]арену С-90.

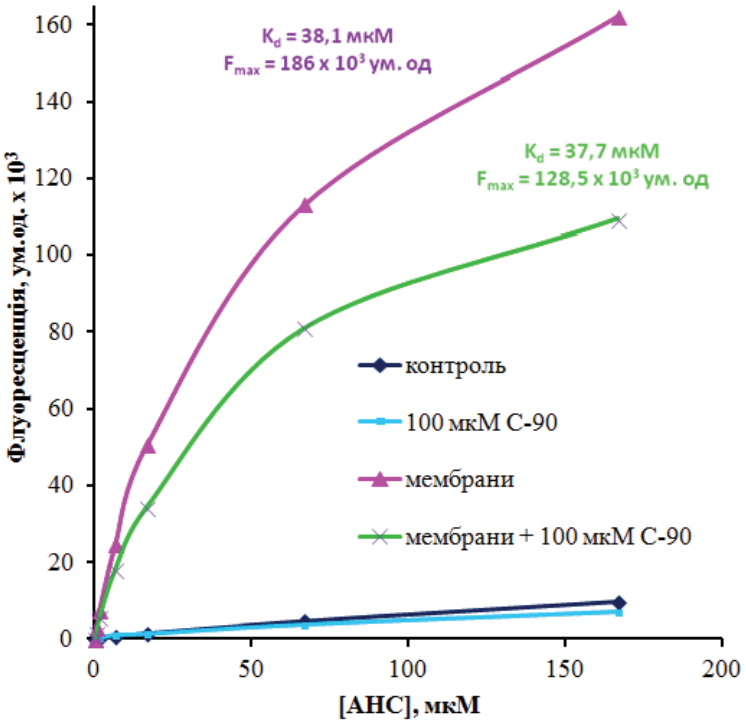


Рис. 5. Ізотерми Ленгмюра (37 °С) у випадку процесу зв`язування зонду АНС з ПМ міоцитів. Вплив К[4]А С-90 на флуоресценцію зонда АНС, в залежності від його концентрації. Наведено результати типового експерименту.

Відомо, що рідинно-кристалічний стан мембран і склад ліпідів впливає на функціонування Na^+,K^+-АТРази та Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази ПМ. Щоб дослідити мембранотропний вплив К[4]А ми використали флуоресцентний зонд АНС. При внесенні у середовище інкубації везикул ПМ за присутності К[4]А С-90 відбувається гасіння флуоресценції зонда АНС (рис. 5). Максимально рівень флуоресценції зонда знижується за присутності К[4]А С-90 у 1,5 рази, що вказує на зменшення кількості центрів взаємодії з зондом на поверхні ПМ; це може бути зумовлено перебудовою мембранної структури. Одержане значення уявної константи дисоціації K_d (38 мкМ) вказує

на відсутність змін спорідненості АНС до мембран у присутності С-90. Тому можна припустити, що під впливом К[4]А С-90 змінюється полярність та/або поверхневий заряд ПМ.

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 К[4]А на ензиматичну та транспортну активність цієї помпи.

Завдання 2. Вивчити вплив калікс[4]аренів на ензиматичну та транспортну активність Mg^{2+}-АТР-залежних кальцієвих помп плазматичної мембрани та саркоплазматичного ретикулума.

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

У результаті попередніх скринінгових досліджень щодо впливу К[4]А на Mg^{2+}-залежні АТР-гідролазні активності у фракції ПМ клітин міометрія ми встановили, що саме К[4]А С-90 у концентрації 100 мкМ ефективно пригнічує Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРазну активність ПМ клітин міометрія до рівня 25,1 ± 0,5 % відносно контрольного значення (прийнятого за 100 %) (M ± m; n = 5) (рис. 6а).

Водночас ця сполука, використана в такій же самій концентрації, практично не впливала на ензиматичну активність Na^{+},K^{+}-АТРази і “базальної” Mg^{2+}-АТРази ПМ: відповідні активності становили 94,2 ± 0,6 і 107,7 ± 1,0 % щодо контрольного значення (рис. 6а). Тобто на рівні ПМ К[4]А С-90 є селективним інгібітором транспортної Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази.

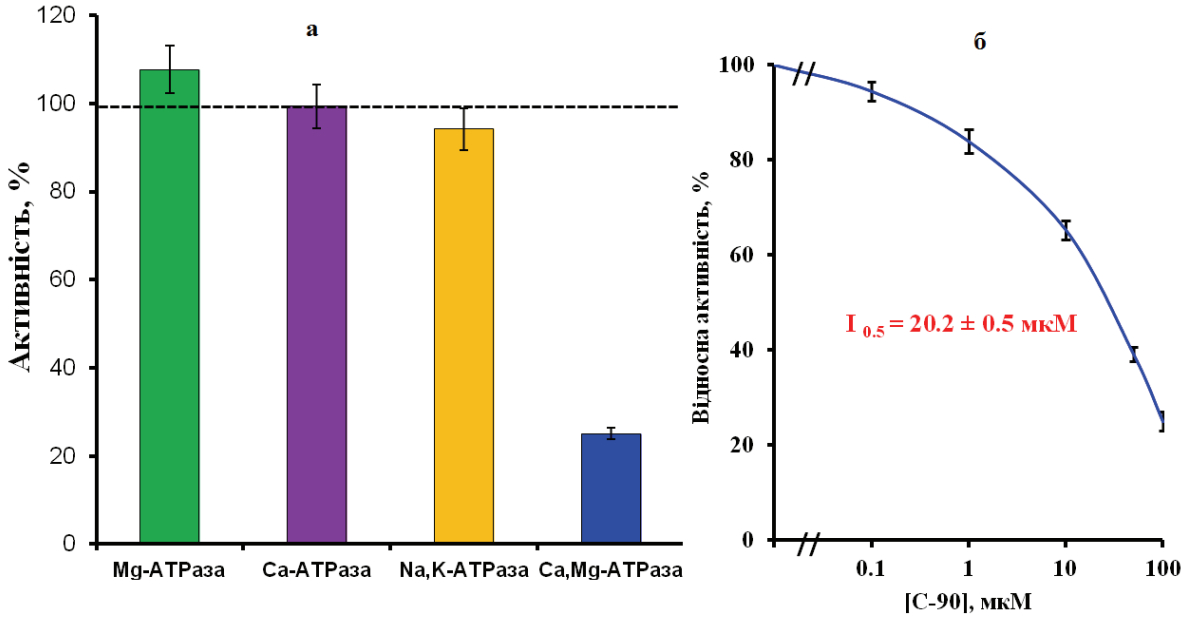


Рис. 6. К[4]А С-90 селективно інгібує активність Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази ПМ клітин міометрія. Дія К[4]А С-90 (100 мкМ) на АТР-гідролазні активності ПМ (а) та залежність активності Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази від його концентрації (б) (M ± m, n = 5). За 100 % прийнято контрольне значення ензиматичних активностей.

У подальших експериментах була вивчена концентраційна залежність інгібувальної дії К[4]А С-90 (10^{-8} – 10^{-4} М) на активність Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази у

фракції ПМ (рис. 6б) і розраховані величина $I_{0,5}$ (20,2 ± 0,5 мкМ) та значення коефіцієнта Хілла n_H (0,55 ± 0,02) (M ± m; n = 5).

Незалежно від нас, у нашому відділі було показано (Н.М. Слінченко), що К[4]А С-90 також пригнічує активність очищеної Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази, солюбілізованої із фракції ПМ ($I_{0,5}$ складає 58 мкМ). Чутлива до дії протонофору СССР акумуляція іонів Са в МХ міометрія виявилась практично резистентною до дії зазначеного калікс[4]арену [Rodik R., 2005].

Отже, К[4]А С-90 є афінним і селективним, на рівні ПМ, інгібітором Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази міоцитів матки.

2.2. Вивчення дії структурних компонентів калікс[4]арену С-90 на активність Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази плазматичної мембрани.

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

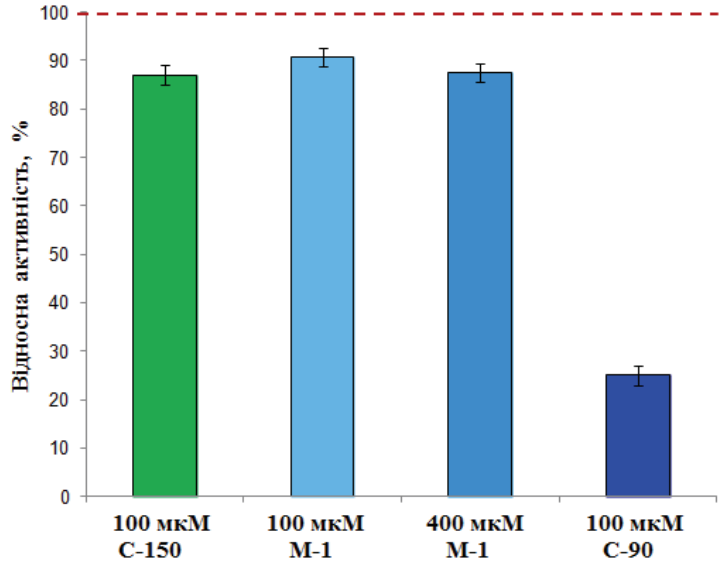


Рис. 7. Активність Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази ПМ клітин міометрія за дії К[4]А С-90, С-150 та модельної сполуки М-1 (M ± m, n = 5).

За 100 % прийнято значення ензиматичної активності у відсутності К[4]А та сполуки М-1 у середовищі інкубації.

З`ясовано, що структурний фрагмент С-150, використаний у концентрації 100 мкМ, здатний незначно (на 13,0±1,8 %) знижувати Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРазну активність (рис. 7) (M ± m; n = 5). Модельна сполука М-1 у концентрації 100 мкМ пригнічує Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРазну активність лише на 9,3 ± 2,4 %, а цей фрагмент у концентрації 400 мкМ (адже у складі молекули К[4]А С-90 маємо 4 фрагменти М-1) інгібує Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРазну активність також незначно – лише на 12,5 ± 1,7 % відносно контрольного значення (M ± m; n = 5) (рис. 7).

Отже, інгібувальна дія К[4]А С-90 на Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРазну активність (рис. 7) 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.

Також ми дослідили, які структурні особливості К[4]А С-90 важливі для інгібуваннння Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази ПМ. Ці дослідження проводились з метою підвищення ефективності інгібування та селективності дії К[4]А на рівні клітинних структур.

Були досліджені К[4]А С-716 та С-772, які, на відміну від К[4]А С-90, мають лише по дві фенілсульфониламідинові групи на верхньому вінці (рис. 1).

Ці 2 сполуки є регіоізомерами. У випадку К[4]А С-716 фенілсульфоніламідинові групи знаходяться на протилежних фенольних кільцях калікс[4]аренової «чаші», тоді як у К[4]А С-772 фенілсульфоніл-амідинові групи знаходяться на сусідніх.

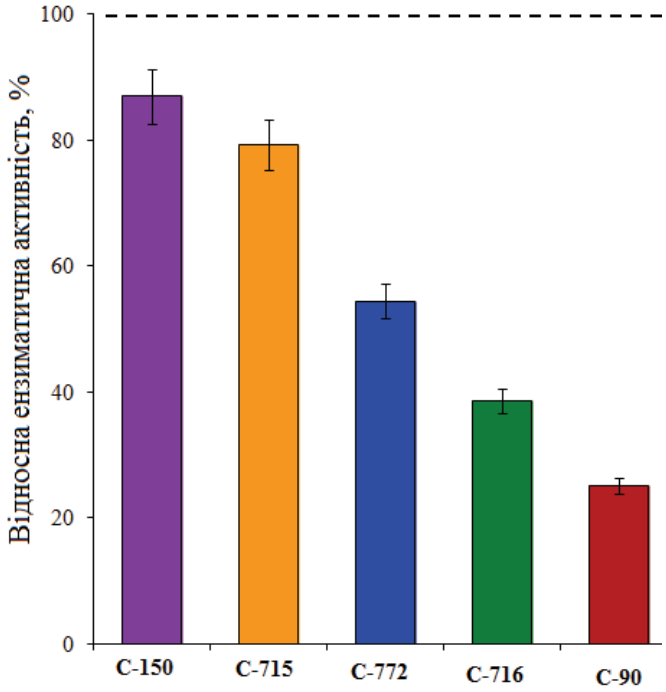


Рис. 8. Вплив К[4]А С-150, С-715, С-772, С-7167 і С-90 (100 мкМ) на активність Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази ПМ клітин міометрія (M ± m; n = 5).
За 100 % прийнято контрольне значення ензиматичних активностей.

У *пара*-положеннях інших фенольних кілець К[4]А С-716 та С-772 замість фенілсульфоніл-амідинових груп, розміщені *трет*-бутильні залишки. Ми встановили, що К[4]А С-772, С-716 та С-90 (використані в концентрації 100 мкМ) з різним ступенем ефективності пригнічують активність Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази ПМ: на 45,9 ± 0,6, 61,5 ± 1,9 та 75,0 ± 0,9 % відносно контрольного значення, відповідно (M ± m; n = 5) (рис. 8). К[4]А С-715 (у нього 2 вкорочених залишки) та суто калікс[4]аренова «чаша» С-150 дуже незначно впливають на ензиматичну активність.

Отже, інгібіторний ефект К[4]А С-772, С-716 і С-90 зростає із збільшенням кількості фенілсульфониламідинових груп на верхньому вінці калікс[4]аренової чаші. Разом з тим має суттєве значення і взаємне положення фенілсульфоніламідінових груп на верхньому вінці К[4]А: якщо вказані групи знаходяться на протилежних фенольних циклах К[4]А (дистальне розташування) ефективність інгібування Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази є більшою, ніж у випадку їх розташування на сусідніх фенольних кільцях (латеральне розташування).

2.3. Кінетика інгібіторної дії калікс[4]арену С-90 на активність транспортної Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази плазматичної мембрани.

Ми дослідили залежність питомої активності Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази від концентрації Ca^{2+} в інкубаційному середовищі при різних концентраціях К[4]А (відповідно 1, 10, 30, 60 та 100 мкМ). Ензиматична активність Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази ПМ міометрія зростає по мірі збільшення концентрації іонів Са від 100 до 1000 нМ, однак зменшується при збільшені концентрації інгібітора (рис. 9, а). Було розраховано кінетичні параметри активації іонами Са та вплив на них К[4]А С-90 (рис. 9, б, в). Величина V_{max} зменшувалася при збільшені концентрації К[4]А С-90 (рис. 9, в). Значення коефіцієнта активації Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази K_{Ca} за відсутності К[4]А С-90 становило 190 ± 1 нМ, величина коефіцієнта Хілла n_H – 2,1 ± 0,1 (M ± m; n=5) (рис. 9, б). Внесення в середовище інкубації К[4]А С-90 збільшувало коефіцієнт активації іонами Са до 312 ± 23

нМ (в присутності 100 мкМ С-90). При цьому величина коефіцієнта Хілла знижувалася до 1,5 ± 0,1 (M ± m; n=5).

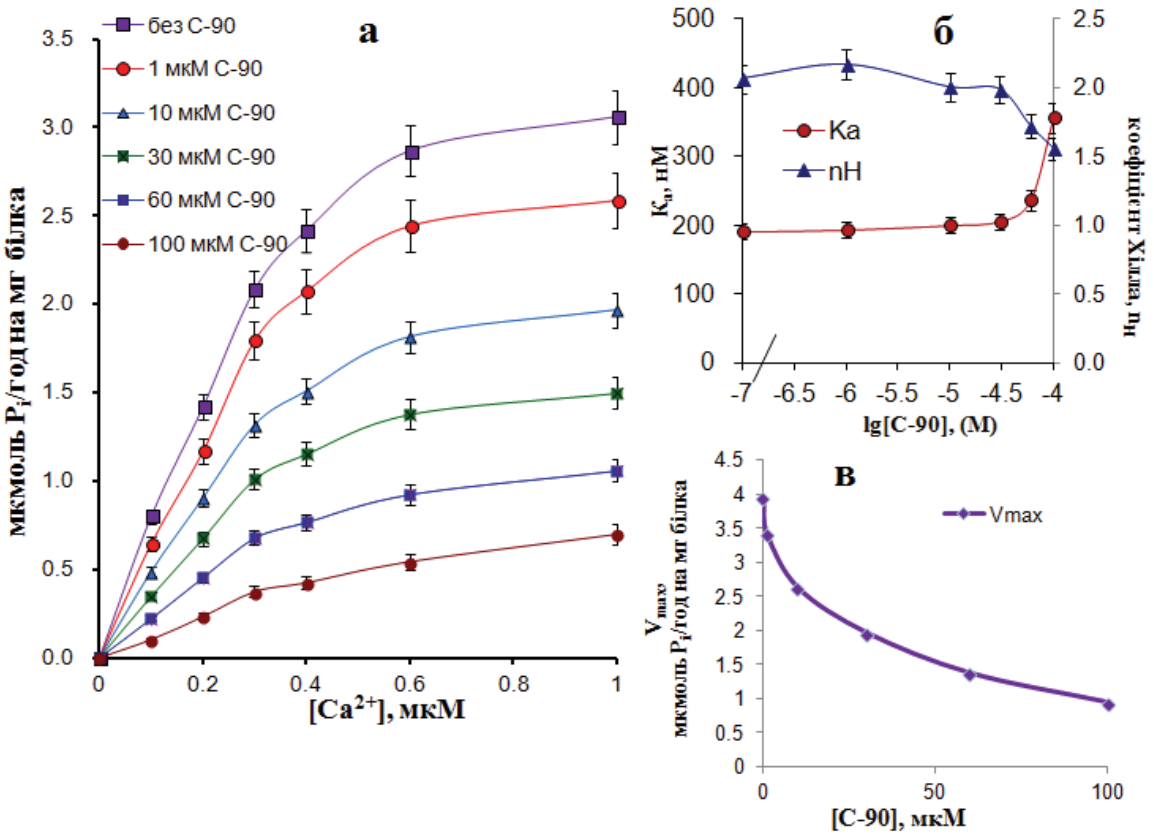


Рис. 9. Вплив К[4]А С-90 на залежність Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРазної активності ПМ клітин міометрія від концентрації іонів Са (а) і на відповідні кінетичні параметри (б і в) (M ± m, n = 5).

Отже, в діапазоні концентрації до 50 мкМ К[4]А С-90 практично не впливає на спорідненість Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази до іонів Са та на кооперативний ефект активації ензиму вказаними іонами.

Таким чином, К[4]А С-90 діє як неконкурентний інгібітор Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази, на що вказує зменшення максимальної швидкості гідролізу АТР та відсутність впливу на константу спорідненості по Ca^{2+}, а також по Mg^{2+} та АТР, та на відповідні коефіцієнти Хілла.

2.4. Молекулярний докінг взаємодії калікс[4]арену С-90 і його модельних сполук з ліганд-зв'язувальними ділянками Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази плазматичної мембрани.

За допомогою молекулярного докінгу було визначено найбільш вірогідні місця зв’язування К[4]А С-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) (рис. 10а). При цьому дана петля модулює функціональні властивості Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази, в том числі спорідненість до катіонів. К[4]А С-150 з найбільшою імовірністю може взаємодіяти з ензимом у примембраній ділянці (ділянки α-спіралі: 73-84, 284-294). Модельна сполука М-1 може зв`язуватися з амінокислотними залишками ензиму на зовнішній стороні мембрани (ділянка α-спіралі: 863-887).

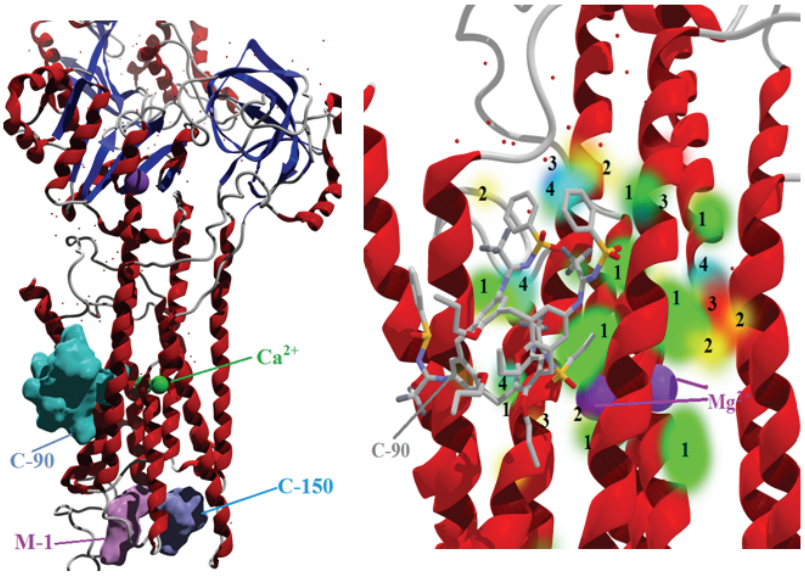


Рис. 10. Докінг при взаємодії К[4]А С-90 з Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРазою ПМ. а. Найбільш імовірні місця зв`язування різних лігандів функціонально-активними ділянками Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази. б. Мапа різноманітних типів взаємодій, які приймають участь у стабілізації С-90 з Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРазою ПМ.

Зелений (1) – стеричні взаємодії; жовтий (2) – донори водню; червоно-синій (3) – електростатичні взаємодії; синьо-зелений (4) – акцептори водню. Програми "Chimera" [Li L., 2010] та "Yasara" [Krieger E., 2002].

Місця зв`язування модельних сполук істотно відрізняються від області зв`язування К[4]А С-90, що пояснює їх незначний інгібувальний вплив на активність ензиму. Було встановлено, що в утворенні комплексу ензиму з К[4]А С-90 найбільш важливими є гідрофобні (стеричні), стекінг- та електростатичні взаємодії (рис. 10, б).

Отже, наші результати по комп`ютерному моделюванню підтверджують експериментальні дані щодо здатності К[4]А С-90 зв`язуватися з Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРазою ПМ. Вдалося ідентифікувати силові взаємодії, що стабілізують ліганд-рецепторний комплекс: гідрофобні (стеричні), стекінг- та електростатичні.

2.5. Вплив калікс[4]арену С-90 на Ca^{2+}-транспортувальну активність Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази плазматичної мембрани.

Аналіз даних літератури свідчить на користь того, що функціонування Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази ПМ ГМК забезпечує трансмембранне активне Mg^{2+}-АТР-залежне перенесення Ca^{2+} із внутрішньоклітинного простору у зовнішньоклітинне середовище. Тому ми припустили, що зниження активності Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази ПМ під впливом К[4]А С-90 має бути асоційоване зі зменшенням ефективності транспортної функції кальцієвої помпи ПМ. Для дослідження активного транспорту Ca^{2+} була використана модель: везикули ПМ, навантажені Ca^{2+}-чутливим зондом fluo-4 AM. Наші експерименти показали, що накопичення Ca^{2+} ("inside out") везикулами ПМ відбувається у присутності в середовищі АТР та іонів Са і Mg, а специфічні інгібітори інших Ca^{2+}-транспортувальних систем (тапсигаргін, азид) не впливають на цей процес (дані не наведені).

Було доведено, що К[4]А С-90 у концентрації 100 мкМ практично повністю блокує транспортну активність Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази ПМ, оскільки накопичення іонів Са всередині везикул не спостерігалось (рис. 11).

Слід зазначити, що за умов сукупного внесення ЕГТА та іонофору А-23187, відбувається падіння флуоресцентного сигналу нижче початкового рівня.

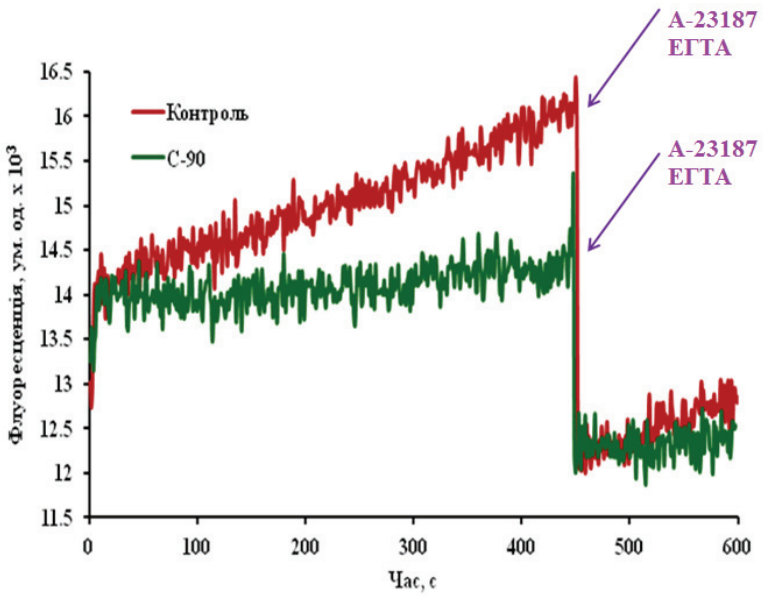


Рис. 11. К[4]А С-90 інгібує транспортну активність Mg^{2+}-АТР-залежної кальцієвої помпи ПМ клітин міометрія. Дія К[4]А С-90 (100 мкМ) на Mg^{2+}-АТР-залежний транспорт Ca^{2+} у фракції ПМ.

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.

Це можна пояснити тим, що ще до активації транспорту іонів кальція Ca^{2+}-помпою ПМ у везикулах ПМ містилася певна кількість вільного Са.

Отже, цей К[4]А не лише пригнічує активність Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази, але й інгібує спряжений з цією активністю Mg^{2+}-АТР-залежний транспорт Ca^{2+} у везикулах.

2.6. Математичне моделювання впливу калікс[4]арену С-90 на вміст іонів Са у незбуджених гладенько-м'язових клітинах.

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 тонусу матки.

Взявши до уваги визначені нами у дослідах кінетичні параметри чутливості Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази ПМ до пригнічувальної дії К[4]А С-90 та використавши метод математичного моделювання, ми розбудували кількісну модель (в стаціонарному режимі) індукції зазначеним К[4]А збільшення базальної концентрації іонів Са в незбуджених міоцитах матки. Згідно з результатами модельних розрахунків одержали: за концентрації селективного інгібітора Mg^{2+},АТР-залежної Ca^{2+}-помпи ПМ К[4]А С-90 10^{-6}-$2{\cdot}10^{-5}$ М хід кривої збільшення цитозольної концентрації Ca^{2+} у незбуджених міоцитах є досить пологим, а за концентрації К[4]А С-90 вищої за $2{\cdot}10^{-5}$ М крива наближається до експоненціальної залежності (рис. 12). Як бачимо, застосування К[4]А С-90 у низьких концентраціях (< 10 –

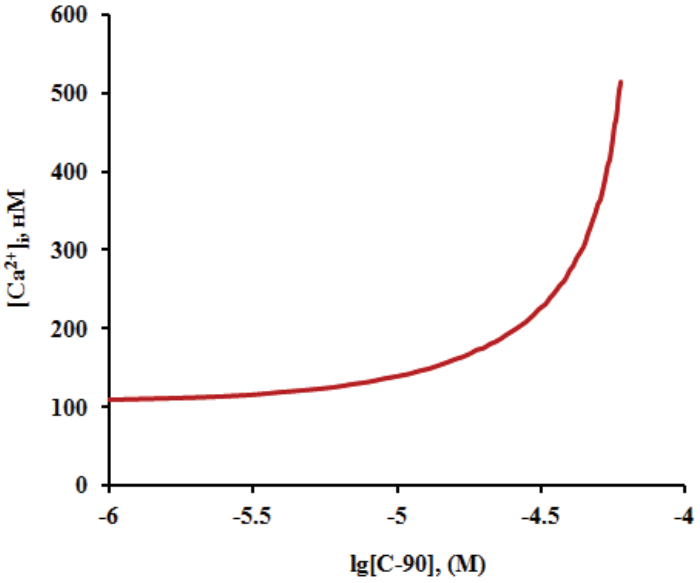


Рис. 12. Результат математичного моделювання залежності рівноважної базальної концентрації іонів Са в клітинах міометрія від концентрації калікс[4]арену С-90.

20 мкМ) має перевагу через помірний вплив на внутрішньоклітинну концентрацію Ca^{2+}, а саме: цитоплазматична концентрація іонів Са зростає не більше, як у 1,5-2 рази відносно початкової (100 нМ), що не повинно призводити до контрактури матки, а дасть змогу керувати базальним тонусом її м'язів.

2.7. Вплив калікс[4]арену С-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 було з`ясувати експериментально, чи К[4]А С-90 дійсно впливатиме на внутрішньоклітинну концентрацію $Ca^{2+}$ у ГМК. У зв`язку з цим у своїх подальших експериментах ми використали метод конфокальної мікроскопії.

Із застосуванням Ca^{2+}-чутливого зонда fluo-4 була встановлена зміна внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} під впливом К[4]А С-90. Було показано, що під дією цього К[4]А (20 мкМ) відбувається транзієнтне (протягом 2-2,5 хв) зростання флуоресцентної відповіді Ca^{2+}-чутливого зонда fluo-4 на 45 ± 9 % (*M* ± *m, n = 7*) у клітині (рис. 13 а, б). Отримані дані підтвердили, що під впливом

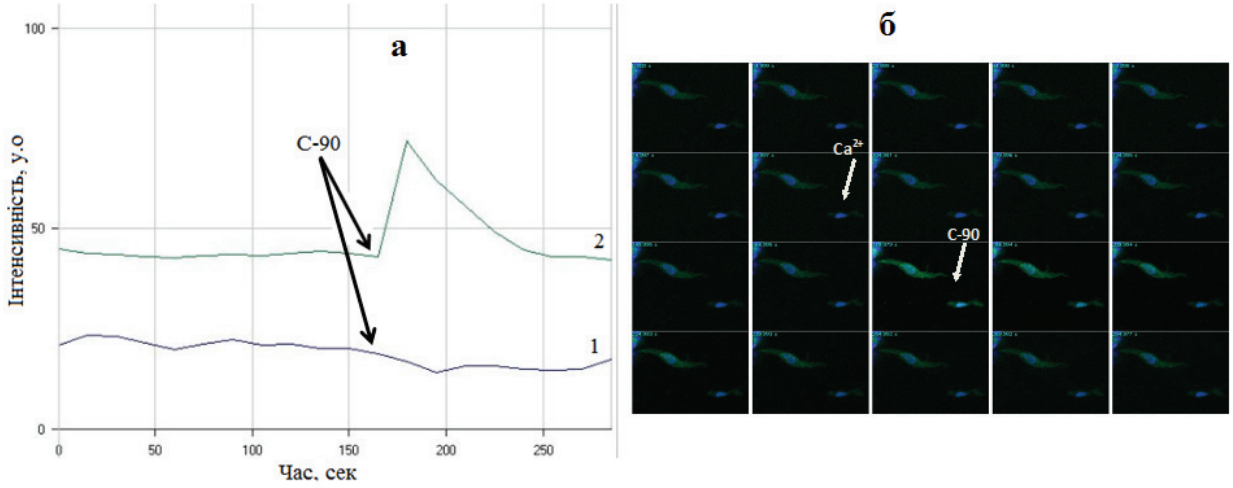


Рис. 13. Селективний інгібітор кальцієвої помпи ПМ К[4]А С-90 індукує збільшення концентрації Ca^{2+} у міоцитах матки. Зміна флуоресценції зондів в міоциті (а), зареєстрована за допомогою методу конфокальної мікроскопії: ДНК-чутливого Hoechst (1) та Ca^{2+}-чутливого fluo-4 AM (2). На 160 сек було внесено аліквоту розчину С-90 (кінцева концентрація - 20 мкМ). Серія послідовних знімків ГМК з використанням скануючого конфокального мікроскопу (б). Наведено результати типового експерименту.

селективного інгібітора Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази ПМ – К[4]А С-90 дійсно зростає концентрація іонізованого Ca^{2+} у міоцитах. Після цього квантовий вихід зонда зменшується й інтенсивність флуоресценції повертається до початкового рівня.

У контрольних дослідах, де використовувалася калікс[4]аренова «чаша» С-150 (20 мкМ), яка практично не чинила вираженого впливу на активність Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази ПМ (рис. 8), підвищення флуоресцентного сигналу fluo-4 не спостерігали (результати не наведено). Також незмінним лишався рівень флуоресценції Hoechst, який був локалізований в основному в ядрі ГМК і фону.

Отже, під впливом К[4]А С-90 (20 мкМ) відбувається підвищення концентрації Ca^{2+} у клітині, яке пов'язано зі зниженням базальної активності

Ca^{2+},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 МХ, Na^{+}-Ca^{2+}-обмінник ПМ).

2.8. Вплив калікс[4]арену С-90 на гідродинамічний діаметр гладеньком'язових клітин.

Вплив К[4]А 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 метод лазерно-кореляційної спектроскопії, за допомогою якої можливо фіксувати зміни ефективного гідродинамічного діаметру ГМК. Як показали результати експериментів, внесення утеротоніка окситоцину (100 нМ) призводило до зменшення ефективного гідродинамічного діаметру у випадку суспензії ГМК на 23,3 ± 3,2 % (M ± m, n = 6) відносно контрольного значення (рис 14, синій стовпчик).

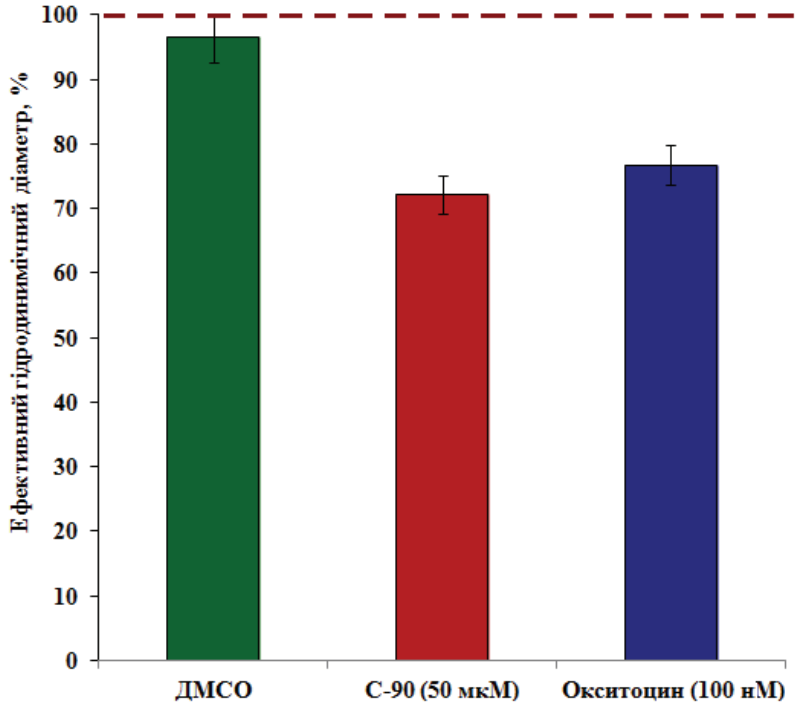


Рис. 14. Зміна ефективного гідродинамічного діаметру ГМК за дії різних ефекторів (M ± m, n =6). За 100 % прийнято контрольне значення гідродинамічного діаметру ГМК за відсутності дії ефекторів.

У випадку контролю середнє значення ефективного гідродинамічного діаметру міоцитів становить близько – 8-9 мкм. У якості контролю на розчинник аплікація аліквоти розчину ДМСО не призводила до істотних змін досліджуваного параметру – гідродинамічний діаметр змінювався лише на 3,5 ± 1,6 % (M ± m, n = 6) відносно контролю (рис. 14, зелений стовпчик). У той же час використання інгібітору Mg^{2+},АТР-залежної Ca^{2+}-помпи ПМ ГМК К[4]А С-90 (50 мкМ) зумовлювало, аналогічно до дії окситоцину, зменшення гідродинамічного діаметра на 27,8 ± 3,8 % (M ± m, n = 6) відносно контрольного значення (рис. 4.29, червоний стовпчик).

Отже, К[4]А С-90 зменшує ефективний гідродинамічний діаметр ГМК ідентично до дії утеротоніка окситоцину. Подібна зміна гідродинамічного діаметру може трактуватися як сукупність подій, які супроводжують процес скорочення ГМК.

2.9. Дія калікс[4]арену С-90 на скоротливу активність міометрія.

Маючи результати по інгібуванню К[4]А С-90 активності кальцієвої помпи ПМ і вказівки на збільшення концентрації іонів Са у клітині під дією К[4]А С-90, цікаво було подивитися, як він діє на спонтанну активність міометрія. Зазначені дослідження були проведені у співпраці з д.б.н. О.В. Цимбалюк. Аналіз зміни механокінетичних параметрів скоротливої відповіді ГМ матки при гіперкалієвій деполяризації за умов застосування К[4]А 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 К[4]А С-90. Скорочення, що були ініційовані аплікацією гіперкалієвого розчину (80 мМ), характеризувалися зниженням амплітуди f_m, та швидкості розслаблення (рис. 15, а).

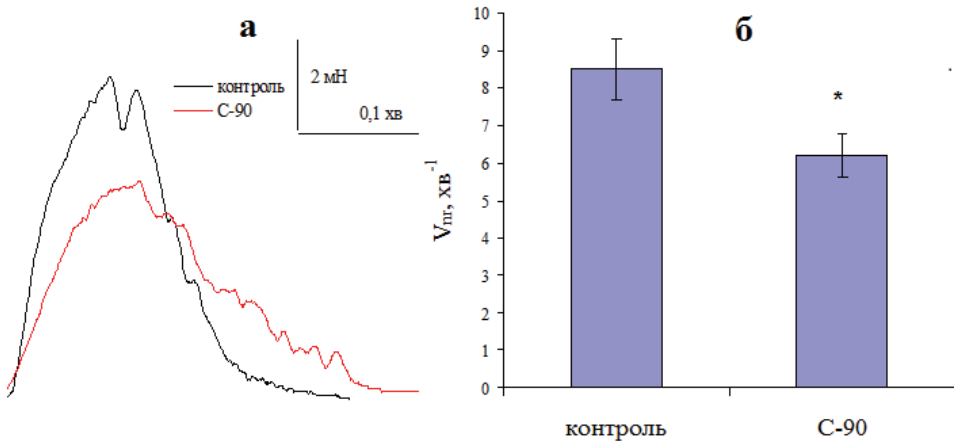


Рис. 15. К[4]А С-90 пригнічує релаксацію механічної напруги ГМ матки. Механокінетика скорочень ГМ в контролі та за дії К[4]А С-90 (10 мкМ) (а) та вплив К[4]А С-90 на нормовану максимальну швидкість фази розслаблення $V_{n,r}$, c^{-1} (б) ($M \pm m$, $n = 5$).

Щоб можна було кількісно охарактеризувати зміни скоротливої відповіді ГМ під впливом К[4]А С-90 ми провели лінеаризацію механокінетичних кривих фази розслаблення гіперкалієвих скорочень. Розрахунки показують, що при дії К[4]А С-90 (10 мкМ) значення нормованої максимальної швидкості $V_{n,r}$ у випадку фази розслаблення знижувалося порівняно з контролем на 25 % (зміни статистично достовірні, $p<0,05$) (рис. 15, б).

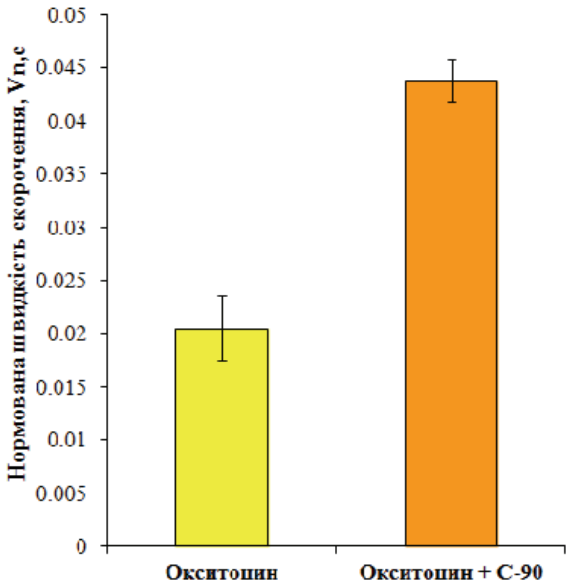


Рис. 16. Зміна нормованої швидкості V_{nc} скорочень міометрія щурів in vitro при дії окситоцину (0,1 МО/мл) за умов впливу калікс[4]арену С-90 (100 мкМ) ($M \pm m$, $n = 7$).

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 $0,0205 \pm 0,0024$ c^{-1} (рис. 16) ($M \pm m$, $n = 10$). За умов попередньої аплікації на ізольований міометрій селективного інгібітора Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази ПМ К[4]А С-90 (100 мкМ), нормована максимальна швидкість окситоцин-індукованого скорочення V_{nc} збільшувалася більше ніж в

два рази – до 0,0438 ± 0,0014 c^{-1} (M ± m, n = 18). Одержані *in vitro* результати (рис. 16) цілком відповідають тлумаченню дії К[4]А С-90 як інгібітора Mg^{2+},АТР-залежної кальцієвої помпи ПМ міоцитів.

Отже, К[4]А С-90 підсилює нормовану швидкість скорочення міометрія у відповідь на його стимуляцію утеротоніком окситоцином.

2.10. Вплив калікс[4]арену С-90 на активність Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази саркоплазматичного ретикулума.

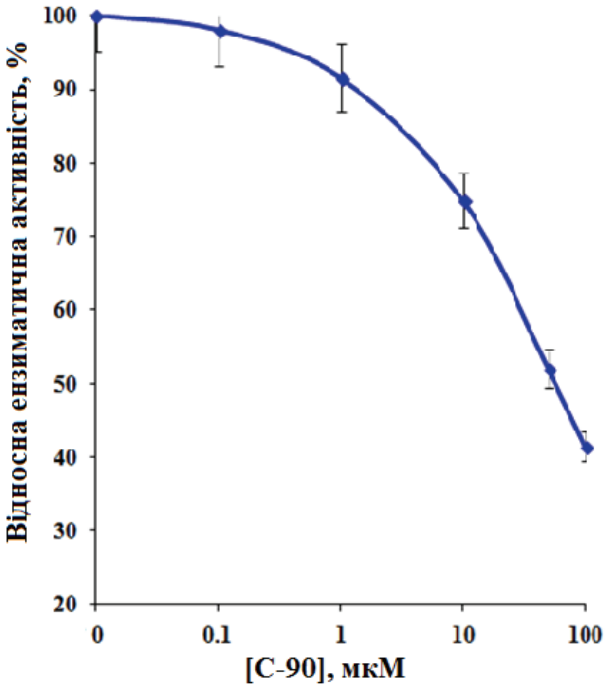


Рис. 17. К[4]А С-90 інгібує активність Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази СР клітин міометрія. Концентраційна залежність інгібіторної дії К[4]А С-90 на ензиматичну активність Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази СР (M ± m, n = 5). За 100 % прийнято значення активності у відсутності К[4]А у середовищі інкубації.

З метою порівняльного з`ясування селективності дії К[4]А С-90, на рівні двох кальцієвих помп ПМ та СР, ми вивчали його вплив на активність Ca,Mg-АТРази СР. Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРаза СР забезпечує зниження внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} в міоплазмі внаслідок акумуляції цього катіона в ретикулярному депо [Sankaranarayanan R., 2016].

Було показано, що К[4]А С-90 (10^{-8}-10^{-4} М) дозозалежно пригнічує Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРазну активність СР, величина коефіцієнта інгібування $I_{0,5}$ складає 57 ± 2 мкМ, значення коефіцієнта Хілла n_H становило 0,60 ± 0,02 (рис. 17) (M ± m; n = 5). У концентраці 100 мкМ К[4]А С-90 зменшує активність ензиму на 59 ± 2 % відносно контрольного значення.

Отже, вплив К[4]А С-90 на активність Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази СР, порівняно з його впливом на активність Ca^{2+},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).

2.11 Активаційна дія сполуки ІФТ-35 на активність Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази плазматичної мембрани гладеньком`язових клітин.

Проте, у процесі виконання дисертаційної роботи нас зацікавили не лише можливі низькомолекулярні селективні інгібітори Ca^{2+}-помпи ПМ, а ще й можливі її активатори. Ми довели, що на роль таких активаторів може претендувати сполука ІФТ-35.

Дана сполука відноситься до похідних імідазо[1,2-α]азепінію, які належать до групи міотропних спазмолітиків - блокаторів Ca^{2+}-каналів чи активаторів АТР-залежних K^+-каналів.

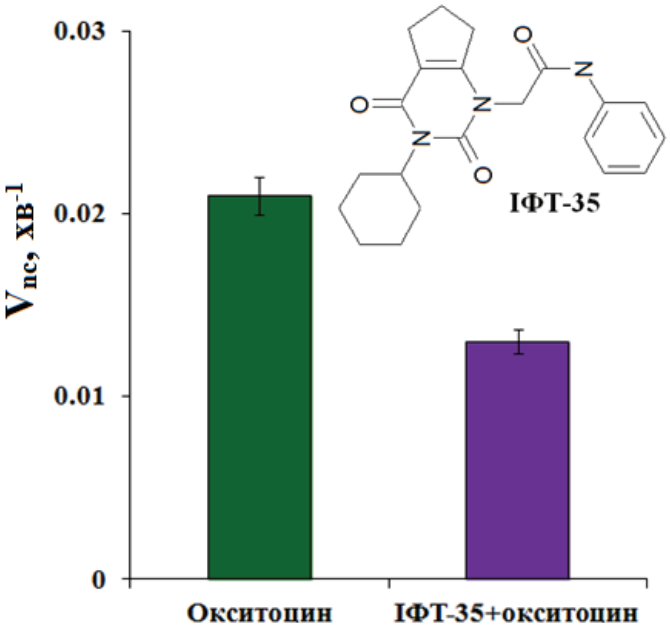


Рис. 18. Зміна нормованої швидкості $V_{нс}$ скорочень міометрія щурів in vitro при дії окситоцину (0,1 МО/мл) за умов впливу С-90 (100 мкМ) та ІФТ-35 (100 мкМ) (M ± m, n = 7).

Вона була надана нам проф. М.А. Мохортом (відділ фармакології серцево-судинних засобів Інституту фармакології та токсикології НАМН України). В дослідженнях *in vitro* на ізольованих поздовжніх смужках міометрія щурів було встановлено, що нормована швидкість скорочення при дії окситоцину складає 0,021±0,003 хв$^{-1}$ (*M±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 0,013±0,001 хв$^{-1}$ (*M±m, n=10*) (рис. 18). Отже, сполука ІФТ-35 здатна до прояву спазмолітичного ефекту на фоні ефекту окситоцину на скорочення матки.

Ми встановили, що ІФТ-35 селективно, на рівні ПМ, активує Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРазу на 40,90±0,37 % (рис. 19).

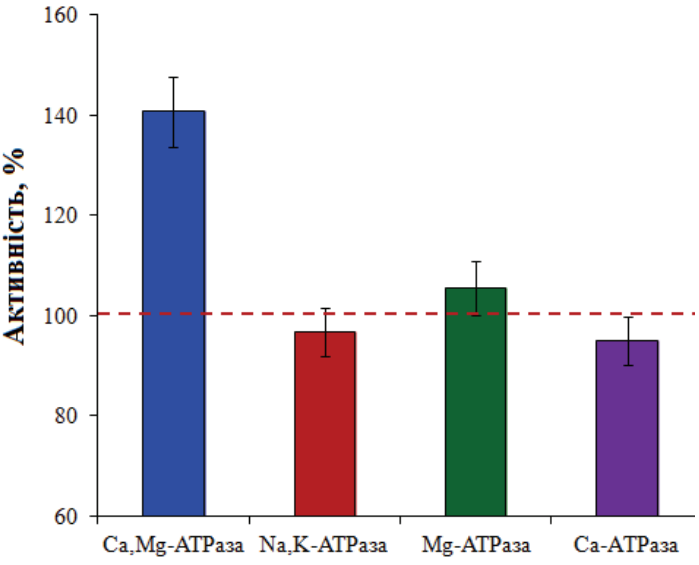


Рис. 19. Сполука ІФТ-35 (100 мкМ) селективно збільшує активність Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази ПМ клітин міометрія (M ± m, n = 5). За 100 % прийнято значення активності у відсутності сполуки ІФТ-35 у середовищі інкубації.

Таким чином, ефект цієї сполуки на активність Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази ПМ є протилежним щодо дії К[4]А С-90 на цей ензим. Поряд з цим, ця сполука, як і К[4]А С-90, практично не впливає на інші АТР-гідролази ПМ: значення активностей для "базальної" Mg^{2+}-АТРази, Ca^{2+}-АТРази і Na^{+},K^{+}-АТРази складали 105±1 %, 95±2 % і 96±1 % відповідно відносно контролю (рис. 19). Константа активації у випадку Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази ПМ для ІФТ-35 $A_{0,5}$ = 6,4±0,5 мкМ, коефіцієнт Хілла n_H = 0,7±0,1 (M ± m; n = 5).

Результати математичного моделювання передбачають, що сполука ІФТ-35 повинна зменшувати концентрацію Ca^{2+} у незбуджених міоцитах: найбільш ефективною є концентрація 0,3-3 мкМ (дані не наведені). Сукупні вищенаведені дані вказують на наступне: сполука ІФТ-35 є перспективною для використання у фармакологічний практиці, оскільки

помірна активація Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази ПМ, яка досягається за порівняно невисоких концентрацій ефектора, дозволить корегувати патологічні стани, пов'язані з надмірною активністю ГМ матки, і які потребують застосування міорелаксанта.

Отже, в наших вищеописаних дослідженнях були вивчені закономірності дії двох селективних "реципрокних" ефекторів на Mg^{2+}-АТР-залежну Ca^{2+}-помпу ПМ міоцитів матки: К[4]А С-90 (інгібітор) та сполуки ІФТ-35 (активатор).

Таким чином, було показано, що К[4]А С-90 пригнічує Ca^{2+}-помпу ПМ та менш ефективно Ca^{2+}-помпу СР, підвищує концентрацію Ca^{2+} в ГМК, стимулює базальний тонус міометрія. І поряд з цим, К[4]А С-90 не впливає на Na^{+}-помпу, "базальну" Ca^{2+}-незалежну Mg^{2+}-АТРазу, Mg^{2+}-незалежну Ca^{2+}-АТРазу ПМ.

Завдання 3. Дослідити вплив калікс[4]аренів на ензиматичну активність Na^{+},K^{+}-АТРази та Mg^{2+}-АТРази плазматичної мембрани.

3.1. 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 катіон-залежних біохімічних процесів і, відповідно, розглядатися як перспективні молекулярні платформи для дизайну фізіологічно активних сполук, ми поставили перед собою за мету вивчити їхній вплив також на активність іншого електроензиму – Na^{+},K^{+}-АТРази ПМ міоцитів матки.

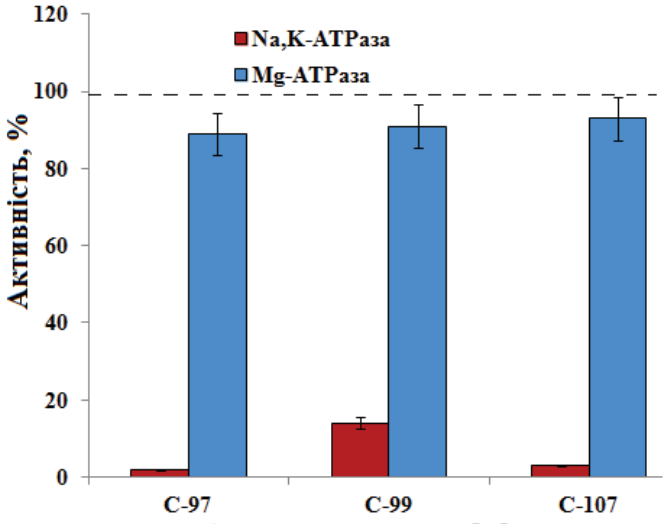


Рис. 20. Інгібувальний вплив К[4]А С-97, С-99, С-107 (100 мкМ) на активності Na^{+},K^{+}-АТРази та базальної Mg^{2+}-АТРази ПМ клітин міометрія (M ± m, n = 7).
За 100 % прийнято значення активності ензимів за відсутності К[4]А у середовищі інкубації.

З великого пулу досліджених К[4]А найбільшу нашу увагу привернули три наступні: С-97, С-99, С-107. Використані у концентрації 100 мкМ, вони пригнічують активність Na^{+},K^{+}-АТРази на 98 %, 86 % та 97 %, відповідно для К[4]А С-97, С-99 та С-107. При цьому ці сполуки майже не впливали на активність Mg^{2+}-АТРази (гальмівний ефект – лише на 9 – 11 %) (рис. 20). Також ми показали, що К[4]А С-97, С-99 та С-107, які використовували в інтервалі концентрацій від 10^{-8} до 10^{-4} М, дозозалежно та значно ефективніше, ніж уабаїн, пригнічують активність Na^{+},K^{+}-АТРази (рис. 21).

Дійсно, К[4]А С-97 та С-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 К[4]А становлять 33±4 та 54±6 нМ відповідно, значення коефіцієнта Хілла n_H складають 0,38±0,06 та 0,40±0,08. З меншою ефективністю пригнічує активність Na^{+},K^{+}-АТРази К[4]А С-99: при використанні його у концентрації 100 мкМ активність ензиму інгібувалась лише на 80 %, а її повне гальмування

спостерігалось при концентрації 1 мМ, при цьому $I_{0,5}$ = 98±8 нМ, n_H = 0,12±0,03. При дії ж уабаїну повне інгібування активності Na^+,K^+-АТази також спостерігається при концентрації 1 мМ, у цьому випадку $I_{0,5}$ = 21±5 мкМ, n_H = 0,54±0,07.

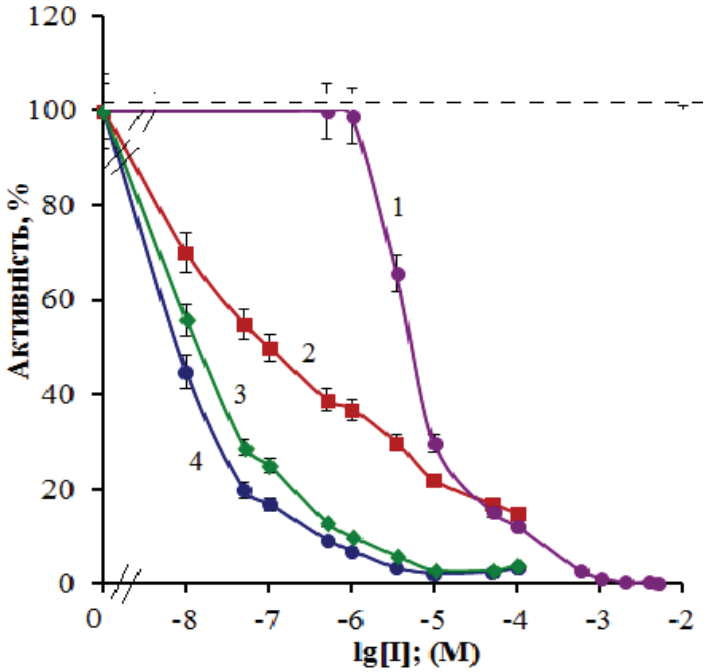


Рис. 21. Каталітичне титрування уабаїном (1), К[4]А С-99 (2), С-107 (3), С-97 (4) Na^+,K^+-АТРази ПМ клітин міометрія (M±m; n = 6).

За 100 % прийнято значення активності у відсутності К[4]А та уабаїну у середовищі інкубації.

Отже, К[4]А С-97, С-107 та С-99 значно ефективніше, ніж уабаїн, гальмують активність натрієвої помпи у діапазоні концентрації цих ефекторів 0 – 10 мкМ: у випадку дії цих К[4]А величина уявної константи інгібування $I_{0,5}$ < 0,1 мкМ, а у випадку дії уабаїну це значення у середньому на два – три порядки більше і становить 20 – 30 мкМ. Для інгібувальної дії як зазначених К[4]А, так і уабаїну, 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 К[4]А чи уабаїну опосередковується взаємодією з декількома молекулярними комплексами Na^+,K^+-АТРази.

У подальших дослідженнях ми, на прикладі Na^+,K^+-АТРази, намагалися дослідити деякі закономірності дії вказаних К[4]А на активність зазначеного електроензиму.

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

Для вивчення впливу структурних компонентів калікс[4]аренової молекули на ензиматичну активність ми провели дослідження інгібувальної дії на Na^+,K^+-АТРазу ПМ клітин міометрія К[4]А С-107, його регіоізомеру – К[4]А С-160, а також модельних сполук – незаміщеного дипропоксикалікс[4]арену С-150 (каліксаренова "чаша"), та N-(4-гідроксифеніл)-2-піридил-амінофосфонової кислоти М-3 (відповідні структурні формули наведені на рис. 2). Зазначимо, що К[4]А С-107 складається як би із 3-х частин: каліксаренової "чаші" (макроциклічна основа із 4-х бензольних кілець, зв'язаних метиленовими групами) (еквівалент – сполука С-150), і двох амінофосфонових груп, пов'язаних з фенольними фрагментами (еквівалент – сполука М-3).

Показано, що К[4]А С-107 лише при концентрації 100 мкМ здатний незначно (на 5 %) інгібувати Mg^{2+}-АТРазну активність.

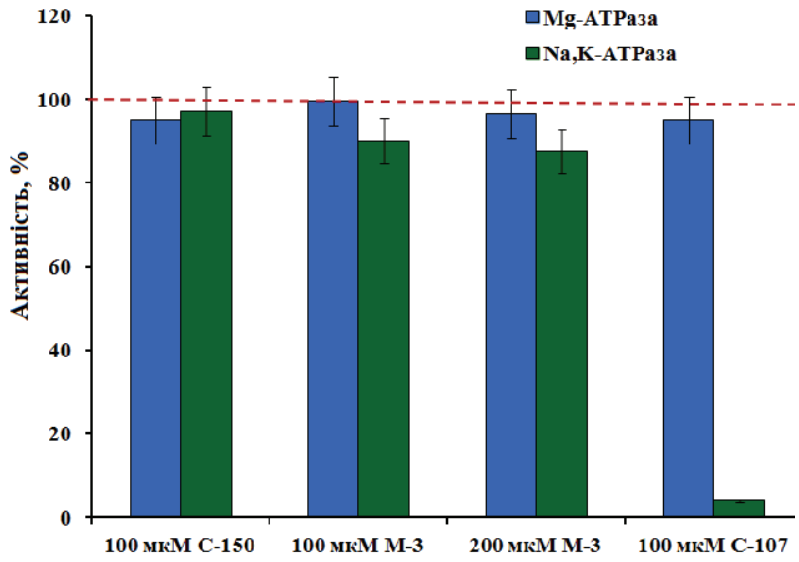


Рис. 22. Активність Na^+,K^+-АТРази та Mg^{2+}-АТРази ПМ за дії К[4]А С-107, С-150 та модельної сполуки М-3 (M ± m, n = 5).
За 100 % прийнято значення активності у відсутності К[4]А та сполуки М-3 у середовищі інкубації.

Структурні фрагменти цього калікс[4]арену С-150 (100 мкМ) та М-3 (100 і 200 мкМ) практично не впливали на досліджувані ензиматичні системи (рис. 22). 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 К[4]А 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.

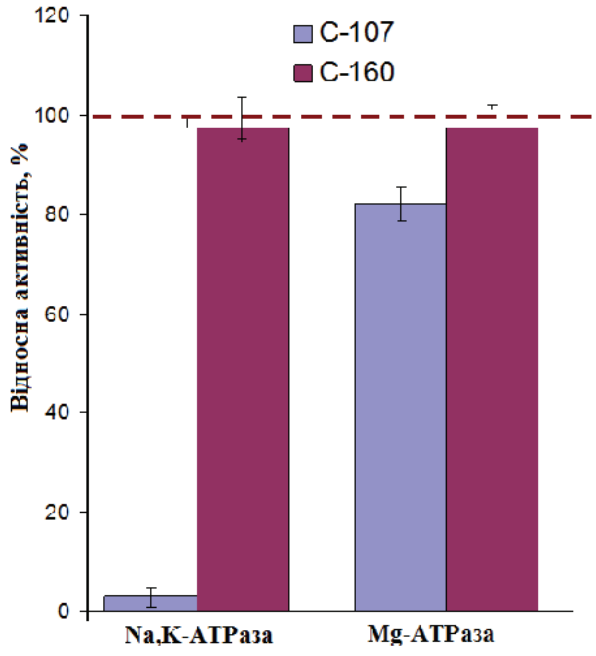


Рис. 23. Порівняльне дослідження впливу К[4]А С-107 та С-160 (100 мкМ) на Na^+,K^+-АТРазну та Mg^{2+}-АТРазну активності ПМ клітин міометрія (M ± m; n = 5).
За 100 % прийнято значення активності у відсутності К[4]А у середовищі інкубації.

Для подальшого визначення ролі структури макроциклічної платформи К[4]А С-107 та взаємного розташування амінофосфонових угрупувань на ній у проявленні інгібувальної дії на Na^+,K^+-АТРазну активність ПМ ГМК матки був досліджений К[4]А С-160, що є регіоізомером К[4]А С-107: у випадку К[4]А С-160 амінофосфонові та трет-бутильні залишки на верхньому вінці каліксаренової чаші та пропокси залишки на нижньому вінці макроциклу, розташовані у проксимальних положеннях каліксаренової основи, на відміну від К[4]А С-107, у якого ці ж залишки знаходяться у дистальних положеннях.

Проведені дослідження вказують на те, що відносне положення замісників каліксаренової чаші дуже важливе, так як це призводить до повної втрати інгібувальних властивостей К[4]А С-160 щодо Na^+,K^+-АТРази порівняно з К[4]А С-107. Поряд з цим, К[4]А С-160 не впливає на активність Mg^{2+}-АТРази, К[4]А С-107 інгібує її лише на 20 % (рис. 23).

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

3.3. Порівняльне дослідження впливу калікс[4]арену С-99 та його аналогів на Na^+,K^+-АТРазну активність.

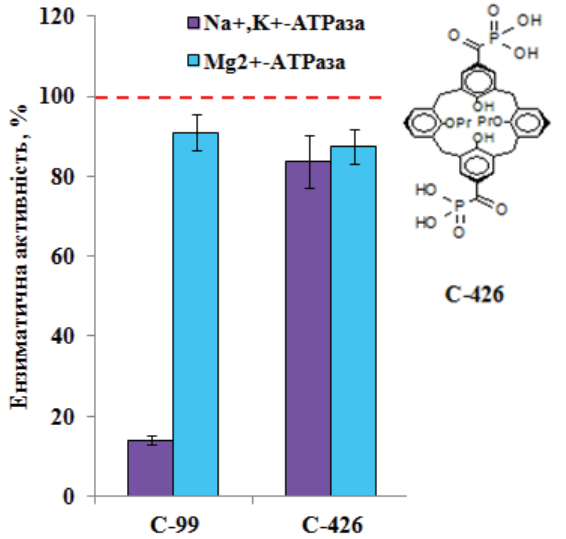


Рис. 24. Вплив К[4]А С-99 та С-426 (100 мкМ) на активність Na^+,K^+-АТРази та "базальної" Mg^{2+}-АТРази ПМ клітин міометрія ($M \pm m$; $n = 5$). За 100 % прийнято значення активності у відсутності К[4]А у середовищі інкубації.

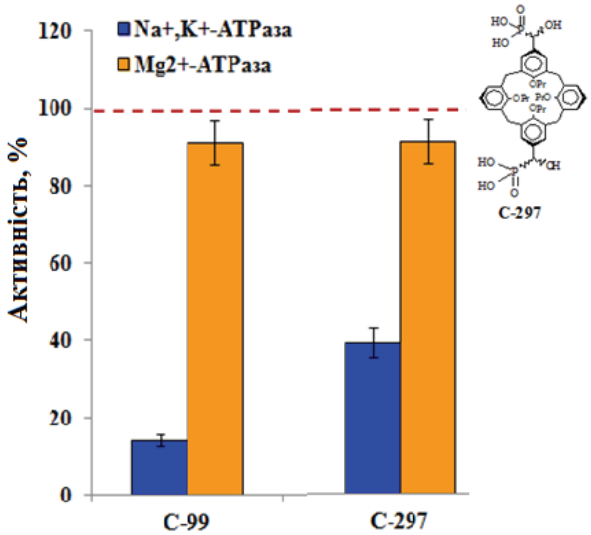


Рис. 25. Вплив К[4]А С-99 і С-297 (100 мкМ) на активність Na^+,K^+-АТРази та "базальної" Mg^{2+}-АТРази ПМ клітин міометрія ($M \pm m$; $n = 5$). За 100 % прийнято значення активності у відсутності К[4]А у середовищі інкубації.

З метою визначення ролі структурної організації молекули К[4]А С-99 у проявленні інгібіторної дії на Na^+,K^+-АТРазу ПМ клітин міометрія, ми вивчали дію структурно подібних до нього К[4]А - С-296 та С-426 на активність даного ензиму.

К[4]А С-426 за своєю структурою подібний до К[4]А С-99. Структурні відмінності цих сполук мають місце на верхньому вінці каліксаренового макроциклу. Як каліксаренова "чаша", так і хімічна будова нижнього вінця є однаковими для них. К[4]А С-426 на верхньому вінці макроциклу має залишки кетометилфосфонової кислоти, на відміну від гідроксіметилфосфонатних залишків К[4]А С-99. Встановлено, що К[4]А С-426 у концентрації 100 мкМ пригнічує активність обох досліджених АТРаз лише на 16 % відносно контрольного значення (рис. 24).

Отже, окислення гідроксиметилфосфонових груп на верхньому вінці К[4]А С-99 призводить до втрати інгібувальної дії на Na^+,K^+-АТРазну активність в ПМ клітин міометрія.

Надалі ми дослідили дію К[4]А С-297, що є структурним аналогом К[4]А С-99, на натрієву помпу (рис. 25). У цього К[4]А нижній вінець відрізняється від К[4]А С-99 наявністю ще двох додаткових пропоксильних груп. Замісники по верхньому вінці макроциклу К[4]А С-297 такі ж, як і у С-99. Показано, що К[4]А С-297 (100 мкМ) знижує ензиматичну активність Na^+,K^+-АТРази на 61,5 ± 1,9 % відносно контрольного значення (рис. 25). При цьому він практично не впливає на активність "базальної" Mg^{2+}-АТРази (зменшення активності лише до 91 % від контрольного значення).

Таким чином, модифікація нижнього вінця К[4]А С-99 двома додатковими пропоксизалишками (К[4]А С-297) призводить до зменшення ефективності інгібувальної дії на Na^+,K^+-АТРазну активність в ПМ клітин міометрія.

3.4. Особливості дії калікс[4]арену С-97 на активність Na^+,K^+-АТРази.

Графік залежності 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 К ензиматична активність Na^+,K^+-АТРази не тестується взагалі (рис. 26, контроль), що є властивим для даного ензиму.

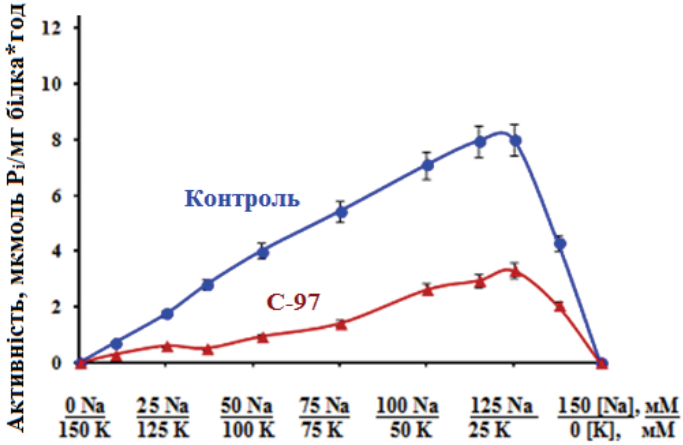


*Рис. 26. Вплив К[4]А **С-97** (10 нМ) на залежність активності Na^+,K^+-АТРази ПМ клітин міометрія від співвідношення $[Na^+]/[K^+]$ (M±m; n = 6).*
Досліди проводились за умови збереження ізотонічності середовища інкубації: $[Na^+] + [K^+] = 150$ мМ.

Отже, за цих умов оптимальним співвідношенням концентрацій $[Na^+]/[K^+]$ для функціонування Na^+,K^+-АТРази є 115-125 мМ NaCl і 35-25 мМ KCl. Значення константи активації K_{Na}^+ для іонів Na для уабаїнчутливої Na^+,K^+-АТРази становить 50±4 мМ ("натрієва гілка" контрольного графіка на рис. 26) (M±m; n=6). Значення константи активації K_K^+ для іонів К становить 136±12 мМ ("калієва гілка" контрольного графіка на рис. 26) (M±m; n=6). Активність Mg^{2+}-АТРази не залежить від зміни співвідношеня $[Na^+]/[K^+]$ взагалі (дані не наведені). Встановлено, що К[4]А С-97, внесений у середовище інкубації в концентрації 10 нМ, зменшував 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 К[4]А (10 нМ) за ізотонічних умов вірогідно збільшував величину константи активації K_{Na}^+ іонами натрію Na^+,K^+-АТРази: від 50±4 мМ (контроль) до 76±6 мМ (у присутності К[4]А С-97) (M±m; n=6). При цьому не спостерігалось змін у спорідненості зазначеного ензиму до іонів К – величина константи активації для цих іонів K_K^+ становила 136±12 мМ (контроль) та 140±15 мМ (у присутності К[4]А) (M±m; n=6). Таким чином, можна припустити, що одна із причин інгібіторної дії К[4]А С-97 на Na^+,K^+-АТРазу може бути пов'язана із зменшенням, під дією цієї речовини, спорідненості ензиму до іонів Na (рис. 26).

Було також показано, що К[4]А С-97 та С-107 не впливають на спорідненість Na^+,K^+-АТРази до іонів Mg та АТР, а також підсилюють інгібувальну дію уабаїну на Na^+,K^+-АТРазну активність (дані не наведені).

3.5. Молекулярний докінг взаємодії калікс[4]арену С-107 і його модельних сполук з ліганд-зв'язувальними ділянками Na^+,K^+-АТРази.

Було проведено комп'ютерне моделювання взаємодії К[4]А С-107 і його модельних сполук з ліганд-зв'язувальними ділянками Na^+,K^+-АТРази ПМ. Результати докінгу К[4]А С-107 в ліганд-зв'язувальних ділянках Na^+,K^+-АТРази свідчать про те, що він може розміщуватися у просторі декількох областей ліганд-зв'язувальних центрів ензиму.

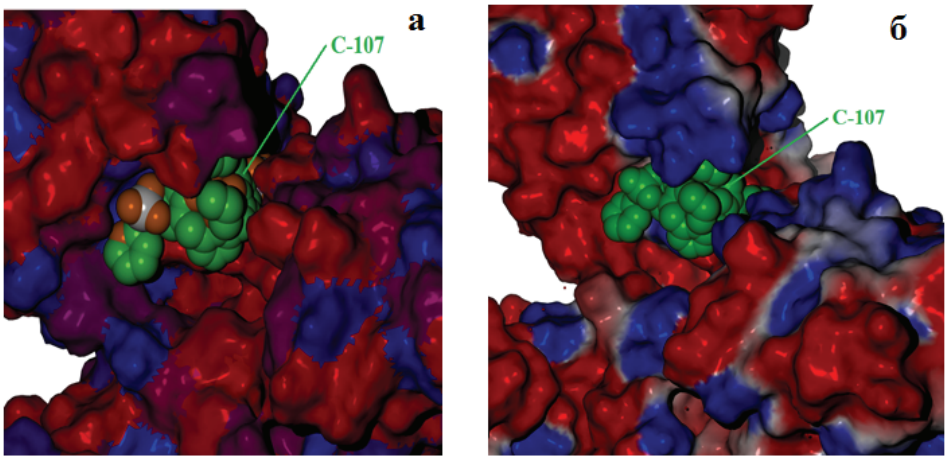


Рис. 27. Ідентифікація гідрофобних (а) та електростатичних (б) взаємодій К[4]А С-107 з ліганд-зв'язувальною ділянкою Na^+,K^+-АТРази в області зв'язування 1. Зони гідрофобних (червоний) і гідрофільних (синій) властивостей ензиму, та відповідно негативно (синій) та позитивно (червоний) заряджені зони ензиму. Програми "Chimera" [Li L., 2010] та "Yasara" [Krieger E., 2002].

При цьому встановлені деякі особливості у взаємодії ліганду з ензимом. Зокрема, важливу участь у взаємодії каліксаре-нової "чаші" С-107 із ензимом відіграють гідрофобні (стеричні) взаємодії (рис. 28). Тобто залишки ароматичних амінокислот "фіксують" К[4]А 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 К[4]А С-107. Таким чином гідрофільні фрагменти К[4]А як би задають "вектор напрямку", у якому фіксується молекула С-107 в області взаємодії із ензимом. Вивчалися і міжмолекулярні водневі зв'язки у системі " К[4]А – білок". Найбільш характерним є водневий зв'язок, в якому беруть участь фосфатна та аміногрупа бічних залишків К[4]А. Менш характерні водневі зв'язки, в яких беруть участь інші атоми бічних залишків К[4]А. Для калікс[4]аренової "чаші" водневі зв'язки з атомами білка не характерні.

Завдання 4. З`ясувати закономірності дії калікс[4]аренів на неензиматичний гідроліз АТР.

4.1. Гідроліз АТР, який стимулюється деякими калікс[4]аренами.

Раніше було продемонстровано, що каліксарени можуть утворювати комплекси з АТР [Tian-Ming Y., 2002]. Нами було показано, що деякі К[4]А можуть 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). Виявилося, що найбільш ефективно стимулює неензиматичний гідроліз АТР К[4]А С-107 (рівень гідролізу - 17,3 ± 1,3 нмоль P_i за 20 хв. інкубації) за умов використання середовища інкубації, яке містило 1 мМ АТР та 3 мМ $MgCl_2$ (температура – 37 °С). К[4]А С-160 значно менш ефективно здатний прискорювати реакцію гідролізу АТР, а К[4]А С-150

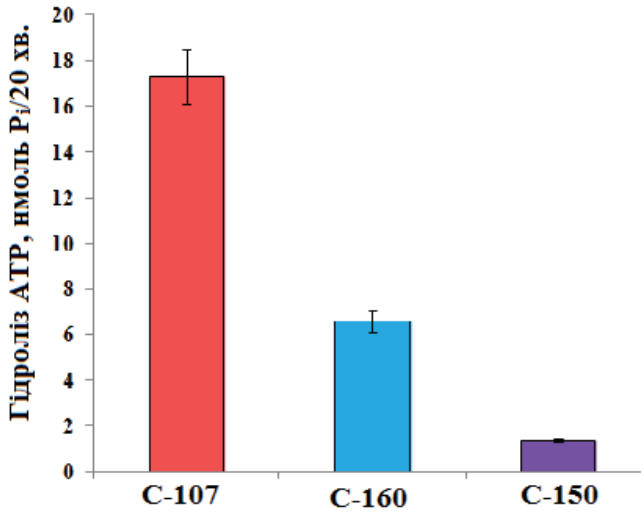


Рис. 28. Прискорення реакції гідролізу АТР К[4]А С-107, С-160 та С-150 (M ± m, n = 6).

зовсім не здатний каталізувати гідроліз АТР (рис. 28).

Отже, каліксаренова "чаша" як така практично, не може здійснювати гідролітичне розщеплення фосфоангідридних зв'язків у молекулі АТР.

У подальших дослідженнях ми вивчили деякі кінетичні закономірності реакції гідролізу АТР, індукованого К[4]А С-107.

4.2. Дослідження кінетики гідролізу АТР, який індукується калікс[4]ареном С-107.

Аналіз кінетики гідролізу АТР, індукованого К[4]А С-107, показав, що крива характеризується монотонною ходою, яка має тенденцію до виходу на плато (у часі). За даних умов протікання процесу (100 мкМ С-107, 1 мМ АТР, 3 мМ $MgCl_2$; температура – 37 °С) платове значення p_{max} накопичення неорганічного фосфату спостерігається приблизно з 45-60^{ої} хв. інкубації, коли реакція практично завершується (рис. 29). Розрахунок свідчить на користь того, що після закінчення реакції гідролізу АТР у середовищі інкубації залишається 90 % від початкової концентрації нуклеозидтрифосфату.

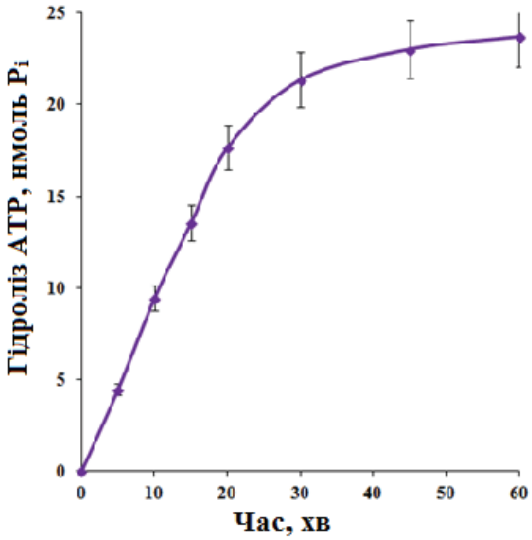


Рис. 29. Кінетична крива неензиматичного гідролізу АТР К[4]А С-107 (M ± m, n = 5). Концентрація К[4]А С-107, АТР та $MgCl_2$ – 100 мкМ, 1 мМ та 3 мМ відповідно.

4.3. Дослідження властивостей реакції гідролізу АТР, який індукується калікс[4]ареном С-107.

Надалі ми дослідили залежність кінетичних параметрів реакції гідролізу АТР від концентрації К[4]А С-107. З`ясовано, що підвищення концентрації К[4]А С-107 від 20 до 100 мкМ підсилює реакцію гідролізу АТР (1 мМ) (дані не наведені). Було знайдено, що підвищення концентрації АТР від 1 до 5 мМ стимулює реакцію гідролізу нуклеозидтрифосфату (концентрація К[4]А С-107 – 100 мкМ) (дані не наведені). Реципрокна лінійна залежність τ часу напівгідролізу АТР від концентрації АТР є перспективною у якості калібрувального графіка для кількісного визначення цього нуклеозидтрифосфату у біологічних рідинах.

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 К[4]А С-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”) (рис. 30а).

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 (рис. 30а).

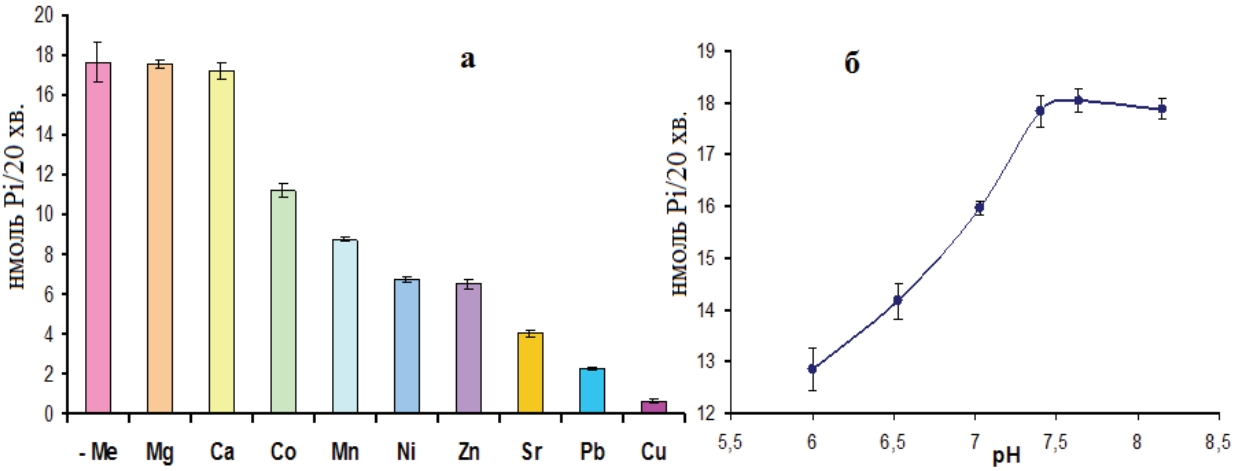


Рис. 30. Вплив двохвалентних металів (3 мМ) (а) та pH середовища інкубації (б) на неензиматичний гідроліз АТР (1 мМ), що стимулюється К[4]А С-107 (100 мкМ) (M ± m; n = 5).

Був вивчений вплив pH на реакцію гідролізу АТР, індукованого К[4]А С-107. Показано, що залуження середовища інкубації в діапазоні pH від 6,0 до 8,0 підсилює каліксарен-залежний гідроліз АТР: pH-залежність при підвищенні pH від 6,0 до 7,4 була майже лінійною, при подальшому ж збільшенні водневого показника вона виходила на стійке плато (рис. 30б).

Величина енергії активації калікс[4]арен-індукованого гідролізу АТР, що була визначена методом Вант-Гоффа, становила 50,7 ± 8,9 кДж/моль. Цей показник близький до такого, що є властивим для реакцій ензиматичного гідролізу АТР транспортною Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРазою [Kosterin S., 1994].

К[4]А С-107-індукований гідроліз АТР не чутливий до зміни в`язкості та іонної сили середовища інкубації.

4.4. Комплексоутворення між калікс[4]ареном С-107 та АТР.

Безпосередньо було доведено, що дійсно має місце комплексоутворення між деякими К[4]А та АТР. Нижче наведені структури комплексу “С-107-АТР” (I-III), що були розраховані методом молекулярної механіки (співпраця з академіком НАНУ проф. В.І.Кальченком та його колегами, ІОХ НАНУ) (рис. 33).

Методом обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії було досліджено процес комплексоутворення К[4]А С-107 з АТР: константа дисоціації комплексу “С-107-АТР” K_d = 200-230 мкМ; стехіометрія зв’язування становить “1:1”; стабілізують утворені комплекси міжмолекулярні водневі зв’язки різних типів, а також відіграють певну роль і більш слабкі взаємодії типу: π-π, OH–π, NH_2^+–π.

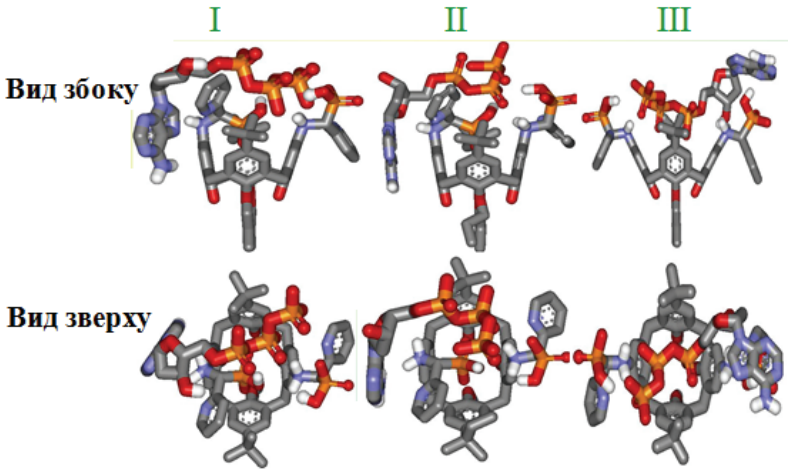


Рис. 31. Структури комплексів "С-107 – АТР" (I-III) (бічний та апікальний вигляд).
У наведених "стрижневих" моделях атоми вуглецю позначені сірим кольором, азоту – синім, кисню – червоним, фосфору – помаранчевим, водню – білим кольорами. Програма "HyperChem 7.01".

Таким чином, проаналізувавши одержані дані можна припустити, що К[4]А С-107 дійсно є комплексоутворювачем для АТР.

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 К[4]А на АТР-гідролази ГМК (рис. 32).

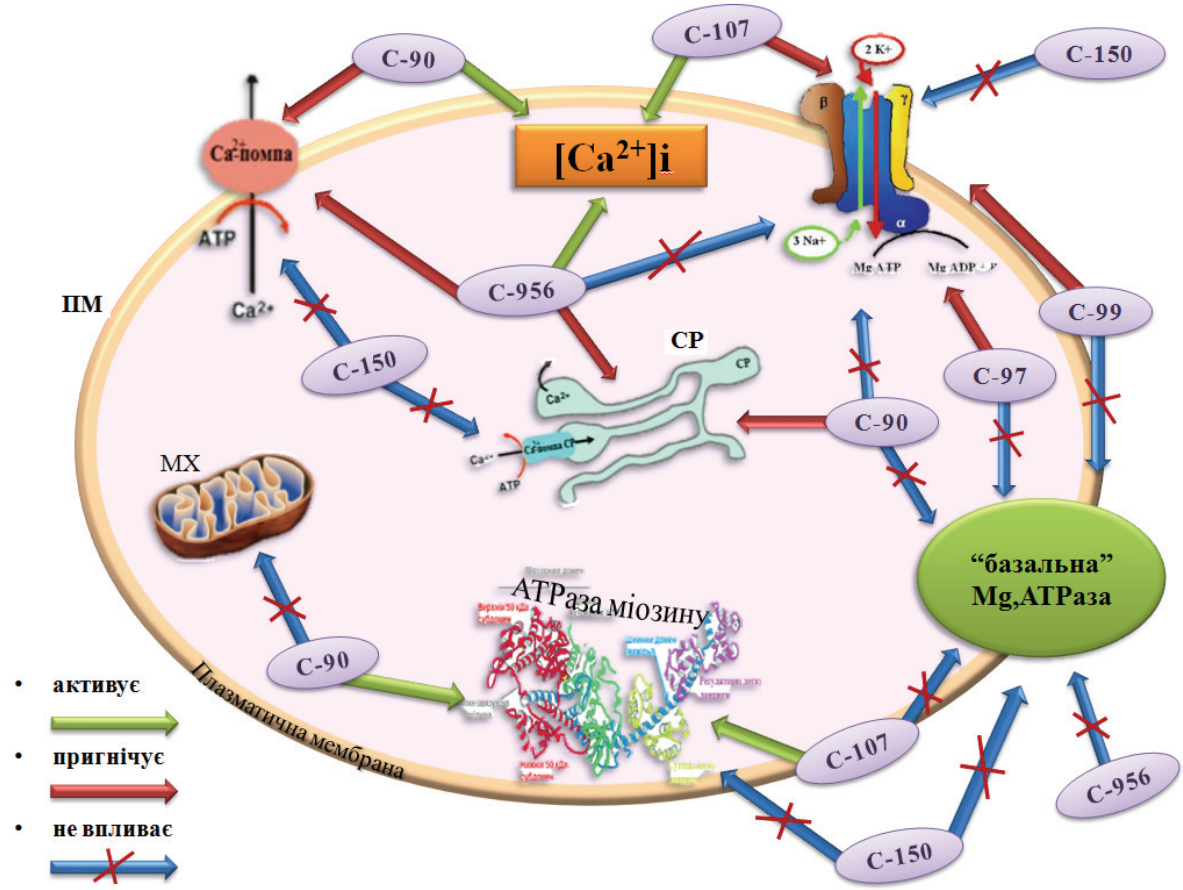


Рис. 32. Потенційні мішені впливу циклічних олігомерів фенолів (К[4]А) на АТР-гідролази гладеньком'язових клітин.

Отже, доведено, що К[4]А С-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 АТРазу міозину. К[4]А С-107 інгібує активність Na^+,K^+-АТРази ПМ, а також підвищує активність АТРази міозину (дані Р.Д. Лабинцевої). Обидва К[4]А не впливають на активність «базальної» Mg^{2+}-АТРази.

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 ГМК, 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 К[4]А 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 К[4]А, що були вивчені нами, є перспективними для розбудови ліків нового покоління – селективних модуляторів функціонування АРТ-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 та кальцієвий гомеостаз в міометрії. 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 С-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 С-99 та С-107 здатні проявляти мембранотропні ефекти. Під впливом калікс[4]арену С-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 С-90 селективно та ефективно ($I_{0,5}$ = 20,2 ± 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 С-90 на Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРазну активність передусім пов'язана саме з кооперативним впливом чотирьох просторово орієнтованих на калікс[4]ареновій платформі сульфоніламідинових груп, але не з дією тетрафенольного макроциклу як такого чи з дією окремої фармакофорної групи.

4. Показано, що, у випадку транспортної Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази плазматичної мембрани, калікс[4]арен С-90 зменшує максимальну початкову швидкість V_{max} реакції гідролізу АТР, але не впливає на коефіцієнти активації для іонів Са та Mg, уявну константу Міхаеліса K_m за АТР. Таким чином, калікс[4]арен С-90 діє як повний неконкурентний інгібітор Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази.

5. Вперше встановлено, що калік[4]арен С-90 (100 мкМ) пригнічує транспортну функцію Mg^{2+}-АТР-залежної Ca^{2+}-помпи плазматичної мембрани у міоцитах матки. Згідно з результатами математичного моделювання калік[4]арен С-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 калік[4]арен С-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 С-97, С-99 та С-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 уабаїн, 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 С-97, С-99, С-107 та уабаїну). В прояві інгібуючої дії калікс[4]арену С-107 на активність Na^+,K^+-АТРази важливе значення мають: сукупний ефект каліксаренової чаші та фрагменту М-3; взаємне розташування амінофосфонових груп у молекулі калікс[4]арену; модифікація верхнього та нижнього вінця молекули калікс[4]арену.

8. Калікс[4]арени С-97 та С-107 зменшують спорідненість Na^+,K^+-АТРази до іонів Na та не впливають на спорідненість до іонів Mg та АТР, а також підсилюють інгібувальну дію уабаїну на Na^+,K^+-АТРазну активність. Із залученням методів докінг-аналізу проведено комп'ютерне моделювання міжмолекулярних взаємодій, характерних для комплексів "ліганд (калікс[4]арен С-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 калік[4]арени (С-107 та С-160) здатні стимулювати неензиматичний гідроліз АТР. На прикладі калікс[4]арену С-107

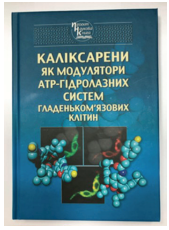
досліджено кінетичні та концентраційні залежності реакції гідролізу АТР: крива процесу гідролізу не підпорядковується закономірностям реакцій низьких порядків.

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 pH та температури (збільшується при підвищені pH та зростанні температури, E_a~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 гладенькоm'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 С-90, він є перспективним для клінічної практики у якості препаратів для стимуляції пологів під час їх ускладнень або для підвищення базального тонусу міометрія.

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 гладенькоm'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 гладенькоm'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. 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).*

4. **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)*.

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]arenas C-90 action on the activity of plasma membrane Ca^{2+},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. **Векліч 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(фенілсульфо-ніліміно)-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).*

11. 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: Академпериодика. 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 Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPases in plasma membrane and

sarcoplasmic reticulum in myometrium cells. The Ukrainian Biochemical Journal. 2016, 88(2): 5-15. (*Особистий внесок: одноосібна робота).*

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 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)*.

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 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)*.

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 уабаїну 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 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)*.

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 уабаїну. 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 Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази плазматичної мембрани гладенькоm`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., Онуфрийчук О.В., **Векліч Т.О.,** Черенок С.О., Кальченко В.І., Мірошніченко М.С., Костерін С.О. Порівняльне дослідження впливу оуабаїну 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 Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази плазматичної мембрани гладенькоm`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 Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази плазматичної мембрани гладенькоm'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. **Векліч Т.О.** Na^+,K^+-АТРазна активність сарколеми міометрія та вплив каліксаренів на неї. Матеріали IX Укр. біохім. з`їзду. Харків. 2006, 1: 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., **Векліч Т.О.** Каліксарен С-107 стимулює неферментативний гідроліз АТР. Тези доповідей II міжнародної конференції молодих учених „Біологія від молекули до біосфери". Харків. 2007: 49-50.

41. Шкрабак О.А., **Векліч Т.О.** Дія каліксарену С-107 на Na^+,K^+-залежний ферментативний та неферментативний гідроліз АТР. 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 каликсарен-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 hydrolysys. 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. Тезисы докладов 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 ПМ ГМК. Тезисы докладов VI Международной 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 ПМ 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 ПМ клітин міометрія від уабаїну. Тезисы докладов 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 PM. 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 Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРазы ПМ ГМК. Тезисы докладов VIII Международной 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-transpotring ATPases of smooth muscle cell plasma membrane. III International Symposium "Intracelular 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 “Intracelular 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., **Векліч Т.О.,** Костерін С.О. Молекулярний дизайн, синтез та біологічні дослідження каліксаренових регуляторів внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу в ГМ 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 Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази ПМ ГМК. Тезисы докладов 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. Тезисы докладов 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., **Векліч Т.О.,** Шкрабак О.А., Бевза О.В. Інгібітор Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази ПМ калікс[4]арен С-90 як модулятор концентрації Ca^{2+} в міоцитах матки. Тези доповідей КМУ „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. К[4]А С-90 как ингибитор Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРазы ПМ. Тезисы докладов КМУ „Экспериментальная и теоретическая биофизика”. Пущино, 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 ПМ – калікс[4]арен С-90 – підвищує концентранцію 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, Tsymbalyuk Olga. Calix[4]arene C-90 as selective inhibitor of PM 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 ПМ міоцитів матки та дія калікс[4]аренів на неї. Тези доповідей 4-го з`їзду УТКБ. 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 УТКБ. Ужгород, Україна. 2014: 7.

74. **Векліч Т.О.,** Шкрабак О.А., Мазур Ю.Ю. Калікс[4]арени як селективні інгітори АТР-гідролазних систем ПМ ГМК. 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 ПМ – калікс[4]арен С-90 викликає зміну концентрації Ca^{2+} у ГМК 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 сесії „Фундаментальні проблеми створення нових речовин і матеріалів хімічного виробництва”. Київ. 2014: 61-63.

77. Mazur Iu.Iu, **Veklich T.O.,** Shkrabak O.A., Tsymbalyuk 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 ПМ 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 ПМ 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 Ca^{2+},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 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 Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРаз ПМ та СР 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 ПМ 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 ПМ міоцитів матки. Тези доповідей 5-го з`їзду УТКБ 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. К[4]А С-90 як перспективна супрамолекулярна сполука для регуляції активності Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази ПМ ГМК. 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 ПМ 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 ПМ ГМ. Тези доповідей 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+}-АТРазу ПМ. 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 ПМ ГМ. Тези доповідей 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 ПМ міоцитів матки. Тези доповідей міжнародної 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 ПМ 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 ПМ міоцитів матки калікс[4]ареном С-956. Тези доповідей 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 К[4]А С-90 на Ca^{2+}-помпу ПМ ГМ. Тези доповідей XXV 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 ПМ ГМ. 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 ПМ ГМК // 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: 320-322.

АНОТАЦІЯ

Векліч Т.О. Механізми дії каліксаренів на катіон-транспортувальні АТР-гідролази та кальцієвий гомеостаз в міометрії. – 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 вивченню біохімічних та фізико-хімічних механізмів дії калікс[4]аренів на мембранозв`язані катіон-транспортувальні електроензими гладенькомʼязових клітин та на неензиматичний гідроліз АТР.

У дослідах, проведених на фракції плазматичних мембран гладенькомʼязових клітин міометрія свині, оброблених розчином дигітоніну (0,1 мг/мл) та на суспензії міоцитів щурів, досліджено дію калікс[4]аренів на Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРазну, Na^{+},K^{+}-АТРазну та Mg^{2+}-АТРазну активності у плазматичній мембрані і Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРазну активність саркоплазматичного ретикулума клітин міометрія, а також 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. Виявлено, що калікс[4]арен С-90 селективно та ефективно ($I_{0,5}$ = 20,2 ± 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 плазматичної мембрани. Калікс[4]арен С-90 не впливає на коефіцієнти активації для іонів Са та Mg, уявну константу Міхаеліса K_m за АТР, проте ця сполука у всіх випадках зменшує максимальну початкову швидкість V_{max} реакції гідролізу АТР. Таким чином, калікс[4]арен С-90 діє як повний неконкурентний інгібітор Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази плазматичної мембрани. Встановлено, що калік[4]арен С-90 (100 мкМ) повністю пригнічує транспортну функцію Ca^{2+}-помпи плазматичної мембрани у міоцитах матки. Згідно з результатами математичного моделювання калік[4]арен С-90 (1-25 мкМ) має збільшувати концентрацію Ca^{2+} в незбуджених міоцитах міометрія. Ці дані підтверджуються результатами, одержаними за допомогою конфокальної мікроскопії, згідно яким ця сполука підвищує концентрацію Ca^{2+} у міоцитах. Встановлено, що окремі калік[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).

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 homeoctasis of the myometrium. - Qualifying scientific research with the manuscript rights.

Thesis for Doctor of Science degree on cpecialty 03.00.04 – biochemistry. O.V. Palladin Institute of Biochemistry of NAS 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.

In experiments carried out with the plasma membrane fraction of pig smooth muscle cells 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 membranetropic 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 ± 0.5 μM) 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 Ca^{2+},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 Ca^{2+},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: Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPase, plasma membrane, enzymatic hydrolysis ATP, smooth muscle cell, myometrium, calix[4]arene.