



**КОСТЕРІН**  
**Сергій Олексійович** – академік НАН України, заступник директора з наукової роботи Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

## КАЛІКСАРЕНИ ЯК ПЕРСПЕКТИВНІ РЕГУЛЯТОРИ СКОРОТЛИВОСТІ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ

Стенограма доповіді на засіданні Президії НАН України 22 березня 2023 року

*У доповіді наведено найважливіші результати фундаментальних досліджень у галузі біохімії м'язів та біохімічної мембранології, отримані в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. Зокрема, актуальним є вивчення властивостей енергозалежних кальцієвих pomp, а також закономірностей спрямованої регуляції каліксаренами процесу  $Ca^{2+}$ -залежного скорочення-розслаблення гладеньком'язових клітин.*

Шановний Анатолію Глібовичу!

Шановні члени Президії! Усі присутні!

Дякую за можливість ознайомити вас з результатами наукових досліджень, які проводяться у відділі біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. Мабуть, багато хто погодиться, що ХХІ ст. буде століттям трансдисциплінарних досліджень у галузі природничих наук. Насправді, ПРИРОДА – ЄДИНА! Вона «не знає», що ми, відповідно до нашої освіти, знань, зацікавленості, націленості на вирішення конкретних наукових завдань, диференціюємо свої підходи до її пізнання на Біологію, Хімію та Фізику. Дійсно, найбільш цікаві проблеми сучасного природознавства локалізовані саме на «перехресті» різноманітних наук та наукових напрямів. Інакше чим пояснити той факт, що в останні роки так стрімко розвиваються саме «перехресні» науки, такі як біофізична хімія, фізична біохімія, хімічна біофізика, біохімічна фізика, фізико-хімічна біологія, фізика живого, математична біофізика, теоретична біологія, біоінформатика, штучний інтелект у біології та медицині. Відповідно, найбільш цікаві наукові проблеми виникають саме «на стику» природничих дисциплін.

Є різні рівні взаємодії між природничими науками – *дисциплінарний*, коли дослідження проводяться в межах методології кожної окремої науки; *мультидисциплінарний*, коли при вирішенні наукової проблеми використовують зв'язки між різними

дисциплінами як у теоретичному, так і в методичному аспекті; *міждисциплінарний*, коли проблема досліджується в межах інтегрованого підходу до вивчення складних проблем та явищ; і найвищий рівень — *трансдисциплінарний*, який передбачає синергетичне поєднання теоретичних і експериментальних методологій різних наук з виходом за рамки окремих дисциплін. І зазвичай усі ці різновиди взаємодії між Біологією, Хімією і Фізикою ґрунтуються на застосуванні математичних підходів.

Одним із класичних об'єктів трансдисциплінарних біохімічних та біофізичних досліджень є м'язи. Як відомо, всі м'язи поділяються на три великі групи:

1) скелетні, або посмуговані, які виконують локомоторну функцію і є частиною опорно-рухового апарату;

2) міокард (серцевий м'яз), який є, по суті, помпою, що забезпечує перекачування крові;

3) гладенькі (непосмуговані) м'язи внутрішніх органів, які іннервуються вегетативною нервовою системою, тобто їх скорочення відбувається мимовільно і не може регулюватися свідомо. Ці м'язи забезпечують функціонування внутрішніх органів та їх систем. Це насамперед судинна, дихальна, лімфатична, сечостатева системи, шлунково-кишковий тракт, протоки залоз зовнішньої та внутрішньої секреції, сфінктер зіниці ока тощо.

З термодинамічної точки зору коефіцієнт корисної дії (ККД) м'язів у середньому становить 20–30 %, але в природі трапляються й унікальні випадки, наприклад ККД скелетного м'язу черепахи досягає 65–75 %.

Слід зазначити, що вагомий внесок у розбудову уявлення про фізичні механізми скорочення м'язів зробили такі видатні українські фізики-теоретики, як академік НАН України Олександр Сергійович Давидов і член-кореспондент НАН України Кирило Борисович Толпиго, а у вивчення біохімії м'язової діяльності — відомий біохімік член-кореспондент НАН України Давид Лазарович Фердман.

Ми трактуємо гладеньком'язову клітину — міоцит — як відкриту рецепторну тензоелек-

трохімічну практично ізотермічну систему, яка здатна до  $\text{Ca}^{2+}$ -залежного скорочення.

Концентрація іонів Са у позаклітинному просторі  $[\text{Ca}^{2+}]_e$  становить  $\sim 10^{-3}$  М, а в незбудженій клітині концентрація цих іонів  $[\text{Ca}^{2+}]_i \sim 10^{-7}$  М, що з урахуванням величини електричного потенціалу  $\Delta\Psi$  на плазматичній мембрані відповідає величині енергії Гіббса для спрямованого в клітину трансмембранного кальцієвого градієнта:

$$\Delta G_{\text{ПМ}} = RT \ln \left\{ \frac{[\text{Ca}^{2+}]_e}{[\text{Ca}^{2+}]_i} \right\} + 2F\Delta\Psi = 40 \text{ кДж/моль},$$

де  $R$  — універсальна газова стала,  $T$  — абсолютна температура в кельвінах,  $F$  — число Фарадея.

При збудженні іони Са через кальцієві канали плазматичної мембрани потрапляють до цитоплазми, внаслідок чого концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  в міоциті збільшується приблизно до  $10^{-6}$  М. Таке підвищення концентрації іонів Са в м'язовій клітині від  $10^{-7}$  до  $10^{-6}$  М індукує низку складних біохімічних процесів, що й приводять до запуску процесу скорочення гладенького м'язу.

З іншого боку, для розслаблення гладеньких м'язів природа передбачила наявність дуже важливих енергозалежних систем, які локалізовані в плазматичній мембрані, —  $\text{Mg}^{2+}$ , АТФ-залежної кальцієвої помпи (електроензим  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФаза) і  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника, які, навпаки, виводять іони Са із клітини проти вищезазначеного електрохімічного кальцієвого градієнта і контролюють процес розслаблення м'язу.

Крім того, у м'язовій клітині є своєрідні кальцієві депо, в яких кальцій накопичується і оборотно вивільняється. Роль таких сховищ іонів Са виконують внутрішньоклітинні органели — саркоплазматичний ретикулум (у ньому також локалізована своя  $\text{Mg}^{2+}$ , АТФ-залежна кальцієва помпа, яка відрізняється за своїми властивостями від кальцієвої помпи плазматичної мембрани) і мітохондрії (в них локалізований  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортер, який забезпечує електрофоретичне накопичення іонів Са в мітохондрійному матриксі, а також  $\text{H}^+(\text{Na}^+)$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник).

Отже, можна бачити, наскільки складними є механізми контролю концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у гладеньком'язовій клітині в динаміці процесу скорочення-розслаблення.

Слід зазначити, що видатний внесок у вивчення іонних каналів та дослідження молекулярних та мембранних механізмів внутрішньоклітинного кальцієвого сигналіngu зробив знаний український нейрофізіолог і біофізик академік НАН України Платон Григорович Костюк, а у вивчення суто фізіології та біофізики гладеньких м'язів — академік НАН України Михайло Федорович Шуба.

У своїй доповіді я хотів би продемонструвати, як, застосовуючи *трансдисциплінарні* експериментальні і теоретичні підходи, можна досліджувати біохімічні механізми  $\text{Ca}^{2+}$ -залежної регуляції скоротливості гладеньких м'язів (на прикладі гладенького м'язу матки — міометрія), а також закономірності її спрямованої модуляції за допомогою макроциклічних сполук каліксаренів (на прикладі каліксаренових ефекторів  $\text{Mg}^{2+}$ , АТФ-залежної кальцієвої помпи плазматичної мембрани).

Загалом пошук молекул, які можуть прицільно, або таргетно, «атакувати» конкретні  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальні протеїни, підвищуючи або знижуючи їх функціональну активність, є надзвичайно важливим завданням у боротьбі з патологіями, при яких порушується функціонування цих протеїнів. І в цьому плані каліксарени, з якими ми працюємо вже досить тривалий час, виявилися вельми цікавими і перспективними об'єктами. *Трансдисциплінарний* підхід дав нам змогу ефективно поєднати в наших роботах біохімічні, фізико-хімічні і фізичні методи досліджень при вивченні функціонування енергозалежних  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних протеїнів.

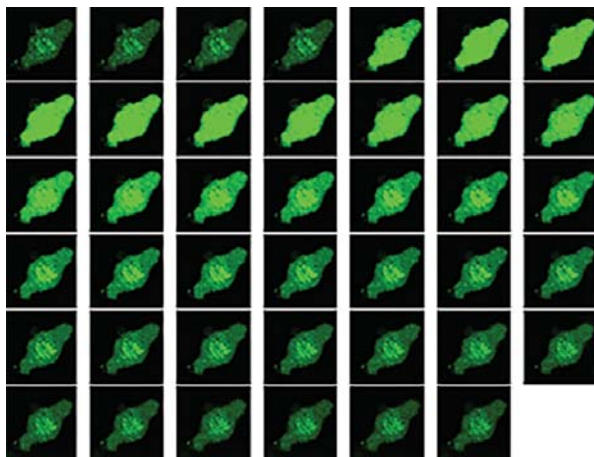
Хотів би особливо підкреслити, що зазначені дослідження ми виконували в тісній творчій співпраці з науковою лабораторією академіка НАН України Віталія Івановича Кальченка (Інститут органічної хімії НАН України), під керівництвом якого синтезували каліксарени й вивчали їхні фізико-хімічні та хімічні властивості. Крім того, у вивченні механокінетики

$\text{Ca}^{2+}$ -залежного скорочення гладеньких м'язів ми активно співпрацювали з Інститутом високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка (професор Ольга Володимирівна Цимбалюк).

Як уже зазначалося, у своїх дослідженнях ми використовували широкий спектр біологічних, фізико-хімічних, фізичних та математичних методів. Йдеться про методи препаративної та аналітичної біохімії, біохімічної мембранології, ензимології, ізотопної техніки ( $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ), фотонкореляційної спектроскопії, спектродифузії, спектродифузії, протокової цитофлуориметрії, світлової та електронної мікроскопії, конфокальної мікроскопії, мас-спектрометрії, комп'ютерного докінг-моделювання та молекулярної динаміки, хімічної кінетики і термодинаміки, біохімічної кінетики, математичного моделювання. В Інституті органічної хімії НАН України, в якому синтезували каліксарени, наші колеги використовували методи органічного синтезу, ядерного магнітного резонансу, інфрачервоної спектроскопії, обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії, а також токсикології. В Інституті високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка були задіяні методи тензометрії та механокінетики.

Відповідних результатів при вивченні трансмембранного обміну іонів  $\text{Ca}^{2+}$  в гладеньких м'язах (на прикладі міометрія) нам вдалося досягти у досліджах з використанням різноманітних (насамперед біохімічних) експериментальних моделей, таких як солюбілізовані  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальні протеїни; реконструйовані  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальні протеїни (протеоліпосоми); ізольовані скоротливі протеїни та їх фрагменти; ізольовані субклітинні мембранні структури (фрагменти плазматичної мембрани, саркоплазматичний ретикулум, мітохондрії); суспензії інтактних та пермеабілізованих дигітоніном гладеньком'язових клітин — міоцитів. Частина досліджень було виконано на ізольованих гладеньком'язових смужках та інтактних тваринах (щури).

У своїх експериментальних дослідженнях ми активно використовували метод скануючої



**Рис. 1.** Вивчення індукованої окситоцином динамічної зміни концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в клітині міометрія шурів методом скануючої лазерної конфокальної мікроскопії з використанням  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливого флуоресцентного зонда Fluo-4AM. Кожний кадр (зліва направо) відповідає збільшенню часової координати. Додавання окситоцину (100 нМ) здійснювали на рівні 4-го кадра (верхня панель)

лазерної конфокальної мікроскопії, зокрема при вивченні кінетики індукованих утеротичним пептидним гормоном окситоцином змін концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  (так званий кальцієвий транз'єнт) у клітинах міометрія. В цих дослідках міоцити попередньо навантажували  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливим флуоресцентним зондом Fluo-4AM. Як можна бачити з рис. 1, під дією окситоцину (концентрація — 100 нМ) спостерігається збільшення концентрації іонів Ca в клітині у часі (завдяки надходженню  $\text{Ca}^{2+}$  в клітину через кальцієві канали плазматичної мембрани), а далі відбувається релаксація (термінація) кальцієвого сигналу (зокрема, внаслідок функціонування систем активного транспорту іонів Ca, передусім  $\text{Mg}^{2+}$ , АТФ-залежної кальцієвої помпи плазматичної мембрани; ці системи забезпечують оборотне зниження концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазмі).

Корисним виявився й методичний підхід, який ґрунтується на вивченні одночасної локалізації різноманітних флуоресцентних зондів у гладеньком'язових клітинах, наприклад барвників, що тестують мембранний потенціал та протонний градієнт на рівні субклі-

тинних мембранних структур. Так, виявилось, що розподіл у міоциті матки зондів, специфічних до мітохондріальної мембрани (зонд NAO), мембранного електричного потенціалу (зонд DIOC-6(3)) та трансмембранного градієнта протонів (зонд 9-аміноакридин), є практично тотожним. Такий методичний підхід дає можливість підійти до більш глибокого розуміння механізмів трансмембранного (зокрема, рН-залежного) обміну іонів Ca в мітохондріях у гладеньком'язових клітинах.

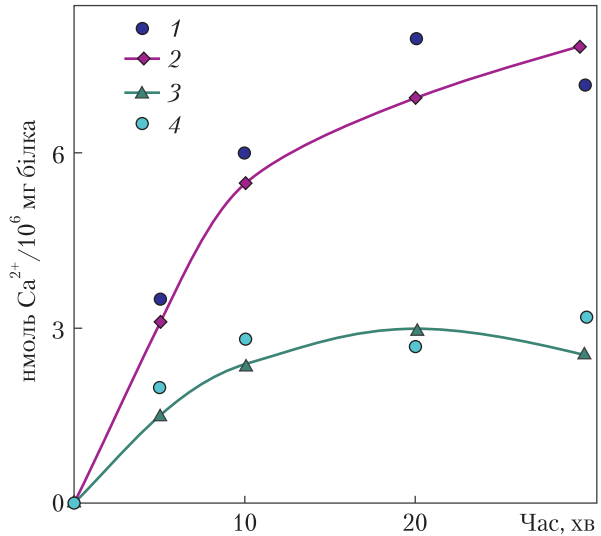
Іммануїл Кант зазначав, що «у кожній природничій науці міститься стільки істини, скільки в ній є математики». Дійсно, кількісна інтерпретація експериментальних результатів та теоретичних уявлень значно поглиблює наше розуміння природних явищ, дає можливість охарактеризувати їх, використовуючи об'єктивні показники. У відділі біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України було розроблено математичну модель регуляції концентрації іонів Ca в клітинах гладенького м'язу матки. При розбудові такої моделі ми виходили з одержаних нами експериментальних уявлень щодо  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем клітин міометрія та їхніх кінетичних параметрів. Звісно, в міру отримання нами нових експериментальних результатів ця модель постійно вдосконалюється, і за її допомогою нам уже вдалося, наприклад, пояснити явища так званих кальцієвих осциляцій та спонтанної  $\text{Ca}^{2+}$ -залежної механічної активності матки.

Досліджувані нами фундаментальні проблеми, про які йшлося вище, мають також важливий практичний аспект. Адже деякі дуже небезпечні патології скоротливої функції гладеньких м'язів часто пов'язані з порушенням обміну іонів кальцію в міоцитах. Зокрема, це стосується гіпо- і гіпертензії; атонії кишкового тракту та інших патологій його моторики; астми; хвороб сечостатевої системи, зокрема гіпо- та гіпертонусу матки, викиднів, спонтанних абортів тощо. Тому пошук нових нетоксичних (або малотоксичних) оборотних ефекторів (інгібіторів, активаторів) — селективних та високоафінних регуляторів мембранозв'язаних  $\text{Ca}^{2+}$ -

транспортувальних АТФ-гідролаз та АТФ-гідролаз скоротливих білків, є вкрай актуальним. Адже потенційно такі ефектори можуть слугувати «молекулярними платформами» для створення ліків нового покоління, що нормалізують скоротливу функцію гладеньких м'язів у разі її порушення за патологічних станів.

У цьому контексті нас цікавила насамперед  $Mg^{2+}$ , АТФ-залежна кальцієва помпа плазматичної мембрани. Вона викидає іони Са проти суттєвого електрохімічного градієнта (як зазначалося вище, вільна енергія Гіббса  $\Delta G_{\text{ПМ}}$  у випадку цього градієнта становить близько 40 кДж/моль). У стані спокою у гладеньких м'язах  $Mg^{2+}$ , АТФ-залежна кальцієва помпа функціонує на тлі стаціонарного базального потоку іонів кальцію ( $10^{-15}$ – $10^{-14}$  моль  $Ca^{2+}$ /см<sup>2</sup> за 1 с), що надходить у незбуджені міоцити за градієнтом електрохімічного потенціалу, і здатна забезпечити довготривале стаціонарне підтримання концентрації  $Ca^{2+}$  в міоплазмі на рівні  $10^{-7}$ – $10^{-6}$  М. Отже, ця помпа є найважливішим елементом загального механізму мембранного контролю базального тонуусу гладенького м'язу. Втім, враховуючи те, що насичення внутрішньоклітинних депо іонами кальцію у збуджених міоцитах відбувається приблизно через 100 скорочень, що активуються серією деполаризуючих імпульсів унаслідок надходження в клітини по кальцієвих каналах плазматичної мембрани позаклітинного  $Ca^{2+}$ , можна зробити висновок, що якби не існувало цієї помпи, то міоцити досить швидко перейшли б у стан стійкої контрактури. Тому  $Mg^{2+}$ , АТФ-залежна кальцієва помпа плазматичної мембрани має фундаментальне значення у забезпеченні  $Ca^{2+}$ -залежного контролю релаксації м'язового напруження збуджених міоцитів.

У випадку міометрія виявилось, наприклад, що  $Mg^{2+}$ , АТФ-залежна кальцієва помпа ( $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -АТФаза) плазматичної мембрани має цікаву особливість. Ми встановили, що утеротонічний пептидний гормон окситоцин чинить інгібувальний вплив на кінетику  $Mg^{2+}$ , АТФ-залежного накопичення  $Ca^{2+}$  в інвертованих (*inside out*) везикулах плазматичної мембрани клітин міометрія. Виявило-



**Рис. 2.** Вплив утеротонічного пептидного гормону окситоцину на кінетику  $Mg^{2+}$ , АТФ-залежного накопичення  $Ca^{2+}$  інвертованими везикулами плазматичної мембрани клітин міометрія щурів: 1 – контроль (без окситоцину); 2 – окситоцин (100 нМ) у середовищі інкубації; 3 – окситоцин (100 нМ) у середовищі гомогенізації тканини (на етапі утворення замкнених *inside out* фрагментів плазматичної мембрани); 4 – окситоцин (100 нМ) як у середовищі інкубації, так і у середовищі гомогенізації тканини

ся, що цей гормон, який потрапляє в *inside out* везикули на етапі їх утворення під час гомогенізації тканини, частково гальмує  $Mg^{2+}$ , АТФ-залежне закачування іонів Са в такі везикули (рис. 2).

У разі екстраполяції цих результатів на події, які відбуваються в цілісній гладеньком'язовій клітині, слід очікувати, що зазначений гормон через взаємодію з відповідним рецептором, розташованим на зовнішньому боці плазматичної мембрани, забезпечуватиме часткове пригнічення  $Mg^{2+}$ , АТФ-залежного викиду іонів Са з клітини. Наявність такого своєрідного позитивного зворотного зв'язку сприятиме підтриманню підвищеної концентрації іонів Са у збуджених міоцитах і, відповідно, скороченню міометрія.

Є й інші моделі, які дають змогу вивчати властивості та механізм функціонування цієї помпи. Зокрема, це протеоліпосоми – ліпідні



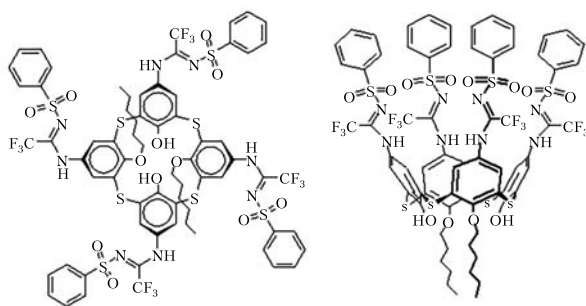


Рис. 3. Структурна формула тіакалікс[4]арену С-1087

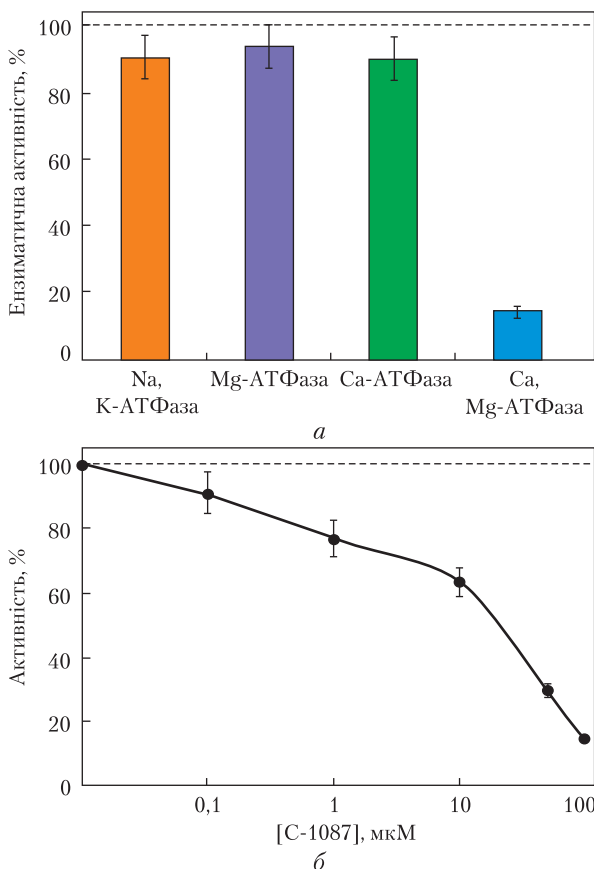


Рис. 4. Селективність (а) та афіність (б) інгібіційної дії тіакалікс[4]арену С-1087 на ензиматичну активність транспортувальної  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФази плазматичної мембрани клітин міомерія шурів. Концентрація тіакалікс[4]арену становить 100 нМ. За 100 % прийнято значення питомої ензиматичної активності за відсутності тіакалікс[4]арену у середовищі інкубації

(наприклад, створені з азолектину) пухирці, що містять вбудовану  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальну  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФаза, яку попередньо було солюбілізовано з плазматичної мембрани клітин міомерія методом афінної хроматографії. Такі протеоліпосоми були здатні за присутності іонів  $\text{Mg}$  та АТФ забезпечувати активне накопичення іонів  $\text{Ca}$ . З використанням відповідних експериментальних моделей (інвертовані пухирці плазматичної мембрани; протеоліпосоми, що містили вбудовану транспорту  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФаза; солюбілізована  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФаза) ми досконально вивчили властивості (кінетичні, каталітичні, енергетичні)  $\text{Mg}^{2+}$ , АТФ-залежної кальцієвої помпи плазматичної мембрани клітин міомерія. Зокрема, було доведено, що ця помпа має високу спорідненість до іонів  $\text{Ca}$  (значення константи активації для іонів  $\text{Ca}$   $K_{Ca}$  становить 0,3–0,4 мкМ) та є потенціалозалежною.

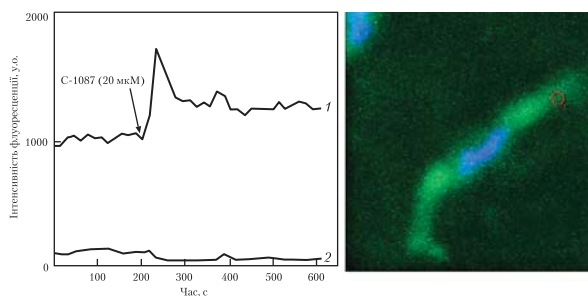
Як уже зазначалося, ми вивчаємо закономірності спрямованої регуляції каліксаренами функціональної активності енергозалежних  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем. Каліксарени — це нетоксичні макроциклічні сполуки, молекули яких мають чашоподібну форму, внутрішньомолекулярні високовпорядковані ліпофільні порожнини і демонструють унікальну здатність розпізнавати і зв'язувати катіони, аніони та нейтральні молекули в стійкі комплекси типу «гість—господар». Ці властивості широко використовують при створенні каталізаторів та сенсорів. Каліксарени мають також широкий спектр біологічної активності, а саме: можуть бути інгібіторами або активаторами ензимів, чинити мембранотропну, антитромботичну, протипухлинну, протитуберкульозну дію, впливати на функціонування рецепторних і транспортних протеїнів, пригнічувати адгезію клітин.

Слід зазначити, що до опублікування наших результатів у світі не були відомі низькомолекулярні селективні інгібітори  $\text{Mg}^{2+}$ , АТФ-залежної кальцієвої помпи плазматичної мембрани. Виявилось, що серед великого розмаїття досліджених нами каліксаренів тіакалікс[4]арен С-1087 (рис. 3) є селективним інгібіто-

ром  $Mg^{2+}$ , АТФ-залежної кальцієвої помпи плазматичної мембрани. Його було синтезовано та охарактеризовано методами ЯМР- та ІЧ-спектроскопії під керівництвом академіка НАН України В.І. Кальченка в Інституті органічної хімії НАН України.

На рис. 4а можна бачити, як ефективно тіакалікс[4]арен С-1087 (100 нМ) гальмує активність саме транспортувальної  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -АТФази (четвертий стовпчик). При цьому подібного впливу зазначеного тіакалікс[4]арену на інші АТФ-гідролази плазматичної мембрани ( $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФазу,  $Ca^{2+}$ -незалежну  $Mg^{2+}$ -АТФазу,  $Mg^{2+}$ -незалежну  $Ca^{2+}$ -АТФазу) практично не спостерігалось. Така селективність у дії тіакалікс[4]арену С-1087, спрямованій саме на  $Mg^{2+}$ -залежну  $Ca^{2+}$ -транспортувальну АТФ-гідролазу, дуже важлива, оскільки в сучасній медицині потрібні таргетні ліки, тобто ті, які атакують один конкретний протеїн і не впливають на інші. Інгібувальна дія тіакалікс[4]арену С-1087 на активність транспортувальної  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -АТФази відбувається з доволі високою спорідненістю до цього ензиму (рис. 4б), значення коефіцієнту інгібування  $I_{0,5}$  у випадку дії тіакалікс[4]арену С-1087 на  $Mg^{2+}$ -залежну  $Ca^{2+}$ -транспортувальну АТФ-гідролазу становить 10 мкМ. Отже, можна стверджувати, що тіакалікс[4]арен С-1087 є селективним, принаймні на рівні плазматичної мембрани, і вельми афінним інгібітором  $Mg^{2+}$ , АТФ-залежної кальцієвої помпи, яка локалізована у зазначеній субклітинній структурі.

Щоб наблизитися до розуміння механізму високої селективності інгібувальної дії тіакалікс[4]арену С-1087 на ензиматичну активність транспортувальної  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -АТФази плазматичної мембрани, ми провели порівняльні дослідження з вивчення впливу окремо каліксаренової «чаші» та функціональних груп на її верхньому вінці на таку активність. Виявилось, що окремо ані сама «чаша», ані функціональні групи практично не справляють будь-якого впливу на ензиматичну активність, і, відповідно, інгібіційна дія тіакалікс[4]арену С-1087 на  $Mg^{2+}$ , АТФ-залежну кальцієву помпу забезпечується саме комплексним ефек-



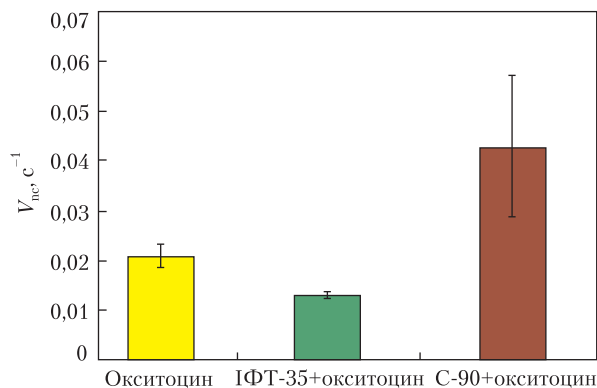
**Рис. 5.** Вплив інгібітора  $Mg^{2+}$ , АТФ-залежної кальцієвої помпи плазматичної мембрани тіакалікс[4]арену С-1087 (20 мкМ) на концентрацію  $Ca^{2+}$  у клітинах міометрія шурів. Концентрація тіакалікс[4]арену становить 20 нМ. Метод скануючої лазерної конфокальної мікроскопії; використовували  $Ca^{2+}$ -чутливий флуоресцентний зонд Fluo-4AM (зліва). Для візуалізації ядра клітини використовували ДНК-чутливий флуоресцентний зонд Hoechst (справа)

том каліксаренової «чаші» та функціональних груп, що модифікують її верхній вінець.

З використанням технологій докінгу та молекулярної динаміки було виявлено два найбільш імовірні місця зв'язування тіакалікс[4]арену С-1087 з функціонально активними сайтами  $Mg^{2+}$ , АТФ-залежної кальцієвої помпи. З'ясувалося, що у стабілізації комплексу « $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -АТФаза — тіакалікс[4]арен С-1087» суттєву роль відіграють стеричні та електростатичні взаємодії, а також водневі зв'язки.

Як виявилось, селективний інгібітор  $Mg^{2+}$ , АТФ-залежної кальцієвої помпи —  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -АТФази плазматичної мембрани тіакалікс[4]арен С-1087 спричиняє збільшення концентрації іонів Ca у гладеньком'язових клітинах матки. Ці дані було отримано з використанням методу конфокальної мікроскопії (задіяно  $Ca^{2+}$ -чутливий флуоресцентний зонд Fluo-4AM) (рис. 5).

З використанням методу лазерної фотон-кореляційної спектроскопії було показано, що тіакалікс[4]арен С-1087 та його аналоги спричиняють зменшення ефективного гідродинамічного діаметра гладеньком'язових клітин матки. Це незалежно підтверджує інгібіційну дію зазначених калікс[4]аренів на  $Mg^{2+}$ -залежну  $Ca^{2+}$ -транспортувальну АТФ-гідролазу, яка



**Рис. 6.** Спрямована зміна нормованої швидкості  $V_{nc}$  ізометричних скорочень міометрія щурів *in vitro* при дії окситоцину (0,1 МО/мл) в умовах впливу інгібітора кальцієвої помпи плазматичної мембрани калікс[4]-арену С-90 (100 мкМ) та активатора кальцієвої помпи плазматичної мембрани сполуки ІФТ-35 (100 мкМ)

викидає іони Са з клітин, оскільки у випадку такої інгібіції сприяння підвищенню концентрації  $Ca^{2+}$  в міоплазмі має приводити до скорочення м'язових клітин.

Безперечно, дуже важливим є суто фізіологічний аспект дії інгібітора  $Mg^{2+}$ -залежної  $Ca^{2+}$ -транспортувальної АТФ-гідролази плазматичної мембрани тіакалікс[4]арену С-1087 та його аналогів на цілісний гладенький м'яз (рис. 6). Ми з'ясували, що один із селективних інгібіторів  $Mg^{2+}$ , АТФ-залежної кальцієвої помпи плазматичної мембрани — калікс[4]-арен С-90 активує індуковане окситоцином ізометричне скорочення міометрія (в цих дослідках визначали швидкість скорочення гладенького м'язу, нормовану на амплітуду скоротливої відповіді, — параметр  $V_{nc}$ ).

Наші колеги з Інституту органічної хімії НАН України встановили у дослідках, проведених на щурах при пероральному шляху введення цієї сполуки в організм, що інгібітор  $Mg^{2+}$ , АТФ-залежної кальцієвої помпи плазматичної мембрани тіакалікс[4]арен С-1087 є малотоксичною речовиною (за класифікацією Л.І. Медведя належить до IV класу токсичності). Зазвичай у медичній практиці при слабкості пологової діяльності, якщо використання окситоцину для стимуляції скорочень матки

не дає належного ефекту, лікарі роблять кесарів розтин, але, відповідно до отриманих нами результатів, є підстави сподіватися, що застосування відповідних каліксаренів — інгібіторів  $Mg^{2+}$ , АТФ-залежної кальцієвої помпи плазматичної мембрани — потенційно може дозволити уникнути цього оперативного втручання.

Отже, вибрані калікс[4]арени є перспективними регуляторами скоротливості гладеньких м'язів.

Для порівняння на рис. 6 наведено також результати, які ми отримали у співпраці зі науковцями Інституту фармакології та токсикології НАМН України (професор М.А. Мохорт з колегами) у дослідках з використанням низькомолекулярного селективного активатора  $Mg^{2+}$ , АТФ-залежної кальцієвої помпи плазматичної мембрани — сполуки ІФТ-35. Ця сполука, на відміну від інгібітора кальцієвої помпи калікс[4]арену С-90, пригнічувала індуковані окситоцином ізометричні скорочення міометрія.

Отже, використання двох селективних ефektorів  $Mg^{2+}$ , АТФ-залежної кальцієвої помпи плазматичної мембрани — інгібітора помпи калікс[4]арену С-90 та активатора помпи сполуки ІФТ-35, відкриває перспективи спрямованої регуляції скоротливої активності матки.

Результати наших досліджень щодо дії калікс[4]аренів на кальцієву помпу плазматичної мембрани та скорочення-розслаблення гладеньких м'язів доповідалися на вітчизняних і міжнародних симпозиумах, їх опубліковано в численних статтях у провідних наукових журналах України та світу, узагальнено в п'яти монографіях, на них одержано 2 патенти на винахід.

Слід зазначити, що в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України велика увага приділяється підготовці молодих наукових кадрів у галузі біохімії м'язів та біохімічної мембранології. Протягом останніх 11 років за цими напрямками захищено 6 докторських та 6 кандидатських дисертацій. На кафедрах біохімії, біофізики та медичної інформатики Київського національного університету імені Тараса Шевченка фахівці Інституту вже багато років викладають відповідні курси лекцій, а



на базі нашого Інституту студенти виконують курсові, бакалаврські та магістерські роботи, присвячені біохімії та біофізичній хімії м'язів.

Ми вважаємо, що результати, про які йшлося у доповіді, є перспективними для подальшого вивчення біохімічних аспектів процесу  $\text{Ca}^{2+}$ -залежного скорочення-розслаблення гладеньких м'язів; розуміння закономірностей порушення іонних, молекулярних, мембранних та клітинних механізмів контролю скоротливої функції гладеньких м'язів за патологічних станів, а також для створення нових фармакологічних препаратів на основі каліксаренів з метою нормалізації скоротливої функції гладеньком'язових клітин у разі її порушення.

Отримані нами результати є наслідком плідної трансдисциплінарної співпраці між установами НАН України (Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна та Інститут органічної хімії НАН України), Київським національним університетом імені Тараса Шевченка та Інститутом фармакології та токсикології НАМН України.

Повертаючись до початку моєї доповіді, хотів би додати, що зважаючи на актуальність

і важливість як у фундаментальному, так і в практичному плані комплексних досліджень, що виконуються «на стику» біології, хімії та фізики із залученням математичної інтерпретації результатів наукового пошуку, ми пропонуємо започаткувати на базі Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України загальноакадемічний трансдисциплінарний науковий семінар «Актуальні питання сучасної фізико-хімічної та математичної біології» (назва попередня)\*, запросивши до участі в ньому фахівців різних секцій, відділень та науково-дослідних установ НАН України.

Дякую за увагу!

*За матеріалами засідання підготувала О.О. Мележик*

---

\* Від редакції. Президія НАН України підтримала ініціативу академіка НАН України С.О. Костеріна щодо створення загальноакадемічного трансдисциплінарного наукового семінару «Актуальні питання сучасної фізико-хімічної та математичної біології», і 21 квітня 2023 р. на базі Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України відбувся перший такий захід.

Sergiy O. Kosterin

*Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine*

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2961-5554>

#### CALIXARENES AS PROMISING REGULATORS OF SMOOTH MUSCLE CONTRACTILITY

Transcript of scientific report at the meeting of the Presidium of NAS of Ukraine, March 22, 2023

The report presents the most important results of fundamental research in the field of muscle biochemistry and biochemical membrane science obtained at the Paladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine. In particular, it is relevant to study the properties of energy-dependent calcium pumps, as well as the patterns of directed regulation by calixarenes of the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent contraction-relaxation of smooth muscle cells.

**Cite this article:** Kosterin S.O. Calixarenes as promising regulators of smooth muscle contractility. *Visn. Nac. Akad. Nauk Ukr.* 2023. (6): 47–55. <https://doi.org/10.15407/visn2023.06.047>