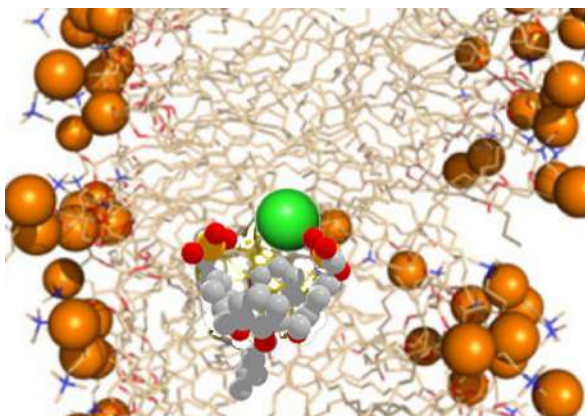


**С.О. КОСТЕРІН, В.І. КАЛЬЧЕНКО,
Т.О. ВЕКЛІЧ, Л.Г. БАБІЧ, С.Г ШЛИКОВ.**

**КАЛІКСАРЕНИ ЯК МОДУЛЯТОРИ
АТР-ГІДРОЛАЗНИХ СИСТЕМ
ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВИХ КЛІТИН**



Київ – 2018

***Світлій пам'яті Батьків наших
присвячуємо...***

АНОТАЦІЯ

**КОСТЕРІН С.О., КАЛЬЧЕНКО В.І., ВЕКЛІЧ Т.О., БАБІЧ Л.Г.,
ШЛИКОВ С.Г. КАЛІКСАРЕНИ ЯК МОДУЛЯТОРИ
АТР-ГІДРОЛАЗНИХ СИСТЕМ ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВИХ КЛІТИН.
Київ – 2018. «Наукова Думка», ... стор.**

Монографію присвячено узагальненню, аналізу та систематизації літературних та власних експериментальних результатів, одержаних співробітниками відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна та відділу хімії фосфоранів Інституту органічної хімії Національної Академії Наук України при вивченні дії циклічних олігомерів фенолів – каліксаренів на мембранозв'язані Mg^{2+} -залежні АТР-гідролазні катіон-транспортувальні та механохімічні системи гладеньких м'язів. Монографії притаманна трансдисциплінарність: результати, що описуються, були одержані на стику біохімії (ензиматичний каталіз, біохімічна кінетика), біохімії *in silico*, органічної, супрамолекулярної та біофізичної хімії. Монографія складається з п'яти частин. В частині Першій наводяться дані щодо синтезу, фізико-хімічних властивостей та біологічної активності каліксаренів. Друга частина монографії присвячена розгляду експериментальних результатів стосовно каліксаренів як ефекторів мембранозв'язаних катіон-транспортувальних АТР-гідролазних систем. У Третій частині акцентується увага на дії каліксаренів як ефекторів АТР-гідролазної системи скоротливих протеїнів гладеньких м'язів. В Четвертій частині описано феномен каліксарен-індукованого неензиматичного гідролізу АТР. П'ята частина монографії спрямована на висвітлення дії каліксаренів на механокінетику процесу скорочення-розслаблення гладеньких м'язів.

Монографія призначена для фахівців у галузі біохімії та біофізичної хімії м'язів, системної біології м'язової клітини, біохімічної мембранології та

фармакології, органічної та супрамолекулярної хімії, а також для студентів та аспірантів – біохіміків, біофізиків, фізіологів, фармакологів.

Науковий редактор – академік НАН та НАМН України С.В. Комісаренко.

Рецензенти - член-кореспондент НАН України професор А.І. Вовк (Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України);

- член-кореспондент НАН України професор Р.С. Стойка (Інститут біології клітини НАН України).

АВТОРИ МОНОГРАФІЇ



КОСТЕРІН СЕРГІЙ ОЛЕКСІЙОВИЧ – академік НАН України, доктор біологічних наук, професор. Випускник кафедри біофізики Київського Національного Університету імені Тараса Шевченка. Заступник директора з наукової роботи та завідувач відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. Професор кафедри біофізики Київського Національного Університету імені Тараса Шевченка та кафедри біології Національного Університету «Києво-Могилянська Академія». Фахівець у галузі біохімії та біофізики м'язів, біохімічної мембранології, кінетики і термодинаміки біохімічних процесів. У 1990 та 1992 р. проходив наукове стажування в МакМастерському університеті м. Гамільтон, пров. Онтаріо, Канада. Автор та співавтор 325 наукових публікацій та 7 монографій та підручників (одна з монографій на замовлення у співпраці з колегами з Канади, США, Японії та Франції вийшла у США). Підготував 14 кандидатів та 4 докторів наук. Наразі є науковим консультантом двох докторантів. Голова Спеціалізованої Вченої ради (спеціальності – «біохімія», «біотехнологія») Інституту біохімії НАН України. Член Бюро Відділення біохімії, фізіології і молекулярної біології НАН України. Віце-президент Українського біохімічного товариства. Лауреат Державної премії України в галузі науки і техніки (2010) та Премії ім. О.В. Палладіна НАН України (1992). Заслужений діяч науки і техніки України (2015). Лауреат премії "Золота Фортуна-2012" з врученням ордена Святого Князя Володимира Великого III ступ. Нагороджений Відзнакою Верховної Ради України «За заслуги перед Українським народом» (2013).



КАЛЬЧЕНКО ВІТАЛІЙ ІВАНОВИЧ - академік НАН України, доктор хімічних наук, професор. Закінчив з відзнакою хіміко-технологічний факультет Київського політехнічного інституту. Директор та завідувач відділу хімії фосфоранів Інституту органічної хімії Національної академії наук

України. Спеціаліст в галузі органічної, фосфороорганічної, біоорганічної та супрамолекулярної хімії. Автор 3 монографій, 25 наукових оглядів та розділів в монографіях, більше 300 наукових статей, 15 авторських свідоцтв на винаходи та 42 патентів. Індекс Хірша цитування його робіт складає 28 (>2500 цитувань). В.І. Кальченко - лауреат Державної премії України в галузі науки і техніки. В.І. Кальченком отримані оригінальні типи функціоналізованих калікс[п]аренів, тіакаліксаренів, каліксрезорцинаренів (в тому числі водорозчинних та хіральних), оптимально передорганізованих для утворення супрамолекулярних комплексів з катіонами металів, аніонами та нейтральними органічними молекулами і біомолекулами, включаючи екологічно небезпечні та біологічно значимі. Він мав PostDoc в Інституті біології та хімії протеїнів CNRS м. Ліон, працював на посадах запрошеного професора в університетах Claude Bernard-Lyon та Ecole Normale Supérieure de Lyon. Під його керівництвом захищені 2 докторські та 11 кандидатських дисертацій. В.І. Кальченко - член редколегії міжнародних журналів «Macroheterocycles», «French-Ukrainian Journal of Chemistry», «Organic Chemistry: an Indian Journal». Він нагороджений грамотами Кабінету міністрів України та Верховної Ради України, відзнакою НАН України «За підготовку наукової зміни».



ВЕКЛІЧ ТЕТЯНА ОЛЕКСАНДРІВНА – кандидат біологічних наук. Випускниця кафедри біофізики Київського Національного Університету імені Тараса Шевченка. Старший науковий співробітник відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. Викладач філії біотехнології кафедри біохімії Київського Національного Університету імені Тараса Шевченка.

Фахівець у галузі біохімії та біофізики м'язів, біохімічної мембранології, кінетики біохімічних процесів. Автор та співавтор 120 наукових публікацій та 1 монографії. Удостоєна Подяки Київського Міського Голови (2015). Готує до захисту докторську дисертацію.



БАБІЧ ЛІДІЯ ГРИГОРІВНА - доктор біологічних наук, старший науковий співробітник. Випускниця кафедри біохімії Київського національного університету імені

Тараса Шевченка. Провідний науковий співробітник відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. Фахівець у галузі біохімії м'язів та клітинної біології. У 2002 - 2003 рр. проходила наукове стажування в університетах шт. Техас та шт. Колорадо, США. Член Спеціалізованої Вченої ради (спеціальності – «біохімія», «біотехнологія») Інституту біохімії НАН України. Автор та співавтор понад 100 наукових публікацій та 1 монографії. Нагороджена Відзнакою Верховної Ради України «За заслуги перед Українським народом» (2015).



ШЛИКОВ СЕРГІЙ ГЕОРГІЙОВИЧ – доктор біологічних наук, старший науковий співробітник. Випускник кафедри біохімії Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Провідний науковий співробітник відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. Фахівець у галузі біохімії м'язів та клітинної біології. У 2000 - 2003 рр. проходив наукове стажування в університетах шт. Техас та шт. Колорадо (США). Автор та співавтор понад 100 наукових публікацій та 1 монографії. За роботи, присвячені відкриттю та вивченню властивостей hTrpC каналів (канали транзійтних рецепторних потенціалів) у клітинах міометрія, у 2003 році одержав Премію Президента Товариства Гінекологічних Досліджень (Society for Gynecologic Investigation, President`s Presenter Award), місто Вашингтон, США. З 2012 року по 2017 рік – член Спеціалізованої Вченої ради (спеціальність «біохімія») Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Удостоєний Подяки Міністерства освіти та науки України.

З М І С Т

ПЕРЕДМОВА (С.В. Комісаренко)	14

ВСТУП (С.О. Костерін, В.І. Кальченко)	21

ЧАСТИНА ПЕРША.

СИНТЕЗ, ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ТА БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ КАЛІКСАРЕНІВ	36

Р о з д і л 1. Основи хімії каліксаренів (В.І. Кальченко)	36

1.1. Синтез та стереохімія каліксаренів.	36

1.2. Комплекси каліксаренів з катіонами металів	42

1.3. Комплекси каліксаренів з аніонами	49

1.4. Комплекси каліксаренів з органічними молекулами і біомолекулами	59

1.4.1. Комплекси з органічними молекулами	59

1.4.2. Комплекси з біомолекулами. Хіральне розпізнавання	64

Р о з д і л 2. Каліксарени в медико-біологічних дослідженнях (Т.О. Векліч, В.І. Кальченко)	78

2.1. Прояви біологічної активності каліксаренів	78

2.2. Токсичність та імуногенність каліксаренів	97

2.3. Перспективи використання каліксаренів у фізико-хімічній біології, біотехнології та фармакології	99

ЧАСТИНА ДРУГА.

КАЛІКСАРЕНИ ЯК ЕФЕКТОРИ КАТІОН-ТРАНСПОРТУВАЛЬНИХ АТР-ГІДРОЛАЗНИХ СИСТЕМ	107

Р о з д і л 3. Mg^{2+},АТР-залежна Ca^{2+}-помпа плазматичної мембрани та каліксарени (С.О. Костерін, Т.О. Векліч)	116
3.1. Дія калікс[4]арену С-90 на активність АТР-гідролаз плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин	120
3.2. Дія структурних компонентів калікс[4]арену С-90 на активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРazi плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин	125
3.3. Залежність інгібіторної дії калікс[4]арену на активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРazi від його структури	127
3.4. Кінетика інгібіторної дії калікс[4]арену С-90 на активність транспортувальної Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРazi плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин	147
3.4.1. Дія калікс[4]арену С-90 на концентраційну залежність активності транспортувальної Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРazi від іонів Са	147
3.4.2. Дія калікс[4]арену С-90 на концентраційну залежність активності транспортувальної Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРazi від іонів Mg	151
3.4.3. Дія калікс[4]арену С-90 на концентраційну залежність активності транспортувальної Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРazi від АТР	155
3.5. Вплив калікс[4]арену С-90 на Ca^{2+} - транспортувальну активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРazi плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин	159
3.5.1. Характеристика Mg^{2+} ,АТР-залежного Ca^{2+} -транспорту у препараті везикул плазматичної мембрани	159
3.5.2. Дослідження впливу калікс[4]арену С-90 на Mg^{2+} ,АТР-залежний Ca^{2+} -транспорт у препараті везикул плазматичної мембрани	164
3.5.3. Вивчення залежності інгібіторного ефекту калікс[4]арену С-90 на транспортувальну активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРazi плазматичної мембрани від ступеня її поляризації	166
3.6. Математичне моделювання впливу калікс[4]арену С-90 на вміст іонів Са у незбуджених гладеньком'язових клітинах	178

3.7. Вплив калікс[4]арену C-90 на внутрішньоклітинну концентрацію Ca^{2+} у клітинах гладеньких м'язів	182
3.8. Вплив калікс[4]арену C-90 на гідродинамічний діаметр гладеньком'язових клітин	184
3.9. Молекулярний докінг взаємодії калікс[4]арену C-90 і його модельних сполук з ліганд-зв'язуючими ділянками Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани	187
3.10. Порівняльне дослідження впливу калікс[4]арену C-90 та сполуки ІФТ-35 на активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин	193

Р о з д і л 4. Енергозалежні Ca^{2+} -транспортувальні системи внутрішньоклітинних мембранних структур та каліксарени (Л.Г. Бабіч, С.Г. Шликов, Т.О. Векліч, С.О. Костерін)

4.1. Вплив калікс[4]арену C-90 на активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази саркоплазматичного ретикулума	202
4.1.1. Концентраційна залежність впливу калікс[4]арену C-90 на активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази саркоплазматичного ретикулума	202
4.1.2. Кінетичні закономірності дії калікс[4]арену C-90 на активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази саркоплазматичного ретикулума	205
4.2. Калікс[4]аренхалконаміди – нанорозмірні модулятори поляризації мембран мітохондрій та вмісту іонізованого Са в них	211

Р о з д і л 5. Mg^{2+} , АТР-залежна Na^+ , K^+ -помпа плазматичної мембрани та каліксарени (Т.О. Векліч, С.О. Костерін)

5.1. Дія калікс[4]аренів на ензиматичні активності Na^+ , K^+ -АТРази та Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин ...	226
5.2. Порівняння ефективності інгібуючої дії калікс[4]аренів C-97, C-99, C-107 та убаїну на ензиматичну активність Na^+ , K^+ -АТРази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин	231

5.3. Вплив структурних компонентів калікс[4]арену C-107 на активність Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин	239
5.4. Порівняльне дослідження впливу калікс[4]арену C-99 та його аналогів на Na^+, K^+ -АТРазну активність у плазматичній мембрані гладеньком'язових клітин	246
5.5. Особливості дії калікс[4]арену C-97 на активність Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин	257
5.5.1. Дія калікс[4]арену C-97 на концентраційну залежність активності Na^+, K^+ -АТРази від іонів Mg	257
5.5.2. Дія калікс[4]арену C-97 на концентраційну залежність активності Na^+, K^+ -АТРази від АТФ	260
5.5.3. Дія калікс[4]арену C-97 на концентраційну залежність активності Na^+, K^+ -АТРази від співвідношень концентрацій $[\text{Na}^+]/[\text{K}^+]$	261
5.5.4. Дія калікс[4]арену C-97 на концентраційну залежність активності Na^+, K^+ -АТРази від убаїну	263
5.6. Особливості дії калікс[4]арену C-107 на активність Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин	266
5.6.1. Дія калікс[4]арену C-107 на концентраційну залежність активності Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани від убаїну	266
5.6.2. Дія калікс[4]арену C-107 на концентраційну залежність активності Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани від АТФ	270
5.6.3. Дія калікс[4]арену C-107 на концентраційну залежність активності Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани від іонів Mg	275
5.7. Калікс[4]арени C-97 та C-107 підсилюють інгібувальну дію убаїну на активність Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани	280
5.8. Порівняльна дія калікс[4]аренів C-97, C-99 та C-107 на активність Na^+, K^+ -АТРази у плазматичній мембрані скоротливих (міометрій) та рухливих (сперматозоїди) клітин	282

5.9. Молекулярний докінг взаємодії калікс[4]арену C-107 і його модельних сполук з ліганд-зв'язуючими ділянками Na^+, K^+ -АТРазі плазматичної мембрани	287

ЧАСТИНА ТРЕТЯ.

КАЛІКСАРЕНИ ЯК ЕФЕКТОРИ АТР-ГІДРОЛАЗНОЇ СИСТЕМИ СКОРОТЛИВИХ ПРОТЕЇНІВ	302

Р о з д і л 6. Калікс[4]арени, АТР-гідролаза скоротливих протеїнів та катіони важких металів (Т.О. Векліч, С.О. Костерін, В.І. Кальченко)	302

6.1. Порівняльний аналіз впливу вибраних калікс[4]аренів на активність АТРазі актоміозину міометрія	302

6.2. Захисний вплив тіакалікс[4]арен-тетрасуфонату на інгібування АТР-гідролазної активності субфрагмента-1 міозину міометрія катіонами важких металів	314

ЧАСТИНА ЧЕТВЕРТА.

КАЛІКСАРЕН-ІНДУКОВАНІЙ НЕЕНЗИМАТИЧНИЙ ГІДРОЛІЗ АТР	334

Р о з д і л 7. Каліксарени та АТР (Т.О. Векліч, В.І. Кальченко, С.О. Костерін).....	334

7.1. Гідроліз АТР, який стимулюється деякими калікс[4]аренами ...	335

7.2. Дослідження кінетики реакції гідролізу АТР, яка індукується калікс[4]ареном C-107	339

7.3. Комплексоутворення між калікс[4]ареном C-107 та АТР	342

7.4. Дослідження особливостей реакції гідролізу АТР, який індукується калікс[4]ареном C-107	349

ЧАСТИНА П'ЯТА.

КАЛІКСАРЕНИ ТА МЕХАНОКІНЕТИКА ПРОЦЕСУ СКОРОЧЕННЯ- РОЗСЛАБЛЕННЯ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ 365

Р о з д і л 8. Каліксарени як модифікатори скоротливої активності гладеньких м'язів (С.О. Костерін, Т.О. Векліч,) 365

8.1. Дослідження дії калікс[4]арену С-90 на скоротливу активність міометрія 365

8.2. Порівняльне дослідження дії калікс[4]арену С-99 та уабаїну на механокінетику процесу «скорочення-розслаблення» ГМ саесит щурів 370

ПІДСУМКИ (С.О. Костерін, В.І. Кальченко, Т.О. Векліч) 376

ДОДАТОК (С.О. Костерін) 396

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ І СКОРОЧЕНЬ 399

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ 402

ПЕРЕДМОВА (БУДЕ ДООПРАЦЬОВАНИЙ С.В.)

Як добре відомо, іонам Ca (Ca^{2+}) належить фундаментальне значення у забезпеченні функціональної активності клітин практично всіх тканин. Такі видатні біологічні (я б навіть сказав загальнобіологічні) феномени, як скорочення м'язів (скелетних, гладеньких, міокарду), внутрішньоклітинна сигналізація, міжклітинна взаємодія, взаємодія антигену з антитілом, секреція, запліднення, зсідання крові, контроль проникності біологічних мембран, активація багатьох ензимів тощо є Ca^{2+} -залежними. Тому в науково-теоретичному аспекті принципове значення має вивчення біохімічних механізмів обміну іонів Ca в організмі, зокрема регуляції концентрації Ca^{2+} в клітинах. По-суті, то є одна з центральних проблем сучасної біохімії, клітинної біології та молекулярної фізіології. З іншого боку, на теперішній час не викликає сумнівів, що виникнення дуже небезпечних хвороб пов'язане з порушеннями біохімічних механізмів підтримання внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу, наприклад, у випадку патологічних змін у функціонуванні м'язів, серцево-судинної системи, різноманітних нефропатій, діабету 2-го типу тощо.

Гладенькі м'язи, разом з іншими тканинами, виконують виключно важливу роль у забезпеченні життєдіяльності організму. Адже їхня робота лежить в основі функціонування багатьох внутрішніх органів та систем органів, зокрема: судинної, сечостатевої, дихальної, лімфатичної систем, а також шлунково-кишкового тракту, протоків залоз зовнішньої та внутрішньої секреції, сфінктера зіниці ока. З позицій системної біології гладеньком'язову клітину ми, безперечно, можемо розглядати як складну відкриту суттєво нерівноважну термодинамічну тензоелектрохімічну рецепторну систему, для якої притаманні наступні найважливіші (щодо внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу) властивості: кооперативність, нелінійність, неадитивність, синергістичність, наявність мережі позитивних і

негативних зворотніх зв'язків, феномен “градієнта спорідненості” до іонів Са у випадку різних енергозалежних Ca^{2+} -транспортувальних механізмів.

Доведено, що деякі патології скоротливої функції гладеньких м'язів також пов'язані з порушенням кальцієвого гомеостазу в міоцитах. Мова йде, зокрема, за: гіпо- та гіпертонус матки, викидні, спонтанні аборти; гіпо- та гіпертензію; атонію кишкового тракту та інші порушення його моторики; астму. І тут необхідно підкреслити, що серед гладеньком'язових органів матці – одному з традиційних об'єктів експериментальних досліджень відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, належить особливе значення, з огляду на її унікальну роль в жіночому організмі. Стає все більш очевидним, що подальше з'ясування біохімічних механізмів Ca^{2+} -залежного контролю скорочення-розслаблення матки – це шлях не лише до пізнання фундаментальних особливостей спряження процесів збудження та скорочення у міометрії, але й до розуміння закономірностей порушень його нормального функціонування у випадку різноманітних патологічних станів.

У літературі маємо чисельні дані, які вказують на те, що часто-густо за патологічних станів змінюються як суто активність, так і особливості регуляції та властивості (фізико-хімічні, кінетичні), а також експресія енергонезалежних (кальцієві канали) та енергозалежних (кальцієві помпи, обмінники, уніпортери) мембранозв'язаних Ca^{2+} -транспортувальних систем. Отже, принципове значення має пошук оборотних малотоксичних (чи, в ідеалі, взагалі - нетоксичних) ефекторів (інгібіторів, активаторів), здатних оборотно, селективно («таргетно») та достатньо афінно модифікувати (гальмувати чи стимулювати) функціональну активність зазначених систем у випадку її порушень за патологічних станів. З цієї точки зору з боку біохіміків, біофізиків, фізіологів та фармакологів в останні роки привертають до

себе увагу каліксарени - нанорозмірні тривимірні макроциклічні сполуки, здатні до супрамолекулярних взаємодій з біологічно значимими катіонами, аніонами та молекулами.

У 2016 р. за моєю редакцією вийшла у світ фундаментальна монографія академіка НАН України професора С.О. Костеріна та його співробітників «Біохімічні властивості та регуляція Ca^{2+} -транспортувальних систем гладеньком'язових клітин» (Київ, «Наукова Думка»). В цій монографії, відповідно до літературних та власних експериментальних результатів, авторами були ґрунтовно проаналізовані шляхи та механізми транспорту іонів Са в гладеньких м'язах, зокрема, в міометрії. Втім, у Передмові до зазначеної монографії я написав: «...я зовсім не виключаю, що наступну монографію автори напишуть «на перехресті» біохімії та супрамолекулярної хімії і присвятять її біофізико-хімічним механізмам дії каліксаренів на ензиматичні системи гідролізу АТФ й на іонні помпи...». Так і сталося: адже наразі переді мною – рукопис нової міждисциплінарної монографії наших колег – біохіміків та хіміків, присвяченої вивченню біохімічних закономірностей дії каліксаренів на енергозалежні системи іонного транспорту (перш за все - кальцієвого) в гладеньких м'язах.

І мені приємно відзначити, що ця монографія дійсно є наслідком успішної багаторічної творчої співпраці наукових колективів двох класичних Інститутів Національної академії наук України – Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна, яким я маю честь керувати (завідувач відділу біохімії м'язів – академік НАН України професор, д.б.н. С.О. Костерін), та Інституту органічної хімії (відділ хімії фосфоранів, директор Інституту та завідувач відділу – академік НАН України, професор, д.х.н. В.І. Кальченко). Результатом такої співпраці стали цікаві міждисциплінарні (на стику біохімії, біофізичної, органічної та супрамолекулярної хімії) дослідження у галузі вивчення впливу

каліксаренів на: - ензиматичний (Ca^{2+} , Mg^{2+} - та Na^+ , K^+ -залежний) та неензиматичний гідроліз АТР; - активний транспорт іонів (перш за все, Ca^{2+}) в гладеньких м'язах. Впевнений, що дані, що були одержані, є суттєвими для вирішення нагальних питань біохімії та молекулярної фізіології гладеньких м'язів, зокрема, у галузі ензимології та біохімічної мембранології міометріальних клітин.

Використання авторами монографії сучасних експериментальних біохімічних, хімічних та фізико-хімічних методів (препаративної та аналітичної біохімії, біохімічної мембранології, ензимології, ізотопної техніки ($^{45}\text{Ca}^{2+}$), спектрофотометрії, фотон-кореляційної спектроскопії, спектрофлуориметрії, протокової цитофлуориметрії, світлової, електронної та конфокальної мікроскопії, органічного синтезу, ядерного магнітного резонансу, інфрачервоної спектроскопії, обернено-фазової вискоефективної рідинної хроматографії, молекулярного комп'ютерного докінг-моделювання та молекулярної динаміки, тензометрії та механокінетики, хімічної та біохімічної кінетики, математичного моделювання) при проведенні власних досліджень стало запорукою одержання змістовних нових результатів у галузі розбудови підходів до спрямованої модуляції каліксаренами функціональної активності катіон-транспортувальних систем в гладеньких м'язах.

Дійсно, можна стверджувати, що вперше в світі автори монографії систематично вивчили біохімічні та фізико-хімічні закономірності дії каліксаренів на системи активного АТР-залежного транспорту іонів Ca та Na у субклітинних мембранних структурах гладеньких м'язів, ідентифікували низку калікс[4]аренів, які можуть слугувати «молекулярними платформами» для подальшого створення оборотних, селективних та афінних низькомолекулярних макроциклічних ефекторів Mg^{2+} , АТР-залежних катіонних помп плазматичної мембрани, Ca^{2+} -уніпортеру мітохондрій, а також АТР-ази

субфрагменту-1 міозину. Безперечно, одержані результати є пріоритетними та перспективними для виробництва ліків нового «супрамолекулярного» покоління – регуляторів активності енергозалежних Ca^{2+} -транспортувальних систем гладеньком'язових клітин у випадку її порушень за патологічних станів.

Я думаю, що дослідження, проведені авторами монографії, та, відповідно, вона сама, є наочним прикладом того, наскільки корисними, плідними та ефективними можуть бути спільні наукові пошуки, які здійснюються фахівцями різних галузей Природознавства (в даному випадку – спеціалістами з біохімії, біофізики, органічної та супрамолекулярної хімії) при вирішенні складних міждисциплінарних наукових проблем. Хочу відзначити, що на теперішній час різноспрямовані дослідження з вивчення біологічної активності каліксаренів провадяться в нашому Інституті не лише у відділі біохімії м'язів, але й в інших відділах – структури і функції протеїну, нейрохімії, хімії та біохімії ензимів.

Я щиро сподіваюся, що ця міждисциплінарна монографія приверне до себе увагу фахівців у біологічній, медичній, фізичній, органічній і супрамолекулярній хімії, біофізики, фізико-хімічній, молекулярній, клітинній і системній біології, фармакології, молекулярній фізіології, а також студентів і аспірантів – біохіміків, біофізиків, фізіологів, фармакологів. Впевнений, що подальший прогрес у галузі теоретичного та практичного вирішення різноманітних проблем сучасної біології та медицини неможливий без ґрунтовної підготовки біологів і медиків — студентів, аспірантів та докторантів - у сфері фундаментальних наук хімічного, фізико-хімічного та фізико-математичного циклів. Якісна освіта, всебічна підготовка наукових кадрів - фахівців у галузі природничих та медичних наук – одна з запорук наукового, технологічного та соціального прогресу України!

І тут я хочу відзначити, що під науковим керівництвом академіка С.О. Костеріна в останні роки було захищено низку дисертацій, виконаних «на стику» біохімії, біофізичної та супромолекулярної хімії, і присвячених дослідженню біохімічних механізмів внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу в гладеньких м'язах та впливу калікс[4]аренів на ензиматичні АТР-гідролазні та катіон-транспортувальні процеси в мембранних структурах гладеньком'язових клітин (докторські дисертації С. Шликова, Л. Бабіч, Ю. Даниловича; кандидатські дисертації О. Шелюк, О. Шкрабака, А. Бевзи, Н. Кандаурової, О. Коломієць, Ю. Мазур; наразі готують до захисту докторські дисертації Т. Векліч та О. Цимбалюк).

Бажаю як досвідченим, так і починаючим вченим, які працюють «на стику» біохімії та органічної хімії, змістовних творчих досягнень, а авторам монографії – нових успіхів у вивченні молекулярних та мембранних механізмів регуляції концентрації іонів Са в міоцитах, дослідженні біохімічних закономірностей впливу каліксаренів на внутрішньоклітинний кальцієвий гомеостаз.

Директор Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,
академік НАН та НАМН України професор С.В. Комісаренко.

Автори монографії щиро вдячні співробітникам відділу біохімії м'язів та лабораторії оптичних методів дослідження Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (Ю.В. Данилович, Р.Д. Лабинцева, Г.В. Данилович, О.А. Шкрабак, О.В. Бевза, А.А. Бевза, Н.В. Кандаурова, Н.С. Кочешкова, Ю.Ю. Мазур, В.Ф. Горчев, С.О. Карахім, О.Ю. Чуніхін), Інституту органічної хімії НАН України (О.І. Кальченко, Р.В. Родіку, С.О. Черенку, О.А. Єсипенку, М.А. Клячиній, В.І. Бойку, Л.І. Атамась) та Київського національного університету імені Тараса Шевченка (О.В. Цимбалюк) за творчу дослідницьку співпрацю у галузі вивчення закономірностей дії каліксаренів на трансмембранний обмін іонів та ензиматичний гідроліз АТР в гладеньком'язових клітинах.

ВСТУП

На теперішній час є цілком очевидним, що найбільш цікаві фундаментальні проблеми сучасного Природознавства є комплексними та міждисциплінарними (краще, мабуть, сказати трансдисциплінарними, «перехресними») в тому розумінні, що їхнє ефективне вирішення вимагає залучення ідей, бачень, уявлень, гіпотез, теорій, методологій та методів, які притаманні різним наукам та науковим напрямам. Адже ПРИРОДА – ЄДИНА, і вона зовсім «не знає» за те, що ми, відповідно до нашої освіти, власних вподобань та уявлень, диференціюємо її на хімію, фізику, біологію тощо. Дійсно, найцікавіші фундаментальні проблеми сучасної біології — наприклад, у галузі вивчення механізмів ензиматичного каталізу, мембранного транспорту речовин, внутрішньоклітинної сигналізації, розповсюдження нервового імпульсу, біомеханохімічних явищ, ліганд-рецепторної взаємодії, біосенсорики тощо, локалізовані саме на «перехресті» різноманітних наук і наукових напрямів, тобто є трансдисциплінарними. Втім, вирішення фундаментальних трансдисциплінарних проблем потребує активного залучення методів та методологій, теорій, гіпотез, концепцій, бачень, уявлень, які притаманні не лише біохімії, біофізиці та молекулярній біології, але й фізичній, колоїдній та супрамолекулярній хімії, термодинаміці та статистичній фізиці, хімічній фізиці, математичній та комп'ютерній біології. Саме з цим пов'язане виникнення в останні десятиріччя таких трансдисциплінарних наук, як фізико-хімічна біологія, біофізична хімія, хімічна біофізика, фізична біохімія, квантова біохімія, системна біологія, молекулярна фізіологія, біоінженерія, молекулярна медицина, інженерна ензимологія, технічна біохімія, біосенсорика, нанобіотехнологія, біоматематика та біоінформатика, біохімія «*in silico*» тощо.

Одній з трансдисциплінарних проблем, яка знаходиться на «перехресті» біохімічної мембранології, ензимології, біофізичної та супрамолекулярної хімії, і присвячено цю монографію.

Але, перш за все, варто акцентувати увагу на наступному. Як добре відомо, один із найважливіших методологічних підходів, що залучений в молекулярних та клітинних технологіях в біохімії, біофізиці, молекулярній біології, і спрямований на вивчення фізико-хімічних і структурно-функціональних властивостей біомакромолекул (протеїнів, нуклеїнових кислот), надмолекулярних комплексів, субклітинних і мембранних структур, ґрунтується на використанні природних та штучних ефекторів E (активаторів, інгібіторів) як модифікаторів активності ензиматичних, транспортних, рецепторних, регуляторних та сигнальних протеїнів. Отже, вивчення фізико-хімічних і біохімічних основ та механізмів взаємодії малих ефекторних молекул з біомакромолекулами та біомембранами – це одна із центральних проблем сучасної так званої «контактної біології». Без перебільшення можна стверджувати, що «контактні» явища є визначальними в реалізації практично усіх фундаментальних загальнобіологічних феноменів, які вивчаються на рівні трансдисциплінарних напрямів біологічних наук. Мова йде, наприклад, за:

-ензиматичний каталіз (контактна система: «субстрат - ензим - ефектор») (галузі досліджень: хімічна, технічна та інженерна ензимологія, фізика та фізична хімія ензиматичного каталізу, біохімічна кінетика);

-мембранний транспорт речовин (контактна система: «речовина, що транспортується – мембранозв'язана транспортна система») (галузі досліджень: фізико-хімічна біологія клітини, біохімічна та біофізична мембранологія, електрофізіологія та електробіофізика клітини);

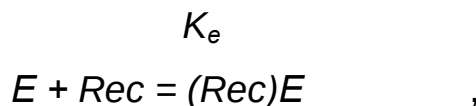
- *внутрішньоклітинну сигналізацію* (зокрема, катіонну, перш за все - кальцієву) (галузі досліджень: системна та клітинна біологія, молекулярна фізіологія, біохімія, біофізика та біофізична хімія клітини, електробіофізика);

- *взаємодію «антиген-антитіло»* (галузі досліджень: імунохімія, молекулярна імунологія);

- *зв'язування закономірностей взаємодії флуоресцентних, магнітних та радіоактивних зондів з протеїнами-мішенями* (галузі досліджень: біофізика та фізична хімія протеїнів, біофізика мембран, ензимологія, нанобіотехнологія).

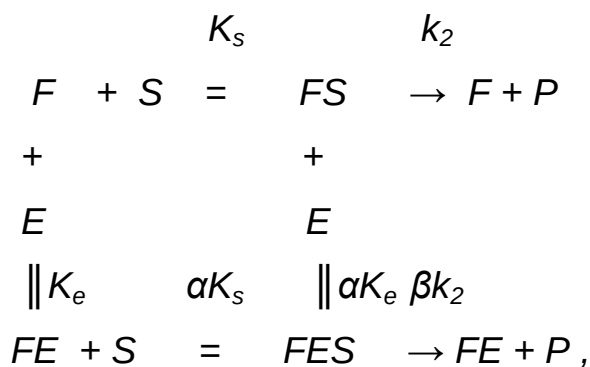
Очевидно, що властивості штучного ефектора E , який претендує на роль «молекулярної платформи», здатної ефективно регулювати функціональну активність внутрішньоклітинного протеїну, а також на роль лікарського препарату, повинні, як мінімум, задовольняти наступним умовам: 1)цей ефектор повинен бути нетоксичним (малотоксичним) та неімуногенним для організму; 2)добре проникати через плазматичну мембрану клітини; 3)діяти за оборотним механізмом; 4)виявляти специфічну (селективну) дію саме на конкретний протеїн; 5)характеризуватися оптимальним афінітетом до протеїна-мішені (принаймні ефекторна константа $K_e \approx 10^{-6} - 10^{-4} \text{ M}$).

З термодинамічної точки зору елементарний «контактний» процес у фізико-хімічній біології в найбільш простому випадку може бути зображений у вигляді тривіальної оборотної реакції:



де E , як вже відзначалося - ефектор, Rec - рецептор (центр зв'язування) на біомакромолекулі чи на біомембрані, K_e - ефекторна константа (константа дисоціації комплексу $RecE$), яка є термодинамічною мірою *спорідненості* ефектору до мішені, причому

«спорідненість» ефектора $\sim 1/K_e$, а $\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K_e$ (ΔG , ΔH та ΔS – зміни вільної енергії Гіббса, ентальпії та ентропії зв'язування ефектора на біомакромолекулі відповідно, R – газова стала, T – абсолютна температура, $^{\circ}K$). У випадку, наприклад, «контактних» систем «ензим - субстрат - ефектор» чи «транспортер - субстрат переносу - ефектор» вищенаведена проста модельна реакція трансформується у циклічну узагальнену реакцію - відому в ензимології схему Моралеса-Боттса-Березина-Мартинєка:



де F – ензиматичний (транспортний) протеїн; S – субстрат ензиматичного чи транспортного процесу; $(FS$ – ензим-субстратний (транспортер-субстратний) комплекс; FES – потрійний комплекс «ензим-субстрат-ефектор» чи «транспортер-субстрат переносу-ефектор»; P – продукт ензиматичного чи транспортного процесу; K_s та K_e – субстратна та ефекторна константи відповідно (реципрокно характеризують спорідненість відповідно субстрату S та ефектору E до протеїну); k_2 – каталітична константа («число обертів» ензиму чи транспортеру) на рівні лімітуючої стадії, α та β – термодинамічний та кінетичний коефіцієнти модифікації відповідно (термодинамічний коефіцієнт модифікації α відповідає енергетичному балансу для циклічного фрагменту вищенаведеної схеми згідно з законом збереження енергії: $K_s(\alpha K_e) = K_e(\alpha K_s)$; β – віддзеркалює відносну зміну

«числа обертів» каталітичного (транспортного) протеїну у присутності ефектора E .

Відповідно до вищенаведеної циклічної схеми Моралеса-Боттса-Березина-Мартінека, абсолютно очевидно, що маніпуляція величинами K_e , α та β , за умов використання різноманітних за хімічною природою та фізико-хімічними властивостями оборотних ефекторів, що здатні зв'язуватися з каталітичними (транспортними) протеїнами, створює можливість для спрямованої модифікації активності ензиму (транспортної системи) (у випадку, наприклад, спотворення такої активності за патологічних станів). Теоретичні основи термодинамічного аналізу закономірностей регуляції оборотними ефекторами спорідненості лігандів до центру зв'язування ензиму чи біомембрани були розроблені у свій час С.О. Костерінім («Журнал физической химии», том LV, №8, ст. 1965-1969, 1981).

З фундаментальної точки зору вищезазначена «ефекторна технологія» при її застосуванні в трансдисциплінарних науках - біохімії, біофізиці, фізико-хімічній біології, молекулярній та клітинній біології, є вкрай перспективною для з'ясування біофізикохімічних та структурно-функціональних властивостей біомакромолекул, вивчення молекулярних та мембранних механізмів метаболічних процесів.

З практичної ж точки зору саме така технологія є коректною і найбільш науково обґрунтованою для проведення, на строгому кількісному рівні, скринінгу нових штучних та природних оборотних селективних ефекторів – активаторів та інгібіторів ензиматичних та транспортних, а також рецепторних, регуляторних та сигнальних протеїнів у нормі та за патологічних станів. Адже врешті-решт мова йде за кількісне підґрунття для спрямованого синтезу, вивчення біологічної активності та біофізикохімічних механізмів дії штучних «молекулярних платформ», необхідних для створення ліків нового

покоління – регуляторів функціональної активності різноманітних протеїнів у випадку різних патологій.

Втім, цілком зрозуміло, що «стартовим» етапом у розбудові вищезазначеної «ефекторної технології» є, перш за все, створення та вивчення властивостей (кінетичних та енергетичних) перспективних інгібіторів та активаторів функціональної активності ензиматичних, транспортних, рецепторних, регуляторних та сигнальних протеїнів.

У контексті вищезазначеного в останні роки все більша увага з боку біохіміків, біофізиків, фахівців у галузі молекулярної та клітинної біології, приділяється таким низькомолекулярним малотоксичним макроциклічним сполукам, як циклічні олігомери фенолів – каліксаренам: нанорозмірним тривимірним макроциклічним сполукам, здатним до супрамолекулярних взаємодій з біокатіонами, біоаніонами, біомолекулами та біомакромолекулами. Так, зазначені сполуки (принаймні, деякі з них) демонструють мембранотропну дію, добре проникають крізь плазматичну мембрану, а також слугують ефекторами (інгібіторами та активаторами) різноманітних ензиматичних, рецепторних та транспортних мембранозв'язаних протеїнів, пригнічують адгезію клітин, виявляють антитромботичну дію, гальмують процеси пухлинного росту, тощо.

На теперішній час в Україні працює наукова школа хіміків-органіків під керівництвом академіка НАН України проф. В.І. Кальченка (відділ хімії фосфоранів, Інституту органічної хімії НАН України), яка займається спрямованим синтезом та вивченням хімічних, фізико-хімічних та біологічних властивостей каліксаренів.

З точки зору хімії каліксарени – це нанорозмірні макроциклічні сполуки чашоподібної будови (рис. В.1). Префікс «калікс» походить від грецького словосполучення «чаша для вина», що віддзеркалює тривимірну форму молекули з глибокою порожниною. В порожнину («ГОСПОДАР») можуть входити і утримуватись в ній за рахунок

різноманітних нековалентних взаємодій так звані «ГОСТІ» - молекули та іони відповідних розмірів та архітектури. Суфікс «арен», вказує на ароматичний «будівельний» блок зазначеної сполуки.



Рис. В.1. Молекулярна будова трет-бутилкалікс[4]арену та грецька ваза-кратер для вина.

Каліксарени одержують циклоконденсацією *пара*-заміщених фенолів з формальдегідом, і широко використовують як молекулярні платформи для дизайну специфічних молекулярних рецепторів, здатних з високою селективністю розпізнавати, на рівні комплексу «ГІСТЬ-ГОСПОДАР», близькі за розміром та властивостями субстрати – різноманітні катіони, аніони та нейтральні молекули. Каліксарени, модифіковані відповідними рецепторними групами, мають також високий афінітет до біомакромолекул – протеїнів, нуклеїнових кислот, сахаридів та інш.

Такі процеси молекулярного розпізнавання базуються на принципах супрамолекулярної хімії, яка вивчає молекулярні системи, організовані із залученням селективних нековалентних взаємодій. В той час як молекулярна хімія «керує» ковалентними зв'язками, супрамолекулярна хімія – це «хімія за межами молекули». Її мета – здобути контроль над міжмолекулярними нековалентними взаємодіями. Супрамолекулярна хімія пов'язана зі складнішими утвореннями, ніж окремі молекули, а саме з супрамолекулярними

ансамблями, що утримуються разом за рахунок міжмолекулярних нековалентних взаємодій. Цей розділ хімії – це трансдисциплінарна галузь знання, що поєднує науку і технологію та перекидає містки від хімії до біології й фізики. Принципи супрамолекулярної хімії покладено в основу створення багатьох сучасних нанотехнологій. Супрамолекулярна хімія є ключем до вирішення одного з найважливіших питань, що стоїть перед нанотехнологією, а саме – як змусити молекули групуватися заданим способом, самоорганізовуватися, щоб у підсумку створити нові матеріали з оригінальними властивостями. Здатність до розпізнавання субстратів і утворення з ними супрамолекулярних комплексів є основою широкого застосування каліксаренів, функціоналізованих на нижньому та (або) верхньому вінці макроциклу різноманітними угрупованнями, в біології, хімії, фізиці, органічному матеріалознавстві, а також в нанотехнологіях.

В останнє десятиріччя зусиллями наукового колективу біохіміків під керівництвом академіка НАН України проф. С.О. Костеріна (відділ біохімії м'язів, Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України) у активній співпраці з науковою школою академіка НАН України проф. В.І. Кальченка були одержанні експериментальні результати щодо закономірностей дії каліксаренів на деякі найважливіші АТР-залежні біохімічні процеси; у якості об'єкту досліджень переважно були обрані мембранні структури, Ca^{2+} -транспортувальні та скоротливі протеїни гладеньких м'язів (традиційний предмет вивчення у відділі біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України).

І тут необхідно підкреслити, що, як відомо, однією з фундаментальних та класичних проблем біохімії та біофізики м'язів, у тому числі і гладеньких, є вивчення іонних, молекулярних та мембранних механізмів їх скорочення. Гладеньким м'язам належить виключно важлива роль у забезпеченні функціональної активності внутрішніх органів та систем органів (серцево-судинної, лімфатичної,

сечостатевої, шлунково-кишкового тракту тощо). Зрозуміти механізми м'язового скорочення та його порушення за патологічних станів – це, у значному ступені, зрозуміти біохімічні закономірності контролю іонного (перш за все – кальцієвого) гомеостазу у м'язових клітинах та функціонування контрактильних протеїнів в нормі та при різних захворюваннях, пов'язаних з порушенням скоротливої активності. У відділі біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України протягом останніх десятиріч були накопичені фундаментальні експериментальні дані щодо кінетичних, каталітичних та функціональних властивостей катіон-транспортувальних та механохімічних катіон-залежних АТФ-гідролазних систем гладенького м'язу матки - міометрія. Літературні та власні результати, одержані у відділі біохімії м'язів в різні роки при вивченні біохімічних механізмів регуляції концентрації іонів Ca в клітинах міометрія, були узагальнені в монографіях: *Курский М.Д., Костерин С.А., Воробец З.Д. Регуляция внутриклеточной концентрации кальция в мышцах. Киев. Наукова думка, 1987. 144 с.; Костерин С.А. Транспорт кальция в гладкой мышце. Київ. Наукова думка, 1990. 216 с.; Kosterin S.A. et al. Mechanisms of Ca^{2+} transport in myometrium. Chapter 6. In: "Control of Uterine Contractility". CRC Press, Boca Raton, USA. 1994. pp.129-154; Костерін С.О., Бабіч Л.Г., Шликов С.Г., Данилович Ю.В., Векліч Т.О., Мазур Ю.Ю. Біохімічні властивості та регуляція Ca^{2+} -транспортувальних систем мембранних структур гладеньком'язевих клітин. Наукова думка, 2016. 273 с.).*

Втім, треба відзначити, що у зв'язку із складним екологічним станом в Україні та загальним погіршенням здоров'я її населення рівень патологій скоротливої активності міометрія (гіпо- та гіпертонус, атонія, тетанус, а також спонтанні аборти, викидні, передчасні пологи тощо) має наочну тенденцію до зростання. Пептидний гормон окситоцин є головним утеротоніком, що застосовується в клініці при

слабкості пологової діяльності. Він впливає на скорочення міометрія через специфічні рецептори плазматичної мембрани (константа дисоціації ліганд-рецепторного комплексу $K_d \sim 10$ нМ), сприяючи підвищенню концентрації Ca в міоплазмі. Це призводить до збільшення тону та скоротливої активності мускулатури матки. Натомість при неефективності введення окситоцину в організм чи при погіршенні стану плоду питання щодо народження дитини вирішується хірургічним чином – шляхом кесаревого розтину. Отже, пошук фармакологічних препаратів нового покоління – модуляторів внутрішньоклітинного кальцієвого обміну, здатних ефективно нормалізувати контрактильну функцію міометрія у випадку її порушень за патологічних станів, є вкрай актуальним. З цієї точки зору каліксарени, відповідно до вищенаведеного, можуть являти собою безперечний інтерес в аспекті вивчення закономірностей їхнього впливу на біохімічні процеси та механізми, які лежать в основі електро- та фармакомеханічного спряження в гладенькому м'язі матки, зокрема, на катіон-залежні АТР-гідролазні транспортні і механохімічні протеїни.

Ця монографія переважно присвячена опису результатів систематичних досліджень, що були здійснені в останнє десятиріччя її авторами та їх колегами з ІБХ та ІОХ НАН України, а також Київського національного університету імені Тараса Шевченка у галузі трансдисциплінарного наукового напрямку – біофізичної хімії каліксаренів, а саме – при вивченні закономірностей впливу зазначених нанорозмірних сполук на мембранозв'язані Mg^{2+} -залежні АТР-гідролази та енергозалежні Ca^{2+} -транспортувальні системи плазматичної мембрани, саркоплазматичного ретикулума, мітохондрій), а також на АТР-гідролазу скоротливих протеїнів міометріальних клітин.

При проведенні своїх досліджень автори монографії використовували різноманітні біохімічні, хімічні та фізико-хімічні

методи: препаративної та аналітичної біохімії, біохімічної мембранології, ензимології, ізотопної техніки ($^{45}\text{Ca}^{2+}$), спектрофотометрії, фотон-кореляційної спектроскопії, спектрофлуориметрії, протокової цитофлуориметрії, світлової, електронної та конфокальної мікроскопії, органічного синтезу, ядерного магнітного резонансу, інфрачервоної спектроскопії, обернено-фазової вискоефективної рідинної хроматографії, молекулярного комп'ютерного докінг-моделювання та молекулярної динаміки, тензометрії та механокінетики, хімічної та біохімічної кінетики, математичного моделювання, статистичного аналізу. Експериментальними моделями слугували: солюбілізовані Ca^{2+} -транспортувальні протеїни (перш за все – $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза плазматичної мембрани), реконструйовані Ca^{2+} -транспортувальні протеїни (протеоліпосоми), ізольовані скоротливі протеїни та їх фрагменти, ізольовані субклітинні мембранні структури (фрагменти плазматичної мембрани, мітохондрії, мікросоми), суспензія інтактних та пермеабілізованих дигітоніном гладеньком'язових клітин, гладеньком'язові смужки, інтактні тварини (щури).

Вибрані результати, що були одержані нами в останні роки при з'ясуванні біохімічних та фізико-хімічних закономірностей дії каліксаренів на ензиматичний гідроліз АТФ та активний транспорт іонів Са в мембранних структурах гладеньких м'язів, були віддзеркалені у багатьох статтях, надрукованих у фахових журналах, а також у низці монографічних видань, а саме: *Komisarenko S.V., Kosterin S.O., Lugovskoy E.V., Kalchenko V.I. Calixarene methylene bisphosphonic acids as promising effectors of biochemical processes. pp. 293-327. In: Biochemistry and Biotechnology for Modern Medicine. Edited by Prof. Serhiy Komisarenko. K.: Publishing House Moskalenko O.M. 2013, 704 p.; Комисаренко С.В., Кальченко В.И., Костерин С.А., Луговской Э.В., Лабынцева Р.Д., Черенок С.А., Бевза А.В.*

Каликс[4]аренметиленбисфосфоновые кислоты - перспективные наноэффекторы биохимических процессов – В кн.: «Нанотехнология». - Киев: Наукова думка, 2014. – С. 455-473; Veklich T.O. Inhibitory peculiarities of calix[4]arenes 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 Polytechnic Publishing House, 2015. – P. 200-204; 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 каликсаренсульфониламидов и их биохимическая активность // Монографія: Фундаментальні проблеми створення нових речовин і матеріалів хімічного виробництва. – Київ: Академперіодика, 2016. – С. 224-235.

Відповідні результати багаторазово доповідалися авторами монографії та обговорювалися на різноманітних фахових міжнародних та вітчизняних конференціях та симпозиумах.

Отже, у монографії сукупно систематизовані, узагальнені та проаналізовані літературні та авторські експериментальні дані щодо хімічних, фізико-хімічних та біологічних властивостей калікс[4]аренів з акцентом на результати авторського вивчення закономірностей їхньої дії на катіон-залежні АТР-гідролазні системи гладеньких м'язів. Так, зокрема, у своїх дослідженнях автори та їхні колеги продемонстрували, що вибрані калікс[4]арени, наприклад С-90, С-91, С-97, С-99, С-107, можуть слугувати селективними ефекторами окремих АТР-гідролазних систем (як мембранозв'язаних транспортувальних, так і "механохімічних"). Ми вважаємо, що використання цих макроциклічних сполук у якості селективних ефекторів АТР-гідролазних систем створює можливість для вирішення найважливіших актуальних проблем системної біології та біофізичної хімії гладеньком'язової клітини, а саме: вивчення біохімічних та

біофізичних властивостей систем активного транспорту іонів Ca , з'ясування парціального внеску цих систем в підтримання внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу в міоплазмі. Є підстави стверджувати, що деякі з вивчених нами калікс[4]аренів можуть слугувати “молекулярними платформами”, перспективними для створення ліків нового (“супрамолекулярного”) покоління, що нормалізують внутрішньоклітинний кальцієвий гомеостаз та скоротливу функцію гладеньких м'язів у випадку її порушення за різноманітних патологічних станів (можливе застосування в медицині: у боротьбі з патологіями в акушерстві та гінекології, серцево-судинними та урологічними хворобами, порушеннями моторики кишково-шлункового тракту тощо).

Монографія складається з п'ятих частин.

Частина Перша стосується загальних питань синтезу, фізико-хімічних властивостей та біологічної активності каліксаренів. В ній акцентується увага на проблемах створення та стереохімії каліксаренів, вивченні комплексів цих сполук з катіонами металів, аніонами та органічними молекулами і біомакромолекулами. Обговорюються різноманітні аспекти використання каліксаренів в медико-біологічних дослідженнях, описуються прояви їхньої біологічної активності. Аналізуються проблеми токсичності та імуногенності каліксаренів. У цій частині також зосереджено увагу на подальших перспективах використання каліксаренів у фізико-хімічній біології, біотехнології та фармакології.

Частина Друга присвячена розгляду калікс[4]аренів як ефекторів (переважно інгібіторів) катіон-транспортувальних АТФ-гідролазних систем. В цьому контексті обговорюються питання щодо дії калікс[4]аренів на активність Mg^{2+} ,АТФ-залежної Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани та Mg^{2+} ,АТФ-залежної Ca^{2+} -помпи саркоплазматичного ретикулума, а також Ca^{2+} -уніпортеру мітохондрій.

Обговорюються результати та закономірності вивчення впливу зазначених сполук на активність Mg^{2+} , АТР-залежної Na^+, K^+ -помпи плазматичної мембрани.

У Третій частині мова йде за калікс[4]арени як ефектори АТР-гідролазної системи скоротливих протеїнів (зокрема, на рівні вивчення впливу цих сполук на АТР-гідролазну активність субфрагмента-1 міозину).

Частина Четверта присвячена опису явища каліксарен-індукованого неензиматичного гідролізу АТР.

І, нарешті, у П'ятій частині обговорюється питання щодо кінетичних закономірностей дії калікс[4]аренів на механокінетику процесу скорочення-розслаблення гладеньких м'язів.

Викладання фактичного матеріалу в монографії завершується розділом «Підсумки», в яких узагальнюються літературні та авторські дані щодо властивостей калікс[4]аренів як низькомолекулярних ефektorів АТР-гідролазних систем. В цьому розділі формулюються деякі бачення авторів стосовно одержаних експериментальних результатів із вивчення біофізикохімічних закономірностей дії калікс[4]аренів на активність Mg^{2+} -залежних АТР-гідролазних систем, обговорюються перспективи подальших досліджень у цій перехресній галузі супрамолекулярної хімії та біохімії.

І, нарешті, «Додаток» містить математичне тлумачення методу, який був задіяний авторами при вивченні кінетики неензиматичного калікс[4]арен-індукованого гідролізу АТР та процесу «скорочення-розслаблення» гладеньких м'язів.

Як вже відзначалося, монографія переважно ґрунтується на результатах власних досліджень авторів, які щиро вдячні за творчу співпрацю і чудове людське спілкування колегам: О. Кальченко, Р. Родіку, С. Черенку, О. Єсипенку, М. Клячиній, В. Бойку, Л. Атамась (Інститут органічної хімії НАН України); Ю. Даниловичу, О.

Шатурському, Н. Слінченко, Р. Лабинцевій, О. Бевзі, О. Шкрабаку, А. Бевзі, Г. Данилович, В. Горчеву, С. Карахіму, О. Чуніхіну, Н. Кандауровій, Н. Кочешковій, О. Коломієць, Ю. Мазур (Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України); О. Цимбалюк, О. Шелюк, В. Хилі (Київський національний університет імені Тараса Шевченка).

Особлива подяка авторів - академіку НАН та НАМН України С.В. Комісаренку, члену-кореспонденту НАН України А.І. Вовку за плідні дискусії при аналізі одержаних експериментальних результатів щодо впливу каліксаренів на ензиматичну та транспортну активність АТР-гідролазних систем і на скоротливу активність гладеньких м'язів.

ЧАСТИНА ПЕРША.

СИНТЕЗ, ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ТА БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ КАЛІКСАРЕНІВ

РОЗДІЛ 1. ОСНОВИ ХІМІЇ КАЛІКСАРЕНІВ

1.1. СИНТЕЗ ТА СТЕРЕОХІМІЯ КАЛІКСАРЕНІВ

Каліксарени – чашоподібні макроциклічні сполуки, які отримуються циклоконденсацією пара-заміщених фенолів з формальдегідом [1]. Їх молекули побудовані з фенольних фрагментів, які сполучені між собою метиленовими містками (рис.1.1).

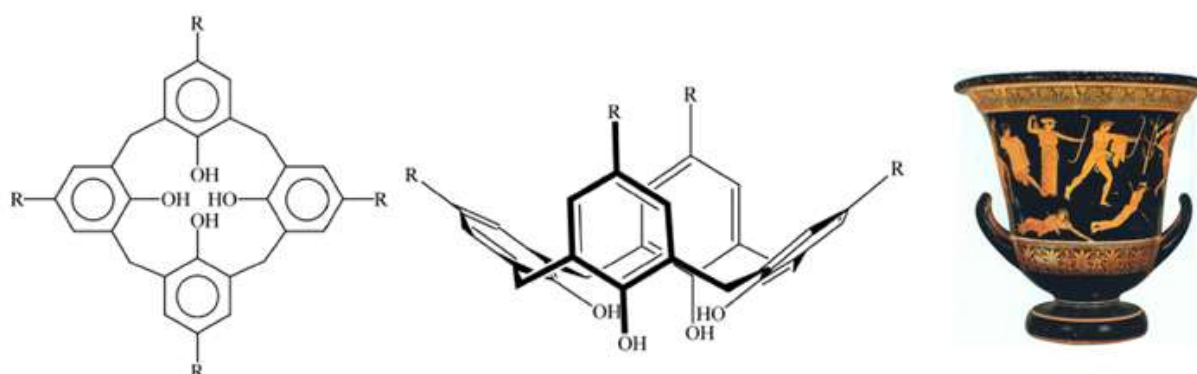


Рис. 1.1. Двовимірне і тривимірне зображення молекулярної структури калікс[4]арену та грецька чаша-кратер.

Термін "калікс[*n*]арен" був введений в літературу американським хіміком Девідом Гютше (David Gutsche). Префікс "калікс" походить від грецького слова чаша-кратер для вина, і вказує на оригінальну чашеподібну форму молекули (рис. 1.1). Суфікс "арен" свідчить про

наявність ароматичних циклів в макроциклічному ансамблі. Дескриптор «n» вказує на кількість ароматичних фрагментів у макроциклічному кістяку молекули. В молекулі каліксаренів умовно виділяють верхній (широкий) вінець, та нижній (вузький) вінець макроциклу. Об'єм внутрішньої порожнини молекули калікс[4]арену в середньому становить 10 кубічних ангстрем.

Каліксарени можна синтезувати двома методами. Історично першим методом отримання калікс[4]аренів була постадійна конденсація заміщених фенолів у лінійні олігомери, та подальша їх циклізація. Так можна отримувати каліксарени, що одночасно містять різні за природою замісники у пара-положеннях бензольних кілець макроциклу, але виходи цільових сполук при цьому низькі.

Пізніше були розроблені препаративні однореакторні методи синтезу калікс[4,6,8]аренів (виходи 50-80%) прецизійною циклоконденсацією *трет*-бутилфенолу з формальдегідом, або параформом, в присутності каталітичних кількостей гідроксидів натрію або калію. Катіони натрію та калію виконуть роль темплатів, і спрямовують реакцію в бік утворення макроциклів відповідного розміру (рис 1.2).

Залежно від природи каталізатора, розчинника і температури реакцію можна спрямувати на утворення *трет*-бутилкалікс[4]арену, *трет*-бутилкалікс[6]арену або *трет*-бутилкалікс[8]арену. *трет*-Бутилкалікс[8]арен є продуктом кінетичного контролю, *трет*-бутилкалікс[4]арен – термодинамічного, а *трет*-бутилкалікс[6]арен – темплатного. В процесі циклоконденсації в незначних кількостях утворюються також каліксарени з непарною кількістю ароматичних фрагментів у макроциклі.

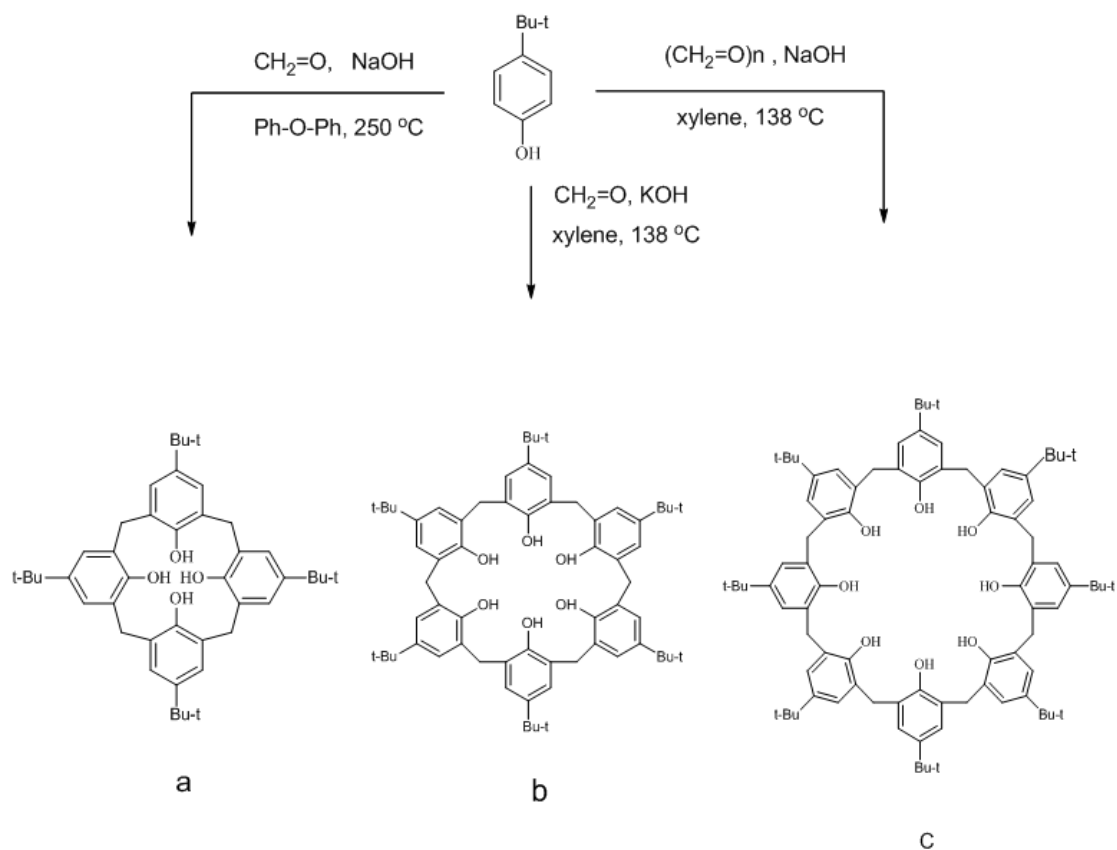
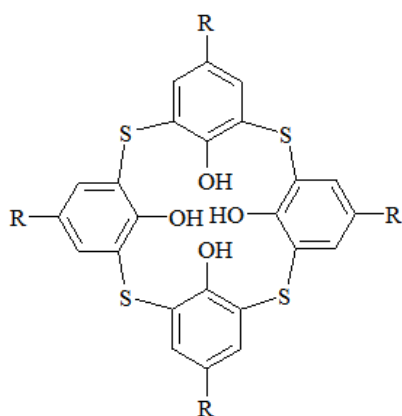


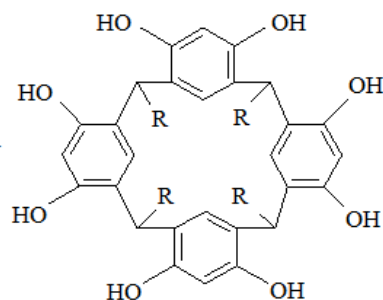
Рис. 1.2. Однореакторний синтез каліксаренів: трет-бутилкалікс[4]арену (а), трет-бутилкалікс[6]арену (б), трет-бутилкалікс[8]арену (с).

трет-Бутильні групи легко видаляються з макроциклу дією безводного хлориду алюмінію з утворенням незаміщеного по верхньому вінцю калікс[4]арену, калікс[6]арену або калікс[8]арену.

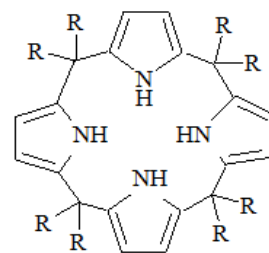
Близькими аналогами каліксаренів, за молекулярною структурою і комплексоутворюючими властивостями, є тіакалікс[4]арени, калікс[4]резорцинарени та калікс[4]піроли [2].



Тіакалікс[4]арени



Калікс[4]резорцинарени

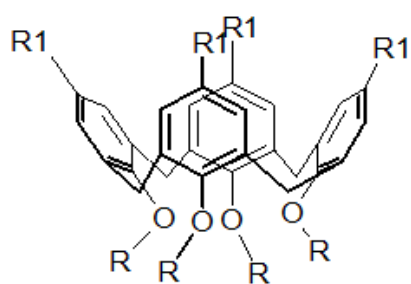


Калікс[4]піроли

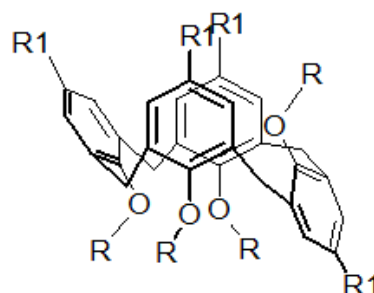
трет-Бутилтіакалікс[4]арен [3] отримують циклоконденсацією *трет*-бутилфенолу з елементною сіркою в розчині диметилового етеру бутиленгліколю при високій температурі в присутності гідроксиду натрію [4]. *трет*-Бутильні групи з утвореного тетраметру легко видаляються дією безводного трихлориду алюмінію [5]. Калікс[4]резорцинарени синтезують циклоконденсацією резорцину з аліфатичними та ароматичними альдегідами. Реакція відбувається у водно-спиртовому розчині за наявності соляної кислоти, яка є каталізатором процесу. Калікс[4]піроли отримують циклоконденсацією піролу з кетонами [6].

Атоми водню гідроксильних груп та атоми водню (або *трет*-бутильні групи) в *пара*-положеннях бензольних кілець калікс[*n*]аренів класичними методами органічної хімії заміщуються на різноманітні функціональні угруповання, які визначають конформаційну поведінку, хімічні, фізико-хімічні властивості і здатність каліксаренів до селективного утворення супрамолекулярних комплексів з субстратами [7].

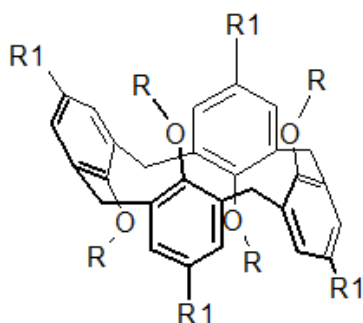
Похідні калікс[4]аренів можуть існувати в чотирьох конформаціях: *конус*, *частковий конус*, *1,2-альтернат*, і *1,3-альтернат* (рис. 1.3), які відрізняються взаємним розміщенням ароматичних фрагментів відносно головної площини макроциклу, що умовно проходить по метиленових зв'язках [8]. В залежності від природи замісників біля атомів кисню ці конформації можуть бути як стереохімічно рухливими, внаслідок вільної інверсії ароматичних фрагментів крізь кільце макроциклу, так і стереохімічно жорсткими. Жорсткі конформації можуть стабілізуватися об'ємними замісниками біля атомів кисню нижнього вінця, які стерично гальмують внутрішнє обертання, або стабілізуватися міцними внутрішньо молекулярними водневими зв'язками між фенольними OH групами ($R = H$).



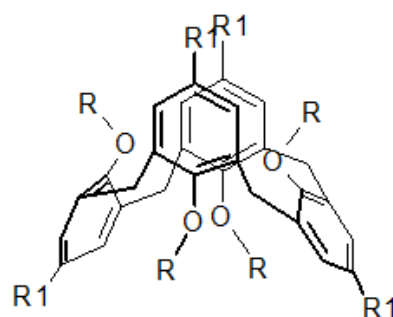
a



b



c



d

Рис. 1.3. Конформації похідних калікс[4]арену: конус (а), частковий конус (b), 1,2-альтернат (с), 1,3-альтернат (d)

Похідні калікс[6]аренів можуть існувати у восьми конформаціях, які відрізняються взаємним розміщенням ароматичних фрагментів відносно головної площини макроциклу [9]. На відміну від калікс[4]аренів, де введення О-пропільних груп повністю блокує інверсію ароматичних фрагментів, калікс[6]арени, навіть при введенні об'ємних О-октильних груп, залишаються конформаційно мобільними. Конформаційна поведінка більших за розміром калікс[8]аренів є значно складнішою.

Молекули каліксаренів можуть адаптуватися до створення найбільш сприятливих взаємодій з мікрооточенням, що пояснюється конформаційною гнучкістю їх макроциклічного кістяка. Здатність розпізнавати та зв'язувати в стійкі комплекси типу “Гість-Господар”, а також розділяти близькі за властивостями катіони, аніони та нейтральні молекули, виникає із особливостей будови каліксаренів.

Супрамолекулярна комплементарність, тобто комплементарність розмірів, форм та зарядів молекул “гостя” та каліксаренового “господаря”, а також різні нековалентні взаємодії, відіграють істотну роль у створенні інклюзійних комплексів типу «господар-гість». Калікс[6]арени та калікс[8]арени можуть включати навіть дві або більше молекул, та завдяки великій кількості можливих конформацій адаптувати свою структуру до будови зв'язаної речовини. Каліксарени є унікальною макроциклічною платформою для створення нового покоління каталізаторів, які містять декілька активних центрів і моделюють ензими.

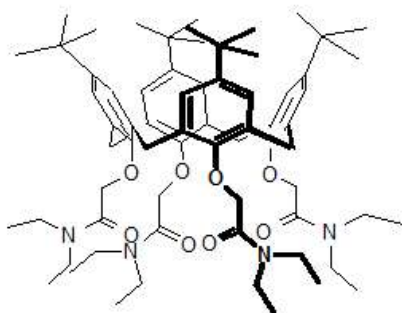
Зараз хіміки розробляють методи регіо- та стереоселективного введення функціональних груп на каліксаренову платформу з метою отримання хіральних каліксаренів та пошуку серед синтезованих

речовин стереоселективних рецепторів іонів та нейтральних молекул, біомолекул, біомакромолекул, енантімерно чистих біологічно активних речовин, сполук, що моделюють функції ензимів [10-18].

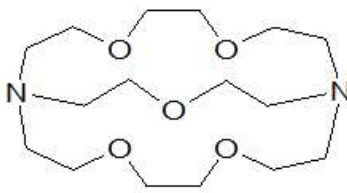
1.2. КОМПЛЕКСИ КАЛІКСАРЕНІВ З КАТІОНАМИ МЕТАЛІВ

Процеси розпізнавання і селективного зв'язування каліксаренами катіонів біометалів (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} та ін.), котрі відіграють важливу роль у функціонуванні клітин, є об'єктом інтенсивних біомедичних досліджень. Високу спорідненість до катіонів лужних та лужно-земельних металів проявляють каліксарени, функціоналізовані по нижньому вінцю макроциклу катіоноакцепторними амідними групами.

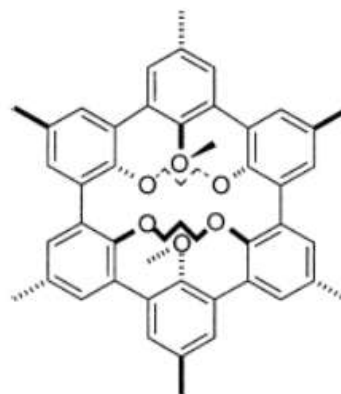
Каліксарентетраамід (1.1) зв'язує катіон Na^+ з приблизно такою ж ефективністю, як і криптанд (1.2), проте значно міцніше, ніж краун-етери та гемісферанди (1.3) [19]. При цьому, каліксарен (1.1) виявляє вищу Na^+/Li^+ і Na^+/K^+ селективність, ніж криптанди і гемісферанди.



(1.1)



(1.2)

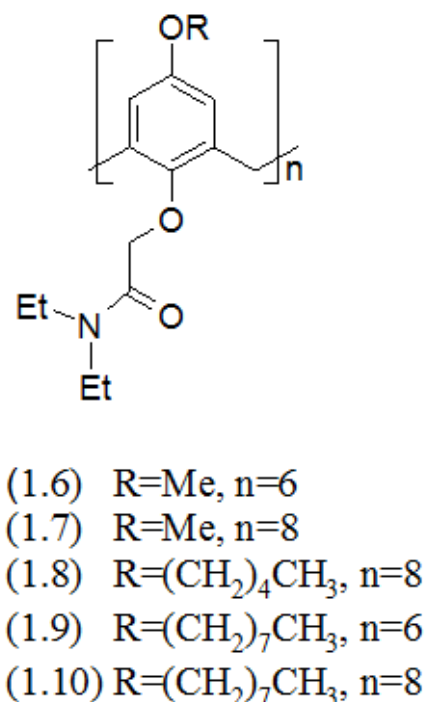
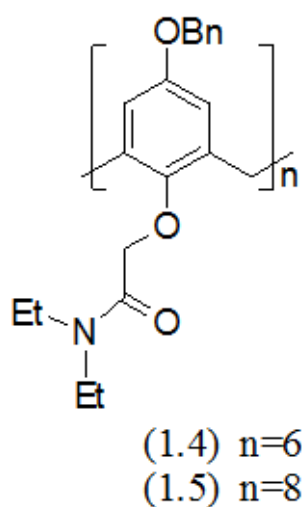


(1.3)

Каліксаренаміди ефективно зв'язують катіони лужно-земельних металів [20]. Так, у розчині метанолу каліксарен (1.1) утворює найстійкіші комплекси із Ca^{2+} та Sr^{2+} ($\lg K_a > 9$), гірше зв'язує Ba^{2+} ($\lg K_a =$

7,2), а комплексоутворення з Mg^{2+} практично не відбувається [21]. Це зумовлює високу Ca^{2+}/Mg^{2+} селективність каліксаренамідів (1.1), яка досягає значення 10^8 , і є найвищою для відомих нейтральних лігандів.

Ефективність комплексоутворення амідів каліксаренкарбонових кислот з катіонами металів великою мірою залежить від розміру макроциклічного кільця. Калікс[4]арентетрааміди проявляють селективність до іонів з невеликим радіусом – Na^+ і Ca^{2+} . Каліксарени з більшим розміром макроциклічного кільця – гексааміди (1.4, 1.6) і октааміди (1.5, 1.7, 1.8, 1.10) [22] погано зв'язують катіони лужних металів (крім Cs^+). Разом з тим, гекса- і октааміди каліксаренкарбонових кислот є ефективними комплексоутворювачами катіонів лужно-земельних металів [23].

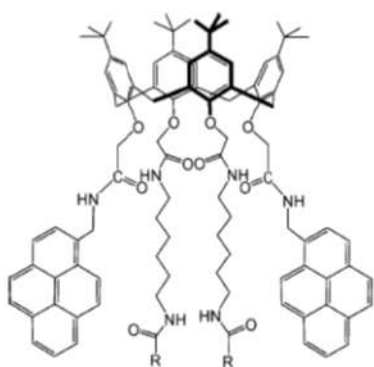


Різна здатність до комплексоутворення цих сполук з катіонами лужних та лужно-земельних металів приводить до значної M^{2+}/M^{1+} селективності. Цікаво зазначити, що октаамід (1.5) (селективність $Sr^{2+}/Na^+ = 51,3$) селективніший за дициклогексил-18-краун-6

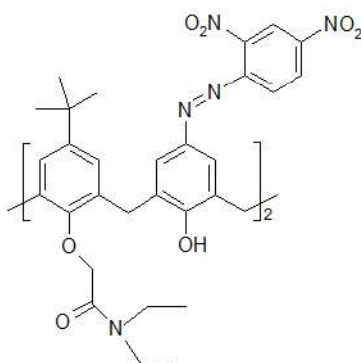
(селективність $\text{Sr}^{2+}/\text{Na}^{+} = 12$), який є одним із найселективніших рецепторів катіонів Sr^{2+} , відомих у літературі. Він використовується для видалення токсичних радіоізоотопів стронцію з ядерних відходів.

Поєднання на каліксареновому макроциклі катіоноакцепторних амідних груп і “сигнальних” (хромо- чи флуорофорних) угруповань дає змогу за допомогою змін в УФ і флуоресцентних спектрах спостерігати комплексоутворення з катіонами [24-25]. Калікс[4]аренамід (1.11) з двома флуоресцентними піреновими замісниками, нанесений на скло у вигляді моношару, селективно розпізнає катіон Na^{+} за наявності K^{+} і Cs^{+} [26]. Додавання розчину солі Na^{+} в метанолі до твердофазного моношару каліксарену (1.11) приводить до зменшення інтенсивності емісії мономеру (при 385 і 395 нм) та зростання емісії ексимеру (при довжині хвилі 480 нм).

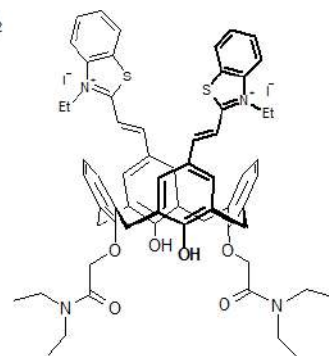
Відомі хромогенні сенсори Ca^{2+} на основі калікс[4]аренамідів, що містять хромофорні азофенольні групи [27, 28]. Наприклад, хромоіонофор (1.12) проявляє високу селективність до Ca^{2+} за наявності Sr^{2+} , Mg^{2+} і Na^{+} . При екстракції солей кальцію у хлороформ каліксареном (1.12) відбувається батохромний зсув максимуму поглинання на 168 нм.



(1.11)



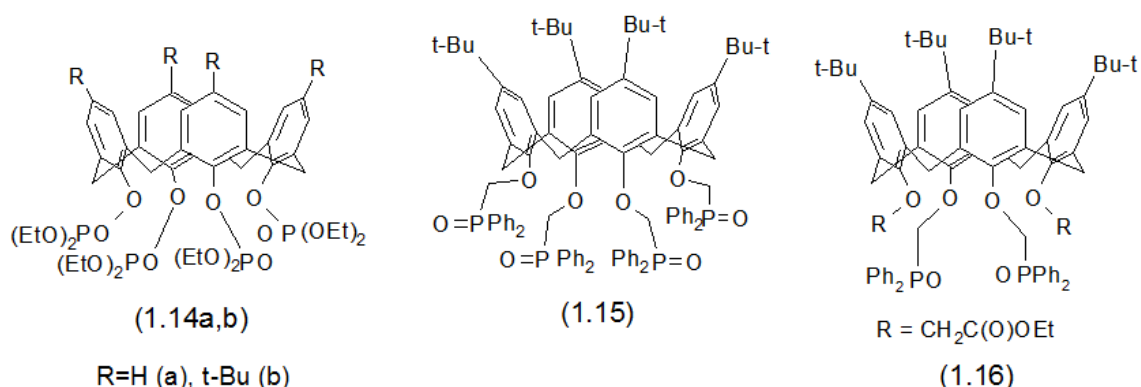
(1.12)



(1.13)

Калікс[4]арендіамід (1.13), функціоналізований двома залишками бензотіазолію, селективно розпізнає катіони Ca^{2+} у водному розчині метанолу за наявності фізіологічно важливих катіонів Na^+ , K^+ , Mg^{2+} [29]. При взаємодії каліксарену (1.13) з катіоном Ca^{2+} в УФ-спектрах спостерігається зростання інтенсивності смуги при 580 нм і зменшення інтенсивності смуги при 434 нм. Селективну відповідь каліксарену (1.13) на катіон Ca^{2+} можна спостерігати навіть неозброєним оком як зміну помаранчового кольору на фіолетовий. На основі каліксаренамідів було створено низку флуоресцентних сенсорів на катіони металів.

Калікс[4]арентетрафосфати (1.14) виявляють високу спорідненість до іонів літію [30]. Константи зв'язування в розчинах ТГФ для (1.14а) становлять $4,2 \cdot 10^6$ для Li^+ , $4,4 \cdot 10^5$ для Na^+ , $8,7 \cdot 10^4$ для K^+ і $6,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ для Cs^+ . Порожнина, утворена одночасно чотирма атомами кисню $\text{P}=\text{O}$ груп та чотирма фенольними атомами кисню, є комплементарною для інкапсулювання катіонів літію, проте замала для катіонів натрію, калію і цезію (рис. 1.4).



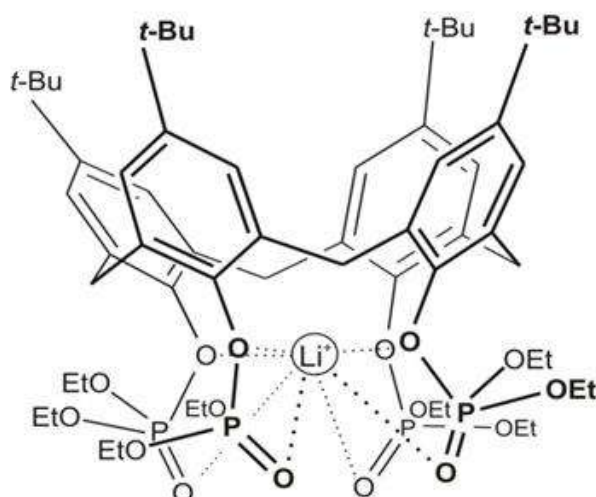


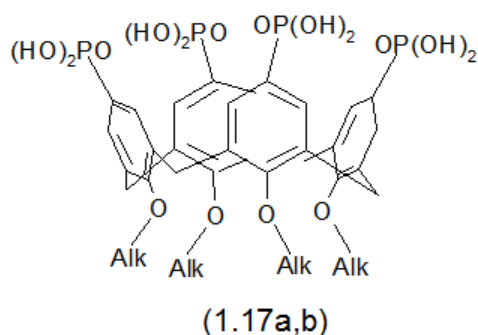
Рис. 1.4. Молекулярна модель комплексу каліксарен тетрафосфту (1.14b) з катіоном літію

Калікс[4]аренфосфіноксиди (1.15) і (1.16) утворюють комплекси складу 1:1 з іонами лужних металів і демонструють іонофорні властивості, які посилюються в ряду $\text{Na}^+ = \text{Li}^+ > \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+$ для (1.16) і $\text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Li}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Na}^+$ для (1.15) [31, 32].

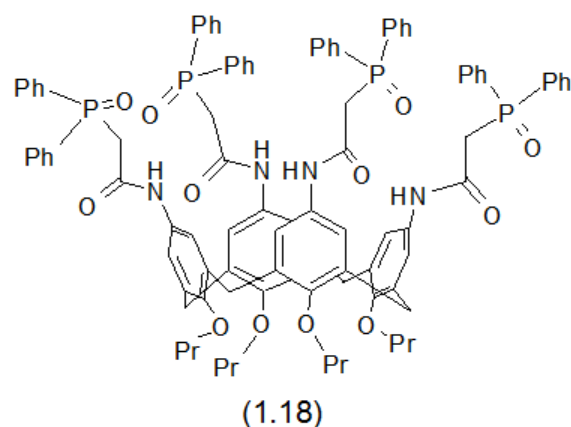
Каліксарени утворюють ліпідоподібні наночастинки, які розглядаються як альтернатива ліпосомам, полімерним наносферам або нанокапсулам, що застосовуються як транспортувальні системи лікарських засобів у фармацевтичній промисловості. Амфіфільні калікс[4]аренфосфонові кислоти (1.17) утворюють стійкі моношари Ленгмюра-Блоджет на межі розділу «повітря-вода» і взаємодіють з іонами Na^+ , Mg^{2+} і Ca^{2+} з утворенням наночастинок діаметром 150–1200 нм [33]. Розмір таких агрегатів є більший за розмір ліпосом і наночастинок амфіфільних каліксрезорцинаренів і циклодекстринів.

Окрім біометалів фосфоровмісні каліксарени селективно зв'язують токсичні радіонукліди [34, 35, 36, 37, 38, 39], і можуть знайти застосування для їх виведення з організму. Каліксарен (1.18), що

містить на верхньому вінці чотири карбамоїлфосфіноксидні (КМФО) групи, зв'язує Eu^{3+} , Th^{4+} , Np^{5+} , Pu^{4+} та Am^{3+} у водних розчинах [40, 41]. Його комплексоутворююча здатність значно вища за класичний КМФО ($\text{iBu}_2\text{NC}(\text{O})\text{CH}_2\text{P}(\text{O})(\text{Oct})\text{Ph}$) через кооперативність дії карбамоїлфосфіноксидних груп, оптимально розташованих на нанорозмірній макроциклічній платформі каліксарену.

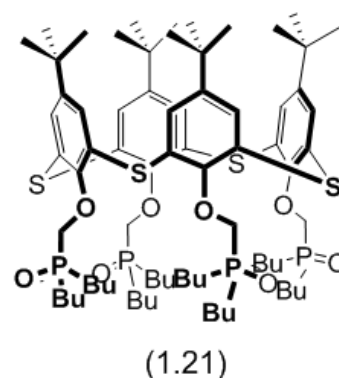
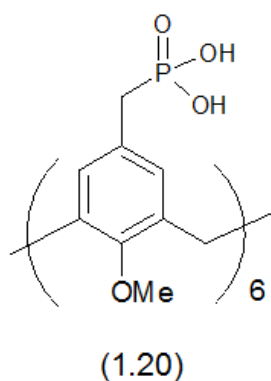
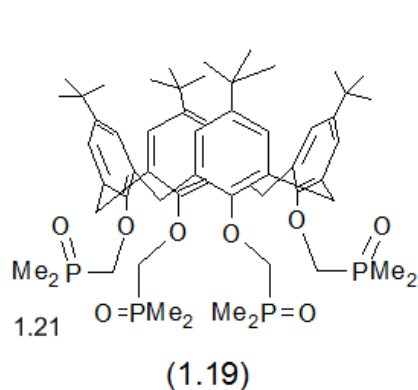


a: $\text{Alk}=\text{C}_{10}\text{H}_{21}$
b: $\text{Alk}=\text{C}_{12}\text{H}_{25}$



Каліксарентетрафосфіноксид (1.19) утворює комплекси складу 1:1 та 1:2 з іонами La^{3+} , Eu^{3+} і Tb^{3+} . Константи зв'язування комплексів в розчинах ацетонітрилу сягають значень $\log \beta_1 = 11,4 \pm 1,5$ і $\log \beta_2 = 19,6 \pm 1,8$ [42].

Калікс[6]арен (1.20), що містить шість фосфонових груп, зв'язаних з ароматичним кільцем метиленовими спейсерами, виявив високу афінність до ураніл-катіону [43]. Константа зв'язування комплексу складу 1:1 у воді становить $10^{17.5} \text{ M}^{-1}$.



Тіакаліксаренфосфіноксид (1.21) є також ефективним та селективним комплексоутворювачем радіоактивних ізотопів Європію, Америцію та Технецію. При цьому атоми двохвалентної сірки, що входять до складу макроциклічного кістяка молекули можуть додатково стабілізувати комплекси з радіонуклідами [44].

Хімічною привязкою каліксаренових комплексоутворювачів до поруватих матриць були створені сорбенти, які селективно зв'язують токсичні радіонукліди у водних середовищах [45, 46, 47, 48]. Наприклад тетрагідроксикаліксарен, модифікований по верхньому вінцю макроциклу карбамоїлфосфіноксидними групами, був хімічно прищеплений до поверхні силікагелю за допомогою тетрахлориду кремнію, яким попередньо оброблявся силікагель (рис. 1.5). Таким чином був отриманий сорбент (1.22) з питомою поверхнею 274 квадратних метрів на 1 грам. Він містив 125 мікромолей каліксарену на 1 грам матеріалу.

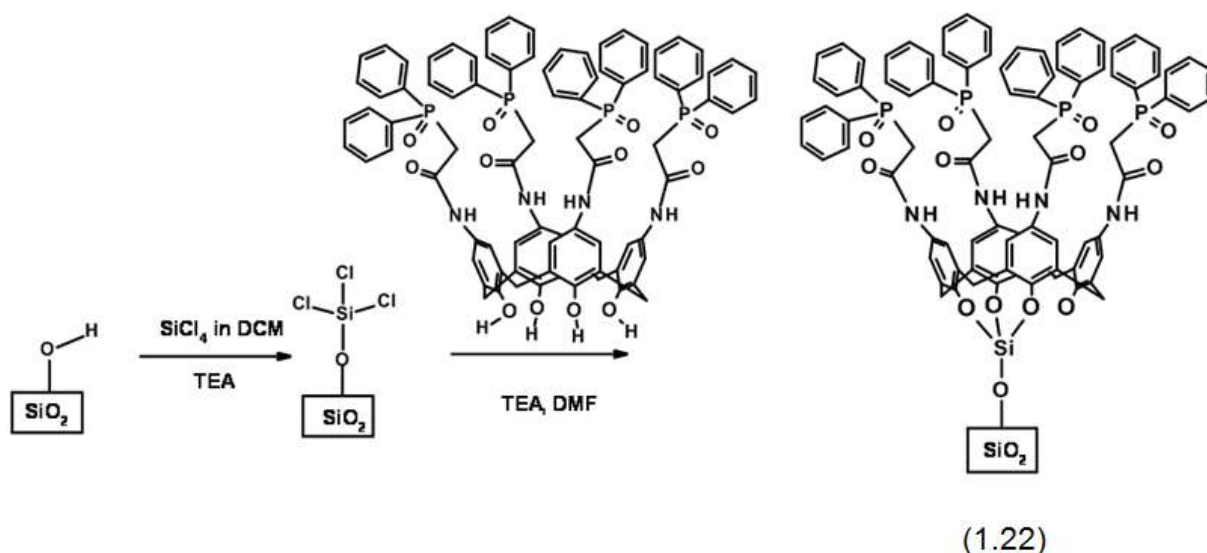


Рис. 1.5. Схема синтезу каліксареновмісного сорбента (1.22)

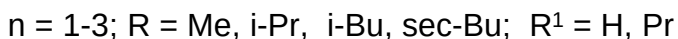
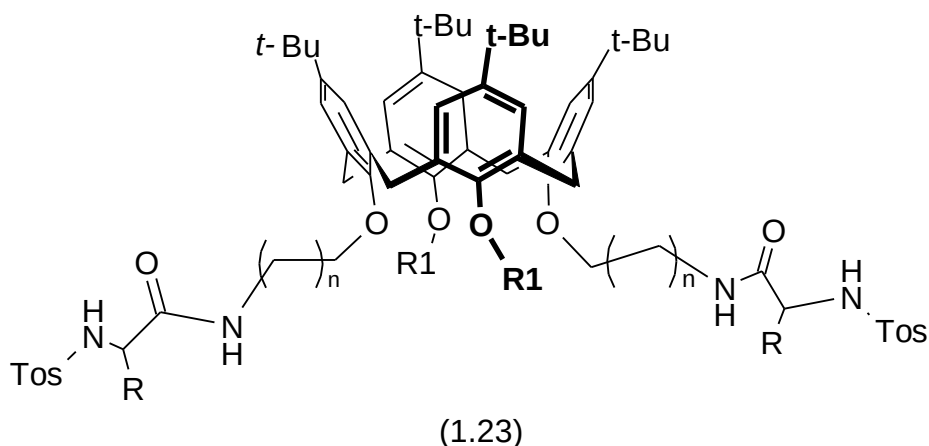
Отриманий сорбент проявив селективність до європію порівняно з америцієм. У випадку європію співвідношення катіонів, які сорбувались, до катіонів, що залишились в розчині, складало 170. В той же час таке співвідношення для америцію було лише 7.5. Селективність європій:америцій, вирахована як співвідношення зазначених параметрів, складало 22 одиниці. Це досить нетривіальний результат, оскільки самі по собі карбомілфосфіноксиди, та каліксарени, модифіковані карбомілфосфіноксидами, проявлять незначну америцієву селективність. Отриманий каліксареновмісний поруватий матеріал може бути використаний як гемосорбент для видалення токсичних радіоізотопів з організму.

1.3. КОМПЛЕКСИ КАЛІКСАРЕНІВ З АНІОНАМИ

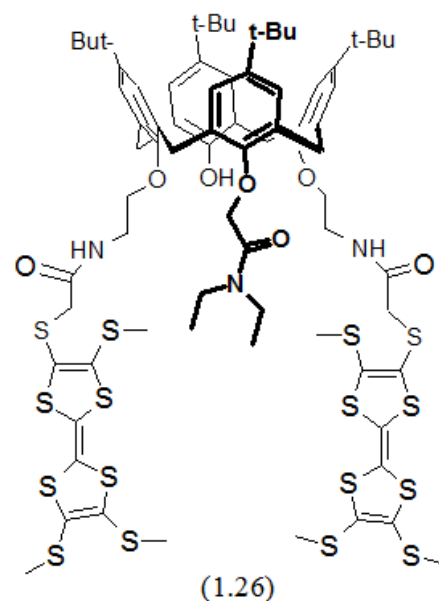
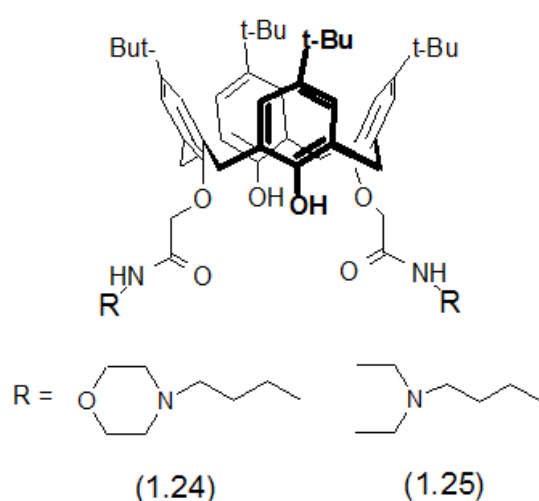
Вивчення взаємодії «аніон-рецептор» є актуальною проблемою сучасної науки [49, 50] оскільки аніони відіграють важливу роль в біохімічних процесах. Відомо, що за допомогою поліаніону ДНК передається генетична інформація. Координація карбоксипептидази А

до С-термінальної карбоксильної групи поліпептидів обумовлює їх гідроліз [51]. Амідні протони пептидного зв'язку формують поверхню аніонних каналів в біологічних мембранах [52].

Первинні і вторинні амідні каліксаренкарбонових кислот здатні зв'язувати не тільки катіони за допомогою атомів кисню С=О-груп, а й аніони, за рахунок утворення водневого зв'язку з достатньо кислими атомами водню N-H груп [53]. Так, каліксарени (1.23) з пептидними фрагментами на нижньому вінці виявляють спорідненість до *N*-тозил-*L*-аланінат-аніону і неорганічних іонів. Константа зв'язування комплексів з *N*-тозил-*L*-аланінат-аніоном у розчині дейтерохлороформу сягає 6924 M^{-1} [54], і є вищою за константи зв'язування комплексів з неорганічними іонами.

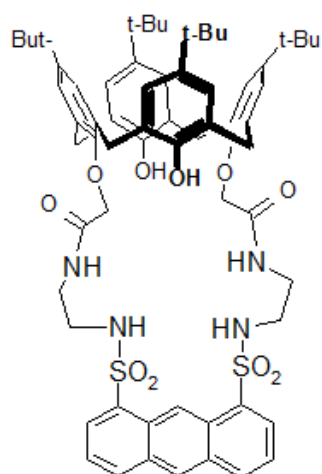


Каліксаренаміди (1.24, 1.25) є ефективними екстрагентами токсичних аніонів $\text{HCr}_2\text{O}_7^-/\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ з водної фази в CH_2Cl_2 [55]. Каліксаренамід (1.26), що містить дві тетратіафульваленові групи, зв'язує аніони H_2PO_4^- , $\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}_2^-$ і CH_3CO_2^- , що було показано методами ^1H ЯМР титруванням та циклічної вольтамперометрії [56, 57].

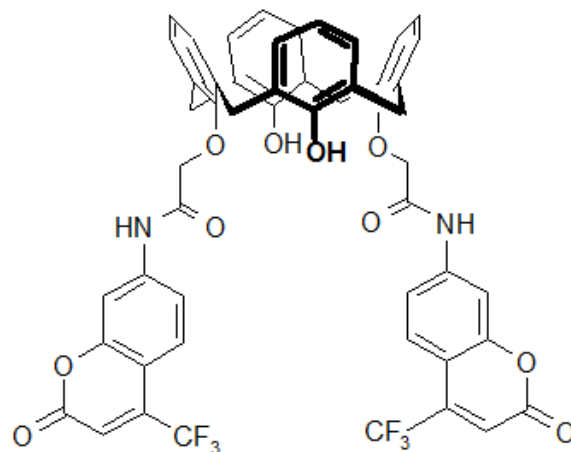


Аміди каліксаренкарбонових кислот, функціоналізовані флуорофорними або хромофорними групами, здатні селективно розпізнавати і зв'язувати аніони та змінювати при цьому своє забарвлення при утворенні комплексів. Вони є перспективними сполуками для створення аніонних хемосенсорів [58, 59].

Флуоресцентний амід (1.27) є селективним сенсором дигідрофосфат-аніону [60]. В емісійному спектрі сполуки (1.27) спостерігається смуга при 432 нм, яка відповідає електронним переходам у вільному антраценовому фрагменті. При додаванні 5 екв. H_2PO_4^- спостерігається збільшення інтенсивності флуоресценції на 134 % із блакитним зміщенням смуги емісії на 5 нм. В аналогічних умовах у присутності 5 екв. AcO^- або Cl^- інтенсивність флуоресценції зростає на 11 % і 52 %, відповідно. Введення аніонів F^- і CN^- збільшує інтенсивність флуоресценції на 34 % і 4,4 %. В присутності аніонів Br^- , I^- , HSO_4^- і NO_3^- , помітних змін у спектрі не спостерігається.



(1.27)



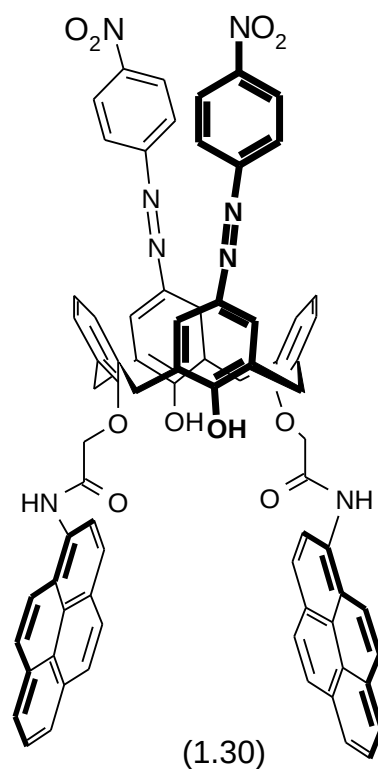
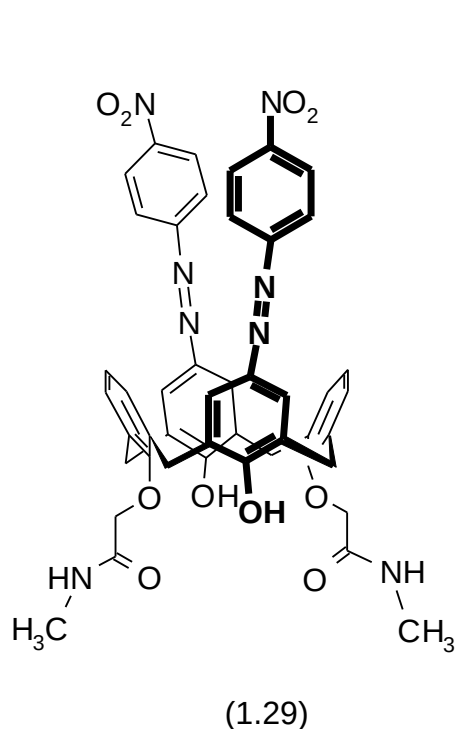
(1.28)

Методом ЯМР титрування і молярних відношень (метод Жоба) [61] було визначено склад і константи зв'язування комплексів каліксарену (1.27) з H_2PO_4^- ($5,48 \cdot 10^9 \text{ M}^{-2}$), AcO^- ($1,26 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1.5}$), Cl^- ($1,79 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$), CN^- ($9,68 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$). Ці дані свідчать про високу спорідненість каліксарену (1.27) до дигідрофосфат-аніону.

Каліксарендіамід (1.28) з двома залишками кумарину є селективним сенсором аніону F^- в присутності аніонів Cl^- , Br^- , I^- , HSO_4^- , CH_3CO_2^- і H_2PO_4^- [62]. Так, додавання F^- до розчину каліксарену (1.28) в ацетонітрилі приводить до зменшення інтенсивності смуги поглинання при 335 нм (що відповідає вільному ліганду) і виникнення двох смуг при 349 і 408 нм в комплексах. Титрування каліксарену (1.28) аніоном F^- при збудженні хвилями з довжиною 335 нм зумовлює зменшення інтенсивності емісійної смуги при 420 нм і викликає червоний зсув до 508 нм. Це можна пояснити виникненням водневого зв'язку між N-H-групами і аніоном. Методом флуоресцентного титрування було встановлено константу зв'язування комплексу каліксарену (1.28) з F^- ($1,08 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$).

Каліксарендіамід (1.29) з двома азофенольними хромофорами у складі макроциклу є колориметрично чутливим до аніонів F^- , AcO^- і H_2PO_4^- в присутності Cl^- , Br^- , I^- , HSO_4^- , CN^- і NO_3^- . Додавання аніонів F^- ,

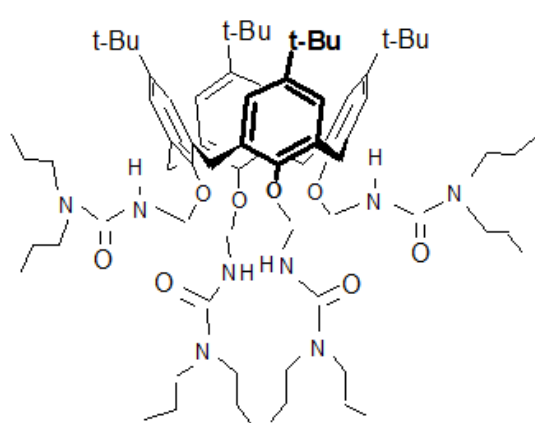
AcO^- і H_2PO_4^- до розчину каліксарену (1.29) в CH_3CN приводить до значного червоного зсуву смуги поглинання на 219 нм і зміни кольору на фіолетово-блакитний для F^- і AcO^- або світло-фіолетово-блакитний для H_2PO_4^- . Отже, каліксарен (1.29) дозволяє визначати аніони F^- , AcO^- і H_2PO_4^- неозброєним оком. Проте суттєвої селективності до одного із цих трьох аніонів рецептор (1.29) не виявляє [63].



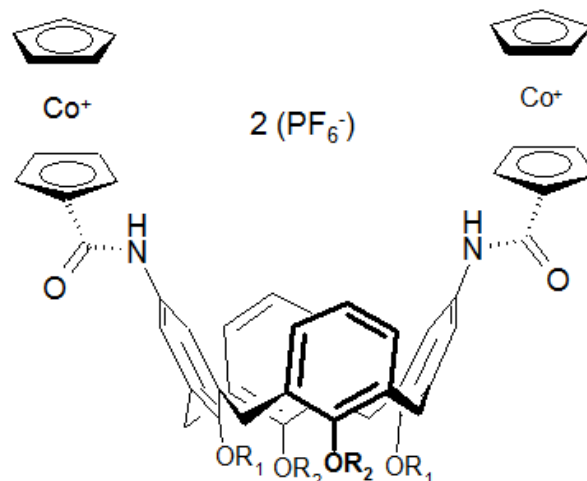
Калікс[4]аренамід (1.30), що містить, крім двох (4-нітрофеніл)азогруп, флуорофорні піренові угруповання, показав здатність до розпізнавання фторид-аніону. За допомогою УФ і флуоресцентної спектроскопії було досліджено зміни в спектрах при додаванні F^- , Cl^- , Br^- , I^- , CH_3CO_2^- , HSO_4^- і H_2PO_4^- до розчинів каліксарену (1.30) в ацетонітрилі. При додаванні F^- до каліксарену (1.30) в УФ спектрах спостерігається червоний зсув смуги поглинання на 54 нм. Червоний зсув смуги поглинання при комплексоутворенні з F^- можна пояснити фотоіндукованим переносом заряду.

Аніонрецепторні властивості каліксарену (1.31), що містить чотири карбамідні фрагменти, приєднані до нижнього вінця

макроциклу метиленовими спейсерами, були вивчені методом ЯМР титрування комплексів з тетрабутиламонійбромідом, йодидом і триметилбензиламонійхлоридом [64]. Більша спорідненість спостерігається до хлорид- і бромід-аніонів ($K_A = 230 (\pm 5) \text{ M}^{-1}$ і $221 (\pm 6) \text{ M}^{-1}$ відповідно), а йодид-аніон зв'язується слабкіше ($K_A = 23 (\pm 5) \text{ M}^{-1}$).



(1.31)



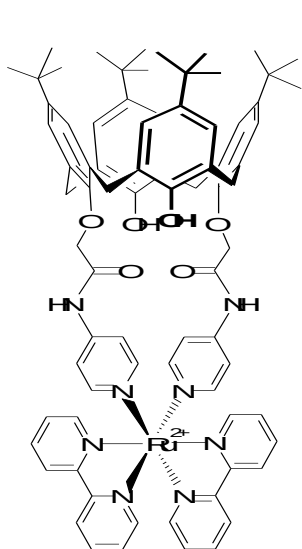
(1.32a-c)

- a: $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{H}$
b: $R_1 = \text{H}$, $R_2 = p\text{-CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}$
c: $R_1 = p\text{-CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2$, $R_2 = \text{H}$

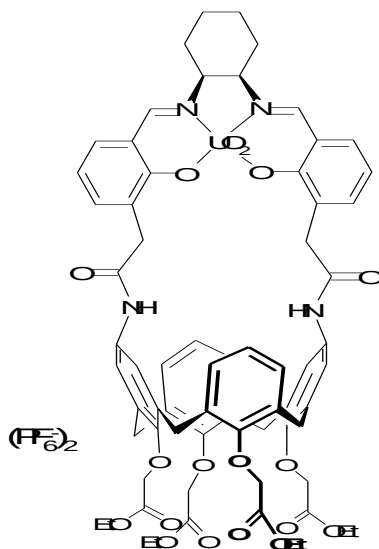
Відомі аніонні рецептори на основі каліксаренамідів (1.32), що містять сендвічеподібні кобальтоценієві катіони [65]. Рецептор (1.32) завдяки наявності амідних груп та кобальтоценієвого льюїсівського центру, зв'язує хлорид-, нітрат-, гідросульфат-аніони і аніони дикарбонових кислот [66]. Наприклад, з адипінат-аніоном константа зв'язування комплексу складу 1:1 становить 11510 M^{-1} (дейтероацетон). При цьому, аніон розміщується між двома кобальтоценієвими центрами.

Описані аніонні рецептори на основі комплексів каліксаренів з перехідними металами. Рутенійвмісний рецептор (1.33), побудований на основі каліксарену, функціоналізованого по нижньому вінцю двома піридиновими групами [67], утворює комплекси складу 1:1 з аніонами

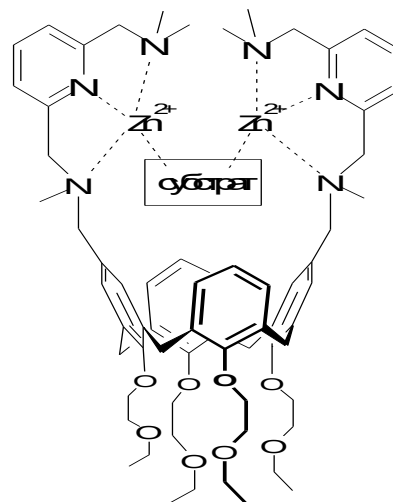
хлору і броду, а також дигідрофосфат-аніоном. При цьому, останній зв'язується міцніше, ніж аніони галогенів.



(1.33)



(1.34)



(1.35)

Рецептор (1.34), який містить функціональний комплекс уранілію, здатний з високою ефективністю зв'язувати аніони, як за рахунок їхнього зв'язування з люїсівським центром, так і за рахунок водневого зв'язку з N-H-протонами. Він проявляє селективність до дигідрофосфат-аніону в присутності хлорид-, гідросульфат- і перхлорат-аніонів в ДМСО [68].

Цинковмісний рецептор (1.35) є ефективним каталізатором трансестерифікації кислих естерів фосфорної кислоти [69]. Наприклад, в присутності каліксарену (1.35) трансестерифікація 2-гідроксипропіл-*л*-нітрофенілфосфату прискорюється у 23000 разів.

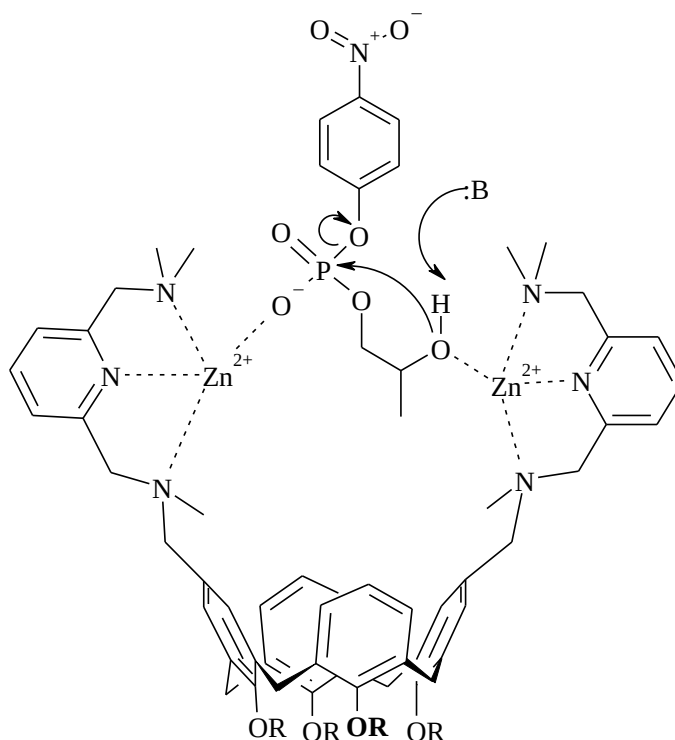
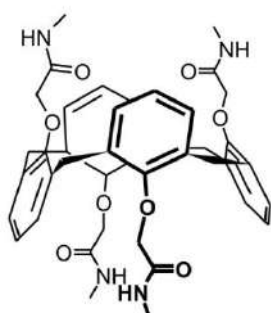


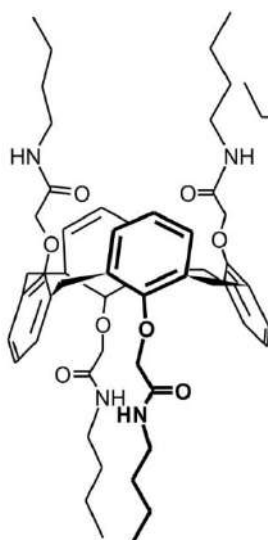
Рис. 1.6. Схема каталізу переестерифікації кислого естеру фосфорної кислоти цинковим комплексом (1.35)

Висока активність (1.35) пояснюється каталітичною дією катіону цинку, а також комплементарністю фосфоестерної групи субстрату розміру порожнини рецептора (рис. 1.6) [70].

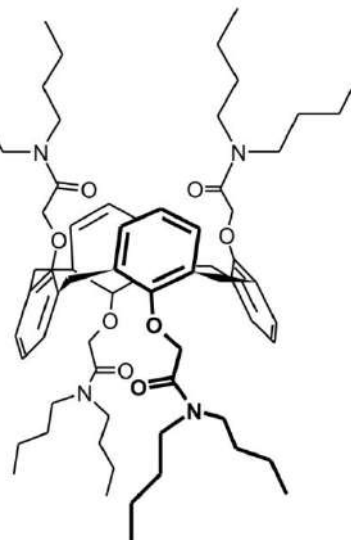
Здатність зв'язувати аніони може бути використана для створення штучних іонних транспортних систем [71]. З цією метою було отримано каліксарен тетракіс-N-метиламід (1.36), тетракіс-N-бутиламід (1.37) і тетракіс-N,N-дибутиламід (1.38) у конформації *1,3-альтернат*. Методом флуоресцентного аналізу було вивчено вплив каліксарен амідів на перенесення хлорид- і сульфат-іонів через клітинну мембрану.



(1.36)



(1.37)



(1.38)

Було встановлено, що селективність транспорту залежить у значній мірі від природи аніона. Так, перенесення хлоридів відбувається швидше, ніж сульфатів (табл. 1.1).

Таблиця 1.1.
Константи швидкості псевдопершого порядку (10^{-3} с^{-1}) процесу переносу іонів каліксарен тетраамідами (1.36) і (1.37)

Транспортер	NaCl	KCl	CsCl	Na ₂ SO ₄
(1.36)	6,8	6,4	7,7	1,1
(1.37)	19	12	5,4	9,1

Октаамід (1.38) не зв'язує аніони, але є ефективним рецептором катіонів. Він здатний транспортувати катіони натрію з більшою селективністю, ніж рецептори (1.36) і (1.37). Разом з цим, аміді немакроциклічної будови не здатні транспортувати іони через досліджувані ліпофільні мембрани.

Здатність до селективного зв'язування аніонів була виявлена у незаряджених калікс[4]піролів [72, 73, 74, 75, 76]. В роботі [77] здійснено порівняльну оцінку комплексоутворюючих властивостей серії похідних калікс[4]піролу по відношенню до галогенід-аніонів і бензоат-аніонів методом ЯМР титрування в ацетонітрилі і методом рентгеноструктурного аналізу.

У спільних дослідженнях з д.б.н. О.Я.Шатурським було знайдено, що каліксарен гідроксиметилфосфонова кислота (C-99) (рис. 1.7) стимулює транспорт аніонів хлору через бішарову ліпідну мембрану [78]. Механізм такого перенесення аніонів хлору ще не встановлено, але цей факт є цікавим, оскільки каліксарен C-99 є ефективним модулятором Na^+, K^+ -залежних АТФ-гідролазних катіонних pomp в гладеньких м'язах.

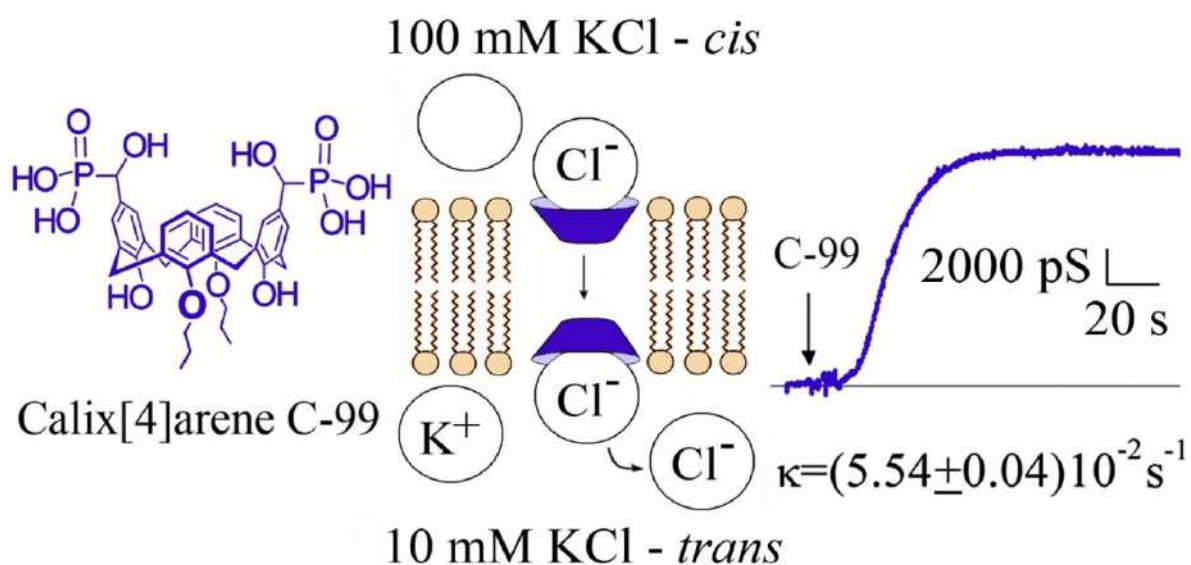


Рис. 1.7. Схематичне зображення транспорту аніонів хлору через бішарову ліпідну мембрану каліксареном (C-99)

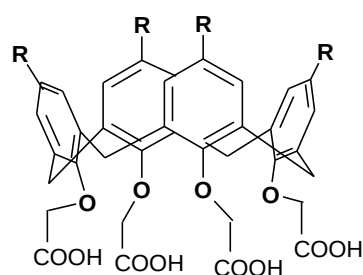
I.4. КОМПЛЕКСИ КАЛІКСАРЕНІВ З ОРГАНІЧНИМИ МОЛЕКУЛАМИ І БІОМОЛЕКУЛАМИ

Розробка і дослідження синтетичних рецепторів, здатних з високою селективністю розпізнавати і зв'язувати в комплекси органічні молекули та біомолекули в водних середовищах, де відбувається технологічні процеси, та більшість біохімічних процесів, є актуальною проблемою хімії і біології [79]. Введення на верхній або нижній вінець каліксаренового макроциклу позитивно заряджених, негативно заряджених або нейтральних полярних угруповань дозволяє отримувати синтетичні рецептори, здатні утворювати супрамолекулярні комплекси з органічними молекулами, в тому числі синтетичними біоактивними сполуками і біомолекулами у водних середовищах [80-94].

1.4.1. Комплекси з органічними молекулами

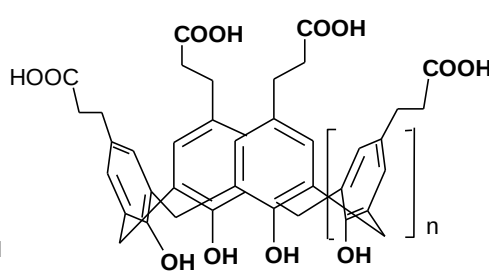
Дослідження комплексоутворення ацетонітрилу, кетонів (ацетон і бутанон) і спиртів (етанол і пропанол) з розчинними у воді калікс[4]арентетраоцтовими кислотами (1.39) та калікс[*n*]аренсульфоокислотами (1.41) показало, що каліксарени (1.41) здатні утворювати комплекси з усіма цими „Гостями” ($K_a = 16-64 \text{ M}^{-1}$), причому (1.41a) більш селективно зв'язує кетони, а (1.41h) спирти. Гідрофобні та зарядові взаємодії відіграють роль у зв'язуванні кетонів та спиртів каліксаренами (1.41). Каліксарентетраоцтова кислота (1.39b), утворює комплекс з ацетонітрилом, який стабілізується за рахунок CN-π-взаємодій. Цей комплекс є більш стабільний, ніж комплекси ацетонітрилу з каліксаренсульфоокислотами (1.41a) і (1.41h), в яких може відбуватися відштовхування між CN диполем і сульфонатними групами. Маленька молекула метанолу не зв'язується

каліксаренами (1.41a) і (1.41h) [95]. Комплексоутворення молекул „Гостей” аліфатичної природи відбувається внаслідок включення алкільного фрагменту в ліпофільну порожнину каліксарену. Включення супроводжується сильнопольним зсувом (до 2 м.ч.) сигналів метильних протонів у спектрах ПМР. У разі алкілпохідних бензену в порожнину може включатись ароматичний або аліфатичний фрагмент „гостя” [96, 97].



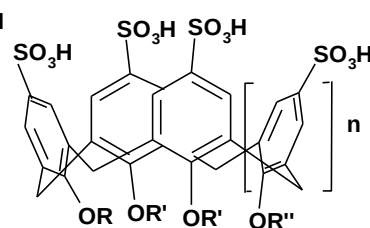
(1.39a-b)

- a: R = t-Bu
b: R = H



(1.40a-e)

- a: n = 1
b: n = 2
c: n = 3
d: n = 4
e: n = 5



(1.41a-s)

- a: R = R' = R'' = H, n = 1
b: R = R' = R'' = H, n = 2
c: R = R' = R'' = H, n = 3
d: R = R' = R'' = H, n = 5
e: R = R' = R'' = Me, n = 1
f: R = R' = R'' = Me, n = 3
g: R = R' = R'' = CH₂CH₂OEt, n = 1
h: R = R' = R'' = CH₂COOH, n = 1
i: R = R' = R'' = CH₂COOH, n = 3
j: R = R'' = H, R' = CH₂CH₂OEt, n = 1
k: R = R'' = H, R' = CH₂COOH, n = 1
l: R = CH₂COOH, R' = R'' = H, n = 1
m: R = CH₂COOH, R' = R'' = H, n = 2
n: R = CH₂COOH, R' = R'' = H, n = 3
o: R = CH₂CH₂NH₂, R' = R'' = H, n = 1
p: R = CH₂CH₂NH₂, R' = R'' = H, n = 2
q: R = CH₂CH₂NH₂, R' = R'' = H, n = 3
r: R = CH₂CH₂NH₂, R' = R'' = H, n = 3
s: R = CH₂CH₂NH₂, R' = R'' = H, n = 5

Четвертинна сіль триметиланіліну (ТМА) включається в порожнину сульфокалікс[4]арену (1.41a) у водному середовищі. За нейтральної реакції (pH = 7) у розчині існують два типи комплексів з орієнтацією ароматичного кільця або зарядженої метиламонійної групи в макроциклічну порожнину (рис. 1.8). Перший тип комплексу стабілізується катіон-π взаємодіями [98], а другий - гідрофобними взаємодіями.

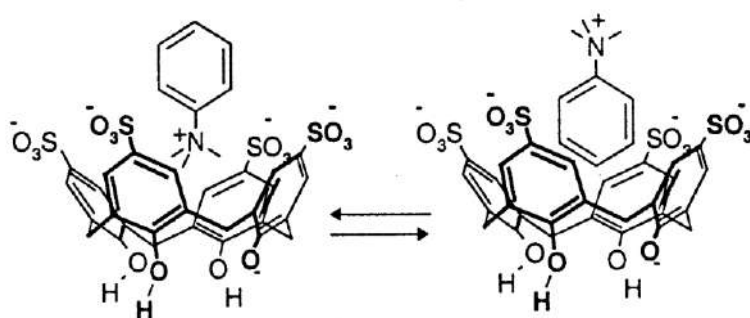


Рис. 1.8. Варіанти включення солі триметиланіліну в порожнину каліксарену (1.45a)

Каліксарендиоцтова кислота (1.41k), фіксована у конформації *конус* водневими зв'язками дистальних фенольних гідроксилів з молекулою води, включає в молекулярну порожнину ароматичний фрагмент четвертинної солі триметиланіліну (рис. 1.9) [99]. Каліксарентетраоцтова кислота (1.39b) зв'язує триметиламонієві групи за участю CH_3 – π взаємодій. В той же час каліксарентетраоцтова кислота (1.41h) з полярними сульфогрупами на верхньому вінці розпізнає лише ароматичне кільце (рис. 1.5). Інклюзійний комплекс в цьому випадку стабілізується гідрофобними взаємодіями.

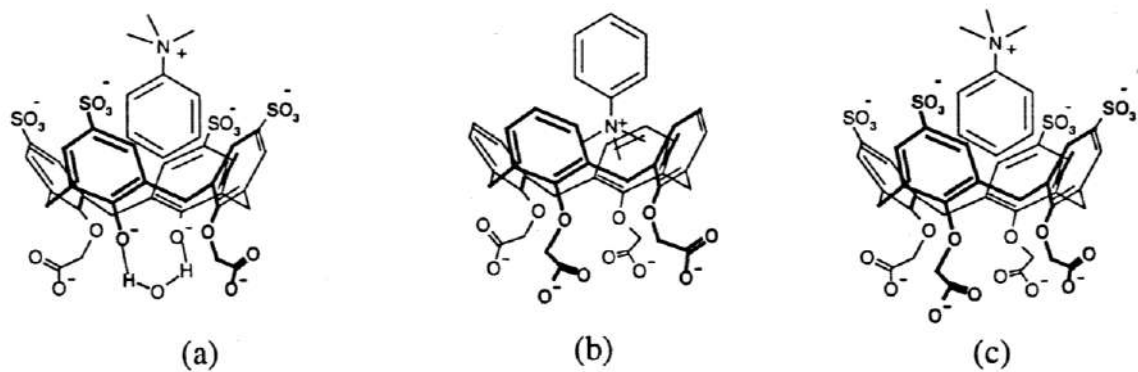


Рис. 1.9. Включення ТМА каліксаренами (1.45k) (a), (1.43b) (b), (1.45h) (c)

Порівняння калікс[4]арентетраоцтової кислоти (1.39b) і калікс[4]арентетраоцтової кислоти (1.41h), функціоналізованої чотирма сульфогрупами на верхньому вінці макроциклу, дало змогу оцінити вплив негативних зарядів на комплексоутворення з амонієвими катіонами – бензилтриетиламонієм (BTMA) і *p*-нітробензилтриетиламонієм (BTMAN) за нейтрального значення pH [100]. Аналіз величин констант зв'язування свідчить про те, що на процес комплексоутворення позитивно впливають сульфогрупи, які спрацьовують як анкери для полярного фрагменту „гостя”.

Результати досліджень свідчать про важливість тонких конформаційних і просторових чинників для ефективного і селективного комплексоутворення. Симетричний і менш вибагливий до просторового розташування ТЕМА ефективно зв'язується з усіма досліджуваними каліксаренами, крім каліксарену (1.41g), в якого макроциклічна порожнина занадто вузька. ТМА селективно зв'язується з ароматичними фрагментами всіх каліксаренів, які мають сульфогрупи на широкому вінці і знаходяться в конформації *конус*.

Термодинамічні значення ΔH° і ΔS° комплексів (1.41h)*ТЕМА і (1.39b) *ТЕМА вказують, що комплексоутворення є ентальпійно керованим процесом і його рушійною силою є катіон-π-взаємодія. В свою чергу, ці дані свідчать, що більш високі значення K_a для комплексу (1.41h)*ТЕМА порівняно зі сполукою (1.39b)*ТЕМА зумовлені ентропійним фактором, як результат більшої десольватації при взаємодії позитивних зарядів ТЕМА з негативними зарядами сульфогруп сполуки (1.39h) [101].

Включення четвертинних амонійних солей у неполярні порожнини каліксаренів вивчалось також у твердому стані. Дані рентгеноструктурного аналізу комплексу (1.41a) з сіллю тетраметиламонію складу 1:5 свідчать, що один тетраметиламонієвий катіон знаходиться всередині гідрофобної порожнини, інші чотири катіони, разом з молекулами води розташовані між пластами каліксаренів [102].

Методом електронного парамагнітного резонансу були визначені константи стійкості і параметри активації процесу комплексоутворення «Гість-Господар» вільного радикалу бензил-*трет*-бутил-нітрооксиду з каліксарен сульфокислотою (1.41a). Бензольний залишок молекули «Гостя» включаються в порожнину каліксарену, в той час як NO-група орієнтована назовні [103].

В роботі [104] по вивченню комплексоутворення ароматичних вуглеводнів з калікс[*n*]аренпропіоновими кислотами (1.40) у воді встановлена тісна кореляція між константами зв'язування і структурою „Господаря” і „Гостя”. Встановлено, що розмір молекулярної порожнини калікс[4]арентетрапропіонової кислоти (1.40a) занадто малий, щоб інкапсулювати об'ємні нафталін або дурен. В той же час більші за розмірами калікс[5]аренпентапропіонова кислота (1.40b) або калікс[6]аренгексапропіонова кислота (1.40c), добре зв'язують нафталін, антрацен і фенантрен. Калікс[7]аренгептапропіонова

кислота (1.40d) і калікс[8]ареноктапропіонова кислота (1.40e) утворюють інклюзійні комплекси з піреном, константи зв'язування яких знаходяться в межах $10^2 - 1,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ [105].

1.4.2. Комплекси з біомолекулами. Хіральне розпізнавання

В роботі [106] досліджена молекулярна будова комплексу каліксаренсульфо кислоти (1.41a) з нейротрансмітером холіном. В твердому стані холін включається в порожнину рецептора (1.41a) зарядженою амонійною групою, тоді як гідроксил знаходиться між двома сульфогрупами. Численні катіон-π взаємодії, характерні для біологічних систем, спостерігались у твердому стані між четвертинними амонієвими катіонами і ароматичними ядрами калікс[η]аренсульфо кислот (1.41), що мали різний розмір і характер заміщення нижнього вінця [107, 108, 109].

Калікс[4]арен біс-фосфонат (1.42) міцно зв'язує похідні урацилу та аденіну – біологічно важливі молекули, що входять до складу нуклеотидів та нуклеїнових кислот. Значення констат стабільності інклюзійних комплексів (рис 1.10), визначених у водних середовищах методом ВЕРХ, знаходяться в широких межах від 5000 M^{-1} (аміноурацил) до 45000 M^{-1} (нітроурацил) і залежать від природи замісників у гетероциклічному ядрі [110, 111].

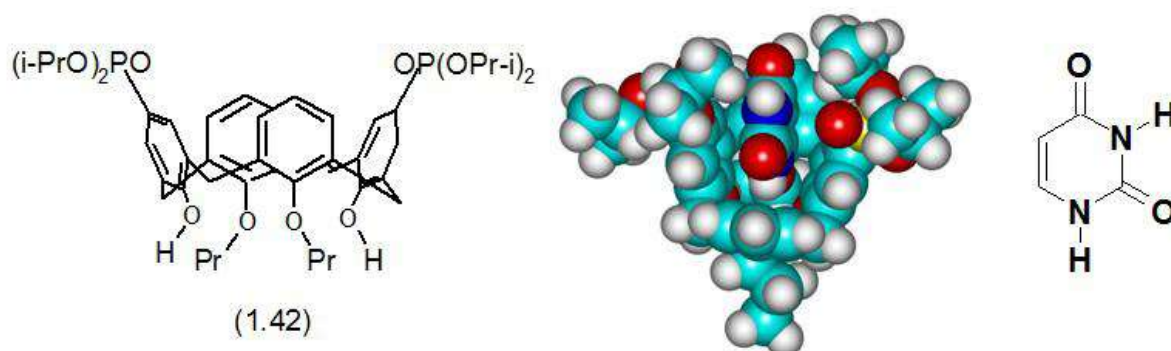


Рис. 1.10. Каліксаренбіс-фосфонат (1.42) та модель його інклюзійного комплексу з молекулою урацилу

Методами ядерного магнітного резонансу, калориметричного титрування і комп'ютерного моделювання вивчено комплексоутворення рацемічної форми та мезо форми калікс[4]арен біс- α -гідроксиметилфосфонової кислоти (1.43) з амінокислотами і дипептидами [112, 113, 114]. Показано, що стабільність утворених комплексів залежить як від природи амінокислот, так і від стереохімічної конфігурації хіральних атомів вуглецю каліксарен біс- α -гідроксиметилфосфонових кислот. Рацемічна форма є більш ефективним рецептором ніж мезо форма (рис. 1.11).

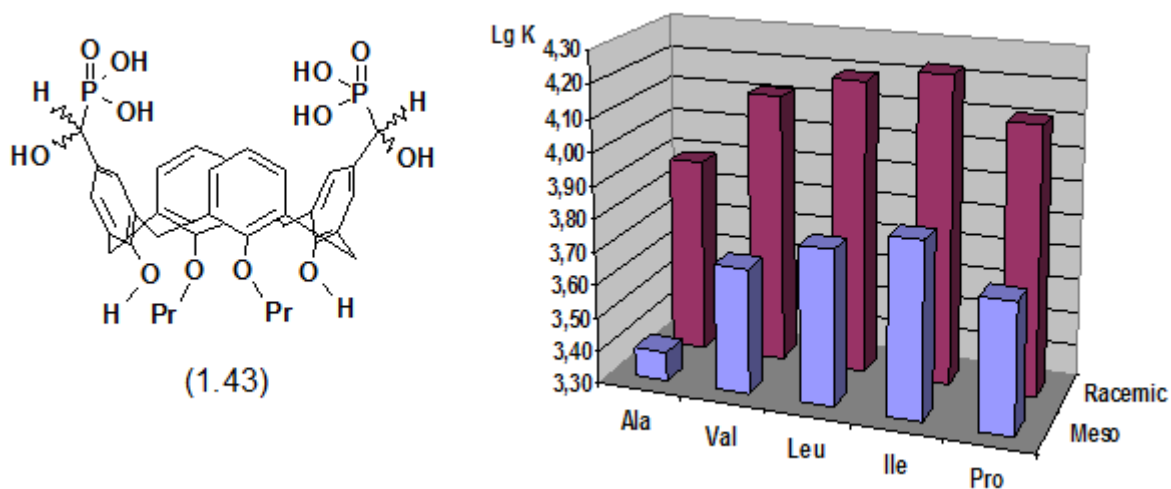
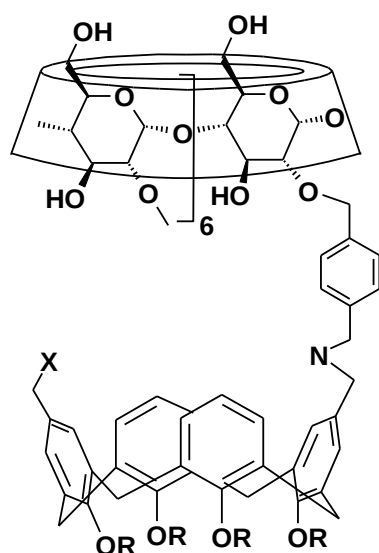


Рис. 1.11. Константи стабільності комплексів рацемічної форми та мезо форми калікс[4]арен біс- α -гідроксиметилфосфонової кислоти (1.43) з амінокислотами

Методом ЯМР титрування було досліджено взаємодію калікс[4]арентетраоцтових кислот (1.39) і калікс[n]аренсульфонатів (1.41) з рядом біологічно важливих амінокислот [115, 116]. Встановлено, що в більшості випадків утворюються стійкі комплекси складу 1:1. Найвищі значення констант зв'язування були отримані для комплексів (1.41l) з серином ($K_a = 3555 \text{ M}^{-1}$) і (1.41o) з аспаргіновою кислотою ($K_a = 5620 \text{ M}^{-1}$). Автори підкреслюють, що введення одного карбоксиметоксильного або аміноетоксильного радикалу на нижній вінець каліксаренсульфонатів (1.41) значно підвищує селективність розпізнавання амінокислот.

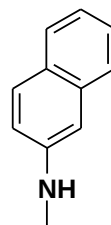
β -Циклодекстринокалікс[4]арени (1.44) використовувалися для дослідження зв'язування нейтральних біоактивних сполук у воді методом флюоресцентної спектроскопії. Сполука (1.44a) утворює комплекси зі стероїдами, терпенами та іншими природні речовини, в той час як (1.44b) не здатний зв'язувати жодну з цих сполук. Чутливість до стероїдів, є приблизно в 10 разів вища, ніж для терпенів. Це свідчить, що розмір порожнини циклодекстрину відіграє важливу роль у процесі комплексоутворення [117]. Молекулярне моделювання вказує, що у випадку (1.44b) спостерігається самовключення флуорофору в порожнину циклодекстрину завдяки сильним водневим зв'язкам між сульфамідною групою і вторинними гідроксильними групами.



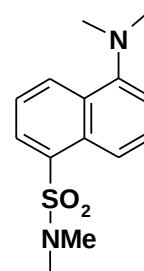
(1.44a-b)



X =

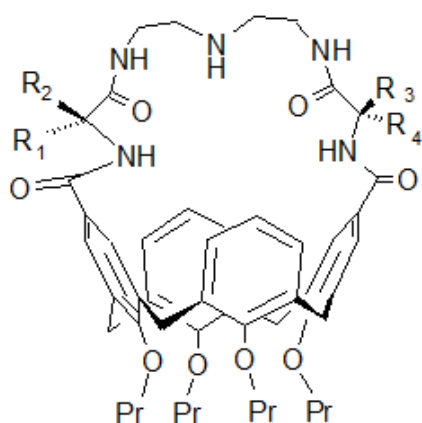


a



b

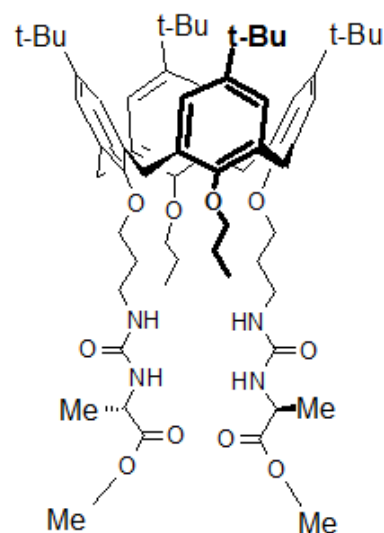
Циклопептидо-каліксарени (1.45) [118] виявляють спорідненість до аніонних форм карбонових кислот, на фоні хлорид- і нітрат-аніонів. Встановлено, що комплексоутворення відбувається з включенням «Гостя» в порожнину, утворену пептидним циклом і каліксареном. Найвища константа стабільності комплексу спостерігається для бензоат-аніону, що пояснюється додатковою π-π взаємодією між ароматичними кільцями субстрату і рецептора. Цікавою особливістю рецепторів (1.45) є здатність до хірального розпізнавання, проте D/L селективність є невисокою і становить 1,3 (в термінах константи зв'язування) у випадку фенілаланінат-іону.



(1.45)

a: $R_1 = R_3 = \text{H}$, $R_2 = R_4 = \text{CH}_3$;

b: $R_2 = R_4 = \text{H}$, $R_1 = R_3 = \text{CH}_3$

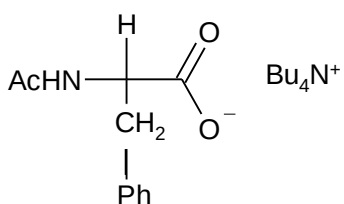
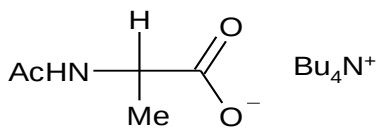


(1.46)

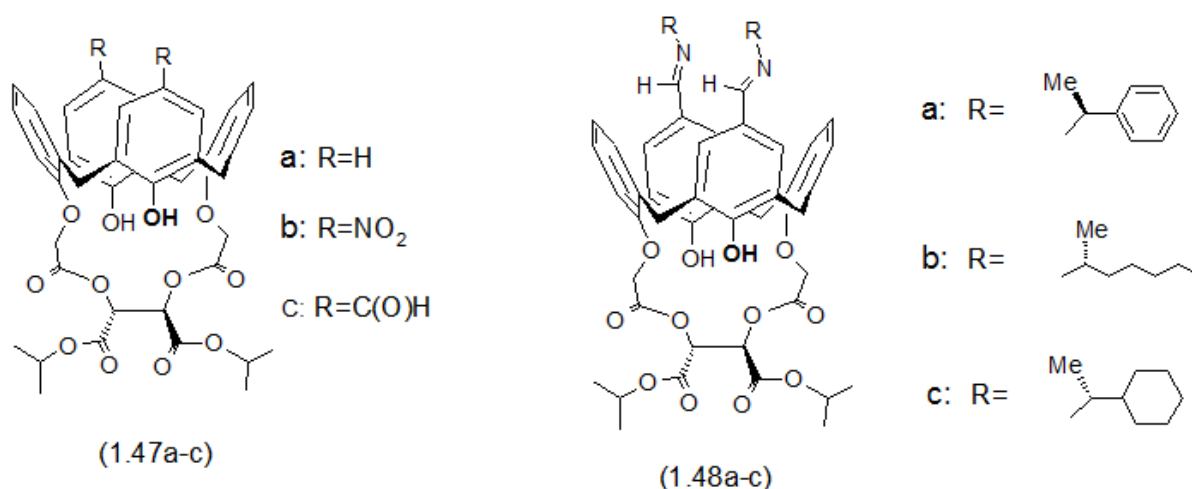
Карбамідокаліксарен (1.46), який містить на нижньому вінці макроциклу фрагменти L-аланіну, ефективно зв'язує N-ацетил-D-фенілаланінат аніон (табл. 1.2). При цьому, константа зв'язування з D-ізомером у 4 рази більша, ніж з L-формою [119]. Селективність обумовлена просторовими перешкодами, яких зазнає бічний ланцюг аніону амінокислоти при зв'язуванні з рецептором. При цьому, для меншого за розміром ацетил-D-аланінат-аніону така селективність не спостерігається.

Таблиця 1.2.

D,L-Дискримінація аніонних форм N-ацильованих амінокислот біс(L-аланілкарбамідо)каліксареном (1.45) (292 К, дейтероацетон)

Амінокислота		$K_{\text{ass}}, \text{M}^{-1}$	D/L селективність
	L	302	4,14
	D	1250	
	L	2460	0,96
	D	2400	

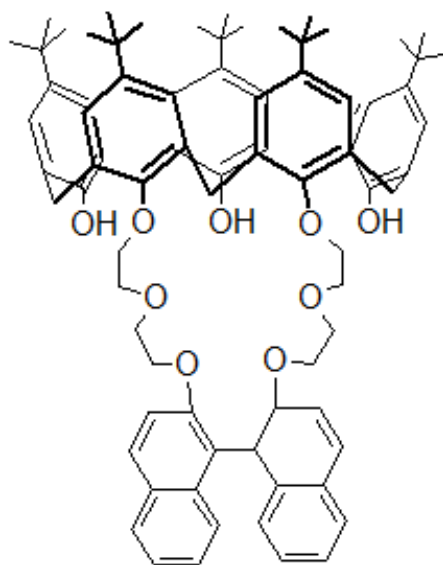
В роботах [120, 121] описані хіральні каліксарени (1.47, 1.48), які містять залишок винної кислоти на вузькому вінці та різні функціональні групи (нітро, альдегідо, Шифові основи) на широкому вінці макроциклу. Здатність отриманих сполук до хірального розпізнавання 1,2-пропандіолів та α -амінокислот була досліджена за допомогою ЯМР та УФ-спектроскопії.



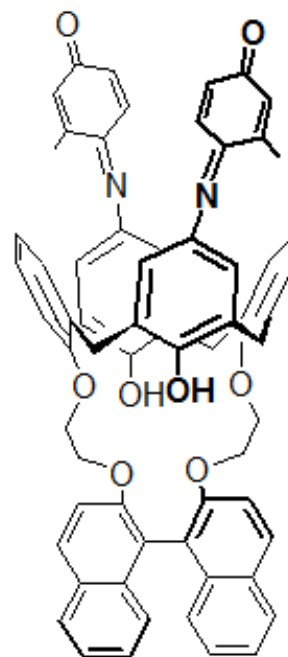
Каліксарен (1.47a) здатен розпізнавати енантиомери гідрохлориду метилового естеру серину, а каліксарен (1.48a) - ізомери 1,2-пропандіолу. Хіральні рецептори (1.48a) та (1.48b) здатні розпізнавати енантиомери гідрохлоридів метилових естерів фенілаланіну та аланіну (енантіоселективність K_D/K_L досягає = 4.36). Як було показано енантиоселективність залежить від хірального фрагменту, який входить до залишку Шиффової основи та від розміру замісників в похідних амінокислот. Стеричні перешкоди між катіоном амонію і фрагментом основи Шиффа біля хірального центру молекули "гостя" відіграють важливу роль в цьому процесі. В усіх розглянутих випадках ці перешкоди зведені до мінімуму для D-ізомерів. Виходячи з цього D-ізомери утворюються більш стабільні комплекси ніж L-ізомери.

Каліксарени (1.49) [122], що містять хіральну бінафтильну групу (R та S стереоізомери) на вузькому вінці макроциклу, утворюють стійкі комплекси складу 1:1 з Cu^{2+} , причому з іншими катіонами (Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}) комплекси є малостійкими, або взагалі не утворюються. Методом флуоресцентного титрування була вивчена здатність мідних комплексів до зв'язування D-(+)-ксилози, D-(-)-рибози, 2-деоксі-D-рибози, D-(-)-арабінози, D-(+)-глюкози а також δ -лактону D-(+)-глюконової кислоти. Високу селективність комплекси проявляють лише по відношенню до δ -лактону D-(+)-глюконової кислоти. Константи стійкості цих комплексів складу 1:1:1 становлять $4.45 \cdot 10^4$ моль⁻¹ для (R)-ізомеру, та $1.81 \cdot 10^4$ моль⁻¹ для (S)-ізомеру. Енантіоселективність K_R/K_S складає 2.4.

Каліксареновмісні енантіоселективні флуоресцентні рецептори як правило складаються з хірального фрагменту, прикріпленого до макроциклічної платформи, та органічного флуорофору, який має бути розміщений якомога ближче до хірального центру, та тих груп, які приймають участь в утворенні водневих зв'язків з аналітами. Використання каліксаренів з флуоресцентними мітками для енантіоселективного розпізнавання викликає значний інтерес при розробці сенсорів для хіральних молекул [123, 124].



(1.49)

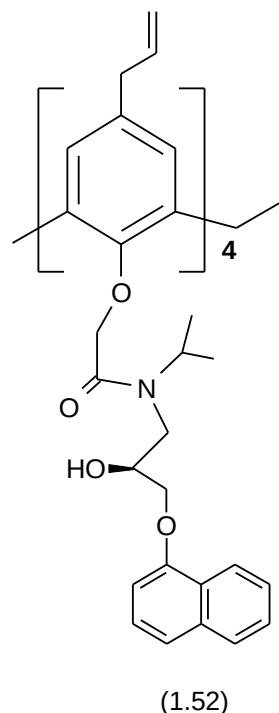
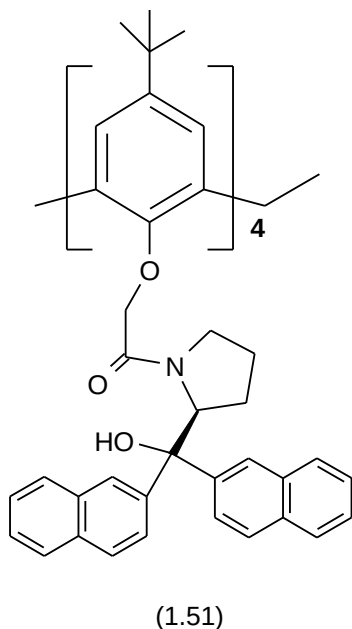


(1.50)

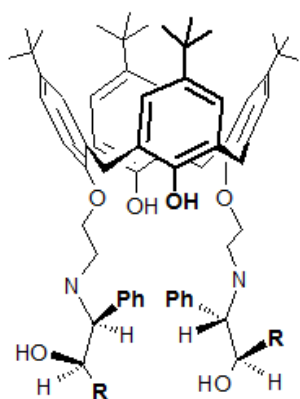
Хіральний бінафтилкаліксарен (1.50) з двома хромоформними групами [125] по різному реагує на енантиомери хіральних аналізів [126]. Етанольний розчин каліксарену (1.50) забарвлений в червоний колір з половою поглинання 515.5 нм. При додаванні (R)-фенілгліцинолу полоса поглинання зміщується до 650 нм і колір розчину змінюється на яскраво-синій. Крива титрування Бенезі-Хілдебранда при 25°C вказує на 1:1 стехіометрію комплексу з константою асоціації 66 ± 8.8 моль⁻¹. В присутності (S)-фенілгліцинолу розчин залишається червоним навіть при надлишку аналіту 10³ молей. Таким чином два енантиомери фенілгліцинолу можуть бути успішно детектовані навіть неозброєним оком.

Каліксарен (1.51) [127, 128, 129] з чотирма флуоресцентними (S)-ди-2-нафтилпроліноламідними групами на нижньому вінці макроциклу розпізнає енантиомери 1-фенілзтиламіну, фенілгліцинолу і норефедрину. Калікс[4]арен (1.52) [130], в якому асиметричний центр віддалений від флуоресцентної нафтильної групи двома атомами,

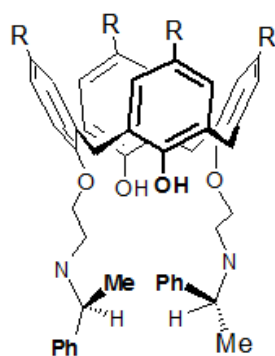
добре розпізнає енантимери фенілаланінолу. Відмічається, що комплекс цього каліксарену з катіоном K^+ теж здатен до розпізнавання енантимерів.



Каліксарени (1.53 – 1.55) з хіральними рецепторними групами на нижньому вінці проявили високу здатність до розпізнавання енантимерів мигдалевої, дибензоїлвинної, та 2-гідрокси-3-метилбутанової кислот. Слід відзначити особливо високу енантиоселективність каліксарену (1.55) по відношенню до (R)/(S) ізомерів мигдалевої кислоти (співвідношення констант стійкості комплексів $K_S/K_R = 102$).



(1.53)



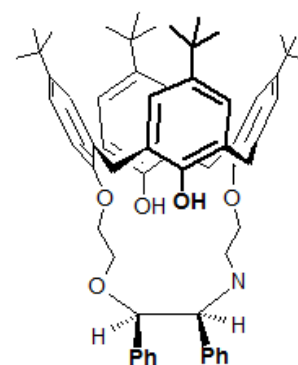
(1.54a-d)

a: $R = C(CH_3)_2(CH_2)_{13}CH_3$

b: $R = C(CH_3)_2(CH_2)_9CH_3$

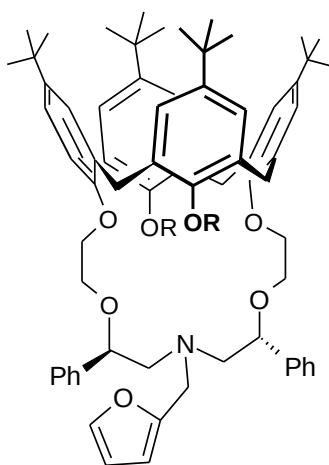
c: $R = C(CH_3)_2(CH_2)_5CH_3$

d: $R = C(CH_3)_2CH_3$



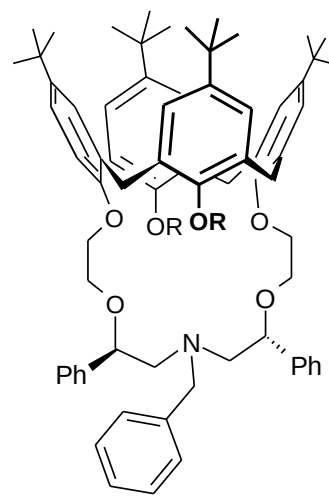
(1.55)

Рецептори (1.56a,b) [131] (1.57a,b) [132] з двома хіральними атомами вуглецю у складі аза-краун етерного фрагменту на нижньому вінці макроциклу зв'язують енантіомери хіральних карбонових кислот та етерів α -амінокислот (значення констант стабільності комплексів лежать в межах $1\text{-}15\text{ моль}^{-1}$). Сполука (1.56a) проявляє також енантіоселективність по відношенню до стереоізомерів метилового етеру фенілаланію ($K_R/K_S = 2.08$) та мигдальної кислоти ($K_R/K_S = 1.86$).



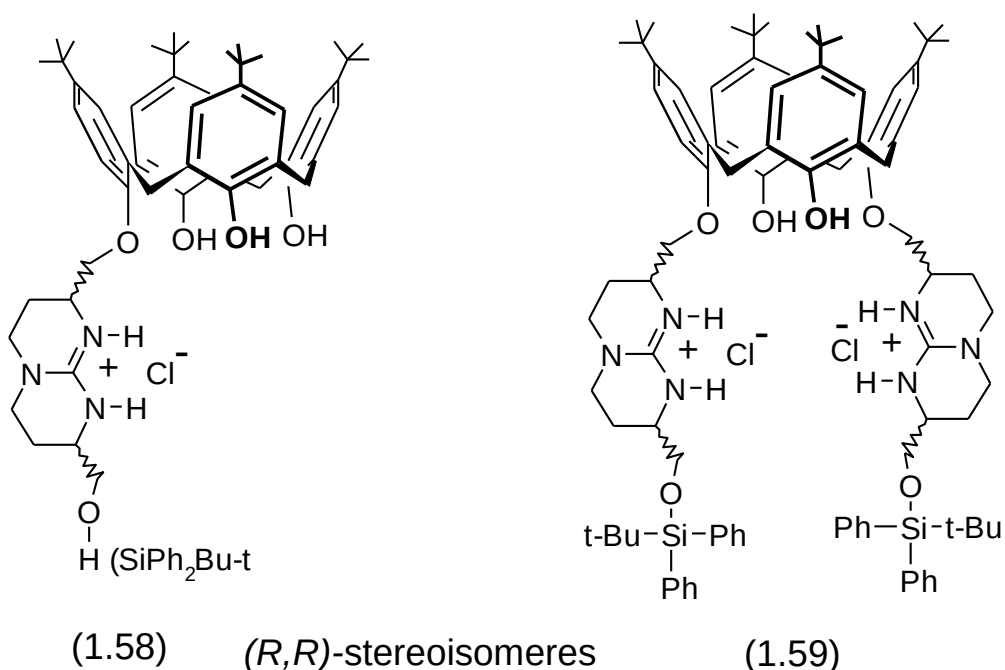
(1.56a,b)

$R = H$ (a), Me (b)

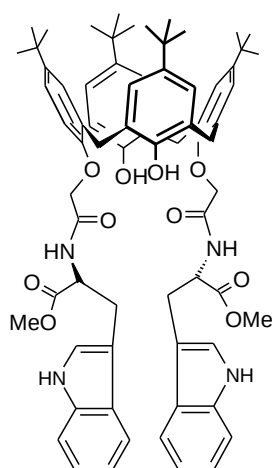


(1.57a,b)

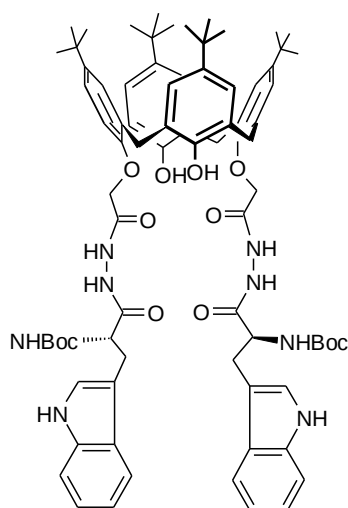
S,S-Діастереомери каліксаренів (1.58) та (1.59) [133] з одним та двома хіральними гуанідиновмісними фрагментами на нижньому вінці розділяють енантиомери фенілаланіну при їх екстракції з водного розчину (єе 76% та 90% відповідно). Ці каліксаени є амфіільними і утворюють на границі розділу фаз вода-повітря стабільні мономолекулярні шари, які здатні до енантиоселективного розпізнавання хіральних ароматичних амінокислот [134].



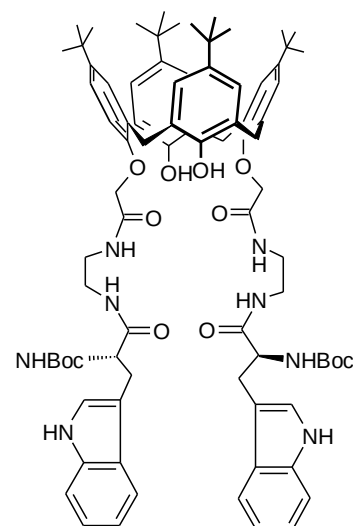
Каліксарни (1.60 – 1.62) [135] з флуоресцентними фрагментами *L*-триптофану розпізнають енантиомери аніонних форм аланіну, фенілаланіну, мигдалевої кислоти. Наприклад, константи стійкості комплексів (1.60a) з аніоном D-аланіну та (1.60b) з аніоном D-мигдалевої кислоти становлять 53.56 M^{-1} та $1.04 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ відповідно. В той же час комплексоутворення цих каліксаренів з *L*-формами аланіну та мигдалевої кислоти не відбувається.



(1.60)

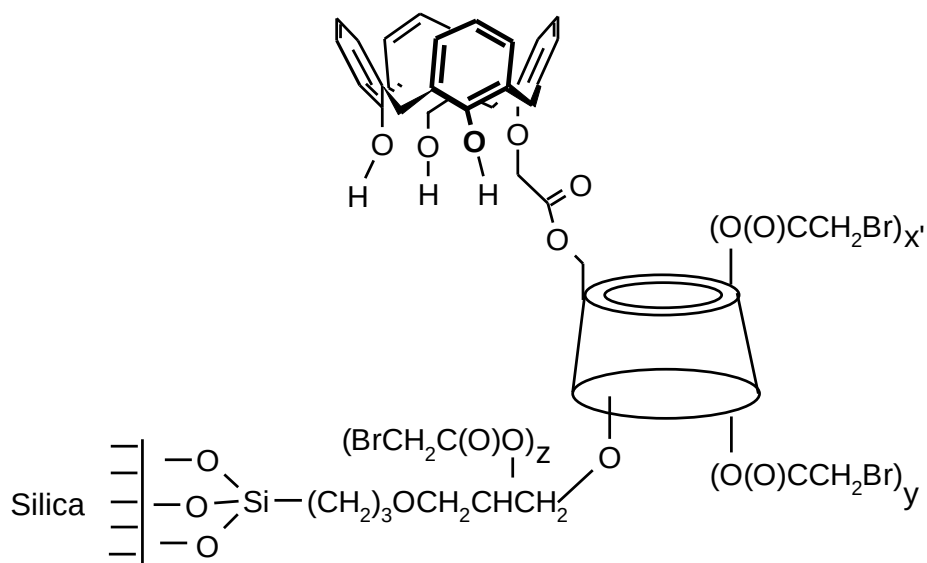


(1.61)



(1.62)

Каліксарени, модифіковані хіральними рецепторними групами, знайшли застосування при розробці стаціонарних хроматографічних фаз для енантіосепарації біологічно активних речовин. На основі каліксарен-циклодикстрин модифікованого силікагелю (1.63) [136] була виготовлена хіральна хроматографічна колонка для обернено-фазної рідинної хроматографії, яка розділяла енаціомери сполук різноманітних класів (в тому числі субстанції лікарських препаратів) у водних середовищах (таблиця 1.3).


$$(1.63) \quad x' + y + z = 2.4$$

Таблиця 1.3.

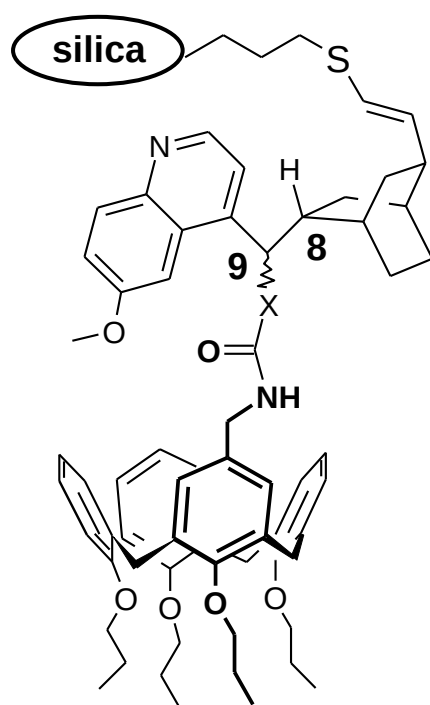
Характеристики каліксареновмісної хроматографічної фази (1.63)

Речовина-аналіт	Рухома фаза	Хроматографічні характеристики			
		t (хв)	K ₁	α	R _s
Аміноглутетимід	MeOH/H ₂ O (60:40, v/v)	6.59	0.88	2.03	1.40
Хлорохін	MeOH/H ₂ O (60:40, v/v)	9.67	1.72	2.22	1.30
Надолол	MeOH/H ₂ O (60:40, v/v)	5.06	0.44	1.50	0.92
1-(1-нафтил)етил-амін	MeOH/H ₂ O (60:40, v/v)	6.55	0.83	1.98	2.06
Фенілаланін	MeOH/H ₂ O (60:40, v/v)	5.03	0.40	2.13	1.04
Прометазин	MeOH/H ₂ O (60:40, v/v)	7.68	0.36	1.65	0.71
Метилловий етер мигдалевої к-ти	MeOH/H ₂ O (40:60 v/v)	3.83	0.28	3.29	2.14
Варфарин	MeOH/H ₂ O (40:60 v/v)	20.18	5.26	1.54	1.67
Безитловий етер мигдалевої к-ти	MeOH/H ₂ O (30:70 vv)	7.99	0.59	1.23	1.23
Кетопрофен	MeOH/H ₂ O (30:70 vv)	7.56	0.99	1.37	0.82
1-Феніл-2-пропанол	MeOH/H ₂ O (30:70 vv)	1.18	1.15	1.64	0.89
1-Феніл-1-пропанол	MeOH/H ₂ O (20:80 vv)	3.47	2.84	1.73	2.41
Метилбензиамін	CH ₃ CN/H ₂ O (80:20 vv)	3.02	0.85	1.26	0.91
Триптофан	CH ₃ CN/H ₂ O (80:20 vv)	4.69	0.97	1.53	1.91

t - час виходу першого енантіомеру; K₁ - коефіцієнт ємності колонки;

α - селективність розділення; R_s - степінь розділення.

Каліксарени, модифіковані по верхньому вінцю фрагментами алкалоїдів хінного дерева, а саме хініну, його ізомеру C9-епіхініну, 9-амінохініну та 9-аміноепіхініну, були використані при виготовленні хіральної стаціонарної фази (1.64) для рідинної хроматографії [137, 138]. Створена фаза використовувався для розділення амінокислот.



- a: (8S,9S), X=O
- b: (8S,9R), X=O
- c: (8S,9S), X=NH
- d: (8S,9R), X=NH

(1.64a-d)

Похідні (1.64b,d) проявляють селективність по відношенню до (S)-енантіомерів нециклічних амінокислот. В той же час сполуки (1.64a,c) можуть розділяти як лінійні, так і циклічні амінокислоти, причому вони краще зв'язують (R)-енантіомери.

РОЗДІЛ 2. КАЛІКСАРЕНИ В МЕДИКО-БІОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ

2.1. ПРОЯВИ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ КАЛІКСАРЕНІВ

На теперішній час описано багато результатів щодо дії каліксаренів на біохімічні процеси. Нижче наведені експериментальні дані щодо впливу зазначених макроциклічних сполук на перебіг біохімічних перетворень.

Така особливість каліксаренів, як здатність зв'язувати нейтральні молекули, катіони та аніони, відкриває широкі можливості для їх використання при вивченні біохімічних процесів та їх регуляції. Попереднє фіксування декількох біоафінних груп на поверхні молекулярної платформи каліксаренів використовується для створення вискоєфективних та селективних лігандів або рецепторів біомолекул, і, таким чином, ця технологія може бути застосована для створення нових біоактивних речовин. Завдяки властивості вбудовуватись в біомембрани, каліксарени здатні впливати на функціонування аніонних та катіонних pomp у клітинах. На їхніх молекулярних платформах можна розробляти специфічні інгібітори ензимів. Введення в структуру макроциклу протонодонорних груп, наприклад, амідних або карбамідних, дозволяє створювати ефективні аніонні рецептори. Якщо структуру каліксарену модифікувати хіральними замісниками, то можна регулювати енантіоселективність розпізнавання. Наприклад, пептидокаліксарени з фрагментами амінокислот *L*-ряду здатні до енантіоселективного зв'язування аніонів *D*-амінокислот [1, 2, 3, 4, 5].

Перш за все акцентуємо увагу на ефектах, пов'язаних з інгібуючою дією каліксаренів на ензиматичну активність, та на прояві їх властивостей, як рецепторних систем.

В останні роки значна увага дослідників зосереджена на використанні каліксаренів у якості інгібіторів АТР-гідролазних систем. Тут наведемо лише деякі приклади.

Було продемонстровано, що калікс[4]арен C-97 ефективно інгібує АТРазну активність субфрагмента-1 міозину міометрія і в той же час спричинює істотне збільшення величини гідродинамічного діаметра молекули субфрагмента-1, що опосередковано вказує на утворення міжмолекулярного комплексу між каліксареном та голівкою міозину [7]. Також показано, що тіакалікс[4]арентетрасульфонат відновлює до контрольного рівня АТРазну активність субфрагмента-1 міозину у присутності катіонів важких металів (Ni^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+}). Механізм відновлення АТРазної активності може бути пов'язаний з можливістю хелатувати важкі метали як у розчині, так і на рівні суто субфрагмента-1 та усувати їх з середовища інкубації [8].

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

Дуже сучасним напрямом у медичній хімії та фармакології є синтез нових біоактивних сполук на основі інформації про структуру біомішеней. Застосовуючи відносно не коштовний синтез можна отримувати фармакологічні препарати з високою ефективністю і селективністю дії. З цією метою використовується широкий спектр сполук у якості молекулярних платформ (пептиди, вуглеводи, циклодекстрини, а також каліксарени). У контексті зазначеного на теперішній час описано багато експериментальних пошуків, спрямованих на створення різних рецепторів для розпізнавання поверхні певних протеїнів.

Наприклад, розробка одного з таких рецепторів основана на приєднанні чотирьох сконструйованих пептидних петель на центральній каліксареновій платформі. За допомогою гелю фільтрації

та афінної хроматографії було показано міцне зв'язування одним з таких рецепторів цитохрому с [9]. Взаємодія імовірно відбувається біля гемової групи протеїну, що містить декілька заряджених лізинових залишків, подібно до його взаємодії з цитохром с оксидазою та цитохром с пероксидазою, адже показана їх конкуренція за сайти зв'язування та здатність каліксарену витіснити ключовий продукт апоптозу Араф-1 з відповідного комплексу з цитохромом с. Таке зв'язування з каліксареном аналогічно до цитохром с пероксидази порушує наближення відновлювальних агентів до гемової групи та на порядок зменшує швидкість реакції відновлення трьохвалентного заліза цитохрому с до двовалентного аскорбат-іоном. Виявлена взаємодія залежить від замісників на нижньому вінці каліксарену, що може пояснюватись різною конформацією по різному модифікованих рецепторів. Важливість координованого розташування чотирьох пептидних петель на каліксареновій платформі була продемонстрована мінімальним впливом (навіть у перевищуючих концентраціях) окремої петлі на відновлення цитохрому с аскорбатом [10, 11]. Показано також, що цитохром с здатний зв'язувати карбоксильні похідні калікс[6]аренів та калікс[8]аренів. При цьому цитохром с був стабільний та демонстрував пероксидазну активність в хлороформі, а калікс[6]арен також проявляє селективність й до інших збагачених лізином протеїнів [12, 13].

Знайдено калікс[4]арен з чотирма пептидними петлями, розташованими навколо калікс[4]аренового ядра, який зв'язується з цитохромом с і є ефективним інгібітором ензиму α -хімотрипсину (на 90 % зменшується швидкість гідролізу хромогенного субстрату N-бензоїлтірозин-п-нітроаніліду α -хімотрипсином в його присутності). В той же час даний каліксарен не впливає на активність іншої протеази – еластази, що є проявом його селективності [14]. Детальний кінетичний аналіз дав змогу з'ясувати, що ця сполука є конкурентним інгібітором і

відбувається так зване повільне інгібування подібно до декількох природних інгібіторів протеїнази. Спочатку інгібітор з'єднується з ензимом, який не втрачає при цьому своєї активності. Потім відбувається повільна ізомеризація протеїну і він стає неактивним. Конкурентне інгібування свідчить на користь припущення щодо зв'язування рецептору з активним центром ензиму. Несподіваним виявилась здатність каліксарену витіснити соєвий інгібітор трипсину з комплексу α -хімотрипсин-інгібітор та утворювати з α -хімотрипсином більш стійкий продукт. Це вказує на зв'язування до спільного регіону біля щілини активного центру. При цьому пептидні зв'язки каліксаренового кон'югату є хімічно-стійкими до α -хімотрипсину і не гідролізуються в його присутності, тобто прямий контакт з активним центром відсутній [14].

Досліджено рецептор на основі водорозчинного комплексу Gd^{3+} з калікс[4]ареном, модифікованим на нижньому вінці, що міцно зв'язується з сироватковим альбуміном людини, константа дисоціації такого комплексу становить 41,6 мкМ. Утворення комплексу «каліксарен-сироватковий альбумін людини» пояснюють гідрофобною взаємодією ароматичних кілець макроциклу з відповідними фрагментами амінокислот (можливо аспарагіну й глутаміну) та координацією катіоном гадолінію. Завдяки високій водорозчинності та стійкості каліксареновий металокомплекс запропоновано для використання в якості контрастного агенту в магнітно-резонансній томографії [15]. За допомогою різних оптичних методів було продемонстровано комплексоутворення сульфonatoкаліксаренів з бичачим сироватковим альбуміном (БСА). Виявлено один афінний та два менш афінні сайти зв'язування з сульфonatoкалікс[4]ареном та сіткоутворюючу взаємодію на поверхні тонкої плівки осаду БСА, що утворює по суті планарну систему [16]. Схожими методами показано, що тверді ліпідні наночастинки, утворені амфіфільними

калікс[4]аренами, також можуть взаємодіяти з сироватковим альбуміном, який формує захисний шар на поверхні каліксаренових наночастинок глибиною до 17 нм. Відсутність агрегації твердих ліпідних наночастинок навіть за високих концентрацій БСА відкриває перспективи їх застосування в якості інтравенозних транспортерів [17].

Описана серія синтезованих калікс[4]арен похідних сполук, здатних приєднуватись до трипетлевого регіону тромбоцитарного фактору росту. Досліджений вплив різних модифікацій хімічними групами каліксаренової основи на спорідненість даного фактору до відповідних рецепторів та на клітинну відповідь. Ці сполуки розглядаються як потенційні антагоністи тромбоцитарного фактору росту та ефектів його дії в організмі [18].

Було синтезовано калікс[8]ареновий рецептор для розпізнавання основних амінокислот на поверхні триптази. Просторове розташування та розподіл негативних зарядів мультифункціонального рецептора комплементарні до активного сайту ензиму, тому відбувається його зв'язування з протеїном, що перешкоджає доступності субстрату до ензиму. Кінетичний аналіз інгібування рекомбінантної триптази легень показав залежне від часу конкурентне інгібування з відповідною константою у наномолярному діапазоні [19].

У літературі описані також каліксарени, які є потенційними інгібіторами L-лізиноксидази, хімотрипсину [20], холінестерази [21], лужної фосфатази [22], трипази [19], трансглутамінази [23]. Синтезовані каліксарени з високим афінітетом до катіонів металів, вони здатні ефективно пригнічувати ензиматичну активність фосфатази, що містять Zn^{2+} у своїх активних сайтах, за рахунок блокування доступу до субстрату [24].

Інгібування L-лізиноксидази пара-сульфонато-калікс[6]ареном було запатентовано як спосіб лікування та заживлення шкіри, адже цей ензим відповідає за створення ковалентних зв'язків між

макромолекулами міжклітинного матриксу, і такі сіткоподібні утворення є важливим фактором у випадку фібролітичних захворювань. Інгібування ензиму пояснюється авторами взаємодією латеральних ланцюгів основних амінокислот активного центру та сульфонатних груп каліксарену [25].

Калікс[4]арени, які містять одну або дві групи метиленбісфосфосфенової кислоти, інгібують дію лужної фосфатази кишківника телят [1]. Авторами досліджувався вплив каліксарен-бісфосфосфенових кислот, а також їх немакроциклічних аналогів, на процес гідролізу *p*-нітрофенілфосфату під дією лужної фосфатази. Найбільш ефективним інгібітором є каліксарен, який містить два фрагменти метиленбісфосфосфенової кислоти. По ефективності інгібування цей каліксарен значно перевищує аналогічний каліксарен з одним залишком метиленбісфосфосфенової кислоти, метиленбісфосфосфенову і *p*-гідроксифенілбісфосфосфенову кислоти, що використані в якості модельних сполук. Висока ефективність пояснюється здатністю обох метиленбісфосфосфосфенових угруповань одночасно зв'язувати два катіони металів (Zn та Mg), розташованих на відстані 3,9 Å один від одного в активному центрі фосфатази. Комплекс може також додатково стабілізуватись за рахунок фізичних (електростатичних, ван-дер-ваальсових, гідрофобних) взаємодій з фрагментами амінокислот на поверхні ензиму [26]. Наступні дослідження інгібувального впливу на лужну фосфатазу свійських тварин були проведені з хіральними ізомерами каліксарен-амінофосфосфенових кислот. Ці речовини мають майже однакову спорідненість до лужної фосфатази кишківника телят. Проте, інгібування такого ж ензиму свиней залежить від абсолютної конфігурації α -амінофосфосфенової кислоти, так як величини констант інгібування для оптичних ізомерів відрізняються в два рази. Селективність до енантіомерів значно зростає у біс-амінофосфосфенових кислот, а саме їх *R,R*-ізомер зв'язується з ензимом свиней в п'ятдесят

разів сильніше, ніж *S,S*-ізомер. Таким чином, ефективність взаємодії інгібітора з ензимом визначається кооперативним ефектом та відповідністю хіральної конфігурації інгібітора до просторової конформації сайту зв'язування [22]. Вивчалось також інгібування лужних фосфатаз з нирок бика та *E. coli* калікс[4]аренами, функціоналізованими на верхньому ободі макроциклу одним та двома залишками метиленбісфосфонової кислоти. При цьому обидві сполуки виявляють приблизно однаковий рівень інгібування. За допомогою комп'ютерного докінгу метиленбісфосфонати, які досліджувалися, було розміщено в активному центрі лужної фосфатази *E. coli*. та проаналізовано можливі способи зв'язування досліджуваних інгібіторів з відповідним ензимом [27].

Синтезовані каліксарени, які виступають інгібіторами тирозинових фосфатаз. Тести на бактеріях *Yersinia* дозволили ідентифікувати каліксарен, що досить ефективно інгібував зазначений ензим ($I_{0,5} = 0,92$ мкМ) [24]. Тіакалікс[4]арен пригнічував активність тирозинової фосфатази ($I_{0,5} = 0,22$ мкМ) по типу конкурентного інгібування, хоча при цьому не володів достатньою селективністю відносно тирозинової фосфатази людини [28]. Калікс[4]арени з метиленбісфосфоновими або гідрокси-метилен-бісфосфоновими залишками використовували як специфічний інгібітор тирозинової фосфатази людини 1В [29].

Каліксарени, завдяки їх комплексоутворюючим властивостям й широким можливостям по функціоналізації різними групами, можуть утворювати супрамолекулярні системи, котрі формуються і утримуються міжмолекулярними нековалентними взаємодіями. Механізми утворення і функціонування супрамолекулярних систем є подібними до механізмів організації та дії біологічних об'єктів, таких як клітинні мембрани, ензими, протеїни та нуклеїнові кислоти. Тому каліксарени також досліджувались як аналоги біологічних структур та

систем, за допомогою яких можна моделювати складні біохімічні процеси.

В останні роки був досягнутий значний прогрес у створенні протеоміметиків на основі каліксаренів, молекули яких імітують структуру та функції різних регіонів поверхні протеїнів. Такі сполуки здатні успішно модулювати протеїн-протеїнові взаємодії, які є привабливими і важливими мішенями впливу із-за їх ключової ролі в численних біологічних процесах [30]. Один з таких протеоміметиків має чотири пептидні петлі, які розташовані на центральній каліксареновій платформі. Таке розташування подібне до гіперваріабельних петель антитіл і формує значну площу поверхні (приблизно $400 \text{ \AA}^2$) для зв'язування комплементарного оточення на зовнішній поверхні протеїна-мішені [9]. Описаний також комплекс гуанідинового похідного пентаметоксікалікс[6]арену з диоктаноїлфосфатидилхоліном – фосфоліпідом мембрани. Згідно аналізу кристалічної структури в комплексі спостерігаються такі ж види взаємодій, як і в природному комплексі антитіла McPC603 з фосфорилхоліном та дуже близькими є значенням вільних енергій ΔG утворення цих комплексів [31].

Приймаючи до уваги рецепторні властивості каліксаренів можна констатувати, що вони є зручною молекулярною платформою для дизайну штучних антитіл та рецепторів.

Водорозчинна модель активного сайту гемвісних білків була створена на основі самоскладання катіонних порфіринів та тетрасульфonatoкалікс[4]арену. Цинквісний порфіриновий комплекс зв'язує ліганди через координаційні взаємодії з металом як в порожнині каліксаренової “чаші” для малих молекул, так і ззовні для більш об'ємних сполук, таких як кофеїн. Кобальтвісний комплекс може бути переносником кисню [32].

Дуже широко каліксарени вивчаються як аналоги ензимів. Адже створення каталізаторів, які здатні зв'язувати субстрат аналогічно

ензимам та по селективності і ефективності наближаються до ензимів, знаходиться у фокусі уваги біоорганічної та органічної хімії [1]. Застосування технології молекулярного розпізнавання дозволяє розробляти каталізатори на основі макроциклічних каліксаренових платформ, для яких активність і селективність визначається міжмолекулярними взаємодіями між субстратом та каталізатором. При цьому каталітичні системи, що включають некоординовані макроциклічні рецептори, можна розглядати в якості “мікрореакторів”, які стабілізують перехідний стан реакції або впливають на регіо- та стереоселективність процесу за рахунок специфічної орієнтації субстрату, що дає можливість здійснення переносу електронів, протонів чи інших груп та полегшує атаку реагенту на субстрат [33].

Простими прикладами синтетичних ензимів є сульфокалікс[6]арени. Вони виявились ефективними кислими каталізаторами гідратації 1,4-дигідронікотинамідів – синтетичних аналогів НАД $\cdot$ H. Вважають, що в процесі ензиматичної реакції за участю гліцераль-3-фосфатдегідрогенази 1,4-дигідронікотинамідний фрагмент протонується ензимом, а утворений катіонний інтермедіат зв’язується з негативно зарядженими групами ензиму електростатичними взаємодіями. Тому каліксарени з негативно зарядженими сульфогрупами на верхньому вінці макроциклу, що в перехідному стані завдяки електростатичній взаємодії можуть зв’язувати катіонний інтермедіат, та протондонорними гідроксильними групами на нижньому вінці, розглядаються як моделі ензимів. Вони суттєво збільшують швидкість реакції, що в 426-1220 разів вище, ніж у випадку їх нециклічних аналогів, а у більш кислому середовищі швидкість зростає ще на порядок, як наслідок зменшення ступеню дисоціації карбоксильних груп [34]. Карбоксиметильовані калікс[n]арени ($n = 5-8$) теж мають аніонні та протондонорні центри. Хоча вони проявляють меншу каталітичну активність, ніж

сульфокалікс[6]арени, що пояснюється меншою кислотністю карбоксильної групи порівняно з сульфогрупою та конформаційною рухливістю метиленкарбоксильного фрагмента у реакції гідратації нікотинаміду. Порівняння калікс[η]аренів з різним розміром циклу дає підстави вважати, що більш ефективний каталізатор гідратації нікотинамідів можна створити на основі саме калікс[6]арену [35].

Каліксарени, подібно ензимам, каталізують також гідроліз естерів карбонових кислот. Для виявлення пептидокалікс[4]аренів, здатних гідролізувати нітрофенілацетат, була синтезована бібліотека зі 120 сполук. Лише три з них каталізували гідролітичну реакцію, а найефективнішим був His-Ser-His-каліксарен, який збільшує швидкість реакції на 1520 % порівняно з некаталітичною реакцією, та на 30 % відносно реакції в присутності трипептиду His-Ser-His [36]. Ще одним прикладом штучної гідролази або естерази 4-нітрофенілових естерів $\text{RCOO-C}_6\text{H}_4\text{-NO}_2$ -п є калікс[4]резорциноларен. Константа швидкості гідролізу залежить від природи замісника R, а процес гідролізу відбувається у дві стадії: перша стадія – утворення комплексу каліксарен-субстрат у 2,5-25 разів швидша, ніж друга – гідроліз субстрату. Це є свідченням високих комплексоутворюючих властивостей каліксарену щодо естерів і ставить його в один ряд з ензимами [1]. Гуанідинові похідні пентаметоксікалікс[6]арену можуть розщеплювати п-нітрофенілхолінкарбонат – модель ацетилхоліну у хлороформі з 1 % метанолом. Для цих каліксаренів властива константа швидкості метанолізу п-нітрофенілхолінкарбонату, що у 8-15 разів вища, ніж у випадку відповідної безкаліксаренової моделі, при цьому вони прискорювали метаноліз у 80-150 разів, тобто збільшення швидкості гідролізу значно менше, ніж притаманне ацетилхолінестеразі [37]. Пара-сульфонато-каліксарени каталізують алкоголіз N-ацетил-похідних основних амінокислот в присутності метанолу відповідно до кінетики Міхаеліса-Ментен. Методом ядерно-

магнітного резонансу продемонстровано, що каталітична активність передбачає формування комплексу каліксаренів зі специфічним субстратом подібно до ензимів [38].

Як вже відзначалося, каліксарени є зручною молекулярною платформою для створення моделей ензимів. При цьому особливу увагу дослідників привертають каталізатори, представлені металічним центром та лігандом. Таким чином, зв'язування субстрату порожниною ліганда-рецептора визначає його орієнтацію по відношенню до металічного центру, що суттєво впливає на розподіл продуктів та субстратну селективність реакції [33]. Перш за все створюються моделі окисно-відновних ензимів, які містять скоординований атом металу змінної валентності та названі “редокс калікс-зимами” [39]. Такі водорозчинні комплексні сполуки часто містять атом міді, а калікс[6]аренова чаша формує гідрофобну ліганд-зв'язувальну кишеню, або канал для доступу субстрату до металічного центру подібно до активного сайту металоензимів [39, 40, 41]. Присутність різних хімічних замісників на каліксареновій основі, що формує координаційний сайт для атому міді, імітує залишки певних амінокислот активного центру ензимів [41]. Супрамолекулярна організація координації атому металу регулює Cu(II)/Cu(I) окисно-відновний процес таким же чином, як протеїнові матриці контролюють цей процес в Cu -вмісних ензимах завдяки фолдінгу протеїну, а також механізму його індукованих змін, стеричним та алостеричним ефектам [42]. Такі моноядерні Cu -калікс[6]арени в присутності молекулярного кисню здатні продукувати супероксидрадикали або руйнувати C-H зв'язки молекул лігандів з включенням в них кисню [43].

Метал-вмісні каліксарени здатні також каталізувати гідроліз та трансестерифікацію ефірів фосфорних кислот. При цьому моноядерні комплекси проявляли слабку каталітичну активність завдяки відсутності кооперативної дії двох атомів металу у той час як диядерні

комплекси з оптимальним розташуванням двох металів були більш ефективними. Адже в біохімічних перетвореннях естерів фосфорної кислоти, які каталізуються металоензимами, беруть участь одночасно два іони металу (Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} та Fe^{3+}), що розташовані на відстані 3-5 Å один від одного в активному центрі ензиму [1]. Так дицинковий комплекс дипіридинокаліксарену ефективно каталізує внутрішньомолекулярну переестерефікацію РНК-модельного субстрату – 2-гідроксіпропіл-п-нітрофенілфосфат з 23000-кратним прискоренням цього процесу порівняно з некаталітичною реакцією та 50-кратним порівняно з моноядерним цинковим комплексом даного каліксарену, що свідчить про важливість синергізму в ефектах двох катіонів цинку. Найбільш імовірно, що один з іонів цинку виступає як активуюча кислота Льюїса, а інший активує нуклеофільну β -гідроксильну групу, в результаті чого відбувається швидка внутрішньомолекулярна реакція [44].

Перевага каліксаренів як молекулярної основи штучного ензиму, що містить два перехідних метали, полягає в тому, що каліксареновий кістяк у розчині має достатню конформаційну рухливість і це дає змогу ефективно зв'язуватись з субстратом та проявляти каталітичну дію. Адже більш структурно жорсткий аналог дицинкового комплексу дипіридинокаліксарену, що конформаційно-стабілізований диетиленглікольним фрагментом по нижньому вінцю макроциклу, проявляв нижчу каталітичну активність. Це вказує на необхідність певної гнучкості між кооперативними центрами [45].

Аналогічна властивість гідролізувати 2-гідроксіпропіл-п-нітрофенілфосфати, ди- та олігорибонуклеотиди характерна для диядерних калікс[4]аренових комплексів з іонами міді(II) в якості металічних центрів. При цьому такі моделі ензимів володіють певною селективністю відносно нуклеозидів, між якими гідролізуються

фосфодиефірні зв'язки, подібною до селективності рибонуклеази А [46].

Крім цього синтезовані також калікс[4]арени з трьома та чотирма діамінними або піридиламінними групами на верхньому вінці для моделювання активних центрів мультіядерних металоензимів [47]. Введення третього металічного центру у випадку з тримідним каліксареновим комплексом не впливає на каталітичну ефективність каліксаренів порівняно з димідним комплексом [46], а у випадку цинкових комплексів та змішаних цинк-мідних комплексів відбувалося підсилення каталітичної активності ензиматичних моделей рибонуклеази, що пояснюється стабілізуючою дією третього катіону Zn^{2+} на групу, яка відщеплюється [48]. Але в усіх випадках спостерігалась різна ефективність каталізу по відношенню до різних динуклеотидів, тобто відносна субстратна селективність.

Показано також, що водорозчинний калікс[4]арен-тетрасульфат, що не містить ніяких металів, каталізує гідроліз АТФ. Методами лазерного фотолізу та імпульсного радіолізу було доведена супрамолекулярна взаємодія між АТФ та каліксареном, що необхідна для каталітичного ефекту каліксарену на гідроліз АТФ [49].

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

Каліксарени завдяки ароматичним блокам в їх будові володіють гідрофобними властивостями, тому вони можуть взаємодіяти з клітинними мембранами. Дослідження такої взаємодії та проникаючої здатності каліксаренів крізь мембрани є важливим з огляду на біологічні ефекти каліксаренів та можливе використання їх в медицині. Перш за все мембранна інкорпорація та/або транслокація каліксаренових похідних залежить від замісників на верхньому та нижньому вінцях, що продемонстровано на прикладі різних пеніцилін-

похідних трет-бутилкалікс[4]аренів та штучних ліпідних мембранах [50]. Показано, що деякі каліксарени впливають на чутливість фосфоліпідних бішарів до фосфоліпази A_2 та їх агрегацію і злиття шляхом модуляції фазової рівноваги мембранних ліпідів. В залежності від структури каліксаренових сполук вони здатні інгібувати або активувати вказані процеси, що корелює також з антитуберкульозною та прототуберкульозною активністю цих сполук відповідно [51].

Здатність каліксаренів проникати або вбудовуватись в мембрани в поєднанні з їх комплексоутворюючими властивостями дає змогу транспортувати крізь мембрану різні речовини. Наприклад, трет-бутилкалікс[4]арен був досліджений як селективний транспортер катіонів Na крізь штучну мембрану з соєвих фосфоліпідів, хоча таке транспортування в 4 рази повільніше порівняно з природнім іонофором моненсином. Результати кінетичного аналізу такого процесу вказують на модель полегшеної дифузії, відповідно до якої каліксарен на поверхні мембрани Na^+ формує комплекс з Na^+ зі стехіометрією 1:1. Цей комплекс далі дифундує до іншого боку мембрани, де розпадається, й каліксарен знов переходить до сторони мембрани, яка межує з більш концентрованим розчином Na^+ [52]. При цьому величина олігофенольного макроциклу трет-бутилкалікс[4]аренових похідних впливає на селективність до транспортування певних катіонів лужних металів. Найбільшою селективністю для Na^+ володіє калікс[4]арен, в той час як калікс[5]арен найкраще переносить K^+ , а калікс[6]арен та калікс[7]арен селективні щодо іону Cs . Калікс[8]арен взагалі не виявив іонофорних властивостей щодо катіонів лужних металів [53]. Знайдені також каліксарени, що селективно транспортують іони ртуті у дифузійно-залежному процесі [54].

Крім того, каліксарени можуть зв'язуватись з мембраною, формуючи в ній канали [55]. Так тетраметокси(тіа)каліксарен може

виступати в якості аналога протеїна аквопорина для моделювання транспорту води через мембрану [56], а трет-бутилкалікс[4]арен поєднаний з чотирма трипептидами, характерними для калієвих каналів, моделює селективний фільтр останнього для іонів K та їх транслокацію [57].

Був запропонований механізм вбудовування у ліпідний бішар каліксаренів, що транспортують іони Na та імітують таким чином іонні канали. При цьому амфіфільні каліксарени завдяки гідрофобному ефекту формують у розчині міцели, які зливаються з мембранами утворюючи мультиканали [58].

Каліксарени у конформації 1,3-альтернат, поєднані з краунетерами довгими аліфатичними ланцюгами, утворюють канали для іонів Na та K, а стереоізомерний каліксарен у конформації конус не здатний транспортувати іони. У мембрані бокові ланцюги каліксарену розходяться до поверхонь мембрани під гострим кутом і завдяки рухам та обертам створюють відкритий каналоподібний простір і при цьому катіони проходять крізь каліксареновий кістяк [59]. Ще один спосіб утворення штучного каналу для K^+ та Na^+ продемонстрований на прикладі каліксрезорциноларенів. Ці каліксарени розташовуються на поверхні мембрани так, що їх гідроксильні групи направлені у водний розчин, а гідрофобні довгі алкільні ланцюги вглиб мембрани. Канал, утворюється за принципом самозбірки й аналогічно руйнується. В певні проміжки часу каліксарени розташовуються один навпроти одного на різних боках мембрани і утворюється відкритий каналоподібний простір. Так як мембрана – це динамічна структура, з часом каліксарени пересуваються в різних напрямках і канал розбирається [60].

Створені каліксарени здатні утворювати канали селективні також до аніонів. Зокрема калікс[4]арен тетрабутиламід у конформації 1,3-альтернат проявляє значну селективність до Cl^- та SO_4^{2-} . Дослідження

цих сполук показали, що для зв'язування та транспортування аніонів необхідними є як каліксареновий кістяк з гідрофобними властивостями, так і амідні замісники [61].

Отже, можна сказати, що на основі каліксаренів, що проявляють іонофорні властивості, можна моделювати і, таким чином, вивчати транспортні процеси в мембранах, а також розробляти ефективні антибіотики, котрі будуть подібні до природних, механізм дії яких полягає у порушенні трансмембранного потенціалу в клітинах та органідах.

Каліксарени проявляють також мембранотропні властивості на рівні катіонтранспортуючих систем нативних мембран. Зокрема, знайдено, що пара-сульфонатокаліксарени є сильними блокаторами потенціал-керованих хлоридних каналів з субнанолярною константою інгібування та винятково довгим часом блокування [62, 63]. Тетрасульфонатокаліксарени індукують також швидке інгібування потенціал-залежних аніонних каналів ендотеліальних клітин за позитивного потенціалу, але вони були неефективні за негативного потенціалу. Вплив рН на блокування каналів вказує на залежність ефекту від протонування сайту зв'язування. Потенціал-залежне інгібування калікс[4]ареном вірогідно відбувається завдяки закупорці каналу за помірно позитивного потенціалу, яке послаблюється за більш позитивного потенціалу завдяки проходженню негативно зарядженого калікс[4]арену через канал [64]. Тетрасульфонатокалікс[6]арен та калікс[8]арен були більш ефективними за високого позитивного потенціалу, так як вони не проникають через канал. Структурні відмінності цих каліксаренів дали змогу оцінити ліміти площі каналу в поперечному зрізі. Такі блокатори можуть бути корисними у подальших дослідженнях властивостей аніонних каналів у відкритому стані [65].

Було встановлено, що калікс[4]арентетрабісметиленбісфосфонова кислота C-192 є специфічним інгібітором полімеризації фібрину та зсідання крові і може бути використаний для розробки нового класу антитромботичних препаратів [7].

У Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАНУ за допомогою методу протокової цитофлуориметрії та DiOC₆(3) показано, що калікс[4]арени C-97, C-99 та C-107 зумовлюють деполяризацію плазматичної мембрани в умовах штучного колапсу мітохондріального потенціалу в разі передінкубації міоцитів у присутності азиду натрію [6]. В умовах штучної деполяризації сарколеми уабаїном калікс[4]арени C-97, C-99 та C-107 у концентрації 100 нМ зумовлюють транзйєнтне зростання мембранного потенціалу мітохондрій, яке сягає 45 % від контрольного рівня і триває близько 5 хв.

На основі каліксаренів вже створені сполуки, які володіють різноманітними біологічними властивостями, що продемонстровано на клітинах та на рівні цілісного організму. Широко застосовуються кон'югати каліксаренів з вуглеводами. Тетрахондройтинсульфаткалікс[4]резорциноларен створений як аналог протеогліканів та інгібує фібронектин-опосередковану адгезію клітин [66].

На теперішній час описано та запатентовано використання каліксаренів як сполук з бактерицидною, противірусною та фунгіцидною дією [67, 4, 68, 69, 70]. Показано, що пептидокаліксарени проявляють антибактеріальну активність по відношенню до пенициліночутливих та пенициліностійких грампозитивних бактерій і не діють на грамнегативні. За механізмом дії дані речовини близькі до природного антибіотика ванкоміцину, тобто зв'язуються з клітинною стінкою бактерій і тим самим унеможливають формування нормальної клітинної стінки [71].

Також створені калікс[8]аренові сполуки, які опосередковано через імунні клітини здатні контролювати інфекцію *Mycobacterium*

tuberculosis. В залежності від довжини поліоксиетиленового ланцюга на нижньому вінці макроциклу каліксарени інгібують або активують ріст туберкульозної палички всередині макрофагів, тим самим вони впливають на метаболізм ліпідів та активність індукцибельної NO-синтази цих клітин. Цей механізм повністю відрізняється від механізму дії інших протитуберкульозних ліків, тому ці речовини є перспективними, оскільки стійкість бактерій до сучасних хіміотерапевтичних агентів зростає [70, 72, 73].

Каліксарени є перспективними сполуками як компоненти препаратів, що пригнічують пухлинний ріст. Наприклад, глікокалікс[8]арен з експонованими залишками N-ацетилглюкозаміну інгібує міграцію та проліферацію клітин гліоми [74]. Галактозо-/глюкозопрезентуючі калікс[n]арени ($n = 4,6,8$) здатні селективно зв'язуватися кожен з окремим галектином людини, які відповідають за адгезію та регуляцію росту клітин і є фактором прогресування пухлин [75]. На основі каліксаренів знайдений селективний інгібітор зв'язування рецепторами тромбоцитарного фактору росту [18] та ендотеліального фактора росту судин [76], що призводить до зменшення росту пухлин та їх голодування. Ще один підхід для створення антиракових препаратів на основі каліксаренів передбачає стимуляцію імунної відповіді на пухлину. N-ацетилглюкозамінкалікс[4]арен, взаємодіючи з рецептором CD69, активує цитотоксичні клітини [77]. Калікс[4]арен, що поєднаний з чотирма пухлиноасоційованими глікоантигенами, стимулює продукування антипухлинних імуноглобулінів і тому може бути використаний в якості вакцини [78].

Каліксарени можуть також безпосередньо впливати на ріст бактерій. Так, пептидокаліксарени проявляють антибактеріальну активність по відношенню до пенициліночутливих та пенициліностійких грампозитивних бактерій і не діють на

грамнегативні. За механізмом дії дані речовини близькі до природного антибіотика ванкоміцину, тобто зв'язуються з глікопептидними будівельними блоками клітинної стінки бактерій, унеможливлюючи формування нормальної клітинної стінки [71].

Сульфonatoкалікс[4]нафтиларени мають високу активність проти широкого кола РНК- та ДНК-вірусів. Порівнюючи з відомими препаратами, ці каліксарени виявилися значно ефективнішими проти вірусу герпесу, а вивчення механізму антивірусної активності свідчить, що вони селективно зв'язуються з білковою оболонкою вірусу, й, тим самим, перешкоджають його потраплянню до клітини. Сульфonatoкалікс[4]нафтиларен та сульфonatoкалікс[4]арен проявляють також антикоагулянтну та антитромботичну дію близьку до дії відомих терапевтичних агентів – гепарину кумарину [1].

За допомогою методів ЛКС та електронної мікроскопії ми показали, що у присутності калікс[4]арену С-107 відбувається аглютинація везикул плазматичної мембрани між собою, та/або з мікрочастинками калікс[4]арену. Показане нами збільшення гідродинамічного діаметру мембранних везикул підтверджується літературними даними, де мова йде за злиття міцел каліксаренів з ліпідними мембранами [58].

В процесі дослідження флуоресцентних характеристик калікс[4]аренів ми з'ясували, що двом калікс[4]аренам (С-90 та С-107) властива автофлуоресценція. Тому ми за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопу вивчали можливість проникності калікс[4]аренів у гладеньком'язову клітину. Результати свідчать на користь того, що, наприклад, калікс[4]арен С-107 може не тільки проникати крізь мембрани, а й накопичуватись в клітинах.

2.2. ТОКСИЧНІСТЬ ТА ІМУНОГЕННІСТЬ КАЛІКСАРЕНІВ

Для безпечного використання каліксаренів у медицині необхідно, щоб у них була відсутня здатність викликати імунну відповідь і виражену токсичність, агрегацію та гемоліз еритроцитів за умов внутрішньовенозного застосування.

Першовідкривач каліксаренів Д. Гютше відзначає, що найпростіші немодифіковані сполуки каліксаренів практично безпечні, про що свідчать результати Еймс-тесту [79, 80, 81]. Доведено, що каліксаренсульфонати не впливають на ріст фібробластів людини і мають той же рівень токсичності, що і глюкоза [82], а пара-сульфонатокалікс[4]арени не проявляють токсичності у дозах, що не перевищують 100 мг на 1 кг маси тіла мишей. При цьому каліксарени швидко виводяться з сечею та не накопичуються в печінці, селезінці, або мозку [83]. Встановлено, що тверді ліпідні наночастинки на основі амфифільних калікс[4]аренпохідних показують відсутність гемолітичних ефектів при концентраціях в межах до 300 мг/л [84], на відміну від поведінки твердих ліпідних наночастинок на основі амфифільних циклодекстринів, які проявляють значні гемолітичні ефекти [85].

Знайдено, що для серії пара-сульфонаткалікс[4, 6, 8]аренів та їх монозаміщених похідних спостерігається гемолітична дія в такому порядку: пара-сульфонаткалікс[8]арен > пара-сульфонаткалікс[6]арен > пара-сульфонаткалікс[4]арен, з 5% гемолізом при концентрації 20, 50 і 200 мМ відповідно [86]. Вони не індукують активацію нейтрофілів та не впливають на їх життєздатність [87]. Досліди на тваринах показали, що антитіла проти калікс[4]аренів виявляються лише при імунізації каліксаренами кон'югованими з білками, а імунна відповідь залежить від природи кон'югованого переносника, дози та способу імунізації [88]. Показано також, що непептидні тетрааміно- та

дигуанідинкалікс[4]арени не викликали спостерігаємої токсичної дії на піддослідних мишах [89].

Було продемонстровано, що ДНК-трансфеговані каліксарени не проявляють токсичність по відношенню до клітин (у яєчниках китайського хом'ячка і клітинних ліній нирок ембріонів людини) у повному фармацевтично відповідному діапазоні концентрацій [90]. Каліксарени, що містили на нижньому макроциклічному вінці гуанідінові групи, проявляли низьку токсичність при їх трансфекції у клітини, що підтверджувалося 75-80 % їх життєздатністю на протязі 48 годин [91].

Подібні до ванкоміцину антибактеріальні пептидокаліксарени не виявляють токсичної дії [1]. Показано, що пара-сульфонатокалікс[4]арени не проявляють токсичності у дозах, що не перевищують 100 мг на 1 кг маси тіла мишей.

Самі каліксаренові матриці не володіють імуногенною дією, хоча деякі каліксарени здатні стимулювати імунну відповідь. Експерименти, проведені на тваринах показали, що антитіла проти калікс[4]аренів виявляються лише при імунізації каліксаренами, що були кон'юговані з протеїнами, а імунна відповідь залежить від природи кон'югованого переносника, дози та способу імунізації [88].

Щодо гемолітичного ефекту на еритроцитах людини, то показана відсутність будь-яких гемолітичних властивостей амфіфільних калікс[4]аренів, що утворюють у водному розчині тверді ліпідні частинки [84]. Хоча водорозчинні пара-сульфонатокаліксарени зумовлюють гемоліз із максимальним ефектом 30 % за концентрації 200 мМ сульфонатокалікс[8]арену. Каліксарени з меншими макроциклами демонстрували набагато менший ступінь гемолізу. Приєднання до калікс[4,6]аренів метоксікарбоксилатних груп зменшувало гемолітичну дію каліксаренів, а етоксіаміногрупи підсилювали її [92]. Можна зробити висновок, що описані в літературі

каліксарени можуть проявляти гемолітичні, токсичні та імуногенні властивості лише за присутності кон'югованих хімічних груп, а також за високих їх концентрацій.

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

2.3. ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ КАЛІКСАРЕНІВ У ФІЗИКО-ХІМІЧНІЙ БІОЛОГІЇ, БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА ФАРМАКОЛОГІЇ

Широкомасштабні дослідження в галузі синтетичної та супрамолекулярної хімії каліксаренів проводяться в Інституті органічної хімії НАН України. Каліксарени — це чашоподібні макроциклічні сполуки (слово *калікс* перекладається з давньогрецької як *чаша для вина*), які завдяки своїй оригінальній нанорозмірній структурі здатні з високою селективністю, близькою до селективності природних ензимів, розпізнавати, зв'язувати в супрамолекулярні комплекси та розділяти близькі за властивостями катіони, аніони, нейтральні органічні молекули, зв'язуватися з поверхнями протеїнів, ДНК, активними сайтами терапевтично важливих пептидів. Ці властивості відкривають широкі перспективи практичного застосування каліксаренів у найрізноманітніших галузях науки, техніки, технології, медицини.

Синтезовані в Інституті органічної хімії НАН України каліксарени використовують як селективні рецептори в хемосенсорі «електронний ніс», розробленому спільно з Інститутом фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України [93]. Ці сенсори — інтелектуальна система, здатна розпізнавати пари органічних сполук у повітрі, створювати їх цифровий образ, зберігати його в електронній пам'яті і

використовувати при аналізі токсичних речовин у повітрі та контролю якості харчових продуктів, напоїв, парфумів тощо.

На основі нанорозмірних каліксаренових платформ в Інституті органічної хімії НАН України розроблено нові типи високоселективних комплексоутворювачів для зв'язування та вилучення з водних розчинів катіонів цезію, стронцію, важких, перехідних металів, лантаноїдів, актиноїдів. Такі нанорозмірні сполуки у сотні разів ефективніші за промислові екстрагенти та сорбенти при зв'язуванні токсичних радіонуклідів. Спільно з науковцями Інституту монокристалів НАН України і Каліфорнійського університету (Берклі) розроблено каліксаренові сорбенти для селективного вилучення цезію, європію, америцію з водних розчинів [94]. Сфери застосування розроблених матеріалів — це перероблення відпрацьованого ядерного палива атомних електростанцій; знезараження радіоактивних матеріалів забруднених територій Чорнобильської зони; очищення води, забрудненої радіонуклідами; радіохімія та аналітична хімія, радіомедицина.

Завдяки супрамолекулярним взаємодіям з біомолекулами — амінокислотами, пептидами, ДНК, каліксарени проявляють різнобічну біологічну активність і їх розглядають як «золоту жилу» при розробленні лікарських та діагностичних препаратів [95]. Було відкрито важливий феномен — розміщення на нанорозмірній каліксареновій платформі біофорних фрагментів приводить до синергічного ефекту, в результаті якого біологічна активність молекули різко зростає.

Біомедичні дослідження каліксаренів, синтезованих в Інституті органічної хімії НАН України, успішно проводяться в інститутах Національної академії наук та Національної академії медичних наук України. Зокрема, в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України академіками НАН України С.В. Комісаренком, С.О. Костеріним та членом-кореспондентом НАН України Е.В. Луговським встановлено,

що похідні каліксаренів є потужними антитромботиками і селективними регуляторами іонних насосів у клітинах. Вони мають широку перспективу застосування в медичній практиці для лікування багатьох захворювань, у тому числі спричинених порушенням іонного обміну.

В Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України членом-кореспондентом НАН України А.І. Вовком та академіком НАН України В.П. Кухарем встановлено високу інгібувальну активність каліксаренфосфонових кислот відносно низки терапевтично значимих фосфатаз, підвищена експресія яких в організмі людини призводить до онкологічних захворювань, діабету, ожиріння [93].

Важливою сучасною проблемою є розроблення препаратів для подолання лікарської резистентності. Відомо, що в організмі людини виробляються Р-глікопротеїни (Multidrug resistance proteins), які видаляють з клітин ксенобіотики різноманітного походження, в тому числі лікарські препарати. В Інституті експериментальної патології, онкології та радіобіології ім Р.Є. Кавецького НАН України академіком НАН України В.Ф. Чехуном встановлено, що похідні каліксаренів зв'язуються з Р-глікопротеїном та інгібують його активність. Це дає можливість зменшувати терапевтичні дози протипухлинних препаратів [93].

У результаті співпраці лабораторії біологічно активних сполук Інституту органічної хімії НАН України з Інститутом фармакології і токсикології НАМН України розроблено і запатентовано сульфонілкарбамідокаліксарени, які виявляють антиглікемічну дію і мають переваги порівняно з відомим препаратом Глібенкламідом.

У співпраці з науковцями лабораторії біофотоніки Страсбурзького університету, професорами А.С. Климченком та І. Мелі (до речі, А.С. Климченко — випускник, а І. Мелі — почесний доктор Київського національного університету імені Тараса Шевченка) створено амфіфільні каліксарени. Такі макроцикли у водних розчинах

самоорганізуються у нанорозмірні міцели діаметром 6—9 нм. Ці міцели мають позитивно заряджену поверхню і ефективно взаємодіють з природними молекулами ДНК. У результаті негативний заряд ДНК повністю маскується і при цьому утворюються стабільні наночастинки розміром 40—100 нм. Такі нанооб'єкти переносять ДНК всередину клітини, де відбувається реалізація генетичної інформації, закодованої в ДНК. Це відкриває нові підходи до генної терапії багатьох спадкових та вірусних захворювань [96]. Іншим прикладом співпраці з французькими колегами є створення водорозчинних флуоресцентних органічних наночастинок розміром 7 нм, які легко проникають всередину клітин. Ці наночастинки мають поверхню, здатну до подальшої функціоналізації і можуть виявитися корисними у цитологічних і гістологічних дослідженнях, а також у молекулярній біохімії [97]. На їх основі можна створити наноконтейнери для ліпофільних сполук і використовувати як системи для спрямованої внутрішньоклітинної доставки лікарських речовин. Іншим аспектом є їх використання як діагностичних флуоресцентних наночастинок для візуалізації біомікрооб'єктів.

Сьогодні широко вивчається можливість використання каліксаренів в суміжних галузях біологічної науки. У літературі зустрічається досить багато даних про різноманітні властивості каліксаренів, у тому числі і про їх біологічну активність, яка активно досліджується у біомедицині. Вченими досліджується утворення інклюзивних комплексів, прояви антикоагуляційної, гідролітичної, протитуберкульозної, антибактеріальної, протівірусної, антитромботичної, протипухлинної активності, тощо. Проведено ряд досліджень, на підставі результатів яких можна розглядати каліксарени як кандидати для створення антивірусних та антибактеріальних препаратів і молекулярних носіїв доставки ліків [98, 99, 100, 101]. Також обговорюється можливість створення

пероральних протидіабетичних засобів з використанням каліксаренів у якості переносників через мембрану [1, 4].

Завдяки тому, що каліксарени володіють рецепторними властивостями по відношенню до різних молекул та іонів, їх широко використовують в аналітичних та діагностичних методах детектування різних біохімічних речовин. Так, глікокалікс[4]арен завдяки мультивалентному експонуванню природних лігандів холерного токсину на каліксареновій основі проявляє високу спорідненість до даного токсину, що може бути використано для його виявлення [102]. Використання амфіфільних каліксаренових похідних дозволяє створювати сенсори, які здатні визначати різні протеїни у наномолярному діапазоні концентрацій. Зокрема, описані аналітичні системи на основі пара-сульфонатокаліксаренів, здатних до супрамолекулярної взаємодії з високопатогенними пріонами, що дозволяє ампліфікувати їх імунологічне детектування методами Western Blot та ELISA [103, 104].

Каліксарени з іонофорними властивостями можна використовувати для створення селективних детекторів на основі електродної техніки. Так були розроблені потенціометричні методи на основі ефірних похідних бутилкалікс[4]аренових сполук для реєстрації концентрації іонів Na^+ селективно відносно іонів K^+ у рослинних клітинах [105] та в плазмі крові [106]. Із використанням вбудованих у полівінілхлоридні мембрани гексагомотріоксакалікс[3]аренів були створені сенсори для визначення допаміну та інших катехоламінів з високою селективністю не тільки відносно неорганічних катіонів, але й відносно інших катехоламінів та четвертинних амінів [107, 108]. Аналогічним чином розроблені також методи аналізу широкого кола інших речовин.

При створенні лікарських засобів використання деяких каліксаренів дає змогу покращити терапевтичні властивості

препаратів. Зокрема, кон'югат моноклональних імуноглобулінів та калікс[4]арену, здатного хелатувати радіоактивний актиній ($^{225}\text{Ac}^{3+}$), є основою радіотерапевтичних агентів. При цьому імунореактивність антитіл не послаблюється приєднанням до 6 молекул каліксарену і дозволяє цілеспрямовано доставляти радіоактивну сполуку до клітин-мішеней [88]. Водорозчинний пара-сульфонатокалікс[8]арен завдяки утворенню стабільного комплексу з практично нерозчинним у воді ніфедипіном суттєво збільшує його біодоступність при оральному застосуванні [109]. Показано, що пара-сульфонатокалікс[4]арен та калікс[4]арендифосфат є ефективними агентами для кристалізації ряду фармацевтично-активних сполук. Кристалізація за допомогою водорозчинних каліксаренів дає змогу покращити їх характеристики, змінювати та контролювати конформацію лікарського засобу [110].

Супрамолекулярні системи на основі каліксаренів подібні до макромолекулярних біохімічних комплексів. Такі системи здатні до самозбірки та самоскладання завдяки міжмолекулярним взаємодіям. Зокрема, калікс[8]арен є придатною платформою для самозбірки тетрапептидів у конформацію паралельного β -складчатого листа [111]. Створений навіть вектор на основі вірусного геному, вкритого глікокалікс[4]резорцинареном. Такий гліковірус здатний до самоскладання та трансфекції культури клітин шляхом ендоцитозу [112].

Можливість функціоналізації каліксаренової платформи дозволяє знизити токсичність дії вже відомого антивірусного препарату і при цьому підвищити ефективність дії, наприклад, як у випадку хлоргексидину та коронавірусу 229E [113]; вірусу простого герпесу [100, 114]. Подібним чином використовують каліксаренову платформу і при розробці протигрибкових препаратів. У літературі описано синтез гібридів з амфотерицину В та калікс[4]арену [115]. Отримані комплекси володіли такою ж протигрибковою активністю, але при цьому гібриди

були в 10 разів менш гемотоксичні за амфотерицин В. Отримані комплекси з калікс[4]ареном були більш селективними до мембран, які містять ергостерол, що зазвичай зустрічається у мембрані дріжджів, ніж до холестеролвмісних, що є характерним для клітин ссавців. Відомі препарати на основі калікс[4]аренів з протигрибковою активністю (на культурах *Candida albicans*), що мають низьку гепатотоксичність [116].

Каліксарени також застосовують у біоорганічній хімії та біотехнології з метою створення синтетичних рецепторів, здатних, подібно природним рецепторам, розпізнавати близькі за властивостями молекули та іони [1, 117, 118].

Описано каліксарени, які зменшують кров'яний та тканинний оксидативний стрес у щурів, викликаний введенням свинцю. Це відбувається завдяки тому, що каліксарен зв'язується з цистеїновими залишками у пептидах, а це, в свою чергу, перешкоджає зв'язуванню свинцю [24]. Також, з використанням з 2,2-дифеніл-1-пікрилгідрозилу, описано антиоксидантні властивості каваоліл- та синапіл-калікс[4]аренів (похідні гідроксикоричної кислоти) [80].

Отже, на теперішній час у світовій літературі накопичені суттєві експериментальні результати щодо сполук, створених на основі каліксаренів, котрі володіють унікальними біохімічними властивостями, що продемонстровано на клітинах та на рівні цілісного організму. Це є вкрай перспективним для подальшого розвитку біохімії, біофізики, молекулярної біології, а особливо - в практичному аспекті: для біотехнології та медицини.

Отже, проаналізувавши літературні дані, ми можемо стверджувати, що наразі є вагомі підстави стверджувати, що каліксарени можуть бути ефективними модуляторами різноманітних біологічних процесів [1, 4, 7, 119]. Каліксарени можна використовувати в багатьох суміжних галузях науки, зокрема у них великий потенціал для застосування у біомедицині.

Втім, потенціал каліксаренів як біологічно активних сполук ще повністю далеко не розкритий. Зокрема необхідні подальші пошуки та дослідження каліксаренових похідних здатних впливати на АТР-гідролазні системи, зокрема $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазу, Na^+, K^+ -АТРазу та інші мембранозв'язані АТРози. У випадку гладеньких м'язів це може бути перспективним для подальшого з'ясування механізмів та закономірностей електро- та фармакологічного спряження, порушення цього феномену у випадках патологічних станів. З іншого боку, як впливає з вищенаведеного, каліксарени самі можуть бути аналогами ензимів, в тому числі й АТР-гідролаз. Тому цікавими є подальші вивчення АТР-гідролітичних властивостей каліксаренів.

ЧАСТИНА ДРУГА.

КАЛІКСАРЕНИ ЯК ЕФЕКТОРИ КАТІОН-ТРАНСПОРТУВАЛЬНИХ АТР-ГІДРОЛАЗНИХ СИСТЕМ

Вивчення закономірностей регуляції концентрації іонізованих кальцію (Ca^{2+}), натрію (Na^+), калію (K^+), а також протонів (H^+) в цитоплазмі - нагальна комплексна проблема клітинної біології. Особливе значення має дослідження молекулярних та мембранних механізмів регуляції саме іонів Ca.

Дійсно, їм належить видатна універсальна роль у забезпеченні функціональної активності клітин практично усіх тканин. В певному розумінні можна навіть стверджувати, що проблема оборотної регуляції концентрації іонізованого Ca в клітині (в діапазоні концентрацій наближено 100 нМ – 1 мкМ) є **фундаментальною загальнобіологічною проблемою**. Адже різноманітні біохімічні, біофізичні і фізіологічні процеси та явища, наприклад: м'язове скорочення, активація та регуляція каталітичної активності багатьох ензимів, передача внутрішньоклітинного сигналу від плазматичної мембрани до внутрішньоклітинних мембранних структур, контроль проникності біологічних мембран, розповсюдження нервового імпульсу, клітинний поділ, секреція, запліднення тощо – всі ці видатні біологічні феномени контролюються іонізованим кальцієм.

Втім, виникає запитання: чому ж саме Ca^{2+} був обраний ПРИРОДОЮ в якості головного неорганічного внутрішньоклітинного сигналізатора? У цьому контексті важливими є, як мінімум, наступні аргументи (зокрема, відповідно до уявлень проф. Д.О. Левицького). 1. Для іону Ca є притаманним утворення великої кількості координаційних зв'язків – переважно 7 чи 8. 2. Довжина зв'язку, що утворюється при взаємодії іону Ca з лігандами, варіює у вельми широкому діапазоні (для зв'язку Ca-O, наприклад – 0,23 – 0,26 нм). 3.

Внаслідок вищенаведеного іон Ca здатний “підлаштовуватися” під гнучку структуру сайту зв’язування на різноманітних протеїнах. 4. Іон Ca не здатний утворювати зв’язки з атомами азоту у складі протеїнових молекул. 5. Іони Ca здатні до надзвичайно динамічного багатофазного (поліекспоненційного) обміну у клітинах і тканинах. Дійсно, із використанням різноманітних методичних підходів (ізотопний $^{45}\text{Ca}^{2+}$ - $^{40}\text{Ca}^{2+}$ -обмін, Ca^{2+} -чутливі флуоресцентні зонди тощо) та залученням різних експериментальних моделей (субклітинні структури, клітинні та тканинні препарати) багато дослідників ідентифікують декілька (3 - 6) експоненційних компонент кальцієвого обміну в тканинах (цікаво, що така багатоекспоненційна кінетика іонного обміну не є властивою для таких одновалентних катіонів, як Na та K). 6. Ca^{2+} виявляє свою месенджерну дію завдяки існуванню суттєвого власного трансмембранного (на рівні плазматичної мембрани) градієнта (вільна енергія Гіббса $\Delta G_{\text{пм}} = RT \ln \{ [\text{Ca}^{2+}]_{\text{e}} / [\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}} \} + 2F\Delta\psi = - 38,8 \text{ кДж/моль}$, де $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{e}}$ та $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ – концентрація іонізованого Ca у позаклітинному просторі та в цитоплазмі відповідно, $\Delta\psi$ – трансмембранний електричний потенціал, T – абсолютна температура, $^{\circ}\text{K}$, F – число Фарадея, R – газова стала). 7. Мобілізація іонів Ca у клітині здійснюється не лише хімічним шляхом (наприклад, під дією IP_3), але й внаслідок електричних процесів на мембранах. 8. Мішенями для іонів Ca можуть слугувати як “розчинні” (наприклад, кальмодулін), так і інтегральні мембранні протеїни.

Все вищенаведене принципово відрізняє біохімічні та фізико-хімічні закономірності обміну іонів Ca в тканинах від закономірностей, притаманних обміну інших фізіологічнозначущих неорганічних іонів - Mg , K та Na .

У позаклітинному середовищі значення концентрації іонів Ca становить коло 1 мМ. Відповідно до багаточисельних даних, що були накопичені з використанням різноманітних Ca^{2+} -чутливих

флуоресцентних зондів, у стані спокою концентрація Ca^{2+} у цитоплазмі становить приблизно 100 нМ. При збудженні (при дії фізіологічно активних та/і фармакологічних речовин) ця концентрація збільшується до декількох сотень нМ, принаймні, не більше ніж до 1 мкМ (хоча значення локальної концентрації Ca^{2+} , особливо, у примембранних шарах, може бути і більшим). Таке підвищення концентрації цитоплазматичного Ca^{2+} , що має місце під дією збуджуючих факторів, відбувається внаслідок надходження іонів Са у клітину через плазматичну мембрану як результат активації різноманітних кальцієвих каналів, що ідентифіковані у цій субклітинній структурі, а також як наслідок викиду Ca^{2+} із головного внутрішньоклітинного кальцієвого депо – ендо(сарко)плазматичного ретикулума. Мітохондрії також здатні звільняти іони Са. Отже, при індукції підвищення концентрації вільного Са у цитоплазмі задіяні мембранозв'язані системи пасивного (енергонезалежного) транспорту цього катіону – кальцієві канали, а відновлення ж „статус-кво” по концентрації вільного Са у клітині - «релаксація» («термінація») кальцієвого транзйенту в середньому до рівня концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} (100 нМ), забезпечується функціонуванням так званих систем активного (енергозалежного) транспорту цього катіону. Такі системи ідентифіковані у плазматичній мембрані (тапсигаргіннечутлива Mg^{2+} , АТР-залежна кальцієва помпа, Na^{+} - Ca^{2+} -обмінник), ендо(сарко)плазматичному ретикулумі (тапсигаргінчутлива Mg^{2+} , АТР-залежна кальцієва помпа) та у мітохондріях (електрофоретичний Ca^{2+} -уніпортер). В цілому ж в першому наближенні є підстави вважати, що динаміка зміни внутрішньоклітинної концентрації іонів Са зумовлена суперпозицією енергонезалежних та енергозалежних кальцієвих потоків. Отже, цілком зрозуміло: вивчення енергонезалежних та енергозалежних Ca^{2+} -транспортуючих систем, а саме - їх властивостей (кінетичних, каталітичних, енергетичних), особливостей регуляції під

дією фізіологічно активних та фармакологічних речовин, а також функціональної ролі – це найважливіша проблема сучасної біохімії та біохімічної мембранології.

Але в останні роки стає все більш очевидним, що зазначена фундаментальна проблема повинна, безперечно, розглядатися у значно більш широкому аспекті. Виявляється, неможливо зрозуміти закономірності виникнення та реалізації кальцієвого сигналу («кальцієвого транзйєнту») у клітині, виходячи лише із знань щодо властивостей окремих ізольованих та реконструйованих Ca^{2+} -транспортуючих протеїнів. Дійсно, феномен прецизійного контролю внутрішньоклітинної концентрації іонів Са є комплексним («концертним!»). Іншими словами, у фундаментальному відношенні ми повинні сьогодні розглядати клітину будь-якої тканини (зокрема, і м'язової) як складну відкриту рецепторну нелінійну неадитивну кооперативну синергічну систему, для якої є властивою (щодо контролю внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу) низка позитивних та негативних регуляторних зворотних зв'язків, тобто як об'єкт дослідження у галузі системної біології.

Натомість, проблема внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу є вкрай важливою і в практичному відношенні. Дійсно, наразі є вагомй підстави стверджувати, що виникнення різноманітних небезпечних патологій (гіпертензія, порушення скоротливої функції скелетних, гладеньких та серцевого м'язів, діабет, гіпоксія/ішемія, різноманітні нейропатії, пухлинний ріст тощо) суттєво пов'язане із змінами у внутрішньоклітинному кальцієвому гомеостазі. Так, відомо, що при деяких патологічних станах можуть змінюватися експресія мембранозв'язаних протеїнів, що забезпечують пасивний та активний транспорт іонів Са, їхня функціональна активність, а також суто властивості (зокрема, кінетичні) та особливості регуляції Ca^{2+} -транспортувальних систем. Саме тому подальше систематичне та

всебічне вивчення мембранозв'язаних Ca^{2+} -транспортувальних протеїнів в нормі та за патологічних станів, зокрема, відпрацювання методології пошуку нових селективних оборотних високоафінних нетоксичних (малотоксичних) ефекторів (інгібіторів, активаторів) систем транспорту іонів Ca , дослідження механізмів дії зазначених речовин на трансмембранний кальцієвий обмін - це важливий етап у розробці сучасних фармакологічних підходів до лікування тяжких захворювань, що пов'язані із порушенням функціонування Ca^{2+} -транспортувальних систем та, відповідно, внутрішньоклітинного гомеостазу Ca^{2+} .

В цілому ж цілком очевидно, що проблема внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу - це „перехресна” (трансдисциплінарна) проблема, вирішення якої потребує залучення методів, гіпотез, теорій, уявлень, які є притаманними різним наукам біологічного та медичного циклу.

Така постановка питання цілком розповсюджується і на м'язову біохімію. Дійсно, на теперішній час абсолютно надійно доведена „лімітуюча” роль іонів Ca у контролі електро- та фармакомеханічного спряження у м'язах – скелетних, міокарді та гладеньких. Значною мірою має сенс таке формулювання проблеми: зрозуміти механізм м'язового скорочення – це, зокрема, пізнати й молекулярні та мембранні механізми контролю концентрації іонізованого Ca у міоплазмі.

Що ж стосується ідентифікації, властивостей та особливостей регуляції систем пасивного та активного транспорту іонів Ca саме у гладеньком'язових клітинах, функціональна активність яких контролюється багатьма факторами (катіонами, протонами H^+ , статевими та пептидними гормонами, розтягуванням тощо), то наші уявлення щодо цього потребують, безсумнівно, подальшого розвитку. Безперечно, певний дефіцит відповідних важливих фундаментальних

даних щодо трансмембранного обміну іонів Са в гладеньком'язових клітинах є суттєвою перешкодою на шляху розробки нових фармакологічних препаратів з метою корекції порушень скоротливої активності гладеньких м'язів за патологічних станів. У зазначеному контексті маємо, як мінімум, три важливі проблеми. 1). Потребують активного розвитку подальші дослідження із надійної ідентифікації окремих мембранозв'язаних Ca^{2+} -транспортувальних систем у субклітинних мембранних структурах гладеньком'язових клітин; 2). Необхідним є ґрунтовне та всебічне вивчення властивостей цих систем (кінетичних, ензиматичних, енергетичних, їхньої чутливості до дії різноманітних фізико-хімічних факторів та ефекторів), біохімічних закономірностей їхньої регуляції метаболічними чинниками; 3). Суттєвим є питання щодо розуміння загальних принципів, що покладені в основу узгодженого ефекту, налаштованого на підтримання кальцієвого гомеостазу в гладеньком'язових клітинах, із урахуванням вельми своєрідної системи позитивних та негативних зворотних зв'язків (Ca^{2+} -залежна інактивація кальцієвих каналів плазматичної мембрани, Ca^{2+} -індукований викид іонів Са із саркоплазматичного ретикулума, депо-кероване надходження іонів Са у міоцити, функціонування циклоспоринчутливої мітохондріальної пори перехідної провідності тощо). В цілому ж можна стверджувати, що кооперативні, нелінійні, неадитивні синергічні ефекти, які скоординовані та узгоджені у просторі та часі і є властивими для феномену внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу в гладеньком'язових клітинах, віддзеркалюють злагоджене сукупне („концертне”!) суперпозиційне функціонування різних мембранозв'язаних систем активного (первинного, вторинного) та пасивного транспорту іонів Са в клітині гладенького м'язу як в складній рецепторній тензоелектрохімічній системі.

Серед гладеньком'язових органів матці - об'єкту експериментальних досліджень авторів цієї монографії - належить особливе значення, з огляду на її унікальну роль в організмі. Подальше дослідження біохімічних механізмів Ca^{2+} -залежного контролю скорочення-розслаблення матки – це шлях не лише до пізнання особливостей спряження процесів збудження та скорочення у міометрії, але й до розуміння закономірностей порушень нормального функціонування його у випадку різноманітних патологічних станів (мова йде, наприклад, за слабкість пологової діяльності, гіпо- та гіпертонус матки, невиношування плоду, викидні, передчасні пологи тощо).

Сучасні уявлення щодо іонних, молекулярних та мембранних механізмів регуляції концентрації іонів Са в клітинах гладеньких м'язів були нещодавно узагальнені нами в монографії: *С.О. Костерін, Л.Г. Бабіч, С.Г. Шликов, Ю.В. Данилович, Т.О. Векліч, Ю.Ю. Мазур «Біохімічні властивості та регуляція Ca^{2+} -транспортувальних систем гладеньком'язових клітин». 2016 р. Київ. «Наукова Думка». 210 с.*

У гладенькі м'язи Ca^{2+} потрапляє до цитоплазми з позаклітинного простору через плазматичну мембрану або з внутрішньоклітинних Ca^{2+} депо (саркоплазматичний ретикулум, мітохондрії) за рахунок його пасивного транспорту за хімічним градієнтом. Основними системами енергозалежного видалення Ca^{2+} з цитозолу (термінація кальцієвого сигналу) є $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза плазматичної мембрани, $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза СР, Na^{+} - Ca^{2+} -обмінник плазматичної мембрани та Ca^{2+} -уніпортер мітохондрій [1, 2, 3, 4].

Важливу роль у забезпеченні скорочення-розслаблення м'язових клітин, зокрема гладеньком'язових, відіграють Mg^{2+} -залежні АТР-гідролазні ензиматичні системи [1, 2, 4, 5, 6, 7].

В плазматичній мембрані, яка має селективну проникність для різноманітних речовин, міститься ряд Mg^{2+} -залежних АТРаза, котрі забезпечують внутрішньоклітинний іонний гомеостаз. До них належать: транспортна Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРаза (КФ 3.6.3.8), яка забезпечує активний Mg^{2+} , АТР-залежний транспорт Ca^{2+} в позаклітинне середовище [8, 5, 10, 11]; убаїнчутлива Na^+, K^+ -АТРаза (КФ 3.6.3.9), яка здійснює енергозалежне протилежно спрямоване перенесення іонів Na та K (співвідношення 3:1) із клітини та в клітину відповідно [12, 13, 14, 15, 16]; убаїнрезистентна “базальна” Mg^{2+} -АТРаза, яка причетна до регуляції концентрації протонів у позаклітинному та внутрішньоклітинному просторах [17, 18, 19, 20].

Порушення скоротливої функції міометрія у жінок часто стає причиною різноманітних патологій: слабкості пологової діяльності, спонтанних абортів, передчасних пологів, викидней, атонії, гіпо- і гіпертонусу матки [21, 22, 23, 24, 25, 26]. Частота передчасних пологів у світі за середніми даними складає 9,6 % [27, 28, 29]. Зазвичай такі патології обумовлені порушеннями у функціонуванні мембранозв'язаних систем переносу катіонів. Тому перспективним є пошук сполук, які були б здатні модифікувати скоротливу функцію міометрія у випадку зазначених патологічних станів і водночас були б нетоксичними для організму.

Спрямований синтез та вивчення властивостей ефекторів, які здатні проникати через плазматичну мембрану та оборотно з високою спорідненістю та селективністю змінювати ензиматичну чи транспортну активність окремих внутрішньоклітинних мембранозв'язаних та цитоплазматичних протеїнів – одна із найважливіших задач сучасної біоорганічної, біофізичної та біологічної хімії. Дійсно, створення нових високоефективних нетоксичних селективних інгібіторів та активаторів є вкрай необхідним, зокрема, для подальшого дослідження іонних, молекулярних та мембранних

механізмів внутрішньоклітинної сигналізації. У галузі біохімії та біофізики м'язів це суттєво для з'ясування закономірностей такого унікального біологічного феномену, як електро- та фармакомеханічне спряження, вивчення ролі Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , а також протонів H^+ у його забезпеченні. В практичному ж аспекті такі розробки є основою для пошуку нових фармакологічних препаратів, здатних ефективно модифікувати функціональну активність конкретних протеїнів у випадку її порушення за патологічних станів.

У цьому аспекті, зокрема, являють інтерес каліксарени – чашоподібні макроциклічні сполуки, які легко з високими виходами отримуються шляхом циклоконденсації пара-заміщених фенолів і формальдегіду. Ці сполуки володіють противірусними, бактерицидними, протипухлинними та антитромботичними властивостями і можуть бути ефективними інгібіторами та активаторами ензиматичних, регуляторних, рецепторних та транспортних мембранозв'язаних протеїнів [30, 31, 32, 33, 34, 35]. Властивості каліксаренів як інгібіторів ензимів з початком XXI століття привертають все більшу увагу вчених (хоча історія хімії цих супрамолекулярних сполук налічує понад 50 років). Існує велика кількість даних, які підтверджують можливість створення на основі каліксаренів рецепторів, іонних каналів, ДНК-чипів, штучних ензимів тощо. Щодо блокаторної та інгібіторної дії каліксаренів, то в науковій літературі є приклади, які доводять ефективність інгібування каліксаренами потенціалзалежних аніонних каналів, лужної фосфатази [36]. Є дані про те, що каліксарени здатні проникати в клітину через плазматичну мембрану [37]. Унікальна будова та властивості молекул каліксаренів дозволяють спрямовано модифікувати їх структуру (використовуючи різні функціональні групи на верхньому та нижньому вінцях молекули), а отже, пошук нових інгібіторів ензимів тільки розпочато. Потрібно відзначити, що каліксаренам притаманна низька

токсичність [38, 39, 40, 41] та імуногенність [42, 43], а також доступний синтез та низька вартість.

В цій частині монографії (розділи 3 - 5) описані результати наших досліджень впливу каліксаренів на ензиматичні та катіон-транспортувальні активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани і саркоплазматичного ретикулуму, Na^+, K^+ -АТРази та Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани, а також на систему транспорту іонів Са в мітохондріях у випадку гладеньком'язових клітин матки.

РОЗДІЛ 3. Mg^{2+} ,АТР-ЗАЛЕЖНА Ca^{2+} -ПОМПА ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ ТА КАЛІКСАРЕНИ

Єдиним високоафінним щодо Ca^{2+} протеїном у системі видалення Ca^{2+} із міоплазми у клітинах ссавців є Mg^{2+} ,АТР-залежна Ca^{2+} -помпа ($\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза, КФ 3.6.1.38) плазматичної мембрани [1]. Цей ензим відіграє ключову роль у клітинному Ca^{2+} гомеостазі, сигнальній трансдукції, а, у випадку гладеньком'язових клітин, і в регуляції процесів скорочення/розслаблення. Порушення функціонування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани, пов'язані зі змінами рівня експресії або модифікаціями протеїну, обумовлюють ряд серцевосудинних захворювань, включаючи розлади у гострій формі, такі як ішемія та серцевий напад, а також повільно прогресуючі патології: гіпертензія, діабет, старіння, хвороба Альцгеймера. Зміни функціонування Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани у випадку захворювань віддзеркалюють важливу роль зазначеного протеїну в гомеостазі Ca^{2+} як у збудливих, так і в незбудливих клітинах [2, 3]. Окрім зазначеного протеїну клітини ссавців мають інші системи, які можуть знижувати концентрацію Ca^{2+} у цитозолі збуджених міоцитів: Ca^{2+} -помпа саркоплазматичного ретикулума, що забезпечує накопичення Ca^{2+} у люмені ретикулума; $\text{Na}^+, \text{Ca}^{2+}$ -обмінник

плазматичної мембрани – видаляє Ca^{2+} з клітини, але має низьку спорідненість до нього [4, 5, 6, 7]. Важливе значення має також і мітохондріальний Ca^{2+} , H^+ -обмінник завдяки високій Ca^{2+} ємності цієї органели [8] та її безпосередній асоціації з саркоплазматичним ретикуломом [9]. Рівень експресії Ca^{2+} -транспортуючих протеїнів та тип їхньої регуляції варіює залежно від типу клітин, етапу їх розвитку, функцій або патологічного процесу.

Для визначення специфічної фізіологічної ролі Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани важливо вивчити її властивості, регуляцію та взаємодію з іншими протеїнами. На сьогодні одним з найбільш популярних методів вивчення функціональної ролі Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани є молекулярно-генетичні підходи. Однак, оскільки Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза плазматичної мембрани присутня у мембранні в незначній кількості, існує методологічна проблема отримати високий рівень її експресії одночасно з «правильним» (фізіологічним) вбудовуванням в плазматичну мембрану [10, 11]. Окрім того, існує тісний функціональний взаємозв'язок Ca^{2+} -регуляторних систем, внаслідок чого Ca^{2+} -транспортери та Ca^{2+} -сенсори також відповідають зміною власної експресії чи активності у випадку появи додаткових транскриптів Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани у клітині [12]. Через це важливим є розвиток альтернативного методу вивчення Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани, а саме розробка фармакологічних препаратів, які б дозволяли селективно та афінно змінювати активність ензиму, таким чином уникаючи надлишкових та компенсаторних ефектів, пов'язаних з генетичними маніпуляціями.

Очевидно також, що використання високоспецифічних ефекторів до мембранозв'язаних систем видалення іонів Ca з цитозолу дозволить вивчати біохімічні механізми електро- і фармакомеханічного спряження у м'язах, у тому числі у гладеньких м'язах. Це має особливий інтерес, оскільки дозволить з'ясовувати порушення у

системах обміну Ca^{2+} при виникненні ряду патологій гладеньких м'язів, таких як артеріальна гіпертензія, ішемія, інфаркт [13], нетримання сечі, погіршення проходження травних мас через кишковик [14]. Важливими є дослідження функціональних шляхів підтримання низької концентрації Ca^{2+} в міоцитах в сфері захворювань гладеньких м'язів матки, оскільки це дозволить краще розуміти фізіологію вказаного органу та розробити успішні підходи у діагностиці та лікуванні таких репродуктивних порушень, як передчасні пологи, дисменорея, тривалі пологи та слабка скоротлива активність матки (дистоція) [15]. Розуміння фізіології скорочення та розслаблення на молекулярному та клітинному рівні у нормі дозволить спрямовано регулювати активність матки у випадку виникнення відповідних порушень. На жаль, на сьогодні не відомі низькомолекулярні специфічні і афінні ефектори Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани, які б використовувалися у фундаментальних дослідженнях скоротливої функції міометрія або в клінічній практиці.

Для застосування у медичних цілях останніми роками активно вивчаються каліксарени – макроциклічні сполуки фенолів, з'єднані метиленовими та сульфурними групами в 2 та 6 позиціях [16]. Такі структурні особливості каліксаренів, як стерична гнучкість, варіативна кількість гідрофобних порожнин, здатність специфічно розпізнавати сполуки та утворювати комплекси, роблять їх перспективними для дизайну нових лікарських препаратів [17, 18, 19, 20]. На сьогодні описано багато біологічних властивостей каліксаренів: антивірусні, антибактеріальні, протипухлинні, антитромботичні, вони використовуються як транспортери лікарських препаратів [18]. Беззаперечними перевагами каліксаренів є низька вартість та простота синтезу, можливість отримання продукту високого ступеня очистки. Практичне використання каліксаренів у біомедичній практиці також є досить перспективним з точки зору низької токсичності

молекул, оскільки каліксарени не показали жодної активності в тесті Амеса [18, 21]. Саме тому академіком НАНУ С.О. Костеріним було висловлено припущення, що каліксарени можуть бути ефективно використані у якості ефекторів мембранозв'язаних іон-транспортуючих АТРазних систем, зокрема Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ [22]. У досліджах, які описано нижче, приймали участь к.б.н. О.А. Шкрабак, к.б.н.О.В. Бевза та к.б.н. Ю.В. Мазур.

3.1. ДІЯ КАЛІКС[4]АРЕНУ C-90 НА АКТИВНІСТЬ АТР-ГІДРОЛАЗ ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВИХ КЛІТИН.

У наших дослідках середнє значення питомої активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРazi плазматичної мембрани становить $3,4 \pm 0,3$ мкмоль P_i /мг протеїну за 1 год, Na^+, K^+ -АТРazi плазматичної мембрани - $10,2 \pm 0,7$ мкмоль P_i /мг протеїну за 1 год, а „базальної” Mg^{2+} -АТРazi плазматичної мембрани - $18,1 \pm 1,2$ мкмоль P_i /мг протеїну за 1 год ($M \pm m$; $n = 7$). Значення середньої питомої активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРazi, солюбілізованої з плазматичної мембрани, становило $83,8 \pm 7,4$ мкмоль P_i /мг протеїну за 1 год ($M \pm m$; $n = 7$).

Препарат очищеної транспортної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРazi було одержано із плазматичних мембран клітин міометрія свині за допомогою методу афінної хроматографії на кальмодулін-сефарозі 4В, як описано [23]. Реконструкцію очищеного та солюбілізованого ензиму до азолектинових ліпосом проводили методом холатного діалізу [24].

Фракцію плазматичних мембран гладеньком'язових клітин матки виділяли з міометрія свині, як було описано раніше [25, 26].

Вміст білка в мембранній фракції визначали методом M. Bredford [27] із використанням реакції з реактивом Кумасі – G250.

Загальну АТРазну активність визначали у фракції плазматичних мембран клітин міометрія при 37°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 (інгібітор АТРazi мітохондрій [28]), 1 убаїн (селективний інгібітор Na^+, K^+ -АТРazi [29, 30]), 0,1 мкМ тапсигаргін (селективний інгібітор $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРazi ендо(сарко)-плазматичного ретикулуму [28]) і 0,1 % дигітонін (фактор перфорації плазматичної мембрани [31]). 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. При вивченні впливу різних концентрацій іонів Са на активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази необхідні концентрації зазначеного катіону також задавали шляхом комп'ютерного розрахунку із використанням зазначеної програми. Кількість протеїну мембранної фракції в пробі – 20-30 мкг. Час інкубації – 5 хв. Ензиматичну реакцію ініціювали введенням до середовища інкубації аліквоти (50 мкл) суспензії плазматичних мембран, а зупиняли - додаванням до інкубаційної суміші 1 мл “стоп”-розчину наступного складу: 1,5 М натрій оцтовокислий, 3,7 % формальдегід, 14 % етанол, 5 % ТХУ, рН 4,3 (при 8 °С). Кількість продукту реакції P_i визначали за методом W. Rathbun et V. Betlach [32].

$\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазну активність розраховували по різниці між величинами АТРазних активностей за присутності та відсутності в середовищі інкубації екзогенних іонів Са (на фоні присутності 1 мМ ЕГТА – специфічного хелатора іонів Са).

В результаті попередніх скринінгових досліджень щодо впливу калікс[4]аренів на Mg^{2+} -залежні АТР-гідролазні активності у фракції плазматичних мембран клітин міометрія ми встановили, що саме калікс[4]арен С-90 (5,11,17,23-тетра(трифтор)метил-(фенілсульфоніліміно)метиламіно-25,26,27,28-тетра-пропоксикалікс[4]арен) в концентрації 100 мкМ ефективно пригнічує $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазну активність до рівня $25,1 \pm 0,5$ % відносно контрольного значення (прийнятого за 100 %) ($M \pm m$; $n = 5$) (рис. 3.1).

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

У той же час ця сполука, що була використана у такій ж самій концентрації, практично не впливала на ензиматичні активності Na^+, K^+ -АТРази і “базальної” Mg^{2+} -АТРази плазматичних мембран: відповідні

активності становили $94,2 \pm 0,6$ і $107,7 \pm 1,0$ % щодо контрольного значення (рис. 3.1). Чутлива до дії протонифору CCCP акумуляція іонів Ca в мітохондріях міометрія виявилася практично резистентною до дії зазначеного калікс[4]арену [22].

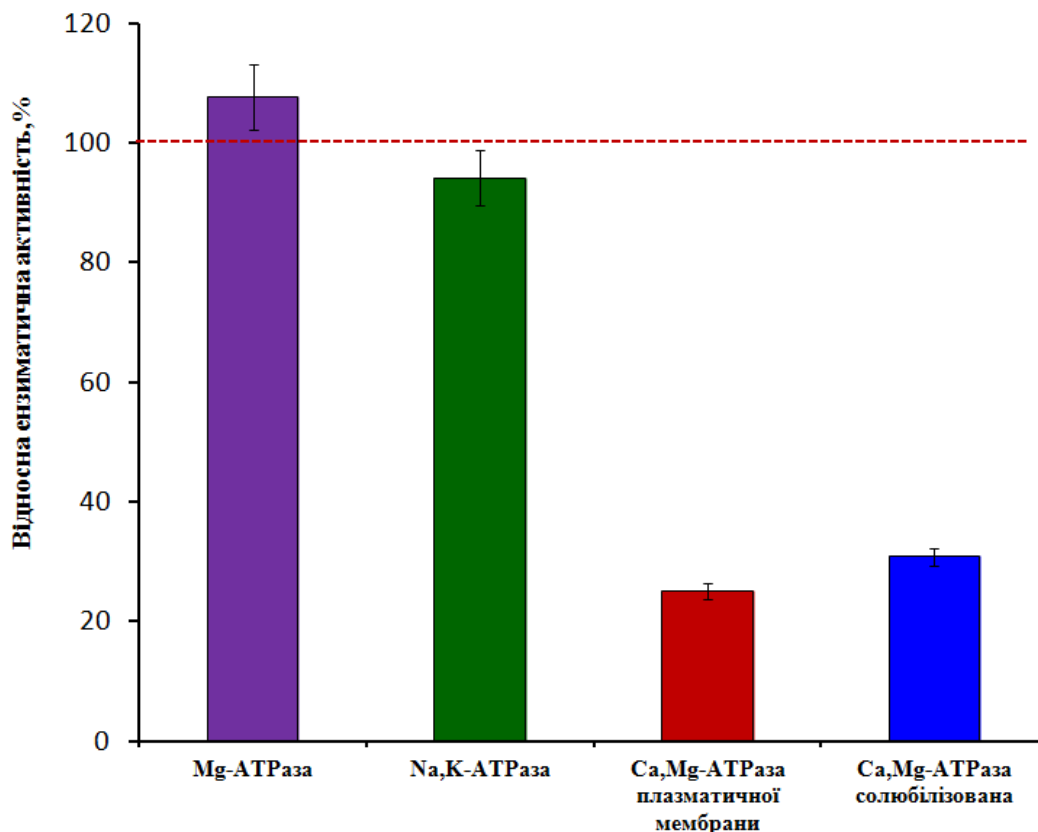


Рис. 3.1. Вплив калікс[4]арену C-90 (100 мкМ) на АТФ-гідролазні активності в плазматичних мембранах клітин міометрія ($M \pm m$, $n = 5$)
За 100 % прийнято значення питомих ензиматичних активностей у відсутності калікс[4]арену C-90 у середовищі інкубації

Таким чином, калікс[4]арен C-90 використаний у концентрації 100 мкМ, ефективно інгібував активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази як у фракції плазматичної мембрани міоцитів матки, так і у випадку препарату очищеної солюбілізованої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази. При цьому він майже не впливав на активність інших АТФ-гідролаз плазматичної мембрани. Отже, калікс[4]арен C-90 селективно пригнічує активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани, не впливаючи на активності Na^+, K^+ -АТРази і Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани.

У наших подальших дослідженнях, ми вивчали концентраційну залежність інгібуючої дії калікс[4]арену С-90 (10^{-8} – 10^{-4} М) на активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази у фракції плазматичної мембрани (рис. 3.2А).

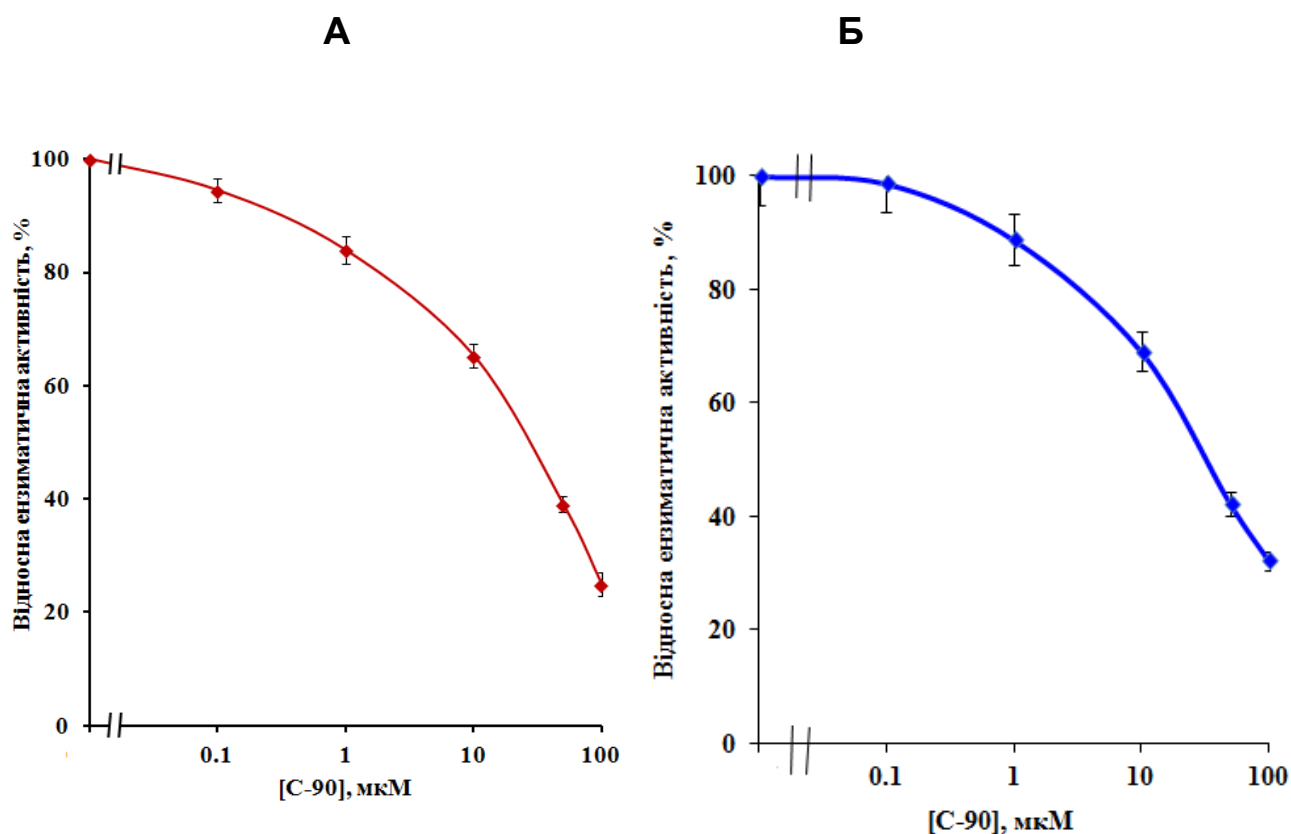


Рис. 3.2. Концентраційні залежності дії калікс[4]арену С-90 на ензиматичну активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази у випадку фракції плазматичної мембрани клітин міометрія (А) і препарату очищеної солюбілізованої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази (Б) ($M \pm m$, $n = 5$)

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

Було показано, що калікс[4]арен С-90 ефективно та дозозалежно пригнічує $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазну активність, величина коефіцієнта інгібування $I_{0,5}$ складає $20,2 \pm 0,5$ мкМ, значення коефіцієнта Хілла n_H становило $0,55 \pm 0,02$ ($M \pm m$; $n = 5$) (таблиця 3.1). Аналогічно калікс[4]арен С-90 дозозалежно пригнічував АТР-гідролазну активність у випадку препарату очищеної солюбілізованої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази (рис.

3.2Б), величина $I_{0,5}$ складала $34,6 \pm 6,4$ мкМ, значення $n_H = 0,67 \pm 0,05$ ($M \pm m$; $n = 5$) (таблиця 3.1).

Таблиця 3.1.

Кінетичні характеристики дії калікс[4]арену С-90 на питому ензиматичну активність Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРази у випадку фракції плазматичних мембран клітин міометрія і препарату очищеної солюбілізованої Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРази ($M \pm m$; $n = 5$).

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

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

Подібні значення коефіцієнта інгібування $I_{0,5}$ та та коефіцієнта Хілла n_H у випадку дії калікс[4]арену С-90 на ензиматичну активність Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани як солюбілізованої, так і в препараті везикул плазматичних мембран, можуть свідчити на користь

того, що мембранне оточення не відіграє вирішальної ролі у реалізації інгібіторного ефекту зазначеного калікс[4]арену. Це не виключає можливості того, що зазначена сполука діє на АТРазу з боку її трансмембранного домену.

3.2. ДІЯ СТРУКТУРНИХ КОМПОНЕНТІВ КАЛІКС[4]АРЕНУ C-90 НА АКТИВНІСТЬ Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВИХ КЛІТИН

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

На основі структурних формул калікс[4]аренів (рис. 3.3) можемо бачити, що калікс[4]арен C-150 не містить жодних додаткових хімічних угруповань на верхньому вінці макроциклу, тобто, по відношенню до досліджуваного калікс[4]арену C-90, він дійсно є суто “каліксареновою чашею”.

Сполука М-1 містить один фенольний фрагмент та сульфониламідинову групу, аналогічну до таких, які присутні на верхньому вінці молекули калікс[4]арену C-90.

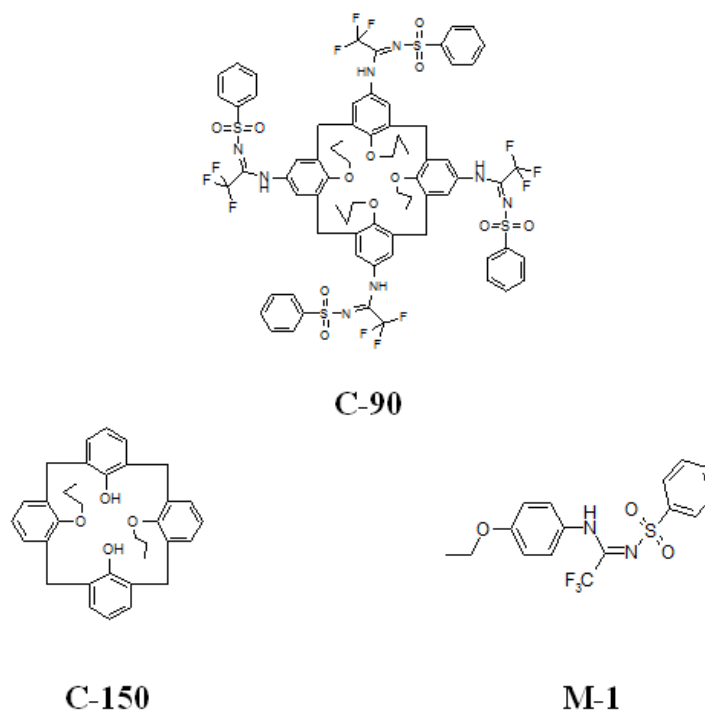


Рис. 3.3. Структурні формули калікс[4]аренів C-90, C-150 та модельної сполуки M-1

Як виявилось, структурний фрагмент C-150 (суто «калікс[4]аренова чаша»), використаний у концентрації 100 мкМ, здатний незначно (на $13,0 \pm 1,8$ %) знижувати $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазну активність ($M \pm m$; $n = 5$). Модельна сполука M-1 у концентрації 100 мкМ пригнічує $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазну активність лише на $9,3 \pm 2,4$ %, а використання цього фрагменту у концентрації 400 мкМ (адже у складі молекули калікс[4]арену C-90 маємо 4 фрагменти M-1) приводить до інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності також незначно - на $12,5 \pm 1,7$ % відносно контрольного значення ($M \pm m$; $n = 5$) (рис. 3.4).

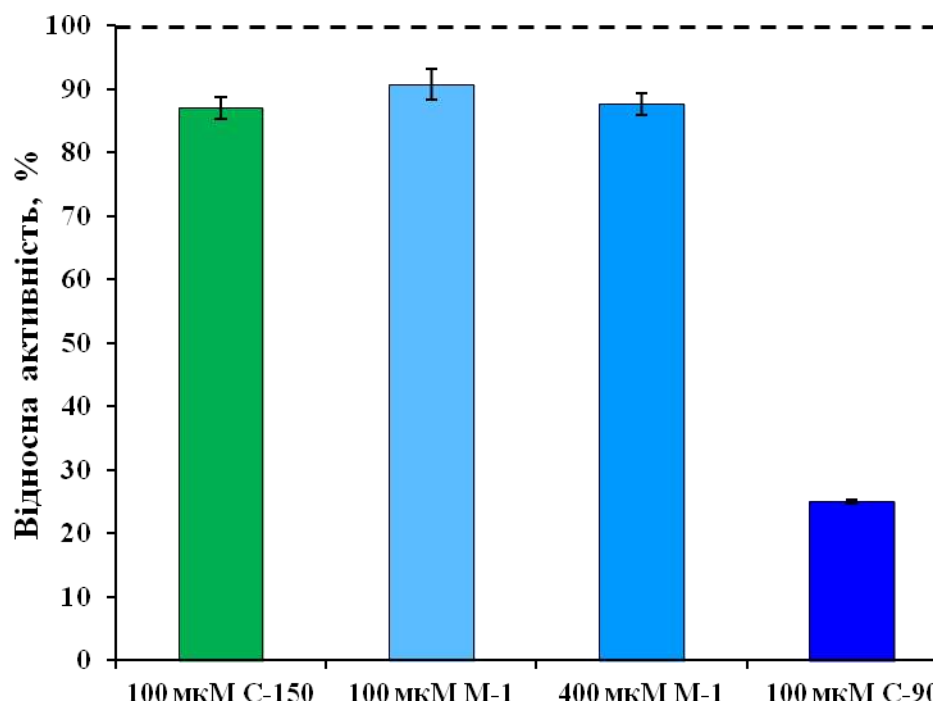


Рис. 3.4. Ензиматична активність транспортної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази у фракції плазматичних мембран клітин міометрія за дії калікс[4]аренів C-90, C-150 і модельної сполуки M-1 ($M \pm m$, $n = 5$)

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

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

3.3. ЗАЛЕЖНІСТЬ ІНГІБІТОРНОЇ ДІЇ КАЛІКС[4]АРЕНУ C-90 НА АКТИВНІСТЬ $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВИХ КЛІТИН ВІД ЙОГО СТРУКТУРИ

Отже, калікс[4]арен C-90 виявляє ознаки селективності у своїй інгібіторній дії на $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазну активність плазматичної

мембрани клітин міометрія. У подальшому ми вивчали структурні особливості калікс[4]арену С-90, які є важливими для формування його інгібіторного впливу на ензиматичну активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани.

Щоб з'ясувати значення, для інгібіторного ефекту, кількості та розташування фенілсульфоніламідинових груп верхнього вінця молекули калікс[4]арену С-90, ми вивчали дію калікс[4]аренів С-716, С-772 та С-957 на ензиматичну активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани. Ці три аналоги подібні за своєю структурою до калікс[4]арена С-90. Як видно із структурних формул, калікс[4]арен С-957 (5,11,7-три(трифтор)метил(фенілсульфоніліміно)метиламіно-23-*трет*-бутил-26,28-дигідрокси-25,27-дипропоксикалікс[4]арен) має три фенілсульфоніламідинові групи на верхньому вінці калікс[4]аренової чаші, а на четвертому фенольному кільці міститься *трет*-бутильна група (рис. 3.5). Молекули калікс[4]аренів С-716 (5,17-ди(трифтор)метил(фенілсульфоніліміно)метиламіно-11,23-дитретбутил-25,27-дипропокси-калікс[4]арен) та С-772 (5,11-ди(трифтор)метил(фенілсульфоніліміно)-метиламіно-17,23-*трет*бутил-26,27-дипропосікалікс[4]арен), на відміну від молекули калікс[4]арену С-90, мають лише по дві фенілсульфоніламідинові групи на верхньому вінці (рис. 3.5). Ці 2 сполуки є регіоізомерами. У випадку калікс[4]арену С-716 фенілсульфоніламідинові групи знаходяться на протилежних фенольних кільцях калікс[4]аренової «чаші», тоді як у випадку калікс[4]арену С-772 фенілсульфоніламідинові групи знаходяться на сусідніх кільцях. В *пара*-положеннях інших фенольних кілець калікс[4]аренів С-716 та С-772 замість фенілсульфоніламідинових груп, знаходяться *трет*-бутильні залишки.

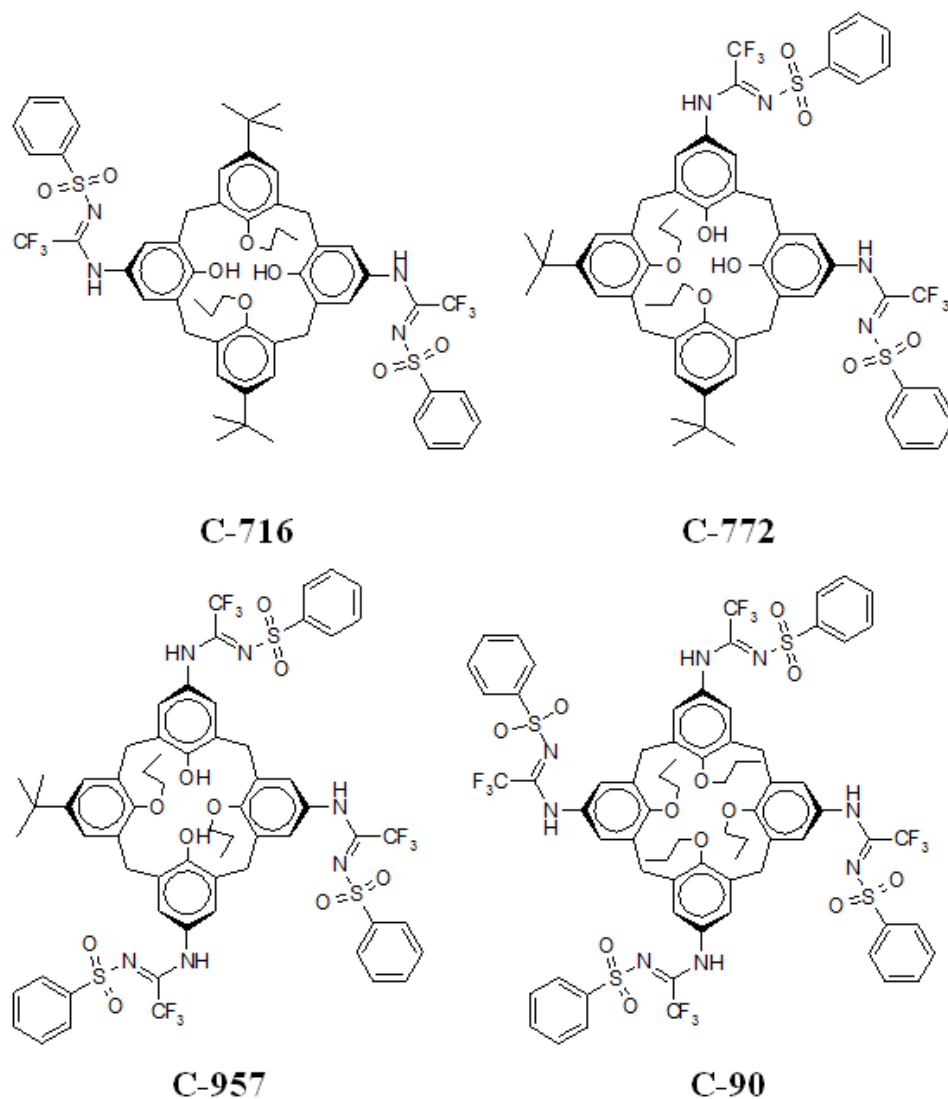


Рис. 3.5. Структурні формули калікс[4]арену C-90 та його структурних аналогів: C-716, C-772 та C-957

Необхідно відмітити, що структура нижнього вінця калікс[4]аренів C-716, C-772 та C-90 також відрізняється за кількістю та взаємним розташуванням пропоксигруп, проте, як ми показали [33], визначальною для прояву інгібіторних властивостей щодо Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани є саме модифікація верхнього вінця калікс[4]арена.

Ми встановили, що калікс[4]арени C-772, C-716, C-957 та C-90 (використані в концентрації 100 мкМ) з різним ступенем ефективності

пригнічують ензиматичну активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани: на $45,9 \pm 0,6$, $61,5 \pm 1,9$, $68,8 \pm 0,6$ та $75,0 \pm 0,9$ % відносно контрольного значення відповідно ($M \pm m$; $n = 5$) (рис. 3.6).

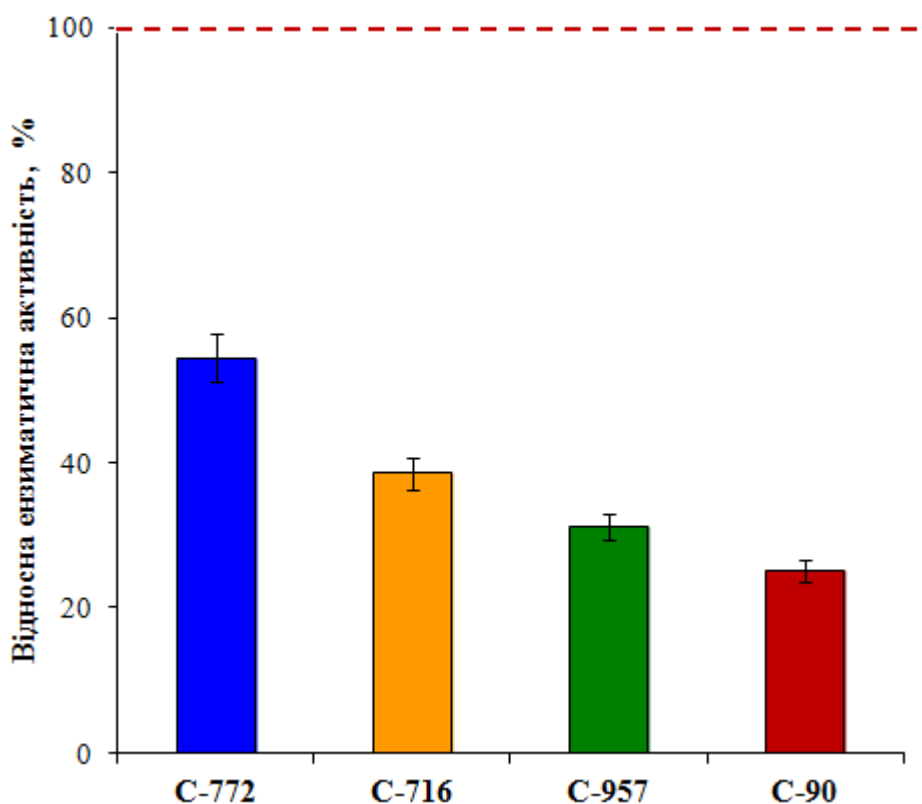


Рис. 3.6. Вплив калікс[4]аренів C-772, C-716, C-957 і C-90 (100 мкМ) на питому ензиматичну активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази у фракції плазматичної мембрани клітин міометрія ($M \pm m$; $n = 5$)
За 100 % прийнято значення питомої ензиматичної активності у відсутності калікс[4]аренів у середовищі інкубації

Отже, інгібіторний ефект калікс[4]аренів C-772, C-716, C-957 і C-90 зростає із збільшенням кількості фенілсульфоніламідинових груп на верхньому вінці калікс[4]аренової чаші. Для визначення кінетичних параметрів, а саме - коефіцієнта інгібування $I_{0,5}$ та коефіцієнта Хілла n_H , ми дослідили дію цих каліксаренів у широкому діапазоні концентрацій калікс[4]аренів: від 10^{-8} до 10^{-4} М. Було показано, що калікс[4]арени C-772, C-716, C-957 і C-90 дозозалежно гальмують

ензиматичну активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани з різною ефективністю (рис. 3.7).

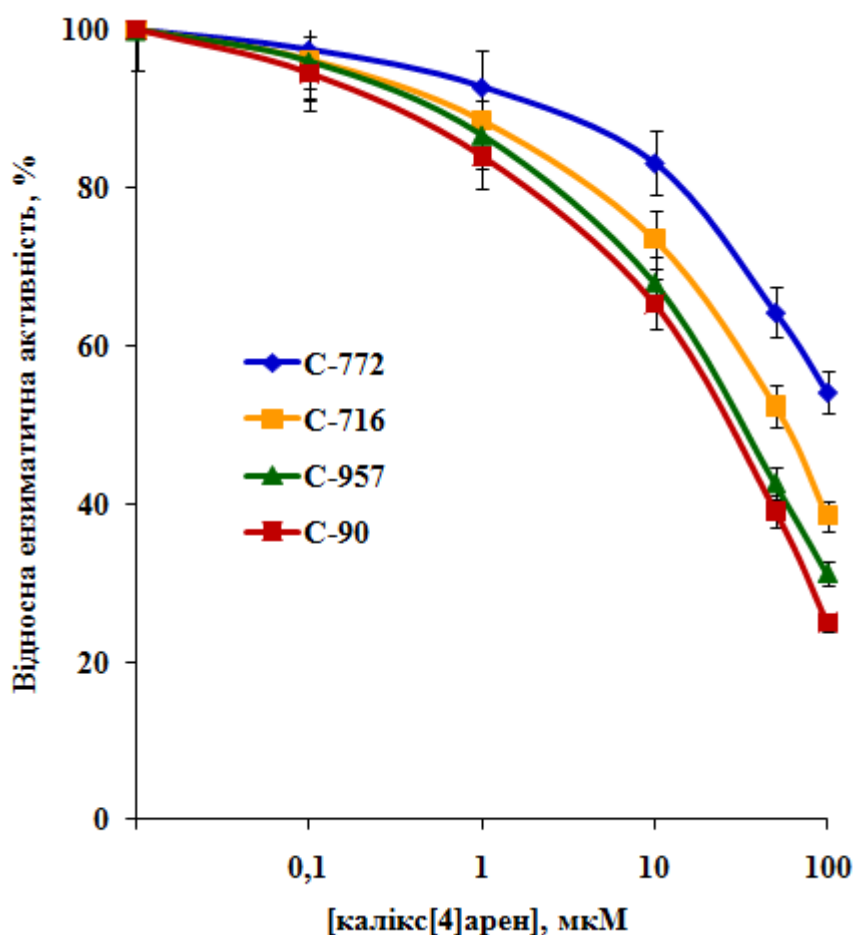


Рис. 3.7. Концентраційні залежності впливу калікс[4]аренів C-772, C-716, C-957 та C-90 на активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази у фракції плазматичних мембран клітин міометрія ($M \pm m$, $n = 5$)

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

З отриманих концентраційних залежностей були розраховані кінетичні параметри, що характеризують ефективність інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності відповідними калікс[4]аренами (таб. 3.2).

Т а б л и ц я 3.2.

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

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

Згідно з результатами, наведеними в таблиці 3.2, калікс[4]арен С-957, в якому наявні три фенілсульфоніламідінові групи, має коефіцієнт інгібування $29,2 \pm 0,9$ мкМ, тобто вищий за відповідний коефіцієнт для калікс[4]арена С-90. А калікс[4]арени С-716 та С-772, які містять по дві фенілсульфоніламідінові групи, є ще менш ефективними інгібіторами $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності плазматичної мембрани, оскільки їхні коефіцієнти інгібування ($53,4 \pm 3,6$ мкМ та 165 ± 20 мкМ) ще вищі, ніж у випадку калікс[4]арену С-957. Таким чином, порівнюючи кінетичні

параметри інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності вказаними чотирма калікс[4]аренами, можна зробити наступний висновок: ефективність інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності калікс[4]аренами зростає зі збільшенням кількості фенілсульфоніламідінових груп на верхньому вінці даних калікс[4]аренів.

Втім, необхідно відмітити, що на підставі порівняння структури калікс[4]аренів С-716 та С-772, які є регіо-ізомерами і відрізняються за положенням фенілсульфоніламідінових груп, та їх інгібіторної ефективності, можна стверджувати: розташування вищевказаних груп на верхньому вінці калікс[4]аренів також відіграє суттєве значення у інгібуванні $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності (таб. 3.2, рис. 3.5). У випадку розташування фенілсульфоніламідінових груп на протилежних фенольних циклах калікс[4]арену С-716 ефективність інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності є більшою, ніж у випадку розташування фенілсульфоніламідінових груп на сусідніх фенольних кільцях калікс[4]арену С-772. Можливо, у даному випадку важливою є відстань між фенілсульфоніламідіновими залишками для забезпечення комплементарної взаємодії з чітко детермінованими хімічними групами відповідного сайту взаємодії з $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазою плазматичної мембрани на її поверхні.

Так як калікс[4]арени С-957, С-716 та С-772, на відміну від калікс[4]арену С-90, мають *трет*-бутильні групи, не можна було нехтувати припущенням про те, що існує можливість зниження ефективності інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності саме за рахунок впливу цих груп. Тому у подальшому ми використали калікс[4]арен С-960 (5,17-ди(трифтор)метил(фенілсульфоніліміно)метиламіно-26,28-дигідроксі-25,27-дипропоксикалікс[4]арен) (рис. 3.8) з меншою кількістю фенілсульфоніламідінових груп, але без *трет*-бутильних залишків на верхньому вінці калікс[4]аренового макроциклу для визначення впливу на активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної плазматичної мембрани.

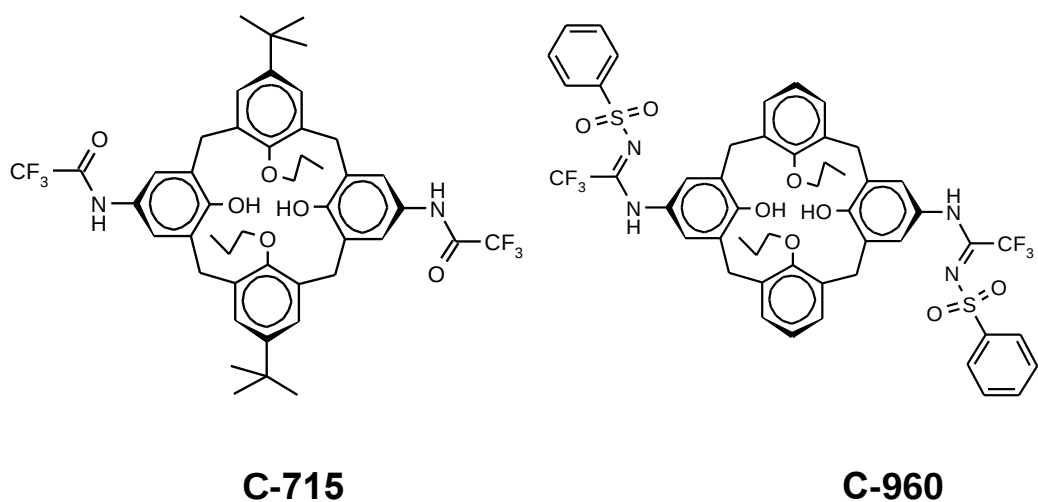


Рис. 3.8. Структурні формули калікс[4]аренів C-715 та C-960

Даний калікс[4]арен містить два фенілсульфоніламідинові залишки на протилежних фенольних фрагментах верхнього вінця, і відрізняється від калікс[4]арену C-716 лише відсутністю *трет*-бутильних груп (рис. 3.8).

Як показали результати експериментів, калікс[4]арени C-715, C-716 та C-960, використані у концентрації 100 мкМ, пригнічують активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани на $20,7 \pm 0,9$, $61,9 \pm 1,9$ та $59,7 \pm 0,5$ % відносно контрольного значення відповідно ($M \pm m$; $n = 5$) (рис. 3.9). Усі три аналоги слабкіше пригнічують досліджувану активність, ніж калікс[4]арен C-90 (пригнічує на $75,0 \pm 0,9$ % відносно контрольного значення).

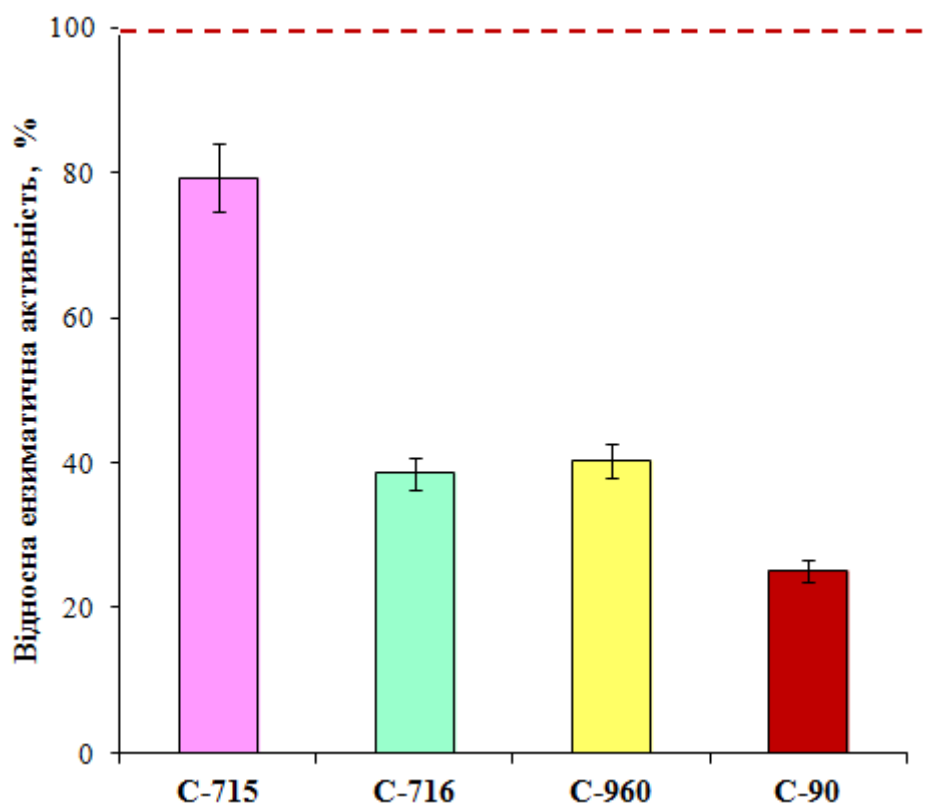


Рис. 3.9. Вплив калікс[4]аренів C-715, C-716, C-960 і C-90 (100 мкМ) на питому ензиматичну активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази у фракції плазматичних мембран клітин міометрія ($M \pm m$; $n = 5$)
За 100 % прийнято значення питомої ензиматичної активності у відсутності калікс[4]аренів у середовищі інкубації

Надалі ми досліджували дію вказаних вище калікс[4]аренів у більш широкому діапазоні концентрацій: від 10^{-8} до 10^{-4} М. Було показано, що калікс[4]арени C-715, C-716, C-960 і C-90 дозозалежно гальмують ензиматичну активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани з різною ефективністю (рис. 3.10). Необхідно відмітити, що дія калікс[4]аренів C-716 та C-960 на активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани практично не відрізняється. Більше того – коефіцієнти інгібування вказаного ензиму ($53,4 \pm 3,6$ мкМ та $50,0 \pm 0,5$ мкМ відповідно для калікс[4]аренів C-716 та C-960) не мають статистично достовірної різниці (таб. 3.2) ($M \pm m$; $n = 5$). Це свідчить про те, що наявність *трет*-бутильних залишків не впливає на ефективність

інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани у випадку використання калікс[4]аренів С-716 та С-960.

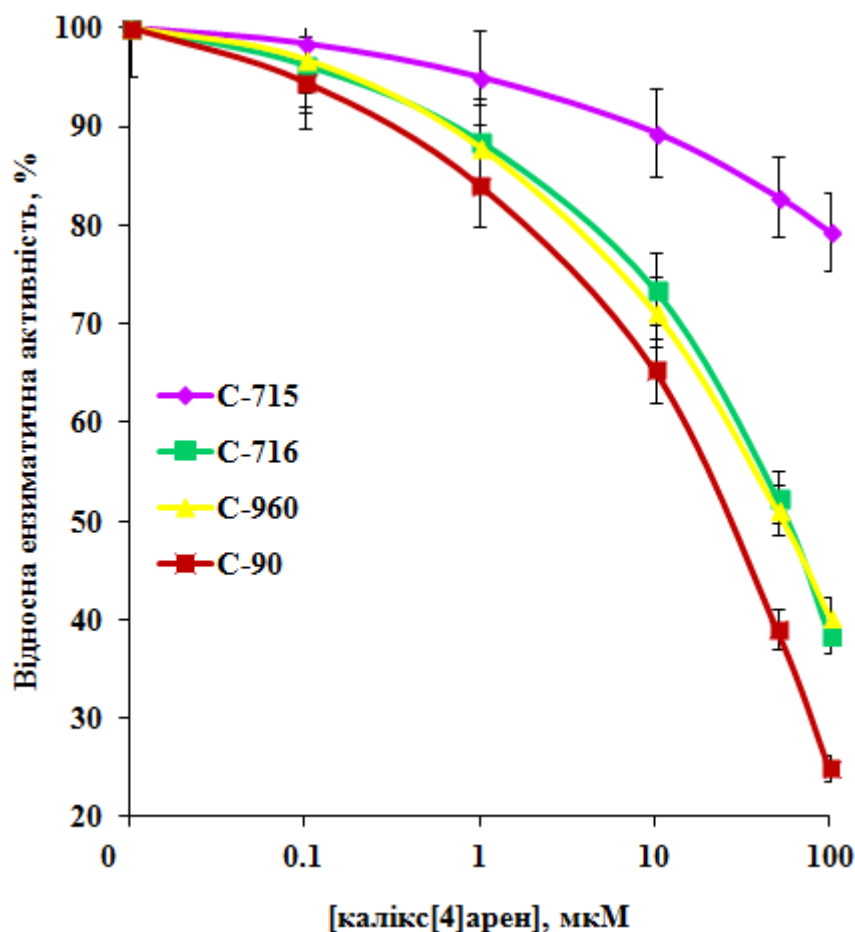


Рис. 3.10. Концентраційні залежності впливу калікс[4]аренів С-715, С-716, С-960 та С-90 на активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази у фракції плазматичної мембрани клітин міометрія ($M \pm m$, $n = 5$)
За 100 % прийнято значення питомої ензиматичної активності при відсутності калікс[4]аренів в середовищі інкубації

Отже, найбільш вірогідно, що саме фенілсульфоніламідинові групи є визначальними для інгібування активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани. Щоб перевірити це припущення, ми використали калікс[4]арен С-715 (5,17-ди(трифтор)метилкарбоніламіно-11,23-дитретбутил-25,27-дипропоксі-калікс[4]арен). Цей калікс[4]арен містить дві трифтрометилацетамідні групи на верхньому вінці калікс[4]аренової чаші (рис. 3.8). Тобто за

своєю структурою він найбільш подібний до калікс[4]арену C-716, але замість фенілсульфонілімінних фрагментів в його молекулі присутні карбонільні фрагменти, які є меншими за розмірами та площею поверхні і мають меншу полярність. Тому ми порівнювали вплив на активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани саме цих калікс[4]аренів (рис. 3.10).

Як показали результати експериментів, калікс[4]арен C-715, використаний у всьому інтервалі концентрацій від 10^{-8} до 10^{-4} М, зовсім неефективно пригнічує активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани (рис. 3.10). При застосуванні максимальної концентрації калікс[4]арену C-715 100 мкМ $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазна активність становить $79,3 \pm 0,8$ % від контрольного значення (таб. 3.2) ($M \pm m$; $n = 5$). Звичайно, що за такого низького рівня інгібування визначити відповідні кінетичні параметри, як для інших калікс[4]аренів, неможливо. Втім такий результат дає нам змогу зробити однозначний висновок про те, що саме фенілсульфонілімінні групи на верхньому вінці як калікс[4]арену C-716, так і калікс[4]арену C-90, безпосередньо залучені у механізмі інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани.

Залишається не відомим механізм інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази калікс[4]ареном C-90, а саме не ідентифіковано сайт його взаємодії з відповідним ензимом. Цікавим також є питання і стосовного того, як саме калікс[4]арен взаємодіє з ензимом: з водного оточення, чи з ліпідного оточення мембрани, та у якому з цих середовищ він переважно концентрується. Всі досліджені калікс[4]арени є гідрофобними сполуками, що є суттєвим недоліком, адже для більш зручного використання препаратів у якості інгібіторів ензимів чи як фармакологічних засобів, важливим є водорозчинність цих сполук. Тому врахувавши усі ці моменти, ми дослідили аналоги калікс[4]арену **C-90**, які відрізняються за наявністю гідрофобних груп (рис. 3.11).

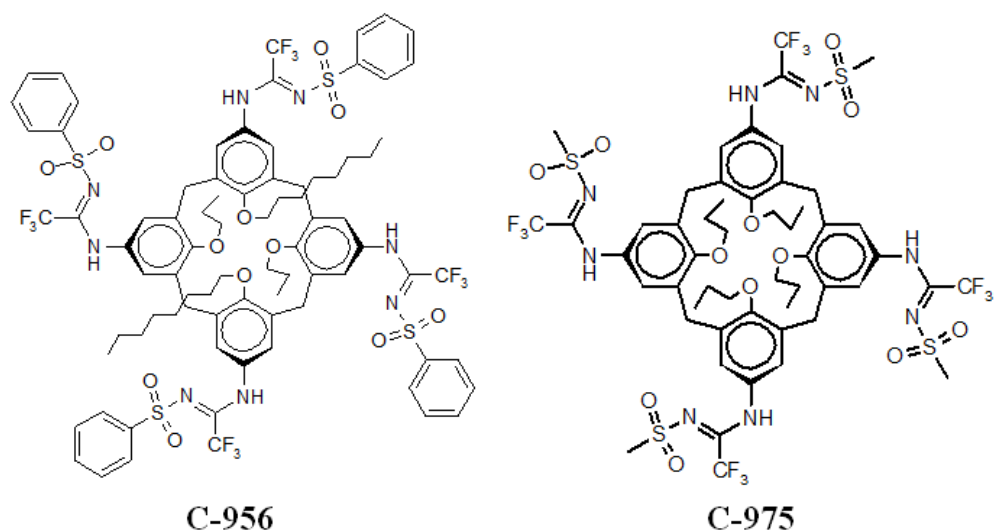


Рис. 3.11. Структурні формули калікс[4]аренів C-956 та C-975

Окрім калікс[4]аренового макроциклу у складі молекули калікс[4]арену C-90 значною гідрофобністю характеризуються фенільні залишки у складі фенілсульфоніламідінових груп. Тому було синтезовано аналог калікс[4]арену C-90 – калікс[4]арен C-975 (5,11,17,23-тетра(трифтор)метил(метилсульфоніліміно)метиламіно-25,26,27,28-тетрапропоксиалікс[4]арен), у якого ці фенільні групи заміщені на метильні, з утворенням метилсульфоніламідінових груп. Калікс[4]арен C-975, використаний у концентрації 100 мкМ, ефективно пригнічує активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани до $29,7 \pm 0,9$ % відносно контрольного значення (рис. 3.12).

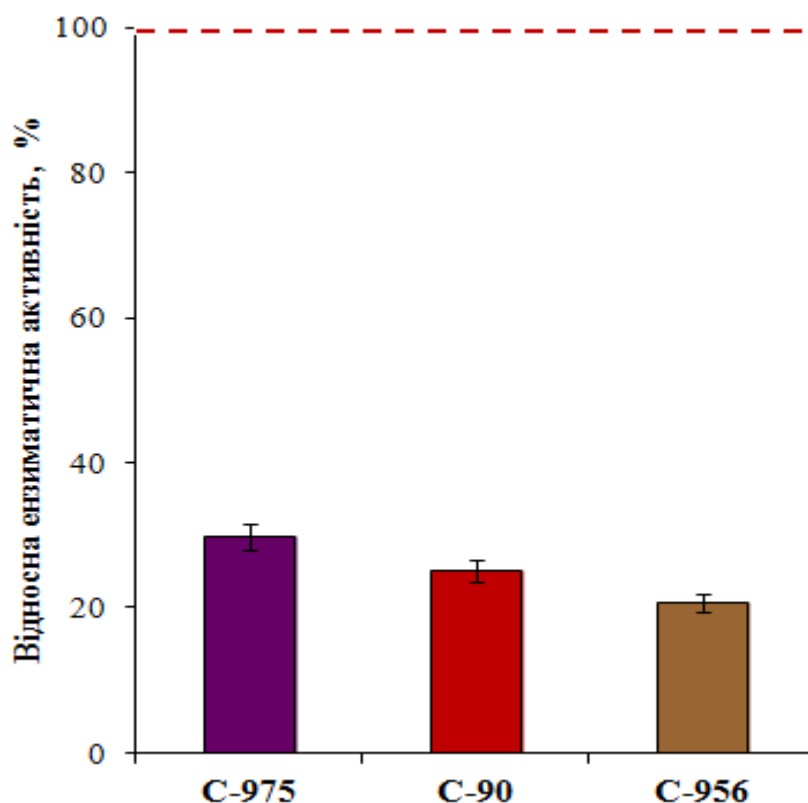


Рис. 3.12. Концентраційні залежності впливу калікс[4]аренів C-975, C-716, C-90 та C-956 на активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази у фракції плазматичної мембрани клітин міометрія ($M \pm m$, $n = 5$)
За 100 % прийнято значення питомої ензиматичної активності при відсутності калікс[4]аренів в середовищі інкубації

З концентраційної залежності інгібування калікс[4]ареном C-975 $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності (рис. 3.13) були розраховані кінетичні параметри, що характеризують ефективність інгібування, а саме коефіцієнт інгібування $I_{0,5}$ ($26,8 \pm 0,9$ мкМ) та коефіцієнт Хілла n_H ($0,57 \pm 0,02$) (таб. 3.2) ($M \pm m$; $n = 5$). Отже, калікс[4]арен C-975 має досить високий інгібіторний потенціал стосовно $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани.

Таким чином, калікс[4]арен C-975 ($I_{0,5}=26,8 \pm 0,9$ мкМ) з трохи меншою ефективністю, ніж калікс[4]арен C-90 ($I_{0,5}=20,2 \pm 0,5$ мкМ), інгібує $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТразу плазматичної мембрани.

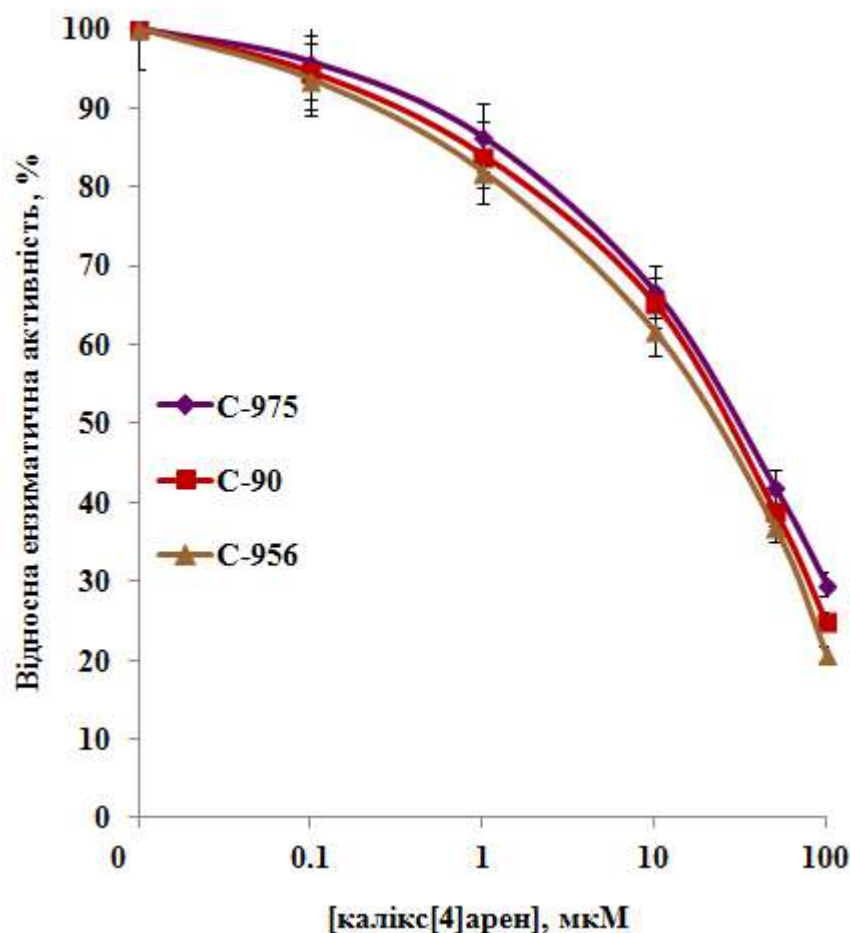


Рис. 3.13. Концентраційні залежності впливу калікс[4]аренів C-975, C-716, C-90 та C-956 на активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази у фракції плазматичної мембрани клітин міометрія ($M \pm m$, $n = 5$)
За 100 % прийнято значення питомої ензиматичної активності при відсутності калікс[4]аренів в середовищі інкубації

Оскільки, на прикладі калікс[4]аренів C-715 та C-716, показана провідна роль фенілсульфонілімінових груп калікс[4]аренів у інгібуванні активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани та, враховуючи суттєвий інгібіторний ефект навіть за відсутності фенільних залишків у складі функціональних груп на верхньому вінці макроциклу, важливим висновком є те, що саме сульфонілімінові угруповання визначають інгібіторні властивості калікс[4]арену C-90 та його аналогів. У той же час фенільні залишки або не приймають участі

у взаємодії з ензимом, або ж така взаємодія є слабкою та суттєво не впливає на функціонування ензиму.

Зміна рівня гідрофобності молекули калікс[4]арену може впливати на його інгібіторні властивості стосовно $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази. Оскільки відомо, що калікс[4]арени здатні вбудовуватись в ліпідні мембрани [19, 34], такі зміни можуть відображатися на розподілі молекул калікс[4]аренів між мембраною та водним середовищем. Порівняння калікс[4]аренів, які містять фенільні залишки, не дозволяє нам зробити висновки щодо впливу саме гідрофобності, оскільки ці залишки знаходяться у складі фенілсульфонілімінових груп верхнього вінця калікс[4]аренів, що детермінують взаємодію з відповідним комплементарним сайтом на поверхні ензиму.

Як нами було описано вище, калікс[4]аренова чаша та пропільні залишки молекули калікс[4]арену С-90 не відграють суттєвої ролі у вияві його інгібіторних властивостей, а лише слугують основою для взаємного розташування фенілсульфоніламідинових груп, хоча не з'ясованим залишалося питання впливу функціональних груп у структурі нижнього вінця макроциклу.

Тому ми використали аналог калікс[4]арену С-90, який відрізняється від нього структурою нижнього вінця, калікс[4]арен С-956 (5,11,17,23-тетра(трифтор)метил(фенілсульфоніліміно)метиламіно-25, 27-діоктилокси-26,28-дипропоксикалікс[4]арен), що містить на нижньому вінці калікс[4]аренового макроциклу більш ліпофільні октильні залишки замість пропільних. Подібна модифікація суттєво не впливає на інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності (рис. 3.13), хоча дещо підвищувала спорідненість інгібітора до $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани: коефіцієнт інгібування $I_{0,5}$ становив $15 \pm 0,5$ мкМ (таб. 3.2) ($M \pm m$; $n = 5$).

Таким чином, серед всіх досліджених калікс[4]аренів саме калікс[4]арен С-956 виявився найефективнішим інгібітором $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -

АТРази плазматичної мембрани. Подібний результат є також опосередкованим свідченням того, що гідрофобність калікс[4]аренів або їх амфіфільність та, відповідно, їх спорідненість до мембранного оточення, відіграють певну роль у взаємодії з ензимом.

Раніше ми показали, що пригнічувальний вплив калікс[4]арену С-90 реалізується також і на нативному ензимі, очищеній $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани з коефіцієнтом інгібування $I_{0,5}$, який становить $58,5 \pm 6,4$ мкМ; було зроблено висновок, що мембранне оточення не відіграє суттєвої ролі у реалізації інгібіторного ефекту вказаного калікс[4]арену на ензиматичну активність трансмембранного протеїну. Поряд з тим можна припустити, що калікс[4]арени, які інгібують $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани, діють з мембранного оточення на ензим, а сайт взаємодії з калікс[4]ареном С-90 та його аналогами знаходиться на трансмембранній ділянці протеїнової молекули. У цьому випадку ступінь гідрофобності каліксарену бути корелювати із ступенем його вбудовування в мембрану та доступністю для нього трансмембранних доменів $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази. Подібність коефіцієнтів інгібування $I_{0,5}$ у випадку солюбілізованої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази та $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани у фракції везикул можна пояснити тим, що навіть солюбілізований протеїн існує у розчині разом з детергентом, який оточує його трансмембранні ділянки і дозволяє зберегти нативну структуру. Тому можна зробити припущення, що для реалізації інгібіторного впливу калікс[4]аренів на $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазну активність не має значення саме склад мембранного оточення, але швидше за все інгібування АТРазної активності включає взаємодію калікс[4]аренів з мембранным оточенням.

Ми припускаємо, що всі згадувані калікс[4]арени діють на вказаний ензим за подібним механізмом. На це опосередковано вказують також

дуже близькі значення коефіцієнтів Хілла для всіх калікс[4]аренів (таб. 3.2).

Приймаючи до уваги, що найбільш ефективним інгібітором Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани виявився калікс[4]арен С-956, ми вирішили більш детально дослідити дію цього калікс[4]арену.

Вплив калікс[4]аренів на іон-транспортні системи міоцитів може детермінувати їх вплив на форму клітин. Зміну форми гладеньком'язових клітин через модифікації водно-осмотичного балансу дозволяє встановлювати лазерна кореляційна спектроскопія, за допомогою якої можливо фіксувати зміни ефективного гідродинамічного діаметру гладеньком'язових клітин.

Згідно літературних даних показано, що фактори, які підвищують скоротливу відповідь гладеньких м'язів, так само наочно змінюють ефективний гідродинамічний діаметр гладеньком'язових клітин. Як описано в [35], внесення Ca^{2+} (3 мМ), обробка А-23187 (10 мкМ), тетраетиламонієм (1 мМ) та 4-амінопіридином (1 мМ), призводять до зменшення ефективного гідродинамічного діаметру, що корелює зі станом скорочення гладеньких м'язів.

Як показали результати експериментів, внесення у середовище утеротоніка окситоцину (100 нМ) призводило до зменшення ефективного гідродинамічного діаметру у випадку суспензії гладеньком'язових клітин на $28,73 \pm 4,49$ % ($M \pm m$, $n = 6$) відносно контрольного значення (рис 3.14, синій стовпчик).

У випадку контролю середнє значення ефективного гідродинамічного діаметру міоцитів становить близько 9 мкм. Ми вимірювали гідродинамічний діаметр гладеньком'язових клітин протягом 1 хв 5 разів, звідки розраховували середнє значення. Так, у якості контролю на розчинник аплікація аліквоти ДМСО не призводила до суттєвих змін досліджуваного параметру – гідродинамічний діаметр змінювався лише на $3,5 \pm 1,6$ % ($M \pm m$, $n = 6$) відносно контролю (рис.

3.14). У той же час використання інгібітору Mg^{2+} , АТР-залежної Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин калікс[4]арену С-956 (50 мкМ) призводить до зменшення гідродинамічного діаметру на $45,54 \pm 9,38 \%$ ($M \pm m$, $n = 6$) відносно контрольного значення, причому такі зміни корелюють з подібними, отриманими у випадку дії окситоцину (100 нМ) – рис. 3.14 (червоний стовпчик).

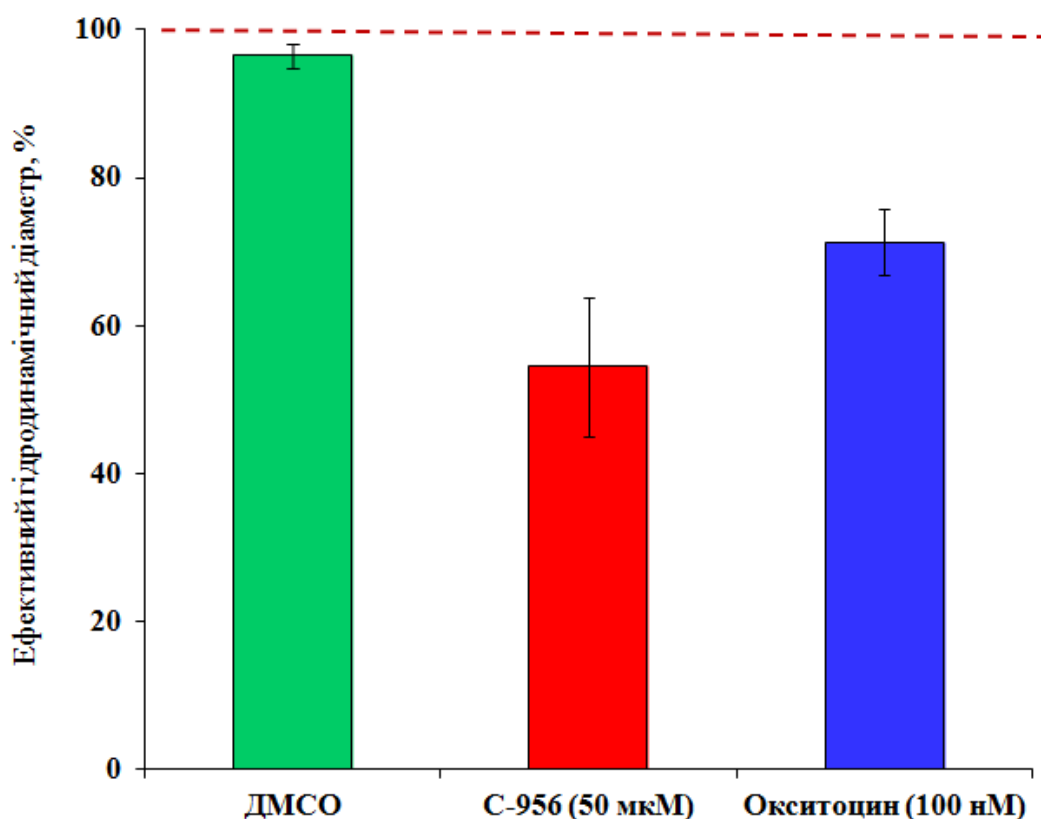


Рис. 3.14. Зміна гідродинамічного діаметру гладеньком'язових клітин за дії різних ефекторів ($M \pm m$, $n = 6$). Використовували метод лазерної кореляційної спектроскопії

За 100 % прийнято контрольне значення гідродинамічного діаметру гладеньком'язових клітин за відсутності дії ефекторів

Отже, калікс[4]арен С-956 зменшує ефективний гідродинамічний діаметр гладеньком'язових клітин ідентично до дії утеротоніка

окситоцину. Подібна зміна гідродинамічного діаметру може трактуватися як наслідок сукупності подій, які супроводжують процеси скорочення/розслаблення гладеньком'язових клітин, а саме зміну водно-осмотичного балансу. Оскільки раніше було показано, що зміна гідродинамічного діаметру гладеньком'язових клітин під впливом скоротливих агентів корелює з станом скорочення гладеньких м'язів, то подібні результати свідчать про перспективні можливості використання калікс[4]арену C-956 у якості регулятора скоротливої активності гладеньких м'язів матки.

Зважаючи на те, що Ca^{2+} -помпа плазматичної мембрани відіграє важливу роль у контролі концентрації іонів Ca у цитоплазмі гладеньких м'язів, важливо було з'ясувати, чи буде впливати калікс[4]арен C-956 на внутрішньоклітинну концентрацію Ca^{2+} у гладеньком'язових клітин. Тому у своїх подальших експериментах ми використали метод конфокальної мікроскопії.

Із використанням Ca^{2+} -чутливого флуоресцентного зонду fluo-4AM була встановлена зміна внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} під впливом калікс[4]арену C-956. Було показано, що під дією калікс[4]арену C-956 (20 мкМ) відбувається транзйентне різке зростання флуоресцентної відповіді Ca^{2+} -чутливого зонду fluo-4 у клітині (рис. 3.15). Протягом 2,5 хв концентрація Ca^{2+} знижується, що свідчить про залучення компенсаторних механізмів (Ca^{2+} -акумулюючі системи мітохондрії та саркоплазматичного ретикулума, натрій-кальцієвий обмінник плазматичної мембрани). Повторне внесення аліквоти калікс[4]арену C-956 у розчин приводить до меншого збільшення концентрації Ca^{2+} у клітині. Отже, калікс[4]арен C-956 викликає підвищення концентрації Ca^{2+} у гладеньком'язових клітинах.

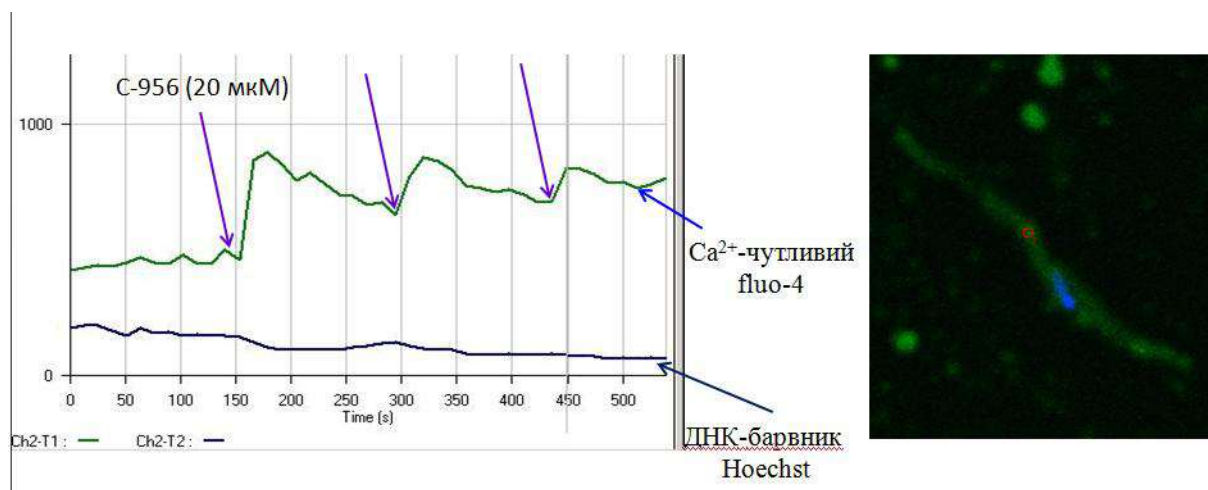


Рис. 3.15. Зміна флуоресценції зондів в міоциті матки, зареєстрована за допомогою конфокальної мікроскопії: ДНК-чутливого Hoechst та Ca^{2+} -чутливого fluo-4 AM. На 150 сек було внесено аліквоту розчину C-956 (кінцева концентрація - 20 мкМ). Наведено результати типового експерименту

У випадку контролю, коли використовувалася суто калікс[4]аренова «чаша» C-150 (20 мкМ), яка за нашими результатами не мала вираженого впливу на активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани, такого підвищення флуоресцентного сигналу fluo-4 не спостерігалось (результати не наведено). Також незмінним лишився рівень флуоресценції барвника Hoechst, який локалізується в основному в ядрі гладеньком'язових клітин, та фону.

Ці результати свідчать про те, що під впливом калікс[4]арену C-956 (20 мкМ) відбувається різке підвищення концентрації Ca^{2+} у клітині, яке пов'язане зі зниження базальної активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани. Разом з тим протягом наступних 100 сек концентрація Ca^{2+} знижується до початкового рівня, що свідчить про залучення компенсаторних Ca^{2+} -транспортуючих систем в міоцитах до релаксації кальцієвого сигналу, які мають нижчу афінність до Ca^{2+} та реагують, головним чином, на його високі концентрації в клітині.

За матеріалами експериментальних досліджень дії калікс[4]арену С-956 був поданий на реєстрацію патент на винахід (Векліч Т.О., Шкрабак О.А., Костерін С.О., Родік Р.В., Бойко В.І., Кальченко В.І. 5,11,17,23-тетра(трифтор)метил(фенілсульфоніліміно)-метиламіно-25,27-діоктилокси-26,28-дипропоксикалікс[4]арен (калікс[4]арен С-956), як селективний інгібітор Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРazi плазматичної мембрани клітин міометрія // Заявка на винахід № а201611842 від 23.11.2016).

Отримані результати є важливими для розуміння механізмів інгібування Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРazi плазматичної мембрани калікс[4]ареном С-90 і його аналогами та можуть бути основою для створення нових більш ефективних інгібіторів вказаного ензиму на основі калікс[4]аренів.

3.4. КІНЕТИКА ІНГІБІТОРНОЇ ДІЇ КАЛІКС[4]АРЕНУ С-90 НА АКТИВНІСТЬ ТРАНСПОРТНОЇ Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРazi ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ ГЛАДЕНЬКОМ`ЯЗОВИХ КЛІТИН

Нижче будуть проаналізовані кінетичні закономірності (у форматі концентраційних залежностей) дії калікс[4]арену С-90 на активність транспортної Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРazi.

3.4.1. Дія калікс[4]арену С-90 на концентраційну залежність активності транспортної Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРazi від іонів Са.

Ми вивчали залежність питомої активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРazi від концентрації Ca^{2+} в інкубаційному середовищі при різних концентраціях калікс[4]арену С-90 (відповідно 1, 10, 30, 60 та 100 мкМ). Концентрацію іонів Са розраховували для системи «ЕГТА - Ca^{2+} ».

Ензиматична активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРazi плазматичної мембрани міометрія монотонно зростає по мірі збільшення

концентрації іонів Са від 100 до 1000 нМ з тенденцією виходу на плато, однак монотонно зменшується при збільшенні концентрації інгібітора (рис. 3.16).

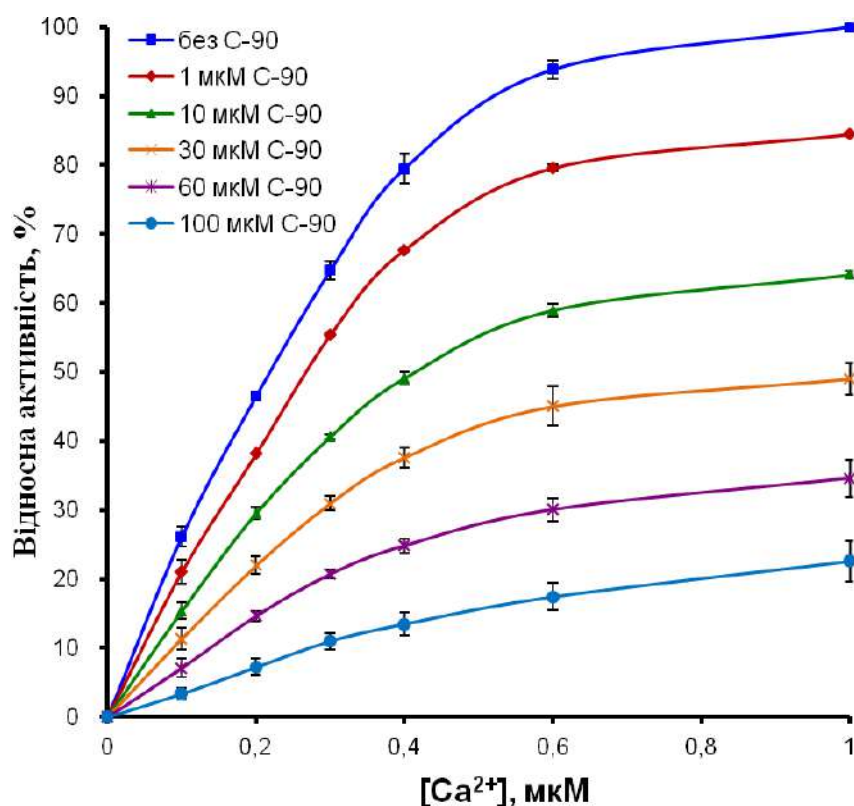


Рис. 3.16. Вплив збільшення концентрації калікс[4]арену C-90 на залежність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності плазматичної мембрани клітин міометрія від концентрації іонів Са ($M \pm m$, $n = 5$)
За 100 % прийнято платове значення питомої ензиматичної активності у відсутності калікс[4]арену у середовищі інкубації

Було розраховано кінетичні параметри активації іонами Са та вплив на них калікс[4]арену C-90 (рис. 3.17 А,Б).

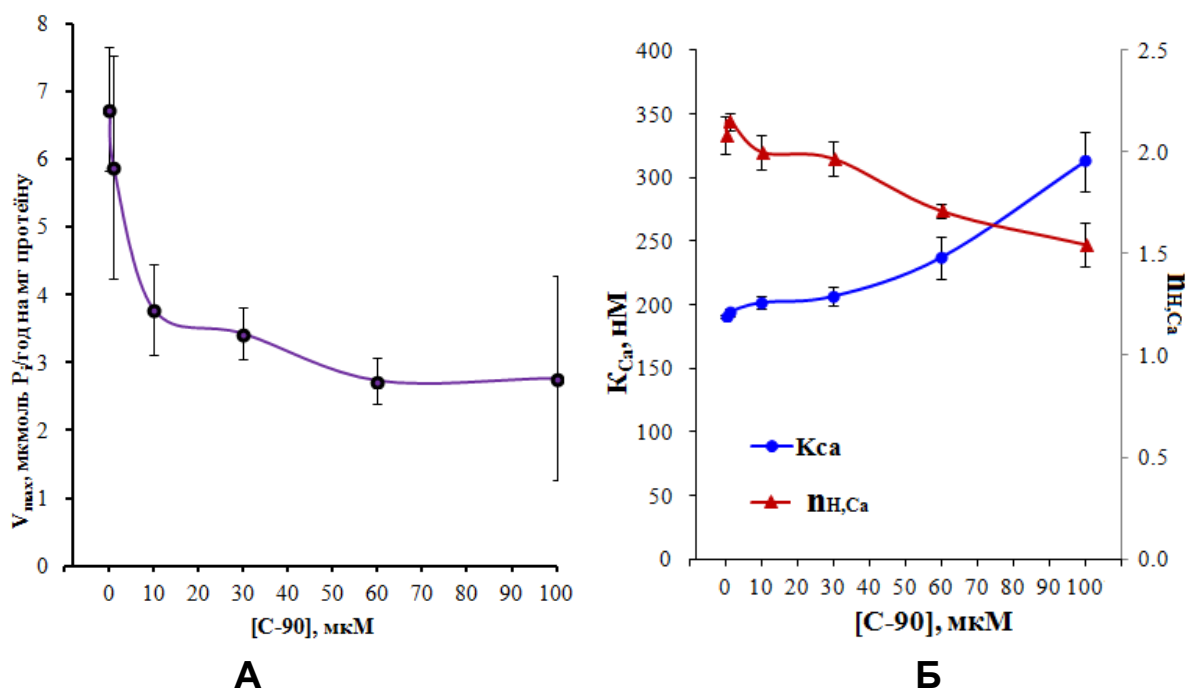


Рис. 3.17. Вплив калікс[4]арену С-90 в різних концентраціях на кінетичні параметри реакції гідролізу АТР по Ca^{2+} ($V_{\max}$ (А), K_{Ca} та $p_{\text{H,Ca}}$ (Б)), що каталізується $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазою плазматичних мембран клітин міометрія ($M \pm m$, $n = 5$)

Як можна бачити, величина $V_{\max}$ по Ca^{2+} зменшувалася при збільшенні концентрації калікс[4]арену С-90 (рис. 3.17 А). Значення коефіцієнту активації $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази K_{Ca} за відсутності калікс[4]арену С-90 становило 190 ± 1 нМ, величина коефіцієнта Хілла p_{H} – $2,1 \pm 0,1$ ($M \pm m$; $n=5$) (рис. 3.17 Б). Внесення ж в середовище інкубації калікс[4]арену С-90 збільшувало коефіцієнт активації іонами Са до 312 ± 23 нМ (в присутності 100 мкМ С-90). При цьому величина коефіцієнта Хілла знижувалася до $1,5 \pm 0,1$ ($M \pm m$; $n=5$).

Отже, в діапазоні концентрації до 50 мкМ калікс[4]арен С-90 дуже слабо впливає на спорідненість $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани до іонів Са та на кооперативний ефект активації ензиму вказаними іонами.

Були також одержані криві інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності під дією калікс[4]арену С-90 за різних концентрацій іонів Са (рис. 3.18 А).

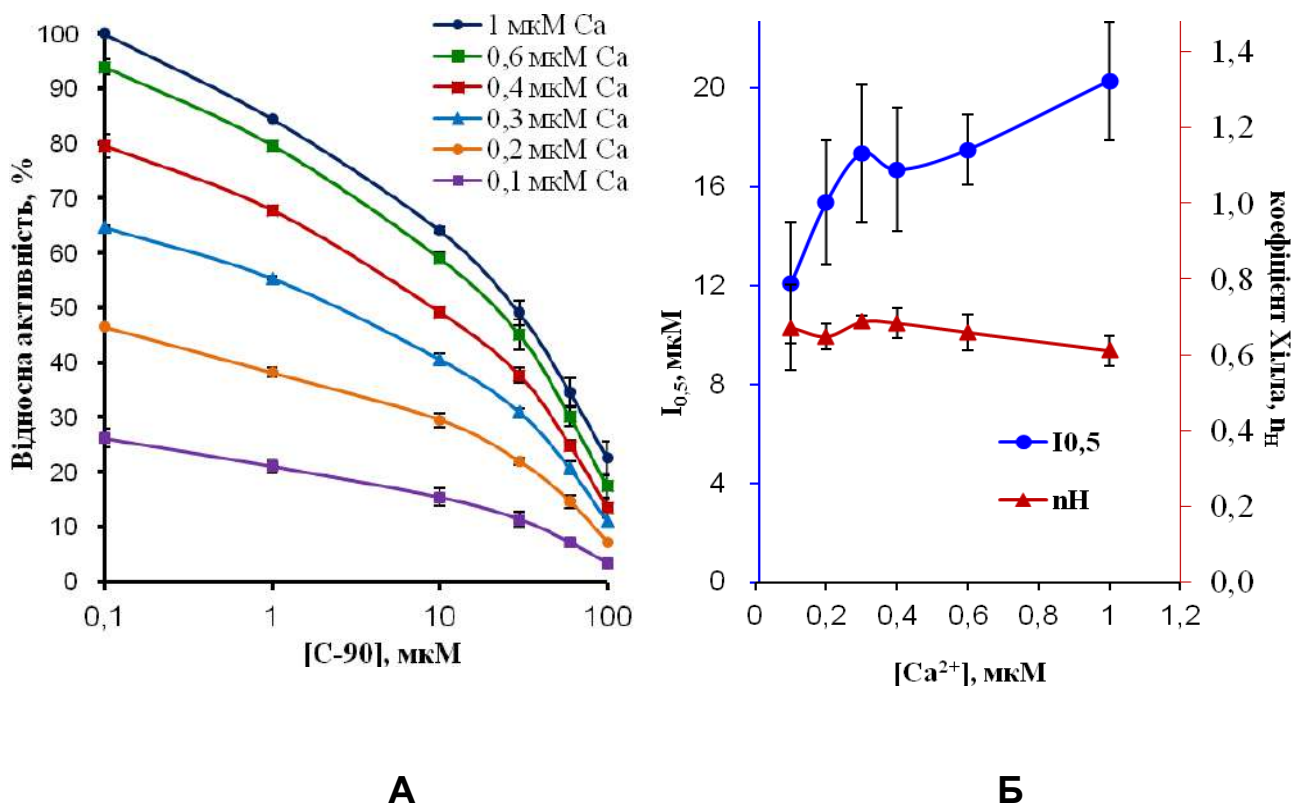


Рис. 3.18. Вплив іонів Са за різних концентрацій на залежність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності у плазматичних мембранах клітин міометрія від концентрації калікс[4]арену С-90 (А) та на коефіцієнт Хілла n_H і коефіцієнт інгібування $I_{0,5}$ (Б) даної активності ($M \pm m$, $n = 5$). За 100 % прийнято значення питомої ензиматичної активності у відсутності калікс[4]арену у середовищі інкубації

Отримані залежності дали змогу розрахувати кінетичні параметри інгібування калікс[4]ареном С-90 за різних концентрацій Ca^{2+} (рис. 3.18 Б). Як видно з малюнку, коефіцієнт Хілла n_H майже не змінюється за різних концентрацій Ca^{2+} та становить 0,6-0,7. Проте зі зниженням концентрації Ca^{2+} знижується коефіцієнт інгібування $I_{0,5}$, тобто збільшується ефективність інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності. Не виключено, що такі кінетичні ефекти можуть бути зумовлені

конкуренцією між калікс[4]ареном С-90 та іонами Са за сайти зв'язування на поверхні ензиму. Зважаючи на здатність каліксаренів до комплексоутворення з іонами металів [19], можливо, що у механізм інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності залучена також взаємодія між калікс[4]ареном С-90 та Ca^{2+} у складі потрібного комплексу з ензимом.

3.4.2. Дія калікс[4]арену С-90 на концентраційну залежність активності транспортної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази від іонів Mg.

Значення Mg^{2+} для метаболізму пояснюється його властивостями як промотора структури макромолекул, субстратзв'язуючого іона і переносника електронів. Відомо багато Mg^{2+} -залежних ензимів, де роль Mg^{2+} не обмежується активацією субстрату, а пов'язана із формуванням активного (каталітичного) центрів. Проте найбільш широко відома роль Mg^{2+} в утворенні хелатного комплексу з АТР – субстратом аденозинтрифосфатазних реакцій MgATP^{2-} . Вважають, що іони Mg^{2+} вступають у взаємодію із фосфатними зарядженими групами АТР, поляризують їх і підвищують реакційну здатність системи, полегшуючи нуклеофільну атаку на термінальний фосфатний залишок АТР [36].

Було досліджено вплив різних концентрацій калікс[4]арену С-90 (1, 10, 30, 60 та 100 мкМ) на концентраційну залежність АТР-гідролазної активності від MgCl_2 (рис. 3.19).

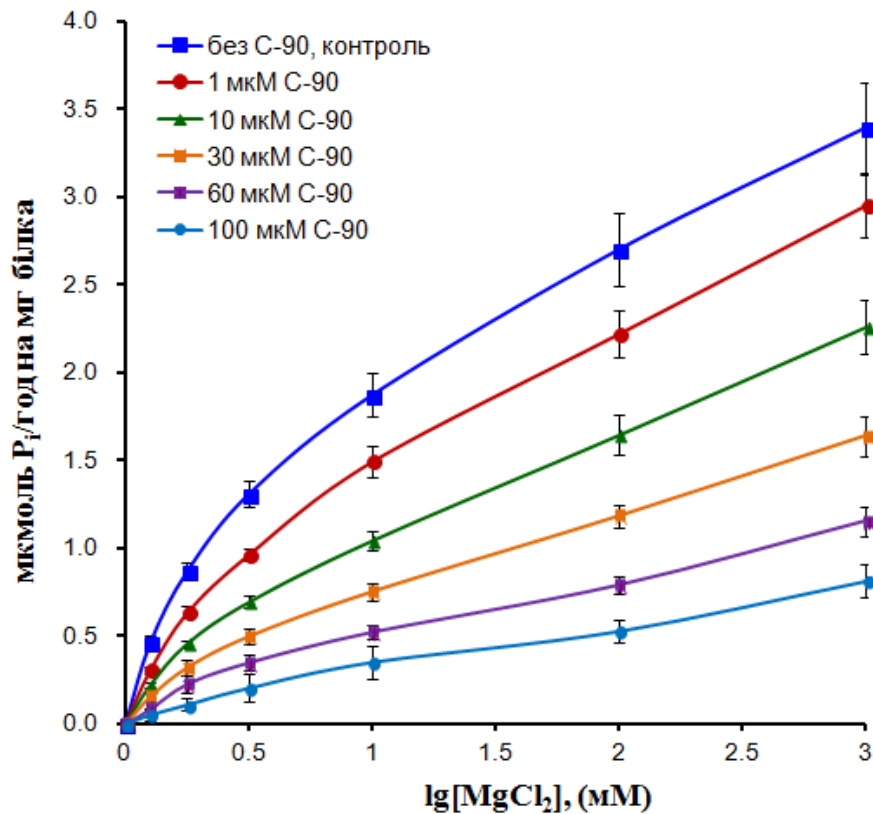


Рис. 3.19. Вплив збільшення концентрації калікс[4]арену C-90 на залежність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності плазматичної мембрани клітин міометрія від концентрації MgCl_2 ($M \pm m$, $n = 5$).

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

Ензиматична активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани міометрія монотонно зростає при збільшенні концентрації MgCl_2 від 0,1 до 3 мМ за умови використання фіксованих концентрацій АТФ (3 мМ) в інкубаційному середовищі та пригнічується при збільшенні концентрації калікс[4]арену C-90. Контрольне значення уявної константи активації $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази K_{Mg} складає $0,70 \pm 0,08$ мМ, контрольна величина коефіцієнта Хілла $n_H - 1,0 \pm 0,1$ ($M \pm m$; $n=5$).

В усіх випадках у разі внесення до середовища інкубації калікс[4]арену C-90, спостерігається зниження активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази з різним ступенем ефективності.

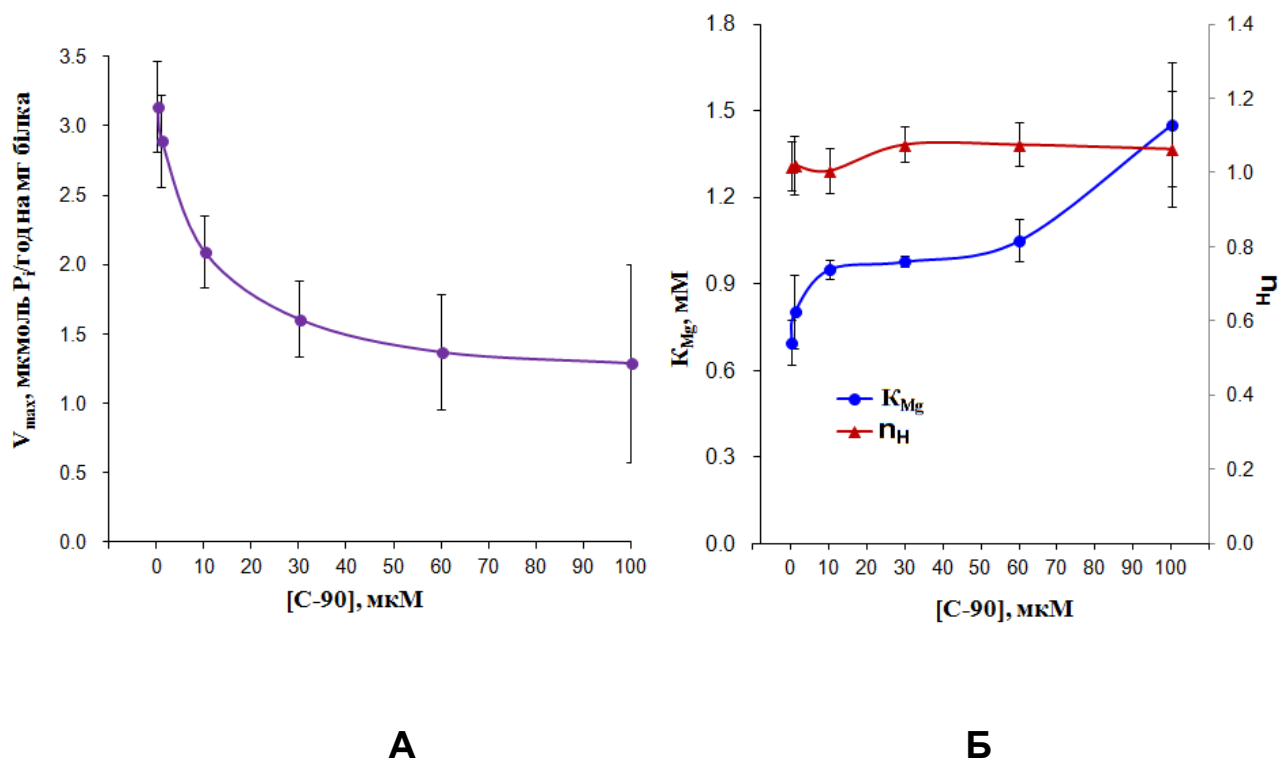


Рис. 3.20. Вплив калікс[4]арену С-90 в різних концентраціях на кінетичні параметри гідролізу АТР по Mg^{2+} (V_{max} (А), K_{Mg} і $n_{H, Mg}$ (Б)), що каталізується Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРазою плазматичної мембрани клітин міометрія ($M \pm m$, $n = 5$)

Величина V_{max} зменшувалася при збільшенні концентрації калікс[4]арену С-90 (рис. 3.20А). Продемонстровано, що під впливом калікс[4]арену С-90 спостерігається зростання коефіцієнта активації Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази хлоридом магнію K_{Mg} до $1,4 \pm 0,2$ мМ (за присутності 100 мкМ С-90), тобто у 2 рази. При цьому величина коефіцієнта Хілла практично не змінюється (рис. 3.20А,Б).

Втім, варто відмітити, що спеціальної уваги потребує аналіз концентраційних (щодо калікс[4]арену С-90) залежностей K_{Ca} та $n_{H, Ca}$ (рис. 3.18Б) і K_{Mg} (рис. 3.20Б) при високих концентраціях цього інгібітора.

Аналогічно до попередніх кінетичних досліджень, були розбудовані залежності інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності калікс[4]ареном С-90 за різних концентрацій MgCl_2 (рис. 3.21А).

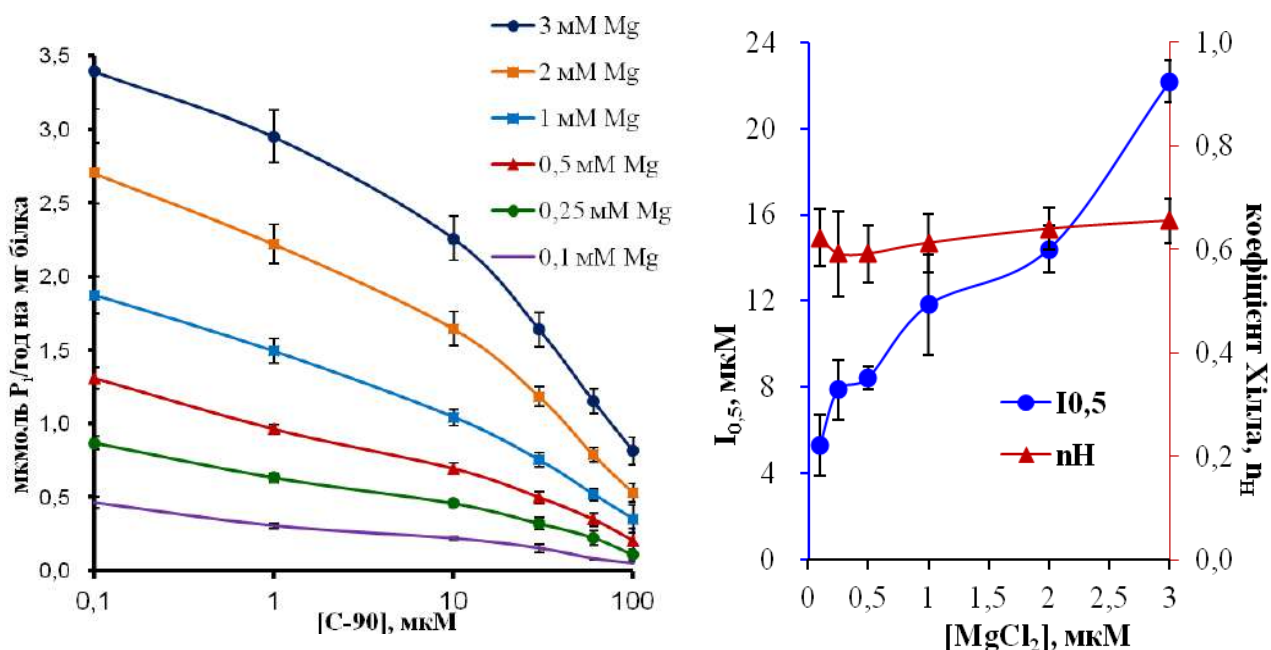


Рис. 3.21. Вплив MgCl_2 на залежність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності у плазматичних мембран клітин міометрія від концентрації калікс[4]арену С-90 (а) та на коефіцієнт Хілла n_H і коефіцієнт інгібування $I_{0,5}$ (б) даної активності ($M \pm m$, $n = 5$)
За 100 % прийнято значення питомої ензиматичної активності у відсутності калікс[4]арену у середовищі інкубації

Далі були розраховані відповідні кінетичні параметри, що характеризують ефективність інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності калікс[4]ареном С-90 за різних концентрацій MgCl_2 (рис. 4.21Б). З наведених результатів видно, що зі зниженням концентрації MgCl_2 суттєво знижується коефіцієнт інгібування калікс[4]ареном С-90 $I_{0,5}$ та не змінюється коефіцієнт Хілла n_H . Таким чином, за малих концентрацій MgCl_2 ефективність інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності калікс[4]ареном С-90 є більшою. Подібна ситуація

спостерігалась також і при дослідженні впливу калікс[4]арену C-90 на кінетику активації $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази іонами Са, що описана вище, тому можливо, що вона може бути зумовлена аналогічними причинами, але за участю іонів Mg. Проте відомо, що субстратом АТРазної реакції є саме комплекс MgATP^{2-} , і саме тому Mg проявляє активуючу дію на $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазну активність [37], тобто в цьому випадку відрізняються механізми активації іонами Mg та Са, і тому представлені кінетичні ефекти, вірогідно, мають різні механізми. Потрібно також підкреслити, що ми аналізували кінетичні ефекти впливу на $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазну активність саме MgCl_2 , а не іонів Mg, тому ефекти саме Mg^{2+} можуть бути відмінними від описаних.

3.4.3. Дія калікс[4]арену C-90 на концентраційну залежність активності транспортної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази від АТР.

Підвищення концентрації АТР в середовищі інкубації в діапазоні від 0,01 до 3 мМ у відсутності C-90 призводило до збільшення ензиматичної активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази (рис. 3.22, контроль) за умов фіксованої концентрації MgCl_2 (3 мМ) в інкубаційному середовищі. Методом Хілла були розраховані уявна константа Міхаеліса K_m та коефіцієнт Хілла n_H для АТР, які становлять $56,3 \pm 4,3$ мкМ та $1,32 \pm 0,14$ відповідно ($M \pm m$; $n = 5$) (рис. 3.23б).

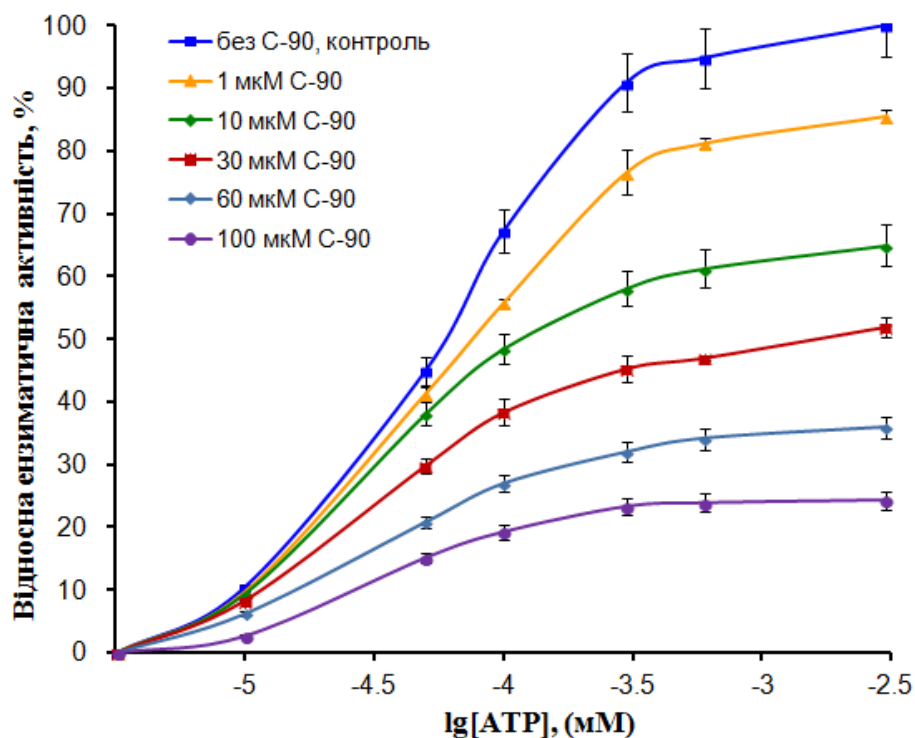


Рис. 3.22. Вплив калікс[4]арену C-90 на залежність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності плазматичних мембран клітин міометрія від концентрації АТР ($M \pm m$, $n=5$)

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

Було з'ясовано, як впливає калікс[4]арен C-90 на спорідненість ензиму до АТР. Було досліджено вплив 5-ти концентрацій калікс[4]арену C-90 (відповідно 1, 10, 30, 60 та 100 мкМ) на концентраційну залежність від АТР (рис. 3.22). В усіх випадках спостерігається монотонне зниження активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази, при цьому залежність ензиматичної активності від АТР виявляє характер, подібний до відповідної контрольної залежності без калікс[4]арену C-90, але відбувається зниження платового рівня активності зі зростанням концентрації калікс[4]арену.

З отриманих залежностей ми розрахували максимальну початкову швидкість $V_{\max}$ реакції гідролізу АТР, що каталізується $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазою плазматичної мембрани, за відсутності та наявності

калікс[4]арену C-90 у різних концентраціях (рис. 3.23 А). Як видно з графіку, калікс[4]арен C-90 знижує $V_{\max}$ реакції, що свідчить про зниження числа обертів ензиму за дії цієї речовини. Нами були також розраховані уявні константи Міхаеліса K_m та коефіцієнти Хілла $n_{H,ATP}$ за відсутності та наявності калікс[4]арену C-90 у різних концентраціях (рис. 3.23 Б). Наведені результати можна інтерпретувати, як відсутність такого впливу. Тобто, вплив калікс[4]арену C-90 є неконкурентним відносно АТР.

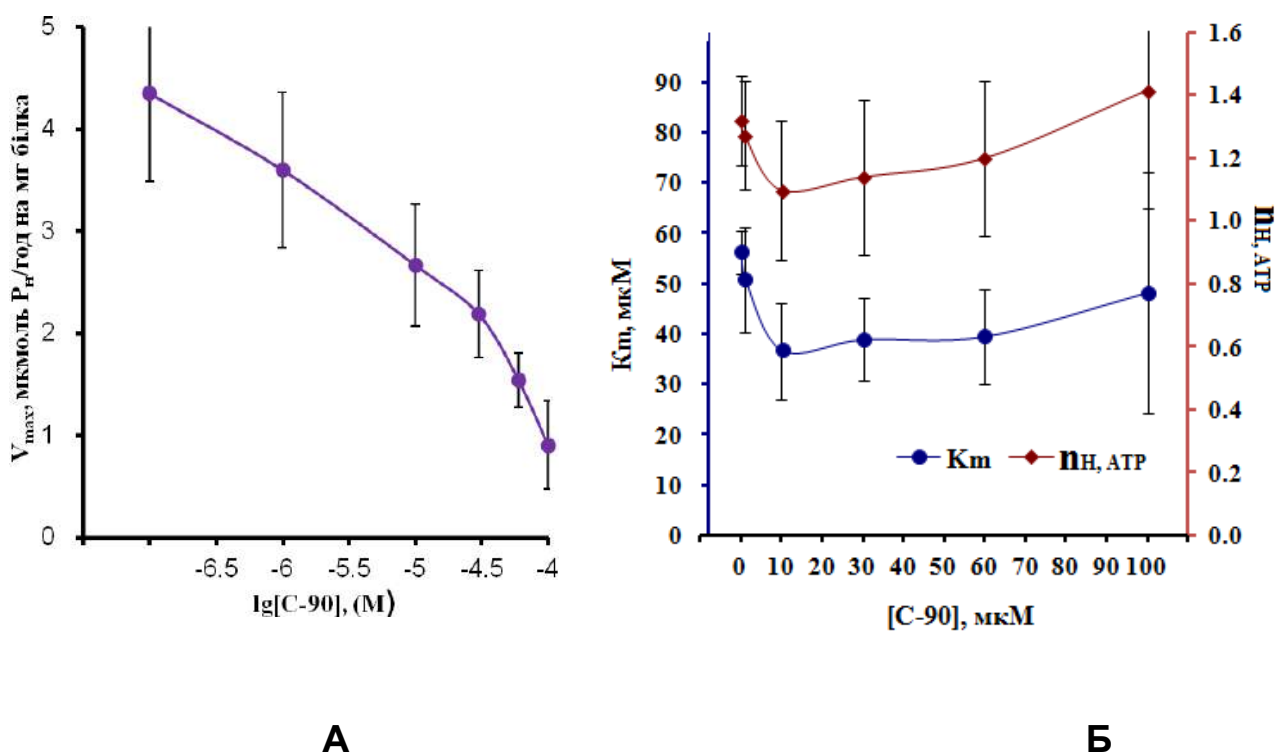


Рис. 3.23. Вплив калікс[4]арену C-90 на максимальну початкову швидкість (А) та на уявну константу Міхаеліса K_m і коефіцієнт Хілла $n_{H,ATP}$ (Б) реакції гідролізу АТР, що каталізується $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазою плазматичної мембрани клітин міометрія ($M \pm m, n = 5$)

Ми також побудували залежність інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності калікс[4]ареном C-90 за різних концентрації АТР (рис. 3.24 А), що дало нам змогу розрахувати коефіцієнти інгібування та коефіцієнти Хілла за різних концентрацій АТР (рис. 3.24 Б). З представлених результатів видно, що використання різних

концентрацій АТР ніяк не впливає на коефіцієнт інгібування і коефіцієнт Хілла для калікс[4]арену С-90, тобто, інгібувальний ефект калікс[4]арену С-90 на питому ензиматичну активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазиди не залежить від спорідненості ензиму до АТР.

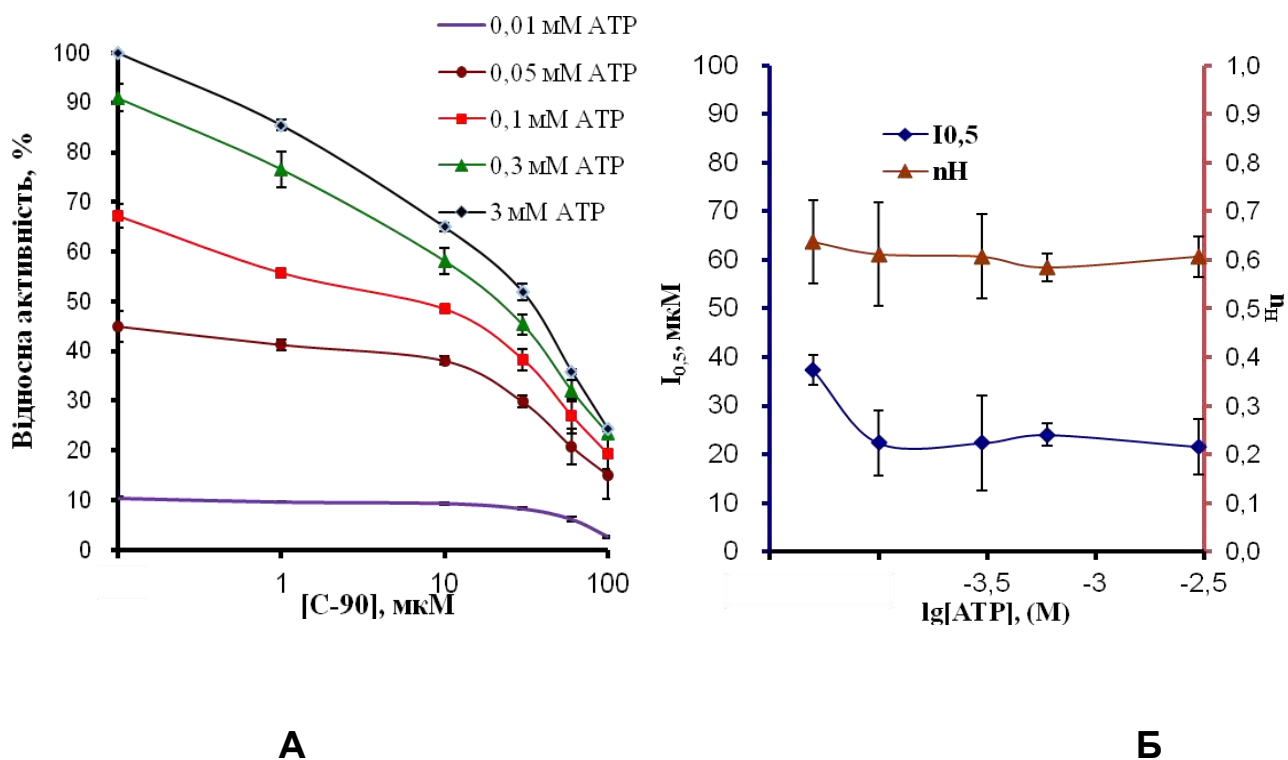


Рис. 3.24. Вплив АТР на залежність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності у плазматичної мембрани клітин міометрія від концентрації калікс[4]арену С-90 (А) та на коефіцієнт Хілла n_H і коефіцієнт інгібування $I_{0,5}$ (Б) даної активності ($M \pm m$, $n=5$)
За 100 % прийнято значення питомої ензиматичної активності у відсутності калікс[4]арену у середовищі інкубації

Ми не виключаємо, що субстратний центр $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазиди та гіпотетичний сайт взаємодії калікс[4]арену С-90 з ензимом не перекриваються на його поверхні.

3.5. ВПЛИВ КАЛІКС[4]АРЕНУ C-90 НА Ca^{2+} -ТРАНСПОРТНУ АКТИВНІСТЬ Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРАЗИ ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ ГЛАДЕНЬКОМ`ЯЗОВИХ КЛІТИН

Якщо калікс[4]арен інгібує активність Ca^{2+} -транспортувальної Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРАЗи плазматичної мембрани, то слід було очікувати, що під дією цієї сполуки буде пригнічуватись Mg^{2+} , АТР-залежний транспорт іонів Са через плазматичну мембрану та, відповідно, підвищуватись концентрація цих іонів в міоплазмі. Подальші дослідження були спрямовані на з'ясування цих питань.

3.5.1. Характеристика Mg^{2+} , АТР-залежного Ca^{2+} -транспорту у препараті везикул плазматичної мембрани.

Для того, щоб дослідити транспортну активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРАЗи плазматичної мембрани ми застосували Ca^{2+} -чутливий флуоресцентний зонд fluo-4 АМ (рис. 3.25), яким попередньо навантажували везикули плазматичних мембран. Вказаний зонд використовуються для вимірювання концентрації Ca^{2+} всередині живих клітин. У дослідженнях використовувалася не флуоресцентна форма – ацетоксиметильний естер (fluo-4 АМ), який всередині клітини розщеплюється неспецифічними естеразами і утворює вільну флуоресцентну (кислотну) форму (fluo-4) [38].

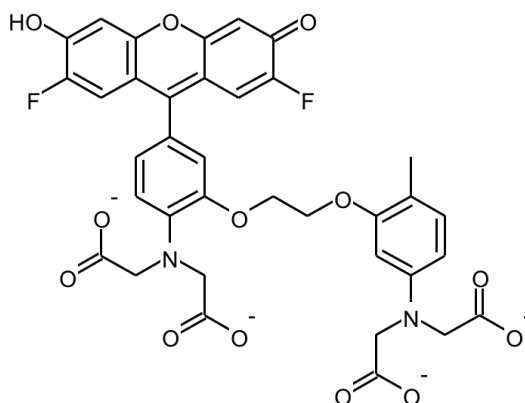


Рис. 3.25. Структурна формула Ca^{2+} -чутливого зонду fluo-4

Зонд (10 мкМ) навантажували протягом 30 хв (25 °С) у готовий препарат везикул плазматичних мембран, який розводили у середовищі наступного складу: 300 мМ KCl, 20 мМ HEPES-Tris (pH=7,4; 8 °С). Для покращення процесу навантаження змішували зонд із Pluronic F-127 (0,02 %). Наступним етапом центрифугували протягом 1 год при 105000 g на кутовому роторі, щоб відмити зонд, який не потрапив у везикули. Для ресуспендування використовували середовище вищеописаного складу.

Реєстрацію зміни концентрації Ca^{2+} у везикулах визначали за допомогою флуоресцентної відповіді fluo-4 AM, спектрофлуориметр Quanta Master 40 PTI (Канада) із програмним забезпеченням FelixGX 4.1.0.3096 ($\lambda_{\text{зб.}}$ = 495 нм, $\lambda_{\text{фл.}}$ = 520 нм). Робоче середовище, з якого здійснювалась енергозалежна акумуляція Ca^{2+} везикулами плазматичних мембран, мало склад (в мМ): 20 HEPES-Tris (pH 7,4; 37 °С), 300 KCl, 3 MgCl_2 , 2 АТР, 0,95 CaCl_2 . Кількість протеїну у пробі становила 100 мкг.

Для підтвердження накопичення Ca^{2+} саме $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазою плазматичних мембран використовували середовище вищеописаного складу, але з варіантами: без АТР, без Mg^{2+} , з різними концентраціями K^+ -фосфатного буферу (20, 60 мМ), з тапсигаргіном (100 нМ), з NaN_3 (1 мМ). В кінці вимірювань вносили ЕГТА (10 мкМ) з А-23187 (2,5 мкМ). Для реєстрації саме $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази компоненти транспорту Ca^{2+} використовували інгібітор калікс[4]арен С-90 (100 мкМ).

Повний гідроліз ацетиксиметильних форм дуже важливий для того, щоб уникнути артефактів. Якщо починати експеримент до початку повного гідролізу, зростаюча флуоресценція під час гідролізу етерефікованої форми зонду fluo-4 AM у неетерефіковану fluo-4 у ході виконання експерименту може інтерпретуватися невірно (як відповідь

зонду на зміну концентрації Ca^{2+}). Тому важливо було попередньо підібрати концентрацію та час навантаження везикул ацетоксиметильною формою зонду. На рис. 3.26 зображена флуоресцентна відповідь зонда, збудженого на хвилі 488 нм [38], яка зростає впродовж інкубації ПМ з fluo-4 AM (1 мкМ).

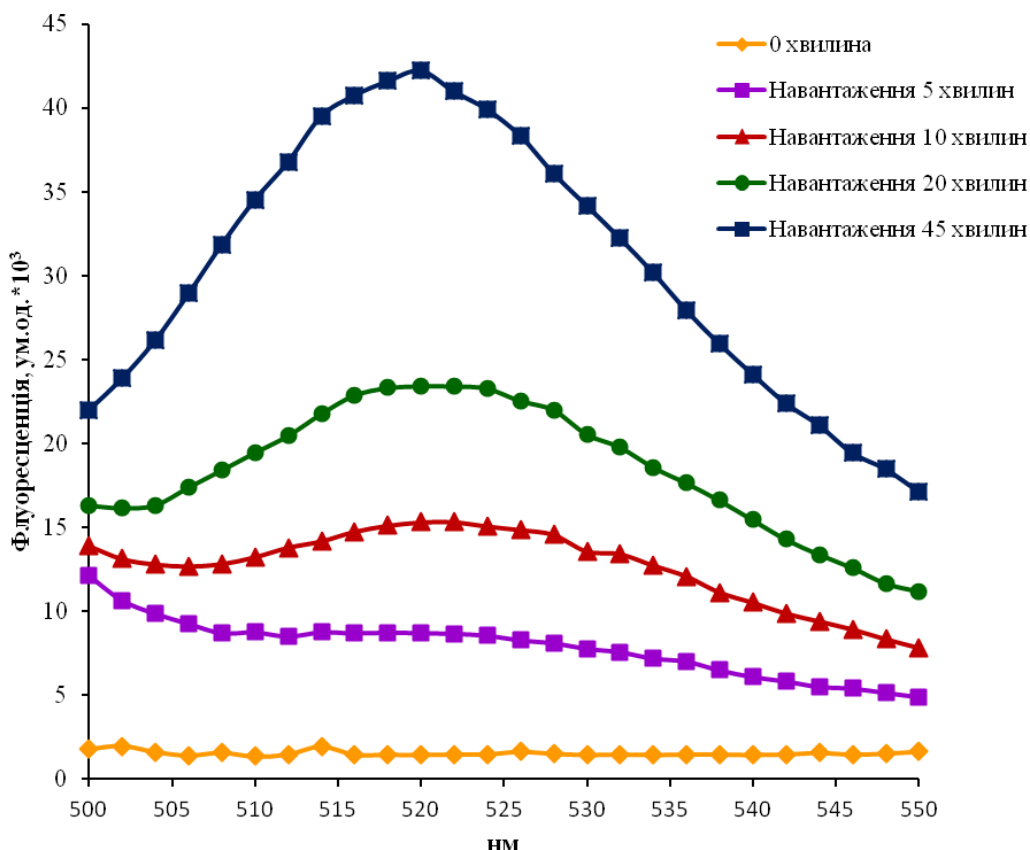


Рис. 3.26. Зростання флуоресцентної відповіді fluo-4 при збільшенні часу інкубації зонду з везикулами плазматичних мембран
Наведено результат типового експерименту

Як показали експерименти, збільшення часу навантаження зондом призводило до зростання квантового виходу флуоресценції fluo-4 AM ($\lambda_{\text{зб}} = 488 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{фл}} = 520 \text{ нм}$) (рис. 3.26), що свідчить про розщеплення естеразами ацетоксиметильного естеру зонду у вільну флуоресцентну (деацетоксиметильну кислоту) форму. Також ми показали, що препарат везикул із зондом позитивно реагував на зміну концентрації вільного Ca^{2+} у середовищі інкубації: чим більша ця

концентрація, тим більшою була флуоресцентна відповідь.

Для коректного визначення транспортної активності Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани необхідно знати топологію мембранних фрагментів фракції плазматичних мембран. Згідно з [39] метод отримання везикул плазматичних мембран, який був застосований у цій роботі, характеризується наявністю переважної більшості фрагментів, які замкнені цитоплазматичним боком назовні («inside out»), на користь чого свідчить АТР-залежне накопичення $^{45}\text{Ca}^{2+}$, що пригнічується окситоцином тільки у випадку його попереднього навантаження у везикули. Нами за допомогою визначення питомої активності ензимів-маркерів плазматичної мембрани (Na^+, K^+ -АТРаз та «базальної» Mg^{2+} -АТРаз) встановлено, що фракція плазматичних мембран ~ на 50 % складається з везикул, які замкнені «inside out», інша половина складається з незамкнених фрагментів та закнених «outside out». Отже, везикульовані мембранні фрагменти є зручним інструментом для дослідження систем активного транспорту Ca^{2+} , які забезпечують перенесення катіону з міоплазми у позаклітинний простір.

Транспортну активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаз плазматичної мембрани ініціювали внесенням 2 мкМ CaCl_2 після стабілізації флуоресцентної відповіді зонду (близько 5-10 хв). Внесення Ca^{2+} у середовище інкубації призводило до поступового зростання квантового виходу зонду (рис. 3.27). Подібне збільшення квантового виходу характеризувалося відсутністю чутливості до 100 нМ тапсигаргіну (специфічний інгібітор $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаз СР [28]), 1 мМ азиду натрія (інгібітор дихання мітохондрій [28]), але повністю пригнічувалося внесенням еозину Y (дані не наведено) (неспецифічний інгібітор АТРаз ПМ [7, 40, 41, 42, 43]). За відсутності Mg^{2+} та АТР у середовищі інкубації зростання флуоресцентної відповіді практично не спостерігалось (рис. 3.27). Внесення у

середовище інкубації аліквоти розчину ЕГТА (2 мМ) разом з Ca^{2+} іонофором А-23187 (2,5 мкМ) (показано стрілками) зменшувало флуоресцентний сигнал fluo-4 і призводило до припинення подальшого зростання квантового виходу зонду (рис. 3.27, 450 с).

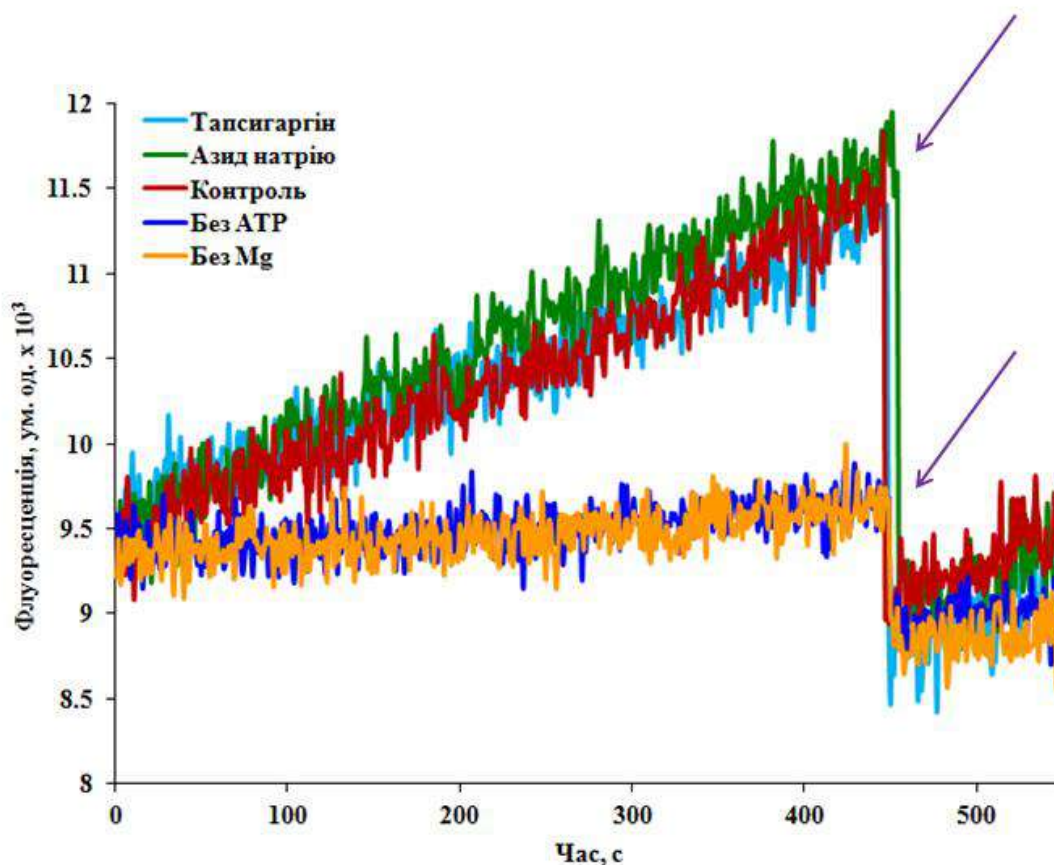


Рис. 3.27. Кінетика флуоресценції Ca^{2+} -чутливого зонду fluo-4 за умов моделювання Mg^{2+} -АТР-залежної акумуляції іонів Ca^{2+} в везикулах («inside out») плазматичної мембрани клітин міометрія. Стрілкою позначено момент внесення аліквоти розчину кальцієвого іонофору А-23187 разом з ЕГТА (кінцеві концентрації у середовищі інкубації 5 мкМ та 2 мМ відповідно). Наведено результат типового експерименту

Отже, отримані нами результати свідчать на користь того, що запропонована нами система дозволяє реєструвати Ca^{2+} транспорт у везикули плазматичних мембран, основна компонента якого обумовлена саме активністю Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани.

3.5.2. Дослідження впливу калікс[4]арену C-90 на Mg^{2+} , АТР-залежний Ca^{2+} -транспорт у препараті везикул плазматичної мембрани.

В подальших експериментах, ми вивчали вплив калікс[4]арену C-90 на транспортну активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани використовуючи розроблену нами модель.

Ми показали, що калікс[4]арен C-90, використаний у концентрації 100 мкМ, ефективно пригнічує транспортну активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани, оскільки накопичення іонів Ca всередині везикул не спостерігається (рис. 3.28).

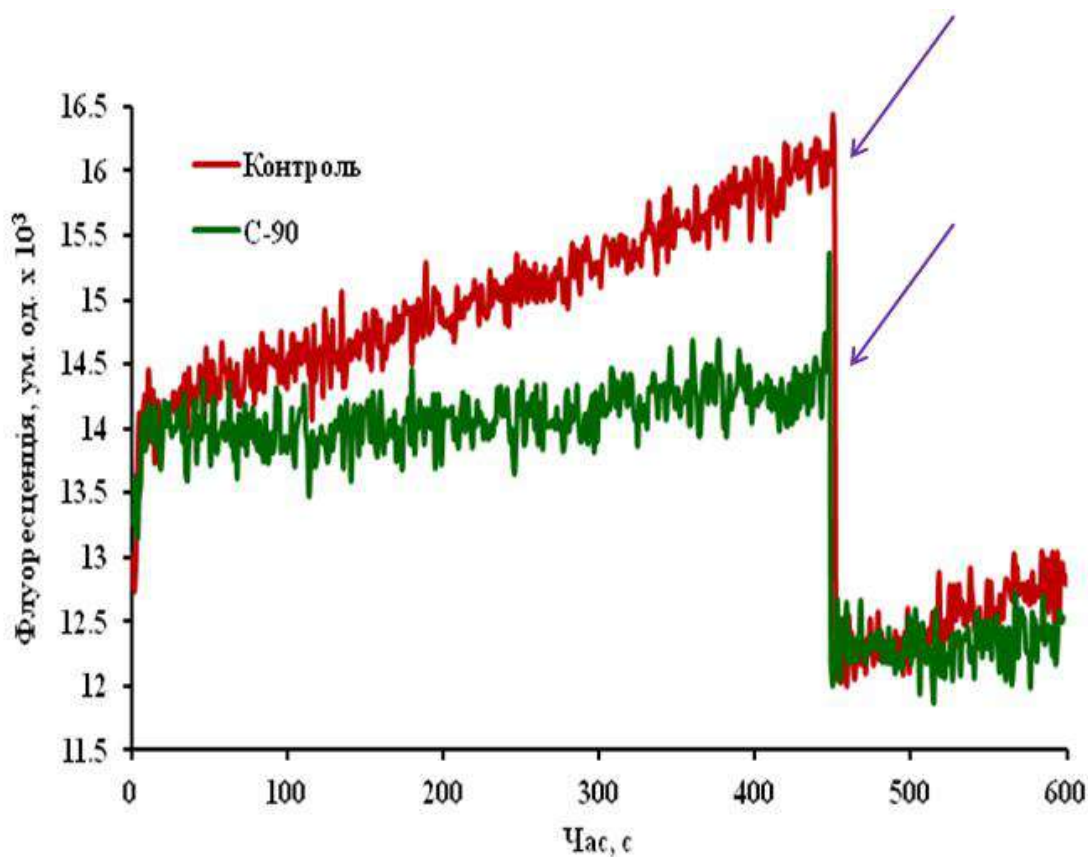


Рис. 3.28. Вплив калікс[4]арену C-90 (100 мкМ) на Mg^{2+} -АТР-залежний транспорт Ca^{2+} у фракції плазматичної мембрани міометрія. Стрілкою позначено момент внесення аліквоти розчину кальцієвого іонофору A-23187 разом з ЕГТА (кінцеві концентрації у середовищі інкубації 5 мкМ та 2 мМ відповідно). Наведено результат типового експерименту

Необхідно відмітити, що за умов сукупного внесення ЕГТА та іонофору А-23187, відбувається падіння флуоресцентного сигналу нижче початкового рівня. Це може бути пояснено тим, що ще до активації транспорту іонів кальція Ca^{2+} -помпою плазматичної мембрани у везикулах плазматичних мембран присутня певна кількість вільного Ca^{2+} , що і підвищує флуоресцентний сигнал fluo-4. Після внесення ЕГТА весь вільний Ca^{2+} зв'язується, і це, в свою чергу, призводить до зниження квантового виходу зонду нижче за початковий рівень сигналу.

Ми раніше показали, що калікс[4]арен С-90 пригнічує АТР-гідролазну активність Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани. Але інгібування ензиматичного гідролізу АТР неоднозначно вказує на пригнічення і транспортної активності. Проведені нами дослідження і отриманий результат (рис. 3.28) дійсно підтверджує те, що С-90 інгібує не тільки АТР-гідролазну активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаз, але і транспортну функцію Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани у міоцитах матки.

Недоліком використаної моделі везикул плазматичних мембран є відсутність контролю за трансмембранним потенціалом, який характерний для плазматичних мембран гладеньком'язових клітин. Поряд з тим, у літературних даних зустрічалися згадки про калікс[4]арени – ефектори потенціал-чутливих каналів, дія яких була найбільш ефективною за деполяризації [44, 45]. Варто врахувати той факт, що активність Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани швидше за все змінюється під впливом змін потенціалу [46]. А також, зважаючи на можливість вбудовування калікс[4]аренів у плазматичну мембрану, необхідно оцінити вплив поляризації мембрани на реалізацію дії калікс[4]арену С-90, оскільки наявність трансмембранного потенціалу на інтактних гладеньком'язових клітинах може як повністю нівелювати

можливість інгібування Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани, так і підсилювати його інгібіторну дію.

3.5.3. Вивчення залежності інгібіторного ефекту калікс[4]арену C-90 на транспортну активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани від ступеня її поляризації.

Раніше було теоретично обґрунтовано можливість формування негативного трансмембранного потенціалу на везикулах плазматичних мембран (зі знаком «-» на внутрішній поверхні мембран) з використанням рівноваги Гіббса-Доннана [47]. Для формування потенціалу Гіббса-Доннана у найпростішому варіанті необхідно 2 типу солі: проникна через мембрану та така сіль, яка містить непроникний іон. У якості проникної солі було обрано KCl, оскільки K^{+} є одним з найважливіших біогенних елементів, який постійно присутній у всіх клітинах організмів. K^{+} бере участь у функціонуванні іонних каналів і регуляції проникності біологічних мембран, в генерації і проведенні нервового імпульсу, в діяльності серця та інших м'язів [48]. У якості солі непроникного катіону – холін хлорид, непроникного аніону – цитрат калію.

Можна виділити 4 варіанти розподілу солі з непроникним іоном в системі «мембранні везикули – середовище інкубації»: 1) непроникний катіон знаходиться у везикулах плазматичних мембран; 2) сіль непроникного аніону знаходиться всередині великул плазматичних мембран; 3) сіль непроникного катіону знаходиться у середовищі інкубації; 4) за умов наявності непроникного аніону у середовищі розведення. Згідно з теоретичними розрахунками найбільш перспективними для формування високих значень потенціалу є ті, де непроникний іон розташований у середовищі розведення.

Для доведення існування потенціалу Гіббса-Доннана у системі «везикули плазматичних мембран – середовище розведення» було використано два зонди: DiOC₆(3) та оксонол VI, - для позитивного та негативного (відносно внутрішньої мембрани везикул плазматичних мембран) потенціалу відповідно. З використанням потенціал-чутливого зонду DiOC₆(3) було побудовано калібрувальну криву залежності потенціалу від флуоресцентної відповіді зонду (дані не наведені). Експериментально присутність потенціалу доведена за допомогою позитивно зарядженого потенціал-чутливого зонду оксонолу VI, у якого відбувається зсув спектру емісії і екстинкції у довгохвильову область, а також підвищення квантового виходу зонду після аплікації поляризованих везикул.

Згідно літературних даних [49] позитивно заряджений флуоресцентний зонд DiOC₆(3) підвищує свій квантовий вихід у відповідь на зв'язування з протеїнами, які входять до складу поляризованих мембран (знак на внутрішній поверхні «-»). Підвищення концентрації DiOC₆(3) викликає агрегацію молекул зонду, що призводить до самогасіння флуоресценції (рис. 3.29).

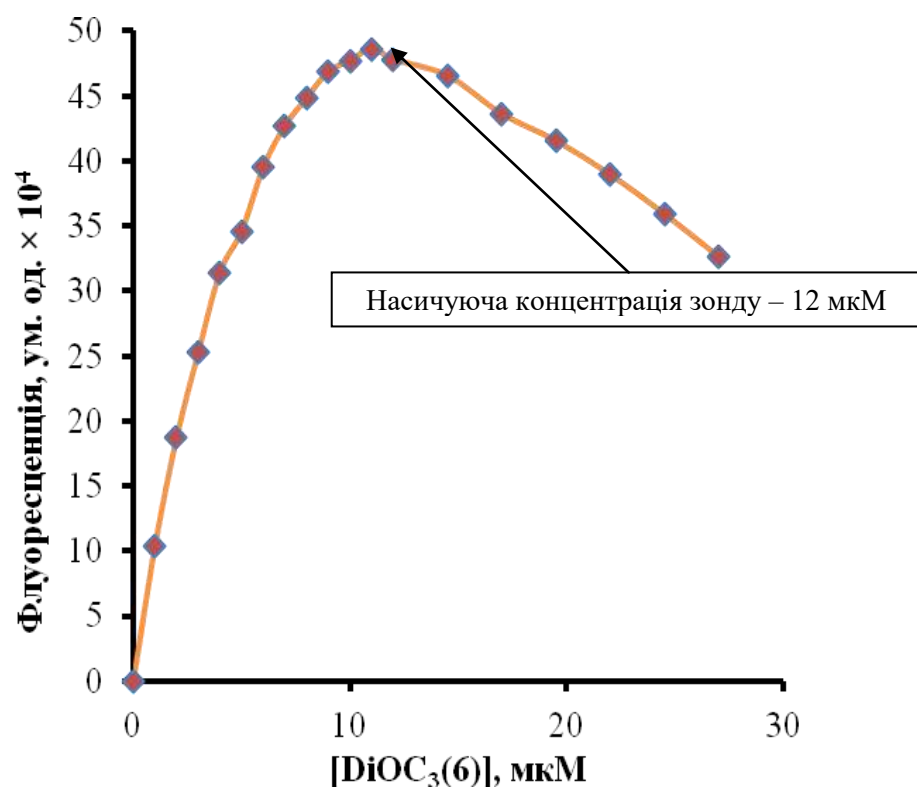


Рис. 3.29. Концентраційна залежність флуоресценції потенціал-чутливого зонду DiOC₆(3). Наведено результати типового експерименту.

Таким чином нами була встановлена критична концентрація зонду, за якої відбувається гасіння флуоресценції > 12 мкМ (максимум кривої на рис. 3.29).

На рис. 3.30 наведено результати типового експерименту, який виконаний з використанням везикул плазматичних мембран міоцитів матки. У всіх експериментах перед внесенням везикул плазматичних мембран чекали стабілізації флуоресцентної відповіді DiOC₆(3) (близько 5 хвилин), вносили аліквоту везикул плазматичних мембран (66 мкг протеїну), після чого перевіряли, чи не дисипує потенціал. Після цього додавали 0,005 % SDS – за цих умов сигнал контролю та проби мав виходити на один рівень. Як можна бачити (рис. 3.39), запропонована нами методика створення потенціалу забезпечує формування саме рівноважного мембранного потенціалу. Окрім того,

додатково проводили вимірювання флуоресценції протягом 10-15 хв для того, щоб переконатися, що потенціал не дисипує у часі.

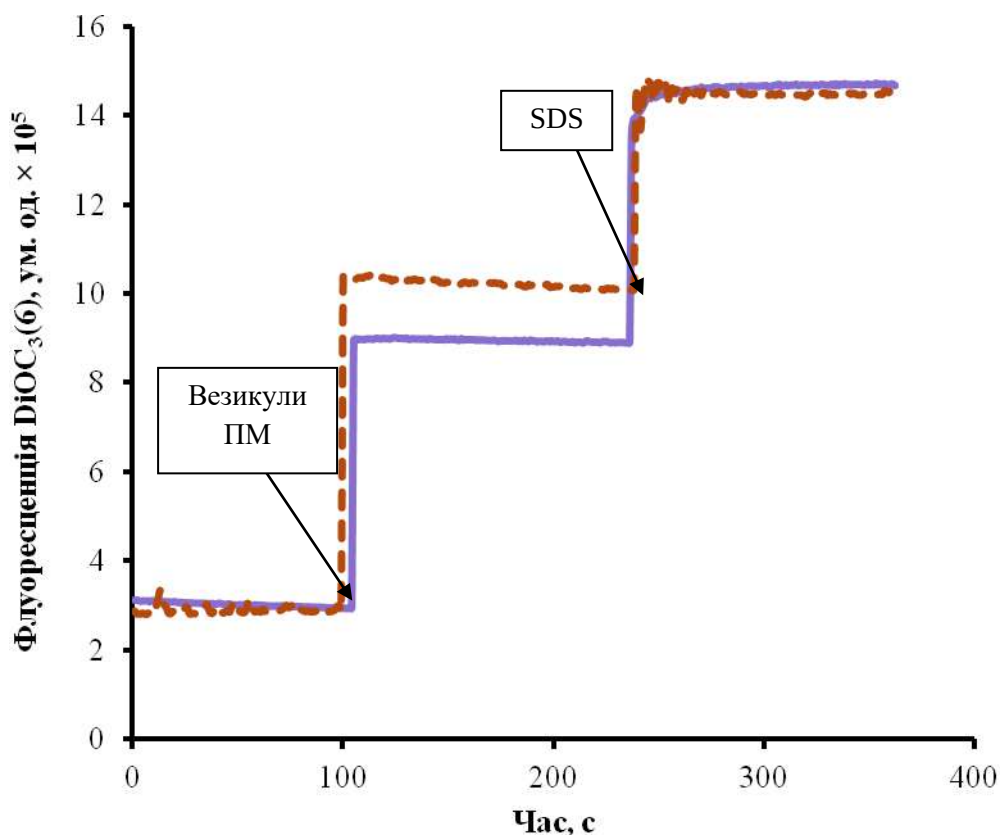


Рис. 3.33. Флуоресцентна відповідь потенціал-чутливого зонду $\text{DiOC}_6(3)$ за наявності та відсутності потенціалу Гіббса-Доннана на везикулах плазматичних мембран: контроль (пунктирна лінія) – у середовищі 300 мМ KCl і розрахований потенціал = 0 мВ, проба (суцільна лінія) – середовище містить 297 мМ холін хлориду та 3 мМ KCl і розрахований потенціал = -65 мВ. Концентрація KCl у везикулах 300 мМ. Наведено результати типового експерименту.

Зміна флуоресцентного сигналу визначалася як безрозмірний коефіцієнт r :

$$r = F_{\text{с}} / F_{\text{фоновий}}, \quad (3.1)$$

де $F_{\text{фоновий}}$ — флуоресцентний сигнал до аплікації везикул, $F_{\text{с}}$ — флуоресцентний сигнал після аплікації везикул. Розрахований коефіцієнт r для контролю $2,93 \pm 0,57$ та проби $1,57 \pm 0,27$ ($M \pm m$; $n = 15$, $p < 0,01$).

Для калібрування флуоресцентної відповіді потенціал-чутливого зонду DiOC₆(3), (2,5 мкМ) створювали градієнт аплікацією різного співвідношення концентрацій KCl та холін хлориду. Значення K⁺-рівноважного потенціалу розраховували як:

$$E_D = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K_e^+]_{eq}}{[K_i^+]_{eq}}, \quad (3.2)$$

де $[K_e^+]_{eq}$ та $[K_i^+]_{eq}$ – концентрація K⁺ поза та в середині везикул відповідно після досягнення рівноваги, R – універсальна газова стала, T – абсолютна температура, F – константа Фарадея.

При підготовці розчинів дотримувалися постійної іонної сили, при цьому були використані розчини наступного складу (наведено початкову концентрацію солей): 300 мМ K_i⁺/300 мМ K_e⁺ (розрахований потенціал Δφ= 0 мВ), 300 мМ K_i⁺/250 мМ K_e⁺ + 50 мМ холін хлориду (розрахований потенціал Δφ= -0,08 мВ), 300 мМ K_i⁺/200 мМ K_e⁺ + 100 мМ холін хлориду (розрахований потенціал Δφ= -4,77 мВ), 300 мМ K_i⁺/100 мМ K_e⁺ + 200 мМ холін хлориду (розрахований потенціал Δφ= -13,9 мВ), 300 мМ K_i⁺/3 мМ K_e⁺ + 297 мМ холін хлориду (розрахований потенціал Δφ= -57,8 мВ). Середовище інкубації окрім того містило 20 мМ Hepes-Tris (pH 7,4; 37 °C).

Розрахований потенціал калібрували з коефіцієнтом поляризації (β), який визначали на основі відмінності між квантовим виходом зонду DiOC₆(3) в умовах поляризованих та неполяризованих везикул.

$$\beta = \frac{I_{max} - I}{I_{max} - I_{min}}, \quad (3.3)$$

де I_{max} – значення флуоресценції в ум. од. у контролі (середовище містить 300 мМ KCl) після внесення везикул ПМ, I – значення флуоресценції (ум. од.) у пробі (містить 300 мМ холін хлорид або суміш холін хлориду та KCl), I_{min} – значення флуоресценції (ум. од.) у пробі до внесення везикул плазматичних мембран.

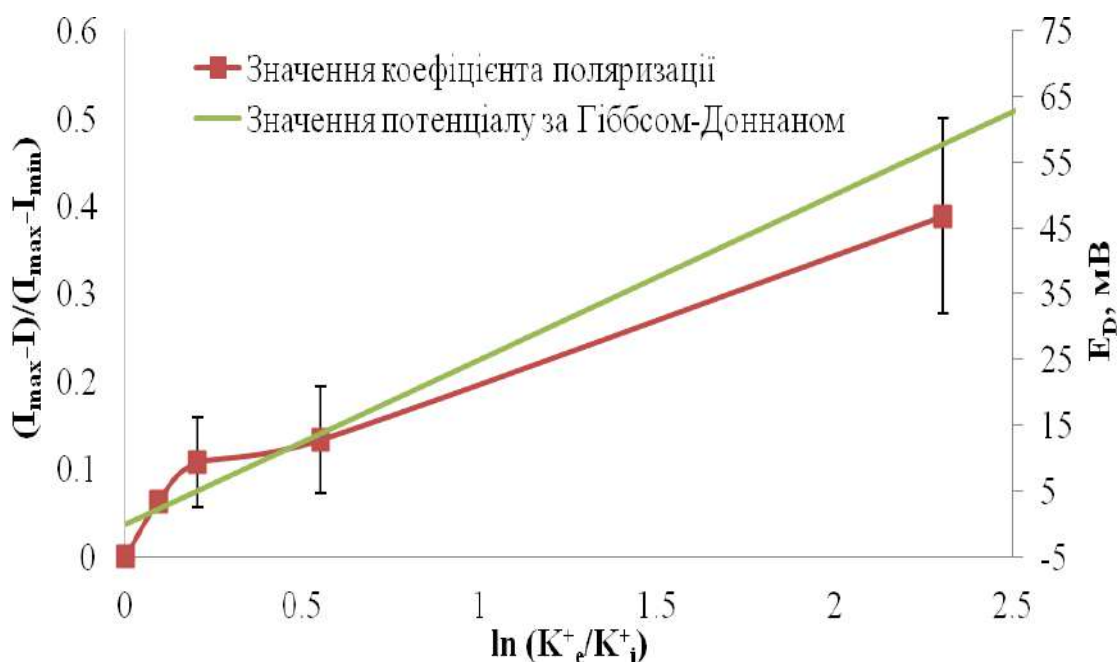


Рис. 3.31. Залежність коефіцієнта поляризації флуоресцентного потенціал-чутливого зонду DiOC₆(3) та теоретичного розрахованого потенціалу Гіббса-Доннана, E_D від співвідношення концентрації K^+ у середовищі інкубації та везикулах плазматичної мембрани ($M \pm m$, $n = 5$).

З рис. 3.31 можна бачити, що флуоресцентна відповідь зонду DiOC₆(3) калібрується з рівноважним потенціалом Гіббса-Доннана E_D , що є перспективним для поляризації мембран везикул плазматичних мембран до кількох десятків мВ. Це може в подальшому використовуватися для вивчення потенціал-залежних властивостей трансмембранних протеїнів.

Задля реєстрації позитивного потенціалу на внутрішньому боці везикул плазматичних мембран було використано оксонол VI. Згідно з літературними даними цей зонд має незначний зсув (на 2-3 нм) у спектрах збудження і поглинання у довгохвильову область при аплікації везикул плазматичних мембран. Якщо везикули поляризовані (з використанням « K^+ -валіноміцинової системи») зсув у довгохвильову область був більш вираженим (~ 10 нм. при трансмембранному

потенціалі +70 мВ) та супроводжувався зростанням квантового виходу зонду [50].

На рис. 3.32 наведено спектр збудження оксонолу VI до внесення везикул плазматичних мембран (рис. 3.32 (1)). Спектри оксонолу VI не змінювалися як при використанні 300 мМ KCl, так і при використанні 300 мМ цитрату калію. Після внесення везикул плазматичних мембран у контрольне середовище – відбувається зсув спектру в довгохвильову область (на 3-4 нм), що узгоджується з даними літератури (рис. 3.32 (2)). Аплікація везикул плазматичних мембран у середовище проби обумовлює зсув піку флуоресценції ~ на 13 нм та значне зростання квантового виходу зонду. Це дозволяє стверджувати, що рівновага Гіббса-Доннана має місце у створенні трансмембранного потенціалу (знак «+» на внутрішній мембрані) на везикулах плазматичних мембран.

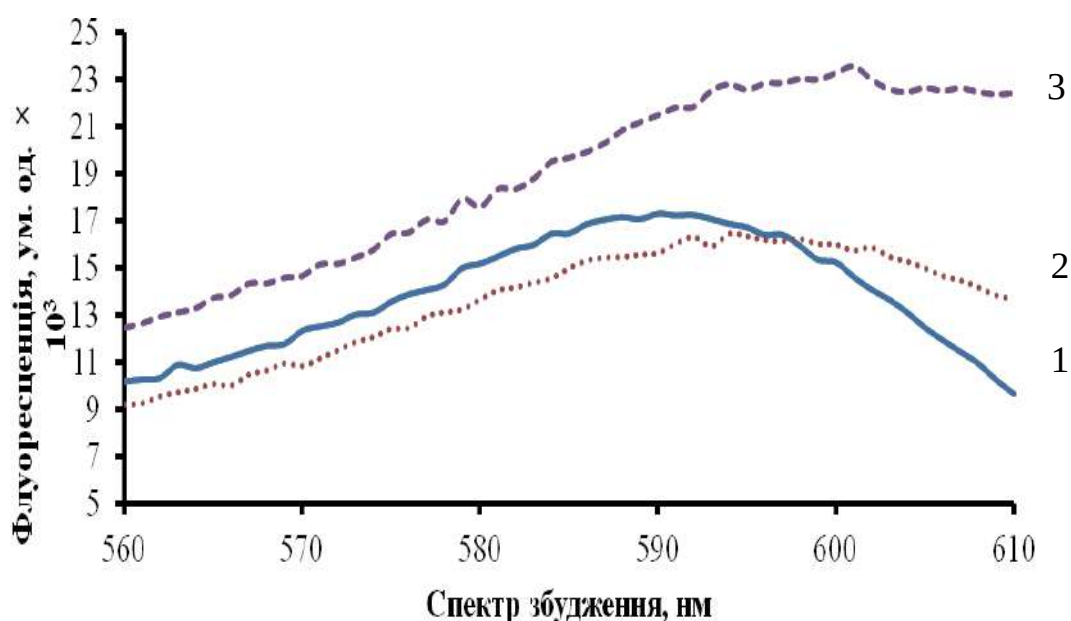


Рис. 3.32. Зміна спектру збудження оксонолу VI після внесення неполяризованих везикул плазматичної мембрани (2) та поляризованих везикул плазматичної мембрани (3) порівняно з контролем (1). Наведено результат типового експерименту.

Подібні результати також отримані для спектру емісії оксонолу VI (рис. 3.33).

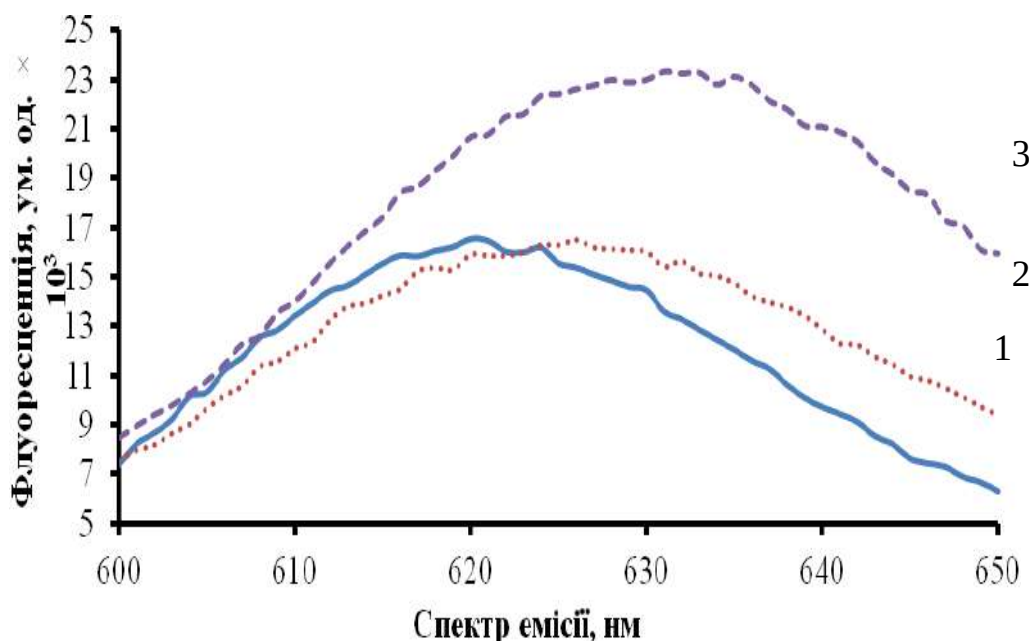


Рис. 3.36. Зміна спектру емісії оксонолу VI після внесення неполяризованих везикул плазматичної мембрани (2) та поляризованих везикул плазматичної мембрани (3) порівняно з контролем (1). Наведено результат типового експерименту.

Отже, згідно з теоретичною моделлю, яка була нами попередньо розроблена (дані не наведені) та за допомогою потенціал-чутливого зонду оксонолу VI експериментально доведено можливість формування позитивного рівноважного потенціалу Гіббса-Доннана на везикулах плазматичних мембран [51].

Питання щодо вплив потенціалу на функціонування трансмембранних протеїнів, що забезпечують як пасивний, так і активний транспорт Ca^{2+} , є вкрай актуальним. Не зважаючи на це, в літературі практично відсутні дослідження, які стосуються впливу трансмембранного потенціалу на функціонування суто Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани. Хоча існують моделі з використанням K^+ -валіноміцинової системи, згідно з якими показано стимулювання активності Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани мембранним

потенціалом (знак «-» всередині везикул) [46]. Але суттєвим недоліком подібних систем є дисипація K^+ -дифузійного потенціалу протягом досить нетривалого періоду часу (близько 5 хв), що створює складнощі для адекватної оцінки впливу трансмембранного потенціалу на активність Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани.

Із застосуванням підходу на основі рівноважного потенціалу Гіббса-Доннана нами було створено негативний та позитивний потенціал на внутрішній поверхні везикул плазматичної мембрани. Транспорт іонів Ca реєстрували за допомогою Ca^{2+} -чуливого зонду fluo-4 AM, яким попередньо навантажували везикули плазматичної мембрани. Оскільки накопичення Ca^{2+} можливо тільки у випадку неправильно замкнених везикул (“inside out”), то сформований потенціал на внутрішній поверхні таких везикул є протилежним до того, який існує в клітині. А саме: позитивний потенціал на внутрішній поверхні мембрани буде моделювати стан спокою клітини або гіперполяризацію, тоді як негативний потенціал відповідає деполяризації.

Згідно з нашими результатами (рис. 3.34) при інкубації везикул плазматичних мембран у середовищі з 297 мМ холін хлоридом відбувається зростання квантового виходу fluo-4, що свідчить про стимуляцію накопичення везикулами плазматичних мембран іонів Ca , а оскільки основна роль у накопиченні Ca^{2+} везикулами плазматичних мембран належить саме Ca^{2+} -помпі плазматичної мембрани, то можна зробити висновок про те, що негативний заряд на внутрішній поверхні, що відповідає стану деполяризації (клітини), стимулює транспортну активність Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани.

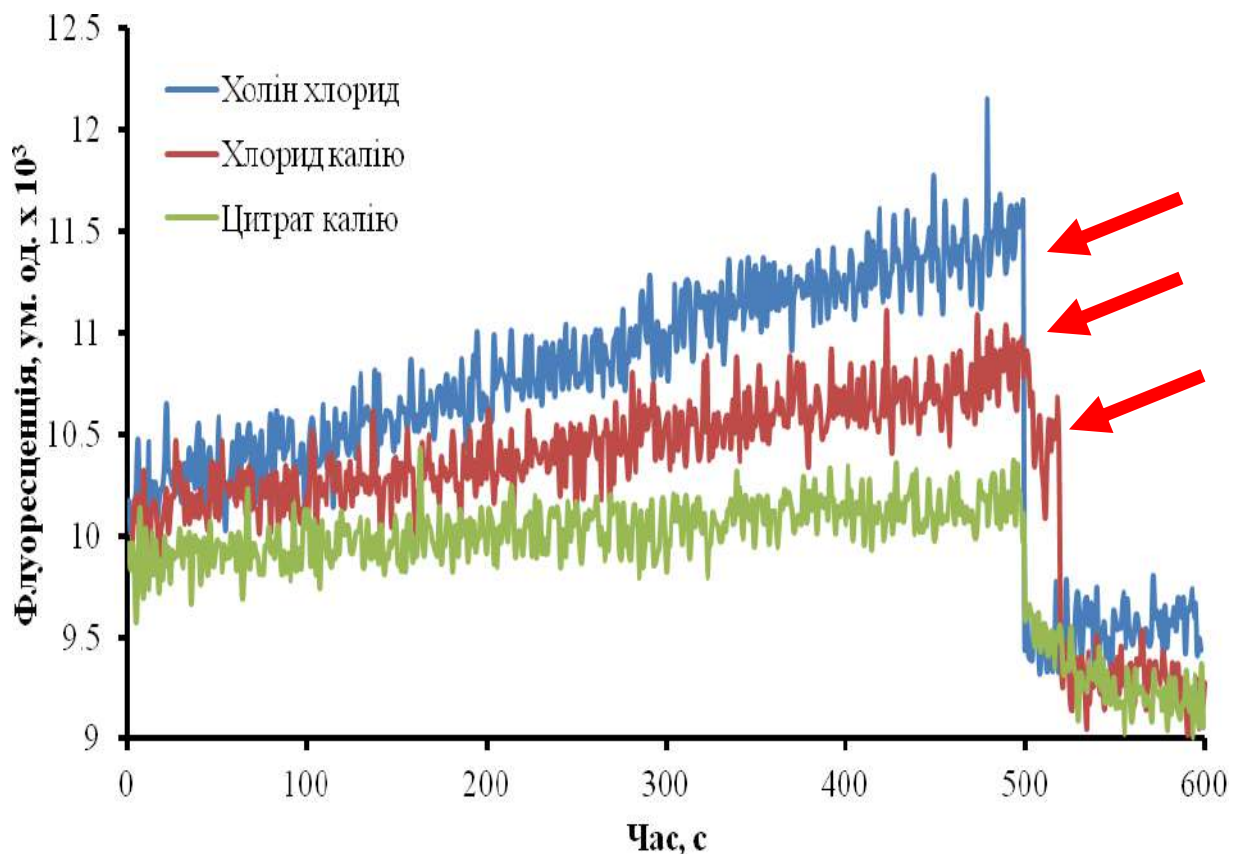


Рис. 3.34. Вплив потенціалу (розрахований потенціал: холін хлорид $\Delta\varphi = -57,8$ мВ, хлорид калію $\Delta\varphi = 0$ мВ, цитрат калію $\Delta\varphi = +57,8$ мВ) на внутрішній поверхні мембран везикул плазматичної мембрани на кінетику флуоресценції Ca^{2+} -чутливого зонду fluo-4. Стрілкою 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.

Також позитивний потенціал (на внутрішній поверхні везикул) зменшує флуоресцентний сигнал fluo-4 (рис. 3.34), що відповідно свідчить про пригнічення транспортної активності Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани. На рівні клітини це може трактуватися як пригнічення транспортної активності Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани за потенціалу спокою або за умов гіперполяризації клітинної мембрани.

Таким чином, зміна потенціалу клітинної мембрани додатково регулює активність Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани. Як було вказано вище, у контексті короткотривалого ефекту це може мати

значення при усуненні Ca^{2+} з цитозолу після скорочення або, в якості довготривалої регуляції, для зміни характеру і частоти осциляції Ca^{2+} сигналів при стимуляції агоністами.

Залежність дії калікс[4]арену C-90 від стану поляризації плазматичної мембрани визначалася як C-90-чутлива компонента Ca^{2+} -транспорту у везикулах плазматичних мембран в умовах позитивного потенціалу на внутрішній мембрані везикул плазматичних мембран (у середовищі непроникний аніон – цитрат калію), негативного потенціалу (у середовищі непроникний катіон – холін хлорид) та за відсутності потенціалу на внутрішній мембрані (склад середовища інкубації відповідає внутрішньому вмісту везикул плазматичних мембран, тобто містить тільки хлорид калію та буфер). Згідно з отриманими результатами (рис. 3.35) незалежно від наявності потенціалу та його знаку C-90-чутлива компонента Ca^{2+} -транспорту практично не змінюється.

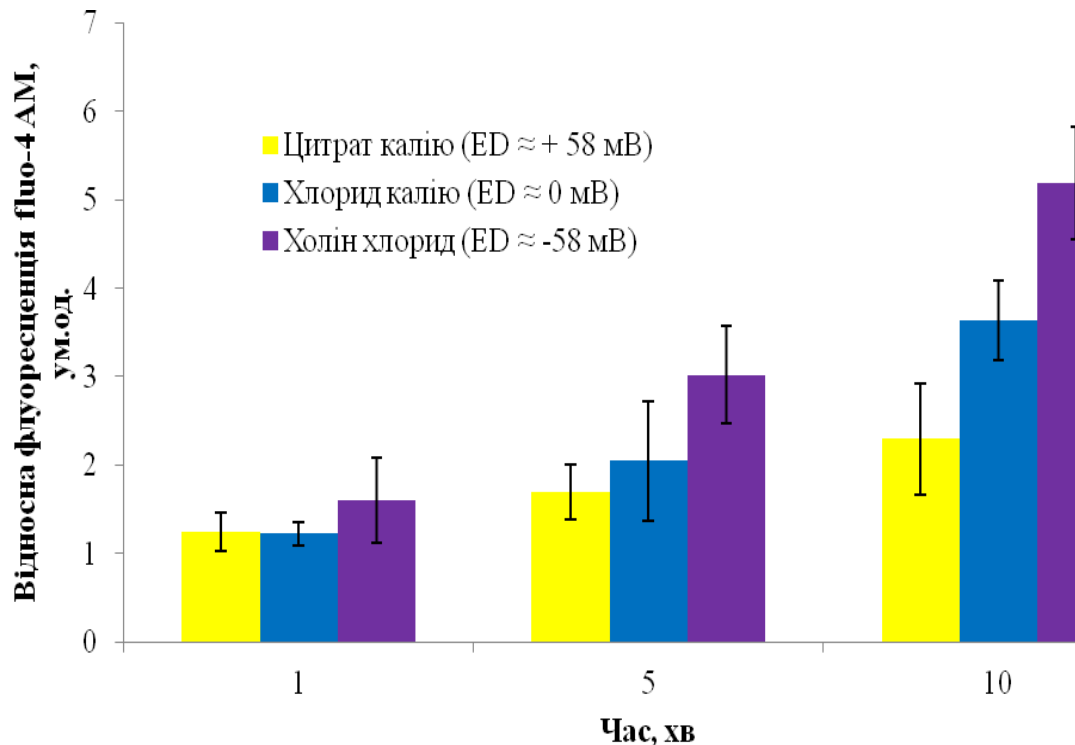


Рис. 3.35. Відносні одиниці C-90-чутливого Mg^{2+} , АТФ-залежного Ca^{2+} транспорту у везикулах плазматичної мембрани (розрахований

потенціал, на внутрішній поверхні мембрани: холін хлорид $\Delta\phi = -57,8$ мВ, хлорид калію $\Delta\phi = 0$ мВ, цитрат калію $\Delta\phi = +57,8$ мВ).

Отже, вплив С-90 на активність зазначеного протеїну не залежить від потенціалу. А саме: як при негативному потенціалі на внутрішній мембрані везикул плазматичних мембран (деполяризація), так і при позитивному потенціалі на внутрішній поверхні везикул плазматичних мембран (гіперполяризація, стан спокою) С-90-залежна компонента не змінюється протягом 8 хвилин. Хоча при тривалих часових проміжках спостерігається певна відмінність у вияві інгібіторного ефекту, а саме у випадку позитивного потенціалу на внутрішній поверхні знижується ефективність пригнічення транспортної активності (рис. 3.35, 500 с).

У подальших дослідках ми намагалися оцінити вплив калікс[4]арену С-90 на внутрішньоклітинний кальцієвий гомеостаз.

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

Загальновідомо, що концентрація іонів Са поза клітиною у 10^4 - 10^3 разів вища за його внутрішньоклітинну концентрацію [39], і відповідно, це призводить до появи суттєвого електрохімічного градієнту за Ca^{2+} , спрямованого в цитоплазму (вільна енергія Гіббса $\Delta G = RT \ln \{ [\text{Ca}^{2+}]_o / [\text{Ca}^{2+}]_i \} + 2F\Delta\psi = 40$ кДж/моль). Завдяки цьому електрохімічному градієнту іонів Са стає можливим надходження у незбуджені клітини стаціонарного «базального» потоку іонів Са, величина якого становить $10^{-15} - 10^{-14}$ моль $\text{Ca}^{2+}/\text{см}^2$ за 1 сек [52]. Проте, у стані спокою у цитоплазмі концентрація Ca^{2+} підтримується на сталому стаціонарному рівні – 10^{-7} - 10^{-8} М. Припускається, що основна роль у підтриманні базальної концентрації іонів Са (концентрація Ca^{2+}

до збудження) у цитоплазмі належить саме $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазі плазматичної мембрани [39], оскільки Ca^{2+} -уніпортер мітохондрій та $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник мають (порівняно з помпою) нижчу спорідненість до Ca^{2+} (значення K_{Ca} рівне 0,1 – 0,3 мкМ, 1 мкМ та 10 – 20 мкМ відповідно [53]).

Ми припустили, що пригнічення активності саме Mg^{2+} ,АТР-залежної Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани призведе до зростання базальної концентрації Ca^{2+} в клітинах міометрія і, отже, до збільшення базального тонуусу матки. Дійсно, з літературних даних відомо, що використання тапсигаргіну (специфічного інгібітора $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазі саркоплазматичного ретикулума) призводить до незначного зростання внутрішньоклітинної концентрації кальцію [54]. У той же час у випадку гладеньких м'язів саркоплазматичний ретикулум є, порівняно з іншими м'язами, слабкорозвиненим, займає близько 5 % внутрішньоклітинного об'єму та має нижчу ємність щодо іонів Ca порівняно з цитоплазмою, тому, відповідно, блокування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазі саркоплазматичного ретикулума не може використовуватися для підвищення стаціонарної (нетранзійентної) цитозольної концентрації Ca^{2+} [52, 55].

Отже, взявши до уваги визначені нами у дослідях кінетичні параметри чутливості $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазі плазматичної мембрани до пригнічувальної дії калікс[4]арену С-90 та використавши метод математичного моделювання, ми розбудували просту кількісну модель (в стаціонарному режимі) індукції зазначеним калікс[4]ареном збільшення базальної концентрації іонів Ca в міоцитах матки.

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

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

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

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

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

де зменшуване описує базальне надходження іонів Ca у клітину через плазматичну мембрану, спричинене наявністю градієнту $([Ca^{2+}]_e - [Ca^{2+}]_i)$ в залежності від константи швидкості проникності мембрани в даному випадку для іонів Ca γ , а від'ємник – це швидкість роботи Mg^{2+} , АТР-залежної Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани. За стаціонарних умов концентрація Ca^{2+} у клітині не змінюється, тобто $\frac{d[Ca^{2+}]_i}{dt} = 0$. У цьому випадку рівняння (2) перетворюється на кубічне рівняння (3):

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

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

очікуваним значенням внутрішньоклітинної концентрації кальцію (≈ 100 нМ).

Згідно з результатами експериментів, при концентрації калікс[4]арену C-90 0,1-50 мкМ значення K_{Ca} практично не змінюється (тобто $\langle K_{Ca} \rangle = K_{Ca}$), а змінюється лише V_{max} , що свідчить про механізм повного неконкурентного інгібування в заданих межах концентрації калікс[4]арену C-90. У випадку ж повного неконкурентного інгібування величина $I_{0,5} = K_i$. Тоді, відповідно до відомих положень ензиматичної кінетики, для $\langle V_{max} \rangle$ (рис. 3а) маємо рівняння (4):

$$\langle V_{max} \rangle = \frac{K_i}{K_i + [C-90]} V_{max}. \quad (4)$$

За нашими попередніми результатами є підстави припускати, що за фізіологічних концентрацій іонів Ca ($< 0,1$ мкМ) величина $I_{0,5} = K_i$ практично не залежить від концентрації Ca^{2+} .

Використовуючи сталі значення $\gamma = 10^{-3} \text{ см}^{-1}$ [52], $[Ca^{2+}]_i = 1 \cdot 10^{-3} \text{ М}$ [39], $K_{Ca} = 1,8 \cdot 10^{-7} \text{ М}$, $I_{0,5} = 2 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ та симулюючи значення V_{max} , що початково становило $4,6 \cdot 10^{-6} \text{ М/хв}$ [52], ми, відповідно до рівнянь (3) та (4), одержали модельну залежність базальної рівноважної концентрації іонів Ca у незбуджених міоцитах матки за умов зміни концентрації калікс[4]арену C-90 – селективного інгібітора Mg^{2+} , АТР-залежної Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани (рис. 3.36).

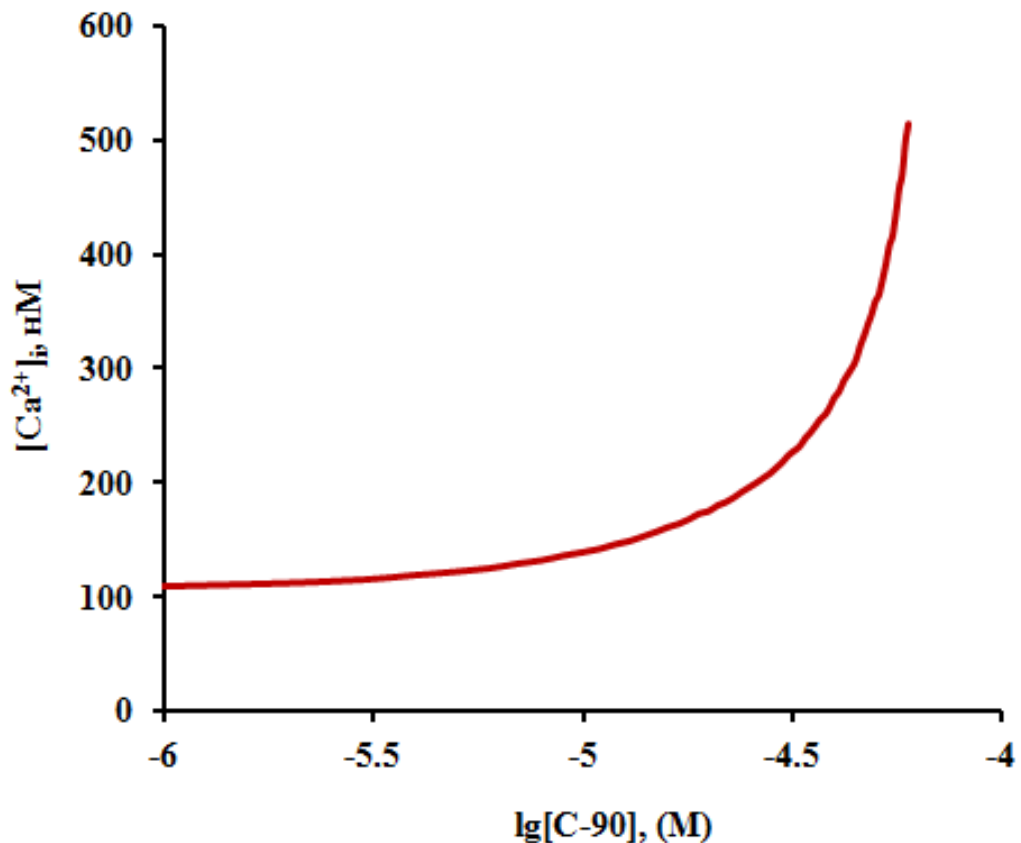


Рис. 3.36. Математична модель залежності рівноважної базальної концентрації іонів Са в клітинах міометрія від концентрації калікс[4]арену C-90

Таким чином, згідно з результатами модельних розрахунків, маємо наступне: при концентрації селективного інгібітора Mg^{2+} , АТР-залежної Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани калікс[4]арену C-90 10^{-6} – $2 \cdot 10^{-5}$ М хід кривої зміни цитозольної концентрації Ca^{2+} у незбуджених міоцитах є досить пологим, а при концентрації калікс[4]арену C-90 вищої за $2 \cdot 10^{-5}$ М крива є наближеною до експоненціальної залежності. Отже, застосування калікс[4]арену C-90 у низьких концентраціях (< 10 – 20 мкМ) має перевагу через помірний вплив на внутрішньоклітинну концентрацію Ca^{2+} , а саме: цитоплазматична концентрація іонів Са зростає не більше, ніж у 2 рази стосовно початкової (100 нМ), що не повинно призводити до контрактури матки, а дозволить керувати базальним тонусом її м'язів.

3.7. Вплив калікс[4]арену C-90 на внутрішньоклітинну концентрацію Ca^{2+} у клітинах гладеньких м'язів.

Зважаючи на те, що Ca^{2+} -помпа плазматичної мембрани відіграє важливу роль у контролі концентрації іонів Ca у цитоплазмі гладеньких м'язів та, приймаючи до уваги результати математичного моделювання, важливо було з'ясувати експериментально, чи буде впливати калікс[4]арен C-90 на внутрішньоклітинну концентрацію Ca^{2+} у гладеньком'язових клітинах. Тому у своїх подальших експериментах ми використали метод конфокальної мікроскопії.

Із використанням Ca^{2+} -чутливого зонду fluo-4 була доведена зміна внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} під впливом калікс[4]арену C-90. Було показано, що під дією калікс[4]арену C-90 (20 мкМ) відбувається транзійтне (протягом 2-2,5 хв) різке зростання флуоресцентної відповіді Ca^{2+} -чутливого зонду fluo-4 AM на $45 \pm 9\%$ ($M \pm m$, $n = 7$) у клітині (рис. 3.31 та рис. 3.38).

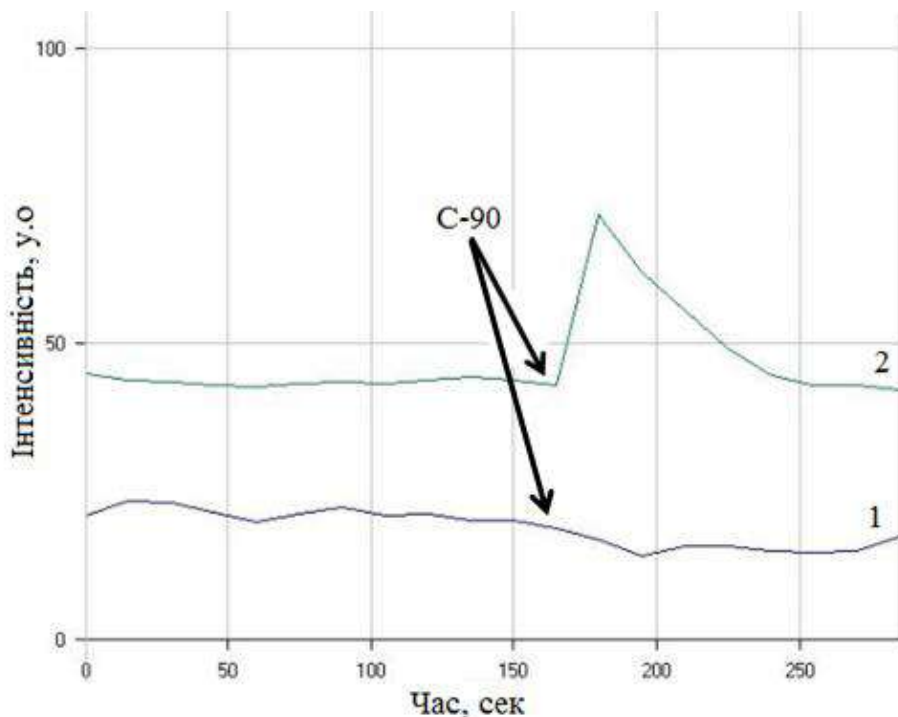


Рис. 3.37. Зміна флуоресценції зондів в міоциті матки, зареєстрована за допомогою конфокальної мікроскопії: ДНК-чутливого Hoechst (1) та Ca^{2+} -чутливого fluo-4 AM (2). На 160 сек було внесено аліквоту розчину С-90 (кінцева концентрація - 20 мкМ). Наведено результати типового експерименту

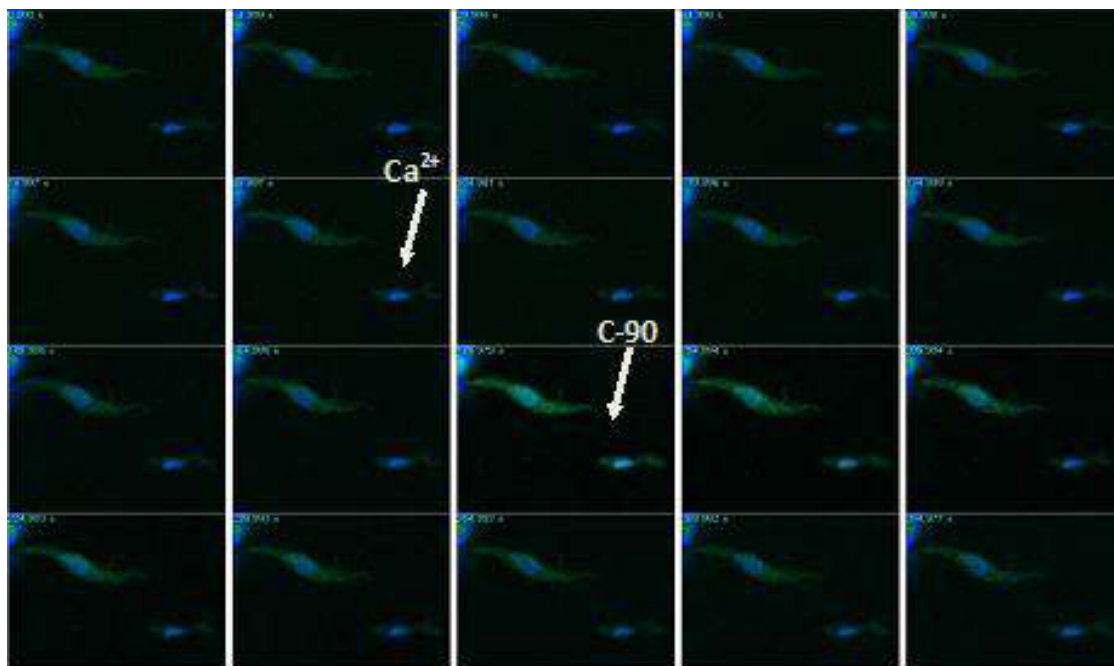


Рис. 3.38. Серія послідовних знімків гладеньком'язових клітин з використанням скануючого конфокального мікроскопу. Стрілками позначено моменти внесення Ca^{2+} (3 мкМ) та калікс[4]арену С-90 (20 мкМ). Наведено результати типового експерименту

Одержані дані свідчать про те, що під впливом селективного інгібітора $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани – калікс[4]арену С-90, дійсно має місце зростання концентрації іонізованого Ca^{2+} у міоцитах. Після цього відбувається зменшення квантового виходу зонду та повернення інтенсивності флуоресценції до початкового рівня.

У контролі, де використовувалася калікс[4]аренова «чаша» С-150 (20 мкМ), яка за нашими результатами не мала вираженого впливу на активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани, такого

підвищення флуоресцентного сигналу fluo-4 не спостерігалось (результати не наведено). Також незмінним лишився рівень флуоресценції Hoechst, який був локалізований в основному в ядрі гладеньком'язових клітин, та фону.

Ці результати свідчать про те, що під впливом калікс[4]арену C-90 (20 мкМ) відбувається підвищення концентрації Ca^{2+} у клітині, яке пов'язано зі зниження базальної активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани. Разом з тим протягом наступних 100 сек концентрація Ca^{2+} знижується до початкового рівня, що може бути пов'язано з залученням компенсаторних Ca^{2+} -транспортуючих систем в міоцитах до релаксації кальцієвого сигналу, які мають нижчу афінність до Ca^{2+} та реагують, головним чином, на його високі концентрації в клітині (Ca^{2+} -уніпортер мітохондрій, Na^{+} - Ca^{2+} -обмінник плазматичної мембрани).

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

Вплив калікс[4]аренів на іон-транспортні системи міоцитів може детермінувати їх вплив на форму клітин. Зміну форми гладеньком'язових клітин через модифікації водно-осмотичного балансу дозволяє встановлювати лазерна кореляційна спектроскопія, за допомогою якої можливо фіксувати зміни ефективного гідродинамічного діаметру гладеньком'язових клітин.

Згідно літературних даних показано, що фактори, які підвищують скоротливу відповідь гладеньких м'язів, так само наочно змінюють ефективний гідродинамічний діаметр гладеньком'язових клітин. Як описано в [35] внесення Ca^{2+} (3 мМ), обробка А-23187 (10 мкМ), тетраетиламонієм (1 мМ) та 4-амінопіридином (1 мМ) призводить до

зменшення ефективного гідродинамічного діаметру, що корелює зі станом скорочення гладеньких м'язів.

Як показали результати експериментів, внесення утеротоніка окситоцину (100 нМ) призводило до зменшення ефективного гідродинамічного діаметру міоцитів у випадку суспензії гладеньком'язових клітин на $23,3 \pm 3,2 \%$ ($M \pm m$, $n = 6$) відносно контрольного значення (рис 3.39, синій стовпчик).

У випадку контролю середнє значення ефективного гідродинамічного діаметру міоцитів становить близько 9 мкм. Ми вимірювали гідродинамічний діаметр гладеньком'язових клітин протягом 1 хв 5 разів, звідки розраховували середнє значення. Так, у якості контролю на розчинник аплікація аліквоти ДМСО не призводила до суттєвих змін досліджуваного параметру – гідродинамічний діаметр змінювався лише на $3,5 \pm 1,6 \%$ ($M \pm m$, $n = 6$) відносно контролю (рис. 3.39, зелений стовпчик). У той же час використання інгібітору Mg^{2+} , АТР-залежної Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин калікс[4]арену С-90 (50 мкМ) призводить, аналогічно до дії окситоцину, до зменшення гідродинамічного діаметру на $27,8 \pm 3,8 \%$ ($M \pm m$, $n = 6$) відносно контрольного значення, причому такі зміни корелюють з подібними, отриманими у випадку дії окситоцину (100 нМ) – рис. 3.39 (червоний стовпчик).

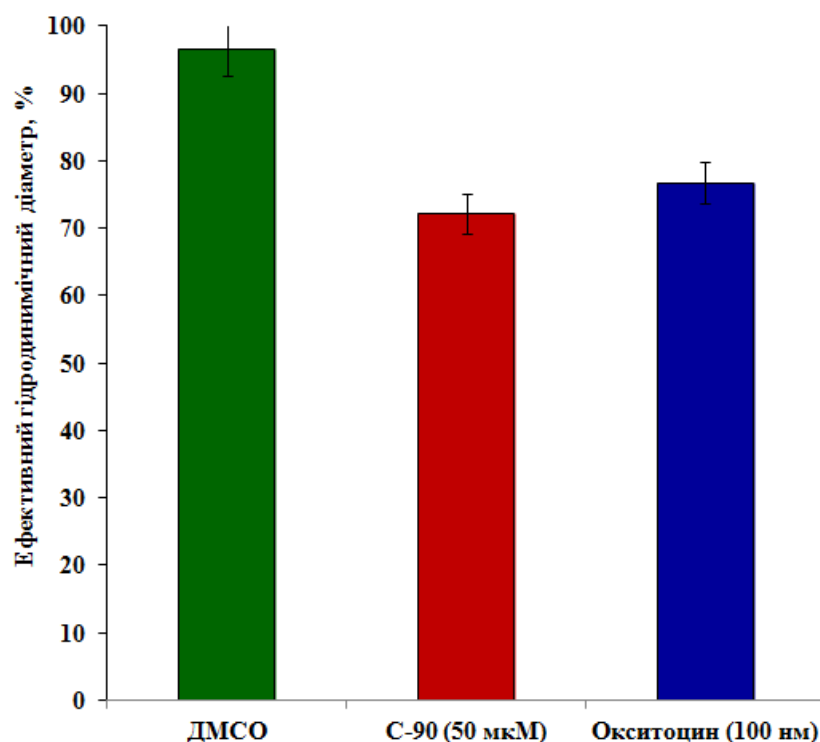


Рис. 3.39. Зміна гідродинамічного діаметру гладеньком'язових клітин за дії різних ефекторів ($M \pm m$, $n = 6$)

За 100 % прийнято контрольне значення гідродинамічного діаметру гладеньком'язових клітин за відсутності дії ефектрів

За даними літератури [56], зміна гідродинамічного діаметру ГМК корелює з ~~htpekmnfnfvb~~ тензометричних досліджень, виконаних на ГМ. Так, оскільки наші дослідження було проведено на суспензії міоцитів, коли клітини мають округлу форму, зміну гідродинамічного діаметру не можна трактувати як скорочення/подовження, але це можна пояснити з точки зору перебудови елементів цитоскелету [57, 58], які супроводжують процес скоротливої активності, що в свою чергу призводить до зміни морфології гладеньком'язових клітин. Крім того, зміни активного транспорту іонів можуть призводити до модифікації водно-осмотичного балансу між клітинами та середовищем інкубації, що також буде впливати на об'єм клітин.

Отже, калікс[4]арен С-90 зменшує ефективний гідродинамічний діаметр гладеньком'язових клітин ідентично до дії утеротоніка окситоцину. Подібна зміна гідродинамічного діаметру може

тракуватися як сукупність подій, які супроводжують процеси скорочення/розслаблення гладеньком'язових клітин, а саме зміну водно-осмотичного балансу, перебудови елементів цитоскелету. Оскільки раніше було показано, що зміна гідродинамічного діаметру гладеньком'язових клітин під впливом скоротливих агентів корелює з станом скорочення гладеньких м'язів, то подібні результати свідчать про перспективні можливості використання калікс[4]арену С-90 у якості регулятора скоротливої активності гладеньких м'язів матки.

3.9. МОЛЕКУЛЯРНИЙ ДОКІНГ ВЗАЄМОДІЇ КАЛІКС[4]АРЕНУ С-90 І ЙОГО МОДЕЛЬНИХ СПОЛУК З ЛІГАНД-ЗВ'ЯЗУЮЧИМИ ДІЛЯНКАМИ Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ.

З метою дослідження структурних особливостей калікс[4]арену С-90 ми провели молекулярне моделювання його конформації. Цей цикл досліджень було виконано у співпраці з к.б.н. О.В. Бевзою.

При цьому виходили із того, що в молекулі калікс[4]арену С-90 присутні по чотири N-сульфоніламідинові і третбутильні групи з протонованими амінними атомами азоту і двома депротонованими гідроксилами різних фосфонових фрагментів. Щоб уникнути проблеми локальних мінімумів енергії при розрахунках, ми провели конформаційний пошук оптимальної геометрії молекули, використовуючи метод молекулярної механіки (силове поле MM+) [59]. При цьому були відібрані декілька енергетично мінімізованих конформерів. Загальні енергії цих структур також перерахували напівемпіричним методом (поле CNDO), після чого вибрали одну структуру з найменшою вільною енергією. При цьому, загальна енергія після мінімізації енергії складала біля 300 ккал/моль.

Після проведення "мінімізації" енергії калікс[4]арен С-90 характеризувався конусовидною конформацією (рис. 3.40). Відстань

між сусідніми атомами кисню на нижньому вінці макроциклу у випадку трет-бутильних залишків складає біля 0,3 нм. Фенольні фрагменти бокових залишків були розташовані дистально відносно трифторметильних залишків. Причому дані залишки локалізуються майже ортогонально відносно площини макроциклу і просторово доступні для міжмолекулярних взаємодій (рис. 3.40).

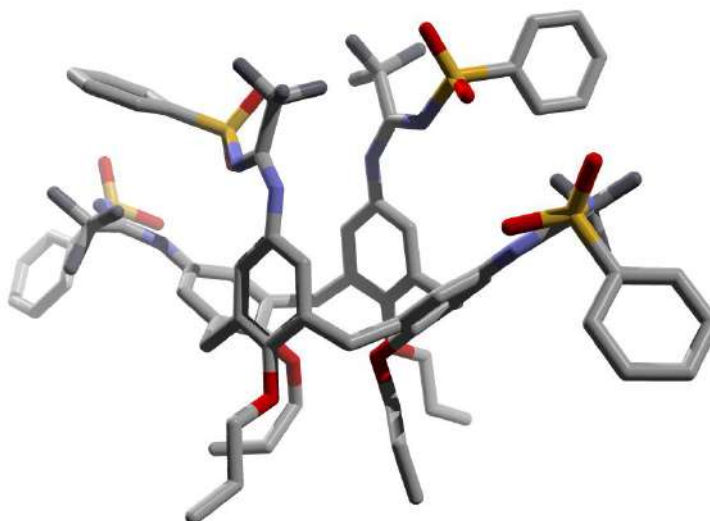


Рис. 3.40. Енергетично мінімізована структура калікс[4]арену С-90. Мінімізація енергії здійснена за допомогою методу MM2 (molecular mechanics 2)

Виходячи із даних комп'ютерного моделювання і порівняння амінокислотних послідовностей, можна припустити, що загальна структура $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРazi плазматичної мембрани подібна іншим типам P_2 -АТРаз, в особливості $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРazi сарко(ендо)плазматичного ретикулуму [60, 61, 62]. Основні “глобальні” відмінності між двома типами кальцієвих pomp зводяться до відмінності в COOH -кінцевому “хвості”, який, як правило, менше у випадку АТРazi сарко(ендо)плазматичного ретикулума (від 20 до 50 залишків), ніж у випадку АТРazi плазматичної мембрани (від 70 до 200 залишків). Зокрема, продемонстрований трохи більший розмір цитоплазматичної петлі між 2 і 3 трансмембранними ділянками і С-кінцевим доменом, в

яких знаходяться ділянки зв'язування кислих фосфоліпідів і кальмодуліна відповідно. Тому моделювання взаємодії лігандів з Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазою плазматичної мембрани здійснювали з використанням моделі АТРази сарко(ендо)плазматичного ретикулуму в якості шаблону, після проведення вирівнювання амінокислотної послідовності деяких (функціонально важливих) негомологічних ділянок Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани на шаблоні АТРази сарко(ендо)плазматичного ретикулума.

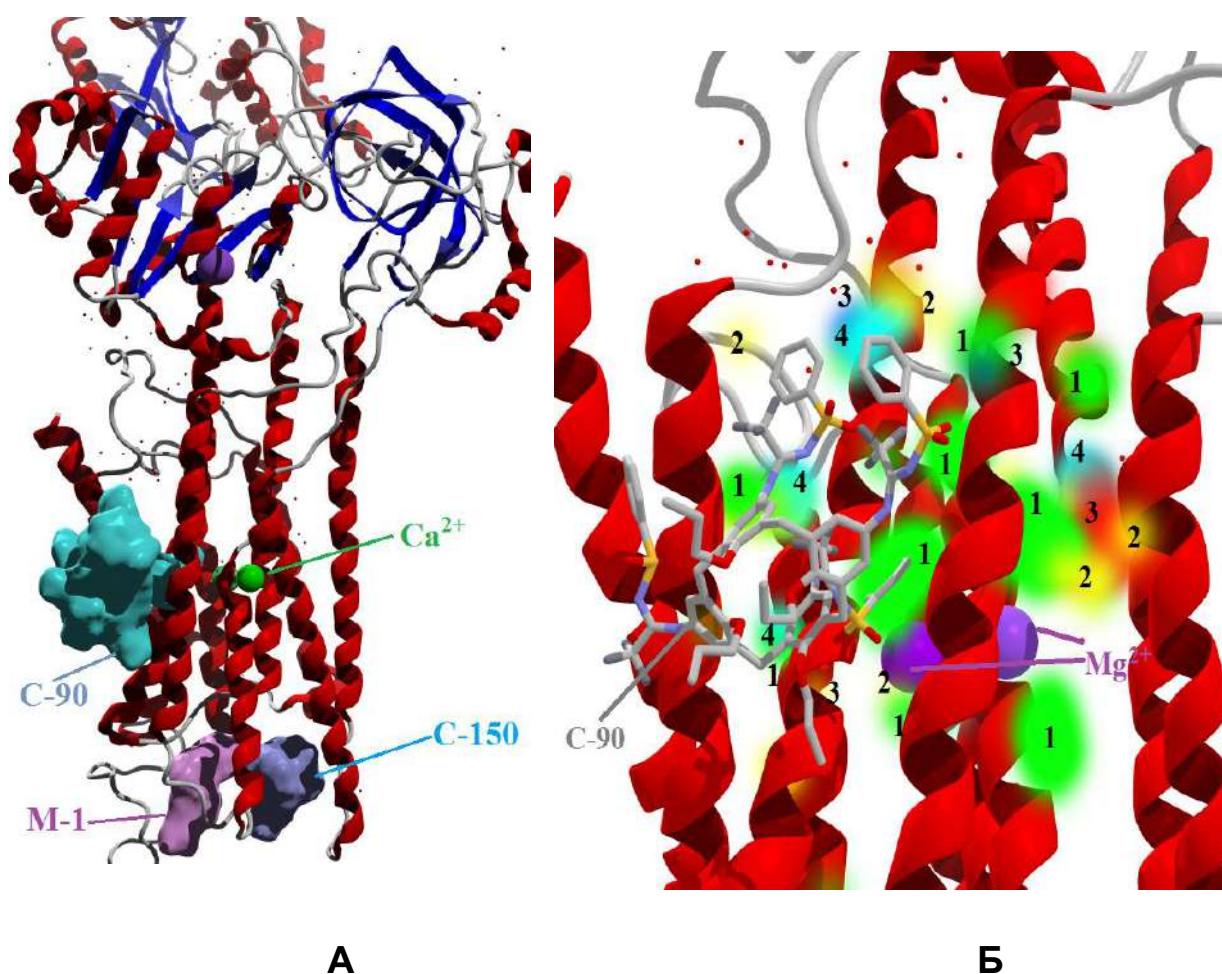


Рис. 3.41. А. Найбільш імовірні місця зв'язування різних лігандів функціонально-активними ділянками Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази (отримано методом докінгу для калікс[4]аренів C-90 і C-150, а також для фрагменту М-1). Б. Карта різноманітних типів взаємодій, які приймають участь у стабілізації C-90 з Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазою плазматичної мембрани.

Зелений (1) – стеричні взаємодії; жовтий (2) – донори водню; червоно-синій (3) – електростатичні взаємодії; синьо-зелений (4) – акцептори водню

Ми визначали потенційні сайти взаємодії лігандів з ліганд-зв'язуючими ділянками $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРazi (рис. 3.41А), наявність яких підтверджується значеннями мінімальної енергії зв'язування і амінокислотним оточенням ліганд-зв'язуючих ділянок. Із врахуванням розмірів і геометричної конформації слід було очікувати, що калікс[4]арен С-90 і його модельні сполуки (С-150, М-1) будуть мати різну спорідненість до ділянок зв'язування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРazi. Причиною цього можуть бути відмінності в організації оточення ліганд-зв'язуючих ділянок помпи для даних інгібіторів. На рис. 3.41Б приведена карта різних типів взаємодій, які приймають участь в утворенні комплексу ензиму з калікс[4]ареном С-90.

Визначення найбільш імовірних місць взаємодії калікс[4]арену С-90 з $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазою показало, що вона може утворювати з ним комплекс в області, структурно наближеної до зони зв'язування з високою спорідненістю до Ca^{2+} , котра локалізована в області петлі між спіралями М4-М6 (ділянка між трансмембранними доменами 4 і 5, що включає основний каталітичний домен, в том числі сайт зв'язування АТР) і спіралі М-8 (рис. 3.42). При цьому зазначена петля модулює функціональні властивості $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРazi, в том числі спорідненість до катіонів.

Ми не виключаємо, що зв'язування молекули калікс[4]арену С-90 в області, безпосередньо наближеної до ділянки між доменами 4 і 5, може викликати пошкодження його конформаційної рухливості шляхом зміни структури ензиму, і таким чином, впливати на реакційний цикл $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРazi і спорідненість до іонів, які приймають участь в реакції.

Результати комп'ютерного моделювання свідчать про те, що гідрофобний “карман”, який взаємодіє з гідрофобною “чашею” калікс[4]арену C-90, формують залишки Phe256, Phe776, Phe834, Phe835 і Tyr837.

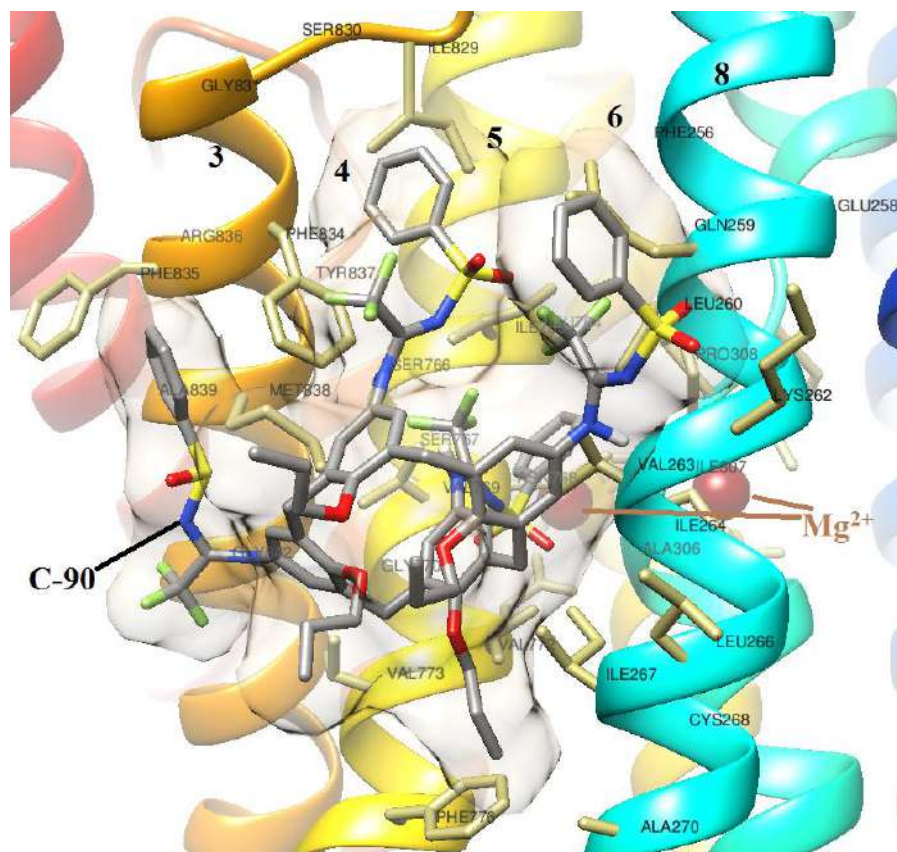


Рис. 3.42. Амінокислотне оточення комплексу “Калікс[4]арен C-90 - Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза плазматичної мембрани ”
Цифрами відмічені номери трансмембранних доменів Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази

Крім того бокові фенольні залишки калікс[4]арену формують “стекінг-зв’язок” з амінокислотами Phe256, Phe776, Phe834. Сульфоніламідинові групи калікс[4]арену взаємодіють з такими залишками: Gln259, Leu260, Val263, Ile 264, Leu266, Ile 267, Ala306, Val772, Val773, Val769, Ile765, Ile829, Met838 (рис. 3.42).

Також нами було проведено комп'ютерне моделювання взаємодії фрагментів калікс[4]арену C-90 – C-150 (“калікс[4]аренова чаша”) і фрагмент M-1 з ліганд-зв'язуючими ділянками Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази.

Було встановлено, що калікс[4]арен С-150 с найбільшою імовірністю може взаємодіяти з ензимом у примембраній області (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). Місця зв'язування модельних сполук істотно відрізняються від області зв'язування калікс[4]арену С-90, що пояснює їх незначний інгібуючий вплив на активність ензиму.

При проведенні комп'ютерного моделювання були встановлені типи взаємодій, котрі приймають участь в утворенні комплексу калікс[4]арену С-90 з ліганд-зв'язуючими ділянками Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРazi. Найбільш характерними є гідрофобні (стеричні) і електростатичні взаємодії. При цьому у більшості випадків спостерігається гідрофобний контакт між ліпофільною макроциклічною структурою калікс[4]арену і аліфатичними або ароматичними боковими ланцюгами амінокислотних залишків ензиму. На противагу цьому, друга частина молекули С-90 – гідрофільні кислотні залишки, контактують з позитивно- і негативно зарядженими R-групами амінокислот ензиму. Також відмічено стекінг-взаємодію фенольних фрагментів макроциклічної структури калікс[4]арену С-90 з ароматичними боковими ланцюгами амінокислотних залишків Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРazi. В результаті відбувається стабілізація конформації калікс[4]арену С-90 в ліганд-зв'язуючих “кишенях” ензиму.

Таким чином, одержані результати комп'ютерного моделювання відповідають експериментальним даним відносно здатності калікс[4]арену С-90 пригнічувати ензиматичну активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРazi.

3.10. ПОРІВНЯЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ КАЛІКС[4]АРЕНУ C-90 ТА СПОЛУКИ ІФТ-35 НА АКТИВНІСТЬ Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ ГЛАДЕНЬКОМ`ЯЗОВИХ КЛІТИН

Порушення скоротливої функції міометрія у жінок часто стає причиною різноманітних патологій: слабкості пологової діяльності, спонтанних абортів, передчасних пологів, викидней, атонії, гіпо- і гіпертонусу матки [63, 64, 65, 66, 67, 68]. Частота передчасних пологів у світі за середніми даними складає 9,6 % [69, 70, 71]. Зазвичай такі патології обумовлені порушеннями у функціонуванні мембранозв'язаних систем переносу катіонів, перш за все – Ca^{2+} . Тому перспективним є пошук сполук, які були б здатні модифікувати скоротливу функцію міометрія у випадку зазначених патологічних станів і водночас були б нетоксичними для організму.

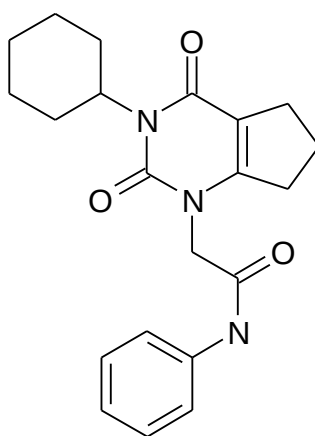
Спрямований синтез та вивчення властивостей ефекторів, які здатні проникати через плазматичну мембрану та оборотно з високою спорідненістю та селективністю змінювати ензиматичну чи транспортну активність окремих внутрішньоклітинних мембранозв'язаних та цитоплазматичних протеїнів – одна із найважливіших задач сучасної біоорганічної, біофізичної та біологічної хімії. Дійсно, створення нових високоефективних нетоксичних селективних інгібіторів та активаторів є вкрай необхідним, зокрема, для подальшого дослідження іонних, молекулярних та мембранних механізмів внутрішньоклітинної сигналізації. У галузі біохімії та біофізики м'язів це суттєво для з'ясування закономірностей 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 препаратів, здатних ефективно

модифікувати функціональну активність конкретних протеїнів у випадку її порушення за патологічних станів.

У попередньому підрозділі ми описували дію селективного інгібітора $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани - калікс[4]арену С-90. Втім, необхідно відмітити, що не менш цікаво було б знайти сполуку, яка могла б селективно активувати ензиматичну активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани.

У цьому аспекті, зокрема, представляють інтерес похідні цикlopента[d]піримідину та імідазо[1,2-а]азепінію. В ДУ «Інститут фармакології та токсикології» НАМН України було проведено скринінг на спазмолітичну, а саме токолітичну, активність зазначених похідних [72, 73]. Ми проводили скринінг низки таких сполук і виявили, що на роль селективного активатора $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани може претендувати сполука ІФТ-35.

Структурна формула похідного цикlopента[d]піримідину ІФТ-35, що був синтезований та охарактеризований у відділі синтезу фізіологічно активних речовин ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», представлена нижче:



ІФТ-35

Як показали результати проведених досліджень, калікс[4]арен С-90, використаний у концентрації 100 мкМ, пригнічує питому ензиматичну активність Ca^{2+} -транспортувальної $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -АТРази до $25,1 \pm 0,5$ % відносно контрольного значення (рис. 3.43А). Поряд з цим калікс[4]арен С-90 (100 мкМ) майже не впливав на ензиматичні активності “базальної” Mg^{2+} -АТРази, Ca^{2+} -АТРази і Na^+,K^+ -АТРази: залишкові значення активностей складали $107,7 \pm 1,0$ %, $99,3 \pm 5,51$ % і $94,2 \pm 0,6$ % відповідно відносно контролю (рис. 3.43А).

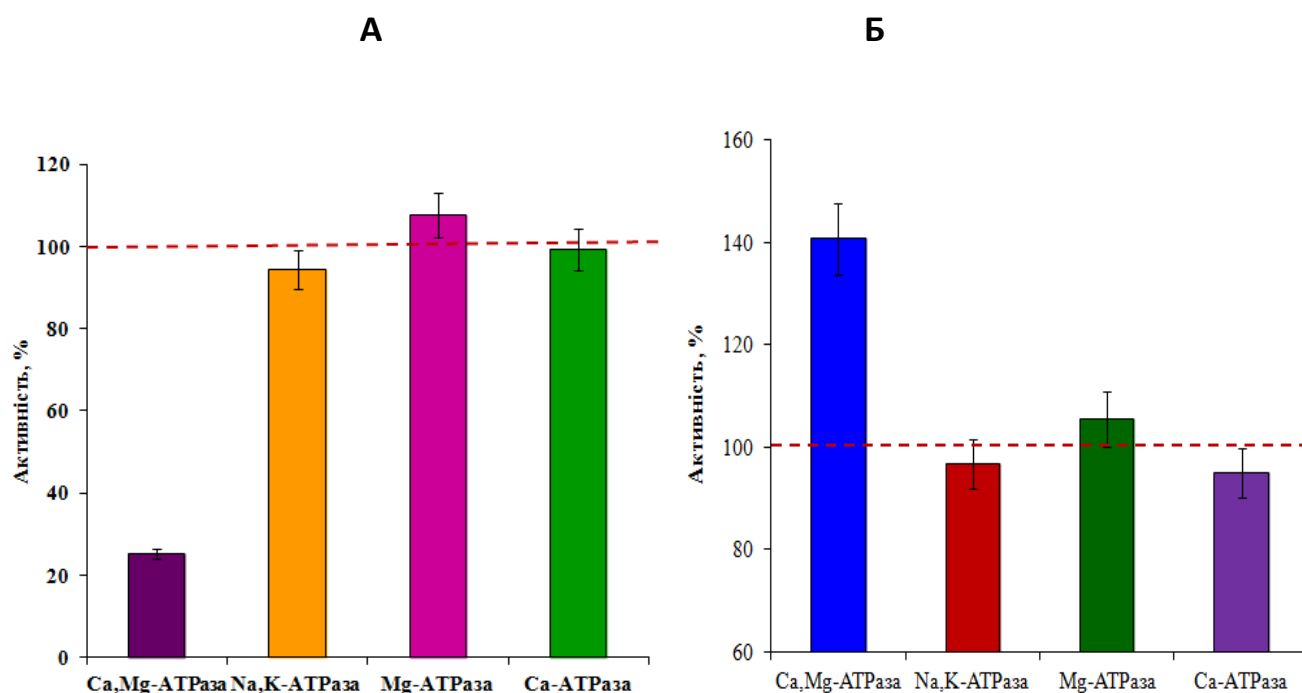


Рис. 3.43. Калікс[4]арен С-90 (100 мкМ) (А) та сполука ІФТ-35 (100 мкМ) (Б) селективно змінюють (інгібують та активують відповідно) активність Ca^{2+} -транспортувальної $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -АТРази в плазматичній мембрані клітин міометрія ($M \pm m$, $n = 5$)

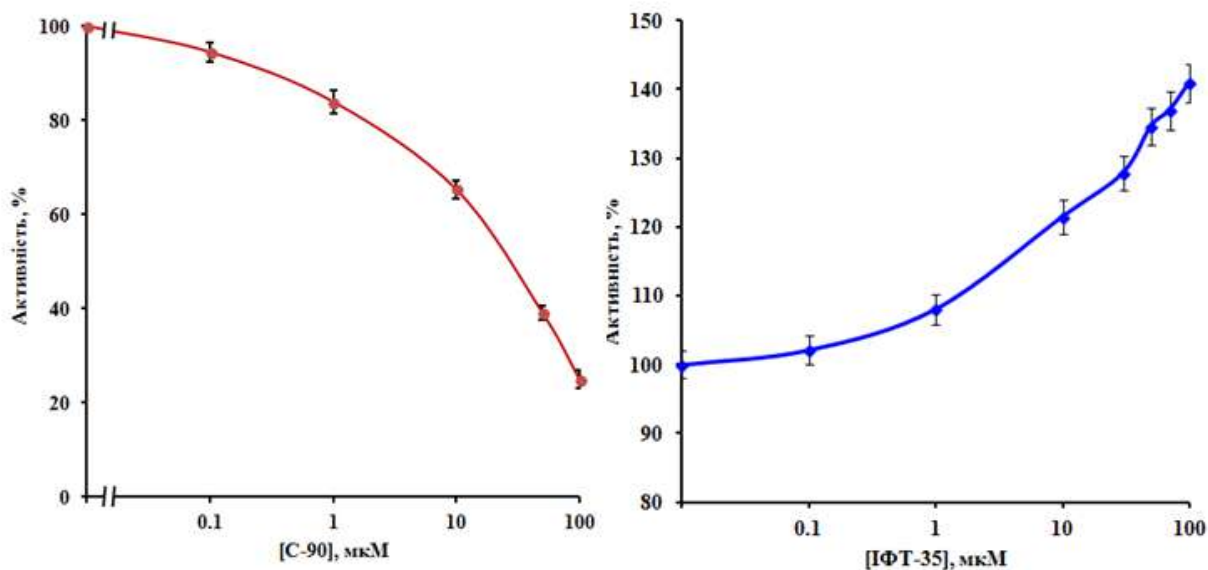
За 100 % прийнято значення питомої ензиматичної активності у відсутності калікс[4]арену С-90 чи сполуки ІФТ-35 у середовищі інкубації

У своїх попередніх експериментах ми досліджували дію низки сполук, а саме - похідних цикlopента[*d*]піримідину (ІФТ-35) та імідазо[1,2-*a*]азепінію (ІФТ-176, ІФТ-208, ІФТ-221), які володіли

токолітичною активністю, на ензиматичну активність “базальної” Mg^{2+} -АТРази, Na^+, K^+ -АТРази, Mg^{2+} -незалежної Ca^{2+} -АТРази та Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани [74]. Серед них особливо нашу увагу привернула сполука ІФТ-35, яка за результатами експериментів, селективно, на рівні плазматичної мембрани, активує Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТразу на $40,9 \pm 0,4 \%$ (рис. 3.43Б). Поряд з цим ця сполука практично не впливає на інші ензиматичні активності плазматичної мембрани: значення активностей для “базальної” Mg^{2+} -АТРази, Mg^{2+} -незалежної Ca^{2+} -АТРази і Na^+, K^+ -АТРази складали $105,5 \pm 1,0 \%$, $95,0 \pm 1,5 \%$ і $96,8 \pm 0,6 \%$ відносно контролю (рис. 3.43Б).

Таким чином, обидва ефектори (100 мкМ) ефективно і селективно, на рівні плазматичної мембрани, впливають на ензиматичну активність Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази: калікс[4]арен С-90 на 74,9 % пригнічує її, а сполука ІФТ-35 - на 40 % активує відносно контрольного значення. При цьому досліджені сполуки майже не впливали на ензиматичні активності “базальної” Mg^{2+} -АТРази, Mg^{2+} -незалежної Ca^{2+} -АТРази і Na^+, K^+ -АТРази.

У подальших наших експериментах ми дослідили концентраційну залежність інгібуючої дії калікс[4]арену С-90 (10^{-8} - 10^{-4} М) на активність Ca^{2+} -транспортувальної Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани (рис. 3.44А). Було показано, що калікс[4]арен С-90 у всьому діапазоні концентрацій ефективно та дозозалежно пригнічує Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРазну активність. Величина коефіцієнта інгібування $I_{0,5}$ для С-90 становить $20,2 \pm 0,5$ мкМ ($M \pm m$; $n = 5$), що вказує на достатньо афінну взаємодію цієї сполуки з ензимом. Значення коефіцієнта Хілла (n_H) становить $0,55 \pm 0,02$ ($M \pm m$; $n = 5$) (таблиця 3.3).



А

Б

Рис. 3.44. Концентраційні залежності ензиматичної активності Ca^{2+} -транспортувальної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази в плазматичній мембрані клітин міометрія за дії ефекторів – інгібітора калікс[4]арену С-90 (А) та активатора сполуки ІФТ-35 (Б) ($M \pm m$, $n = 5$)

За 100 % прийнято значення питомої ензиматичної активності у відсутності калікс[4]арену С-90 чи ІФТ-35 у середовищі інкубації

Т а б л и ц я 3.3:

Кінетичні характеристики інгібіторної дії калікс[4]арену С-90 та активаторної дії сполуки ІФТ-35 на параметри ензиматичної активності Ca^{2+} -транспортувальної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани клітин міометрія ($M \pm m$; $n = 5$).

Параметри	С-90	ІФТ-35
Коефіцієнт інгібування ($I_{0,5}$), мкМ	$20,2 \pm 0,5$	-----
Коефіцієнт активації ($A_{0,5}$), мкМ	-----	$6,40 \pm 0,45$
Коефіцієнт Хілла (n_H)	$0,55 \pm 0,02$	$0,70 \pm 0,04$
% інгібування (для С-90) чи активації (для ІФТ-35) при концентрації ефекторів 100 мкМ	$74,9 \pm 0,5$	$40,9 \pm 0,4$

Також ми вивчили, як впливає активуюча сполука ІФТ-35 на активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРози плазматичної мембрани у широкому діапазоні концентрацій – від 10^{-8} М до 10^{-4} М (рис. 3.44Б). Результати експериментів показали, що у всьому діапазоні концентрацій ІФТ-35 дозозалежно активує $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаду плазматичної мембрани. Константа активації для ІФТ-35 $A_{0,5} = 6,4 \pm 0,45$ мкМ та коефіцієнт Хілла $n_H = 0,7 \pm 0,04$ ($M \pm m$; $n = 5$) (таблиця 3.3).

Цілком очевидно (рис. 3.44), що калікс[4]арен С-90 значно більш ефективно модифікує активність транспортувальної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРози плазматичної мембрани, ніж сполука ІФТ-35: при використанні цих речовин у концентрації 100 мкМ в першому випадку зміна ензиматичної активності відбувається майже у 5 разів (інгібування), а у другому випадку – лише в 1,4 рази (активація).

В подальших експериментах ми провели механокінетичне дослідження дії калікс[4]арену С-90 та сполуки ІФТ-35 на скоротливу активність міометрія.

Поздовжні смужки міометрія вирізали із рогів матки щурів, після декапітації під легким ефірним наркозом, у відповідності із міжнародними рекомендаціями (етичним кодексом) по проведенню медико-біологічних досліджень з використанням тварин (1985 рік). Виділені смужки фіксували в проточній камері на двох сталевих гачках з попереднім навантаженням 10 мН. Камера об'ємом 0,5 мл перфузувалася розчином Кребса зі швидкістю 1,7 мл/хв. Температура підтримувалася на постійному рівні $37 \pm 0,5$ °С.

Силу скорочувальних реакцій вимірювали в ізометричному режимі за допомогою ємнісних тензометричних датчиків (FTK-0,1; ТОВ «Miosensor», Росія). Запис скорочень здійснювали на персональному комп'ютері із застосуванням програм DataTrax2 та LabScribe2, за допомогою аналогово-цифрового перетворювача Lab-Trax-4/16 (World Precision Instruments). Запис механограми ізольованих поздовжніх

смужок рогів матки щурів проводили після періоду стабілізації, що тривала 40 хв у проточній камері. Після досягнення стабільних фазних скорочень ізольованих гладеньком'язових препаратів здійснювали запис вихідних даних протягом 10 хв. Далі здійснювали аплікацію досліджуваних сполук в концентрації 100 мкМ протягом 15 хв, після чого додавали окситоцин (0,1 МО/мл). На механограмі вимірювали нормовану максимальну швидкість скорочення на окситоцин за методом описаним раніше [75]. В якості контролю слугувала група із скороченням на окситоцин інтактного міометрія.

В дослідженнях *in vitro* на ізольованих поздовжніх смужках міометрія щурів було встановлено, що нормована (на амплітуду скоротливої відповіді) швидкість скорочення V_{nc} у відповідь на окситоцин (0,1 МО/мл) (контроль) складає $0,0205 \pm 0,0024 \text{ с}^{-1}$ ($M \pm m$, $n = 10$). За умов попередньої аплікації на ізольований міометрій селективного інгібітора $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани – калікс[4]арену С-90 (100 мкМ) нормована максимальна швидкість окситоцин-індукованого скорочення V_{nc} збільшувалася більше ніж в два рази – до $0,0438 \pm 0,0014 \text{ с}^{-1}$ ($M \pm m$, $n = 18$). А попередня аплікація на ізольовані гладеньком'язові препарати активатора $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани - ІФТ-35 (100 мкМ), призводила до статистично достовірного зменшення нормованої максимальної швидкості скорочення на окситоцин V_{nc} до рівня $0,0135 \pm 0,0005 \text{ с}^{-1}$ ($M \pm m$, $n = 10$), що пояснює його спазмолітичну активність на гладеньком'язові структури при дослідженнях *in vitro* та *in vivo* [76] (рис. 3.45). Одержані *in vitro* результати (рис. 3.45) цілком відповідають тлумаченню дії калікс[4]арену С-90 та сполуки ІФТ-35 як, відповідно, інгібітора та активатора Mg^{2+} ,АТР-залежної кальцієвої помпи плазматичної мембрани міоцитів.

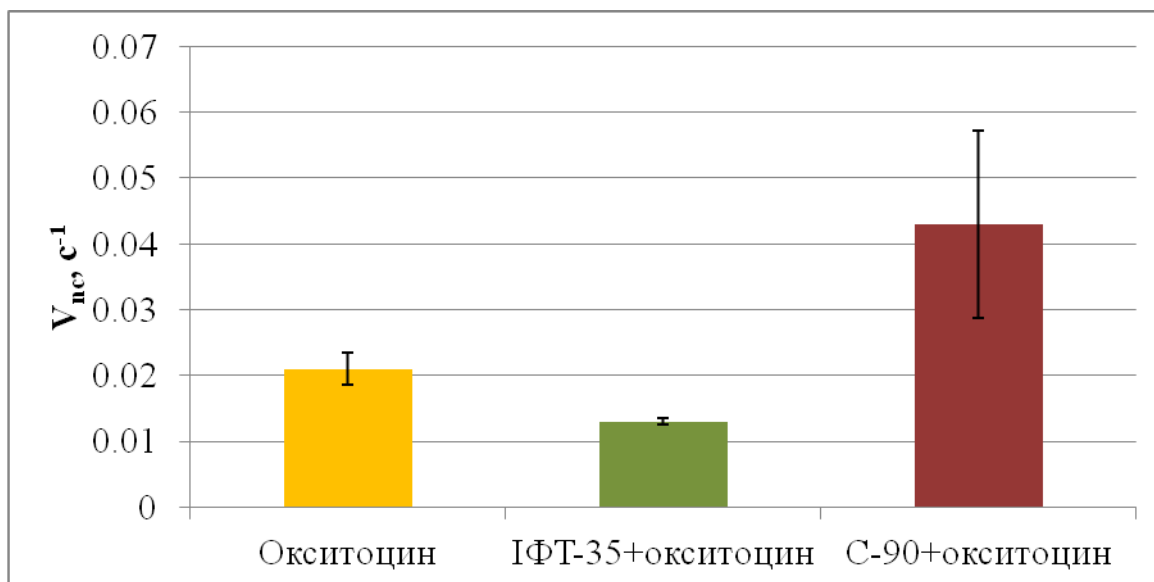


Рис. 3.38. Зміна нормованої швидкості V_{nc} скорочень міометрія щурів *in vitro* при дії окситоцину (0,1 МО/мл) за умов впливу С-90 (100 мкМ) та ІФТ-35 (100 мкМ) ($M \pm m$, $n = 7$). Механокінетичні параметри розраховували із використанням методу [76].

Гладеньком'язові клітини можна трактувати як виключно складну відкриту ізотермічну рецепторну тензоелектрохімічну систему, для якої властиві, стосовно внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу, такі особливості, як нелінійність, кооперативність, неадитивність, синергічність, наявність компенсаторних ефектів тощо. Тому провести інтерпретацію одержаних нами вищенаведених експериментальних результатів на механізменому рівні є вельми складно. Втім, деякі висновки ми всеж-таки можемо зробити.

Ми довели, що дві низькомолекулярні речовини – калікс[4]арен С-90 та сполука ІФТ-35 можуть селективно (на рівні плазматичної мембрани) модифікувати ензиматичну активність транспортної Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази – інгібувати та активувати відповідно.

Калікс[4]арен С-90 – інгібітор Ca^{2+} -транспортуючої Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази ($I_{0,5} = 20,2 \pm 0,5$ мкМ) ефективно пригнічує Mg^{2+} , АТР-залежний транспорт Са через плазматичну мембрану клітин міометрія та викликає, відповідно до результатів математичного моделювання,

підвищення концентрації цього катіону у незбуджених міоцитах, а також прискорює окситоцин-індуковані скорочення міометрія *in vitro*. Ми вважаємо, що калікс[4]арен C-90 може бути перспективним для спільного використання, разом з утеротоніком окситоцином, з метою підсилення скорочення матки.

Втім, сполука ІФТ-35 – активатор Ca^{2+} -транспортуючої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ($A_{0,5} = 6,40 \pm 0,45$ мкМ) згідно з результатами математичного моделювання (дані не наведено), вельми слабо впливала на зменшення концентрації Ca^{2+} у незбуджених міоцитах, а також пригнічувала швидкість окситоцин-індукованих скорочень міометрія за умов дослідів *in vitro*. Отже, сполука ІФТ-35 здатна до прояву спазмолітичного ефекту на фоні ефекту окситоцину на скорочення матки.

Одержані результати можуть бути перспективними для розбудови нових фармакологічних сполук – регуляторів скоротливої функції матки.

РОЗДІЛ 4. ЕНЕРГОЗАЛЕЖНІ Ca^{2+} -ТРАНСПОРТУЮЧІ СИСТЕМИ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННИХ МЕМБРАННИХ СТРУКТУР ТА КАЛІКСАРЕНИ

4.1. ВПЛИВ КАЛІКС[4]АРЕНУ C-90 НА АКТИВНІСТЬ Ca^{2+} , Mg^{2+} - АТРАЗИ САРКОПЛАЗМАТИЧНОГО РЕТИКУЛУМА

4.1.1. Концентраційна залежність впливу калікс[4]арену C-90 на активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРАЗИ саркоплазматичного ретикулума.

У попередньому розділі (див. розділ 3) ми показали, що калікс[4]арен C-90, використаний у концентрації 100 мкМ, ефективно (на 75 % стосовно контрольного значення) інгібував ензиматичну активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРАЗИ у фракції плазматичних мембран міоцитів матки, практично не впливаючи на активність Mg^{2+} -незалежної Ca^{2+} -залежної АТРАЗИ, Na^+ , K^+ -АТРАЗИ та Mg^{2+} -АТРАЗИ, локалізованих у тій самій мембранній структурі. Ці дані вказують на те, що на рівні плазматичної мембрани калікс[4]арен C-90 є селективним інгібітором Ca^{2+} -транспортувальної Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРАЗИ. Також важливо підкреслити, що чутлива до дії протонифору СССР акумуляція іонів Ca^{2+} в мітохондріях міометрія виявилася практично резистентною до дії зазначеного каліксарену.

Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРАЗа саркоплазматичного ретикулума забезпечує зниження внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} внаслідок акумуляції цього катіона в ретикулярному депо [1, 2]. Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРАЗа саркоплазматичного ретикулума є високомолекулярним протеїном з молекулярною масою приблизно 115 кДа [3, 4, 5, 6]. Сучасні дані літератури свідчать, що саркоплазматичний ретикулум є одним з найбільших внутрішньоклітинних депо кальцію [7, 8]. Так як внутрішній простір саркоплазматичного ретикулума налічує велику кількість

кальційзв'язувальних протеїнів (кальсеквестрин та кальретикулін), сумарна концентрація катіона в цьому депо може перевищити 1 мМ. Поряд з тим концентрація вільного Са (Ca^{2+}) в депо відповідає діапазону 100-700 мкМ [9, 10, 11, 12, 13, 14].

Приймаючи до уваги, що Ca^{2+} -помпа саркоплазматичного ретикулума має високий афінітет до іонів Са, та зважаючи на структурну подібність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани і саркоплазматичного ретикулума, доцільно було перевірити, чи впливає калікс[4]арен С-90 на Ca^{2+} -помпу саркоплазматичного ретикулума.

Для визначення АТРадної активності саркоплазматичного ретикулума клітини міометрія (концентрація протеїну 20 мкг в пробі) пермеабілізували дігітоніном (0,1 %). Загальну АТРахну активність визначали 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. $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРахну активність саркоплазматичного ретикулума розраховували за різницею між величинами АТРадної активності за присутності та відсутності в середовищі інкубації 0,1 мкМ тапсигаргіну. У наших дослідах було встановлено, що для сарколеми міометрія щурів питома ензиматична (тапсигаргінчутлива) активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази саркоплазматичного ретикулума складає $2,45 \pm 0,14$ мкмоль P_i /мг протеїну за 1 год ($M \pm m$; $n = 7$).

Ми показали, що калікс[4]арен С-90 (10^{-8} - 10^{-4} М) дозозалежно пригнічує $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРахну активність саркоплазматичного ретикулума, величина коефіцієнта інгібування $I_{0,5}$ складає 57 ± 2 мкМ, значення коефіцієнта Хілла n_H становило $0,60 \pm 0,02$ (рис. 4.1) ($M \pm m$; $n = 5$). У концентрації 100 мкМ калікс[4]арен С-90 зменшує активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази на $58,5 \pm 1,5$ % відносно контрольного значення.

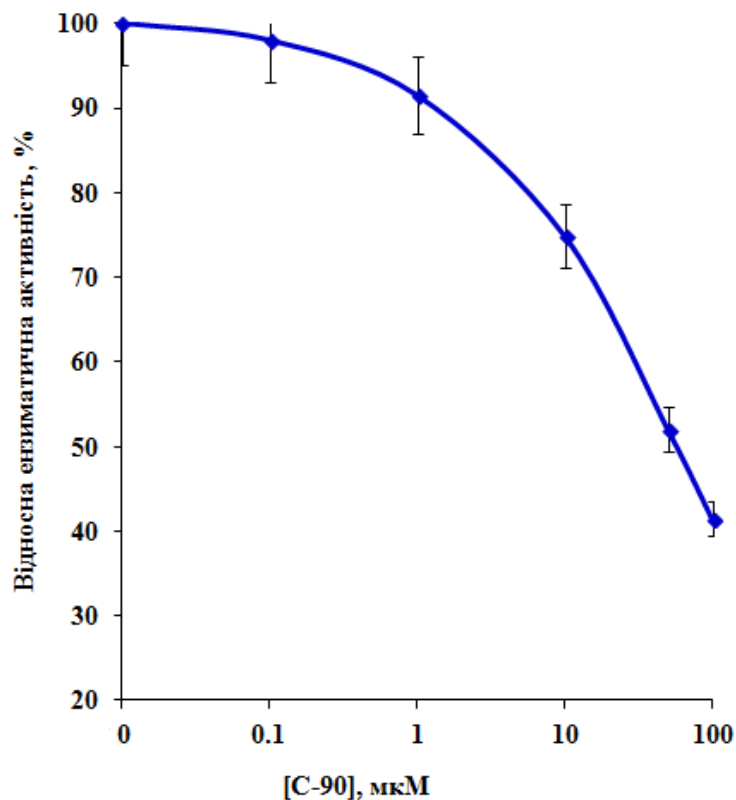


Рис. 4.1. Концентраційна залежність інгібіторної дії калікс[4]арену С-90 на ензиматичну активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази саркоплазматичного ретикулума ($M \pm m$, $n = 5$).

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

Якщо порівнювати дію калікс[4]арену С-90 на активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази саркоплазматичного ретикулума і плазматичної мембрани, то його вплив на $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази саркоплазматичного ретикулума є менш ефективним та характеризується меншим афінітетом до ензиму (коефіцієнт напівінгібування $I_{0,5}$ у 3 рази вищий у випадку $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази саркоплазматичного ретикулума відносно $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани).

Незначна зміна спорідненості може відбуватися внаслідок деяких відмінностей у структурі $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани та саркоплазматичного ретикулума, а саме наявності регуляторного COOH -кінця у структурі $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани [15].

Також певна різниця у реалізації інгібіторного ефекту калікс[4]арену C-90 може мати місце за рахунок різного хімічного складу мембран, де локалізовані вищезазначені ензими, оскільки плазматична мембрана містить вищий рівень фосфатидилхоліну та фосфатидилетаноламіну, які впливають на активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани [16]. Окрім того, мембрани саркоплазматичного ретикулума містять менше холестеролу, концентрація якого негативно корелює з активністю $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани [16, 17].

4.1.2. Кінетичні закономірності дії калікс[4]арену C-90 на активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази саркоплазматичного ретикулума.

Для встановлення кінетичних закономірностей інгібування калікс[4]ареном C-90 активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази саркоплазматичного ретикулума ми перевірили, чи змінюється спорідненість цієї $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани до субстратів відповідної ензиматичної реакції під впливом інгібітора.

При підвищенні концентрації АТР в середовищі інкубації в діапазоні від 0,01 до 3 мМ (рис. 4.2, контроль) спостерігалось збільшення ензиматичної активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази саркоплазматичного ретикулума за умов фіксованої концентрації MgCl_2 (3 мМ) в інкубаційному середовищі. Використовуючи метод Хілла, ми розрахували уявну константу Міхаеліса K_m та коефіцієнт Хілла $n_{\text{н, АТР}}$ для АТР, які становлять відповідно $132,1 \pm 5,1$ мкМ та $0,96 \pm 0,01$ для $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази саркоплазматичного ретикулума ($M \pm m$; $n = 5$). Отримане нами значення уявної константи Міхаеліса для $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази саркоплазматичного ретикулума було у 2 рази більше, ніж таке для $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани.

Надалі ми досліджували дію калікс[4]арену C-90 на спорідненість ензиму до АТР. Було досліджено вплив калікс[4]арену C-90

(концентрація 50 мкМ) на концентраційну залежність від АТР. У присутності калікс[4]арену С-90 спостерігається зниження активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазі саркоплазматичного ретикулума. Залежність ензиматичної активності від АТР виявляє характер, подібний до відповідної контрольної залежності без калікс[4]арену С-90, але відбувається зниження платового рівня активності під впливом калікс[4]арену С-90 (рис. 4.2).

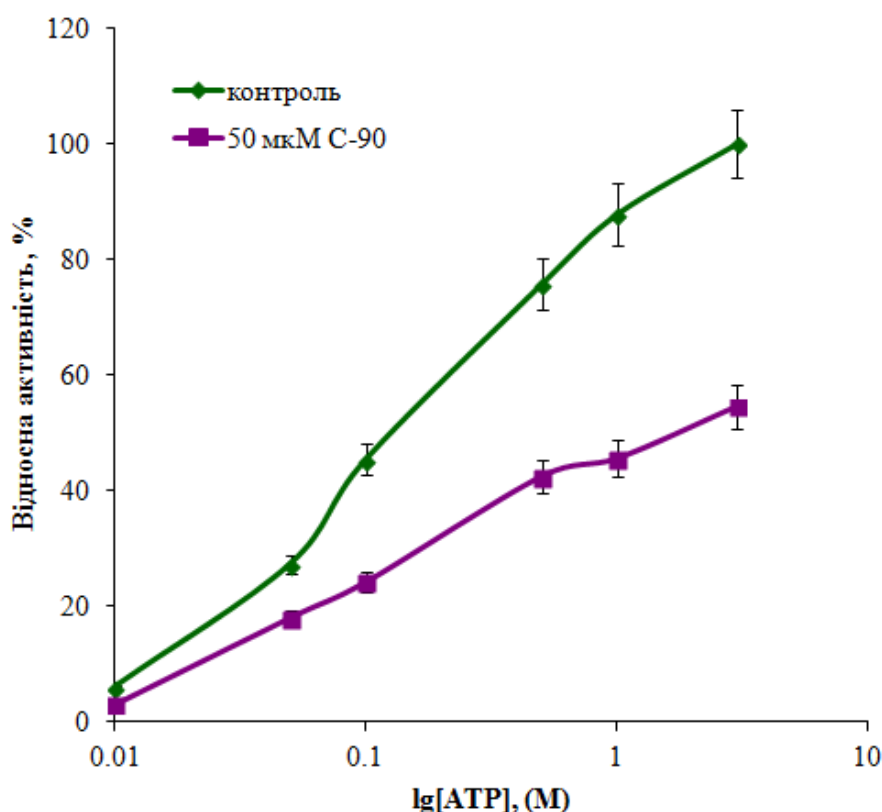


Рис. 4.2. Вплив калікс[4]арену С-90 на залежність ензиматичної активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази саркоплазматичного ретикулума від концентрації АТР ($M \pm m$, $n = 5$)

Показане нами зниження швидкості ензиматичного гідролізу АТР $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази саркоплазматичного ретикулума під впливом калікс[4]арену С-90 свідчить про зниження числа обертів ензиму за його дії. Також були розраховані уявна константа Міхаеліса K_m та

коефіцієнт Хілла $n_{H,ATP}$ за наявності калікс[4]арену C-90, які становлять $141,4 \pm 8,6$ мкМ та $0,92 \pm 0,04$ відповідно ($M \pm m$; $n = 5$).

Таким чином, отримані результати можна інтерпретувати, як відсутність впливу калікс[4]арену C-90 на вказані параметри. Тобто, вплив калікс[4]арену C-90 на Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРази саркоплазматичного ретикулума є неконкурентним відносно АТР, так як атака C-90 йде виключно на значення V_{max} .

Отже, спорідненість Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРази саркоплазматичного ретикулума до АТР практично не залежить від наявності калікс[4]арену C-90 у середовищі інкубації, що вказує на відсутність конкуренції між АТР та інгібітором. Тому можна припустити, що субстратні центри Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРази саркоплазматичного ретикулума і гіпотетичний сайт взаємодії калікс[4]арену C-90 не перекриваються на поверхні ензиму.

В подальших наших експериментах ми вивчали залежність ензиматичної активності Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРази саркоплазматичного ретикулума від концентрації Ca^{2+} в інкубаційному середовищі. Було розраховано концентрацію іонів Са, враховуючи концентрацію ЕГТА і АТР та їх спорідненість до Ca^{2+} . Розрахунки, що були виконані із використанням комп'ютерної програми «MAXCHEL», свідчать за наступне: за даних фізико-хімічних та концентраційних умов середовища інкубації концентрація вільного Са (суто Ca^{2+}) становила 1 мкМ.

Ензиматична активність Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРази саркоплазматичного ретикулума клітин міометрія зростає при збільшенні концентрації іонів Са від 100 до 1000 нМ (рис. 4.3, контроль). Використовуючи метод Хілла, ми розраховували уявну константу активації K_{Ca} та коефіцієнт Хілла $n_{H,ATP}$ для Ca^{2+} , які становлять 376 ± 11 нМ та $1,90 \pm 0,06$ для Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРази саркоплазматичного ретикулума відповідно ($M \pm m$; $n = 5$). Необхідно відмітити, що спорідненість Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани до іонів Са у 2 рази вища ніж для Ca^{2+},Mg^{2+} -

АТРazi саркоплазматичного ретикулума.

Дослідження впливу калікс[4]арену С-90 (50 мкМ) на спорідненість Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРazi саркоплазматичного ретикулума до Ca^{2+} показало, що ензиматична активність вказаної АТРazi знижується, але при цьому її залежність від концентрації Ca^{2+} виявляє характер, подібний до відповідної контрольної залежності без калікс[4]арену С-90. Проте спостерігається зниження платового рівня активності під дією калікс[4]арену С-90, тобто зменшується $V_{\max}$ (рис. 4.3). Розраховані нами уявна константа активації K_{Ca} та коефіцієнт Хілла $n_{\text{H,Ca}}$ за наявності калікс[4]арену С-90 становили 394 ± 29 нМ та $1,90 \pm 0,15$ для Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРazi саркоплазматичного ретикулума відповідно ($M \pm m$; $n = 5$).

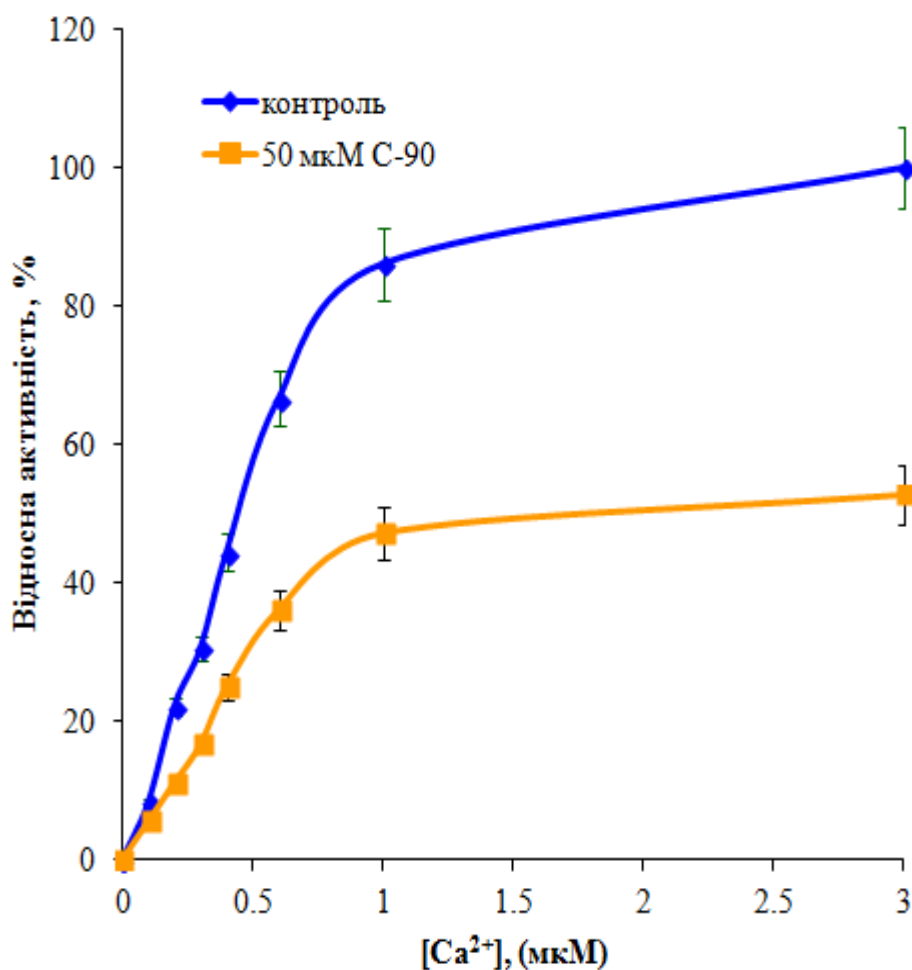


Рис. 4.3. Вплив калікс[4]арену С-90 на залежність ензиматичної

активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази саркоплазматичного ретикулума від концентрації іонів Ca ($M \pm m$, $n=5$)

Як показують значення величини уявної константи активації K_{Ca} та коефіцієнта Хілла $n_{\text{H}, \text{Ca}}$, калікс[4]арен С-90 практично не впливає на спорідненість $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази саркоплазматичного ретикулума до іонів Ca , та на кооперативний ефект активації ензиму вказаними іонами.

Надалі ми досліджували залежність активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази саркоплазматичного ретикулума від концентрації MgCl_2 в інкубаційному середовищі. Ензиматична активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази саркоплазматичного ретикулума зростає при збільшенні концентрації MgCl_2 від 0,1 до 3 мМ за умови фіксованих концентрацій АТФ (3 мМ) в інкубаційному середовищі (рис. 4.4, контроль).

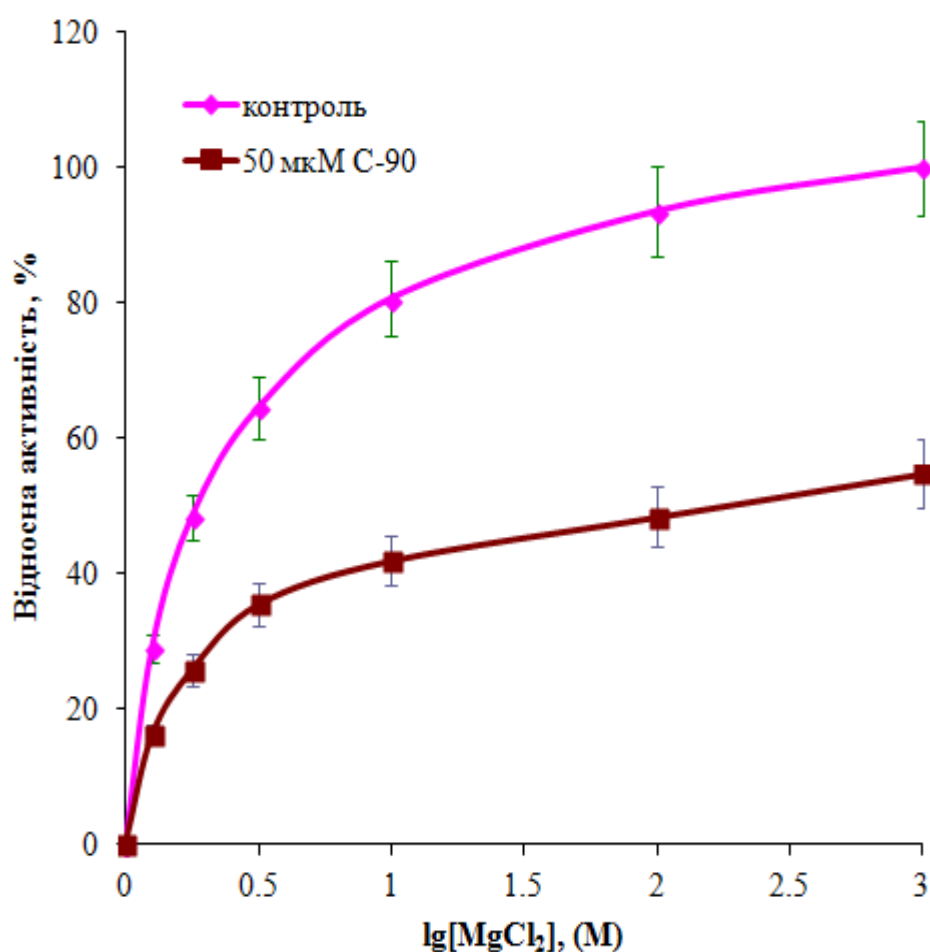


Рис. 4.4. Вплив калікс[4]арену C-90 на залежність ензиматичної активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази саркоплазматичного ретикулума від концентрації іонів Mg ($M \pm m, n=5$)

Значення уявної константи активації $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази саркоплазматичного ретикулума іонами Mg K_{Mg} складає $259,2 \pm 2,2$ мкМ, величина коефіцієнта Хілла $n_{\text{H}, \text{Mg}}$ ставить $1,10 \pm 0,03$ ($M \pm m; n=5$).

Для вивчення впливу калікс[4]арену C-90 на спорідненість $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази саркоплазматичного ретикулума до Mg^{2+} було оцінено його дію (концентрація 50 мкМ) на концентраційну залежність АТР-гідролазної активності від MgCl_2 . Тут також спостерігається зниження активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази саркоплазматичного ретикулума відносно контролю, але зберігається характер залежності ензиматичної активності від концентрації MgCl_2 , як і у контролі без калікс[4]арену C-90. Тобто під дією калікс[4]арену C-90 знижується платовий рівень активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази саркоплазматичного ретикулума (рис. 4.4). Показано, що під впливом калікс[4]арену C-90 (50 мкМ), спостерігається незначне зростання коефіцієнту активації хлоридом магнію K_{Mg} до $304,7 \pm 14,9$ мкМ ($M \pm m; n=5$). При цьому величина коефіцієнта Хілла практично не змінюється ($1,00 \pm 0,04$ у присутності C-90 ($M \pm m; n=5$)).

Таким чином, спорідненість $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази саркоплазматичного ретикулума до Mg^{2+} майже не залежить від наявності калікс[4]арену C-90 у середовищі інкубації, що вказує на відсутність конкуренції між Mg^{2+} та C-90.

Одержані нами дані вказують на те, що калікс[4]арен C-90 діє на помпу саркоплазматичного ретикулума за механізмом повного неконкуретного інгібування.

4.2. КАЛІКС[4]АРЕНХАЛКОНАМІДИ – НАНОРОЗМІРНІ МОДУЛЯТОРИ ПОЛЯРИЗАЦІЇ МЕМБРАН МІТОХОНДРІЙ ТА ВМІСТУ ІОНІЗОВАНОГО Са В НИХ

Мітохондрії були відкриті вже понад 100 років тому, проте і сьогодні залишається багато невирішених питань щодо їхнього функціонування як своєрідної «енергетичної станції» клітин. Це дуже важлива функція мітохондрій, проте вона не єдина. Зокрема, сьогодні доведено, що мітохондрії задіяні у широкому спектрі найважливіших функцій клітини таких як, Ca^{2+} -сигналювання, апоптоз, адаптація до стресу, стероїдогенез та старіння [18]. Порушення функціонування мітохондрій відіграє центральну роль у залежних від віку захворюваннях, нейродегенеративних змінах та різних формах раку [18].

Канали та транспортери, що забезпечують перенесення іонів та метаболітів крізь мітохондріальну мембрану, безпосередньо задіяні в регуляції функцій мітохондрій, зокрема, та у контролі метаболізму клітини, в цілому. Здатність мітохондрій накопичувати іони Са відома ще з 1960 років [19]. Проте молекулярні механізми та значимість акумуляції іонів Са у мітохондріях були з'ясовані значно пізніше. Збільшення концентрації іонізованого Са у матриксі мітохондрій може супроводжуватись двома протилежно спрямованими ефектами. З одного боку, спостерігається активація мітохондріального метаболізму за рахунок стимуляції циклу Кребса та активності дихального ланцюга, що веде до збільшення синтезу АТФ. З іншого боку, перевантаження мітохондрій іонами Са супроводжується відкриванням мітохондріальної пори перехідної проникності, вивільненням цитохрому c і, як наслідок, загибеллю клітини [20]. Отже пошуки сполук, які здатні таргетно впливати на обмін та концентрацію

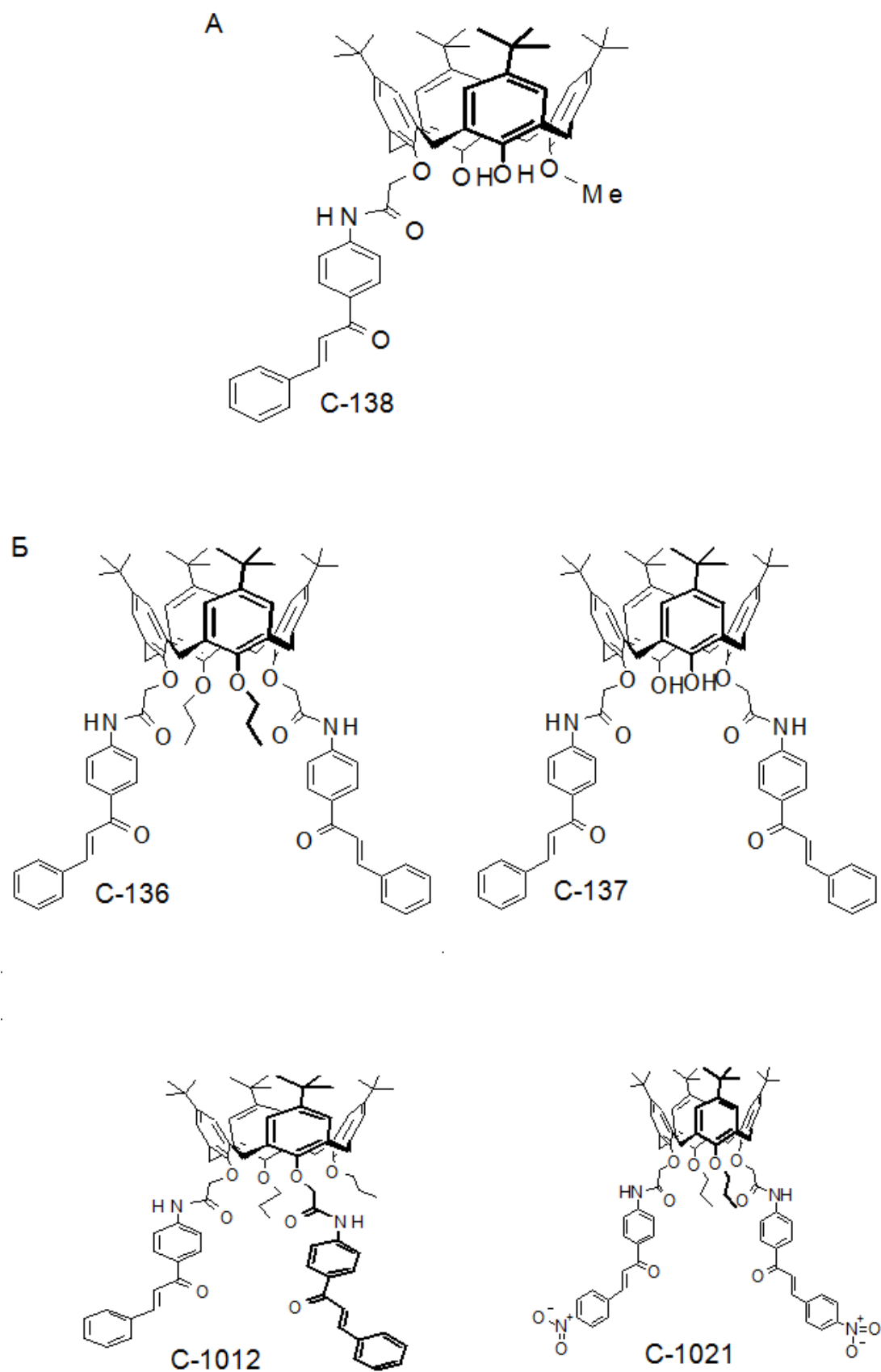
іонізованого Са у матриксі мітохондрій, є стратегічним завданням сучасної біохімії.

Рівень поляризації мембран мітохондрій є важливим параметром у функціонуванні цих субклітинних структур, адже більшість транспортних процесів у цих органелах є потенціалозалежними. Зокрема, системи що транспортують до матриксу іони Са, є також потенціалозалежними [21-23]. Отже, впливаючи на рівень поляризації мітохондріальних мембран, можна спрямовано змінювати концентрацію іонізованого Са у матриксі мітохондрій.

Як вже відзначалося вище, калікс[4]арени – це макроциклічні сполуки з подібною до келиха конформацією, біологічні ефекти яких активно досліджуються, що зумовлене необхідністю пошуку альтернативних лікарських засобів. В контексті зазначеної тези виникає запитання - які ж переваги дають саме калікс[4]арени у якості переносників фізіологічно активних сполук? По-перше, завдяки своїм гідрофобним властивостям, вони здатні розчинятися у ліпідній фазі клітин, що забезпечує їм роль переносників функціонально активних груп. По-друге, є можливість приєднати до калікс[4]аренового келиха функціонально активні сполуки у різній кількості. До таких функціонально активних сполук належать, зокрема, халкони - ароматичні кетони - представники класу флавоноїдів, для яких властивий широкий спектр біологічної активності [24-28], що зумовило велику зацікавленість дослідників у вивченні можливості застосування халконів у якості фармацевтичних препаратів за різноманітних патологічних станів [24-26, 29].

Ми досліджували вплив халкон-вмісних калікс[4]аренів на рівень поляризації мембран мітохондрій міометрія та концентрацію іонізованого Са у матриксі цих органел. У досліджах вивчали вплив калікс[4]аренів, які містять одну (С-138), дві (С-136, С-137, С-1012 та С-

1021), три (C-1023 та C-1024) та чотири (C-1011) халконові групи. На рис. 4.5 наведені структурні формули досліджуваних калікс[4]аренів.



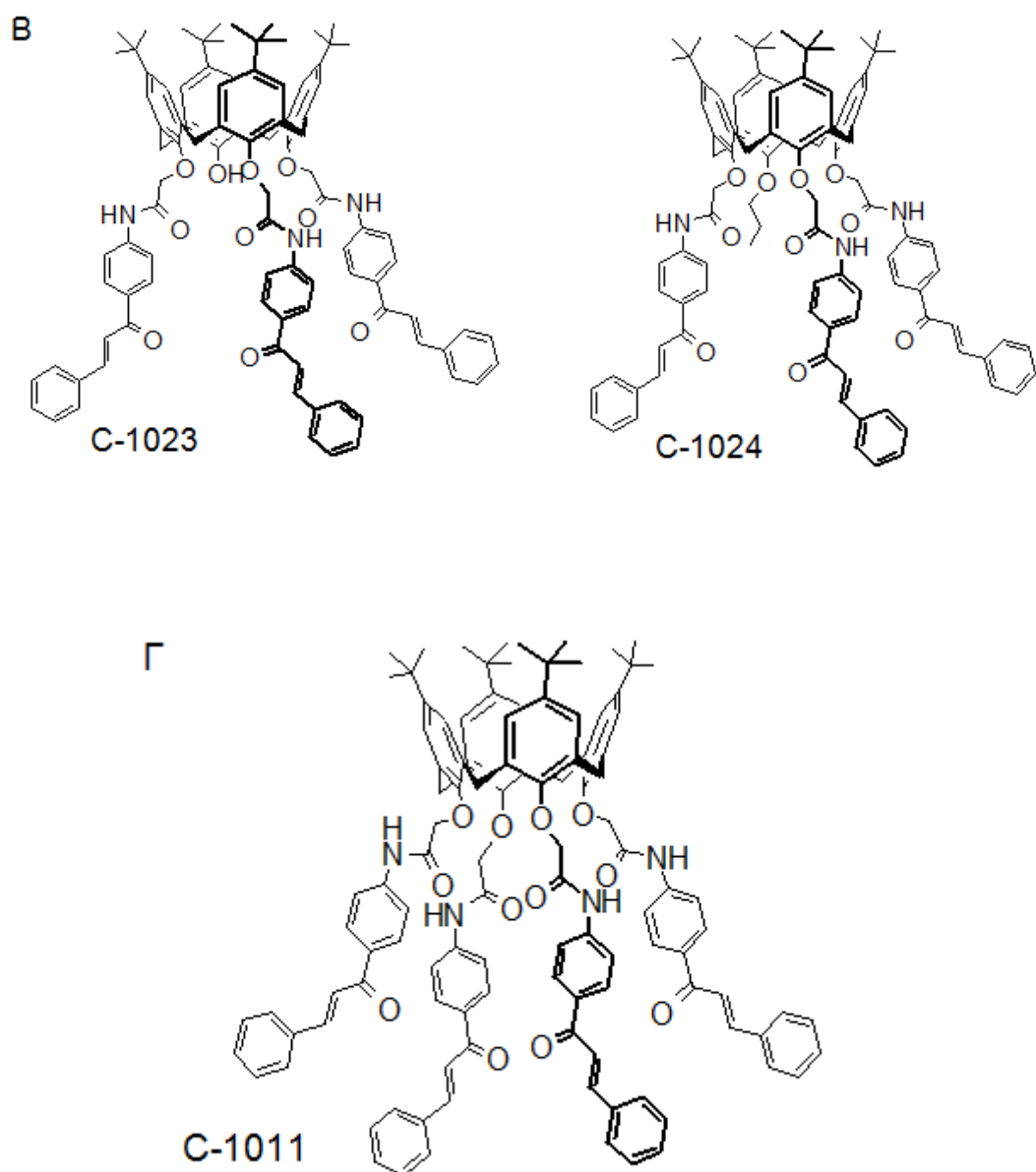


Рис. 4.5. Структурні формули калікс[4]аренхалконамідів: А – одна, Б – дві, В – три та Г – чотири халконові групи

Як видно з рис. 4.5, калікс[4]арен С-138 містить одну халконову групу.

Калікс[4]арени С-136 та С-137 містять по дві халконові групи в дистальних положеннях. Крім того в структурі С-136 є ще дві пропільні групи та відсутні вільні –ОН групи, тоді як С-137 містить дві –ОН групи.

Калікс[4]арен C-1021 є аналогом C-136, проте у пара-положенні кінцевих фенольних кілець стоять нітро групи ($-\text{NO}_2$).

Калікс[4]арен C-1012 має дві халконові групи в проксимальних положеннях.

Калікс[4]арени C-1023 та C-1024 містять по три халконові групи. Проте C-1023 має вільну $-\text{OH}$ групу, тоді як C-1024 немає вільних $-\text{OH}$ груп, містить пропільну групу.

Тестування мембранного потенціалу мітохондрій на пермеабілізованих дигітоніном клітинах міометрія проводили за допомогою проточного цитометра та потенціалчутливого зонда TMRM (tetramethylrhodamine methyl ester). Пермеабілізація плазматичної мембрани клітин дигітоніном, по-перше, знімає питання про внесок поляризації цієї мембрани у флуоресцентну відповідь зонда, по-друге, сприяє вільному проходженню компонентів середовища інкубації у середину клітин. Як видно з рис. 4.6, суспензії клітин міометрія властива автофлуоресценція. Інкубація перфорованих клітин з зондом TMRM приводить до збільшення інтенсивності флуоресценції, про що свідчить зсув сигналу вправо (крива червоного кольору), відносно автофлуоресценції (крива синього кольору). Тобто, маємо накопичення цього позитивно зарядженого катіона усередині мітохондрій, що свідчить про наявність поляризації внутрішньої мембрани мітохондрій. Додавання у середовище інкубації протонофору CCCP (крива блакитного кольору) призводить до зсуву піку інтенсивності флуоресценції зонда вліво, що свідчить про деполяризацію внутрішньої мембрани мітохондрій.

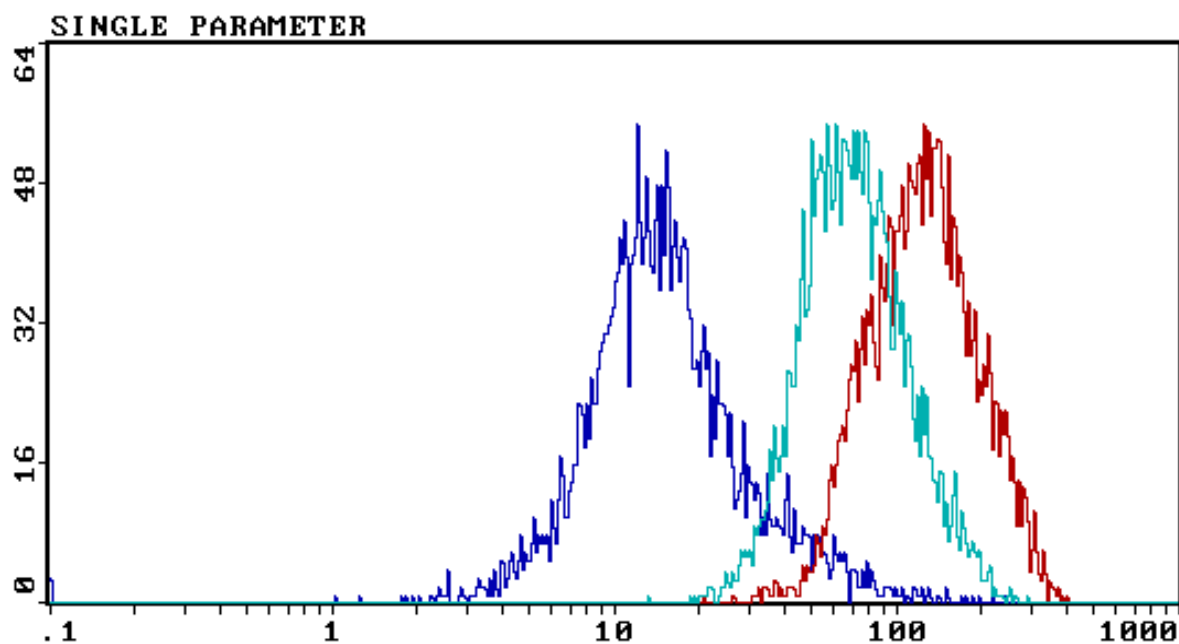


Рис. 4.6. Тестування мембранного потенціалу мітохондрій.
 Синій – автофлуоресценція суспензії клітин;
 Червоний – 100 нМ TMRM;
 Блакитний – 100 нМ TMRM + 1 мкМ CCCP

Сигнал флуоресцентного зонда був стабільним (щонайменше протягом часу проведення експерименту) і зменшувався у відповідь на введення протонофору CCCP, про що свідчать результати, наведені на рис. 4.7.

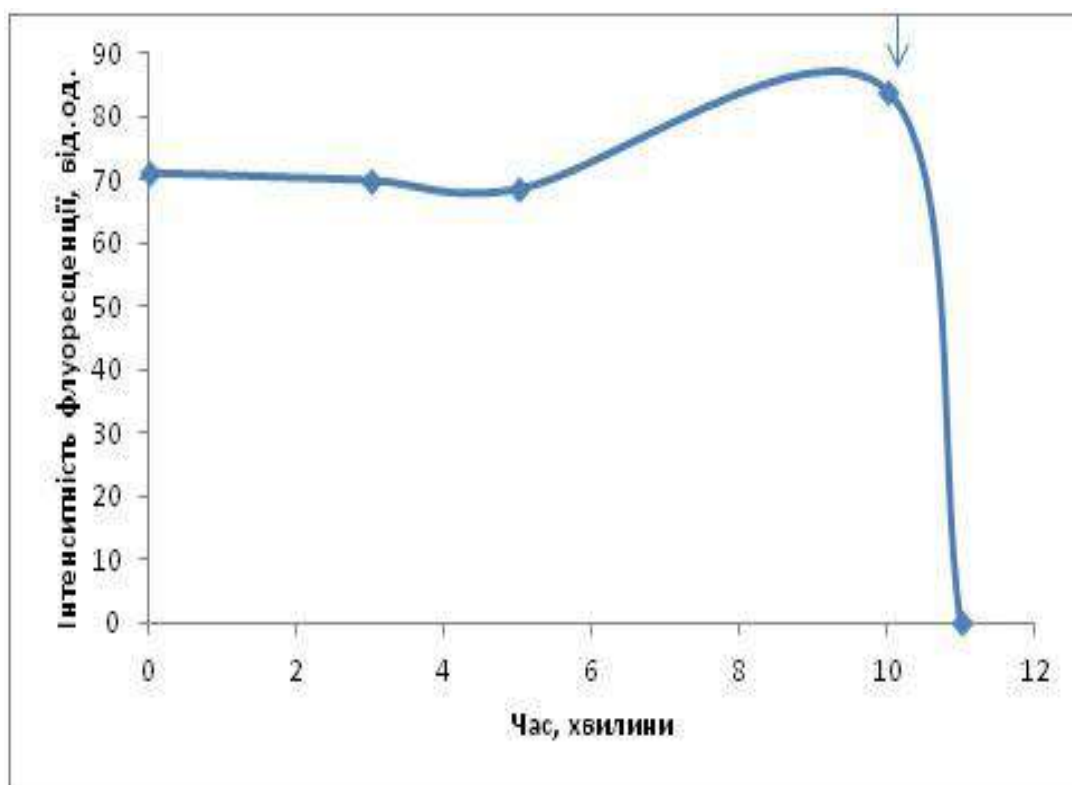


Рис. 4.7. Кінетика зміни інтенсивності флуоресценції потенціал чутливого зонда, навантаженого у мітохондрії пермеабілізованих дигітоніном клітин міометрія. Час додавання протонофору СССР позначено стрілкою

Таким чином, модель перфорованих дигітоніном міоцитів матки та протокова цитометрія з використанням потенціал чутливого зонда дозволяють надійно тестувати СССР-чутливий компонент поляризації мембран мітохондрій.

Наступні експерименти були спрямовані на дослідження впливу калікс[4]аренів С-136, С-137 та С-138 на мембранний потенціал мітохондрій міометрія. Калікс[4]арен С-138 містить одну халконову групу, тоді як С-136 та С-137 - дві. Клітини попередньо інкубували з каліксаренами протягом 5 хвилин, після чого до середовища інкубації вносили потенціал чутливий зонд TMRM. Навантаження зондом також

тривало 5 хвилин. Далі проби аналізували на протоковому цитометрі, де і відбувалась реєстрація розподілу флуоресцентного барвника у мітохондріях. Як видно з наведених на рис. 4.8 результатів, калікс[4]арени С136 та С137 підвищували рівень поляризації мембран мітохондрій міометрія. Максимальний стимулюючий ефект складав 173 % і спостерігався при концентрації калікс[4]арену 10 мкМ (рис. 4.8). У той же час калікс[4]арен С-138 не впливав на мембранний потенціал мітохондрій.

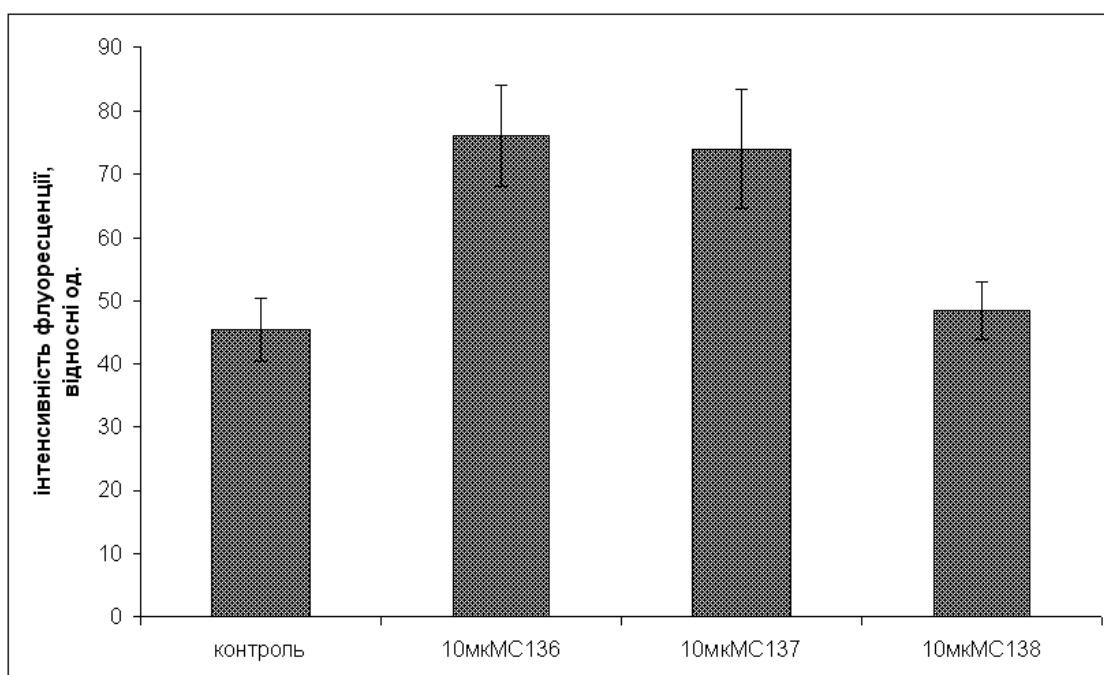


Рис. 4.8. Вплив калікс[4]аренів С136-138 на мембранний потенціал мітохондрій клітин міометрія щурів ($M \pm m$, $n=8$)

Отже показано, що попередня інкубація пермеабілізованих клітин міометрія з 10 мкМ калікс[4]ареном С-136 або С-137 веде до збільшення поляризації мітохондріальних мембран. Ми не виключаємо, що наявність двох амідохалконових груп на нижньому ободі каліксаренової чаші (калікс[4]арен С-136 і калікс[4]арен С-137) сприяє збільшенню поляризації мітохондріальної мембрани. Можливо, це пов'язано з утворенням водневих зв'язків між NH групами амідних

фрагментів і якимись функціональними групами в мітохондріальній мембрані (тією ж амідною, карбонільною, гідроксильною та ін., і навіть з молекулами мембранозв'язаної води). Наявність же тільки однієї такої групи в молекулі каліксарена C-138 не впливає на мембранний потенціал мітохондрій, тобто однієї амідохалконової групи мабуть недостатньо для гіперполяризації мітохондріальної мембрани.

У той же час, очевидно, що наявність або відсутність фенольних гідроксилів на вузькому ободі каліксаренової платформи, здатних також утворювати водневі зв'язки (калікс[4]арени C-136 і C-137), не впливає на мембранний потенціал мітохондрій. Ймовірно, в цьому випадку вигідніше утворення внутрішньомолекулярних водневих зв'язків, чим водневих зв'язків між гідроксильними групами вказаних калікс[4]аренів і мітохондріальною мембраною.

При аналізі одержаних результатів виникають наступні питання: чи залежить ефект калікс[4]аренів на поляризацію мембран мітохондрій від кількості халконових груп та їх взаємного розташування на нижньому ободі каліксаренової чаші? Для відповіді на ці питання були синтезовані такі калікс[4]арени: C-1012 та C-1021 - у своїй структурі містять дві халконові групи, C-1023 та C-1024 - три халконові групи та C-1011 - чотири халконові групи. Аналіз розподілу зонда TMRM у мітохондріях перфорованих дигітоніном клітин міометрія показав, що усі синтезовані калікс[4]арени, які містять дві та більше халконових груп, збільшують рівень поляризації мембран мітохондрій, проте цей ефект не зростає зі збільшенням кількості халконових груп у структурі калікс[4]арену (рис. 4.9).

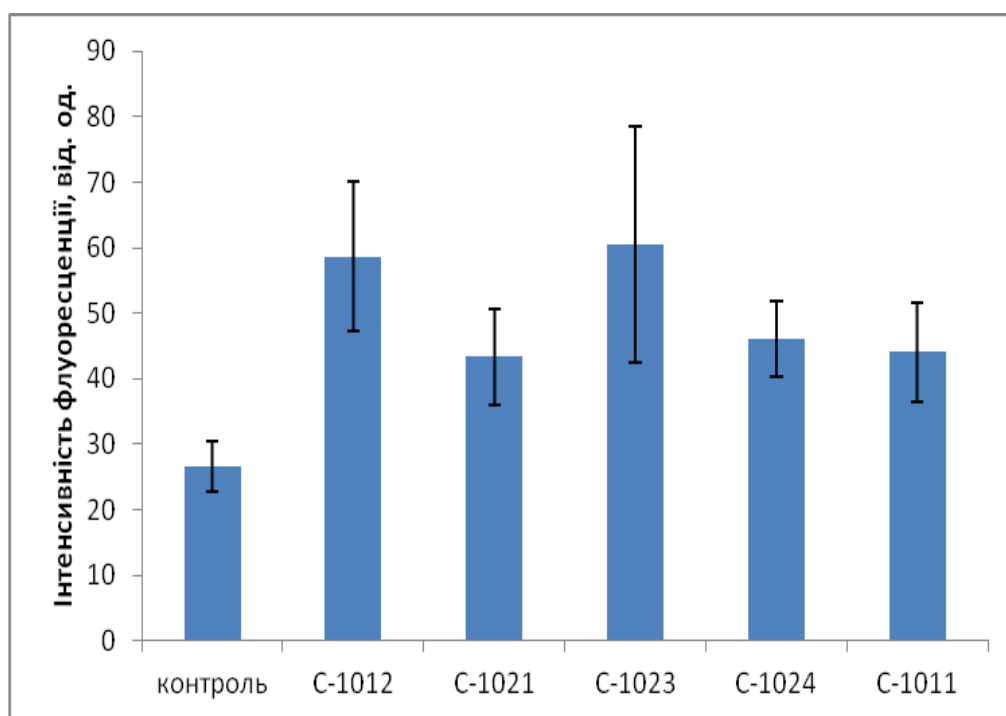


Рис. 4.9. Вплив калікс[4]аренів C-1012, C-1021, C-1023, C-1024 та C-1011 на мембранний потенціал мітохондрій клітин міометрія щурів ($M \pm m$, $n=7$)

Отже, калікс[4]арени, що містять 2 та більше халконові групи, сприяють збільшенню рівня поляризації мембран мітохондрій міометрія. Потенціал на внутрішній мембрані мітохондрій є ключовим чинником в забезпеченні функціонування мітохондрій [30, 31]. Зокрема, показано, що синтез АТФ, транспорт іонів К і Са залежать від рівня поляризації мітохондріальних мембран. Добре відомо, що мітохондрії здатні акумулювати значну кількість іонів Са [32, 33]. Ca^{2+} -акумулююча активність мітохондрій залежить від багатьох чинників, серед яких рівень поляризації мітохондріальних мембран є одним з визначальних [32]. Раніше, з використанням ізотопної техніки ($^{45}\text{Ca}^{2+}$), ми показали, що попередня інкубація пермеабілізованих дигітоніном клітин міометрія з калікс[4]аренхалконамідами, призводить до збільшення протонофор-чутливої акумуляції іонів Са в мітохондріях

гладенького м'яза матки [34]. Маємо зазначити, що ізотопна техніка дозволяє реєструвати так званий «загальний Ca^{2+} », тобто сукупно іонізований та зв'язаний. Проте функціонально активним є вільний Ca, реєстрація якого здійснюється за участі флуоресцентних барвників. Отже подальші наші експерименти були спрямовані на дослідження ефектів калікс[4]аренхалконамідів на рівень іонізованого Ca у матриксі мітохондрій. Зміни концентрації іонізованого Ca у мітохондріях міометрія щурів досліджували із використанням спектрофлуориметра QuantaMaster™ 40 компанії Photon Technology International та флуоресцентного зонда Fluo 4AM ($\lambda_{\text{збуд.}}$ = 490 нм, $\lambda_{\text{фл.}}$ = 520 нм) у середовищі такого складу (мМ): 20 Hepes (pH=7,4), 250 цукроза, 2 P_i (у вигляді K^+ -фосфатного буферу, pH =7,4), 5 сукцинату натрію, 3 MgCl_2 , ± 3 АТР. Тестування кожної проби завершувалось додаванням розчину 0,1 % тритону X-100 та, за 1 хв., розчину 5 мМ EGTA (значення флуоресценції - F_{max} та F_{min} відповідно). У всіх дослідах калікс[4]арени використовували у концентрації 10 мкМ. Концентрацію іонізованого Ca в матриксі розраховували за формулою Грінкевича [34].

Визначення концентрації іонізованого Ca ($[\text{Ca}^{2+}]_m$) у матриксі мітохондрій проводили за стандартною процедурою. Мітохондрії попередньо інкубували протягом 5 хв. у стандартному середовищі інкубації та визначали рівень ендогенного Ca^{2+} у матриксі. Потім до середовища інкубації вносили 100 мкМ Ca та тестували зміни рівня іонізованого Ca у матриксі. Для стандартизації результати кожного експерименту нормували на 100 % контрольної проби. Інкубацію мітохондрій проводили у середовищах двох типів: Mg^{2+} - та Mg^{2+} , АТР-вмістному. Калікс[4]арени у концентрації 10 мкМ вносили у середовище інкубації на етапі попередньої інкубації мітохондрій. Як видно з результатів, наведених на рис. 4.10, попередня інкубація мітохондрій у Mg^{2+} -вмістному середовищі з калікс[4]аренхалконамідами супроводжується зростанням рівня

іонізованого Са в цих органелах у порівнянні з контролем як у відсутності іонів Са, так і за умов внесення у середовище інкубації 100 мкМ Са²⁺.

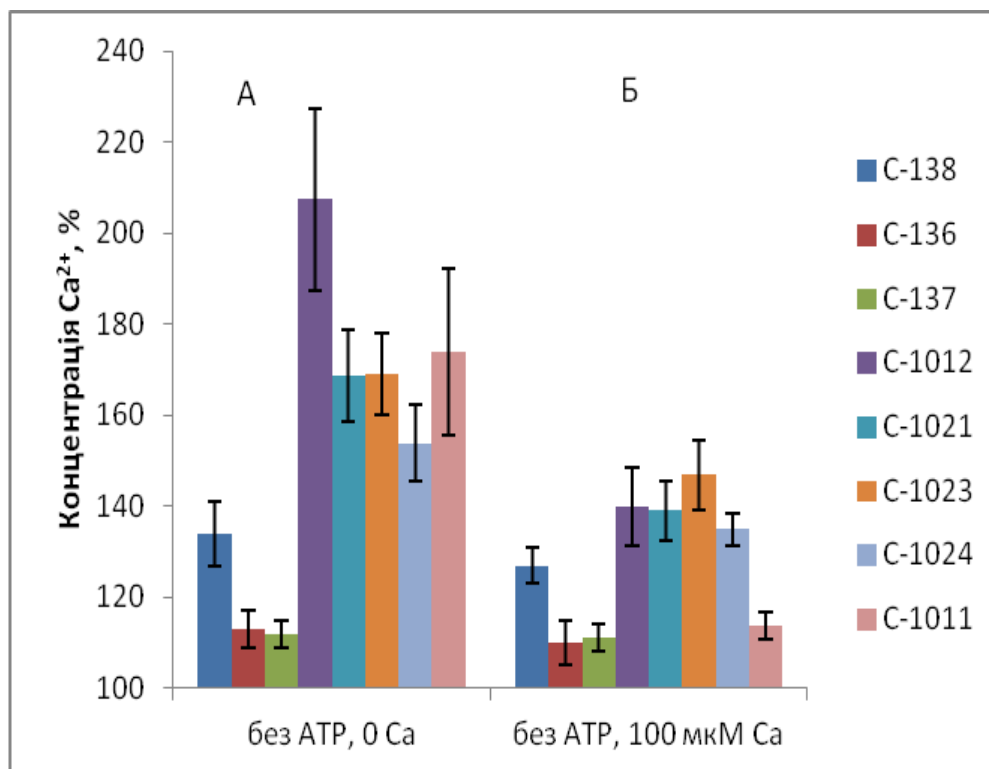


Рис. 4.10. Рівень іонізованого Са у матриксі мітохондрій міометрія після 5 хв інкубації у Mg-вмістному середовищі з 0 мкМ (А) та 100 мкМ Са²⁺ (Б) за відсутності (контроль) та присутності 10 мкМ калікс[4]аренхалконамідів. М+m, n=6

У попередніх роботах ми показали, що введення АТР до середовища інкубації, що містить Mg²⁺, супроводжується зростанням рівня ендogenous Са у матриксі мітохондрій [35] та суттєво збільшує загальний рівень акумуляції Са²⁺ у цих структурах [33]. Отже наступну серію експериментів ми провели у середовищі, що містить Mg²⁺, АТР. Як видно з результатів, наведених на рис. 4.11, попередня інкубація мітохондрій з калікс[4]аренхалконамідами супроводжується зростанням рівня іонізованого Са в цих органелах у порівнянні з контролем як у відсутності іонів Са, так і за умов внесення у середовище інкубації 100 мкМ Са²⁺.

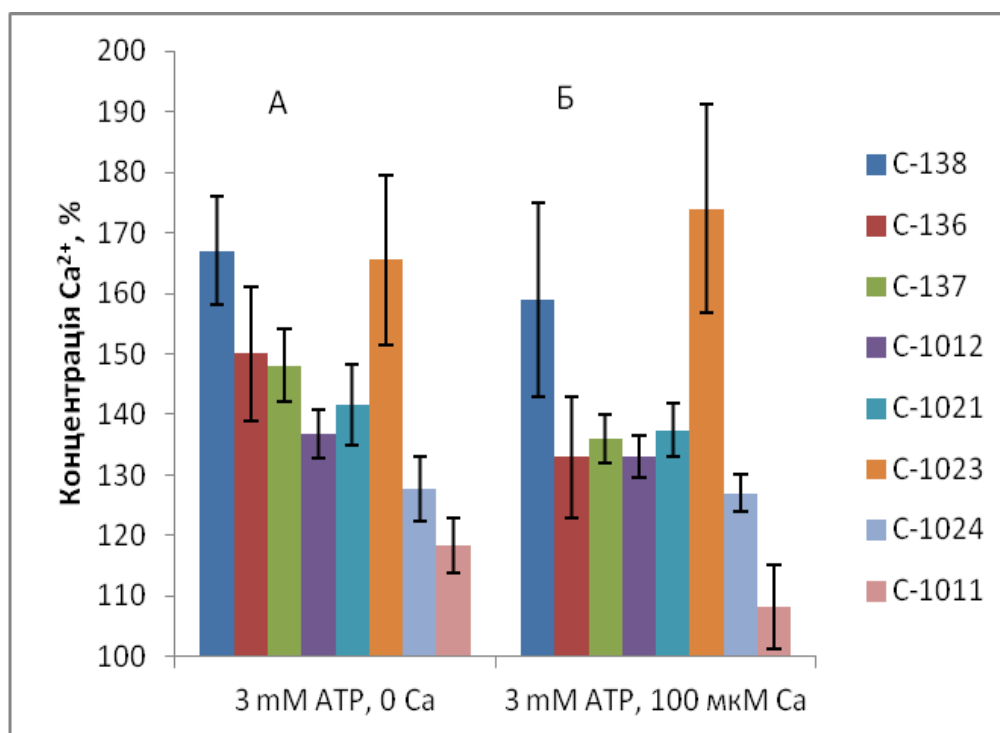


Рис. 4.11. Рівень іонізованого Са у матриксі мітохондрій міометрія після 5 хв інкубації у Mg,ATP-вмістному середовищі з 0 мкМ (А) та 100 мкМ Ca^{2+} (Б) за відсутності (контроль) та присутності 10 мкМ калікс[4]аренхалконамідів. (M+m, n=4-5)

Таким чином ми показали, що за нетривалої (5-10 хв) інкубації мітохондрій міометрія у присутності калікс[4]аренхалконамідів збільшується як рівень поляризації мембран мітохондрій, так і концентрація іонізованого Са у матриксі мітохондрій.

Відомо, що збільшення концентрації іонізованого Са у матриксі мітохондрій може супроводжуватись двома протилежно спрямованими ефектами. З одного боку, спостерігається активація мітохондріального метаболізму за рахунок стимуляції циклу Кребса та активності дихального ланцюга, що веде до збільшення синтезу АТФ. З іншого боку перевантаження мітохондрій іонами Са супроводжується відкриванням мітохондріальної пори перехідної проникності, вивільненням цитохрому с і, як наслідок, клітини гинуть.

Доведено, що мітохондрії відіграють важливу роль у виникненні патологічних станів за рахунок продукування надлишкової кількості активних форм кисню, що веде до ушкодження компонентів клітин і, як наслідок, до загибелі клітини [36]. За нормальних умов понад 90 % кисню за участі дихального ланцюга окислюється до H_2O . Було доведено, що утворення активних форм кисню залежить від величини мембранного потенціалу мітохондрій ($\Delta\psi$). Так, встановлено, що за фізіологічних значень $\Delta\psi$, які не перевищують 140 мВ, активно відбувається синтез АТФ, тоді як генерація активних форм кисню гальмується [37]. Маємо зазначити, що за певних умов синтез активних форм кисню може мати місце і за низьких значень $\Delta\psi$ [38], проте загально визнаним є положення, що патологічні рівні активних форм кисню формуються за високих значень $\Delta\psi$ [36]. Так встановлено, що гіперполяризація внутрішньої мембрани мітохондрій супроводжується експоненціальним збільшенням утворення активних форм кисню [39, 40]. Зокрема показано, що збільшення значення $\Delta\psi$ понад 140 мВ супроводжується 70-90 % збільшенням концентрації активних форм кисню [39]. Ці сполуки вільно проходять крізь мітохондріальну мембрану або транспортуються за участі мітохондріальних каналів, потрапляють до цитозолу, де незворотно пошкоджують різні компоненти клітини, що в решті решт веде до загибелі клітини. На підставі одержаних результатів висловлюється припущення, що запуск апоптозу відбувається у три етапи, а саме - надмірне вивільнення іонів Ca , транзйєнтна гіперполяризація мембран мітохондрій та різке зростання кількості активних форм кисню [36].

Отже мітохондрії, найважливіша функція яких полягає у забезпеченні клітини енергією, за певних умов можуть сприяти розвитку апоптозу, тобто викликати загибель клітини. Саме цю здатність мітохондрій брати участь у запуску апоптозу намагаються використовувати дослідники у пошуку сполук, що сприятимуть загибелі

небажаних клітинах, зокрема, онкотрансформованих. Добре відомо, що в онкотрансформованих клітинах порушені механізми запуску апоптозу [41]. Як показали дослідження, до сполук, які спроможні запустити апоптоз з використанням мітохондріального шляху, належать халкони [42, 43]. На ізольованих гепатоцитах щурів показано, що цитотоксичний ефект гідроксихалконів зумовлений, зокрема, колапсом мембранного потенціалу мітохондрій [43]. Існує також думка, що апоптоз за участі мітохондрій може привести до зменшення об'єму міоми та міометрія і можливого полегшення симптомів хвороби [44]. Відомо, що гіперполяризація мембран передую колапсу мембранного потенціалу. Отже встановлений нами гіперполяризуючий ефект калікс[4]аренхалконамідів може стати у нагоді при проведенні дослідів по вивченню можливих шляхів знешкодження небажаних клітин.

РОЗДІЛ 5. Mg^{2+} ,АТР-ЗАЛЕЖНА Na^+ , K^+ -ПОМПА ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ ТА КАЛІКСАРЕНИ

Натрієва помпа (Na^+ , K^+ -АТРаза плазматичної мембрани) (К.Ф. 3.6.3.9) – ензим, який енергозалежно транспортує іони Na^+ і K^+ , залучення у підтримання трансмембранного потенціалу, іонного гомеостазу, у передачу сигналів до клітини і регуляцію експресії багатьох генів, які кодують важливі внутрішньоклітинні протеїни [1]. Порушення її функціонування є ключовою ланкою в розвитку таких поширених патологій, як артеріальна гіпертензія, цукровий діабет зі супутнім пригніченням моторики кишечника, ниркова та серцева недостатність, преєклампсія вагітних тощо [2, 3].

Приймаючи до уваги, що каліксарени, завдяки їх здатності утворювати супрамолекулярні комплекси з біологічно важливими молекулами та іонами, можуть впливати на перебіг біохімічних процесів і, відповідно, розглядатися як перспективні молекулярні платформи для дизайну фізіологічно активних сполук [4, 5], ми поставили перед собою за мету вивчити їхній вплив на активність Na^+ , K^+ -АТРази плазматичної мембрани міоцитів матки. У відповідних дослідках приймав участь к.б.н. О.А.Шкрабак.

5.1. ДІЯ КАЛІКС[4]АРЕНІВ НА ЕНЗИМАТИЧНІ АКТИВНОСТІ Na^+ , K^+ -АТРази ТА Mg^{2+} -АТРази ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ ГЛАДЕНЬКОМ`ЯЗОВИХ КЛІТИН

Під час пошуку ефекторів, здатних модифікувати ензиматичну активність, важливо щоб їх дія була специфічною та селективною. У дослідках, які були проведені із використанням широкого загалу калікс[4]аренів (14 сполук), було знайдено (рис. 5.1), що їхній гальмівний ефект на питому ензиматичну активність Na^+ , K^+ -АТРази

плазматичної мембрани клітин міометрія задовольняє послідовності: C-97 $\approx$ C-107 > C-99 > CIP-45 > ID-30 $\approx$ C-100 $\approx$ C-98 $\approx$ YA-038 $\approx$ ID-17 > C-54 $\approx$ YA-024 > AS-1 $\approx$ C-90. Дійсно, як можна бачити, найбільш ефективну гальмівну дію на активність Na^+, K^+ -АТРази виявляють калікс[4]арени C-97 та C-107 (майже повне інгібування: зменшення активності до 2 - 3 % відносно контролю), трохи меншу гальмівну дію демонстрував калікс[4]арен C-99 (до 14 %). Менш ефективно (до 28 %) Na^+, K^+ -залежний ензиматичний гідроліз АТР гальмує калікс[4]арен CIP-45 (ФГ = $\text{P}(\text{O})\text{Et}_2$). Калікс[4]арени ID-30, C-100, C-98, YA-038 та ID-17 (ФГ = tetrakis- $\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$, tetrakis-tetrazole, bis- $\text{CH}(\text{P}(\text{O})(\text{OH})\text{ONa})_2$, tetrakis- COOH , tetrakis- $\text{P}(\text{O})\text{Ph}_2$ відповідно) інгібують Na^+, K^+ -АТРазу майже однаково: вони пригнічують її активність лише до 40 – 50 %. Малоефективно гальмують цей ензим калікс[4]арени C-54 (ФГ = tetrakis- $(\text{CH}_3)_2\text{N}^+\text{C}_2\text{H}_4\text{OH Cl}^-$) та YA-024 (ФГ = bis- COOH) - до 65 - 70 %. Калікс[4]арени AS-1 (ФГ = tetrakis- $i\text{-PrNH}_2^+ \text{Cl}^-$) та C-90 (ФГ = tetrakis- $\text{HN-C}(\text{CF}_3)=\text{NSO}_2\text{Ph}$) не інгібують Na^+, K^+ -АТРазу – залишкова ензиматична активність становить 90 – 95 %. Що ж стосується калікс[4]арену C-91 (ФГ = bis- $\text{HN-C}(\text{O})\text{CH}_2\text{OC}_6\text{H}_4\text{F-}p$), то він виявляв деяку активуючу дію на активність Na^+, K^+ -АТРази – до 119 % від контрольного значення.

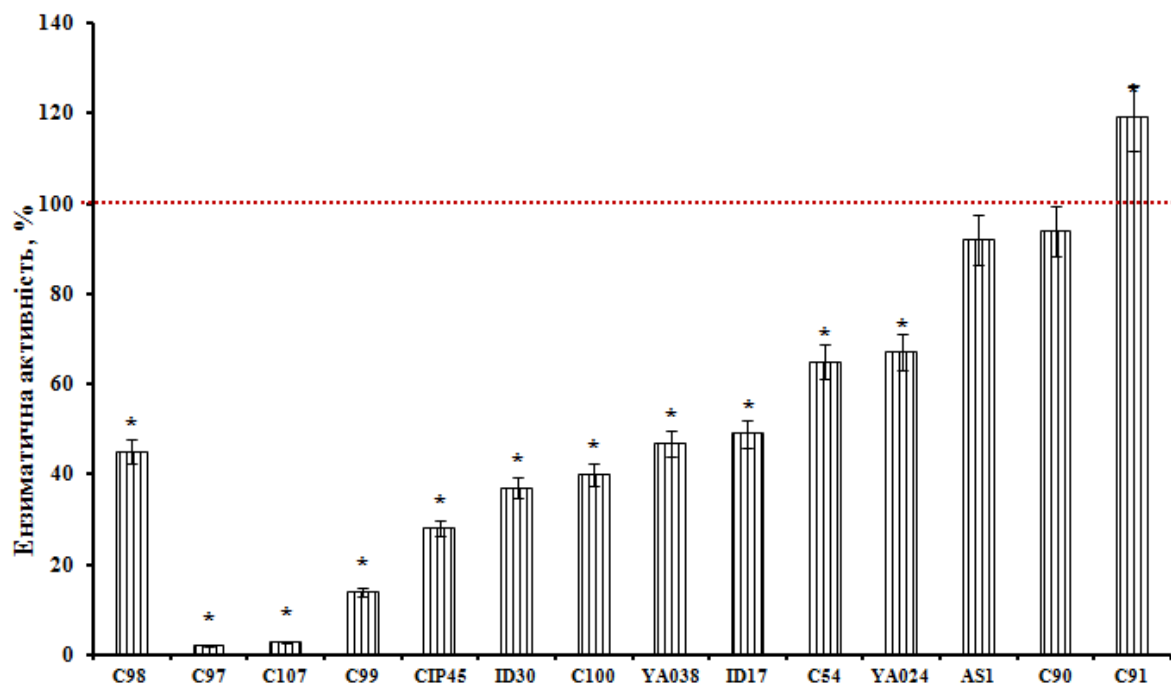


Рис. 5.1. Вплив калікс[4]аренів (100 мкМ) на ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази у фракції плазматичної мембрани клітин міометрія ($M \pm m$; $n = 7$)

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

* - відмінність щодо контролю є достовірною ($p \leq 0,05$, $M \pm m$; $n = 7$)

“Загальну” $\text{Mg}^{2+}, \text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРазну активність визначали у фракції плазматичних мембран клітин міометрія, як описано раніше [6], при 37 °C у стандартному середовищі (об’єм - 0,4 мл), яке містило (мМ): 1 АТФ, 3 MgCl_2 , 125 NaCl, 25 KCl, 1 ЕГТА, 20 Непер-трис-буфер (pH 7,4), 1 NaN_3 (інгібітор АТРази мітохондрій [7]), 0,1 мкМ тапсигаргін (селективний інгібітор $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ендо(сарко)-плазматичного ретикулуму [7]) і 0,1% дигітонін (фактор перфорації плазматичної мембрани [8]). Кількість протеїну мембранної фракції в пробі – 20 – 30 мкг. Час інкубації - 3 хвилини. Ензиматичну реакцію ініціювали введенням до середовища інкубації аліквоти (20 мкл) суспензії плазматичних мембран, а зупиняли - додаванням до інкубаційної

суміші 1 мл “стоп”-розчину наступного складу: 1,5 М натрій оцтовокислий, 3,7 % формальдегід, 14 % етанол, 5 % ТХУ, рН 4,3 (при 8 °С). Наявність Ca^{2+} -хелатора ЕГТА у середовищі інкубації забезпечувало зв’язування ендogenous іонів Са у ньому.

„Базальну” Mg^{2+} -АТРазну активність визначали в тому ж середовищі інкубації, але в присутності 1 мМ убаїну (селективний інгібітор Na^+, K^+ -АТРази [9, 10]).

Убаїнчутливу Na^+, K^+ -АТРазну активність ми розраховували по різниці між величинами “загальної” $\text{Mg}^{2+}, \text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРазної і “базальної” (убаїннечутливої) Mg^{2+} -АТРазної активностей. Тому при пошуку ефекторів, здатних модифікувати активність Na^+, K^+ -АТРази, важливим є наступне: дуже бажано, щоб ці ефектори не впливали на активність “базальної” Mg^{2+} -АТРази.

Отже, ми вивчили вплив досліджуваних калікс[4]аренів на питому ензиматичну активність Mg^{2+} -АТРази (рис. 5.2). Виявилось, що гальмівний ефект калікс[4]аренів на питому ензиматичну активність Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани клітин міометрія задовільняє послідовності: C-91 $\simeq$ C-54 > AS-1 $\simeq$ УА-024 $\simeq$ СІР-45 $\simeq$ ID-17 $\simeq$ ID-30 > УА-038 $\simeq$ C-97 $\simeq$ C-98 $\simeq$ C-107 $\simeq$ C-99 > C-100.

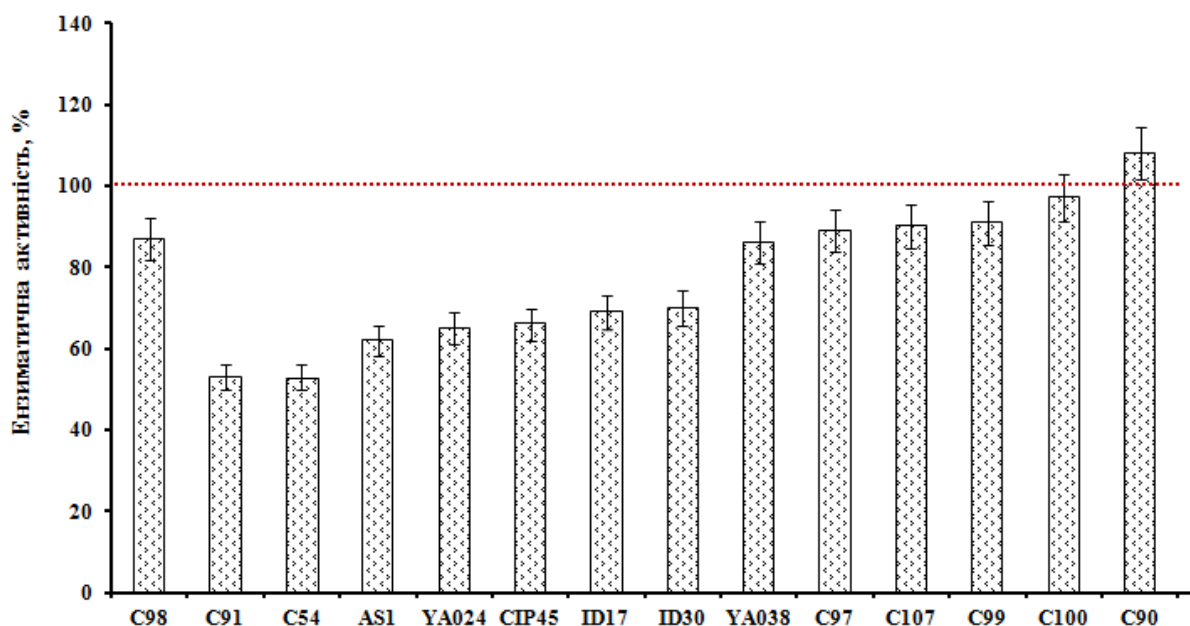


Рис. 5.2. Вплив калікс[4]аренів (100 мкМ) на ензиматичну активність „базальної” Mg^{2+} -АТРази у фракції плазматичної мембрани клітин міометрія ($M \pm m$; $n = 7$).

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

* - відмінність щодо контролю є достовірною ($p \leq 0,05$, $M \pm m$; $n = 7$)

Таким чином, на половину зменшують активність Mg^{2+} -АТРази калікс[4]арени С-91 та С-54 - до 53 – 55 % стосовно контрольного значення, прийнятого за 100 %. Калікс[4]арени AS-1, YA-024, CIP-45, ID-17, ID-30 майже однаково пригнічують активність Mg^{2+} -АТРази - до 60 – 70 %. Менш ефективно гальмують зазначену ензиматичну активність калікс[4]арени YA-038, C-97, C-98, C-107 та C-99 – до 85 - 90 %. Майже не впливає на ензиматичну активність Mg^{2+} -АТРази калікс[4]арен С-100 та С-90: в їх присутності рівень активності зазначеної АТРази становив 97 та 108 % від контрольного значення відповідно.

Таким чином, із вищенаведених даних (рис. 5.1 та 5.2) можна зробити наступний висновок: серед усієї сукупності досліджених

калікс[4]аренів водорозчинні калікс[4]арени С-97, С-99 та С-107, що були використані у концентрації 100 мкМ, ефективно (на 86 – 98 % стосовно контрольного значення) інгібували ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРazi у фракції плазматичної мембрани, не впливаючи на активність Mg^{2+} -АТРazi (гальмівний ефект – лише на 9 – 11 %).

Саме тому у подальших дослідженнях особливу нашу увагу привернули калікс[4]арени С-97, С-99 та С-107. Аналіз дії інших калікс[4]аренів на активність Na^+, K^+ -АТРazi навряд чи був доцільним внаслідок того, що деякі з них: а) не впливали на цей ензим взагалі (AS-1 та С-90); б) низькоефективно впливали на активність Na^+, K^+ -АТРзи навіть за умов відсутності ефективного впливу на активність Mg^{2+} -АТРazi (С-100, YA-038); в) гальмували одночасно обидві ензиматичні активності – і Na^+, K^+ -АТРазну і Mg^{2+} -АТРазну (CIP-45, ID-30, ID-17, С-54, YA-024).

5.2. ПОРІВНЯННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ІНГІБУЮЧОЇ ДІЇ КАЛІКС[4]АРЕНІВ С-97, С-99, С-107 ТА УАБАЇНУ НА ЕНЗИМАТИЧНУ АКТИВНІСТЬ Na^+, K^+ -АТРazi ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ ГЛАДЕНЬКОМ`ЯЗОВИХ КЛІТИН

Як відомо, кардіоактивні стероїди убаїн (рис. 5.3) і строфантин є практично абсолютними селективними інгібіторами Na^+, K^+ -АТРazi [11, 12, 13]. Кардіоглікозиди зв'язуються з протеїном з позаклітинного зовнішнього боку плазматичної мембрани клітини. Фосфорилування ензиму і перехід в конформацію Р-Е₂ полегшує зв'язування глікозидів.

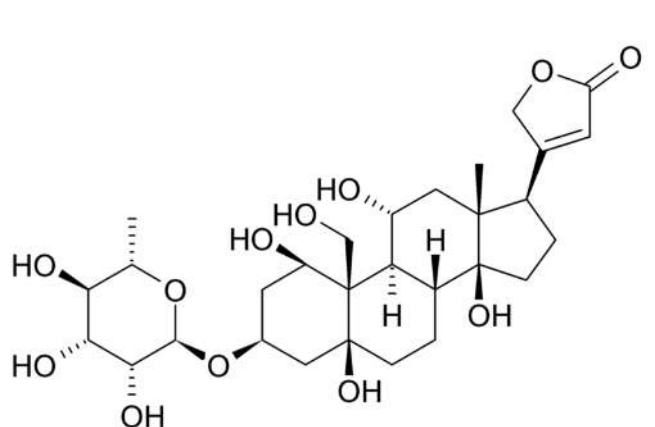


Рис. 5.3. Структурна формула уабаїну

Вважають, що стероїди блокують ензим в стані $P-E_2$ і, таким чином, гальмують перехід на рівні конформерів $E_2 \rightarrow E_1$. Як можна бачити (рис. 5.4а), уабаїн в діапазоні концентрацій 10^{-6} - $5 \cdot 10^{-3}$ М ефективно пригнічує “загальну” Mg^{2+}, Na^+, K^+ -АТРазну активність сарколеми міометрія, при концентрації уабаїну $5 \cdot 10^{-4}$ - $5 \cdot 10^{-3}$ М ця активність зменшується до 63 % відносно контролю (за нього приймається так звана „нульова точка”, яка тестується у відсутності інгібітору: $28,7 \pm 1,4$ мкмоль P_i /год на 1 мг протеїну ($M \pm m$; $n=7$)). Таким чином, абсолютне значення уабаїнчутливої Na^+, K^+ -АТРазної активності становить $10,6 \pm 0,9$ мкмоль P_i /год на 1 мг протеїну ($M \pm m$; $n=7$). „Залишок” ензиматичної активності, нечутливої до дії уабаїну, свідчить про наявність в плазматичній мембрані так званої „базальної” Mg^{2+} -залежної АТРази ($18,1 \pm 1,2$ мкмоль P_i /год на 1 мг протеїну відповідно ($M \pm m$; $n=7$)).

Значення уявної константи $I_{0,5}$ інгібування Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани клітин міометрія уабаїном складає $21,3 \pm 1,5$ мкМ ($M \pm m$; $n=5$) (рис. 5.4.б). Для порівняння зазначимо, що, за літературними даними, величина $I_{0,5}$ для серцевого м'язу собаки становить 0,1-0,3 мкМ, а для серцевого м'язу пацюків – 75-93 мкМ [14]. Взагалі ж найбільш чутливим до уабаїну є ензим, який був виділений із

тканин людини, корів, собак і ярчуків, менш чутливою до убаїну є Na^+, K^+ -АТРаза мурчаків, щурів і кроликів [14].

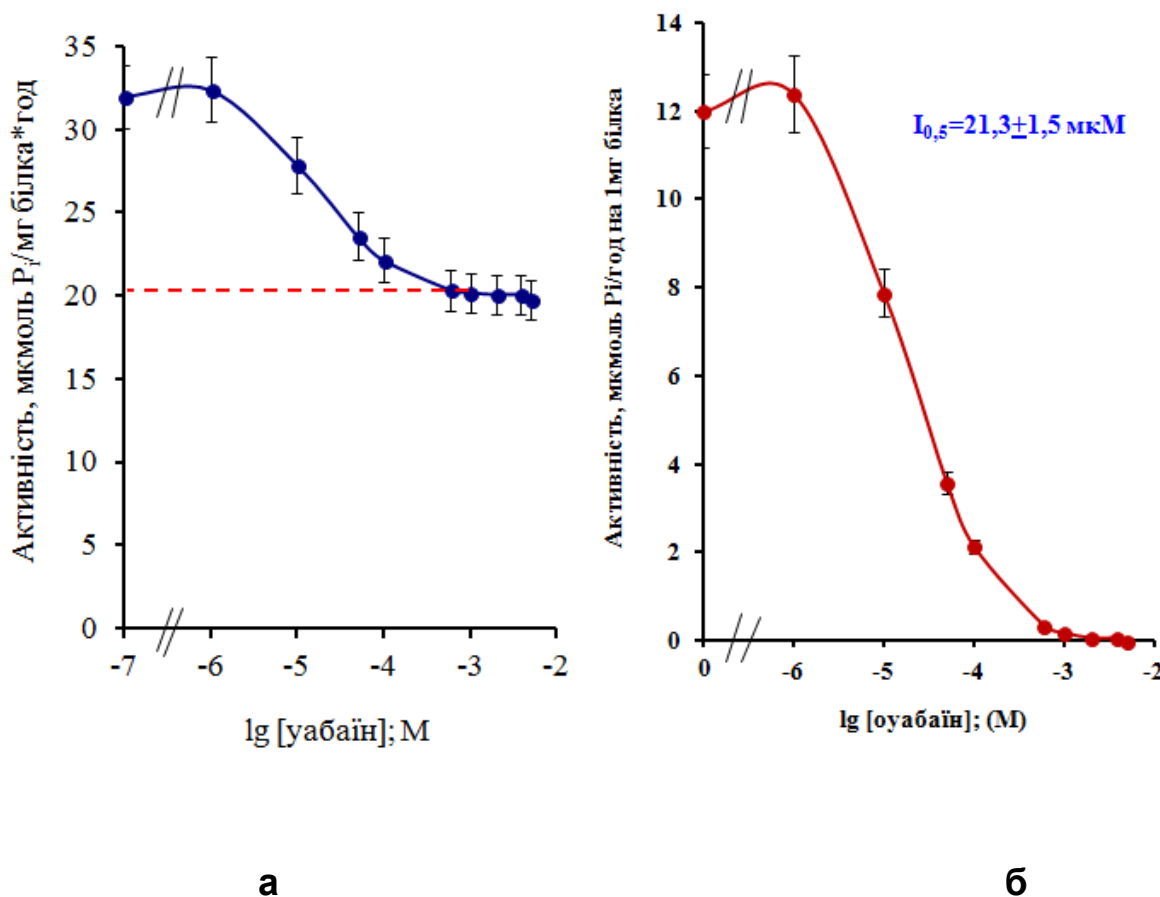


Рис. 5.4. Концентраційні залежності впливу убаїну на $\text{Mg}^{2+}, \text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРазну (“загальну”) (а) та убаїнчутливу Na^+, K^+ -АТРазну (б) активність у фракції плазматичної мембрани клітин міометрія ($M \pm m$; $n = 5$)

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

В подальших експериментах ми зосередили свою увагу на деяких вибраних калікс[4]аренах, а саме - С-97 (5-біс(дигідроксифосфорил)метил-26,28-дигідрокси-25,27-дипропoxикалікс[4]арен), С-99 (5,17-біс(дигідроксифосфонілметилол)-26,28-дигідрокси-25,27-дипропoxикалікс[4]арен) та С-107 (5,17-ди(фосфоно-2-піриділ-метил)аміно-11,23-ди-трет-бутил-26,28-

дигідрокси-25,27-дипропоксикалікс[4]арен). Вони, використані у концентрації 100 мкМ, пригнічують активність Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани на 98 %, 86 % та 97 % відповідно для калікс[4]аренів С-97, С-99 та С-107 (рис. 5.5). При цьому ці сполуки майже не впливали на активність „базальної” Mg^{2+} -АТРази (гальмівний ефект – лише на 9 – 11 %).

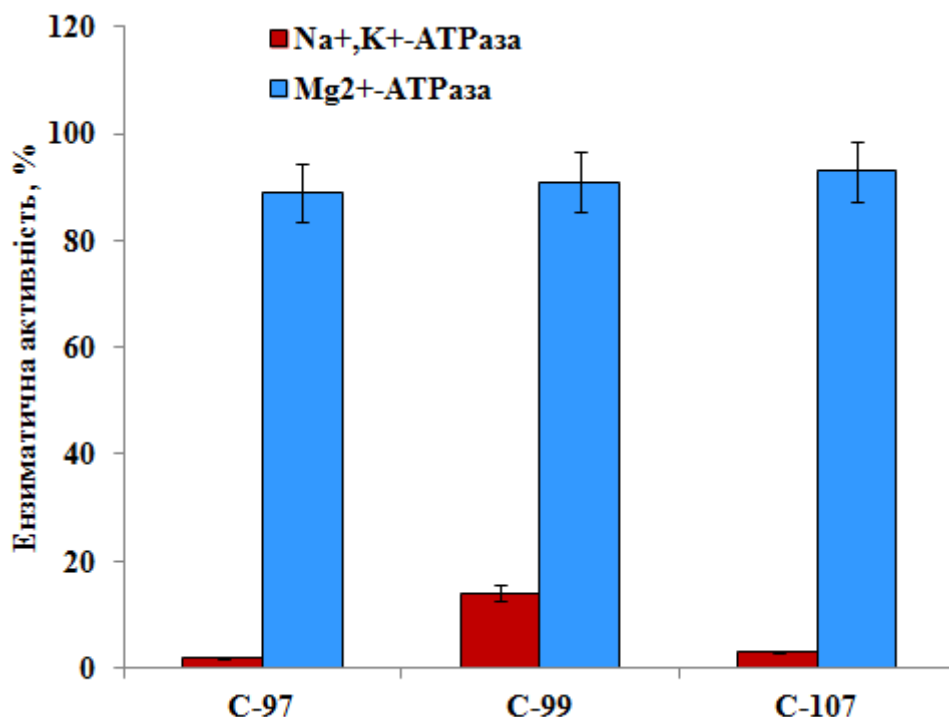


Рис. 5.5. Вплив калікс[4]аренів С-97, С-99, С-107 (100 мкМ) на активності Na^+, K^+ -АТРази та базальної Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани клітин міометрія ($M \pm m$, $n = 7$).

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

Також ми показали, що відібрані калікс[4]арени С-97, С-99 та С-107, які використовували в інтервалі концентрацій від 10^{-8} до 10^{-4} М, дозозалежно та значно ефективніше, ніж убаїн, пригнічують активність Na^+, K^+ -АТРази (рис. 5.6а).

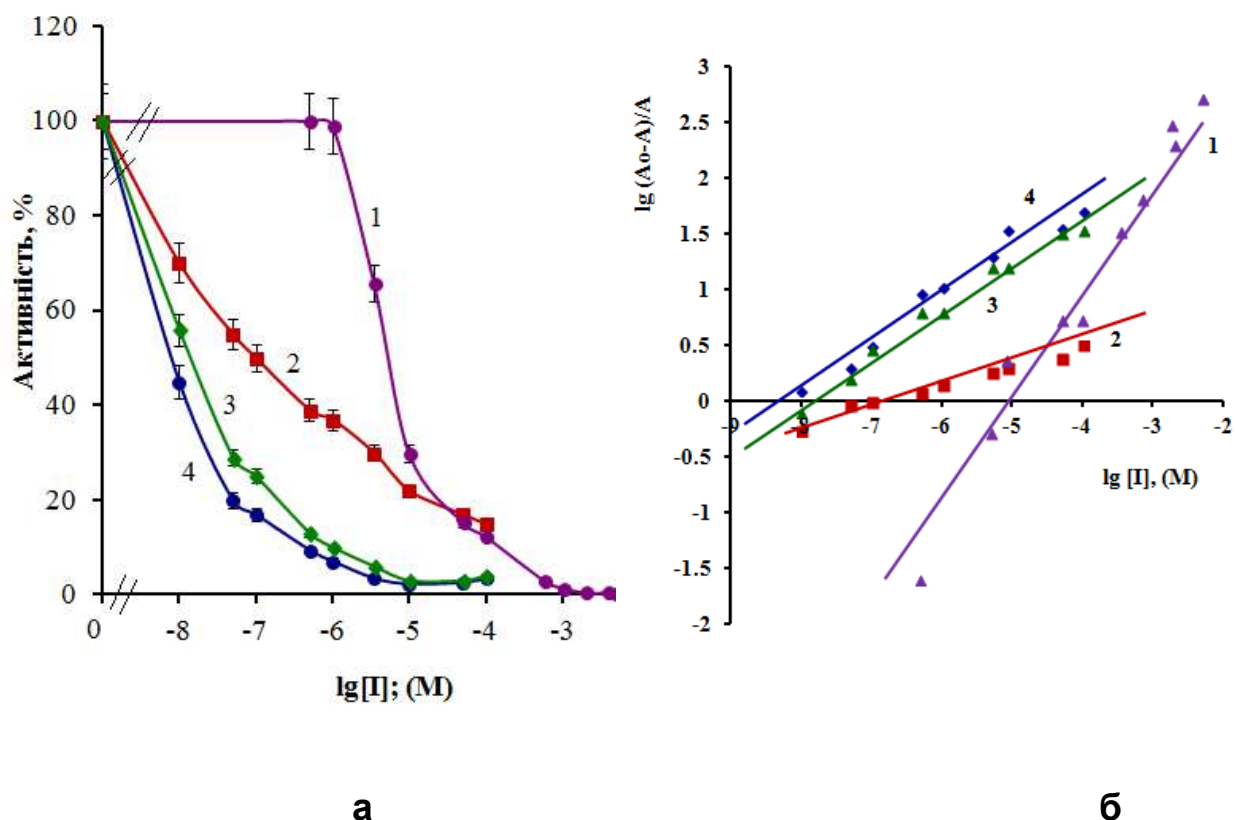


Рис. 5.6. Каталітичне титрування калікс[4]аренами С-97, С-99, С-107 та убаїном активності Na^+, K^+ -АТРози у фракції плазматичної мембрани клітин міометрія ($M \pm m$; $n = 6$)

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

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

б – лінеаризовані у координатах Хілла усереднені ($n = 6$) криві каталітичного титрування (див. рис. 5.2.4а). Типові значення коефіцієнту кореляції r становили 0,98-0,99

Лінеаризовані у координатах Хілла $\{\lg[(A_0-A)/A]; \lg[I]\}$ графіки концентраційних залежностей наведені на рис. 5.6а. Вони були використані з метою розрахунку кількісних показників (константа інгібування $I_{0,5}$, коефіцієнта Хілла n_H) інгібуючої дії трьох зазначених калікс[4]аренів порівняльно до дії убаїну (рис. 5.5б, табл. 5.1). Отже, калікс[4]арени С-97 та С-107 вже у концентрації 10^{-5} М гальмують активність Na^+, K^+ -АТРози плазматичної мембрани практично повністю

(залишкова активність - до 2% відносно контрольного значення). Величини уявних констант інгібування $I_{0,5}$ для цих калікс[4]аренів становлять 33 ± 4 та 54 ± 6 нМ відповідно, значення коефіцієнта Хілла n_H складають $0,38 \pm 0,06$ та $0,4 \pm 0,08$. З меншою ефективністю пригнічує каталітичну активність Na^+, K^+ -АТРази калікс[4]арен С-99: при використанні його у концентрації 100 мкМ активність ензиму інгібувалась лише на 80 %, а її повне гальмування спостерігалось при концентрації 1 мМ, при цьому $I_{0,5} = 98 \pm 8$ нМ, $n_H = 0,12 \pm 0,03$. При дії ж убаїну повне інгібування активності Na^+, K^+ -АТрази також спостерігається при концентрації 1 мМ, у цьому випадку $I_{0,5} = 21 \pm 5$ мкМ, $n_H = 0,54 \pm 0,07$ (табл. 5.1).

Таблиця 5.1.

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

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

Додаток: При дослідженні концентраційних залежностей дії калікс[4]аренів та убаїну на ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази значення уявних констант інгібування $I_{0,5}$ та коефіцієнтів Хілла n_H розраховували із використанням

лінеаризованих графіків Хілла (значення коефіцієнтів кореляції становили 0,98-0,99).

Для порівняльної наочності на рис. 5.7 наведені результати, що були одержані при каталітичному титруванні Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани клітин міометрія калікс[4]аренами С-97, С-99, С-107: як бачимо, при використанні цих речовин в діапазоні від 10^{-8} до 10^{-7} М інгібування ензиматичної активності Mg^{2+} -АТРази не спостерігалось, при подальшому збільшенні концентрації цих речовин до 10^{-4} М гальмівний ефект не перевищував 5 – 10 %.

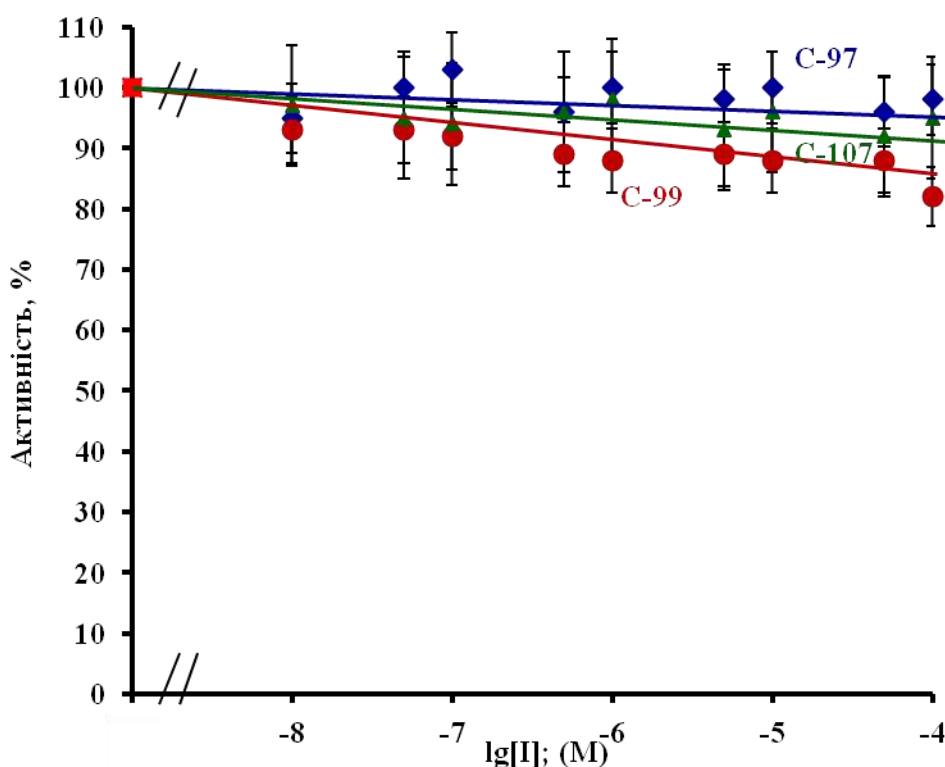


Рис. 5.7. Каталітичне титрування калікс[4]аренами С- 97, С-99 та С-107 активності Mg^{2+} -АТРази у фракції плазматичних мембран клітин міометрія ($M \pm m$; $n = 6$)

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

Таким чином, результати вищенаведених порівняльних експериментів із каталітичного титрування відібраними калікс[4]аренами С-97, С-99 та С-107, а також убаїном, Na^+, K^+ -АТРazi плазматичної мембрани клітин міометрія (рис. 5.6, 5.7; табл. 5.1), вказують на наступне.

По-перше, калікс[4]арени С-97, С-107 та С-99 значно більш ефективно, ніж убаїн, гальмують ензиматичну активність натрієвої помпи у діапазоні концентрації цих ефекторів 0 – 10 мкМ: у випадку дії цих калікс[4]аренів величина уявної константи інгібування $I_{0,5} < 0,1$ мкМ, а у випадку дії убаїну це значення у середньому на два – три порядки більше і становить 20 – 30 мкМ. Саме калікс[4]арени – С-97 та С-107 є найбільш ефективними інгібіторами ($I_{0,5} \approx 30 - 60$ нМ): адже використання їх у концентрації 10 мкМ гарантує повне пригнічення активності Na^+, K^+ -АТРazi плазматичної мембрани. У той же час калікс[4]арен С-99 ($I_{0,5} \approx 100$ нМ) та убаїн ($I_{0,5} \approx 20$ мкМ) повністю гальмують активність ензиму у концентрації 1 мМ.

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

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

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

Приймаючи до уваги факт найбільш ефективного, за значенням величини параметру $I_{0,5}$, інгібіторного впливу саме калікс[4]аренів С-97, С-99 та С-107 на Na^+, K^+ -АТРазу активність у плазматичних мембран, у подальших дослідженнях ми намагалися дослідити деякі закономірності такої їх дії.

5.3. ДІЯ СТРУКТУРНИХ КОМПОНЕНТІВ КАЛІКС[4]АРЕНУ С-107 НА АКТИВНІСТЬ Na^+, K^+ -АТРази ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ ГЛАДЕНЬКОМ`ЯЗОВИХ КЛІТИН

В попередніх дослідах, що були проведені із використанням 14 калікс[4]аренів, нами було знайдено, що 5,17-ди(фосфоно-2-піриділ-метил)аміно-11,23-ди-*трет*-бутил-26,28-дигідрокси-25,27-дипропоксикалікс[4]-арен (калікс[4]арен С-107) здатен ефективно інгібувати активність Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани гладеньком`язових клітин матки. Проте властивості інгібувальної дії зазначеного калікс[4]арену на Na^+, K^+ -АТРазу активність, зокрема, залежність цієї дії від структурної організації каліксаренової молекули, не з'ясовані.

Тому у подальших експериментах, для вивчення впливу структурних факторів, ми провели дослідження інгібувальної дії на Na^+, K^+ -АТРазу плазматичної мембрани клітин міометрія калікс[4]арен-1,3-бісамінофосфонової кислоти – калікс[4]арену С-107 (5,17-ди(фосфоно-2-піриділ-метил)аміно-11,23-ди-трет-бутил-26,28-дигідрокси-25,27-дипропоксикалікс[4]арен), її проксимального 1,2-регіоізомеру – калікс[4]арену С-160 (5,11-ди(фосфоно-2-піриділ-метил)аміно-17,23-ди-трет-бутил-26,27-дигідрокси-25,28-дипропоксикалікс[4]арен), а також модельних сполук – незаміщеного

дипропоксикалікс[4]арену C-150 (26,28-дигідрокси-25,27-дипропоксикалікс[4]арен), та N-(4-гідроксифеніл)-2-піридил-амінофосфонової кислоти M-3 (структурні формули наведені на рис. 5.3).

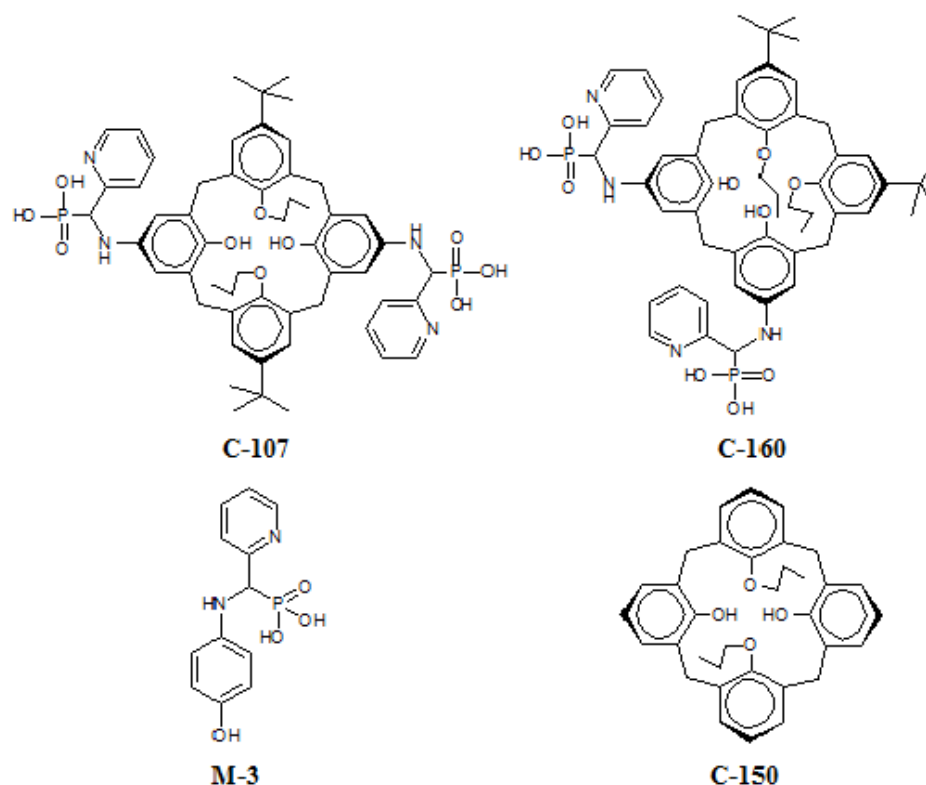


Рис. 5.8. Структурні формули калікс[4]аренів C-107, C-160, C-150 та модельної сполуки M-3

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

Як видно із структурних формул каліксаренів (рис. 5.8), калікс[4]арен C-150 не містить жодних додаткових хімічних угруповань на верхньому вінці макроциклу, тобто по відношенню до досліджуваних каліксаренів він є суто каліксареновою “чашею”.

Сполука М-3 містить один фенольний фрагмент та амінофосфонове угруповання аналогічне до такого ж у складі молекули калікс[4]арену С-107.

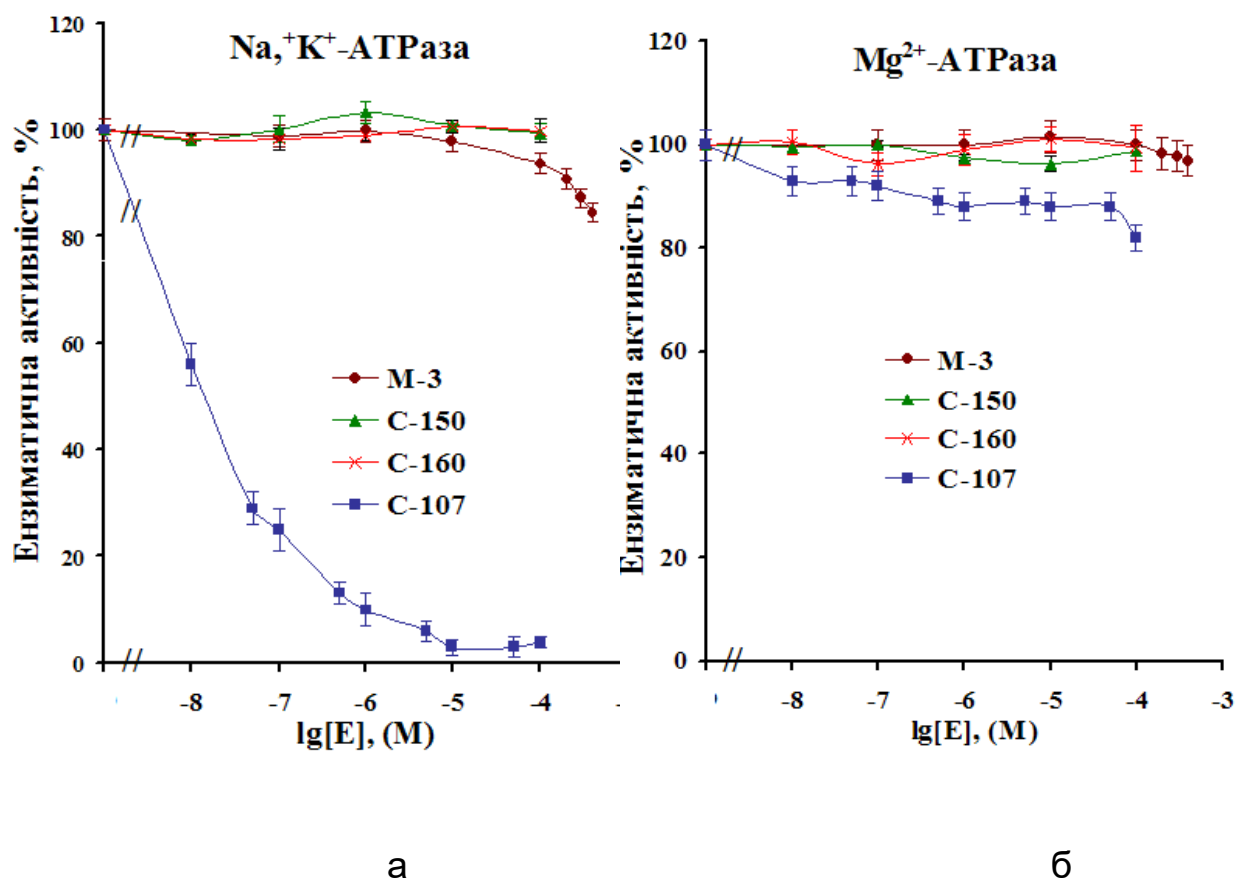


Рис. 5.9. Порівняльне дослідження концентраційних залежностей впливу калікс[4]аренів С-107, С-150 та С-160, а також модельної сполуки М-3 на активність Na^+, K^+ -АТРази (а) та “базальної” Mg^{2+} -АТРази (б) плазматичної мембрани клітин міометрія ($M \pm m$, $n = 5$)
За 100 % прийнято значення питомої активності ензиму за відсутності калікс[4]аренів у середовищі інкубації; [E] – концентрація ефекторів

В порівняльних дослідях з каталітичного титрування Na^+, K^+ -АТРази та Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани гладеньком’язових клітин матки калікс[4]ареном С-107 та його структурними фрагментами С-150 та М-3 було показано, що калікс[4]арен С-107 при вельми високих концентраціях (10^{-5} - 10^{-4} М) здатний незначно (на 10 %) впливати на активність цих ензимів.

інгібувати Mg^{2+} -АТРазну активність. Структурні фрагменти цього калікс[4]арену С-150 (10^{-8} - 10^{-4} М) та М-3 (10^{-8} - $4 \cdot 10^{-3}$ М) у широкому діапазоні концентрацій практично не впливали на досліджувані ензиматичні системи (рис. 5.9а, 5.9б). Хоча треба відзначити, що сполука М-3 у концентрації $4 \cdot 10^{-3}$ М здійснювала незначний (приблизно на 15 %) інгібувальний ефект на Na^{+},K^{+} -АТРазну (але не на Mg^{2+} -АТРазну) активність.

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

Для подальшого визначення ролі структури макроциклічної платформи калікс[4]арену С-107 та взаємного розташування амінофосфонових угруповань на ній у проявленні інгібувальної дії на Na^{+},K^{+} -АТРазну активність гладеньком'язових клітин матки був досліджений калікс[4]арен С-160, що є регіоізомером калікс[4]арену С-107. Дані калікс[4]арени відрізняються один від одного положенням амінофосфонових та трет-бутильних залишків на верхньому вінці каліксаренової чаші та положенням пропоксидних залишків на нижньому вінці макроциклу, а саме у випадку калікс[4]арену С-160 вказані залишки, розташовані у проксимальних положеннях каліксаренової основи, на відміну від калікс[4]арену С-107, у якого ці ж залишки знаходяться у дистальних положеннях.

Проведені дослідження вказують на те, що зміна положення замісників каліксаренової чаші дуже важлива, так як це призводить до повної втрати інгібувальних властивостей калікс[4]арену С-160 щодо Na^{+},K^{+} -АТРази порівняно з калікс[4]ареном С-107. Це було показано для широкого діапазону концентрацій цих речовин (10^{-8} - 10^{-4} М). Поряд

з цим, калікс[4]арен С-160 не впливає на активність Mg^{2+} -АТРази, як і калікс[4]арен С-107 (рис. 5.9а, 5.9б).

Отже, проаналізувавши отримані експериментальні дані, можна зробити припущення, що головну роль у подібній різниці між властивостями калікс[4]аренів С-107 та С-160 відіграє саме різниця у розташуванні амінофосфонових замісників цих калікс[4]аренів (у випадку калікс[4]арену С-107 вони знаходяться в положеннях 5,17, а у випадку калікс[4]арену С-160 – в положеннях 5,11). При цьому, зміни положення трет-бутильних та пропоксид залишків можна вважати несуттєвими для інгібування Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани, тому що пропоксид залишки на нижньому вінці макроциклу присутні також у складі молекули калікс[4]арену С-150, який не здатний інгібувати АТР-гідролазну реакцію (рис. 5.9), а трет-бутильні замісники взагалі відсутні у таких калікс[4]аренів, як С-97 та С-99, які, подібно до калікс[4]арену С-107, є високоефективними інгібіторами Na^+, K^+ -АТРазної активності плазматичної мембрани клітин міометрія.

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

З метою вивчення структурних особливостей калікс[4]аренів С-107 та С-160 було проведено молекулярне моделювання з використанням програми «HyperChem 7.01» [15]. При цьому виходили з того, що молекули каліксаренів є ди-цвітеріонами із протонованими амінними атомами азоту та двома депротонованими гідроксилами різних фосфонових фрагментів. З метою уникнення проблеми локальних мінімумів енергії при розрахунках ми провели конформаційний пошук оптимальної геометрії молекули, використавши метод молекулярної механіки (силове поле MM+). Для кожного калікс[4]арену були відібрані по 5 енергетично-мінімізованих

Рис. 5.10. Розраховані конформації калікс[4]аренів C-107 та C-160, бокові (а, в) та верхні (б, г) проекції (атоми вуглецю показані зеленим,

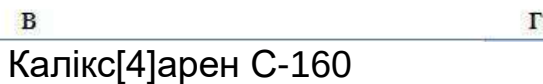


Рис. 5.10. Розраховані конформації калікс[4]аренів C-107 та C-160, бокові (а, в) та верхні (б, г) проекції (атоми вуглецю показані зеленим,

кисню – червоним, азоту – синім, фосфору – жовтим, атоми водню не показані)

Таблиця 5.2.

Характеристичні відстані між дистальними та проксимальними фрагментами N–C–P калікс[4]аренів C-107 та C-160.

Міжатомні відстані (<i>l</i>), Å			Δl , Å
	C-107	C-160	
N...N	9.43	6.73	2.70
C...C	7.75	8.09	0.34
P...P	4.85	9.40	4.55

Згідно розрахунків обидва калікс[4]арени C-107 та C-160 мають практично однакову конформацію *регулярний* конус. Разом з тим відстані N...N, C...C, P...P (*l*) між амінофосфоновими фрагментами N–C–P суттєво різняться (табл. 5.2). Наприклад, значення Δl для атомів фосфору сягає 4.55 Å. При цьому в дистально-заміщеному калікс[4]арені C-107 обидві фосфонові групи орієнтовані всередину макроциклічної порожнини. В проксимально-заміщеному калікс[4]арені C-160 фосфонові групи орієнтовані на периферію. Молекулярна порожнина даного макроциклу заповнена одним із піридилних фрагментів.

Таким чином можна стверджувати, що вплив калікс[4]арену C-107 на Na⁺,K⁺-АТРазну активність визначається оптимальним просторовим розташуванням амінофосфонових груп на каліксареновій платформі, що вірогідно є комплементарним до сайту взаємодії з Na⁺,K⁺-АТРазою плазматичної мембрани.

Отже, слід вважати, що в цілому біофізикохімічні ефекти в системі “каліксарен – мембранні фрагменти” є вельми складними. Проте для інгібувальної дії калікс[4]арену С-107 на Na^+, K^+ -АТРазну активність, що визначається у зазначеній гетерогенній системі, суттєвим є саме відносне розташування амінофосфонових груп на поверхневому вінці макроциклу.

5.4. ПОРІВНЯЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ КАЛІКС[4]АРЕНУ С-99 ТА ЙОГО АНАЛОГІВ НА Na^+, K^+ -АТРазну АКТИВНІСТЬ У ПЛАЗМАТИЧНІЙ МЕМБРАНІ ГЛАДЕНЬКОМ`ЯЗОВИХ КЛІТИН

З метою визначення ролі структурної організації молекули калікс[4]арену С-99 у проявленні інгібаторної дії на Na^+, K^+ -АТРазу плазматичної мембрани клітин міометрія, ми вивчали дію структурно подібних до нього калікс[4]аренів - С-296, С-297, С-424, С-425, С-426, С-427 на активність даного ензиму.

Повні хімічні назви калікс[4]аренів:

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

С-296 (5,17-Біс(дигідроксифосфонілметилол)-11,23-дибром-25,26,27,28–тетрапропоксикалікс[4]арен);

С-297 (5,17-Біс(дигідроксифосфонілметилол)-25,26,27,28–тетрапропоксикалікс[4]арен);

С-424 (5,17–дікарбоксил-25,27–дипропоксикалікс[4]арен);

С-425 (5,17-Біс(1-гідроксиметил-1,1-біс(дигідроксифосфорил)-25,27-дипропоксикалікс[4]арен);

С-426 (5,17-Біс(1-кето-1-дигідроксифосфорилметил)-25,27-дипропоксикалікс[4]арен);

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

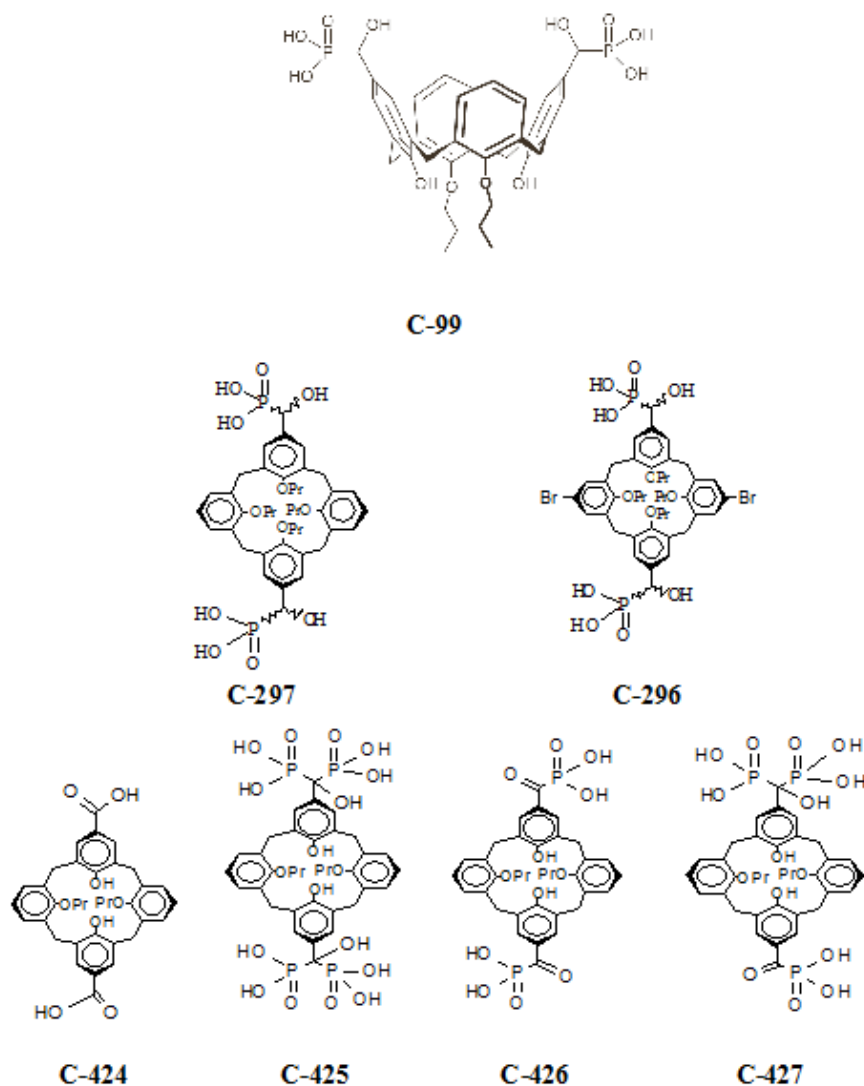


Рис. 5.11. Структурні формули калікс[4]арену C-99 та його аналогів

Спочатку ми досліджували дію калікс[4]аренів C-296 і C-297, що є структурними аналогами калікс[4]арену C-99 (рис. 5.11). У цих калікс[4]аренів нижній вінець відрізняється від калікс[4]арену C-99 наявністю ще двох додаткових пропоксильних груп. Замісники по верхньому вінці макроциклу калікс[4]арену C-297 такі ж як і у C-99, а калікс[4]арен C-296 має ще два атоми брома у положеннях 11 та 23 на верхньому вінці макроциклу.

Як показали результати досліджень, калікс[4]арени C-296 і C-297, що були використані у концентрації 100 мкМ, з однаковим ступенем ефективності виявляють інгібуючу дію на питому ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази: має місце зниження активності на $63,5 \pm 4,3$ % та $61,5 \pm 1,9$ % відповідно відносно контрольного значення (рис. 5.12). При цьому обидва калікс[4]арени майже не впливають на активність “базальної” Mg^{2+} -АТРази (зменшення активності лише до 91 % від контрольного значення).

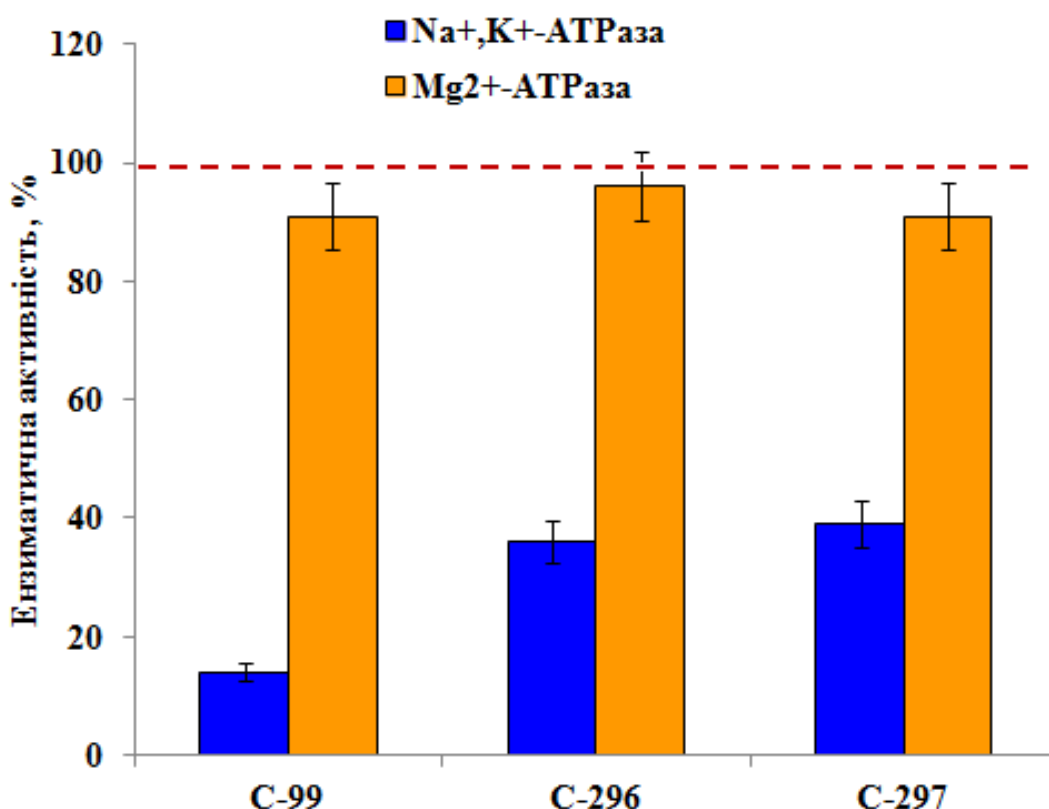


Рис. 5.12. Вплив калікс[4]аренів C-99, C-296 і C-297 (100 мкМ) на питому ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази та “базальної” Mg^{2+} -АТРази у фракції плазматичних мембран клітин міометрія ($M \pm m$; $n = 5$)

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

Також ми показали, що калікс[4]арени C-296 та C-297, які використовували в інтервалі концентрацій від 10^{-8} до 10^{-4} М, ефективно

та дозозалежно гальмують активність Na^+, K^+ -АТРazi плазматичної мембрани (рис. 5.13). Величини уявних констант інгібування $I_{0,5}$ для цих калікс[4]аренів становлять $4,90 \pm 0,31$ та $15,21 \pm 1,92$ мкМ відповідно (табл. 5.11). Значення коефіцієнта Хілла (η_H) для калікс[4]аренів С-296 та С-297 практично однакові: $0,33 \pm 0,02$ і $0,35 \pm 0,06$ відповідно.

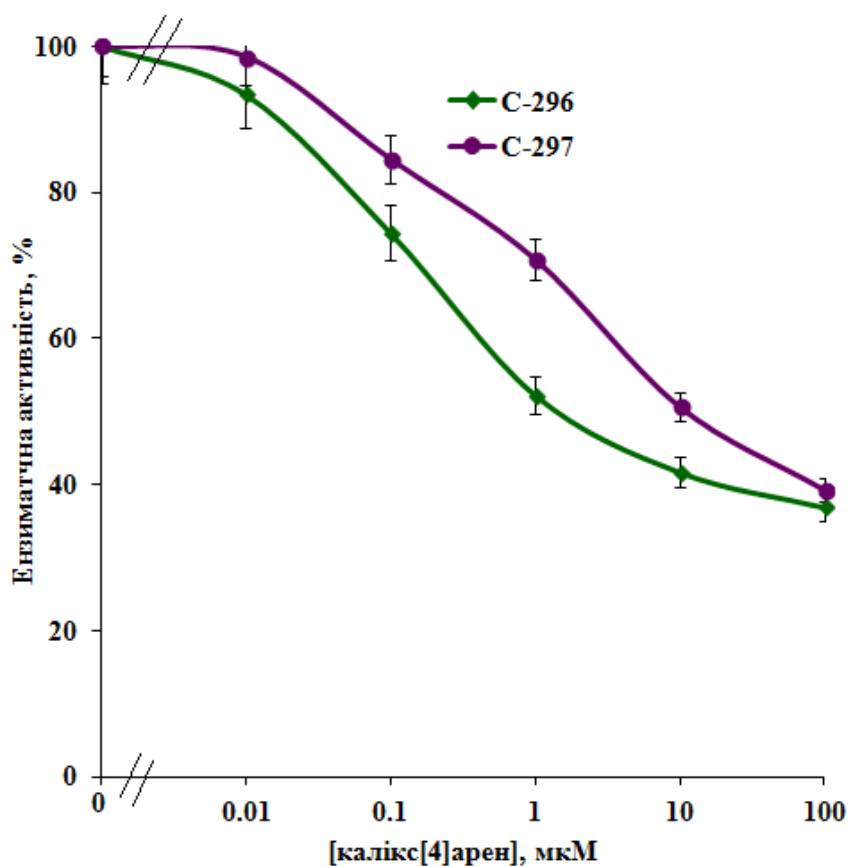


Рис. 5.13. Концентраційна залежність впливу калікс[4]аренів С-296 і С-297 на активність Na^+, K^+ -АТРazi у фракції плазматичних мембран клітин міометрія ($M \pm m$; $n = 5$)

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

Таблиця 5.3.

Кінетичні параметри інгібування калікс[4]аренами активності Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани клітин міометрія.

Калікс[4]арен	Коефіцієнт інгібування, $I_{0,5}$	Коефіцієнт Хілла, n_H
C-99	$98 \pm 8 \text{ нМ}$	$0,12 \pm 0,03$
C-296	$4,90 \pm 0,31 \text{ мкМ}$	$0,33 \pm 0,02$
C-297	$15,21 \pm 1,92 \text{ мкМ}$	$0,35 \pm 0,06$
C-425	$1,20 \pm 0,10 \text{ мкМ}$	$0,36 \pm 0,01$
C-427	$2,80 \pm 0,18 \text{ мкМ}$	$0,38 \pm 0,01$

Отже, калікс[4]арени C-296 та C-297 є менш ефективними інгібіторами Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани порівняно з калікс[4]ареном C-99, уявна константа інгібування у випадку якого наведена у таблиці 5.3. Очевидно, що інгібіторні властивості вказаних калікс[4]аренів визначаються структурою верхнього вінця макроциклу. Проте дві додаткові пропоксильні групи на нижньому вінці калікс[4]аренів C-296 та C-297 зумовлюють більшу гідрофобність цих сполук порівняно з калікс[4]ареном C-99, що може бути причиною зниження ефективності інгібування Na^+, K^+ -АТРази. Крім цього, наявність на нижньому вінці макроциклу калікс[4]аренів C-296 та C-297 чотирьох пропоксильних груп зумовлює відмінності у конформаційній поведінці цих калікс[4]аренів, а саме калікс[4]арени C-296 та C-297 в розчинах перебувають у конформаційно мобільній конформації *конус*. В той же час калікс[4]арен C-99 знаходиться в конформаційно жорсткій конформації *сплющений конус*, яка стабілізується завдяки утворенню водневих зв'язків між проксимальними групами $\text{OH} \cdots \text{OPr}$.

Наявність двох атомів бром у молекулі калікс[4]арену C-296, порівняно з калікс[4]ареном C-297, може призводити до екранування

залишків гідроксиметилфосфонової кислоти верхнього вінця макроциклу, але дана обставина суттєво не впливає на ефективність інгібування Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани, адже уявна константа інгібування калікс[4]ареном С-296 навіть нижча (4,9 мкМ) від аналогічної константи для калікс[4]арену С-297 (15,2 мкМ). Тобто, можна припустити, що модифікування верхнього вінця калікс[4]арену С-99 у положеннях 11 та 23 атомами бромової кислоти дозволило збільшити ефективність інгібування Na^+, K^+ -АТРази.

В наших подальших експериментах ми досліджували дію калікс[4]аренів С-424, С-425, С-426, С-427 на активність Na^+, K^+ -АТРази (рис. 5.14). Дані речовини за своєю структурою подібні до калікс[4]арену С-99. Структурні відмінності цих сполук знаходяться на верхньому вінці каліксаренового макроциклу. Як каліксаренова чаша, так і хімічна будова нижнього вінця, є однаковими для всіх вказаних калікс[4]аренів. Найпростішу структуру має калікс[4]арен С-424. На його верхньому вінці знаходяться лише два залишки карбонової кислоти у *пара*-положенні. Тобто, порівняно з калікс[4]ареном С-99, калікс[4]арен С-424 позбавлений залишків фосфонової кислоти. Натомість калікс[4]арен С-425, на відміну від калікс[4]арену С-99, має ще дві додаткові фосфонатні групи, що приєднані до атому вуглецю гідроксиметилфосфонатних залишків, тобто це фрагменти α -гідроксиметилбісфосфонової кислоти. Калікс[4]арен С-426 на верхньому вінці макроциклу має залишки кетометилфосфонової кислоти, на відміну від гідроксиметилфосфонатних залишків калікс[4]арену С-99, а калікс[4]арен С-427 має один залишок гідроксиметилбісфосфонату, як у калікс[4]арена С-425, та один залишок кетометилфосфонової кислоти, як у випадку калікс[4]арена С-426. Розташування замісників на верхньому вінці усіх калікс[4]аренів однакове.

Як показали результати проведених досліджень, калікс[4]арен С-424 (концентрація 100 мкМ) не впливає на активність Na^+, K^+ -АТРази та “базальної” Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани (рис. 5.14). Відсутність інгібіторної дії калікс[4]арену С-424 була очікувана, оскільки дана сполука не має залишків фосфонових кислот у своєму складі, які є відомими комплексоутворювачами. Вірогідно, що саме фосфонатні групи відіграють вирішальну роль у взаємодії калікс[4]арену С-99, а також інших фосфонатвмісних калікс[4]аренів (С-97, С-107), з ензимом та його інгібуванні.

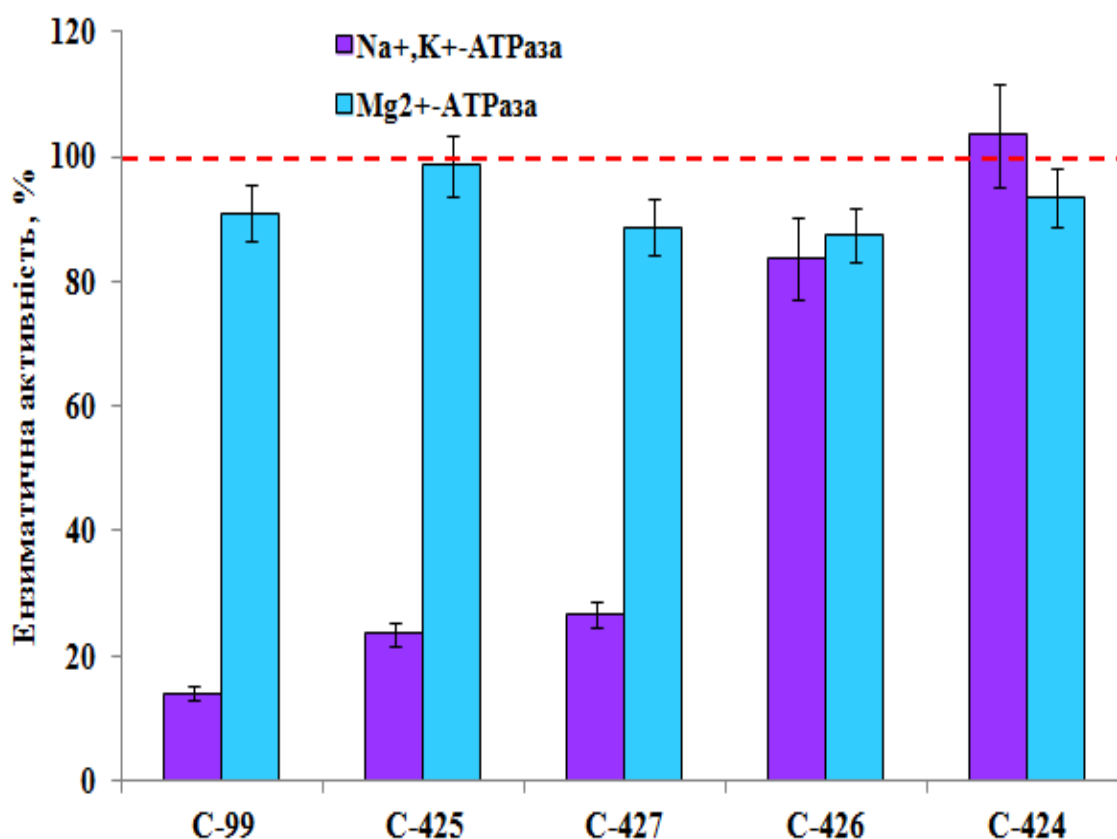


Рис. 5.14. Вплив калікс[4]аренів С-99, С-424 і С-425, С-426 та С-427 (100 мкМ) на питому ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази та “базальної” Mg^{2+} -АТРази у фракції плазматичних мембран клітин міометрія ($M \pm m$; $n = 5$)

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

Калікс[4]арен С-426, використаний у концентрації 100 мкМ, пригнічує активність обох досліджених АТРаз лише на 16 % від контрольного значення (рис. 5.14). Тобто, даний аналог калікс[4]арену С-99 практично не має інгібіторної дії на Na^+, K^+ -АТРазу. На перший погляд даний результат є несподіваним, адже калікс[4]арен С-426 за хімічною структурою дуже подібний до калікс[4]арену С-99, а кетофосфонові кислоти, якою є калікс[4]арен С-426, відомі як інгібітори ензимів. Втім, можливо декілька припущень щодо пояснення причин такої відмінності в інгібіторних властивостях цих сполук. По-перше, калікс[4]арен С-426 містить кетогрупи на метилфосфонатних замісниках замість гідроксильної групи калікс[4]арена С-99, яка здатна утворювати водневі зв'язки з різними хімічними групами на поверхні молекули ензиму. Тобто, можливо саме такі водневі зв'язки є необхідними для утворення інгібіторного комплексу калікс[4]арену С-99 з Na^+, K^+ -АТРазою. По-друге, атоми вуглецю у метилфосфонатних груп калікс[4]арену С-426 мають вищу ступінь окислення та знаходяться у *sp*²-гібридизованому стані, порівняно з *sp*³-гібридизацією аналогічних атомів калікс[4]арену С-99. Відповідно атоми кетометилфосфонатної групи знаходяться у одній площині з фенольним залишком макроциклу та жорстко закріплені на ньому, в той час як зв'язки атому вуглецю гідроксиметилфосфонові кислоти мають тетраедричну будову та здатні до обертання. Тобто метилфосфонові замісники калікс[4]арену С-99 є конформаційно рухливими, що дозволяє їм краще “прилаштовуватися” до взаємодії з ензимом. Вірогідно, що більш жорстка “конформація” залишків кетофосфонові кислоти калікс[4]арену С-426 не здатна до ефективної взаємодії з Na^+, K^+ -АТРазою.

Калікс[4]арени С-425 і С-427, що були використані у концентрації 100 мкМ, виявили подібну дію на активність Na^+, K^+ -АТРази: спостерігається пригнічення активності на $76,7 \pm 0,3$ % та $74,5 \pm 0,5$ %

відповідно відносно контролю (рис. 5.14). Поряд з цим калікс[4]арен С-425 зовсім не впливає на питому ензиматичну активність “базальної” Mg^{2+} -АТРази, а калікс[4]арен С-427 пригнічує її на $11,70 \pm 0,66 \%$. Приймаючи до уваги значну інгібіторну дію калікс[4]аренів С-425 і С-427 на натрієву помпу, ми дослідили концентраційну залежність їх впливу на ензиматичну активність. Було показано, що калікс[4]арени С-425 та С-427, які використовували в інтервалі концентрацій від 10^{-8} до 10^{-4} М, ефективно та дозозалежно гальмують активність Na^+, K^+ -АТРази (рис. 5.15). Величини уявних констант інгібування $I_{0,5}$ для цих калікс[4]аренів становлять $1,20 \pm 0,10$ та $2,80 \pm 0,18$ мкМ відповідно (таб. 5.3). Значення коефіцієнта Хілла (n_H) для калікс[4]аренів С-425 та С-427 практично однакові: $0,36 \pm 0,01$ і $0,38 \pm 0,01$ відповідно.

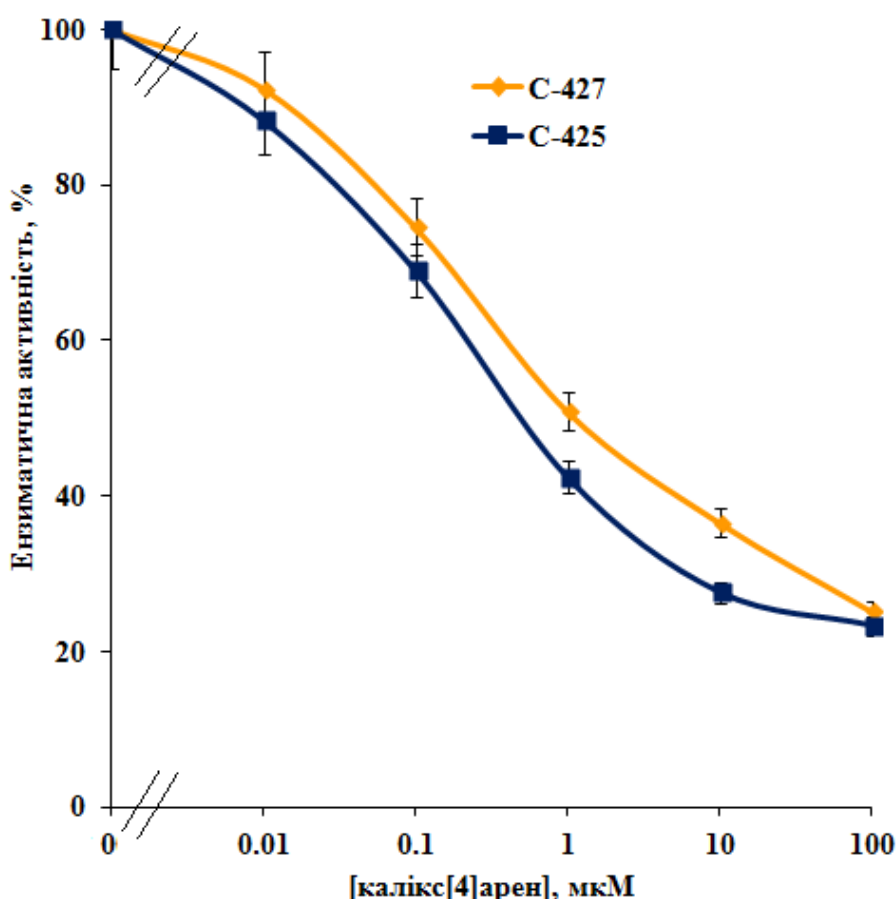


Рис. 5.15. Концентраційна залежність впливу калікс[4]аренів С-425 та С-427 на активність Na^+, K^+ -АТРази у фракції плазматичних мембран клітин міометрія ($M \pm m$; $n = 5$)

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

Калікс[4]арен С-425 має 4 фосфонатні залишки на верхньому вінці макроциклу, проте його ефективність інгібування менша від калікс[4]арену С-99 ($I_{0,5} = 98 \pm 8$ нМ), який має два фосфонатні залишки. Очевидно, що для ефективного інгібування Na^+, K^+ -АТРазної активності необхідна взаємодія з ензимом саме двох фосфонатних груп. Крім цього калікс[4]арен С-425 має більший негативний заряд, що можливо створює електростатичні перешкоди для його ефективної взаємодії з Na^+, K^+ -АТРазою. Калікс[4]арен С-427 має три фосфонатні залишки, але його ефективність інгібування Na^+, K^+ -АТРази ще нижча, ніж у випадку калікс[4]арену С-425. Один з замісників калікс[4]арену С-427 аналогічний до замісників калікс[4]арену С-426, який практично не інгібує ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази, тобто можна припустити, що дана кетометилфосфонатна група не бере участі у інгібувальній взаємодії з ензимом. Вірогідно, що саме друга гідроксиметилбісфосфонатна група калікс[4]арену С-427 взаємодіє з відповідними амінокислотними залишками на поверхні ензиму та відповідно саме така взаємодія зумовлює інгібування Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани. Синтезування та перевірка інгібіторних властивостей калікс[4]арену, який би містив одну гідроксиметилбісфосфонатну групу на верхньому вінці макроциклу, дозволить нам в майбутньому перевірити вказане припущення. Даний гіпотетичний калікс[4]арен буде також подібним до калікс[4]арену С-97, який має одну метиленбісфосфонатну групу на верхньому вінці макроциклу та є дуже ефективним інгібітором Na^+, K^+ -АТРази ($I_{0,5} = 33 \pm 4$ нМ). Тому не виключено, що вказаний гіпотетичний калікс[4]арен буде мати також високу ефективність інгібування.

Отже, порівнюючи вплив досліджених калікс[4]аренів, які є структурно подібними, на Na^+, K^+ -АТРази активність плазматичної мембрани міоцитів матки, ми можемо визначати, які хімічні групи калікс[4]аренів зумовлюють їхні інгібіторні властивості щодо вказаного ензиму. Крім того такий аналіз дозволяє нам припускати структуру нових гіпотетичних калікс[4]аренів, що будуть здатні інгібувати Na^+, K^+ -АТРази. Тобто, дані цієї роботи можуть слугувати підґрунтям для подальшої розробки, на основі досліджуваних калікс[4]аренів, ефективних інгібіторів Na^+, K^+ -АТРази.

Втім, по суті ми можемо розглядати транспортну Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани як Mg^{2+} , АТФ-залежний електрогенний $3\text{Na}^+ - 2\text{K}^+$ -антипортер; відповідно, ензиматична та транспортна активність такого мембранозв'язаного електроензиму повинна втрачатися, якщо одночасно з активним електрогенним контртранспортом Na^+ та K^+ буде мати місце незалежний від нього симпорт додаткового аніону (наприклад, Cl^-) з катіонами Na , чи незалежний від зазначеного контртранспорту антипорт додаткового носія позитивного заряду (наприклад, протону H^+). Іншими словами, втручання в баланс носіїв електричного заряду, який контролюється електроензимом, повинно, скоріше за все, приводити до гальмування його функціонування.

І тут важливо відзначити, що у експериментах, виконаних на пласких ліпідних мембранах, нами у співпраці з д.б.н. О.Я. Шатурським було доведено, що інгібітор натрієвої помпи калікс[4]арен С-99 дійсно здатний вбудовуватися в пласку мембрану та формувати в ній струмопровідну, щодо аніонів Cl , структуру [16].

Аналіз кінетичних та енергетичних (енергія активації $E_a = 7.20 \pm 0.96$ ккал/мол) характеристик зазначеного аніонного транспорту свідчить на користь того, що мова може йти за полегшену трансмембранну дифузію Cl^- через штучну пласку мембрану.

Отже, високоафінний інгібітор транспортної Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани калікс[4]арен С-99, вбудований у штучну пласку мембрану, здатний формувати Cl^- -провідні структури, які забезпечують полегшену дифузію зазначеного аніону.

5.5. ОСОБЛИВОСТІ ДІЇ КАЛІКС[4]АРЕНУ С-97 НА АКТИВНІСТЬ Na^+, K^+ -АТРази ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ ГЛАДЕНЬКОМ`ЯЗОВИХ КЛІТИН

5.5.1. Дія калікс[4]арену С-97 на концентраційну залежність активності Na^+, K^+ -АТРази від іонів Mg

Реагентами в Na^+, K^+ -залежній АТР-гідролазній реакції, що каталізується Na^+, K^+ -АТРазою, є не лише іони Na та K, але й, іони Mg та нуклеозидтрифосфат АТР. Дійсно, у цій реакції Mg^{2+} діє як кофактор, який зв`язується з регуляторним центром Na^+, K^+ -АТРази [13, 17]. Окрім того, Mg^{2+} утворює з ATP^{4-} хелатний комплекс MgATP^{2-} , який слугує істинним субстратом в реакції фосфорилювання ензимного протеїну [18]. І, нарешті, у високих концентраціях (десятки мМ) магній проявляє інгібуючий вплив на Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани [13].

Нами було показано, що каталітична активність Na^+, K^+ -АТРази зростає по мірі збільшення концентрації іонів Mg від 0,01 до 5 мМ за умов фіксованих концентрацій АТР (1 мМ) в інкубаційному середовищі. Значення оптимальної концентрації Mg^{2+} для Na^+, K^+ -АТРази складає 1 мМ, (рис. 5.16, крива контроль). Значення константи активації по Mg^{2+} K_{Mg}^{2+} для Na^+, K^+ -АТРази становить 430 ± 22 мкМ ($M \pm m$; $n = 6$). При подальшому рості концентрації іонів Mg ми спостерігаємо вихід графіку на плато.

При внесенні до середовища інкубації калікс[4]арену С-97 (10 нМ) спостерігається зниження ензиматичної активності Na^+, K^+ -АТРази

приблизно у 2 рази (рис. 5.16, крива С-97). Як видно з графіка, калікс[4]арен С-97 не модифікує характер залежності активності Na^+, K^+ -АТРази від концентрації іонів Mg (0,01 – 5 мМ, концентрація АТФ - 1 мМ). Наші розрахунки свідчать, що калікс[4]арен С-97 не призводить до вірогідної зміни величин константи активації за іонами Mg K_{Mg}^{2+} (430 ± 22 та 413 ± 19 мкМ в контролі та у присутності калікс[4]арену С-97 відповідно; $M \pm m$; $n = 6$).

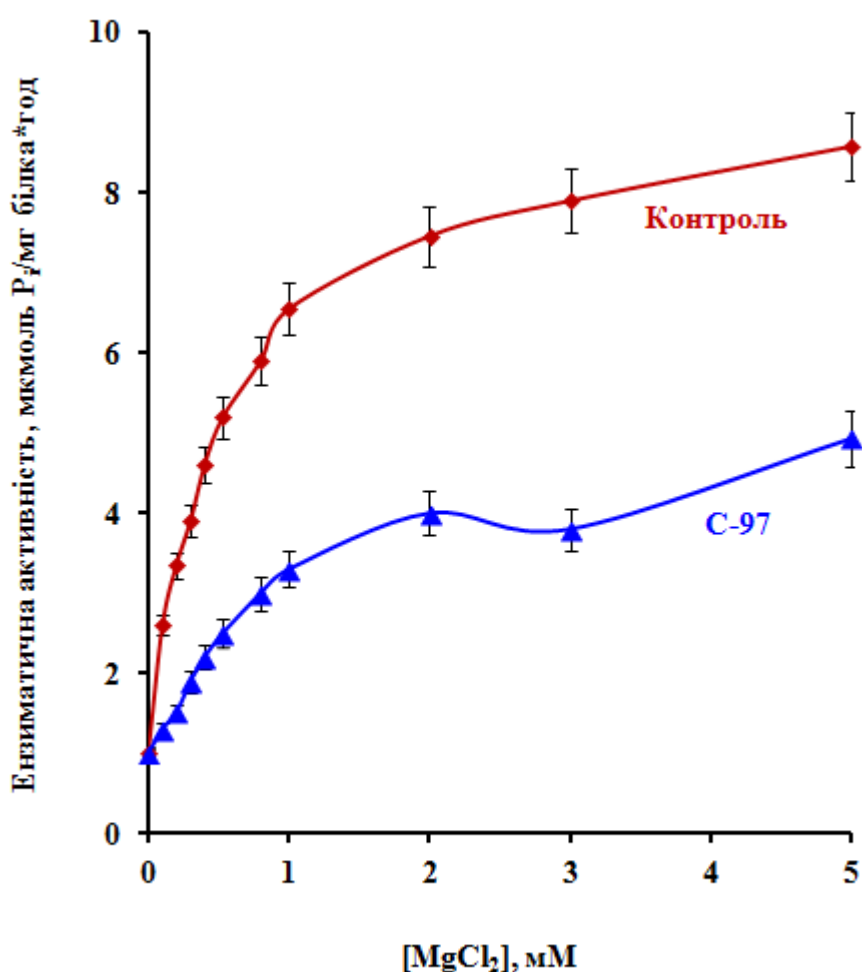


Рис. 5.16. Каталітичне титрування іонами Mg (концентрація АТФ - 1 мМ) Na^+, K^+ -АТРази у фракції плазматичних мембран клітин міометрія у відсутності (контроль) та у присутності калікс[4]арену С-97 (10 нМ) ($M \pm m$; $n = 6$)

Таким чином, є підстави вважати, що інгібуючий ефект калікс[4]арену C-97 на Na^+, K^+ -АТРазу плазматичної мембрани не може бути пов'язаний із зменшенням, під дією цієї речовини, спорідненості ензиму до іонів Mg.

5.5.2. Дія калікс[4]арену C-97 на концентраційну залежність активності Na^+, K^+ -АТРази від АТР

Для подальшої кінетичної інтерпретації впливу калікс[4]арену C-97 на ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани міометрія ми дослідили його дію на характер концентраційної залежності даної активності від АТР.

Підвищення концентрації АТР в середовищі інкубації в діапазоні від 0,01 до 1 мМ призводило до зростання ензиматичної активності Na^+, K^+ -АТРази (рис. 5.17, контроль) за умов фіксованої концентрації MgCl_2 (3 мМ) в інкубаційному середовищі. При подальшому зростанні концентрації АТР до 5 мМ спостерігається пригнічення даної активності. Значення оптимальної концентрації АТР складає 0,5 - 1 мМ. Методом Ейзенталя-Корніш-Бодена були розраховані уявна константа Міхаеліса K_m по нуклеозидтрифосфату АТР та коефіцієнт Хілла n_H , які становлять 115 ± 12 мкМ та $1,4 \pm 0,2$ відповідно ($M \pm m$; $n = 7$).

Отримане нами значення K_m за АТР Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани в принципі корелює з даними літератури. Дійсно, величина K_m за АТР по Na^+, K^+ -АТРазі для сольових залоз качки – 70 мкМ, для мозку пацюків – 260 мкМ [19].

У дослідях із каталітичного титрування Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани АТР (концентрація Mg^{2+} - 3 мМ) (рис. 5.17, C-97) було знайдено, що калікс[4]арен C-97 (10 нМ) гальмує ензиматичну активність в середньому у 2 рази, проте це, як з'ясувалось, не призводить до вірогідної зміни величин константи Міхаеліса за АТР K_m (115 ± 12 та 127 ± 16 мкМ в контролі та у присутності калікс[4]арену відповідно; $M \pm m$; $n=7$) (величини K_m розраховували методом Ейзенталя-Корніш-Бодена [20]).

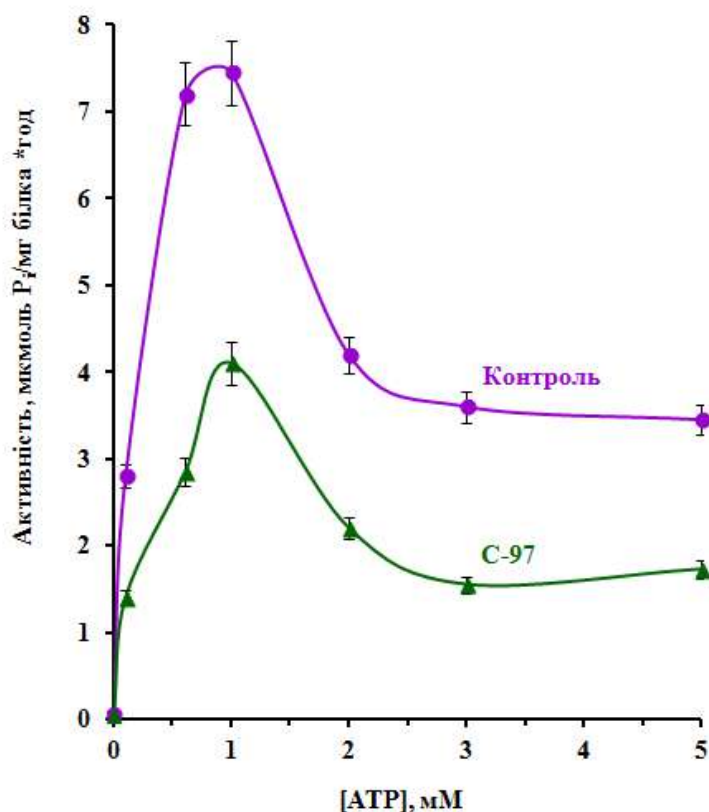


Рис. 5.17. Каталітичне титрування АТФ (концентрація Mg^{2+} - 3 мМ мМ) Na^+,K^+ -АТРази у фракції плазматичних мембран клітин міометрія у відсутності (контроль) та у присутності калікс[4]арену C-97 (10 нМ) ($M \pm m$; $n = 7$)

Таким чином, можна зробити висновок, що пригнічувальний ефект калікс[4]арену C-97 на Na^+,K^+ -АТРази плазматичної мембрани не може бути пов'язаний із зменшенням, під дією цієї речовини, спорідненості ензиму до АТФ.

5.5.3. Дія калікс[4]арену C-97 на концентраційну залежність активності Na^+,K^+ -АТРази від співвідношень концентрацій $[Na^+]/[K^+]$

Графік залежності ензиматичної активності Na^+,K^+ -АТРази плазматичної мембрани від співвідношень концентрацій $[Na^+]/[K^+]$ (за

умов сталої сумарної концентрації одновалентних катіонів $[Na^+] + [K^+] = 150 \text{ mM}$) має типовий куполоподібний вигляд (ліва та права гілки – “натрієва” та “калієва” відповідно); при відсутності ж в середовищі інкубації іонів Na^+ чи K^+ ензиматична активність Na^+,K^+ -АТРази не тестується взагалі (рис. 5.18, контроль), що є властивим для даного ензиму [14, 21].

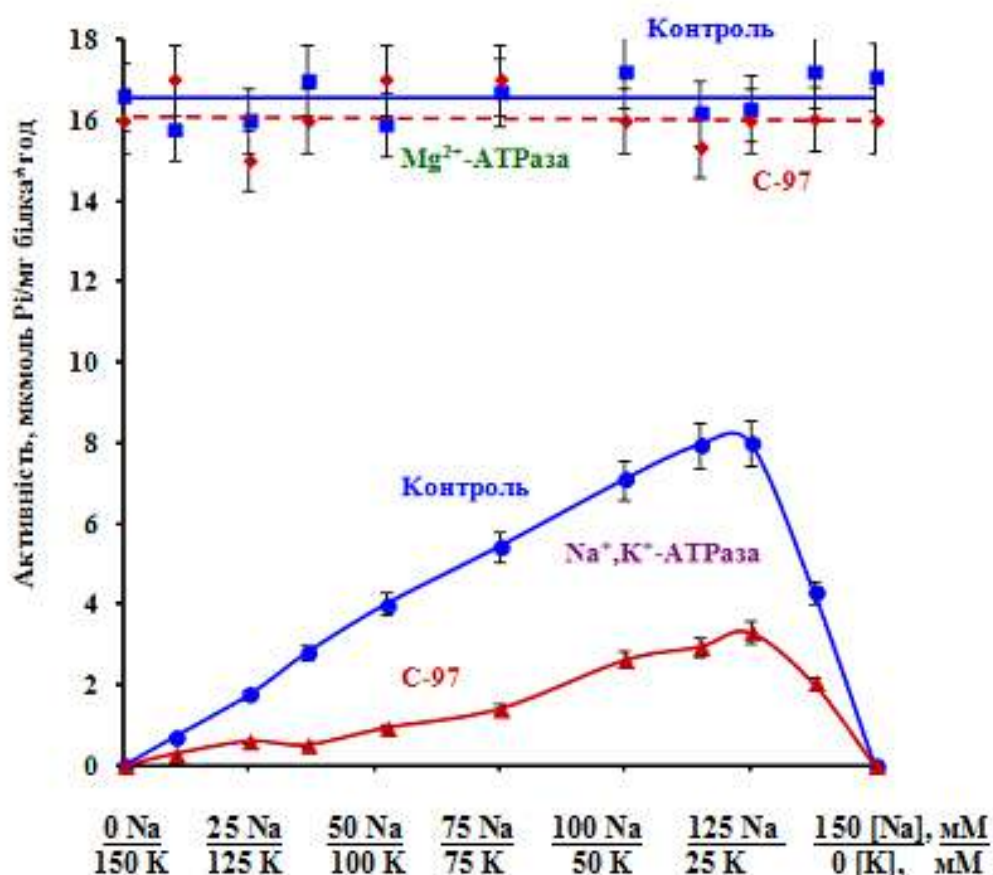


Рис. 5.18. Вплив калікс[4]арену C-97 (10 нМ) на залежність питомої активності Na^+,K^+ -АТРази та Mg^{2+} -АТРази у фракції плазматичних мембран клітин міометрія від співвідношення $[Na^+]/[K^+]$ ($M \pm m$; $n = 6$)
Досліди проводились за умови збереження ізотонічності середовища інкубації: $[Na^+] + [K^+] = 150 \text{ mM}$

Отже, за цих умов оптимальним співвідношенням концентрацій $[Na^+]/[K^+]$ для функціонування Na^+,K^+ -АТРази є 115-125 mM NaCl і 35-25 mM KCl. Значення константи активації K_{Na^+} для іонів Na для убаїнчутливої Na^+,K^+ -АТРази становить $50 \pm 4 \text{ mM}$ (“натрієва гілка”

контрольного графіка на рис. 5.18) ($M \pm m$; $n=6$). Значення константи активації K_K^+ для іонів K становить 136 ± 12 мМ (“калієва гілка” контрольного графіка на рис. 5.18) ($M \pm m$; $n=6$). На відміну від Na^+, K^+ -АТРази величина питомої Mg^{2+} -залежної АТР-гідролазної ензиматичної активності взагалі не змінюється в залежності від зміни співвідношення $[Na^+]/[K^+]$ за умов сталої іонної сили ($[Na^+] + [K^+] = 150$ мМ) (рис. 5.18).

Було знайдено, що калікс[4]арен С-97, внесений у середовище інкубації в концентрації 10 нМ, зменшував ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази, не порушуючи характер її куполоподібної залежності від співвідношення $[Na^+]/[K^+]$ за ізотонічних умов, та практично не впливав на активність Mg^{2+} -АТРази. У той же час цей калікс[4]арен (10 нМ) за ізотонічних умов вірогідно збільшував величину константи активації K_{Na}^+ іонами Na убаїнчутливої Na^+, K^+ -АТРази: від 50 ± 4 мМ (контроль) до 76 ± 6 мМ (у присутності калікс[4]арену С-97) ($p < 0,05$; $M \pm m$; $n=6$). При цьому не спостерігалось змін у спорідненості зазначеного ензиму до іонів K – величина константи активації для цих іонів K_K^+ становила 136 ± 12 мМ (контроль) та 140 ± 15 мМ (у присутності калікс[4]арену С-97) ($M \pm m$; $n=6$).

Таким чином, можна припустити, що одна із причин інгібіторної дії калікс[4]арену С-97 на Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани може бути пов'язана із зменшенням, під дією цієї речовини, спорідненості ензиму до іонів Na (рис. 5.18).

5.5.4. Дія калікс[4]арену С-97 на концентраційну залежність активності Na^+, K^+ -АТРази від убаїну

Як показали результати експериментів, калікс[4]арен С-97, внесений у середовище інкубації в концентрації 10 нМ, призводить до гальмування активності Na^+, K^+ -АТРази стосовно контролю ($12,0 \pm 1,3$ та $6,1 \pm 0,8$ мкмоль Р/год на 1 мг протеїну у контролі та при дії зазначеної

речовини відповідно; $M \pm m$; $n=6$), але одночасно збільшує спорідненість ензиму до серцевого глікозиду: дійсно, величини уявної константи інгібування $I_{0,5}$ становлять $21,5 \pm 1,5$ мкМ та $5,3 \pm 0,7$ мкМ у контролі та при дії калікс[4]арену C-97 відповідно (рис. 5.19, табл. 5.4).

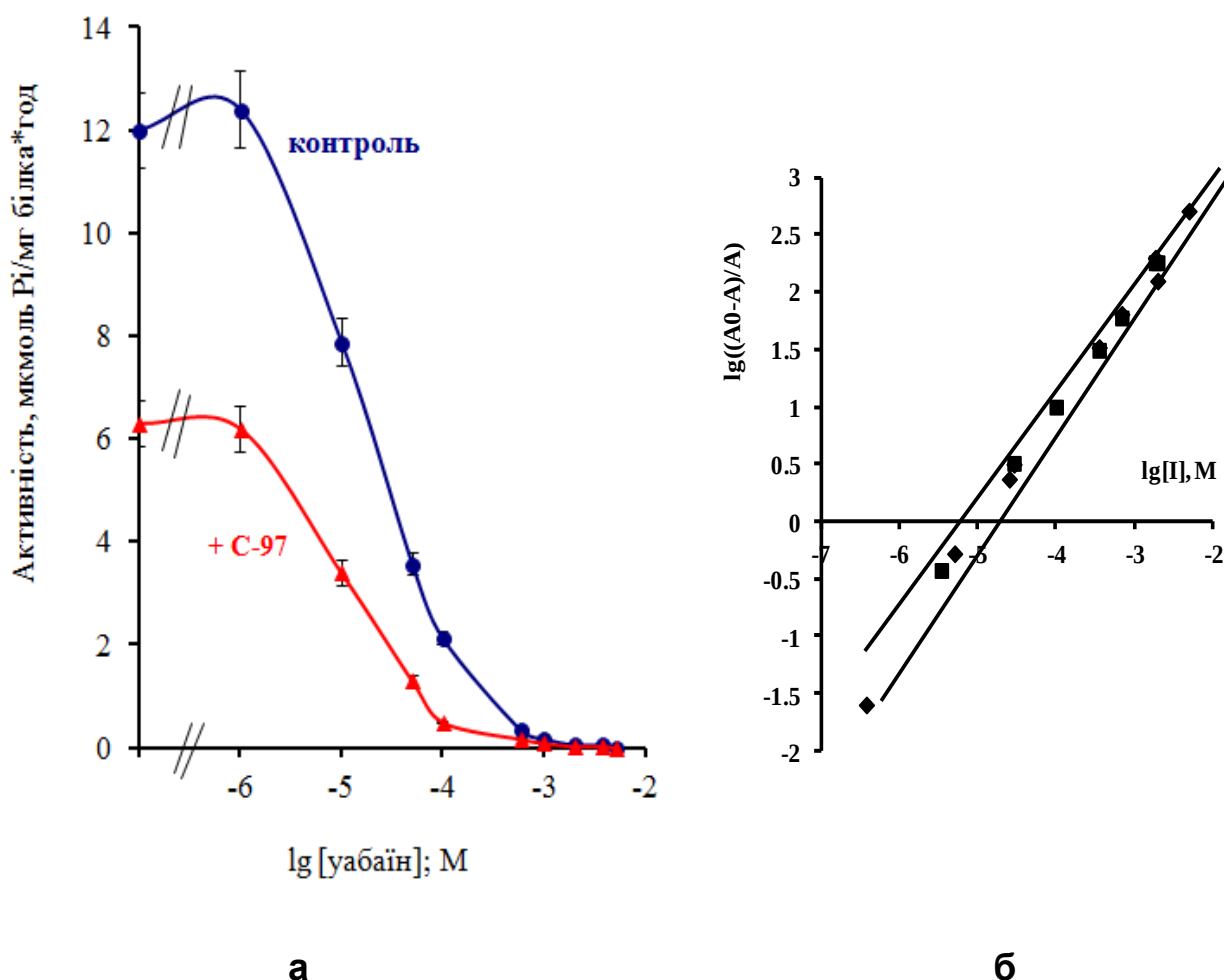


Рис. 5.19. Вплив калікс[4]арену C-97 (10 нМ) на залежність питомої ензиматичної активності Na^+, K^+ -АТРази у фракції плазматичних мембран клітин міометрія від концентрації уабаїну ($M \pm m$; $n = 6$)

За 100 % (контроль) прийнято значення питомої ензиматичної активності у відсутності уабаїну у середовищі інкубації. Лінеаризацію кривих здійснювали згідно з емпіричним рівнянням Хілла $\lg[(A_0 - A)/A] = -n_H \lg I_{0,5} + n_H \lg [I]$, де A_0 та A – питомі ензиматичні активності у відсутності („нульова точка”) та в присутності в середовищі інкубації калікс[4]арену в концентрації 10 нМ, $I_{0,5}$ та n_H - уявні константа інгібування та коефіцієнт Хілла відповідно. Типові значення коефіцієнту кореляції r становили 0,98-0,99

Що ж стосується коефіцієнту Хілла n_H , то відповідні значення цього параметру були: $0,54 \pm 0,07$ та $0,45 \pm 0,05$ у контролі та при дії калікс[4]арену С-97 відповідно (негативна кооперативність) (рис. 5.19, табл. 5.4) (у цих дослідях величини $I_{0,5}$ та n_H розраховували із використанням лінеаризованих графіків Хілла відповідно до рівняння Хілла $\lg[(A_0-A)/A] = -n_H \lg I_{0,5} + n_H \lg[I]$, де A_0 та A – питомі ензиматичні активності у відсутності („нульова точка”) та в присутності в середовищі інкубації калікс[4]арену в концентрації 10 нМ.

Таблиця 5.4.

Кінетичні характеристики дії калікс[4]арену С-97 на концентраційну залежність інгібіторної дії убаїну на ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани клітин міометрія ($M \pm m$; $n = 6$).

Умови досліджу	Уявна константа інгібування, $I_{0,5}$	Коефіцієнт Хілла, n_H	Концентрація убаїну, при якій спостерігається повне інгібування ензиматичної активності
Контроль	21 ± 5 мкМ	0.54 ± 0.07	1 мМ
Контроль +С-97 (10 нМ)	5.3 ± 0.7 мкМ	0.45 ± 0.05	~0.1 мМ

Отже, можна стверджувати, що калікс[4]арен С-97 збільшує спорідненість убаїну до Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани клітин міометрія, не впливаючи на характер кооперативності інгібуючої дії серцевого глікозиду на цей ензим. Логічно, припускати, що виявлене явище збільшення афінітету убаїну до Na^+, K^+ -АТРази

опосередковується впливом калікс[4]арену C-97 на взаємодію „уабайн – уабайновий рецептор”, що призводить до її полегшення.

5.6. ОСОБЛИВОСТІ ДІЇ КАЛІКС[4]АРЕНУ C-107 НА АКТИВНІСТЬ Na^+, K^+ -АТРАЗИ ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ ГЛАДЕНЬКОМ`ЯЗОВИХ КЛІТИН

5.6.1. Дія калікс[4]арену C-107 на концентраційну залежність активності Na^+, K^+ -АТРАЗИ плазматичної мембрани від уабайну

Ми дослідили вплив калікс[4]арену C-107 у різних концентраціях (відповідно 10, 25, 50, 75 та 100 нМ) на залежність активності Na^+, K^+ -АТРАЗИ плазматичної мембрани від концентрації уабайну (рис. 5.20).

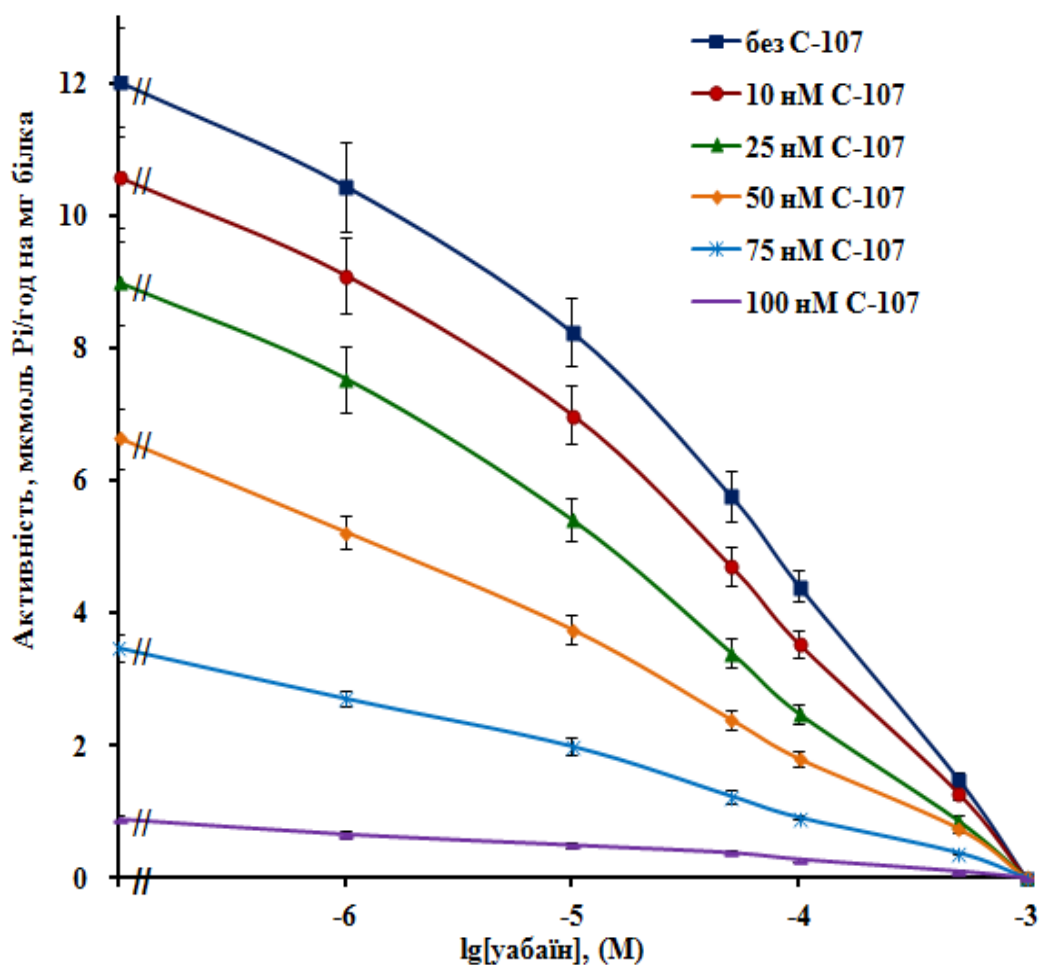


Рис. 5.20. Вплив калікс[4]арену С-107 у різних концентраціях на залежність ензиматичної активності Na^+, K^+ -АТРази у фракції плазматичних мембран клітин міометрія від концентрації убаїну ($M \pm m$; $n = 5$)

Спостерігається зниження активності Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани у всіх випадках з різним ступенем ефективності. Знайдено, що при зростанні концентрації калікс[4]арену С-107 відбувається зниження ефективності інгібування ($I_{0,5}$) Na^+, K^+ -АТРази убаїном (рис. 5.21).

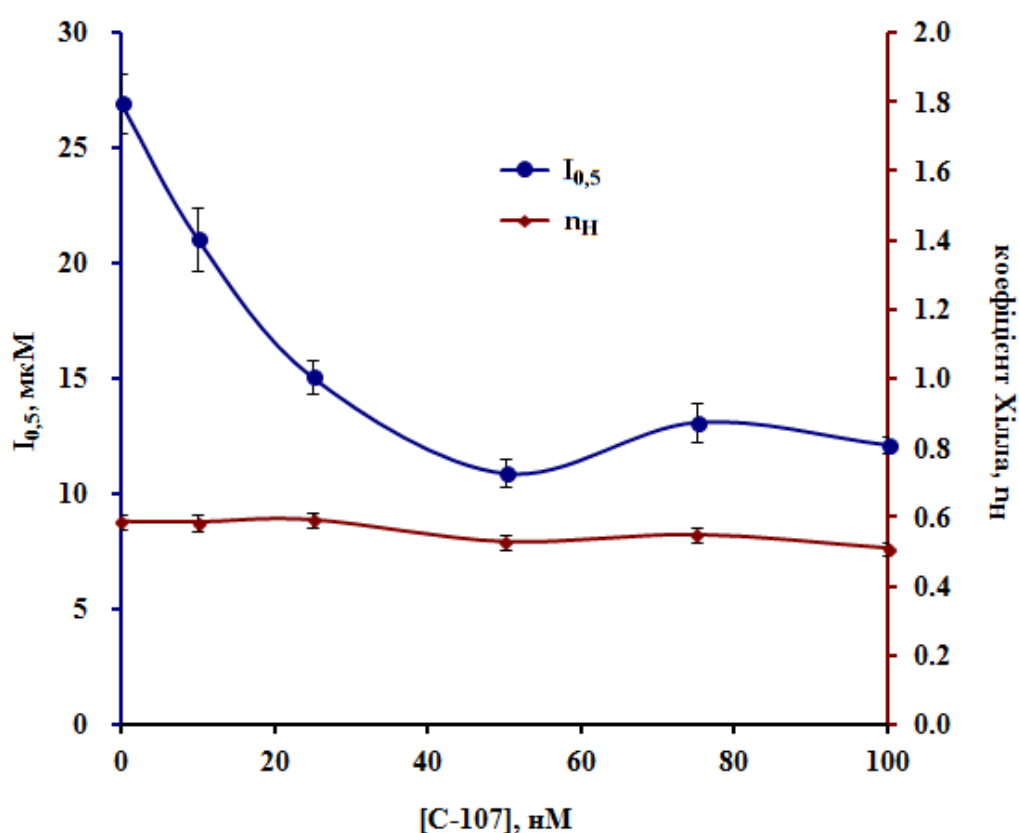


Рис. 5.21. Вплив калікс[4]арену С-107 на кінетичні параметри (константу гальмування $I_{0,5}$ і коефіцієнт Хілла n_H) дії убаїну на активність Na^+, K^+ -АТРази у фракції плазматичних мембран клітин міометрія ($M \pm m$; $n = 5$)

Отже, калікс[4]арен С-107, призводячи до гальмування активності Na^+, K^+ -АТРази стосовно контролю, збільшує спорідненість

ензиму до серцевого глікозиду. Значення коефіцієнту Хілла при цьому не змінюється ($n_H \simeq 0,5$). Таким чином кооперативність інгібувальної дії убаїну не залежить від наявності калікс[4]арену C-107, залишаючись від'ємною ($n_H < 1$) в діапазоні концентрацій калікс[4]арену до 10-100 нМ.

На відміну від цього, використання різних концентрацій убаїну (рис. 5.22) не впливає на константу гальмування $I_{0,5}$ і коефіцієнт Хілла n_H для калікс[4]арену C-107.

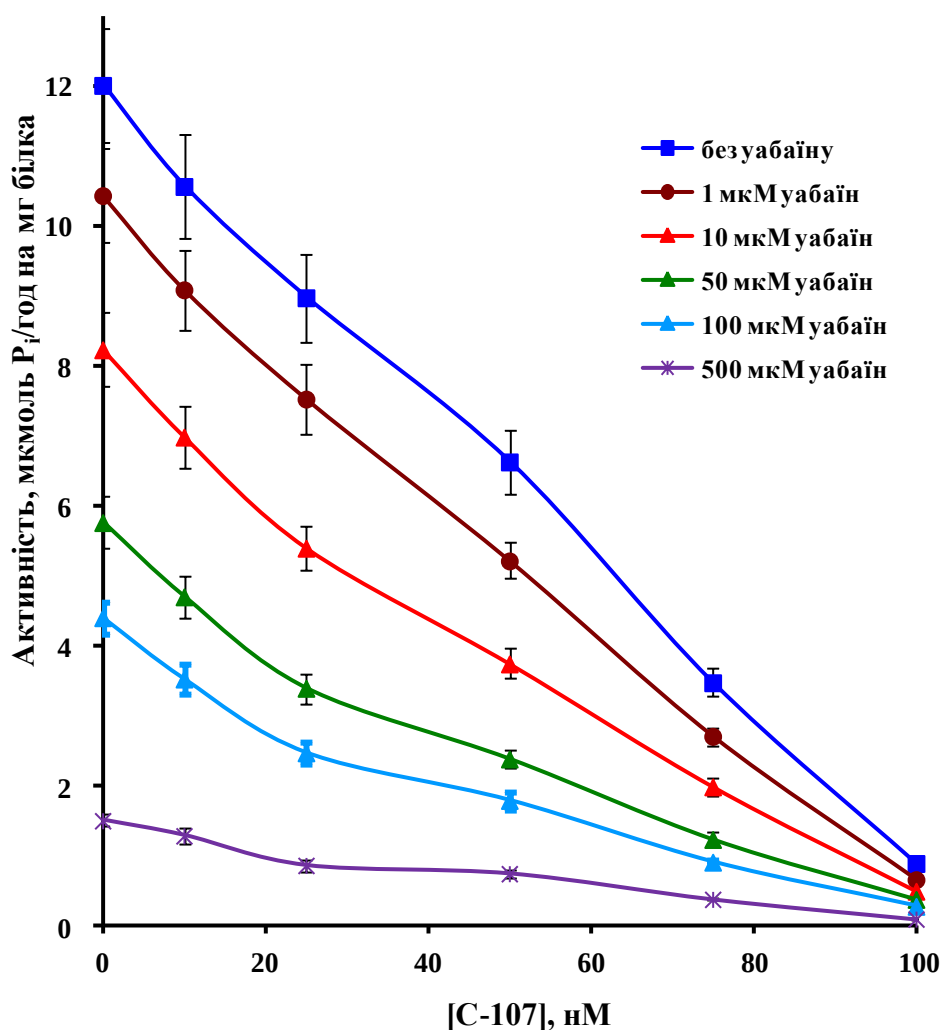


Рис. 5.22. Вплив убаїну у різних концентраціях на залежність питомої ензиматичної активності Na^+, K^+ -АТРази у фракції плазматичних мембран клітин міометрія від концентрації калікс[4]арену C-107 ($M \pm m$; $n = 5$)

Значення коефіцієнту Хілла $n_H = 1,4-1,8$, що відповідає позитивній кооперативності ензиматичної реакції по калікс[4]арену С-107 (рис. 5.23). Різниця у значеннях коефіцієнтів кооперативності дії калікс[4]арену С-107 та убаїну вказує на різні механізми інгібування Na^+, K^+ -АТРази даними речовинами.

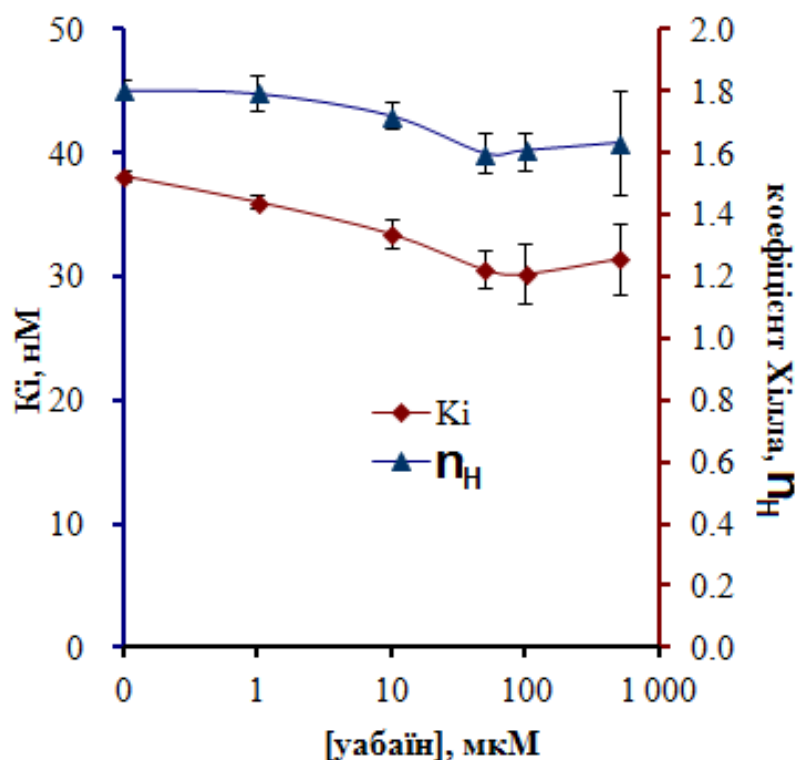


Рис. 5.23. Вплив убаїну на кінетичні параметри (константу гальмування K_i і коефіцієнт Хілла n_H) дії калікс[4]арену С-107 на активність Na^+, K^+ -АТРази у фракції плазматичних мембран клітин міометрія ($M \pm m$; $n = 5$)

Отже, можна стверджувати, що у присутності калікс[4]арену С-107 збільшується спорідненість Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани клітин міометрія до убаїну, при цьому не змінюється величина коефіцієнту Хілла інгібуючої дії серцевого глікозиду на цей ензим. Проте, кооперативність дії калікс[4]арену С-107 на активність Na^+, K^+ -АТРази є позитивною ($n_H = 1,4-1,8$). Таким чином можна припустити, що збільшення афінітету убаїну до Na^+, K^+ -АТРази

викликане підсилюючим впливом калікс[4]арену C-107 на взаємодію “уабіаін – уабіаїновий рецептор”.

5.6.2. Дія калікс[4]арену C-107 на концентраційну залежність активності Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани від АТР

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

Підвищення концентрації АТР в середовищі інкубації в діапазоні від 0,01 до 1 мМ призводило до підвищення ензиматичної активності Na^+, K^+ -АТРази (рис. 5.24, без C-107) за умов фіксованої концентрації MgCl_2 (3 мМ) в інкубаційному середовищі.

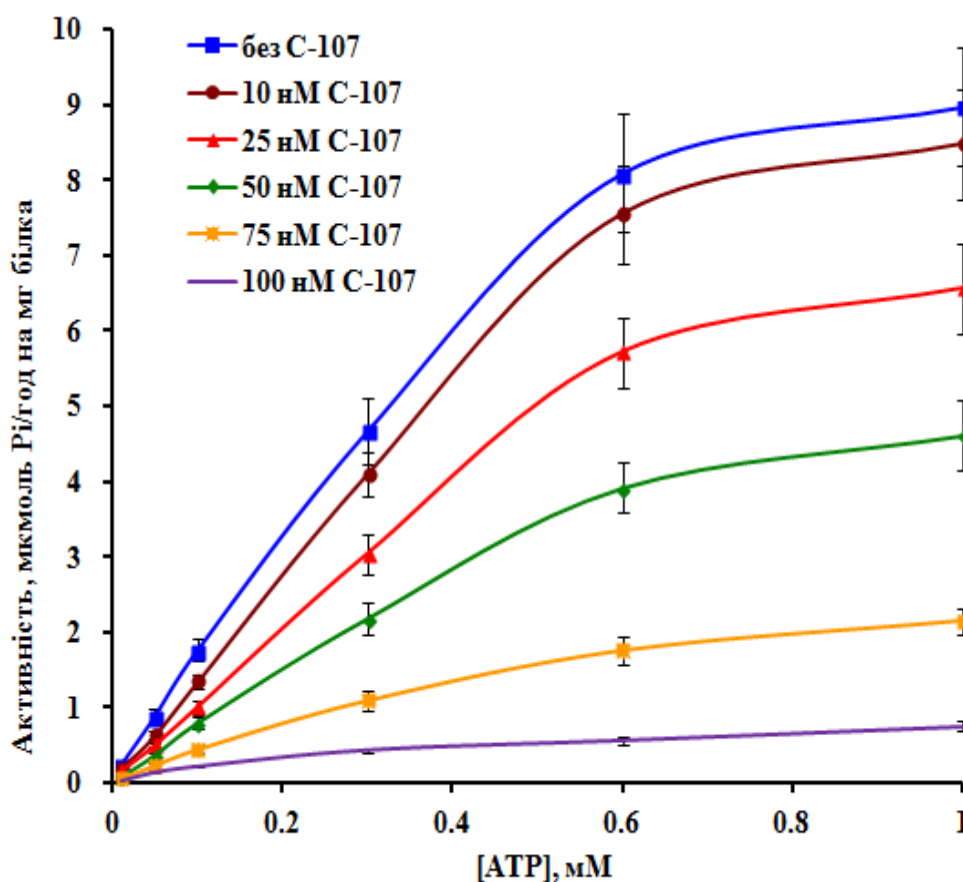


Рис. 5.24. Вплив калікс[4]арену C-107 у різних концентраціях на залежність питомої ензиматичної активності Na^+, K^+ -АТРази у фракції плазматичних мембран клітин міометрія від концентрації АТФ ($M \pm m$; $n = 5$). Концентрація MgCl_2 – 3 мМ

Методом Хілла були розраховані уявна константа Міхаеліса K_m по нуклеозидтрифосфату АТФ та коефіцієнт Хілла n_H , які становлять $204,6 \pm 11,1$ мкМ та $1,38 \pm 0,15$ відповідно ($M \pm m$; $n = 5$) (рис. 5.25). Отримане нами значення K_m за АТФ для Na^+, K^+ -АТРази корелює з даними літератури. Величина K_m реакції гідролізу АТФ у нервовій тканині паціюків складає 260 мкМ [22].

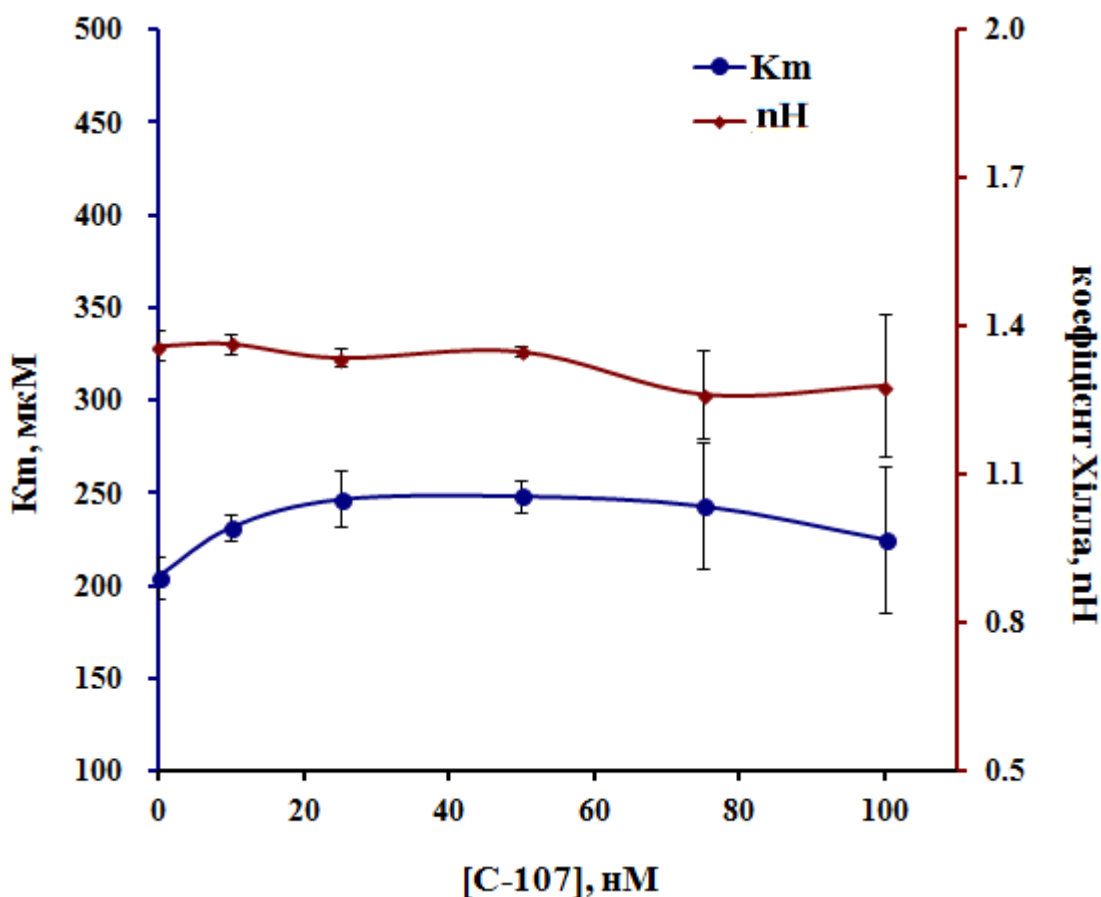


Рис. 5.25. Вплив калікс[4]арену C-107 на кінетичні параметри (константу Міхаеліса K_m і коефіцієнт Хілла n_H) дії АТФ на активність Na^+, K^+ -АТРази у фракції плазматичних мембран клітин міометрія ($M \pm m$; $n = 5$)
Концентрація [C-107] = 0 мМ – контроль. Концентрація MgCl_2 – 3 мМ.

Нами вивчався вплив калікс[4]арену C-107 на кінетичні параметри, що характеризують спорідненість ензиму до АТР. Було досліджено вплив 5-ти концентрацій калікс[4]арену C-107 (відповідно 10, 25, 50, 75 та 100 нМ) на концентраційну залежність від АТР. В усіх випадках спостерігається зниження з різним ступенем ефективності активності Na^+, K^+ -АТРазиди плазматичної мембрани, при цьому залежність ензиматичної активності від АТР виявляє характер, подібний до відповідної контрольної залежності без калікс[4]арену C-107, але платовий рівень активності зі зростанням концентрації калікс[4]арену знижується (рис. 5.25). Розраховані середні значення уявної константи Міхаеліса K_m та коефіцієнти Хілла n_H за присутності різних концентрацій калікс[4]арену C-107 вірогідно не відрізняються від контрольних значень даних кінетичних параметрів у відсутності ефектору в середовищі інкубації (рис. 5.25). Величина коефіцієнту Хілла n_H вказує на позитивний кооперативний ефект залежності ензиматичної активності Na^+, K^+ -АТРазиди плазматичної мембрани від концентрації АТР, який майже не змінюється за присутності калікс[4]арену C-107 у різних концентраціях (рис. 5.25).

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

Нами також були розраховані кінетичні параметри дії калікс[4]арену C-107 за присутності різних концентрацій субстрату АТРазної реакції. Показано, що використання різних концентрацій АТР (рис. 5.26) слабо впливає на константу гальмування K_i калікс[4]ареном C-107; поряд з цим з графіку видно, що зростання концентрації АТР

приводить до збільшення коефіцієнту Хілла n_H з $1,38 \pm 0,15$ до $2,18 \pm 0,11$ інгібувальної дії калікс[4]арену C-107 (рис. 5.27).

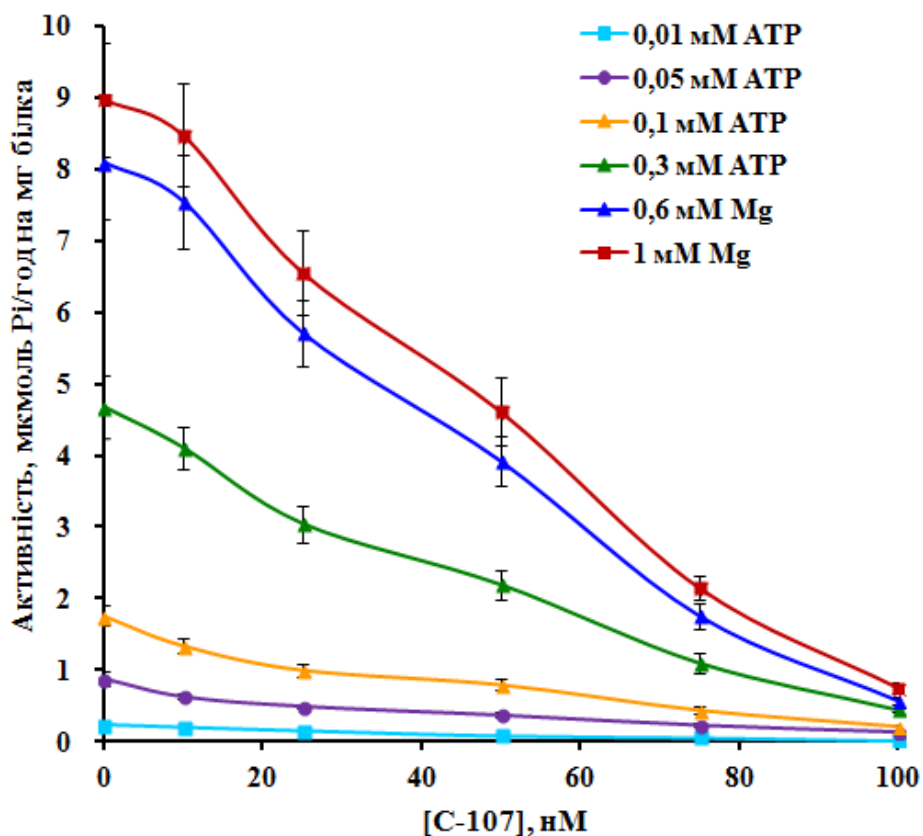


Рис. 5.26. Вплив АТФ у різних концентраціях на залежність питомої ензиматичної активності Na^+, K^+ -АТРази у фракції плазматичних мембран клітин міометрія від концентрації калікс[4]арену C-107 ($M \pm m$; $n = 5$). Концентрація MgCl_2 – 3 мМ

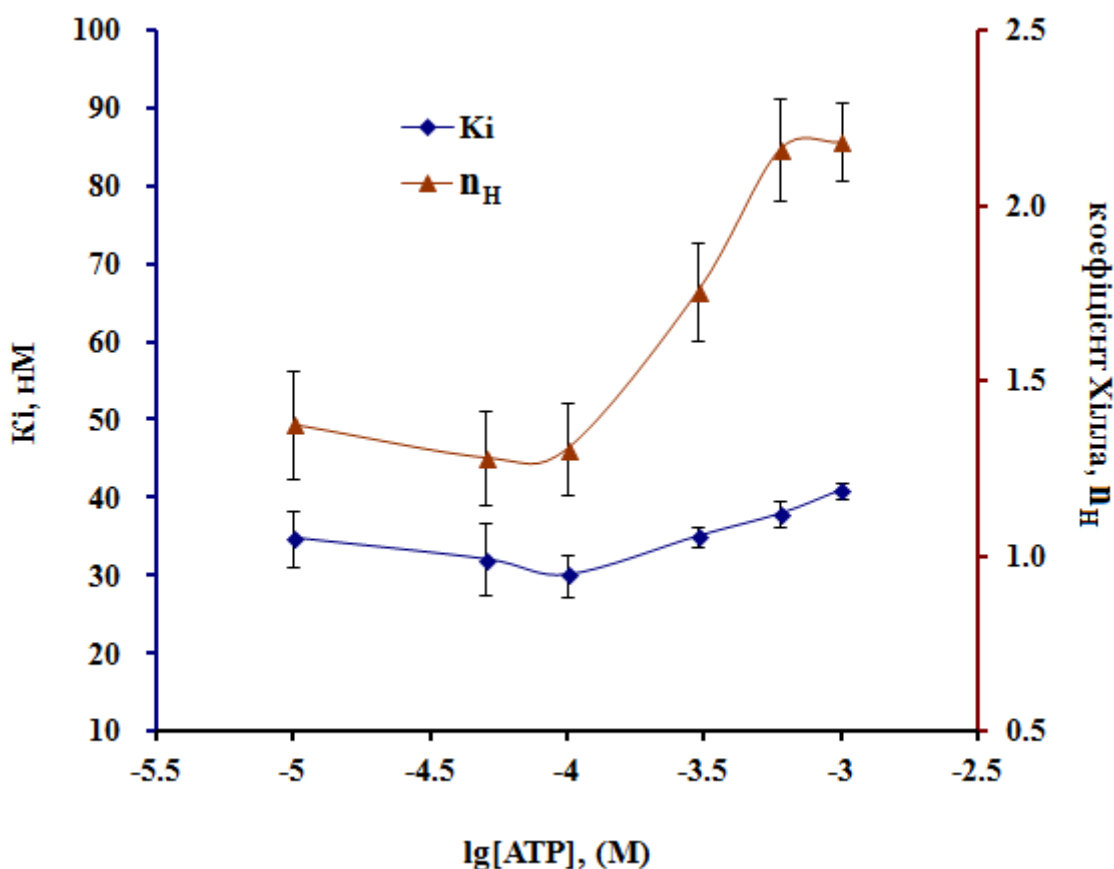


Рис. 5.27. Вплив АТР на кінетичні параметри (константу гальмування K_i і коефіцієнт Хілла n_H) дії калікс[4]арену С-107 на активність Na^+, K^+ -АТРазу у фракції плазматичних мембран клітин міометрія ($M \pm m$; $n = 5$). Концентрація MgCl_2 – 3 мМ

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

5.6.3. Дія калікс[4]арену C-107 на концентраційну залежність активності Na^+, K^+ -АТРazi плазматичної мембрани від іонів Mg

Відомо, що значення Mg^{2+} для метаболізму пояснюється його властивостями як промотора структури макромолекул, субстратзв'язуючого іона і переносника електронів. Відомий цілий ряд Mg^{2+} -залежних ензимів, де роль Mg^{2+} не обмежується активацією субстрату, а пов'язана із формуванням активного (каталітичного) центрів. Проте найбільш широко відома роль Mg^{2+} в утворенні хелатного комплексу з АТР – субстратом аденозинтрифосфатазних реакцій. Вважають, що іони Mg^{2+} вступають у взаємодію із фосфатними зарядженими групами АТР, поляризують їх і підвищують реакційну здатність системи, полегшуючи нуклеофільну атаку на термінальний фосфат АТР [19].

Ензиматична активність Na^+, K^+ -АТРazi плазматичної мембрани міометрія зростає по мірі збільшення концентрації MgCl_2 від 0,01 до 3 мМ за умов фіксованих концентрацій АТР (1 мМ) в інкубаційному середовищі (рис. 5.29, контроль). Значення уявної константи активації Na^+, K^+ -АТРazi K_{Mg} становить $173 \pm 4,5$ мкМ, величина коефіцієнта Хілла $n_H - 0,99 \pm 0,03$ ($M \pm m$; $n = 5$) (рис. 5.28, контроль) ($M \pm m$; $n = 5$). Необхідно відмітити, що концентрація вільних іонів Mg^{2+} в середовищі інкубації може суттєво відрізнятися та не лінійно залежати від концентрації MgCl_2 , тому представлені кінетичні параметри були розраховані саме для MgCl_2 , а не для Mg^{2+} .

Ми дослідили вплив калікс[4]арену C-107 на кінетичні параметри дії MgCl_2 . Було вивчено концентраційну залежність від MgCl_2 за присутності калікс[4]арену C-107 в різних концентраціях (рис. 5.28).

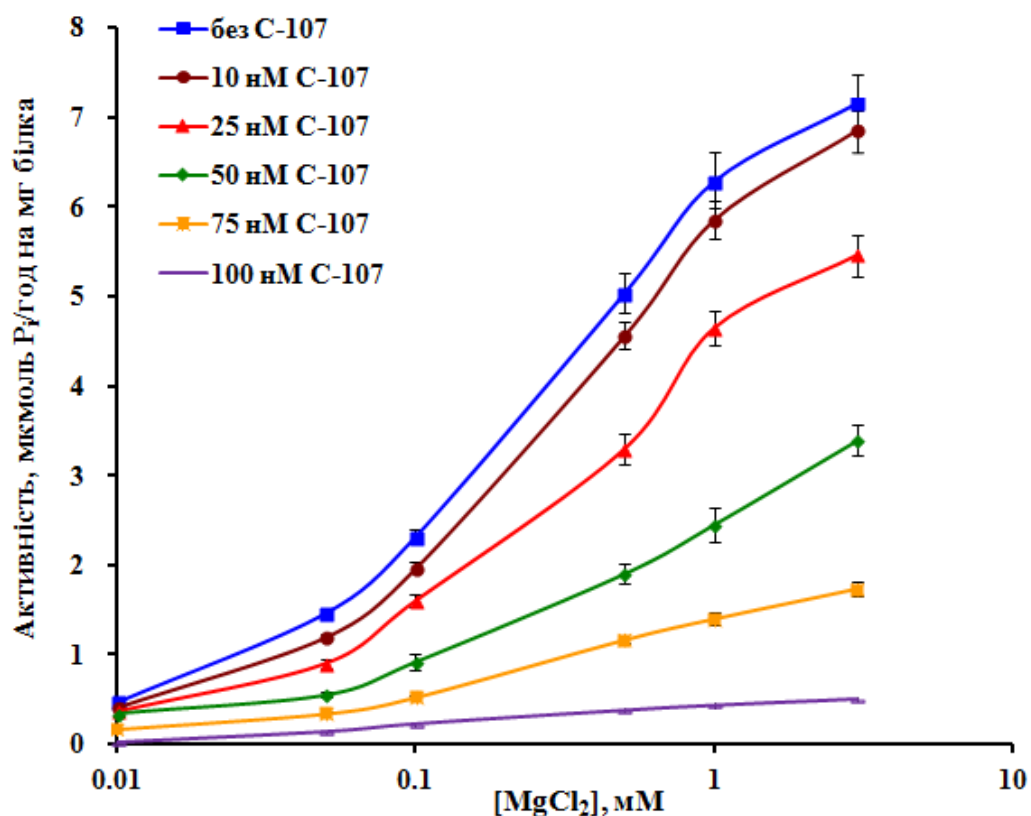


Рис. 5.28. Вплив калікс[4]арену C-107 у різних концентраціях на залежність питомої ензиматичної активності Na^+, K^+ -АТРази у фракції плазматичних мембран клітин міометрія від концентрації MgCl_2 ($M \pm m$; $n = 5$). Концентрація АТФ – 1 мМ

В усіх випадках у разі внесення до середовища інкубації калікс[4]арену C-107 спостерігається зниження активності Na^+, K^+ -АТРази з різним ступенем ефективності.

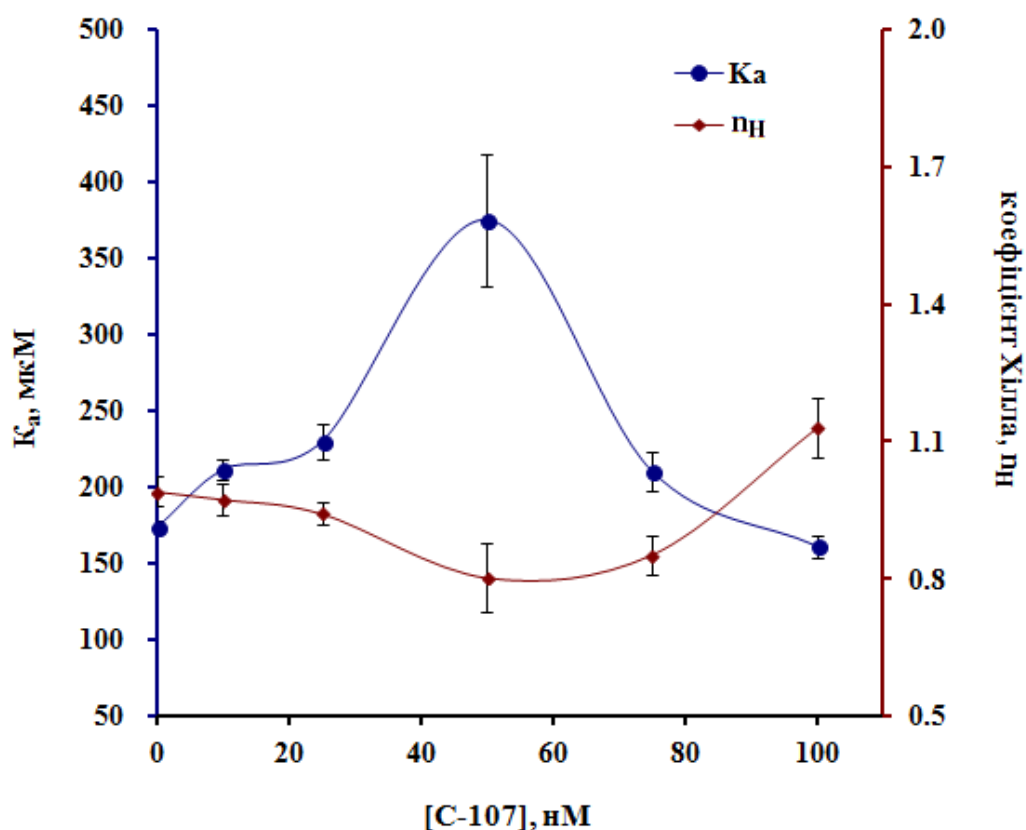


Рис. 5.29. Вплив калікс[4]арену С-107 на кінетичні параметри (константу активації K_a і коефіцієнт Хілла n_H) дії $MgCl_2$ на активність Na^+, K^+ -АТРази у фракції плазматичних мембран клітин міометрія ($M \pm m$; $n = 5$).

Концентрація [C-107] = 0 мМ – контроль. Концентрація АТФ – 1 мМ.

Продемонстровано, що залежність константи активації іонами Mg від концентрації калікс[4]арену С-107 має складний двофазний характер та її значення підвищується до 375 ± 43 мкМ із ростом концентрації калікс[4]арену С-107 до 50 нМ, при подальшому збільшені концентрації калікс[4]арену – K_{Mg} знижується до майже контрольного рівня (при концентрації калікс[4]арену С-107 100 нМ) (рис. 5.29) ($M \pm m$; $n = 5$). При цьому величина коефіцієнту Хілла n_H практично не змінюється за присутності калікс[4]арену С-107 у різних концентраціях ($n_H = 0,99 \pm 0,032 - 1,13 \pm 0,065$) ($M \pm m$; $n = 5$).

На відміну від цього, використання різних концентрацій MgCl_2 (рис. 5.30) суттєво не впливає на константу гальмування ензиматичної активності K_i калікс[4]ареном C-107.

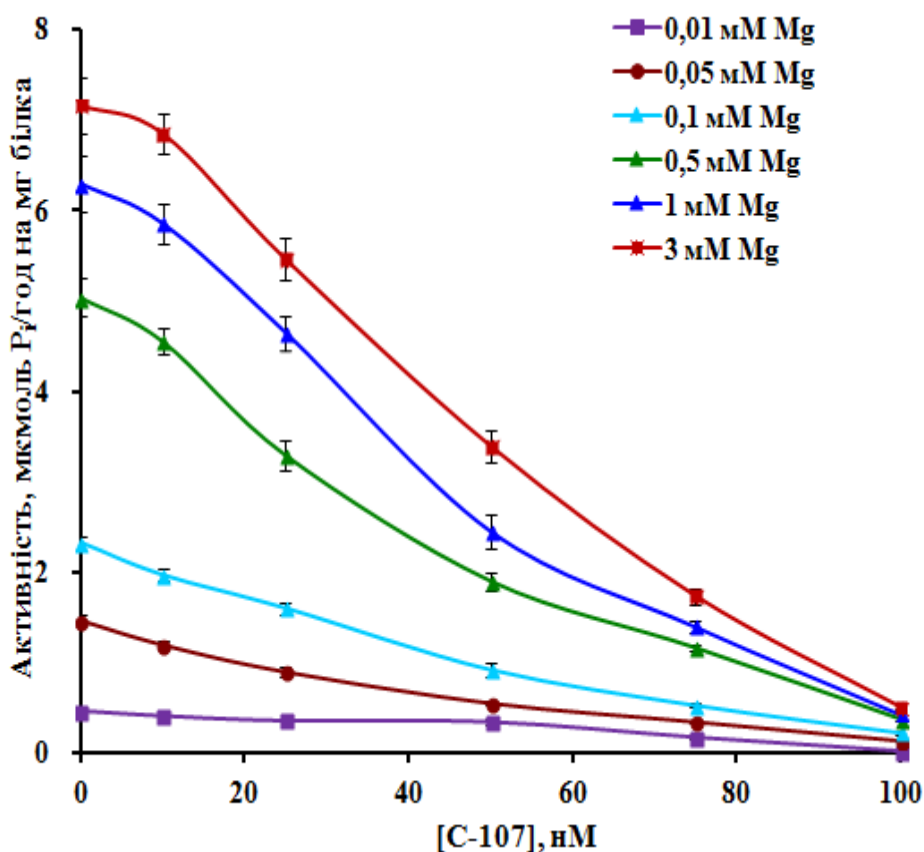


Рис. 5.30. Вплив MgCl_2 у різних концентраціях на залежність питомої ензиматичної активності Na^+, K^+ -АТРази у фракції плазматичних мембран клітин міометрія від концентрації калікс[4]арену C-107 ($M \pm m$; $n = 5$). Концентрація АТФ – 1 мМ

Значення коефіцієнту Хілла зростає з $1,55 \pm 0,04$ до $2,39 \pm 0,21$, що вказує на зростання позитивної кооперативності дії калікс[4]арену C-107 на ензим (рис. 5.31) ($M \pm m$; $n = 5$). Тобто в даному випадку зростання концентрації MgCl_2 можливо змінює субодиничний склад Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани.

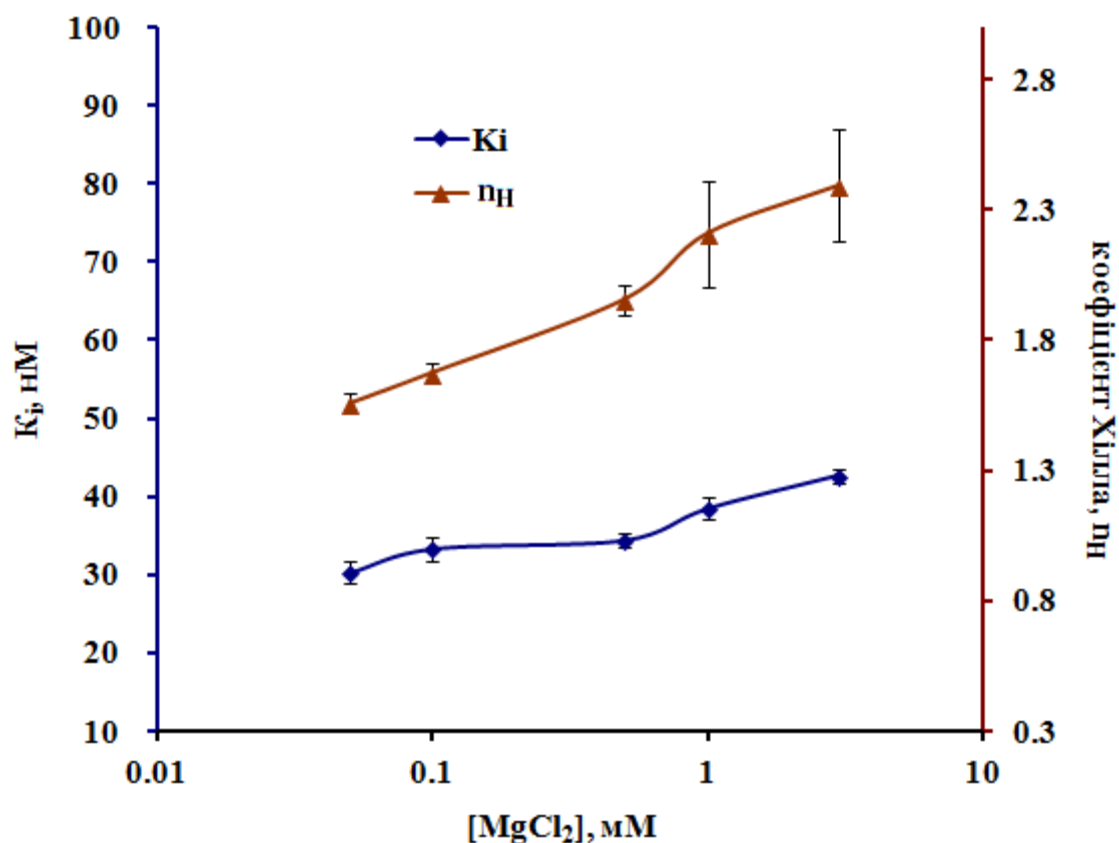


Рис. 5.31. Вплив різних концентрацій MgCl_2 на кінетичні параметри (константу гальмування K_i і коефіцієнт Хілла n_H) дії калікс[4]арену С-107 на активність Na^+, K^+ -АТРазу у фракції плазматичних мембран клітин міометрія ($M \pm m$; $n = 5$). Концентрація АТР – 1 мМ

Отже, встановлені взаємні залежності кінетичних характеристик дії калікс[4]арену С-107 та MgCl_2 вказують на складні механізми взаємодії цих речовин з ензимом у досліджуваній модельній системі. Дійсно, іони Mg можуть утворювати хелатні комплекси як з ензимом та АТР, так і з присутньою в середовищі інкубації ЕГТА та і з самим калікс[4]ареном С-107. Тому закономірності дії MgCl_2 на ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРазу є сумарним результатом суперпозиції окремих вказаних взаємодій іонів Mg з АТР, ЕГТА, ензимом, іншими компонентами середовища інкубації та калікс[4]ареном С-107.

5.7. КАЛІКС[4]АРЕНИ C-97 ТА C-107 ПІДСИЛЮЮТЬ ІНГІБУВАЛЬНУ ДІЮ УАБАЇНУ НА АКТИВНІСТЬ Na^+, K^+ -АТРАЗИ ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ

Зважаючи на те, що калікс[4]арени C-97 та C-107 з високою ефективністю інгібували ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРАЗи у фракції плазматичних мембран, при цьому практично не впливали на активність Mg^{2+} -АТРАЗи, а також беручи до уваги той факт, що у їх присутності збільшується спорідненість Na^+, K^+ -АТРАЗи до уабаїну, нам було цікаво з'ясувати як змінюється її активність за умов сукупної дії калікс[4]аренів та уабаїну.

Як показали результати експериментів, калікс[4]арени C-97 та C-107, які були використані у концентраціях, що відповідали значенням $I_{0.5}$ (40 та 60 нМ відповідно), суттєво підсилювали гальмівну дію уабаїна на питому активність Na^+, K^+ -АТРАЗи у фракції плазматичних мембран клітин міометрія. Дійсно, як виявилось, 10 мкМ уабаїн пригнічував активність Na^+, K^+ -АТРАЗи в середньому на 49 %, а калікс[4]арени C-97 та C-107 – на 47 та 49 % відповідно. У той же час у присутності 40 нМ C-97 та 60 нМ C-107 пригнічувальний ефект 10 мкМ уабаїну суттєво підвищувався і становив у середньому 82 та 78 % відповідно; натомість 100 мкМ C-97 та 100 мкМ C-107 повністю пригнічували активність Na^+, K^+ -АТРАЗи у відсутності уабаїну (рис. 5.32).

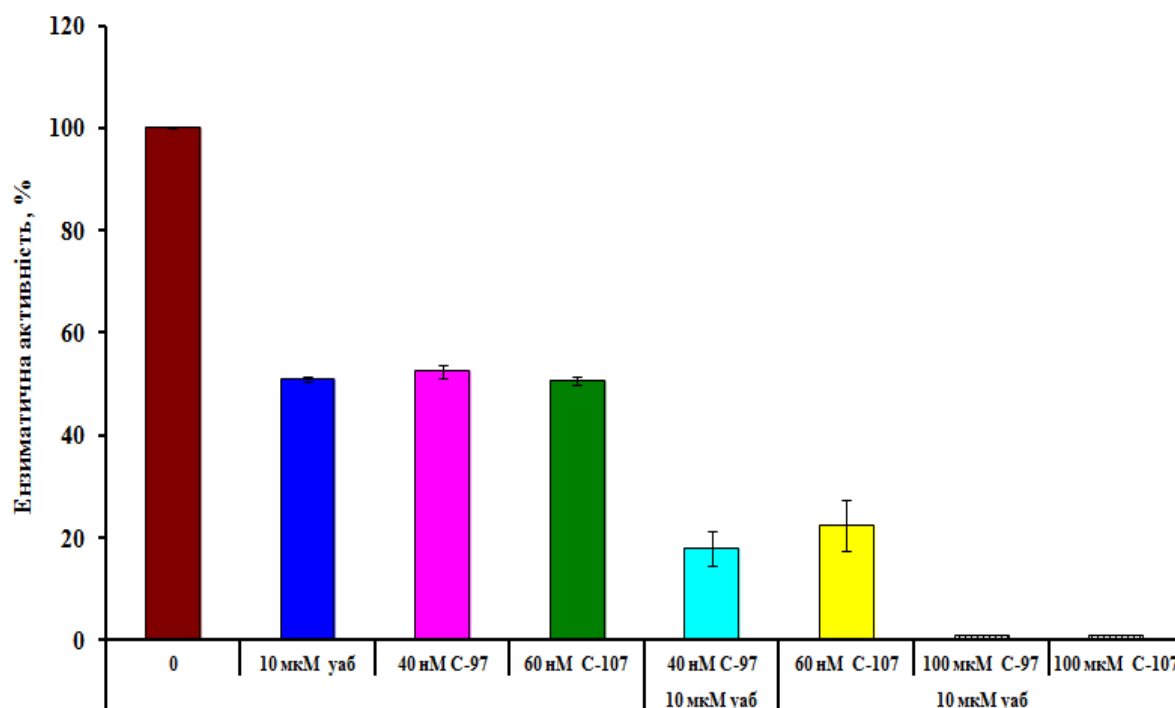


Рис. 5.32. Стимуляція калікс[4]аренами С-97 та С-107 інгібувальної дії убаїну на активність Na^+, K^+ -АТРази у фракції плазматичних мембран клітин міометрія ($M \pm m$; $n = 6$)

За 100 % (контроль) прийнято значення питомої ензиматичної активності у відсутності убаїну та калікс[4]аренів у середовище інкубації. Значення концентрацій калікс[4]аренів С-97 та С-107 були обрані такими, що відповідали відповідним величинам $I_{0,5}$

Ці дані вказують також на наступне: за умов сукупного використання убаїну з калікс[4]ареном С-97 чи С-107 має місце наочний неадитивний ефект у дії цих інгібіторів на Na^+, K^+ -АТРазну активність. Дійсно, якщо кожний з них за зазначених концентраційних режимів гальмує АТРазну активність приблизно на 50 %, то за умов парного використання убаїну з будь-яким із калікс[4]аренів тестується залишкова Na^+, K^+ -АТРазна активність, що становить приблизно 20 % від контрольної величини. Отже, дані, що були одержані, свідчить за те, що калікс[4]арени С-97 і С-107 не лише самі по собі гальмують ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази, але й є також активаторами

інгібіторного ефекту глікозиду на цей ензим (рис. 5.32).

Отже, ми показали що, вискоефективні інгібітори Na^+, K^+ -АТРазної активності калікс[4]арени С-97 чи С-107 здатні підсилювати ефект класичного інгібітора натрієвої помпи убаїну, збільшуючи її спорідненість до серцевого глікозиду.

5.8. ПОРІВНЯЛЬНА ДІЯ КАЛІКС[4]АРЕНІВ С-97, С-99 ТА С-107 НА АКТИВНІСТЬ Na^+, K^+ -АТРАзи У ПЛАЗМАТИЧНІЙ МЕМБРАНІ СКОРОТЛИВИХ (МІОМЕТРИЙ) ТА РУХЛИВИХ (СПЕРМАТОЗОЇДИ) КЛІТИН

Відомо, що Na^+, K^+ -АТРАзі належить важлива роль у забезпеченні функціональної активності скоротливих та рухливих клітин репродуктивної системи, зокрема міоцитів матки та сперматозоїдів [23, 24, 25, 26, 27, 28]. Так, енергія натрієвого градієнту, який створюється Na^+, K^+ -АТРазою, використовується для функціонування $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмінника, локалізованого в плазматичній мембрані клітин міометрія та сперматозоїдів [14, 25, 29, 30]. У структурі Na^+, K^+ -АТРАзи сперматозоїдів ідентифіковано унікальну $\alpha 4$ субодиницю, інгібування експресії якої призводить до пригнічення їхньої рухливості [26]. Втім, Na^+, K^+ -АТРаза сперматозоїдів відіграє ключову роль не лише у забезпеченні їх рухливості [26], але й здатності до запліднення [27]; Na^+, K^+ -АТРазна активність позитивно корелює з густиною сперми (концентрацією сперматозоїдів в 1 мл еякуляту) [28]. Пригнічення активності Na^+, K^+ -АТРАзи призводить до астенozoоспермії (зменшення рухливості сперматозоїдів), олігозооспермії (зниження густини сперми до рівня менше 60 млн/мл) і навіть азооспермії (відсутності сперматозоїдів в еякуляті). Отже, активність Na^+, K^+ -АТРАзи може бути важливим діагностичним показником функціонального стану клітин, що досліджувалися (гладеньких м'язів матки та сперматозоїдів).

Зважаючи на отримані нами дані стосовно ефективнішого ніж убаїн пригнічення активності ензиматичної Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани клітин гладеньких м'язів матки каліксаренами С-97, С-99 та С-107, нам було цікаво провести порівняльне вивчення впливу зазначених каліксаренів на Na^+, K^+ -АТРазну активність у плазматичних мембран скоротливих (міометрій) та рухливих (сперматозоїди) клітин. У цих дослідженнях приймала участь к.б.н. Н.С. Кочешкова.

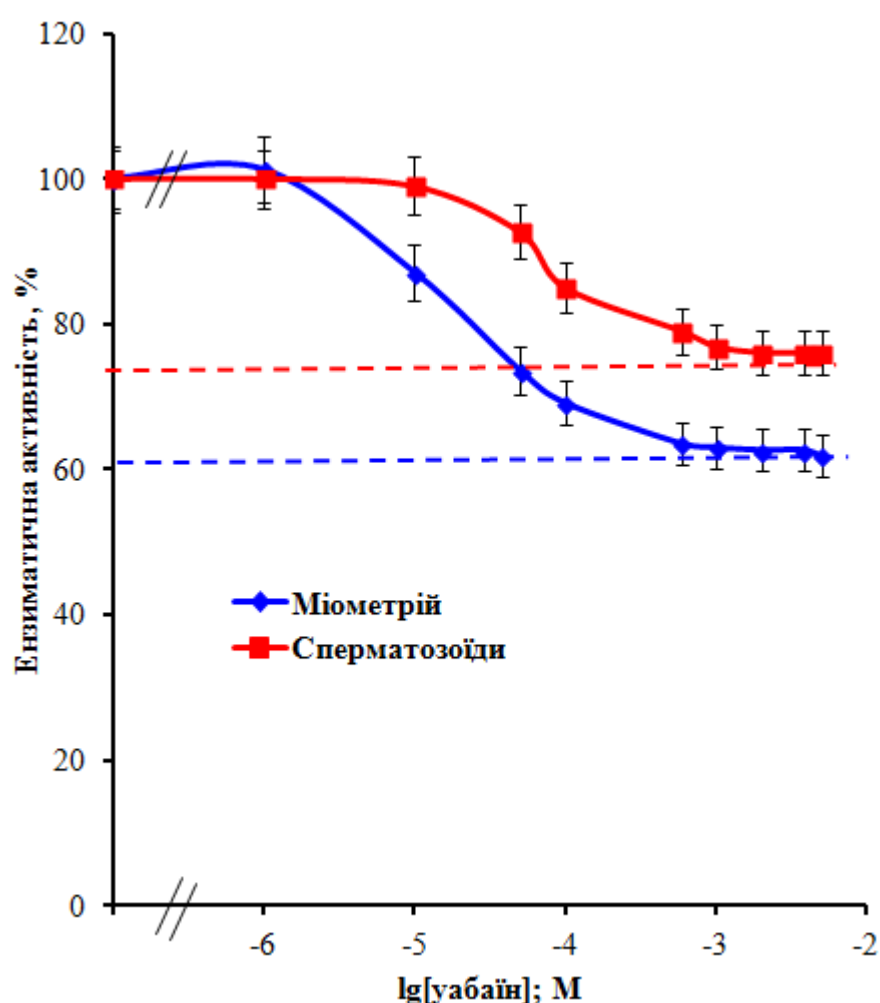


Рис. 5.33. Концентраційні залежності впливу убаїну на $\text{Mg}^{2+}, \text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРазну (“загальну”) активність у суспензії плазматичних мембран клітин міометрія та сперматозоїдів ($\text{M} \pm \text{m}$; $n = 7$)
В обох випадках за 100 % прийнято значення питомої ензиматичної активності за відсутності убаїну у середовищі інкубації („нульова

точка", контроль), а пунктиром вказано рівень „базальної” (уабаїн-нечутливої) питомої Mg^{2+} -АТРазної активності

Як добре відомо, кардіоактивні стероїди уабаїн, строфантидин та інші є практично абсолютними селективними інгібіторами Na^+, K^+ -АТРази. Кардіоглікозиди зв'язуються з протеїном з позаклітинного зовнішнього боку плазматичної мембрани клітини. Фосфорилування ензиму і перехід в конформацію $P-E_2$ полегшує зв'язування глікозидів. Вважають, що стероїди блокують ензим в стані $P-E_2$ і, таким чином, гальмують перехід на рівні конформерів $E_2 \rightarrow E_1$ [11, 12, 13].

Як можна бачити (рис. 5.33), уабаїн в діапазоні концентрацій 10^{-6} – $5 \cdot 10^{-3}$ М ефективно пригнічує так звану “загальну” Mg^{2+}, Na^+, K^+ -АТРазну активність у фракції плазматичних мембран міометрія: при концентрації уабаїну $5 \cdot 10^{-4}$ – $5 \cdot 10^{-3}$ М ця активність зменшується до 63 % відносно контролю (за нього приймається так звана „нульова точка”, яка тестується у відсутності інгібітору та характеризується значенням ензиматичної активності $478,3 \pm 23,3$ нмоль P_i /хв на 1 мг протеїну ($M \pm m$; $n=7$)). Таким чином, абсолютне значення уабаїнчутливої Na^+, K^+ -АТРазної активності у плазматичних мембран гладеньком'язових клітин становить $176,7 \pm 15,0$ нмоль P_i /хв на 1 мг протеїну ($M \pm m$; $n=7$). „Залишок” ензиматичної активності, нечутливої до дії уабаїну (60 % відносно контролю), свідчить про наявність у плазматичних мембран міоцитів так званої „базальної” Mg^{2+} -залежної АТРази ($301,7 \pm 20,0$ нмоль P_i /хв на 1 мг протеїну ($M \pm m$; $n=7$)). Значення уявної константи $I_{0,5}$ інгібування Na^+, K^+ -АТРази міоцитів матки уабаїном складає $21,3 \pm 1,5$ мкМ ($M \pm m$; $n=7$). Аналогічно уабаїн дозозалежно та ефективно в діапазоні концентрацій 10^{-5} – 10^{-3} М інгібує “загальну” Mg^{2+}, Na^+, K^+ -АТРазну активність у суспензії сперматозоїдів (рис. 5.34) – до 76 % відносно контролю (тестується за відсутності уабаїну), ензиматична активність становить $32,6 \pm 3,6$ нмоль P_i /хв на 1 мг протеїну ($M \pm m$; $n=7$). Величина уабаїнчутливої Na^+, K^+ -

АТРазної активності у цьому об'єкті досліджень становить $8,6 \pm 0,5$ нмоль P_i /хв на 1 мг протеїну, убаїн-нечутлива ензиматична активність – так звана „базальна” Mg^{2+} -залежна АТРаза, рівна $24,0 \pm 1,2$ нмоль P_i /хв на 1 мг протеїну ($M \pm m$; $n=7$). Значення уявної константи $I_{0,5}$ інгібування Na^+, K^+ -АТРази мембрани сперматозоїдів убаїном складає $18,8 \pm 2,3$ мкМ ($M \pm m$; $n=7$).

Отже, вищенаведені дані (рис. 5.33) вказують на те, що, у випадку клітин міометрія питомий внесок убаїнчутливої Na^+, K^+ -АТРазної активності в „загальну” Mg^{2+}, Na^+, K^+ -АТРазну активність більше, ніж у випадку сперматозоїдів (40 та 24 % відповідно).

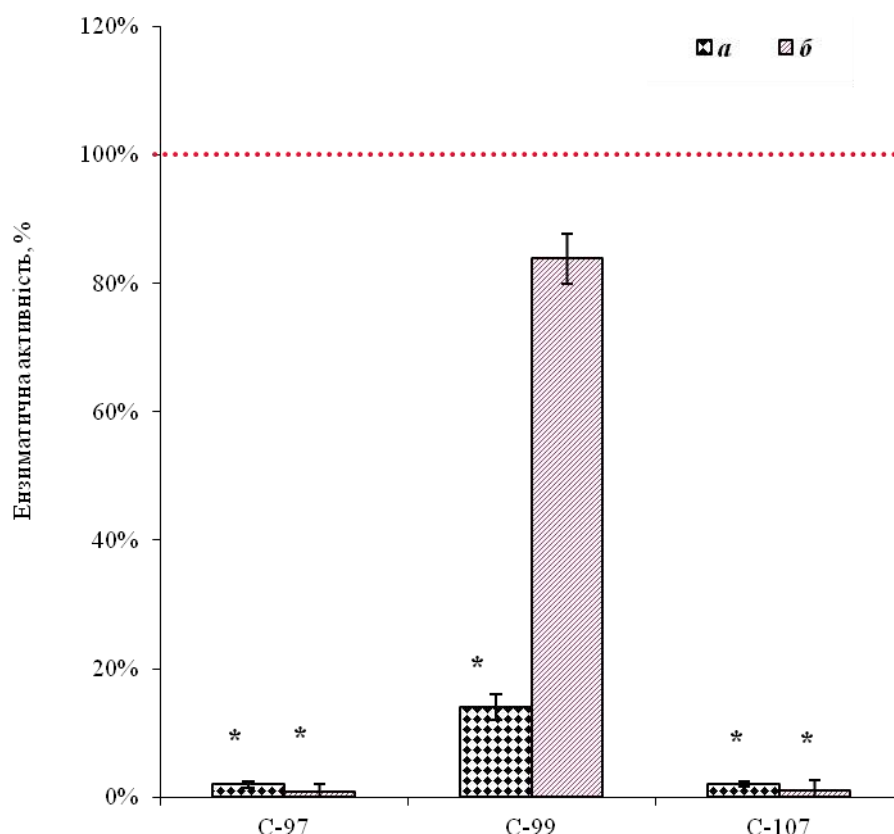


Рис. 5.34. Вплив калікс[4]аренів С-97, С-99 та С-107 (100 мкМ) на Na^+, K^+ -АТРазну активність у суспензії плазматичних мембран міометрія (а) та сперматозоїдів (б) ($M \pm m$, $n = 7-10$)

За 100 % прийнято значення питомої ензиматичної активності за відсутності калікс[4]аренів у середовищі інкубації („нульова точка”,

контроль); */ - відмінність щодо контролю є достовірною ($p \leq 0,05$, $M \pm m$, $n = 7-10$)

В подальших експериментах ми порівняли вплив калікс[4]аренів С-97, С-99 та С-107 на ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази суспензії плазматичних мембран міоцитів матки та суспензії сперматозоїдів.

Було знайдено (рис. 5.34), що гальмівний ефект калікс[4]аренів (100 мкМ) на питому ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази суспензії плазматичних мембран клітин міометрія задовольняє послідовності: С-97 $\approx$ С-107 > С-99. Дійсно, як можна бачити, найбільш ефективну гальмівну дію на активність Na^+, K^+ -АТРази виявляють калікс[4]арени С-97 та С-107 (майже повне інгібування: зменшення активності до 2-3 % відносно контролю), трохи меншу гальмівну дію демонстрував калікс[4]арен С-99 (інгібування до 14 % відносно контролю). У випадку вивчення впливу калікс[4]аренів на ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази суспензії сперматозоїдів ми показали (рис. 5.34), що калікс[4]арени С-97 та С-107 також повністю інгібують Na^+, K^+ -АТРазну активність (залишкова активність – 1-2 % відносно контролю), проте калікс[4]арен С-99, який є більш гідрофільним, ніж калікс[4]арени С-97 та С-107, практично не впливає на неї, знижуючи ензиматичну активність лише до 80-85 % відносно контрольного значення ($M \pm m$, $n = 7-10$).

Також ми вивчили вплив досліджуваних калікс[4]аренів на питому ензиматичну активність Mg^{2+} -АТРази міометрія та сперматозоїдів (дані не наведені). Було знайдено, що в обох випадках всі калікс[4]арени практично не впливають на “базальну” Mg^{2+} -АТРазну активність (мало місце зменшення активності лише до 90-95 % від контрольного значення).

Таким чином із вищенаведених даних можна зробити наступний висновок: калікс[4]арени С-97 та С-107, що були використані у

концентрації 100 мкМ, ефективно (на 97-99 % стосовно контрольного значення) інгібують ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази у суспензії плазматичних мембран міометрія та сперматозоїдів, практично не впливаючи на активність Mg^{2+} -АТРази (гальмівний ефект – лише на 5-10 %). Менш ефективним виявився калікс[4]арен С-99, який у концентрації 100 мкМ знижував Na^+, K^+ -АТРазну активність у суспензії плазматичних мембран міометрія – на 80-85 %, але вельми слабо - на 15-20 % - у випадку суспензії сперматозоїдів, аналогічно не впливаючи на активність Mg^{2+} -АТРази (гальмівний ефект – на 5-8 %).

5.9. МОЛЕКУЛЯРНИЙ ДОКІНГ ВЗАЄМОДІЇ КАЛІКС[4]АРЕНУ С-107 І ЙОГО МОДЕЛЬНИХ СПОЛУК З ЛІГАНД-ЗВ'ЯЗУЮЧИМИ ДІЛЯНКАМИ Na^+, K^+ -АТРази ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ

У нижченаведених дослідженнях активну участь приймав к.б.н. О.В. Бевза.

Відповідно до літературних даних слід очікувати, що деякі каліксарени можуть транспортувати катіони металів через біомембрани за механізмом переносників [31] завдяки утворенню міцних комплексів катіонів із залишками α -аміно- та метиленбісфосфонових кислот [32], та вбудовуватися в ліпідні біомембрани, утворюючи канали для транспортування катіонів завдяки амфіфільному характеру, обумовленому просторовим розділенням гідрофільних кислотних угруповань та ліпофільного макроциклічного кістяка із алкільними залишками [33, 34, 35]. Також, завдяки гідрофільним залишкам, калікс[4]арен С-107 може зв'язуватися з аміно-кислотними фрагментами іонтранспортуєчих протеїнів [36]. Тобто, калікс[4]арен С-107, інгібуючи функціонування натрієвої помпи, може впливати на транссарколемальний іонний обмін в клітинах гладеньком'язових клітин.

На теперішній час чітко, експериментально підтверджене уявлення про природу взаємодії між Na^+, K^+ -АТРазою плазматичної мембрани та її природними лігандами або синтетичними препаратами практично відсутнє. Це зумовлено, в першу чергу, значною утрудненістю у проведенні рентгеноструктурного аналізу Na^+, K^+ -АТРаз, оскільки при кристалізації ензим втрачає свою нативну конформацію, стабілізовану в організмі клітинною мембраною. Відносно достовірні експериментальні моделі даного ензиму почали з'являтися нещодавно, із вдосконаленням методів аналізу структур мембранозв'язаних ензимів [37, 38, 39]. Необхідно зауважити, що доступні в базах даних кристалічні структури для Na^+, K^+ -АТРаз відносяться до конформації P-E_2 . При цьому фосфорилювання ензиму і перехід в конформацію P-E_2 полегшує зв'язування убаїну. Вважають, що стероїди блокують ензим в стані P-E_2 і, таким чином, гальмують перехід на рівні конформерів $\text{E}_2 \rightarrow \text{E}_1$. Тому дослідження взаємодії калікс[4]арену C-107 із Na^+, K^+ -АТРазою проводили із структурою ензиму саме в цій конформації. Можливо, що фосфорилювання внутрішньо-мембранної частини Na^+, K^+ -АТРаз викликає конформаційні зміни ензиму, що сприяє інгібуючому впливу калікс[4]арену на активні внутрішньоклітинні ділянки ензиму.

Реагентами в Na^+, K^+ -залежній АТР-гідролазній реакції є іони Na , K , Mg та АТР. У даній реакції Mg^{2+} діє як кофактор, який зв'язується з регуляторним центром Na^+, K^+ -АТРаз, та утворює з ATP^{4-} хелатний комплекс MgATP^{2-} , який слугує істинним субстратом в реакції фосфорилювання ензиму (рис. 5.35).

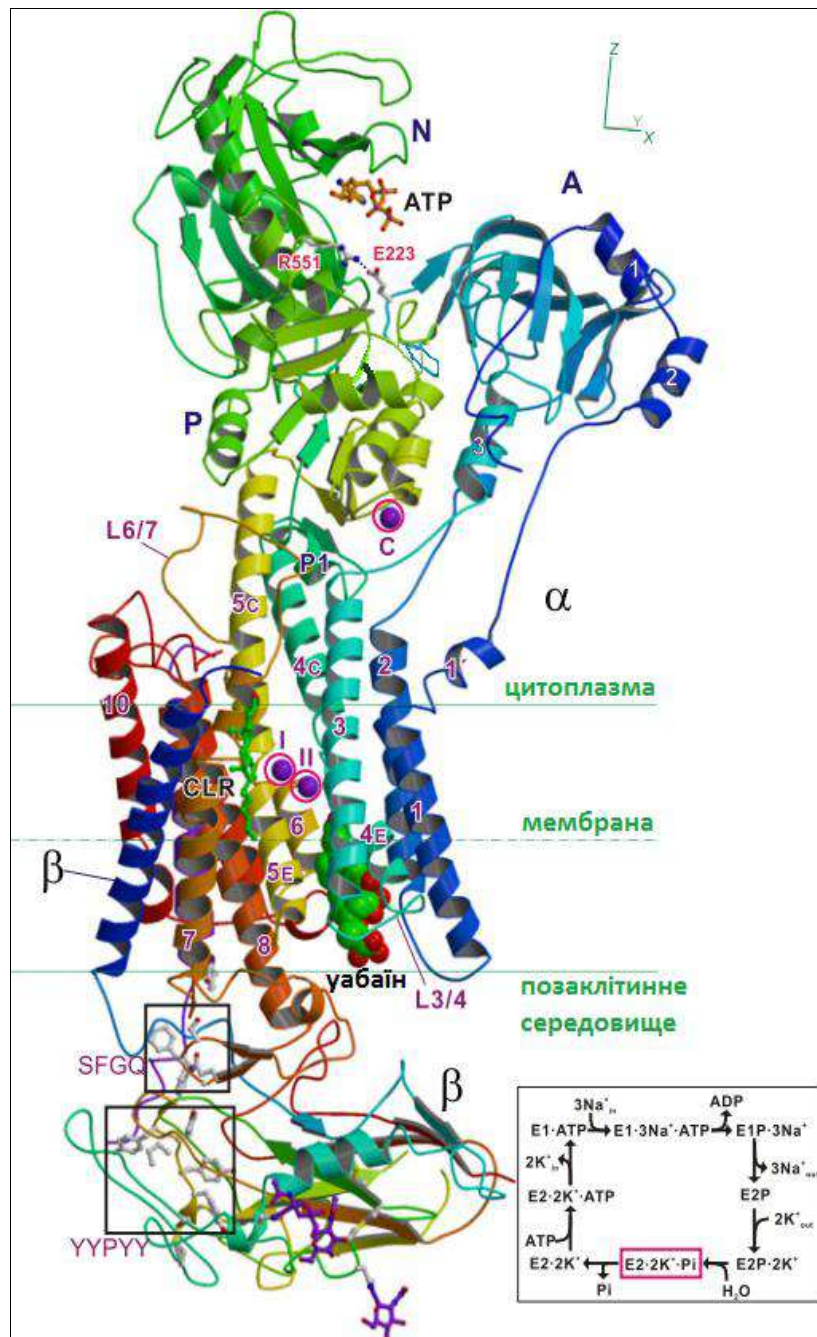


Рис. 5.35. Схема структурної організації Na^+, K^+ -АТРази у комплексі з уабаїном та АТФ (PDB ID: 3A3Y) [39, 40]. Колір поступово змінюється від N-кінця (синій) до С-кінця (червоний). Зв'язані іони K^+ відмічені символами – I, II і C і обведені колом. А – активаторний домен; N – нуклеотид-зв'язуючий домен; P – фосфорилюємий домен. α – β – субодиниці Na^+, K^+ -АТРази. L – петлі між спіралями α – субодиниці, які позначені цифрами. У вставці показана спрощена схема Поста-Альбертса.

Раніше нами було показано [41], що калікс[4]арен C-107 може

ефективно утворювати комплекси з АТР у розчинах. Важливо і те, що при стехіометричному комплексоутворенні С-107 з АТР γ-атом фосфору в молекулі нуклеозидтрифосфату набуває більшої електрофільності внаслідок утворення водневих зв'язків. Молекула калікс[4]арену С-107 є дицвітеріоном із протонованими амініними атомами азоту та двома депротонованими гідроксилами фосфонових фрагментів, тому NH^{2+} групи аміно(2піридил)метил-фосфонових фрагментів молекули С-107 можуть взаємодіяти із негативно зарядженими амінокислотними залишками ензиму. Відповідно, POH- групи даних фрагментів можуть утворювати комплекс із позитивно зарядженими амінокислотними залишками.

Необхідно відмітити, що ми визначали потенційні сайти взаємодії ензиму із калікс[4]ареном С-107. Точна локалізація С-107 в ліганд-зв'язувальних ділянках ензиму ускладнена у зв'язку з тим, що натрієва помпа – мембрано-зв'язаний ензим і в літературі наведені дані стосовно досить значних переміщень цитоплазматичних доменів АТРаз Р-типу один відносно одного у ензиматичному циклі [42, 43]. Тому ми визначили найбільш вірогідні області взаємодії каліксарену із ензимом, існування яких підтверджуються значеннями мінімальної енергії зв'язування та амінокислотним оточенням ліганд-зв'язувальних ділянок (рис. 5.36).

Калікс[4]арен С-107 та уабаїн мають різну спорідненість по відношенню до Na^+, K^+ -АТРazi плазматичної мембрани [44]. Причиною цього може бути відмінність в організації оточення ліганд-зв'язувальних ділянок Na^+, K^+ -АТРazi для даних інгібіторів. З даних літератури доступні відомості про можливі місця зв'язування АТР [45] та уабаїну [46, 47] на ліганд-зв'язувальних ділянках Na^+, K^+ -АТРazi. Отже, виходячи із структурних особливостей калікс[4]арену С-107, ми проаналізували отримані методом докінгу дані зв'язування даного калікс[4]арену та його модельних сполук для встановлення механізму

дії досліджуваних сполук на роботу ензиму. При цьому, за допомогою методу докінгу, визначено можливі місця приєднання ("впадини") досліджуваних лігандів до ліганд-зв'язувальних ділянок Na^+, K^+ -АТРази (рис. 5.36.А), та досліджено їх взаємодію з рецептором, в результаті був відібраний ряд комплексів із найменшою загальною енергією.

Попереднє визначення найбільш вірогідних місць приєднання калікс[4]арену C-107 до Na^+, K^+ -АТРази, за отриманими значеннями мінімальної енергії зв'язування, показало, що він може утворювати комплекс із ензимом в областях 1 та 4 (рис. 5.36).

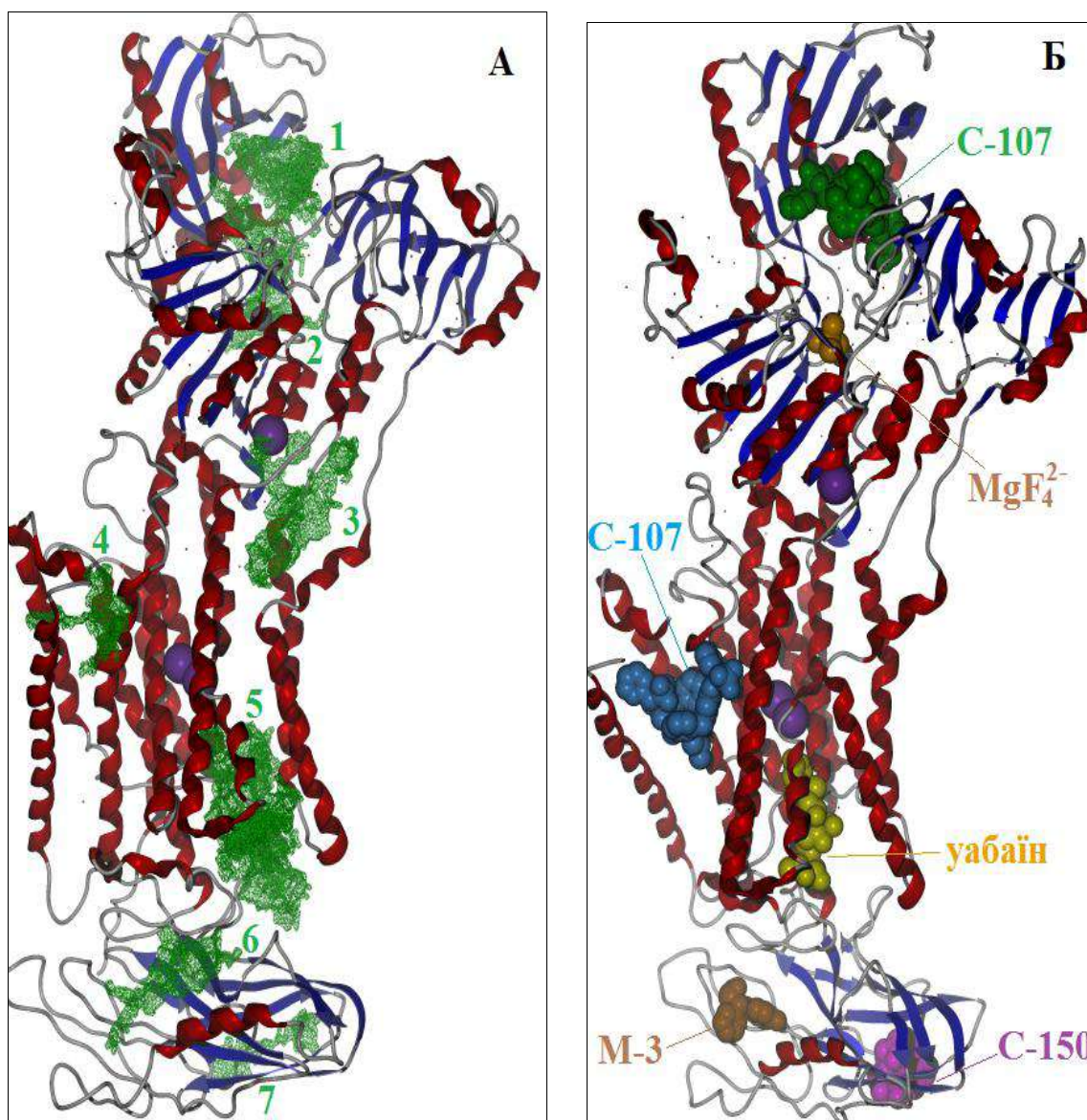


Рис. 5.36. Аналіз димера (α - та β -субодиниця) Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани на наявність впадин (cavities) - функціонально активних ділянок, які виділені зеленим кольором: А – впадини; Б - найбільш вірогідні місця зв'язування різних лігандів функціонально-активними ділянками Na^+, K^+ -АТРази, отримані методом докінга (для С-107, С-150 та М-3)

До суттєвих структурних особливостей Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани можна віднести організацію додаткової ділянки зв'язування субстрату, віддаленої від активного центру [40, 48]. Дані про Na^+, K^+ -АТРази свідчать також про наявність, поруч з активним центром, залишків амінокислот, що не беруть безпосередню участь у механізмах каталізу, але просторово закривають доступ до центру зв'язування субстрату [49]. У молекулі Na^+, K^+ -АТРази N-домен менше ($\sim 20^\circ$) повернутий до А-області на відміну від Ca^{2+} -помпи саркоплазматичного ретикулуму, і між ними є тільки один зв'язок: сольовий місток між Arg551 в N-області і Glu223 в А-доміні [50]. Залишок Arg551, як очікується, взаємодіє з β -фосфатом АТР, і для прискорення відкриття реакційної голівки ензиму необхідно розірвати зв'язок із АТР/АДР. Даний процес може бути ключовою подією, необхідною для переходу у стан Е1. Враховуючи здатність С-107 проникати через мембрану, не виключена можливість його взаємодії із цитоплазматичними фрагментами ензиму.

Так, нами було встановлено, що С-107 із великою вірогідністю може утворювати комплекс із ензимом в області 1 (між N- та А-доменами Na^+, K^+ -АТРази), близько до сольового містка між Arg551 в N-області і Glu223 в А-доміні (рис. 5.37). Таким чином, взаємодія С-107 із амінокислотними залишками в даній області може впливати на розташування субстрату і гідроліз ковалентного ензимсубстратного інтермедіату. При цьому встановлено, що у взаємодії із фосфонатними групами калікс[4]арену можуть бути задіяні залишки

Lys212.A, Arg240.A і Arg551.A. NH^{2+} групи аміно-фосфонових фрагментів молекули C-107 взаємодіють із залишками Glu223.A і Glu489.A (A, у позначеннях амінокислотних залишків, означає α -домен, а Б – відповідно β -домен ензиму) (рис. 5.37). Калікс[4]аренові фрагменти облаштовуються у простір, утворений залишками Lys212.A, Pro224.A, Gln225.A, Met380.A, Gly449.A, Asp450.A, Ala451.A, Ser452.A та Ser484.A. При цьому фенольні кільця каліксаренової чаші знаходяться у гідрофобній та стекінг взаємодії із залишками ароматичних амінокислот – Phe482.A, Tyr488.A та Tyr542.A.

При здійсненні комп'ютерного моделювання було отримано значення вільної енергії зв'язування та різних типів взаємодій, які характеризують взаємодію калікс[4]арену C-107 з ліганд - зв'язуючою ділянкою Na^+, K^+ -АТРази в області зв'язування 1 (табл. 5.5).

Таблиця 5.5.

Величини загальної вільної енергії зв'язування (відносні одиниці ОФ, E_{score}) при різних типах взаємодій калікс[4]арену C-107 з ліганд - зв'язуючою ділянкою Na^+, K^+ -АТРази в області зв'язування 1.

C-107	Значення	MolDock Score, E_{score}
Загальна енергія		-109.776
Взаємодія із зовнішнім лігандом		-154,824
Білок - ліганд взаємодія		-154,367
Стерична взаємодія (по PLP)	-145,417	-145,417
Стерична взаємодія (по LJ12-6)	-0,376	
Водневі зв'язки	-7,088	-7,088
Водневі зв'язки (непрямі)	-8,949	

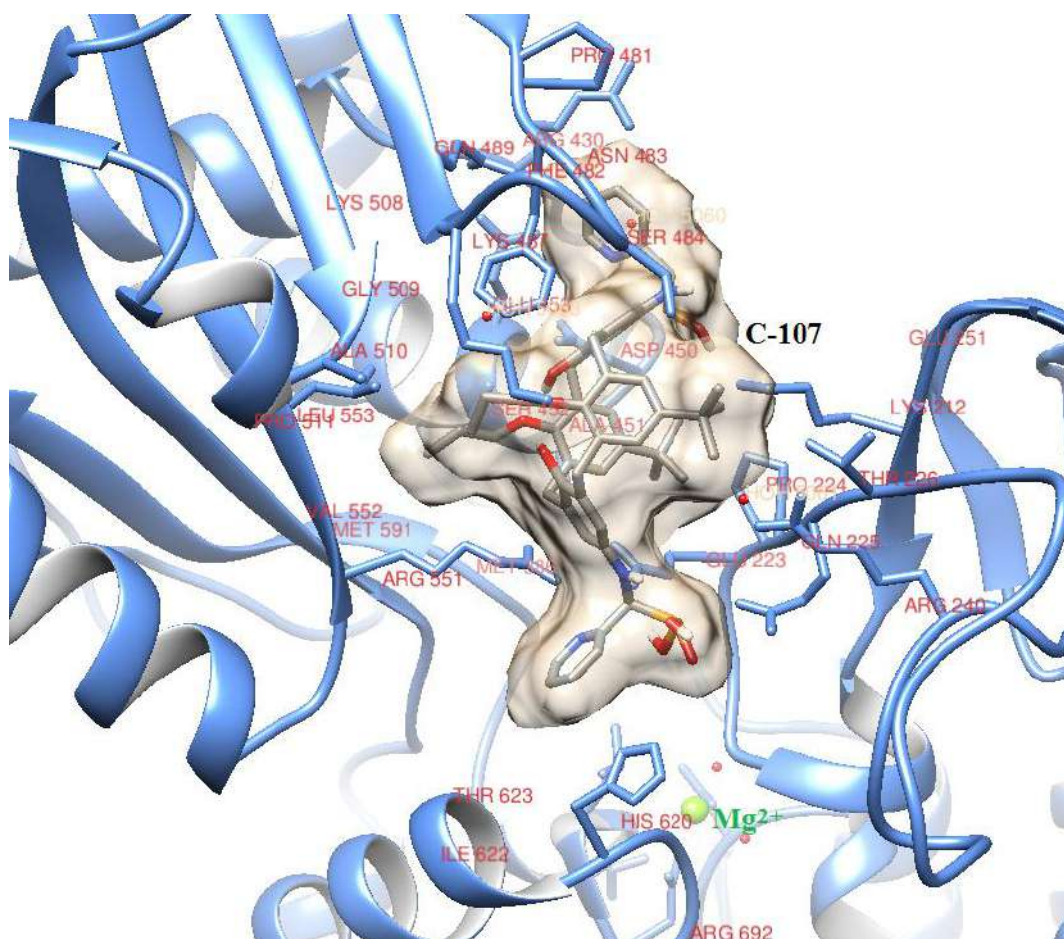


Рис. 5.37. Амінокислотне оточення комплексу калікс[4]арен “C-107 – Na^+ , K^+ -АТРази”, в області зв’язування 1

Також нас цікавило, які саме взаємодії приймають участь при утворенні комплексу калікс[4]арену C-107 з ліганд - зв’язуючою ділянкою Na^+ , K^+ -АТРази в області зв’язування 1. На рис. 5.38 ідентифіковані гідрофобні (А) та електростатичні взаємодії (Б).

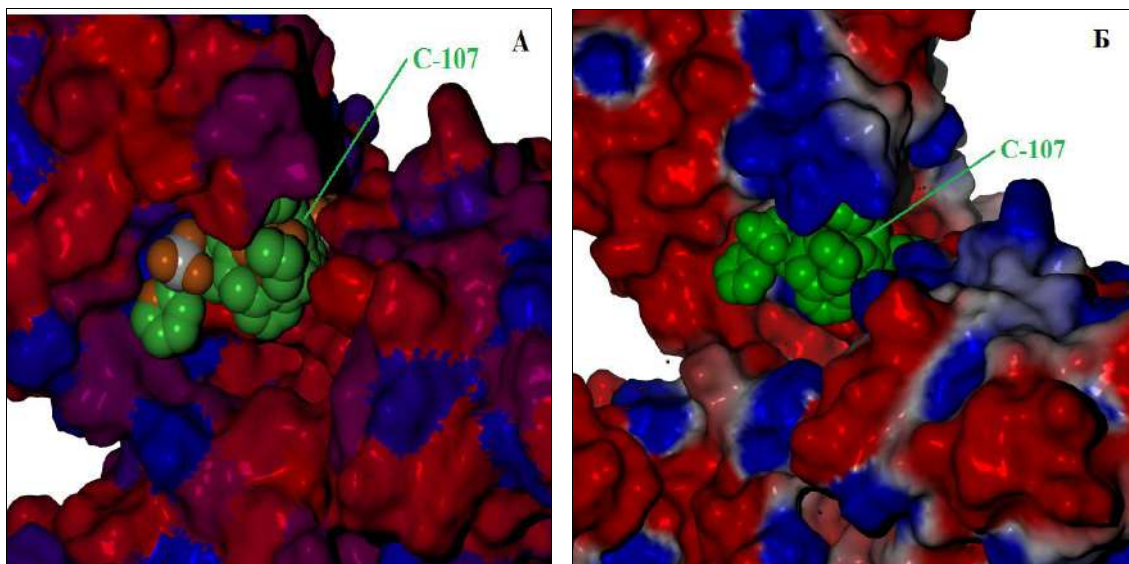


Рис. 5.38. Гідрофобні (А) та електростатичні (Б) взаємодії калікс[4]арену С-107 з ліганд - зв'язуючою ділянкою Na^+, K^+ -АТРазі в області зв'язування 1. Зони гідрофобних (червоний) і гідрофільних (синій) властивостей ензиму. Та відповідно негативно (синій) та позитивно (червоний) заряджені зони ензиму

Область 4 знаходиться в тій частині молекули Na^+, K^+ -АТРазі, де присутній сегмент, пов'язаний з трансмембранною спіраллю М5 і петлею L6/7 (рис. 5.36), що зв'язує спіралі М6 і М7 (L6/7), який може рухатися під час реакційного циклу і впливати на спорідненість до іонів, які приймають участь у реакції [51, 52]. При цьому в конформації бічного ланцюга Asn783 фіксується водневим зв'язком з Tyr854 на вигнутій частині спіралі М7. Спіраль М5 α -субодиниці також частково розкручена і вигнута. Цей вигин, причиною якого є Pro785, має вирішальне значення для створення простору та забезпечення здатності карбоксилу Thr799 основного ланцюгу для координування K^+ [53]. Спіраль М7 α -субодиниці стабілізується водневим зв'язком між Tyr44 на β -субодиниці з карбоксилем Gly855 α -субодиниці.

Встановлено, що у взаємодії із фосфонатними групами каліксарену можуть бути задіяні залишки Arg28.В і Arg848.А. NH^{2+} групи аміно-фосфонових фрагментів молекули С-107 взаємодіють із

залишками Glu847.A і Glu1020.A. Калікс[4]аренові фрагменти облаштовуються у простір, утворений залишками Trp33.B, Ile36.B, Tyr40.B, Tyr44.B, Val298.A, Phe301.A, Leu302.A, Ser851.A, Tyr854.A, Gly855.A та Gln856.A. При цьому каліксаренова чаша розміщується у гідрофобному кластері, утвореному залишками ароматичних амінокислот – Phe37.B, Phe39.B, Tyr40.B, Tyr44.B, Phe301.A та Tyr854.A. Дані залишки можуть утворювати гідрофобні та стекінг-взаємодії із фенольними кільцями каліксаренової чаші (рис. 5.39).

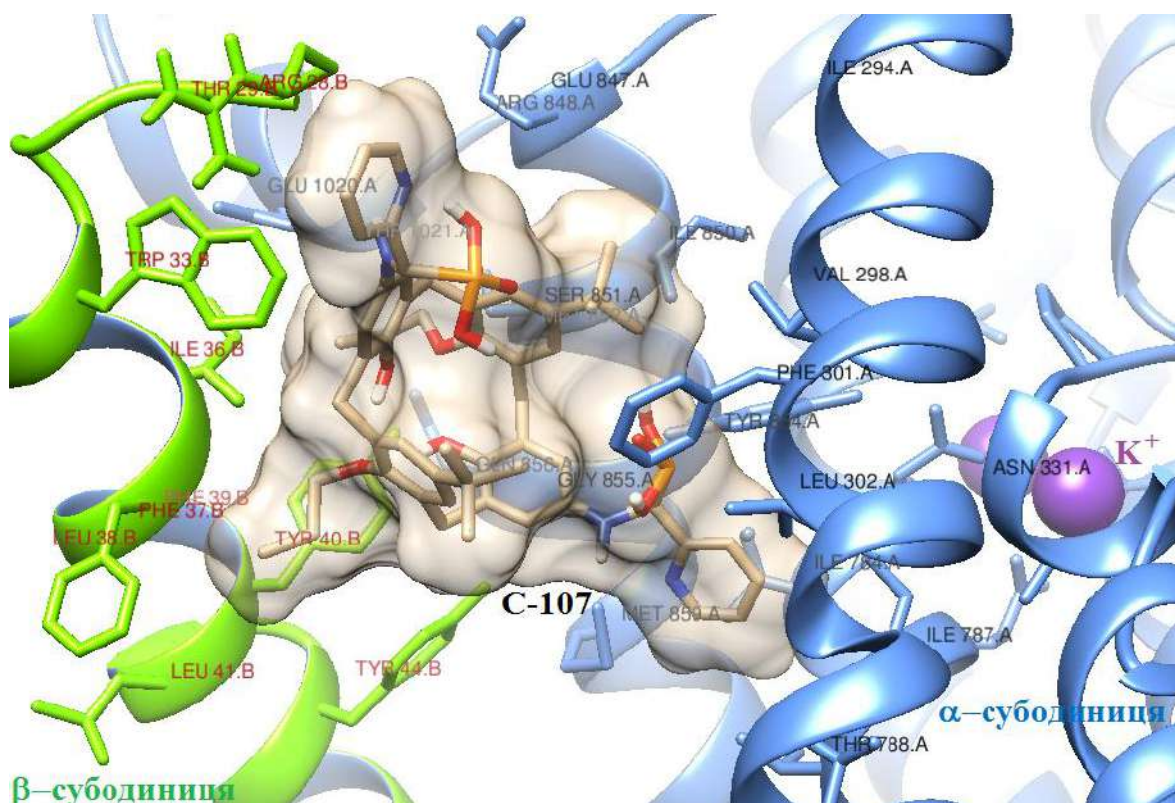


Рис. 5.39. Амінокислотне оточення комплексу каліксарен C-107 – ензим, в області зв'язування 4

Необхідно відмітити, що в області 4 молекула калікс[4]арену C-107 формує стекінг-зв'язки із залишками ароматичних амінокислот α - та β -субодиниці одночасно. Зокрема, калікс[4]арен C-107 взаємодіє із Tyr44.B бічного ланцюга β -субодиниці.

Очевидно, що зв'язування молекули калікс[4]арену C-107 в області, наближеній до даного сегменту, може викликати порушення

конформаційної рухливості даного сегменту, і таким чином, впливати на реакційний цикл ензиму та спорідненість до іонів, які приймають участь у реакції, що підтверджується нашими експериментальними даними [41]. При цьому утворення комплексу калікс[4]арену C-107 із ензимом у даній області може викликати конформаційні зміни структури ензиму, що, в свою чергу, може також пояснити вплив калікс[4]арену на вірогідність підвищення спорідненості уабаїну до ензиму, оскільки сайт зв'язування уабаїну з помпою знаходяться неподалік (рис. 5.36.Б), кільце лактона уабаїну знаходиться близько до частково розкрученої М4 спіралі α -субодиниці, а залишок рамнози взаємодіє з L7/8 петлею α -субодиниці [54, 55].

При здійсненні комп'ютерного моделювання було отримано значення загальної вільної енергії зв'язування та різних типів взаємодій, які характеризують взаємодію калікс[4]арену C-107 з ліганд - зв'язуючою ділянкою Na^+, K^+ -АТРази в області зв'язування 1 (таб. 5.6).

Таблиця 5.6.

Величини загальної вільної енергії зв'язування (відносні одиниці ОФ, E_{score}) при різних типах взаємодій калікс[4]арену C-107 з ліганд - зв'язуючою ділянкою Na^+, K^+ -АТРази в області зв'язування 1.

C-107	Значення	MolDock Score, E_{score}
Загальна енергія		-152,537
Взаємодія із зовнішнім лігандом		-155,125
Блок - ліганд взаємодія		-155,227
Стерична взаємодія (по PLP)	-153,188	-153,188
Стерична взаємодія (по	-10,890	

LJ12-6)		
Водневі зв'язки	-1,926	-1,926
Водневі зв'язки (непрямі)	-5,804	

Також для порівняння із дослідженням області 1 ми провели визначення взаємодій, які приймають участь при утворенні комплексу калікс[4]арену С-107 з ліганд - зв'язувальною ділянкою Na^+, K^+ -АТРازی в області зв'язування 4. На рис. 5.40, ідентифіковані гідрофобні (А) та електростатичні (рис. Б) взаємодії.

Отже, як показують результати докінг-аналізу взаємодії калікс[4]арену С-107 із ліганд - зв'язувальною ділянкою ензиму, в переважній більшості випадків спостерігається гідрофобний контакт між ліпофільною макроциклічною структурою калікс[4]арену і аліфатичними або ароматичними бічними ланцюгами амінокислотних залишків ензиму.

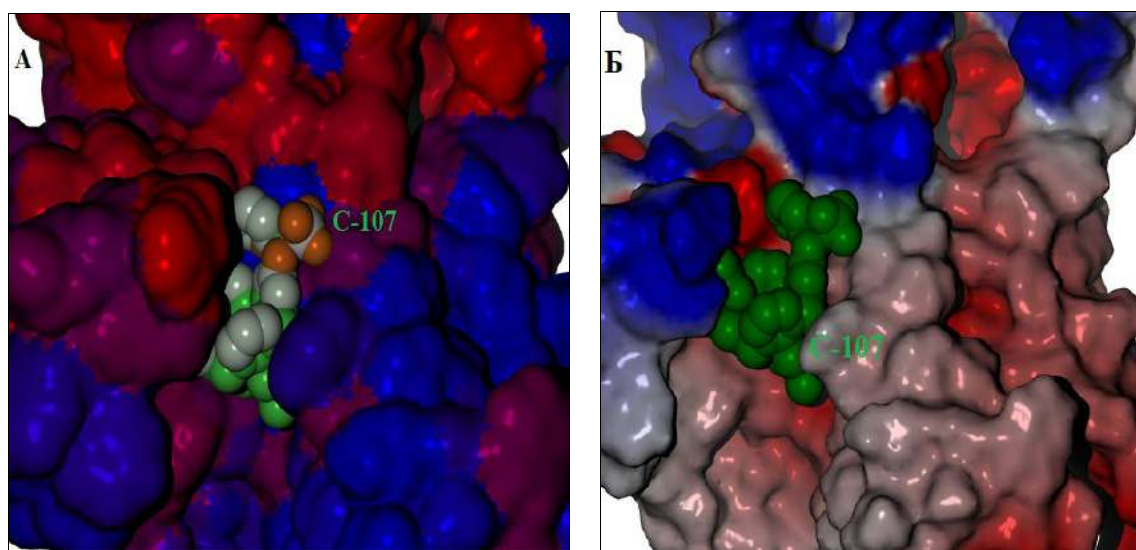


Рис. 5.40. Гідрофобні (А) та електростатичні (Б) взаємодії калікс[4]арену С-107 з ліганд - зв'язуючою ділянкою Na^+, K^+ -АТРازی в області зв'язування 4. Зони гідрофобних (червоний) і гідрофільних (синій) властивостей ензиму. Та відповідно негативно (синій) та позитивно (червоний) заряджені зони ензиму

На противагу цьому, інша частина молекули C-107 - гідрофільні кислотні залишки, контактують із позитивно- та негативно зарядженими R-групами амінокислот ензиму. При цьому також відмічено стекінг-взаємодію фенольних фрагментів макроциклічної структури C-107 з ароматичними бічними ланцюгами залишків. В результаті відбувається стабілізація конформації калікс[4]арену у ліганд-зв'язуючих кишнях ензиму.

Також були досліджені міжмолекулярні водневі зв'язки у системі "калікс[4]арен – ензим". Найбільш характерним є водневий зв'язок, в якому беруть участь фосфатна та аміногрупа бічних залишків калікс[4]арену. Менш характерні водневі зв'язки, в яких беруть участь інші атоми бічних залишків калікс[4]арену. Для каліксаренової чаші C-150 водневі зв'язки з атомами протеїну не є властивими.

Таким чином отримані нами результати комп'ютерного моделювання відповідають експериментальним даним стосовно здатності калікс[4]арену впливати на ензиматичну активність Na^+ , K^+ -АТРази.

Також нами було проведено комп'ютерне моделювання взаємодії модельних фрагментів калікс[4]арену C-107 (C-150 та M-3) із ліганд-зв'язувальними ділянками Na^+ , K^+ -АТРази (рис. 5.36).

Встановлено, що C-150 з найбільшою вірогідністю може взаємодіяти із ензимом в області скупчення ароматичних залишків β - субодиниці (область 7), яка знаходиться у позаклітинному боці, що добре корелює із особливістю структури C-150, яка являє собою гідрофобну тетрафенольну «корзину» (рис. 5.36 А). Необхідно відмітити, що місце зв'язування даного модельного фрагменту істотно відрізняється від області зв'язування калікс[4]арену C-107, і фактично знаходиться в області протеїну, яка не містить функціонально важливих амінокислотних залишків. Що добре підтверджується отриманими експериментальними результатами про практичну

відсутність впливу C-150 на роботу ензиму.

Модельний фрагмент M-3, як показують результати комп'ютерного моделювання, також може зв'язуватися з амінокислотними залишками ензиму на позаклітинному боці мембрани (область 6) у зоні між α – та β – субодинаціями (рис. 5.36 А). Показаний експериментально незначний вплив фрагменту M-3 за концентрації $4 \cdot 10^{-4}$ М (~15 % інгібувальний ефект) може пояснюватися зв'язуванням даного фрагменту у невеликій впадині із амінокислотними залишками протеїну в області зв'язування 6 (рис. 5.36 Б) неподалік від області, де спіраль β -субодинаці утворює численні зв'язки з петлею, яка зв'язує спіралі M7 і M8 (L7/8) α -субодинаці (рис. 5.36). Для даної області характерна комплексна взаємодія α і β субодинаць. При цьому, β -субодинаця модулює функціональні властивості Na^+, K^+ -АТРази, в тому числі спорідненість до катіонів і захоплення K^+ [47].

Отже, результати докінгу калікс[4]арену C-107 в ліганд-зв'язувальних ділянках Na^+, K^+ -АТРази свідчать про те, що цей калікс[4]арен може розміщуватися у просторі декількох областей ліганд-зв'язувальних ділянок ензиму (рис. 5.36). При цьому встановлені деякі особливості у взаємодії ліганду з ензимом. Зокрема, важливу участь у взаємодії каліксаренової чаші C-107 із ензимом відіграють гідрофобні (стеричні) взаємодії. Тобто залишки ароматичних амінокислот «фіксують» калікс[4]арен в області зв'язування із протеїном. В той же час залишки негативно та позитивно заряджених амінокислот формують водневі зв'язки із NH^{2+} -групами аміно-фосфонових фрагментів та атомами кисню метиленбісфосфонатних фрагментів калікс[4]арену C-107. Таким чином гідрофільні фрагменти калікс[4]арену задають “вектор напрямку” у якому фіксується молекула C-107 в області взаємодії із ензимом.

Результати нашого дослідження демонструють особливості застосування макроциклічної платформи для цілеспрямованого конструювання інгібіторів активності Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани. Перевагою таких макроциклічних інгібіторів може бути можливість введення в їхню структуру біоізостеричних груп, певним чином орієнтованих у просторі і здатних, в окремих випадках, суттєво підвищувати спорідненість інгібітора до ензиму. Очевидно, наявність гідрофобної платформи функціоналізованих калікс[4]аренів може сприяти закріпленню їх на гідрофобних ділянках у центрі зв'язування субстрату. Калікс[4]арен С-107 є ефективним інгібітором Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани міометрія, що можна пояснити додатковою фіксацією фосфонатних залишків та гідрофобним контактом макроциклічної платформи. Очевидно, що у взаємодії С-107 із ліганд - зв'язуючими ділянками Na^+, K^+ -АТРази важливу роль відіграють гідрофобні зв'язки.

Таким чином механізм дії калікс[4]арену С-107 на Na^+, K^+ -АТразу відрізняється від дії убаїну. Враховуючи складну структуру даної АТРази, яка у біологічній мембрані складається із двох спарених α і β субодиниць, калікс[4]арен С-107, скоріше за все, може не тільки зменшувати спорідненість іонів Na до натрієвої помпи, а також безпосередньо впливати на макроструктуру Na^+, K^+ -АТРази, на відміну від дії убаїну, що фактично підтверджується більшою інгібуючою дією калікс[4]арену С-107 у порівнянні із убаїном [44].

Отже, у цій роботі із використанням методів докінг-аналізу було проведено комп'ютерне моделювання міжмолекулярних взаємодій, характерних для комплексів "ліганд (калікс[4]арен С-107 та модельні сполуки) – рецептор (ліганд-зв'язуючі ділянки Na^+, K^+ -АТРази)". На основі одержаних результатів проаналізовані амінокислотні залишки, які взаємодіють з даними лігандами, і досліджено тип їх взаємодій.

ЧАСТИНА ТРЕТЯ.

КАЛІКСАРЕНИ ЯК ЕФЕКТОРИ АТР-ГІДРОЛАЗНОЇ СИСТЕМИ СКОРОТЛИВИХ ПРОТЕЇНІВ

РОЗДІЛ 6. КАЛІКС[4]АРЕНИ, АТР-ГІДРОЛАЗА СКОРОТЛИВИХ ПРОТЕЇНІВ ТА КАТІОНИ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ.

6.1. ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ВПЛИВУ ВИБРАНИХ КАЛІКС[4]АРЕНІВ НА АКТИВНІСТЬ АТРази АКТОМІОЗИНУ МІОМЕТРІЯ

Здатність м'язів до скорочення передусім визначається функціонуванням основного структурного та скоротливого протеїну – міозину. Молекула міозину характеризується ензиматичними властивостями, по суті вона є Mg^{2+} -залежною АТРазою. Міозинова АТРаза перетворює хімічну енергію, що депонована в нуклеозидтрифосфаті АТР, у механічну енергію направлено руху, тому цей ензим ще називають молекулярним мотором [1]. Mg^{2+} -АТРазна активність міозину лише при його взаємодії з актином має фізіологічне значення. Це дозволяє використовувати актоміозинову АТР-гідролазну ензиматичну систему у якості зручної моделі для скринінгу дії різноманітних речовин – регуляторів скорочення та розслаблення м'язів, а також для моніторингу різних патологічних станів. Для вивчення механізму впливу будь-яких ефекторів на АТР-гідролазну активність міозину доцільно використовувати у якості об'єкта досліджень ізольований субфрагмент-1 (голівку) міозину, оскільки він є основною каталітичною та функціональною одиницею міозину, що здатний навіть в ізольованому стані зберігати такі властивості нативного міозину, як АТРазна активність та здатність взаємодіяти з актином [2, 3, 4, 5].

Порушення процесу скорочення-розслаблення гладеньких м'язів матки є основою різноманітних патологій: слабкості пологової діяльності, передчасних пологів, викиднів, атонії, гіпо- та гіпертонусу матки та ін. [6, 7, 8, 9]. За різних патологічних станів репродуктивної системи жінки, в тому числі і тих, які виникають внаслідок гормонального дисбалансу, відмічаються порушення у функціонуванні скоротливого комплексу, що відображаються у зміні швидкості реакції суперпреципітації (*in vitro*) та АТРазній активності актоміозину. При порушенні скоротливої функції гладеньких м'язів, у тому числі і міометрія, за деяких патологій (гіпертрофія) мають місце зміни у експресії ізоформ міозину та у кінетиці актин-міозинової взаємодії [10, 11, 12, 13]. Тому скринінг оборотних афінних модифікаторів (інгібіторів, активаторів) актин-міозинової взаємодії є важливим для розбудови нових фармакологічних засобів, здатних ефективно нормалізувати скоротливу функцію матки за патологічних станів міометрія.

Показано, що окремі каліксаренфосфонові кислоти здатні модифікувати ензиматичну активність різних у функціональному відношенні Mg^{2+} -залежних АТРаз гладеньких м'язів матки. Зокрема, калікс[4]арени С-97, С-99 та С-107 є ефективними інгібіторами ензиматичної активності Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани, практично не впливаючи на активність Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани [14]. Проте очевидно, що потенціал каліксаренів як біологічно активних сполук ще повністю далеко не розкритий. Практично відсутні систематичні уявлення щодо каліксаренів як потенційних ефекторів, що модулюють ензиматичну активність скоротливого комплексу м'язів.

Наведені нижче результати отримані у творчій співпраці з к.б.н. Р.Д. Лабинцевою, та к.б.н А.А. Бевзою [15].

Було проведено порівняльний аналіз впливу деяких каліксаренів – С-90, С-91, С-97 та С-99 на активність АТРази актоміозину.

Фізіологічна дія каліксаренів C-90, C-91, C-97, C-99 може бути обумовлена рядом їх фізико-хімічних властивостей. Завдяки утворенню металокомплексів з амідними і сульфониламідinovими групами та із залишками альфа-гідрокси-, альфа-аміно- та метиленбісфосфонових кислот [16], вони здатні транспортувати катіони металів через біомембрани [17]. Завдяки амфіфільному характеру, обумовленому розташуванням полярних угруповань на верхньому вінці ліпофільного макроціклічного кістяка [18], каліксарени можуть вбудовуватися в ліпідні біомембрани, утворюючи канали для транспорту катіонів [19, 20]. Амідні, сульфониламіднові, фосфорильні групи можуть слугувати сайтами зв'язування каліксаренів з амінокислотними фрагментами іонтранспортних протеїнів [21].

Каліксарен C-91 перебуває у розчині у конусоподібній конформації. Доказом такої конформації є пара дублетів аксіальних та екваторіальних протонів метиленових груп макроциклу (δ 3.3-4.3 м.ч.) в спектрах ЕПР.

Більш детальна інформація про просторову будову каліксарену була отримана молекулярним моделюванням за методом ММ+ (рис. 6.1; 6.2).

Кути, утворені трет-бутильованими кільцями з площиною метиленових груп макроциклу, складають 118.85° та 116.97° , а відповідні кути функціоналізованих кілець дорівнюють 116.13° та 116.27° , що вказує на незначне відхилення конформації від регулярного конусу. Відстані між сусідніми атомами кисню на нижньому вінці складають 2.79-2.89 Å, тобто утворюються внутрішньо молекулярні водневі зв'язки між гідроксильною та пропокси-групою, котрі стабілізують конусоподібну конформацію. Амідні фрагменти супряжені з ароматичними кільцями макроциклу (дієдральні кути 15.5° та 16.5°). Ацильний залишок має практично пласку будову, що залишає порожнину макроциклу відкритою для комплексоутворення та

збільшує її розмір. Фторофеноксильні кільця розташовані відносно площини макроциклу майже ортогонально і є також просторово-доступними для міжмолекулярних взаємодій.

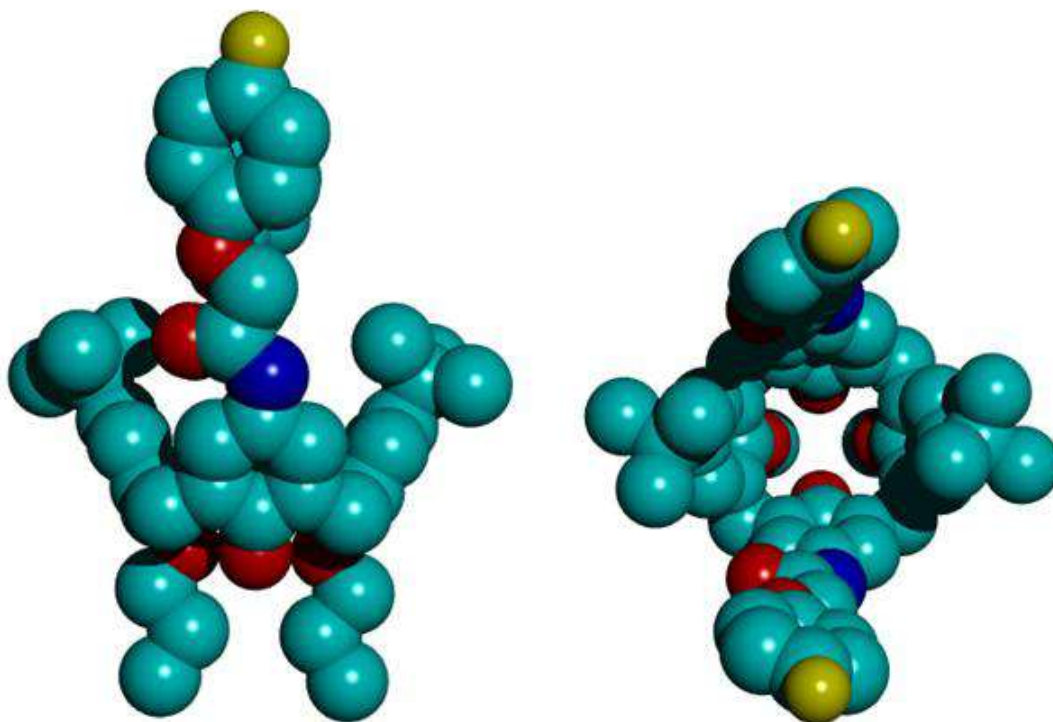


Рис. 6.1. Мінімізована структура калікс[4]арену C-91. (HyperChem 6, MM+). Атоми водню не показані

Відповідні структурні формули досліджуваних каліксаренів наведені на рис. 6.2.

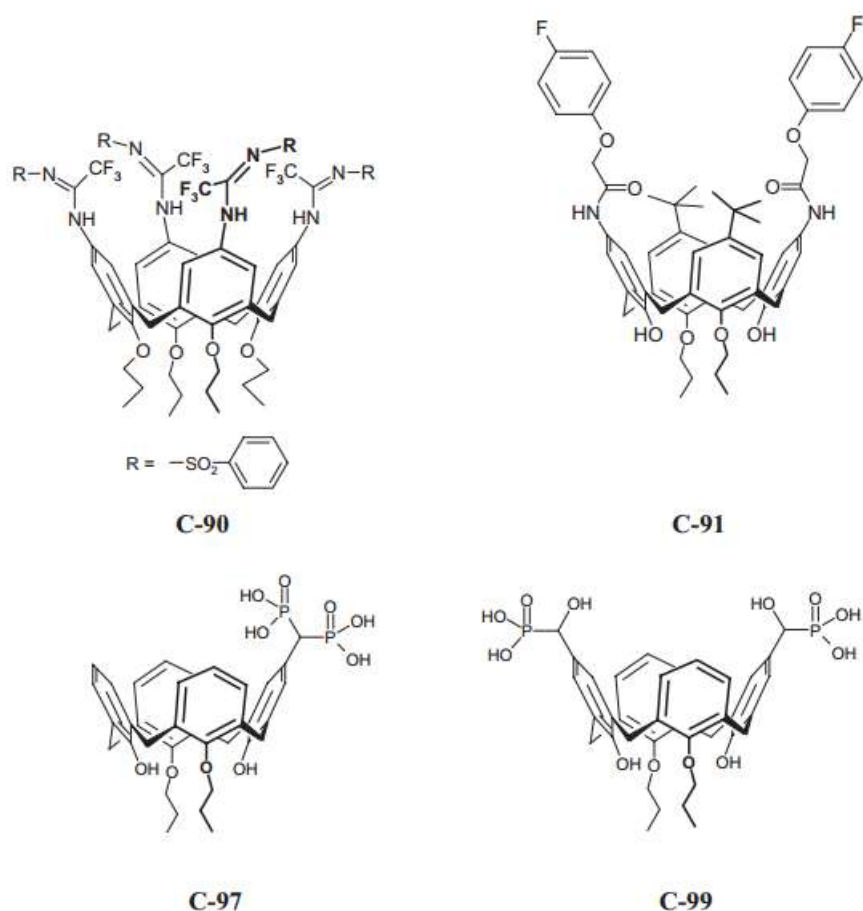


Рис. 6.2. Структурні формули вибраних калікс[4]аренів

Повні хімічні назви досліджуваних каліксаренів:

- C-90 (5,11,17,23-тетра(трифтор)метил(фенілсульфоніліміно)-метиламіно-25,26,27,28-тетрапропокси-калікс[4]арен),
- C-91 (5,17-ди(2(4-фторофеніл)оксіацетамідо)-11,23-ди-трет-бутил-26,28-дигідрокси-25,27-дипропоксикалікс[4]арен),
- C-97 (5-біс(дигідроксифосфорил)метил-26,28-дигідрокси-25,27-дипропоксикалікс[4]арен),
- C-99 (5,17-біс(дигідроксифосфонілметилол)-26,28-дигідрокси-25,27-дипропоксикалікс[4]арен).

Препарат актоміозину отримували з гладеньком'язових клітин матки свині за модифікованими методами Barany [22] та Weber [23]. Чистоту препарату контролювали методом електрофорезу в поліакриламідному гелі. АТРазну активність актоміозину досліджували в середовищі інкубації (загальний об'єм 1 мл) такого складу (мМ) : 50 трис-НCl-буфер (pH 7,2) , 100 KCl, 0,01 CaCl₂, 5 MgCl₂, 4 АТР, 20 мкг/мл актоміозину. Тривалість інкубації 10 хв. Вміст протеїну визначали за методом М. Bradford [24] із використанням реакції з реактивом Кумасі – G250. Кількість відщепленого від нуклеозидтрифосфату неорганічного фосфату P_i внаслідок АТР-гідролазної реакції, визначали за методом Ратбун та Бетлах [25].

Здатність м'язів до скорочення визначається функціонуванням основного структурного компонента м'язів - актоміозину, який здійснює ензиматичний гідроліз АТР в активному центрі, локалізованому в каталітичному домені голівки міозину [26, 27]. Ензиматичний гідроліз АТР супроводжується вивільненням енергії, яка викликає обертання шарнірної ділянки регуляторного домена голівки міозину. Зв'язування актину з останнім прискорює звільнення продуктів гідролізу нуклеозидтрифосфату з активного центра та приводить до подальшого обертання регуляторного домена, в результаті чого спостерігається спрямоване переміщення актинових філаментів [26]. Міозинова АТРаза перетворює хімічну енергію макроергічних зв'язків молекули АТР у направлений механічний рух, тому її ще називають, як вже відзначалося вище, молекулярним мотором [26, 27]. У наших досліджах середнє значення питомої АТРазної активності актоміозину становить 10-15 мкмоль P_i/мг протеїну за 1 год (M±m; n=6).

При дослідженні впливу каліксаренів С-90, С-91, С-97 та С-99 на АТРазну активність актоміозинового комплексу було встановлено, що ці сполуки, обрані у концентрації 100 мкМ, по-різному впливають на її активність (рис. 6.3). Каліксарен С-90 виявився ефективним

активатором АТРази скоротливого комплексу, в його присутності ензиматична активність зростає в 4 рази стосовно контролю. Як ми описували раніше, цей каліксарен ефективно гальмує (на 70 % порівняно з контролем) активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичних мембран та майже не впливає на Na^+, K^+ -АТРазу (залишкова ензиматична активність становить 90 – 95 % від контролю) та на „базальну” Mg^{2+} -АТРазу (108 % відносно контролю).

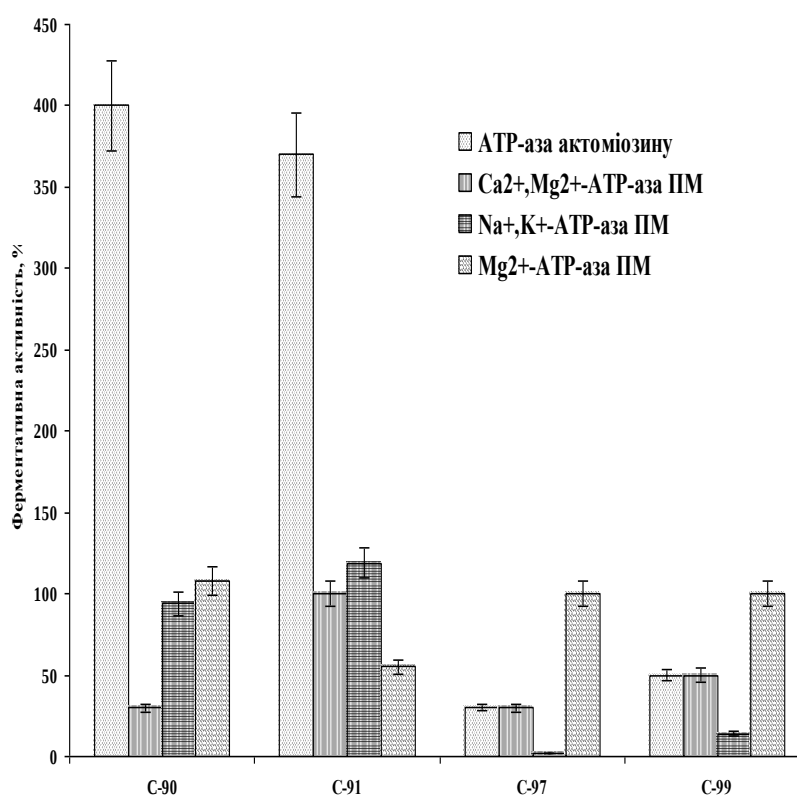


Рис. 6.3. Порівняльний аналіз впливу вибраних калікс[4]аренів (100 мкМ) на ензиматичну активність Mg^{2+} -залежних АТРаз міометрія ($M \pm m$; $n = 5-7$)

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

Калікс[4]арен C-91, як і попередній, майже у 4 рази активує АТР-гідролазну реакцію, що каталізується актоміозиновим комплексом. Ензиматична активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичних мембран

практично не змінюється в присутності калікс[4]арену С-91 (залишкова активність 95 % щодо контролю), лише на 20 % в порівнянні з контролем зростає активність Na^+, K^+ -АТРази, але наполовину зменшується активність Mg^{2+} -АТРази - до 53 – 55 % стосовно контрольного значення, прийнятого за 100 %.

Калікс[4]арени С-97 та С-99 виявили практично однаковий інгібуючий вплив на процес гідролізу АТР, що каталізується АТРазою актоміозину та $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазою плазматичних мембран. Калікс[4]арен С-97 гальмує активність обох ензимів на 70 % щодо контролю, а калікс[4]арен С-99 – наполовину. Ще більший гальмівний ефект цих калікс[4]аренів спостерігався у їх дії на питому активність Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани: майже повністю її пригнічує каліксарен С-97 та на 86 % стосовно контролю - калікс[4]арен С-99. Втім, обидва каліксарени не впливали на „базальну” Mg^{2+} -АТРазну активність плазматичних мембран.

На рис. 6.4 показана концентраційна залежність впливу калікс[4]аренів С-90 та С-91 на АТРазну активність скоротливого комплексу гладенького м'яза матки. У цих дослідках за основу було прийняте каталітичне титрування АТРази актоміозину калікс[4]аренами у різних концентраціях (від 10^{-5} до 10^{-4} М). Результати експериментів демонструють значне підвищення ензиматичної активності навіть за наявності в інкубаційному середовищі 10 мкМ калікс[4]аренів: активація калікс[4]аренами С-90 та С-91 АТРазної активності привела до дво- та триразового (відповідно) її зростання порівняно з контролем. При підвищенні концентрації калікс[4]арену С-90 до 100 мкМ спостерігається дозозалежне зростання активації процесу гідролізу АТР до 400 ± 48 % ($M \pm m$; $n=6$) відносно контрольного значення. Калікс[4]арен С-91 в інтервалі концентрацій від 10 до 20 мкМ активує процес гідролізу АТР, що каталізується актоміозином, до 370 ± 42 % ($M \pm m$; $n=6$) щодо контролю, при подальшому зростанні

концентрації цього калікс[4]арену спостерігається тенденція до виходу графіка на плато. Значення уявної константи активації АТРази актоміозину калікс[4]ареном С-90 становить 52 ± 11 мкМ, водночас, калікс[4]ареном С-91 – 8 ± 2 мкМ, що свідчить про більшу чутливість скоротливого комплексу до каліксарену С-91 ($n=6$).

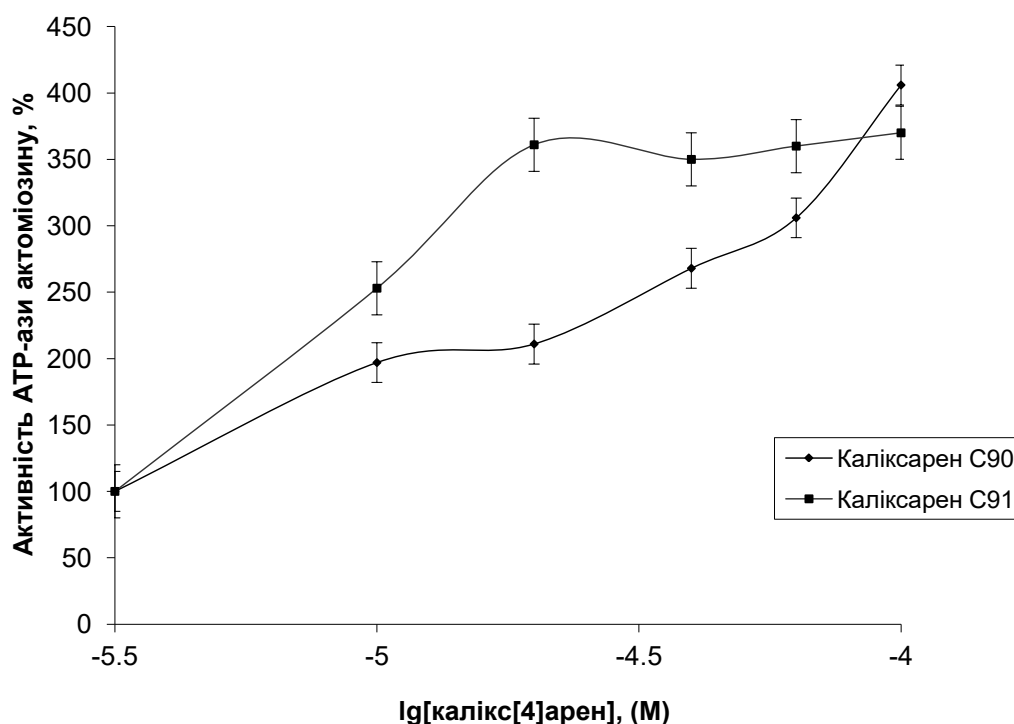


Рис. 6.4. Каталітичне титрування калікса[4]ренами С-90 та С-91 АТРази актоміозину міометрія ($M \pm m$; $n = 6$)
За 100 % (контроль) прийнято значення питомої ензиматичної активності у відсутності калікс[4]аренів у середовищі інкубації

Отже, калікс[4]арени С-90 та С-91 різнонаправлено впливають на ензиматичну активність різних у функціональному відношенні Mg^{2+} -АТРаз міометрія. Обидві сполуки ефективно активують АТРази актоміозину, що суттєво відрізняє цей вплив від дії на активність мембранозв'язаних Mg^{2+} -залежних АТРаз: калікс[4]арен С-90 гальмує

активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази та не впливає на активність Na^+, K^+ -АТРази та “базальної” Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани, а каліксарен С-91 гальмує “базальну” Mg^{2+} -АТРази, не впливаючи на $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази та має невеликий активуючий ефект на Na^+, K^+ -АТРази. Очевидно, у випадку цих калікс[4]аренів суттєву роль у їх взаємодії з Mg^{2+} -залежними АТРазами відіграють особливості структурної організації та регуляції цих АТРаз, а також властивості фосфоліпідного матрикса плазматичної мембрани, який може впливати на чутливість ензимів до каліксаренів.

У дослідях із каталітичного титрування АТРазної активності актоміозину міометрія калікс[4]аренами С-97 та С-99 у концентраціях від 10^{-5} до 10^{-4} М було знайдено, що ці сполуки у концентрації від 10 до 20 мкМ практично не впливають на процес ензиматичного гідролізу АТР, який каталізується скоротливим комплексом. При збільшенні їх концентрації спостерігається дозозалежне гальмування АТР-гідролазної реакції актоміозину, яке при концентрації 100 мкМ досягає 70 % відносно контролю (уявна константа інгібування $I_{0,5} = 88 \pm 12$ мкМ) ($M \pm m$; $n=5$) для калікс[4]арену С-97 та 50 % щодо контролю для калікс[4]арену С-99 (уявна константа інгібування $I_{0,5} = 86 \pm 15$ мкМ) ($M \pm m$; $n=5$) (рис. 6.5).

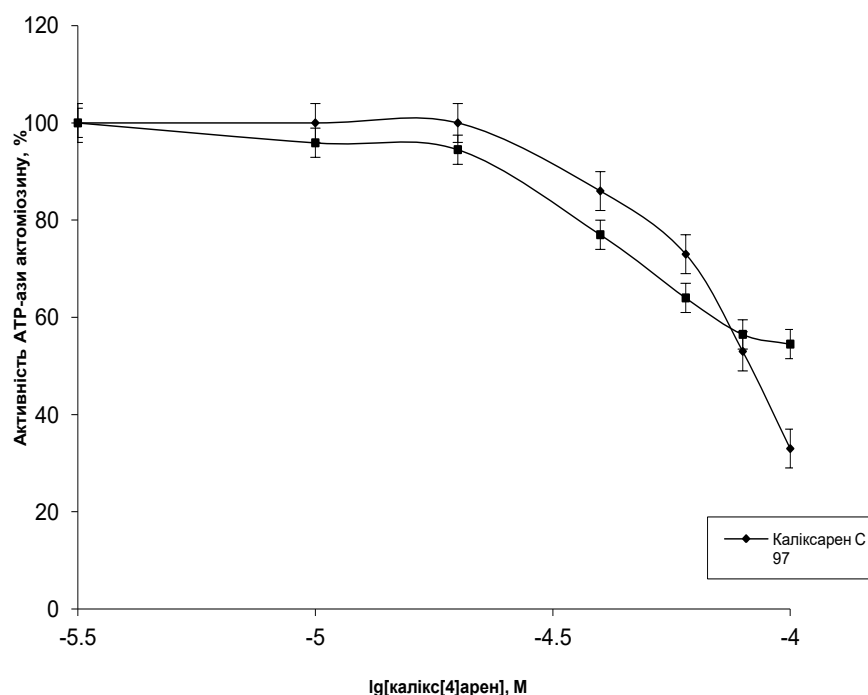


Рис. 6.5. Каталітичне титрування калікс[4]аренами С-97 та С-99 АТР-ази актоміозину міометрія ($M \pm m$; $n = 6$)
За 100 % (контроль) прийнято значення питомої ензиматичної активності у відсутності калікс[4]аренів у середовищі інкубації

Таким чином, результати вищенаведених порівняльних експериментів із каталітичного титрування калікс[4]аренами С-97 та С-99 АТР-ази актоміозину та Na^+, K^+ -АТР-ази плазматичних мембран міометрія, вказують на значно більшу чутливість Na^+ -помпи до цих каліксаренів порівняно з АТР-азою скоротливого комплексу. Величина уявної константи інгібування АТР-ази актоміозину каліксаренами С-97 та С-99 ($I_{0,5}$ становить 88 ± 9 та 86 ± 8 мкМ відповідно) на три порядки більше, ніж у випадку Na^+, K^+ -АТР-ази плазматичної мембрани ($I_{0,5}$ дорівнює 33 ± 4 та 98 ± 8 нМ відповідно). Цікаво, що при дії убаїну повне інгібування “убаїнчутливої” Na^+, K^+ -АТР-азної активності

спостерігається при концентрації 1 мМ, у цьому випадку $I_{0,5} = 21 \pm 5$ мкМ. Зазначені калікс[4]арени навіть у концентрації 100 мкМ практично не впливають на активність “базальної” Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани.

Отже, було продемонстровано, що структурно схожі калікс[4]арени С-97 та С-99 здійснюють однонаправлену (гальмівну) дію на три функціонально різні Mg^{2+} -АТРази міометрія – АТРази актоміозину та дві АТРази, які відносять до АТРаз Р-типу, а саме Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази та Na^{+}, K^{+} -АТРази плазматичної мембрани. Така подібність у дії цих сполук на Mg^{2+} -АТРазні системи може бути обумовлена подібністю механізму ензиматичного гідролізу нуклеозидтрифосфату цими АТРазами. Різна чутливість цих Mg^{2+} -залежних АТРаз до дії калікс[4]аренів можна пояснити структурними та функціональними особливостями різних ензиматичних систем, пов'язаними з їх функціональною роллю в міоцитах. Виключення складає тільки “базальна” Mg^{2+} -АТРаза плазматичної мембрани.

Як можна бачити, було продемонстровано, що вибрані калікс[4]арени виявляють вплив на активність низки важливих ензимів, задіяних у енергозабезпеченні процесу скорочення м'язів. Одержані результати можуть бути корисними для подальших досліджень, спрямованих на встановлення кореляції між структурою каліксаренів та їх дією на різні АТР-гідролазні ензимні системи, а також на використання каліксаренів як потенційних фармакологічних сполук, здатних модулювати скоротливу функцію матки при деяких патологіях вагітності у жінок.

6.2. ЗАХИСНИЙ ВПЛИВ ТІАКАЛІКС[4]АРЕН-ТЕТРАСУФОНАТУ НА ІНГІБУВАННЯ АТР-ГІДРОЛАЗНОЇ АКТИВНОСТІ СУБФРАГМЕНТА-1 МІОЗИНУ МІОМЕТРІЯ КАТІОНАМИ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

Велику кількість патологій в жінок, обумовлених порушенням скоротливої функції гладенького м'язу матки (міометрій), пов'язують з накопиченням важких металів у довкіллі [28, 29]. Скоротлива функція гладенького м'язу матки пов'язана з роботою основного структурного та скоротливого протеїну гладенького м'язу матки – міозину. Завдяки АТРазі міозин використовує хімічну енергію гідролізу АТР для виконання механічної роботи, яка приводить у рух голівки міозину вдовж актинових філаментів, в результаті чого відбувається скорочення м'язів [30].

Відомо, що Pb^{2+} та Cd^{2+} є найпоширенішими в навколишньому середовищі серед катіонів важких металів та мають найбільшу здатність накопичуватись в тканинах живих організмів. Вони токсичні для багатьох фізіологічних систем у хребетних, в тому числі і для репродуктивної. Матка є органом, здатним накопичувати ці метали [31-33]. Ni^{2+} , як біометал, у надлишковій кількості є токсичним для живих організмів і може спричинювати низку патологій. Хронічна інтоксикація Ni^{2+} підвищує ризик розвитку новоутворень легенів, нирок, шкіри, шлунка. Відомий його негативний вплив на репродуктивну систему людини та тварин [33, 34]. Встановлено інгібувальну дію Ni^{2+} , а також Pb^{2+} та Cd^{2+} на АТР-гідролазну активність актоміозинового комплексу міометрія свині [35, 36].

Негативний вплив Pb^{2+} , Cd^{2+} та Ni^{2+} на скоротливі властивості міометрія потребує пошуку фармакологічних сполук, які можуть усунути дію цих металів.

Перспективним класом сполук для такого пошуку є похідні каліксаренів [37] та тіакаліксаренів [38], які містять на макроциклічній молекулярній платформі рецепторні угруповання, здатні до селективного зв'язування катіонів металів певного типу [39]. Похідні каліксаренів, завдяки здатності зв'язувати в супрамолекулярні комплекси катіони (біо)металів, знайшли застосування в біомедичних дослідженнях як мембранотропні препарати [40], модулятори АТР-залежних кальцієвих насосів [41], інгібітори металоферментів [42], сорбенти радіонуклідів, [43] сенсори [44].

Об'єктом наших досліджень був тетрагідрокситіакалікс[4]арен-тетрасульфонат (сполука С-798) (рис. 6.6а) у формі тетранатрової солі [45]. У цій сполуці щільно розміщені на нижньому вінці макроциклу гідроксильні групи та атоми двохвалентної сірки, що здатні хелатувати перехідні та важкі метали, в тому числі Pb^{2+} , Cd^{2+} та Ni^{2+} з утворенням міцних металокомплексів (рис. 6.6б) [46]. Верхній вінець макроциклу містить чотири аніонні сульфонатні угруповання, котрі забезпечують гарну водорозчинність тіакаліксарену та адгезію до протеїнових молекул за рахунок електростатичних контактів з позитивно зарядженими атомами азоту амінокислотних фрагментів [47].

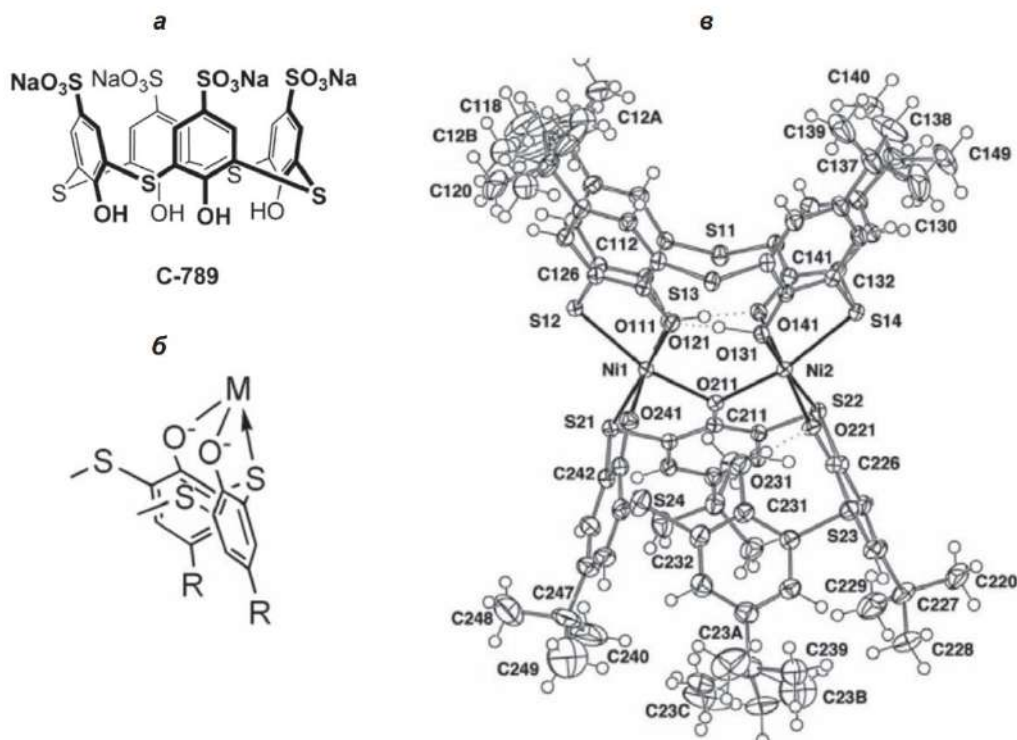


Рис. 6.6. Молекулярна формула сполуки C-789 (а) та структура халатного комплексу з катіоном металу (б). Молекулярна структура комплексу $[\text{Ni}_2(\text{тіакаліксарен} \cdot \text{Me}_2\text{CO})(\text{тіакаліксарен} \cdot \text{dmf})]$ (Me_2CO – ацетон; dmf – диметилформамід – не показано) [48] (в)

Детальне вивчення будови комплексу *трет*-бутилтіакалікс[4]арену з Ni^{2+} за допомогою методів ЯМР-спектроскопії та рентгеноструктурних досліджень (рис. 6.6в) чітко вказує на те, що атоми сірки беруть безпосередню участь у формуванні комплексу [48].

У цій роботі проведені дослідження сумісної дії катіонів важких металів (Pb^{2+} , Cd^{2+} та Ni^{2+}) та тіакаліксарену C-798 на біохімічний процес, який є найважливішим елементом молекулярного механізму скорочення міометрія - АТРазну активність субфрагмента-1 міозину. Як відомо, субфрагмент-1 є основною функціональною одиницею міозину, оскільки навіть в ізольованому стані він має АТРазну активність, близьку до активності нативного міозину. Завдяки розчинності у розчинах з низькою іонною силою (на відміну від міозину) субфрагмент-1 є зручною моделлю для вивчення впливу будь-яких

ефекторів на АТР-гідролазну активність скоротливих протеїнів. У цій роботі приймали участь к.б.н. Р.Д. Лабинцева та к.б.н. О.В. Бевза.

Препарат актоміозину отримували із гладенького м'яза матки (міометрія) свині методом, описаним у попередній роботі [36]. Препарат субфрагмента-1 міозину одержували із актоміозину свині за методом Weeds & Taylor [49] з деякими модифікаціями [36]. Чистоту препарату контролювали методом електрофорезу в поліакриламідному гелі за денатуруючих умов. Активність АТРази субфрагмента-1 міозину визначали при температурі 37 °С у середовищі інкубації (загальний об'єм 1 мл) такого складу (в мМ): трис-НСІ буфер (рН 7,2) – 20, КСІ – 100, СаСІ₂ – 0,01, МgСІ₂ – 5, АТР – 3 (стандартні умови). Концентрація протеїну – 20 мкг/мл. Тривалість інкубації – 1 хв. Контролем на неензиматичний гідроліз АТР слугували проби, в яких актоміозин був відсутній. Кількість відщепленого від нуклеозидтрифосфату неорганічного фосфату Р_i під час АТР-гідролазної реакції визначали методом Chen [50]. Суперпреципітацію актоміозину досліджували при кімнатній температурі у середовищі інкубації (загальний об'єм 2 мл) такого складу: трис-НСІ буфер (рН 7,2) – 5, КСІ – 100, СаСІ₂ – 0,01, МgСІ₂ – 5 (стандартні умови). Концентрація протеїну – 500 мкг/мл. Запускали реакцію суперпреципітації додаванням до інкубаційного середовища, яке містило протеїн, аліквоту АТР до кінцевої концентрації 4 мМ. Кінетику суперпреципітації актоміозину реєстрували на спектрофотометрі СФ-26, λ 550 нм. Тривалість дослідження – 10 хв. В наших дослідах значення АТР-гідролазної активності субфрагмента-1 міозину становили 50-80 мкмоль Р_i / хв на мг протеїну. Вплив Рb²⁺, Cd²⁺ та Ni²⁺ окремо, а також разом з калікс[4]ареном С-798 на питому ензиматичну активність АТРази субфрагмента-1 міозину та суперпреципітацію актоміозину досліджували у стандартному середовищі інкубації. Концентрація Рb²⁺, Cd²⁺ та Ni²⁺ у пробі становила 0,03 – 0,3 мМ,

каліксарену – 100 мкМ. Коефіцієнти інгібування $I_{0,5}$ визначали графічно як концентрацію катіонів важких металів, за яких інгібування АТРазної активності субфрагмента-1 становило 50 % від контрольного значення (стандартні умови).

Концентрацію катіонів двовалентних металів у розчинах визначали титруванням за методом Мора [51].

Тетрасульфонат С-798 був синтезований з виходом 70 % *іпс*-сульфонуванням *трет*-бутилтіакалікс[4]арену концентрованою сірчаною кислотою при 80 °С, та наступною обробкою хлоридом натрію за методом [45] (схема 1).

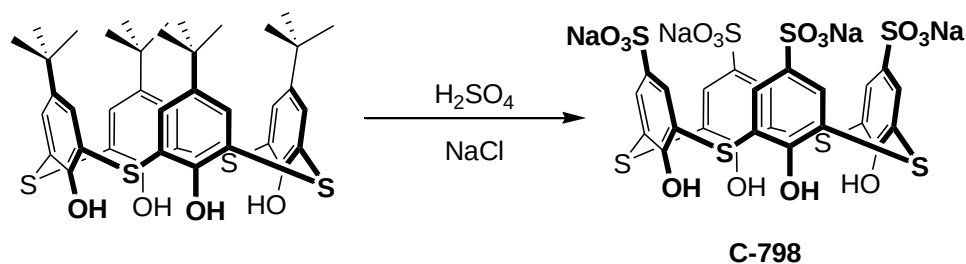


Схема 1

Комп'ютерне моделювання (докінг) взаємодії досліджуваних лігандів (Pb^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} та тіакаліксарену С-798 із субфрагментом-1 міозину проводили у програмі Autodock 4.2 [52]. Під час розрахунку енергії зв'язування враховувалися ван-дер-ваальсові, електростатичні та гідрофобні взаємодії, водневі зв'язки, а також внесок енергії десольватації. Відбір оптимальних результатів проводили як за геометричними показниками положення ліганду в центрі зв'язування комплексу «протеїн – ліганд», так і за енергетичними показниками, використовуючи «вбудовані» в програмі докінгу функції розрахунку енергії зв'язування в комплексі «рецептор – ліганд».

Процедуру докінгу в активний центр субфрагмента-1 міозину було виконано для лігандів із повністю іонізованими фрагментами. Для іонів металів (Cd^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+}) використовували стандартні параметри силового поля AMBER. При моделюванні взаємодії лігандів із субфрагментом-1 міозину міометрія здійснювали так званий напівгнучкий докінг і відбирали низку комплексів з найменшою вільною енергією зв'язування лігандів. Далі розраховували оптимальну геометрію утворених комплексів та визначали енергетично найвигідніше розташування тіакаліксарену у просторі субфрагмента-1 міозину. У роботі використовували просторову структуру субфрагмента-1 міозину, з ідентифікатором - 1B7T в базі даних протеїнів (RSCB Protein Data Bank) [53]. Для аналізу результатів та підготовки рисунків із результатами докінгу використовували програми "Chimera" [54] та "Yasara" [55].

Перш за все було досліджено вплив Pb^{2+} , Cd^{2+} та Ni^{2+} на АТР-гідролазну активність міозину гладенького м'яза матки, зокрема його субфрагмента-1, який є основною функціональною одиницею міозину. На рис. 6.7 представлена залежність АТРазної активності субфрагмента-1 міозину від концентрації Pb^{2+} , Cd^{2+} та Ni^{2+} . Катіони важких металів додавали до стандартного середовища інкубації (яке містило 3 мМ АТР, 5 мМ Mg^{2+} та 10 мкМ Ca^{2+}) у концентрації від 0,03 до 0,3 мМ. За 100 % приймали величину АТРазної активності субфрагмента-1 міозину у контрольних умовах, а саме в середовищі інкубації, яке не містило катіонів важких металів, але містило АТР, Mg^{2+} та Ca^{2+} . Величина активності АТРази за цих умов становила 50-80 мкмоль P_i / хв на мг протеїну. Катіони Pb та Cd виявляли яскраво виражений інгібувальний ефект на процес гідролізу АТР, каталізований субфрагментом-1 міозину: за 0,03 мМ концентрації Pb^{2+} та Cd^{2+} пригнічували АТРазну активність на 25 % та 20 % відповідно, при підвищенні концентрації до 0,3 мМ пригнічувальний ефект

збільшується в середньому до 88 % від контролю у присутності Pb^{2+} та до 56 % відносно контролю у присутності Cd^{2+} . Величина коефіцієнтів $I_{0,5}$ для цих катіонів складає $0,08 \pm 0,01$ мМ та $0,30 \pm 0,03$ мМ відповідно. Значно менший інгібувальний вплив встановлений за присутності катіонів Ni – за 0,3 мМ концентрації Ni^{2+} інгібував активність АТРази субфрагмента-1 міозину на 30 %.

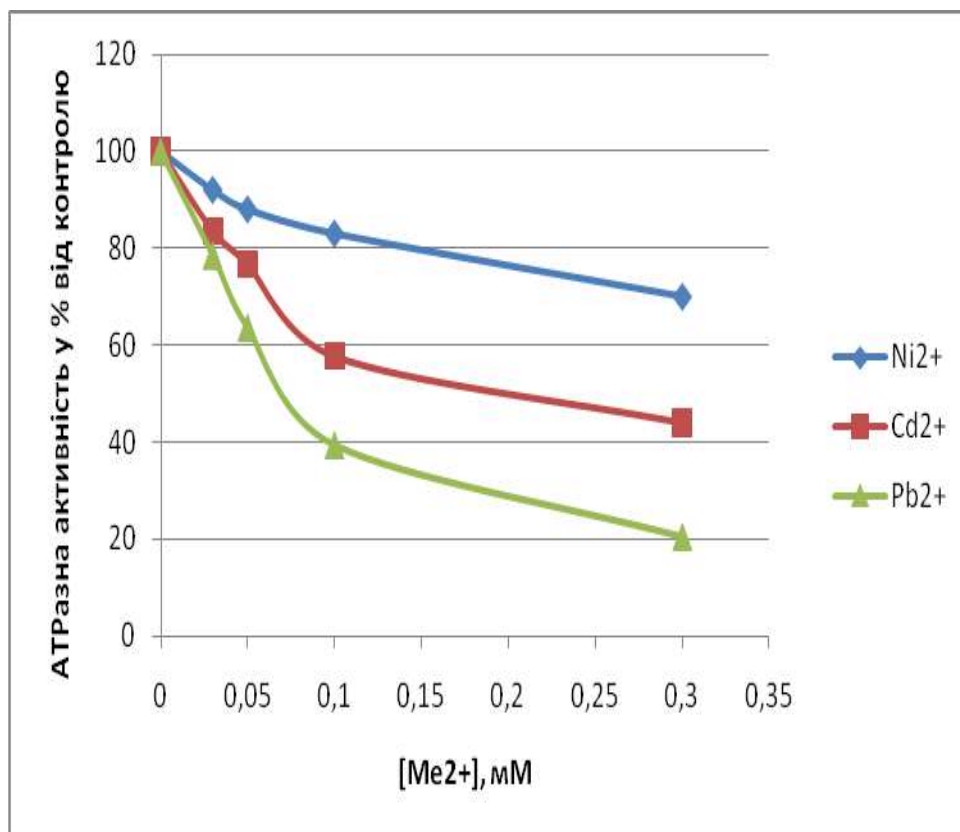


Рис. 6.7. Концентраційна залежність впливу катіонів Pb , Cd та Ni на АТРАЗну активність субфрагмента-1 міозину міометрія. За 100 % приймали значення АТРАЗної активності без додавання катіонів важких металів

Щоб з'ясувати, чи зможе С-798 зняти негативний вплив Pb^{2+} , Cd^{2+} та Ni^{2+} на ензиматичну активність міозину гладенького м'яза матки, до інкубаційного середовища додавали розчин С-798 (50 мМ).

Відомо, що сульфонільні групи цього тіакаліксарену С-798 здатні за певних умов (рН 9,8) зв'язувати катіони Mg^{2+} та Ca^{2+} [56][s1], що

може бути причиною невеликого інгібувального впливу сполуки C-798 на АТРазну активність субфрагмента-1 міозину міометрія (рис. 6.8). Скоріше всього, це зумовлене вилученням з інкубаційного середовища певної кількості катіонів Mg, необхідних для зв'язування АТР в активному центрі АТРази та здійснення гідролізу нуклеозидтрифосфату. Втім, дослідження сумісної дії 0,1 мМ Pb^{2+} та Cd^{2+} та C-798 на процес гідролізу АТР, каналізований субфрагментом-1 міозину виявило здатність тіокаліксарену відновлювати до контрольного рівня АТРазну активність міозину міометрія у присутності катіонів важких металів (рис. 6.8). Тіакалікс[4]арен-тетрасульфонат виявляв подібну коригувальну дію відносно АТРазної активності субфрагмента-1 міозину за наявності 0,3 мМ Ni^{2+} (Рис. 6.9).

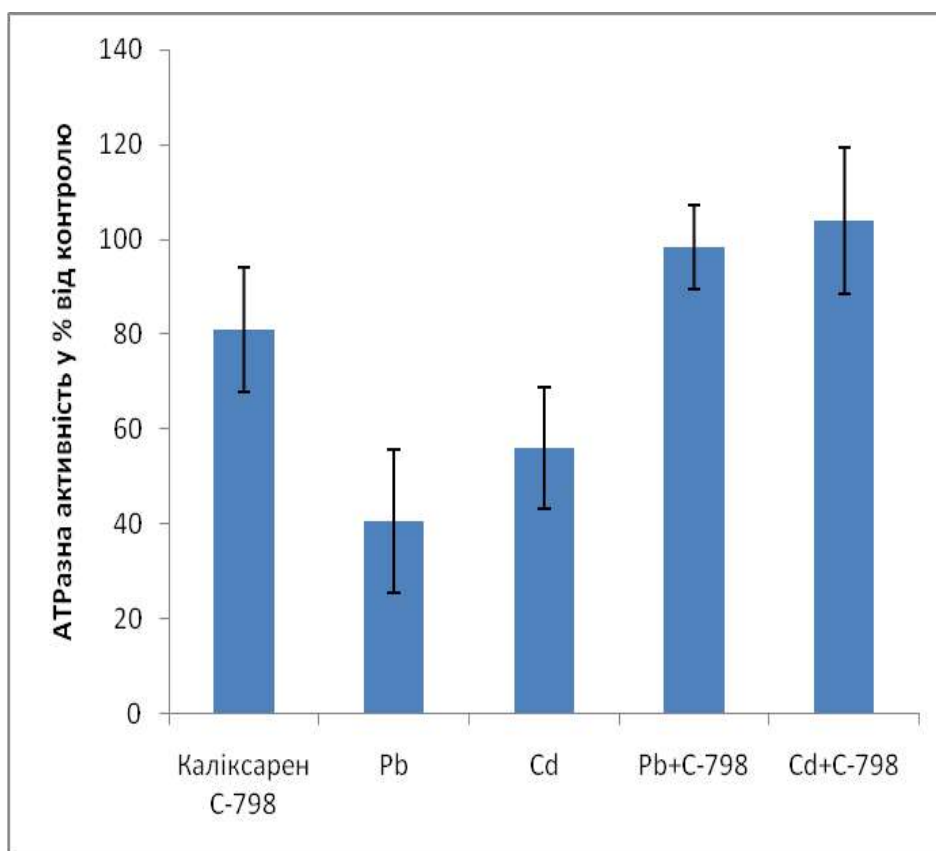


Рис. 6.8. Вплив 100 мкМ C-798 на АТРазну активність субфрагмента-1 міозину у присутності 100 мкМ Pb^{2+} та Cd^{2+} ($M \pm m$, $n = 5-6$)

За 100 % приймали значення АТРазної активності без додавання катіонів важких металів. *Різниця між значеннями « Pb^{2+} » та « Pb^{2+} +С-798» і ** різниця між значеннями « Cd^{2+} » та « Cd^{2+} +С-798» статистично вірогідні, $P < 0,05$

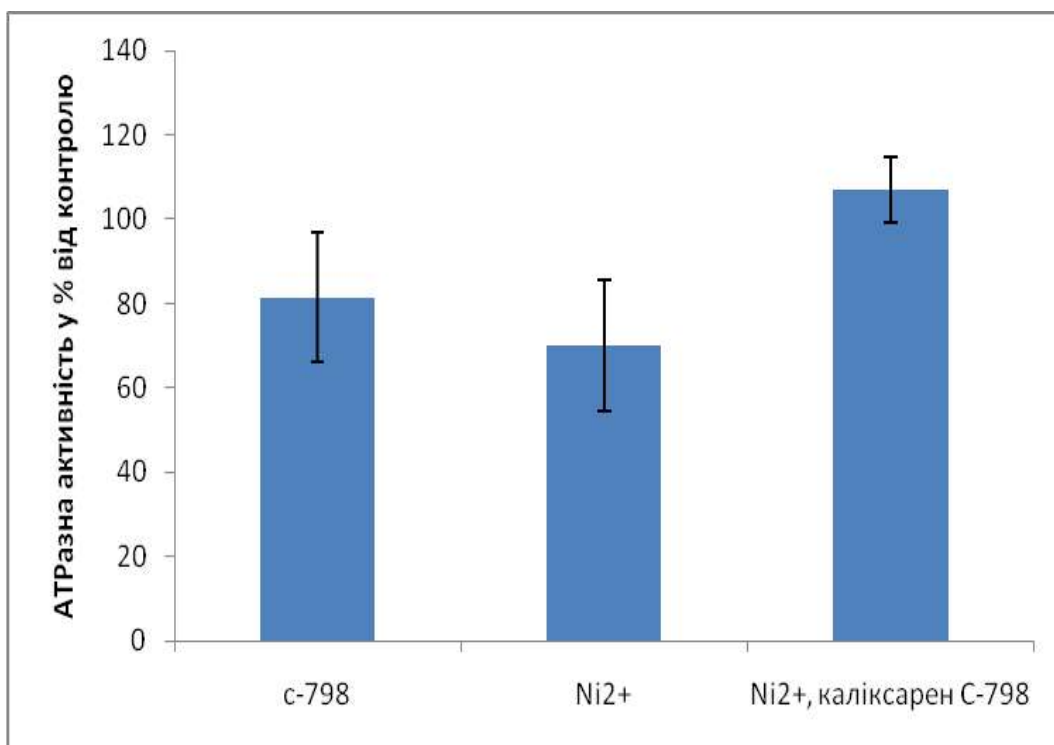


Рис. 6.9. Вплив 100 мкМ С-798 на АТРазну активність субфрагмента-1 міозину за присутності 300 мкМ Ni^{2+} ($M \pm m$, $n = 7-8$)

За 100 % приймали значення АТРазної активності без додавання катіонів важких металів. *Різниця між значеннями « Ni^{2+} » та « Ni^{2+} +С-798» статистично вірогідна, $P < 0,05$

Тіакалікс[4]арен-тетрасульфонат С-798 виявляв також відновлювальну дію на реакцію суперпреципітації актоміозину міометрія у присутності 300 мкМ Ni^{2+} (рис. 6.10). А як відомо, реакція суперпреципітації актоміозинового комплексу в певному наближенні характеризує його скоротливу здатність та пов'язана з процесом гідролізу АТФ в активному центрі міозину [57].

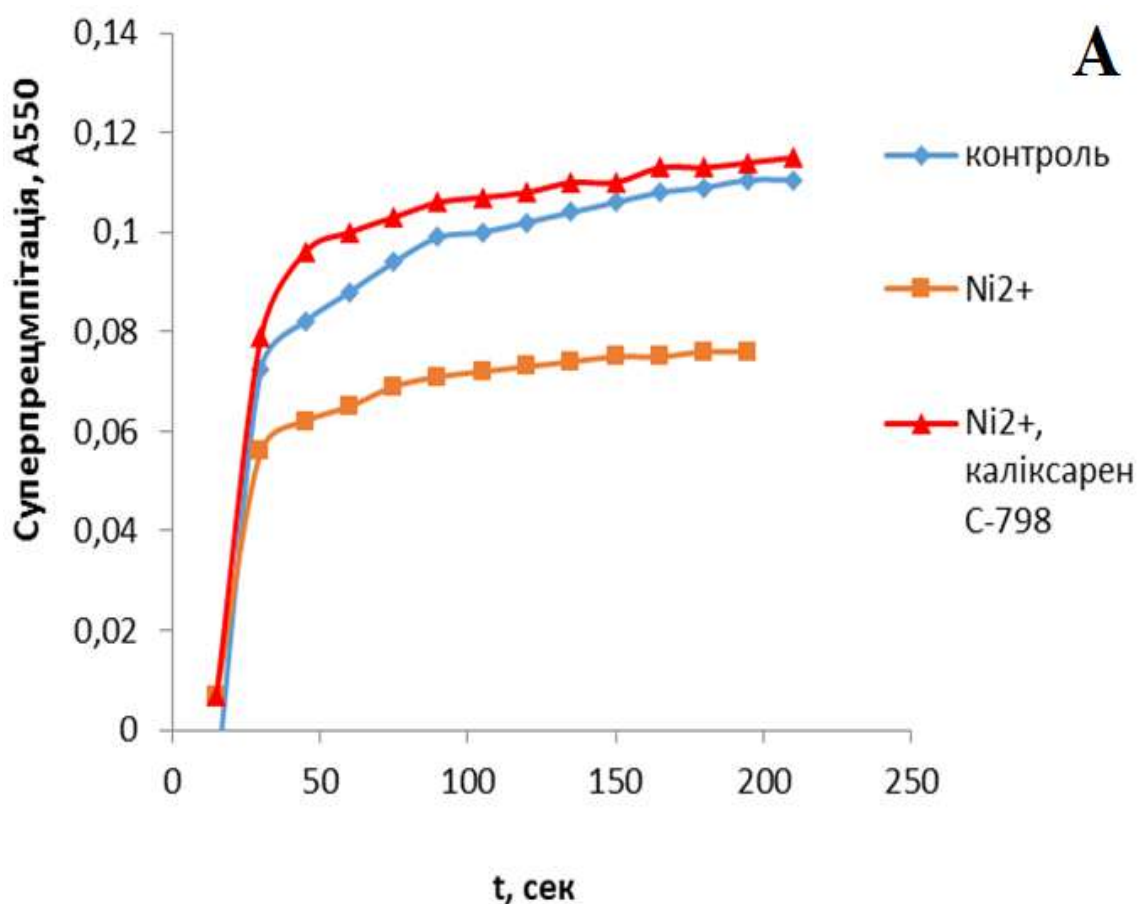


Рис. 6.10. Сумісна дія 0,3 мМ Ni²⁺ та 100 мкМ C-798 на суперпреципітацію актоміозину міометрія
Наведений типовий графік із вибірки n = 4

Щодо механізму корегувальної дії C-798 на АТР-гідролазну активність субфрагмента-1 міозину у присутності Pb²⁺, Cd²⁺ та Ni²⁺, то одним із найвирогідніших припущень може бути вилучення досліджуванним тіакаліксареном катіонів Pb, Cd та Ni із середовища інкубації, завдяки його здатності зв'язувати катіони важких металів. Водночас, цікаво, чи здатен цей тіакаліксарен «знешкоджувати» ті катіони важких металів, які вже зв'язалися в певних ділянках молекули міозину. Під час дослідження інших можливих механізмів коригувальної дії C-798 на АТРазу міозину міометрія у присутності важких металів необхідно було з'ясувати можливі ділянки зв'язування цих катіонів із субфрагментом-1 міозину, а також можливість взаємодії катіонів

металів з C-798 у структурі субфрагмента-1 міозину. З цією метою ми скористались методами комп'ютерного моделювання.

АТРазна активність міозину залежить від природи катіонів металів, присутніх в інкубаційному середовищі, та добре корелює з їхнім іонним радіусом. Іонні радіуси Mg^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} та Pb^{2+} у розчинах становлять 0,070; 0,067; 0,102 та 0,126 нм відповідно [58]. Очевидно, що взаємодія Cd^{2+} та Pb^{2+} з Mg^{2+} -зв'язувальними ділянками міозину істотно ускладнена через значно більший розмір катіонів Cd та Pb у порівнянні з Mg^{2+} . Але враховуючи експериментально доведену їх інгібувальну дію на АТРазну активність субфрагмента-1 міозину, можна припустити, що досліджувані катіони можуть зв'язуватися з іншими функціонально важливими ділянками субфрагмента-1, які відповідають за зв'язування та гідроліз АТР.

Методом комп'ютерного моделювання було встановлено, що катіони Pb^{2+} , Cd^{2+} та Ni^{2+} можуть взаємодіяти з амінокислотними залишками субфрагмента-1 міозину в декількох зонах, що мають відношення до функціонування ензиму. Причому місця зв'язування досліджуваних катіонів на поверхні субфрагмента-1 міозину відрізняються від місць зв'язування Mg^{2+} (Рис. 6.11).

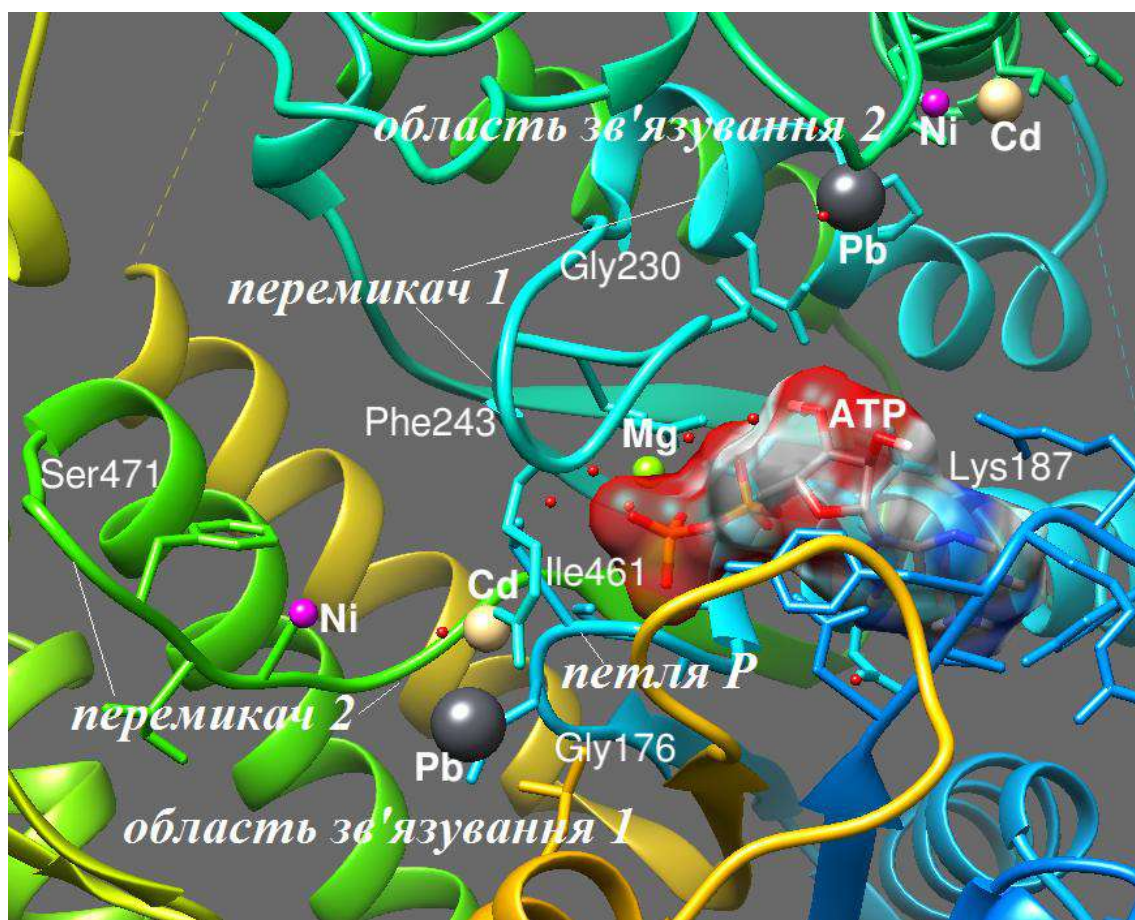


Рис. 6.11. Докінг Cd^{2+} (світло-жовтий), Pb^{2+} (чорний) та Ni^{2+} (рожевий) в зони зв'язування в області, наближеній до нуклеозидзв'язувальної ділянки субфрагмента-1 молекули міозину. На рисунку показано петлю Р (Gly176-Lys187), перемикач 1 (Gly230-Phe243) і перемикач 2 (Ile461-Ser471).

Як відомо, у формуванні АТР-зв'язувального центру беруть участь петля Р (Gly176-Lys187), перемикач 1 (Gly230-Phe243) і перемикач 2 (Ile461-Ser471), 50 кДа - «верхній» та 50 кДа - «нижній» субдомени, «реле» (Leu475-Glu506) [59, 60]. [s2]Тому найбільшу увагу ми звернули на дві найвірогідніші області зв'язування для кожного з катіонів (Cd^{2+} , Pb^{2+} , та Ni^{2+}), які наближені до АТР-зв'язувальної ділянки субфрагмента-1 міозину.

Встановлено, що катіон Cd координується з атомами кисню

Glu177 (довжина зв'язку 0,27 та 0,36 нм) і з атомом кисню Ser178 (довжина зв'язку 0,35 нм). Також Cd^{2+} взаємодіє з Arg236 (довжина зв'язку 0,3 нм) в області зв'язування 1 (рис. 6.12, А), яка знаходиться в нижній частині щілини між нуклеозидзв'язувальним центром та «нижнім» субдоменом розміром 50-кДа (Ser652-Leu666), безпосередньо біля петлі Р.

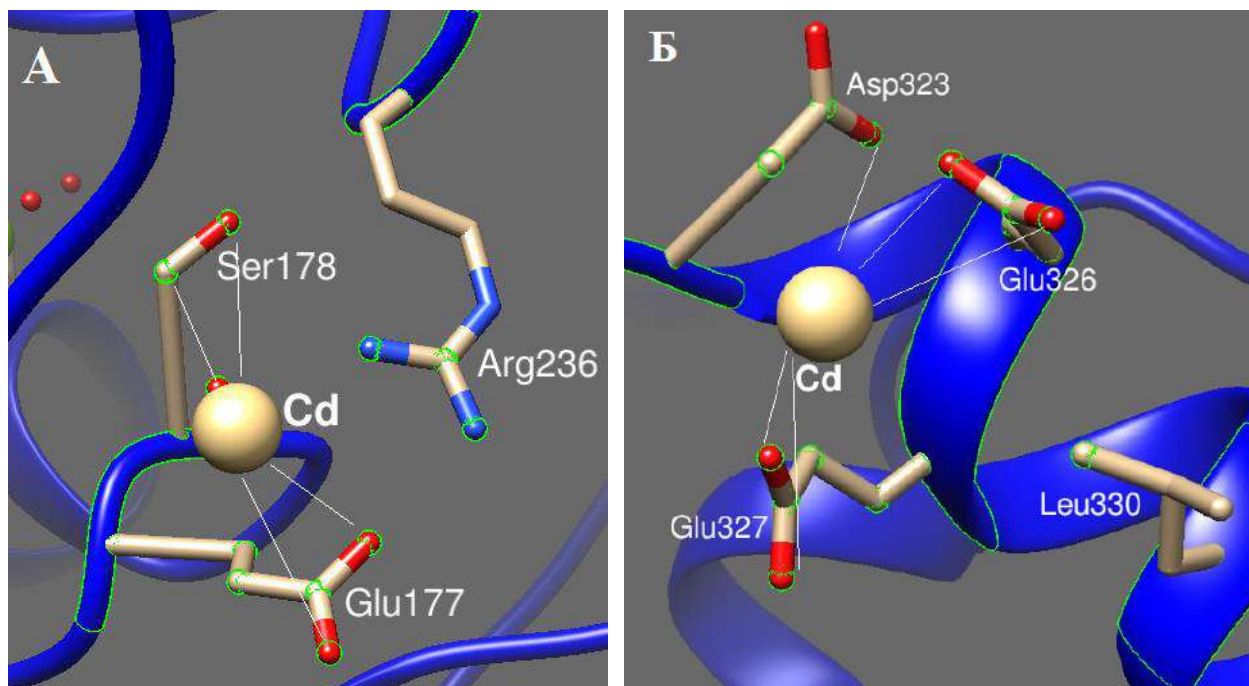


Рис. 6.12. Взаємодія катіона Cd із лігандзв'язувальною ділянкою субфрагмента -1 міозину у водному оточенні

Лініями показані водневі та іонні взаємодії. А та Б – 1 та 2 ділянки зв'язування

В області зв'язування 2 (рис. 6.12, Б), що знаходиться в нижній частині «верхнього» субдомену розміром 50 кДа (Leu218-Asp463, Glu605-Phe621) та яка наближена до перемикача 1 (Gly233-Phe246), катіон Cd координується із атомом кисню Glu327 (довжина зв'язку 0,24 нм), з атомом кисню Glu326 (довжина зв'язку 0,32 нм) та атомом кисню Asp323 (довжина зв'язку 0,35 нм). Ця ділянка зв'язування, як і 1, також має відношення до зв'язування та гідролізу АТФ.

Для катіона Pb виявлені дві можливі ділянки зв'язування з субфрагментом-1 міозину. Перша з них (рис. 6.13, А) контактує з перемикачем 1 та петлею Р, неподалік від спіралі «реле» (Leu475-Glu506). Катіон Pb координується з атомом кисню Glu177 (довжина зв'язку 0,32 нм), з атомами кисню Glu675 (довжина зв'язку 0,27 та 0,35 нм). Також катіон Pb взаємодіє з Arg236 (довжина зв'язку 0,25 нм) та Leu686 (довжина зв'язку 0,26 та 0,30 нм).

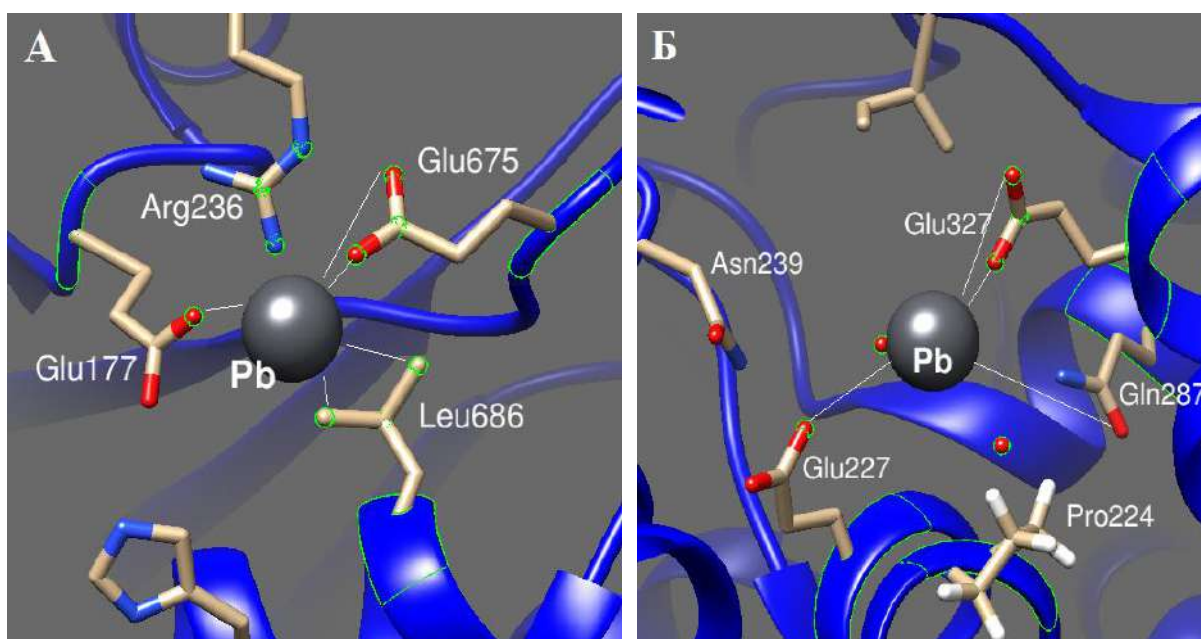


Рис. 6.13. Взаємодія катіона Pb із лігандзв'язувальною ділянкою субфрагмента-1 міозину у водному оточенні
Лініями показані водневі та іонні взаємодії. А та Б – 1 та 2 ділянки зв'язування

В іншій ділянці зв'язування (рис. 6.13, Б), катіон Pb координується з атомами кисню Glu327 (довжина зв'язку 0,25 та 0,34 нм), з атомом кисню Glu227 (довжина зв'язку 0,35). Також катіон Pb взаємодіє з Pro224 (довжина зв'язку 0,4 нм) та Gln287 (довжина зв'язку 0,45 нм). Ця ділянка зв'язування контактує з перемикачем 1, і також має відношення до зв'язування та гідролізу АТФ.

Катіон Ni може взаємодіяти із субфрагментом-1 міозину в області зв'язування, яка контактує з перемикачем 2, що бере участь у зв'язуванні АТР та його гідролізі, а саме взаємодіє з Glu 465 (довжина зв'язку 0,22 нм), Asp468 (довжина зв'язку 0,35 нм) та Leu653 (довжина зв'язку 0,37 нм). Ця область зв'язування знаходиться поблизу актинзв'язувальної ділянки та щілини між «верхнім» та «нижнім» 50 кДа субдоменами, на дні якої знаходиться АТР-зв'язувальна кишеня, де через Mg^{2+} зв'язується молекула субстрату. Вона зазнає складних конформаційних перетворень в процесі передачі енергії від АТР-гідролазного центру до актинзв'язувальної поверхні. Також катіон Ni, подібно до Cd^{2+} та Pb^{2+} , може взаємодіяти із протеїном в області зв'язування 2 (дані не наведено).

Можна зазначити, що взаємодія іонів з поверхнею протеїну відбувається, як правило, за участю їх гідратних оболонок. Якщо енергія зв'язку іона з дипольною молекулою води, яка залежить від іонного радіуса, менше теплової енергії, то на поверхні іонів вода не буде утримуватися. Під час взаємодії безпосередньо з поверхнею протеїну, іон металу з великим іонним радіусом міцніше зв'язується з негативно зарядженою групою амінокислотного залишку протеїну і може утворювати кулонівський комплекс на макромолекулі протеїну із загальною гідратною оболонкою. У цьому випадку іони металу повністю компенсують локальний поверхневий заряд протеїнової молекули, і зв'язування катіонів металу із протеїном стає міцнішим.

Дійсно, аналізуючи отримані результати щодо докінгу Cd^{2+} , Pb^{2+} та Ni^{2+} , можна вказати на те, що у зв'язуванні досліджуваних катіонів з молекулою міозину основне значення відіграють їх взаємодії з негативно зарядженими групами амінокислотних залишків ензиму, зокрема Glu та Asp.

Також ми провели дослідження взаємодії C-798 з катіонами Cd та Pb за умови їх попереднього докінгу в лігандзв'язувальну ділянку

субфрагмента-1 міозину. Цей тіакаліксарен знаходиться в конформації «конус», яка стабілізується внутрішньомолекулярними водневими зв'язками між фенольними групами. Спочатку ми отримали енергетично мінімізовану структуру C-798: загальна енергія після мінімізації становила 62,45 ккал/моль. Наявність іонізованих сульфонільних груп на верхньому вінці та гідроксильних груп на нижньому вінці тіакаліксарену істотно збільшує внесок електростатичних взаємодій в загальну енергію взаємодії «гість-хазяїн» [61].[s3]

На рис. 6.14 наведені результати вбудовування C-798 в структуру субфрагмента-1 міозину за умови попереднього зв'язування протеїном катіонів Cd (рис. 6.14, А) та Pb (рис. 6.14, Б) в області зв'язування 1 для кожного катіону. Катіон Cd взаємодіє з атомами кисню нижнього ободу та місткової сірки C-798 (O3 – 0,21 нм; S1 – 0,3 нм, O2 – 0,33 нм). При цьому спостерігається зміна положення катіона в цій області зв'язування. Показано, що Cd^{2+} дещо відходить від амінокислотних залишків петлі P, і його взаємодія з атомом кисню Glu177 послаблюється (довжина зв'язку 0,39 нм) (рис. 6.14, А).

У разі взаємодії з катіоном Cd, C-798 фіксується у «западині» моторного домена субфрагмента-1 міозину за участі декількох амінокислотних залишків. Зокрема, гідрофобна корзина тіакаліксарену фіксується залишками ароматичних амінокислот Phe467 та Phe469 субфрагмента-1 міозину, негативно заряджені атоми кисню тіакаліксарену взаємодіють із позитивно зарядженими залишками амінокислот – Arg570, Asn572 та His689.

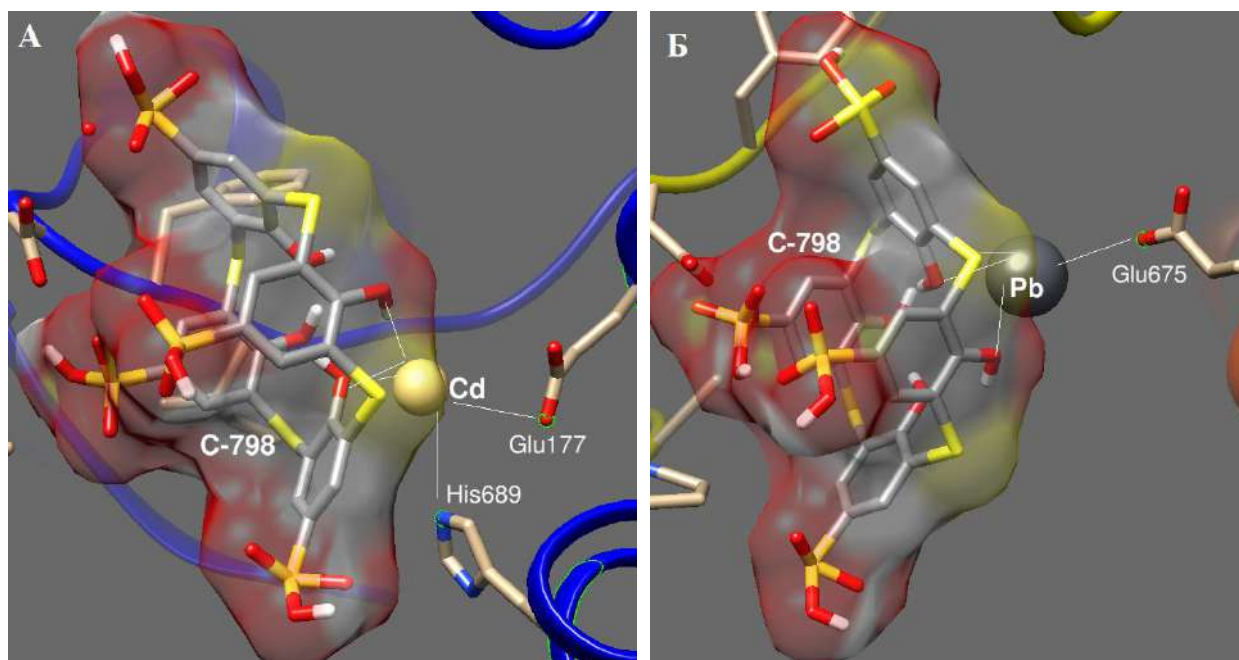


Рис. 6.14. Вплив C-798 на взаємодію катіонів Cd (А) та Pb (Б) із амінокислотними залишками субфрагмента-1 в області зв'язування 1 кожного з катіонів

Катіон Pb, подібно до Cd^{2+} , взаємодіє з атомами кисню нижнього ободу та місткової сірки каліксарену (S2 – 0,23 нм; O1 – 0,25 нм; O3 – 0,28 нм) (рис. 6.14, Б) і також дещо віддаляється від попереднього місця зв'язування в області 1 (рис. 6.14, Б). Катіон Pb^{2+} перестає взаємодіяти із атомом кисню Glu177, а координування з Glu675 стає слабкішим (довжина зв'язку 0,39 нм). Водночас, гідрофобна корзина C-798 фіксується залишками ароматичних амінокислот Phe464 та Phe467 субфрагмента-1 міозину, негативно заряджені атоми кисню калікс[4]арену взаємодіють із позитивно зарядженими залишками амінокислот – Pro571, Asn572 та Gln573.

Також ми дослідили вплив C-798 на зміну геометрії положення катіонів Cd та Pb при докінгу в область зв'язування 2 субфрагмента-1 міозину (рис. 6.15). За присутності тіакаліксарену, Cd^{2+} взаємодіє з атомами кисню третьої сульфонільної групи (O16 – 0,25 нм; O15 – 0,26

нм) (рис. 6.15, А), майже не взаємодіє з атомами кисню Asp323 та Glu326, а координування з Glu327 значно слабішає (довжина зв'язку 0,41 нм).

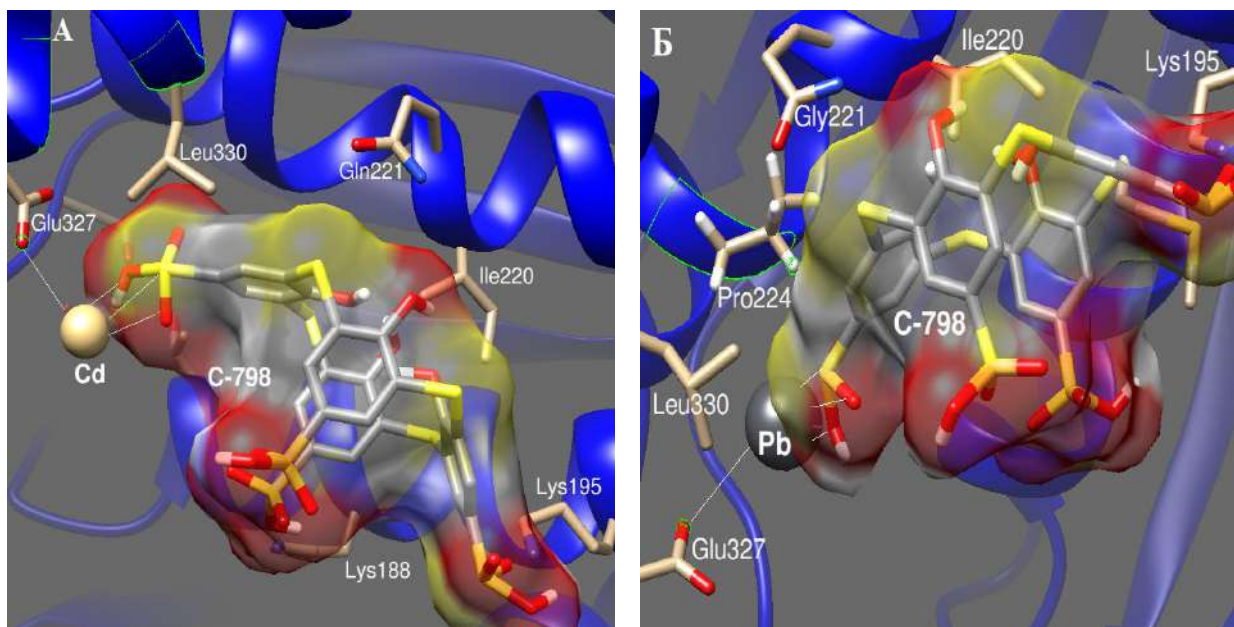


Рис. 6.15. Вплив C-798 на взаємодію катіонів Cd (А) та Pb (Б) із амінокислотними залишками S-1, в області зв'язування 2 кожного з катіонів. Лініями показані водневі та іонні взаємодії

У разі вбудовування C-798 як і у разі з Cd^{2+} катіон Pb також взаємодіє з атомами кисню третьої сульфонільної групи (O16 – 0,2 нм; O14 – 0,26 нм; O15 – 3,8 нм). При цьому даний катіон дещо віддаляється від попереднього місця зв'язування в області 2 субфрагмента-1 міозину, і нівелюється його взаємодія з атомом кисню Glu227, а з Glu327 координується лише з одним атомом кисню, причому їх взаємодія значно послаблюється (довжина зв'язку 0,41 нм) (рис. 6.15, Б). В обох випадках тікаліксарен фіксується у «западині» протеїну за участі декількох амінокислотних залишків (рис.6.15). Зокрема, негативно заряджені атоми кисню сульфонільних груп тікаліксарену взаємодіють із позитивно зарядженими залишками

амінокислот – Lys188, Lys195 та Gln221 субфрагмента-1 міозину.

На рис. 6.14 та рис. 6.15 С-798 «оточений» напівпрозорою поверхнею, яка відображає карту розповсюдження електростатичних взаємодій, зумовлених наявністю атомів кисню (червоний колір) та атомів сірки (жовтий колір). Згідно з рисунками, катіони Cd та Pb контактують і навіть дещо перекриваються з даною поверхнею. Це свідчить про те, що досліджувані катіони знаходяться у досить тісній взаємодії з негативно зарядженими атомами верхнього та нижнього вінців С-798. Ймовірно, що тіакаліксарен «відтягує» на себе катіони Pb та Cd, наслідок чого взаємодія катіонів із амінокислотними залишками ензиму послаблюється.

Отже, результати докінку С-798 у ділянку субфрагмента-1 міозину, яка наближенна до АТР-гідролазного центру, за умови зв'язування з протеїном катіонів Cd^{2+} , Pb^{2+} , вказують на ймовірність взаємодії функціональних груп С-798 з катіонами важких металів. При цьому зв'язки катіонів Cd та Pb із залишками амінокислот субфрагмента-1 міозину істотно послаблюються, і відстань між ними збільшується. Можливо, внаслідок цього знімається їх негативний вплив на АТРазну активність міозину.

Таким чином, встановлено інгібувальну дію Ni^{2+} , Pb^{2+} та Cd^{2+} (0,03 - 0,3 мМ) на АТР-гідролазну активність субфрагмента-1 міозину міометрія свині. Тіакалікс[4]арен-тетрасульфонат С-798 відновлює до контрольного рівня АТРазну активність субфрагмента-1 міозину у присутності катіонів важких металів. Одним із найбільш вірогідних припущень щодо механізму коригувальної дії С-798 може бути вилучення катіонів Pb^{2+} , Cd^{2+} та Ni^{2+} із середовища інкубації завдяки їх зв'язуванню з катіонами важких металів. Методом комп'ютерного моделювання було визначено можливі місця зв'язування Ni^{2+} , Pb^{2+} та Cd^{2+} із субфрагментом-1 міозину, встановлено тип зв'язків між цими катіонами та амінокислотними залишками, їх довжина та геометричні

характеристики. Показано зміну положення катіонів важких металів під час докінгу С-798 у ділянки зв'язування Pb^{2+} та Cd^{2+} в межах субфрагмента-1, що може свідчити про здатність С-798 взаємодіяти з катіонами важких металів, які зв'язалися з молекулою міозину. Кориговальна дія С-798 може бути наслідком послаблення взаємодії катіонів важких металів з амінокислотними залишками молекули міозину поблизу активного центру.

ЧАСТИНА ЧЕТВЕРТА.

КАЛІКСАРЕН-ІНДУКОВАНИЙ НЕЕНЗИМАТИЧНИЙ ГІДРОЛІЗ АТР

РОЗДІЛ 7. КАЛІКСАРЕНИ ТА АТР.

Добре відомо, що обов'язковою стадією протікання всіх каталітичних та ензиматичних процесів є комплексоутворення каталізатора/ензима з субстратом. У випадку ензиматичного каталізу важливу роль при цьому відіграє “геометрія” комплексу “ензим-субстрат”, яка забезпечує здійснення ефективного переносу електронів, протонів, хімічних груп і полегшує “атаку” реакційно-здатних хімічних груп ензиму на субстрат [1]. Із використанням методів лазерного фотолізу та пульсуючого радіолізу було продемонстровано, що водорозчинний каліксарен (калікс[4]арен-5,11,17,23-тетрасульфонат) може утворювати супрамолекулярні комплекси з нуклеозидтрифосфатом АТР, що є необхідним для забезпечення каліксарен-залежного гідролізу останнього [2]. Раніше в експериментах, виконаних на суспензії плазматичних мембран клітин міометрія, ми показали, що серед великої групи досліджених нами каліксаренів саме каліксарени С-97, С-99 та С-107 (вказані шифри) ефективно інгібують активність убаїн-чутливої Na^+, K^+ -АТРazi плазматичної мембрани (значення уявної константи інгібування $K_i < 0,1$ мкМ), але практично не впливають на активність так званої “базальної” (убаїн-резистентної) Mg^{2+} -АТРazi [3, 4, 5]. У той же час каліксарен С-91 суттєво стимулював Mg^{2+} , АТР-залежну акумуляцію іонів Са в мітохондріях міометрія, але практично не впливав на активність Na^+, K^+ -АТРazi плазматичної мембрани міоцитів матки, одночасно гальмуючи активність Mg^{2+} -АТРazi у цій субклітинній структурі [3, 6]. Проте при виконанні зазначених досліджень ми звернули увагу на те,

що калікс[4]арен C-107 має цікаву здатність – гідролізувати АТР у відсутності субклітинних мембранних структур у середовищі інкубації (процес неензиматичного гідролізу нуклеозидтрифосфату тестувався за звільненням одного з продуктів зазначеної реакції – неорганічного фосфату P_i).

Тому у цьому розділі ми розглянемо кінетичні властивості індукованої калікс[4]ареном C-107 реакції гідролізу АТР та проведемо дослідження комплексоутворення між цим калікс[4]ареном та нуклеозидтрифосфатом. У досліджах, що описані нижче, приймали участь к.б.н. О.А. Шкрабак та к.х.н. О.І. Кальченко.

7.1. ГІДРОЛІЗ АТР, ЯКИЙ СТИМУЛЮЄТЬСЯ ДЕЯКИМИ КАЛІКС[4]АРЕНАМИ

Для перевірки можливості неензиматичного гідролізу АТР ми досліджували 8 калікс[4]аренових сполук, які використовували у концентрації 100 мкМ. Було показано, що найбільш ефективно стимулює гідроліз АТР калікс[4]арен C-107 за умов використання середовища інкубації, яке містило (мМ): 1 АТР, 3 $MgCl_2$, 50 NaCl, 100 KCl, 1 ЕГТА, 20 Нерес-tris-буфер (pH 7,4) (температура – 37 °C). Тому у подальших дослідженнях ми вивчали дію на неензиматичний гідроліз АТР саме калікс[4]арену C-107 (рис. 7.1).

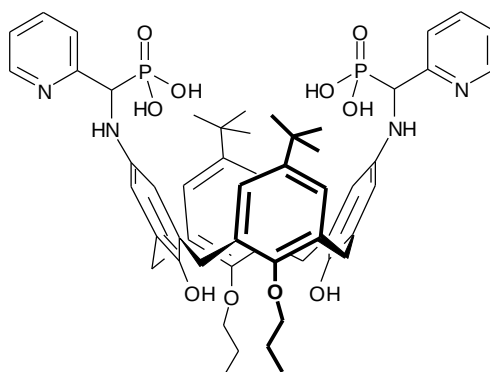


Рис. 7.1. Структурна формула калікс[4]арену С-107 (5,17-ди(фосфоно-2-піридилметил)аміно-11,23-ди-трет-бутил-26,28-дигідрокси-25,27-дипропоксикалікс[4]арен)

Реакцію ініціювали введенням до середовища інкубації 40 мкл розчину калікс[4]арену, а зупиняли – додаванням до інкубаційної суміші 1 мл “стоп”-розчину наступного складу: 1,5 М натрій оцтовокислий, 3,7 % формальдегід, 14 % етанол, 5 % ТХУ (рН 4,3 при 8 °С).

Важливо відзначити, що при проведенні цих дослідів нами були прийняті до уваги три контрольні проби на вміст неорганічного фосфату P_i у середовищі інкубації: 1) на вміст P_i , що був привнесений у середовище інкубації з реактивами (але за умов відсутності АТФ та каліксарену в ньому), 2) на вивільнення P_i внаслідок спонтанного гідролізу АТФ (у відсутності каліксарену) під час інкубації та 3) на вивільнення P_i при можливому спонтанному розкладі каліксарену (при відсутності АТФ) під час інкубації. Ми показали, що при вказаних вище концентраційних умовах з урахуванням відповідних контролів рівень гідролізу АТФ, що був індукований калікс[4]ареном С-107, становив $17,3 \pm 1,3$ нмоль P_i за 20 хв. інкубації; сукупний же контрольний рівень вивільнення неорганічного фосфату складав не більше 8-9 нмоль P_i за 20 хв. інкубації ($M \pm m$; $n = 6$) (рис. 7.2).

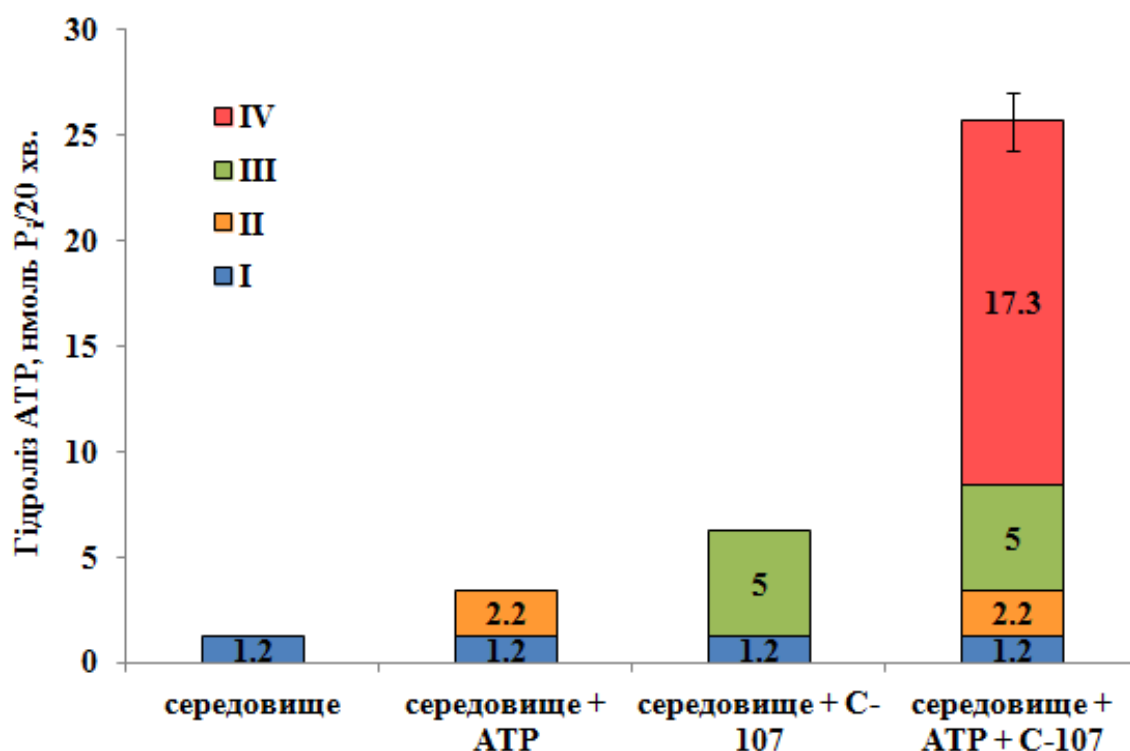


Рис. 7.2. Індукція калікс[4]ареном C-107 реакції гідролізу АТР ($M \pm m$; $n = 6$)

Тут: I, II та III – позначки “контролів” на вміст фосфату P_i у середовищі інкубації (за умов відсутності АТР та калікс[4]арену; в середньому – 1,2-1,5 нмоль P_i), на вивільнення P_i при спонтанному гідролізі АТР та при можливому розкладі калікс[4]арену під час інкубації відповідно, IV – суто калікс[4]арен-залежний гідроліз АТР. Цифрами на стовпчиках I-IV зазначені абсолютні середні значення кількості P_i (нмоль/20 хв.) у випадку відповідних контролів та суто реакції калікс[4]арен-залежного гідролізу АТР. Концентрація калікс[4]арену, АТР та $MgCl_2$ – 100 мкМ, 1 та 3 мМ відповідно

З метою з'ясування ролі олігофенольного макроциклу у забезпеченні каталітичного ефекту калікс[4]арену C-107 були проведені дослідження дії калікс[4]аренів C-160 та C-150 на неензиматичний гідроліз АТР. Калікс[4]арен C-160 є проксимальним 1,2-регіоізомером – калікс[4]арену C-107, а калікс[4]арен C-150 є суто калікс[4]ареновою чашею без жодних додаткових хімічних угруповань на верхньому вінці макроциклу.

Ми показали, що калікс[4]арен C-160 значно менш ефективно здатний прискорювати реакцію гідролізу АТР, а калікс[4]арен C-150 практично не здатний каталізувати гідроліз АТР (рис. 7.3). Це вказує на те, що для протікання реакції гідролізу АТР зміна взаємного положення замісників на каліксареновій чаші відображається лише в зміні швидкості реакції.

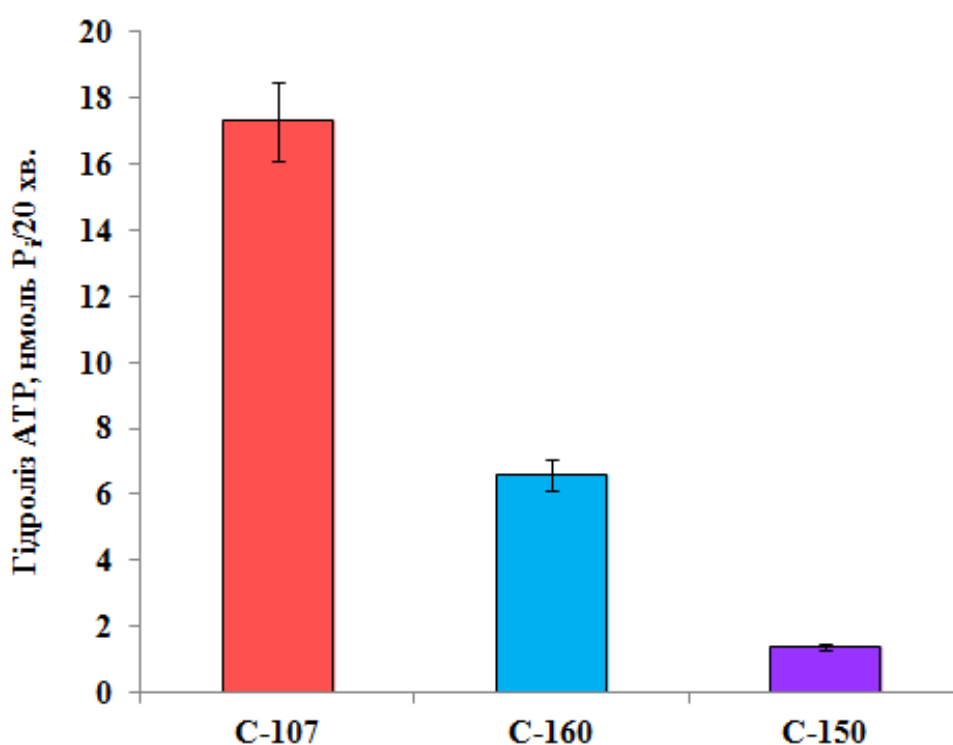


Рис. 7.3. Прискорення реакції гідролізу АТР калікс[4]аренами C-107, C-160 та C-150 ($M \pm m$, $n = 6$)

Отже, каліксаренова чаша не приймає безпосередньої участі в каталітичних процесах, що зумовлюють гідролітичне розщеплення фосфоангідридних зв'язків у молекулі АТР.

У подальших дослідженнях ми вивчили деякі кінетичні закономірності реакції гідролізу АТР, індукованого калікс[4]ареном C-107.

7.2. ДОСЛІДЖЕННЯ КІНЕТИКИ РЕАКЦІЇ ГІДРОЛІЗУ АТР, ЯКА ІНДУКУЄТЬСЯ КАЛІКС[4]АРЕНОМ С-107

Аналіз кінетики гідролізу АТР, індукованого калікс[4]ареном 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. 7.4).

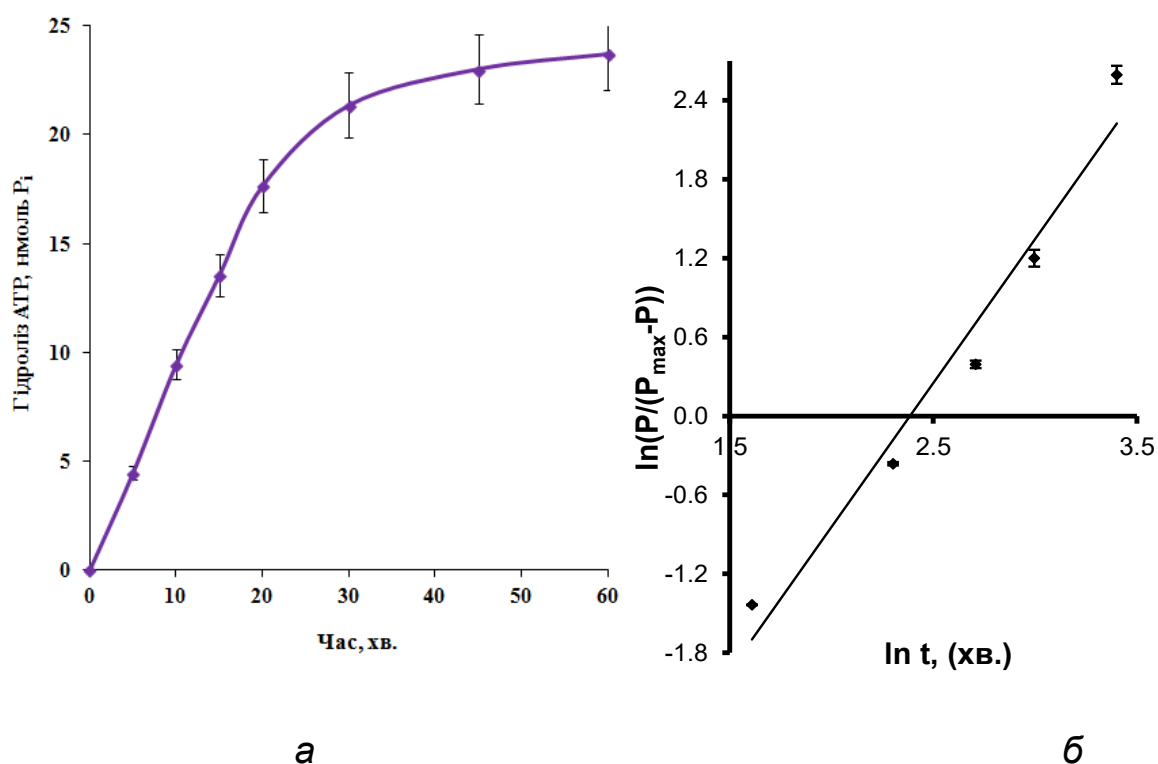


Рис. 7.4. Кінетика реакції гідролізу АТР калікс[4]ареном С-107 ($M \pm m$; $n = 5$)

а – кінетична крива каліксарен-залежного гідролітичного процесу. Концентрація калікс[4]арену, АТР та MgCl_2 – 100 мкМ, 1 мМ та 3 мМ, відповідно; б – лінеаризація кінетичної кривої, зображеної на рис. 3а, відповідно до емпіричного методу [7]

При первинному кінетичному аналізі цієї залежності виявилося, що закономірності її протікання не підпорядковуються властивостям хімічних процесів низьких порядків (нульового, першого), що свідчить про складність даної реакції. Щоб кількісно охарактеризувати кінетику реакції каліксарен-залежного гідролізу АТР (рис. 7.4), ми обрали метод емпіричного аналізу для опису складних кінетичних кривих [7], що був розроблений нами раніше. Отримана усереднена кінетична крива гідролізу АТР, що була наведена на рис. 7.4, добре лінеаризувалася (типові значення коефіцієнту кореляції становить 0,94-0,99) у відповідних координатах, і це дало нам можливість розрахувати необхідні емпіричні кінетичні параметри: логарифмічний декремент крутизни кінетичної кривої n ($2,20 \pm 0,05$), характеристичний час реакції τ (“період напівнасичення”) ($10,82 \pm 0,39$ хв), час θ , в який спостерігається максимальне значення миттєвої швидкості реакції ($6,89 \pm 0,26$ хв), максимальну миттєву швидкість реакції V ($1,46 \pm 0,06$ нмоль P_i /хв) ($M \pm m$; $n = 5$).

Отже, отримані нами дані вказують на наступне:

1. Максимальна (“платова”) кількість неорганічного фосфату $p_{\max}$, який звільняється внаслідок калікс[4]арен-залежного гідролізу АТР (рис. 7.4а), значно менша, ніж початкова кількість субстрату реакції (a_0) (початкова концентрація АТР – 1 мМ, об’єм середовища інкубації становить 0,4 мл). Обрахунки показують, що середнє значення відношення $p_{\max}/a_0 \approx 23 \text{ нмоль}/400 \text{ нмоль} \approx 6 \cdot 10^{-2}$ ($p_{\max}$ – максимальний вихід продукту реакції, a_0 – початкова концентрація АТР). Отже, кількість P_i , що звільняється у ході каліксарен-залежної реакції гідролізу АТР, не перевищує 6 % від початкової кількості АТР у середовищі інкубації. Таким чином, ми припустили, що припинення (практично з 45^{ої} хвилини інкубації) гідролізу АТР, індукованого калікс[4]ареном С-107 (рис. 7.2), не може бути пов’язане з можливим

повним вичерпанням субстрату в ході реакції, а обмежується якимось іншим фактором. Це питання потребує подальшого з'ясування.

2. Процес каліксарен-залежного гідролізу АТР є дуже повільним: характеристичний час реакції τ ("період напівнасичення") в середньому становить 10,82 хв. Кінетична крива (рис. 7.4а) реакції каліксарен-залежного гідролізу АТР є негіперболічною (у часі) – адже логарифмічний декремент її крутизни n має середнє значення 2,2, тобто не дорівнює 1. За своєю величиною час $\theta = 6,89$ хв, в який спостерігається максимальне значення миттєвої швидкості V реакції, приблизно на 4 хв. менший за величину характеристичного часу реакції τ .

3. Середнє значення максимальної миттєвої швидкості V реакції каліксарен-залежного гідролізу АТР становить 1,46 нмоль P_i /хв. У контрольних дослідах ми показали, що середня швидкість спонтанного гідролізу АТР у відсутності калікс[4]арену С-107 не перевищує 0,1 нмоль P_i /хв. (у складі середовища інкубації – 1 мМ АТР, 3 мМ $MgCl_2$; температура – 37 °С). Отже, за даних експериментальних умов швидкість каліксарен-залежного гідролізу АТР перевищує швидкість спонтанного гідролізу цього нуклеозидтрифосфату приблизно в 14-15 разів.

Як вже відзначалося, одним із етапів каліксарен-залежної реакції гідролізу АТР є утворення комплексу каліксарену з нуклеозидтрифосфатом [2]. З метою подальшого вивчення механізму розщеплення АТР у присутності калікс[4]арену С-107 було досліджено взаємодію останнього з нуклеозидтрифосфатом та визначено константу дисоціації утвореного комплексу.

7.3. КОМПЛЕКСОУТВОРЕННЯ МІЖ КАЛІКС[4]АРЕНОМ C-107 ТА АТР

Константи дисоціації K_d каліксаренових комплексів з органічними сполуками в розчинах зазвичай визначають методом ЯМР [8, 9, 10]. Однак нами, як вже відзначалося вище, для вивчення комплексоутворюючих властивостей каліксаренів [11, 12, 13 14, 15] був розроблений та успішно використаний метод, заснований на застосуванні обернено-фазної вискоєфективної рідинної хроматографії. Цей метод дозволяє оперувати низькими концентраціями досліджуваних сполук у полярних розчинниках та їх сумішах. Для підвищення достовірності результатів дослідження нами було використано два типи хроматографічних насадок різної полярності ("Zorbax CN" та "LiChrosorb RP 18"), вибір яких був зумовлений будовою та хімічними властивостями калікс[4]арену C-107 і АТР, а також відомими літературними даними [16] з аналізу подібних сполук. Комплексоутворення вивчалось у розчині ацетонітрил/вода (47/53 за об'ємом) в якості рухомої фази. При хроматографічному аналізі додавання АТР до складу рухомої фази калікс[4]арену C-107 приводить до утворення комплексу "Господар-Гість" і спричиняє зниження значень основних хроматографічних характеристик АТР: часу утримання t_R та коефіцієнту ємкості k' . Значення основних хроматографічних характеристик: часу утримання t_R та коефіцієнту ємкості k' для калікс[4]арену C-107 та АТР наведені в табл. 7.1, а значення величини $1/k'$ в залежності від концентрації калікс[4]арену C-107 у складі рухомої фази – в табл. 7.2 та на рис. 7.5 та 7.6.

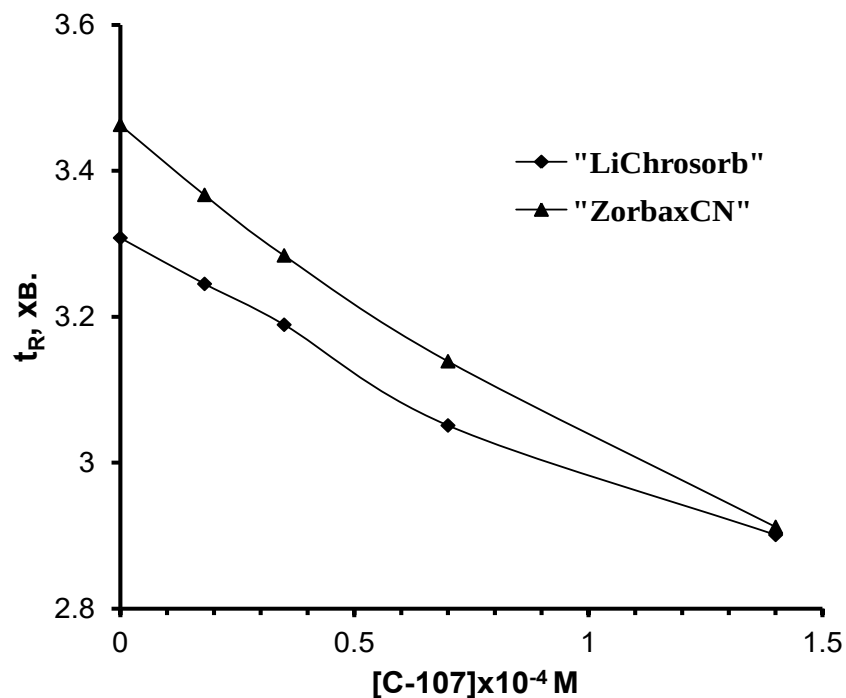


Рис. 7.5. Залежність часу утримання t_R для АТФ хроматографічними насадками “LiChrosorb RP 18” і “Zorbax CN” від концентрації калікс[4]арену C-107 в рухомій фазі

Таблиця 7.1.

Основні хроматографічні характеристики: час утримання (t_R) та коефіцієнт ємкості (k') калікс[4]арену C-107 та субстрату АТФ, що були одержані із використанням насадок “Zorbax CN” і “LiChrosorb RP 18” в потоці ацетонітрил/вода (47/53 за об’ємом)

Сполука	Насадка “Zorbax CN”		Насадка “LiChrosorb RP 18”	
	t_R , хВ	k'	t_R , хВ	k'
C-107	7,520	2,384	10,834	3,706
АТФ	3,463	0,559	3,308	0,437

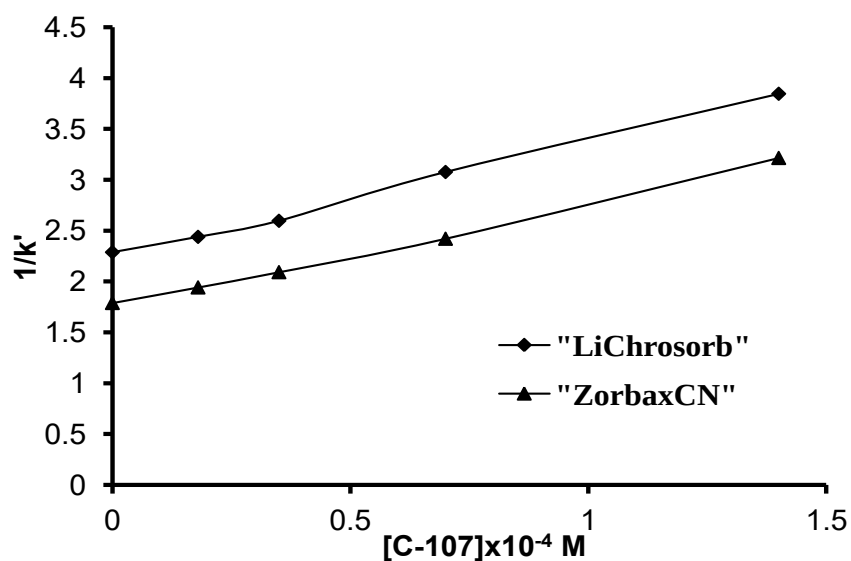


Рис. 7.6. Залежність величини $1/k'$ для АТФ від концентрації калікс[4]арену С-107 у рухомій фазі для насадок “LiChrosorb RP 18” та “Zorbax CN”

Таблиця 7.2.

Коефіцієнт ємкості субстрату АТФ (k'), що визначався в залежності від концентрації калікс[4]арену С-107 у рухомій фазі, та значення константи дисоціації комплексу “Калікс[4]арен С-107-АТФ”

Концентрація С-107, $\cdot 10^{-4}$ М	Насадка					
	“Zorbax CN”			“LiChrosorb RP 18”		
	k'	$1/k'$	K_d , мкМ (RSD,%)	k'	$1/k'$	K_d , мкМ (RSD,%)
0	0,559	1,789	197	0,437	2,288	231
0,18	0,515	1,942	(8 %)	0,410	2,439	(15 %)

0,35	0,478	2,092		0,385	2,597	
0,70	0,413	2,421		0,325	3,077	
1,40	0,311	3,215		0,260	3,846	

У випадку застосування обох насадок “LiChrosorb RP 18” та “Zorbax CN” характер лінійної залежності (рис. 7.6) величини $1/k'$ від концентрації каліксаренової добавки у рухомій фазі (коефіцієнт кореляції 0,98-0,99) вказує на стехіометрію калікс[4]арену C-107 і АТР в комплексі, що відповідає співвідношенню 1:1.

На підставі лінійної залежності величин $1/k'$ від концентрації калікс[4]арену C-107 у рухомій фазі, одержаних з експериментальних даних, ми розраховували константи дисоціації K_d комплексу “калікс[4]арен C-107 – АТР” за рівнянням (1) [17]:

$$1/k' = 1/k_0' + (1/K_d) \cdot [C-107]/k_0' \quad (1)$$

де k_0' і k' – коефіцієнти ємкості, що були визначені у відсутності та у присутності калікс[4]арену C-107 у рухомій фазі. Детальна процедура таких обчислень викладена у роботі [17]. Середні значення констант дисоціації K_d , що були розраховані із використанням цього методу у випадку насадок “LiChrosorb RP 18” і “Zorbax CN”, становлять 231 та 197 мкМ відповідно (табл. 7.2).

Визначивши стехіометрію комплексоутворення (1:1), ми провели моделювання комплексу “калікс[4]арен C-107 – АТР” з використанням програми “HyperChem 7.01”. При цьому виходили з того, що молекула калікс[4]арену C-107 існує у формі дицвіттеріону з протонованими амінними атомами азоту і двома депротонованими гідроксилами фосфонових фрагментів, а молекула АТР існує у формі тетрааніону. Методом молекулярної механіки (“силове поле MM+”) був проведений

конформаційний пошук оптимальної геометрії “Господаря” – калікс[4]арену C-107 та “Гостя” – АТР. Потім довільним шляхом «зближували» “Господаря” і “Гостя” і розраховували оптимальну геометрію утворених комплексів. В результаті був відібраний ряд структур комплексів з найменшою загальною енергією E. Для порівняння значення загальних енергій цих комплексів вони також були перераховані напівемпіричним методом (“поле CNDO”), після чого було вибрано три структури I-III (рис. 7.7) з найменшими загальними енергіями E. Відносні значення розрахованих загальних енергій комплексу “калікс[4]арен C-107-АТР” (I-III) приведені в таблиці 7.3.

Таблиця 4.3.

Відносні значення розрахованих загальних енергій E комплексів “C-107–АТР” (I-III).

Комплекс	Молекулярна механіка, “силове поле MM+”		Напівемпіричний метод, “поле CNDO”	
	Загальна енергія E, відносні од.	Різниця, %	Загальна енергія E, відносні од.	Різниця, %
I	103,82	3,82	100,00	0
II	100,00	0	100.02	0,02
III	100.87	0,87	100.06	0,06

Примітка: У випадку методу молекулярної механіки “силове поле MM+” та напівемпіричного методу “поле CNDO” значення

загальної енергії E прийнято за умовний нуль для комплексів II та I, відповідно.

Як маємо з даних, що наведені в табл. 7.3, загальні енергії комплексів E відрізняються між собою не більше, ніж на 4 %, тобто вони практично є рівновірогідними.

Слід відмітити, що у випадку комплексів I та II (рис. 7.7) спостерігається самовключення одного фосфонового залишку каліксарену в його молекулярну порожнину. При такому самовключенні (структури I та II) мають місце внутрішньомолекулярні водневі зв'язки $P=O \cdots H-N$ між амінофосфоновими фрагментами. В комплексі III подібні водневі зв'язки не утворюються, при цьому спостерігається більш повне включення молекули АТР в порожнину каліксаренового макроциклу, ніж у випадку структур I та II.

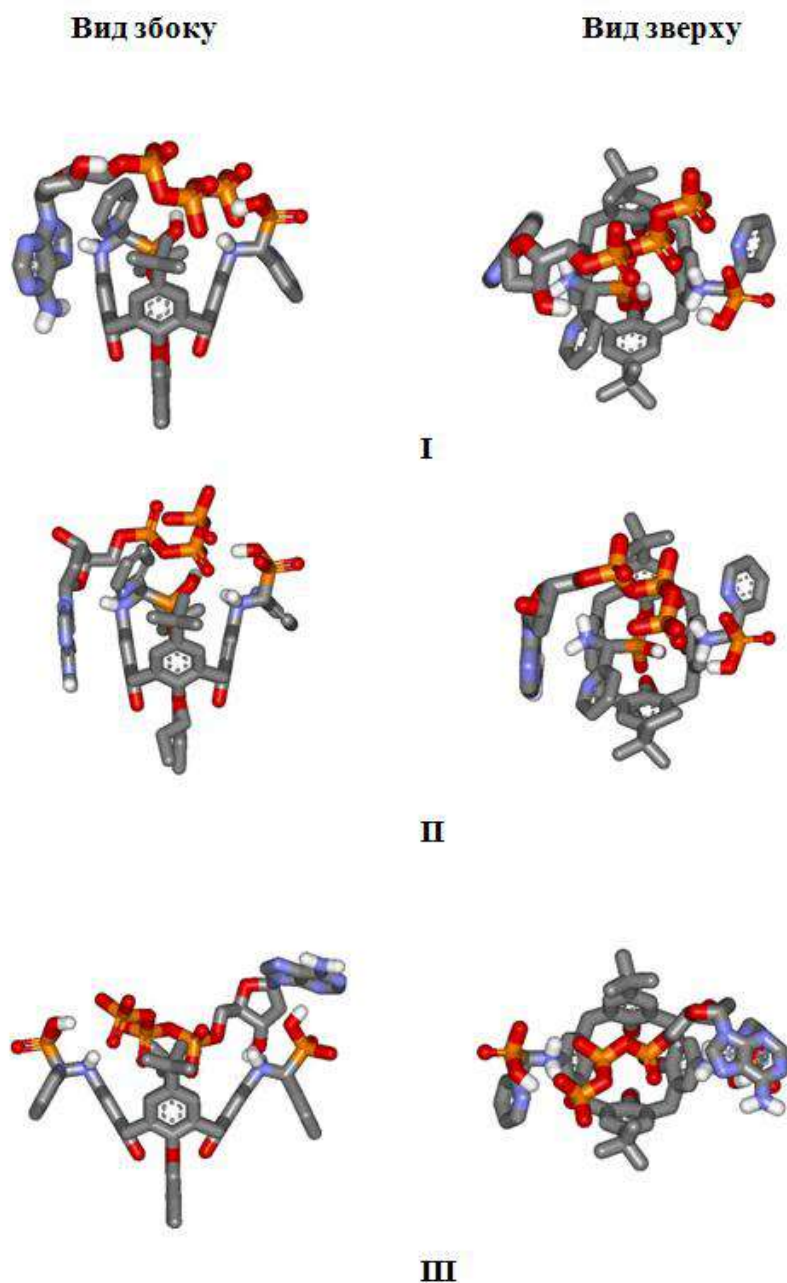


Рис. 7.7. Можливі структури комплексів “С-107 – АТР” (I-III) (бічний та апікальний вигляд)

У наведених “стрижневих” моделях атоми вуглецю позначені сірим кольором, азоту – синім, кисню – червоним, фосфору – помаранчевим, водню – білим кольорами. Атоми водню, які не беруть участі у міжмолекулярних водневих зв’язках, для спрощення не зазначені

Взагалі ж між калікс[4]ареном С-107 та АТР утворюються міжмолекулярні водневі зв’язки різних типів, які стабілізують утворені комплекси (рис. 7.7), а саме:

1. У всіх трьох структурах NH_2^+ -групи одного аміно-(2-піридил)метилфосфонового фрагменту молекули С-107 взаємодіють з γ - та β -фосфорильними залишками молекули АТР.

2. Разом з тим NH_2^+ -групи другого аміно-(2-піридил)метилфосфонового фрагменту молекули С-107 взаємодіють з α -фосфорильним залишком та гідроксилом дезоксирибози молекули АТР.

3. Р-ОН-групи одного аміно-(2-піридил)метилфосфонового фрагменту молекули С-107 зв'язуються з γ -фосфорильним залишком молекули АТР; в той же час Р-ОН-групи другого аміно-(2-піридил)метилфосфонового фрагменту молекули С-107 зв'язані з β - або α -фосфорильним залишком молекули АТР.

Таким чином, проаналізувавши одержані дані можна припустити, що калікс[4]арен С-107 є комплексоутворювачем для АТР у розчинах.

Очевидно, що явища комплексоутворення каліксаренів з АТР, а також каліксарен-залежного гідролізу цього нуклеозидтрифосфату, становлять безперечний інтерес як з точки зору біоорганічної хімії та біохімії, так і біотехнології та фармакології.

У своїх подальших дослідженнях ми вивчали каталітичні властивості реакції гідролізу АТР, індукованого калікс[4]ареном С-107.

7.4. ДОСЛІДЖЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ РЕАКЦІЇ ГІДРОЛІЗУ АТР, ЯКИЙ ІНДУКУЄТЬСЯ КАЛІКС[4]АРЕНОМ С-107

Як вже відзначалося, середовище інкубації, яке ми використовували для дослідження неензиматичного гідролізу АТР, містило 3 мМ MgCl_2 . Проте, як показали експерименти, гідроліз АТР (1 мМ), що був індукований калікс[4]ареном 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”). Еквімолярна заміна іонів Mg на іони Ca також не впливала на рівень гідролізу ATP стосовно “контролю”. Проте іони Co, Mn, Zn, Ni, Sr, Pb та Ba пригнічували каліксарен-залежний гідроліз ATP; в присутності ж іонів Cu він практично не спостерігався. В цілому ж при дії іонів двовалентних металів на цей гідроліз має місце наступна послідовність щодо ефективності їхньої гальмівного впливу на каліксарен-залежну гідролітичну реакцію: $Cu^{2+} > Ba^{2+} > Pb^{2+} > Sr^{2+} > Ni^{2+} = Zn^{2+} > Mn^{2+} > Co^{2+} > Ca^{2+} = Mg^{2+} = \text{“контроль”}$ (тобто у відсутності катіонів двовалентних металів Me^{2+}) (рис. 7.8, табл. 7.4).

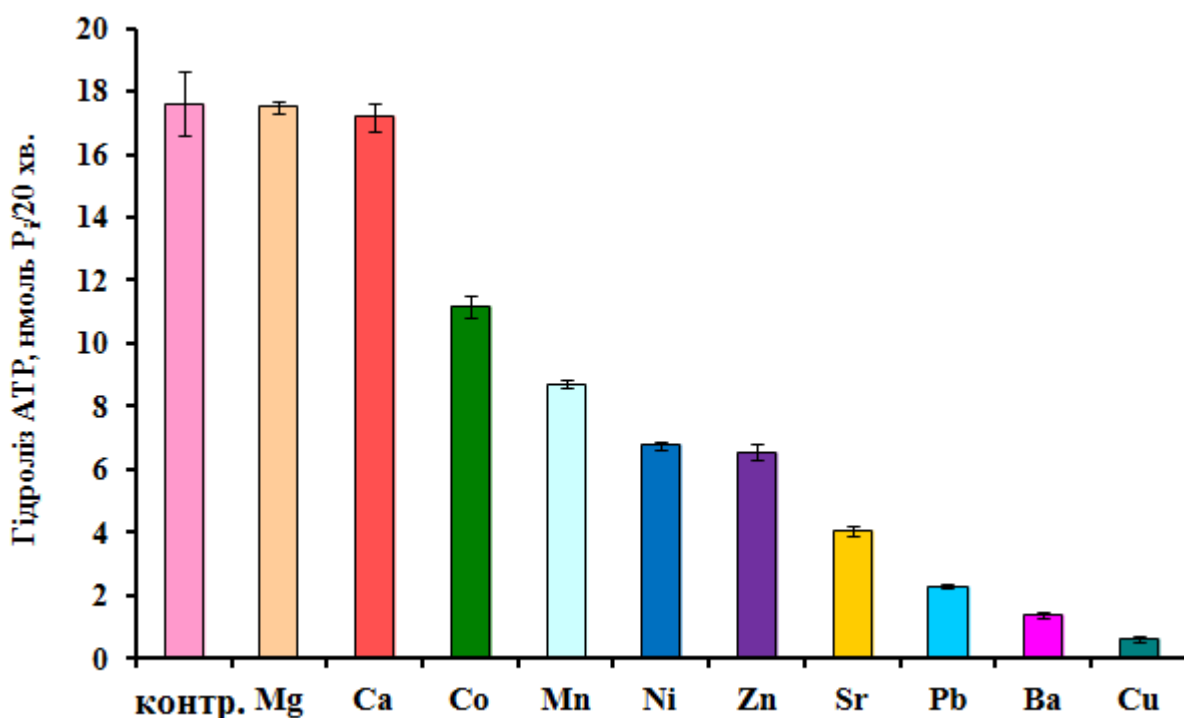


Рис. 7.8. Вплив іонів двовалентних металів на індуковану калікс[4]ареном C-107 реакцію гідролізу ATP ($M \pm m$; $n = 5$)
Концентрація калікс[4]арену C-107, ATP та двовалентних катіонів (Me) – 100 мкМ, 1 та 3 мМ відповідно

У наступних експериментах ми вивчали вплив одновалентних катіонів та іонної сили на реакцію гідролізу ATP, індукованого

калікс[4]ареном C-107.

Таблиця 7.4.

**Властивості реакції гідролізу АТР, індукованої
калікс[4]ареном C-107**

Показники	Властивості реакції	Додаток
Катіонна специфічність щодо двовалентних катіонів	Ca^{2+} та Mg^{2+} не впливають на протікання реакції гідролізу. У присутності інших двовалентних катіонів спостерігається пригнічення реакції відповідно до послідовності: $\text{Cu}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ni}^{2+} = \text{Zn}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Ca}^{2+} = \text{Mg}^{2+}$	концентрація АТР та двовалентних катіонів становила 1 та 3 мМ відповідно
щодо одновалентних катіонів	Відсутня; Na^+, K^+, Li^+ чи холін⁺ не впливають на протікання реакції гідролізу	концентрація АТР та одновалентних катіонів становила 1 та 150 мМ відповідно
Чутливість до зміни іонної сили	Слабка	іонну силу (фізіологічне значення) задавали шляхом використання хлоридів одновалентних металів у концентрації 150 мМ
Чутливість до зміни в'язкості	Практично відсутня	зміну в'язкості моделювали шляхом заміни 150 мМ хлоридів

		одновалентних катіонів на 300 мМ сахарозу
Чутливість до зміни рН	Наявна; залуження в діапазоні рН 6,0-8,0 стимулює гідроліз АТР (вихід на платовий рівень при значеннях рН > 7,4)	при задаванні значень рН використовували 20 мМ Hepes-tris буфер
Чутливість до зміни температури	Наявна; збільшення температури від 6 до 37 °С призводить до стимуляції гідролізу АТР, величина E_a становить $50,7 \pm 8,9$ кДж/моль. При подальшому підвищенні температури має місце пригнічення АТР-гідролісної реакції	концентрація АТР і каліксарену становила 1 мМ та 100 мкМ відповідно
Субстратна специфічність	Відсутня; успішно гідролізується не лише АТР, але й інші нуклеозидтрифосфати, а також АДФ (хоча і менш ефективно, ніж АТР)	використовували АТР, GTP та UTP, а також АДФ в концентрації 1 мМ
Чутливість до зміни концентрації каліксарену (20-100 мкМ) Кінетичні параметри: p_{max} v	Наявна; підвищення концентрації каліксарену стимулює гідроліз АТР Лінійно збільшується із підвищенням концентрації каліксарену Лінійно збільшується із зростанням концентрації каліксарену Нелінійно зменшується із зростанням концентрації	концентрація АТР становила 1 мМ

τ Чутливість до зміни концентрації АТР (1-5 мМ) Кінетичні параметри: p_{max} V τ	каліксарену Наявна; підвищення концентрації АТР стимулює гідроліз цього нуклеозидтрифосфату Не залежить від концентрації АТР Нелінійно збільшується із зростанням концентрації АТР Лінійно зменшується із зростанням концентрації АТР	концентрація каліксарену становила 100 мкМ
Константа дисоціації K_d комплексу “С-107 – АТР”	197-231 мкМ	При розрахунку K_d використовували метод, що ґрунтувався на застосуванні ОФ ВЕРХ

Ми показали, що наявність у середовищі інкубації 150 мМ NaCl, KCl, LiCl чи холінхлориду призводила до невеликого однакового за величиною пригнічення (не більше, ніж на 10-15 %) каліксарен-залежного гідролізу АТР стосовно контролю (за умов відсутності зазначених хлоридів у середовищі, прийнято за 100 %) (дані не наведені). За концентраційних умов $[NaCl] + [KCl] = 150$ мМ зміна співвідношення концентрацій зазначених хлоридів не призводила до зміни швидкості цього гідролізу (дані не наведені) (табл. 7.4). У випадку відсутності у середовищі інкубації солей одновалентних металів, але використання сахарози в ізотонічній концентрації (300 мМ, “контроль” на можливий ефект іонної сили), цей гідроліз також

практично не змінювався (дані не наведені) (табл. 7.4). Таким чином, одновалентні катіони різної хімічної природи (Na^+ , K^+ , Li^+ , холін⁺), не є критично необхідними для протікання каліксарен-залежного гідролізу АТР. Імовірно також, що електростатичним взаємодіям між калікс[4]ареном С-107 та АТР навряд чи належить суттєве значення у забезпеченні реакції гідролізу цього нуклеозидтрифосфату, так як ця реакція не була чутливою до зміни іонної сили. Втім, у випадку вивчення комплексоутворення між АТР та калікс[4]арен-5,11,17,23-тетрасульфонатом [2], не виключають роль електростатичних взаємодій між зазначеним калікс[4]ареном та АТР.

Також ми вивчали вплив рН на реакцію гідролізу АТР, індукованого калікс[4]ареном С-107. Показано, що залуження середовища інкубації в діапазоні рН від 6,0 до 8,0 підсилює каліксарен-залежний гідроліз АТР: рН-залежність при підвищенні рН від 6,0 до 7,4 була майже лінійною, при подальшому ж збільшенні водневого показника вона виходила на стійке плато (рис. 7.9, табл. 7.4).

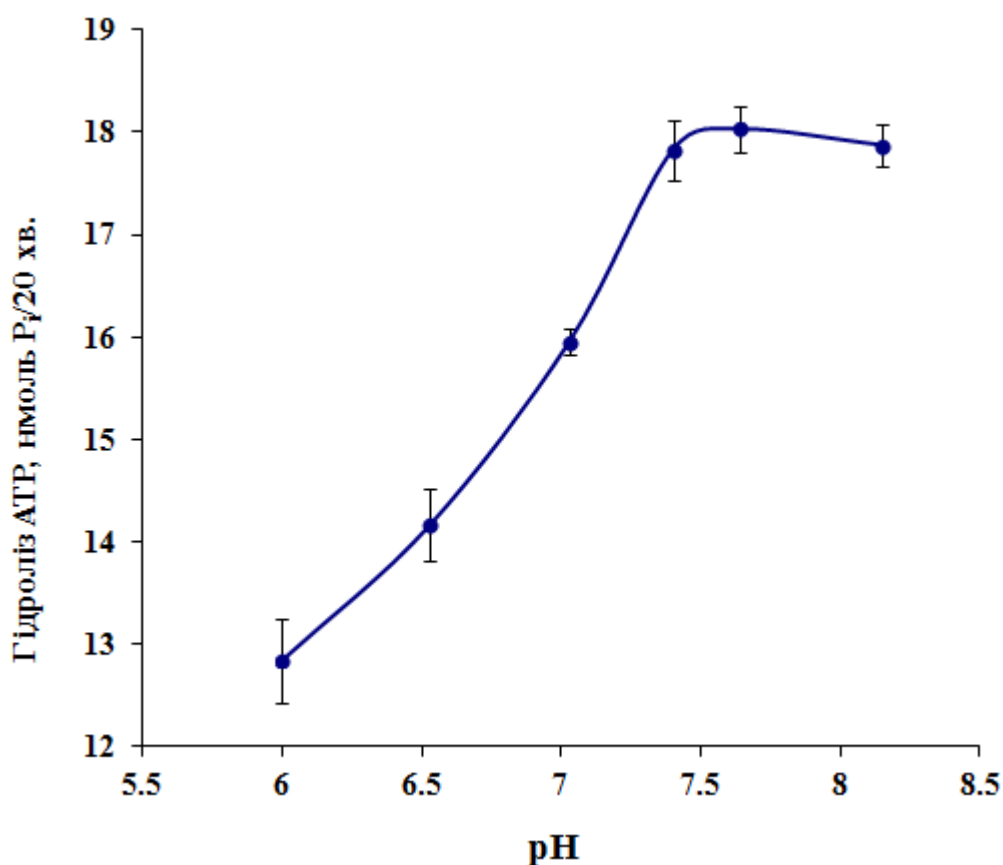


Рис. 7.9. Вплив рН на індуковану калікс[4]ареном С-107 реакцію гідролізу АТР ($M \pm m$; $n = 5$)
Концентрація калікс[4]арену С-107, АТР та $MgCl_2$ – 100 мкМ, 1 мМ та 3 мМ відповідно

Таким чином, при зниженні концентрації протонів від 1 до 0,01 мкМ підсилюється реакція гідролізу АТР, індукованого калікс[4]ареном С-107, що свідчить про важливість для реалізації гідролізу нуклеозидтрифосфату ефектів “протонування-депротонування” іоногенних функціональних груп в системі “калікс[4]арен С-107 – АТР”.

Дослідження енергетики реакції гідролізу АТР, індукованого калікс[4]ареном С-107, показують, що при підвищенні температури середовища інкубації в діапазоні від 6 до 37 °С має місце експоненціальне зростання швидкості каліксарен-залежного гідролізу АТР, подальше підвищення температури (до 47 °С) призводило до

незначного пригнічення цієї реакції (дані не наведені) (табл. 7.4). Використавши метод Вант-Гоффа для розрахунку уявної енергії активації E_a реакції (діапазон температур 6-37 °C) ми визначили значення цієї величини, що становило $50,7 \pm 8,9$ кДж/моль ($M \pm m$; $n = 6$). Необхідно відзначити, що це значення не дуже сильно відрізняється від типових значень E_a , які є властивими для ензиматисних АТР-гідролазних реакцій, зокрема, для реакції $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -залежного гідролізу АТР, що каталізується Ca^{2+} -транспортуючою АТРазою плазматичної мембрани клітин ($55\text{-}63$ кДж/моль) [18].

При вивченні субстратної специфічності реакції гідролізу АТР, індукованої калікс[4]ареном С-107, ми показали, що еквімолярна заміна АТР (1 мМ) на інші нуклеозидтрифосфати, зокрема, на GTP та UTP, не впливала на рівень їхнього каліксарен-залежного гідролізу, який у середньому становив 17-18 нмоль P_i за 20 хв.; еквімолярна заміна АТР (1 мМ) на ADP, призводила до зменшення на 30 % рівня гідролізу стосовно контролю, який тестується у присутності АТР (дані не наведені) (табл. 7.4). Отже, реакції індукованого калікс[4]ареном С-107 гідролізу фосфоангідридних зв'язків моонуклеотиду не притаманна субстратна специфічність: у її ході успішно гідролізується не лише АТР, але й інші нуклеозидтрифосфати, а також й ADP (хоча і менш ефективно, ніж АТР). Втім, зараз вже синтезовані уридин-похідні калікс[4]арену, що специфічно зв'язуються з АТР за участю взаємодій, аналогічних таким, які існують між парами основ у ДНК та РНК [19].

Надалі ми досліджували залежність кінетичних параметрів реакції гідролізу АТР від концентрації калікс[4]арену С-107. Як показують результати експериментів, підвищення концентрації калікс[4]арену С-107 від 20 до 100 мкМ підсилює реакцію гідролізу АТР (концентрація АТР – стала: 1 мМ) (рис. 7.10а; наведено дані типового експерименту). Ми проаналізували одержані криві за допомогою методу емпіричного кінетичного аналізу [7]. Проведені розрахунки

показали, що максимальний рівень $p_{\max}$ вивільненого продукту реакції – неорганічного фосфату P_i та максимальна миттєва швидкість реакції V лінійно збільшувались із зростанням концентрації калікс[4]арену С-107; характеристичний час реакції τ навпаки нелінійно зменшувався (головним чином в діапазоні концентрації калікс[4]арену С-107 20-40 мкМ) (рис. 7.106; табл. 7.4).

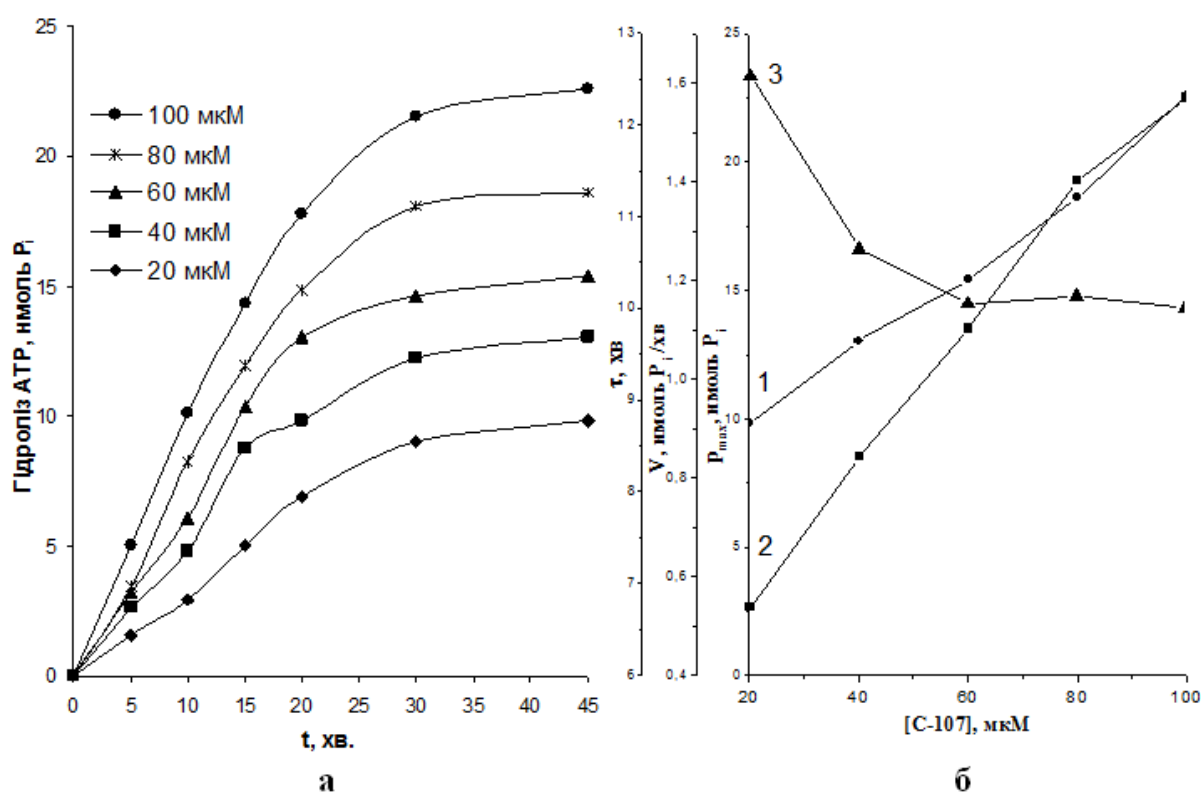


Рис. 4.10. Вплив різних концентрацій калікс[4]арену С-107 на кінетику реакції гідролізу АТР (типіві графіки)

а – динаміка звільнення продукту реакції – неорганічного фосфату P_i при різних концентраціях каліксарену. Концентрація АТР – 1 мМ, концентрація $MgCl_2$ – 3 мМ;

б – залежності кінетичних параметрів реакції гідролізу АТР: 1 – платового рівня $p_{\max}$ звільнення продукту, неорганічного фосфату P_i , 2 – максимальної миттєвої швидкості V та 3 – характеристичного часу τ від концентрації каліксарену

Як ми продемонстрували раніше, значення констант дисоціації K_d комплексу “С-107 – АТР”, що були розраховані із використанням методу ОФ ВЕРХ у системі “ацетонітрил/вода” у випадку двох хроматографічних насадок різної полярності “LiChrosorb RP 18” і “Zorbax CN”, становлять 231 та 197 мкМ відповідно (табл. 7.2). Якщо порівняти вказані величини K_d із реальною концентрацією АТР у клітинах ($\sim 5 \cdot 10^{-4}$ - $5 \cdot 10^{-3}$ М), то можна стверджувати, що калікс[4]арен С-107 має відносно високу спорідненість до зазначеного нуклеозидтрифосфату.

Було знайдено, що підвищення концентрації АТР від 1 до 5 мМ стимулює реакцію гідролізу нуклеозидтрифосфату (концентрація калікс[4]арену С-107 стала – 100 мкМ) (рис. 7.11). Одержані криві також були проаналізовані із використанням вищенаведеного методу кінетичного аналізу [7]. Розрахунки показали, що платовий рівень $p_{\max}$ звільнення продукту реакції – неорганічного фосфату P_i не залежить від концентрації АТР, максимальна миттєва швидкість V нелінійно збільшується із зростанням концентрації нуклеозидтрифосфату; характеристичний час реакції τ – лінійно зменшується (рис. 7.11б, табл. 7.4).

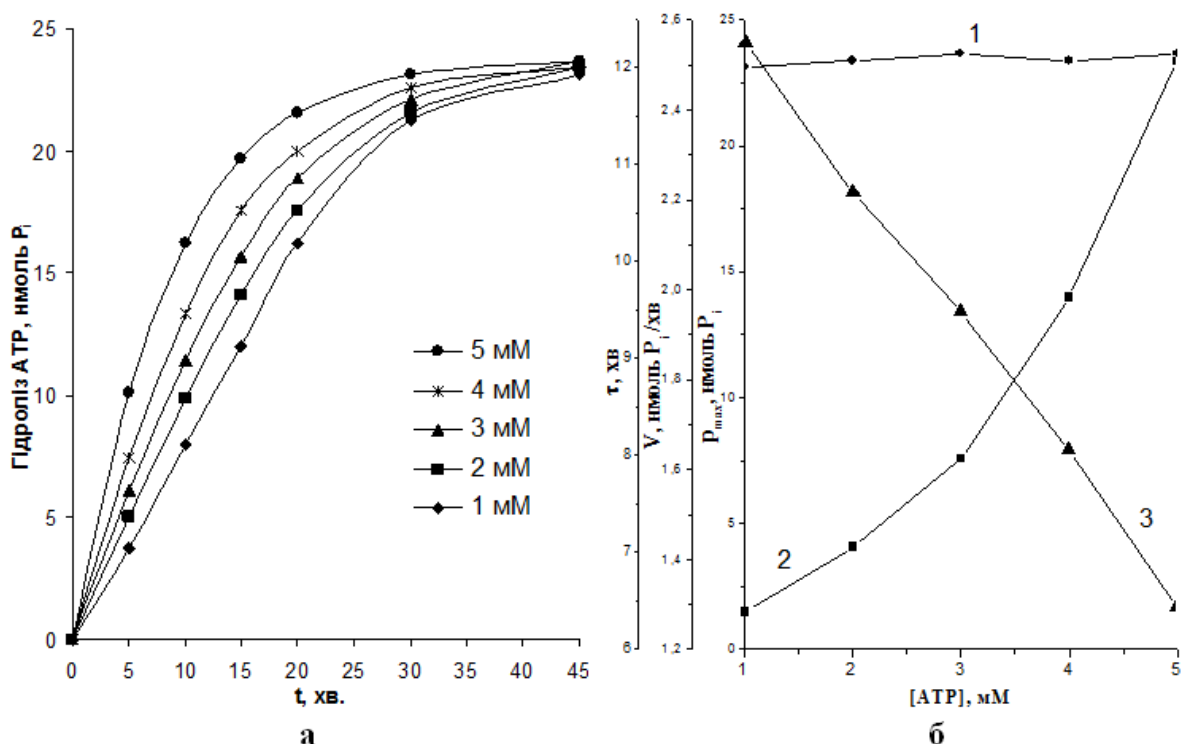


Рис. 7.11. Вплив різних концентрацій АТР на кінетику індукованої каліксареном С-107 реакції гідролізу нуклеозидтрифосфату (типіві графіки)

а – динаміка звільнення продукту реакції – неорганічного фосфату P_i при різних концентраціях АТР. Концентрація каліксарену – 100 мкМ, концентрація $MgCl_2$ – 3 мМ;

б – залежності кінетичних параметрів реакції гідролізу АТР: 1 – платового рівня p_{max} звільнення продукту, неорганічного фосфату P_i , 2 – максимальної миттєвої швидкості V та 3 – характеристичного часу t від концентрації нуклеозидтрифосфату

Отже, при фіксованій концентрації калікс[4]арену С-107 величина p_{max} взагалі не залежала від концентрації АТР, а величина V нелінійно збільшувалась із зростанням концентрації цього нуклеозидтрифосфату, але без виходу на “плато” (рис. 7.11). Таким чином, при сталій концентрації калікс[4]арену С-107 значення p_{max} накопичення неорганічного фосфату не визначається концентрацією АТР, а значення V визначається.

Проаналізуємо результати, що були одержані (рис. 7.8-7.11, табл. 7.4). В літературі маємо значну кількість даних стосовно взаємодії одно- та двовалентних катіонів з АТР та каліксаренами [20, 21, 22]. За умов використання одновалентних катіонів (150 мМ), які мають різні фізико-хімічні властивості та різну хімічну природу (Na^+ , K^+ , Li^+ , холін $^+$), ми не спостерігали будь-яких суттєвих ефектів їхньої дії на гідролітичний процес в режимі підтримання сталої іонної сили (табл. 7.4). Отже, фізіологічно-значущі одновалентні катіони К та Na не є критично необхідними для протікання каліксарен-залежного гідролізу АТР. Такі фізіологічно-значущі двовалентні катіони, як Mg та Ca, які ми використовували у концентрації 3 мМ, також не є необхідними для забезпечення каліксарен-залежного гідролізу АТР і не впливають на нього (рис. 7.8, табл. 7.4). Можливо, що хелатні комплекси MgATP^{2-} та CaATP^{2-} , як і вільний нуклеозидтрифосфат ATP^{4-} , в однаковому ступені можуть гідролізуватися калікс[4]ареном C-107, або іони Ca та Mg взагалі не впливають на взаємодію цього каліксарену з вільним нуклеозидтрифосфатом. У той же час у присутності Cu^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} та Sr^{2+} , які використовували в еквімолярній концентрації, каліксарен-залежний гідроліз АТР ефективно (на 80-100 %) гальмувався (рис. 7.8, табл. 7.4). Ймовірно, що можливих причин цього гальмування може бути декілька (чи реально має місце їхня комбінація). По-перше, не виключено, що хелатні комплекси CuATP^{2-} , BaATP^{2-} , PbATP^{2-} та SrATP^{2-} , взагалі не здатні зв'язуватися з каліксареном. По-друге, можливо, що ці комплекси здатні зв'язуватися (конкурентно щодо вільної ATP^{4-}) з каліксареном, але не гідролізуються ним (чи гідролізуються слабкіше у порівнянні з ATP^{4-} ; комплекс CuATP^{2-} , скоріше за все, не гідролізується взагалі). По-третє, не можна виключати, що Cu^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} та Sr^{2+} , на відміну від Mg^{2+} та Ca^{2+} , самі по собі здатні переводити калікс[4]арен C-107 у стан, для якого не є властивою спроможність забезпечувати зв'язування з вільним ATP^{4-} та

гідролізувати його (дані катіони здатні утворювати міцні комплекси з калікс[4]ареном C-107 завдяки наявності фосфонатних та піридилних лігандних груп [23, 24]) При аналізі катіонної специфічності реакції каліксарен-залежного гідролізу АТР мабуть необхідно приймати до уваги і той факт, що, відповідно до результатів молекулярного моделювання та принципу мінімізації загальної енергії комплексу, останній, у випадку системи “калікс[4]арен-C-107 – АТР” [25], може, характеризуватися не одним, а мінімум 3^{Ma} станами, кожний з яких, взагалі кажучи, може мати свою катіонну специфічність. В цілому ж безперечно, що питання катіонної специфічності (щодо дії двовалентних катіонів) реакції каліксарен-залежного гідролізу АТР потребує подальшого вивчення.

Реакція каліксарен-залежного гідролізу АТР є чутливою до зміни таких фізико-хімічних властивостей середовища інкубації, як рН та температура. Дійсно, зменшення концентрації протонів від 1 до 0,01 мкМ стимулює цю реакцію (рис. 7.9, табл. 7.4); отже, ефекти “протонування-депротонування” функціональних груп в системі “калікс[4]арен C-107 – АТР” є важливими для реалізації гідролізу нуклеозидтрифосфату. Що ж стосується впливу температури, то реакція каліксарен-залежного гідролізу АТР характеризується середнім значенням енергії активації $E_a = 50,7 \pm 8,9$ кДж/моль (табл. 7.4). Це дещо менше, ніж типові значення E_a , які є властивими для ензиматичних АТР-гідролазних реакцій, зокрема, для реакції Ca^{2+}, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР, що каталізується Ca^{2+} -транспортуючою АТРазою плазматичної мембрани клітин (55-73 кДж/моль) [18].

Певним чином протікання реакції каліксарен-залежного гідролізу АТР залежить і від концентрації її реагентів. Так, при фіксованій концентрації АТР платовий рівень p_{max} звільнення неорганічного фосфату P_i та максимальна миттєва швидкість реакції V лінійно

збільшувались із зростанням концентрації каліксарену (рис. 7.10). Отже, при сталій концентрації АТР значення $p_{\max}$ та V накопичення неорганічного фосфату визначаються концентрацією каліксарену. При фіксованій концентрації каліксарену величина $p_{\max}$ взагалі не залежала від концентрації АТР, а величина V нелінійно збільшувалась із зростанням концентрації цього нуклеозидтрифосфату, але без виходу на “плато” (рис. 7.11). Таким чином, при сталій концентрації каліксарену значення $p_{\max}$ накопичення неорганічного фосфату не визначається концентрацією АТР, а значення V визначається. З формально-кінетичної точки зору усі ці дані вказують на складність механізму каліксарен-залежної реакції гідролізу АТР. Очевидно, що питання з'ясування цього механізму також потребує подальшої розробки.

З іншого боку, зміна деяких інших фізико-хімічних факторів суттєво не впливає на каліксарен-залежний гідроліз АТР. Як з'ясувалося, реакції каліксарен-залежного гідролізу фосфангідридних зв'язків моонуклеотиду не притаманна субстратна специфічність: у її ході успішно гідролізується не лише АТР, але й інші нуклеозидтрифосфати, а також й аденозиндифосфат ADP (хоча і менш ефективно, ніж АТР) (табл. 7.4). Модифікація значення іонної сили та в'язкості цього середовища (моделювалося шляхом ізотонічної заміни 150 мМ хлоридів одновалентних катіонів на сахарозу) вельми незначно впливала на гідролізну реакцію (табл. 7.4). Як вже підкреслювалося вище, наше тлумачення силових взаємодій між каліксареном С-107 та АТР на рівні трьох можливих комплексів типу “Гість-Господар” наведено у роботі [25]: є підстави припускати, що між калікс[4]ареном С-107 та АТР утворюються міжмолекулярні водневі зв'язки різних типів, які стабілізують утворені комплекси. Так, у випадку всіх трьох комплексів NH_2^+ -групи одного аміно-(2-піридил)метилфосфонового фрагменту молекули С-107 взаємодіють з

γ - та β -фосфорильними залишками молекули АТР. З іншого боку, NH_2^+ -групи другого аміно-(2-піридил)метилфосфонового фрагменту молекули С-107 взаємодіють з α -фосфорильним залишком та гідроксилом дезоксирибози молекули АТР. І, нарешті, Р-ОН-групи одного аміно-(2-піридил)метилфосфонового фрагменту молекули С-107 зв'язуються з γ -фосфорильним залишком молекули АТР; в той же час Р-ОН-групи другого аміно-(2-піридил)метилфосфонового фрагменту молекули С-107 зв'язані з β - або α -фосфорильним залишком молекули АТР. Також необхідно підкреслити, що, поряд з водневими зв'язками, в стабілізації комплексу відіграють роль і більш слабкі взаємодії: π - π , ОН- π , NH_2^+ - π . Проте важливо відзначити наступне: нечутливість реакції гідролізу АТР до зміни іонної сили (табл. 7.4) дає підстави припускати, що електростатичним взаємодіям між калікс[4]ареном С-107 та АТР навряд чи належить суттєве значення у забезпеченні реакції гідролізу цього нуклеозидтрифосфату; ця точка зору не співпадає з такою, викладеною у роботі [2] у випадку вивчення взаємодії між АТР та калікс[4]арен-5,11,17,23-тетрасульфонатом.

Ми припускаємо, що результати, які були одержані нами при вивченні впливу калікс[4]арену С-107 на гідроліз АТР, можуть бути перспективними для більш кращого розуміння молекулярних механізмів реакцій як супрамолекулярного неензиматичного, так і ензиматичного (зокрема, Na^+ , K^+ -залежного) гідролізу АТР, процесів АТР-залежного транспорту іонів Са у субклітинних мембранних структурах, а також з точки зору спрямованої розробки своєрідних “молекулярних платформ” на основі каліксаренів для створення штучних (“абіогенних”) каталізаторів, здатних гідролізувати АТР. З іншого боку, у зв'язку з тим, що для каліксаренів є притаманною бактерицидна, антивірусна, протипухлинна та антитромботична

активність, вони практично не проявляють токсичної дії на клітини [26], у випадку розробки ліків на основі даних макроциклів треба, очевидно, мати на увазі, що, принаймні, деякі з них можуть утворювати комплекси з АТР (та іншими нуклеозидтри- та нуклеозиддифосфатами) та гідролізувати цей метаболіт.

ЧАСТИНА П'ЯТА.

КАЛІКСАРЕНИ ТА МЕХАНОКІНЕТИКА ПРОЦЕСУ СКОРОЧЕННЯ-РОЗСЛАБЛЕННЯ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ

РОЗДІЛ 8. КАЛІКСАРЕНИ ЯК МОДИФІКАТОРИ СКОРОТЛИВОЇ АКТИВНОСТІ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ.

8.1. ДОСЛІДЖЕННЯ ДІЇ КАЛІКС[4]АРЕНУ C-90 НА СКОРОТЛИВУ АКТИВНІСТЬ МІОМЕТРІЯ

Наведені нижче результати отримані у творчій співпраці з к.б.н. О.В. Цимбалюк.

Аналіз зміни механокінетичних параметрів скоротливої відповіді гладеньких м'язів матки при гіперкалієвій деполяризації за умов застосування калікс[4]арену C-90 – інгібітора Mg^{2+} , АТР-залежної кальцієвої помпи плазматичної мембрани, проводили за умов гіперкалієвої контрактури, коли застосовується фізіологічний розчин з підвищеною (за ізотонічних умов) концентрацією K^{+} . Відповідні механокінетичні розрахунки ґрунтуються на використанні метода, наведеного у «Додатку»; цей метод є корисним як при описі кінетики реакції каліксарен-індукованого неензиматичного гідролізу АТР, так і фаз скорочення – розслаблення механокінетичних кривих.

Смужки міометрія були попередньо інкубовані в розчині Кребса разом з калікс[4]ареном C-90. Скорочення, що були ініційовані аплікацією гіперкалієвого розчину (80 мМ), характеризувалися зниженням амплітуди f_m , та швидкостей скорочення та розслаблення (рис. 8.1).

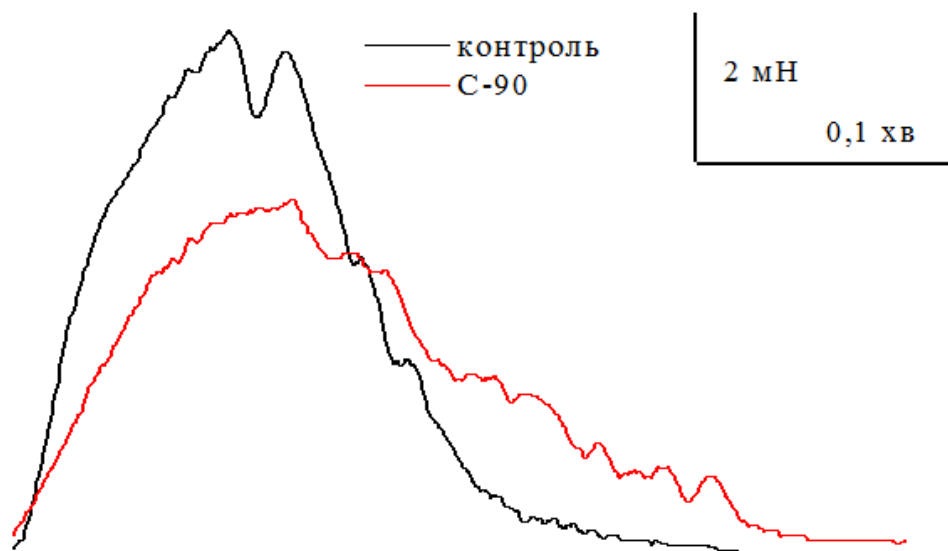


Рис. 8.1. Кінетика скорочень гладеньких м'язів матки в контролі та за дії калікс[4]арену C-90 (10 мкМ). Наведено результати типового експерименту

Щоб можна було кількісно охарактеризувати зміни скоротливої відповіді гладеньких м'язів під впливом калікс[4]арену C-90, ми провели лінеаризацію механокінетичних кривих фази розслаблення гіперкалієвих скорочень. Розрахунки показують, що при дії калікс[4]арену C-90 значення нормованих максимальних швидкостей $V_{n,r}$ у випадку фази розслаблення знижувалося порівняно з контролем (рис. 8.1). Так, середнє значення максимальної нормованої швидкості розслаблення у випадку дії калікс[4]арену C-90 (10 мкМ) зменшувалося на 25 % (зміни статистично достовірні $p < 0,05$).

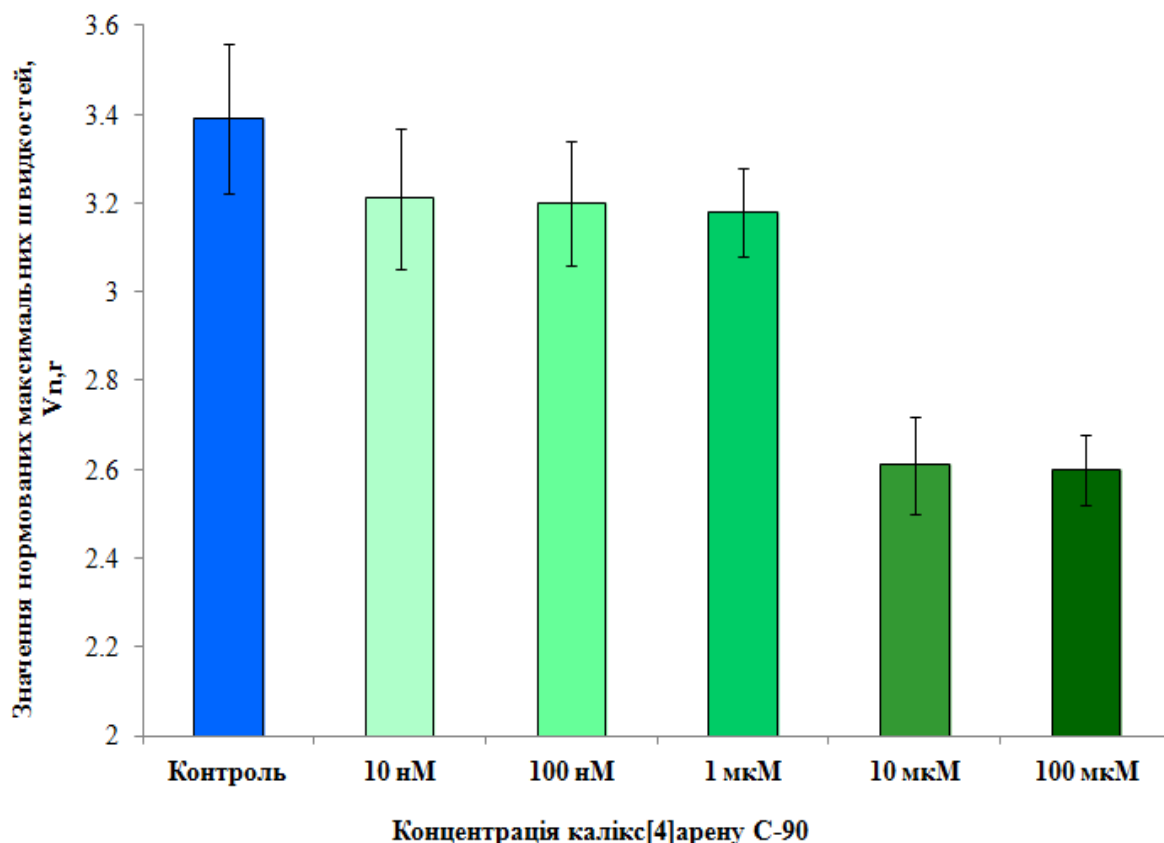


Рис. 8.2. Вплив калікс[4]арену C-90 на нормовані максимальні швидкості фази розслаблення гладеньких м'язів матки щура $V_{n,r}$, с^{-1} ($M \pm m$, $n = 5$)

У таких досліджах важливим є визначення мінімальної діючої концентрації калікс[4]арену C-90, за якої реалізується його фізіологічний вплив. Ми показали, що мінімальною діючою концентрацією калікс[4]арену C-90 є 10 мкМ (рис. 8.2), так як при меншій концентрації аплікація калікс[4]арену C-90 (0,01 - 1 мкМ) практично не призводила до достовірно відмінних змін у максимальній нормованій швидкості розслаблення гладеньких м'язів.

Також були проведені дослідження дії калікс[4]арену C-90 на швидкість скорочення гладеньких м'язів при їх спонтанній активності, у тому числі за умов впливу утеротонічного пептидного гормону окситоцину. Наведені нижче результати отримані у творчій співпраці з

з І.В. Геращенко та проф. М.А. Мохортом (Інститут фармакології та токсикології НАМН України).

Поздовжні смужки міометрія вирізували із рогів матки щурів, після декапітації під легким ефірним наркозом, у відповідності із міжнародними рекомендаціями (етичним кодексом) по проведенню медико-біологічних досліджень з використанням тварин (1985 рік). Виділені смужки фіксували в проточній камері на двох сталевих гачках з попереднім навантаженням 10 mN. Камера об'ємом 0,5 мл перфузувалася розчином Кребса зі швидкістю 1 0,7 мл/хв. Температура підтримувалася на постійному рівні $37 \pm 0,5$ °C.

Силу скорочувальних реакцій вимірювали в ізометричному режимі за допомогою ємнісних тензометричних датчиків (FTK-0,1; ТОВ «Miosensor», м. Москва). Запис скорочень здійснювали на персональному комп'ютері із застосуванням програм DataTrax2 та LabScribe2, за допомогою аналогово-цифрового перетворювача Lab-Trax-4/16 (World Precision Instruments). Запис механограми ізольованих поздовжніх смужок рогів матки щурів проводили після періоду стабілізації, що тривала 40 хв у проточній камері. Після досягнення стабільних фазних скорочень ізольованих гладеньком'язових препаратів, здійснювали запис вихідних даних протягом 10 хв. Далі здійснювали аплікацію досліджуваних сполук в концентрації 100 мкМ/л протягом 15 хв, після додавали окситоцин (0,1 МО/мл).

На механограмі вимірювали нормовану максимальну швидкість скорочення на окситоцин за методом описаним раніше [1]. В якості контролю слугувала група із скороченням на окситоцин інтактного міометрія.

В дослідженнях *in vitro* на ізольованих поздовжніх смужках міометрія щурів було встановлено, що нормована швидкість скорочення V_{nc} у відповідь на окситоцин (0,1 МО/мл) (контроль) складає $0,0205 \pm 0,0024$ с⁻¹ (рис. 8.3) ($M \pm m$, $n = 10$).

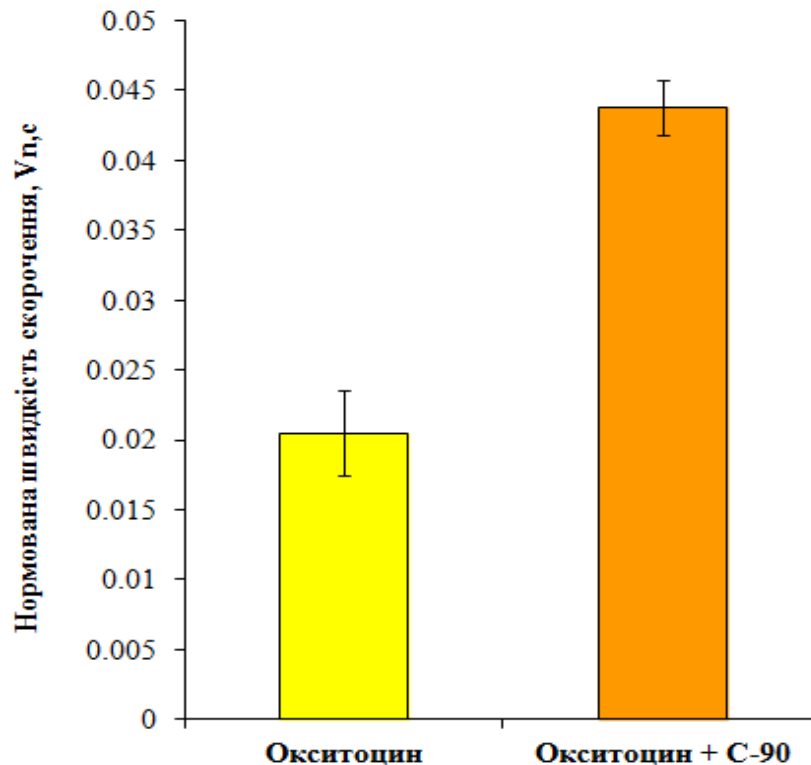


Рис. 8.3. Зміна нормованої швидкості V_{nc} скорочень міометрія щурів *in vitro* при дії окситоцину (0,1 МО/мл) за умов впливу калікс[4]арену C-90 (100 мкМ) ($M \pm m$, $n = 10$)

За умов попередньої аплікації на ізольовану смужку міометрія селективного інгібітора Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани – калікс[4]арену C-90 (100 мкМ) нормована максимальна швидкість окситоцин-індукованого скорочення V_{nc} збільшувалася більше ніж в два рази – до $0,0438 \pm 0,0014 \text{ c}^{-1}$ ($M \pm m$, $n = 18$) (рис. 8.3). Одержані *in vitro* результати (рис. 8.3) цілком відповідають тлумаченню дії калікс[4]арену C-90 як, інгібітора Mg^{2+} , АТР-залежної кальцієвої помпи плазматичної мембрани, яка викидає іони Ca з міоцитів.

Отже, калікс[4]арен C-90 підсилює швидкість скорочення міометрія у відповідь на стимуляцію утеротоніком окситоцином.

В клінічній практиці для стимуляції пологової активності уже досить давно використовують пептидний гормон окситоцин [2, 3, 4].

Це дозволяє зменшити тривалість пологів в середньому на 1,5 год за рахунок підвищення частоти та інтенсивності скорочення матки [5]. Показано також, що стимуляція пологів високими дозами окситоцину може призводити до виникнення ряду побічних ефектів, таких як розвиток аутизму у дітей [6], брадикардія та асфіксія, геморагії [3], аномалії серця [7]. Отже, актуальним для клінічної практики є розробка нових підходів, які б дозволили залишити стимулюючий ефект дії окситоцину, але зменшити його побічні наслідки.

Таким чином, отримані нами дані показують, що калікс[4]арен C-90 потенційно підвищує скоротливу активність міометрія. Ця сполука позитивно впливає на кінетичні параметри скоротливої активності матки, що підсилюється його синергічним ефектом з окситоцином. Те, що аплікація калікс[4]арену C-90 призводить до зростання тонуусу матки, дозволяє розглядати цей калікс[4]арен як препарат, придатний не тільки для стимуляції пологової активності, а також для корекції патологічних станів, пов'язаних зі слабким тонуусом гладеньких м'язів, як маткового, так і інших типів.

8.2. ПОРІВНЯЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ДІЇ КАЛІКС[4]АРЕНУ C-99 ТА УБАЇНУ НА МЕХАНОКІНЕТИКУ ПРОЦЕСУ «СКОРОЧЕННЯ- РОЗСЛАБЛЕННЯ» ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ САЕСУМ ЩУРІВ

В фізіологічних умовах головним індуктором скорочень гладеньких м'язів є позаклітинний Ca^{2+} , зростання концентрації якого в міоцитах може спричинятися через потенціал- та рецепторкеровані кальцієві канали [8].

Відповідно вивчався вплив убаїну та калікс[4]арену C-99 на скоротливі відповіді гладеньком'язових препаратів саесум щурів у випадках активації проведення збуджуючого сигналу по шляхам електро- та фармакомеханічного спряження збудження-скорочення.

Наведені нижче результати отримані у творчій співпраці з к.б.н. О.В. Цимбалюк [9].

Класичною моделю у вивченні ефективності електромеханічного шляху спряження при скороченні в гладеньких м'язах є гіперкалієва контрактура: фізіологічний розчин зі збільшеною (за ізотонічних умов) концентрацією іонів K^+ викликає деполяризацію гладеньком'язових клітин і, як наслідок його використання, вхід в міоцити позаклітинного Ca^{2+} через потенціалкеровані Ca^{2+} -канали [8].

Як ми показали раніше, у випадку гладеньком'язових клітин калікс[4]арен C-99 ефективно ($I_{0,5} = 98 \pm 8$ нМ) інгібував ензиматичну активність убаїнчутливої Na^+, K^+ АТРази плазматичної мембрани ($I_{0,5} = 21 \pm 5$ мкМ), не впливаючи при цьому на активність "базальної" Mg^{2+} -АТРази ($M \pm m$; $n = 5$). Відповідно логічним було припущення щодо можливої односпрямованості впливу убаїну та зазначеного калікс[4]арену й на параметри скоротливої активності гладеньких м'язів.

Саме тому вивчалися в порівняльному аспекті зміни механокінетичних параметрів скоротливих відповідей гладеньких м'язів саесит при калієвій деполяризації за умов використання убаїну та калікс[4]арену C-99 ($M \pm m$; $n = 6 - 7$) (рис 8.4).

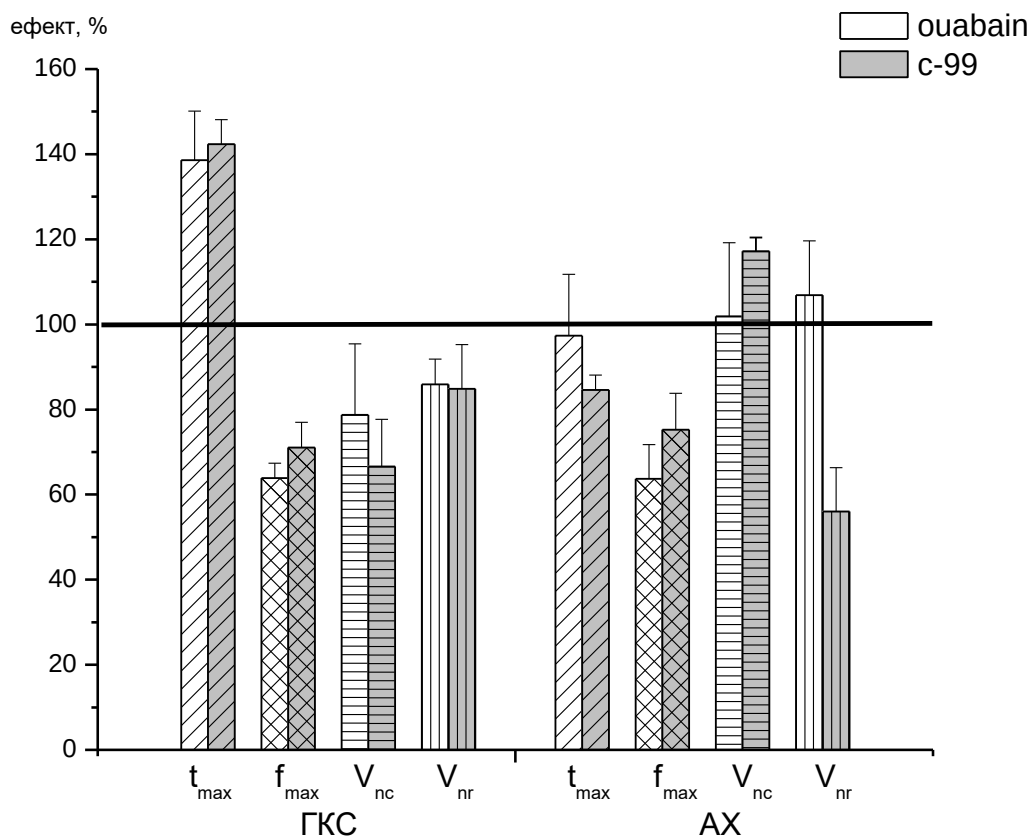


Рис. 8.4. Дія калікс[4]арену С-99 та уабаїну (у % порівняно з контролем, прийнятим за 100 %) на ізометричне скорочення гладеньких м'язів саесит, викликаних аплікацією гіперкалієвого розчину (ГКР, 80 мМ) та ацетилхоліну (АХ, 10 мкМ) в нормальному розчині Кребса

Тут: t_m – час досягнення амплітудного значення сили скорочення, f_m – амплітуда скорочення, V_{nc} - максимальна нормована швидкість фази скорочення, V_{nr} - максимальна нормована швидкість фази розслаблення

Аплікація гіперкалієвого розчину (80 мМ) після 30 хв попередньої інкубації препаратів в розчині Кребса з уабаїном (10 мкМ) супроводжувалась вірогідним зниженням амплітуди скорочень f_m у середньому на 30 – 40 % порівняно з контролем, прийнятим за 100 %. В аналогічних умовах калікс[4]арен С-99 (10 мкМ) спричиняв вірогідне зниження амплітуди скорочень приблизно на таку ж саму величину - на 25 – 35 % відносно контролю. Що ж стосується часу досягнення t_m

амплітудного значення сили скорочення f_m , то цей параметр вірогідно збільшувався стосовно контролю в середньому на 30 – 50 % у випадку дії обох речовин ($P \leq 0,05$). В умовах дії убаїну і калікс[4]арену C-99 значення нормованих максимальних швидкостей V_n у випадку фаз скорочення та розслаблення зменшувались порівняно з контролем. Так, середнє значення максимальної нормованої швидкості скорочення V_{nc} у випадку дії убаїну та калікс[4]арену C-99 зменшувалось на 20 - 30 % (відміни були вірогідними щодо контролю, $P \leq 0,05$). Середнє ж значення максимальної нормованої швидкості розслаблення V_{nr} зменшувалось на 10 - 20 % як під дією убаїну, так і калікс[4]арену C-99 ($P \leq 0,05$) (рис. 8.4).

Одержані результати добре узгоджуються з даними літератури, за якими убаїн пригнічував скоротливі відповіді за умов аплікації розчинів з підвищеною концентрацією іонів K^+ у випадку гладеньком'язових препаратів ileum та taenia coli мурчаків [10, 11, 12].

Також здійснювали перевірку можливої модифікації убаїном та калікс[4]ареном C-99 рецепторкерованих механізмів регуляції внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca^{2+} в гладеньких м'язах саесит щурів. З цією метою реєстрували скорочення препаратів під дією агоніста мускаринових рецепторів ацетилхоліну (10^{-5} М) (рис. 8.4).

Як було встановлено, обидві досліджувані речовини справляють вірогідний пригнічуючий вплив на амплітуду початкового фазного компоненту ацетилхолінових скорочень. Під дією калікс[4]арену C-99 спостерігалось вірогідне пригнічення фазного компоненту, тоді як амплітуда тонічного компоненту залишалась на рівні контрольних значень. У випадку убаїну було отримано пригнічення одного порядку обох компонентів ацетилхолін-викликаного скорочення. Такі зміни співвідношення фазного і тонічного компонентів ацетилхолінових скорочень зумовили відповідні зміни в кінетиці фаз розслаблення.

У дослідях по вивченню скоротливої активності препаратів

саесит, спричиненої ацетилхоліном (10 мкМ) в нормальному розчині Кребса (рис. 8.4), було встановлено, що уабаїн (10 мкМ) та калікс[4]арен С-99 (10 мкМ) вірогідно стосовно контролю знижують амплітуду скорочень f_m відповідно на 20 - 40 % ($P \leq 0,05$). Що ж стосується часу досягнення t_m амплітудного значення сили скорочення f_m , то цей параметр у випадку дії уабаїну практично не змінювався стосовно контролю, але мав тенденцію до зменшення (в середньому – на 10 - 15 %) у випадку дії калікс[4]арену С-99. При порівнянні нормованих максимальних швидкостей V_{nc} фаз скорочення в контролі та за умови модифікації м'язів калікс[4]ареном С-99 було виявлено, на відміну від результатів експериментів з уабаїном, вірогідне зростання цього показника на 15 - 20 % ($P \leq 0,05$). В той же час, нормовані максимальні швидкості V_{nr} фази розслаблення під дією калікс[4]арену С-99 вірогідно зменшувались – в середньому на 30 - 50 % ($P \leq 0,05$), а в присутності уабаїну залишались практично на контрольному рівні.

Отже, уабаїн (10 мкМ) та калікс[4]арен С-99 (10 мкМ) вірогідно пригнічували амплітуду скоротливих відповідей індукованих як калієвою деполяризацією, так і аплікацією ацетилхоліну. Виявилось, що за деякими механокінетичними показниками уабаїн та калікс[4]арен С-99 як в якісному, так і в кількісному відношенні, односпрямовано змінюють скоротливі відповіді, які були викликані гіперкалієвою деполяризацією та аплікацією ацетилхоліну в нормальному та номінально безкальцієвому розчині Кребса. Втім, у випадку скорочень, індукованих ацетилхоліном, вплив ефекторних речовин на максимальну нормовану швидкість розслаблення гладеньких м'язів V_{nr} суттєвим чином відрізняється: ефективне гальмування цієї швидкості спостерігається в присутності калікс[4]арену С-99, тоді як за наявності уабаїну цей показник залишається на рівні контролю. В цілому ж дані, які були одержані, дають підставу припускати, що дія високоефективного інгібітора Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани

калікс[4]арену C-99 на механокінетику ізометричних скорочень гладеньких м'язів саесит є подібною до дії убаїну.

В наступних експериментах [13] було встановлено, що в умовах попереднього повного блокування натрієвої помпи убаїном (100 мкМ) калікс[4]арен C-99 (100 мкМ) спричиняє активацію спонтанних скорочень гладеньких м'язів. Також виявлено, що цей калікс[4]арен в умовах попередньої дії убаїну змінює механокінетичні параметри скоротливих реакцій на деполяризацію плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин гіперкалієвим розчином (80 мМ) і на аплікацію агоніста мускаринових холінорецепторів ацетилхоліну (10 мкМ). Виявлено, що калікс[4]арен C-99 практично не змінює мобілізацію іонів Ca^{2+} із саркоплазматичного ретикулуму.

ПІДСУМКИ

В цій монографії ми намагалися проаналізувати та узагальнити результати власних експериментальних досліджень та відповідні літературні дані щодо вивчення впливу циклічних олігомерів фенолів – калікс[4]аренів на функціонування Mg^{2+} -АТФ-гідролазних систем гладеньком'язових клітин. Зазначені дослідження є трансдисциплінарними, адже вони провадилися на стику різних наук та наукових напрямів - біохімії, органічної та супрамолекулярної хімії, біофізичної хімії та біохімії «*in silico*».

Зважаючи на те, що кальцієва та натрієва помпи плазматичної мембрани є мембранозв'язаними ензимами і досліджувані нами калікс[4]арени мають гідрофобні властивості, можна було припустити, що виявлена нами їхня ефекторна дія на ензими обумовлена взаємодією з мембраною. Аналіз літературних даних вказує на те, що каліксарени в органічному розчиннику здатні утворювати тверді ліпідні наночастинки при подальшому розчиненні у воді.

За допомогою методів фотон-кореляційної спектроскопії та електронної мікроскопії ми показали, що у присутності калікс[4]арену С-107 відбувається аглютинація везикул між собою та/або з мікрочастинками калікс[4]арену. Показане нами збільшення гідродинамічного діаметру везикул підтверджується літературними даними, де мова іде за злиття міцел каліксаренів з ліпідами мембран.

Деякі з каліксаренів можуть взаємодіяти з біологічними мембранами, при цьому вони здатні забезпечувати пасивний транспорт іонів, або ж навпаки – блокують його. Таким чином, вони мають впливати на величину трансмембранного потенціалу, а також на активність електроензимів, яка залежить від цього потенціалу. За допомогою методу протокової цитометрії ми досліджували вплив калікс[4]арену С-99 на K^{+} -дифузійний трансмембранний потенціал у

системі “K⁺/валіноміцин – везикули плазматичних мембран ”. Нами було показано, що вплив калікс[4]арену C-99 на флуоресцентну відповідь потенціалчутливого зонда DiOC₆(3) залежить від поляризації мембрани. Таким чином, калікс[4]арен C-99 може проявляти мембранотропні ефекти і опосередковано впливати на АТР-гідролазні мембранозв’язані ензими, активність яких залежить від структурно-функціонального стану мембран. Ми допускаємо, що вплив цього калікс[4]арену на активність Na⁺,K⁺-АТРazi плазматичної мембрани деякою мірою реалізується внаслідок мембранотропних ефектів.

В процесі дослідження флуоресцентних характеристик калікс[4]аренів ми з’ясували, що двом калікс[4]аренам (C-90 та C-107) властива автофлуоресценція. Тому ми за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопу вивчали можливість проникності калікс[4]аренів у клітину. Результати свідчать на користь того, що калікс[4]арен C-107 дійсно може не лише вбудовуватись та накопичуватись в біологічних мембранах, але й проникати крізь них.

Ми допускаємо, що рідинно-кристалічний стан мембран і склад ліпідів може впливати на функціонування Na⁺,K⁺-АТРazi та Ca²⁺,Mg²⁺-АТРazi плазматичної мембрани. Щоб дослідити мембранотропний вплив калікс[4]аренів ми використали флуоресцентний зонд АНС, який може бути задіяний для вивчення поверхневих властивостей мембрани. При внесенні у середовище інкубації везикул плазматичних мембран за присутності калікс[4]арену C-107 відбувається гасіння флуоресценції зонда АНС. Максимально рівень флуоресценції зонда знижується за присутності калікс[4]арену C-107 у 1,5 рази, що вказує на зниження кількості центрів взаємодії з зондом на поверхні плазматичної мембрани. Отже можна припустити, що під впливом калікс[4]арену C-107 змінюється полярність та/або поверхневий заряд плазматичної мембрани.

Таким чином, отримані результати вказують на можливі зміни як

рідинно-кристалічного стану мембран, так і їх поверхневого заряду під впливом калікс[4]аренів С-107 та С-90, що в свою чергу, може опосередковано впливати на Na^+, K^+ -АТРазну та $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазну активність відповідно.

Приймаючи до уваги те, що Mg^{2+} ,АТР-залежна Ca^{2+} -помпа плазматичної мембрани є високоафінним протеїном, що видаляє Ca^{2+} із цитоплазми, а також відіграє ключову роль, у випадку гладеньком'язових клітин, в регуляції процесів скорочення/розслаблення м'язів, ми вивчали дію калікс[4]аренів на її активність.

Було показано, що калікс[4]арен С-90 є ефективним і селективним, на рівні плазматичної мембрани, інгібітором $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази як у фракції плазматичних мембран міоцитів матки, так і у випадку препарату очищеної солюбілізованої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази. Він майже не впливав на інші АТР-гідролазні ензиматичні активності плазматичної мембрани: Na^+, K^+ -АТРази і "базальну" Mg^{2+} -АТРази. Значення коефіцієнта інгібування $I_{0,5}$ складає $20,2 \pm 0,5$ та $34,6 \pm 6,4$ мкМ ($M \pm m$; $n = 5$); величина коефіцієнта Хілла n_H становила $0,55 \pm 0,02$ і $0,67 \pm 0,05$ ($M \pm m$; $n = 5$) відповідно для $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази у фракції плазматичних мембран та у випадку препарату очищеної солюбілізованої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази.

Втім, структурні компоненти молекули калікс[4]арену С-90, а саме модельні сполуки калікс[4]арен С-150 (суто «калікс[4]аренова чаша») та сполука М-1 (четверта частина молекули С-90), незначно пригнічують $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазну активність. Таким чином, для ефективного прояву інгібувальної дії калікс[4]арену С-90 на $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазну активність необхідна сукупна наявність чотирьох просторово орієнтованих на калікс[4]ареновій платформі сульфониламідинових груп. Самі по собі калікс[4]арен С-150 чи сполука М-1 не забезпечують інгібування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани.

Також ми вивчали, які структурні особливості калікс[4]арену C-90 важливі для інгібування Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани. Ці дослідження проводились з метою підвищення ефективності інгібування та селективності дії калікс[4]арену на рівні клітинних структур. Показано, що інгібіторний ефект калікс[4]аренів зростає із збільшенням кількості фенілсульфоніламідінових груп на верхньому вінці калікс[4]аренової чаші. Разом з тим має суттєве значення і положення фенілсульфоніл-амідінових груп на верхньому вінці калікс[4]аренів: якщо вказані групи знаходяться на протилежних фенольних циклах калікс[4]арену - ефективність інгібування Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази є більшою, ніж у випадку їх розташування на сусідніх фенольних кільцях. Ми встановили, що на ефективність інгібування Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани не впливає наявність *трет*-бутильних залишків. Якщо зі складу фенілсульфоніламідінової групи калікс[4]арену видалити фенольний фрагмент, то це суттєво не змінить спорідненості каліксаренового інгібітора до Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани. Отже, саме сульфоніламідінові групи на верхньому вінці макроциклу мають вирішальне значення у прояві інгібіторного ефекту.

Калікс[4]арени, які ми досліджували, були гідрофобними сполуками. Якщо намагатися їх використовувати у якості інгібіторів ензимів чи як фармакологічних засобів, ця обставина може бути суттєвою. Тому ми дослідили структурні аналоги калікс[4]арену C-90, які відрізнялися за наявністю гідрофобних груп. Показано, що підвищення гідрофобності калікс[4]аренів покращує їх мембранотропні ефекти та взаємодію з плазматичною мембраною, що, в свою чергу, полегшує умови взаємодії трансмембранних доменів з інгібітором. Модифікація нижнього вінця калікс[4]аренового макроциклу більш ліпофільними октильними залишками замість пропільних привела до

деякого збільшення спорідненості інгібітора до $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани.

В подальших експериментах ми досліджували кінетичні закономірності інгібуючого впливу калікс[4]арену С-90. Розраховані нами уявна константа Міхаеліса K_m , коефіцієнти активації іонами Са та Mg (K_{Ca} , K_{Mg}), також відповідні коефіцієнти Хілла ($n_{\text{H,ATP}}$, $n_{\text{H,Ca}}$, $n_{\text{H,Mg}}$) свідчать на користь того, що калікс[4]арен С-90 діє як повний неконкурентний інгібітор. У концентрації до 50 мкМ калікс[4]арен С-90 практично не впливає на вказані коефіцієнти. При цьому дозозалежно від концентрації С-90 зменшується максимальна швидкість ензиматичного гідролізу АТФ V_{max} .

Аналіз даних літератури свідчить на користь того, що функціонування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин дійсно забезпечує трансмембранне активне перенесення Ca^{2+} із внутрішньоклітинного простору у зовнішньоклітинне середовище. Тому ми припустили, що зниження активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани під впливом калікс[4]арену С-90 має бути асоційованим зі зменшенням ефективності транспортної функції кальцієвої помпи плазматичної мембрани. Для дослідження транспорту Ca^{2+} була запропонована модель: везикули плазматичної мембрани, навантажені Ca^{2+} -чутливим зондом fluo-4 АМ. Попередні експерименти показали, що накопичення Ca^{2+} везикулами плазматичних мембран відбувається у присутності в середовищі АТФ та іонів Са і Mg, а специфічні інгібітори інших Ca^{2+} -транспортувальних систем (тапсигаргін, азид) не впливають на цей процес. Доведено, що калікс[4]арен С-90 практично повністю блокує акумуляцію Ca^{2+} у везикулах плазматичних мембран. Отже, цей калікс[4]арен не лише пригнічує активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази, але й інгібує спряжений з цією активністю транспорт Ca^{2+} у везикулах.

Беручи до уваги те, що калікс[4]арен С-90 ефективно впливає на

гомеостаз Ca^{2+} у гладеньком'язових клітин, ми припустили, що він має впливати і на скоротливу активність гладеньких м'язів. Цей вплив повинен привести до зростання базальної концентрації Ca^{2+} в клітинах міометрія і, відповідно, до збільшення базального тонуусу матки. Ми використали метод математичного моделювання і розбудували кількісну модель (в стаціонарному режимі) індукції калікс[4]ареном C-90 збільшення базальної концентрації іонів Ca у незбуджених міоцитах матки. Результати моделювання показують, що калікс[4]арен C-90 повинен помірно підвищувати внутрішньоклітинну концентрацію Ca^{2+} у гладеньком'язових клітинах.

Ці дані підтверджуються експериментальними результатами з використанням конфокальної мікроскопії. Було показано, що під впливом калікс[4]арену C-90 дійсно зростає концентрація іонізованого Ca^{2+} у міоцитах.

За допомогою методу фотон-кореляційної спектроскопії було продемонстровано, що калікс[4]арен C-90, подібно до дії утеротоніка окситоцину, зменшує ефективний гідродинамічний діаметр міоцитів у випадку суспензії гладеньком'язових клітин. Імовірно, що зміни гідродинамічного діаметру міоцитів віддзеркалюють перебудови цитоскелету та зміни водно-осмотичного балансу, які відбуваються під час м'язового скорочення.

За допомогою молекулярного докінгу було визначено найбільш вірогідні місця зв'язування калікс[4]арену C-90 з Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазою: це ділянка, яка структурно близька до зони зв'язування з високою спорідненістю до Ca^{2+} (петля між спіралями M4-M6 і спіраль M8). При цьому дана петля модулює функціональні властивості Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази, в том числі спорідненість до катіонів. Було встановлено, що в утворенні комплексу ензиму з калікс[4]ареном C-90 найбільш важливими є гідрофобні (стеричні), стекінг- та електростатичні взаємодії. Отже наші результати по комп'ютерному моделюванню

підтверджують експериментальні дані щодо здатності калікс[4]арену С-90 знижувати активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани.

$\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза саркоплазматичного ретикулума, як і $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза плазматичної мембрани, належить до АТРаз Р-типу і має високий ступінь структурної та амінокислотної подібності до $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани. Тому було важливо перевірити дію калікс[4]арену С-90 на активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази саркоплазматичного ретикулума. Ми продемонстрували, що калікс[4]арен С-90 пригнічує $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазну активність саркоплазматичного ретикулума, проте величина коефіцієнта інгібування $I_{0,5}$ була у 3 рази вища порівняно з $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазою плазматичної мембрани. Спорідненість $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази саркоплазматичного ретикулума до АТР практично не залежить від наявності калікс[4]арену С-90 у середовищі інкубації, що вказує на відсутність конкуренції між АТР та інгібітором. Цей каліксарен також не впливав на коефіцієнти інгібування ($I_{0,5}$) та на їх кооперативність (n_H) для іонів Са та Mg. Отримані нами дані вказують на те, що калікс[4]арен С-90 діє на помпу саркоплазматичного ретикулума за механізмом повного неконкуретного інгібування.

Також ми встановили, що калікс[4]арен С-90 у якості селективного інгібітора Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани пригнічує релаксацію м'язевого скорочення в режимі реєстрації спонтанної активності смужок міометрія. Показано, що він стимулює базальний тонус міометрія. В дослідженнях *in vitro* на ізольованих поздовжніх смужках міометрія щурів було встановлено, що у присутності калікс[4]арену С-90 підсилюється швидкість скорочення міометрія у відповідь на стимуляцію утеротоніком окситоцином. Встановлений ефект підсилення дії окситоцину під впливом калікс[4]арену С-90 дає можливість розробляти нові підходи з використанням С-90, які б

дозволили залишити стимулюючий ефект дії окситоцину, але зменшити його побічні наслідки.

Натрієва помпа (Na^+, K^+ -АТРаза плазматичної мембрани) – ензим, який енергозалежно та електрогенно транспортує іони Na^+ і K^+ , залучення у підтримання трансмембранного потенціалу, іонного гомеостазу, у передачу сигналів до клітини і регуляцію експресії багатьох генів, які кодують важливі внутрішньоклітинні протеїни. Порушення її функціонування є ключовою ланкою в розвитку таких поширених патологій, як артеріальна гіпертензія, цукровий діабет зі супутнім пригніченням моторики кишечника, ниркова та серцева недостатність, прееклампсія вагітних тощо.

Під час пошуку ефекторів, здатних модифікувати ензиматичну активність, важливо щоб їх дія була специфічною та селективною. На початку нашої роботи з калікс[4]аренами ми протестували більше 14 сполук, проте лише деякі з них нас зацікавили у відповідному аспекті. У подальших дослідженнях особливу увагу привернули калікс[4]арени С-97, С-99 та С-107, які ефективно інгібували ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази у фракції плазматичної мембрани, не впливаючи на активність Mg^{2+} -АТРази. Встановлено, що ці сполуки дозозалежно та значно ефективніше, ніж убаїн, пригнічують активність Na^+, K^+ -АТРази: значення уявних коефіцієнтів інгібування $I_{0,5}$ для цих калікс[4]аренів $< 0,1$ мкМ, а значення $I_{0,5}$ для убаїну складає 20 – 30 мкМ. Важливо, що навіть у концентрації 100 мкМ зазначені калікс[4]арени не впливають на активність Mg^{2+} -АТРази.

Приймаючи до уваги високу ефективність дії калікс[4]аренів С-97, С-99 та С-107, важливо було дослідити залежність цієї дії від структурної організації каліксаренової молекули. Для цього було проведене дослідження дії структурних компонентів молекули калікс[4]арену, модельних сполук – незаміщеного дипропоксикалікс[4]арену С-150, та N-(4-гідроксифеніл)-2-піридил-

амінофосфонової кислоти М-3. Молекула калікс[4]арену С-107 складається як би із 3-х частин: каліксаренової “чаші” (еквівалент – сполука С-150), і двох амінофосфонових груп, пов’язаних з фенольними фрагментами (еквівалент – сполука М-3). Показано, що структурні фрагменти цього калікс[4]арену С-150 та М-3 у широкому діапазоні концентрацій практично не впливали на ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази та Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани. Отже, пригнічувальна дія калікс[4]арену С-107 пов’язана з спільним впливом двох просторово орієнтованих на каліксареновій платформі амінофосфонових груп, а не з дією тетрафенольного макроциклу як такого, або дією окремого амінофосфонового залишку.

Також ми вивчали дію калікс[4]арену С-160, який є регіоізомером калікс[4]арену С-107. Ці калікс[4]арени відрізняються один від одного різним положенням замісників каліксаренової чаші на верхньому вінці макроциклу (у випадку калікс[4]арену С-160 вказані залишки розташовані у проксимальних положеннях, на відміну від калікс[4]арену С-107, у якого ці ж залишки знаходяться у дистальних положеннях). Виявилось, що зміна положення замісників каліксаренової чаші дуже важлива, так як це призводить до повної втрати інгібувальних властивостей калікс[4]арену С-160 щодо Na^+, K^+ -АТРази порівняно з калікс[4]ареном С-107. Для з’ясування структурних особливостей калікс[4]аренів С-107 та С-160 було проведене їх молекулярне моделювання з використанням програми «HyperChem 7.01». Проведені розрахунки показують що обидва калікс[4]арени С-107 та С-160 мають практично однакову конформацію *регулярний* конус, проте відстані N...N, C...C, P...P між амінофосфоновими фрагментами N–C–P суттєво відрізняються. Отже, вплив калікс[4]арену С-107 на Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани визначається оптимальним просторовим розташуванням

амінофосфонових груп на каліксареновій платформі, що вірогідно є комплементарним до сайту взаємодії з Na^+, K^+ -АТРазою.

Щоб з'ясувати, яку роль відіграє структурна організація молекули калікс[4]арену С-99 у прояві пригнічувальної дії на Na^+, K^+ -АТРазу плазматичної мембрани, були досліджені калікс[4]арени С-296, С-297, С-424, С-425, С-426, С-427. Ці сполуки є структурними аналогами калікс[4]арену С-99. Було показано, що калікс[4]арени С-296 і С-297, у яких нижній вінець відрізняється від калікс[4]арену С-99 наявністю ще двох додаткових пропоксильних груп, є менш ефективними інгібіторами Na^+, K^+ -АТРази порівняно з калікс[4]ареном С-99. Калікс[4]арени С-424, С-425, С-426, С-427 відрізняються від калікс[4]арену С-99 замісниками на верхньому вінці каліксаренового макроциклу. Показано, що калікс[4]арен С-424, який не мвстить залишків фосфонової кислоти, не впливає на активність Na^+, K^+ -АТРази та "базальної" Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани. Калікс[4]арен С-425 та С-427, які мають 4 та 3 фосфонатні залишки на верхньому вінці макроциклу відповідно, з меншою ефективністю, у порівнянні з калікс[4]ареном С-99, інгібують Na^+, K^+ -АТРазну активність плазматичної мембрани.

Таким чином, проведенні дослідження впливу низки калікс[4]аренів, які є структурно подібними до С-99, на Na^+, K^+ -АТРазу активність плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин дозволяють зрозуміти, які саме хімічні групи калікс[4]аренів зумовлюють їхні інгібіторні властивості щодо вказаного ензиму.

Транспортна Na^+, K^+ -АТРаза по суті є енергозалежним електрогенним $3\text{Na}^+-2\text{K}^+$ -антипортером і ми припустили, що її активність буде втрачатися, якщо одночасно з активним котранспортом Na^+ та K^+ буде мати місце незалежний від нього симпорт додаткового аніону (наприклад, Cl^-) з катіонами Na , чи незалежний від зазначеного котранспорту антипорт додаткового носія

позитивного заряду (наприклад, протону H^+). Наше припущення було підтверджене у експериментах, котрі були виконані на пласких ліпідних мембранах д.б.н. О.Я. Шатурським, згідно з якими калікс[4]арен C-99 дійсно здатний вбудовуватися в пласку мембрану та формувати в ній струмопровідну, щодо аніонів Cl, структуру.

Як добре відомо, для такого мембранозв'язаного електрогенного ензиму як Na^+,K^+ -АТРаза, властивий складний рівень структурної організації та регуляції, перш за все – за участі іманентних реагентів (іонів Na, K, Mg, а також АТР), при цьому суттєве значення має стан та властивості фосфоліпідного матриксу плазматичної мембрани, яке впливає не лише на каталітичну активність, але й на чутливість ензиму до специфічного інгібітора убаїну. Відповідно, складним є питання щодо механізму дії калікс[4]арену C-97 на активність мембранозв'язаної натрієвої помпи. Ми продемонстрували, що такий механізм не зумовлений зв'язуванням зазначеним калікс[4]ареном іонів Mg та (чи) його впливом на взаємодію Mg^{2+} з ATP^{4-} у середовищі інкубації. Інгібуючий ефект калікс[4]арену C-97 на Na^+,K^+ -АТРазу не пов'язаний також із можливим зменшенням спорідненості ензиму до іонів Mg чи АТР - внутрішньоклітинних реагентів АТР-гідролазної реакції. Проте, як з'ясувалось, калікс[4]арен C-97 зменшує спорідненість ензиму до іону Na (катіон, що активує Na^+,K^+ -АТРазу з цитоплазматичного боку мембрани), але збільшує до убаїну (специфічний інгібітор, що діє з зовнішньоклітинного боку мембрани). У той же час цей калікс[4]арен не впливає на спорідненість ензиму до іншого одновалентного активуючого катіона – іона K, який стимулює активність ензиму з зовнішнього боку клітини. В цілому ж необхідно підкреслити, що питання щодо іонних та мембранних механізмів дії калікс[4]арену C-97 на натрієву помпу плазматичної мембрани потребує подальшого з'ясування.

Отже, ми стверджуємо, що калікс[4]арен С-97 є високоефективним ($I_{0,5} = 33 \pm 4$ нМ) порівняно з убаїном селективним (щодо відсутності впливу на “базальну” Mg^{2+} -АТРази) інгібітором Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани. В практичному аспекті він у концентрації 1 – 10 мкМ може бути використаний у біохімічній мембранології при тестуванні та вивченні кінетичних та каталітичних властивостей натрієвої помпи у випадку такої експериментальної моделі, як фрагменти плазматичної мембрани.

Приймаючи до уваги високу ефективність інгібіторної дії калікс[4]арену С-107 на активність Na^+, K^+ -АТРази, ми в подальших дослідженнях вивчали деякі закономірності його впливу на цей ензим. Було показано, що у присутності калікс[4]арену С-107 в середовищі інкубації підвищується спорідненість Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани до убаїну. Поряд з цим не змінюється величина коефіцієнта Хілла інгібуючої дії убаїну на цей ензим.

Також було досліджено вплив калікс[4]арену С-107 на кінетичні параметри, що характеризують спорідненість ензиму до АТР та іонів Mg. Показано, що в обох випадках із ростом концентрації калікс[4]арену С-107 спостерігається зниження, з різним ступенем ефективності, платового рівня активності Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани.

При цьому калікс[4]арен С-107 достовірно не впливає на значення уявної константи Міхаеліса K_m та коефіцієнта Хілла n_H . Таким чином, калікс[4]арен С-107 не змінює уявної спорідненості ензиму до АТР, а також кооперативності ензиматичної реакції по АТР.

В подальших експериментах вивчали вплив калікс[4]арену С-107 на кінетичні параметри дії $MgCl_2$. Ми показали, що із ростом концентрації калікс[4]арену С-107 в середовищі інкубації до 50 нМ константа активації хлоридом магнію підвищується від $173 \pm 4,5$ мкМ (в контролі) до 375 ± 43 мкМ, при подальшому збільшенні концентрації

калікс[4]арену – константа активації знижується до майже контрольного рівня (при концентрації калікс[4]арену C-107 100 нМ) ($M \pm m$; $n = 5$). Поряд з цим не змінюється величини коефіцієнта Хілла під дією калікс[4]арену C-107.

Приймаючи до уваги той факт, що два калікс[4]арени, а саме C-97 та C-107, дуже ефективно пригнічують активність Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани і збільшують її спорідненість до убаїну, ми дослідили як буде змінюватися Na^+, K^+ -АТРазна активність за умов сукупної дії калікс[4]аренів та убаїну. Було встановлено, що ці калікс[4]арени підвищують інгібувальну дію убаїну на активність Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани шляхом збільшення її спорідненості до серцевого глікозиду.

Важливу роль відіграє Na^+, K^+ -АТРаза у забезпеченні функціональної активності скоротливих та рухливих клітин репродуктивної системи, зокрема міоцитів матки та сперматозоїдів. Тому ми провели порівняльне дослідження дії каліксаренів C-97, C-99 та C-107 на Na^+, K^+ -АТРазну активність у плазматичній мембрані скоротливих (міометрій) та рухливих (сперматозоїди) клітин. Ми показали, що убаїн в діапазоні концентрацій $10^{-6} - 5 \cdot 10^{-3}$ М ефективно пригнічує “загальну” $\text{Mg}^{2+}, \text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРазну активність у фракції плазматичних мембран міометрія та у суспензії сперматозоїдів, значення уявної константи $I_{0,5}$ інгібування Na^+, K^+ -АТРази міоцитів матки та суспензії сперматозоїдів убаїном становить $21,3 \pm 1,5$ мкМ і $18,8 \pm 2,3$ мкМ відповідно.

В подальших дослідженнях ми вивчали дію калікс[4]аренів C-97, C-99 та C-107 на активність Na^+, K^+ -АТРази суспензії плазматичних мембран міоцитів матки та суспензії сперматозоїдів. Дані наведені вище свідчать, що калікс[4]арени C-97 та C-107 (використані у концентрації 100 мкМ) майже повністю пригнічують ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази суспензії плазматичних мембран міоцитів матки (інгібування до 2-3 % відносно контролю), а калікс[4]арен C-99 з меншою ефективністю

проявляє пригнічувальну дію (інгібування до 14 % відносно контролю). Результати отримані при вивченні впливу калікс[4]аренів на ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази суспензії сперматозоїдів показали, що калікс[4]арени С-97 та С-107 також повністю інгібують Na^+, K^+ -АТРазну активність (залишкова активність – 1-2 % відносно контролю), проте калікс[4]арен С-99 практично не впливає на неї, знижуючи ензиматичну активність лише до 80-85 % відносно контрольного значення. Всі три калікс[4]арени практично не впливають на “базальну” Mg^{2+} -АТРазну активність у суспензії плазматичних мембран міометрія та сперматозоїдів (мало місце зменшення активності лише до 90-95 % від контрольного значення).

Також ми провели комп'ютерне моделювання взаємодії калікс[4]сарену С-107 і його модельних сполук з ліганд-зв'язуючими ділянками Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани. Результати докінгу калікс[4]сарену С-107 в ліганд-зв'язуючих ділянках Na^+, K^+ -АТРази свідчать про те, що цей каліксарен може розміщуватися у просторі декількох областей ліганд-зв'язувальних ділянок ензиму. При цьому встановлені деякі особливості у взаємодії ліганду з ензимом. Зокрема, важливу участь у взаємодії каліксаренової чаші С-107 із ензимом відіграють гідрофобні (стеричні) взаємодії. Тобто залишки ароматичних амінокислот «фіксують» каліксарен в області зв'язування із протеїном. В той же час залишки негативно та позитивно заряджених амінокислот формують водневі зв'язки із NH -групами аміно-фосфонових фрагментів та атомами кисню метиленбісфосфонатних фрагментів каліксарену С-107. Таким чином гідрофільні фрагменти каліксарену як би задають “вектор напрямку”, у якому фіксується молекула С-107 в області взаємодії із ензимом. Вивчалися і міжмолекулярні водневі зв'язки у системі “калікс[4]арен - протеїн”. Найбільш характерним є водневий зв'язок, в якому беруть участь фосфатна та аміногрупа бічних залишків калікс[4]арену. Менш

характерні водневі зв'язки, в яких беруть участь інші атоми бічних залишків калікс[4]арену. Для каліксаренової чаші водневі зв'язки з атомами протеїну не характерні.

Отже отримані нами результати комп'ютерного моделювання відповідають експериментальним даним стосовно здатності калікс[4]арену С-107 впливати на ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРazi.

Ми вивчили механокінетику процесу «скорочення-розслаблення» гладеньких м'язів сліпої кишки (саесум) щурів у випадку дії калікс[4]арену С-99 та убаїну. Скорочення гладеньких м'язів відбувається внаслідок зростання концентрації Ca^{2+} в міоцитах, яке відбувається за рахунок входу позаклітинного Ca^{2+} у цитоплазму через потенціал- та рецепторкеровані кальцієві канали. Беручи до уваги, що калікс[4]арен С-99 і убаїн інгібували ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРazi, ми припустили, що їхній вплив на параметри скоротливої активності гладеньких м'язів має бути подібним.

В умовах дії убаїну і калікс[4]арену С-99 значення нормованих максимальних швидкостей V_n у випадку фаз скорочення та розслаблення зменшувались порівняно з контролем. Ми показали, що убаїн (10 мкМ) та калікс[4]арен С-99 (10 мкМ) вірогідно пригнічували амплітуду скоротливих відповідей індукованих як калієвою деполяризацією, так і аплікацією ацетилхоліну. За деякими механокінетичними показниками ці сполуки як в якісному, так і в кількісному відношенні, односпрямовано змінюють скоротливі відповіді, які були викликані гіперкалієвою деполяризацією та аплікацією ацетилхоліну в нормальному та номінально безкальцієвому розчині Кребса. Проте, у випадку скорочень, індукованих ацетилхоліном, вплив ефекторних речовин на максимальну нормовану швидкість розслаблення гладеньких м'язів V_{nr} суттєвим чином відрізняється: ефективне гальмування цієї швидкості спостерігається в

присутності калікс[4]арену C-99, тоді як за наявності уабаїну цей показник залишається на рівні контролю.

Ми вважаємо перспективними результати, що були одержані при вивченні дії вибраних калікс[4]аренхалконамідів на поляризацію мітохондріальної мембрани. У цих дослідках була використана модель перфорованих дигітоніном міоцитів матки та протокова цитометрія з використанням потенціал чутливого зонда з метою тестування СССР-чутливої компоненти поляризації мембран мітохондрій. Як виявилось, за нетривалої (5-10 хв) інкубації мітохондрій міометрія у присутності калікс[4]аренхалконамідів збільшується як рівень поляризації мембран мітохондрій, так і концентрація іонізованого Са у матриксі мітохондрій.

І, нарешті, було продемонстровано, що калікс[4]арен-діамінометилфосфонова кислота (калікс[4]арен C-107) здатна як така гідролізувати АТР.

Виявилося, що кінетична крива процесу гідролізу не підпорядковується закономірностям реакцій низьких порядків (нульового, першого) і є негіперболічною (у часі), а максимальна кількість продукту реакції – неорганічного фосфату P_i , не перевищує 6 % від початкової кількості АТР у середовищі інкубації.

Процес каліксарен-залежного гідролізу АТР є вельми повільним: характеристичний час реакції τ (“період напівнасичення”) становить 10-11 хв. Швидкість каліксарен-залежного гідролізу АТР перевищує швидкість спонтанного гідролізу нуклеозидтрифосфату щонайменше в 14-15 разів.

Методом обернено-фазної високоефективної рідинної хроматографії було досліджено процес комплексоутворення калікс[4]арену C-107 з АТР у системі “ацетонітрил/вода”. Константи дисоціації комплексу K_d , що були одержані при використанні двох хроматографічних насадок різної полярності, становили 197-231 мкМ, стехіометрія комплексу “Господар-Гість” – 1:1.

За допомогою методів молекулярного моделювання була розрахована оптимальна геометрія 3^{ox} можливих варіантів структури комплексу С-107 з АТР. Ці структури стабілізуються міжмолекулярними водневими зв'язками різних типів, а також, можливо, більш слабкими взаємодіями: π - π , ОН- π , NH_2^+ - π . В цілому ж суттєвим є той факт, що при стехіометричному комплексоутворенні С-107 з АТР γ -атом фосфору в молекулі нуклеозидтрифосфату стає більш електрофільним внаслідок утворення водневих зв'язків, і це може бути можливою причиною полегшення гідролізу зв'язку $\text{P}^\beta\text{-O-P}^\gamma$ в молекулі АТР. Одержані результати підтверджують літературні дані (на прикладі калікс[4]арен-5,11,17,23-тетрасульфонату) щодо можливості комплексоутворення між каліксаренами та АТР.

Були досліджені залежності кінетичних характеристик реакції від концентрації реагентів: максимальне значення вивільненого P_i не залежить від концентрації АТР та лінійно збільшується із підвищенням концентрації калікс[4]арену С-107, крім цього з підвищенням концентрації АТР або калікс[4]арену максимальна миттєва швидкість реакції зростає, а характеристичний час реакції зменшується.

Показано, що за умов використання одновалентних катіонів (150 мМ), які мають різні фізико-хімічні властивості та різну хімічну природу (Na^+ , K^+ , Li^+ , холін⁺), ми не спостерігали будь-які суттєві ефекти їхньої дії на гідролітичний процес в режимі підтримання сталої іонної сили. Отже, фізіологічно-значущі одновалентні катіони К та Na не є критично необхідними для протікання каліксарен-залежного гідролізу АТР.

Такі фізіологічно-значущі двовалентні катіони, як Mg та Ca, які ми використовували у концентрації 3 мМ, також не є необхідними для забезпечення каліксарен-залежного гідролізу АТР і не впливають на нього. Можливо, що хелатні комплекси MgATP^{2-} та CaATP^{2-} , як і вільний нуклеозидтрифосфат ATP^{4-} , в однаковому ступені можуть гідролізуватися калікс[4]ареном С-107, або іони Ca та Mg взагалі не

впливають на взаємодію цього каліксарену з вільним нуклеозидтрифосфатом.

У той же час у присутності Cu^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} та Sr^{2+} , які використовували в еквімолярній концентрації, каліксарен-залежний гідроліз АТФ ефективно (на 80-100 %) гальмувався. Ймовірно, що можливих причин цього гальмування може бути декілька (чи реально має місце їхня комбінація). По-перше, не виключено, що хелатні комплекси CuATP^{2-} , BaATP^{2-} , PbATP^{2-} та SrATP^{2-} , взагалі не здатні зв'язуватися з калікс[4]ареном С-107. По-друге, можливо, що ці комплекси здатні зв'язуватися (конкурентно щодо вільної ATP^{4-}) з калікс[4]ареном, але не гідролізуються ним (чи гідролізуються слабкіше у порівнянні з ATP^{4-} ; а комплекс CuATP^{2-} , скоріше за все, не гідролізується взагалі). По-третє, не можна виключати, що Cu^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} та Sr^{2+} , на відміну від Mg^{2+} та Ca^{2+} , самі по собі здатні переводити калікс[4]арен С-107 у стан, для якого не є властивою спроможність забезпечувати зв'язування з вільним ATP^{4-} та гідролізувати його (дані катіони здатні утворювати міцні комплекси з калікс[4]ареном С-107 завдяки наявності фосфонатних та піридилних лігандних груп).

Реакція каліксарен-залежного гідролізу АТФ є чутливою до зміни таких фізико-хімічних властивостей середовища інкубації, як рН та температура. Дійсно, зменшення концентрації протонів від 1 до 0,01 мкМ стимулює цю реакцію; отже, ефекти “протонування-депротонування” функціональних груп в системі “калікс[4]арен С-107 – АТФ” є важливими для реалізації гідролізу нуклеозидтрифосфату. Що ж стосується впливу температури, то реакція каліксарен-залежного гідролізу АТФ характеризується середнім значенням енергії активації $E_a = 50,7 \pm 8,9$ кДж/моль. Це менше, ніж типові значення E_a , які є властивими для ензиматичних АТФ-гідролазних реакцій, зокрема, для реакції $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -залежного гідролізу АТФ, що каталізується Ca^{2+} -

транспортуючою АТРазою плазматичних мембран клітин (55-73 кДж/моль).

Певним чином протікання реакції каліксарен-залежного гідролізу АТР залежить і від концентрації її реагентів. Так, при фіксованій концентрації АТР платовий рівень $p_{\max}$ звільнення неорганічного фосфату P_i та максимальна миттєва швидкість реакції V лінійно збільшувались із зростанням концентрації калікс[4]арену С-107. Отже, при сталій концентрації АТР значення $p_{\max}$ та V накопичення неорганічного фосфату визначаються концентрацією калікс[4]арену. При фіксованій концентрації калікс[4]арену величина $p_{\max}$ взагалі не залежала від концентрації АТР, а величина V нелінійно збільшувалась із зростанням концентрації цього нуклеозидтрифосфату, але без виходу на "плато". Таким чином, при сталій концентрації калікс[4]арену значення $p_{\max}$ накопичення неорганічного фосфату не визначається концентрацією АТР, а значення V визначається.

З іншого боку, зміна деяких інших фізико-хімічних факторів суттєво не впливає на каліксарен-залежний гідроліз АТР. Як з'ясувалося, реакції каліксарен-залежного гідролізу фосфангідридних зв'язків мононуклеотиду не притаманна субстратна специфічність: у її ході успішно гідролізується не лише АТР, але й інші нуклеозидтрифосфати, а також й аденозиндифосфат ADP (хоча і менш ефективно, ніж АТР). Модифікація фізіологічного значення іонної сили та в'язкості цього середовища (моделювалося шляхом ізотонічної заміни 150 мМ хлоридів одновалентних катіонів на сахарозу) вельми незначно впливала на гідролізу реакцію.

Ми припускаємо, що результати, які були одержані нами при вивченні впливу калікс[4]арену С-107 на гідроліз АТР, можуть бути перспективними для більш кращого розуміння молекулярних механізмів реакцій як супрамолекулярного неензиматичного, так і ензиматичного (зокрема, Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежного та Na^+ , K^+ -залежного)

гідролізу АТР, процесів АТР-залежного транспорту іонів Са у субклітинних мембранних структурах, а також з точки зору спрямованої розробки своєрідних “молекулярних платформ” на основі каліксаренів для створення штучних (“абіогенних”) каталізаторів, здатних гідролізувати АТР. З іншого боку, у зв’язку з тим, що для каліксаренів є притаманною бактерицидна, антивірусна, протипухлинна та антитромботична активність, вони практично не проявляють токсичної дії на клітини, у випадку розробки ліків на основі даних макроциклів треба, очевидно, мати на увазі, що, принаймні, деякі з них можуть утворювати комплекси з АТР (та іншими нуклеозидтри- та нуклеозиддифосфатами) та гідролізувати цей метаболіт.

З формально-кінетичної точки зору усі ці дані вказують на складність механізму каліксарен-залежної реакції гідролізу АТР. Очевидно, що питання з’ясування цього механізму потребує подальшої розробки. Проте на основі отриманих результатів можна стверджувати, що такий кінетичний параметр, реакції гідролізу АТР, як наприклад, характеристичний час реакції, лінійно спадає із збільшенням залежить від концентрації АТР; отже, цей параметр може бути використаний для визначення концентрації АТР в біологічних рідинах, що є актуальним для аналітичної біохімії.

ДОДАТОК

МЕТОД КІНЕТИЧНОГО АНАЛІЗУ РЕАКЦІЇ КАЛІКСАРЕН- ІНДУКОВАНОГО ГІДРОЛІЗУ АТР ТА ФАЗ СКОРОЧЕННЯ ТА РОЗСЛАБЛЕННЯ ГЛАДЕНЬКОГО М'ЯЗУ

Раніше у відділі біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України було запропоновано та апробовано у дослідках метод емпіричного аналізу складних кінетичних кривих, що спочатку був застосований для кількісної інтерпретації нелінійних біофізичних процесів – скорочення-розслаблення м'язів та внутрішньоклітинної кальцієвої сигналізації (*Burdyga T.V., Kosterin S.A. Kinetic analysis of smooth muscle relaxation//Gen. Physiol. Biophys. – 1991. – V. 10 – P. 589-598*).

Втім, як свідчить наш досвід, зазначений метод може бути успішно використаний також для опису складних динамічних кривих у хімічній кінетиці, які не підпорядковуються закономірностям, що є властивими для реакцій низьких порядків – нульового, першого та другого. Тут ми викладаємо суть цього методу саме на прикладі вивчення кінетичних закономірностей протікання реакції неензиматичного каліксарен-індукованого гідролізу АТР (розділ IV). Також, в деякій модифікації метод був використаний для механокінетичного аналізу процесу скорочення-розслаблення гладеньких м'язів (розділ 7).

Ідея методу полягає у тому, що монотонна кінетична крива, яка, у випадку складних хімічних, фізико-хімічних та фізіологічних процесів, часто-густо є S-подібною і має тенденцію до виходу на плато (у часі t), може бути успішно лінеаризована у координатах $\{\ln[p/(p_{max} - p)]; \ln t\}$ відповідно до емпіричного рівняння:

$$\ln[p/(p_{\max} - p)] = -n \cdot \ln \tau + n \cdot \ln t, \quad (1Д)$$

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

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

Часова точка $t = \theta$, яка відповідає “точці перегину” (у часі) кінетичної кривої (координати цієї точки – $[p_\theta; \theta]$), може бути визначена відповідно до умови: $(dv/dt)_{t=\theta} = 0$. Тоді, згідно рівняння (2Д), для значення часової абсциси “точки перегину” θ (відповідає максимальній величині миттєвої швидкості $V = v_{t=\theta}$) будемо мати:

$$\theta = [(n-1)/(n+1)]^{1/n} \cdot \tau. \quad (3Д)$$

Підставляючи вираз для θ замість t в рівняння (2Д) можемо одержати співвідношення для максимальної миттєвої швидкості $V = (dp/dt)_{t=\theta}$ хімічного процесу:

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

Таким чином, використання вищеописаного методу, відповідно до рівнянь (1Д), (3Д) та (4Д), дає змогу визначити низку важливих емпіричних параметрів: платове значення накопичення продукту реакції p_{max} , логарифмічний декремент крутизни кінетичної кривої n , характеристичний час реакції τ , θ – час, в який спостерігається максимальне значення миттєвої швидкості реакції, V – максимальну миттєву швидкість реакції; ці параметри вичерпно характеризують кінетику хімічного перетворення, що описується монотонною кривою, яка не відповідає закономірностям хімічних процесів низьких порядків і для якої є властивою тенденція виходу “на плато” (у часі). Серед цих параметрів слід вважати найбільш важливими і зручними у користуванні саме платове (максимальне) значення p_{max} накопичення продукту та максимальну миттєву швидкість V реакції.

У випадку вивчення кінетичних закономірностей реакції каліксарен-індукованого не ензиматичного гідролізу АТР кінетичні розрахунки нами проводилися в режимі програмного забезпечення “MS Office” на персональному комп’ютері IBM PC.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ І СКОРОЧЕНЬ

АТР – трифосфорний ефір аденозину, який є похідним аденину та рибози

БСА – бичачий сироватковий альбумін

ДМСО – диметилсульфоксид

ЕГТА – етиленглікольдіамінтетраоцтова кислота

IP₃ - інозитол-1,4,5-трифосфат

fluo-4 AM – 2-{{2-(2-{5-[біс(карбоксиметил)аміно]-2-метилфенокси}етокси)-4-(2,7-дифлуоро-6-гідрокси-3-оксо-3Н-ксантен-9-іл)феніл}(карбокси-метил)аміно}ацетова кислота;

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

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

DiOC₆(3) – 3,3'-дігексилоксакарбоцианінйодит

SDS – натрій додецилсульфат

Tris – трис(гідроксиметил)амінометан

Tg – тапсигаргін

[Ca²⁺]_e та [Ca²⁺]_i – концентрація іонізованого Са у позаклітинному просторі та в цитоплазмі відповідно

Δψ – трансмембранний електричний потенціал

Ca²⁺, Mg²⁺-АТРаза – Ca²⁺-транспортуюча Mg²⁺-залежна АТРаза плазматичної мембрани чи саркоплазматичного ретикулуму (ендоплазматичного ретикулуму)

Mg²⁺-АТРаза – Ca²⁺-незалежна Mg²⁺-залежна («базальна») АТРаза плазматичної мембрани

Na⁺, K⁺-АТРаза – Mg²⁺-залежна Na⁺, K⁺-транспортуюча АТРаза плазматичної мембрани

Na⁺-Ca²⁺-обмінник - Na⁺-Ca²⁺-антипортер іонів Na та Ca (в плазматичних мембранах чи мітохондріях)

H^+-Ca^{2+} -обмінник - H^+-Ca^{2+} -антипортер іонів Na та Ca (в мітохондріях)

$\Delta\psi$ – трансмембранний електричний потенціал

T – абсолютна температура, °K

F – число Фарадея

$I_{0,5}$ – коефіцієнт інгібування

n_H – коефіцієнт Хілла

E_a – енергія активації

K_{Ca} – константа активації по іонах Ca

K_{Mg} – константа активації по іонах Mg

K_m – константа Міхаеліса по АТР (чи по хелатному комплексу $MgATP$)

K_D – константа дисоціації

V_{max} – максимальна швидкість ензиматичного (транспортного) процесу

$t_{1/2}$ – характеристичний час фізико-хімічного, хімічного чи біохімічного процесу (активації, інактивації, ензиматичного перетворення, трансмембранного переносу речовини)

*Позначки та спеціальні кінетичні характеристики
реакції каліксарен-індукованого гідролізу АТР*

p – кількість продукту реакції

p_{max} – максимальна (у часі) кількість продукту реакції

$n = d\ln[p/(p_{max}-p)]/d\ln t$ – логаріфмічний декремент крутизни S-подібної кінетичної кривої

τ - характеристичний час (“період напівнасичення”) S-подібної кінетичної кривої

$v = p_{max}[n \cdot \tau^n \cdot t^{n-1}/(\tau^n + t^n)^2]$ – миттєва швидкість реакції у випадку S-подібної кінетичної кривої

$\theta = [(n-1)/(n+1)]^{1/n} \cdot \tau$ - часова абсциса “точки перегину” (відповідає максимальній величині миттєвої швидкості $V = v_{t=\theta}$) у випадку S-подібної кінетичної кривої

$V = (p_{max}/4n \cdot \tau) \cdot [(n-1)^{(n-1)/n} \cdot (n+1)^{(n+1)/n}]$ – максимальна миттєва швидкість реакції гідролізу АТФ (в точці $t = \theta$)

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

До розділу 1

1. *Gutsche C.D.* Calixarenes: An introduction. – Cambridge.: Royal Society of Chemistry. – 2008. – 276 p.
2. Calixarenes 2001, ed. Asfari Z., Bohmer V., Harrowfield J. and Vicens J., Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, 2001.
3. *Morohashi N.* Thiacalixarenes / Morohashi N., Narumi F., Iki N., Hattori T. and Miyano S. // Chem. Rev. – 2006. – Vol. 106. – P. 5291-5316.
4. *Kumagai H.* Facile Synthesis of p-tert-Butylthiacalix[4]arene by the Reaction of p-tert-Butylphenol with Elemental Sulfur in the Presence of a Base / Kumagai H., Hasegawa M., Miyanari S., Sugawa Y., Sato Y., Hori T., Ueda S., Kamiyama H., Miyano S. // Tetrahedron Lett. – 1997. – Vol. 38. – P. 3971-3972.
5. *Iki N.* Can thiacalixarene surpass calixarene? / N. Iki, S. Miyano // J. Incl. Phenom. – 2001. – Vol. 41. – P. 99 – 105.
6. *Chauhan S.M.S.* Syntheses of calix[4]pyrroles by amberlyst-15 catalyzed cyclocondensations of pyrrole with selected ketones / S.M.S. Chauhan, B. Garg, T. Bisht // Molecules. – 2007. – Vol. 12. – P. 2458 – 2466.
7. *Böhmer V.* Calixarenes, Macrocycles with (Almost) Unlimited Possibilities / Böhmer V. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. – 1995. – Vol. 34. – P. 713–745.
8. *Gutsche C.D.* Conformational isomers of the ethers and esters of calix[4]arenes / C.D. Gutsche, B. Dhawan, J.A. Levine et al. // Tetrahedron. – 1983. – Vol. 39. – P. 409 – 426.
9. *van Hoorn W.P.* Conformation of hexahydroxycalix[6]arene / W.P. van Hoorn, F.C.J.M. van Veggel, D.N. Reinhoudt // J. Org. Chem. – 1996. – Vol. 61. – P. 7180 – 7184.

10. *Бойко В.И.* Хиральные каликсарены / Бойко В.И., Кальченко В.И., Есипенко А.А. // Saarbrücken.: LAP LAMBERT Academic Publishing. – 2014. – 230 p.
11. *Neri P.* Calixarenes and Beyond / Neri P., Sessler J.L., Wang M-X. // Springer. – 2016.
12. [Sansone F. Calixarenes in bioorganic and biomimetic chemistry / Sansone F., Segura M., Ungaro R., Asfari M-Z, Böhmer V., Harrowfield J., Vicens J. \(Eds.\) // Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. — 2001. — P. 496-512.](#)
13. Calixarenes in Action, ed. L. Mandolini and R. Ungaro, Imperial College Press, London, UK, 2000.
14. *Yakovenko A.V.* N-Linked-peptidocalix[4]arene as enantioselective receptors for amino acid derivatives / Yakovenko A.V., Boyko V.I., Kalchenko V.I., Baldini L., Casnati A., Sansone F., Ungaro R. // J. Org. Chem. – 2007. – Vol. 72, Issue 9. – P. 3223-3231.
15. *Yakovenko A.V.* Diastereoselective lower rim (1S)-camphorsulfonylation as the shortest way to the inherently chiral calix[4]arene / Yakovenko A.V., Boyko V.I., Danylyuk O., Suwinska K., Lipkowski J., Kalchenko V.I. // Organic Letters. – 2007. – Vol. 9, Issue 7. – P. 1183-1185.
16. *Cherenok S.* Phosphorus-containing chiral macrocycles (Review) / Cherenok S., Dutasta J.-P., Kalchenko V. // Current Organic Chemistry. – 2006. – Vol. 10, Issue 18. – P. 2307-2331.
17. *Polischuk K.A.* Stereoselective synthesis of six stereoisomers of inherently chiral methoxy-propoxy-butoxy-methoxycarbonylmethoxy-tert-butylcalix[4]arene / Polischuk K.A., Yesypenko O.A., Rozhenko A.B., Pirozhenko V.V., Salimov Yu.A., Ischenko V.V., Boyko V.I., Khilya V.P., Kalchenko V.I. // Tetrahedron Letters. – 2015. – Vol. 56, Issue 33. – P. 4788-4791.

18. *Yesypenko O.A.* Design, synthesis and structure determination of new inherently chiral para-bromoalkoxycalix-[4]arenes / Yesypenko O.A., Klyachina M.A., Dekhtyarenko M.V., Pirozhenko V.V., Shishkina S.V., Boyko V.I., Voitenko Z.V., Kalchenko V.I. // *Supramol. Chem.* – 2017. – Vol. 29, Issue 1. – P. 49-58.
19. *Cram D.J.* Preorganization - from solvents to spherands / D.J. Cram // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 1986. – Vol. 25. – P. 1039 – 1057.
20. *Arnaud-Neu F.* Selective alkali and alkaline earth cation complexation by calixarene amides / F.Arnaud-Neu, M.J. Schwing, Ziat K. et al. // *New J. Chem.* – 1991. – Vol. 15. – P. 33 – 37.
21. *Muzet N.* Alkaline–earth and uranyl cation complexes of a calix[4]arene tetraamide: MD and FEP simulation in aqueous and acetonitrile solutions and X-Ray structure of Sr(picrate)₂ complex / N. Muzet, G. Wipff, A. Casnati et al. // *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2.* – 1996. – N 6. – P. 1065 – 1075.
22. *Casnati A.* New efficient calixarene amide ionophores for the selective removal of strontium ion from nuclear waste: synthesis, complexation, and extraction properties / A. Casnati, S. Barbosa, H. Rouquette et al. // *J. Amer. Chem. Soc.* – 2001. – Vol. 123. – P. 12182 – 12190.
23. *McKervey M.A.* Cation binding by calixarenes / Schwing-Weill M.-J., Arnaud-Neu F. *Comprehensive supramolecular chemistry* // Ed. G.Gokel. – Oxford: Pergamon Press, 1996. – Vol. 1. – P. 573 – 603.
24. *Ludwig R.* Calixarene-based molecules for cation recognition / R. Ludwig, N.T.K. Dzong // *Sensors.* – 2002. – Vol. 2, N 10. – P. 397 – 416.
25. *Kim J.S.* Calixarene-derived fluorescent probes / J.S. Kim, D.T. Quang // *Chem. Rev.* – 2007. – Vol. 107. – P. 3780 – 3799.
26. *Van der Veen N.J.* Monolayer of a Na⁺-selective fluoroionophore on glass: connecting the fields of monolayers and optical detection of metal ions / N.J. Van der Veen, S. Flink, M.A. Deij et al. // *J. Amer. Chem. Soc.* – 2000. – Vol. 122, N 25. – P. 6112 – 6113.

27. *Kim N.Y.* Calix[4]arenes bearing two distal azophenol moieties: highly selective chromogenic ionophores for the recognition of Ca^{2+} Ion / N.Y. Kim, S.-K. Chang // *J. Org. Chem.* – 1998. – Vol. 63. – P. 2362 – 2364.
28. *Halouani H.* Synthesis, conformations and extraction properties of new chromogenic calix[4]arene amide derivatives / H. Halouani, I. Dumazet-Bonnamour, C. Duchamp et al. // *Eur. J. Org. Chem.* – 2002. – Vol. 24. – P. 4202 – 4210.
29. *Kim E.J.* Novel Ca^{2+} -selective merocyanine-type chromoionophore derived from calix[4]arene-diamide / E.J. Kim, J.-I. Choe, S.-K. Chang // *Tetrahedron Lett.* – 2003. – Vol. 44, N 28. – P. 5299 – 5302.
30. *Lukin O.* O-Phosphorylated calix[4]arenes as Li^+ -selective receptors / O. Lukin, M. Vysotsky, V. Kalchenko // *J. Phys. Org. Chem.* – 2001. – Vol. 14, N 7. – P. 468 – 473.
31. *Bozkurt S.* Synthesis of calix[4]arene mono and diamide derivatives and selective complexation of alkali and alkaline earth cations / S. Bozkurt, M. Durmaz, A. Sirit et al. // *J. Macromol. Sci., Part A: Pure and Appl. Chemistry.* – 2007. – Vol. 44, N 2. – P. 159 – 165.
32. *Baaden M.* Cation coordination by calix[4]arenes bearing amide and/or phosphine oxide pendant groups: how many arms are needed to bind Li^+ vs. Na^+ ? A combined NMR and molecular dynamics study / M. Baaden, G. Wipff, M. Yaftian et al. // *J. Chem. Soc., Perkin. Trans. 2.* – 2000. - N 7. – P. 1315 – 1321.
33. *Houel E.* Interfacial interaction of cations with amphiphilic dihydroxyphosphonylcalix[4]arene mesosystems / E. Houel, A. Lazar, E. Da Silva et al. // *Langmuir.* – 2002. – Vol. 18, N 4. – P. 1374 – 1379.
34. *Atamas L.* New organophosphorus calix[4]arene ionophores for trivalent lanthanide and actinide cations / Atamas L., Klimchuk O., Rudzevich V., Pirozhenko V., Kalchenko V., Smirnov I., Babain V., Efremova T., Varnek A., Wipff G., Arnaud-Neu F., Roch M., Saadioui M.,

Bohmer V. // J. Supramolecular Chemistry. – 2002. – Vol. 2, Issues 4-5. – P. 421-427.

35. *Klimchuk O.* New wide rim phosphomethylated calix[4]arenes in extraction of americium and europium / Klimchuk O., Atamas L., Miroshnichenko V., Kalchenko V., Smirnov I., Babain V., Varnek A., Wipff G. // J. Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry. – 2004. – Vol. 49, Issue 1-2. – P. 47–56.

36. *Kalchenko V.* Calixarene receptors of environmentally hazardous and bio-relevant molecules and ions / Kalchenko V. // Pure and Applied Chemistry. – 2008. – Vol. 80, Issue 7. – P. 1449-1458.

37. *Cherenok S.* Phosphorus-containing calixarenes (review) / Cherenok S., Kalchenko V. // Topics Heterocyclic Chemistry. - 2009. – Vol. 20. – P. 229-273.

38. *Miroshnichenko S.* Synthesis of new calixarene-phosphine oxides and their extraction properties in ionic liquids / Miroshnichenko S., Ternova D., Billard I., Ouadi A., Klimchuk O., Kalchenko V. // Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements. – 2011. – Vol. 186, N 4. – P. 903-905.

39. *Karavan M.* Novel phosphorylated calixarenes for the recognition of *f*-elements / Karavan M., Arnaud-Neu F., Hubscher-Bruder V., Smirnov I., Kalchenko V. // J. Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry. – 2010. – Vol. 66, No 1-2. – P. 113-123.

40. *Мастрюкова Т.А.* Экстракционные свойства нейтральных фосфорорганических соединений для фракционирования радиоактивных отходов / Т.А. Мастрюкова, О.И. Артюшин, И.Л. Одинец и др. // РЖВХО (Журнал Российского химического общества им. Д.И. Менделеева). – 2005. – Т. 2. – С. 86 – 96.

41. *Baaden M.* Lanthanide cation binding to a phosphoryl-calix[4]arene: the importance of solvent and counterions investigated by molecular dynamics and quantum mechanical simulations / M. Baaden, M. Burgard,

C. Boehme et al. // Phys. Chem. Chem. Phys. – 2001. – Vol. 3. – P. 1317 – 1325.

42. *Saulnier L.* Lanthanide complexes with a *p*-*tert*-butylcalix[4]arene fitted with phosphinoyl pendant arms / L. Saulnier, S. Varbanov, R. Scopelini et al. // J. Chem. Soc. Dalton Trans. – 1999. – N 22. – P. 3919 – 3925.

43. *Nagasaki T.* The solid state structure of 1,2,4,5-tetrasubstituted *p*-*tert*-butyl-calixarenes / T. Nagasaki, T. Arimura, S. Shinkai // Bull. Chem. Soc. Jpn. – 1991. – Vol. 64. – P. 2575 – 2577.

44. *Kharchenko S.* Dibutylphosphinoylmethyloxythiacalix[4]arenes / Kharchenko S., Drapailo A., Shishkina S., Shishkin O., Karavan M., Smirnov I., Ryabitskii A., Kalchenko V.I. // Synthesis, structure, americium, europium and technetium extraction. Supramol. Chem. – 2014. - Vol. 26, Issue 10-12. - P. 864-872.

45. *Лукашова М.С.* Влияние импрегнированных на силикагеле каликс[4]аренов с фосфиноксидными и фосфорильными группировками на эффективность экстракции Eu^{3+} из водных растворов / Лукашова М.С., Беликов К.Н., Брылева К.Ю., Вербицкая А.В., Кальченко В.И. // Теорет. и эксперим. химия. – 2013. – Т. 49, № 3. – С. 184-188.

46. *Lukashova M.S.* Merrifield resin modified with thiacalixarene-tetraphosphonates: synthesis, characterization and europium sorption / Lukashova M.S., Belikov K.N., Bryleva K.Y., Kharchenko S.G, Vishnevsky S.G., Kalchenko V.I. // Functional Materials. – 2016. – Vol. 23, Issue 1. - P. 111-119.

47. *Краснопьорова А.П.* Екстракція урану(VI) поруватим кополімером стирен-дивінілбензен, імпрегнованим каліксаарен-тетрафосфіноксидом / Краснопьорова А.П., Юхно Г.Д., Тернова Д.С., Мірошніченко С.І., Коровін В.Ю., Коровін Ю.Ф., Кальченко В.І. // Доповіді НАН України. – 2013. - № 11. – С. 124-129.

48. *May Erin M.* Unprecedented Increase in Affinity for Eu(III) and Am(III) through Silica Grafting of a Carbamoylmethylphosphine Oxide-Calix[4]arene Site / May Erin M., Solovyov Andrew, Guo Yijun, Drapailo Andriy, Matveev Yury, Kalchenko Vitaly, Nitsche Heino, Katz Alexander // *Eur. J. Inorg. Chem.* – 2016. – Vol. 2016, Issue 28. – P. 4542-4545.
49. *Gale P.A.* Anion and ion-pair receptor chemistry: highlights from 2000 and 2001 / P.A. Gale // *Coord. Chem. Rev.* – 2003. – Vol. 240. – P. 191 – 221.
50. *Beer P.D.* Anion recognition and sensing: the state of the art and future perspectives / P.D. Beer, P.A. Gale // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2001. – Vol. 40. – P. 486 – 516.
51. *Keil B.* The enzymes, hydrolysis: peptide bond / B. Keil // In “The Enzymes” (3rd edn) Ed. Boyer P.D. New-York: Academic Press. – 1971. – Vol. 3. – P. 249 – 275.
52. *Miller C.* ClC chloride channels viewed through a transporter lens / C. Miller // *Nature*. – 2006. – Vol. 440. – P. 484–489.
53. *Kang S.O.* Amide-based ligands for anion coordination / C. Miller // *Angew. Chem., Int. Ed.* – 2006. – Vol. 45. – P. 7882 – 7894.
54. *Sdira S.B.* Synthesis and structure of lower rim C-linked N-tosyl peptidocalix[4]arenes / S.B. Sdira, C.P. Felix, M.-B.A. Giudicelli et al. // *J. Org. Chem.* – 2003. – Vol. 68. – P. 6632 – 6638.
55. *Bozkurt S.* Synthesis of two calix[4]arene diamide derivatives for extraction of chromium (VI) / S. Bozkurt, A.A. Karakucuk, S. Sirit et al. // *Tetrahedron*. – 2005. – Vol. 61, N 44. – P. 10443 – 10448.
56. *Zhao B.-T.* Carboxylic acid derivatives of tetrathiafulvalene: key intermediates for the synthesis of redox-active calixarene-based anion receptors / B.-T. Zhao, M.-J. Blesa, F.L. Derf // *Tetrahedron*. – 2007. – Vol. 63, N 43 – P. 10768 – 10777.

57. *Zhao B.-T.* A calixarene amide tetrathiafulvalene assembly for the electrochemical detection of anions / B.-T. Zhao, M.-J. Blesa, N. Mercier et al. // *New J. Chem.* – 2005. – Vol. 29, N 9. – P. 1164 – 1167.
58. *Matvieiev Y.I.* Synthesis of Calixarene-Based Ketocyanine Fluorophores / Matvieiev Y.I., Karpenko Y.A., Kulinich A.V., Ryabitskii A.B., Pivovarenko V.G., Shishkina S.V., Shishkin O.V., Kalchenko V.I. // *Tetrahedron Lett.* – 2011. – Vol. 52. – P. 3922-3925.
59. *Matvieiev Yuriy.* The Upper Rim Functionalized Calixarene Ketocyanines: Synthesis, Structure and Fluorescence Properties / Matvieiev Yuriy, Kulinich Andrii, Ryabitskii Aleksey, Shishkina Svitlana, Shishkin Oleg, Pivovarenko Vasyl, Kalchenko Vitaly // *Макрогетероциклы/Macroheterocycles (Rus.)*. – 2016. – Vol. 9, N 9. – P. 288-293.
60. *Chen Q.-Y.* A highly selective fluorescent chemosensor for H_2PO_4^- -based on a calix[4]arene tetraamide derivative / Q.-Y. Chen // *Eur. J. Org. Chem.* – 2005. – Vol. 2005, N 12. – P. 2468 – 2472.
61. *Job P.* Recherches sur la formation de complexes minéraux en solution, et sur leur stabilité / P. Job // *Ann. Chim. Phys.* – 1928. – Vol. 9. – P. 113 – 134.
62. *Lee S.H.* Fluoride sensing with a PCT-based calix[4]arene / S.H. Lee, H.J. Kim, Y.O. Lee et al. // *Tetrahedron Lett.* – 2006. – Vol. 47. – P. 4373 – 4376.
63. *Chen C.-F.* Azocalix[4]arene-based chromogenic anion probes / C.-F. Chen // *New J. Chem.* – 2006. – Vol. 30, N 2. – P. 143 – 147.
64. *Boyko V.I.* New isocyanatomethoxy-calix[4]arenes in design of anion receptors / V.I. Boyko, A.V. Yakovenko, I.F. Tsymbal, V.I. Kalchenko // *Mendeleev Communications*. – 2006. – Vol. 16, N 1. – P. 24 – 2.
65. *Beer P.D.* Dicarboxylate anion recognition by a redox-responsive ditopic bis(coba1ticiuim) calix[4]arene receptor molecule / P.D. Beer,

M.G.B. Drew, C. Hazlewood, et al. // J. Chem. Soc., Chem. Commun. – 1993. – N 3. – P. 229 – 231.

66. *Beer P.D.* Anion recognition by redox-responsive ditopic bis-cobaltocenium receptor molecules including a novel calix[4]arene derivative that binds a dicarboxylate dianion / P.D. Beer, D. Hesek, J.E. Kingston, et al. // Organometallics. – 1995. – Vol. 14, N 7. – P. 3288 – 3295.

67. *Beer P.D.* New classes of anion receptor containing charged and neutral transition metal Lewis acidic recognition sites / P.D. Beer, C.A.P. Dickson, N. Fletcher, et al. // J. Chem. Soc., Chem. Commun. – 1993. – N 10. – P. 828 – 830.

68. *Rudkevich D.M.* Calix[4]arene salenes: a bifunctional receptor for NaH_2PO_4 / D.M. Rudkevich, W. Verboom, D.N. Reinhoudt // J. Amer. Chem. Soc. – 1994. – Vol. 59, N 13. – P. 3683 – 3686.

69. *Molenveld P.* Highly efficient phosphate diester transesterification by a calix[4]arene-based dinuclear zinc(II) catalyst / P. Molenveld, S. Kapsabelis, J.F.J. Engbersen et al. // J. Amer. Chem. Soc. – 1997. – Vol. 119. – P. 2948 – 2949.

70. *Molenveld P.* Dinuclear metallo-phosphodiesterase models: application of calix[4]arenes as molecular scaffolds / P. Molenveld, S. Kapsabelis, D.N. Reinhoudt // Chem. Soc. Rev. – 2000. – Vol. 29. – P. 75 – 86.

71. *Sidorov V.* Ion channel formation from a calix[4]arene amide that binds HCl / V. Sidorov, F.W. Kotch, G. Abdrakhmanova et al. // J. Amer. Chem. Soc. – 2002. – Vol. 124, N 10. – P. 2267 – 2278.

72. *Yoon D.-W.* Synthesis of a strapped calix[4]pyrrole: structure and anion binding properties / D.-W. Yoon, H. Hwang, C.-H. Lee // Angew. Chem. Int. Ed. – 2002. – Vol. 41, N 10. – P. 1757 – 1759.

73. *Lee C.-H.* Single side strapping a new approach to fine tuning the anion recognition properties of calix[4]pyrroles / C.-H. Lee, H.-K. Na, D.-W. Yoon et al. // J. Amer. Chem. Soc. – 2003. – Vol. 125, N 24. – P. 7301 – 7306.

74. *Lee C.H.* Cis- and trans-strapped calix[4]pyrroles bearing phthalamide linkers: synthesis and anion-binding properties / C.H. Lee, J.S. Lee, H.K. Na et al. // *J. Org. Chem.* – 2005. – Vol. 70, N 6. – P. 2067 – 2074.
75. *Yoon D.W.* Real-time determination of chloride anion concentration in aqueous-DMSO using a pyrrole-strapped calix[4]pyrrole anion receptor / D.W. Yoon, D.E. Gross, V.M. Lynch et al. // *Chem. Commun.* – 2009. – Vol. 9. – P. 1109 – 1111.
76. *Yoon D.W.* Benzene, pyrrole and furan-containing diametrically strapped calyx[4]pyrroles-an experimental and theoretical study of hydrogen-bonding effects in chloride anion recognition / D.W. Yoon, D.E. Gross, V.M. Lynch et al. // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2008. – Vol. 47, N 27. – P. 5038 – 5042.
77. *Gross D.E.* Anion binding behaviour of heterocycle-strapped calix[4]pyrroles / D.E. Gross, D.W. Yoon, V.M. Lynch et al. // *J. Incl. Phenom.* – 2010. – Vol. 66, N 1-2. – P. 81 – 85.
78. *Shatursky O.Ya.* Anion carrier formation by calix[4]arene-bis-hydroxymethylphosphonic acid in bilayer membranes / Shatursky O.Ya, Kasatkina L.A., Rodik R.V., Cherenok S.O., Shkrabak A.A., Veklich T.O., Borisova T.A., Kosterin S.O., Kalchenko V.I. // *Org. Biomol. Chem.* – 2014. – Vol. 12, Issue 48. – P. 9811 - 9821.
79. *Oshovsky G.V.* Supramolecular chemistry in water / G.V. Oshovsky, D.N. Reinhoudt, W. Verboom // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2007. – Vol. 46, N 14. – P. 2366 – 2393.
80. *Shinkai S.* Calixarenes – the third generation of supramolecules / Shinkai S. // *Tetrahedron.* – 1993. – Vol. 49. – P. 8933 – 8968.
81. *Bohmer V.* Calixarenes. Macrocycles with (almost) unlimited possibilities / Bohmer V. // *Angew. Chem., Int Ed. Engl.* – 1995. – Vol. 34. – P. 713 – 745.
82. *Mchedlov-Petrosyan N.O.* The colloidal nature of cationic calix[4]arene aqueous solutions / Mchedlov-Petrosyan N.O., Vodolazkaya N.A., Rodik

R.V., Bogdanova L.N., Cheipesh T.A., Soboleva O.Yu., Kryshtal A.P., Kutuzova L.V., Kalchenko V.I. // J. Phys. Chem. C. – 2012. – Vol. 116. – P. 10245-10259.

83. *Кальченко О.І.* Хроматографія в хімії каліксаренів / Кальченко О.І., Кальченко В.І. // Київ: Видавництво «Наукова Думка». – 2013. – 197 с.

84. *Kalchenko V.* Calixarene receptors of environmentally hazardous and bio-relevant molecules and ions / Kalchenko V. // Pure and Applied Chemistry. – 2008. – Vol. 80, Issue 7. – P. 1449-1458.

85. *Kalchenko O.I.* Complexation of Calix[4]arenephosphonous Acids with 2,4- Dichlorophenoxyacetic Acid and Atrazine in Water / Kalchenko O.I., Solovyov A.V., Cherenok S.A., Starodub N.F., Kalchenko V.I. // J. Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry. – 2003. – Vol. 46, Issue 1-2. – P. 19-25.

86. *Kalchenko O.* Complexation of tetrapropoxycalix[4]arene with uracil and adenine derivatives in water containing solution / Kalchenko O., Poznanski J., Marcinowicz A., Cherenok S., Solovyov A., Zielenkiewicz W., Kalchenko V. // J. Phys. Org. Chem. – 2003. – Vol. 16, Issue 4. – P. 246-252.

87. *Tairov M.A.* Symmetrical and inherently chiral water-soluble calix[4]arenes bearing dihydroxyphosphoryl groups / Tairov M.A., Vysotsky M.O., Kalchenko O.I., Pirozhenko V.V., Kalchenko V.I. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1. – 2002. – Issue 11. – P. 1405-1411.

88. *Kalchenko O.* Complexation of calyx[4]arenehydroxymethylphosphonic acids with amino acids. Binding constants determination of the complexes by HPLC method / Kalchenko O., Cherenok S., Yushchenko O., Kalchenko V. // J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem. – 2013. – Vol. 76, Issue 1-2. – P. 29-36.

89. *Kalchenko O.I.* Complexation of thiacalix[4]arene methylphosphonic and sulfonic acids with amino acids / Kalchenko O.I., Drapailo A., Shishkina S.V., Shishkin O.V., Kharchenko S., Gorbachuk V., Kalchenko V. // Supramolecular Chemistry. – 2013. – Vol. 25, No 5. – P. 263-268.

90. *Kharchenko S.G.* Thia- and Sulfonylcalix[4]arene methylphosphonous acids. Synthesis, Structure, Amino Acids Binding / Kharchenko S.G., Drapailo A.B., Kalchenko O.I., Yampolska G.D., Shishkina S.V., Shishkin O.V., Kalchenko V.I. // Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements. – 2013. – Vol. 188. – P. 243-248.
91. *Vodolazkaya N.A.* The Influence of Aggregates of Calixarenes and Dendrimers on the Protolytic Equilibria of Dyes in Aqueous Solution / Vodolazkaya N.A., Mchedlov-Petrossyan N.O., Bogdanova L.N., Rodik R.V., Kalchenko V.I. // У книзі «From molecules to functional architecture. Supramolecular interactions» / Edited by V.I. Rybachenko. – Donetsk: East Publisher House, 2013. – 538 p. – P. 49-70.
92. *Ukhatskaya E.* Cationic quaternized aminocalix[4]arenes: cytotoxicity, haemolytic and antibacterial activities / Ukhatskaya E., Kurkov S.V., Hjálmarisdóttir M.A., Karginov V.A., Matthews S.E., Rodik R.V., Kalchenko V.I., Loftsson T. // Int. J. Pharm. – 2013. – Vol. 458. – P. 25-30.
93. *Andreyko E.A.* Enantioselective Recognition of Amino Acids by Enantiomerically Pure Calix[4]arene Carboxylic Acid or Their Diastereomerically Pure N-(1-Phenyl)ethyl Amides / Andreyko E.A., Stoikov I.I., Antipin I.S., Karpus A.O., Sikorsky A.M., Yesypenko O.A., Rozhenko A.B., Boyko V.I., Kalchenko V.I. // Macroheterocycles. – 2013. – Vol. 6, N 3. – P. 227-233.
94. *Kalchenko Olga.* Complexation of Calix[4]arene bis-Hydroxymethylenediphosphonic Acid with Amino acids. Binding Constants Determination by RP HPLC Method / Kalchenko Olga, Cherenok Sergiy, Kalchenko Vitaly // French-Ukrainian Journal of Chemistry. – 2015. – Vol. 3, Issue 2. – P. 93-100.
95. *Arena G.* Complexation of small neutral organic molecules by water soluble calix[4]arenes / G. Arena, A. Contino, F. Giilino et al. // Tetrahedron Lett. – 2000. – Vol. 41, N 48. – P. 9327 – 9330.

96. *Arena G.* Water-soluble pentasulfonato- calix[5]arene: selective recognition of ditopic trimethylammonium cations by a triple non-covalent interaction / G. Arena, S. Gentile, F. Gulino et al. // *Tetrahedron Lett.* – 2004. – Vol. 45, N 38. – P. 7091 – 7094.
97. *Arena G.* Entropic origin of the sulfonate groups electrostatic assistance in the complexation of quaternary ammonium cations by water soluble calix[4]arenes / G. Arena, A. Casnati, A. Contino et al. // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* – 2000. – N 3. – P. 419 – 423.
98. *Shinkai S.* NMR and crystallographic studies of a p-sulfonatocalix[4]arene-guest complex / S. Shinkai, K. Araki, T. Matsuda et al. // *J. Amer. Chem. Soc.* – 1990. – Vol. 112, N 25. – P. 9053–9058.
99. *Arena G.* A new water-soluble calix[4]arene ditopic receptor rigidified by microsolvation: acid-base and inclusion properties / G. Arena, A. Casnati, L. Mirone // *Tetrahedron Lett.* – 1997. – Vol. 38, N 11. – P. 1999–2002.
100. *Arena G.* Water-soluble calixarene hosts that specifically recognize the trimethylammonium group or the benzene ring of aromatic ammonium cations: a combined ^1H NMR, calorimetric, and molecular mechanics investigation / G. Arena, A. Casnati, A. Contino, et al. // *Chem. Eur. J.* – 1999. – Vol. 5. – P. 738 –744.
101. *Arena G.* ^1H NMR and calorimetric studies of the inclusion of trimethylammonium cations into water soluble calixresorcin-arenes / G. Arena, A. Contino, T. Fujimoto, et al. // *Supramol. Chem.* – 2000. – Vol. 11, N 4. – P. 279 – 288.
102. *Atwood J.L.* Structure of the p-sulfonatocalix[4]arene complex with tetramethylammonium ions, $[\text{NMe}_4]_5[\text{p-sulfonatocalix[4]arene}] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ / J.L. Atwood, L.J. Barbour, P.C. Junk et al. // *Supramol. Chem.* – 1995. – Vol. 5, N 2. – P. 105–108.
103. *Franchi P.* An EPR Investigation of the kinetics of inclusion of a persistent radical in water-soluble calix[4]arenes / P. Franchi, M. Lucarini,

G. Pedulli et al. // *Angew. Chem., Int. Ed.* – 2000. – Vol. 39, N 1. – P. 263–266.

104. *Gutshe C.D.* The complexation and catalytic properties of water soluble calixarenes / C.D. Gutshe, I. Alam // *Tetrahedron.* – 1988. – Vol. 44, N 15. – P. 4689–4694.

105. *Diederich F.* A new water-soluble macrocyclic host of the cyclophane type: host-guest complexation with aromatic guests in aqueous solution and acceleration of the transport of arenes through an aqueous phase / F. Diederich, K. Dick // *J. Amer. Chem. Soc.* – 1984. – Vol. 106, N 26. – P. 8024–8036.

106. *Lehn J.M.* Binding of acetylcholine and other quaternary ammonium cations by sulfonated calixarenes. Crystal structure of a [choline-tetrasulfonated calix[4]arene] complex / J.M. Lehn, R. Meric, J.P. Vigneron et al. // *Supramol. Chem.* – 1995 – Vol. 5, N 2. – P. 97–103.

107. *Harrowfield J.M.* Cation-calixarene interactions: tetraalkylammonium cation binding by calixarene anions / J.M. Harrowfield, M.I. W.R. Ogden, Richmond et al. // *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2.* – N 11. – 1993. – P. 2183–2190.

108. *Harrowfield J.M.* Alkylammonium cation interactions with calixarene anions. Part 2. Structural characterisation of a salt of 2:3 cation:calixarene stoichiometry / J.M. Harrowfield, W.R. Richmond, A.N. Sobolev et al. // *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2.* – 1994. – N 1. – P. 5 – 9.

109. *Harrowfield J.M.* Inclusion of quaternary ammonium compounds by calixarenes / J.M. Harrowfield, W.R. Richmond, A.N. Sobolev // *J. Incl. Phenom.* – 1994. – Vol. 19, N 1–4. – P. 257 – 276.

110. *Kalchenko O.* Complexation of the upper rim phosphorylated calix[4]arenes with uracil derivatives in water-containing solution / Kalchenko O., Marcinowicz A., Poznanski J. Cherenok S., Solovyov A., Zielenkiewicz W., Kalchenko V. // *J. Phys. Org. Chem.* – 2005. – Vol. 18, Issue 7. – P. 578-585.

111. Кальченко О.І. Хроматографічне дослідження комплексоутворення фосфорильованих калікс[4]аренів з нуклеїновими основами / Кальченко О.І., Черенок С. О., Кальченко В.І. // Укр. Хім. Журн. – 2008. – Т. 74, № 5-6. – С. 58-62.
112. Zielenkiewicz W. Calorimetric, NMR, and UV investigations of aliphatic L-amino acids complexation by calix[4]arene bis-hydroxymethylphosphous acid / Zielenkiewicz W., Marciniwicz A., Poznanski J., Cherenok S., Kalchenko V. // J. Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry. – 2006. – Vol. 55, Issue 1-2. – P. 11–19.
113. Zielenkiewicz W. Complexation of isoleucine by phosphorylated calix[4]arene in methanol followed by calorimetry, NMR and UV–VIS spectroscopies, and molecular modeling methods / Zielenkiewicz W., Marcinowicz A., Poznański J., Cherenok S., Kalchenko V. // J. Molecular Liquids. – 2005. – Vol. 121, Issue 1. – P. 8-14.
114. Zielenkiewicz W. Phosphorylated calixarenes as receptors of L-amino acids and dipeptides: calorimetric determination of Gibbs energy, enthalpy and entropy of complexation / W. Zielenkiewicz, A. Marcinowicz, S. Cherenok et al. // Supramol. Chem. – 2006. – Vol. 18, N 3. – P. 167 – 176.
115. Perret F. Biochemistry of the para-sulfonato-calix[n]arenes / F. Perret, A. Lazar, A.W. Coleman // Chem. Commun. – 2006. – Vol. 23. – P. 2425 – 2438.
116. Kalchenko O.I. A comparative study of the determination of the stability constants of inclusion complexes of p-sulfonatocalix[4]arene with amino acids by RP-HPLC and ^1H NMR / O.I. Kalchenko, F. Perret, N. Morel-Desrosiers, A.W. Coleman // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2 – 2001. – N 3. – P. 258 – 263.
117. Bugler J. Novel Water-soluble β -cyclodextrin-calix[4]arene couples as fluorescent sensor molecules for the detection of neutral analytes / J. Bugler, J.F.J. Engbersen, D. Reinhoudt // J. Org. Chem. – 1998. – Vol. 63, N 16. – P. 5339 – 5344.

118. *Sansone F.* Biomimetic macrocyclic receptors for carboxylate anion recognition based on C-linked peptidocalix[4]arenes / F. Sansone, L. Baldini, A. Casnati, et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – Vol. 99, N 8. – P. 4842 – 4847.
119. *Yakovenko A.V.* N-Linked-peptidocalix[4]arene as enantioselective receptors for amino acid derivatives / A.V. Yakovenko, V.I. Boyko, V.I. Kalchenko et al. // *J. Org. Chem.* – 2007. – Vol. 72. – P. 3223 – 3231.
120. *Karakucuk A.* Synthesis and chiral recognition properties of two novel chiral calix[4]arene tartaric ester derivatives / Karakucuk A., Durmaz M., Sirit A., Yilmaz M., Demir A.S. // *Tetrahedron: Asymmetry.* – 2006. – Vol. 17, N 13. – P. 1963–1968.
121. *Durmaz M.* Enantiomeric recognition of amino acid derivatives by chiral schiff bases of calix[4]arene / Durmaz M., Alpaydin S., Sirit A., Yilmaz M. // *Tetrahedron: Asymmetry.* – 2007. – Vol. 18, N 7. – P. 900–905.
122. *Li S.-Y.* Fluorescent probes of D-(+)-gluconic acid d-lactone based on binary hosts of chiral calix[5]arene / Li S.-Y., Zheng Q.-Y., Chen C.-F., Huang Z.-T. // *Tetrahedron: Asymmetry.* – 2005. – Vol. 16, N 16. – P. 2816–2820.
123. *Pu L.* Fluorescence of Organic Molecules in Chiral Recognition / Pu L. // *Chem. Rev.* – 2004. – Vol. 104, N 3. – P. 1687–1716.
124. *Lin J.* Highly enantioselective fluorescent recognition of α -amino acid derivatives / Lin J., Li Z.-B., Zhang H.-C., Pu L. // *Tetrahedron Lett.* – 2004. – Vol. 45, N 1. – P. 103–106.
125. *Kubo Y.* Molecular recognition of butylamines by a binaphthyl-derived chromogenic calix[4]crown / Kubo Y., Maruyama S., Ohhara N., Nakamura M., Tokita S. // *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* – 1995. – P. 1727-1728.
126. *Kubo Y.* Colorimetric chiral recognition by a molecular sensor / Kubo Y., Maeda S., Tokita S., Kubo M. // *Nature.* – 1996. – Vol. 382. – P. 522-524.

127. *Grady T.* Determination of the Enantiomeric Composition of Chiral Amines Based on the Quenching of the Fluorescence of a Chiral Calixarene / Grady T., Harris S.J., Smyth M.R., Diamond D. // *Anal. Chem.* – 1996. – Vol. 68. – P. 3775–3782.
128. *Jennings K.* Enantioselective molecular sensing of aromatic amines using tetra-(S)-di-2-naphthylprolinol calix[4]arene / Jennings K., Diamond D. // *Analyst.* – 2001. – Vol. 126. – P. 1063–1067.
129. *Grady T.* Chiral resolution of the enantiomers of phenylglycinol using (S)-di-naphthylprolinol calix[4]arene by capillary electrophoresis and fluorescence spectroscopy / Grady T., Joyce T., Harris S. J., Diamond D. // *Anal. Commun.* – 1998. – Vol. 35. – P. 123–125.
130. *Lynam C.* Tuning and Enhancing Enantioselective Quenching of Calixarene Hosts by Chiral Guest Amines / Lynam C., Jennings K., Nolan K., Kane P., McKerverey M.A., Diamond D. // *Anal. Chem.* – 2002. – Vol. 74, N 1. – P. 59–66.
131. *Demirtas H.N.* Synthesis of new chiral calix[4]azacrowns for enantiomeric recognition / Demirtas H. N.; Bozkurt, S.; Durmaz, M.; Yilmaz, M.; Sirit, A. // *Tetrahedron: Asymmetry.* – 2008. – Vol. 19, N 17. – P. 2020–2025.
132. *Demirtas H.N.* Chiral calix[4]azacrowns for enantiomeric recognition of amino acid derivatives / Demirtas H.N., Bozkurt S., Durmaz M., Yilmaz M., Sirit A. // *Tetrahedron.* – 2009. – Vol. 65, N 15. – P. 3014–3018.
133. *Liu F.* Synthesis of Calix[4]arene Derivatives with Alkyl Guanidinium or Chiral Bicyclic Guanidinium / Liu F., Lu G.-Y., He W.-J., Hu J., Mei Y.-H., Zhu L.-G. // *Synthesis.* – 2001. – Vol. 4. – P. 607–611.
134. *Liu F.* Enantioselective recognition of calix(4)arene derivatives bearing chiral bicyclic guanidinium for dl-phenylalanine zwitterions at the air-water interf / Liu F., Lu G.-Y., He W.-J., Liu M.-H., Zhu L.-G. // *Thin Solid Films.* – 2004. – Vol. 468, N 1-2. – P. 244–249.

135. *Qing G.Y.* Enantioselective Fluorescent Sensors for Chiral Carboxylates Based on Calix[4]arenes Bearing an L-Tryptophan Unit / Qing G.Y., He Y.B., Wang F., Qin H.J., Hu C.G., Yang X. // *Eur. J. Org. Chem.* – 2007. – Vol. 11. – P. 1768–1778.
136. *Thamarai Chelvi S.K.* Preparation and evaluation of calix[4]arene-capped α -cyclodextrin-bonded silica particles as chiral stationary phase for high-performance liquid chromatography / Thamarai Chelvi S.K., Yong E.L., Gong Y. // *J. Chromatogr. A.* – 2008. – Vol. 1203, N 1. – P. 54–58.
137. *Krawinkler K.H.* Novel urea-linked cinchona-calixarene hybrid-type receptors for efficient chromatographic enantiomer separation of carbamate-protected cyclic amino acids / Krawinkler K.H., Maier N.M., Sajovic E., Lindner W. // *J. Chromatogr. A.* – 2004. – Vol. 1053, N. 1,2. – P. 119–131.
138. *Krawinkler K.H.* Novel Cinchona Carbamate Selectors With Complementary Enantioseparation Characteristics for N-Acylated Amino Acids / Krawinkler K.H., Maier N.M., Ungaro R., Sansone F., Casnati A., Lindner W. // *Chirality.* – 2003. – Vol. 15, N S1. – P. S17–29.

До розділу 2

1. *Кальченко В.І.* Каліксарени. Перспективи медико-біологічного застосування / Кальченко В.І., Родік Р.В., Бойко В.І. // *Журнал органічної та фармацевтичної хімії.* – 2006. – Т. 3, № 4. – С.13 – 29.
2. *Geide I.* Novel ditopic receptor based on tetrakis-aminosulfonyl-calix[4]arene / I. Geide, D. Soldatov, O. Kramarenko [et al.] // *Journal of Structural Chemistry.* – 2005. – Vol. 46. – P. 28 – 32.
3. *Matthews S.E.* Calixarene-Based Anion Receptors / S.E. Matthews, P.D. Beer // *Calixarenes* : [eds. Z. Asfari et al.]. – 2001. – P. 421-439.

4. *Rodik R.V.* Calixarenes in bio-medical researches / R.V. Rodik, V.I. Boyko, V.I. Kalchenko // *Curr. Med. Chem.* – 2009. – Т. 16, № 13. – P. 1630 – 1655.

5. *Cherenok S.* Phosphorus-containing calixarenes / Cherenok S., Kalchenko V. // *Topics Heterocyclic Chemistry.* – 2009. – Vol. 20. – P. 229-273.

6. *Данилович Г.В.* Зміни поляризації плазматичної та внутрішньої мітохондріальної мембран клітин міометрія за дії каліксаренів – інгібіторів Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани / Данилович Г.В., Данилович Ю.В., Коломієць О.В., Костерін С.О., Родік Р.В., Черенок С.О., Кальченко В.І., Чуніхін О.Ю., Горчев В.Ф., Карахім С.О. // *Укр. біохім. журн.* – 2012. – Т. 84, № 6. – С. 37-48.

7. *Komisarenko S.V.* Calixarene methylene bisphosphonic acids as promising effectors of biochemical processes / Komisarenko S.V., Kosterin S.O., Lugovskoy E.V., Kalchenko V.I. // *УБЖ.* – 2013. – Т. 85, № 6. – С. 106-128.

8. *Лабинцева Р.Д.* Захисний вплив тіакалікс[4]арентетрасульфонату на інгібування АТФ-гідролазної активності субфрагмента А-1 міозину міометрія катіонами важких металів / Лабинцева Р.Д., Бевза О.В., Бевза А.А., Люлько А.О., Харченко С.Г., Кальченко В.І., Костерін С.О. // *УБЖ.* – 2014. – Т. 86, № 6. – С. 154-166.

9. *Hamuro Y.* A Calixarene with Four Peptide Loops: An Antibody Mimic for Recognition of Protein Surfaces / Hamuro Y., Calama M.C., Park H.S., Hamilton A.D. // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 1997. – Vol. 36 – P. 2680-2683.

10. *Lin S.H.* Two Ca^{2+} -dependent ATPase in rat liver plasma membrane. The previously purified $(\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+})$ -ATPase is not a Ca^{2+} -pump but an ecto-ATPase / Lin S.H., Russel W.E. // *J. Biol. Chem.* – 1988. – Vol. 263, N 25. – P. 12253-12258.

11. *Wei Y.* Disruption of Protein-protein Interactions: Design of a Synthetic Receptor that Blocks the Binding of Cytochrome C to Cytochrome C Peroxidase / Wei Y., McLendon G.L., Hamilton A.D., Case M.A., Purring C.B., Lin Q., Park H.S., Lee C.-S., Yu T. // Chem. Commun. – 2001. – P. 1580-1581.
12. *Oshima T.* Recognition of lysine residues on protein surfaces using calixarenes and its application / Oshima T., Baba Y., Shimojo K., Goto M. // Curr. Drug Discov. Technol. – 2007. – Vol. 4, N 4. – P. 220-228.
13. *Oshima T.* Complex formation of cytochrome C with a calixarene carboxylic acid derivative: a novel solubilization method for biomolecules in organic media / Oshima T., Goto M., Furusaki S. // Biomacromolecules. – 2002. – Vol. 3, N 3. – P. 438-444.
14. *Park H.S.* Protein Surface Recognition by Synthetic Receptors: A Route to Novel Submicromolar Inhibitors for α -Chymotrypsin / Park H.S., Lin Q., Hamilton A.D.J. // Am. Chem. Soc. – 1999. – Vol. 121. – P. 8-13.
15. *Aime S.* A Calix[4]arene Gd^{III} Complex Endowed with High Stability, Relaxivity, and Binding Affinity to Serum Albumin / Aime S., Barge A., Botta M., Casnati A., Fragai M., Luchinat C., Ungaro R. // Angew Chem. Int. Ed. – 2001. – Vol. 40 – P. 4737-4739.
16. *Memmi L.* Protein-calixarene interactions: complexation of Bovine Serum Albumin by sulfonatocalix[n]arenes / Memmi L., Lazar A., Brioude A., Ball V., Coleman A.W. // Chem. Commun. (Camb.). – 2001. – Vol. 7, N 23. – P. 2474-2475.
17. *Gualbert J.* Interactions of amphiphilic calix[4]arene-based Solid Lipid Nanoparticles with bovine serum albumin / Gualbert J., Shahgaldian P., Coleman A.W. // Int J Pharm. – 2003. – Vol. 257, N 1-2. – P. 69-73.
18. *Zhou H.* Structure-activity studies on a library of potent calix[4]arene-based PDGF antagonists that inhibit PDGF-stimulated PDGFR tyrosine phosphorylation / Zhou H., Wang D.A., Baldini L., Ennis

E., Jain R., Carie A., Sebti S.M., Hamilton A.D. // Org. Biomol. Chem. – 2006. – Vol. 4, N 12. – P. 2376-2386.

19. *Mecca T.* Designed calix[8]arene-based ligands for selective tryptase surface recognition / Mecca T., Consoli G.M., Geraci C., Cunsolo F. // Bioorg. Med. Chem. – 2004. – Vol. 12, N 19. – P. 5057-5062.

20. *Park H.S.* Modulation of protein-protein interactions by synthetic receptors: design of molecules that disrupt serine protease-protenaceous inhibitors interaction / Park H.S., Lin Q., Hamilton A.D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2002. – Vol. 99, N 8. – P. 5105-5109.

21. *Stoikova E.E.* 1,3-Disubstituted p-tert-butylcalix[4]arenes as cholinesterase inhibitors / Stoikova E.E., Evtugyn G.A., Belyakova S.V., Khrustalev A.A., Stoikov I.I., Antipin I.S., Budnikov H.C., Konovalov A.I. // J. Inclusion Phenom. Macrocycl. Chem. – 2001. – Vol. 39, N 3-4. – P. 339-346.

22. *Cherenok S.* Calix[4]arene α -aminophosphonic acids: asymmetric synthesis and enantioselective inhibition of an alkaline phosphatases / Cherenok S., Vovk A., Muravyova I., Shivanyuk A., Kukhar V., Lipkowski J., Kalchenko V. // Org. Lett. – 2006. – Vol. 8, N 4. – P. 549-552.

23. *Francese S.* Transglutaminase surface recognition by peptidocalix[4]arene diversomers / Francese S., Cozzolino A., Caputo I., Esposito C., Martino M., Gaeta C., Troisi F., Neri P. // Tetrahedron Lett. – 2005. – Vol. 46, N 10. – P. 1611-1615.

24. *Schühlea D.T.* Metal binding calixarenes with potential biomimetic and biomedical applications / Schühlea D.T., Petersa J.A., Schatz J. // Coordination Chemistry Rev. – 2011. – Vol. 255, N 23–24. – P. 2727–2745.

25. *Perret F.* Biochemistry of the para-sulfonato-calix[n]arenes / Perret F., Lazar A.N., Coleman A.W. // Chem Commun (Camb). – 2006. – Vol. 21, N 23. – P. 2425-2438.

26. Vovk A.I. Calix[4]arene methylenebisphosphonic acids as calf intestine alkaline phosphatase inhibitors / Vovk A.I., Kalchenko V.I., Cherenok S.A., Kukhar V.P., Muzychka O.V., Lozynsky M.O. // *Org. Biomol. Chem.* – 2004. – Vol. 2. – P. 3162-3166.

27. Музичка О.В. Калікс[4]аренметилєнбісфосфонові кислоти: особливості інгібування лужних фосфатаз / Музичка О.В., Таньчук В.Ю., Вовк А.І., Муравйова І.В., Кальченко В.І., Черенок С.О., Кухар В.П. // *Укр. біохим. журн.* – 2007. – Т. 79, № 6. – С. 26-33.

28. Vovk A.I. Inhibition of *Yersinia* protein tyrosine phosphatase by phosphonate derivatives of calixarenes / Vovk A.I., Kononetsa L.A., Tanchuka V.Yu, Cherenok S.O., Drapailo A.B., Kalchenko V.I., Kukhar V.P. // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* – 2010. – Vol. 20, N 2. – P. 483–487.

29. Trush V.V. Calix[4]arene methylenebisphosphonic acids as inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B / Trush V.V, Cherenok S.O., Tanchuk V.Yu., Kukhar V.P, Kalchenko V.I., Vovk A.I. / *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* – 2013. – Vol. 23, N 20. – P. 5619–5623.

30. Fletcher S. Protein surface recognition and proteomimetics: mimics of protein surface structure and function / Fletcher S., Hamilton A.D. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 2005. – Vol. 9, N 6. – P. 632-638.

31. Magrans J.O. A Designed Non-Peptidic Receptor that Mimics the Phosphocholine Binding Site of the McPC603 Antibody / Magrans J.O., Ortiz A.R., Molins M.A., Lebouille P.H.P., Sanchez-Quesada J., Prados P., Pons M., Gaco F., de Mendoza J. // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 1996. – Vol. 35. – P. 1712-1715.

32. Fiammengo R. Heme-protein active site models via self-assembly in water / Fiammengo R., Wojciechowski K., Crego-Calama M., Timmerman P., Figoli A., Wessling M., Reinhoudt D.N. // *Org. Lett.* – 2003. – Vol. 5, N 19. – P. 3367-3370.

33. *Караханов Э.А.* Создание супрамолекулярных металлокомплексных каталитических систем для органического и нефтехимического синтеза / Караханов Э.А., Максимов А.Л., Рунова Е.А. // Успехи химии. – 2005. – Т. 74, № 1. – С. 104-119.

34. *Shinkai S.* Hexasulfonated Calix[6]arene Derivatives: A New Class of Catalysts, Surfactants, and Host Molecules / Shinkai S., Mori S., Koreishi H., Tsubaki T., Manabe O. // J. Am. Chem. Soc. – 1986. – Vol. 108. – P. 2409-2416.

35. *Gutsche C.D.* Calixarenes. 23. Complexation and Catalytic Properties of Water Soluble Calixarenes / Gutsche C.D., Alam I. // Tetrahedron. – 1988. – Vol. 44. – P. 4689-4694.

36. *Brewster R.E.* Synthesis of a peptidocalix[4]arene library and identification of compounds with hydrolytic activity / Brewster R.E., Dalton B.G.A., Shuker S.B. // Bioorganic Chemistry. – 2005. – Vol. 33. – P. 16-21.

37. *Cuevas F.* Toward an Artificial Acetylcholineesterase / Cuevas F., Di Stefano S., Magrans J.O., Prados P., Mandolini L., de Mendoza J. // Chem. Eur. J. – 2000. – Vol. 6. – P. 3228-3234.

38. *Goto K.* Catalytic specificity exhibited by p-sulfonatocalix[n]arenes in the methanolysis of N-acetyl-L-amino acids / Goto K., Yano Y., Okada E., Liu C.-W., Yamamoto K., Ueoka R. // J. Org. Chem. – 2003. – Vol. 68, N 3. – P. 865-870.

39. *Izzet G.* Calix[6]tren and copper(II): a third generation of funnel complexes on the way to redox calix-zymes / Izzet G., Douziech B., Prange T., Tomas A., Jabin I., Le Mest Y., Reinaud O. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2005. – Vol. 102, N 19. – P. 6831-6836.

40. *Rondelez Y.* The first water-soluble copper(I) calix[6]arene complex presenting a hydrophobic ligand binding pocket: a remarkable model for active sites in metalloenzymes / Rondelez Y., Bertho G., Reinaud O. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. – 2002. – Vol. 41, N 6. – P. 1044-1046.

41. *Rondelez Y.* Calix[6]arene-based cuprous "funnel complexes": a mimic for the substrate access channel to metalloenzyme active sites / *Rondelez Y., Rager M.N., Duprat A., Reinaud O.* // *J. Am. Chem. Soc.* – 2002. – Vol. 124, N 7. – P. 1334-1340.

42. *Poul N.L.* Monocopper center embedded in a biomimetic cavity: from supramolecular control of copper coordination to redox regulation / *Poul N.L., Champion M., Douziech B., Rondelez Y., Clainche L.L., Reinaud O., Mest Y.L.* // *J. Am. Chem. Soc.* – 2007. – Vol. 129, N 28. – P. 8801-8810.

43. *Izzet G.* Dioxygen Activation at a Mononuclear Cu(I) Center Embedded in the Calix[6]arene-Tren Core / *Izzet G., Zeitouny J., Akdas-Killig H., Frapart Y., Ménage S., Douziech B., Jabin I., Le Mest Y., Reinaud O.* // *J. Am. Chem. Soc.* – 2008. – Vol. 130, N 29. – P. 9514-9523.

44. *Molenveld P.* Highly Efficient Phosphate Diester Transesterification by a Calix[4]arene-Based Dinuclear Zinc(II) Catalyst / *Molenveld P., Kapsabelis S., Engbersen J.F.J., Reinhoudt D.N.* // *J. Am. Chem. Soc.* – 1997. – Vol. 119. – P. 2948-2949.

45. *Molenveld P.* Dinuclear and Trinuclear Zn(II) Calix[4]arene Complexes as Models for Hydrolytic Metallo-Enzymes. Synthesis and Catalytic Activity in Phosphate Diester Transesterification / *Molenveld P., Stikvoort W.M.G., Kooijman H., Spek A.L., Engbersen J.F.J., Reinhoudt D.N.* // *J. Org. Chem.* – 1999. – Vol. 64. – P. 3896-3906.

46. *Cacciapaglia R.* Catalysis of diribonucleoside monophosphate cleavage by water soluble copper(II) complexes of calix[4]arene based nitrogen ligands / *Cacciapaglia R., Casnati A., Mandolini L., Reinhoudt D.N., Salvio R., Sartori A., Ungaro R.* // *J. Am. Chem. Soc.* – 2006. – Vol. 128, N 37. – P. 12322-12330.

47. *Spencer D.J.* Calix[4]arenes linked to multiple bidentate N-donors: potential ligands for synthetic modeling of multinuclear

metalloenzymes / Spencer D.J., Johnson B.J., Tolman W.B. // *Org. Lett.* – 2002. – Vol. 4, N 8. – P. 1391-1393.

48. *Molenveld P.* Specific RNA Dinuclear Cleavage by a Synthetic Calix[4]arene-Based Trinuclear Metallo(II)-phosphodiesterase / Molenveld P., Engbersen J.F.J., Reinhoudt D.N. // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 1999. – Vol. 38. – P. 3189-3192.

49. *Yao Tian-Ming.* Supramolecular interaction between water-soluble calix[4]arene and ATP – the catalysis of calix[4]arene for hydrolysis of ATP / Yao Tian-Ming, Ye Zhi-Feng, Wang Li, Gu Jin-Ying, Yao Si-De, Shi Xian-Fa // *Spectrochimica Acta. Part A.* – 2002. – Vol. 58. – P. 3033-3038.

50. *Korchowiec B.* Calixarenes in a membrane environment: a monolayer study on the miscibility of three p-tert-butylcalix[4]arene beta-lactam derivatives with 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine / Korchowiec B., Ben Salem A., Corvis Y., de Vains J.B., Korchowiec J., Rogalska E. // *J. Phys. Chem B.* – 2007. – Vol. 111, N 46. – P. 13231-13242.

51. *Jain M.K.* Effect of antituberculous calixarenes on phospholipase A₂ susceptibility and on fusion of phospholipid bilayers / Jain M.K., Jahagirdar D.V. // *Biochem. J.* – 1985. – Vol. 227, N 3. – P. 789-794.

52. *Jin T.* Selective Na⁺ Transport through Phospholipid Bilayer Membrane by a Synthetic Calix[4]arene Carrier / Jin T., Kinjo M., Koyama T., Kobayashi Y., Hirata H. // *Langmuir.* – 1996. – Vol. 12, N 11. – P. 2684-2689.

53. *Jin T.* Ion Transport Activity of Calix[n]arene (n = 4, 5, 6, 7, 8) Esters toward Alkali-metal Cations in a Phospholipid Bilayer Membrane / Jin T., Kinjo M., Kobayashi Y., Hirata H. // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* – 1998. – Vol. 94. – P. 3135-3140.

54. *Ersoz M.* Transport of mercury through liquid membranes containing calixarene carriers / Ersoz M. // Adv. Colloid Interface Sci. – 2007. – Vol. 134-135 – P. 96-104.

55. *de Mendoza J.* Synthetic Cation-Transporting Calix[4]arene Derivative Active in Phospholipid Bilayers / de Mendoza J., Cuevas F., Prados P., Meadows E.S., Gokel G.W. // Angew. Chem. Int. Ed. – 1998. – Vol. 37. – P. 1534-1537.

56. *Thallapally P.K.* Diffusion of water in a nonporous hydrophobic crystal / Thallapally P.K., Lloyd G.O., Atwood J.L., Barbour L.J. // Angewandte Chemie (International ed. in English) – 2005. – Vol. 44, N 25. – P. 3848-3851.

57. *Mareque-Rivas J.C.* Interchain hydrogen-bonding interactions may facilitate translocation of K^+ ions across the potassium channel selectivity filter, as suggested by synthetic modeling chemistry / Mareque-Rivas J.C., Schwalbe H., Lippard S.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – Vol. 98, N 17. – P. 9478-9483.

58. *Iqbal K.S.* Artificial transmembrane ion channels from commercial surfactants / Iqbal K.S., Allen M.C., Fucassi F., Cragg P.J. // Chem. Commun. (Camb). – 2007. – N 38. – P. 3951-3953.

59. *Yanaka Y.* Non-Peptidic Ion channel with K^+ Selectivity / Yanaka Y., Kobuke Y., Sokabe M.A. // Angew. Chem. Int. Ed. – 1995. – Vol. 34. – P. 693-694.

60. *Yoshino N.* An Artificial Ion Channel Formed by a Macrocyclic Resorcin[4]arene with Amphiphilic Cholic Acid Ether Groups / Yoshino N., Satake A., Kobuke Y. // Angew. Chem. Int. Ed. – 2001. – Vol. 40. – P. 457-459.

61. *Sidorov V.* Ion channel formation from a calix[4]arene amide that binds HCl / Sidorov V., Kotch F.W., Abdrakhmanova G., Mizani R., Fettinger J.C., Davis J.T. // J. Am. Chem. Soc. – 2002. – Vol. 124, N 10. – P. 2267-2278.

62. *Singh A.K.* Development of chloride channel modulators / Singh A.K., Venglarik C.J., Bridges R.J. // *Kidney. Int.* – 1995. – Vol. 48. – P. 985-993.
63. *Schultz B.D.* Pharmacology of CFTR Chloride Channel Activity / Schultz B.D., Singh A.K., Devor D.C., Bridges R.J. // *Physiol. Rev.* – 1999. – Vol. 79, N 1. – P. 109-144.
64. *Droogmans G.* Sulphonic acid derivatives as probes of pore properties of volume-regulated anion channels in endothelial cells / Droogmans G., Maertens C., Prenen J., Nilius B. // *Br. J. Pharmacol.* – 1999. – Vol. 128, N 1. – P. 35-40.
65. *Droogmans G.* Voltage-dependent block of endothelial volume-regulated anion channels by calix[4]arenes / Droogmans G., Prenen J., Eggermont J., Voets T., Nilius B. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 1998. – Vol. 275. – P. 646-652.
66. *Tomita N.* Macrocyclic proteoglycan mimics. Potent inhibition of cell adhesion by a bundle of chondroitin sulfate chains assembled on the calix[4]resorcarene platform / Tomita N., Sando S., Sera T., Aoyama Y. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2004. – Vol. 14, N 9. – P. 2087-2090.
67. *Balasahe S.* Biological applications of functionalized calixarenes / Balasahe S., Nimsea T. Kim. // *Chem. Soc. Rev.* – 2013. – Vol. 42. – P. 366-386.
68. *De Fatima A.* Calixarenes as new platforms for drug design / De Fatima A., Fernandes S. A., Sabino A. A. // *Curr. Drug Disc. Tech.* – 2009 – Vol. 6. – P. 151-170.
69. *Hoskins C.* Simple Calix[n]arenes and Calix[4]resorcinarenes as Drug Solubilizing Agents / Hoskins C., Curtis A. // *Journal of Nanomedicine Research.* – 2015. – Vol. 2, Issue 3. – P. 1-8.
70. *Родік Р.В.* Антимікробна та протівірусна активність каліксаренів / Родік Р.В. // *Журнал органічної та фармацевтичної хімії.* – 2015. – Т. 13, вип 1. – С. 67-78.

71. *Casnati A.* Synthesis, antimicrobial activity and binding properties of calix[4]arene based vancomycin mimics / Casnati A., Fabbì M., Pelizzi N., Pochini A., Sansone F., Ungaro R., Di Modugno E., Tarzia G. // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 1996. – Vol. 6, N 22. – P. 2699-2704.

72. *Hart P.D.* Calixarenes with host-mediated potency in experimental tuberculosis: further evidence that macrophage lipids are involved in their mechanism of action / Hart P.D., Armstrong J.A., Brodaty E. // *Infect. Immun.* – 1996. – Vol. 64, N 4. – P. 1491-1493.

73. *Colston M.J.* Antimycobacterial calixarenes enhance innate defense mechanisms in murine macrophages and induce control of *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice / Colston M.J., Hailes H.C., Stavropoulos E., Herve A.C., Herve G., Goodworth K.J., Hill A.M., Jenner P., Hart P.D., Tascon R.E. // *Infect. Immun.* – 2004. – Vol. 72, N 11. – P. 6318-6323.

74. *Viola S.* Inhibition of rat glioma cell migration and proliferation by a calix[8]arene scaffold exposing multiple GlcNAc and ureido functionalities / Viola S., Consoli G.M., Merlo S., Drago F., Sortino M.A., Geraci S., Geraci C. // *J. Neurochem.* – 2008. – Vol. 107, N 4. – P. 1047-1055.

75. *André S.* Calix[n]arene-based glycoclusters: bioactivity of thiourea-linked galactose/lactose moieties as inhibitors of binding of medically relevant lectins to a glycoprotein and cell-surface glycoconjugates and selectivity among human adhesion/growth-regulatory galectins / André S., Sansone F., Kaltner H., Casnati A., Kopitz J., Gabius H.J., Ungaro R. // *ChemBiochem.* – 2008. – Vol. 9, N 10. – P. 1649-1661.

76. *Sun J.* Blocking angiogenesis and tumorigenesis with GFA-116, a synthetic molecule that inhibits binding of vascular endothelial growth factor to its receptor / Sun J., Blaskovich M.A., Jain R.K., Delarue F., Paris D., Brem S., Wotoczek-Obadia M., Lin Q., Coppola D., Choi K., Mullan M.,

Hamilton A.D., Sebti S.M. // *Cancer Res.* – 2004. – Vol. 64, N 10. – P. 586-592.

77. *Krenek K.* N-Acetyl-d-glucosamine substituted calix[4]arenes as stimulators of NK cell-mediated antitumor immune response / Krenek K., Kuldová M., Hulíková K., Stibor I., Lhoták P., Dudic M., Budka J., Pelantová H., Bezouska K., Fiserová A., Kren V. // *Carbohydr. Res.* – 2007. – Vol. 342, N 12-13. – P. 1781-1792.

78. *Geraci C.* Calix[4]arene decorated with four Tn antigen glycomimetic units and P3CS immunoadjuvant: synthesis, characterization, and anticancer immunological evaluation / Geraci C., Consoli G.M., Galante E., Bousquet E., Pappalardo M., Spadaro A. // *Bioconjug. Chem.* – 2008. – Vol. 19, N 3. – P. 751-758.

79. *Gutsche C.D.* Calixarenes. In *Host Guest Complex Chemistry Macrocycles; Synthesis, Structures, Applications* / Gutsche C.D. [Eds be Weber E., Vögtle F.]. –Springer: Tokyo. – 1985. – 421 p.

80. *Consoli G.M.L.* Hydroxycinnamic acid clustered by a calixareneplatform: radical scavenging and antioxidant activity / Consoli G.M.L., Galante E., Daquino C., Granata G., Cunsolo F., Geraci C. // *Tetrahedron Lett.* – 2006. – Vol. 47, N 37. – P. 6611-6614.

81. *Xue Y.* Amphoteric calix[8]arene-based complex for pH-triggered drug delivery / Xue Y., Guan Y., Zheng A, Xiao H. // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* – 2013. – Vol. 101. – P. 55– 60.

82. *Perret F.* First step in the study of the cellular toxicity of the calixarene / F. Perret, M. Mazzorana, P. Shahgaldian [et al.] // *ISSC XI, Fukuoka* – 2000. – PB-26 – P. 387.

83. *Coleman A.W.* Toxicity and biodistribution of para-sulfonato-calix[4]arene in mice / Coleman A.W., Jebors S., Cecillon S., Perret P., Garin D., Marti-Battle D., Moulin M. // *New J. Chem.* – 2008. – Vol. 32. – P. 780-782.

84. *Shahgaldian P.* A first approach to the study of calixarene solid lipid nanoparticle (SLN) toxicity / P. Shahgaldian, E. Da Silva, A.W. Coleman // J. Incl. Phenom. – 2003. – Vol. 46 – P. 175 – 177.

85. *Memisoglu E.* Direct formation of nanospheres from amphiphilic-cyclodextrin inclusion complexes / E. Memisoglu, A. Bochot, M. Oezalp [et al.] // Pharm. Res. – 2003. – Vol. 20 – P. 117-125.

86. *Da Silva E.* Biopharmaceutical applications of calixarenes / Da Silva E., Lazar A.N., Coleman A.W. // Journal of Drug Delivery Science and Technology. – 2004. – Vol. 14, N 1. – P. 3 – 20.

87. *Paclet M-H.* An Absence of Non-specific Immune Response towards para-Sulphonato-calix[n]arenes / Paclet M-H., Rousseau C.F., Yannick C., Morel F., Coleman A.W. // Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry. – 2006. – Vol. 55, N 3-4. – P. 353-357.

88. *Grote Gansey M.H.* Conjugation, immunoreactivity, and immunogenicity of calix[4]arenes; model study to potential calix[4]arene-based Ac^{3+} chelators / Grote Gansey M.H., de Haan A.S., Bos E.S., Verboom W., Reinhoudt D.N. // Bioconjug. Chem. – 1999. – Vol. 10, N 4. – P. 613-623.

89. *Dings R.P.M.* Design of nonpeptidic topomimetics of antiangiogenic proteins with antitumor activities / R.P.M. Dings, X. Chen, D.M.E.I. Hellebrekers [et al.] // J. Natl. Cancer Inst. – 2006. – Vol. 98 – P. 932 – 936.

90. *Lalor R.* Efficient gene transfection with functionalized multicalixarenes / R. Lalor, J.L. DiGesso, A. Mueller [et al.] // Chem. Commun. – 2007. – P. 4907 – 4909.

91. *Bagnacani V.* Macrocyclic nonviral vectors: High cell transfection efficiency and low toxicity in a lower rim guanidinium calix[4]arene / V. Bagnacani, F. Sansone, G. Donofrio [et al.] // Org. Lett. – 2008. – Vol. 10. – P. 3953 – 3956.

92. *Da Silva E.* Haemolytic properties of some water-soluble para-sulphonato-calix-[n]-arenes / Da Silva E., Shahgaldian P., Coleman A.W. // Int. J. Pharm. – 2004. – Vol. 273, N 1-2. – P. 57-62.

93. *Кальченко В.І* Супрамолекулярні наномашини та стартові матеріали / Кальченко В.І, Родік Р.В. / Вісн. НАН України. – 2017. – № 1. – С.82 – 88.

94. *May E.M.* Unprecedented increase in affinity for EuIII over AmIII through silica grafting of a carbamoylmethylphosphine oxide-calix[4]arene site / May E.M., Solovyov A., Guo Y., Drapailo A., Matveev Y., Kalchenko V., Nitsche H., Katz A. // Eur. J. Inorg. Chem. – 2016. – Vol. 28. – P. 4542-4545.

95. *Rodik R.V.* Calixarenes in biotechnology and bio-medical researches / Rodik R.V., Boyko V.I., Kalchenko V.I. // Front. Med. Chem. – 2016. – Vol. 8. – P. 206-301.

96. *Rodik R.V.* Cationic amphiphilic calixarenes to compact DNA into small nanoparticles for gene delivery / Rodik R.V., Anthony A.-S., Kalchenko V.I., Mély Y., Klymchenko A.S. // New J. Chem. – 2015. – Vol. 39. – P. 1654-1664.

97. *Shulov I.* Protein-sized bright fluorogenic nanoparticles based on cross-linked calixarene micelles with cyanine corona / Shulov I., Rodik R.V., Arntz Y., Reisch A., Kalchenko V.I., Klymchenko A.S. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. – 2016. – Vol. 55. – P. 15884-15888.

98. *Khadra K.* Synthesis of novel p-tert-butylcalix[4]arene Schiff bases and their complexes with C₆₀, potential HIV-Protease inhibitors / K. Khadra, S. Mizyed, D. Marji et al. // Spectrochimica Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc. – 2015. – Vol. 136. – P. 1869-1874.

99. *Lamartine R.* Antimicrobial activity of calix[n]arene / R. Lamartine, M. Tsukada, D. Wilson, A. Shirata // C. R. Chimie. – 2002. – Vol. 5, N 3. – P. 163-169.

100. *Mourer M.* Synthesis and anti-HIV evaluation of water-soluble calixarene-based bithiazolyl podands / M. Mourer, N. Psychogios, G. Laumond et al. // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2010. – Vol. 18, N 1. – P. 36-45.

101. *Tsou L.K.* Discovery of a synthetic dual inhibitor of HIV and HCV infection based on a tetrabutoxy-calix[4]arene scaffold / L.K. Tsou, G.E. Dutschman, E.A. Gullen et al. // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2010. – Vol. 20, N 7. – P. 2137-2139.

102. *Arosio D.* A synthetic divalent cholera toxin glyocalix[4]arene ligand having higher affinity than natural GM1 oligosaccharide / Arosio D., Fontanella M., Baldini L., Mauri L., Bernardi A., Casnati A., Sansone F., Ungaro R. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2005. – Vol. 127, N 11. – P. 3660-3661.

103. *Coleman A.W.* Enhanced detection of the pathogenic prion protein by its supramolecular association with para-sulfonato-calix[n]arene derivatives / Coleman A.W., Perret F., Cecillon S., Moussa A., Martin A., Dupin M., Perron H. // *New J. Chem.* – 2007. – Vol. 31. – P. 711-717.

104. *Coleman A.W.* Calix[n]arenes as Protein Sensors / Coleman A.W., Perret F., Moussa A., Dupin M., Guo Y., Perron H. // *Top. Curr. Chem.* – 2007. – Vol. 277. – P. 31-88.

105. *Carden D.E.* An improved Na⁺-selective microelectrode for intracellular measurements in plant cells / Carden D.E., Diamond D., Miller A.J. // *J. Exp. Bot.* – 2001 – Vol. 52, N 359. – P. 1353-1359.

106. *Telting-Diaz M.* Comparison of a calixarene-based ion-selective electrode with two automated analyzers for the clinical determination of sodium in blood plasma / Telting-Diaz M., Regan F., Diamond D., Smyth M.R. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 1990. – Vol. 8, N 8-12. – P. 695-700.

107. *Saijo R.* The effects of O-substituents of hexahomotrioxacalix[3]arene on potentiometric discrimination between dopamine and biological organic/inorganic cations / Saijo R., Murakami H.,

Tsunekawa S., Imanishi S., Shirai N., Ikeda S., Odashima K. // Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). – 2007. – Vol. 55, N 3. – P. 417-421.

108. Saijo R. Dopamine-selective potentiometric responses by new ditopic sensory elements based on a hexahomotrioxacalix[3]arene / Saijo R., Tsunekawa S., Murakami H., Shirai N., Ikeda S., Odashima K. // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2007. – Vol. 17, N 3. – P. 767-771.

109. Yang W. Effect of para-sulfonato-calix[n]arenes on the solubility, chemical stability, and bioavailability of a water insoluble drug nifedipine / Yang W., Otto D.P., Liebenberg W., de Villiers M.M. // Curr. Drug. Discov. Technol. – 2008. – Vol. 5, N 2. – P. 129-139.

110. Danylyuk O. Solid-state complexes of water-soluble calixarenes with biorelevant molecules: Dissertation within International Ph.D Studies. – Warsaw, 2007. – 160p.

111. Satheeshkumar K.S. Calix[8]arene-mediated self-assembly of tetrapeptide H-Leu-Leu-Ile-Leu-OMe / Satheeshkumar K.S., Vasu G., Vishalakshi V., Moni M.S., Jayakumar R. // J. Mol. Recognit. – 2004. – Vol. 17, N 1. – P. 67-75.

112. Nakai T. Remarkably size-regulated cell invasion by artificial viruses. Saccharide-dependent self-aggregation of glycoviruses and its consequences in glycoviral gene delivery / Nakai T., Kanamori T., Sando S., Aoyama Y. // J. Am. Chem. Soc. – 2003 – Vol. 125, N 28. – P. 8465-8475.

113. Geller C. Antiseptic properties of two calix[4]arenes derivatives on the human coronavirus 229E / C. Geller, S. Fontanay, M. Mourer, et al. // Antiviral Res. – 2010. – Vol. 88, N 3. – P. 343-346.

114. Motornaya A.E. Synthesis and antiherpetic activity of N-(3-amino-1-adamantyl)calix[4]arene / A.E. Motornaya, L.M. Alimbarova, E.A. Shokova, V.V. Kovalev // Pharm. Chem. J. – 2006. – Vol. 40, N 2. – P. 68-72.

115. *Paquet V.* Biologically active amphoterecin B-calix[4]arene conjugates / V. Paquet, A. Zumbuehl, E.M. Carreira // *Bioconjugate Chem.* – 2006. – Vol. 17, N 6. – P. 1460-1463.

116. *Soares M.N.* Evaluation of the biological effects of 5-Cl-8-oxyquinolinepropoxycalix[4]arene and 8-oxyquinolinepropoxycalix[4]arene *in vitro* and *in vivo* / M.N. Soares, T.M. Gáscon, F.L.A. Fonseca et al. // *Materials Science and Engineering: C.* – 2014. – Vol. 40, N 1. – P. 260-266.

117. *Talanova G. G.* Calixarenes with a novel proton ionizable group: synthesis and metal ion separation/ G.G. Talanova, H.S. Hwang., V.S. Talanov [et al.] // *Chem. Commun.* – 1998. – Vol. 9. – P. 419–420.

118. *Budka J.* Urea derivatives of calix[4]arene *1,3-alternate*: An anion receptor with profound negative allosteric effect / Budka J., Lhotak P., Michlova V., Stibor I. // *Tetrahedron Lett.* – 2001. – Vol. 42. – P. 1583-1586.

119. *Rodik R.* Calix[4]arenesulfonylamidines. Synthesis, structure and influence on Mg^{2+} , ATP-dependent calcium pumps / Rodik R., Boiko V., Danylyuk O., Suwinska K., Tsymbal I., Slinchenko N., Babich L., Shlykov S., Kosterin S., Lipkowski J., Kalchenko V. // *Tetrahedron Lett.* – 2005. – Vol. 46, N 43. – P. 7459-7462.

До частини другої

1. *Burdyga T., Richard J.P.* Chapter 86 – Calcium Homeostasis and Signaling in Smooth Muscle Muscle, Joseph Hill, Boston/ Waltham. – 2012. – P. 1155–1171.

2. *Pande J.* Plasma membrane calcium pumps in smooth muscle: from fictional molecules to novel inhibitors / Pande J., Grover A.K. // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2005. – Vol. 83. – P. 743–754.

3. *Chalmers S.* Ion channels in smooth muscle: Regulation by the sarcoplasmic reticulum and mitochondria / . Chalmers S., Olson M.L., Mac Millan D., Rainbow R.D., McCarron J.G. // Cell Calcium. – 2007. – Vol. 42, N 4–5. – P. 447–466.

4. *Strehler E.E.* Plasma membrane Ca^{2+} -pumps: structural diversity as basis for functional versatility / Strehler E.E., Adelaida G.F., Penniston J.T., Caride A.J. // Biochem. Soc. Trans. – 2007. – Vol. 35, Pt 5. – P. 919–922.

5. *Бабіч Л.Г.* Ca ion transport in smooth muscle mitochondria / Бабіч Л.Г., Шликов С.Г., Костерін С.О. // Укр. біохім. журн. – 2014. – Т. 86, № 6. – С. 18-30.

6. *Danylovych Iu.V.* Electrochemical potential of the inner mitochondrial membrane and Ca^{2+} homeostasis of myometrium cells / Danylovych Iu.V., Karakhim S.O., Danylovich H.V., Kolomiiets` O.V., Kosterin S.O. // Ukr. Biochem. J. – 2014. – Vol. 87, N 5. – С. 61-71.

7. *De Juan-Sanz J.* Presynaptic control of glycine transporter 2 (GlyT2) by physical and functional association with plasma membrane Ca^{2+} -ATPase (PMCA) and Na^{+} - Ca^{2+} exchanger (NCX) / De Juan-Sanz J., Nunez E., Zafra F., Berrocal M., Corbacho I., Ibanez I., Arribas-Gonzalez E., Marcos D., Lopez-Corcuera B., Mata A.M., Aragon C. // J. Biol Chem. – 2014. – Vol. 289, N 49. – P. 34308-34324.

8. *Strehler E.E.* Plasma membrane Ca^{2+} ATPases as dynamic regulators of cellular calcium handling / Strehler E.E., Caride A.J., Filoteo A.G., Xiong Y., Penniston J.T., Enyedi A. // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2007. – Vol. 1099. - P. 226–236.

9. *Strehler E.E.* Plasma membrane calcium ATPase proteins as novel regulators of signal transduction pathways / Strehler E.E. // World J. Biol. Chem. – 2010. – Vol. 1, N 6. – P. 201 – 208.

10. *Костерин С.А.* Транспорт кальция в гладких мышцах.- К.: Наук. думка, 1990. – 216с.

11. *Костерін С.О.* Біохімічні властивості та регуляція Ca^{2+} -транспортувальних систем мембранних структур гладеньком'язових клітин / Костерін С.О., Бабіч Л.Г., Шликов С.Г., Данилович Ю.В., Векліч Т.О., Мазур Ю.Ю. // Монографія. – Київ: – Наукова Думка, 2016. – 210 с.
12. *Geering K.* FXYP proteins: new regulators of Na-K-ATPase / Geering K. // Am. J. Physiol. Renal Physiol. – 2006. – Vol. 290. – P. 241-250.
13. *Biser P.S.* Na^+, K^+ -ATPase alpha-subunit isoform distribution and abundance in guinea-pig longitudinal muscle/myenteric plexus after exposure to morphine / Biser P.S., Thayne K.A., Fleming W.W., Taylor D.A. // Brain Res. – 2002. – Vol. 931, N 2. – P.186-193.
14. *Santos L.* Cyclooxygenase pathway is involved in the vascular reactivity and inhibition of the Na^+, K^+ -ATPase activity in the tail artery from L-NAME-treated rats / Santos L., Xavier F.E., Vassallo D.V., Rossoni L.V. // Life Science. – 2003. – Vol. 74, N 5. – P. 613-627.
15. *Jain D.b* Effect of sensitization on membrane ion fluxes & intracellular calcium in guineapigs / Jain D., Cnhabra S.K., Paj H.G. // Indian. J. Med. Res. – 2004. – Vol. 120. – P. 534-541.
16. *Isenovic E.R.* Angiotensin II regulation of the Na^+ pump involves the phosphatidylinositol-3 kinase and p42/44 mitogen-activated protein kinase signaling pathways in vascular smooth muscle cells / Isenovic E.R., Jacobs D.B., Kedees M.N. Sha Q., Milivojevic N., Kawakami K., Gick G., Sowers J.R. // Endocrinology. – 2004. – Vol. 145, N 3. – P. 1151-1160.
17. *Selvendiran K.* Chemopreventive effect of piperine on modulating lipid peroxidation and membrane bound enzymes in benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis / Selvendiran K., Sakthisekaran D. // Biomed. Pharmacother. – 2004. – Vol. 58, N 4. – P. 264-267.
18. *Djemli-Shipkolye A.* Differential effect of omega3 PUFA supplementations on Na,K-ATPase and Mg-ATPase activities: possible role

of the membrane omega6/omega3 ratio / Djemli-Shipkolye A., Raccach D., Pieroni G., Vague P., Coste T.C., Gerbi A. // J. Membr. Biol. – 2003. – Vol. 191, N 1 – P. 37-47.

19. *Marchesini N.* A plasma membrane P-type H⁺-ATPase regulates intracellular pH in *Leishmania mexicana amazonensis* / Marchesini N., Docampo R. // Mol. Biochem. Parasitol. – 2002. – Vol. 119, N 2. – P. 225-36.

20. *Костерін С.О.* Кінетичне тлумачення своєрідної рН-залежності ферментативної активності „базальної” Mg²⁺-АТПази сарколеми гладенького м'язу / С.О. Костерін, Т.О. Векліч, Ю.І. Прилуцький, П.О. Бориско // Український біохімічний журнал. – 2005. – Т. 77, № 6. – С. 37-45.

21. Woodcock N.A., Taylor C.W., Thornton S. Effect of an oxytocin receptor antagonist and rho kinase inhibitor on the [Ca²⁺]_i sensitivity of human myometrium / Woodcock N.A., Taylor C.W., Thornton S. // Am. J. Obstet. Gynecol. – 2004. – Vol. 190, N 1. – P. 222-228.

22. *Arakawa T.K.* Long-term hypoxia alters calcium regulation in near-term ovine myometrium / Arakawa T.K., Mlynarczyk M., Kaushal K.M., Zhang L., Ducusy C.A. // Biol. Reprod. – 2004. – Vol. 71, N 1. – P. 156-162.

23. Buxton I.L. Regulation of uterine function: a biochemical conundrum in the regulation of smooth muscle relaxation / Buxton I.L. // Mol. Pharmacol. – 2004. – Vol. 65, N 5. – P. 1051-1059.

24. *Al-Nijji J.* Nitric oxide synthase activity in human trophoblast, term placenta and pregnant myometrium / Al-Nijji J., Andolf E., Laurini R., Batra S. // Reprod. Biol. Endocrinol. – 2003. – Vol. 1, N 1. – P. 51-58.

26. *Hertelendy F.* Regulation of myometrial smooth muscle functions / Hertelendy F., Zakar T. // Curr. Pharm. Des. – 2004. – Vol. 10, N 20. – P. 2499-2517.

27. *Brown H.K.* Biological determinants of spontaneous late preterm and early term birth: a retrospective cohort study / Brown H. K., Speechley K. N., Macnab J. [et al] // BJOG. – 2015. – Vol. 122, N 4. – P. 491-499.

28. *Doyle J.* Preterm labor: role of the nurse practitioner / Doyle J., Silber A. // Nurse Pract. – 2015. – Vol. 40, N 3. – P. 49-54.

29. *Абрамян Р.А.* Анализ структуры преждевременных родов и связанных с ними перинатальных потерь (2006-2010 гг.) / Абрамян Р. А., Григорян В. Ф. // Неонатология, хірургія та перинатальна медицина. – 2011. – Т. 1, № 1. – С. 26-29.

30. *Luo Z.* Synthesis and anti-integrase evaluation of novel calix[4]arene derivatives containing the triazolyl 1,3-diketo moiety / Luo Z., Zhao Y., Maa C., Xu X., Zhang X., Huang N., He H. // Chinese Chemical Letters. – 2014. – Vol. 25, N 5. - P. 737–740.

31. *Rodik R.V.* Calixarenes in bio-medical researches / R.V. Rodik, V.I. Boyko, V.I. Kalchenko // Curr. Med. Chem. – 2009. – Vol.16, N 13. – P.1630 – 1655.

32. *Родік Р.В.* Антимікробна та противірусна ативність каліксаренів / Родік Р.В. // Журнал органічної та фармацевтичної хімії. – 2015. – Т. 13, вип 1. – С. 67-78.

33. *Кальченко В.І.* Каліксарени. Перспективи медико-біологічного застосування / Кальченко В.І., Родік Р.В., Бойко В.І. // Журнал органічної та фармацевтичної хімії. – 2006. – Т. 3, № 4. – С.13 – 29.

34. *Komisarenko S.V.* Calixarene methylene bisphosphonic acids as promising effectors of biochemical processes / Komisarenko S.V., Kosterin S.O., Lugovskoy E.V., Kalchenko V.I. // УБЖ. – 2013. – Т. 85, № 6. – С. 106-128.

35. *Кальченко В.І.* Супрамолекулярні наномашини та старт-матеріали / Кальченко В.І., Родік Р.В. // Вісник НАНУ. – 2017. – № 1. – С. 82-88.

36. *Vovk A.I.* Calix[4]arene methylenebisphosphonic acids as calf

intestine alkaline phosphatase inhibitors / Vovk A.I., Kalchenko V.I., Cherenok S.A., Kukhar V.P., Muzychka O.V., Lozynsky M.O. // *Org. Biomol. Chem.* – 2004. – Vol. 2. – P. 3162-3166.

37. *Lalor R.* Cellular uptake of a fluorescent calix[4]arene derivative / R. Lalor, Baillie- H. Johnson , C. Redshaw [et al.] // *J Am Chem Soc.* – 2008 – Vol. 130, N 10 – P. 2892 – 2893.

38. *Consoli G.M.L.* Hydroxycinnamic acid clustered by a calixareneplatform: radical scavenging and antioxidant activity / Consoli G.M.L., Galante E., Daquino C., Granata G., Cunsolo F., Geraci C. // *Tetrahedron Lett.* – 2006. – Vol. 47, N 37. – P. 6611-6614.

39. *Xue Y.* Amphoteric calix[8]arene-based complex for pH-triggered drug delivery / Xue Y., Guan Y., Zheng A, Xiao H. // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* – 2013. – Vol. 101. – P. 55–60.

40. *Coleman A.W.* Toxicity and biodistribution of para-sulfonato-calix[4]arene in mice / Coleman A.W., Jebors S., Cecillon S., Perret P., Garin D., Marti-Battle D., Moulin M. // *New J. Chem.* – 2008. – Vol. 32. – P. 780-782.

41. *Da Silva E.* Biopharmaceutical applications of calixarenes / Da Silva E., Lazar A.N., Coleman A.W. // *Journal of Drug Delivery Science and Technology.* – 2004. – Vol. 14, N 1. – P. 3–20.

42. *Paclet M-H.* An Absence of Non-specific Immune Response towards para-Sulphonato-calix[n]arenes / Paclet M-H., Rousseau C.F., Yannick C., Morel F., Coleman A.W. // *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry.* – 2006. – Vol. 55, N 3-4. – P. 353-357.

43. *Grote Gansey M.H.* Conjugation, immunoreactivity, and immunogenicity of calix[4]arenes; model study to potential calix[4]arene-based Ac^{3+} chelators / Grote Gansey M.H., de Haan A.S., Bos E.S., Verboom W., Reinhoudt D.N. // *Bioconjug. Chem.* – 1999. – Vol. 10, N 4. – P. 613-623.

До розділу 3

1. *Strehler E.E.* Plasma membrane Ca^{2+} ATPases as dynamic regulators of cellular calcium handling / Strehler E.E., Caride A.J., Filoteo A.G., Xiong Y., Penniston J.T., Enyedi A. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2007. – Vol. 1099. – P. 226–236.

2. *Lehotsky J.* The role of plasma membrane Ca^{2+} pumps (PMCA) in pathologies of mammalian cells/ Lehotsky J., Kaplan P., Murin R., Raeymaekers L. // *Front. Biosci.* – 2002. – Vol. 7, N 1-2. – P. d53–d84.

3. *Oceandy D.* The emergence of plasma membrane calcium pump as a novel therapeutic target for heart disease / Oceandy D., Buch M.H., Cartwright E.J., Neyses L. // *Mini. Rev. Med. Chem.* – 2006. – Vol. 6, N 5. – P. 583–588.

4. *Burdyga T., Richard J. P.* Chapter 86 – Calcium Homeostasis and Signaling in Smooth Muscle. Joseph Hill. Boston/ Waltham. – 2012. – P. 1155- 1171.

5. *Pande J.* Plasma membrane calcium pumps in smooth muscle: from fictional molecules to novel inhibitors / Pande J., Grover A.K. // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2005. – Vol. 83, N 8-9. – P. 743-754.

6. *Chalmers S.* Ion channels in smooth muscle: Regulation by the sarcoplasmic reticulum and mitochondria / S. Chalmers, M.L. Olson, D. MacMillan, R.D. Rainbow, J.G. McCarron // *Cell Calcium.* – 2007. – Vol. 42, N 4-5. – P. 447-466.

7. *Floyd R.* Calcium transporters and signalling in smooth muscles / Floyd R., Wray S. // *Cell Calcium.* – 2007. – Vol. 42, N 4–5. – P. 467-476.

8. *Carafoli E.* Mitochondrial Calcium Transport: Historical Aspects / *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)*, Editors-in-Chief: William J. Lennarz and M. Daniel Lane, Waltham. – 2013. – P. 118-126.

9. *Marchi S.* The endoplasmic reticulum–mitochondria connection: One touch, multiple functions/ Marchi S., Patergnani S., Pinton P. // *BBA* –

Bioenergetics Volume. – 2014. – Vol. 1837, N 4. – P. 461–469.

10. *Adamo H.P.* Overexpression of the erythrocyte plasma membrane Ca^{2+} pump in COS-1 cells / H.P. Adamo, A.K. Verma, M.A. Sanders, R. Heim, J.L. Salisbury, E.D. Wieben, J.T. Penniston // *Biochem. J.* – 1992. – Vol. 285, N 3. - P. 791–797.

11. *Brini M.* Calcium pump in health and disease / Brini M., Carafoli E. // *Physiol. Rev.* – 2009. – Vol. 89, N 4. – P. 1341-1378.

12. *Liu B.F.* Consequences of functional expression of the plasma membrane Ca^{2+} pump isoform 1a/ Liu B.F., Xu X., Fridman R., Muallem S., Kuo T.H. // *J. Biol. Chem.* 1996. – Vol. 271, N 10. – P. 5536–5544.

13. *Clark J.F.* Vascular smooth muscle function: The physiology and pathology of vasoconstriction / Clark J.F, Pyne-Geithman G. // *Pathophysiology.* – 2005. – Vol. 12, N 1. – P. 35-45.

14. *Pozo M.J.* Melatonin, a potential therapeutic agent for smooth muscle-related pathological conditions and aging / Pozo M.J., Gomez-Pinilla P.J., Camello-Almaraz C., Martin-Cano F.E., Pascua P., Rol M.A., Acuña-Castroviejo D., Camello P.J. // *Curr Med Chem.* – 2010. – Vol. 17, N 34. – P. 4150-4165.

15. *Otaibi M.A.* The physiological mechanism of uterine contraction with emphasis on calcium ion / Otaibi M.A. // *Calcium Signaling.* – 2014. – Vol. 1, N 2. – P. 70-75.

16. *Luo Z.* Synthesis and anti-integrase evaluation of novel calix[4]arene derivatives containing the triazolyl 1,3-diketo moiety / Luo Z., Zhao Y., Maa C., Xu X., Zhang X., Huang N., He H. // *Chinese Chemical Letters.* – 2014. – Vol. 25, N 5. – P. 737–740.

17. *Baldini L.* Calixarene-based multivalent ligands / Baldini L., Casnati A., Sansone F., Ungaro R. // *Chem. Soc. Rev.* – 2007. – Vol. 36, N 2. – P. 254–266.

18. *Xue Y.* Amphoteric calix[8]arene-based complex for pH-triggered drug delivery / Xue Y., Guan Y., Zheng A, Xiao H. // *Colloids and Surfaces*

B: Biointerfaces. – 2013. – Vol. 101. – P. 55– 60.

19. *Кальченко В.І.* Каліксарени. Перспективи медико-біологічного застосування / Кальченко В.І., Родік Р.В., Бойко В.І. // Журнал органічної та фармацевтичної хімії. – 2006. – Т. 3, № 4. – С.13–29.

20. *Rodik R.V.* Calixarenes in bio-medical researches / R.V. Rodik, V.I. Boyko, V.I. Kalchenko // Curr. Med. Chem. – 2009. – Т.16, №13. – P.1630–1655.

21. *Consoli G.M.L.* Hydroxycinnamic acid clustered by a calixareneplatform: radical scavenging and antioxidant activity / Consoli G.M.L., Galante E., Daquino C., Granata G., Cunsolo F., Geraci C. // Tetrahedron Lett. – 2006. – Vol. 47, N 37. – P. 6611-6614.

22. *Rodik R.* Calix[4]arenesulfonylamidines. Synthesis, structure and influence on Mg^{2+} ,ATP-dependent calcium pumps / Rodik R., Boiko V., Danylyuk O., Suwinska K., Tsymbal I., Slinchenko N., Babich L., Shlykov S., Kosterin S., Lipkowski J., Kalchenko V. // Tetrahedron Lett. – 2005. – Vol. 46, N 43. – P. 7459-7462.

23. *Слинченко Н.Н.* Выделение и очистка Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза плазматических мембран миомерия / Слинченко Н.Н., Любаковская Л.А., Курский М.Д., Сопель Л.В. // Укр. биохим. журн. – 1990. – Т. 62, № 3. – С. 60–65.

24. *Курский М.Д.* Реконструкция очищенной Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза сарколемы миомерия в липосомы и ее каталитические свойства / Курский М.Д., Слинченко Н.Н., Любаковская Л.А. // Укр. биохим. журн. – 1990. – Т. 62, № 3. – С. 66–71.

25. *Кондратюк Т.П.* Выделение и характеристика фракции плазматических мембран миомерия свинки / Кондратюк Т.П., Быченко С.Ф., Прищепа Л.А., Бабич Л.Г., Курский М.Д., Осипенко А.А. // Украинский биохимический журнал. – 1986. – Т. 58, № 4. – С. 50-56.

26. *Bradford M.M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye

binding / Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72, N 1. – P. 248-282.

27. *Flynn E.R.M.* Functionally separate intracellular Ca^{2+} stores in smooth muscle / Flynn E.R.M., Bradley K.N., Muir T.C., McCarron J.G. // *The Journal of Biological Chemistry.* – 2001. – Vol. 276, N 39. – P. 36411-36418.

28. *Valente R.C.* Mechanisms of ouabain toxicity / Valente R.C., Capella L.S., Monteiro R.Q. Rumjanek V.M., Lopes A.G., Capella M.A. // *FASEB J.* – 2003. – Vol. 17, N 12. – P. 1700-1702.

29. *Wang H.* Ouabain assembles signaling cascades through the caveolar Na^+/K^+ -ATPase / Wang H., Haas M., Liang M., Cai T., Tian J., Li S., Xie Z. // *The Journal of Biological Chemistry.* – 2004. – Vol. 279, N 17. – P. 17250-17259.

30. *Векліч Т.О.* Катіонна специфічність системи акумуляції Ca^{2+} в мітохондріях клітин гладенького м'яза / Т.О. Векліч, С.О. Костерін, О.П. Шинлова // *Український біохімічний журнал.* – 2002. – Т. 74, № 1. – С. 42-48.

31. *Rathbun W.* Estimation of enzymically produced orthophosphate in the presence of cystein and adenosine triphosphate / Rathbun W., Betlach V. // *Anal. Biochem.* – 1969. – Vol. 28, N1-3. – P. 436-445.

32. *Tidow H.* A bimodular mechanism of calcium control in eukaryotes / Tidow H., Poulsen L.R., Andreeva A. et al. // *Nature.* – 2012. – Vol. 491. – P. 468-472.

33. *Veklich T.O.* Calix[4]arene C-90 selectively inhibits $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase of myometrium cell plasma membrane / Veklich T.O., Shkrabak A.A., Slinchenko N.N., Mazur I.I., Rodik R.V., Boyko V.I., Kalchenko V.I., Kosterin S.O. // *Biochemistry (M).* – 2014. – Vol. 79, N 5. – P. 417-424.

34. *Shatursky O.Ya.* Anion carrier formation by calix[4]arene - bis-hydroxymethylphosphonic acid in bilayer membranes / Shatursky O.Ya., Kasatkina L.A., Rodik R.V., Cherenok S.O., Shkrabak A.A., Veklich T.O.,

Borisova T.A., Kosterin S.O., Kalchenko V.I. // Organic Biomolecular Chemistry. – 2014. – Vol. 12. – P. 9811-9821.

35. *Данилович Ю.В.* Тестування змін розмірів міоцитів матки за діх модуляторів її скоротливої активності методом фотонної кореляційної спектроскопії / Данилович Ю.В., Чуніхін О.Ю., Данилович Г.В. // УБЖ. – 2013. – Т. 59, № 1. – С. 32-39.

36. *Болдырев А.А.* Na⁺,K⁺-АТРаза как олигомерный ансамбль / Болдырев А.А. // Биохимия. – 2001. – Т. 66, вып. 6. – С.1013-1025.

37. *Векліч Т.О.* Катіонна специфічність системи акумуляції Ca²⁺ в мітохондріях клітин гладенького м'яза / Векліч Т.О., Костерін С.О., Шинлова О.П. // Укр. біохім. журн. – 2002. – Т. 74, № 1. – С. 42-48.

38. *Gee K.R.* Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca²⁺-indicator dyes / Gee K.R., Brown K.A., Chen W.N., Bishop-Stewart J., Gray D., Johnson I. // Cell Calcium. – 2000. – Vol. 27, N 2. – P. 97–106.

39. *Костерин С.А.* Транспорт кальция в гладких мышцах.- К.: Наук. думка, 1990. – 216с.

40. *Krebs.* Calcium: A Matter of Life or Death. - Elsevier. The plasma membrane calcium pump // Ortega C., Ortolano S., Carafoli E. – 2009. – P. 179–197.

41. *Слинченко Н.Н.* Влияние эозина Y на каталитическую и функциональную активность Mg²⁺-АТФ-зависимого кальциевого насоса плазматической мембраны гладкомышечных клеток / Слинченко Н.Н., Браткова Н.Ф., Костерин С.А., Зими́на В.П., Черныш И.Г. // Биохимия. – 1998. – 63, вып. 6. – С. 812–819.

42. *Gatto C.* Inhibition of the red blood cell calcium pump by eosin and other fluorescein analogues / Gatto C., Milanick M.A. // Amer. J. Physiol. – 1993. – Vol. 264, N 6. – P. 1577–1586.

43. *Gatto C.* Eosin, a potent inhibitor of the plasma membrane Ca pump, does not inhibit the cardiac Na-Ca exchanger / Gatto C., Hale C.C., Xu W., Milanick M.A. // Biochemistry. – 1995. – Vol. 34, N 3. – P. 965–972.

44. *Droogmans G.* Sulphonic acid derivatives as probes of pore properties of volume-regulated anion channels in endothelial cells / Droogmans G., Maertens C., Prenen J., Nilius B. // Br. J. Pharmacol. – 1999. – Vol. 128, N 1. – P. 35-40.

45. *Droogmans G.* Voltage-dependent block of endothelial volume-regulated anion channels by calix[4]arenes / Droogmans G., Prenen J., Eggermont J., Voets T., Nilius B. // Am. J. Physiol. Cell Physiol. – 1998. – Vol. 275. – P. 646-652.

46. *Бабич Л.Г.* Вплив етанолу на активність енергозалежних Ca^{2+} -транспортуючих систем клітин міометрія / Бабич Л.Г., Шликов С.Г., Борисова Л.А., Слінченко Н.М., Браткова Н.Ф., Костерін С.О. // УБЖ. – Т. 72, № 1. – С. 32-41.

47. *Kosterins S.A.* Gibbs-Donnan equilibrium in the system membrane vesicles – incubation medium / Kosterins, S.A., and Cherny, A.P. // Biophysica. – 1991. – Vol. 36. – P. 826-829.

48. *Weaver C.M.* Potassium and Health / C.M. Weaver // Adv. Nutr. – 2013. – Vol. 4, N 3. – P. 368S-377S.

49. *Данилович Г.В.* Порівняльне дослідження методами спектрофлуориметрії та протокової цитометрії поляризації плазматичної і внутрішньої мітохондріальної мембран гладеньком'язових клітин із використанням потенціалчутливого зонда $\text{DiOC}_6(3)$ / Г.В. Данилович, Ю.В. Данилович, В.Ф. Горчев // УБЖ. – 2011. – Т. 83, № 3. – С. 99-105.

50. *Apell H.-J.* Oxonol VI as an optical indicator for membrane potentials in lipid vesicles / H.-J. Apell, B. Bersch // BBA Biomembranes. – 1987. – Vol. 903, N 3. – P. 480-494.

51. *Mazur I.* Gibbs-Donnan potential as a tool for membrane vesicles polarization / Mazur I., Kosterin S., Veklich T. // Journal of Biophysical Chemistry. – 2014. – Vol. 5, N 2. – P. 78-89.

52. *Oloizia B.* Ca^{2+} Clearance and contractility in vascular smooth muscle: Evidence from gene-altered murine models / Oloizia B., Paul R.J. // J. Mol. Cellul. Cardiol. – 2008. – Vol. 45, N 3. – P. 347–362.

53. *McFadzean I.* The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle / McFadzean I., Gibson A. // Br. J. Pharmacol. – 2002. – Vol. 135, N 1. – P. 1-13.

54. *Daub B.* An estimate of rapid cytoplasmic calcium buffering in a single smooth muscle cell / Daub B., Ganitkevich V. // Cell Calcium. – 2000. – Vol. 27, N 1 – P. 3-13.

55. *Kosterin S.A.* Control of Uterine Contractility / Kosterin S.A., Burdyga Th.V., Fomin V.P., Grover A.K. // Eds. R.E. Garfield, T.N. Tabb. – CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo. – 1994. – P. 129-153.

56. *Данилович Г.В.* Зміни поляризації плазматичної та внутрішньої мітохондріальної мембрани клітин міометрія за дії каліксаренів – інгібіторів Na^+, K^+ -АТПази плазматичної мембрани / Данилович Г.В., Данилович Ю.В., Коломієць О.В., Костерін С.О., Родік Р.В., Черенок С.О., Кальченко В.І., Чуніхін О.Ю., Горчев В.Ф., Карахім С.О. // Укр. біохім. журн. – 2012. – Т. 84, № 6. – С. 37-48.

57. *Crotty T.P.* Contraction in the smooth muscle cell / Crotty T.P. // Medical Hypotheses. – 1999. – Vol. 53, N 5. – P. 432–446.

58. *Stamenović D.* Cytoskeletal mechanics in airway smooth muscle cells / Stamenović D. // Respiratory Physiology & Neurobiology. – 2008. – Vol. 163. – N 1–3. – P. 25–32.

59. *Hocquet A.* An evaluation of the mm^+ force field / Hocquet A., Langgard M. // Molecular modeling annual. – 1998. – Vol. 4, N 3. – P. 94-11.

60. *Di Leva F.* The plasma membrane Ca^{2+} -ATPase of animal cells: Structure, function and regulation / Di Leva F., Domi T., Fedrizzi L., Lima

D., Carafoli E. // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2008. – Vol. 476. – P. 65–74.

61. *Brini M.* The plasma membrane Ca^{2+} ATPase and the plasma membrane sodium calcium exchanger cooperate in the regulation of cell calcium / Brini M., Carafoli E. // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. – 2011. – P. 1-15.

62. *Strehler E.E.* Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps / Strehler E.E., Zacharias D.A. // Physiol. Rev. – 2001. – Vol. 81, N 1. – P. 21-50.

63. *Woodcock N.A.* Effect of an oxytocin receptor antagonist and rho kinase inhibitor on the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sensitivity of human myometrium / Woodcock N.A., Taylor C.W., Thornton S. // Am. J. Obstet. Gynecol. – 2004. – Vol. 190, N 1. – P. 222-228.

64. *Arakawa T.K.* Long-term hypoxia alters calcium regulation in near-term ovine myometrium / Arakawa T.K., Mlynarczyk M., Kaushal K.M., Zhang L., Ducusy C.A. // Biol. Reprod. – 2004. – Vol. 71, N 1. – P. 156-162.

65. *Buxton I.L.* Regulation of uterine function: a biochemical conundrum in the regulation of smooth muscle relaxation / Buxton I.L. // Mol. Pharmacol. – 2004. – Vol. 65, N 5. – P. 1051-1059.

66. *Al-Nijji J.* Nitric oxide synthase activity in human trophoblast, term placenta and pregnant myometrium / Al-Nijji J., Andolf E., Laurini R., Batra S. // Reprod. Biol. Endocrinol. – 2003. – Vol. 1, N 1. – P. 51-58.

67. *Золотухін М.С.* Профілактика невиношування вагітності. МК-141 / М.С. Золотухін, Л.П. Дабіжа, О.М. Мациніп // Збірник наукових праць «Невиношування вагітності». – 2007. – С. 145-148.

68. *Hertelendy F.* Regulation of myometrial smooth muscle functions / Hertelendy F., Zakar T. // Curr. Pharm. Des. – 2004. – Vol. 10, N 20. – P. 2499-2517.

69. *Brown H.K.* Biological determinants of spontaneous late preterm and early term birth: a retrospective cohort study / Brown H. K., Speechley K. N., Macnab J. [et al] // BJOG. – 2015. – Vol. 122, N 4. – P. 491-499.

70. *Doyle J.* Preterm labor: role of the nurse practitioner / Doyle J., Silber A. // Nurse Pract. – 2015. – Vol. 40, N 3. – P. 49-54.

71. *Абрамян Р.А.* Анализ структуры преждевременных родов и связанных с ними перинатальных потерь (2006-2010 гг.) / Абрамян Р. А., Григорян В. Ф. // Неонатологія, хірургія та перинатальна медицина. – 2011. – Т. 1, № 1. – С. 26-29.

72. *Мохорт М.А.* Сучасний стан терапії передчасних пологів та пошук активних токолітиків серед похідних імідазолієвих солей / Мохорт М.А., Геращенко І.В. // Журнал національної академії медичних наук України. – 2012. – Т. 18, № 1. – С. 31-39.

73. *Геращенко І.В.* Токолітична активність похідних імідазо[1,2-а]азепінію / Геращенко І.В. // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2012. – Т. 31, № 6. – С. 37-41.

74. *Мохорт М.А.* Похідні імідазо [1,2-а]азепінію як модифікатори скоротливої активності міометрію / Мохорт М.А., Геращенко І.В., Шкрабак О.А., Мазур Ю.Ю., Векліч Т.О. // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2014. – Т. 37, № 1. – С. 65-72.

75 *Burdyga Th.V.* Kinetic analysis of smooth muscle relaxation / Burdyga Th.V., Kosterin S.A. // Gen. Physiol. Biophys. – 1991. – N 10. – P. 589-598.

76. *Пупишева О. В.* Поиск миотропных спазмолитиков мочевого пузыря среди производных 5 Н-циклопента [d]пиримидина/ О. В. Пупишева // European Applied Sciences. – 2013. - № 1. – С. 82 – 84.

До розділу 4

1. Wray S. Role of the calcium store in uterine contractility / Wray S., Shmygol A. // *Seminars in Cell & Developmental Biology*. – 2007. – Vol. 18. – P. 315-320.
2. Shmigel A.V. The role of the sarcoplasmic reticulum as a Ca^{2+} sink in rat uterine smooth muscle cells / Shmigel A.V., Eisner D.A., Wray S. // *J. Physiol.* – 1999. – Vol. 520, N 1. – P. 153-163.
3. Владимиров Ю.А. Кальциевые насосы живой клетки / Ю.А. Владимиров // *Соросовский образовательный журнал*. – 1998. – № 3. – С. 20-27.
4. Курский М.Д. Реконструкция очищенной Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы сарколемы миометрия в липосомы и ее каталитические свойства / Курский М.Д., Слинченко Н.Н., Любаковская Л.А. // *Укр. биохим. журн.* – 1990. – Т. 62, № 3. – С. 66–71.
5. Kotyk A. Transport adenosinetriphosphatases / Kotyk A. // *Cell. Molec. Biol. Letters*. – 1997. – Vol. 2, N 1. – P. 131-144.
6. Prasad V. Phenotypes of SERCA and PMCA knockout mice / Prasad V., Okunade G.W., Miller M.L., Shull G.E. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2004. – Vol. 322. – P. 1192–1203.
7. Foskett J.K. Inositol Trisphosphate Receptor Ca^{2+} Release Channels / Foskett J.K., White C., Cheung King-Ho, MAK Don-On D. // *Physiol. Rev.* – 2007. – Vol. 87. – P. 593-658.
8. Sankaranarayanan R. Biphasic decay of the Ca transient results from increased sarcoplasmic reticulum Ca leak / Sankaranarayanan R., Greensmith D.J., Eisner D.A., Venetucci L. // *J. Physiol.* – 2016. – Vol. 594, N 3. – P. 611-623.
9. Alvarez J. Measuring $[\text{Ca}^{2+}]$ in endoplasmic reticulum with aequorin / Alvarez J., Montero M. // *Cell Calcium*. – 2002. - Vol. 32. – P. 251-260.

10. *Bassik M.C.* Phosphorylation of Bcl-2 regulates ER Ca^{2+} homeostasis and apoptosis / Bassik M.C., Scorrano L., Oakes S.A., Pozzan T., Korsmeyer S.J. // EMBO J. – 2004. – Vol. 23. – P. 1207-1216.
11. *Bygrave F.L.* What is the concentration of calcium ions in the endoplasmic reticulum? / Bygrave F.L., Benedetti A. // Cell Calcium. – 1996. – Vol. 19. – P. 547-551.
12. *Palmer A.E.* Bcl-2-mediated alterations in endoplasmic reticulum Ca^{2+} analyzed with an improved genetically encoded fluorescent sensor / Palmer A.E., Jin C., Reed J.C., Tsien R.Y. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – Vol. 101. – P. 17404-17409.
13. *Pinton P.* The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum / Pinton P., Pozzan T., Rizzuto R. // EMBO J. – 1998. – Vol. 17. – P. 5298-5308.
14. *Verkhatsky A.* Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons / Verkhatsky A. // Physiol. Rev. – 2005. – Vol. 85. – P. 201-279.
15. *Strehler E.E.* Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps / Strehler E.E., Zacharias D.A. // Physiol. Rev. – 2001. – Vol. 81, N 1. – P. 21-50.
16. *Tang D.* The influence of membrane lipid structure on plasma membrane Ca^{2+} -ATPase activity / Tang D., Dean W.L., Borchman D., Paterson C.A. // Cell Calcium. – 2006. – Vol. 39, N 3. – P. 209–216.
17. *Pang Y.* The characterization of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in rich sphingomyelin-cholesterol domains / Pang Y., Zhu H., Wu P., Chen J. // FEBS Lett. – 2005. – Vol. 579, N 11. – P. 2397-403.
18. *Rostovtseva T.K.* Molecular Basis for Mitochondrial Signaling / Rostovtseva T.K. // Cham: Springer International Publishing. – 2017. doi:10.1007/978-3-319-55539-3.

19. *Deluca H.F.* Calcium uptake by rat kidney mitochondria / Deluca H.F., Engstrom G.W. // Proc Natl Acad Sci USA. – 1961. – Vol. 47. – P. 1744-1750.
20. *Filadi R.* Mitochondrial Ca^{2+} Handling and Behind: The Importance of Being in Contact with Other Organelles / Filadi R., Theurey P., Rossi A., Fedeli C., Pizzo P. // In: – 2017. – P. 3-39. doi:10.1007/978-3-319-55539-3_1.
21. *Babich L.H.* Ca ion transport in smooth muscle mitochondria / Babich L.H., Shlykov S.H., Kosterin S.O. // Ukr Biochem J. – 2014. – Vol. 86, N 6. – P. 18-30.
22. *Dedkova E.N.* Calcium signaling in cardiac mitochondria / Dedkova E.N., Blatter L.A. // J Mol Cell Cardiol. – 2013. – Vol. 58. – P.125-133.
23. *Williams G.S.B.* Mitochondrial calcium uptake / Williams G.S.B., Boyman L., Chikando A.C., Khairallah R.J., Lederer W.J. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2013. – Vol.110, N 26. – P. 10479-10486.
24. *Orlikova B.* Dietary chalcones with chemopreventive and chemotherapeutic potential / Orlikova B., Tasdemir D., Golais F., Dicato M., Diederich M. // Genes Nutr. – 2011. – Vol. 6, N 2. – P. 125-147.
25. *León-González A.J.* Chalcones as Promising Lead Compounds on Cancer Therapy / León-González A.J., Acero N., Muñoz-Mingarro D., Navarro I., Martín-Cordero C. // Curr Med Chem. –2015. – Vol. 22, N 30. – P. 3407-3425.
26. *Mahapatra D.K.* Therapeutic potential of chalcones as cardiovascular agents / Mahapatra D.K., Bharti S.K. // Life Sci. – 2016. – Vol. 148. – P. 154-172.
27. *Zhang S.* A new brominated chalcone derivative suppresses the growth of gastric cancer cells in vitro and in vivo involving ROS mediated up-regulation of DR5 and 4 expression and apoptosis / Zhang S., Li T., Zhang Y. et al. // Toxicol Appl Pharmacol. – 2016. – Vol. 309. – P. 77-86.

28. *Zhou B.* Diverse Molecular Targets for Chalcones with Varied Bioactivities / Zhou B., Xing C. // *Med Chem (Los Angeles)*. – 2015. – Vol. 5, N 8. – P. 388-404.

29. *Nimse S.B.* Biological applications of functionalized calixarenes / Nimse S.B., Kim T. // *Chem Soc Rev*. – 2013. – Vol. 42, N 1. – P. 366-386.

30. *Antonenko Y.N.* Derivatives of rhodamine 19 as mild mitochondria-targeted cationic uncouplers / Antonenko Y.N., Avetisyan A.V., Cherepanov D.A. et al. // *J Biol Chem*. – 2011. – Vol. 286, N 20. – P. 17831-17840.

31. *Divakaruni A.S.* The regulation and physiology of mitochondrial proton leak / Divakaruni A.S., Brand M.D. // *Physiology (Bethesda)*. – 2011. – Vol. 26, N 3. – P. 192-205.

32. *McCarron J.G.* Examining the role of mitochondria in Ca^{2+} signaling in native vascular smooth muscle / McCarron J.G., Olson M.L., Wilson C., Sandison M.E., Chalmers S. // *Microcirculation*. – 2013. – Vol. 20, N 4. – P. 317-329.

33. *Babich L.G.* Energy-dependent Ca^{2+} -transport in intracellular smooth muscle structures / Babich L.G., Shlykov S.G., Borisova L.A., Kosterin S.A. // *Biokhimiia* (Moscow, Russ.) – 1994. – Vol. 59, N 8. – P. 1218-1229.

34. *Klyachina M.A.* Calix[4]arene N-chalconeamides: synthesis and influence on Mg^{2+} , ATP-dependent Ca^{2+} accumulation in the smooth muscle subcellular structures / Klyachina M.A., Boyko V.I., Yakovenko A.V. et al. // *J Incl Phenom Macrocycl Chem*. – 2008. – Vol. 60, N 1-2. – P. 131-137.

35. *Babich L.G.* Ca^{2+} -dependent regulation of the Ca^{2+} concentration in the myometrium mitochondria. I. Trifluoperazine effects on mitochondria membranes polarization and $[\text{Ca}^{2+}]_m$ / Babich L.G., Shlykov S.G., Kushnarova A.M., Kosterin S.O. // *The Ukrainian Biochemical Journal*. – 2016. – Vol. 88, N 4. – P. 5-11.

36. *Sanderson T.H.* Molecular Mechanisms of Ischemia–Reperfusion Injury in Brain: Pivotal Role of the Mitochondrial Membrane Potential in Reactive Oxygen Species Generation / Sanderson T.H., Reynolds C.A., Kumar R., Przyklenk K., Hüttemann M. // *Mol Neurobiol.* – 2013. – Vol. 47, N 1. – P. 9-23.
37. *Kaim G.* ATP synthesis by F-type ATP synthase is obligatorily dependent on the transmembrane voltage / Kaim G., Dimroth P. // *EMBO J.* – 1999. – Vol. 18, N 15. – P. 4118-4127.
38. *Suski J.M.* Relation between mitochondrial membrane potential and ROS formation / Suski J.M., Lebiedzinska M., Bonora M., Pinton P., Duszynski J., Wieckowski M.R. // *Methods Mol Biol.* – 2012. – Vol. 810. – P. 183-205.
39. *Starkov A.A.* Regulation of brain mitochondrial H₂O₂ production by membrane potential and NAD(P)H redox state / Starkov A.A., Fiskum G. // *J Neurochem.* – 2003. – Vol. 86, N 5. – P. 1101-1107.
40. *Liu S-S.* Mitochondrial Q cycle-derived superoxide and chemiosmotic bioenergetics / Liu S-S. // *Ann N Y Acad Sci.* – 2010. – Vol. 1201, N 1. – P. 84-95.
41. *Hockenbery D.M.* Targeting mitochondria for cancer therapy / Hockenbery D.M. // *Environ Mol Mutagen.* – 2010. – Vol. 51, N 5. – P. 476-489.
42. *Gutierrez R.M.P.* Review: The potential of chalcones as a source of drugs / Gutierrez R.M.P., Muniz-Ramirez A., Saucedo J.V. // *African J Pharm Pharmacol.* – 2015. – Vol. 9, N 8. – P. 237-257.
43. *Sabzevari O.* Molecular cytotoxic mechanisms of anticancer hydroxychalcones / Sabzevari O., Galati G., Moridani M.Y., Siraki A., O'Brien P.J. // *Chem Biol Interact.* – 2004. – Vol. 148, N 1-2. – P. 57-67.
44. *Cheng Z-P.* Early-stage morphological observations of myoma and myometrium after laparoscopic uterine artery occlusion treatment /

Cheng Z-P., Tao X., Gong J., Dai H., Hu L-P., Yang W-H. // Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. – 2009. – Vol. 145, N 1. – P. 113-116.

До розділу 5

1. *Цимбалюк О.В.* Влив каліксарену C-99 на скоротливу активність м'язів товстого кишечника щурів / Цимбалюк О.В. // Біологічні студії / Studia Biologica. – 2016. – Т. 10, № 3-4. – С. 33-46.

2. *Цимбалюк О.В.* Na^+, K^+ -АТРаза, ендogenous кардіостероїди та їхня трансдукторна роль / Цимбалюк О.В., Костерін С.О. // Укр. біохім. журн. – 2012. – Т. 84, № 1. – С. 5-17.

3. *Hauck C.* Systemic hypertension: the roles of salt, vascular Na^+, K^+ -ATPase and the endogenous glycosides, ouabain and marinobufagenin / Hauck C., Frishman W.H. // Cardio. Rev. – 2012. – Vol. 20, N 3. – P. 130-138.

4. *Dodds F.* Synthesis and structure of the calixarene-like phosph(III)azane macrocycle $[\{\text{P}(\mu\text{-N}(\text{t})\text{Bu})\}_2\{1,5\text{-(NH)}_2\text{C}_{10}\text{H}_6\}]_3$ / Dodds F., Garcia F., Kowenicki R.A., McPartlin M., Steiner A., Wright D.S. // Chem Commun (Camb). – 2005. – Vol. 29. – P. 3733-3735.

5. *Darbost U.* Polarizing a hydrophobic cavity for the efficient binding of organic guests: the case of calix[6]tren, a highly efficient and versatile receptor for neutral or cationic species / Darbost U., Rager M.N., Petit S., Jabin I., Reinaud O. // J Am Chem Soc. – 2005. – Vol. 127, N 23. – P. 8517-8525.

6. *Векліч Т.О.* Порівняльне дослідження властивостей Na^+, K^+ -АТРази та Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани міометрія / Векліч Т.О., Костерін С.О. // Укр. біохім. журн. – 2005. – Т. 77, № 2. – С. 66-75.

7. *Flynn E.R.M.* Functionally separate intracellular Ca^{2+} stores in smooth muscle / Flynn E.R.M., Bradley K.N., Muir T.C., McCarron J.G. // The Journal of Biological Chemistry. – 2001. – V. 276, N 39. – P. 36411-36418.

8. Векліч Т.О. Катіонна специфічність системи акумуляції Ca^{2+} в мітохондріях клітин гладенького м'яза / Т.О. Векліч, С.О. Костерін, О.П. Шинлова // Український біохімічний журнал. – 2002. – Т. 74, № 1. – С. 42-48.

9. Valente R.C. Mechanisms of ouabain toxicity / Valente R.C., Capella L.S., Monteiro R.Q. Rumjanek V.M., Lopes A.G., Capella M.A. // FASEB J. – 2003. – V.17, N12. – P. 1700-1702.

10. Wang H. Ouabain assembles signaling cascades through the caveolar Na^+/K^+ -ATPase / Wang H., Haas M., Liang M., Cai T., Tian J., Li S., Xie Z. // The Journal of Biological Chemistry. – 2004. – V. 279, N 17. – P. 17250-17259.

11. Valente R.C. Mechanisms of ouabain toxicity / Valente R.C., Capella L.S., Monteiro R.Q. Rumjanek V.M., Lopes A.G., Capella M.A. // FASEB J. – 2003. – Vol. 17, N12. – P. 1700-1702.

12. Wang H. Ouabain assembles signaling cascades through the caveolar Na^+/K^+ -ATPase / Wang H., Haas M., Liang M., Cai T., Tian J., Li S., Xie Z. // J. Biol. Chem. – 2004. – Vol. 279, N 17. – P. 17250-17259.

13. Павлов К.В. Электрогенный транспорт ионов Na^+, K^+ -АТФазой / Павлов К.В., Соколов В.С. // Биологические мембраны. – 1999. – Т. 16, № 6. – С. 604-637.

14. Boldyrev A.A. Na^+, K^+ -ATPase: 40 years of investigations / Boldyrev A.A. // Membr. Cell. Biol. – 2000. – Vol. 13, N 6. – P. 715-719.

15. Програма HyperChem:

<http://www.hyper.com/Download/AllDowloads/tabid/470/Default.aspx>.

16. Shatursky O.Ya. Anion carrier formation by calix[4]arene - bis-hydroxymethylphosphonic acid in bilayer membranes / Shatursky O.Ya., Kasatkina L.A., Rodik R.V., Cherenok S.O., Shkrabak A.A., Veklich T.O., Borisova T.A., Kosterin S.O., Kalchenko V.I. // Organic Biomolecular Chemistry. – 2014. – Vol. 12. – P. 9811-9821.

17. *Sachs J.R.* Interaction of Magnesium with the Sodium-Pump of the Human Red-Cell / Sachs J.R. // J. Physiol. London. – 1988. – Vol. 400. – P. 575-591.

18. *Кравцов А.В.* Регуляция Na^+, K^+ -АТРаза: эффекты ионов Mg и Ca / Кравцов А.В., Кравцова В.В. // Укр. біохім. журн. – 2001. – Т. 73, № 2. – С. 5-27.

19. *Болдырев А.А.* Na^+, K^+ -АТРаза как олигомерный ансамбль / Болдырев А.А. // Биохимия. – 2001. – Т. 66, вып. 6. – С.1013-1025.

20. *Варфоломеев С.Д.* Биокинетика: практический курс / Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. // М.: ФАИР-ПРЕСС. – 1999. – 720 с.

21. *Лопина О.Д.* Взаимодействие каталитической субъединицы Na^+, K^+ -АТРаза с клеточными белками и другими эндогенными регуляторами / Лопина О.Д. // Биохимия. – 2001. – Т. 66, вып. 6. – С. 1389-1400.

22. Введение в биомембранологию / Под. ред. Болдырева А.А. М.: Изд-во МГУ. – 1990. – 280 с.

23. *Костерин С.А.* Кинетические закономерности реакции гидролиза АТР, катализируемой Mg^{2+} -АТРазой плазматической мембраны гладкомышечных клеток / Костерин С.А., Браткова Н.Ф., Зимина В.П. // Биохимия. – 1995. – Т. 60, № 9. – С. 1450-1459.

24. *Данилович Г.В.* Ідентифікація та характеристика «базальної» Ca^{2+} -незалежної Mg^{2+} -залежної АТР-гідролазної ферментативної активності у фракції плазматичних мембран гладеньком'язових клітин / Данилович Г.В., Костерін С.О. // Укр. біохім. журн. – 2001. – Т. 73, № 6. – С. 30-40.

25. *Андрология.* Мужское здоровье и дисфункция репродуктивной системы. / Под ред. Э. Нишлага, Г.М. Бере. Перевод с англ. под ред. И.И. Дедова. Москва: МИА. – 2005. – 551 с.

26. Woo A. Sperm Motility Is Dependent on a Unique Isoform of the Na,K-ATPase / Woo A.L., James P.F., Lingrel J.B. // J. Biol. Chem. – 2000. – Vol. 275, N 27. – P. 20693-20699.

27. Blanco G. The $\alpha 4$ isoform of the Na,K-ATPase is expressed in the germ cells of the testes / Blanco G., Sanchez G., Melton R.J. et al. // J. Histochem Cytochem. – 2000. – Vol. 48, N 8. – P. 1023-1032.

28. Wang Z.S. The influence of vasectomy and vasovasostomy on testicular ATPases, cAMP, ABP and androgen receptor in rabbits / Wang Z.S., Zhao X.J., Li Y. // Contraception. – 1994. – Vol. 50, N 5. – P. 491-500.

29. Aitken R.J. Molecular mechanisms regulating human sperm functions / Aitken R.J. // Mol. Hum. Reprod. – 1997. – Vol. 3, N 3. – P. 169-173.

30. Кочешкова Н.С. Системи транспортування Ca^{2+} у сперматозоїдах. Біохімічні механізми капацитації та акросомної реакції / Кочешкова Н.С., Воробець З.Д. // Укр. біохім. журн. – 2006. – Т. 78, № 4. – С. 67-79.

31. Pelizzi N. Synthesis and properties of new calixarene-based ditopic receptors for the simultaneous complexation of cations and carboxylate anions / Pelizzi N., Casnati A., Friggeri A., Ungaro R. // J. Chem. Soc., Perkin Trans. – 1998. – N 6. – P. 1307 – 1312.

32. Budka J. Urea derivatives of calix[4]arene 1,3-*alternate*: An anion receptor with profound negative allosteric effect / Budka J., Lhotak P., Michlova V., Stibor I. // Tetrahedron Lett. – 2001. – Vol. 42. – P. 1583-1586.

33. Arena G. Complexation of small neutral organic molecules by water soluble calix[4]arenes / Arena G., Contino A., Gulino F.G., Magri A., Sciotta D., Ungaro R. // Tetrahedron Lett. – 2000. – Vol. 41. – P. 9327-9330.

34. Perret F. Biochemistry of the para-sulfonato-calix[n]arenes /

Perret F., Lazar A., Coleman A. // Chem. Commun. – 2006. – P. 2435-2438.

35. *Кальченко В.І.* Каліксарени. Перспективи медико-біологічного застосування / Кальченко В.І., Родік Р.В., Бойко В.І. // Журнал органічної та фармацевтичної хімії. – 2006. – Т. 3, № 4. – С. 13 – 29.

36. Da Silva E. Biopharmaceutical applications of calixarenes / Da Silva E., Lazar A.N., Coleman A.W. // Journal of Drug Delivery Science and Technology. – 2004. – Vol. 14, N 1. – P. 3 – 20.

37. *Shinoda T.* Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution / Shinoda T., Ogawa H., Cornelius F., Toyoshima C. // Nature. – 2009. – Vol. 459. – P. 446-450.

38. *Morth J.P.* Crystal structure of the sodium-potassium pump / Morth J.P., Pedersen B.P., Toustrup-Jensen M.S., Sorensen T.L.M., Petersen J. // Nature. – 2007. – Vol. 450. – P. 1043-1049.

39. *Ogawa H.* Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na^+, K^+ -ATPase) with bound potassium and ouabain / Ogawa H., Shinoda T., Cornelius F., Toyoshima C. // Proc.Natl.Acad.Sci.USA. – 2009. – Vol. 106. – P. 13742-13747.

40. *Toyoshima C.* First Crystal Structures of Na^+, K^+ -ATPase: New Light on the Oldest Ion Pump / Toyoshima C., Kanai R., Cornelius F. // Structure. Elsevier. – 2011. – Vol. 19. – P. 1732-1738.

41. *Шкрабак О.А.* Каліксарензалежний гідроліз АТФ. І. Кінетика реакції та комплексоутворення між каліксареном С-107 та нуклеозидтрифосфатом / Шкрабак О.А., Кальченко О.І., Родік Р. В., Векліч Т.О., Кальченко В.І., Костерін С.О. // Укр. біохім. журн. – 2008. – Т. 80, № 2. – С. 90-100.

42. *Toyoshima C.* Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution / Toyoshima C., Nakasako M., Nomura H. & Ogawa H. // Nature. – 2000. – Vol. 405. – P. 647–655.

43. Xu C. A structural model for the catalytic cycle of Ca^{2+} -ATPase / Xu C., Rice W.J., He W., Stokes D.L. // J. Mol. Biol. – 2002. – Vol. 316. – P. 201–211.

44. Векліч Т.О. Каліксарени C-97 та C-107 стимулюють вплив убаїну на Na^+, K^+ -АТРазну активність у плазматичній мембрані гладеньком'язових клітин / Векліч Т.О., Шкрабак О.А., Костерін С.О., Родік Р.В., Черенок С.О., Бойко В.І., Кальченко В.І. // Укр. біохім. журн. – 2006. – Т. 78, № 6. – С. 53-63.

45. Geering K. Functional roles of Na,K-ATPase subunits / Geering K. // Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. – 2008. – Vol. 17. – P. 526–532.

46. Lingre J.B. The physiological significance of the cardiotonic steroid/ouabain-binding site of the Na,K-ATPase / Lingre J.B. // Annu. Rev. Physiol. – 2010. – Vol. 72. – P. 395–412.

47. Yatime L. Structural insights into the high affinity binding of cardiotonic steroids to the Na^+, K^+ -ATPase / Yatime L., Laursen M., Morth J.P., Esmann M., Nissen P., Fedosova N.U. // J. Struct. Biol. – 2011. – Vol. 174. – P. 296–306.

48. Adamian L. Lipid - binding surfaces of membrane proteins: evidence from evolutionary and structural analysis / Adamian L., Naveed H., Liang J. // Biochim. Bio phys. Acta. – 2011. – Vol. 1808. – P. 1092–1102.

49. Cornelius F. Characterization of fluoride-stabilized phosphoenzyme analogues and their interaction with cardiotonic steroids / Cornelius F., Mahmmoud Y.A., Toyoshima C. // J. Biol.Chem. – 2011. – Vol. 286, N 34. – P. 29882–29892.

50. Bab-Dinitz E. A C-terminal lobe of the beta subunit of Na,K-ATPase and H,K-ATPase resembles cell adhesion molecules / Bab-Dinitz E., Albeck S., Peleg Y., Brumfeld V., Gottschalk K.E., Karlish S.J. // Biochemistry. – 2009. – Vol. 48. – P. 8684–8691.

51. *Hasler U.* Structural and functional features of the transmembrane domain of the Na,K-ATPase beta subunit revealed by tryptophan scanning / Hasler U., Crambert G., Horisberger J.D., Geering K. // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276, N 19. – P. 16356–16364.

52. *Lifshitz Y.* Purification of the human alpha2 Isoform of Na,K-ATPase expressed in *Pichia pastoris*. Stabilization by lipids and FXYD1 / Lifshitz Y., Petrovich E., Haviv H., Goldshleger R., Tal D.M., Garty H., Karlisch S.J. // Biochemistry. – 2007. – Vol. 46. – P. 14937–14950.

53. *Mishra N.K.* Fxyd Proteins Stabilize na,k-Atpase Amplification of Specific Phosphatidylserine-Protein Interactions / Mishra N.K., Peleg Y., Cirri E., Belogus T., Lifshitz Y., Voelker D.R., Apell H.J., Garty H., Karlisch Sjd // J. Biol.Chem. – 2011. – Vol. 286. – P. 9699–9712.

54. *Yatime L.* P-type ATPases as drug targets: Tools for medicine and science / Yatime L., Buch-Pedersen M.J., Musgaard M., Morth J.P., Winther A.L., Pedersen B.P., Olesen C., Andersen J.P., Vilsen B., Schiott B., Palmgren M.G., Moller J.V., Nissen P., Fedosova N. // BBA. – 2009. – Vol. 1787. – P. 207–220.

55. *De Pont J.J.* The non-gastric H,K-ATPase as a tool to study the ouabain-binding site in Na,K-ATPase / De Pont J.J., Swarts H.G., Karawajczyk A., Schaftenaar G., Willems P.H., Koenderink J.B. // Pflugers Arch. – 2009. – Vol. 457. – P. 623–634.

До розділу 6

1. *Khataee H.R.* Applications of molecular motors in intelligent nanosystems / H.R. Khataee, A.R. Khataee // Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures. – 2009. – Vol. 4, N 4. – P. 613-621.

2. *Aguilar H.N.* Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility / H. Aguilar, B. Mitchell // Human Reproduction Update. – 2010. – Vol. 16, N 6. – P. 725-744.

3. *Coluccio L.M.* Myosins. A Superfamily of Molecular Motors. Proteins and Cell Regulation / Ed by L. M. Coluccio. Watertown, MA, U.S.A.: Springer, 2008. – Vol. 7. – 467p.

4. *Попов Е.М.* Структурно-функциональная организация белков: [у 4 т.] / Попов Е.М., Демин В. В., Шибанова Е. – М: Наука. –1996. – Т 2.– 480 с.

5. *Левицкий Д.И.* Актинмиозиновые системы биологической подвижности / Д. И. Левицкий // Биохимия. – 2004. – Т. 69, № 11. – С. 1447–1462.

6. *Al-Nijji J.* Nitric oxide synthase activity in human trophoblast, term placenta and pregnant myometrium / J. Al-Nijji, E. Andolf , R. Laurini [et al.] // *Reprod. Biol. Endocrinol.* – 2003. – Vol. 1, N 1. – P. 51–58.

7. *Woodcock N.A.* Effect of an oxytocin receptor antagonist and rho kinase inhibitor on the $[Ca^{2+}]$ sensitivity of human myometrium / N.A. Woodcock, C.W. Taylor, S. Thornton // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2004. – Vol. 190, N 1. – P. 222–228.

8. *Arakawa T.K.* Long-term hypoxia alters calcium regulation in near-term ovine myometrium / T.K. Arakawa, M. Mlynarczyk, K.M. Kaushal [et al.] // *Biol. Reprod.* – 2004. – Vol. 71, N 1. – P.156 – 162.

9. *Buxton I.L.* Regulation of uterine function: a biochemical conundrum in the regulation of smooth muscle relaxation / I.L. Buxton // *Mol. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 65, N 5. – P.1051 – 1059.

10. *Михайленко Е.Т.* Биохимия родового акта и его регуляция / Михайленко Е.Т., Курський М.Д., Чуб В.В. – Киев, Здоров'я, 1980 – 182 с.

11. *Курський М.Д.* Транспорт кальция и функция гладких мышц / Курський М.Д., Михайленко Е.Т., Федоров А.Н. – Киев, Наукова думка, 1981. – 169 с.

12. *Arner A.* Smooth, slow and smart muscle motors. / A. Arner, M. Löfgren, I. Morano // *Muscle Res Cell Motil.* – 2003. – Vol. 24, N 2 - 3. – P.165 – 73.

13. *Кириллина В.П.* Гипертрофизис подавляеет способность актина формировать с миозином сильную форму связывания / В. Кириллина, А. Якубець-Пука, Ю. Боровиков // *Цитология.* – 2010 . – Т. 52, № 10 – С. 869 – 873.

14. *Векліч Т.О.* Вплив каліксаренфосфонових кислот на Na^+, K^+ -АТФ-азну активність в плазматичній мембрані гладеньком'язових клітин / Т.О. Векліч, С.О. Костерін, Р.В. Родік, С.О. Черенок, В.І. Бойко, В.І. Кальченко // *Укр. біохім. журн.* – 2006. – Т. 78, № 1. – С. 70-86.

15. *Лабинцева Р.Д.* Порівняльне дослідження впливу каліксаренів на Mg^{2+} -залежні АТФ-гідролазні ферментативні системи гладеньком'язових клітин матки / Лабинцева Р.Д., Слінченко Н.М., Векліч Т.О., Родік Р.В., Черенок С.О., Бойко В.І., Кальченко В.І., Костерін С.О. // *Укр. біохім. журн.* – 2007. – Т. 79, №3. – С. 44-54.

16. *Дятлова Н.М.* Комплексоны и комплексопаты металлов / Дятлова Н.М., Темкина В.Я., Попов К.И. // М.: Химия. 1988. 544 с.

17. *Jin T.* Selective Na^+ Transport through Phospholipid Bilayer Membrane by a Synthetic Calix[4]arene Carrier / Jin T., Kinjo M., Koyama T., Kobayashi Y., Hirata H. // *Langmuir.* – 1996. – Vol. 12, N 11. – P. 2684-2689.

18. *Houel E.* Interfacial interactions of cations with amphiphilic dihydroxyphosphonyl-calix-[4]-arene mesosystems / Houel E., Lazar A. , Da Silva E., Coleman A.W., Solovyov A.V., Cherenok S. A., Kalchenko V.I. // *Langmuir.* – 2002. – Vol. 18. – P. 1374 – 1379.

19. *Yoshino N.* An artificial ion channel formed by a macrocyclic resorcin[4]arene with amphiphilic cholic acid ether groups / Yoshino N., Satake A., Kobuke Y. // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2001. – Vol. 40. – P. 457-459.

20. *Tanaka Y.* A Non-Peptidic Ion Channel with K⁺ Selectivity / Tanaka Y., Kobuke Y., Sokabe M. // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 1995. – Vol. 34. – P. 693-694.

21. *Solovyov A.V.* Calix[4]arenes bearing alpha-amino- or alpha-hydroxy-phosphonic acid fragments at the upper rim / A.V. Solovyov, S. Cherenok, I. Tsymbal [et al.] // *Heteroatom Chemistry.* – 2001. – Vol. 12. – P. 58 – 67.

22. *Barany K.* Chicken gizzard myosin / Barany K., Barany M, Gaetijens E., Balin G. // *Arch.Biochem. and Biophys.* – 1966. – Vol. 113, N 1. – P. 205-211.

23. *Weber A.* The ultracentrifugal separation of L-myosin and actin in an actomyosin sol under the influence of ATP / Weber A. // *Biochem. Biophys. Acta.* – 1956. – Vol. 19, N 2. – P. 345 – 351.

24. *Bradford M.M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72, N 1. – P. 248-254.

25. *Rathbun W.* Estimation of enzymically produced orthophosphate in the presence of cystein and adenosine triphosphate / Rathbun W., Betlach V. // *Anal. Biochem.* – 1969. – Vol. 28, N 1-3. – P. 436-445.

26. *Highsmith S.* Lever arm model of force generation by actin-myosin-ATP / S. Highsmith // *Biochemistry.* – 1999. – Vol. 38, N 31. – P. 9791 – 9797.

27. *Левицкий Д.И.* Актомиозиновые системы биологической подвижности / Д. И. Левицкий // *Биохимия.* – 2004. – Т. 69, вып. 11. – С. 1447-1462.

28. *Паранько Н.М.* Роль тяжелых металлов в возникновении репродуктивных нарушений / Паранько Н.М., Рублевская Н.И., Белицкая Э.Н., Головкова Т.А., Землякова Т.Д., Чуб Л.Е., Шматков Г.Г. // *Гигиена и санитария.* – 2002. – № 1. – С. 28-30.

292. Сердюк А.М. Тяжелые металлы внешней среды и их влияние на репродуктивную функцию женщин / Сердюк А.М., Белицкая Э.Н., Паранько Н.М., Шматков Г.Г. // Днепропетровск: АРТ-ПРЕСС. – 2004. – 148 с.

30. Лабинцева Р.Д. Захисний вплив тіакалікс[4]арен-тетрасульфонату на інгібування АТР-гідролазної активності субфрагмента-1 міозину міометрія катіонами важких металів / Лабинцева Р.Д., Бевза О.В., Бевза А.А., Люлько А.О., Харченко С.Г., Кальченко В.І., Костерін С.О. // Ukr. Biochem. J. – 2014. – Vol. 86, N 6. – С. 154-166.

31. Dorea J.G. Early (in uterus and infant) exposure to mercury and lead / Dorea J.G., Donangelo C.M. // Clin Nutr. – 2006. – Vol. 25, N 3. – P. 369–376.

32. Bellinger D.C. Health Risks from Lead-Based Ammunition in the Environment / Bellinger D.C., Burger J., Cade T.J., Finkelstein M., Hu H., Kosnett M., Landrigan P.J., Lanphear B., Pokras M.A., Redig P.T., Rideout B.A., Silbergeld E., Wright R., Smith D.R. // Environ Health Perspect. – 2013. – Vol. 121, N 6. P. a178–a179.

33. Bires J. Accumulation of trace elements in sheep and the effects upon qualitative and quantitative ovarian changes / Bires J., Maracek I., Bartko P., Biresova M., Weissova T. // Vet Hum Toxicol. – 1995. – Vol. 37, N 4. – P. 349-356.

34. Benini S. Molecular Details of Urease Inhibition by Boric Acid: Insights into the Catalytic Mechanism / Benini S., Rypniewski W.R., Wilson K.S. Mangani S., Ciurli S. et al. // J. Am. Chem. Soc. - 2004. – Vol. 126. – P. 3714-3715.

35. Лабынцева Р.Д. Влияние ионов тяжелых металлов на суперпреципитацию и АТРазную активность актомиозина гладкой мышцы матки / Лабынцева Р.Д., Ульяненко Т.В., Костерин С.А. // Укр. биохим.журн. – 1998. – Т. 70, № 1. – С. 71-77.

36. *Лабинцева Р.Д.* Вплив катіонів важких металів на АТРазну активність актоміозинового комплексу та субфрагмента-1 міозина гладенького м'яза матки / Лабинцева Р.Д., Бобровська О.М., Чуніхін О.Ю., Костерін С.О. // Укр. біохім. журн. – 2011. – Т. 83, № 4. – С. 79-88.

37. *Gutsche, C.D.* Calixarenes: an introduction, monographs in supramolecular chemistry. Royal Society of Chemistry. Cambridge, 2008.

38. *Morohashi N., Narumi F., Iki N., Hattori T., Miyano S.* // *Chem. ev.* -2006.- Vol. 106. – P. 5291-5316.

39. *Lumetta, G.J., Rogers, R.D., Gopalan, A.S. (eds).* Calixarenes for Separations. American Chemical Society. Washington, 2000.

40. *Кальченко В.И.* Каліксарени. Перспективи медико-біологічного застосування / Кальченко В.И., Родик Р.В., Бойко В.И. // Журнал органической и фармацевтической химии – 2005. - Т. 3, вып. 4. – С. 13-29.

41. *Векліч Т.О.* Вплив каліксаренфосфонових кислот на Na^+, K^+ -АТР-азну активність у плазматичній мембрані гладеньком'язових клітин / Векліч Т.О., Костерін С.О., Родік Р.В., Черенок С.О., Бойко В.И., Кальченко В.И. // Український біохімічний журнал. – 2006. – Т. 78, № 1 – С. 70-86.

42. *Cherenok S.* Calix[4]arene α -aminophosphonic acids: asymmetric synthesis and enantioselective inhibition of alkaline phosphatases / Cherenok S., Vovk A., Muravyova I., Shivanyuk A., Kukhar V., Lipkowski J., Kalchenko V. // *Organic Letters*. – 2006. – Т. 8. – P. 549-552.

43. *Phan G.* Calixarene cleansing formulation for uranium skin contamination / Phan G., Semili N., Bouvier-Capely C., Landon G., Mekhloufi G., Huang N., Rebière F., Agarande M., Fattal E. // *Health Phys.* – 2013. – Vol. 105, N 4. – P. 382-9.

44. *Nimse S.B.* Biological applications of functionalized calixarenes / Nimse S.B., Kim T. // *Chem. Soc. Rev.* – 2013. – Vol. 42. – P. 366-386.

45. *Iki N.* New Water-Soluble Host Molecule Derived from Thiacalixarene / Iki N., Fujimoto T., Miyano S. A. // Chem. Lett. – 1998. – P. 625-626.

46 *Iki N.* High Complexation Ability of Thiacalixarene with Transition Metal Ions. The Effect of Replacing Methylene Bridges of Tetra(p-t-butyl)calyx[4]arenetetrol by Epithio Groups / Iki N., Morohashi N., Narumi F., Miyano S. // Bull. Chem. Soc. Jpn. – 1998. – Vol. 71. – P. 1597-1603.

47. *Coleman A.W.* Calix[n]arenes as protein sensors / Coleman A.W., Perret F., Moussa M., Dupin M., Guo Y., Perron H. // Top. Curr. Chem. – 2007. – Vol. 277. – P. 31-88.

48. *Bilyk A.* Systematic structural coordination chemistry of p-tbutyltetrathiacalix[4]arene: further complexes of transition-metal ions / Bilyk A., Dunlop J.W., Fuller R.O., Hall A.K., Harrowfield J.M., Hosseini M.W., Koutsantonis G.A., Murray I.W., Skelton B.W., Stamps R.L., White A.H. // Eur. J. Inorg. Chem. – 2010. – P. 2106-2126.

49. *Weeds A.G.* Separation of subfragment-1 isoenzymes from rabbit skeletal muscle myosin / Weeds A.G., Taylor R.S. // Nature. – 1975. – Vol. 257, N 1. – P. 54-56.

50. *Chen P.S.* Microdetermination of phosphorus / Chen P.S., Toribara Jr.T.Y., Warner H. // Analytical Chemistry. – 1956. – Vol. 28, N 11. – P. 1756-1758.

51. *Коростылев П.П.* Приготовление растворов для химико-аналитических работ. - М.: Наука, 1964. - 202 с.

52. *Cassidy C.E.* Cancer-relevant biochemical targets of cytotoxic Lonchocarpus flavonoids: a molecular docking analysis / Cassidy C. E., Setzer W. N. // J. Mol. Model. – 2010. – Vol. 16. – P. 311–326.

53. *Houdusse A.* Atomic structure of scallop myosin subfragment S1 complexed with MgADP: a novel conformation of the myosin head / Houdusse A., Kalabokis V.N., Himmel D. et. al. // Cell. –1999. – Vol. 97, N 4. – P. 459-470.

54. *Li L.* Structural changes of envelope proteins during alphavirus fusion / Li L., Jose J., Xiang Y., Kuhn R.J., Rossmann M.G. // *Nature*. – 2010. – Vol. 468, N 7324. – P. 705-708.

55. *Krieger E.* Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA a self-parameterizing force field / Krieger E., Koraimann G., Vriend G. // *Proteins*. – 2002. – Vol. 47, N 3. – P. 393-402.

56. *Morohashi N.* Selective oxidation of thiacalix[4]arenes to the sulfinyl or sulfonyl counterparts and their complexation abilities towards metal ions as studied by solvent extraction / Morohashi N., Iki N., Sugawara A., Miyano S. // *Tetrahedron*. – 2001. – Vol. 57. – P. 5557-5563.

57. *Кофман Е.В.* Некоторые особенности суперпреципитации актомиозина и ее возможные механизмы / Кофман Е.В., Нанкина В.П. // К кн.: Биофизические и биохимические методы исследования мышечных белков. – Л.: Изд-во ЛГУ. – 1978. – С. 82-86.

58. *Бугаенко Л.Т.* Почти полная система средних ионных кристаллографических радиусов и ее использование для определения потенциалов ионизации / Бугаенко Л.Т., Рябых С.М., Бугаенко А.Л. // *Вестн. Моск. Ун-та. – серия 2. – Химия*. – 2008. – Т. 49, № 6. – С. 363-383.

59. *Burghardt T.P.* Myosin individualized: single nucleotide polymorphisms in energy transduction / Burghardt T.P., Neff K.L., Wieben E.D., Ajtai K. // *BMC Genomics*. – 2010. – Vol. 11. – P. 172.

60. *Risal D.* Myosin subfragment 1 structures reveal a partially bound nucleotide and a complex salt bridge that helps couple nucleotide and actin binding / Risal D., Gourinath S., Himmel D.M. // *PNAS*. – 2004. – Vol. 101, N 24. – P. 8930-8935.

61. *Mustafina A.R.* Outer-sphere association of calixarenes and other macrocyclic ligands with metal complexes as a basis for designing of molecular devices / Mustafina A.R., Skripacheva V.V., Konovalov A.I. // *Usp. chim.* – 2007. – Vol. 76, N 10. – P. 979-993.

До розділу 7

1. Варфоломеев С.Д. Химическая энзимология. – М.: “ACADEMIA”, 2005. – 472 с.

2. Tian-Ming Y. Supramolecular interaction between water-soluble calix[4]arene and ATP-the catalysis of calix[4]arene for hydrolysis of ATP / Tian-Ming Y., Zhi-Feng Y., Li W., Jin-ying G., Si-De Y., Xian-Fa S. // Spectrochimica Acta Part A Mol Biomol Spectrosc. – 2002. – Vol. 58, N 14 – P. 3033-3038.

3. Векліч Т.О. Вплив каліксаренфосфонових кислот на Na^+, K^+ -АТФ-азну активність у плазматичній мембрані гладеньком'язових клітин / Векліч Т.О., Костерін С.О., Родік Р.В., Черенок С.О., Бойко В.І., Кальченко В.І. // Український біохімічний журнал. – 2006. – Т. 78, № 1 – С. 70-86.

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

5. Векліч Т.О. Каліксарени C-97 та C-107 стимулюють вплив убаїну на Na^+, K^+ -АТФазну активність у плазматичній мембрані гладеньком'язових клітин / Векліч Т.О., Шкрабак О.А., Костерін С.О., Родік Р.В., Черенок С.О., Бойко В.І., Кальченко В.І. // Український біохімічний журнал. – 2006. – Т. 78, № 6. – С. 53-63.

6. Шликов С.Г., Бабіч Л.Г., Слінченко Н.М. та ін.// Укр. біохім. журн. – 2007. – Т. 79, № 4 – С. 28-33.

7. Burdyga T.V. Kinetic analysis of smooth muscle relaxation / Burdyga T.V., Kosterin S.A. // Gen. Physiol. Biophys. – 1991. – Vol. 10 – P. 589-598.

8. *Ikeda A.* NMR spectroscopic and X-ray crystallographic studies of calix[4]arene·Ag⁺ complexes. Influence of bound Ag⁺ on C_{2v}–C_{2v} interconversion in cone-calix[4]arenes / Ikeda A., Tsuzuki H., Shinkai S. // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2. – 1994. – P. 2073-2080.

9. *Arduini A.* Calix[4]arenes Blocked in a Rigid Cone Conformation by Selective Functionalization at the Lower Rim / Arduini A., Fabbi M., Mantovani M. Mirone L., Pochini A., Secchi A., Ungaro R. // J. Org. Chem. – 1995. – Vol. 60, N 5. – P. 1454-1457.

10. *Arduini A.* Rigid cone calix4.arenes as 7i-donor systems: complexation of organic molecules and ammonium ions in organic media / Arduini A., McGregor W., Paganuzzi D., Pochini A. et al. // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2. – 1996. – P. 839-846.

11. *Kalchenko O.I.* Effect of octakis(diethoxyphosphoryloxy)-tert-butyl-calix[8]arene in mobile phase on the reversed-phase retention behavior of aromatic compounds. Host-guest complexes formation and the stability constants determination / Kalchenko O.I., Lipkowski J., Kalchenko V.I. et al. // J. Chrom. Sci. – 1998. – Vol. 36. – P. 269-273.

12. *Lipkowski J.* Host-guest interactions of calix[4]-resorcinarenes with benzene derivatives 1 in conditions of reversed-phase high-performance liquid chromatography. Stability constants determination / Lipkowski J., Kalchenko O.I., Slowikowska J. et al. // J. Phys. Org. Chem. – 1998. – Vol. 11. – P. 426-435.

13. *Kalchenko O.I.* Study of the complexation of octakis(diethoxyphosphoryloxy)-tetramethyl-calix[4]-resorcinarene with benzene derivatives by RP HPLC method / Kalchenko O.I., Solovyov A.V., Lipkowski J., Kalchenko V.I. // J. Incl. Phenom. – 1999. – Vol. 34. – P. 259-266.

14. *Kalchenko O.I.* RP HPLC study of the complexation of benzene derivatives guest molecules with 5,17-bis(N-tolylmethylenimino)-25,27-*isopropoxycalix[4]arene* in acetonitrile-water solution / Kalchenko O.I.,

Solovyov A.V., Lipkowski J., Kalchenko V.I. // J. Chem. Res. (S). – 1999. – P. 60-61.

15. *Kalchenko O.I.* A comparative study of the determination of the stability constants of inclusion complexes of p-sulphonato-calix[4]arene with aminoacids by RP HPLC and ^1H NMR / Kalchenko O.I., Perret F., Coleman A.W. // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2. – 2001. – P. 258-263.

16. Современное состояние жидкостной хроматографии. Под ред. Дж. Киркланда. – М.: “Мир”, 1974. – С. 309.

17. *Kalchenko O.* Complexation of tetrapropoxycalix[4]arene with uracil and adenine derivatives in water-containing solution / Kalchenko O., Poznanski J., Marcinowicz A. et al. // J.Phys.Org.Chem. – 2003. – Vol. 16. – P. 246-252.

18. *Kosterin S.O.* Kinetics and energetics of Mg^{2+} ,ATP-dependent Ca^{2+} transport in the plasma membrane of smooth muscle cells / Kosterin S.O. // Neurophysiol. – 2003. – Vol. 35, N 3/4. – P. 215–228.

19. *Liang J.* Synthesis and molecular recognition of the uridine-containing derivative of p-tertbutylcalix[4]arene / Jian Liang, Haiying Fu, Yu Liu et al. // Can. J. Chem. – 2003. – Vol. 81. – P. 1019-1024.

20. Lumetta G.J., Rogers R.D., Gopalan A.S. Calixarenes for Separations. – Washington: American Chemical Society, 2000. – 366p.

21. *Namor A.F.* The various factors involved in the extraction of alkali metal picrates by calixarene ester derivatives in the mutually saturated water–dichloromethane solvent system / Namor A.F., Pugliese A., Casal A.R. et al. // Phys. Chem. Chem. Phys. – 2000. – Vol. 2. – P. 4355-4360.

22. *Talanova G. G.* Calixarenes with a novel proton ionizable group: synthesis and metal ion separation/ G.G. Talanova, H.S. Hwang., V.S. Talanov [et al.] // Chem. Commun. – 1998. – Vol. 9. – P. 419–420.

23. *Ouadi A.* Influence of trans-1,2-diaminocyclohexane structure and mixed carboxylic/phosphonic group combinations on samarium-153 chelation capacity and stability / Ouadi A., Loussouarn A., Morandea L.,

Remaud P., Faivre-Chauvet A., Webb J. et al. // Eur J Med Chem. – 2004. – Vol. 39. – P. 467–472.

24. <http://en.wikipedia.org/wiki/Phosphonate>

25. *Шкрабак О.А.* Каліксарензалежний гідроліз АТР. І. Кінетика реакції та комплексоутворення між каліксареном С-107 та нуклеозидтрифосфатом / Шкрабак О.А., Кальченко О.І., Родік Р. В., Векліч Т.О., Кальченко В.І., Костерін С.О. // Український біохімічний журнал. – 2008. – Т. 80, № 2. – С. 90-100.

26. *Кальченко В.І.* Каліксарени. Перспективи медико-біологічного застосування / Кальченко В.І., Родік Р.В., Бойко В.І. // Журнал органічної та фармацевтичної хімії. – 2006. – Т. 3, № 4. – С.13-29.

До розділу 8

1. *Burdyga Th.V.* Kinetic analysis of smooth muscle relaxation / Burdyga Th.V., Kosterin S.A. // Gen. Physiol. Biophys. – 1991. – N 10. – P. 589-598.

2. *Hendricks C.H.* Use of intranasal oxytocin in obstetrics. 1. A laboratory evaluation / Hendricks C.H., Gabel R.A. // Am. J. Obstet. Gynecol. – 1960. – Vol. 79. - P. 780–788.

3. *Ekelin M.* Sense and sensibility: Swedish midwives' ambiguity to the use of synthetic oxytocin for labour augmentation / Ekelin M., Svensson J., Evehammar S., Kvist L.J. // Midwifery. – 2015. – Vol. 31, N 3. – P. e36–e42.

4. *Clark S.L.* Oxytocin: new perspectives on an old drug / Clark S.L., Simpson K.R., Knox G.E., Garite T.J. // Am. J. Obstet. Gynecol. – 2009. – Vol. 200, N 1. – P. 35.e1–35.e6.

5. *Wei S.* High-dose vs low-dose oxytocin for labor augmentation: a systematic review / Wei S., Luo Z., Qi H., Xu H., Fraser W.D. // American J. Obstetrics and Gynecology. – 2010. – Vol. 203, N 4. – P. 296–304.

6. *Weisman O.* Oxytocin-augmented labor and risk for autism in males / Weisman O., Agerbo E., Carter C.S., Harris J.C., Uldbjerg N., Henriksen T.B., Thygesen M., Mortensen P.B., Leckmana J.F., Dalsgaard S. // *Behavioural Brain Res.* – 2015. – Vol. 284, N 1. – P. 207–212.

7. *Kajiwarra K.* Study on cardiotocogram abnormalities due to oxytocin-induced labor and perinatal prognosis / Kajiwarra K., Kuniaki O., Miura Y., Dobasi M., Tanaka K., Tanemoto T., Wada S., Okamoto A., Ochiai K., Tanaka T. // *Intern. J. Gynecol. & Obstetric.* – 2012. – Vol. 119, N 3. – P. S383.

8. *Kuriyama H.* Physiological Features of Visceral Smooth Muscle Cells, With Special Reference to Receptors and Ion Channels / Kuriyama H., Kitamura K., Itoh T., Inoue R. // *Physiol. Reviews.* – 1998. – Vol. 78, N 3. – P. 812-920.

9. *Цимбалюк О.В.* Порівняльне дослідження впливу оуабайну і каліксарен біс-гідроксиметилфосфонової кислоти на активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази та механокінетику процесу „скорочення - розслаблення” гладенького м'язу / О.В. Цимбалюк, О.В. Онуфрійчук, Т.О. Векліч, С.О. Черенок, В.І. Кальченко, М.С. Мірошніченко, С.О. Костерін // *Physics of the Alive.* – 2006. – Vol. 14, N1. – P. 53-72.

10. *Kishimoto T.* Effects of ouabain on high-K induced contractions of various smooth muscle tissues in the guinea-pig / Kishimoto T., Urakawa N. // *Jpn. J. Pharmacol.* – 1982. – Vol. 32, N 3. – P.551 – 561.

11. *Shimizu K.* Species differences in the inhibitory effect of ouabain on high K-induced contraction in the ileal longitudinal muscle / Shimizu K., Nakajyo S., Urakawa N. // *Jpn. J. Pharmacol.* – 1985. – Vol. 39, N 1. – P. 67 – 75.

12. *Nasu T.* The recovery from the relaxant effect by ouabain and metabolic dependency of K^+ contractions in guinea-pig taenia coli / Nasu T., Zakimi S., Shibata H. // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1991. – Vol. 99, N 3. – P. 467 – 473.

13. *Цимбалюк О.В.* Влив каліксарену С-99 на скоротливу активність м'язів товстого кишечника щурів / *Цимбалюк О.В.* // Біологічні студії / *Studia Biologica.* – 2016. – Т. 10, № 3-4. – С. 33-46.