

# ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ РОБОТИ

УДК 577.152.3+544.147+544.176+544.168

## ПРОСТОРОВА БУДОВА КАЛІКСАРЕН-АМІНОФОСФОНОВИХ КИСЛОТ Є СУТТЄВОЮ ДЛЯ ПРОЯВУ ЇХНЬОЇ ІНГІБУЮЧОЇ ДІЇ НА $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТР-азну АКТИВНІСТЬ У ПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАНАХ ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВИХ КЛІТИН

Т. О. ВЕКЛІЧ<sup>1</sup>, О. А. ШКРАБАК<sup>1</sup>, Р. В. РОДІК<sup>2</sup>, В. І. БОЙКО<sup>2</sup>,  
В. І. КАЛЬЧЕНКО<sup>2</sup>, С. О. КОСТЕРІН<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;

<sup>2</sup>Інститут органічної хімії НАН України, Київ;

e-mail: kinet@biochem.kiev.ua; vik@bpci.kiev.ua

В експериментах, виконаних на суспензії плазматичних мембран клітин міометрія, оброблених 0,1%-м розчином дигітоніну, досліджували інгібуючу дію 5,17-ди(фосфоно-2-піридилметил)аміно-11,23-ди-трет-бутил-26,28-дигідрокси-25,27-дипропоксикалікс[4]арену (каліксарен **C-107**, наведено шифр) на  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТР-азну активність. Структуру цього та інших каліксаренів, а також їхніх попередників, підтверджено методами ядерного магнітного резонансу та інфрачервоної спектроскопії. Визначено, що каліксарен **C-107**,  $10^{-8}$ – $10^{-4}$  М, дозозалежно пригнічує активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТР-ази, практично не впливаючи на активність базальної  $\text{Mg}^{2+}$ -АТР-ази. Величина уявної константи інгібування  $I_{0,5}$  становить  $33 \pm 4$  нМ, значення коефіцієнта Хілла  $n_H$  складає  $0,38 \pm 0,06$ . Модельні сполуки: незаміщений по верхньому вінцю 25,27-дипропоксикаліксарен (каліксарен **C-150**, суто каліксаренова «платформа»,  $10^{-8}$ – $10^{-4}$  М) та N-(4-гідроксифеніл)-2-піридил-амінофосфонова кислота (сполука **M-3**, амінофосфонова група разом з фенольним фрагментом,  $10^{-6}$ – $4 \cdot 10^{-3}$  М) практично не впливають на досліджувані ензимні системи. 5,11-Ди(фосфоно-2-піридилметил)аміно-17,23-ди-трет-бутил-27,28-дигідрокси-25,26-дипропоксикалікс[4]арен (каліксарен **C-160**, регіоізомер каліксарену **C-107**,  $10^{-8}$ – $10^{-4}$  М) не впливає як на  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТР-азну, так і на  $\text{Mg}^{2+}$ -АТР-азну активність плазматичної мембрани клітин міометрія. З метою вивчення структурних особливостей каліксаренів **C-107** і **C-160** у зв'язку з дією останніх на АТР-гідролазну активність проведено молекулярне моделювання цих сполук з використанням програми NuserChem 7.01. При цьому виходили із того, що молекули каліксаренів є дицвітеріонами із протонованими амінними атомами азоту та двома депротонованими гідроксилами різних фосфонових фрагментів. При розрахунках здійснено конформаційний пошук оптимальної геометрії молекули (використовували метод молекулярної механіки – силове поле MM+). Для кожного каліксарену відібрано 5 енергетично-мінімізованих конформерів. Загальні енергії цих структур також перерахували напівемпіричним методом (поле CNDO), після чого вибрали по одній структурі з найменшою загальною енергією. Згідно із розрахунками каліксарени **C-107** і **C-160** мають практично однаковий за конформацією регулярний конус. Разом з тим відстані N...N, C...C, P...P (l) між амінофосфоновими фрагментами N–C–P суттєво різняться. При цьому у дистально-заміщеному каліксарені **C-107** обидві фосфонові групи орієнтовано усередину макроциклічної порожнини. У проксимально-заміщеному каліксарені **C-160** фосфонові групи орієнтовано на периферію. Молекулярна порожнина даного макроциклу заповнена одним із піридилних фрагментів. Дійшли висновку, що інгібуючий вплив каліксарену **C-107** на  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТР-азну активність визначається взаємним розташуванням амінофосфонових груп саме у положеннях 5,17 на протилежних фенольних фрагментах верхнього вінця молекули каліксарену, на відміну від каліксарену **C-160**, для якого властива локалізація цих груп у положеннях 5,11. Із використанням методу лазерної кореляційної спектроскопії продемонстровано, що 100 мкМ каліксарен **C-107**, розчинений у 2,5%-му розчині ДМСО, містить мікрочастинки, які характеризуються різним гідродинамічним діаметром – від 100 нм до 10 мкм. У присутності фрагментів плазматичних мембран утворюється певна кількість частинок із розміром, більшим ніж 10 мкм, тобто за наявності каліксаренів відбувається аглютинація фрагментів біологічних мембран з мікрочастинками каліксарену та/або між собою. Отже, в цілому біофізико-хімічні ефекти у гетерогенній системі каліксарен-мембранні фрагменти є вельми складними. Проте для інгібувальної дії каліксарену **C-107**

на мембранозв'язану  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-азну активність суттєвим є саме відносне розташування амінофосфонових груп на верхньому вінці макроциклу у положеннях 5,17, яке, вірогідно, є комплементарним сайту взаємодії цього каліксарену із  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-азою. Отже, просторова будова каліксарен-амінофосфонових кислот є суттєвою для прояву їхньої інгібувальної дії на  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-азну активність у плазматичних мембранах гладеньком'язових клітин.

*Ключові слова:*  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-аза,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТР-аза, плазматична мембрана, гладеньком'язові клітини, міометрій, каліксарени, амінофосфонові кислоти, просторова структура, гідродинамічні розміри.

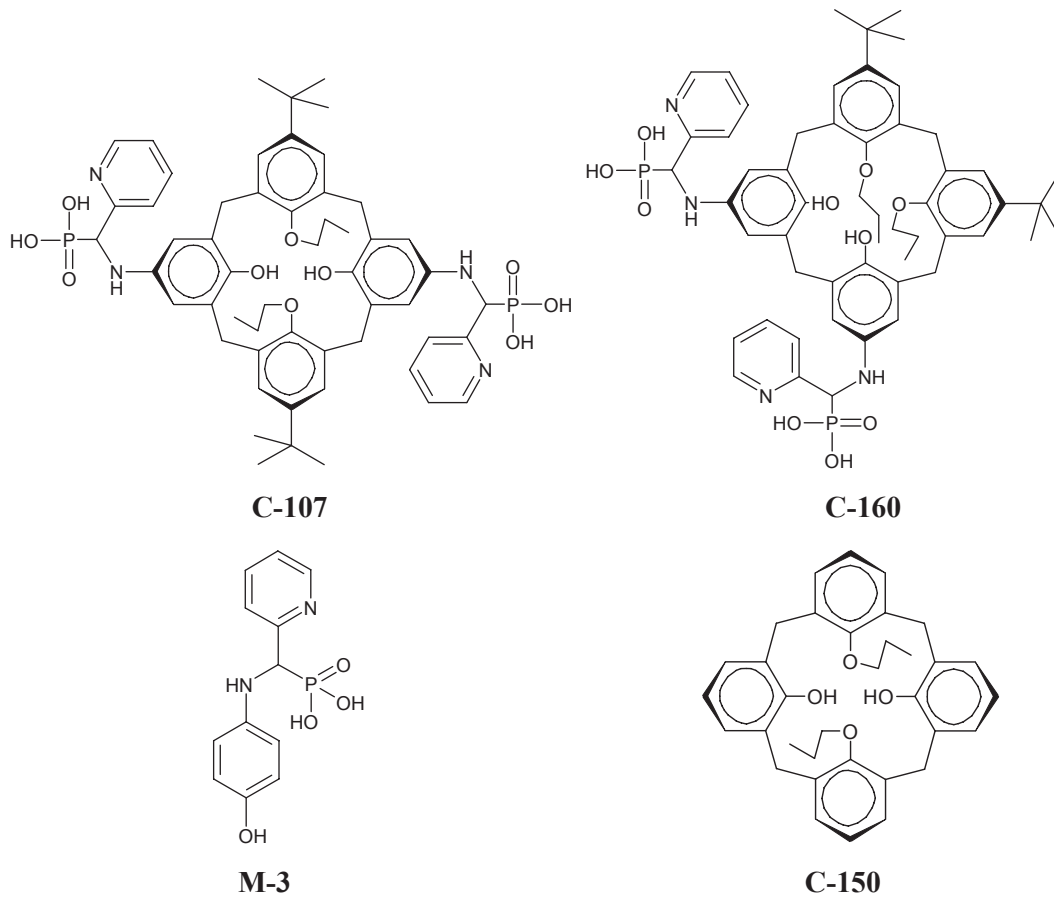
Гладенькі м'язи, скорочення та розслаблення яких є основою функціонування кровоносних та лімфатичних судин, шлунково-кишкового тракту, дихальних шляхів, зіниці ока та матки, відіграють важливу роль у забезпеченні життєдіяльності організму. Відомо, що у контролі скорочення м'яза, зокрема гладенького, суттєва роль належить  $\text{Mg}^{2+}$ -залежним АТР-гідролазним катіон-транспортувальним ензиматичним системам [1,2]. Для плазматичної мембрани клітин гладеньких м'язів властивим є широкий спектр АТР-азної активності. Зокрема фундаментальне значення для життєдіяльності клітин має  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-аза, яка забезпечує підтримку у цитоплазмі високої концентрації  $\text{K}^+$  та низької концентрації  $\text{Na}^+$  [3]. Своєрідне місце серед АТР-гідролаз плазматичної мембрани займає так звана «базальна»  $\text{Mg}^{2+}$ -АТР-аза. Її питома ензиматична активність значно перевищує активність  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-ази та інших АТР-аз [4,5] і є нечутливою до впливу відомих інгібіторів транспортних АТР-аз – уабаїну, олігоміцину, азиду натрію, циклопіазонієвої кислоти тощо [6].

Створення та пошук нових штучних ефективних селективних регуляторів систем АТР-залежного іонного транспортування є актуальним для подальшого з'ясування біохімічних механізмів електро- та фармакомеханічного спряження у м'язах, а також вивчення ролі іонів  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{H}^+$  в його забезпеченні. Згідно з цим каліксаренам в останній час приділяється все більше уваги. Ці синтетичні сполуки є циклічними олігомерами фенолів, молекули яких мають чашоподібну будову з внутрішньомолекулярними високовпорядкованими ліпофільними порожнинами, які утворені ароматичними фрагментами макроциклічного кістяка. Завдяки комплексоутворюючим властивостям каліксаренів та їхнім можливостям функціоналізуватися різними групами вони здатні, подібно до природних рецепторів, розпізнавати та розділяти близькі за властивостями молекули та іони [7,8]. У разі утворення супрамолекулярних комплексів

з біологічно важливими молекулами та іонами каліксарени також впливають на перебіг біохімічних процесів і відповідно можуть бути перспективними молекулярними «платформами» для створення фізіологічно активних сполук нового покоління. Адже каліксаренові матриці мають низьку токсичність [9,10] та імуногенність [11], їх легко синтезувати за відомими методиками [12]. На каліксареновій основі розроблено також ефективні інгібітори ензимів [13] та мембраноактивні сполуки, які здатні впливати на іонні канали [14] або проявляти йонофорні властивості [15]. Ці сполуки легко проникають у клітину через плазматичну мембрану і є досить перспективними для створення нових високоєфективних селективних інгібіторів та активаторів внутрішньоклітинних біохімічних процесів, оскільки здатні оборотно модифікувати функціональну активність окремих протеїнів [7,16].

У попередніх дослідях, які проведено із використанням 14 калікс[4]аренів, нами знайдено, що 5,17-ди(фосфоно-2-піридил-метил)-аміно-11,23-ди-*трет*-бутил-26,28-дигідрокси-25,27-дипропоксикалікс[4]арен (каліксарен **C-107**) здатний ефективно інгібувати активність  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-ази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин матки [17]. Проте властивості інгібувальної дії зазначеного каліксарену на  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-азну активність, зокрема залежність цієї дії від структурної організації каліксаренової молекули, не з'ясовано.

У цій роботі для вивчення ролі структурної організації каліксаренів у проявленні їхньої інгібувальної дії на  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-азу плазматичної мембрани клітин міометрія ми провели дослідження впливу на вказану ензиматичну систему калікс[4]арен-1,3-бісамінофосфонові кислоти – каліксарену **C-107**, її проксимального 1,2-регіоізомеру – каліксарену **C-160**, а також модельних сполук – незаміщеного дипропоксикалікс[4]арену **C-150** і N-(4-гідроксифеніл)-2-піридил-амінофосфонові кислоти **M-3**, структурні формули яких наведено нижче.



### Матеріали і методи

Каліксарени синтезовано у відділі хімії фосфоранів Інституту органічної хімії НАН України. Вибір із 14 каліксаренів саме каліксарену **C-107** (5,17-ди(фосфоно-2-піридил-метил)аміно-11,23-ди-*tert*-бутил-26,28-дигідрокси-25,27-дипропоксикалікс[4]арен), як головного об'єкту нашого дослідження, обумовлено начочною селективністю інгібуючої дії цієї сполуки, що була нами попередньо виявлена на рівні двох  $\text{Ca}^{2+}$ -незалежних  $\text{Mg}^{2+}$ -залежних ензиматичних систем плазматичної мембрани клітин –  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТР-ази та «базальної»  $\text{Mg}^{2+}$ -АТР-ази: ефективно гальмуючи першу з них, зазначений каліксарен практично не впливає на другу. Важливо, що калікс[4]арен **C-107**, по-перше, може мати здатність транспортувати катіони металів через біомембрани за механізмом переносників [18] завдяки утворенню міцних комплексів катіонів із залишками альфа-амінофосфонових кислот [19]; по-друге, може вбудовуватися в ліпідні біомембрани, утворюючи канали для транспортування катіонів завдяки амфіфільному характеру, обумовленому просторовим розділенням гідрофільних кислотних угруповань та ліпофіль-

ного макроциклічного кістяка із алкільними залишками [20–22]; по-третє, має фрагменти альфа-амінофосфонові кислоти, які можуть бути сайтами зв'язування каліксарену з амінокислотними фрагментами іонтранспортуючих протеїнів [23].

Методику синтезу калікс[4]арену **C-107** було описано раніше [17]. У цьому каліксарені амінофосфонові групи на верхньому вінці макроциклу локалізовано у 5,17-положеннях на протилежних (дистальних) фенольних кільцях.

Він складається як би із 3 частин: каліксаренової «чаши» як макроциклічної основи із 4 бензольних кілець, зв'язаних метиленовими групами (еквівалент – сполука **C-150**), і двох амінофосфонових груп, пов'язаних з фенольними фрагментами (еквівалент – сполука **M-3**).

Для визначення ролі структурної організації калікс[4]арену **C-107** та взаємного розташування хімічних угруповань у складі його молекули у проявленні інгібуючої дії на  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТР-азу активність гладеньком'язових клітин матки було синтезовано калікс[4]арен **C-160** (5,11-ди(фосфоно-2-піридил-метил)

аміно-17,23-ди-*трет*-бутил-27,28-дигідрокси-25,26-дипропоксикалікс[4]арен), який відрізняється від каліксарену **C-107** лише взаємним розташуванням замісників на верхньому та

нижньому вінцях макроциклу, тобто є ізомером каліксарену **C-107**. Зокрема, у каліксарені **C-160** амінофосфонові групи у верхньому вінці макроциклу локалізовано у проксималь-

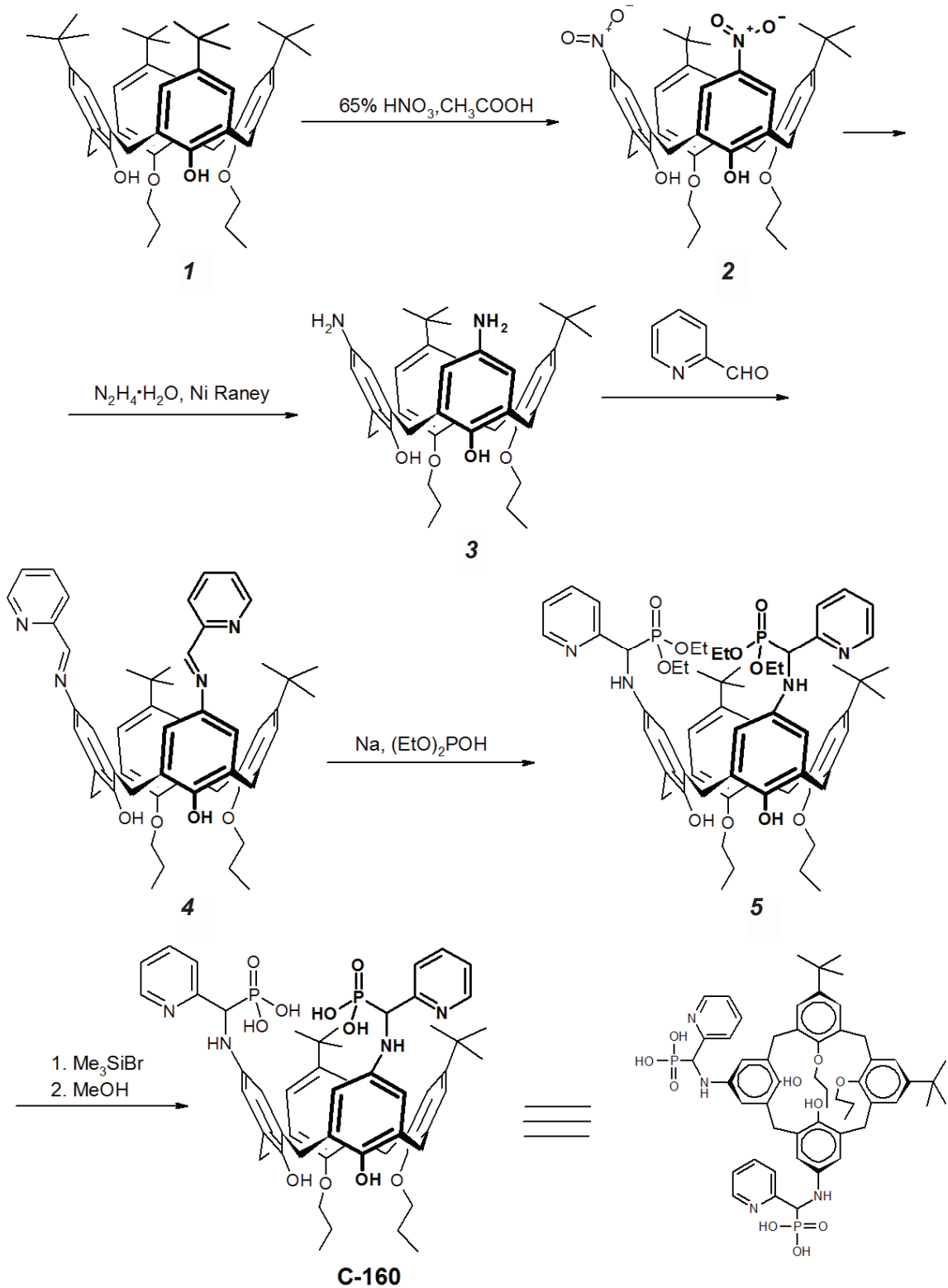


Схема. Синтез каліксарену **C-160**



них **5,11** положеннях, а у випадку каліксарену **C-107** вони локалізовані у дистальних **5,17** положеннях.

Каліксарен **C-160** було синтезовано за такою схемою:

- нітрування 1,2-дипропокси-*трет*-бутил-каліксарену **1** [24] сумішшю концентрованої азотної та льодяної оцтової кислот у сухому хлористому метилені до 1,2-динітрокаліксарену **2**;

- відновлення 1,2-динітрокаліксарену надлишком гідразингідрату у присутності каталізатора нікелю Ренея у киплячому спирті до діамінокаліксарену **3**.

- за взаємодії діамінокаліксарену **3** з великим надлишком піридин-2-карбоксіальдегіду у киплячому бензолі утворюється діамінокаліксарен **4**, який приєднує дві молекули діетилфосфіту у присутності надлишку металічного натрію з утворенням каліксаренамінофосфонату **5**;

- за взаємодії каліксарену **5** із триметилбромсиланом у сухому хлороформі утворюються силілові ефіри, які розкладаються метанолом до каліксарен-1,2-діамінофосфонової кислоти **C-160**.

Структуру каліксарену **C-160** та його попередників — каліксаренів **2–5** підтверджено методами ядерного магнітного резонансу (ЯМР) та інфрачервоної спектроскопії (ІЧ). Використано такі характеристики спектрів ЯМР: триплет (т), дублет (д), синглет (с) та мультиплет (м); м.ч. — мільйонні частинки, як одиниця розмірності шкали; J — частота, Гц;  $\delta$  — шкала ЯМР-спектра, в якій сильнопольним сигналам притаманні менші цифрові значення.

**5,11-Динітро-17,23-ди-трет-бутил-27,28-дигідрокси-25,26-дипропоксикалікс[4]арен 2.** До 18 мл охолодженого (0 °С) розчину 1,2-дипропоксикаліксарену **1** [24] (0,68 ммоль у сухому хлористому метилені) додавали по краплям суміш із 1 мл 65%-ї азотної та 1 мл оцтової кислот. Розчин набував спочатку синє-чорного кольору. З часом після зміни кольору реакційної суміші на коричневий її виливали у 100 мл води, відділяли органічний шар, промивали водою, потім розсолем (по 20 мл) і сушили 12 год над сульфатом натрію. Розчинник відганяли у вакуумі (10 мм рт. ст., 20 °С). До залишку додавали 4 мл метанолу, кип'ятили розчин упродовж 3 год, після охолодження світло-жовтий осад продукту **2** відфільтровували та сушили протягом доби на повітрі. Вихід складав 50%.  $T_{пл}$  302–305 °С. ЯМР  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 299,94 МГц),  $\delta$ , м.ч.: 1,16 с (18H, t-BuH) 1,17 т (J = 7,2 Гц, 6H,

O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) 2,14 м (4H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 3,45 д (J = 12,5 Гц, 1H, ArCH<sub>eq</sub>Ar), 3,46 д (J = 13,1 Гц, 1H, ArCH<sub>eq</sub>Ar), 3,56 д (J = 13,7 Гц, 2H, ArCH<sub>eq</sub>Ar), 3,92 м (2H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 4,15 м (2H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 4,18 д (J = 13,7 Гц, 2H, ArCH<sub>ax</sub>Ar), 4,41 д (J = 12,5 Гц, 1H, ArCH<sub>ax</sub>Ar), 4,64 д (J = 13,1 Гц, 1H, ArCH<sub>ax</sub>Ar), 6,99 д (J = 2,3 Гц, 2H, t-Bu-ArH), 7,19 д (J = 2,3 Гц, 2H, t-Bu-ArH), 7,96 д (J = 2,7 Гц, 2H, O<sub>2</sub>N-ArH), 7,99 д (J = 2,7 Гц, 2H, O<sub>2</sub>N-ArH), 9,69 с (2H, OH). Розраховано для C<sub>42</sub>H<sub>50</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, %: C 70,96; H 7,09; N 3,94. Знайдено, %: C 71,13; H 7,14; N 3,79.

**5,11-Діаміно-17,23-ди-трет-бутил-27,28-дигідрокси-25,26-дипропоксикалікс[4]арен 3.** До суспензії динітрокаліксарену **2** (1,4 ммоль) в абсолютному етанолі (50 мл) додавали гідразингідрат (2,9 мл). Реакційну суміш нагрівали за перемішування до 70 °С, до неї додавали суспензію нікелю Ренея (0,1–0,2 мл) і кип'ятили при перемішуванні суміш до повного розчинення осаду та знебарвлення розчину (7 год). Після охолодження суміші до кімнатної температури (атмосфера аргону) нікель Ренея відфільтровували крізь шар силікагелю (1–1,5 см). Розчинник відганяли у вакуумі (10 мм рт. ст., 80 °С). Для повного видалення води до продукту додавали толуол (20 мл), який потім відганяли у вакуумі (10 мм рт. ст., 110 °С). Залишок, тобто діамінокаліксарен **3**, є безбарвною кристалічною речовиною, яка легко окислюється на повітрі. Вихід складав 90%. Спектр ЯМР  $^1H$ , ( $CDCl_3$ , 299,94 МГц),  $\delta$ , м.ч.: 1,12 т (J = 7,5 Гц, 6H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1,19 с (18H, t-Bu), 2,11 м (4H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 3,12 д (J = 13,2 Гц, 1H, ArCH<sub>eq</sub>Ar), 3,15–3,24 уш. с (4H, NH<sub>2</sub>), 3,27 д (J = 12,9 Гц, 2H, ArCH<sub>eq</sub>Ar), 3,37 д (J = 12,3 Гц, 1H, ArCH<sub>eq</sub>Ar), 3,87 м (2H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 4,03 м (2H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 4,27 д (J = 12,9 Гц, 2H, ArCH<sub>ax</sub>Ar), 4,35 д (J = 13,2 Гц, 1H, ArCH<sub>ax</sub>Ar), 4,45 д (J = 12,2 Гц, 1H, ArCH<sub>ax</sub>Ar), 6,35 д (J = 2,8 Гц, 2H, NH<sub>2</sub>-ArH), 6,38 д (J = 2,8 Гц, 2H, NH<sub>2</sub>-ArH), 6,95 д (J = 2,8 Гц, 2H, t-Bu-ArH), 7,09 д (J = 2,8 Гц, 2H, t-Bu-ArH), 8,28 с (2H, OH). ІЧ спектр (КВг, см<sup>-1</sup>)  $\nu_{NH}$  = 3510,  $\nu_{OH}$  = 3300. Розраховано для C<sub>42</sub>H<sub>54</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, %: C 77,50; H 8,36; N 4,30. Знайдено, %: C 77,86; H 8,23; N 4,02.

**5,11-Ди(2-піридилметиліден)аміно-17,23-ди-трет-бутил-27,28-дигідрокси-25,26-дипропоксикалікс[4]арен 4.** До розчину діамінокаліксарену **3** (1 ммоль) у бензолі (20 мл) додавали альдегід (2,2 ммоль). Реакційну суміш кип'ятили над молекулярними ситами упродовж 15 год. Після її охолодження молекулярні сита відокремлювали, розчинник відганяли у

вакуумі (10 мм рт. ст., 90 °С). Залишок перемішували протягом 3 год у киплячому гексані (10 мл), одержаний продукт **4** (жовто-оранжеву тверду речовину) відфільтровували з гарячого розчину. Сушили на повітрі. Вихід складав 72%.  $T_{пл}$  260 °С (розкл.). ЯМР  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 299,94 МГц),  $\delta$ , м.ч.: 0,85 т (J = 6,5 Гц, 6H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1,15 с (18H, t-BuH), 2,14 м (4H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 3,41 д (J = 13,0 Гц, 1H, ArCH<sub>eq</sub>Ar), 3,43 д (J = 12,6 Гц, 1H, ArCH<sub>eq</sub>Ar), 3,46 д (J = 13,0 Гц, 2H, ArCH<sub>eq</sub>Ar), 3,91 м (2H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 4,11 м (2H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 4,31 д (J = 13,0 Гц, 2H, ArCH<sub>ax</sub>Ar), 4,47 д (J = 13,0 Гц, 1H, ArCH<sub>ax</sub>Ar), 4,50 д (J = 12,6 Гц, 1H, ArCH<sub>ax</sub>Ar), 6,99 д (J = 2,3 Гц, 2H, t-Bu-ArH), 7,10 д (J = 2,4 Гц, 2H, N-ArH), 7,11 д (J = 2,3 Гц, 2H, t-Bu-ArH), 7,11 д (J = 2,4 Гц, 2H, N-ArH), 7,22 и 7,69 два м (4H 4,5-PyrH), 8,11 д (J = 8,0 Гц, 2H, 3 PyrH) 8,55 с (2H N=CH-Pyr), 8,60 д (J = 4,6 Гц, 2H, 6-PyrH), 9,07 с (2H, OH), ІЧ-спектр (KBr, см<sup>-1</sup>)  $\nu_{C=N}$  = 1575,  $\nu_{OH}$  = 3290. Розраховано для C<sub>34</sub>H<sub>60</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>, %: С 78,23; Н 7,29; N 6,76. Знайдено, %: С 78,13; Н 7,14; N 6,78.

**5,11-Ди(діетоксифосфорил-2-піридил-метил)аміно-17,23-ди-трет-бутил-27,28-дигідрокси-25,26-дипропоксикалікс[4]арен 5.** До діетилфосфіту (5 мл) додавали 30 мг натрію (1,304 ммоль), після розчинення якого до отриманого розчину додавали 100 мг (0,12 ммоль) каліксареніміну **4**. Розчин залишали при кімнатній температурі на 18 год, його колір ставав блідо-оранжевим, при цьому з'являлась незначна кількість безбарвного осаду. Реакційну суміш виливали у воду (230 мл), до неї додавали при перемішуванні триетиламін до стійкого в часі рН 8–9 і залишали на 8–12 год при 5 °С. Безбарвний осад відфільтровували і висушували на повітрі. Вихід складав 55%.  $T_{пл}$  118 °С. (RR+SS+RS+SR – стереоізомерні форми) ЯМР  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 299,94 МГц),  $\delta$ , м.ч.: 0,80-1,17 м (72H, P-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1,07 с (18H, t-Bu), 1,08 с (18H, t-Bu), 1,15 с (18H, t-Bu), 1,17 с (18H, t-Bu), 1,19 т (J = 7,5 Гц), 2,05 м (16H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 2,98-3,31 три м (16H, ArCH<sub>eq</sub>Ar), 3,78-4,27 три м (63H, P-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, ArCH<sub>ax</sub>Ar), 4,39 д (J = 13,2 Гц, 1H, ArCH<sub>ax</sub>Ar), 4,73-4,89 чотири д (J = 21,6-22,4 Гц, 8H CH-P(O)), 6,11 д (J = 2,6 Гц, 2H, N-ArH), 6,16 д (J = 2,4 Гц, 2H, N-ArH), 6,30-6,37 м (12H, N-ArH), 6,75 д (J = 1,9 Гц, 2H, t-Bu-ArH), 6,91 м (4H, t-Bu-ArH), 7,00-7,06 м (10H, t-Bu-ArH), 7,15, 7,46, 7,59 три м (24 H, 3,4,5-PyrH) 8,19, 8,29, 8,35 та 8,36 чотири с (8H, OH), 8,61 уш. д (8H, 6-PyrH). ЯМР  $^{31}P$ , ( $CDCl_3$ , 80,95 МГц)  $d$ , м.д.: 22,1 м (HC-P(O)(OEt)<sub>2</sub>). ІЧ спектр (KBr, см<sup>-1</sup>)  $\nu_{P-O}$  965,  $\nu_{C-O-P}$  1027, 1056,  $\nu_{P=O}$  1240,  $\nu_{OH}$  3330,  $\nu_{NH}$  3475. Розраховано для

C<sub>62</sub>H<sub>82</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>P<sub>2</sub>, %: С 67,37; Н 7,48; N 5,07; P 5,60. Знайдено, %: С 67,85; Н 7,53; N 4,89; P 5,79.

**5,11-Ди(фосфоно-2-піридилметил)аміно-17,23-ди-трет-бутил-27,28-дигідрокси-25,26-дипропоксикалікс[4]арен (каліксарен С-160).** До 5 мл розчину амінофосфонату **5** у хлороформі (0,1 ммоль) додавали щойно перегнаний триметилсилілбромід (2 ммоль) і залишали на 48 год. Реакційна суміш набуває яскравого оранжево-червоного кольору. Розчинник та надлишок реагенту відганяли у вакуумі (10 мм рт. ст., 70 °С), склоподібний залишок витримували у вакуумі (0,05 мм. рт. ст., 20 °С) протягом 3 год і розчиняли у метанолі (10 мл). Через 4 год розчинник відганяли у вакуумі (10 мм рт. ст., 80 °С). Отримували жовто-коричневу тверду речовину. Вихід складав 60%.  $T_{пл}$  108 °С. (RR+SS+RS+SR стереоізомерні форми) ЯМР  $^1H$  ( $CD_3OD$ , 299,94 МГц),  $\delta$ , м.ч.: 1,60-1,80 м (96H, t-Bu, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 2,46-2,69 м (16H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 3,72-4,09 м (16H, ArCH<sub>eq</sub>Ar), 4,37-4,86 м (32H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, ArCH<sub>ax</sub>Ar), 5,97-6,13 м (8H, CH-P(O)), 6,85 – 9,26 п'ять м (64H, N-ArH, t-Bu-ArH, PyrH). ЯМР  $^{31}P$ , ( $CD_3OD$ , 80,95 МГц)  $d$ , м.д.: 12,96 м (HC-P(O)(OH)<sub>2</sub>). ІЧ спектр (KBr, см<sup>-1</sup>)  $\nu_{P-O}$  978,  $\nu_{C-O-P}$  1028, 1070,  $\nu_{P=O}$  12605,  $\nu_{NH,OH}$  3330, (широка),  $\nu_{NH}$ , OH 3505 (широка). Розраховано для C<sub>34</sub>H<sub>66</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>P<sub>2</sub>, %: С 65,31; Н 6,70; N 5,64; P 6,24. Знайдено, %: С 66,23; Н 6,94; N 5,12; P 5,96.

Молекулярне моделювання структурних особливостей каліксаренів **С-107** і **С-160** проводили з використанням програми HyperChem 7.01.

### Біохімічні дослідження

Вивчення впливу каліксаренів на активність Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТР-ази у плазматичних мембранах гладеньком'язових клітин проведено у відділі біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України.

Фракцію плазматичних мембран гладеньком'язових клітин виділяли з міометрія свині, як було описано раніше [4,25].

За допомогою методу фотон-кореляційної спектроскопії визначали середній гідродинамічний діаметр та функцію розподілу везикул плазматичної мембрани міометрія за розміром. Дослідження проводили за допомогою лазерного кореляційного спектрометра ZetaSizer-3 (Malvern Instrument, Велика Британія), який обладнаний корелятором (multi computing correlator, type 7032 ce). Суспензію плазматичних мембран готували в середовищі такого складу (мМ): NaCl – 50, KCl – 100, ЕГТА – 1,

HEPES-Tris-буфер – 20 (рН 7,4). Зразок об'ємом 1,5 мл розташовували у циліндричній скляній кюветі діаметром 10 мм. Реєстрацію розсіяного від суспензії під кутом 90° лазерного випромінювання (використовували гелій-неоновий лазер ЛГ-111 потужністю 25 мВт з довжиною хвилі 633 нм) проводили протягом 300–400 сек при кімнатній температурі. З експериментально одержаної автокореляційної функції за допомогою стандартної комп'ютерної програми PCS-Size mode v 1. розраховували функцію розподілу мікрочастинок за гідродинамічним діаметром.

Фракція мембран, яка була одержана за допомогою диференційного центрифугування, містила широкий спектр частинок різного розміру, що розсіювали світло. Проте переважна кількість зареєстрованих частинок мала розміри від ~ 100 до 600 нм. Частинок меншого гідродинамічного діаметра, наявні у досліджуваній фракції, вірогідно є високомолекулярними протеїновими комплексами та невезикульованими фрагментами мембран. У незначній кількості були присутні також великі частинки діаметром до 1 мкм, якими можливо є залишки мітохондрій та агломерати везикул різного походження. Середній (найбільш вірогідний) гідродинамічний діаметр везикул плазматичних мембран міометрія складав  $401 \pm 17$  нм ( $M \pm m; n = 13$ ).

Вміст протеїну в мембранній фракції визначали методом М. Bradford [26] із використанням реакції з реактивом Кумасі G250.

«Загальну»  $Mg^{2+}, Na^+, K^+$ -АТФ-азну активність визначали у фракції плазматичних мембран клітин міометрія, як описано раніше [4], при 37 °С у стандартному середовищі об'ємом 0,4 мл, яке містило (мМ): АТФ – 1,  $MgCl_2$  – 3, NaCl – 125, KCl – 25, ЕГТА – 1, HEPES-Tris-буфер (рН 7,4) – 20,  $NaN_3$  (інгібітор АТФ-ази мітохондрій [27]) – 1, 0,1 мкМ тапсигаргін (селективний інгібітор  $Ca^{2+}, Mg^{2+}$ -АТФ-ази ендо(сарко)-плазматичного ретикулулу [27]) і 0,1%-й дигітонін (фактор перфорації плазматичної мембрани [28]). Кількість протеїну мембранної фракції у пробі – 20–30 мкг, час інкубації – 4 хв. Ензиматичну реакцію ініціювали внесенням у середовище інкубації 50 мкл суспензії плазматичних мембран, а зупиняли при 8 °С додаванням до інкубаційної суміші 1 мл «стоп»-розчину такого складу: 1,5 М натрій оцтовокислий, 3,7%-й формальдегід, 14%-й етанол, 5%-й ТХУ, рН 4,3.

«Базальну»  $Mg^{2+}$ -АТФ-азну активність визначали у тому самому середовищі інкубації, але у присутності 1 мМ убаїну (селективний інгібітор  $Na^+, K^+$ -АТФ-ази [29, 30]).

«Убаїнчутливу»  $Na^+, K^+$ -АТФ-азну активність розраховували за різницею між величинами «загальної» АТФ-азної і  $Mg^{2+}$ -АТФ-азної активністю.

У всіх дослідах контролем на неензиматичний гідроліз АТФ слугувало середовище інкубації, що мало склад, аналогічний описаному вище, але не містило фракції плазматичної мембрани. Контролем на кількість ендогенного неорганічного фосфату ( $P_i$ ) у мембранному препараті було середовище, яке містило тільки фракцію мембранного препарату у водному розчині. Отже питому «загальну» АТФ-азну ензиматичну активність розраховували за різницею між кількістю  $P_i$ , що утворився у середовищі інкубації у присутності та за відсутності фрагментів плазматичної мембрани з урахуванням поправки на неензиматичний гідроліз АТФ та вміст ендогенного  $P_i$  у мембранному препараті. Кількість продукту реакції  $P_i$  визначали за методом W. Rathbun et V. Betlach [31].

При вивченні впливу калікс[4]аренів ( $10^{-8}$ – $10^{-4}$  М) на питому ензиматичну активність  $Na^+, K^+$ -АТФ-ази та  $Mg^{2+}$ -АТФ-ази використовували описане вище стандартне середовище інкубації, до якого додавали аліквоту розчину каліксарену у відповідній початковій концентрації. У дослідах використовували концентровані (4 мМ) вихідні розчини каліксаренів у ДМСО, які далі розводили водою. За 100% («нульову точку») приймали значення АТФ-гідролізу активності за відсутності зазначених речовин у стандартному середовищі інкубації. При вивченні впливу різних концентрацій модельної сполуки **М-3** ( $10^{-8}$ – $4 \cdot 10^{-3}$  М) на питому ензиматичну активність  $Na^+, K^+$ -АТФ-ази та  $Mg^{2+}$ -АТФ-ази до стандартного середовища додавали аліквоту водного розчину модельної сполуки **М-3** у відповідній концентрації.

Статистичний аналіз одержаних даних проводили із залученням загальновідомих стандартних методів із використанням *t*-критерію Стьюдента. Кінетичні та статистичні розрахунки здійснювали за допомогою програмного забезпечення MS Office.

У роботі використано реактиви: АТФ, HEPES, убаїн та тапсигаргін (Sigma, США), tris-гідроксиметил-амінометан (Reanal, Угорщина), дигітонін (Merck, Німеччина), ЕГТА (Fluka, Швейцарія). Інші реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації чда та хч.

## Результати та обговорення

Раніше нами було з'ясовано, що у випадку сарколеми міометрія свині питома активність  $Na^+, K^+$ -АТФ-ази і  $Mg^{2+}$ -АТФ-ази складає від-



повідно  $10,2 \pm 0,7$  та  $18,1 \pm 1,2$  мкмоль  $P_i$ /год на 1 мг протеїну ( $M \pm m$ ;  $n = 7$ ) [4].

У попередніх дослідях, які проведено із використанням широкого загалу калікс[4]аренів (14 сполук), було знайдено, що найефективнішу гальмівну дію на активність  $Na^+, K^+$ -АТР-ази виявляє саме каліксарен **C-107**, який зменшує її активність до 2–3% відносно контролю. У порівняльних дослідях ми також вивчили вплив 100 мкМ каліксарену **C-107** на питому ензиматичну активність «базальної»  $Mg^{2+}$ -АТР-ази. Було показано, що він майже не знижує активність цього ензиму.

Таким чином, каліксарен **C-107** у концентрації 100 мкМ ефективно (на 97–98% стосовно контрольного значення) інгібує активність  $Na^+, K^+$ -АТР-ази у фракції плазматичних мембран міоцитів матки, практично не впливаючи на активність  $Mg^{2+}$ -АТР-ази (гальмівний ефект лише на 10–11%).

Ми дослідили концентраційну залежність впливу каліксарену **C-107** ( $10^{-8}$ – $10^{-4}$  М) на активність  $Na^+, K^+$ -АТР-ази (рис. 2). Виявилось, що цей каліксарен дозозалежно пригнічує активність  $Na^+, K^+$ -АТР-ази (рис. 2, А). У концентрації  $10^{-5}$  М він гальмує активність цього ензиму повністю (залишкова активність – до 2% відносно контрольного значення). Величина уявної константи інгібування  $I_{0,5}$  становить  $33 \pm 4$  нМ, значення коефіцієнта Хілла  $n_H$  складає  $0,38 \pm 0,06$  ( $M \pm m$ ;  $n = 6$ ).

Для визначення ролі хімічних угруповань у складі молекули каліксарену **C-107** в інгібуванні активності  $Na^+, K^+$ -АТР-ази досліджено дві модельні сполуки: каліксарен **C-150** та 4-гідроксіаніліно(2-піридил)метилфосфонова кислота **M-3**. Як видно із структурних формул каліксаренів, каліксарен **C-150** не містить жодних додаткових хімічних угруповань на верхньому вінці макроциклу, тобто по відношенню до досліджуваних каліксаренів він є суто каліксареновою «чашею». Сполука **M-3** містить один фенольний фрагмент та амінофосфонове угруповання, аналогічне до такого самого у складі молекули каліксарену **C-107**.

У порівняльних дослідях із каталітичного титрування  $Na^+, K^+$ -АТР-ази та  $Mg^{2+}$ -АТР-ази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин матки каліксареном **C-107** та його структурними фрагментами **C-150** та **M-3** показано, що каліксарен **C-107** при вельми високих концентраціях ( $10^{-5}$ – $10^{-4}$  М) практично нездатний інгібувати (лише на 10%)  $Mg^{2+}$ -АТР-азну активність. Структурні фрагменти цього каліксарену **C-150** ( $10^{-8}$ – $10^{-4}$  М) та **M-3** ( $10^{-8}$ – $4 \cdot 10^{-3}$  М) у широкому діапазоні концен-

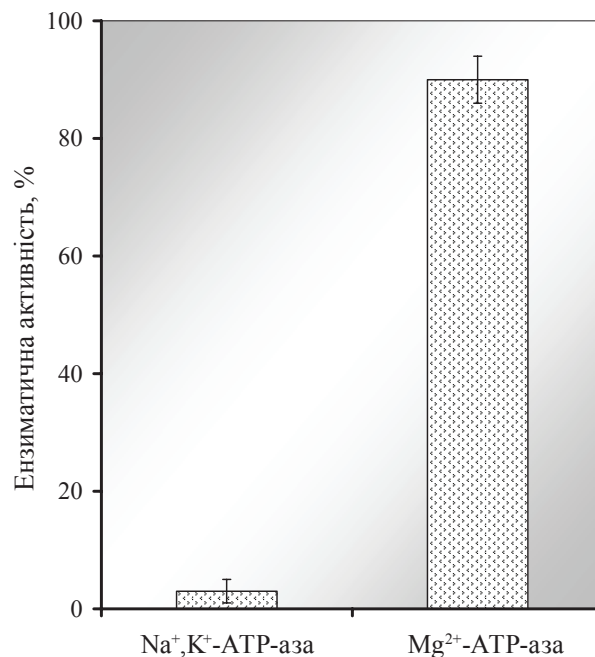


Рис. 1. Порівняльне дослідження впливу каліксарену **C-107** (100 мкМ) на питому ензиматичну активність  $Na^+, K^+$ -АТР-ази та «базальної»  $Mg^{2+}$ -АТР-ази у фракції плазматичних мембран клітин міомерія ( $M \pm m$ ;  $n = 7$ ).

За 100% прийнято значення питомої ензиматичної активності за відсутності каліксарену у середовищі інкубації

трацій практично не впливають на обидві досліджувані ензиматичні системи (рис. 2, А і Б). Слід зазначити, що сполука **M-3** у концентрації  $4 \cdot 10^{-3}$  М незначно (приблизно на 15%) інгібує  $Na^+, K^+$ -АТР-азну (але не на  $Mg^{2+}$ -АТР-азну) активність.

Отже, інгібуюча дія каліксарену **C-107** на активність  $Na^+, K^+$ -АТР-ази передусім пов'язана саме з кооперативним впливом двох просторово орієнтованих на каліксареновій платформі амінофосфонових груп, а не з дією тетрафенольного макроциклу як такого, або обумовлена дією окремого амінофосфонового залишку.

Для подальшого визначення ролі структури макроциклічної платформи каліксарену **C-107** та взаємного розташування на ній амінофосфонових угруповань в інгібуючій дії на  $Na^+, K^+$ -АТР-азну активність гладеньком'язових клітин матки досліджено каліксарен **C-160**, що є регіоізомером каліксарену **C-107**. Ці каліксарени відрізняються положенням амінофосфонових та третбутильних залишків на верхньому вінці каліксаренової чаші та положенням пропоксизалишків на нижньому вінці макроциклу. Саме у каліксарену **C-160** вказані залиш-



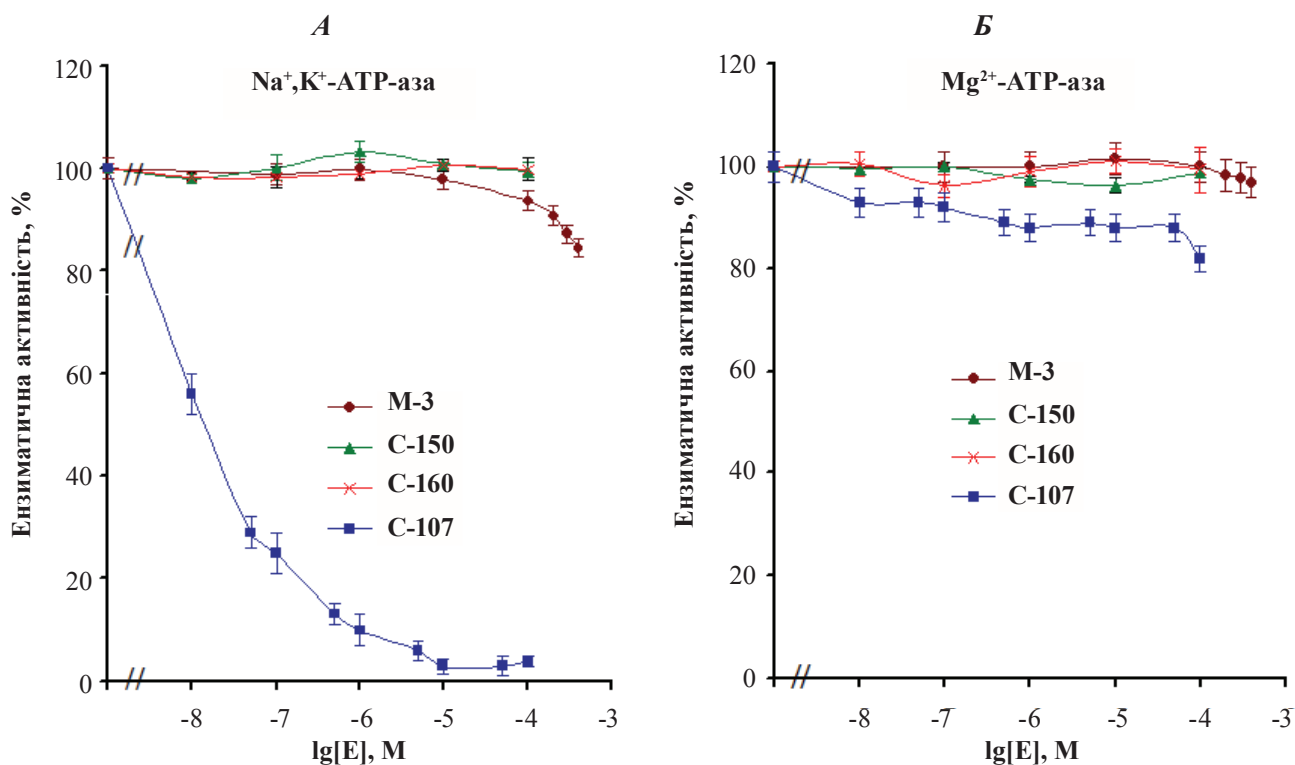


Рис. 2. Порівняльне дослідження концентраційної залежності впливу каліксаренів **C-107**, **C-150** і **C-160**, а також модельної сполуки **M-3** на активність  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-ази та «базальної»  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-ази плазматичних мембран клітин міометрія ( $M \pm m$ ,  $n = 5$ ).

За 100 % прийнято значення питомої активності ензиму за відсутності каліксаренів у середовищі інкубації;  $[E]$  – концентрація ефекторів

ки розташовано у проксимальних положеннях каліксаренової основи, а у каліксарену **C-107** ці самі залишки знаходяться у дистальних положеннях.

Незважаючи на лише зміни положення замісників каліксаренової чаші це призводить до повної втрати інгібувальних властивостей каліксарену **C-160** щодо  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-ази порівняно з каліксареном **C-107**, що показано для широкого діапазону концентрацій цих речовин ( $10^{-8}$ – $10^{-4}$  М). Активність  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-ази також не виявляє чутливості до дії каліксарену **C-160**.

Зважаючи на такий результат, можна припустити, що головну роль у подібній різниці між каліксаренами **C-107** і **C-160** відіграє саме розташування амінофосфонових замісників цих каліксаренів (у випадку каліксарену **C-107** вони знаходяться у положеннях 5,17, а у випадку каліксарену **C-160** у положеннях 5,11). Зміни положення третбутильних та пропоксизалишків можна вважати несуттєвими для інгібування  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-ази, тому що пропоксизалишки на нижньому вінці макроциклу присутні також у складі молекули каліксарену

**C-150**, який нездатний інгібувати АТФ-гідролазну реакцію, а третбутильні замісники взагалі відсутні у каліксаренів **C-97** і **C-99**, які, подібно до каліксарену **C-107**, є високоефективними інгібіторами  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азної активності плазматичних мембран клітин міометрія [17].

З метою вивчення структурних особливостей каліксаренів **C-107** і **C-160** ми провели молекулярне моделювання їхніх конформацій з використанням програми NucleoChem 7.01. При цьому виходили із того, що молекули каліксаренів є дицвітеріонами із протонованими амінними атомами азоту та двома депротонованими гідроксилами різних фосфонових фрагментів. Для уникнення проблеми локальних мінімумів енергії при розрахунках ми провели конформаційний пошук оптимальної геометрії молекули, використавши метод молекулярної механіки (силове поле MM+). Для кожного каліксарену було відібрано 5 енергетично-мінімізованих конформерів. Загальні енергії цих структур також перерахували напівемпіричним методом (поле CNDO), після чого вибрали по одній структурі з найменшими за-

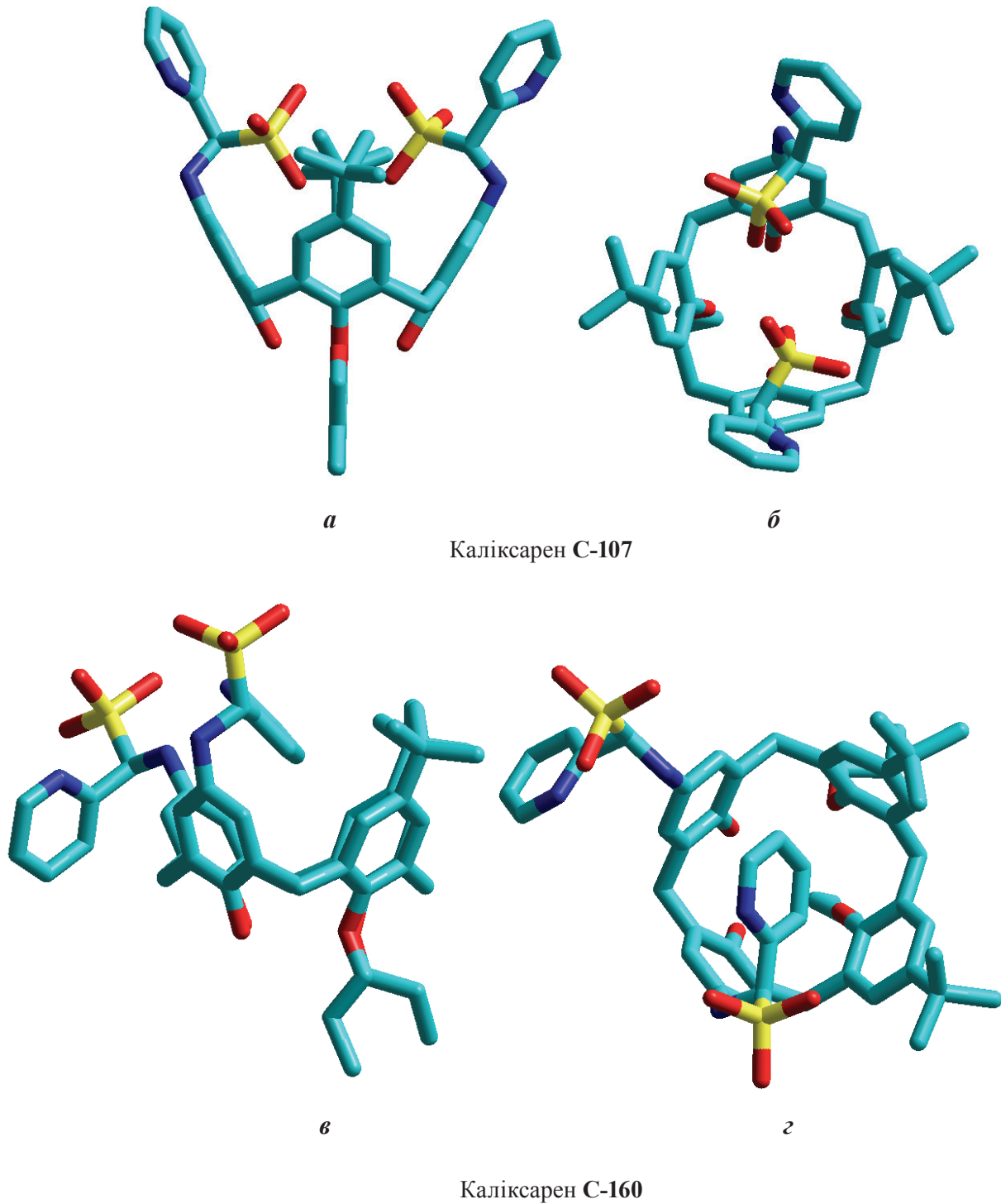


Рис. 3. Розраховані конформації каліксаренів С-107 і С-160. Проекції: а, в – бокові; б, г – верхні. Атоми вуглецю показано зеленим, кисню – червоним, азоту – синім, фосфору – жовтим, атоми водню не показано

гальними енергіями (рис. 3). Різниця в енергії каліксаренів С-107 і С-160 складає 0,1%.

Згідно з розрахунками каліксарени С-107 і С-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 (таблиця). Наприклад, значення  $\Delta l$  для атомів фосфору сягає 0,455 нм. При цьому в дистальнозаміщеному каліксарені С-107 обидві фосфонові

Характеристичні відстані між дистальними та проксимальними фрагментами N–C–P каліксаренів C-107 і C-160

Відстані між атомами	Величина відстані (l), нм		$\Delta l$ , нм
	C-107	C-160	
N...N	0,943	0,673	0,270
C...C	0,775	0,809	0,034
P...P	0,485	0,940	0,455

групи орієнтовано усередину макроциклічної порожнини. У проксимальнозаміщеному каліксарені C-160 фосфонові групи орієнтовано на периферію. Молекулярна порожнина даного макроциклу заповнена одним із піридинних фрагментів.

Таким чином, можна стверджувати, що вплив каліксарену C-107 на  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азну активність визначається оптимальним просторовим розташуванням амінофосфонових груп на каліксареновій платформі, що вірогідно є комплементарним до сайту  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-ази, з яким відбувається взаємодія.

Однак слід зазначити, що за інтерпретації можливого механізму дії каліксаренів на активність  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-ази треба враховувати той факт, що молекули каліксаренів можуть агрегувати між собою та утворювати асоціації із мембранними фрагментами, а зазначений ензим знаходиться у мембранозв'язаному стані.

Дійсно, із використанням методу лазерної кореляційної спектроскопії було визначено, що 100 мкМ розчин каліксарену C-107 у 2,5% ДМСО містить мікрочастинки, які характеризуються різним гідродинамічним діаметром – від 100 нм до 10 мкм. При цьому у 2,5%-му розчині ДМСО без каліксарену C-107 світлорозсіюючих частинок не було виявлено. Відомо, що деякі амфіфільні каліксарени, розчинені в органічному розчиннику, при подальшому розчиненні у воді утворюють так звані «тверді ліпідні частинки», розміри яких залежать від складу розчину. Такі мезоскопічні системи розглядаються деякими дослідниками як транспортувальна форма каліксаренів у разі інтравенозного застосування їх як можливих фармакологічних агентів [32]. Безперечно, присутність таких частинок ускладнює аналіз взаємодії каліксаренів із мембранами, але результати дослідів свідчать про те, що після такої взаємодії може утворюватися певна кількість частинок із розміром, більшим

ніж 10 мкм, тобто у присутності каліксаренів відбувається аглютинація фрагментів біологічних мембран із мікрочастинками каліксарену та/або між собою. Також описано злиття міцел каліксаренів із ліпідними мембранами [33], тому такий шлях збільшення гідродинамічного діаметра мембранних везикул також можливий. На користь того, що каліксарени можуть утворювати комплекси із фрагментами плазматичних мембран, свідчать також дані електронної мікроскопії.

Таким чином, слід вважати, що в цілому біофізикохімічні ефекти у системі «каліксарен – мембранні фрагменти» є вельми складними. Проте для інгібуючої дії каліксарену C-107 на  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азну активність, що визначається у зазначеній гетерогенній системі, суттєвим є саме відносне розташування амінофосфонових груп на верхньому вінці макроциклу. Отже, просторова будова каліксарен-амінофосфонових кислот є суттєвою для прояву їхньої інгібуючої дії на  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азну активність у плазматичних мембранах гладеньком'язових клітин.

Автори висловлюють подяку к.ф.-м.н. В. Ф. Горчеву, к.б.н. В. І. Чернишову за участь у проведенні експериментів із використанням методів лазерної кореляційної спектроскопії та електронної мікроскопії відповідно.

Робота фінансувалась Державним фондом фундаментальних досліджень (гранти № Ф7/426-2001 та 5А/4Б-2005).

#### ПРОСТРАНСТВЕННОЕ СТРОЕНИЕ КАЛИКСАРЕН-АМИНОФОСФОНОВЫХ КИСЛОТ СУЩЕСТВЕННО ДЛЯ ПРОЯВЛЕНИЯ ИХ ИНГИБИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ НА $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азную АКТИВНОСТЬ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК

Т. А. Веклич<sup>1</sup>, А. А. Шкрабак<sup>1</sup>,  
Р. В. Родик<sup>2</sup>, В. И. Бойко<sup>2</sup>,  
В. И. Кальченко<sup>2</sup>, С. А. Костерин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии им. А. В. Палладина  
НАН Украины, Киев;

<sup>2</sup>Институт органической химии  
НАН Украины, Киев;

e-mail: kinet@biochem.kiev.ua; vik@bpci.kiev.ua

В экспериментах, выполненных на суспензии плазматических мембран клеток миометрия, обработанных 0,1%-м раствором дигитонина, исследовали ингибиторное дейс-

твие 5,17-ди(фосфоно-2-пиридилметил)амино-11,23-ди-*трет*-бутил-26,28-ди-гидрокси-25,27-дипропоксикаликс[4]арена **C-107** (указан шифр) на  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азную активність. Этот каліксарен дозозависимо ( $10^{-8}$ – $10^{-4}$  М) угнетает активність  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы, практически не влияя на активність «базальной»  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азы. Величина кажущейся константы ингибирования  $I_{0,5}$  составляет  $33 \pm 4$  нМ, а значение коэффициента Хилла  $n_H$  –  $0,38 \pm 0,06$ . Модельные соединения – незамещенный по верхнему ободу 25,27-дипропоксикаликсарен **C-150** ( $10^{-8}$ – $10^{-4}$  М) – каліксареновая «платформа» и N-(4-гидроксифенил)-2-пиридил-аминофосфоновая кислота **M-3** ( $10^{-8}$ – $4 \cdot 10^{-3}$  М) (аминофосфоновая группа вместе с фенольным фрагментом) – практически не влияют на исследованные энзиматические системы. 5,11-Ди(фосфоно-2-пиридилметил)амино-17,23-ди-*трет*-бутил-27,28-дигидрокси-25,26-дипропоксикаликс[4]арен **C-160** – региоизомер каліксарена **C-107** ( $10^{-8}$ – $10^{-4}$  М) не влияет как на  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азную, так и на  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азную активність плазматической мембраны клеток миомерия.

Сделан вывод, что ингибирующее влияние каліксарена **C-107** на  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азу определяется взаимным расположением аминокислотных групп именно в положениях 5,17 на противоположных фенольных фрагментах верхнего венца молекулы каліксарена в отличие от каліксарена **C-160**, в котором эти группы локализованы в положении 5,11.

**Ключевые слова:**  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-аза,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-аза, плазматическая мембрана, гладкомышечные клетки, миомерий, каліксарены, аминокислотные кислоты, пространственная структура, гидродинамические размеры.

## SPATIAL STRUCTURE OF THE CALIXARENE-AMINOPHOSPHONIC ACIDS IS IMPORTANT FOR THEIR INHIBITION OF THE $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase ACTIVITY IN PLASMATIC MEMBRANE OF SMOOTH MUSCLE CELLS

T. O. Veklich<sup>1</sup>, A. O. Shkrabak<sup>1</sup>, R. V. Rodik<sup>2</sup>, V. I. Boyko<sup>2</sup>, V. I. Kalchenko<sup>2</sup>, S. O. Kosterin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

<sup>2</sup>Institute of Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

e-mail: kinet@biochem.kiev.ua;  
vik@bpcci.kiev.ua

### Summary

It was found that calixarene **C-107** (5,17-diamino(2-pyridyl)methylphosphono-11,23-di-*tert*-butyl-26,28-dihydroxy-25,27-dipropoxycalix[4]arene) could effectively reduce  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity of the myometrium cell plasmatic membranes (the value of the apparent constant of inhibition  $I_{0,5}$  was  $33 \pm 4$  nM) while it practically did not influence the «basal»  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity of the same membrane. In comparative experiments, we have shown that the model calixarene **C-150** – the calixarene «scaffold» (26,28-dihydroxy-25,27-dipropoxycalix[4]arene), and the model compound **M-3** (4-hydroxyaniline(2-pyridine)methylphosphonic acid) – a fragment of the calixarene **C-107**, had practically no influence on the enzymatic activities of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase and  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase over a wide range of concentrations. Hence, the influence of calixarene **C-107** on  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity was caused by the joint action of two aminophosphonic substituents on the upper rim of the calixarene bowl. The isomer of calixarene **C-107** – calixarene **C-160** (5,11-diamino(2-pyridyl)methylphosphono-



17,23-di-tert-butyl-26,28-dihydroxy-25,27-dipropoxycalix[4]arene) also did not influence the  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase and  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activities of plasmatic membrane of myometrium cells. We carried out molecular modeling of calixarenes **C-107** and **C-160** and showed differences in interatomic distance between aminophosphonic substituents of mentioned calixarenes. We came to the conclusion that spatial structure of calixarene **C-107**, namely localization of two aminophosphonic substituents in 5,17 position of the upper rim of this calixarene, is crucial for inhibition of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity. Using laser correlation spectroscopy it was found that the 100  $\mu\text{M}$  solution of calixarene **C-107** and 2.5% DMSO had microparticles with size range from 100 nm to 10  $\mu\text{m}$ . Plasma membrane vesicles had average hydrodynamic diameter  $401 \pm 17$  nm, but after interaction of these vesicles with calixarene **C-107** we have registered the creation of some particles with sizes greater than 10  $\mu\text{m}$ . Therefore membrane vesicles agglutinated to each other and/or to calixarene microparticles.

**Key words:**  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase, plasma membrane, smooth muscle cells, myometrium, calixarenes, aminophosphonic acid, spatial structure, hydrodynamic dimensions.

- Ishida Y., Paul R. J. // J. Smooth Muscle Res. – 2005. – **41**, N 5. – P. 235–45.
- Floyd R., Wray S. // Cell Calcium. – 2007. – **42**, N 4–5 – P. 467–76.
- Geering K. // Am. J. Physiol. Renal Physiol. – 2006. – **290**. – P. 241–250.
- Векліч Т. О., Костерін С. О. // Укр. біохім. журн. – 2005. – **77**, № 2. – С. 66–75.
- Selvendiran K., Sakthisekaran D. // Biomed. Pharmacother. – 2004. – **58**, N 4. – P. 264–267.
- Данилович Г. В., Костерін С. О. // Укр. біохім. журн. – 2001. – **73**, № 6. – С. 30–40.
- Кальченко В. І., Родік Р. В., Бойко В. І. // Журнал органічної та фармацевтичної хімії. – 2005. – **3**, № 4. – С. 13–29.
- Geide I., Soldatov D., Kramarenko O. et al. // J. Struct. Chem. – 2005. – **46**. – P. S28–S32.
- Coleman A. W., Jebors S., Cecillon S. et al. // New J. Chem. – 2008. – **32**. – P. 780–782.
- Da Silva E., Lazar A. N., Coleman A. W. // J. Drug Deliv. Sci. Technol. – 2004. – **14**, N 1. – P. 3–20.
- Paclat M-H., Rousseau C. F., Yannick C. et al. // J. Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry. – 2006. – **55**, N 3–4. – P. 353–357.
- Gutsche C. D. Calixarenes Revisited / Ed. J. F. Stoddart. – Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1998. – P. 233.
- Vovk A. I., Kalchenko V. I., Cherenok S. A. et al. // Org. Biomol. Chem. – 2004. – **2**. – P. 3162–3166.
- Dérand R., Bulteau-Pignoux L., Vesq F. // J. Membr. Biol. – 2003. – **194**, N 2. – P. 109–17.
- Mutihac L. // Curr. Drug Discov. Technol. – 2008. – **5**, N 2. – P. 98–104.
- Perret F., Lazar A. N., Coleman A. W. // Chem. Commun. – 2006. – P. 2425–2438.
- Векліч Т. О., Костерін С. О., Родік Р. В. та ін. // Укр. біохім. журн. – 2006. – **78**, № 1. – С. 62–78.
- Jin T., Kinjo M., Koyama Y. et al. // Langmuir. – 1996. – **12**. – P. 2684–2689.
- Дятлова Н. М., Темкина В. Я., Попов К. И. Комплексоны и комплексонаты металлов. – М.: Химия, 1988. – 544 с.
- Howel E., Lazar A., Da Silva E. et al. // Langmuir. – 2002. – **18**. – P. 1374–1379.
- Yoshino N., Satake A., Kobuke Y. // Angew. Chem. Int. Ed. – 2001. – **40**, N 2. – P. 457–459.
- Tanaka Y., Kobuke Y., Sokabe M. // Ibid. – 1995. – **34**, N 6 – P. 693–694.
- Casnati A., Sansone F., Ungaro U. // Acc. Chem. Res. – 2003. – **36**. – P. 246–254.
- Boyko V. I., Podoprigrorina A. A., Yakovenko A. V. et al. // J. Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry. – 2004. – **50**. – P. 193–197.
- Кондратюк Т. П., Быченко С. Ф., Прищепна А. А. и др. // Укр. біохім. журн. – 1986. – **58**, № 4. – С. 50–56.
- Bradford M. M. // Anal. Biochem. – 1976. – **72**. – P. 248–282.
- Flynn E. R. M., Bradley K. N., Muir T. C., McCarron J. G. // J. Biol. Chem. – 2001. – **276**, N 39. – P. 36411–36418.
- Векліч Т. О., Костерін С. О., Шинлова О. П. // Укр. біохім. журн. – 2002. – **74**, № 1. – С. 42–48.
- Valente R. C., Capella L. S., Monteiro R. Q. et al. // FASEB J. – 2003. – **17**, N 12. – P. 1700–1702.
- Wang H., Haas M., Liang M. et al. // J. Biol. Chem. – 2004. – **279**, N 17. – P. 17250–17259.
- Rathbun W., Betlach V. // Anal. Biochem. – 1969. – **28**, N 1–3. – P. 436–445.
- Gualbert J., Shahgaldian P., Coleman A. W. // Int. J. Pharm. – 2003. – **257**, N 1–2. – P. 69–73.
- Iqbal K. S. J., Allen M. C., Fucassi F. et al. // Chem. Commun. (Camb). – 2007. – N 38. – P. 3951–3953.

Отримано 30.12.2009