

УДК 577.3

**ПОРІВНЯЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ В ДОСЛІДАХ *IN VITRO* ТА *IN VIVO*
ВПЛИВУ КАЛІКСАРЕНУ С107 ТА УБАЇНУ НА Na^+ , K^+ -АТР-азну
АКТИВНІСТЬ У ПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАНАХ
ГЕПАТОЦИТІВ ЩУРІВ**

О. В. ЦИМБАЛЮК¹, С. О. КОСТЕРІН², Р. В. РОДІК³, В. І. КАЛЬЧЕНКО³

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;

²Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;

³Інститут органічної хімії НАН України, Київ;

e-mail: otsimbal@univ.kiev.ua

Проведено порівняльне дослідження впливу *in vitro* та за хронічної дії *in vivo* інгібіторів Na^+ , K^+ -АТР-ази убаїну та каліксарену С107, а також його структурного компонента – фрагмента М3, на Na^+ , K^+ -АТР-азну активність препаратів плазматичних мембран (ПМ) клітин печінки щура. Показана здатність каліксарену С107 та убаїну (обидві речовини у концентрації 1 мМ) пригнічувати Na^+ , K^+ -АТР-азну активність ПМ гепатоцитів *in vitro*. В умовах введення *in vivo* має місце різнорідна дія каліксарену С107 та убаїну на Mg^{2+} , Na^+ , K^+ -АТР-азну та Mg^{2+} -АТР-азну активність препаратів ПМ: загальна активність в умовах введення убаїну в підвищених концентраціях залишається без змін, але вірогідно зростає Mg^{2+} -АТР-азна активність; в аналогічних умовах під дією каліксарену С107 обидва показники знижуються вдвічі порівняно з контролем. Як в умовах *in vitro*, так і *in vivo* структурний компонент дослідженого каліксарену (фрагмент М3) не змінює показники ензиматичної активності. Обговорюються біохімічні механізми ефекторної дії каліксарену С107 на активність Na^+ , K^+ -АТР-ази в ПМ гепатоцитів.

Ключові слова: гепатоцити, убаїн, каліксарен С107, активність Mg^{2+} , Na^+ , K^+ -АТР-ази, Mg^{2+} -АТР-ази, Na^+ , K^+ -АТР-ази *in vitro* та *in vivo*.

Пошук нових високоефективних хімічних сполук, які виявляють високу селективність щодо певних іон-транспортувальних систем клітини, є актуальною проблемою сучасної біохімічної мембранології та фармакології. Натрієва помпа плазматичної мембрани (ПМ) – Na^+ , K^+ -АТР-ази (3.6.3.9) – електрогенний білковий комплекс, який, крім безпосереднього Mg^{2+} , АТР-залежного трансмембранного переносу Na^+ і K^+ , залучений також й до транспортування амінокислот, вуглеводів, фосфату та рідин; ця помпа бере участь і в регуляції низки таких важливих функцій організму, як контроль тонуусу судин, об'єму позаклітинної рідини, виведення надлишку іонів Na^+ із сечею [1–2]. Зараз загальноживаними лікарськими засобами, які застосовуються для корекції патологій серцево-судинної системи, пов'язаних з надлишковим активним функціонуванням Na^+ , K^+ -АТР-ази, є препарати серцевих глікозидів – дигоксин і убаїн.

В останнє десятиріччя було доведено, що в організмі ссавців синтезуються ендogenous кардіотонічні стероїди (убаїн, дигоксин, телочи-

нобуфагін, 19-норбуфалін, дигоксинподібний інгібітор, маринобуфагенін) [2–4]. Їхній гомеостаз надзвичайно важливий для підтримання нормального функціонування багатьох систем організму, зокрема серцево-судинної і видільної. Низка патологій серцево-судинної системи (гіпертензія, кардіоміопатія, серцева недостатність, гіпертрофія міокарда та ендотелію судин) пов'язана з надлишковим рівнем кардіостероїдів. Аналогічні ефекти можна спричинити тривалим ін'єктуванням убаїну в підвищених концентраціях (концентрація у плазмі крові понад 0,9 нМ) [5]. У разі одиничного ін'єктування дія убаїну опосередковується деполаризацією клітин і зростанням внутрішньоклітинної концентрації іонів Na^+ , що, у свою чергу, призводить до активації потенціалкерованих кальцієвих каналів та електрогенного Na^+ / Ca^{2+} -обмінника та, як наслідок, до збільшення входу Ca^{2+} у клітини. Дослідження останніх років показали, що, крім ефекту на клітинний гомеостаз Na^+ через блокування натрієвої помпи, убаїн спричинює зміну експресії більш ніж сотні генів протеїнових продуктів, серед яких, зокрема, є калієві канали

Kv4.2, β -субодиниця гліцинових рецепторів, нереперторна тирозинфосфатаза типу II, β 1-аррестин [5, 6]. Тепер домінують гіпотези, згідно з якими існують два функціональні мембранні пули Na^+ , K^+ -АТФ-ази. За блокування уабаїном активності першого пулу розвивається дисбаланс внутрішньоклітинних концентрацій Na^+ , K^+ та Ca^{2+} , а взаємодія ензиму з уабаїном на рівні другого пулу змінює протеїн–протеїнову взаємодію, спричиняючи активацію відповідних внутрішньоклітинних сигнальних шляхів [3, 5]. Це свідчить про надзвичайну важливість пошуку альтернативних речовин, застосування яких спричиняло б селективне пригнічення функції натрієвої помпи без шкідливих побічних ефектів.

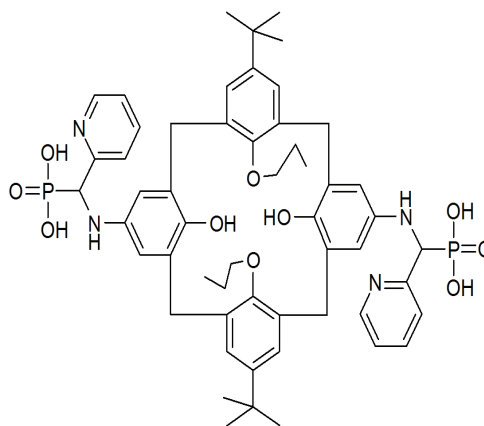
Перспективною основою для створення фармакологічних речовин нового покоління зі спрямованою дією є, зокрема, каліксарени – макроциклічні чашоподібні сполуки, які одержують прецизійною циклоконденсацією пара-заміщених фенолів і формальдегіду [7]. Каліксарени, які містять на верхньому або нижньому вінці макроциклу попередньо організовані біоафінні угруповання, аналогічно до природних ензимів, можуть розпізнавати низку біологічно активних молекул, таких як амінокислоти, дипептиди, протеїни, холін і ацетилхолін, вуглеводи, вітаміни B_2 (рибофлавін) і B_{12} , нуклеотиди, нуклеозиди та короткі фрагменти ДНК. Похідні калікс[4]аренів використовувалися також для розпізнавання протеїнових поверхонь. Здатність імітувати субстрат-рецепторні взаємодії з біоактивними молекулами є підставою проведення біомедичних досліджень похідних каліксаренів [8–10].

Відомо, що окремі каліксарени специфічно модифікують іон-транспортувальні системи ПМ і внутрішньоклітинних органел. Так, було показано, що каліксарени С97, С99 та С107 (наведено шифри) порівняно з уабаїном ефективніше пригнічували активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази ПМ гладеньком'язових клітин матки свині, але вони не змінювали базальну Mg^{2+} -АТФ-азну активність; структурний фрагмент каліксарену С107 – сполука М3 (наведено шифр) – практично не впливала на активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази [11–13]. В дослідях *in vitro* було досліджено кінетичні закономірності інгібуючої дії зазначених каліксаренів на активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази [11,13].

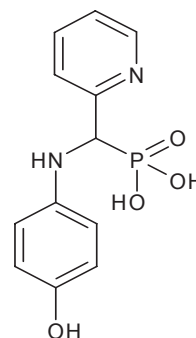
В порівняльних дослідях *in vitro* та *in vivo* нами у цій роботі було вивчено ефекти каліксарену С107 та уабаїну на Na^+ , K^+ -АТФ-азну активність у ПМ гепатоцитів щура.

Матеріали і методи

Каліксарен С107 та його фрагмент-сполука М3 синтезовано у відділі хімії фосфоранів Інституту органічної хімії НАН України (зав. відділу – член-кор. НАНУ проф. В. І. Кальченко) і охарактеризовано за допомогою методів ядерного магнітного резонансу та інфрачервоної спектроскопії. Структурні формули зазначених сполук наведено нижче:



Каліксарен С107



Фрагмент М3

Каліксарен С107: (5,17-ди(фосфоно-2-піридил-метил)аміно-11,23-ди-*трет*-бутил-26,28-дигідрокси-25,27-дипропоксикалікс[4]-арен);

Сполука М3: 4-гідроксіаніліно(2-піридил)-метилфосфонова кислота.

Як можна побачити із структурних формул, у разі каліксарену С107 амінофосфонові групи локалізовані на верхньому вінці макроциклу на протилежних фенольних фрагментах каліксарену, а саме в положеннях 5 та 17. Відзначимо, що каліксарен С107 складається ніби із 3 частин: каліксаренової «чаші» (молекулярна основа з циклічно розташованих 4 бензольних кілець) і двох амінофосфонових груп, пов'язаних із фенольним фрагментом (еквівалент – сполука М3).

Біохімічні експерименти проводили на нелінійних білих щурах-самцях популяції віварію біологічного факультету Київського національного університету імені Тараса Шевченка. За основу взято протокол дослідження, який було розроблено раніше [6]. Експериментальні групи формували зі щурів-самців віком 6–8 тижнів. Тварин довільно ділили на 5 груп: інтактні щури (група № 1); щури, яким ін'єктували фізіологічний розчин (0,9%-й NaCl) із вмістом неполярного розчинника диметилсульфоксиду (ДМСО) (група № 2); а також щури, яким ін'єктували розчини відповідних ефекторів, розведених у фізіологічному розчині: убаїн (група № 3); каліксарен С107 (група № 4); фрагмент М3 (група № 5).

Усі ін'єкційні розчини (групи тварин №№ 2–5) готували так, щоб вони містили ДМСО в концентрації 1% (адже каліксарен С107 та фрагмент М3 є нерозчинними у воді, тому маточні розчини їх готували в ДМСО). За даними літератури ДМСО в такій концентрації не справляє токсичного ефекту на організм щурів [14]. Ін'єкції здійснювали внутрішньом'язово (об'єм одноразової ін'єкції – 50–100 мкл). Сумарна дія зазначених речовин тривала 6,5 місяця. У перший день тваринам груп №№ 3, 4 і 5 було введено речовини в дозах (розрахованих на 1 кг маси тіла тварини): убаїн – 34 мкг/кг, каліксарен С107 – 46,3 мкг/кг, сполука М3 – 23,7 мкг/кг (всіх трьох груп використовували еквімолярні концентрації зазначених речовин, що відповідає значенню 45,8 нмоль/г маси тіла тварини). Потім щурам щодня протягом десяти тижнів вводили речовини відповідно в дозах 27,8, 37,9 та 19,4 мкг/кг (еквімолярні концентрації – 36,3 нмоль/г маси тіла тварини). Наступні чотири місяці усім тваринам три рази на тиждень ін'єктували речовини в концентрації, в якій їх вводили в перший день.

ПМ клітин печінки виділяли методом ультрацентрифугування у градієнті щільності сахарози [15]. Концентрацію протеїну визначали за методом, наведеним у роботі [16].

Na^+, K^+ -АТР-азну активність у фракції ПМ гепатоцитів визначали за різницею між загальною $\text{Mg}^{2+}, \text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-азною активністю і базальною Mg^{2+} -АТР-азною активністю. Останню тестували у присутності 1 мМ убаїну. Середовище інкубації для визначення загальної АТР-азної активності містило (об'єм 0,4 мл): 100 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 5 мМ MgCl_2 , 0,5 мМ EGTA, $5 \cdot 10^{-7}$ М SDS, 20 мМ Hepes-Tris-буфер (pH 7,4 при 37 °C), 1 мМ NaN_3 , 5 мМ АТР та 20 мкг протеїну мембранного препарату. Кількість неорганічного фосфату виз-

начали за методом [17]. Неензиматичний гідроліз АТР оцінювали в середовищі інкубації за відсутності в ньому мембранного препарату. Вміст ендogenous P_i у препараті ПМ визначали в середовищі інкубації, яке не містило АТР. Загальну АТР-азну активність обчислювали як різницю між кількістю P_i , що утворився в середовищі інкубації у присутності й за відсутності препарату ПМ. При цьому було враховано поправку на вміст ендogenous P_i в мембранному препараті. Тривалість інкубації препаратів ПМ при температурі 37 °C становила 4 хв. Ензиматичну реакцію ініціювали введенням до середовища інкубації протеїну, а зупиняли додаванням до інкубаційної суміші 1 мл розчину 10%-ї трихлороцтової кислоти.

Експериментальні дані обробляли методами варіаційної статистики із використанням програми OriginPro 8. Перевірку вибірок на їхню приналежність до нормально розподілених генеральних сукупностей здійснювали за допомогою критерію Шапіро–Уїлка. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами двох вибірок використовували *t*-критерій Стьюдента для незалежних груп даних, у разі одночасного порівняння більшої кількості вибірок – дисперсійний аналіз. Вірогідними вважали результати за умови значення ймовірності *P* менше 5% ($P < 0,05$). Результати представлені як середнє арифметичне \pm стандартна похибка середнього. Кількість дослідів (*n*) відповідає кількості тварин, досліджених у кожному випадку (кожен раз використовували печінку від однієї тварини).

У дослідах використовували реактиви: АТР, Hepes, Tris (всі – виробництва Sigma, США), убаїн (виробництва SERVA, Німеччина), інші реактиви – вітчизняного виробництва марки не нижче чда.

Результати та обговорення

У серії дослідів *in vitro* було перевірено здатність каліксарену С107 та його фрагмента М3 пригнічувати Na^+, K^+ -АТР-азну активність препаратів ПМ гепатоцитів щура. Для цього порівнювали показники загальної ($\text{Mg}^{2+}, \text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-азної), базальної (Mg^{2+} -АТР-азної) та Na^+, K^+ -АТР-азної активності в контролі та в умовах додавання до середовища інкубації мембран інгібітора Na^+, K^+ -АТР-ази – убаїну – або зазначених речовин (всі – у концентрації 1 мМ) (рис. 1).

Виявилось, що загальна $\text{Mg}^{2+}, \text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-азна активність препаратів ПМ печінки інтактних щурів становить $418,7 \pm 16,7$ нмоль P_i /хв на 1 мг протеїну (прийнято за 100%), а за до-

давання 1 мМ убаїну ензиматична активність зменшується до рівня базальної Mg^{2+} -АТР-азної активності – $331,5 \pm 12,4$ нмоль $P_{ii}/xв$ на 1 мг протеїну (до 79%) ($n = 6$). Таким чином, активність убаїнчутливої Na^+, K^+ -АТР-ази становить близько 21% від Mg^{2+}, Na^+, K^+ -АТР-азної активності препаратів. У разі заміни убаїну каліксареном С107 в аналогічній концентрації (1 мМ) базальна (каліксареннечутлива) Mg^{2+} -АТР-азна активність становить $341,0 \pm 11,3$ нмоль $P_{ii}/xв$ на 1 мг протеїну ($n = 6$) (рис. 1). Тобто активність каліксарен-С107-чутливої Na^+, K^+ -АТР-ази становить 19% від загальної Mg^{2+}, Na^+, K^+ -АТР-азної активності. Отже, величини Na^+, K^+ -АТР-азної і Mg^{2+} -АТР-азної активності є однаковими після додавання як убаїну, так і каліксарену С107 ($P > 0,05$), тобто убаїнчутлива та каліксарен-С107-чутлива Na^+, K^+ -АТР-азна активність однакові. У дослідях *in vitro* фрагмент М3 не впливає на Na^+, K^+ -АТР-азну активність (рис. 1).

Таким чином, одержані нами результати щодо здатності каліксарену С107 в концентрації 1 мМ повністю пригнічувати убаїнчутливу Na^+, K^+ -АТР-азну активність препаратів ПМ гепатоцитів щура, цілком узгоджуються з результатами, одержаними у разі використання

препаратів ПМ міоцитів матки свині та сперматозоїдів людини [11, 13].

Розпочинаючи опис результатів досліджень *in vivo*, варто зупинитись на деяких наших спостереженнях, які було виявлено на підготовчому етапі експериментів.

Встановлено, що тривале введення щурам убаїну (група тварин № 3), або еквімолярної кількості каліксарену С107 (група тварин № 4) чи його фрагмента М3 (група тварин № 5), не спричинює загибелі тварин. Разом із тим, щури груп № 4 та № 5 характеризуються підвищеним нервовим збудженням та зниженням маси тіла. Маса печінки тварин різних груп не мала вірогідної різниці, але у щурів групи № 4 спостерігали деяке пожовтіння цього органу. Окрім того, під час виділення фракції ПМ виявилися ще деякі відмінності. У разі фракціонування гомогенату печінки щурів групи № 4 фракція ПМ виявляє розмиті межі на градієнті сахарози, що може свідчити про зміну фізико-хімічних властивостей ПМ гепатоцитів, обумовлену тривалим впливом каліксарену.

Після хронічного введення щурам розчинів ДМСО (група тварин № 2), убаїну (група тварин № 3), каліксарену С107 (група тварин № 4) та фрагмента М3 (група тварин № 5)

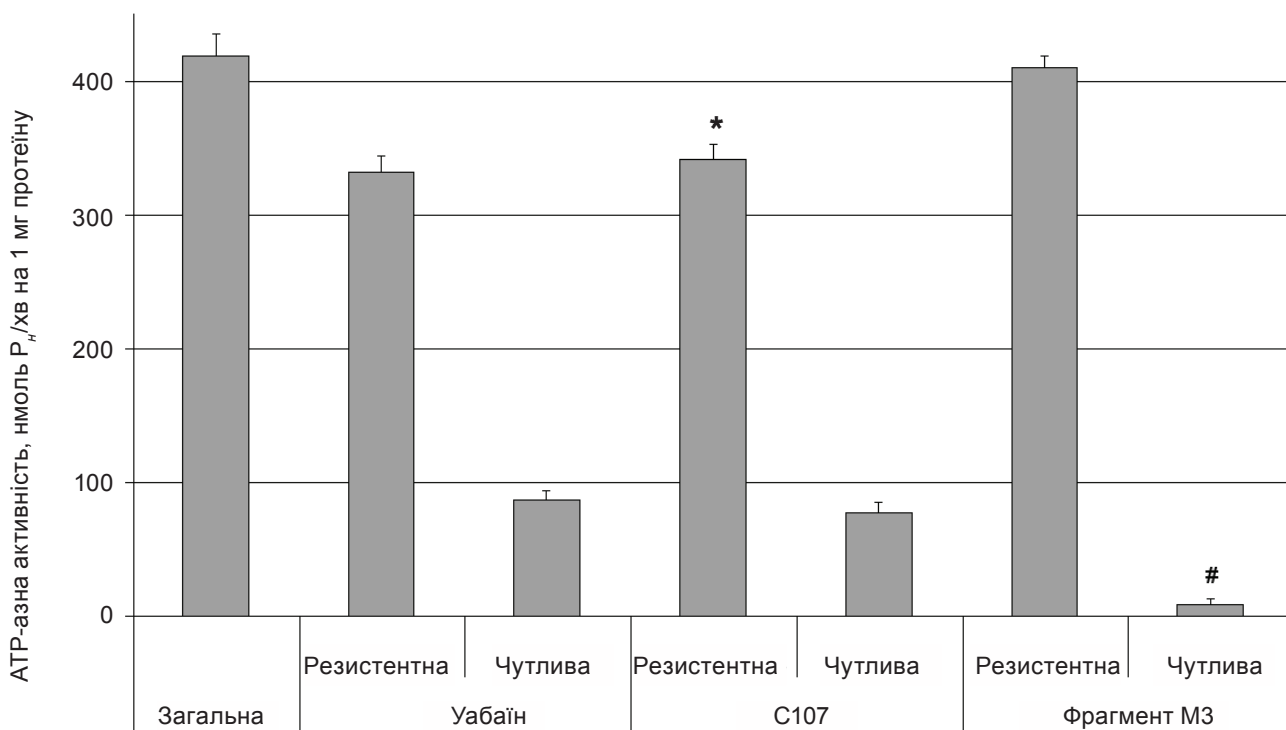


Рис. 1. Вплив убаїну, каліксарену С107 та його структурного фрагмента М3 на Mg^{2+}, Na^+, K^+ -АТР-азну, Mg^{2+} -АТР-азну та Na^+, K^+ -АТР-азну активність плазматичних мембран гепатоцитів щурів ($M \pm m$; $n = 6$). *Відмінності стосовно загальної Mg^{2+}, Na^+, K^+ -АТР-ази вірогідні ($P < 0,05$); # відмінності стосовно убаїнчутливої Na^+, K^+ -АТР-ази вірогідні ($P < 0,05$)

було проведено вимірювання Mg^{2+}, Na^+, K^+ -АТР-азної, Mg^{2+} -АТР-азної та Na^+, K^+ -АТР-азної активності препаратів ПМ гепатоцитів щура. У разі введення диметилсульфоксиду (група тварин № 2) зазначені показники активності не відрізняються від таких групи інтактного контролю (група тварин № 1). Препарати ПМ клітин печінки щурів, яким тривалий час вводили убаїн (група тварин № 3), також характеризуються загальною АТР-азною активністю на рівні контрольних значень ($424,1 \pm 11$, нмоль P_{II}/xv на 1 мг протеїну, $n = 5$). Проте активність базальної Mg^{2+} -АТР-ази зростає порівняно з контролем (рис. 2), а активність Na^+, K^+ -АТР-ази є пригніченою і становить близько 15% відносно цього показника у тварин груп №№ 1 і 2. Отже, досліди *in vivo* показали здатність убаїну не тільки впливати безпосередньо на активність Na^+, K^+ -АТР-ази, але також і на убаїннечутливої АТР-ази (убаїннечутлива натрієва помпа [18]). Не виключено, що в цих експериментальних умовах має місце повне блокування убаїном, який було введено в організм, активності Na^+, K^+ -АТР-ази на тлі зрос-

тання базальної Mg^{2+} -АТР-азної активності. У цьому сенсі варто згадати про наявність у ПМ багатьох тканин і, зокрема у печінці щура K^+ - і убаїннечутливої Na^+ -АТР-ази, що транспортує іони Na^+ симпортно з Cl^- із клітини, активність якої становить близько 25% від активності Na^+, K^+ -АТР-ази [6, 18]; вважається, що вона виконує адаптаційну функцію при добових коливаннях активності ендогенних убаїноподібних речовин. Можна припустити, що зміна кількості та/або активності цього чутливого до внутрішньоклітинної концентрації іонів Na^+ ензиму, у разі блокування Na^+, K^+ -АТР-ази, може компенсувати транспортування натрію і робить внесок в активність базальної Mg^{2+} -АТР-ази гепатоцитів.

Після тривалого введення розчину каліксарену С107 (група тварин № 4) проводили аналіз ензиматичної активності препаратів ПМ клітин печінки щурів. Виявлено зміни активності Mg^{2+} -АТР-ази: вона дорівнює $220,3 \pm 6,1$ нмоль P_{II}/xv на 1 мг протеїну, ($n = 6$, порівняно з контролем $P < 0,05$). Убаїнчутлива Na^+, K^+ -АТР-азна активність повністю при-

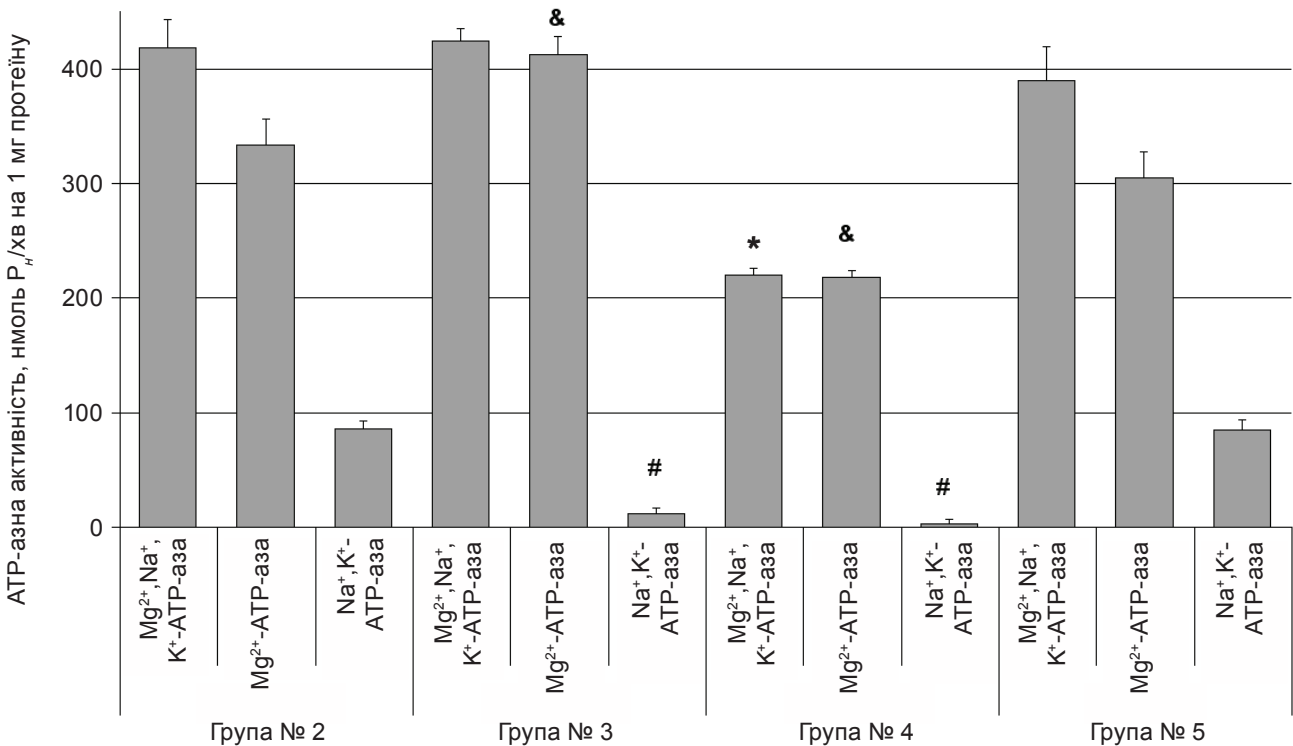


Рис. 2. Mg^{2+}, Na^+, K^+ -АТР-азна, Mg^{2+} -АТР-азна та Na^+, K^+ -АТР-азна активність плазматичних мембран гепатоцитів щурів, яким вводили убаїн (група № 3), каліксарен С107 (група № 4) та його структурний фрагмент М3 (група № 5) ($M \pm m$; $n = 5-6$); за контроль прийнято відповідні показники у групі щурів, яким вводили ДМСО (група № 2). *Відмінності стосовно Mg^{2+}, Na^+, K^+ -АТР-ази щурів групи 2 вірогідні ($P < 0,05$); & відмінності стосовно Mg^{2+} -АТР-ази щурів групи 2 вірогідні ($P < 0,05$); # відмінності стосовно Na^+, K^+ -АТР-ази щурів групи 2 вірогідні ($P < 0,05$)

гнічена внаслідок введення каліксарену С107 в організм (рис. 2). Таким чином, блокування каліксареном С107 убаїнчутливої Na^+, K^+ -АТР-ази *in vitro* (див. вище) відтворюється також в експериментах *in vivo*.

Препарати ПМ гепатоцитів, виділених із печінки щурів, яким вводили структурний фрагмент каліксарену С107 (речовину М3), виявляють тенденцію до зниження загальної АТР-азної активності ($390,0 \pm 29,2$ нмоль $\text{P}_i/\text{хв}$ на 1 мг протеїну, $n = 5$) порівняно з контролем, яка однак не підтверджена статистично ($P > 0,05$). Разом з тим, Na^+, K^+ -АТР-азна активність у препаратах ПМ зберігає чутливість до убаїну. Отже, у разі використання *in vivo*, фрагмент М3, як і у разі *in vitro* (див. вище), також не впливає на функціонування натрієвої помпи ПМ клітин печінки щурів.

Проаналізуємо наведені вище експериментальні дані, одержані у дослідах *in vivo*. Ефект пригнічення АТР-азної активності плазматичних мембран гепатоцитів щурів, яким вводили каліксарен С107 та убаїн, може бути спричинений декількома факторами. По-перше, за хронічного введення підвищених концентрацій цих речовин дійсно можливо має місце блокування натрієвої помпи. Зокрема, на користь даної гіпотези свідчать результати експериментів [6, 19], згідно з якими активність Na^+, K^+ -АТР-ази різних тканин щура (у т. ч. і печінки) вірогідно (з різницею амплітуд активності у два рази) варіює протягом доби і це пов'язано з такими самими ритмами зростання рівня ендогенного убаїну в судинному руслі. Також, ймовірно, що у процесі препаративних процедур значні концентрації убаїну і каліксарену С107, які мають бути в гомогенаті, роблять внесок у пригнічення Na^+, K^+ -АТР-ази.

По-друге, тривале введення тваринам інгібіторів натрієвої помпи (принаймні убаїну) може призводити до зміни експресії ізоформ α - і β -субодиниць цього ензиму в різних тканинах [20–22], і у клітинах печінки, зокрема.

Можна також припустити, що у разі хронічного використання підвищених концентрацій досліджених речовин, і, зокрема убаїну, виникає гіпертонічний ефект. В цих умовах, за даними літератури [2, 23, 24], реалізується наступний сигнальний ланцюг: убаїн спричинює підвищення рівня ендотеліну-1 у плазмі крові, що може призводити до зниження постачання крові і кисню у клітини печінки. Відомо, що за гіпоксичних станів у мембранах гепатоцитів значно пригнічується активність Na^+, K^+ -АТР-ази аж до повної її втрати (але без зміни мембранного потенціалу) [25, 26]. Не можна виключати, що часткове

пригнічення Na^+, K^+ -АТР-азної активності за умов хронічного введення щурам убаїну могло спричинитись ймовірними гіпоксичними ефектами.

Разом з тим, для щурів, яким тривалий час вводили убаїн (група 3), варто відмітити вірогідне підвищення рівня базальної Mg^{2+} -АТР-азної активності, що, як уже зазначалося, може мати адаптаційний характер. Також можна припустити інший ланцюг подій, який спричиняє такий самий ефект. Дані літератури свідчать [27], що тривале введення щурам підвищених доз убаїну зумовлюють зростання (певною мірою ендотелін-1-залежне) в ендотеліоцитах активності ензимів фосфоліпази А2 і циклооксигенази-2 і, як наслідок, концентрації арахідонової кислоти (АА), простагландинів та тромбоксану А2. В інших дослідженнях, проведених також на щурах, виявлено, що підвищення рівня простагландинів, зокрема Е2, *in vivo* зумовлює зниження рівня експресії, кількості молекул ензиму та активності Na^+, K^+ -АТР-ази ПМ гепатоцитів [28]. На фракції синапсомозку щура показано [29], що в умовах підвищення рівня АА спостерігається простагландинопосередкований ефект «інвертування» Mg^{2+} -АТР-азної активності: базальна активність у присутності убаїну виявляється вищою від загальної активності. Отже, сукупність вищенаведених даних літератури дозволяє висунути припущення, що принаймні частково ефекти *in vivo* реалізуються за рахунок активації ланки синтезу АА і простагландинів.

Таким чином, у наших дослідах *in vitro* показана здатність каліксарену С107 пригнічувати Na^+, K^+ -АТР-азну активність в ПМ клітин печінки. Ці результати узгоджуються із даними, одержаними на ПМ клітин міометрія свині та сперматозоїдів людини [11, 13]. Ефект блокування натрієвої помпи убаїном та С107 виявлений і в дослідах *in vivo*. Тобто каліксарен С107 зберігає свої інгібіторні властивості щодо Na^+, K^+ -АТР-ази в умовах цілісного організму. Заслуговує на увагу особливість дії С107: окрім блокування натрієвої помпи ця речовина зумовлює значне (у два рази) зниження загальної АТР-азної активності фракції ПМ гепатоцитів. Такий ефект може бути пов'язаний, зокрема, зі здатністю багатьох каліксаренів взаємодіяти з ліпідами мембран [30]. Таким чином, можна припустити, що механізми впливу досліджених речовин (каліксарену С107 та убаїну) на натрієву помпу в умовах *in vivo* не ідентичні, тому є перспективним подальше вивчення особливостей дії каліксарену С107 в умовах організму.

Автори висловлюють подяку співробітнику Інституту рибного господарства В. Ю. Філіпову за допомогу у проведенні препаративних процедур для одержання ПМ гепатоцитів.

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ
В УСЛОВИЯХ *IN VITRO* И *IN VIVO*
ВЛИЯНИЯ УБАИНА И
КАЛИКСАРЕНА C107 НА Na⁺,K⁺-
АТР-азную АКТИВНОСТЬ В
ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАНАХ
ГЕПАТОЦИТОВ КРЫС**

О. В. Цимбалюк¹, С. А. Костерин²,
Р. В. Родик³, В. И. Кальченко³

¹Киевский национальный университет
имени Тараса Шевченко, Украина;

²Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев;

³Институт органической химии
НАН Украины, Киев;
e-mail: otsimbal@univ.kiev.ua

Проведено сравнительное изучение влияния *in vitro* и при хроническом действии *in vivo* ингибиторов Na⁺,K⁺-АТР-азы убаина и каликсарена C107, а также структурного компонента этого каликсарена – фрагмента М3, на показатели Na⁺,K⁺-АТР-азной активности препаратов плазматических мембран (ПМ) гепатоцитов крысы. Показана способность каликсарена C107 и убаина (оба вещества в концентрации 1 мМ), угнетать Na⁺,K⁺-АТР-азу ПМ гепатоцитов *in vitro*. В условиях *in vivo* имеет место разнородное действие повышенных концентраций каликсарена C107 и убаина на Mg²⁺,Na⁺,K⁺-АТР-азную и Mg²⁺-АТР-азную активность препаратов ПМ: общая активность в условиях введения повышенных концентраций убаина остается без изменений, но достоверно возрастает Mg²⁺-АТР-азная активность; в аналогичных условиях под действием каликсарена C107 оба показателя снижаются в два раза по сравнению с контролем. Как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*, показатели исследуемой энзиматической активности при действии структурного компонента исследуемого каликсарена – фрагмента М3 – не изменяются. Обсуждаются биохимические механизмы эффекторного действия каликсарена C107 на активность Na⁺,K⁺-АТР-азы в ПМ гепатоцитов.

Ключевые слова: гепатоциты, убаин, каликсарен C107, активность Mg²⁺,Na⁺,K⁺-АТР-азы, Mg²⁺-АТР-азы, Na⁺,K⁺-АТР-азы в условиях *in vitro* и *in vivo*.

**COMPARATIVE STUDY IN THE
IN VITRO AND *IN VIVO* EXPERIMENTS
OF INFLUENCE OF OUABAIN AND
CALIXARENE C107 ON Na⁺,K⁺-ATPase
ACTIVITY OF RAT HEPATOCYTE
PLASMATIC MEMBRANES**

O. V. Tsymbalyuk¹, S. O. Kosterin²,
R. V. Rodik³, V. I. Kalchenko³

¹Taras Shevchenko Kyiv National University, Ukraine;

²Palladin Institute of Biochemistry, National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

³Institute of Organic Chemistry, National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: otsimbal@univ.kiev.ua

S u m m a r y

The comparative study of influence of ouabain and calixarene C107, and the structure component of this calixarene – fragment M3, in the conditions of *in vitro* and chronic action *in vivo* on Na⁺,K⁺-ATPase activity was carried out on the fractions of plasmatic membranes (PM) of the rat hepatocytes. A general property in the conditions *in vitro* is the ability of calixarene C107 and ouabain (both substances were in the concentration of 1 mM) to inhibit PM Na⁺,K⁺-ATPase of rat hepatocytes. However, in the case of activities of calixarene C107 and ouabain in the conditions *in vivo* heterogeneous action on Mg²⁺-ATPase and Mg²⁺,Na⁺,K⁺-ATPase activities takes place: total activity in the conditions of injection of increased concentrations of ouabain remains without changes, but Mg²⁺-ATPase activity significantly grows; in analogous conditions under the action of calixarene C107 both these activities decrease twice in comparison with control. Both under the *in vitro* and *in vivo* conditions, M3 fragment (the structural component of C107) does not change the values of investigated enzymatic activities. The biochemical mechanisms of calixarene C107 action on Na⁺,K⁺-ATPase activity in PM of rat hepatocytes are discussed.

Key words: hepatocytes, ouabain, calixarene C107, activity *in vitro* and *in vivo* Mg²⁺,Na⁺,K⁺-ATPase, Mg²⁺-ATPase, Na⁺,K⁺-ATPase.

1. Xie Z., Askari A. // Eur. J. Biochem. – 2002. – 269. – P. 2434–2439.
2. Bagrov A. Y., Shapiro J. I., Fedorova O. V. // Pharmacol. Rev. – 2009. – 61(1). – P. 9–38.
3. Schoner W. // Eur. J. Biochem. – 2002. – 269. – P. 2440–2448.
4. Kawamura A., Guo J., Itagaki Y. et al. // PNAS. – 1999. – 96. – P. 6654–6659.

5. Schoner W., Scheiner-Bobis G. // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. – 2007. – **293**. – P. C509–C536.
6. Ren Y., Huang R., Lu Z. // Acta Pharmacol. Sin. – 2006. – **27**(2). – P. 165–172.
7. Gutsche C. D. Calixarenes Revisited, The Royal Society of Chemistry: Cambridge (1998).
8. Rodik R. V., Boyko V. I., Kalchenko V. I. // Curr. Med. Chem. – 2009. – **16**. – P. 1630–1655.
9. de Fatima A., Fernandes S.A., Sabino A. A. // Curr. Drug Discovery Technol. – 2009. – **6**. – P. 151–167.
10. Coleman A. W., Perret F., Moussa F. et al. // Top Curr. Chem. – 2007. – **277**. – P. 31–88.
11. Векліч Т. О., Шкрабак О. А., Костерін С. О. та ін. // Укр. біохім. журн. – 2006. – **78**, № 6. – С. 53–63.
12. Цимбалюк О. В., Онуфрійчук О. В., Векліч Т. О. та ін. // Фізика живого. – 2006. – **14**, № 1. – С. 53–72.
13. Векліч Т. О., Костерін С. О., Родік Р. В. та ін. // Укр. біохім. журн. – 2006. – **78**, № 1. – С. 70–74.
14. Cavaletti G., Oggioni N., Sala F. et al. // Toxicol Lett. – 2000. – **118**(1–2). – P. 103–107.
15. Song C. S., Rubin W., Rifkind A. B., Kappas A. // J. Cell Biology. – 1969. – **41**. – P. 124–132.
16. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. Biol. Chem. – 1951. – **93**. – P. 265–275.
17. Rathbun W. B., Betlach M. V. // Anal. Biochem. – 1969. – **28**(1). – P. 436–445.
18. Reyes A., Galindo M. M., Garcia L. et al. // Physiol. Res. – 2009. – **58**(5). – P. 693–699.
19. Proverbio F., Reyes A., Galindo M. M. et al. // Nefrol. Venez. – 2004. – **6**. – P. 19–22.
20. Xie Z., Cai T. // Mol. Interv. – 2003. – **3**(3). – P. 157–168.
21. Schwinger R. H., Bubdgaard H., Muller-Ehmsen J., Kjeldsen K. // Cardiovasc. Res. – 2003. – **57**. – P. 913–920.
22. Shamraj O., Grupp I., Grupp G. et al. // Ibid. – 1993. – **72**. – P. 2229–2237.
23. Zahler R., Gilmore-Hebert M., Baldwin J. et al. // Biochim. Biophys. Acta. – 1993. – **1149**. – P. 189–194.
24. Янчук П. І., Русіничук Я. І., Терехов А. А. // Фізiol. журн. – 2008. – **54**, № 6. – С. 38–41.
25. Krumschnabel G., Biasi C., Schwarzbaum P. J., Wieser W. // Am. J. Physiol. – 1996. – **270**, N 3, Pt.2. – P. R614–R620.
26. Buck L. T., Hochachka P. W. // Ibid. – 1993. – **265**, N 5, Pt. 2. – P. R1020–R1025.
27. Xavier F. E., Davel A. P., Fukuda L. E., Rossoni L. V. // J. Hypertens. – 2009. – **27**(6). – P. 1233–1242.
28. Kreydiyyeh S. I., Riman S., Serhan M., Kassardjian A. // Prostaglandins Other Lipid Mediat. – 2007. – **83**(4). – P. 295–303.
29. Okun I. M., Lyskova T. I., Aksentsev S. L., Konev S. V. // Gen. Physiol. Biophys. – 1992. – **11**(6). – P. 589–598.
30. Gualbert J., Shahgaldian P., Coleman A. W. // Int. J. Pharm. – 2003. – **257** (1–2). – P. 69–73.

Отримано 22.03.2010