

## ВПЛИВ КАЛІКСАРЕНУ С-107 НА КІНЕТИЧНІ ПАРАМЕТРИ $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-АЗИ ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ МІОЦИТІВ МАТКИ

Т. О. ВЕКЛИЧ<sup>1</sup>, О. А. ШКРАБАК<sup>1</sup>, Р. В. РОДІК<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 перфорованих плазматичних мембран клітин міометрія, досліджували інгібуючу дію каліксарену С-107 (5,17-ди(фосфоно-2-піридилметил)аміно-11,23-ди-трет-бутил-26,28-дигідрокси-25,27-дипропоксикалікс[4]арен) на кінетичні характеристики  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-азної активності.

Показано, що каліксарен С-107, інгібуючи  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-азу, не змінює кінетичні параметри залежності швидкості реакції ( $K_m, n_H$ ) від концентрації субстрату. Константа активації ензиму хлоридом магнію  $K_a$  має складний двофазний характер залежності від концентрації каліксарену С-107 – збільшується вдвічі з ростом концентрації каліксарену С-107 до 50 нМ, а за подальшого підвищення концентрації каліксарену знижується до майже контрольного рівня. При цьому величина коефіцієнта кооперативності Хілла  $n_H$  активуючої дії  $\text{MgCl}_2$  практично не змінюється у присутності каліксарену С-107. Як АТР, так і  $\text{MgCl}_2$  не впливає на константу інгібування  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-ази каліксареном С-107, але збільшення концентрації зазначених речовин призводить до зростання коефіцієнта кооперативності  $n_H$  інгібування АТР-азної реакції каліксареном С-107.

*Ключові слова:* каліксарени,  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-аза, плазматична мембрана, гладеньком'язові клітини, міометрій, кінетичні властивості АТР-ази.

Спрямований синтез та вивчення властивостей ефекторів, які здатні проникати через плазматичну мембрану (ПМ) і з високою спорідненістю та селективністю змінювати ензиматичну або транспортну активність окремих внутрішньоклітинних мембранозв'язаних та розчинних протеїнів – одна із найважливіших задач сучасної біоорганічної, біофізичної та біологічної хімії. Дійсно, створення нових високоефективних селективних інгібіторів та активаторів є дуже необхідним для подальшого дослідження іонних, молекулярних та мембранних механізмів внутрішньоклітинної сигналізації. До таких модуляторів можна віднести циклічні олігомери фенолів – каліксарени. Вони виявляють низьку токсичність [1, 2] та імуногенність [3, 4], а деякі з них – бактерицидну, противірусну, антитромботичну та протипухлинну властивість. Зазначені сполуки (принаймні, деякі з них) демонструють мембранотропну дію, добре проникають через ПМ, а також слугують ефекторами (інгібіторами та активаторами) ензиматичних, рецепторних та транспортних мембранозв'язаних протеїнів.

$\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-аза (натрієва помпа) – електрогенна  $\text{Mg}^{2+}, \text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-залежна транспортна система ПМ, яка здійснює активне перенесення одновалентних іонів Na і K і тим самим підтримує їхні електрохімічні градієнти, які є необхідними для нормального функціонування клітини [5–8].

Таким чином, з одного боку, вивчення біохімічних аспектів регуляції активності  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-ази являє собою значний інтерес для розуміння іонних, молекулярних та мембранних механізмів контролю функцій різноманітних тканин, у тому числі і скорочення м'язової тканини. З іншого боку, доведено, що у разі таких патологій, як діабет та ішемія відбувається зниження активності натрієвої помпи [9]. Тому зрозуміло, що пошук оборотних ефекторів – селективних інгібіторів та активаторів, – які були б здатні спрямовано впливати на  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-азу, відновлюючи її активність при патологічних станах, є вельми перспективним не лише з фундаментальної, але й з практичної точки зору.

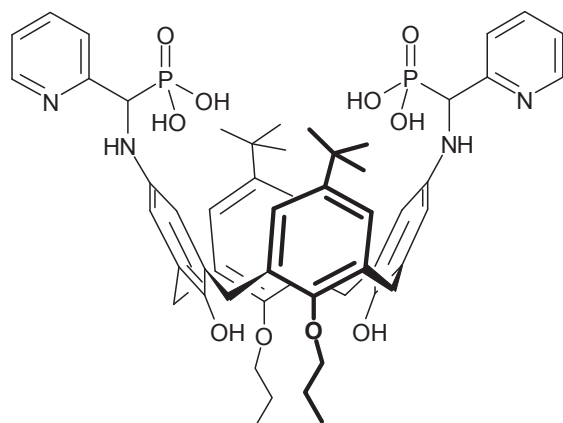
У попередніх дослідженнях, виконаних на препараті ПМ міоцитів матки, було проде-

монстровано, що каліксарен **C-107** ефективно інгібує ензиматичну активність убаїнчутливої  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-ази, практично не впливаючи на активність «базальної» убаїнрезистентної  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-ази [10].

У цій роботі ми поставили перед собою завдання дослідити вплив каліксарену **C-107** на залежність  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азної активності ПМ клітин міометрія від концентрації АТФ та іонів  $\text{Mg}$ .

### Матеріали і методи

Каліксарен **C-107** (5,17-ди(фосфоно-2-піридилметил)аміно-11,23-ди-трет-бутил-26,28-дигідрокси-25,27-дипропоксикалікс[4]-арен (див. нижче), був синтезований та охарактеризований із використанням методів ЯМР та інфрачервоної спектроскопії у відділі хімії фосфоранів Інституту органічної хімії НАН України (зав. відділом – член-кор. НАНУ В. І. Кальченко). Методику синтезу зазначеного каліксарену було описано раніше [10].



Каліксарен **C-107**

Ензиматичні дослідження були проведені у відділі біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України (зав. відділом – член-кор. НАНУ С. О. Костерін).

Фракцію ПМ гладеньком'язових клітин виділяли з міометрія свині, як було описано раніше [11, 12].

Вміст протеїну в мембранній фракції визначали методом М. Bradford із використанням реактиву кумасі – G250 [13].

«Загальну»  $\text{Mg}^{2+}, \text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азну активність визначали у фракції ПМ клітин міометрія, як описано раніше [11], при  $37^\circ\text{C}$  у стандартному середовищі (об'єм – 0,4 мл), яке містило (мМ): 1 АТФ, 3  $\text{MgCl}_2$ , 125  $\text{NaCl}$ , 25  $\text{KCl}$ , 1 ЕГТА, 20 Непес-трис-буфер (рН 7,4), 1  $\text{NaN}_3$  (інгібітор АТФ-ази мітохондрій [14]), 0,1 мкМ тапсигаргін (селективний інгібітор

$\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФ-ази ендо(сарко)-плазматичного ретикулуму [14]) і 0,1% дигітонін (фактор перфорації ПМ [15]). Кількість протеїну мембранної фракції у пробі – 20–30 мкг. Час інкубації – 4 хв. Ензиматичну реакцію ініціювали введенням до середовища інкубації аліквоти (50 мкл) суспензії ПМ, а зупиняли – додаванням до інкубаційної суміші 1 мл «стоп-розчину» такого складу: 1,5 М натрій оцтовокислий, 3,7% формальдегід, 14% етанол, 5% ТХО, рН 4,3 (при  $8^\circ\text{C}$ ). Наявність  $\text{Ca}^{2+}$ -хелатора ЕГТА у середовищі інкубації забезпечувало зв'язування ендогенних іонів  $\text{Ca}$  у ньому.

«Убаїнчутливу»  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азну активність розраховували за різницею між величинами «загальної» АТФ-азної активності у присутності та за відсутності 1 мМ убаїну (селективний інгібітор  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-ази [16, 17]).

Кількість продукту реакції  $P_i$  визначали за методом W. Rathbun et V. Betlach [18].

У дослідах з вивчення впливу різних концентрацій АТФ (0,01–1 мМ) та каліксарену **C-107** (10,0–100,0 нМ) на  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азну активність використовували стандартне середовище інкубації, наведене вище, до якого додавали аліквоту розчину АТФ та каліксарену **C-107** у відповідній концентрації. При цьому концентрація  $\text{MgCl}_2$  у стандартному середовищі інкубації була постійною і становила 3 мМ.

У дослідах з вивчення впливу різних концентрацій  $\text{MgCl}_2$  (0,01–3 мМ) та каліксарену **C-107** (10,0–100,0 нМ) на  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азну активність також використовували стандартне середовище інкубації, до якого додавали аліквоту розчину  $\text{MgCl}_2$  та каліксарену **C-107** у відповідній концентрації. Концентрація АТФ в ньому становила 1 мМ. У всіх дослідах використовували концентрований (4 мМ) розчин каліксарену **C-107** в ДМСО, який дали розводили водою до необхідної кінцевої концентрації.

Кінетичні параметри дії АТФ та іонів  $\text{Mg}^{2+}$  на ензиматичну активність  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-ази розраховували з використанням концентраційних залежностей, побудованих у подвійних логарифмічних координатах відповідно до лінеаризованого рівняння Хілла  $\lg[(V_{\max} - V)/V] = n_H \cdot \lg K - n_H \cdot \lg S$ , де  $V$  – питома ензиматична активність,  $V_{\max}$  – максимальна питома ензиматична активність,  $K$  – уявна константа Міхаеліса або уявна константа активації іонами  $\text{Mg}$ ,  $S$  – концентрація субстрату або йона-активатора в середовищі інкубації. Значення уявної константи інгібування  $K_i$  каліксареном **C-107** та коефіцієнта Хілла розраховували із використанням лінеаризованих

графіків Хілла відповідно до рівняння:  $\lg[(V_0 - V)/V] = n_H \cdot \lg I - n_H \cdot \lg K_i$ , де  $V$  – питома ензиматична активність за відсутності інгібітора,  $I$  – концентрація інгібітора в середовищі інкубації. У разі побудови таких графіків типове значення середньоквадратичного відхилення коефіцієнта апроксимації становило 0,9–0,99. Кінетичні та статистичні розрахунки здійснювали за допомогою програмного забезпечення MS Excel.

У роботі застосовували такі реактиви: АТР, Нерес, убаїн, 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

Питома ензиматична активність  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-ази і  $\text{Mg}^{2+}$ -АТР-ази сарколеми міомерія свині складає  $10,2 \pm 0,7$  та  $18,1 \pm 1,2$  мкмоль  $\text{P}_i/\text{мг}$  протеїну за 1 год відповідно ( $n = 7$ ) [15].

У попередніх дослідах, які було проведено з використанням калікс[4]аренів (в цілому 14 сполук), було знайдено, що саме каліксарен **C-107** є одним із найефективніших інгібіторів  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-азної активності ПМ (у концентрації 100 мкМ). За цих умов спостерігається майже повне інгібування

ензиматичної активності: до 2–3% відносно контролю. При цьому зазначений каліксарен практично не впливає на питому ензиматичну активність «базальної»  $\text{Mg}^{2+}$ -АТР-ази [10].

Тому для подальшої кінетичної інтерпретації впливу каліксарену **C-107** на ензиматичну активність  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-ази ПМ міомерія ми дослідили його дію на характер концентраційної залежності його активності від АТР та іонів  $\text{Mg}$ .

Підвищення концентрації АТР в середовищі інкубації в діапазоні від 0,01 до 1,0 мМ призводить до підвищення ензиматичної активності  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-ази (рис. 1, контроль) в умовах фіксованої концентрації  $\text{MgCl}_2$  (3 мМ) в інкубаційному середовищі. Методом Хілла були розраховані уявна константа Міхаеліса  $K_m$  за нуклеозидтрифосфатом АТР та коефіцієнт Хілла  $n_H$ , які становлять  $204,6 \pm 11,1$  мкМ та  $1,38 \pm 0,15$  відповідно ( $n = 5$ ) (рис. 2, контроль). Одержане нами значення  $K_m$  за АТР для  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-ази корелює з даними літератури. Величина  $K_m$  реакції гідролізу АТР у нервовій тканині пацюків складає 260 мкМ [19].

Нами вивчено вплив каліксарену **C-107** на кінетичні параметри, що характеризують спорідненість ензиму до АТР. Було досліджено вплив 5 концентрацій каліксарену **C-107** (10, 25, 50, 75 та 100 нМ) на концентраційну

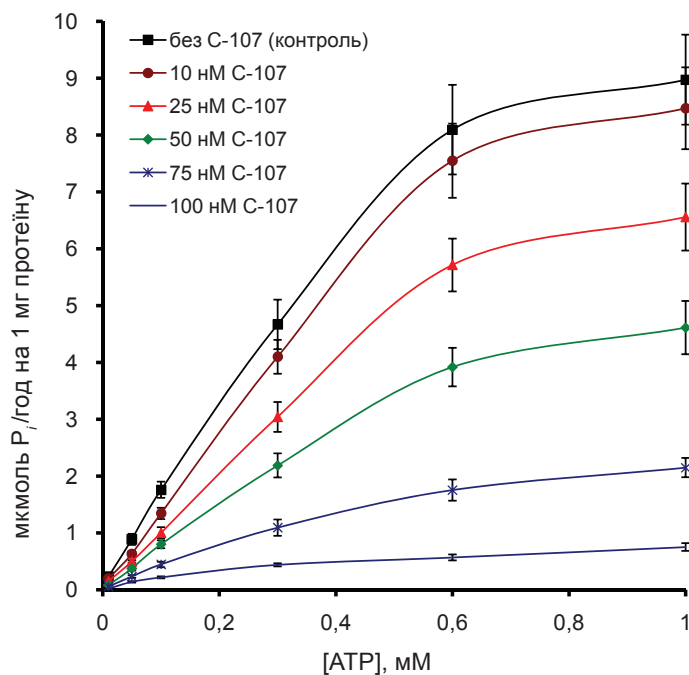


Рис. 1. Вплив каліксарену **C-107** у різних концентраціях на залежність питомої ензиматичної активності  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-ази у фракції плазматичних мембран клітин міомерія від концентрації АТР ( $M \pm m$ ;  $n = 5$ ). Концентрація  $\text{MgCl}_2$  – 3 мМ

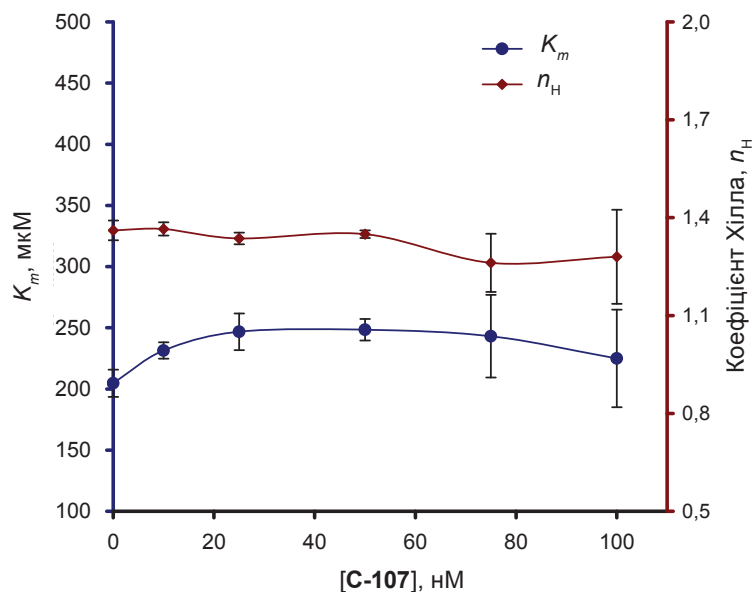


Рис. 2. Вплив каліксарену **C-107** на кінетичні параметри (константу Міхаеліса  $K_m$  і коефіцієнт Хілла  $n_H$ ) дії АТФ на активність  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-ази у фракції плазматичних мембран клітин міометрія ( $M \pm m$ ;  $n = 5$ ). Концентрація  $[\text{C-107}] = 0 \text{ мМ}$  – контроль. Концентрація  $\text{MgCl}_2 - 3 \text{ мМ}$

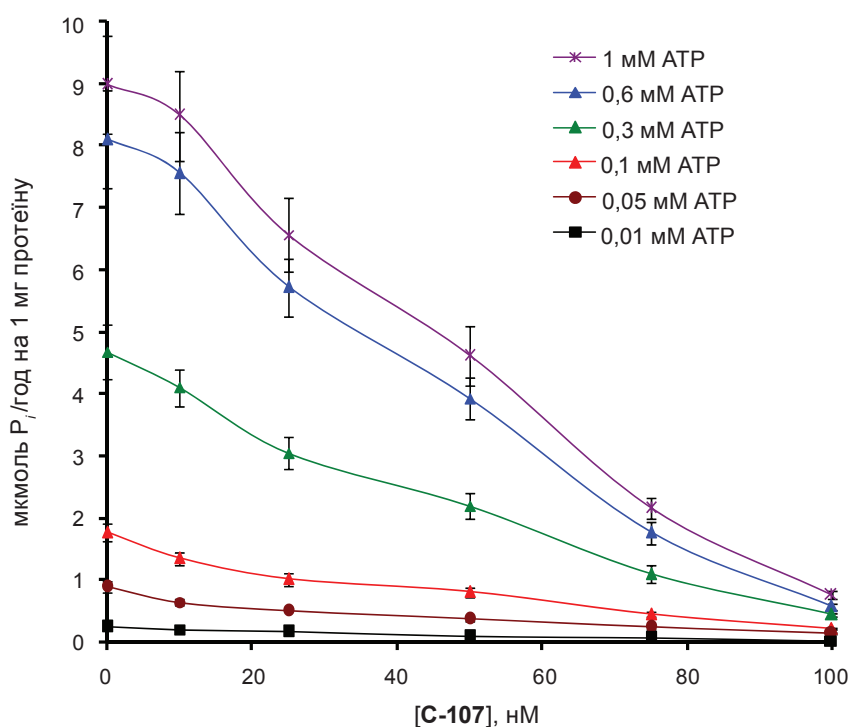


Рис. 3. Вплив АТФ в різних концентраціях на залежність питомої ензиматичної активності  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-ази у фракції плазматичних мембран клітин міометрія від концентрації каліксарену **C-107** ( $M \pm m$ ;  $n = 5$ ). Концентрація  $\text{MgCl}_2 - 3 \text{ мМ}$

залежність від АТФ. В усіх випадках спостерігається зниження з різним ступенем ефективності активності  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-ази, при цьому залежність ензиматичної активності від

АТФ виявляє характер, подібний до відповідної контрольної залежності без каліксарену **C-107**, але платовий рівень активності зі зростанням концентрації каліксарену знижується (рис. 1).

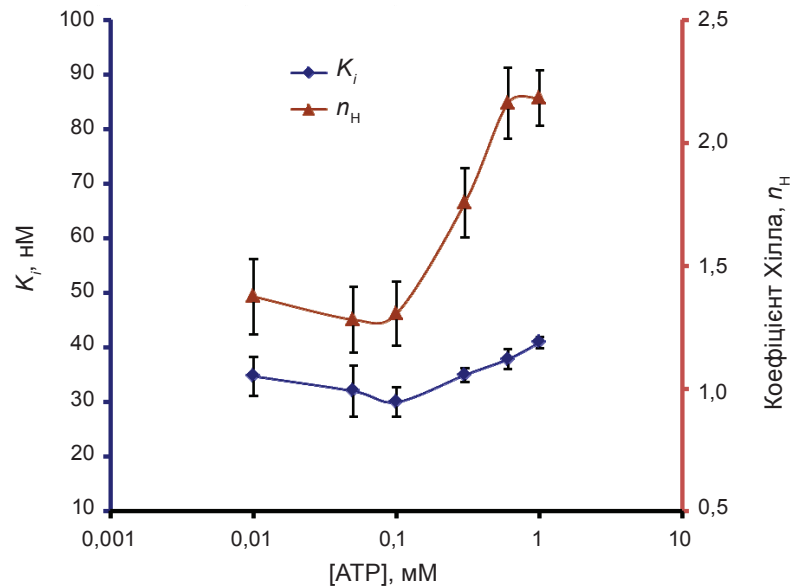


Рис. 4. Вплив АТР на кінетичні параметри (константу гальмування  $K_i$  і коефіцієнт Хілла  $n_H$ ) дії каліксарену С-107 на активність  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-ази у фракції плазматичних мембран клітин міомерія ( $M \pm m$ ;  $n = 5$ ). Концентрація  $\text{MgCl}_2 - 3 \text{ мМ}$

Розраховані середні значення уявної константи Міхаеліса  $K_m$  та коефіцієнта Хілла  $n_H$  у присутності різних концентрацій каліксарену С-107 вірогідно не відрізняються від контрольних значень кінетичних параметрів за відсутності ефектора в середовищі інкубації (рис. 2). Величина коефіцієнта Хілла  $n_H$  вказує на позитивну кооперативну дію залежності ензиматичної активності  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-ази від концентрації АТР, яка майже не змінюється у присутності каліксарену С-107 у різних концентраціях (рис. 2).

Отже, каліксарен С-107, призводячи до гальмування активності  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-ази відносно контролю, практично не змінює уявної спорідненості ензиму до АТР, а також кооперативність ензиматичної реакції по АТР. Очевидно, що в такому разі інгібування каліксареном С-107 відбувається за рахунок зниження числа обертів ензиму, тобто  $V_{\max}$  АТР-азної реакції.

Нами також було розраховано кінетичні параметри дії каліксарену С-107 у присутності різних концентрацій субстрату АТР-азної реакції. Показано, що використання різних концентрацій АТР (рис. 3) слабо впливає на константу гальмування  $K_i$  каліксареном С-107; поряд з цим із графіка видно, що зростання концентрації АТР призводить до збільшення коефіцієнта Хілла  $n_H$  з  $1,38 \pm 0,15$  до  $2,18 \pm 0,11$  інгібуючої дії каліксарену С-107 (рис. 4).

Таким чином, інгібуючий ефект каліксарену С-107 на питому ензиматичну

активність  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-ази не залежить від кількості АТР у середовищі інкубації, що вказує на відсутність конкуренції між АТР та каліксареном С-107. Тому можна припустити, що субстратний центр  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-ази та гіпотетичний сайт взаємодії каліксарену С-107 не перекриваються на поверхні ензиму. Зростання коефіцієнта Хілла дії каліксарену С-107 може свідчити про зміну субдинічного складу ензиму за підвищення концентрації АТР.

Відомо, що значення  $\text{Mg}^{2+}$  для метаболізму пояснюється його властивостями як промотора структури макромолекул, субстратв'язуючого іона і переносника електронів. Відома низка  $\text{Mg}^{2+}$ -залежних ензимів, роль  $\text{Mg}^{2+}$  для яких не обмежується активацією субстрату, а пов'язана із формуванням активного (каталітичного) центру. Проте найбільше відома роль  $\text{Mg}^{2+}$  в утворенні хелатного комплексу з АТР – субстратом аденозинтрифосфатазних реакцій. Вважають, що іони  $\text{Mg}^{2+}$  вступають у взаємодію із фосфатними зарядженими групами АТР, поляризують їх і підвищують реакційну здатність системи, полегшуючи нуклеофільну атаку на термінальний фосфат АТР [20].

Ензиматична активність  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-ази ПМ міомерія зростає в міру збільшення концентрації  $\text{MgCl}_2$  від 0,01 до 3 мМ за умов фіксованих концентрацій АТР (1 мМ) в інкубаційному середовищі (рис. 5, контроль). Значення уявної константи активації  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-ази  $K_a$  становить  $173 \pm 4,5 \text{ мкМ}$ , величина коефіцієнта Хілла  $n_H - 0,99 \pm 0,03$  ( $M \pm m$ ;

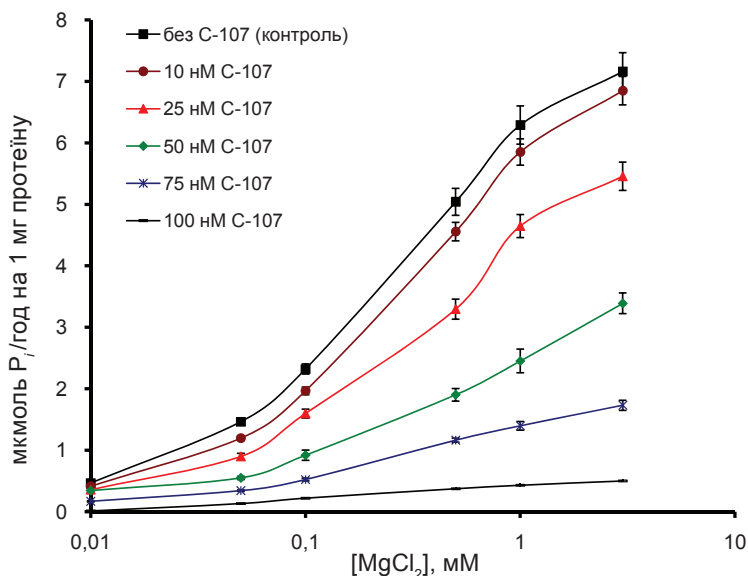


Рис. 5. Вплив каліксарену **C-107** у різних концентраціях на залежність питомої ензиматичної активності  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-ази у фракції плазматичних мембран клітин міометрія від концентрації  $\text{MgCl}_2$  ( $M \pm m$ ;  $n = 5$ ). Концентрація АТФ – 1 мМ

$n = 5$ ) (рис. 6, контроль). Необхідно зазначити, що концентрація вільних іонів  $\text{Mg}^{2+}$  в середовищі інкубації може істотно відрізнятися та нелінійно залежати від концентрації  $\text{MgCl}_2$ . Тому наведені кінетичні параметри було розраховано саме для  $\text{MgCl}_2$ , а не для  $\text{Mg}^{2+}$ .

Нами було досліджено вплив каліксарену **C-107** на кінетичні параметри дії  $\text{MgCl}_2$ . Вивчено концентраційну залежність від  $\text{MgCl}_2$

у присутності каліксарену **C-107** в різних концентраціях (рис. 5).

В усіх випадках у разі внесення до середовища інкубації каліксарену **C-107**, спостерігається зниження активності  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-ази з різним ступенем ефективності. Продемонстровано, що залежність константи активації хлоридом магнію від концентрації каліксарену **C-107** виявляє складний двофаз-

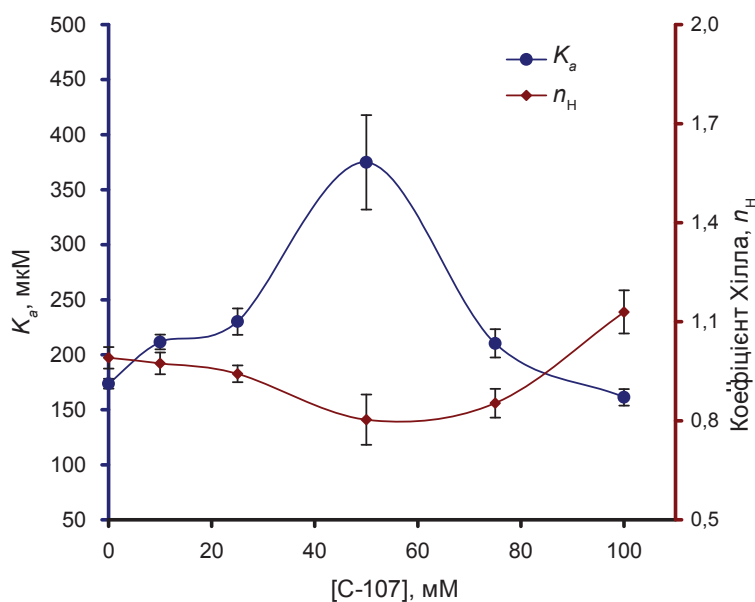


Рис. 6. Вплив каліксарену **C-107** на кінетичні параметри (константу активації  $K_a$  і коефіцієнт Хілла  $n_H$ ) дії  $\text{MgCl}_2$  на активність  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-ази у фракції плазматичних мембран клітин міометрія ( $M \pm m$ ;  $n = 5$ ). Концентрація  $[\text{C-107}] = 0$  мМ – контроль. Концентрація АТФ – 1 мМ

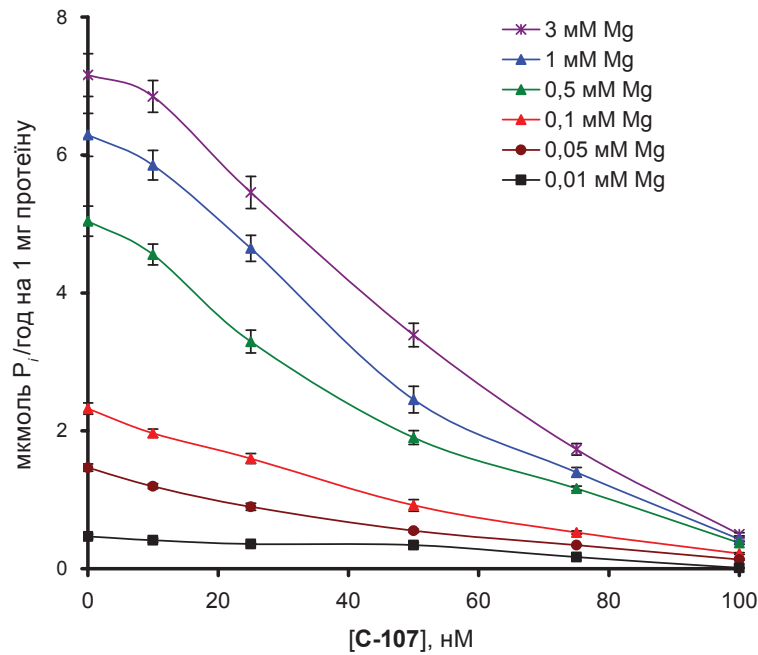


Рис. 7. Вплив  $MgCl_2$  в різних концентраціях на залежність питомої ензиматичної активності  $Na^+,K^+$ -АТР-ази у фракції плазматичних мембран клітин міомерія від концентрації каліксарену **C-107** ( $M \pm t$ ;  $n = 5$ ). Концентрація АТР – 1 мМ

ний характер та підвищується до  $375 \pm 43$  мкМ із ростом концентрації каліксарену **C-107** до 50 нМ, за подальшого збільшення концентрації каліксарену – знижується майже до контрольного рівня (при концентрації каліксарену **C-107** 100 нМ) (рис. 6). При цьому величина коефіцієнта Хілла  $n_H$  практично не

змінюється у присутності каліксарену **C-107** в різних концентраціях ( $n_H = 0,99 \pm 0,032 - 1,13 \pm 0,065$ ).

На відміну від цього, використання різних концентрацій  $MgCl_2$  (рис. 7) істотно не впливає на константу гальмування  $K_i$  каліксареном **C-107**. Значення коефіцієнта Хілла зростає

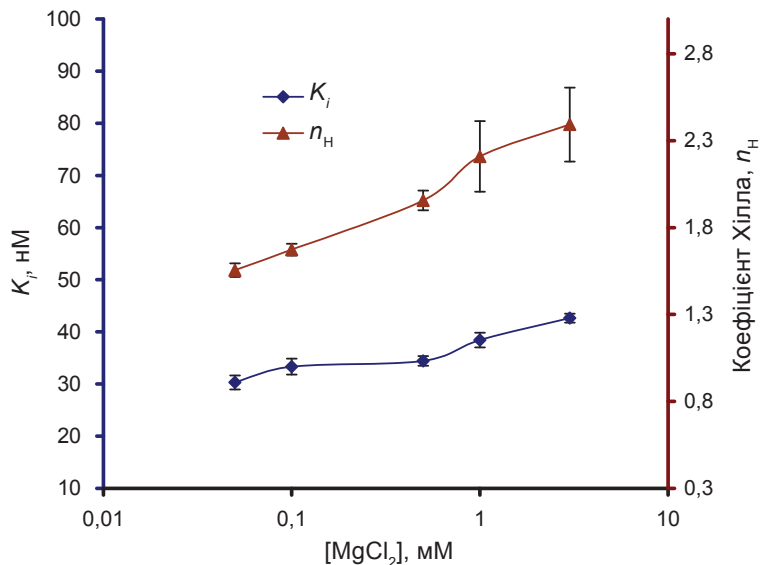


Рис. 8. Вплив  $MgCl_2$  на кінетичні параметри (константу гальмування  $K_i$  і коефіцієнт Хілла  $n_H$ ) дії каліксарену **C-107** на активність  $Na^+,K^+$ -АТР-ази у фракції плазматичних мембран клітин міомерія ( $M \pm t$ ;  $n = 5$ ). Концентрація АТР – 1 мМ

з  $1,55 \pm 0,039$  до  $2,39 \pm 0,212$ , що вказує на зростання позитивної кооперативності дії каліксарену **C-107** на ензим (рис. 8). Тобто в цьому разі зростання концентрації  $MgCl_2$  можливо змінює субодиничний склад  $Na^+, K^+$ -АТР-ази.

Отже, встановлена взаємозалежність кінетичних характеристик дії каліксарену **C-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 із самим каліксареном **C-107**. Тому кінетика дії  $MgCl_2$  на ензиматичну активність  $Na^+, K^+$ -АТР-ази є сумарним результатом кінетики конкурентної взаємодії йонів  $Mg$  з АТР, ЕГТА, ензимом, іншими компонентами фракції плазматичних мембран та каліксареном **C-107**.

Таким чином, наведені в цій роботі результати свідчать про те, що нуклеозидтрифосфат АТР здатний збільшувати ступінь кооперативності щодо зв'язування каліксарену **C-107**  $Na^+, K^+$ -АТР-азою ПМ клітин міометрія, практично не впливаючи на величину уявної константи інгібування  $K_i$  АТР-гідролазної реакції. З іншого боку, залежність величини константи активації  $K_a$  за хлоридом магнію від концентрації зазначеного каліксарену має куполоподібний характер, при цьому ступінь кооперативності щодо іонів  $Mg$  практично не змінюється зі зміною концентрації каліксарену. Іони  $Mg$  індукують збільшення уявної константи інгібування  $K_i$  АТР-гідролазної реакції під дією каліксарену **C-107**.

Отже, одержані результати вказують на те, що високоефективна інгібуюча дія каліксарену **C-107** на  $Na^+, K^+$ -АТР-азу має неконкурентний характер і пов'язана зі зниженням числа обертів ензиму в його присутності.

Передбачається, що одержані експериментальні дані, які було одержано з використанням каліксарену **C-107** – інгібітора  $Na^+, K^+$ -АТР-ази – можуть мати важливе значення для з'ясування мембранних механізмів катіонного обміну у гладеньких м'язах, зокрема, під час вивчення ролі плазматичної мембрани в забезпеченні електромеханічного спряження в них, а також у регуляції іонного гомеостазу в ГМК.

Робота фінансувалася цільовою комплексною міждисциплінарною програмою наукових досліджень НАН України

«Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій» (грант № 31-2010), програмою фундаментальних досліджень НАН України та національним науково-дослідним центром Франції (грант №14-2010).

### ВЛИЯНИЕ КАЛИКСАРЕНА C-107 НА КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ $Na^+, K^+$ -АТР-АЗЫ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ МИОЦИТОВ МАТКИ

Т. А. Веклич<sup>1</sup>, А. А. Шкрабак<sup>1</sup>,  
Р. В. Родик<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, исследовали ингибиторное действие каліксарена **C-107** (5,17-ди(фосфоно-2-пиридилметил)амино-11,23-ди-трет-бутил-26,28-ди-гидрокси-25,27-дипропоксикаликс[4]арен) на кинетические характеристики  $Na^+, K^+$ -АТР-азной активности.

Показано, что каліксарен **C-107**, ингибируя  $Na^+, K^+$ -АТР-азу, не изменяет кинетические параметры ( $K_m$ ,  $n_H$ ) зависимости скорости реакции от концентрации субстрата. Константа активации энзима хлоридом магния  $K_a$  имеет сложный двухфазный характер зависимости от концентрации каліксарена **C-107** – увеличивается в два раза с ростом концентрации каліксарена **C-107** до 50 нМ, а при дальнейшем повышении концентрации каліксарена снижается до почти контрольного уровня. При этом величина коэффициента кооперативности Хилла  $n_H$  активирующего действия  $MgCl_2$  практически не изменяется в присутствии каліксарена **C-107**. Как АТР, так и  $MgCl_2$  не влияют на константу ингибирования  $Na^+, K^+$ -АТР-азы каліксареном **C-107**, но увеличение концентрации указанных веществ приводит к увеличению коэффициента кооперативности  $n_H$  ингибирования АТР-азной реакции каліксареном **C-107**.

Ключевые слова: каліксарены,  $Na^+, K^+$ -АТР-аза, плазматическая мембрана, гладкомышечные клетки, миометрий, кинетические свойства АТР-азы.



**THE EFFECT OF CALIXARENE C-107 ON KINETIC PARAMETERS OF Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase OF UTERUS MYOCYTE PLASMA MEMBRANE**

T. O. Veklich<sup>1</sup>, O. A. Shkrabak<sup>1</sup>, R. V. Rodik<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@bpici.kiev.ua

**S u m m a r y**

The inhibitory action of calixarene **C-107** (5,17-diamino(2-pyridyl)methylphosphono-11,23-di-tert-butyl-26,28-dihydroxy-25,27-dipropoxy-calix[4]arene) on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity kinetic properties of myometrium perforated plasma membrane was investigated. It has been shown that the calixarene **C-107** inhibiting Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase does not change the kinetic parameters ( $K_m$ ,  $n_H$ ) of reaction velocity dependence on substrate concentration. The constant  $K_a$  of enzyme activation by MgCl<sub>2</sub> has complex dependence on calixarene **C-107** concentration: it increases twice with growth of calixarene concentration up to 50 nM and decreases to the control level with further growth of calixarene concentration. The Hill cooperativity coefficient  $n_H$  of activation by MgCl<sub>2</sub> does not vary in the presence of calixarene **C-107**. Both ATP and MgCl<sub>2</sub> have no influence on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase constant of inhibition by calixarene **C-107**, but an increase of concentration of the mentioned physiological compounds causes the growth of cooperativity coefficient  $n_H$  of enzymatic reaction inhibition by calixarene **C-107**.

**Key words:** calixarene, Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, plasmatic membrane, smooth muscle cells, myometrium, kinetic properties of ATPase.

1. Coleman A. W., Jebors S., Cecillon S. et al. // *New J. Chem.* – 2008. – **32**, N 5. – P. 780–782.
2. Da Silva E., Lazar A. N., Coleman A. W. // *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* – 2004. – **14**, N 1. – P. 3–20.
3. Paclet M-H., Rousseau C. F., Yannick C. et al. // *J. Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry.* – 2006. – **55**, N 3–4. – P. 353–357.
4. Grare M., Mourer M., Fontanay S. et al. // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2007. – **60**, N 3. – P. 575–581.
5. Biser P. S., Thayne K. A., Fleming W. W., Taylor D. A. // *Brain Res.* – 2002. – **931**, N 2. – P. 186–193.
6. Geering K. // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* – 2006. – **290**. – P. 241–250.
7. Santos L., Xavier F. E., Vassallo D. V., Rossoni L. V. // *Life Science.* – 2003. – **74**, N 5. – P. 613–627.
8. Jain D., Cnhabra S. K., Paj H. G. // *Indian. J. Med. Res.* – 2004. – **120**. – P.534–541.
9. Blaustein M. P. // *Am. J. Physiol.* – 1993. – **264** (6 Pt 1). – P. C1367–C1387.
10. Веклич Т. О., Костерін С. О., Родік Р. В. та ін. // *Укр. біохім. журн.* – 2006. – **78**, № 1. – С. 62–78.
11. Кондратюк Т. П., Быченко С. Ф., Прищепна Л. А. и др. // Там же. – 1986. – **58**, № 4. – С. 50–56.
12. Bradford M. M. // *Anal. Biochem.* – 1976. – **72**, N 1–2. – P. 248–282.
13. Flynn E. R. M., Bradley K. N., Muir T. C., McCarron J. G. // *J. Biol. Chem.* – 2001. – **276**, N 39. – P. 36411–36418.
14. Веклич Т. О., Костерін С. О., Шинлова О. П. // *Укр. біохім. журн.* – 2002. – **74**, № 1. – С. 42–48.
15. Valente R. C., Capella L. S., Monteiro R. Q. et al. // *FASEB J.* – 2003. – **17**, N 12. – P. 1700–1702.
16. Wang H., Haas M., Liang M. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2004. – **279**, N 17. – P. 17250–17259.
17. Rathbun W., Betlach V. // *Anal. Biochem.* – 1969. – **28**, N 1–3. – P. 436–445.
18. *Введение в биомембранологию* / Под ред. А. А. Болдырева. – М.: Изд-во МГУ, 1990. – 208 с.
19. Болдырев А. А. // *Биохимия.* – 2001. – **66**, вып. 6. – С. 1013–1025.

Отримано 25.02.2011