

ПОРІВНЯЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ КАЛІКС[4]АРЕНУ С-99 ТА ЙОГО АНАЛОГІВ НА Na^+ , K^+ -АТР-азну АКТИВНІСТЬ У ПЛАЗМАТИЧНІЙ МЕМБРАНІ МІОЦИТІВ МАТКИ

Т. О. ВЕКЛІЧ¹, О. А. ШКРАБАК¹, С. О. ЧЕРЕНОК²,
В. І. КАЛЬЧЕНКО², С. О. КОСТЕРІН¹

¹Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;

²Інститут органічної хімії НАН України, Київ;
e-mail: kinet@biochem.kiev.ua; vik@ioch.kiev.ua

З метою визначення ролі структурної організації молекули калікс[4]арену С-99 у проявленні інгібіторної дії на Na^+ , K^+ -АТР-азу плазматичних мембран клітин міометрія досліджено дію структурно подібних до нього калікс[4]аренів С-296, С-297, С-424, С-425, С-426, С-427 на активність цього ензиму. Показано, що каліксарени С-296 та С-297 (мають дві додаткові пропокси-групи на нижньому вінці макроциклу) є менш ефективними інгібіторами Na^+ , K^+ -АТР-ази порівняно з каліксареном С-99. Каліксарени С-425 та С-427 (мають на верхньому вінці макроциклу відповідно три та чотири залишки фосфонових кислот) також інгібують активність Na^+ , K^+ -АТР-ази з нижчою ефективністю порівняно з каліксареном С-99. Каліксарен С-424, в якого на верхньому вінці знаходяться лише два залишки карбонової кислоти, та каліксарен С-426, що містить на верхньому вінці кетометилфосфонові залишки замість гідроксиметилфосфонових залишків у каліксарені С-99, не впливають на активність Na^+ , K^+ -АТР-ази. Зроблено відповідні висновки щодо ролі певних хімічних груп каліксарену С-99 у його взаємодії з Na^+ , K^+ -АТР-азою.

Ключові слова: Na^+ , K^+ -АТР-аза, Mg^{2+} -АТР-аза, плазматична мембрана, гладеньком'язові клітини, міометрій, кінетичні властивості АТР-ази, каліксарени, фосфонові кислоти.

Ензим Na^+ , K^+ -АТР-аза (3.6.1.37), локалізований у плазматичній мембрані клітин збудливих тканин, є інтегральним трансмембранним олігомерним протеїном. Na^+ , K^+ -АТР-аза забезпечує ензиматичне перетворення енергії гідролізу АТР в енергію трансмембранних градієнтів одновалентних іонів Na і K (стехіометрія – 1 АТР : 3 іони Na : 2 іони K) [1–3]. Створена Na^+ , K^+ -АТР-азою трансмембранна різниця концентрацій одновалентних катіонів використовується для перебігу ключових реакцій життєдіяльності – генерації збудження, водно-сольового обміну, а також для регуляції клітинного метаболізму. Зараз цілком очевидно, що низка важливих клітинних процесів (а саме: експресія певних генів, клітинний ріст, проліферація, апоптоз, клітинна рухливість, кров'яний тиск, серцеве скорочення) модулюються за участю Na^+ , K^+ -АТР-ази [4, 5]. Зміни у функціонуванні натрієвої помпи спостерігаються за порушення вмісту гормонів, зокрема за гіпертиреозидизму, тиреотоксикозу та цукрового діабету [6]. Na^+ , K^+ -АТР-аза має велике значення для контролю скоротливої активності, зокрема, гладеньких м'язів [7].

Є багато даних, що молекулярною платформою для біоізоостеричних груп для конструювання потенційно біоактивних сполук можуть слугувати макроциклічні сполуки каліксарени. Модифікація калікс[4]арену залишками фосфонових кислот є перспективним напрямом пошуку нових інгібіторів та активаторів ензимів. У складі молекули класичних каліксаренів можна виділити верхній вінець, центральний макроцикл, утворений ароматичними ареновими фрагментами, та нижній вінець із гідрокси- чи алкоксизамісниками. Разом ці структурні фрагменти формують внутрішню порожнину молекули каліксарену, об'єм якої в середньому рівний 1 нм³ [8, 9]. Продемонстровано, що каліксарени можуть легко проникати крізь плазматичні мембрани всередину клітини і є досить перспективними для створення нових високоефективних селективних інгібіторів і активаторів внутрішньоклітинних біохімічних процесів, завдяки тому, що здатні оборотно модифікувати функціональну активність окремих протеїнів. Крім того, каліксарени виявляють низьку токсичність та імуногенність. Вони відносно легко синтезуються за відомими ме-

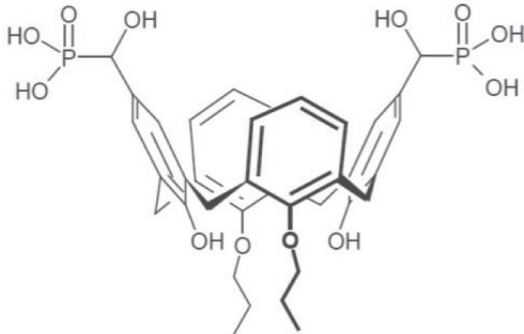
тодами. Каліксарени також знаходять використання як сполуки-аналоги ензимів, за допомогою яких можливе моделювання складних ензиматичних процесів [8–15].

Мета роботи полягала у вивченні дії низки калікс[4]аренів – **C-296**, **C-297**, **C-424**, **C-425**, **C-426**, **C-427**, які відрізняються від апробованого раніше калікс[4]арену **C-99** (високоафінний інгібітор натрієвої помпи плазматичної мембрани) хімічними угрупованнями на нижньому та верхньому вінцях макроциклу, на активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази плазматичної мембрани міоцитів матки.

Матеріали і методи

Калікс[4]арени було синтезовано у відділі хімії фосфоранів Інституту органічної хімії НАН України (зав. відділом – член-кор. НАН України, проф. В. І. Кальченко).

Вибір із низки досліджених каліксаренів саме каліксарену **C-99** (5,17-біс(дигідроксифосфонілметил)-26,28-дигідрокси-25,27-дипропоксикалікс[4]арен) обумовлено селективністю інгібуючої дії цієї сполуки: **C-99** ефективно гальмує активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази і практично не впливає на активність «базальної» Mg^{2+} -АТФ-ази.



Структурна формула калікс[4]арену **C-99**

Для визначення ролі структурної організації калікс[4]арену **C-99** у виявленні його пригнічуючої дії на Na^+ , K^+ -АТФ-азну активність плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин матки було синтезовано структурно подібні до каліксарену **C-99** сполуки:

- **C-296** (5,17-біс(дигідроксифосфонілметил)-11,23-дибром-25,26,27,28-тетрапропоксикалікс[4]арен);
- **C-297** (5,17-біс(дигідроксифосфонілметил)-25,26,27,28-тетрапропоксикалікс[4]арен);
- **C-424** (5,17-дикарбоксил-25,27-дипропоксикалікс[4]арен);

– **C-425** (5,17-біс(1-гідроксиметил-1,1-біс(дигідроксифосфорил)-25,27-дипропоксикалікс[4]арен);

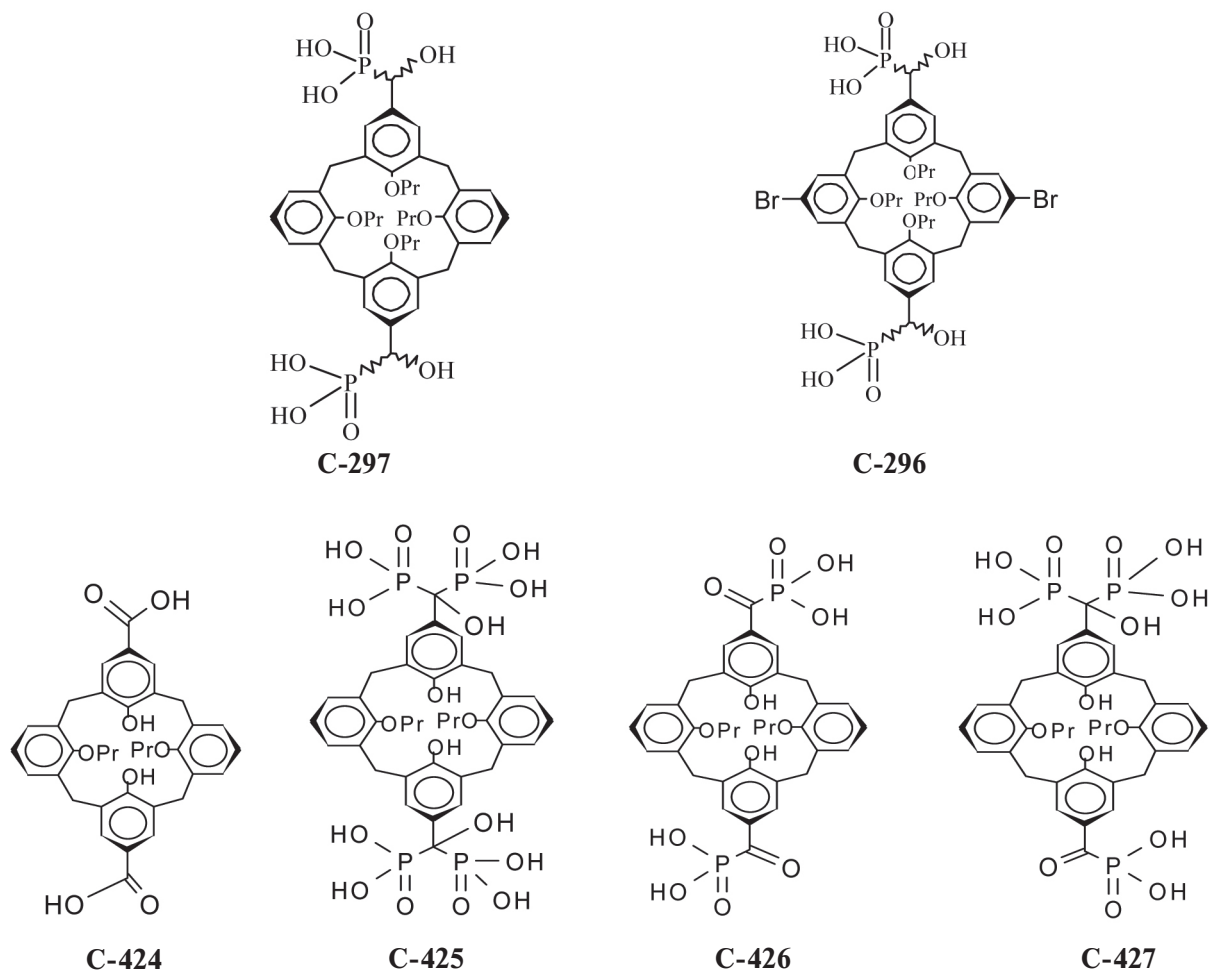
– **C-426** (5,17-біс(1-кето-1-дигідроксифосфорилметил)-25,27-дипропоксикалікс[4]арен);

– **C-427** (5-(1-гідрокси-метил-1,1-біс(дигідроксифосфорил)-17-(1-кето-1-дигідроксифосфорил-метил)-25,27-дипропоксикалікс[4]арен).

Біохімічні дослідження проводили на фракції плазматичних мембран, яку виділяли з міомерія свині методом диференційного центрифугування в градієнті густини сахарози як було описано раніше [16, 17]. Вміст протеїну в мембранах визначали методом М. Bradford [18] за реакцією з реактивом кумасі – G250.

«Загальну» АТФ-азну активність визначали у фракції плазматичних мембран клітин міомерія як описано раніше [16] при 37 °С у стандартному середовищі (об'єм – 0,4 мл), яке містило (мМ): 1 АТФ, 3 MgCl_2 , 125 NaCl , 25 KCl , 1 ЕГТА, 20 Nepes-Tris -буфер (рН 7,4), 1 NaN_3 (інгібітор АТФ-ази мітохондрій [19]), 0,1 мкМ тапсигаргін (селективний інгібітор Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-ази ендо(сарко)-плазматичного ретикулула [19]) і 0,1% дигітонін (фактор перфорації плазматичної мембрани [20]). Наявність Ca^{2+} -хелатора ЕГТА в середовищі інкубації забезпечувало зв'язування ендogenous іонів Ca в ньому. Кількість протеїну мембранної фракції в пробі – 20–30 мкг. Час інкубації при 37 °С – 4 хв. Ензиматичну реакцію ініціювали введенням до середовища інкубації аліквоти (50 мкл) мембранного препарату (8 °С), а зупиняли – додаванням до інкубаційної суміші 1 мл «стоп-розчину» такого складу: 1,5 М натрій оцтовий, 3,7% формальдегіду, 14% етанолу, 5% ТХУ, рН 4,3 (8 °С).

У всіх дослідах контролем на неензиматичний гідроліз АТФ було середовище інкубації, аналогічного складу, описаному вище, але не містило мембранного препарату. Контролем на кількість ендogenous неорганічного фосфору (P_i) в мембранному препараті було середовище, що містило тільки мембранний препарат у водному розчині. Питому загальну АТФ-азну ензиматичну активність розраховували за різницею між кількістю P_i , що утворився в середовищі інкубації у присутності та за відсутності фрагментів плазматичної мембрани з урахуванням поправки на неензиматичний гідроліз АТФ та вміст ендogenous P_i в мембранному препараті. Кількість продукту реакції P_i визначали методом W. Rathbun і V. Betlach [21].

Структурні формули аналогів калікс[4]арену **C-99**

«Базальну» Mg^{2+} -АТФ-азну активність визначали в тому самому середовищі, але у присутності 1 мМ убаїну (селективний інгібітор Na^+, K^+ -АТФ-ази плазматичної мембрани [22, 23]).

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

У дослідях використовували концентрований (4 мМ) розчин каліксаренів в ДМСО, який далі розводили водою. У дослідях з вивчення впливу різних концентрацій каліксаренів **C-296**, **C-297**, **C-425**, **C-427** (10^{-8} – 10^{-4} М) на Na^+, K^+ -АТФ-азну активність використовували стандартне середовище інкубації, описане вище, до якого додавали аліквоту розчину каліксаренів у відповідній концентрації.

За вивчення концентраційної залежності дії каліксаренів на ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТФ-ази значення уявних констант інгібування $I_{0,5}$ та коефіцієнтів Хілла n_H роз-

раховували, використовуючи лінеаризовані графіки Хілла згідно з його емпіричним рівнянням $\lg[(A_0 - A)/A] = -n_H \lg I_{0,5} + n_H \lg I$, де A_0 та A – питома ензиматична активність за відсутності («нульова точка») та у присутності в середовищі інкубації каліксарену в концентрації I . Типове значення середньоквадратичного відхилення коефіцієнта апроксимації, визначене за графіками, становить 0,9–0,99.

Статистичний аналіз одержаних даних проводили із залученням загальновідомих стандартних методів. Кінетичні та статистичні розрахунки здійснювали з допомогою програмного забезпечення MS Excel.

У роботі було застосовано такі реактиви: АТФ, Нерес, убаїн, тапсигаргін (Sigma, США), Трис-гідроксиметил-аміноетан (Reanal, Угорщина), дигітонін (Merck, Німеччина), ЕГТА (Fluka, Швейцарія). Інші реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації чда та хч.

Результати та обговорення

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

У попередніх дослідах нами було показано, що для сарколеми міометрія свині питома ензиматична активність Na^+, K^+ -АТР-ази складає $10,2 \pm 0,7$ мкмоль P_i /мг протеїну за 1 год відповідно ($M \pm m, n = 7$).

Зрозуміло, що для пошуку ефекторів, здатних модифікувати активність Na^+, K^+ -АТР-ази, важливим є те, що б ці ефектори не впливали на активність «базальної» Mg^{2+} -АТР-ази.

У попередніх дослідах, які було проведено із використанням різних каліксаренів (14 сполук), було знайдено, що ефективну гальмівну дію на активність Na^+, K^+ -АТР-ази виявив каліксарен **C-99** (у разі використання його в концентрації 100 мкМ активність ензиму інгібується до 8%, $I_{0,5} = 98 \pm 8$ нМ, табл.). При цьому він майже не впливає на «базальну» Mg^{2+} -АТР-азну активність (зменшення активності лише до 91% від контрольного значення – дані не наведено).

Нами досліджено дію каліксаренів **C-296** і **C-297**, що є структурними аналогами каліксарену **C-99**. Нижній вінець цих каліксаренів відрізняється від такого каліксарену **C-99** наявністю ще двох додаткових пропоксильних груп. Замісники на верхньому вінці макроциклу каліксарену **C-297** такі самі як і у **C-99**, а каліксарен **C-296** має ще два атоми бромів у положеннях 11 та 23 на верхньому вінці макроциклу.

Як показали результати досліджень, каліксарени **C-296** і **C-297**, які були використані в концентрації 100 мкМ, з однаковим ступенем ефективності виявляють інгібуючу дію на питому ензиматичну активність Na^+, K^+ -

АТР-ази: має місце зниження активності на $63,5 \pm 4,3$ та $61,5 \pm 1,9\%$ відповідно відносно контрольного значення (рис. 1). При цьому обидва каліксарени майже не впливають на активність «базальної» Mg^{2+} -АТР-ази (зменшення активності лише до 91% від контрольного значення).

Також нами показано, що каліксарени **C-296** та **C-297**, які використовували в інтервалі концентрацій від 10^{-8} до 10^{-4} М, ефективно та дозозалежно гальмують активність Na^+, K^+ -АТР-ази (рис. 2). Величини уявних констант інгібування $I_{0,5}$ для цих каліксаренів становлять $4,90 \pm 0,31$ та $15,21 \pm 1,92$ мкМ відповідно (табл.). Значення коефіцієнта Хілла (n_H) для каліксаренів **C-296** та **C-297** практично однакові: $0,33 \pm 0,02$ і $0,35 \pm 0,06$ відповідно.

Отже, каліксарени **C-296** та **C-297** є менш ефективними інгібіторами Na^+, K^+ -АТР-ази порівняно з каліксареном **C-99**, уявна константа інгібування якого наведена в таблиці. Очевидно, що інгібіторні властивості вказаних каліксаренів визначаються структурою верхнього вінця макроциклу. Проте дві додаткові пропоксильні групи на нижньому вінці каліксаренів **C-296** та **C-297** зумовлюють більшу гідрофобність цих сполук порівняно з каліксареном **C-99**, що може бути причиною зниження ефективності інгібування Na^+, K^+ -АТР-ази. Крім цього, наявність на нижньому вінці макроциклу каліксаренів **C-296** та **C-297** чотирьох пропоксильних груп зумовлює відмінності у конформаційній поведінці цих каліксаренів, а саме каліксарени **C-296** та **C-297** в розчинах перебувають у мобільній конформації *конус*. В той же час каліксарен **C-99** знаходиться в жорсткій конформації *сплощений конус*, яка стабілізується завдяки утворенню водневих зв'язків між проксимальними групами $\text{OH}\cdots\text{OR}_1$.

Наявність двох атомів бромів в молекулі каліксарену **C-296** порівняно з каліксареном **C-297** може призводити до екранування залишків гідроксиметилфосфонової кислоти верхнього вінця макроциклу, але ця обставина істотно не впливає на ефективність інгібування Na^+, K^+ -АТР-ази, адже уявна константа інгібування каліксареном **C-296** навіть нижча (4,9 мкМ) від аналогічної константи для каліксарену **C-297** (15,2 мкМ). Тобто можна припустити, що модифікування верхнього вінця каліксарену **C-99** у положеннях 11 та 23 атомами бромів, можливо, дозволить збільшити ефективність інгібування Na^+, K^+ -АТР-ази.

В наших подальших експериментах було досліджено дію каліксаренів **C-424**, **C-425**,

Кінетичні параметри інгібування каліксаренами активності Na^+, K^+ -АТР-ази плазматичної мембрани клітин міометрія

Каліксарен	Коефіцієнт інгібування, $I_{0,5}$	Коефіцієнт Хілла, n_H
C-99	98 ± 8 нМ	$0,12 \pm 0,03$
C-296	$4,90 \pm 0,31$ мкМ	$0,33 \pm 0,02$
C-297	$15,21 \pm 1,92$ мкМ	$0,35 \pm 0,06$
C-425	$1,2 \pm 0,1$ мкМ	$0,36 \pm 0,01$
C-427	$2,80 \pm 0,18$ мкМ	$0,38 \pm 0,01$

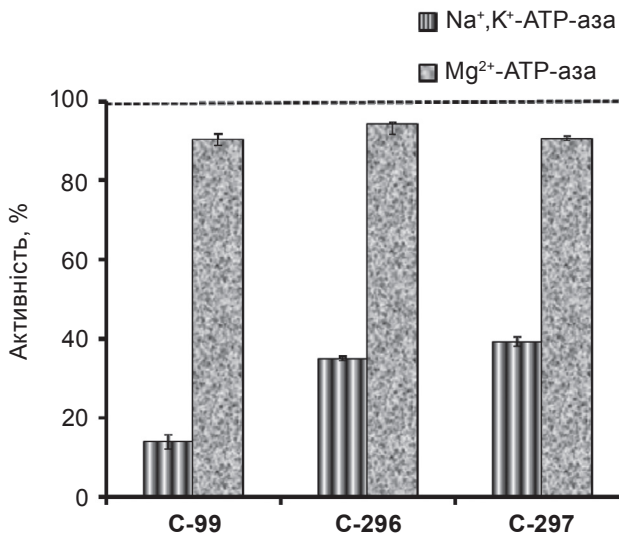


Рис. 1. Вплив каліксаренів C-99, C-296 і C-297 (100 мкМ) на питому ензиматичну активність Na⁺,K⁺-АТФ-ази та «базальної» Mg²⁺-АТФ-ази у фракції плазматичних мембран клітин міометрія ($M \pm m$; $n = 5$). Тут і на рис. 2–4 за 100% прийнято значення питомої ензиматичної активності за відсутності каліксаренів у середовищі інкубації

C-426, C-427. Ці речовини за своєю структурою подібні до каліксарена C-99. Структурні відмінності цих сполук знаходяться на верхньому вінці каліксаренового макроциклу. Як каліксаренова чаша, так і хімічна будова нижнього вінця є однаковими для каліксаренів, що вивчалися. Найпростішу структуру має каліксарен C-424. На його верхньому вінці знаходяться лише два залишки карбонової кислоти у пара-положенні. Тобто порівняно з каліксареном C-99 каліксарен C-424 позбавлений залишків фосфонової кислоти. Натомість каліксарен C-425, на відміну від каліксарену C-99, має ще дві додаткові фосфонатні групи, які приєднані до атому вуглецю гідроксиметилфосфонатних залишків, тобто це фрагменти α -гідроксиметилбісфосфонової кислоти. Каліксарен C-426 на верхньому вінці макроциклу має залишки кетометилфосфонової кислоти, на відміну від гідроксиметилфосфонатних залишків каліксарену C-99, а каліксарен C-427 має один залишок гідроксиметилбісфосфонату як у каліксарена C-425 та один залишок кетометилфосфонової кислоти як у разі з каліксареном C-426. Розташування замісників на верхньому вінці усіх каліксаренів однаково.

Як показали результати проведених досліджень каліксарен C-424 (концентрація

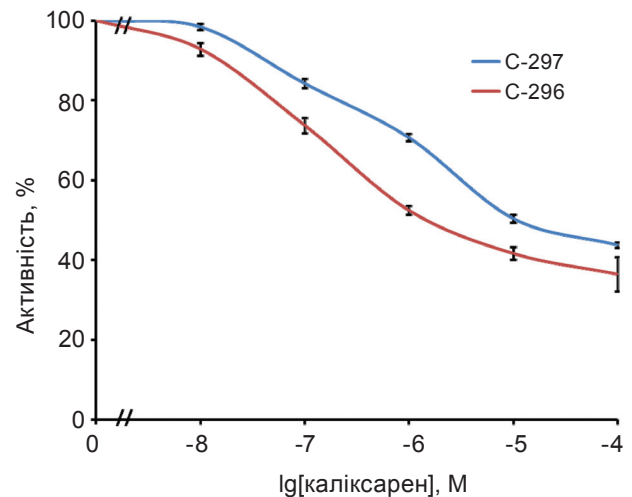


Рис. 2. Концентраційна залежність впливу каліксаренів C-296 і C-297 на активність Na⁺,K⁺-АТФ-ази у фракції плазматичних мембран клітин міометрія ($M \pm m$, $n = 5$)

100 мкМ) не впливає на активність Na⁺,K⁺-АТФ-ази та «базальної» Mg²⁺-АТФ-ази (рис. 3). Відсутність інгібіторної дії каліксарену C-424 була очікуваною, оскільки ця сполука в своєму складі не має залишків фосфонових кислот, які є відомими комплексоутворювачами. Вірогідно, що саме фосфонатні групи відіграють вирішальну роль у взаємодії каліксарену C-99, а також інших фосфонатвмісних каліксаренів (C-97, C-107), з ензимом та в його ігібуванні.

Каліксарен C-426, використаний у концентрації 100 мкМ, пригнічує активність обох досліджених АТФ-аз лише на 16% від контрольного значення (рис. 3). Тобто цей аналог каліксарену C-99 не має інгібіторної дії на Na⁺,K⁺-АТФ-азу. На перший погляд, такий результат є несподіваним, адже каліксарен C-426 за хімічною структурою дуже подібний до каліксарену C-99, а кетифосфонової кислоти, якою є каліксарен C-426, відомі як інгібітори ензимів. Можливими є декілька припущень щодо пояснення причин такої відмінності у інгібіторних властивостях цих сполук. По-перше, каліксарен C-426 містить кетогрупи на метилфосфонатних замісниках замість гідроксильної групи каліксарену C-99, яка здатна утворювати водневі зв'язки з різними хімічними групами на поверхні молекули ензиму. Ймовірно, саме такі водневі зв'язки є необхідними для утворення інгібіторного комплексу каліксарену C-99 з Na⁺,K⁺-АТФ-азою. По-друге, атоми вуглецю у метилфосфонатних груп каліксарену C-426 виявляють вищу ступінь окислення та знаходяться у

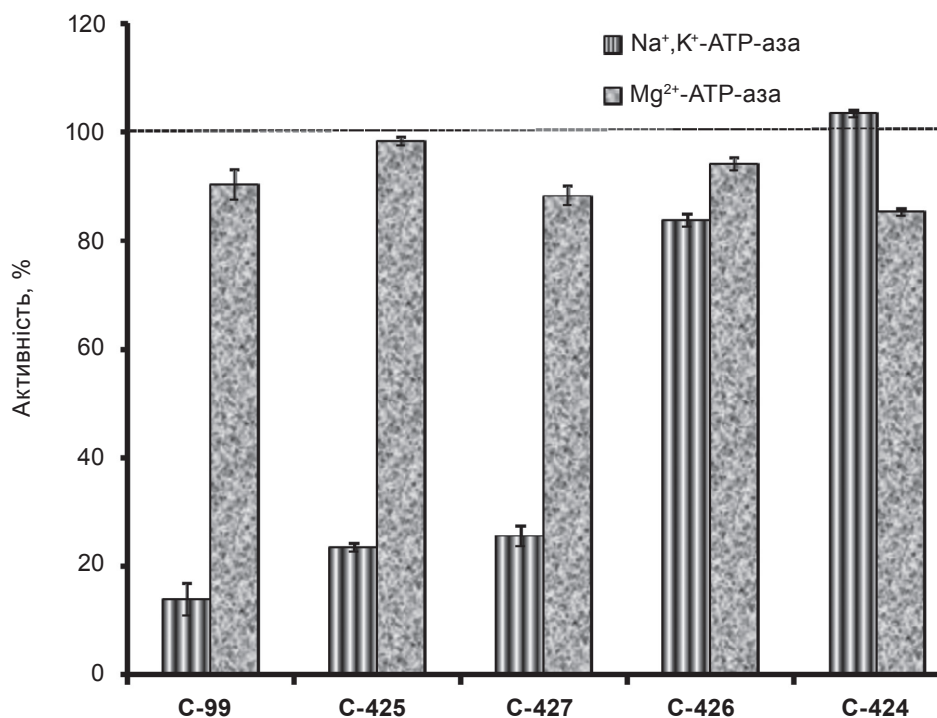


Рис. 3. Вплив каліксаренів С-99, С-424 і С-425, С-426 та С-427 (100 мкМ) на питому ензиматичну активність Na⁺,K⁺-АТФ-ази та «базальної» Mg²⁺-АТФ-ази у фракції плазматичних мембран клітин міометрія ($M \pm m, n = 5$)

sp2-гібридизованому стані порівняно з sp3-гібридизацією аналогічних атомів каліксарену С-99. Відповідно атоми кетометилфосфонатної групи знаходяться в одній площині з фенольним залишком макроциклу та жорстко закріплені на ньому, в той час як зв'язки атому вуглецю гідроксиметилфосфонові кислоти мають тетраедричну будову та здатні до обертання. Тобто метилфосфонові замісники каліксарену С-99 є конформаційно рухливими, що дозволяє їм краще «прилаштуватися» до взаємодії з ензимом. Вірогідно, що жорсткіша «конформація» залишків кетофосфонові кислоти каліксарену С-426 не здатна до ефективної взаємодії з Na⁺,K⁺-АТФ-азою.

Каліксарени С-425 і С-427, які використовувалися в концентрації 100 мкМ, виявили подібну дію на активність Na⁺,K⁺-АТФ-ази: спостерігається пригнічення активності на $76,7 \pm 0,3$ та $74,5 \pm 0,5\%$ відносно контролю відповідно (рис. 3). Поряд із цим каліксарен С-425 зовсім не впливає на питому ензиматичну активність «базальної» Mg²⁺-АТФ-ази, а каліксарен С-427 пригнічує її на $11,70 \pm 0,66\%$. Беручи до уваги значну інгібіторну дію каліксаренів С-425 і С-427 на натрієву помпу, ми дослідили концентраційну залежність їх дії. Було показано, що каліксарени С-425 та С-427,

які використовували в інтервалі концентрацій від 10^{-8} до 10^{-4} М, ефективно та дозозалежно гальмують активність Na⁺,K⁺-АТФ-ази (рис. 4). Величини уявних констант інгібування $I_{0,5}$ для цих каліксаренів становлять $1,20 \pm 0,10$ та $2,80 \pm 0,18$ мкМ відповідно (табл.). Значення коефіцієнта Хілла (n_H) для каліксаренів С-425 та С-427 практично однакові: $0,36 \pm 0,01$ і $0,38 \pm 0,01$ відповідно.

Каліксарен С-425 має 4 фосфонатні залишки на верхньому вінці макроциклу, проте його ефективність інгібування менша від каліксарену С-99 ($I_{0,5} = 98 \pm 8$ нМ), який має два фосфонатні залишки. Очевидно, що для ефективного інгібування Na⁺,K⁺-АТФ-азної активності необхідна взаємодія з ензимом саме двох фосфонатних груп. Крім цього, каліксарен С-425 має більш негативний заряд, що можливо створює електростатичні перешкоди для його ефективної взаємодії з Na⁺,K⁺-АТФ-азою. У каліксарені С-427 присутні три фосфонатні залишки, але його ефективність інгібування Na⁺,K⁺-АТФ-ази ще нижче, ніж у разі з каліксареном С-425. Один із замісників каліксарену С-427 аналогічний до замісників каліксарену С-426, який практично не інгібує ензиматичну активність Na⁺,K⁺-АТФ-ази. Таким чином, можна припустити, що ке-

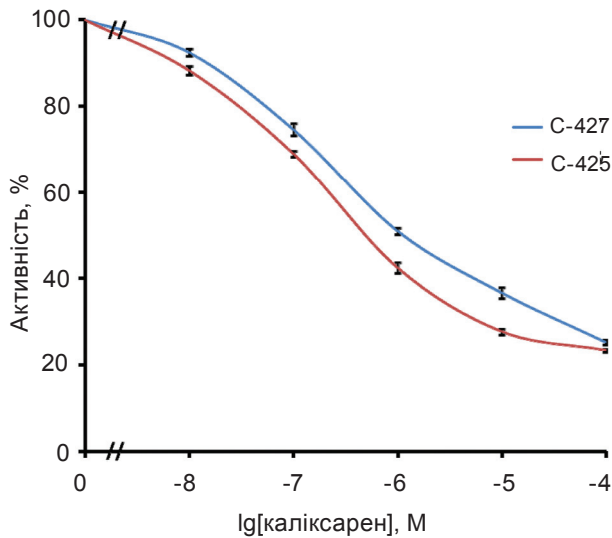


Рис. 4. Концентраційна залежність впливу каліксаренів С-425 та С-427 на активність Na^+, K^+ -АТФ-ази у фракції плазматичних мембран клітин міометрія ($M \pm m, n = 5$)

тометилфосфонатна група не бере участі в інгібуванні взаємодії з ензимом. Вірогідно, що саме друга гідроксиметилбісфосфонатна група каліксарену С-427 взаємодіє з відповідними амінокислотними залишками на поверхні ензиму та відповідно саме така взаємодія зумовлює інгібування Na^+, K^+ -АТФ-ази. Синтез та перевірка інгібіторної властивості каліксарену, який би містив одну гідроксиметилбісфосфонатну групу на верхньому вінці макроциклу, дозволить нам перевірити це припущення. Такий гіпотетичний каліксарен буде також подібним до каліксарену С-97, який має одну метиленбісфосфонатну групу на верхньому вінці макроциклу та є дуже ефективним інгібітором Na^+, K^+ -АТФ-ази ($I_{0.5} = 33 \pm 4$ нМ). Тому не виключено, що цей гіпотетичний каліксарен буде мати також високу ефективність інгібування.

Отже, порівнюючи вплив досліджених, структурно подібних калікс[4]аренів на Na^+, K^+ -АТФ-азу активність плазматичної мембрани міоцитів матки, можна визначити, які хімічні групи каліксаренів зумовлюють їхні інгібіторні властивості щодо цього ензиму. Крім того, аналіз одержаних результатів дозволяє нам припускати структуру нових гіпотетичних каліксаренів, які будуть здатні інгібувати Na^+, K^+ -АТФ-азу. Таким чином, дані цієї роботи можуть слугувати підґрунтям для подальшої розробки на основі досліджуваних каліксаренів ефективних інгібіторів Na^+, K^+ -АТФ-ази.

Робота фінансувалась цільовою комплексною міждисциплінарною програмою наукових досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій» (№ держреєстрації 0110U005971), програмою фундаментальних досліджень НАН України та національним науковим центром Франції «Супрамолекулярні системи в хімії та біології. Каліксарени як модулятори активності ензиматичних та транспортних білків гладеньких м'язів» (№ держреєстрації 0110U000988), державною цільовою науково-технічною програмою «Нанотехнології та наноматеріали» (№ держреєстрації 0110U005970), цільовою комплексною програмою фундаментальних досліджень (ЦКПФД) НАН України «Молекулярний дизайн, синтез та біологічні дослідження каліксаренових регуляторів внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу в гладеньких м'язах в нормі та у випадку порушень скоротливої функції» (№ держреєстрації 0112U004262) та грантом НАН України на підтримку досліджень молодих вчених «Каліксарени як ефектори АТФ-гідролази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин» (№ держреєстрації 0111U007135).

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ КАЛИКС[4]АРЕНА С-99 И ЕГО АНАЛОГОВ НА Na^+, K^+ -АТФ-азную АКТИВНОСТЬ В ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЕ МИОЦИТОВ МАТКИ

Т. А. Веклич¹, А. А. Шкрабак¹,
С. О. Черенок², В. И. Кальченко²,
С. А. Костерин¹

¹Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев;

²Институт органической химии
НАН Украины, Киев;

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

С целью определения роли структурной организации молекулы калікс[4]арена С-99 в проявлении ингибиторного действия на Na^+, K^+ -АТФ-азу плазматических мембран клеток миометрия, исследовано действие структурно подобных к нему калікс[4]аренов С-296, С-297, С-424, С-425, С-426, С-427 на активность данного энзима. Показано, что каліксарены С-296 и С-297 (имеют две дополнительные пропоксигруппы на нижнем венце макроцикла) менее эффективные ингибиторы Na^+, K^+ -АТФ-ази по сравнению с каліксареном С-99. Каліксарены С-425 и С-427 (имеют на верхнем венце макроцикла соответственно три

и четыре остатка фосфоновых кислот) также ингибируют активность Na^+, K^+ -АТФ-азы, но с более низкой эффективностью по сравнению с каликсареном **C-99**. Каликсарен **C-424**, у которого на верхнем венце находятся лишь два остатка карбоновой кислоты, и каликсарен **C-426**, который содержит на верхнем венце кетометилфосфоновые остатки вместо гидроксиметилфосфоновых остатков каликсарена **C-99**, не влияют на активность Na^+, K^+ -АТФ-азы. Сделаны соответствующие выводы о роли определенных химических групп каликсарена **C-99** в его взаимодействии с Na^+, K^+ -АТФ-азой.

Ключевые слова: Na^+, K^+ -АТФ-аза, Mg^{2+} -АТФ-аза, плазматическая мембрана, гладкомышечные клетки, миоцитов, кинетические свойства АТФ-азы, каликсарены, фосфоновые кислоты.

COMPARATIVE INVESTIGATION OF THE EFFECT OF CALIX[4]ARENE C-99 AND ITS ANALOGS ON Na^+, K^+ -ATPase ACTIVITY OF UTERUS MYOCYTE PLASMA MEMBRANE

*T. O. Veklich¹, A. A. Shkrabak¹,
S. O. Cherenok², V. I. Kalchenko²,
S. O. Kosterin¹*

¹Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

²Institute of Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: kinet@biochem.kiev.ua; vik@ioch.kiev.ua

S u m m a r y

The aim of our investigation was to determine structural features of calix[4]arene **C-99** which are important for its inhibition properties relative to Na^+, K^+ -ATPase of uterus myocyte plasma membrane. Therefore we studied the effect of calix[4]arenes **C-296**, **C-297**, **C-424**, **C-425**, **C-426**, **C-427**, which are structurally similar to this inhibitor, on the mentioned enzyme activity. We have shown that calixarenes **C-296** and **C-297** which have two additional propoxy groups on the lower rim of macrocycle are less effective inhibitors of Na^+, K^+ -ATPase relative to calixarene **C-99**. Calixarenes **C-425** and **C-427** which have on the upper rim of macrocycle three and four phosphonic residues, respectively, also inhibit Na^+, K^+ -ATPase activity less effectively as compared to calixarene **C-99**. Both calixarenes: **C-424**, which has only two carbonate residues on the upper rim, and **C-426**, which has on the upper rim ketomethylphosphonate residues instead of

hydroxymethylphosphonate residues of calixarene **C-99**, do not affect Na^+, K^+ -ATPase activity. We have made respective conclusions concerning the role of certain chemical groups of calixarene **C-99** during its interaction with Na^+, K^+ -ATPase.

Key words: Na^+, K^+ -ATPase, Mg^{2+} -ATPase, plasma membrane, smooth muscle cells, myometrium, kinetic properties of ATPase, calixarenes, aminophosphonic acids.

1. Geering K. // Am. J. Physiol. Renal Physiol. – 2006. – **290**. – P. 241–250.
2. Лопина О. Д. // Биол. мембр. – 2000. – **13**. – С. 721–744.
3. Morth J. P., Pedersen B. P., Toustrup-Jensen M. S. et al. // Nature. – 2007. – **450**, N 7172. – P. 1043–1049.
4. Болдырев А. А. // J. Sib. Fed. Univ. Biol. 3. – 2008. – **1**. – P. 206–225.
5. Lingrel J. B., Williams M. T., Vorhees C. V., Moseley A. E. // Bioenerg. Biomembr. – 2007. – **39**. – P. 385–389.
6. Blaustein M. P. // Am. J. Physiol. – 1993. – **264**(6 Pt 1). – P. C1367–C1387.
7. Pritchard T. J., Bowman P. S., Jefferson A. et al. // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2010. – **299**, N 2. – P. 548–556.
8. Кальченко В. І., Подік Р. В., Бойко В. І. // Журн. орг. фарм. хімії. – 2005. – **3**, № 4. – С. 13–29.
9. Geide I., Soldatov D., Kramarenko O. et al. // J. Struct. Chem. – 2005. – **46**. – P. S28–S32.
10. Coleman A. W., Jebors S., Cecillon S. et al. // New J. Chem. – 2008. – **32**. – P. 780–782.
11. Da Silva E., Lazar A. N., Coleman A. W. // J. Drug Deliv. Sci. Technol. – 2004. – **14**, N 1. – P. 3–20.
12. Paclat M-H., Rousseau C. F., Yannick C. et al. // J. Inclus. Phenom. Macrocycl. Chem. – 2006. – **55**, N 3–4. – P. 353–357.
13. Gutsche C. D. Calixarenes Revisited, Stoddart J. F., Ed. / Cambridge: The Royal Society of Chemistry – 1998. – P. 233.
14. Lalor R., Baillie-Johnson H., Redshaw C. et al. // J. Am. Chem. Soc. – 2008. – **130**, N 10. – P. 2892–2893.
15. Perret F., Lazar A. N., Coleman A. W. // Chem. Commun. – 2006. – P. 2425–2438
16. Веклич Т. О., Костерин С. О. // Укр. біохім. журн. – 2005. – **77**, № 2. – С. 66–75.
17. Кондратюк Т. П., Быченко С. Ф., Прищепина Л. А. и др. // Укр. биохім. журн. – 1986. – **58**, № 4. – С. 50–56.
18. Bradford M. M. // Anal. Biochem. – 1976. – **72**. – P. 248–282.

19. Flynn E. R. M., Bradley K. N., Muir T. C., McCarron J. G. // J. Biol. Chem. – 2001. – **276**, N 39. – P. 36411–36418.
20. Векліч Т. О., Костерін С. О., Шинлова О. П. // Укр. біохім. журн. – 2002. – **74**, № 1. – С. 42–48.
21. Rathbun W., Betlach V. // Anal. Biochem. – 1969. – **28**, N 1–3. – P. 436–445.
22. Valente R. C., Capella L. S., Monteiro R. Q. et al. // FASEB J. – 2003. – **17**, N 12. – P. 1700–1702.
23. Wang H., Haas M., Liang M. et al. // J. Biol. Chem. – 2004. – **279**, N 17. – P. 17250–17259.

Отримано 21.05.2012