

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ РОБОТИ

УДК 577.352.4+544.147+544.176+544.168

КІНЕТИКА ІНГІБІТОРНОЇ ДІЇ КАЛІКС[4]АРЕНУ C-90 НА АКТИВНІСТЬ ТРАНСПОРТНОЇ Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВИХ КЛІТИН

Т. О. ВЕКЛИЧ¹, О. А. ШКРАБАК¹, Ю. Ю. МАЗУР¹, Р. В. РОДИК²,
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

В експериментах, виконаних на суспензії плазматичних мембран клітин міометрія, яку було оброблено 0,1%-им розчином дигітоніну, досліджували кінетичні закономірності інгібуючої дії калікс[4]арену C-90 (5,11,17,23-тетра(трифтор)метил(фенілсульфоніліміно)метиламіно-25,26,27,28-тетрапропокси-калікс[4]арен) на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази активність. Перевіряли спорідненість зазначеного ензиму до АТР, іонів Mg та Ca в залежності від концентрації каліксарену C-90, а також його вплив на кооперативний ефект і на максимальну швидкість гідролізу АТР. Встановлено, що на спорідненість Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази до АТР каліксарен C-90 практично не впливає, що свідчить про відсутність конкуренції між центрами зв'язування АТР та C-90. Також відзначено відсутність впливу на спорідненість та кооперативний ефект іонів Ca у разі застосування каліксарену C-90 в концентрації до 50 мкМ. Під впливом калікс[4]арену C-90 відмічено незначне зростання коефіцієнта активації Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази хлоридом магнію. У всіх трьох випадках спостерігається істотне зменшення максимальної швидкості гідролізу АТР, що в поєднанні з відсутнім впливом на константу спорідненості свідчить про неконкурентний механізм інгібування каліксареном C-90 Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази активності.

Ключові слова: Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза, плазматична мембрана, гладеньком'язові клітини, міометрій, ензиматичний гідроліз АТР, кінетичні властивості АТРази, калікс[4]арени.

Зміни концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} призводять до скорочення гладеньком'язових клітин, до формування нервових імпульсів, а також лежать в основі багатьох сигнальних шляхів, апоптозу та некрозу. Головна роль у контролі концентрації іонів Ca у цитоплазмі належить кальцієвим транспортерам, до яких, окрім Ca^{2+} -помпи саркоплазматичного ретикулума, уніпортеру мітохондрій та Na^+ , Ca^{2+} -обмінника плазматичної мембрани, належить і кальцієва помпа (Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза (3.6.1.38)) плазматичної мембрани [1–6]. У разі гладеньких м'язів вона виконує дві фундаментальні функції: підтримання низької концентрації Ca^{2+} в розслаблених міоцитах і зниження концентрації цього катіона в міоплазмі

під час релаксації м'язів [5, 7]. Mg^{2+} -залежна Ca^{2+} -помпа використовує енергію гідролізу однієї молекули АТР для транспортування одного іона Ca проти градієнта концентрації останнього [6, 8], процес є електрогенним, оскільки у зворотному напрямку транспортується лише один протон [1, 2].

Для дослідження ролі і парціального внеску Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази в регуляцію внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca необхідно використання селективних, високо-ефективних інгібіторів, які на сьогодні, на відміну від інгібіторів для кальцієвої помпи ендо(сарко)плазматичного ретикулума [9], практично відсутні. За даними літератури на роль таких специфічних інгібіторів Ca^{2+} , Mg^{2+} -

АТРази плазматичної мембрани можуть претендувати пептиди класу калоксинів 1A1, 2A1 та 3A1, які зв'язуються з першим, другим та третім зовнішньоклітинними доменами ензиму відповідно [10–14]. У той же час низькомолекулярні селективні інгібітори кальцієвої помпи плазматичної мембрани невідомі.

Однак в останні роки продемонстровано, що циклічні олігомери фенолів – каліксарени, можуть бути ефективними інгібіторами та активаторами ензиматичних, рецепторних та транспортних мембранозв'язаних протеїнів. Каліксарени мають противірусні, бактерицидні, протипухлинні та антитромботичні властивості. Серед переваг каліксаренів можна відзначити їх синтетичну доступність, низьку токсичність [15, 16] та можливість модифікації їхньої структури різними функціональними групами [17].

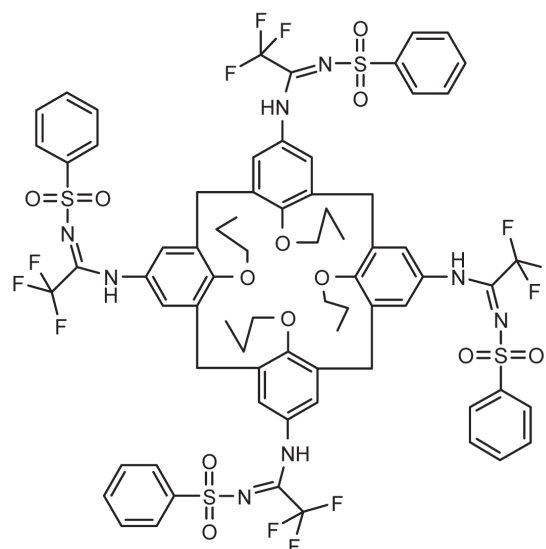
У попередніх дослідженнях нами було показано, що калікс[4]арен С-90 (наведено шифр), використаний в концентрації 100 мкМ, ефективно (на 75% відносно контрольного значення) інгібував активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази у фракції плазматичної мембрани міоцитів матки, практично не впливаючи на активність Mg^{2+} -незалежної Ca^{2+} -залежної АТРази, Na^+, K^+ -АТРази та Mg^{2+} -АТРази, локалізованих у тій самій мембранній структурі [18].

З метою кінетичної інтерпретації впливу калікс[4]арену С-90 на ензиматичну активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани міомерія ми дослідили його дію на концентраційну залежність зазначеної активності від іонів Ca , Mg та АТР.

Матеріали і методи

Калікс[4]арен С-90 (5,11,17,23-тетра(трифтор)метил(фенілсульфоніліміно)-метиламіно-25,26,27,28-тетрапропоксикалікс[4]арен) (див. структурну формулу) синтезували та охарактеризували з використанням методів ЯМР та ІЧ-спектроскопії у відділі хімії фосфоранів Інституту органічної хімії НАН України. Метод синтезу зазначеного калікс[4]арену було описано раніше [19].

Ензиматичні дослідження проведено у відділі біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України. Фракцію плазматичних мембран гладеньком'язових клітин виділяли з міомерія свині, як було описано



Калікс[4]арен С-90

раніше [20, 21]. Вміст протеїну в мембранній фракції визначали методом М. Bredford [22] із використанням реакції з реактивом кумасі – G250.

АТРазну активність визначали у фракції плазматичних мембран при 37 °С у стандартному середовищі (об'єм – 0,4 мл, яке містило (мМ): 3,0 АТР, 3,0 MgCl_2 , 25,0 NaCl , 125,0 KCl , 1 ЕГТА, 20,0 Hepes-tris-буфер (рН 7,4), 1,0 NaN_3 (інгібітор АТРази мітохондрій [23]), 1,0 убаїн (селективний інгібітор Na^+, K^+ -АТРази [24, 25]), 0,1 мкМ тапсигаргін (селективний інгібітор $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ендосарко)-плазматичного ретикулула [23]) і 0,1%-й дигітонін (фактор перфорації плазматичної мембрани [26]). Кількість протеїну мембранної фракції в пробі – 20–30 мкг. Час інкубації – 5 хв. Ензиматичну реакцію ініціювали введенням до середовища інкубації суспензії плазматичних мембран (50 мкл), а зупиняли – додаванням до інкубаційної суміші 1 мл «стоп»-розчину такого складу: 1,5 М натрій оцтовокислий, 3,7%-й формальдегід, 14%-й етанол, 5%-на трихлороцтова кислота, рН 4,3 (при 8 °С).

$\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазну активність розраховували за різницею між величинами АТРазної активності у присутності та за відсутності в середовищі інкубації 0,95 мМ CaCl_2 . Кількість продукту реакції P_i визначали за методом W. Rathbun et V. Betlach [27].

У дослідях з вивчення впливу різних концентрацій калікс[4]арену С-90 (1–100 мкМ)

на $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази активність використовували стандартне середовище інкубації, до якого додавали розчин калікс[4]-арену у відповідній концентрації, що було описане вище. У дослідах використовували концентрований (20 мМ) розчин калікс[4]арену С-90 у диметилсульфоксиді, який далі розводили водою.

Значення уявних констант активації за катіонами Ca^{2+} та Mg^{2+} ($K_{\text{Ca}}, K_{\text{Mg}}$), константи Міхаеліса (K_m), та відповідних коефіцієнтів Хілла ($n_{\text{H,Ca}}, n_{\text{H,Mg}}, n_{\text{H,ATP}}$) розраховували з використанням лінеаризованих графіків Хілла відповідно до рівняння

$$\lg[(A_{\text{max}} - A)/A] = n_{\text{H}} \lg K - n_{\text{H}} \lg [S],$$

де A_{max} – максимальна активність, A – ензиматична активність за діючої концентрації речовини S (Ca^{2+} , Mg^{2+} та АТР) у середовищі інкубації.

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

У роботі було використано такі реактиви: АТР, Ca^{2+} , Нерес, убаїн, тапсигаргін (Sigma, США), трис-гідроксиметил-амінометан (Reanal, Угорщина), дигітонін (Merck, Німеччина), ЕГТА (Fluka, Швейцарія). Інші реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації чда та хч.

Результати та обговорення

Встановлено, що для сарколеми міометрія свині питома ензиматична активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази становить $3,4 \pm 0,3$ мкмоль P_i /год на 1 мг протеїну ($M \pm m; n = 7$).

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

Ми вивчили, як впливає калікс[4]арен С-90 на спорідненість ензиму до АТР. Було досліджено вплив п'яти концентрацій калікс[4]-арену С-90 (відповідно 1, 10, 30, 60 та 100 мкМ) на концентраційну залежність від АТР (рис. 1). В усіх випадках спостерігається зниження активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази, при цьому

залежність ензиматичної активності від АТР виявляє характер, подібний до відповідної контрольної залежності без калікс[4]арену С-90, але відбувається зниження платового рівня активності зі зростанням концентрації калікс[4]-арену.

З отриманих залежностей ми розраховали максимальну початкову швидкість V_{max} реакції гідролізу АТР, що каталізується $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани, за відсутності та у разі наявності калікс[4]арену С-90 в різних концентраціях (рис. 2, а). Як видно із графіка, калікс[4]арен С-90 знижує V_{max} реакції, що свідчить про зниження числа обертів ензиму за його дії. Були також розраховані уявні константи Міхаеліса K_m та коефіцієнти Хілла $n_{\text{H,ATP}}$ за відсутності та за наявності калікс[4]арену С-90 в різних концентраціях (рис. 2, б). Представлені результати свідчать, що вплив калікс[4]арену С-90 є неконкурентним відносно АТР.

Отже, спорідненість $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази до АТР практично не залежить від концентрації калікс[4]арену С-90 в середовищі інкубації, що вказує на відсутність конкуренції між АТР та інгібітором. Тому можна припустити, що субстратний центр $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази та гіпотетичний сайт взаємодії калікс[4]арену С-90 не перекриваються на поверхні ензиму.

У подальших експериментах, ми вивчали залежність питомої активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази від концентрації Ca^{2+} в інкубаційному середовищі за різних концентрацій калікс[4]-арену С-90 (відповідно 1, 10, 30, 60 та 100 мкМ). У цьому разі розраховували концентрацію іонів Са, враховуючи концентрацію ЕГТА та його спорідненість до Ca^{2+} . Ензиматична активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани міометрія зростала в міру збільшення концентрації іонів Са від 100 до 1000 нМ, однак зменшувалась у разі збільшення концентрації інгібітора (рис. 3).

Розраховано кінетичні параметри активації іонами Са та перевірено вплив на них калікс[4]-арену С-90 (рис. 4, а, б). Величина V_{max} зменшувалася внаслідок збільшення концентрації калікс[4]-арену С-90 (рис. 4, а). Значення коефіцієнта активації $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази K_{Ca} за відсутності калікс[4]арену С-90 становило 190 ± 1 нМ, величина коефіцієнта Хілла $n_{\text{H,Ca}}$ дорівнювала $2,1 \pm 0,1$ ($M \pm m; n = 5$). Внесення в середовище інкубації калікс[4]арену С-90

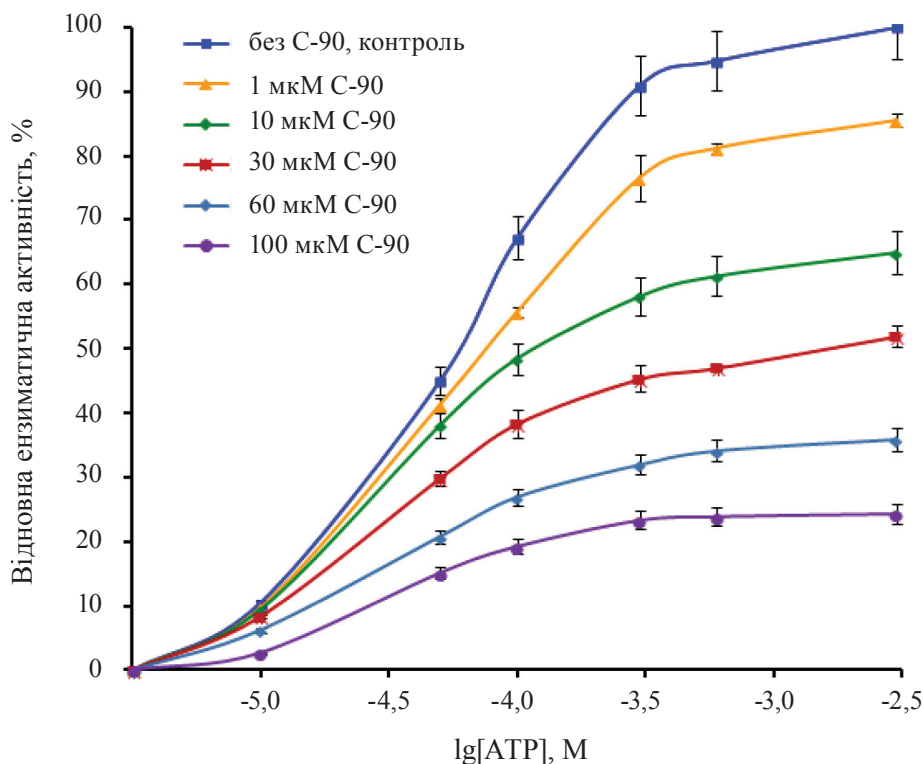


Рис. 1. Вплив збільшення концентрації калікс[4]арену C-90 на залежність відносної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності плазматичної мембрани клітин міомерія від концентрації АТР ($M \pm t, n = 5$). За 100% прийнято значення питомої ензиматичної активності за відсутності калікс[4]арену C-90 у середовищі інкубації за концентрації АТР 3 мМ

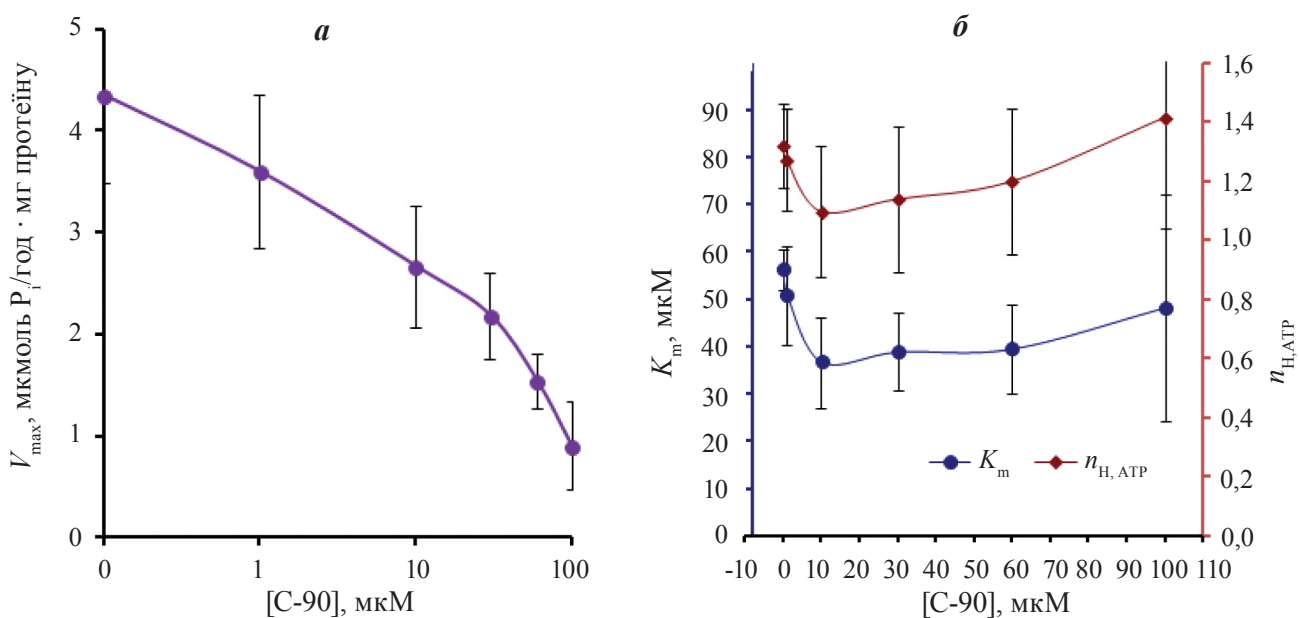


Рис. 2. Вплив калікс[4]арену C-90 в різних концентраціях на кінетичні параметри реакції гідролізу АТР (V_{max} (а), K_m і $n_{H,ATP}$ (б)), що каталізується $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазою плазматичної мембрани клітин міомерія ($M \pm t, n = 5$)

збільшувало константу активації іонами Ca до 312 ± 23 нМ (у присутності 100 мкМ С-90), тоді як величина коефіцієнта Хілла знижувалася до $1,5 \pm 0,1$ ($M \pm m$; $n = 5$). Але до 50 мкМ калікс[4]-арен С-90 практично не впливає на спорідненість Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази до іонів Ca, та на кооперативний ефект активації ензиму вказаними іонами.

Значення Mg^{2+} для метаболізму полягає в його властивостях промотора структури макромолекул, субстратв'язуючого іона і переносника електронів. Відомо багато Mg^{2+} -залежних ензимів, де роль Mg^{2+} не обмежується активацією субстрату, а пов'язана із формуванням активного (каталітичного) центру. Проте найважливіша роль Mg^{2+} полягає в утворенні хелатного комплексу з АТФ – субстратом аденозинтрифосфатних реакцій. Вважають, що Mg^{2+} вступає у взаємодію із фосфатними зарядженими групами АТФ, поляризує їх і підвищує реакційну здатність системи, полегшуючи нуклеофільну атаку на термінальний фосфатний залишок АТФ [28].

Досліджено вплив калікс[4]арену С-90 (1, 10, 30, 60 та 100 мкМ) на концентраційну

залежність АТФ-гідролазної активності від MgCl_2 (рис. 5). Активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани міометрія зростає під час збільшення концентрації MgCl_2 від 0,1 до 3 мМ при фіксованих концентраціях АТФ (3 мМ) в інкубаційному середовищі та пригнічується при збільшенні концентрації С-90. Значення уявної константи активації Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази K_{Mg} за відсутності калікс[4]-арену С-90 складає $0,70 \pm 0,08$ мМ, величина коефіцієнта Хілла $n_{\text{H}, \text{Mg}} - 1,0 \pm 0,1$ ($M \pm m$; $n = 5$). В усіх випадках у разі внесення до середовища інкубації калікс[4]арену С-90, спостерігалось зниження активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази з різним ступенем ефективності. Величина V_{max} зменшувалася за збільшення концентрації калікс[4]-арену С-90 (рис. 5, а). Продемонстровано, що під впливом калікс[4]арену С-90, спостерігається зростання коефіцієнта активації Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази хлоридом магнію K_{Mg} до $1,4 \pm 0,2$ мМ (у присутності 100 мкМ С-90), тобто у 2 рази. При цьому величина коефіцієнта Хілла практично не змінюється (рис. 6, а, б).

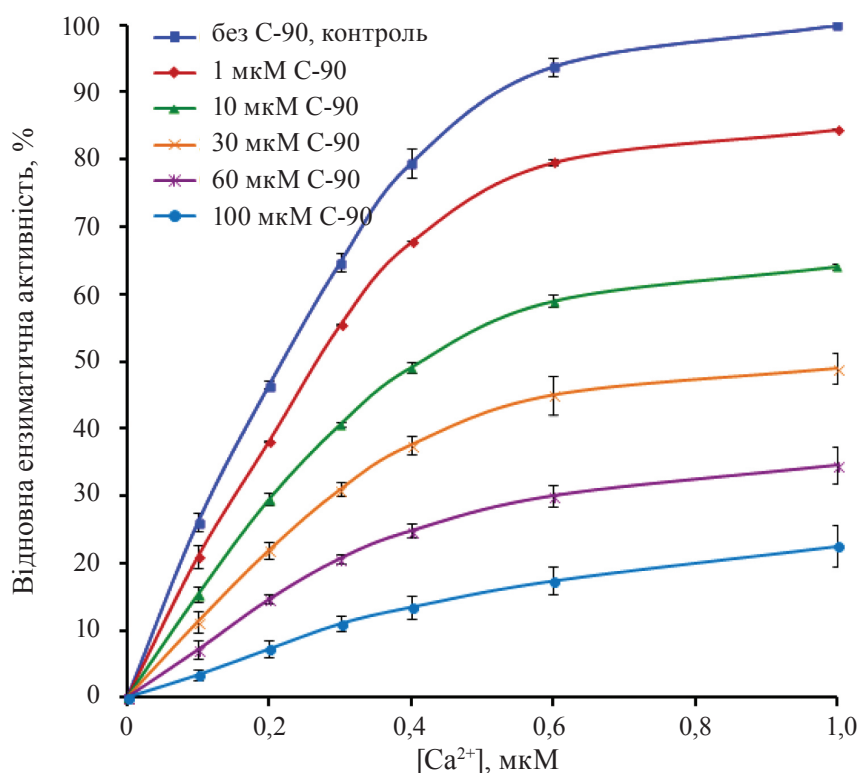


Рис. 3. Вплив збільшення концентрації калікс[4]арену С-90 на залежність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазної активності плазматичної мембрани клітин міометрія від концентрації іонів Ca ($M \pm m$, $n = 5$). За 100% прийнято значення питомої ензиматичної активності за відсутності калікс[4]арену С-90 в середовищі інкубації

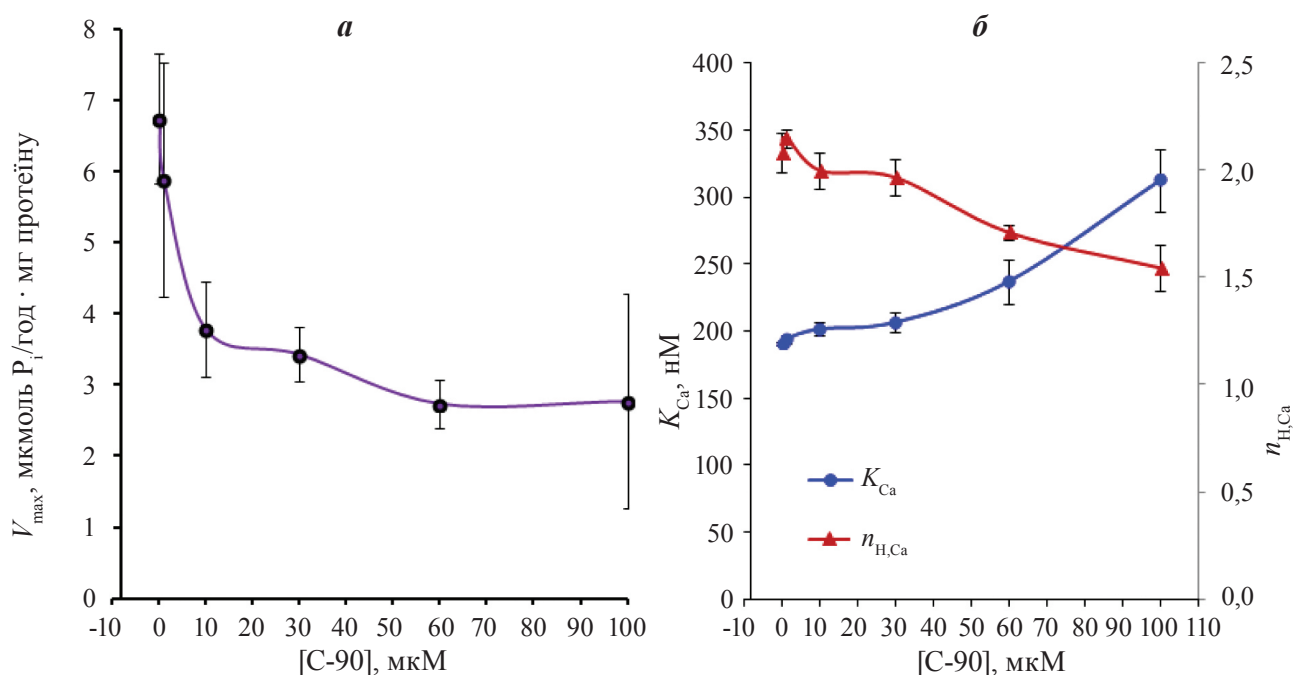


Рис. 4. Вплив калікс[4]арену C-90 в різних концентраціях на кінетичні параметри реакції гідролізу АТР по Ca^{2+} (V_{max} (а), K_{Ca} і $n_{H,Ca}$ (б)), що каталізується Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРазою плазматичної мембрани клітин міометрія ($M \pm t, n = 5$)

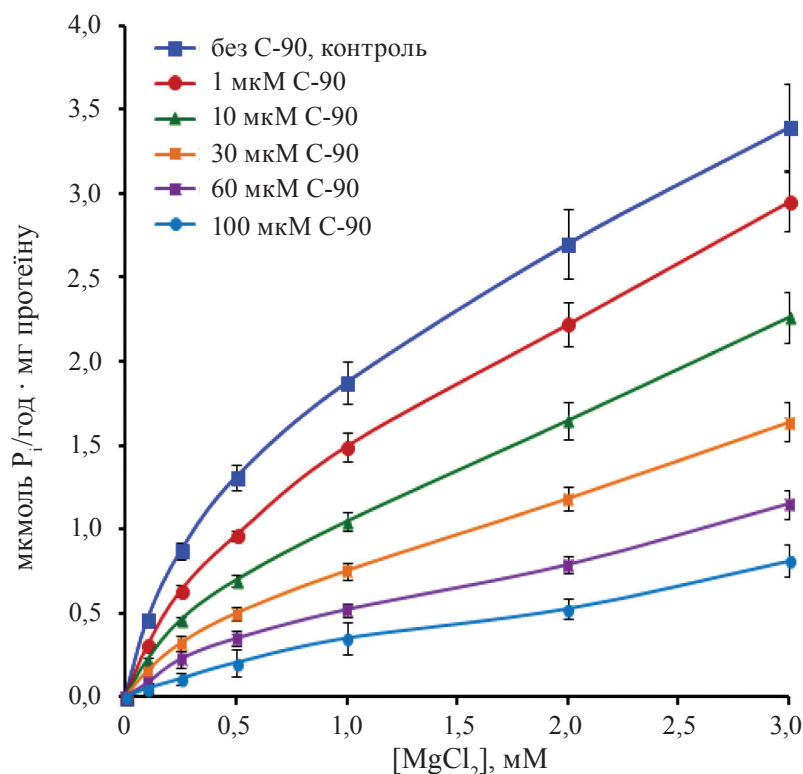


Рис. 5. Вплив збільшення концентрації калікс[4]арену C-90 на залежність Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРазної активності плазматичної мембрани клітин міометрія від концентрації $MgCl_2$ ($M \pm t, n = 5$). За 100% прийнято значення питомої ензиматичної активності за відсутності калікс[4]арену C-90 в середовищі інкубації при концентрації Mg^{2+} 3 мМ

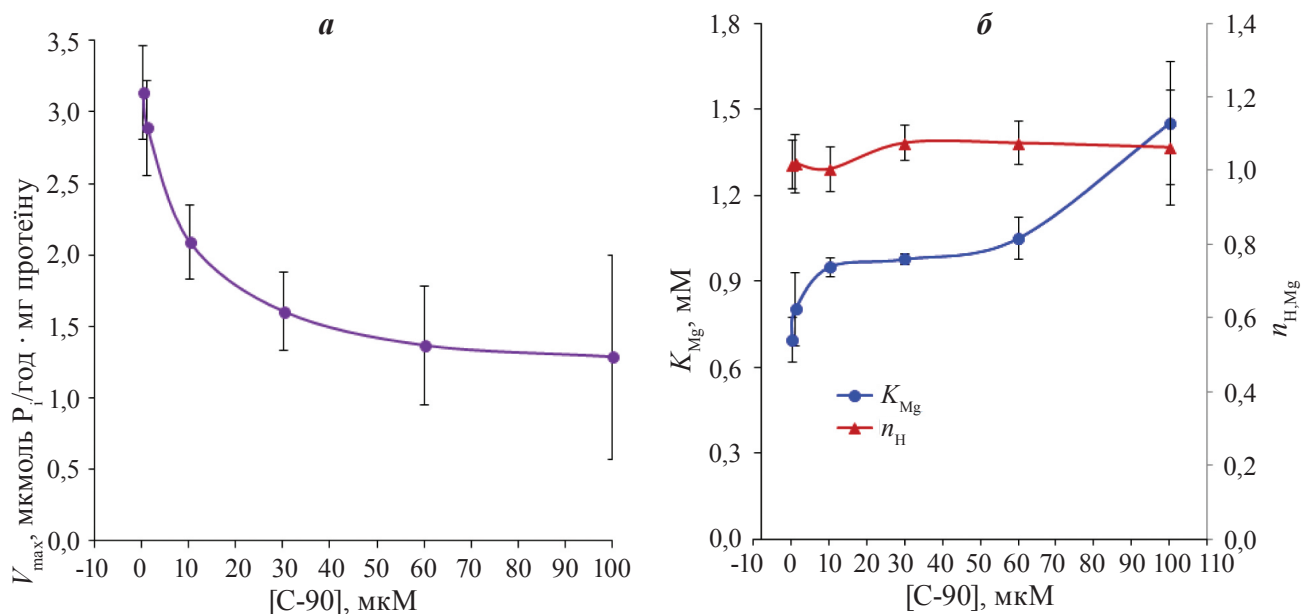


Рис. 6. Вплив калікс[4]арену С-90 в різних концентраціях на кінетичні параметри реакції гідролізу АТФ по Mg^{2+} (V_{max} (а), K_{Mg} і $n_{H,Mg}$ (б)), що каталізується $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазою плазматичної мембрани клітин міомерія ($M \pm t$, $n = 5$).

Таким чином, результати цієї роботи можуть слугувати підґрунтям для розробки на основі каліксарену ефективного інгібітора $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани, що, в свою чергу, матиме важливе значення для подальшого з'ясування мембранних механізмів катіонного обміну в гладеньких м'язах, зокрема, під час вивчення ролі плазматичної мембрани в забезпеченні електромеханічного sprzęження в них, а також у регуляції іонного гомеостазу в гладеньком'язових клітинах. Крім цього, селективний інгібітор кальцівої помпи плазматичної мембрани може бути основою для розробки фармакологічних засобів, здатних корегувати внутрішньоклітинну концентрацію іонів Са за патологічних станів, які супроводжуються порушенням скоротливої активності гладеньких м'язів, у тому числі міомерія.

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 завдяки гранту НАН України на підтримку досліджень молодих вчених «Каліксарени як ефектори АТГідролази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин» (№ держреєстрації 0111U007135).

**КИНЕТИКА ИНГИБИТОРНОГО
ДЕЙСТВИЯ КАЛИКС[4]АРЕНА С-90
НА АКТИВНОСТЬ ТРАНСПОРТНОЙ
Ca²⁺,Mg²⁺-АТРазы ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ
МЕМБРАНЫ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ
КЛЕТОК**

*Т. А. Веклич¹, А. А. Шкрабак¹, Ю. Ю. Мазур¹,
Р. В. Родик², 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

В экспериментах, выполненных на суспензии плазматических мембран клеток миомеретрия, обработанных 0,1%-ым раствором дигитонина, исследовали кинетические закономерности ингибирующего действия каликс[4]арена С-90 (5,11,17,23-тетра(трифтор)метил(фенилсульфонилимино)метиламино-25,26,27,28-тетрапропоксикаликс[4]арен) на Ca²⁺,Mg²⁺-АТРазную активность. Проверили сродство указанного энзима к АТФ, ионам Mg и Ca в зависимости от концентрации каликсарена С-90, а также его влияние на кооперативный эффект и на максимальную скорость гидролиза АТФ. Показано, что на сродство Ca²⁺,Mg²⁺-АТРаза к АТФ каликсарен С-90 практически не влияет, что свидетельствует об отсутствии конкуренции между центрами связывания АТФ и С-90. Также отмечено отсутствие влияния на сродство и кооперативный эффект ионов Ca при применении каликсарена С-90 в концентрациях до 50 мкМ. Под влиянием каликс[4]арена С-90 наблюдается незначительное увеличение коэффициента активации Ca²⁺,Mg²⁺-АТРаза хлоридом магния. Во всех трех случаях наблюдалось существенное уменьшение максимальной скорости гидролиза АТФ, что в сочетании с отсутствием влияния на константу сродства свидетельствует о неконкурентном механизме ингибирования каликсареном С-90 Ca²⁺,Mg²⁺-АТРазной активности.

Ключевые слова: Ca²⁺,Mg²⁺-АТРаза, плазматическая мембрана, гладкомышечные клетки, миомеретрий, энзиматический гидролиз АТФ, кинетические свойства АТРаза, каликс[4]арены.

**KINETICS OF INHIBITORY EFFECT
OF CALIX[4]ARENE C-90 ON
ACTIVITY OF TRANSPORTING
PLASMA MEMBRANE Ca²⁺, Mg²⁺-
ATPase OF SMOOTH MUSCLE CELLS**

*T. O. Veklich¹, A. A. Shkrabak¹, Yu. Yu. Mazur¹,
R. V. Rodik², 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

In experiments on the suspension of myometrium cell plasma membrane, processed by 0.1% digitonin, the inhibitory action of calix[4]arene C-90 (5,11,17,23-tetra(threeftor) methyl(phenilsulphonilimino)-methylamino-25,26, 27,28-tetrapropoxy-calix[4]arene) on the activity of Ca²⁺,Mg²⁺-ATPase was investigated. The authors also examined the influence of calix[4]arene in different concentration on affinity of enzyme (Ca²⁺,Mg²⁺-ATPase) for the ATP and ions of Mg and Ca, and its influence on cooperative effect and maximum velocity of ATP hydrolysis. It is shown that calix[4]arene does not influence the affinity of Ca²⁺,Mg²⁺-ATPase for the ATP, which means that these two compounds have different binding centers. Also calix[4]arene has no influence on affinity and cooperative effect of Ca ions, if it is used in concentration lower than 50 μM. Calix[4]arene slightly increases coefficient of Ca²⁺,Mg²⁺-ATPase activation by magnesium chloride. In all three cases, where ATP, Mg and Ca ions are used to test the impact of calix[4]arene, maximum velocity of ATP hydrolysis significantly decreases. All these results clarify that calix[4]arene implements its inhibitory action through mechanism of uncompetitive inhibition of Ca²⁺,Mg²⁺-ATPase activity.

Key words: Ca²⁺,Mg²⁺-ATPase, plasma membrane, smooth muscle cells, myometrium, enzymatic hydrolysis of ATP, kinetic properties of ATPase, calix[4]arenes.

References

1. Austin C., Wray S. Interactions between Ca²⁺ and H⁺ and functional consequences in vascular smooth muscle. *Circ. Res.* 2000;86:353-363.
2. Brini M., Caratoli E. Calcium pumps in health and disease. *Physiol. Rev.* 2009;89(4):1341-1378.

3. Burdyga T., Paul R. J. Chapter 86 - Calcium homeostasis and signaling in smooth Muscle. Muscle. Fundamental Biology and Mechanisms of Disease. Edited by J. A. Hill and E. N. Olson. Elsevier Inc. 2012;2:1155-1171.
4. Fafula R. V., Efremova U. P., Vorobets Z. D. Characteristics of Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPases of peripheral blood lymphocytes of patients with rheumatic pathology. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2012; 84(6):115-123. (In Ukrainian).
5. Kosterin S. O. Kinetics and energetics of Mg^{2+} ,ATP-dependent Ca^{2+} transport in the plasma membrane of smooth muscle cells. *Neurophysiology.* 2003;35(3-4):187-200.
6. Koide M., Nystoriak M. A., Brayden J. E., Wellman G. C. Impact of subarachnoid hemorrhage on local and global calcium signaling in cerebral artery myocytes. *Acta Neurochir. Suppl.* 2011;110(Pt 1):145-150.
7. Carafoli E., Brini M. Calcium pumps: structural basis for and mechanism of calcium transmembrane transport. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2000;4(2):152-161.
8. Pestov N. B., Shakhparanov M. I., Dmitriev R. I. Regulation of Ca^{2+} -ATPase activity. *Biological Chemistry Reviews.* 2003;43:99-138.
9. Vats Yu. O., Klepets M. Yu., Fedirko N. V. Kinetic characteristics of Ca^{2+} -transport, Mg^{2+} -activated ATPases from cells of the submandibular salivary gland. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2004;76(6):44-54. (In Ukrainian).
10. Rosa A. O., Yamaguchia N., Mortan M. Mechanical regulation of native and the recombinant calcium channel. *Cell Calcium.* 2013;53(4):264-274.
11. Chen H. H., Lin Y. R., Peng Q. G., Chan M. H. Effects of trichloroethylene and perchloroethylene on muscle contractile responses and epithelial prostaglandin release and acetylcholinesterase activity in swine trachea. *Toxicol. Sci.* 2005;83(1):149-154.
12. Pande J., Mallhi K. K., Grover A. K. A novel plasma membrane Ca^{2+} -pump inhibitor: caloxin 1A1. *Eur. J. Pharmacol.* 2005;508(1-3):1-6.
13. Pande J., Mallhi K. K., Grover A. K. Role of third extracellular domain of plasma membrane Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase based on the novel inhibitor caloxin 3A1. *Cell Calcium.* 2005;37(3):245-250.
14. Szewczyk M. M., Pande J., Akolkar G., Grover A. K. Caloxin 1b3: A novel plasma membrane Ca^{2+} -pump isoform 1 selective inhibitor that increases cytosolic Ca^{2+} in endothelial cells. *Cell Calcium.* 2010;48(6):352-357.
15. Coleman A. W., Jebors S., Cecillon S., Perret P., Garin D., Marti-Battle D., Moulin M. Toxicity and biodistribution of para-sulfonato-calix[4]-arene in mice. *New J. Chem.* 2008;32(5):780-782.
16. Da Silva E., Lazar A. N., Coleman A. W. Biopharmaceutical applications of calixarenes. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2004;14(1):3-20.
17. Rodik R. V. Application of calixarenes for DNA transfection in cells. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2012;84(5):5-15. (In Ukrainian).
18. Veklich T. O., Shkrabak O. A., Mazur Yu. Yu., Rodik R. V., Boyko V. I., Kalchenko V. I., Kosterin S. O. Kinetic regularities of calixarene C-90 action on the myometrial plasma membrane Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity and on Ca^{2+} concentration in unexcited cells of the myometrium. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2013;85(4):20-29. (In Ukrainian).
19. Rodik R., Boiko V., Danylyuk O., Suwińska K., Tsybmal I., Slinchenko N., Babich L., Shlykov S., Kosterin S., Lipkowski J., Kalchenko V. Calix[4]-arenesulfonamidines. Synthesis, structure and influence on Mg^{2+} ,ATP-dependent calcium pumps. *Tetrahedron Letters.* 2005;(46):7459-7462.
20. Veklich T. O., Kosterin S. O. Comparative research of properties of Na^{+} , K^{+} -ATPase and Mg^{2+} -ATPase of the plasma membrane of the myometrium. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2005;77(2):66-75. (In Ukrainian).
21. Kondratuk T. P., Buchenuk S. F., Prichepa A. A., Babich L. G., Kursky M. D., Osipenko A. A. Isolation and characteristic of the fraction of plasma membranes in pig myometrium. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 1986;58(4):50-56. (In Ukrainian).
22. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976;72(1-2):248-282.
23. Flynn E. R. M., Bradley K. N., Muir T. C., McCarron J. G. Functionally separate intracellular Ca^{2+} stores in smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 2001;276(39):36411-36418.
24. Valente R. C., Capella L. S., Monteiro R. Q., Rumjanek V. M., Lopes A. J., Capella M. A. Mechanisms of ouabain toxicity. *FASEB J.* 2003;17(12):1700-1702.
25. Wang H., Haas M., Liang M., Cai T., Tian J., Li S., Xie Z. Ouabain assembles signaling

- cascades through the caveolar Na⁺/K⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* 2004;279(17):17250-17259.
26. Veklich T. O., Kosterin S. O., Schinlova O. P. Cation specificity of Ca²⁺ accumulation system in the smooth muscle cells mitochondria. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2002;74(1):42-48. (In Ukrainian).
27. Rathbun W., Betlach V. Estimation of enzymically produced orthophosphate in the presence of cysteine and adenosine triphosphate. *Anal. Biochem.* 1969;28(1-3):436-445.
28. Boldyrev A. A. Na/K-ATPase as oligomeric ensemble. *Biokhimiya.* – 2001;66(6):1013-1025. (In Russian).

Отримано 12.02.2014