



УДК 577.3

© 2007

О. В. Цимбалюк, О. В. Онуфрийчук, М. С. Мірошніченко,
С. О. Черенок, член-кореспондент НАН України В. І. Кальченко,
член-кореспондент НАН України С. О. Костерін

**Каліксарен *бис*-гидроксиметилфосфонова кислота
змінює механокінетичні параметри скорочення
кільцевих гладеньких м'язів *саесит* щура,
що викликані ацетилхоліном**

We studied the influence of calixarene bis-hydroxymethylphosphone acid (code C99) on the mechanokinetic parameters of the acetylcholine-evoked contractions of smooth muscles caecum strips of rats. It is established that this substance inhibits the amplitude and selectively modifies the mechanokinetic characteristics of contractions. The kinetic analysis has shown that the normalized maximal rate of contraction was not changed relative to control, and the normalized maximal rate of relaxation was significantly inhibited by calixarene C99 in such a manner that the form of dependence of this parameter on the effector concentration changed from sigmoid (in control) to linear.

Каліксарени — макроциклічні сполуки, здатні включати у високовпорядковані молекулярні порожнини різноманітні за природою біомолекули: амінокислоти та дипептиди [1], стероїди [2], ацетилхолін [3], бичачий сироватковий альбумін [4, 5]. Речовини цього класу мають широкий спектр дії на живі системи. Вони здатні специфічно модифікувати ферментні системи (інгібування лужної фосфатази, активування реакцій трансетерифікації полірибонуклеїнових кислот, гідратації аналогів НАДН тощо); зв'язуватись з мембраною, формуючи в ній селективні до окремих іонів (зокрема, Na^+ й K^+) канали; слугувати в якості платформи для дизайну штучних антитіл; мають антибактеріальну, антивірусну, антикоагуляційну, антитромботичну [6, 7] та протипухлинну активність [8]. Таким чином, дослідження впливу речовин класу каліксаренів на біологічні системи є надзвичайно важливою проблемою біофізики.

Як було показано нами раніше [9], одна із сполук цієї групи — каліксарен *бис*-гидроксиметилфосфонова кислота (С99) (рис. 1) є високоспецифічним інгібітором Na^+ - K^+ -АТФази. Із використанням комп'ютерного моделювання було також показано, що каліксарен С99 здатний утворювати супрамолекулярний комплекс з агоністом М-холінорецепторів ацетилхоліном (рис. 2), який, подібно до комплексу з калікс[4]аренсульфо кислотою [3],

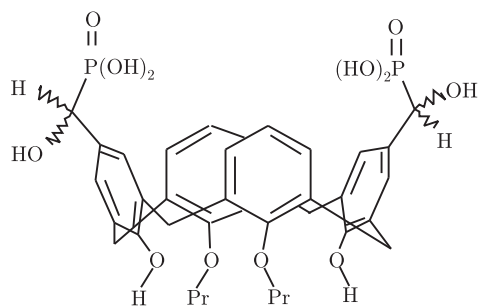


Рис. 1. 5,17-Біс(дигідроксифосфонілметил)-25,27-дипропоксикалікс[4]арен (С99)

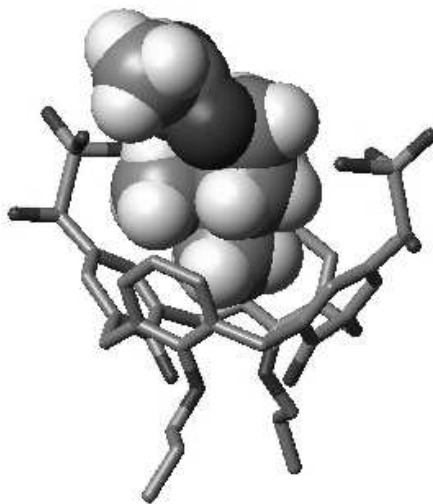


Рис. 2. Енергетично мінімізована структура комплексу С99 з ацетилхоліном (HyperChem 7, РМЗ, вакуум). Атоми водню в молекулі каліксарену не показані

стабілізується електростатичними та $C-H \cdots \pi$ взаємодіями між рецептором та субстратом.

Na^+-K^+ -АТФаза (натрієва помпа) — важлива транспортна система плазматичної мембрани, яка генерує трансмембранний градієнт іонів Na^+ й K^+ і, як наслідок, забезпечує значний внесок у мембранний потенціал клітини. Специфічним блокатором натрієвої помпи є оубаїн, його аналоги синтезуються в організмі, зокрема, наднирками і гіпоталамусом [10–12]. Шляхом каталітичного титрування було показано [9], що С99 значно ефективніше, ніж оубаїн, пригнічує активність Na^+-K^+ -АТФази сарколеми міомерія свині. Також було виявлено здатність обох блокаторів інгібувати скоротливі реакції гладеньких м'язів (ГМ) *saesum* щура на аплікацію гіперкалієвого розчину та медіатора ацетилхоліну (АCh) [9].

Для подальшого з'ясування закономірностей впливу С99 на ГМ досліджували ефект цієї речовини на механокінетичні параметри АCh-викликаних скорочень мультіклітинних препаратів кільцевих ГМ *saesum*.

Матеріали і методи досліджень. Каліксарен С99 був синтезований за методикою, описаною в роботі [13]. Експерименти здійснювали на препаратах *saesum* декапітованих щурів масою 200–250 г. Очищені кільцеві гладеньком'язові смужки мали середній розмір $1,5 \times 10$ мм. Дослідження проводили в робочій камері (об'єм 2 мл) з проточним розчином Кребса (швидкість проходження 5 мл/хв), термостатованій при $37^\circ C$. Препарату надавали

пасивний натяг на рівні 10 мН і залишали на 1 год (до появи спонтанних скорочень постійної амплітуди і частоти та скорочень, викликаних АСh з постійними механокінетичними параметрами). Скоротливу активність досліджували в ізометричному режимі за допомогою датчика сили. Сигнали реєстрували, використовуючи електричний потенціометр НЗ39.

У досліджах використовували розчин Кребса такого складу, мМ: 120,4 NaCl; 5,9 KCl; 15,5 NaHCO₃; 1,2 NaH₂PO₄; 1,2 MgCl₂; 2,5 CaCl₂; 11,5 глюкоза; значення рН розчину становило 7,4. Для задання ефективних концентрацій АСh спочатку готували його концентрований водний розчин (з розрахунку додавання 1% розчину речовини до кінцевого об'єму), аліквоту якого вносили у розчин Кребса до одержання потрібної концентрації. Каліксарен попередньо розчиняли в диметилсульфоксиді (DMSO) і вносили в розчин Кребса (остаточно вміст DMSO становив 1% загального об'єму розчину) за 30 хв до вивчення механічної активності гладеньком'язової смужки.

Аналіз механокінетичних параметрів процесу скорочення-розслаблення гладеньком'язових препаратів здійснювали аналогічно методу, описаному раніше [12], в основу якого покладено лінеаризацію фази розслаблення механокінетичної кривої в координатах $\{\ln[(f_m - f)/f]; \ln t\}$, де f_m — величина максимальної сили скорочення. Час, за який досягається f_m , приймається початковою точкою відліку фази розслаблення $t = 0$; поточному значенню часу t відповідає значення миттєвої сили f . Даний метод дає змогу розраховувати механокінетичні параметри, які характеризують спонтанні або викликані скоротливі відповіді та не залежать від амплітуди f_m . Найбільш інформативною кінетичною характеристикою процесу розслаблення, що не залежить від амплітуди, є нормована максимальна швидкість розслаблення V_n :

$$V_n = -\frac{1}{f_m} \frac{df}{dt} = \frac{(n-1)^{(n-1)/n} (n+1)^{(n+1)/n}}{4n\tau}, \quad (1)$$

де τ та n — характеристичний час (чисельно дорівнює часу, в який спостерігається напів-максимальне значення сили $1/2f_m$) та показник крутизни фази розслаблення відповідно. Оскільки фаза скорочення м'язу (за характером зміни напруження в часі) не має принципових відмінностей від фази розслаблення, даний метод також можливо застосовувати і для аналізу фази генерації напруження.

Статистичну обробку одержаних результатів та механокінетичний аналіз проводили в програмі Origin 7.0 (OriginLab Corporation, США). У випадку лінеаризованих механокінетичних графіків типове значення коефіцієнта кореляції r становило 0,976–0,998.

Результати експериментів обробляли статистично з використанням критерію t Ст'юдента, із залученням загальновідомих стандартних методів. Розрахунки здійснювали в режимі програмного забезпечення на персональному комп'ютері IBM PC.

Результати і обговорення. АСh є медіатором, вивільнення якого з нервових закінчень інтрамурального нервового сплетення спричиняє скорочення ГМ кишечника. Мускаринові холінорецептори клітин вісцеральних ГМ представлені М2 та М3 підтипами [14, 15]. Первинне швидке зростання сили скорочення у відповідь на аплікування АСh — фазний компонент, забезпечується збільшенням концентрації Ca²⁺ у міоплазмі шляхом його вивільнення з інозитол-1,4,5-трифосфатчутливого компартменту саркоплазматичного ретикулуму у відповідь на активацію рецепторів М3 підтипу. Наступний підвищений рівень напруження м'язу (тонічний компонент АСh-викликаного скорочення) асоційований з активацією М2 підтипу мускаринових холінорецепторів; в цей час деполяризована плазматична мембрана проникна для Ca²⁺, який потрапляє до клітини через кальцієві канали L-типу [14, 15].

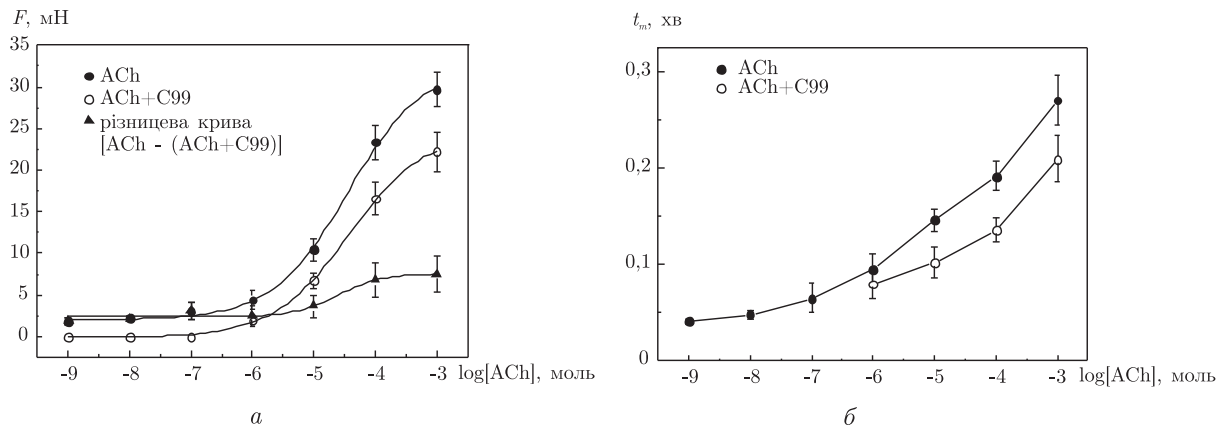


Рис. 3. Концентраційна залежність ацетилхолін-викликаних скорочень гладеньком'язових препаратів *saesum* у контролі (ACh; $M \pm m$, $n = 7$) та у присутності каліксарену С99 (ACh + C99; $M \pm m$, $n = 7$): *a* – амплітуда скорочення (f_m) у контролі (ACh), у присутності каліксарену С99 (ACh + C99) та різницева крива [ACh – (ACh + C99)]; *б* – час досягнення максимального напруження препарату (t_m)

У роботі було досліджено скоротливі відповіді ГМ препаратів на АСh в концентраціях 10^{-9} – 10^{-3} М. Скорочення характеризували амплітудою фазового компонента (f_m) та часом від початку наростання сили до амплітудного значення (t_m). Далі, скорочення, що були отримані в контролі, порівнювали з такими, зареєстрованими в присутності в розчині каліксарену С99 (10^{-5} М).

Як видно з рис. 3, *a*, *б*, АСh дозозалежно збільшував силу скорочень f_m та показник часу t_m . Додаткове введення до омиваючого розчину каліксарену С99 у концентрації 10^{-5} М (за 30 хв до початку АСh стимуляції м'язу) викликало стабільне вірогідне пригнічення амплітуди f_m АСh-викликаних скорочень на величину 30–35%. Так, аплікування АСh у низьких концентраціях (10^{-9} – 10^{-7} М) на фоні каліксарену не змінювало напруження ГМ препаратів (рис. 3, *a*). Мінімальна концентрація АСh, яка спричиняла скоротливу реакцію м'язу, в присутності С99 була на три порядки вища порівняно з контролем (10^{-6} та 10^{-9} М відповідно). Концентрація АСh, яка викликає напівмаксимальне скорочення (EC_{50}), під впливом С99 зростала в три рази порівняно з контрольним значенням.

Для одержання додаткової інформації про величину зміни функціональної спроможності ГМ під впливом С99 розраховували різницю максимальної сили скорочення в контролі та в присутності каліксарену ($f_m - f_{m,C99}$); відповідну залежність лінеаризували в координатах Хілла ($\lg(A_0 - A)/A$; $\lg[\text{ACh}]$), A_0 та A – амплітудні значення скоротливих відповідей у відсутності та у присутності в омиваючому розчині С99 відповідно. Лінеаризований графік був використаний для розрахунку коефіцієнта Хілла n_H та уявної константи ігбування $I_{0,5}$. Ці величини для С99 в концентрації 10^{-5} М становили: $n_H = (0,63 \pm 0,04)$ та $I_{0,5} = (4,55 \pm 0,23)$ мкМ.

Час досягнення амплітудного значення сили t_m виявляв логарифмічну залежність від концентрації АСh (рис. 3, *б*). Принциповий характер тренду не змінювався під дією каліксарену С99, однак дана субстанція спричиняла незначне вірогідне зменшення показника часу t_m .

Використання методів кінетичного аналізу дозволяє отримати додаткову інформацію про характер змін скорочень за умови впливу на м'яз тих чи інших фізико-хімічних чинників. Попередньо було показано, що метод [9, 12] є надзвичайно чутливим до зміни характеру

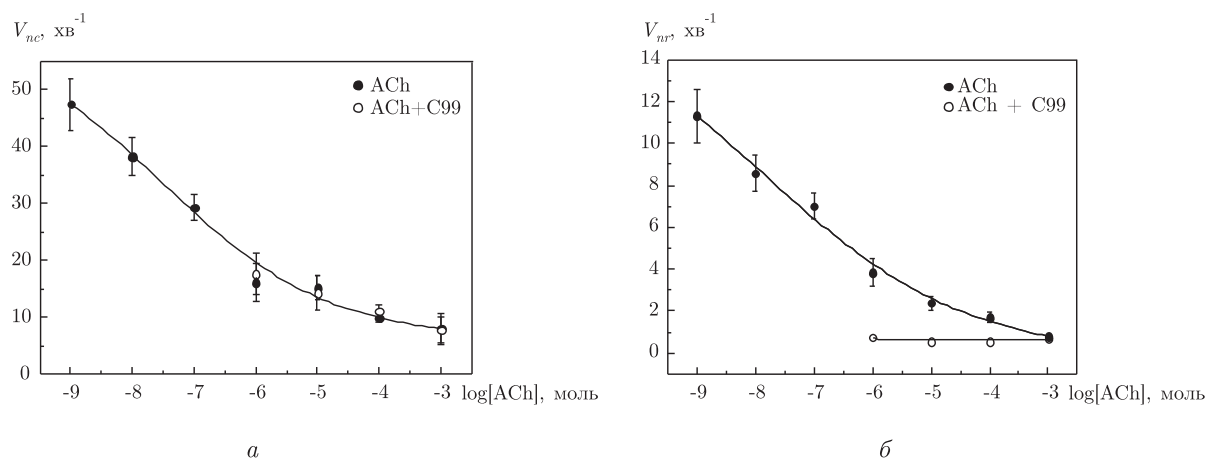


Рис. 4. Концентраційні залежності нормованих максимальних швидкостей фази скорочення (V_{nc} , (а)) та розслаблення (V_{nr} , (б)) ацетилхолін-викликаних скорочень гладеньком'язових препаратів *saesit* у контролі (ACh; $M \pm m$, $n = 7$) та у присутності каліксарену C99 (ACh + C99; $M \pm m$, $n = 7$)

фаз наростання і спаду сили скоротливої відповіді. Він забезпечує розрахунок незалежних від амплітуди параметрів окремо фаз скорочення та розслаблення: характеристичний час τ , емпіричний параметр n , нормовані максимальні швидкості фаз скорочення V_{nc} та розслаблення V_{nr} .

Контрольні скоротливі відповіді, що отримані при аплікації ACh у різних концентраціях ($10^{-9} - 10^{-3}$ М) та модифіковані в присутності в омиваючому розчині каліксарену C99 (10^{-5} М), аналізували відповідно до методу [12]. Окремо фази скорочення та розслаблення лінеаризували в координатах $\{\ln(f_m - f)/f; \ln t\}$. Всі лінійні залежності характеризувались високим значенням коефіцієнта кореляції ($r = 0,97-0,99$). За формулою (1) розраховували показники нормованих максимальних швидкостей V_{nc} та V_{nr} (узагальнені результати наведено на рис. 4, а, б). Видно, що кінетичні параметри фази скорочення і фази розслаблення чутливі до концентрації ефектора, який модифікує скорочення. У випадку фази наростання сили показник V_{nc} логарифмічно зменшувався зі зростанням концентрації ACh, а його напівмаксимальне значення досягалося при концентрації ефектора ($94,6 \pm 4,6$) мкМ. Аналогічні тенденції виявляла залежність нормованої максимальної швидкості розслаблення V_{nr} в діапазоні досліджених концентрацій ACh (напівмаксимальне значення показника спостерігалось в присутності ($31,6 \pm 2,9$) мкМ ACh).

Проведення кінетичного аналізу за методом [9, 12] дозволило виявити особливості модифікування ACh-викликаних скорочень ГМ каліксареном C99. Було встановлено, що фаза скорочення не чутлива до цієї субстанції, оскільки показник V_{nc} залишався на рівні контрольних значень. І навпаки, розслаблення ACh-індукованих скорочень у присутності C99 драматично пригнічувалось так, що розраховані показники V_{nr} залишались постійними і збігались зі значеннями V_{nr} контрольних скорочень, викликаних 10^{-3} М ACh (рис. 4, б).

Таким чином, аналіз кривих доза-ефект ACh-викликаних скорочень ГМ *saesit*, зареєстрованих у присутності блокатора $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ фази каліксарену C99, дозволяє зробити ряд висновків та припущень. По-перше, каліксарен C99 вірогідно пригнічує скоротливі відповіді у всьому діапазоні концентрацій ACh. Мінімальна концентрація ACh, при якій спостерігається скорочення ГМ препаратів, під впливом C99 зсувається з 10^{-9} М у контролі до 10^{-6} М. По-друге, досліджений каліксарен вибірково змінює механокінетичні характеристики ско-

рочень. Так, нормовані максимальні швидкості фази скорочення не змінювались у присутності С99, повністю збігались з аналогічними, зареєстрованими за контрольних умов. Нормовані максимальні швидкості фази розслаблення вірогідно пригнічувались каліксареном С99 таким чином, що форма залежності цього показника від концентрації ефектора скорочень (АCh) змінювалась із сигмоподібною (в контролі) до лінійної. Приймаючи до уваги інформацію [9], що досліджений каліксарен володіє надзвичайно потужною здатністю до гальмування натрієвої помпи плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин (константа інгібування на два порядки вища від такої специфічного блокатора помпи оубаїну), отримані результати дозволяють висунути припущення про викликане порушенням гомеостазу іонів Na^+ в міоцитах пригнічення інших транспортних систем. Зокрема, в цьому випадку можливо передбачити гальмування, зокрема, Na^+ - Ca^+ -обмінника плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин і, як наслідок, пригнічення виведення іонів Ca^{2+} із цитоплазми після стимуляції їх входу АCh.

З іншого боку треба пам'ятати, що каліксарен С99 здатний утворювати супрамолекулярний комплекс з АCh (рис. 2). Втім вищенаведений ефект взаємодії АCh з С99, ймовірно, має незначне значення. Про це свідчать результати наших дослідів. Дійсно, нами попередньо було показано [9], що С99 та специфічний блокатор Na^+ - K^+ -АТФази оубаїн в аналогічних умовах (концентрації речовин 10 мкМ) пригнічували АCh-викликані скорочення на однакову величину, що було б неможливим при суттєвому внеску зв'язування С99 і АCh.

1. Zielenkiewicz W., Marcinowicz A., Cherenok S. et al. Phosphorylated calixarenes as receptors of L-amino acids and dipeptides: calorimetric determination of Gibbs energy, enthalpy and entropy of complexation // *Supramol. Chem.* – 2006. – **18**. – P. 167–176.
2. Silva E., Valmalle C., Becchi M. et al. The Use of Electrospray Mass Spectrometry (ES/MS) for the Differential Detection of Some Steroids as Calix – [n]-arene Sulphonate Complexes // *J. Incl. Phenom. Macro.* – 2003. – **46**. – P. 65–69.
3. Lehn J. M., Meric R., Vigneron J.-P. et al. Binding of acetylcholine and other quaternary ammonium cations by sulfonated calixarenes. Crystal structure of a [choline-tetrasulfonated calix[4]arene] complex // *Supramol. Chem.* – 1995. – **5**. – P. 97–103.
4. Memmi L., Lazar A., Brioude A. et al. Protein-calixarene interactions: complexation of Bovine Serum Albumin by sulfonatocalix[n]arenes // *Chem. Commun.* – 2001. – **7**. – P. 2474–2475.
5. Silva E., Rousseau C. F., Zanella-Cle'on I. et al. Mass Spectrometric Determination of Association Constants of Bovine Serum Albumin (BSA) with para-Sulphonato-Calix[n]arene Derivatives // *J. Incl. Phenom. Macro.* – 2006. – **54**. – P. 53–59.
6. Cherenok S., Vovk A., Muravyova I. et al. Calix[4]arene α – Aminophosphonic Acids: Asymmetric Synthesis and Enantioselective Inhibition of an Alkaline Phosphatase // *Org. Lett.* – 2006. – **8**(4). – P. 549–552.
7. Vovk A. I., Kalchenko V. I., Cherenok S. A. et al. Calix[4]arene methylenebisphosphonic acids as calf intestine alkaline phosphatase inhibitors // *Org. Biomol. Chem.* – 2004. – **2**. – P. 3162–3166.
8. Zhou H., Wang D., Baldini L. et al. Structure-activity studies on a library of potent calix[4]arene-based PDGF antagonists that inhibit PDGF-stimulated PDGFR tyrosine phosphorylation // *Ibid.* – 2006. – **4**. – P. 2376–2386.
9. Цимбалюк О. В., Онуфрійчук О. В., Веклич Т. О. та ін. Порівняльне дослідження впливу оубаїну і каліксарен біс-гідроксиметилфосфонові кислоти на активність Na^+/K^+ – АТФази на міханокінетику процесу “скорочення-розслаблення” гладенького м'язу // *Фізика живого.* – 2006. – **14** (1). – С. 53–72.
10. Schoner W. Endogenous cardiac glycosides, a new class of steroid hormones // *Eur. J. Biochem.* – 2002. – **269** – P. 2440–2448.
11. Hamlyn J. M. Biosynthesis of Endogenous Cardiac Glycosides by Mammalian Adrenocortical Cells: Three Steps Forward // *Clinical Chemistry.* – 2004. – **50** (3). – P. 469–470.
12. Burdyga Th. V., Kosterin S. A. Kinetic analysis of smooth muscle relaxation // *Gen. Phys. Biophys.* – 1991. – **10**. – P. 589–598.
13. Solovyov A. V., Cherenok S., Tsymbal I. et al. Calix[4]arenes bearing alpha-amino – or alpha-hydroxyphosphonic acid fragments at the upper rim // *Heteroatom Chem.* – 2001. – **12**. – P. 58–67.

14. *Abrams P., Andersson K-E., Buccafusco J. J. et al.* Muscarinic receptors: their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder // *British. J. Pharmacol.* – 2006. – **148**. – P. 565–578.
15. *Eglen R. M.* Muscarinic receptors and gastrointestinal tract smooth muscle function // *Life Sci.* – 2001. – **68**. – P. 2573–2578.

*Київський національний університет
ім. Тараса Шевченка
Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна
НАН України, Київ
Інститут органічної хімії НАН України, Київ*

Надійшло до редакції 19.02.2007