

УДК 577.152.3+544.147+544.176+544.168

КАЛІКСАРЕН С-107 ЗБІЛЬШУЄ СПОРІДНЕНІСТЬ Na⁺,K⁺-АТР-ази ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВИХ КЛІТИН ДО УБАЇНУ

Т. О. ВЕКЛІЧ¹, О. А. ШКРАБАК¹, Р. В. РОДІК²,
В. І. КАЛЬЧЕНКО², С. О. КОСТЕРІН¹

¹Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: kinet@biochem.kiev.ua;

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

В експериментах, виконаних на суспензії плазматичних мембран клітин міометрія, обробленій 0,1%-им розчином дигітоніну, 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 Na⁺,K⁺-АТР-азну активність.

Доведено, що ця сполука здатна збільшувати спорідненість ензиму до убаїну: уявна константа інгібування ($I_{0,5}$) Na⁺,K⁺-АТР-ази убаїном зменшується з $26,9 \pm 1,3$ мкМ до $10,9 \pm 0,6$ мкМ. Проте сам убаїн не впливає на спорідненість Na⁺,K⁺-АТР-ази до зазначеного калікс[4]арену.

Ключові слова: Na⁺,K⁺-АТР-аза, Mg²⁺-АТР-аза, плазматична мембрана, гладеньком'язові клітини, міометрій, ензиматичний гідроліз АТР, кінетичні властивості АТР-ази, каліксарени, амінофосфонові кислоти.

Добре відомо, що у забезпеченні контролю скорочення м'яза, зокрема гладенького, суттєва роль належить Mg²⁺-залежним АТР-гідролазним катіон-транспортуючим ензиматичним системам [1–4]. У плазматичній мембрані (ПМ) клітин гладеньких м'язів функціонує низка АТР-аз. Зокрема, фундаментальне значення має електроензим Na⁺,K⁺-АТР-аза, що підтримує у цитоплазмі високі концентрації K⁺ та низькі концентрації Na⁺, забезпечуючи клітинну збудливість та інші біохімічні і біофізичні явища та процеси [5–9]. Цей ензим присутній у всіх тканинах, а його активність дуже чутлива до енергетичного стану клітини [10, 11]. Отже, в певному розумінні можна стверджувати, що каталітична та транспортна активність Na⁺,K⁺-АТР-ази характеризує енергетичний потенціал клітини. Na⁺,K⁺-АТР-аза займає ключову роль у регуляції багатьох біохімічних процесів, цей ензим є мішенню впливу як фізіологічних регуляторних чинників, так й фармакологічних агентів [5–11].

Із урахуванням вищезазначеного і, зокрема, беручи до уваги важливу роль Na⁺,K⁺-АТР-ази в забезпеченні спряження збудження і скорочення гладеньких м'язів, є значущим, як із фундаментальної, так і з практичної точки зору, пошук оборотних ефекторів – селек-

тивних інгібіторів та активаторів, які були б здатні спрямовано впливати на цю ензиматичну систему.

В останній час, зокрема, все більше уваги приділяється каліксаренам як потенційним біологічно активним сполукам. Це синтетичні макроциклічні олігомери фенолів, молекули яких мають чашоподібну будову. Каліксарени, завдяки здатності утворювати супрамолекулярні комплекси з біологічно важливими молекулами та іонами [12–14], можуть впливати на перебіг біохімічних процесів і, відповідно, розглядаються як перспективні молекулярні «платформи» для дизайну нових фізіологічно активних сполук. Адже каліксаренові матриці створюються за допомогою недорогих, але ефективних методів синтезу [15], вони мають низьку токсичність [16, 17] та імуногенність [18, 19]. На теперішній час накопичені численні експериментальні дані, які свідчать на користь того, що для каліксаренів є притаманними бактерицидна, антивірусна, антитромботична, протипухлинна активність та інші біологічні властивості [12, 20, 21]. Деякі каліксарени є ефективними інгібіторами ензимів [22], зокрема Na⁺,K⁺-АТР-ази [23]. Каліксарени можуть впливати на біохімічні та фізико-хімічні властивості біологічних мембран [24, 25]. Проте потенціал

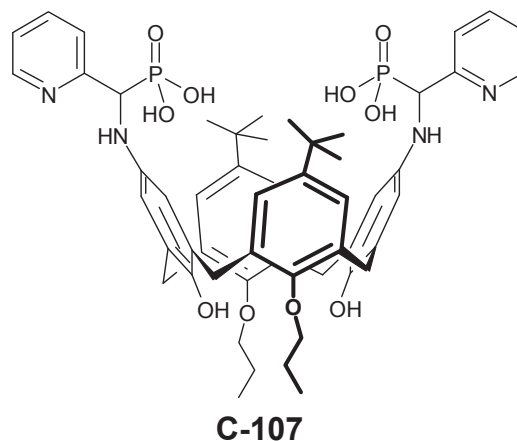
каліксаренів як біологічно активних сполук ще повністю далеко не розкритий.

У раніше проведених дослідах із використанням широкого загалу калікс[4]аренів (14 сполук), було знайдено, що найефективнішу інгібуючу дію на активність Na^+, K^+ -АТР-ази виявив каліксарен **C-107** в концентрації 100 мкМ (за цих умов спостерігалось майже повне інгібуння ензиматичної активності: до 2–3% відносно контролю). У попередніх порівняльних дослідах ми також вивчили вплив каліксарену **C-107** (100 мкМ) на питому ензиматичну активність «базальної» Mg^{2+} -АТР-ази. Було показано, що він майже не знижує «базальну» Mg^{2+} -АТР-азну активність (гальмування відбувається лише до рівня 90% від контрольного значення; дані не наведено) [4].

У концентрації 60 нМ **C-107** знижував активність Na^+, K^+ -АТР-ази на 49% [4], що відповідає значенню $I_{0,5}$. Цей рівень (49%) гальмування Na^+, K^+ -АТР-ази уабаїном досягається у разі його значно більшої концентрації – 10 мкМ. В той самий час у присутності **C-107** (60 нМ) пригнічувальний ефект уабаїну (10 мкМ) суттєво підвищувався і становив у середньому 78%. Ці дані вказують на те, що за умов сукупного використання уабаїну з каліксареном **C-107** має місце синергічний вплив **C-107** на інгібуння Na^+, K^+ -АТР-азної активності уабаїном. Тому ми поставили за мету дослідити кінетичні закономірності дії інгібітора Na^+, K^+ -АТР-ази – каліксарену **C-107** на активність цього ензиму в ПМ клітин міомерія.

Матеріали і методи

Калікс[4]арен **C-107** (5,17-ди(фосфоно-2-піридил-метил)аміно-11,23-ди-трет-бутил-26,28-дигідрокси-25,27-дипропоксикалікс[4]-арен) 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 [26]. Вибір саме каліксарену **C-107** як головного об'єкту нашого дослідження (формула наведена нижче) був обумовлений наочною селективністю його інгібуючої дії, що було нами попередньо виявлено на рівні двох Ca^{2+} -незалежних Mg^{2+} -залежних ензиматичних систем ПМ – Na^+, K^+ -АТР-ази та «базальної» Mg^{2+} -АТР-ази: ефективно гальмуючи першу з них, зазначений каліксарен практично не впливав на другу [23].



Ензиматичні дослідження було проведено 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 міомерія свині, як було описано раніше [4, 27].

Вміст протеїну в мембранній фракції визначали методом М. Bredford [28] із використанням реакції з реактивом кумасі – G250.

«Загальну» $\text{Mg}^{2+}, \text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-азну активність визначали у фракції ПМ клітин міомерія, як описано раніше [4], при 37 °С у стандартному середовищі (об'єм – 0,4 мл), яке містило (мМ): 1 АТР, 3 MgCl_2 , 125 NaCl , 25 KCl , 1 ЕГТА, 20 Нерес-трис-буфер (рН 7,4), 1 NaN_3 (інгібітор АТР-ази мітохондрій [29]), 0,1 мкМ тапсигаргін (селективний інгібітор $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТР-ази ендосарко)-плазматичного ретикулула [29]) і 0,1%-ий дигітонін (фактор перфорації ПМ [30]). 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» наступного складу: 1,5 М натрій оцтовокислий, 3,7%-ий формальдегід, 14%-ий етанол, 5%-ий ТХУ, рН 4,3 (при 8 °С). Наявність Ca^{2+} -хелатору ЕГТА в середовищі інкубації забезпечувало зв'язування ендогенних іонів Ca в ньому.

«Уабаїнчутливу» Na^+, K^+ -АТР-азну активність розраховували за різницею між величинами АТР-азної активності у присутності та за відсутності 1 мМ уабаїну (селективний інгібітор Na^+, K^+ -АТР-ази [31, 32]).

Кількість продукту реакції P_i визначали за методом W. Rathbun та V. Betlach [33].

У дослідах із вивчення впливу різних концентрацій уабаїну (10^{-4} –1 мМ) та

каліксарену **C-107** (10–100 нМ) на Na^+, K^+ -АТР-азну активність використовували описане вище стандартне середовище інкубації, до якого додавали аликвоту розчину убаїну у відповідній концентрації. У дослідях використовували концентрований (4 мМ) розчин каліксарену **C-107** в ДМСО, який далі розводили водою.

Під час вивчення концентраційної залежності дії убаїну та каліксаренів на ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТР-ази значення уявних констант інгібування $I_{0,5}$ та коефіцієнтів Хілла n_H розраховували із використанням лінеаризованих графіків Хілла відповідно до емпіричного рівняння Хілла $\lg[(A_0 - A)/A] = -n_H \lg I_{0,5} + n_H \lg [I]$, де A_0 та A – питома ензиматична активність за відсутності («нульова точка») та у присутності в середовищі інкубації каліксарену в концентрації I . Для таких графіків типове значення середньоквадратичного відхилення коефіцієнта апроксимації становило 0,90–0,99.

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

У роботі було застосовано 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

Ми дослідили вплив каліксарену **C-107** у різних концентраціях (відповідно 10, 25, 50, 75 та 100 нМ) на залежність активності Na^+, K^+ -АТР-ази від концентрації убаїну (рис. 1). Спостерігається зниження активності Na^+, K^+ -АТР-ази у всіх випадках із різним ступенем ефективності. Знайдено, що у разі зростання концентрації каліксарену **C-107** відбувається зниження ефективності інгібування ($I_{0,5}$) Na^+, K^+ -АТР-ази убаїном (рис. 2). Отже, каліксарен **C-107**, призводячи до гальмування активності Na^+, K^+ -АТР-ази відносно контролю, збільшує спорідненість ензиму до серцевого глікозиду. Значення коефіцієнта Хілла в цьому разі не змінюється ($n_H \sim 0,5$). Таким чином, кооперативність інгібувальної дії убаїну не залежить від наявності каліксарену **C-107**, залишаючись від'ємною ($n_H < 1$) в діапазоні концентрацій каліксарену від 10 до 100 нМ.

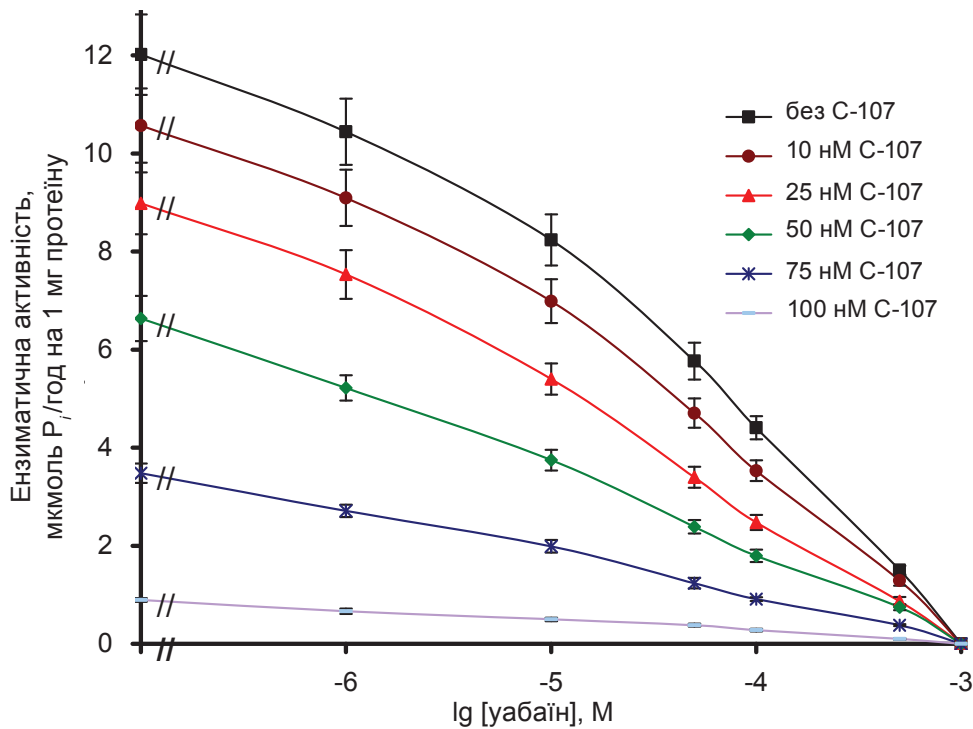


Рис. 1. Вплив каліксарену **C-107** у різних концентраціях на залежність питомої ензиматичної активності Na^+, K^+ -АТР-ази у фракції плазматичних мембран клітин міомерія від концентрації убаїну ($M \pm m$, $n = 5$)

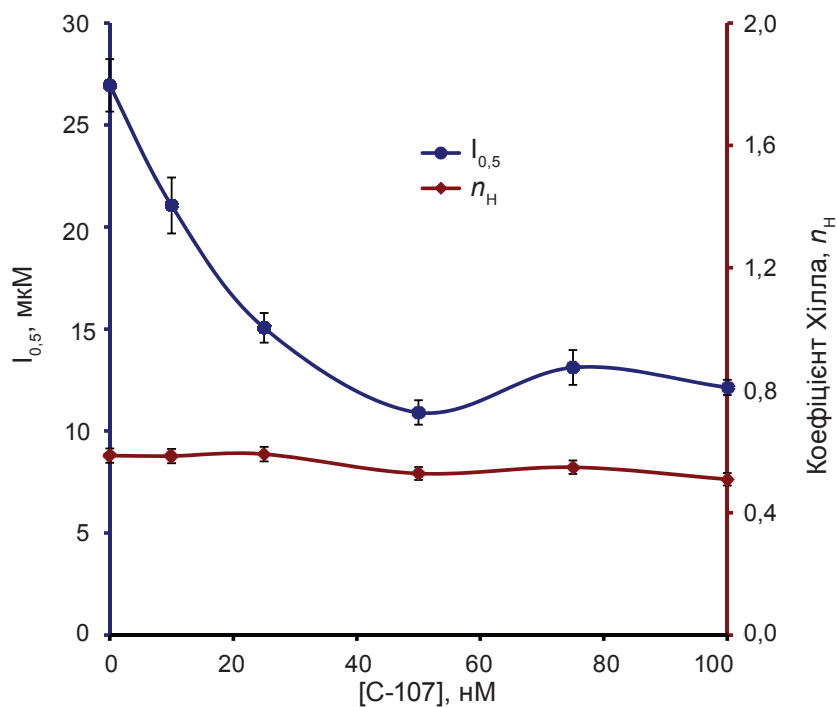


Рис. 2. Вплив каліксарену **C-107** на кінетичні параметри (константу гальмування $I_{0,5}$ і коефіцієнт Хілла n_H) дії убаїну на активність Na^+, K^+ -АТФ-ази у фракції плазматичних мембран клітин міометрія ($M \pm m$, $n = 5$)

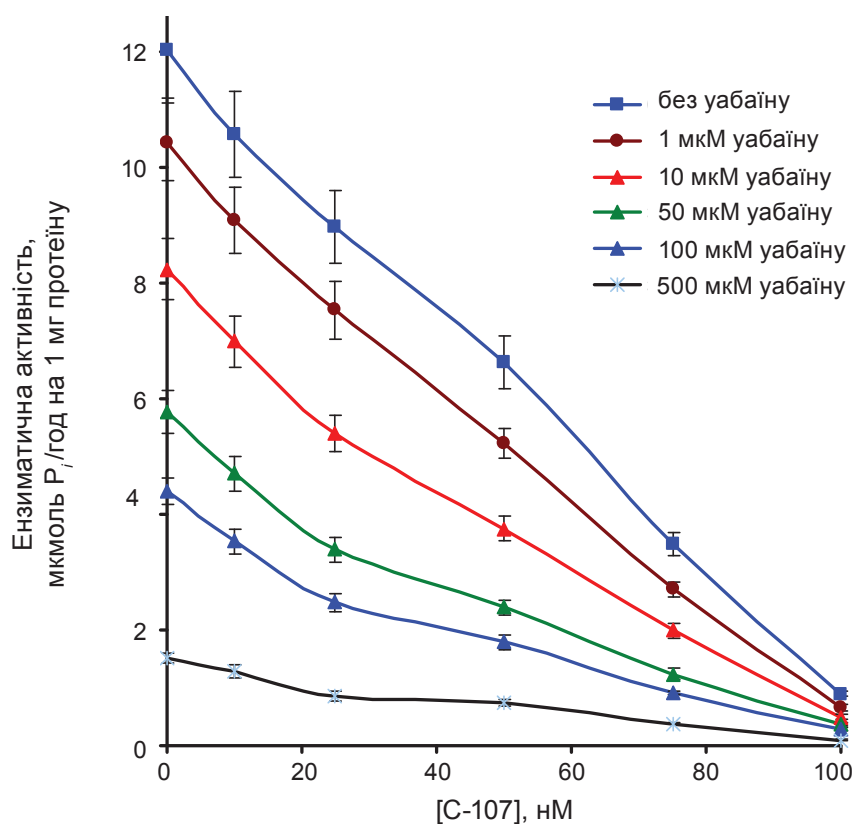


Рис. 3. Вплив убаїну в різних концентраціях на залежність питомої ензиматичної активності Na^+, K^+ -АТФ-ази у фракції плазматичних мембран клітин міометрія від концентрації каліксарену **C-107** ($M \pm m$, $n = 5$)

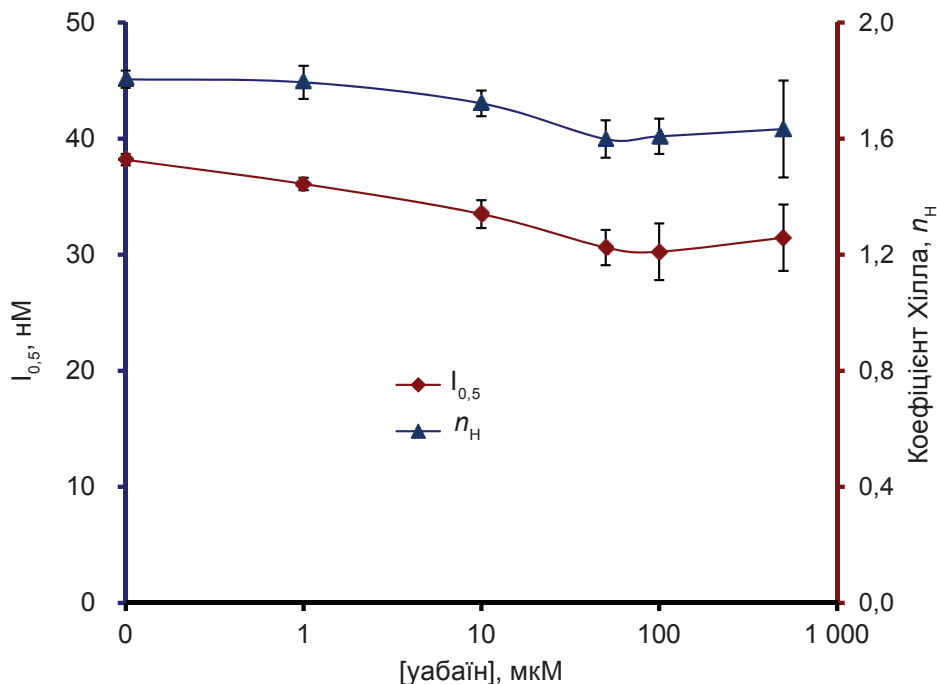


Рис. 4. Вплив уабаїну на кінетичні параметри (константу гальмування $I_{0,5}$ і коефіцієнт Хілла n_H) дії каліксарену С-107 на активність Na^+, K^+ -АТФ-ази у фракції плазматичних мембран клітин міомерія ($M \pm m, n = 5$)

На відміну від цього, використання різних концентрацій уабаїну (рис. 3) не впливає на константу гальмування $I_{0,5}$ і коефіцієнт Хілла n_H для каліксарену С-107. Значення коефіцієнта Хілла $n_H = 1,4-1,8$, що відповідає позитивній кооперативності ензиматичної реакції каліксарену С-107 (рис. 4). Різниця у значеннях коефіцієнтів кооперативності дії каліксарену С-107 та уабаїну свідчить про різні механізми інгібування Na^+, K^+ -АТФ-ази цими речовинами.

Отже, можна стверджувати, що у присутності каліксарену С-107 збільшується спорідненість Na^+, K^+ -АТФ-ази ПМ клітин міомерія до уабаїну, у цьому разі не змінюється величина коефіцієнта Хілла інгібуючої дії серцевого глікозиду на цей ензим. Проте кооперативність дії каліксарену С-107 на активність Na^+, K^+ -АТФ-ази є позитивною ($n_H = 1,4-1,8$). Таким чином, можна припустити, що збільшення афінітету уабаїну до Na^+, K^+ -АТФ-ази спричинюється стимулюючим впливом каліксарену на взаємодію «уабаїн–уабаїновий рецептор».

Робота фінансувалася цільовою комплексною міждисциплінарною програмою наукових досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біо-

технологій» (грант № 31-2010) та програмою фундаментальних досліджень НАН України та національним науковим центром Франції (грант №14-2010).

КАЛИКСАРЕН С-107 УВЕЛИЧИВАЄТ СРОДСТВО Na^+, K^+ -АТФ-ази ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК К УАБАИНУ

Т. А. Веклич¹, А. А. Шкрабак¹, Р. В. Родик², В. И. Кальченко², С. А. Костерин¹

¹Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев; e-mail: kinet@biochem.kiev.ua;

²Институт органической химии НАН Украины, Киев; e-mail: vik@ioch.kiev.ua

В экспериментах, выполненных на суспензии плазматических мембран клеток миомерия, обработанных 0,1%-ым раствором дигитонина, исследовали ингибирующее действие каліксарена С-107 (5,17-ди(фосфоно-2-пиридилметил)амино-11,23-ди-трет-бутил-26,28-ди-гидрокси-25,27-дипропокси-каликс[4]арен) на Na^+, K^+ -АТФ-азную активність.

Показано, что это соединение увеличивает сродство энзима к убаину, поскольку кажущаяся константа ингибирования ($I_{0,5}$) Na^+, K^+ -АТФ-азы уменьшается с $26,9 \pm 1,3$ мкМ до $10,9 \pm 0,6$ мкМ. Однако сам убаин не влияет на сродство Na^+, K^+ -АТФ-азы к указанному каликс[4]арену.

Ключевые слова: Na^+, K^+ -АТФ-аза, Mg^{2+} -АТФ-аза, плазматическая мембрана, гладкомышечные клетки, миомерий, энзиматический гидролиз АТФ, кинетические свойства АТФ-азы, каликсарены, аминокислоты.

THE CALIXARENE C-107 INCREASES THE AFFINITY OF THE Na^+, K^+ -ATPase ACTIVITY IN PLASMATIC MEMBRANE OF SMOOTH MUSCLE CELLS TO THE OUABAIN

T. O. Veklich¹, A. A. Shkrabak¹, R. V. Rodik², V. I. Kalchenko², S. O. Kosterin¹

¹Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv; e-mail: kinet@biochem.kiev.ua;

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

S u m m a r y

In the experiments carried out with the suspension of the myometrium cell plasmatic membranes treated with 0.1% digitonin solution we investigated the influence of calixarene **C-107** (5,17-diamino(2-pyridyl)methylphosphono-11,23-di-tert-butyl-26,28-dihydroxy-25,27-dipropoxycalix[4]arene) on the Na^+, K^+ -ATPase activity. It was shown that this calixarene increased the affinity of the enzyme for the sodium pump conventional inhibitor - ouabain: the magnitudes of the seeming constant of inhibition $I_{0,5}$ changed from 26.9 ± 1.3 mM to 10.9 ± 0.6 mM. However the ouabain itself did not influence on the affinity of the Na^+, K^+ -ATPase for calixarene **C-107**.

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

1. *Ishida Y., Paul R. J.* // J. Smooth Muscle Res. – 2005 – **41**, N 5 – P. 235–245.
2. *Floyd R., Wray S.* // Cell Calcium. – 2007. – **42**, N 4–5 – P. 467–476.
3. *Kosterin S. O.* // Neurophysiology. – 2003. – **35**, N 3–4. – P. 187–200.
4. *Веклич Т. О., Костерин С. О.* // Укр. біохім. журн. – 2005. – **77**, №2. – С. 66–75.
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. *Isenovic E. R., Jacobs D. B., Kedees M. N. et al.* // Endocrinology. – 2004. – **145**, N 3. – P. 1151–1160.
10. *Nelson D.* Lehninger principles in biochemistry, 3 rd. ed. / D. Nelson, M. Cox. – New York: Worth Publisher, 2000. – 1150 p.
11. *Капля А. А., Морозова В. С.* // Укр. біохім. журн. – 2010. – **82**, № 1. – С. 5–20.
12. *Кальченко В. І., Родік Р. В., Бойко В. І.* // Журн. орг. фарм. хімії. – 2006. – **3**, № 4. – С. 13–29.
13. *Matthews S. E., Beer P. D.* Calixarene-Based Anion Receptors. Asfari Z. et al. (eds.), Calixarenes. – 2001. – P. 421–439.
14. *Geide I., Soldatov D., Kramarenko O. et al.* // J. Struct. Chem. – 2005. – **46**. – P. S28–S32.
15. *Gutsche C. D., Iqbal M.* // Org. Synth., Coll. – 1993. – **8**. – P. 75–77.
16. *Coleman A. W., Jebors S., Cecillon S. et al.* // New J. Chem. – 2008. – **32**. – P. 780–782.
17. *Da Silva E., Lazar A. N., Coleman A. W.* // J. Drug Deliv. Sci. Technol. – 2004. – **14**, N 1. – P. 3–20.
18. *Paclat M-H., Rousseau C. F., Yannick C. et al.* // J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem. – 2006. – **55**, N 3–4. – P. 353–357.
19. *Grote Gansey M. H., de Haan A. S., Bos E. S. et al.* // Bioconjug. Chem. – 1999. – **10**, N 4. – P. 613–623.
20. *Grare M., Mourer M., Fontanay S. et al.* // J. Antimicrob. Chemother. – 2007. – **60**, N 3. – P. 575–581.

21. *Viola S., Consoli G. M., Merlo S. et al.* // *J. Neurochem.* – 2008. – **107**, N 4. – P. 1047–1055.
22. *Vovk A. I., Kalchenko V. I., Cherenok S. A. et al.* // *Org. Biomol. Chem.* – 2004. – **2**. – P. 3162–3166.
23. *Шкрабак О. А.* Вплив каліксаренів на АТР-гідролазні системи плазматичної мембрани міомерія та на неензиматичний гідроліз АТР. Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – К., 2010. – 21 с.
24. *Jin T., Kinjo M., Koyama Y. et al.* // *Langmuir.* – 1996. – **12**. – P. 2684–2689.
25. *Kobuke Y., Nagatani T.* // *Chem. Lett.* – 2000. – N 4. – P. 298–306.
26. *Векліч Т. О., Костерін С. О., Родік Р. В. та ін.* // *Укр. біохім. журн.* – 2006. – **78**, № 1. – С. 62–78.
27. *Кондратюк Т. П., Быченко С. Ф., Прищепна Л. А. и др.* // Там же. – 1986. – **58**, № 4. – С. 50–56.
28. *Bradford M. M.* // *Anal. Biochem.* – 1976. – **72**. – P. 248–282.
29. *Flynn E. R. M., Bradley K. N., Muir T. C., McCarron J. G.* // *J. Biol. Chem.* – 2001. – **276**, N 39. – P. 36411–36418.
30. *Векліч Т. О., Костерін С. О., Шинлова О. П.* // *Укр. біохім. журн.* – 2002. – **74**, № 1. – С. 42–48.
31. *Valente R. C., Capella L. S., Monteiro R. Q. et al.* // *FASEB J.* – 2003. – **17**, N 12. – P. 1700–1702
32. *Wang H., Haas M., Liang M. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 2004. – **279**, N 17. – P. 17250–17259.
33. *Rathbun W., Betlach V.* // *Anal. Biochem.* – 1969. – **28**, N 1–3. – P. 436–445.

Отримано 21.01.2011