

PACS numbers: 81.16.Fg, 82.39.Jn, 87.16.dp, 87.16.dr, 87.16.Tb, 87.19.Ff, 87.64.kv

Калікс[4]арен С-90 як перспективна супрамолекулярна сполука для регуляції активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин

Т. О. Векліч¹, О. А. Шкрабак¹, Ю. В. Ніконішина¹, Р. В. Родік²,
В. І. Кальченко², С. О. Костерін¹

¹Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України,
вул. Леонтовича, 9,
01030 Київ, Україна

²Інститут органічної хімії НАН України,
вул. Мурманська, 5,
02660 Київ, Україна

Метою роботи було з'ясувати біохімічні та фізико-хімічні закономірності впливу калікс[4]арену С-90 та його аналогів на активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани (ПМ) міомерія, а також функціональний відгук гладеньком'язових клітин на калікс[4]арен С-90. Для цього були використані методи ензимології, лазерно-кореляційної спектроскопії та кінетичного аналізу. Показано, що інгібувальна дія калікс[4]арену С-90 на активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ пов'язана з кооперативним впливом чотирьох просторово орієнтованих на каліксареновій платформі фенілсульфоніл-трифторометилацетімідоамідних груп. Калікс[4]арен С-90 у межах концентрації 1–50 мкМ не впливає на коефіцієнти активації йонами Ca , Mg та АТР Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ; натомість дана сполука дозозалежно зменшує максимальну швидкість ензиматичного гідролізу АТР. Отже, калікс[4]арен С-90 діє як повний неконкурентний інгібітор транспортної Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ. Також показано, що калікс[4]арен С-90, подібно до утеротоніку окситоцину, призводить до зменшення ефективного гідродинамічного діаметра гладеньком'язових клітин, що свідчить про скорочення міоцитів. Результати, що були одержані, можуть бути корисними для подальших досліджень, спрямованих на використання каліксаренів як потенційних фармакологічних сполук, здатних модулювати скоротливу функцію матки при патологіях її скоротливої активності.

The aim is to reveal the biochemical and physicochemical regularities of calix[4]arene C-90 and its analogues' effects on the activity of plasma membrane (PM) Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase of myometrium, and functional response of the smooth muscle cells in the presence of calix[4]arene C-90. For this pur-

pose, we use methods of enzymology, dynamic light scattering, and kinetic analysis. We show that the inhibitory effect of calix[4]arene C-90 on the activity of PM Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase is caused by cooperative influence of four trifluoromethyl(phenylsulfonylimino)methylamino groups spatially oriented on calixarene platform. Calix[4]arene C-90 within the concentration range 1–50 mM do not influence on the coefficients of PM Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activation by ions of Ca, Mg and ATP, while mentioned compound dose-dependently decreases the maximum rate of enzymatic hydrolysis of ATP. Therefore, calix[4]arene C-90 is a complete non-competitive inhibitor of PM Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase. We also show that calix[4]arene C-90, like uterotonic oxytocin, reduces the effective hydrodynamic diameter of the smooth muscle cells indicating a contraction of myocytes. Obtained results may be useful for the future studies aimed at using of calixarenes as potential pharmacological compounds for modulation of the uterine contractile function during the pathology of contractile activity.

Целью работы было выяснить биохимические и физико-химические закономерности влияния каликс[4]арена С-90 и его аналогов на активность Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза плазматической мембраны (ПМ) миометрия, а также функциональный отклик гладкомышечных клеток на каликс[4]арен С-90. Для этого были использованы методы энзимологии, лазерно-корреляционной спектроскопии и кинетического анализа. Показано, что ингибирующее действие каликс[4]арена С-90 на активность Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза ПМ связано с кооперативным влиянием четверых пространственно ориентированных на каликсареновой платформе фенолсульфонил-трифторометилацетимидоамидных групп. Каликс[4]арен С-90 в пределах концентрации 1–50 мкМ не влияет на коэффициенты активации ионами Ca, Mg и АТФ Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза ПМ; вместо этого, данное соединение дозозависимо уменьшает максимальную скорость энзиматического гидролиза АТФ. Итак, каликс[4]арен С-90 действует как полный неконкурентный ингибитор транспортной Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза ПМ. Также показано, что каликс[4]арен С-90, подобно утеротонику окситоцина, приводит к уменьшению эффективного гидродинамического диаметра гладкомышечных клеток, что свидетельствует о сокращении миоцитов. Результаты, которые были получены, могут быть полезными для дальнейших исследований, направленных на использование каликсаренов как потенциальных фармакологических соединений, способных модулировать сократительную функцию матки при патологиях её сократительной активности.

Ключові слова: Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза, плазматична мембрана, міометрій, калікс[4]арени.

Key words: Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase, plasma membrane, myometrium, calix[4]arene.

Ключевые слова: Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза, плазматическая мембрана, миометрий, каликс[4]арены.

(Отримано 1 грудня 2016 р.; після доопрацювання — 8 грудня 2016 р.)

1. ВСТУП

Транспортна Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза плазматичної мембрани (ПМ) у випадку гладеньких м'язів (ГМ) має фундаментальне значення у підтриманні фізіологічної концентрації Ca^{2+} у міоцитах, за рахунок компенсації пасивного потоку йонів Са в клітину, який відбувається в спокої. Вона використовує енергію гідролізу АТР для відкачування Ca^{2+} із клітини проти градієнта концентрації, що існує між зовнішньо- та внутрішньоклітинним середовищем. З огляду на вищезазначене перспективним є пошук сполуки, яка дозволяла б змінювати активність Ca^{2+} -помпи ПМ. З цієї точки зору цікавими є каліксарени, оскільки в попередніх дослідях нами було знайдено, що калікс[4]арен С-90 здатний селективно (відносно інших АТР-гідролаз ПМ) інгібувати активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ($I_{0,5} = 20,2 \pm 0,5$ мкМ). За результатами конфокальної мікроскопії калікс[4]арен С-90 (20 мкМ) транзійтно підвищує концентрацію внутрішньоклітинного Ca^{2+} .

Метою цієї роботи було з'ясувати біохімічні та фізико-хімічні закономірності впливу калікс[4]арену С-90 та його аналогів на активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ клітин ГМ.

2. ЕЛЕМЕНТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ МЕТОДИКИ

Калікс[4]арен С-90 (5,11,17,23-тетра(трифтор)метил(фенілсульфоніліміно)-метиламіно-25,26,27,28-тетрапропокси-калікс[4]арен) (рис. 1) був синтезований та охарактеризований із використанням методів ЯМР та інфрачервоної спектроскопії у відділі хімії фосфоранів Інституту органічної хімії НАН України (зав. відділу — чл.-кор. НАН України В. І. Кальченко). Методику синтезу зазначеного калікс[4]арену було описано раніше [1].

Ензиматичні дослідження були проведені у відділі біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАНУ (зав. відділу — академік НАН України С. О. Костерін).

Експерименти були виконані на суспензії клітин міомерія та фракції ПМ, обробленій 0,1% розчином дигітоніну. Фракцію плазматичних мембран ГМК виділяли з міомерія свині, як було описано раніше [2]. Вміст білка в мембранній фракції визначали методом М. Bredford [3].

АТРазну активність визначали у фракції ПМ при 37°C у стандартному середовищі (об'єм — 0,4 мл), яке містило (мМ): 3 АТР, 3 MgCl_2 , 25 NaCl, 125 KCl, 1 ЕГТА, 20 Hepes-tris-буфер (рН 7,4), 1 NaN_3 , 1 убаїн, 0,1 мкМ тапсигаргін і 0,1% дигітонін. Кількість білку мембранної фракції в пробі — 20–30 мкг. Час інкубації — 5 хв. Ензиматичну реакцію ініціювали введенням до се-

редовища 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% формальдегід, 14% етанол, 5% трихлороцетова кислота, рН 4,3 (при 8°C).

Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазну активність розраховували по різниці між величинами АТРазної активності за присутності та відсутності в середовищі інкубації (див. вище) 0,95 мМ CaCl_2 . Кількість продукту реакції P_i визначали за методом W. Rathbun et V. Betlach [4].

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

3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

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

Для визначення ролі хімічних угруповань у складі молекули калікс[4]арену С-90 (рис. 1) в інгібуванні активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази були досліджені дві модельні сполуки: калікс[4]арен С-150 (суто «калікс[4]аренова чаша») та N-(4-етоксифеніл)-N'-(фенілсульфоніл)-трифторометилацетімідоамід М-1. Виходячи із структурних формул досліджуваних сполук [4]аренів (рис. 1),

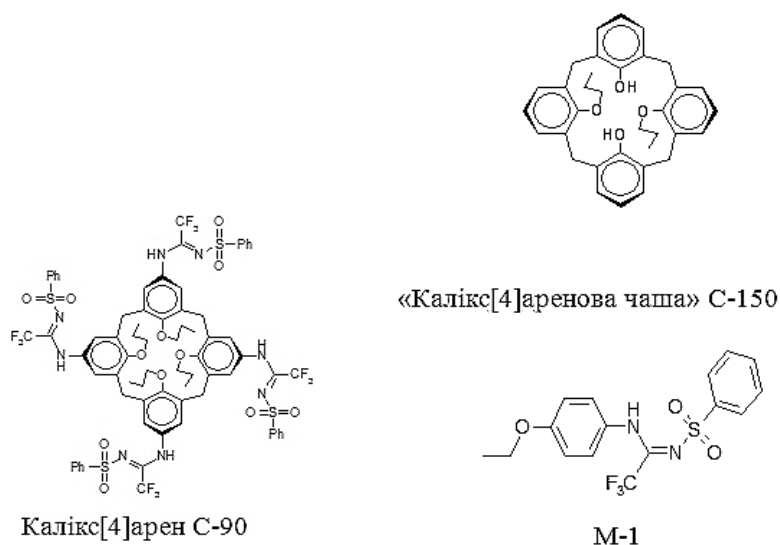


Рис. 1. Структурні формули досліджуваних речовин.¹

видно що, калікс[4]арен С-150 не містить жодних додаткових хімічних угруповань на верхньому вінці макроциклу, тобто він є «калікс[4]ареновою чашею». Сполука М-1 містить один фенольний фрагмент та фенілсульфонил-трифторометилацетімідоамідне угруповання, аналогічне до такого ж у складі молекули калікс[4]арену С-90 (рис. 1).

Нами було показано, що структурний фрагмент С-150, використаний у концентрації 100 мкМ, незначно (на $13,0 \pm 1,8\%$) знижує активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ($M \pm m$; $n = 5$) (рис. 2). Модельна сполука М-1 у концентрації 100 мкМ пригнічує Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТразу на $9,3 \pm 2,4\%$, використання її у концентрації 400 мкМ приводить до інгібування активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази на $12,5 \pm 1,7\%$ відносно контрольного значення ($M \pm m$; $n = 5$).

Отже, інгібувальна дія калікс[4]арену С-90 на активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази передусім пов'язана саме з кооперативним впливом чотирьох просторово орієнтованих на каліксареновій платформі фенілсульфонил-трифторометилацетімідоамідних груп, а не з дією тетрафенольного макроциклу як такого або дією окремого фенілсульфонил-трифторометилацетімідоамідного залишку.

Було досліджено вплив аналогів С-90, які відрізнялися за кі-

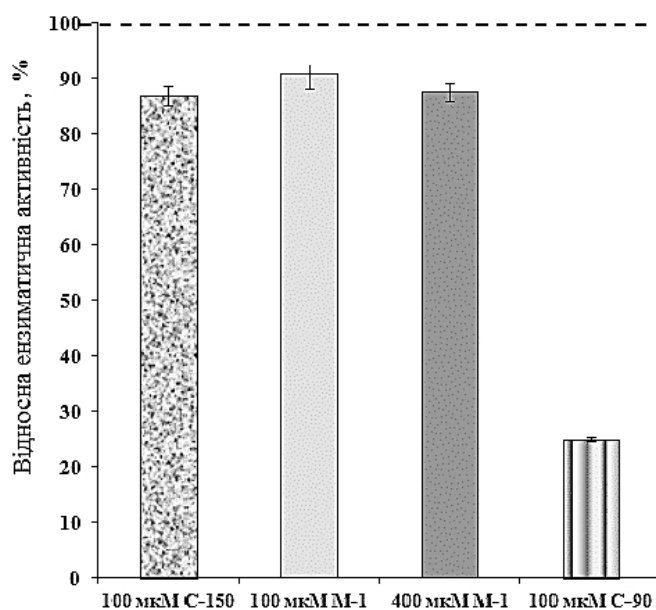


Рис. 2. Ензиматична активність транспортної Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази у фракції плазматичних мембран клітин міометрія за дії калікс[4]аренів С-90, С-150 і модельної сполуки М-1 ($M \pm m$, $n = 5$). За 100% прийнято значення питомої ензиматичної активності у відсутності калікс[4]аренів та сполуки М-1 у середовищі інкубації.²

лькістю та розташуванням сульфоніламідинових груп на верхньому вінці калікс[4]аренового макроциклу. За інгібіторним ефектом аналоги можна розташувати в ряд: С-90 (має 4 амідиніві групи) — $I_{0,5} = 20,2 \pm 0,5$ мкМ, С-716 (має 2 дистальні амідиніві групи) — $I_{0,5} = 53,4 \pm 3,5$ мкМ, С-772 (має 2 латеральні амідиніві групи) $I_{0,5} = 168,3 \pm 21,1$ мкМ ($n = 5$). Отже, серед зазначених аналогів калікс[4]арен С-90 інгібує активність транспортної АТРази ПМ найбільш ефективно.

Перевіривши спорідненість зазначеного ензиму до АТР, йонів Mg та Ca в залежності від концентрації калікс[4]арену С-90, а також його вплив на кооперативний ефект та на максимальну швидкість гідролізу АТР, ми встановили, що у всіх трьох випадках спостерігалось суттєве зменшення максимальної швидкості гідролізу АТР, що у поєднанні з відсутнім впливом на константи спорідненості свідчить про неконкурентний механізм інгібування калікс[4]ареном С-90 $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРадної активності (дані не наведені).

Також було показано, що С-90 (50 мкМ), подібно до утеротоніку окситоцину, призводить до зменшення ефективного гідродинамічного діаметру гладеньком'язових клітин, виміряного за допомогою лазерно-кореляційного спектрометра, до 74% відносно контролю, що свідчить про скорочення міоцитів (рис. 3).

Таким чином, дані цієї роботи можуть слугувати підґрунтям

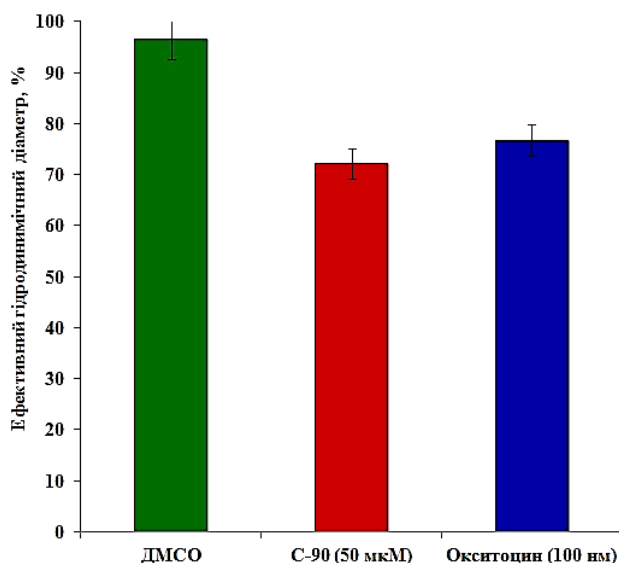


Рис. 3. Зміна гідродинамічного діаметра ГМК за дії різних ефекторів ($M \pm m$, $n = 6$). За 100% прийнято контрольне значення гідродинамічного діаметра ГМК за відсутності дії ефекторів.

для наступної розробки на основі калікс[4]арену С-90 ефективного інгібітору Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ, що, в свою чергу, матиме важливе значення для подальшого з'ясування мембранних механізмів Ca^{2+} -обміну у ГМ, зокрема, під час вивчення ролі ПМ в забезпеченні електромеханічного спряження в них. Результати, що були одержані, можуть бути корисними для подальших досліджень, спрямованих на використання каліксаренів як потенційних фармакологічних сполук, здатних модулювати скоротливу функцію матки при деяких патологіях скоротливої активності ГМ.³

4. ВИСНОВКИ

Отже, вирішальне значення у інгібуванні Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ калікс[4]ареном С-90 відіграє просторова конфігурація сульфоніламідних груп на верхньому вінці калікс[4]аренової «чаші». Калікс[4]арен С-90 у межах концентрації 1–50 мкМ не впливає на коефіцієнти спорідненості та кооперативності для йонів Са та Mg. Ця сполука не конкурує з АТР за зв'язування з Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазою ПМ; натомість вона дозозалежно зменшує максимальну швидкість ензиматичного гідролізу АТР. Отже, калікс[4]арен С-90 діє як повний неконкурентний інгібітор транспортної Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ. Калікс[4]арен С-90, подібно до утеротоніку окситоцину, призводить до зменшення ефективного гідродинамічного діаметру гладеньком'язових клітин.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. R. V. Rodik, V. I. Boyko, O. B. Danylyuk et al., *Tetrahedron Letters*, **46**: 7459 (2005).
2. Т. О. Векліч, С. О. Костерін, *Укр. біохім. журн.*, **77**, № 2: 66 (2005).
3. M. M. Bradford, *Anal. Biochem.*, **72**, No. 1: 248 (1976).
4. W. Rathbun and V. Betlach, *Anal. Biochem.*, **28**, Nos. 1–3: 436 (1969).

REFERENCES

1. R. V. Rodik, V. I. Boyko, O. B. Danylyuk et al., *Tetrahedron Letters*, **46**: 7459 (2005).
2. T. O. Veklich and S. O. Kosterin, *Ukrainian Biochemical Journal*, **77**, No. 2: 66 (2005) (in Ukrainian).
3. M. M. Bradford, *Anal. Biochem.*, **72**, No. 1: 248 (1976).
4. W. Rathbun and V. Betlach, *Anal. Biochem.*, **28**, Nos. 1–3: 436 (1969).

¹O. V. Palladin Institute of Biochemistry, N.A.S. of Ukraine,
Leontovych Str., 9,
01030 Kyiv, Ukraine

²*Institute of Organic Chemistry, N.A.S. of Ukraine,
Murmans'ka Str., 5,
020940 Kyiv, Ukraine*

¹ Fig. 1. Structure formula of investigated compounds.

² Fig. 2. The effect of calix[4]arenes C-90, C-150 and the model compound M-1 on the enzymatic activity of transport Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase in fraction of myometrium cell plasma membranes ($M \pm m$, $n = 5$). 100% is the value of the enzymatic activity in the absence of calix[4]arenes and M-1 compound in the incubation medium.

³ Fig. 3. Change of the hydrodynamic diameter of the SMC after the influence of effectors ($M \pm m$, $n = 6$). 100% is hydrodynamic diameter of SMC in the absence of effectors.