

## ВАЗОДИЛАТУЮЧІ ЕФЕКТИ N-(2-АРИЛ-4-ТІОКАРБАМОІЛ-1,3-ОКСАЗОЛ-5-ІЛ)- $\beta$ -АЛАНІНІВ – СПЕЦИФІЧНИХ ІНГІБІТОРІВ ПРОТЕЇНКИНАЗИ СК2

І.Н.Яковенко, О.В.Шабликін, О.П.Козаченко, В.С.Броварець

Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України  
02660, м. Київ, вул. Мурманська, 1. E-mail: brovarets@bpci.kiev.ua

*Ключові слова:* протеїнкіназа СК2; кровоносні судини; вазодилататори;  
N-(2-арил-4-тіокарбамоіл-1,3-оксазол-5-іл)- $\beta$ -аланіни

*Для ряду синтезованих N-(2-арил-4-тіокарбамоіл-1,3-оксазол-5-іл)- $\beta$ -аланінів виявлений вазорелаксуючий ефект при дії на ізольовані каротидні артерії кроликів, що були попередньо скорочені агоністом  $\alpha_1$ -адренорецепторів фенілефрином. Показано, що найбільш суттєвий вазодилатуючий ефект проявили похідні оксазолу, ідентифіковані раніше як ефективні специфічні інгібітори протеїнкінази СК2. З огляду на літературні та отримані нами дані запропоновано можливий молекулярний механізм впливу СК2 на функціональну активність гладеньком'язових клітин судин.*

### VASODILATOR EFFECTS OF N-(2-ARYL-4-THIOCARBAMOYL-1,3-OXAZOL-5-YL)- $\beta$ -ALANINES AS SPECIFIC INHIBITORS OF CK2 PROTEINKINASE

I.N.Yakovenko, O.V.Shablykin, O.P.Kozachenko, V.S.Brovarets

*For series of N-(4-thiocarbamoyl-1,3-oxazol-5-yl)- $\beta$ -alanines synthesized the vasodilator effect has been revealed under their action on the isolated rabbit carotid arteries segments precontracted with  $\alpha_1$ -adrenoreceptor agonist phenylephrine. The compounds studied have been identified as specific inhibitors of CK2 proteinkinase. The substances with higher inhibitory activity to CK2 also demonstrate comparatively more essential vasorelaxation effect. Taking into account the literature and experimental data a possible molecular mechanism for CK2 participation in the functional activity of the vascular smooth muscle cells has been proposed.*

### ВАЗОДИЛАТИРУЮЩИЕ ЭФФЕКТЫ N-(2-АРИЛ-4-ТІОКАРБАМОИЛ-1,3-ОКСАЗОЛ-5-ИЛ)- $\beta$ -АЛАНИНОВ – СПЕЦИФИЧЕСКИХ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕИ НКИНАЗЫ СК2

И.Н.Яковенко, О.В.Шаблыкн, А.П.Козаченко, В.С.Броварець

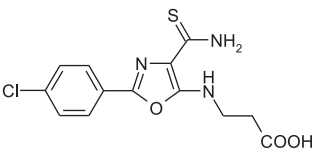
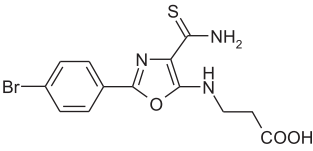
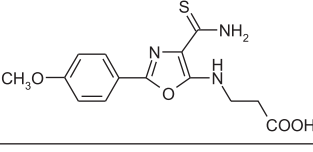
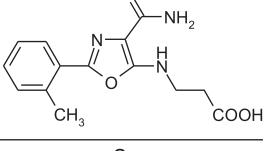
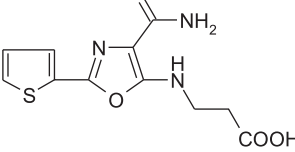
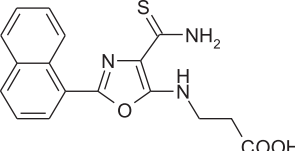
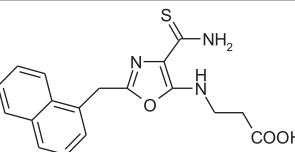
*Для ряда синтезированных N-(2-арил-4-тіокарбамоил-1,3-оксазол-5-ил)- $\beta$ -аланінов выявлен вазорелаксирующий эффект при их воздействии на изолированные каротидные артерии кроликов, предварительно сокращенные агонистом  $\alpha_1$ -адренорецепторов фенилэфрином. Показано, что наиболее существенный вазодилатирующий эффект проявили производные оксазола, которые были идентифицированы ранее как эффективные специфические ингибиторы протеинкиназы СК2. Учитывая литературные и полученные нами данные, мы предложили возможный молекулярный механизм влияния СК2 на функциональную активность гладкомышечных клеток сосудов.*

У попередній роботі нами були вперше виявлені вазоактивні властивості специфічних інгібіторів протеїнкінази СК2 різної хімічної будови [1]. Метою даних досліджень було подальше вивчення впливу на тонус ізольованих каротидних артерій кроликів нещодавно синтезованих N-(2-арил-4-тіокарбамоіл-1,3-оксазол-5-іл)- $\beta$ -аланінів [2], ідентифікованих у біохімічних тестах *in vitro* як активніші специфічні інгібітори СК2. Вазоактивні властивості сполук досліджували, як описано раніше [3]. Кільцеві сегменти каротидних артерій кроликів діаметром 2,5 мм та довжиною 2 мм фіксувались ізометрично в камері з фізіологічним розчином Кребса між сталевим стаціонарним гачком та ізометричним перетворю-

вачем, з'єднаним з самописцем (TZ 213S, Laboratorní přístroj, Чехія). У подальшому експериментальну камеру з судинами за допомогою перистальтичного насосу перфузували при 37°C розчином Кребса, який містив (в мМ): NaCl – 133; KCl – 4,7; CaCl<sub>2</sub> – 2,5; MgCl<sub>2</sub> – 1,2; NaHCO<sub>3</sub> – 10; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,38; глюкозу – 7,8; HEPES – 10 (pH 7,4). Оскільки судинний тонус, який *in vivo* регулюється нейроендокринною системою, *in vitro* близький до нульового значення, судинні сегменти попередньо скорочували агоністом  $\alpha_1$ -адренорецепторів фенілефрином (1·10<sup>-5</sup> М). Досліджувані сполуки розчиняли в диметилсульфоксиді (ДМСО) та вносили до розчину Кребса, що перфузував судинний сегмент. Максимальний об'єм ДМСО, який при цьо-

Таблиця

Вплив N-(2-арил-4-тіокарбамоїл-1,3-оксазол-5-іл)-β-аланінів на тонус попередньо скорочених фенілефрином ( $1 \cdot 10^{-5}$  M) ізольованих сегментів каротидних артерій кроликів та на активність протеїнкінази CK2

Сполука	Процент від скорочення, викликаного фенілефрином ( $1 \cdot 10^{-5}$ M)		IC <sub>50</sub> **, ( $1 \cdot 10^{-6}$ M)
	концентрація сполуки, M		
	$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-4}$	
	52,3±3,93*	8,6±4,57*	2,0
	71,2±4,51*	30,0±2,86*	4,5
	65,4±2,08*	21,1±2,32*	1,2
	68,4±5,05*	49,8±10,99*	2,4
	75,8±2,95*	20,7±2,94*	>30
	96,1±2,03	65,2±2,70*	>30
	100±0	73,0±5,54*	>30

Примітки: \* Показники ( $M \pm m$ ;  $n = 3$ ) розраховані як процент від прийнятого за 100% скорочення, викликаного фенілефрином ( $1 \cdot 10^{-5}$  M). Значення достовірно відрізняються від контролю ( $p < 0.05$ ). \*\* IC<sub>50</sub> – концентрація сполуки, що викликає 50% інгібування активності CK2 *in vitro* (за даними роботи [2]).

му також вводився в розчин Кребса разом зі сполукою, не перевищував 0,1% (при відповідній концентрації сполуки  $1 \cdot 10^{-4}$  M) та в контрольних експериментах достовірно не впливав на тонус судин. Після досягнення плато ефекту досліджуваної речовини ізольований сегмент артерії відмивали від сполуки розчином Кребса, що призводило до відновлення судинного тонусу.

Дослідження біологічної активності ряду нових N-(2-арил-4-тіокарбамоїл-1,3-оксазол-5-іл)-β-аланінів виявили їх вазодилатуючий вплив на тонус ізольованих сегментів каротидних артерій кроликів (таблиця).

При цьому виявилось, що вазодилатуюча ефективність протестованих сполук прямо пропорційна їх CK2-інгібіторній активності, яку характери-

зує встановлений нами в попередніх дослідженнях *in vitro* параметр  $IC_{50}$  (концентрація сполуки, що викликала 50% інгібування активності СК2) [2]. Деякі розбіжності між  $IC_{50}$  речовин та рівнем вазодилатації, на наш погляд, можуть бути викликані здатністю досліджених сполук проникати через біомембрани в товщу гладенького м'яза судини. Крім цього, протестовані нами в даних дослідженнях більш активні інгібітори СК2 (за їх  $IC_{50}$ ) також виявились ефективнішими вазодилататорами, ніж отримані та описані нами раніше порівняно слабші інгібітори СК2 з більшими значеннями  $IC_{50}$  ряду 5-аміно-1,3-оксазолів іншої хімічної будови [1].

Відомо, що викликана дією вазоактивних сполук вазодилатація кровоносних судин може розвиватись не тільки за рахунок зменшення рівня  $Ca^{2+}$  в цитозолі їх гладеньком'язових клітин, а також завдяки збільшенню утворення вазорелаксуючих факторів (простациклін, оксид азоту та ін.) клітинами ендотелію, який вистилає внутрішню поверхню судин [4]. Тому для вивчення можливості участі судинного ендотелію в механізмах виявлених вазоактивних ефектів інгібіторів СК2 нами в подальшому було досліджено вплив N-(2-(4-хлорофеніл)-4-тіокарбамоїл-1,3-оксазол-5-іл)- $\beta$ -аланіну як одного з найбільш активних інгібіторів СК2 на тонус сегментів каротидних артерій кроликів з видаленням ендотелієм. Ендотеліальний шар клітин таких судин попередньо видаляли обережною механічною обробкою внутрішньої поверхні артерій бавовняним тампоном з подальшим контролем відсутності ендотелію опосередкованої релаксації таких судин на дію ацетилхоліну, як це описано для фізіологічних експериментів [4]. Деендотелізовані препарати каротидних артерій кроликів також реагували на дію N-(2-(4-хлорофеніл)-4-тіокарбамоїл-1,3-оксазол-5-іл)- $\beta$ -аланіну дилатацією, величина якої становила для діючих концентрацій цієї сполуки  $1 \cdot 10^{-5}$  та  $1 \cdot 10^{-4}$  М відповідно  $51,3 \pm 5,60\%$  ( $n=3$ ) та  $12,3 \pm 3,93\%$  ( $n=3$ ) від прийнятого за 100% скорочення, викликаного фенілефрином і достовірно не відрізнялась від величини реакцій досліджуваної речовини на інтактні судини (таблиця). Це свідчить про опосередкованість вазодилатуючих ефектів інгібіторів СК2 їх дією на гладеньком'язові клітини судин. До того ж у літературі [5] відмічено ефект релаксації гладеньком'язових клітин дихальних шляхів щура при дії інгібітора СК2 різної хімічної будови. Тому особливий інтерес представляють можливі молекулярні механізми реалізації цих процесів.

Як відомо, фізіологічний механізм скорочення судин запускається шляхом збільшення концентрації  $Ca^{2+}$  в цитозолі судинних міоцитів. Так, при дії агоніста  $\alpha_1$ -адренорецепторів скорочення

судин відбувається в результаті активації  $Ca^{2+}$ -мобілізуючого поліфосфоінозитидного (ПФІ) каскаду внутрішньоклітинної сигналізації [6]. Трансмембранний етап активації ПФІ-каскаду опосередковується G-білками, котрі трансдукують активацію фосфоліпази C (ФЛ-С) від зв'язаного з фенілефрином рецептора. ФЛ-С гідролізує фосфатидилінозитол-4,5-дифосфат ( $PIF_2$ ) до інозитол-1,4,5-трифосфату ( $IP_3$ ), який стимулює мобілізацію внутрішньоклітинного  $Ca^{2+}$  та діацилглицеролу (ДАГ), що активує різні ізоформи протеїнкінази C (ПК-С). Результатом цих процесів є збільшення рівня внутрішньоклітинного  $Ca^{2+}$ , що призводить до скорочення міоцитів судин. У літературі відмічено ефект зменшення рівня внутрішньоклітинного  $Ca^{2+}$  в міоцитах дихальних шляхів щура при дії специфічного інгібітора СК2 5,6-дихлоро-1- $\beta$ -D-рибофуранозилбензімідазолу (DRB) та сполуки LY-294002, дилатуючі властивості якої на зазначені міоцити пов'язують з інгібуванням СК2 [5].

СК2 є серин/треоніновою протеїнкіназою, яка модифікує функціональну активність більш ніж 300 різноманітних клітинних білків [7]. Дані літератури свідчать про наявність СК2 в кровоносних судинах [8]. Роль СК2 в  $Ca^{2+}$ -опосередкованій сигналізації до кінця не з'ясована. Хоча показано, що СК2 здатна фосфорилувати GAIIP-білок ( $G_{\alpha}$  взаємодіючий білок), що є одним із представників родини RGS-білків (регуляторів G-білків) [9] і тому потенційно може моделювати активність розглянутого вище ПФІ-каскаду внутрішньоклітинної сигналізації. В цьому випадку при інгібуванні СК2 має зменшитись рівень фосфорилування GAIIP-білка, в результаті чого зменшиться вхід  $Ca^{2+}$  в міоцити судин за рахунок ПФІ-каскаду, що призведе до вазорелаксації.

У свою чергу, СК2 може фосфорилуватися тирозиновими протеїнкіназами Src, що призводить до збільшення активності СК2 [10]. У гладеньком'язових клітинах при дії констрикторів на зв'язані з G-білком рецептори відмічена активація Src-кіназ, яка призводить до збільшення входу  $Ca^{2+}$  в міоцити, а інгібітори Src-кіназ викликають релаксацію гладеньком'язових клітин [11]. Таким чином, релаксація гладеньком'язових клітин при дії інгібіторів Src-кіназ може бути опосередкована зменшенням активності СК2.

Крім того, фосфоінозитиди відіграють важливу роль у внутрішньоклітинній сигналізації не тільки як субстрати ФЛ-С, а також як сайт-специфічні сигнальні молекули, що викликають конформаційні перебудови білкових комплексів біомембран. Особливий інтерес у таких процесах приділяють фосфатидилінозитол-3,4,5-трифосфату ( $PIF_3$ ), що синтезується фосфатидилінозитол 3-кіназою ( $PI_3$ -К) шляхом фосфорилування  $PIF_2$ . Показано,

що вазоконстриктори активують  $\text{FI}_3\text{-K}$  в міоцитах судин [12, 13], а продукт реакції за участю кінрази  $\text{FI}\Phi_3$  регулює утворення  $\text{I}\Phi_3$  та мобілізацію внутрішньоклітинного  $\text{Ca}^{2+}$ , яка запускається при активації відповідних рецепторів ПФІ-каскаду в гладеньком'язових клітинах різних типів [14]. Інгібітори  $\text{FI}_3\text{-K}$  викликають релаксацію ізольованих та попередньо скорочених гладеньких м'язів товстої та дванадцятипалої кишки, аорти щура [15-18]. Механізм такої дії може бути обумовлений тим, що  $\text{FI}\Phi_3$  підвищує активність однієї з ізоформ ФЛ-С (ФЛ-С $\gamma$ ) ПФІ-каскаду, прямо зв'язуючись з РН- та SH2-доменом ферменту [19, 20], або опосередковано через активацію тирозинкінази Брутона (Btk-кіназу) [21]. В свою чергу, внутрішньоклітинний рівень  $\text{FI}\Phi_3$  також залежить від активності ліпідної фосфатази РТЕН, яка дефосфорилує  $\text{FI}\Phi_3$  [22] і таким чином відмінняє функціональні ефекти  $\text{FI}_3\text{-K}$  [23]. Фосфорилування РТЕН протеїнкіназою СК2 інгібує ферментативну активність цієї фосфатази [23] та підвищує рівень  $\text{FI}\Phi_3$  [24]. Виходячи з цього, мож-

на припустити, що на фоні дії інгібіторів СК2 на ізольовані сегменти артерій в міоцитах судин зменшиться кількість фосфорильованої РТЕН, що, в свою чергу, призведе до зменшення рівня  $\text{FI}\Phi_3$  та відповідної вазорелаксації.

Таким чином, інгібітори СК2 можна розглядати як ще один тип вазоактивних сполук, вазодилатуючі властивості яких реалізуються специфічними шляхами модуляції протеїнкіназою СК2 функціональної активності гладеньком'язових клітин судин.

## Висновки

1. Встановлено вазодилатуючий ефект нових специфічних інгібіторів протеїнкінази СК2 в ряду N-(2-арил-4-тіокарбамоїл-1,3-оксазол-5-іл)- $\beta$ -аланіну при їх дії на ізольовані каротидні артерії кроликів.

2. Найефективнішими вазодилататорами виявилися 4-тіокарбамоїл-1,3-оксазоли з найбільшою інгібіторною активністю відносно СК2, що свідчить про можливу реалізацію ефектів досліджених сполук шляхом інгібування СК2.

## Література

1. Шабликін О.В., Кухаренко О.П., Яковенко І.Н. та ін. // *Ukr. Bioorg. Acta.* – 2008. – Т. 6, №1. – С. 28-36.
2. Шабликін О.В., Кухаренко О.П., Броварець В.С. та ін. // *Ukr. Bioorg. Acta.* – 2010. – Т. 8, №1. – С. 61-66.
3. Яковенко І.Н., Сливчук С.Р., Броварець В.С. // *ЖОФХ.* – 2007. – Т. 5, №3. – С. 74-77.
4. Ignarro L.J. // *Circ. Res.* – 1989. – Vol. 65. – P. 1-21.
5. Tolochko B., Turkevitch P., Al-Chalabi M., Martin J.G. // *J. Pharmacol. Experim. Ther.* – 2004. – Vol. 311. – P. 787-793.
6. Кухарь В.П., Луїк А.И., Мозилевич С.Е. и др. *Химия биорегуляторных процессов.* – К.: Наукова думка, 1991. – 477 с.
7. Meggio F., Pinna L.A. // *FASEB J.* – 2003. – Vol. 17, №3. – P. 349-368.
8. Garat C.V., Crossno Jr J.T., Sullivan T.M. et al. // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* – 2010. – Vol. 55, №5. – P. 469-480.
9. Fischer T., Elenko E., Wan L. et al. // *Proc. Natl. Acad.* – 2000. – Vol. 97, №8. – P. 4040-4045.
10. Donella-Deana A., Cesaro L., Sarno S. et al. // *Biochem. J.* – 2003. – Vol. 372, №3. – P. 841-849.
11. Tolochko B., Turkevitch P., Choudry S. et al. // *Am. J. Physiol.* – 2002. – Vol. 282, №6. – P. L1305-L1313.
12. Saward L., Zahradka P. // *Circ. Res.* – 1997. – Vol. 81. – P. 249-257.
13. Viard P., Exner T., Maier U. et al. // *FASEB J.* – 1999. – Vol. 13. – P. 685-694.
14. Scharenberg A.M., Kinet J.P. // *Cell.* – 1998. – Vol. 94. – P. 5-8.
15. Ibitayo A.I., Tsunoda Y., Nozu F. et al. // *Am. J. Physiol.* – 1998. – Vol. 275. – P. G705-G711.
16. Kawabata A., Kuroda R., Kuroki N. et al. // *Life Sci.* – 2000. – Vol. 67. – P. 2521-2530.
17. Yang Z., Wang J., Altura B.T., Altura B.M. // *Pflugers Arch.* – 2000. – Vol. 439. – P. 240-247.
18. Northcott C.A., Poy M.N., Najjar S.M., Watts S.W. // *Circ. Res.* – 2002. – Vol. 91. – P. 360-369.
19. Falasca M., Logan S.K., Lehto V.P. et al. // *EMBO J.* – 1998. – Vol. 17. – P. 414-422.
20. Rameh L.E., Rhee S.G., Spokes K. et al. // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273. – P. 23750-23757.
21. Li Z., Wahl M.I., Eguinoa A. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 1997. – Vol. 94. – P. 13820-13825.
22. Maehama T., Dixon J.E. // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273. – P. 13375-13378.
23. Vazquez F., Sellers W.R. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2000. – Vol. 1470. – P. M21-M35.
24. Vazquez F., Grossman S.R., Takahashi Y. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – P. 48627-48630.

Надійшла до редакції 12.01.2011 р.