

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ РОБОТИ

УДК 577.352.4+544.147+544.176+544.168

КІНЕТИЧНІ ЗАКОНОМІРНОСТІ ДІЇ КАЛІКС[4]АРЕНУ С-90 НА Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРАЗНУ АКТИВНІСТЬ ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ ТА НА КОНЦЕНТРАЦІЮ Ca^{2+} В НЕЗБУДЖЕНИХ КЛІТИНАХ МІОМЕТРІЯ

Т. О. ВЕКЛИЧ¹, О. А. ШКРАБАК¹, Ю. Ю. МАЗУР¹, Р. В. РОДІК²,
В. І. БОЙКО², 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

Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза плазматичної мембрани є важливим елементом загального механізму контролю базального тону м'язів, яка також частково забезпечує релаксацію м'язової напруги після скорочення м'язу. В експериментах, виконаних на суспензії плазматичних мембран клітин м'язів, оброблених 0,1%-им розчином дигітоніну, досліджували інгібуючу дію калікс[4]арену С-90 (5,11,17,23-тетра(трифтор)метил(фенілсульфоніліміно)-метиламіно-25,26,27,28-тетрапропокси-калікс[4]арен) на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазну активність ензиму. Калікс[4]арен С-90 ефективно пригнічує Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазну активність ензиму (значення $I_{0,5}$ для С-90 становить $20,2 \pm 0,5$ мкМ). Інгібувальна дія калікс[4]арену С-90 на роботу Ca^{2+} -помпи передусім пов'язана саме з кооперативним впливом чотирьох просторово орієнтованих на калікс[4]ареновій платформі фенілсульфоніліміно-трифторометилацетамідних груп, а не з дією суто тетрафенольного макроциклу чи з дією окремих фармакофорних сульфоніламідних груп. Із урахуванням встановлених кінетичних закономірностей інгібувальної дії калікс[4]арену С-90 на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазну активність плазматичної мембрани розбудовано стаціонарну кінетичну модель контролю рівня базальної концентрації Ca^{2+} в незбуджених міоцитах матки. Припускається, що одержані результати можуть бути перспективними для створення на основі калікс[4]арену С-90, фармакологічного препарату нового («супрамолекулярного») покоління – стимулятора базального тону матки.

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

В основі скоротливої активності гладеньких м'язів лежать зміни концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} . У стані спокою концентрація іонів Са у гладеньком'язовій клітині ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) становить наближено 100 нМ, у разі збудження вона підвищується до рівня 1 мкМ і навіть більше, що й забезпечує скорочення м'язу. Саме позаклітинному Ca^{2+} (наближена величина концентрації $[\text{Ca}^{2+}]_e$ – 1 мМ) належить істотна роль в активації скоротливої функції гладеньких м'язів (значення вільної енергії Гіббса ΔG у разі транссарколемного кальцієвого градієнта, спрямованого в клітину, є: $\Delta G = RT \ln \{ [\text{Ca}^{2+}]_i / [\text{Ca}^{2+}]_e \} + 2F\Delta\psi = 40$ кДж/моль, де $\Delta\psi$ – мембранний потенціал, T – абсолютна температура (°К), R – універсальна стала, F – число Фарадея); за рахунок зазначеного транссарко-

лемного кальцієвого градієнта спостерігається також пасивне надходження Ca^{2+} в клітини. Релаксація м'язової напруги спряжена з оборотним зменшенням концентрації Ca^{2+} до початкового рівня 100 нМ.

Головна роль у контролі змін концентрації Ca^{2+} в міоплазмі належить мембранозв'язаним системам пасивного (кальцієві канали плазматичної мембрани та саркоплазматичного ретикулума) та активного (кальцієві помпи плазматичної мембрани та саркоплазматичного ретикулума, кальцієві обмінники плазматичної мембрани та мітохондрій, кальцієвий уніпортер мітохондрій) транспортування цього катіона.

У плазматичній мембрані гладеньком'язових клітин знаходиться ензим Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза (3.6.1.38), який забезпечує Ca^{2+} , Mg^{2+} -

залежний гідроліз АТР, спряжений з активним Mg^{2+} , АТР-залежним транспортом Ca^{2+} з міоцитів у позаклітинний простір, і, по суті, є кальцієвою помпою (стехіометрія транспортування: $1 Ca^{2+} : 1 АТР$) [1–6].

Mg^{2+} , АТР-залежна кальцієва помпа плазматичної мембрани виконує дві фундаментальні функції в гладеньком'язовій клітині: 1) підтримує низьку концентрацію Ca^{2+} в розслаблених міоцитах, компенсуючи повільне надходження цих іонів у незбуджену клітину, і, відповідно, контролюючи «базальний» тонус гладеньких м'язів; 2) забезпечує зниження концентрації Ca^{2+} в міоплазмі після скорочення м'яза і, отже, робить внесок у релаксацію м'язової напруги [5].

Очевидно, що для подальшого дослідження функціональної ролі і парціального внеску Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази в регуляцію внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} та забезпечення електро- та фармакомеханічного спряження в гладеньких м'язах є необхідним використання селективних вискоєфективних інгібіторів цього ензиму. Втім, на сьогодні селективні інгібітори Mg^{2+} , АТР-залежної кальцієвої помпи плазматичної мембрани, на відміну від кальцієвої помпи ендосаркоплазматичного ретикулула (тапсигаргін, циклопіазонієва кислота) [7], практично відсутні. За даними літератури єдиними відомими на сьогодні специфічними інгібіторами Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани є лише пептиди класу калоксинів 1A1, 2A1 та 3A1, які зв'язуються з першим, другим та третім зовнішньоклітинними доменами ензиму відповідно [8–11].

Останнім часом було продемонстровано, що циклічні олігомери фенолів, або каліксарени, можуть бути ефективними інгібіторами та активаторами ензиматичних, рецепторних та транспортних мембранозв'язаних протеїнів [12–14]. Деяким каліксаренам притаманні противірусні, бактерицидні, протипухлинні та антитромботичні властивості [15–17]. Серед переваг каліксаренів можна відзначити їх легкий синтез та можливість модифікації різноманітними функціональними групами [18], а також низьку токсичність та імуногенність [19, 20].

У попередніх дослідках нами було знайдено, що калікс[4]арен С-90 (5,11,17,23-тетра(трифтор)метил(фенілсульфоніліміно)-метиламіно-25,26,27,28-тетрапропокси-калікс[4]арен) у концентрації 100 мкМ ефективно пригнічує Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазну активність плазматичної

мембрани клітин міометрія до рівня $25,1 \pm 0,5\%$ відносно контрольного значення (прийнятого за 100%); у той же час зазначена сполука, яку було використано в такій самій концентрації, практично не впливала на ензиматичну активність Na^+ , K^+ -АТРази і «базальної» Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани: відповідна активність становила $94,2 \pm 0,6$ і $107,7 \pm 1,0\%$ щодо контрольного значення. Чутлива до дії протонифору СССР акумуляція Ca^{2+} в мітохондріях міометрія виявилася практично резистентною до дії зазначеного каліксарену [21]. Наведені дані можуть бути основою для створення фармакологічного препарату нового («супрамолекулярного») покоління – селективного інгібітора Mg^{2+} , АТР-залежної кальцієвої помпи плазматичної мембрани клітин гладеньких м'язів на підставі використання «молекулярної платформи» калікс[4]арену С-90, який можливо здатний стимулювати їхній базальний тонус та скорочення за патологічних станів (атонія та гіпотонус матки, шлунково-кишкового тракту, гіпотензія тощо).

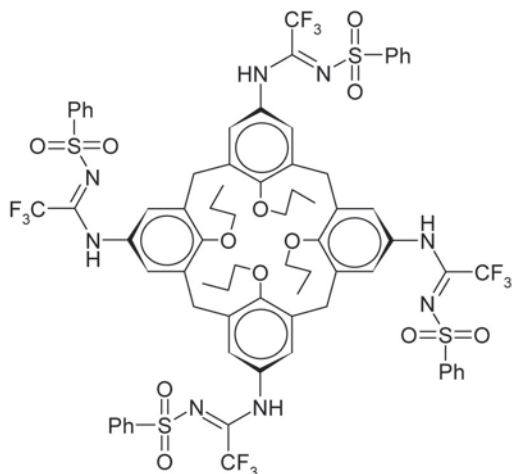
У цій роботі ми поставили перед собою завдання вивчити кінетичні закономірності дії калікс[4]арену С-90 на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазну активність плазматичної мембрани клітин міометрія і на підставі одержаних даних розбудувати стаціонарну математичну модель участі зазначеного ензиму в контролі «базальної» концентрації Ca^{2+} в міоплазмі незбуджених міоцитів.

Матеріали і методи

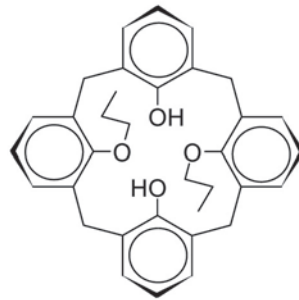
Синтез та структура калікс[4]арену С-90. Калікс[4]арен С-90 (5,11,17,23-тетра(трифтор)метил(фенілсульфоніліміно)-метиламіно-25,26,27,28-тетрапропокси-калікс[4]арен) та його фрагменти – так звана «калікс[4]аренова чаша» (калікс[4]арен С-150), (25,27-дипропокси-калікс[4]арен) і сполука М-1 (N-(4-етоксифеніл)-N'-(фенілсульфоніл)-трифторометилацетамідин), що є структурним фрагментом молекули каліксарену С-90 (структурні формули див. нижче), було синтезовано та охарактеризовано з використанням методів ЯМР та інфрачервоної спектроскопії у відділі хімії фосфоранів Інституту органічної хімії НАН України [21].

Біохімічні дослідження було проведено у відділі біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України.

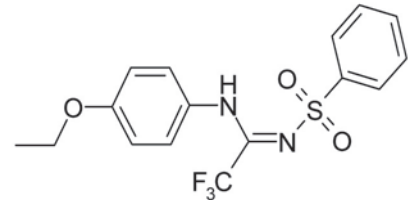
Фракцію плазматичних мембран гладеньком'язових клітин матки виділяли з міометрія свині, як було описано раніше [23, 24].



Калікс[4]арен С-90



«Калікс[4]аренова чаша»
С-150



М-1

Вміст протеїну в мембранній фракції визначали методом М. Bredford [25] із використанням реакції з реактивом кумасі – G250.

Загальну АТРазну активність визначали у фракції плазматичних мембран клітин міометрія при 37 °С у стандартному середовищі (об'єм – 0,4 мл), яке містило (мМ): 3 АТР, 3 MgCl₂, 0,95 CaCl₂, 25 NaCl, 125 KCl, 1 ЕГТА, 20 Нерес-трис-буфер (рН 7,4), 1 NaN₃ (інгібітор АТР-ази мітохондрій [26]), 1 убаїн (селективний інгібітор Na⁺,K⁺-АТРази [27, 28]), 0,1 мкМ тапсигаргін (селективний інгібітор Ca²⁺,Mg²⁺-АТРази ендо(сарко)-плазматичного ретикулу-ма [26]) і 0,1%-й дигітонін (фактор перфорації плазматичної мембрани [29]). Розрахунки, які було виконано з використанням комп'ютерної програми «МАХСНЕМ», свідчать про те, що за фізико-хімічних умов середовища інкубації концентрація вільного кальцію (суто Ca²⁺) становить 1 мкМ. Для вивчення впливу різних концентрацій Ca²⁺ на активність Ca²⁺,Mg²⁺-АТРази його необхідні концентрації також визначали шляхом комп'ютерного розрахунку із використанням зазначеної програми. Кількість протеїну мембранної фракції в пробі – 20–30 мкг. Час інкубації – 5 хв. Ензиматичну реакцію ініціювали введенням до середовища інкубації аліквоти (50 мкл) суспензії плазматичних мембран, а зупиняли – додаванням до інкубаційної суміші 1 мл «стоп-розчину»: 1,5 М натрію оцтовокислого, 3,7% формальдегіду, 14% етанолу, 5% ТХО, рН 4,3 (при 8 °С). Кількість продукту реакції P_i визначали методом W. Rathbun et V. Betlach [30].

Ca²⁺,Mg²⁺-АТРазну активність розраховували за різницею між величинами АТРазної активності у присутності та за відсутності в

середовищі інкубації екзогенного Ca²⁺ (на фоні присутності 1 мМ ЕГТА – специфічного хелатора Ca²⁺).

У дослідах з вивчення впливу різних концентрацій калікс[4]арену С-90 (1–100 мкМ) на Ca²⁺,Mg²⁺-АТРазну активність використовували описане вище стандартне середовище інкубації, до якого додавали аліквоту розчину калікс[4]арену у відповідній концентрації. У дослідах використовували концентрований (20 мМ) розчин калікс[4]арену С-90 в ДМСО, який далі розводили водою.

Кінетичні дослідження. Для вивчення концентраційної залежності дії калікс[4]аренів на ензиматичну активність значення коефіцієнтів інгібування I_{0,5} та коефіцієнтів Хілла n_H розраховували із використанням лінеаризованих графіків Хілла відповідно до рівняння:

$$\lg[(A_{\max} - A)/A] = -n_H \lg I_{0,5} + n_H \lg [C-90],$$

де A_{max} та А – питома ензиматична активність за відсутності («нульова точка») та у присутності в середовищі інкубації калікс[4]арену у відповідній концентрації [С-90].

Значення уявних констант активації Ca²⁺,Mg²⁺-АТРази іонами Ca <K_{Ca}>, а також коефіцієнтів Хілла n_{Ca} розраховували з використанням лінеаризованих графіків Хілла відповідно до рівняння:

$$\lg[(A_{\max} - A)/A] = n_{Ca} \lg <K_{Ca}> - n_{Ca} \lg [Ca^{2+}],$$

де A_{max} та А – питома ензиматична активність за оптимальної та діючої концентрації кальцію [Ca²⁺] в середовищі інкубації.

Уявну максимальну початкову швидкість <V_{max}> реакції гідролізу АТР визначали в обернених координатах Лайнуївера–Берка відповідно до рівняння:

$$1/V = K_{Ca}[Ca^{2+}]/\langle V_{max} \rangle + 1/\langle V_{max} \rangle,$$

де V – питома ензиматична активність у присутності в середовищі інкубації Са в певній концентрації $[Ca^{2+}]$. За такими графіками типове значення середньоквадратичного відхилення коефіцієнта апроксимації становить 0,9–0,99.

Математичне моделювання. Під час обчислення математичної моделі було створено комп'ютерну програму (мова «Groovy»), що виконувала розрахунки із заданим значенням точності. Обрахунки здійснювали на комп'ютері із процесором 2.5 GHz Intel Core i5 (4-ядерний) з пам'яттю 8 GB 1333 MHz DDR3.

Статистичний аналіз одержаних даних проводили із залученням стандартних методів із використанням t -критерію Стьюдента. Кінетичні та статистичні розрахунки здійснювали з використанням програмного забезпечення MS Excel.

В роботі було використано такі реактиви: АТР, Нерес, убаїн, тапсигаргін (Sigma, США), Tris-гідроксиметил-амінометан (Reanal, Угорщина), дигітонін (Merck, Німеччина), ЕГТА (Fluka, Швейцарія). Інші реактиви вітчизняного виробництва класифікації чда та хч.

Результати та обговорення

Як уже відзначалося, калікс[4]арен С-90, використаний в концентрації 100 мкМ, пригнічує питому ензиматичну Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРазну активність до $25,1 \pm 0,5\%$ відносно контрольного значення (у відсутності калікс[4]арену в середовищі інкубації, яке прийнято за 100%) ($M \pm m; n = 5$). Для визначення ролі різних функціональних груп у складі молекули калікс[4]арену С-90 в інгібуванні активності Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази було досліджено дві модельні сполуки: «калікс[4]аренова чаша» – калікс[4]арен С-150 (25,27-дипропоксикалікс[4]арен) та сульфоніламідин – сполука М-1 (N-(4-етоксифеніл)-N'-(фенілсульфоніл)-трифторометилацетамідин). На основі структурних формул калікс[4]аренів, наведених вище, можемо бачити, що калікс[4]арен С-150 не містить жодних додаткових хімічних групвань на верхньому вінці макроциклу, тобто є суто «каліксареновою чашею». Сполука М-1 містить один фенольний фрагмент та сульфоніламідинову групу, аналогічну до таких, які присутні на верхньому вінці молекули калікс[4]арену С-90. Як виявилось, структурний фрагмент С-150 («калікс[4]аренова чаша»), використаний в концентрації 100 мкМ, здатний незначно (на $13,0 \pm 1,8\%$) знижувати Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРазну активність ($M \pm m; n = 5$).

Модельна сполука М-1 у концентрації 100 мкМ пригнічує Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРазну активність лише на $9,3 \pm 2,4\%$, а використання цього фрагмента в концентрації 400 мкМ (оскільки у складі молекули калікс[4]арену С-90 маємо 4 фрагменти М-1) також призводить до незначного інгібування Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРазної активності – на $12,5 \pm 1,7\%$ відносно контрольного значення ($M \pm m; n = 5$) (рис. 1).

Отже, інгібувальна дія калікс[4]арену С-90 на Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРазну активність передусім пов'язана саме з кооперативним впливом чотирьох просторово орієнтованих на калікс[4]ареновій платформі сульфоніламідинових груп, а не з дією тетрафенольного макроциклу як такого чи з дією окремої фармакофорної групи.

У подальших наших експериментах ми показали, що калікс[4]арен С-90, використаний в діапазоні концентрацій 10^{-8} – 10^{-4} М, ефективно та дозозалежно гальмує Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРазну активність (рис. 2). Величина коефіцієнта інгібування $I_{0,5}$ для С-90 становить $20,2 \pm 0,5$ мкМ ($M \pm m; n = 5$), що вказує на достатньо афінну взаємодію. Значення коефіцієнта Хілла (n_H) становить $0,55 \pm 0,02$ ($M \pm m; n = 5$).

Для кінетичної інтерпретації впливу калікс[4]арену С-90 на ензиматичну активність Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани клітин міометрія ми дослідили його дію на характер концентраційної залежності зазначеної активності від Ca^{2+} .

З цією метою вивчали залежність Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРазної активності від концентрації Ca^{2+} в інкубаційному середовищі за різних концентрацій калікс[4]арену С-90 (1, 10, 30, 60 та 100 мкМ). Для цього ми розраховували концентрацію Ca^{2+} , враховуючи концентрацію ЕГТА та АТР та їхню спорідненість до Ca^{2+} , використовуючи комп'ютерну програму «MAXCHEL» (див. «Матеріали і методи»).

На основі одержаних експериментальних даних нами були розраховані кінетичні параметри активації Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРазної активності плазматичної мембрани Ca^{2+} та вплив на них калікс[4]арену С-90 (рис. 3). Уявна максимальна початкова швидкість $\langle V_{max} \rangle$ реакції гідролізу АТР, що каталізується Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРазною плазматичної мембрани, в контролі за відсутності каліксарену становить $6,7 \pm 0,9$ мкмоль Р_i/год на мг протеїну ($M \pm m; n = 5$) та знижується зі збільшенням концентрації калікс[4]арену С-90 до 100 мкМ, (рис. 3, а). Отже, під впливом цього калікс[4]арену спостерігається зниження числа обертів

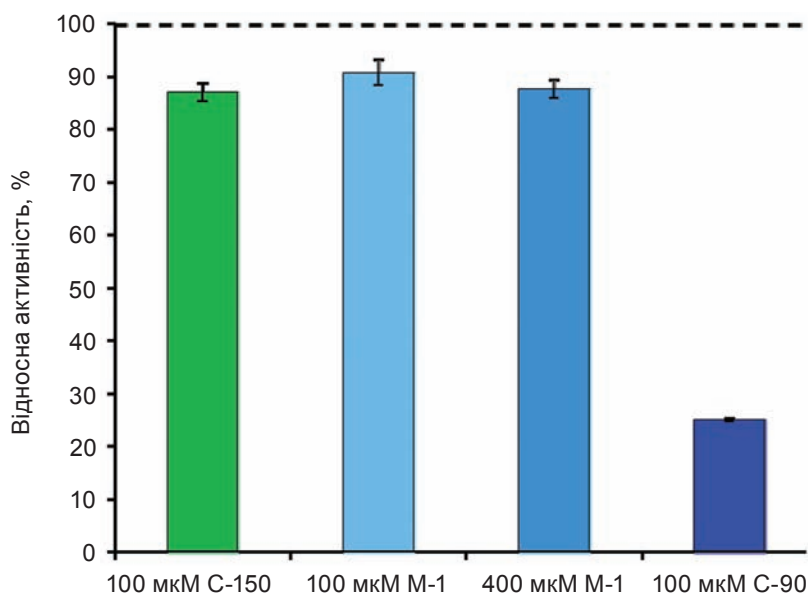


Рис. 1. Ензиматична активність транспортної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази у фракції плазматичних мембран клітин міометрія за дії калікс[4]аренів С-90, С-150 і модельної сполуки М-1 ($M \pm m$, $n = 5$). За 100% прийнято значення питомої ензиматичної активності за відсутності каліксаренів та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

ензиму. Значення уявної константи активації $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази $\langle K_{\text{Ca}} \rangle$ за відсутності калікс[4]арену С-90 у середовищі інкубації дорівнює 190 ± 1 нМ, величина коефіцієнта Хілла $n_{\text{Ca}} - 2,1 \pm 0,1$ ($M \pm m$; $n = 5$). У разі внесення в середовище інкубації калікс[4]арену С-90 в діапазоні концентрацій 0,1–10 мкМ значення уявної константи активації $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази $\langle K_{\text{Ca}} \rangle$ та коефіцієнта Хілла n_{Ca} за Ca^{2+} практично не змінюється; лише у разі подальшого збільшення концентрації калікс[4]арену С-90 (> 50 мкМ) спостерігаються істотні зміни в зазначених кінетичних параметрах: величина $\langle K_{\text{Ca}} \rangle$ збільшується до 312 ± 23 нМ, а значення коефіцієнта Хілла n_{Ca} знижується до $1,5 \pm 0,1$ (рис. 3, а). Таким чином, лише за відносно великих концентрацій калікс[4]арену С-90 (50–100 мкМ) спостерігається зменшення спорідненості $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази до Ca^{2+} та знижується позитивний кооперативний ефект активації ензиму цими катіонами.

Як вже було зазначено, концентрація Ca^{2+} поза клітиною у 10^4 – 10^3 рази вища за внутрішньоклітинну концентрацію цього катіона [31], що призводить до появи електрохімічного градієнта за кальцієм, спрямованого в цитоплазму (вільна енергія Гіббса ΔG). Саме цей електрохімічний градієнт Ca^{2+}

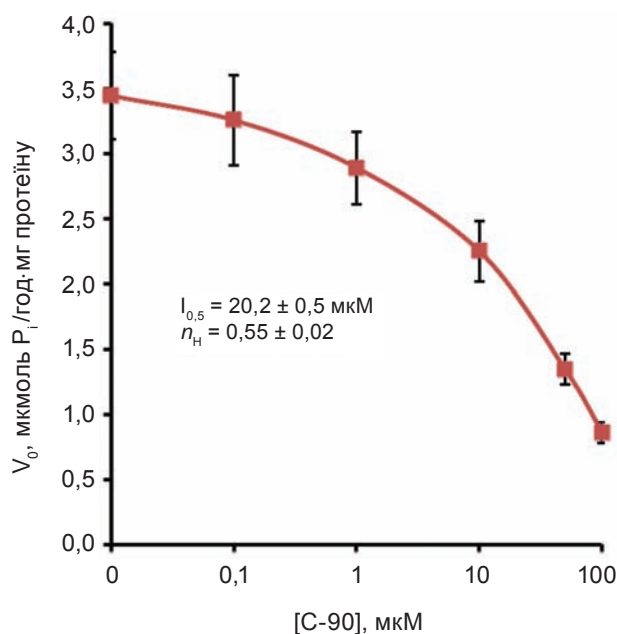


Рис. 2. Залежність ензиматичної активності транспортної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази у фракції плазматичних мембран клітин міометрія від концентрації калікс[4]арену С-90 ($M \pm m$, $n = 5$). За 100% прийнято значення питомої ензиматичної активності за відсутності каліксарену в середовищі інкубації

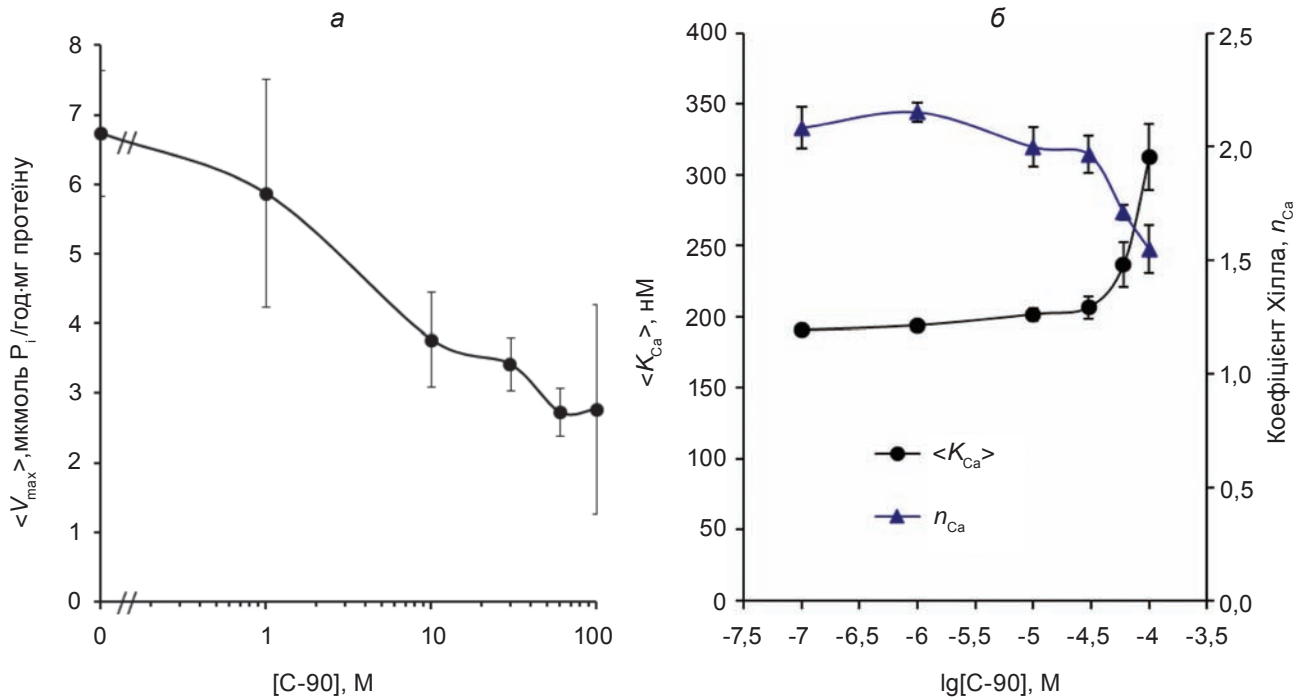


Рис. 3. Вплив калікс[4]арену С-90 на уявну максимальну швидкість V_{max} (а) та на уявний коефіцієнт активації K_{Ca} і коефіцієнт Хілла n_{Ca} (б) реакції гідролізу АТР, що каталізується Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазою плазматичної мембрани (всі параметри розраховано на основі залежності ензиматичної активності від концентрації Ca^{2+}) ($M \pm m$, $n = 5$)

зумовлює надходження в незбуджені клітини стаціонарного «базального» потоку Ca^{2+} , величина якого становить 10^{-15} – 10^{-14} моль Ca^{2+}/cm^2 за 1 сек [32]. Втім, у стані спокою в цитоплазмі концентрація Ca^{2+} підтримується на сталому рівні – 10^{-7} – 10^{-8} М. Припускається, що основна роль у підтриманні базальної концентрації Ca^{2+} (концентрація Ca^{2+} до збудження) в цитоплазмі належить саме Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани [31], оскільки Ca^{2+} -уніпортер мітохондрій та Na^+/Ca^{2+} -обмінник виявляють (порівняно з помпою) нижчу спорідненість до Ca^{2+} (значення K_{Ca} дорівнює 0,1–0,3 мкМ, 1 мкМ та 10–20 мкМ відповідно [33]). Нами було висловлено гіпотезу, що інгибування активності саме Mg^{2+} , АТР-залежної Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани призведе до зростання базальної концентрації Ca^{2+} в клітинах міометрія і, отже, до збільшення базального тонуусу матки. Дійсно, з даних літератури відомо, що використання тапсигаргіну (специфічного інгібітора Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази саркоплазматичного ретикулума) призводить до незначного зростання внутрішньоклітинної концентрації кальцію [34]. Це можна пояснити тим, що у гладеньких м'язах саркоплазматичний ретикулум не є розвиненим порівняно з іншими м'язами, займає

близько 5% внутрішньоклітинного об'єму та має нижчу ємність щодо Ca^{2+} порівняно з цитоплазмою, тому блокування Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази саркоплазматичного ретикулума не може використовуватися для підвищення стаціонарної (нетранзійентної) цитозольної концентрації Ca^{2+} [32, 35, 36].

Таким чином, враховуючи визначені в описаних вище дослідах кінетичні параметри чутливості Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани до інгибуючої дії калікс[4]арену С-90 (рис. 2 та 3) та використовуючи метод математичного моделювання ми можемо розбудувати кількісну модель (в стаціонарному режимі) індукції зазначеним калікс[4]ареном збільшення «базальної» концентрації Ca^{2+} в міоцитах матки.

Швидкість роботи (V) Mg^{2+} , АТР-залежної Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани описується рівнянням Хілла (1):

$$V = \frac{\langle V_{max} \rangle [Ca^{2+}]_e^n}{\langle K_{Ca} \rangle^n + [Ca^{2+}]_i^n}, \quad (1)$$

де $\langle V_{max} \rangle$ – уявна максимальна швидкість транссарколемального викиду Ca^{2+} із клітини, $[Ca^{2+}]_i$ – концентрація внутрішньоклітинного

Ca^{2+} , $\langle K_{Ca} \rangle$ – уявна константа активації, а n_{Ca} – коефіцієнт Хілла для Ca^{2+} .

Беручи до уваги, що за нашими експериментальними результатами коефіцієнт Хілла n_{Ca} наближено рівний 2 (рис. 3, б), зміну цитозольної концентрації Ca^{2+} у незбуджених міоцитах матки в часі можна описати рівнянням (2):

$$\frac{d[Ca^{2+}]_i}{dt} = \gamma([Ca^{2+}]_e - [Ca^{2+}]_i) - \frac{\langle V_{max} \rangle \times [Ca^{2+}]_e^2}{\langle K_{Ca} \rangle^2 + [Ca^{2+}]_i^2}, \quad (2)$$

де зменшуване описує базальне надходження Ca^{2+} в клітину крізь плазматичну мембрану, спричинене наявністю градієнта ($[Ca^{2+}]_e - [Ca^{2+}]_i$) залежно від константи швидкості проникності мембрани в цьому разі для Ca^{2+} (γ), а від'ємник – це швидкість роботи Mg^{2+} , АТР-залежної Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани. У стаціонарних умовах концентрація Ca^{2+} в клітині не змінюється, тобто $\frac{d[Ca^{2+}]_i}{dt} = 0$, тоді рівняння

(2) перетворюється на кубічне рівняння (3):

$$\gamma[Ca^{2+}]_i^3 + (\langle V_{max} \rangle - \gamma[Ca^{2+}]_e) \times [Ca^{2+}]_i^2 + \gamma \langle K_{Ca} \rangle^2 [Ca^{2+}]_i - \gamma \langle K_{Ca} \rangle^2 [Ca^{2+}]_e = 0. \quad (3)$$

Таким чином, розв'язавши це рівняння (3) відносно $[Ca^{2+}]_i$, ми отримуємо залежність базальної концентрації кальцію $[Ca^{2+}]_i$ від константи швидкості проникності мембрани γ , позаклітинної концентрації Ca^{2+} $[Ca^{2+}]_e$, константи активації для Ca^{2+} K_{Ca} та максимальної швидкості роботи помпи V_{max} . Розглянуте нами кубічне рівняння мало три корені, один з яких з від'ємним значенням, два інші спряжені – значення позитивного кореня збігається з очікуваним значенням внутрішньоклітинної концентрації кальцію (≈ 100 нМ).

За нашими результатами (рис. 3, б) при концентрації калікс[4]арену С-90 0,1–50 мкМ значення K_{Ca} практично не змінюється (тобто $\langle K_{Ca} \rangle = K_{Ca}$), а змінюється лише V_{max} (рис. 3, а), що свідчить про механізм повного неконкурентного інгібування в заданих межах концентрації калікс[4]арену С-90. У разі ж повного неконкурентного інгібування величини

на $I_{0,5} = K_i$. Тоді, відповідно до відомих положень ензиматичної кінетики для $\langle V_{max} \rangle$, маємо рівняння (4):

$$\langle V_{max} \rangle = \frac{K_i}{K_i + [C - 90]} V_{max}. \quad (4)$$

За нашими попередніми результатами є підстави припустити, що за фізіологічних концентрацій Ca^{2+} ($< 0,1$ мкМ) величина $I_{0,5} = K_i$ практично не залежить від концентрації Ca^{2+} .

Використовуючи сталі значення $\gamma = 10^{-3} \text{ см}^{-1}$ [31], $[Ca^{2+}]_i = 1 \cdot 10^{-3} \text{ М}$ [31], $K_{Ca} = 1,9 \cdot 10^{-7} \text{ М}$, $I_{0,5} = 2 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ (рис. 3) та симуюючи значення V_{max} , що початково становило $4,6 \cdot 10^{-6} \text{ М/хв}$ [31], ми, відповідно до рівнянь (3) та (4), одержали модельну залежність базальної рівноважної концентрації Ca^{2+} у незбуджених міоцитах матки за умов зміни концентрації калікс[4]арену С-90 – селективного інгібітора Mg^{2+} , АТР-залежної Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани (рис. 4).

Отже, результати модельних розрахунків свідчать про те, що за концентрації селективного інгібітора Mg^{2+} , АТР-залежної Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани калікс[4]арену С-90 10^{-6} – $2 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ хід кривої зміни цитозольної концентрації Ca^{2+} у незбуджених міоцитах є досить пологим, а за концентрації інгібітора вищої за $2 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ крива є майже експоненціально залежною. Таким чином, використання калікс[4]арену С-90 в низьких концентраціях (< 10 – 20 мкМ) має перевагу через помірний вплив на внутрішньоклітинну концентрацію Ca^{2+} , а саме: цитоплазматична концентрація Ca^{2+} зростає не більше ніж у 2 рази стосовно початкової (100 нМ), що не має призводити до контрактури матки, а дозволить керувати базальним тонусом її м'язів.

Передбачається, що експериментальні дані, які було одержано з використанням калікс[4]арену С-90 – інгібітора Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани, можуть мати значення для з'ясування іонних, молекулярних та мембранних механізмів кальцієвого обміну в гладеньких м'язах, зокрема під час вивчення ролі плазматичної мембрани в забезпеченні електро- та фармакомеханічного спряження в них. Результати модельних розрахунків свідчать: факт можливості модуляції калікс[4]ареном С-90 величини базальної концентрації Ca^{2+} в міоплазмі може бути перспективним для створення на основі зазначеної сполуки нового фармакологічного препарату – стимулятора базального тонусу матки.

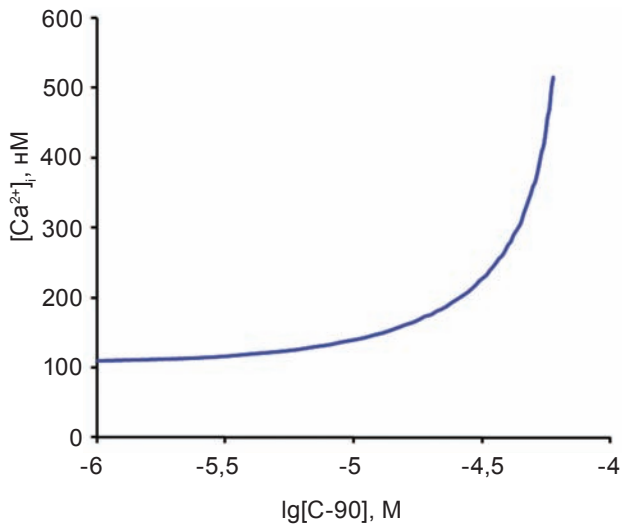


Рис. 4. Модельна залежність рівноважної базальної концентрації Ca^{2+} в клітинах міометрія від концентрації калікс[4]арену С-90 – селективного інгібітора Mg^{2+} -АТФ-залежної кальцієвої помпи плазматичної мембрани

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 грант НАН України на підтримку досліджень молодих вчених «Каліксарени як ефектори АТФ-гідролаз плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин» (№ держреєстрації 0111U007135).

КИНЕТИЧЕСКИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ДЕЙСТВИЯ КАЛИКС[4]АРЕНА С-90 НА Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ И НА КОНЦЕНТРАЦИЮ Ca^{2+} В НЕВОЗБУЖДЕННЫХ КЛЕТКАХ МИОМЕТРИЯ

Т. А. Веклич¹, А. А. Шкрабак¹,
Ю. Ю. Мазур¹, Р. В. Родик², В. И. Бойко²,
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

Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза плазматической мембраны – важный элемент общего механизма контроля базального тонуса миометрия, которая также частично обеспечивает релаксацию мышечного напряжения после сокращения мышцы. В экспериментах, проведенных на суспензии плазматических мембран клеток миометрия, обработанных 0,1%-ым раствором дигитонина, исследовали ингибирующее действие калікс[4]арен С-90 (5,11,17,23-тетра(трифтор)метил(фенилсульфонилимино)-метиламино-25,26,27,28-тетрапропокси-калікс[4]арен) на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРАЗНУЮ активність. Калікс[4]-арен С-90 ефективно угнетает Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРАЗНУЮ активність (значение $I_{0,5}$ для С-90 равно $20,2 \pm 0,5$ мкМ). Ингибирующее действие калікс[4]арен С-90 на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРАЗНУЮ активність прежде всего связано именно с кооперативным влиянием четырех пространственно ориентированных на калікс[4]ареновой платформе фенилсульфонилиминотрифторометил-ацетамидных групп, а не с действием только тетрафенольного макроцикла или с действием отдельных фармакоформных сульфониламинодиновых групп. С учетом установленных кинетических закономерностей ингибирующего действия калікс[4]-арен С-90 на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРАЗНУЮ активність плазматической мембраны создана стационарная кинетическая модель контроля уровня базальной концентрации Ca^{2+} в невозбужденных миоцитах матки. Предполагается, что полученные результаты

могут быть перспективными для создания на основе каликс[4]арена C-90, фармакологического препарата нового («супрамолекулярного») поколения – стимулятора базального тонуса матки.

Ключевые слова: Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза, плазматическая мембрана, гладкомышечные клетки, миомерий, энзиматический гидролиз АТР, кинетические свойства АТРаза, каликс[4]арены.

KINETIC REGULARITIES OF CALIXARENE C-90 ACTION ON THE MYOMETRIAL PLASMA MEMBRANE Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase ACTIVITY AND ON THE Ca^{2+} CONCENTRATION IN UNEXCITED CELLS OF THE MYOMETRIUM

T. O. Veklich¹, A. A. Shkrabak¹, Yu. Yu. Mazur¹, R. V. Rodik², V. I. Boyko², 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

Plasma membrane Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase is an important element of general myometrium tonus control mechanism, which also makes a contribution to muscle tension relaxation after its contraction. Experiments were done on the myometrial cell plasma membrane suspension, which was treated with 0.1% digitonin solution. The authors have investigated the inhibitory action of calix[4]arene C-90 (5,11,17,23-tetra(trifluoromethyl(phenylsulphonylimino)-methylamino-25,26,27,28-tetra propoxi-calix[4]arene) on the Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity (the magnitude of $I_{0.5}$ was 20.2 ± 0.5 mkM). The inhibitory action of calix[4]arene C-90 on the activity of Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase is explained as cooperative action of four trifluoromethyl(phenylsulfonylimino)methylamino groups that are spatially oriented on the calix[4]arene base rather than with the action of tetraphenol macrocycle or separate pharmacophore sulphonylamidin groups. Considering established kinetic pattern of calix[4]arene C-90 inhibitory action on the plasma membrane Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity, stationary kinetical model of basal calcium concentration control in unexcited uterus myocytes was developed. It is assumed that obtained results may be promising for creation of new generation («supramolecular») pharmacological agent - uterus

basal tonus stimulator – on the base of calix[4]arene C-90.

Key words: Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase, plasma membrane, smooth muscle cells, myometrium, enzymatic hydrolysis of ATP, kinetic properties of ATPase, calix[4]arenes.

1. Austin C., Wray S. // Circ. Res. – 2000. – **86**. – P. 353–363.
2. Brini M., Carafoli E. // Physiol. Rev. – 2009. – **89**. – P. 1341–1378.
3. Burdyga T., Paul R. J. // Muscle. Fundam. Biol. Mech. Dis. – 2012. – **2**. – P. 1155–1171.
4. Фафула П. В., Єфремова У. П., Воробець З. Д. // Укр. біохім. журн. – 2012. – **84**, № 6. – С. 115–123.
5. Kosterin S. O. // Neurophysiology. – 2003. – **35**, N 3–4. – P. 215–228.
6. Carafoli E. J. // Biol. Chem. – 1992. – **267**, N 4. – P. 2115–2118.
7. Rosa A. O., Yamaguchi N., Morad M. // Cell Calcium. – 2013. – **53**, Issue 4. – P. 26–274
8. Chen H. H., Lin Y. R., Peng Q. G., Chan M. H. // Toxicol. Sci. – 2005. – **83**, N 1. – P. 149–154.
9. Pande J., Mallhi K. K., Grover A. K. // Eur. J. Pharmacol. – 2005. – **508**, N 1–3. – P. 1–6.
10. Pande J., Mallhi K. K., Grover A. K. // Cell Calcium. – 2005. – **37**, N 3. – P. 245–250.
11. Szewczyk M. M., Pande J., G. Akolkar, Grover A. K. // Cell Calcium. – 2010. – **48**. – P. 352–357.
12. Kopaczynska M., Wang T., Schulz A. et al. // Langmuir. – 2005. – **21**, N 18 – P. 8460–8465.
13. Zhao B. T., Blesa M. J., Mercier N. et al. // J. Org. Chem. – 2005. – **70**, N 16. – P. 6254–6257.
14. Gutsche C. D. Calixarenes Revisited, The Royal Society of Chemistry: Cambridge, 1998. – 233 p.
15. Perret F., Lazar A., Coleman A. // Chem. Commun. – 2006. – **24**. – P. 2425–2438.
16. Кальченко В. І., Родік Р. В., Бойко В. І. // Журн. орг. та фарм. хімії. – 2006. – **3**, № 4. – С. 13–29.
17. Da Silva E., Lazar A., Coleman A. // Drug. Sci. tech. – 2004. – **14**, N 1. – P. 3–20.
18. Родік Р. В. // Укр. біохім. журн. – 2012. – **84**, № 5. – С. 5–15.
19. Coleman A. W., Jebors S., Cecillon S. et al. // New J. Chem. – 2008. – **32**, N 5. – P. 780–782.
20. Da Silva E., Lazar A. N., Coleman A. W. // J. Drug Deliv. Sci. Technol. – 2004. – **14**, N 1. – P. 3–20.
21. Rodik R. V., Boyko V. I., Danylyuk O. B. et al. // Tetrahedron Lett. – 2005. – **46**. – P. 7459–7462.

22. Векліч Т. О., Костерін С. О. // Укр. біохім. журн. – 2005. – 77, № 2. – С. 66–75.
23. Кондратюк Т. П., Быченко С. Ф., Прищепа Л. А. и др. // Укр. біохім. журн. – 1986. – 58, № 4. – С. 50–56.
24. Bradford M. M. // Anal. Biochem. – 1976. – 72, N 1–2. – P. 248–282.
25. Flynn E. R. M., Bradley K. N., Muir T. C., McCarron J. G. // J. Biol. Chem. – 2001. – 276, N 39. – P. 36411–36418.
26. Valente R. C., Capella L. S., Monteiro R. Q. et al. // FASEB J. – 2003. – 17, N 12. – P. 1700–1702.
27. Wang H., Haas M., Liang M. et al. // J. Biol. Chem. – 2004. – 279, N 17. – P. 17250–17259.
28. Векліч Т. О., Костерін С. О., Шинлова О. П. // Укр. біохім. журн. – 2002. – 74, № 1. – С. 42–48.
29. Rathbun W., Betlach V. // Anal. Biochem. – 1969. – 28, N 1–3. – P. 436–445.
30. Tidow H., Poulsen L.R., Andreeva A. et al. // Nature. – 2012. – 491. – P. 468–472.
31. Транспорт кальция в гладких мышцах / С. А. Костерин. – К: Наук. думка, 1990. – 216 с.
32. Oloizia B., Paul R. G. // J. Mol. Cell. Cardiol. – 2008. – 45. – P. 347–362.
33. McFadzean I., Gibson A. // Br. J. Pharmacol. – 2002. – 135, N 1. – P. 1–13.
34. Daub B., Ganitkevich V. // Cell Calcium. – 2000. – 27. – P. 3–13.
35. Kosterin S. A., Burdyga Th. V., Fomin V. P., Grover A. K. / Control of Uterine Contractility / Eds. R. E. Garfield, T. N. Tabb. – CRC Press, Boca Raton, Ann. Arbor, London, Tokyo, 1994. – P. 129–153.

Отримано 21.02.2013