

ВПЛИВ ІФТ-35 (ПОХІДНЕ ЦИКЛОПЕНТА[*d*]ПІРИМІДИНУ) НА КІНЕТИЧНІ ПАРАМЕТРИ Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ МІОЦИТІВ МАТКИ

Веклич Т.О.

Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, Україна

veklich@biochem.kiev.ua

Порушення скоротливої функції гладенького м'язу (ГМ) матки (міометрій) у жінок часто стає причиною різноманітних патологій: слабкості пологової діяльності, спонтанних абортів, передчасних пологів, викидней, атонії, гіпо- і гіпертонусу матки. Часто-густо такі патології супроводжуються змінами у функціонуванні мембранозв'язаних систем переносу катіонів та відповідно скоротливої активності ГМ матки. Тому перспективним є пошук фармакологічних сполук, здатних модифікувати скоротливу функцію міометрія у випадку зазначених патологічних станів.

Mg^{2+} -АТР-залежна кальцієва помпа плазматичної мембрани (ПМ) ефективно бере участь у регуляції концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} , що, в свою чергу, впливає на скоротливу активність біометрія [1, 2]. Саме тому важливим є детальне вивчення особливостей її функціональної активності Ca^{2+} -помпи за допомогою сполук, які специфічно впливають на неї. На жаль, сьогодні не є відомими низькомолекулярні ефектори, які селективно, та афінно змінювали б активність Ca^{2+} -помпи ПМ.

З цієї точки зору цікавими є похідні циклопента[*d*]піримідину, оскільки в попередніх дослідках нами було знайдено, що ІФТ-35 у концентрації 100 мкМ, селективно (відносно інших АТР-гідролаз ПМ) активує ензиматичну активність Ca^{2+} -транспортувальної Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази на 40,9 ± 0,4 % ($M \pm m$; $n = 5$) відносно контрольного значення [3].

З метою кінетичної інтерпретації впливу сполуки ІФТ-35 на ензиматичну активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани міометрія ми дослідили її дію на концентраційні залежності зазначеної активності від іонів Ca , Mg та АТР. Сполука ІФТ-35 (рис. 1) була синтезована та охарактеризована у відділі синтезу фізіологічно активних речовин ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України».

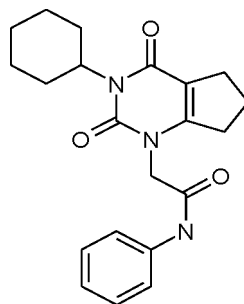


Рис. 1 Структурна формула сполуки ІФТ-35

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

Експерименти були виконані на суспензії ПМ клітин міометрія, обробленій 0,1 % розчином дигітоніну.

Фракцію ПМ виділяли з міометрія свині, як було описано раніше [4]. Вміст білка в мембранній фракції визначали методом M. Bredford [5]. АТРазну активність визначали у фракції ПМ при 37 °С у стандартному середовищі (об'єм – 0,4 мл), яке містило (мМ): 3 АТР, 3 MgCl_2 , 25 NaCl , 125 KCl , 1 ЕГТА, 20 Nepes-tris -буфер (рН 7,4), 1 NaN_3 , 1 убаїн, 0,1 мкМ тапсигаргін і 0,1 % дигітонін. Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазну активність розраховували по різниці між величинами АТРазної активності за присутності та відсутності в середовищі інкубації 0,95 мМ CaCl_2 . Кількість продукту реакції P_i визначали за методом W. Rathbun et V. Betlach [6].

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

При вивченні концентраційних залежностей дії сполуки ІФТ-35 на ензиматичну активність значення коефіцієнту активації $A_{0,5}$ та коефіцієнту Хілла n_H розраховували із використанням лінеаризованих графіків Хілла відповідно до рівняння: $\lg[(A_{max}-A)/(A-A_0)] = n_H \cdot \lg A_{0,5} - n_H \cdot \lg [I\Phi T-35]$, де A_0 та A – питомі ензиматичні активності у відсутності (“нульова точка”) та у присутності в середовищі інкубації сполуки ІФТ-35 в концентрації $[I\Phi T-35]$. A_{max} – максимальна питома ензиматична активність у присутності в середовищі інкубації сполуки ІФТ-35 (при концентрації 100 мкМ).

Як показали результати проведених досліджень, ІФТ-35, використана у діапазоні концентрацій від 10^{-8} М до 10^{-4} М дозозалежно активує Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ. Були розраховані константа активації $A_{0,5} = 6,4 \pm 0,45$ мкМ та коефіцієнт Хілла $n_H = 0,7 \pm 0,04$ ($M \pm m$; $n = 5$). Результати математичного моделювання передбачають, що сполука ІФТ-35 повинна зменшувати концентрацію Ca^{2+} у незбуджених міоцитах: найбільш ефективною є концентрація 0,3-3 мкМ. Це робить сполуку ІФТ-35 перспективною для використання у фармакологічній практиці, оскільки помірна активація Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ, яка досягається за порівняно невисоких концентрацій ефектора, дозволить корегувати патологічні стани, пов'язані з надмірною активністю ГМ матки і які потребують застосування міореклсанта.

Ми показали, що ІФТ-35 також пригнічує швидкість окситоцин-індукованих скорочень міометрія за умов дослідів *in vitro*. Отже, сполука ІФТ-35 здатна до прояву спазмолітичного ефекту на фоні дії окситоцину на скорочення матки.

Для кінетичної інтерпретації впливу ІФТ-35 на ензиматичну активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани клітин міометрія ми дослідили його дію на характер концентраційних залежностей зазначеної активності від іонів Са (рис. 2). З цією метою вивчалася залежність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази активності від концентрації Ca^{2+} в інкубаційному середовищі при різних концентраціях ІФТ-35 (відповідно 1, 10, 30, 60 та 100 мкМ). В цьому випадку ми розраховували концентрацію іонів Са, враховуючи концентрацію ЕГТА та його спорідненість до Ca^{2+} відповідно до комп'ютерної програми «МАХСHEL».

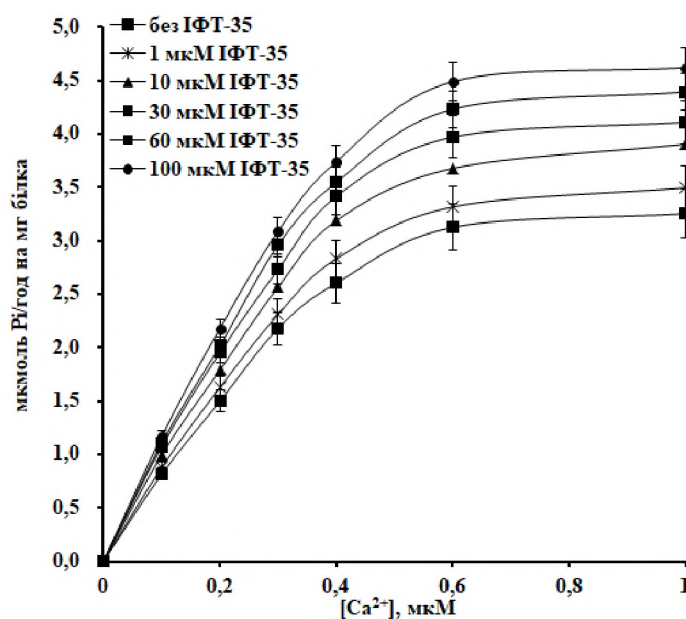


Рис. 2 Вплив збільшення концентрації ІФТ-35 на залежність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази активності плазматичної мембрани клітин міометрія від концентрації іонів Са ($M \pm m$, $n = 5$)

За 100 % прийнято значення титомої ензиматичної активності у відсутності ІФТ-35 у середовищі інкубації.

Ензиматична активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани міометрія зростає по мірі збільшення концентрації іонів Са від 100 до 1000 нМ, при наявності ІФТ-35 в середовищі інкубації активність монотонно підвищується при збільшенні концентрації активатора (рис. 2).

На основі одержаних експериментальних даних нами була розраховані кінетичні параметри активації $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази активності плазматичної мембрани іонами Са та вплив на них ІФТ-35 (рис. 3 а, б).

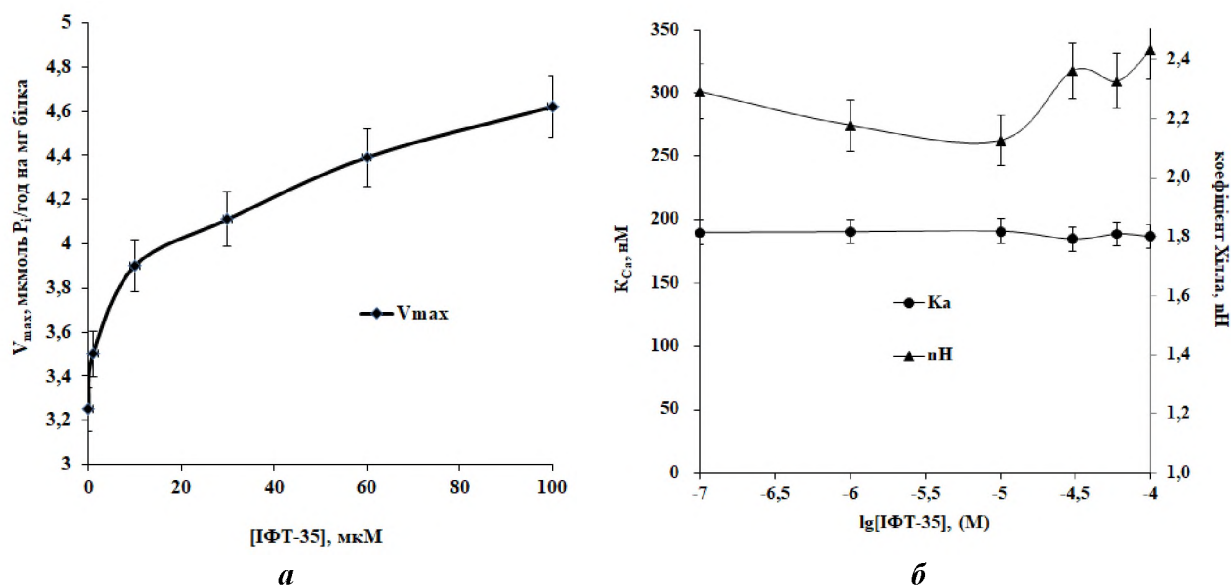


Рис. 3 Вплив ІФТ-35 на кінетичні параметри реакції гідролізу АТР по Ca^{2+} (уявну максимальну початкову швидкість V_{\max} (а) і константу активації K_{Ca} та коефіцієнт Хіллан $_{H,Ca}$) (б), що каталізується $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазою ПМ клітин міометрія ($M \pm m, n = 5$)

Уявна максимальна початкова швидкість $\langle V_{\max} \rangle$ реакції гідролізу АТР, що каталізується $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазою плазматичної мембрани, в контролі за відсутності ІФТ-35 становить $6,7 \pm 0,9$ мкмоль P_i /год на мг протеїну ($M \pm m; n = 5$) та підвищується із ростом концентрації ІФТ-35 до 100 мкМ. Значення коефіцієнту активації $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази K_{Ca} за відсутності ІФТ-35 становило 190 ± 1 нМ, величина коефіцієнта Хілла $n_H - 2,1 \pm 0,1$ ($M \pm m; n=5$).

Отже, спостерігається збільшення числа обертів ензиму під впливом даної сполуки. При внесенні в середовище інкубації ІФТ-35 у діапазоні його концентрацій 0,1-10 мкМ значення уявної константи активації $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази іонами Са $\langle K_{Ca} \rangle$ та коефіцієнта Хілла n_H за іонами Са практично не змінюється 187 ± 3 нМ, величина коефіцієнта Хілла $n_H - 2,4 \pm 0,2$ ($M \pm m; n = 5$). Таким чином, під впливом ІФТ-35 не спостерігається зміни спорідненості $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази до іонів Са.

Таким чином, дані цієї роботи можуть слугувати підґрунтям для розробки на основі ІФТ-35 ефективного активатора $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани, що, в свою чергу, матиме важливе значення для подальшого з'ясування мембранних механізмів катіонного обміну у гладеньких м'язах, зокрема, під час вивчення ролі плазматичної мембрани в забезпеченні електромеханічного sprzęження в них, а також в регуляції іонного гомеостазу в гладеньком'язових клітинах.

Крім цього, селективний активатор кальцієвої помпи плазматичної мембрани може бути основою для розробки фармакологічних засобів здатних корегувати внутрішньоклітинну концентрацію іонів Ca за патологічних станів.

Автор вдячний академіку НАНУ проф. С.О. Костеріну за обговорення результатів дослідів та творчі дискусії.

1. Костерін С.О., Бабіч Л.Г., Шликов С.Г., Данилович Ю.В., Векліч Т.О., Мазур Ю.Ю. Біохімічні властивості та регуляція Ca^{2+} -транспортувальних систем мембранних структур гладеньком'язових клітин // Монографія. – Київ: – Наукова Думка, 2016. – 210 с.

2. Векліч Т.О., Мазур Ю.Ю., Костерін С.О. Mg^{2+} , АТР-залежна кальцієва помпа плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин. II. Регуляція активності // Укр. біохім. журн. – 2015. – 87, № 2. – С. 5-25.

3. Mazur Yu.Yu., Veklich T.O., Shkrabak O.A., Mohart M.A., Demchenko A.M., Gerashchenko I.V., Rodik R.V., Boyko V.I., Kalchenko V.I., Kosterin S.O. Selective inhibition of smooth muscle plasma membrane transport Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase by calix[4]arene C-90 and its activation by IFT-35 compound // General Physiology and Biophysics. – 2018. – 37. – P.223-231.

4. Кондратюк Т.П., Быченко С.Ф., Прищепя Л.А., Бабич Л.Г., Курский М.Д., Осипенко А.А. Выделение и характеристика фракции плазматических мембран миомерия свинки // Укр. биохим. журн. – 1986. – 58, № 4. – С. 50-56.

5. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – 72, N 1. – P.248-282.

6. Rathbun W., Betlach V. Estimation of enzymically produced orthophosphate in the presence of cysteine and adenosine triphosphate // Anal. Biochem. – 1969. – 28, N1-3. – P. 436-445.

ВПЛИВ ТІАКАЛІКС[4]АРЕНУ C-1087 НА Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРАЗУ ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ ТА СКОРОТЛИВУ АКТИВНІСТЬ МІОМЕТРИЯ

Векліч Т.О., Цимбалюк О.В.

Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, Україна

veklich@biochem.kiev.ua

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 іонів Ca в клітину, який відбувається в спокої [1, 2]. 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.

Результати наших попередніх досліджень щодо вивчення впливу каліксаренів на енергозалежний транспорт іонів Ca через ПМ клітин ГМ свідчать про те, що деякі з цих сполук можуть виступати в ролі інгібіторів зазначеного процесу [3]. Як відомо, каліксарени - низькомолекулярні малотоксичні макроциклічні сполуки, які здатні утворювати комплекси «господар-гість» із іонами металів і органічними речовинами, та є циклоолігомерами пара-заміщених фенолів та формальдегіду [4]. Унікальна будова та властивості молекул каліксаренів дають змогу модифікувати їх структуру (із залученням різних функціональних груп на верхньому й нижньому вінцях молекули), а отже, пошук нових каліксаренових ефекторів ензимів, зокрема Ca^{2+} -транспортувальних, тільки розпочато. Слід зазначити, що каліксаренам притаманні низькі токсичність [5] та імуногенність [3, 6], а також доступний синтез і його низька вартість.