

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.

Тому **метою** даної роботи було дослідити закономірності інгібіторного впливу тіакалікс[4]арену С-1087 на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазну активність ПМ ГМК матки.

Тіакалікс[4]арен С-1087(5,11,17,23-тетра(трифтор)метил(феніл-сульфоніліміно) метиламіно-25,27-дигексилокси-26,28-дигідрокситіакалікс[4]арен) (рис. 1) був синтезований та охарактеризований із використанням методів ЯМР та інфрачервоної спектроскопії. Сполука була синтезована академіком НАНУ В.І. Кальченком та його колегами (Інститут органічної хімії НАНУ).

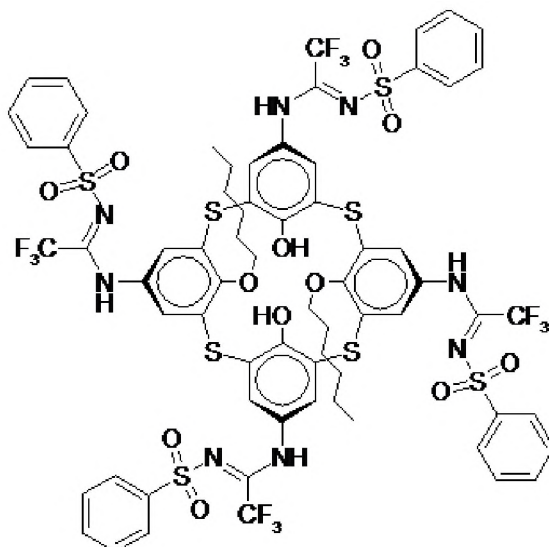


Рис. 1 Структурна формула тіакалікс[4]арену С-1087

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 міомерія, обробленій 0,1 % розчином дигітоніну.

Фракцію ПМ виділяли з міомерія свині, як було описано раніше [7]. Вміст білка в мембранній фракції визначали методом М. Bredford [8]. 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 та псигаргін 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. Rathbunet V. Betlach [9]. Встановлено, що для сарколеми міомерія свині питома ензиматична активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ складає $3,4 \pm 0,3$ мкмоль P_i /мг протеїну за 1 год відповідно ($M \pm m$; $n = 7$).

При вивченні концентраційної залежності дії тіакалікс[4]арену на ензиматичну активність, значення коефіцієнтів інгібування $I_{0,5}$ та коефіцієнтів Хілла n_H розраховували із використанням лінеаризованих графіків Хілла відповідно до рівняння

$$\lg[(A_{max}-A)/A] = -n_H \lg I_{0,5} + n_H \lg [C-1087],$$

де A_{max} та A – питомі ензиматичні активності у відсутності (“нульова точка”) та у присутності в середовищі інкубації тіакалікс[4]арену в концентрації $[C-1087]$.

У попередніх дослідженнях ми показали, що синтетична сполука калікс[4]арен С-90 (5,11,17,23-тетра(трифтор)метил(фенілсульфоніліміно)-метиламіно-25,26,27,28-тетрапропокси-калікс[4]арен) в концентрації 100 мкМ ефективно (на 75 % відносно контролю) інгібує активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ міоцитів матки (рис. 2). Поряд з цим, виявилось, що цей калікс[4]арен також пригнічує ензиматичну активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази СР (на 58 % відносно контролю) (рис. 2).

Тому в подальших експериментах, ми дослідили дію цілого ряду калікс[4]аренів, структурних аналогів калікс[4]арену С-90, на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазну активність ПМ [10], і з'ясували, що ще більшу інгібіторну ефективність має тіакалікс[4]арен С-1087. Ми встановили, що тіакалікс[4]арен С-1087 (5,11,17,23-тетра(трифтор)метил(фенілсульфоніліміно)метиламіно-25,27-дигексилокси-26,28-дигідрокситіакалікс[4]арен) в концентрації 100 мкМ ефективно пригнічує Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазну активність ПМ клітин міомерія до рівня $14,9 \pm 0,5$ % відносно контрольного значення (прийнятого за 100 %) ($M \pm m$; $n = 5$) (рис. 2). Він значно менш ефективно пригнічує ензиматичну активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазиСР (на 34 % відносно контролю) (рис. 2).

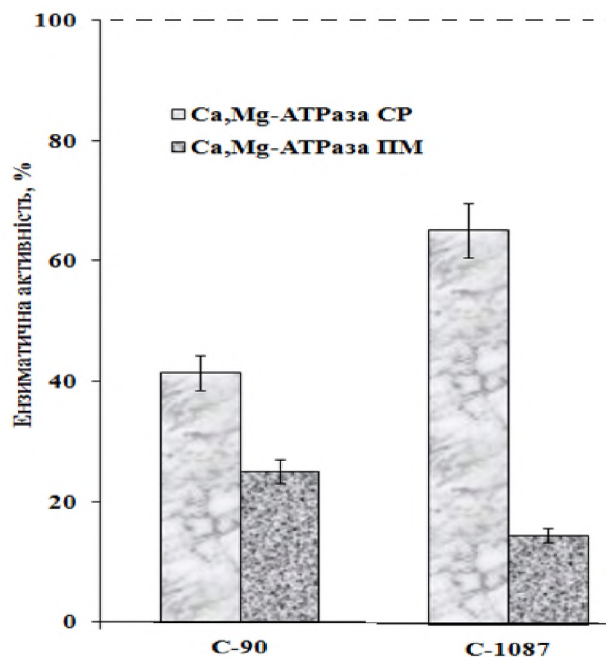


Рис. 2 Результати вивчення порівняльного впливу калікс[4]арену С-90 та тіакалікс[4]арену С-1087 (100 мкМ) на активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази саркоплазматичного ретикулуму та плазматичної мембрани міоцитів міомерія ($M \pm m$, $n = 5$)

За 100 % прийнято значення питомої ензиматичної активності у відсутності калікс[4]аренів у середовищі інкубації.

Були розраховані коефіцієнти інгібування $I_{0,5}$, що становлять $20,2 \pm 0,5$ мкМ та $9,4 \pm 0,6$ мкМ для калікс[4]арену С-90 та тіакалікс[4]арену С-1087 відповідно ($M \pm m$; $n = 5$). В подальших наших дослідженнях ми намагалися з'ясувати селективність дії тіакалікс[4]арену С-1087 на АТР-гідролазні активності ПМ міоцитів. Як уже було вказано вище, тіакалікс[4]арен С-1087 в концентрації 100 мкМ ефективно пригнічує Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазну активність ПМ клітин міомерія до рівня $14,9 \pm 0,5$ % відносно контрольного значення (прийнятого за 100 %) ($M \pm m$; $n = 5$) (рис. 2, 3).

За 100 % прийнято значення питомих ензиматичних активностей у відсутності тіакалікс[4]арену С-1087 у середовищі інкубації.

У той же час ця сполука, що була використана у такій ж самій концентрації, практично не впливала на ензиматичні активності Na^+ , K^+ -АТРази, “базальної” Mg^{2+} -АТРази Ca^{2+} -АТРази ПМ: відповідні активності становили $90,1 \pm 0,7$; $95,3 \pm 1,0$ і $89,1 \pm 0,8$ % щодо контрольного значення ($M \pm m$; $n = 5$) (рис. 3).

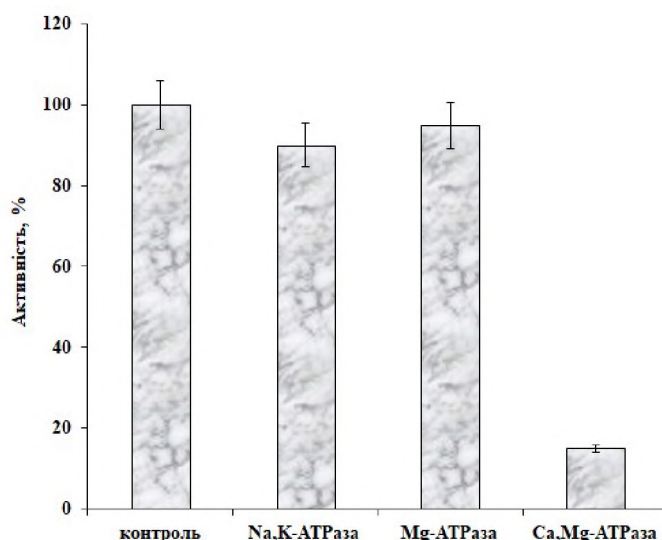


Рис. 3 Результати вивчення порівняльного впливу тіакалікс[4]арену С-1087 (100 мкМ) на АТР-гідролазні активності в плазматичних мембранах клітин міометрія ($M \pm m$, $n = 5$)

Таким чином, тіакалікс[4]арен С-1087, використаний у концентрації 100 мкМ, ефективно інгібував активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази у фракції ПМ міоцитів матки. При цьому він майже не впливав на активність інших АТР-гідролаз ПМ. Отже, тіакалікс[4]арен С-1087 селективно (на рівні ПМ) пригнічує активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ, не впливаючи на активності Na^+ , K^+ -АТРази, Mg^{2+} -АТРази і Ca^{2+} -АТРази ПМ.

За допомогою конфокальної мікроскопії з використанням Ca^{2+} -чутливого флуоресцентного зонду fluo-4 показано, що аплікація тіакалікс[4]арену С-1087 до іммобілізованих міоцитів матки зумовлює зростання рівня внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca.

Тензометричними дослідженнями з наступним механокінетичним аналізом продемонстровано, що тіакалікс[4]арен С-1087 (10 мкМ) спричиняє суттєве зниження максимальних швидкостей розслаблення спонтанних та активованих гіперкалієвим розчином (80 мМ) скоротливих відповідей мультиклітинних гладеньком'язових препаратів матки щурів (дані не наведені). Результати комплексних біохімічних і механокінетичних досліджень вказують на те, що тіакалікс[4]арен С-1087 із високою спорідненістю (величина коефіцієнта інгібування $I_{0,5}$ складає $9,4 \pm 0,6$ мкМ) й вибірково (порівняно з іншими системами активного іонного транспорту) блокує Ca^{2+} -помпу плазматичної мембрани, таким чином гальмуючи екструзію іонів Ca^{2+} з цитозолу міоцитів та уповільнюючи процес розслаблення.

Отже, дані цієї роботи можуть слугувати підґрунтям для використання тіакалікс[4]арену С-1087 в якості селективного та ефективного інгібітора Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ, що, в свою чергу, матиме важливе значення для подальшого з'ясування мембранних механізмів контролю Ca^{2+} -обміну у ГМ, зокрема, під час вивчення ролі ПМ в забезпеченні електромеханічного спряження в них. Результати, що були одержані, можуть також бути корисними для подальших досліджень, спрямованих на встановлення кореляції між структурою калікс[4]аренів та їх дією на різні катіон-транспортуючі ензиматичні системи, що є основою покращення селективності та ефективності їх потенційних нових інгібіторів на основі каліксаренів. Крім того, такі дані можуть бути основою для створення на потенційних фармакологічних засобів, здатних модулювати скоротливу функцію матки при патологіях скоротливої активності ГМ.

Автори вдячні академіку НАНУ проф. С.О. Костеріну та академіку НАНУ проф. В.І. Кальченко 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. Kosterin S.O., Kalchenko V.I., Veklich T.O., Babich L.G., Shlykov S.G. Calixarenes as modulators of ATP-hydrilizing systems of smoot hmscles. K.: Science opinion, 2019. 256p.
4. Atamas L.I., Boyko V.I., Drapaylo A.B., Yesypenko A.A., Kalchenko O.I., Klyachina M.A., Matveev Yu.I., Miroshnichenko S.I., Rodik R.V., Chrenok S.A., Kalchenko V.I. Supramolecular chemistry of calixarenes //Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry.– 2009. – 7, N 2(26). – P. 28-36.
5. Coleman A.W., Jebors S., Cecillon S., Perret P., Garin D., Marti-Battle D., Moulin M. Toxicity and biodistribution of para-sulfonato-calix[4]arene in mice // New J. Chem. –2008. – 32. – P.780-782.
6. Rodik R.V., Boyko V.I., Kalchenko V.I. Calixarenes in Biotechnology and Bio-Medical Researches //Front. Med. Chem.–2016. – 8. – P. 206-301.
7. Кондратюк Т.П., Быченко С.Ф., Прищеп Л.А., Бабіч 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.
8. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the prinsiple of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – 72, N 1. – P.248-282.
9. Rathbun W., Betlach V. Estimation of enzymically produced orthophosphate in the presence of cystein and adenosine triphosphate // Anal. Biochem. – 1969. – 28, N1-3. – P. 436-445.
10. Veklich T.O., Shkrabak A.A., Slinchenko N.N., Mazur I.I., Rodik R.V., Boyko V.I., Kalchenko V.I., Kosterin S.O. Calix[4]arene C-90 selectivelyinhibits Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase of myometrium cell plasma membrane // Biochemistry (M). –2014. – 79, N5. –P. 417-424.

ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ТЕРМОЧУТЛИВИХ ФІЗИЧНО-ЗШИТИХ ГІДРОГЕЛІВ ДЛЯ ЗАПОВНЕННЯ ПІСЛЯОПЕРАЦІЙНИХ ПОРОЖНИН

*Керносенко Л.О.¹, Пасмурцева Н.О.¹, Полторацька Т.П.¹, Воротицький П.В.¹,
Сірик О.О.^{1,2}, Самченко Ю.М.¹*

¹Інститут біоколоїдної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України, Київ, Україна

kernosenko@ukr.net

²Інститут агрофізики ПАН, Люблін, Польща

Увага дослідників в останні роки зосереджена на "розумних" гідрогелевих системах транспорту ліків, які здатні реагувати на незначні зміни в навколишньому середовищі різкою зміною набухання та, як наслідок, дифузії. Вони є чудовими матрицями для доставки ліків [1, 2], вирощування та культивування клітин [3], очищення води тощо. Найбільша увага приділяється термо- та рН-чутливим гідрогелям, які здатні до контрольованого вивільнення ліків, наприклад, протипухлинних препаратів, під впливом невеликих, фізіологічно прийнятних змін температури або рН [1,2]. Фізичне зшивання з використанням синтетичного глинистого матеріалу лапоніту [4] дозволяє значно покращити порівняно з традиційними хімічно зшитими гідрогелями їх оптичні та механічні властивості, а також швидкість притаманного їм фазового переходу. Дане дослідження присвячене синтезу термочутливихгідрогелевих матриць на основі N-ізопропілакриламід (НІПА) і лапоніту (LAP), створенню на їх основі матеріалів для заповнення