

PACS numbers: 81.16.Fg, 82.39.-k, 87.14.Cc, 87.16.D-, 87.19.Ff, 87.64.km, 87.64.kv

## Калікс[4]арени C-107 і C-90 вбудовуються у ліпідний бішар плазматичних мембран і змінюють їхню структуру

Т. О. Векліч<sup>1</sup>, О. А. Шкрабак<sup>1</sup>, Р. В. Родік<sup>2</sup>, В. І. Кальченко<sup>2</sup>,  
С. О. Костерін<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Інститут органічної хімії НАН України,  
вул. Мурманська, 5,  
02660 Київ, Україна

На фракції плазматичних мембран гладеньком'язових клітин було показано, що калікс[4]арени C-107 і C-90, які селективно інгібують, відповідно,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРази та  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани, гасять флюоресценцію мембранного зонду АНС, що відбувається за рахунок пониження максимальної флюоресценції зонду (в 1,5 рази) без істотних змін спорідненості мембран до зонду, тобто без конкурування каліксаренів із АНС за зв'язування з мембраною. Одержані результати вказують на вбудовування калікс[4]аренів C-107 і C-90 у плазматичні мембрани та зміни їхнього рідиннокристалічного стану та/або поверхневого заряду і можливість взаємодії каліксаренів з трансмембранними доменами  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРази та  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРази, а інгібування їх може бути опосередковане через ліпідне оточення.

Using plasmatic membrane fractions of smooth-muscle cells, it is shown that calix[4]arenes C-107 and C-90, which selectively inhibit  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase and  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase, respectively, quench the fluorescence of the membrane probe ANS that is caused by decreasing of the maximum fluorescence of the probe (by 1.5 times) without significant changes in the affinity of the membranes to the probe, i.e., without the competition of calixarenes with the ANS for binding to the membrane. The obtained results indicate the incorporation of calix[4]arenes C-107 and C-90 into plasmatic membranes and changes of their liquid-crystalline state and/or surface charge that means the possibility of calixarene interaction with the transmembrane domains of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase and  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase, and their inhibition by respective calixarenes can be mediated through the lipid environment.

**Ключові слова:**  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРаза,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРаза, плазматична мембра-

на, міометрій, калікс[4]арени.

**Key words:**  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРаза,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРаза, plasmatic membrane, myometrium, calix[4]arene.

(Отримано 3 грудня 2019 р.)

## 1. ВСТУП

У попередніх досліджах ми показали, що калікс[4]арен С-90 ефективно пригнічує  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРаза активність ( $I_{0,5} = 21$  мкМ) і практично не впливає на ензиматичні активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРази і «базальної»  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани (ПМ) міоцитів матки. Проте механізм його дії є нез'ясованим. Так само за невідомим механізмом відбувається інгібування  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРаза активності плазматичної мембрани калікс[4]ареном С-107. При цьому його вплив є високоефективним ( $I_{0,5} = 54$  нМ) і селективним відносно інших АТРаза плазматичної мембрани. Оскільки як  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРаза, так і  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРаза є інтегральними білками плазматичної мембрани, не виключено, що калікс[4]арени здатні впливати на вказані ензими опосередковано через ліпідне оточення.

Метою цієї роботи було дослідити мембранотропний вплив калікс[4]аренів С-90 та С-107.

## 2. ЕЛЕМЕНТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ МЕТОДИКИ

Калікс[4]арени С-90 (5,11,17,23-тетра(трифтор)метил(фенілсульфоніліміно)-метиламіно-25,26,27,28-тетрапропокси-калікс[4]арен) та С-107 (5,17-ди(фосфоно-2-піридилметил)аміно-11,23-ди-трет-бутил-26,28-дигідрокси-25,27-дипропокси-калікс[4]арен) (рис. 1) були синтезовані й охарактеризовані із використанням метод ЯМР та інфрачервоної спектроскопії у відділі хімії фосфоранів Інституту органічної хімії НАН України (зав. відділу — академік НАН України В. І. Кальченко). Методику синтезу зазначених калікс[4]аренів було описано раніше [1].

Біохімічні 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 фракції ПМ, обробленій 0,1% розчином дигітоніну. Фракцію плазматичних мембран гладеньком'язових клітин виділяли з міометрія свині, як було описано раніше [2]. Вміст білка в мембранній фракції визначали методом М. Bredford [3].

Інтенсивність флюоресценції зонду АНС визначали на спектрофлюориметрі Quanta Master 40 РТІ (Канада) за 37°C у середовищі (об'єм —

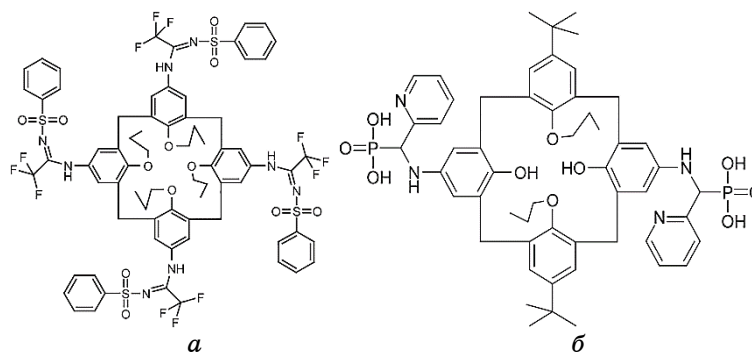


Рис. 1. Структурні формули досліджуваних речовин.<sup>1</sup>

2 мл), яке містило (мМ): 1 АТФ, 3 MgCl<sub>2</sub>, 25 NaCl, 125 KCl, 1 ЕГТА, 20 Нерес-tris-буфер (рН 7,4), 1 NaN<sub>3</sub>. Кількість білку мембранної фракції в пробі — 75–150 мкг.

Спочатку були визначені довжини хвиль максимумів у спектрах збудження та флюоресценції АНС. Максимум флюоресценції АНС у водному середовищі становить 520 нм, а максимум збудження — 380 нм (дані не наведено). Внесення у середовище мембранної фракції істотно збільшувало квантовий вихід флюоресценції зонду та відбувався зсув максимумів флюоресценції і збудження до 485 нм і 394 нм відповідно. Оскільки нас цікавить флюоресцентна відповідь зонду, зв'язаного з мембраною, ми використовували для подальшої аналізи значення інтенсивності флюоресценції саме за цих довжин хвиль.

Статистичну аналізу одержаних даних проводили із залученням загальновідомих стандартних метод. Кінетичні та статистичні розрахунки здійснювали в режимі програмного забезпечення MS Excel.

### 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для дослідження мембранотропного впливу калікс[4]аренів С-90 та С-107 ми використали флюоресцентний зонд 1,8-АНС. Його флюоресценція істотно збільшується при взаємодії з мембранами та залежить від полярності мембранного мікрооточення та поверхневого заряду мембран.

Рідиннокристалічний стан мембран, як і склад ангулярних ліпідів мембранних білків, може істотно впливати на їхнє функціонування, що відомо саме для Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТРази. Тому спочатку було досліджено мембранотропний вплив калікс[4]арена С-107, який є вискоєфективним і селективним інгібітором Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТРазної активності.

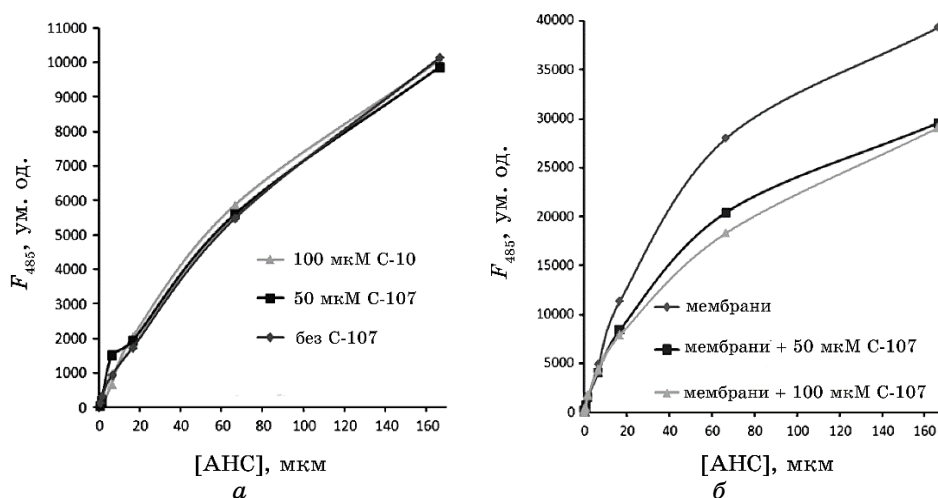
Використання флюоресцентних зондів для вивчення мембранотропного впливу каліксаренів є непрямою метою дослідження, і тому не можна виключати безпосереднього впливу каліксаренів на

флюоресценцію зонду. Для перевірки цього припущення нами було досліджено вплив калікс[4]арену С-107 на флюоресценцію зонду за відсутності мембран. Як видно з рис. 2, а флюоресценція зонду за відсутності та присутності каліксарену С-107 у концентраціях 50 і 100 мкМ майже однакова у широкому діапазоні концентрацій АНС. Тобто каліксарен С-107 безпосередньо не впливає на флюоресценцію АНС за використаних умов, і тому даний зонд може бути використаний для дослідження мембранотропного впливу каліксарену С-107.

Для того щоб охарактеризувати взаємодію АНС з мембранами та вплив каліксаренів на цю взаємодію, ми визначали спектри флюоресценції за різних концентрацій АНС і розраховували характеристичні параметри, а саме, уявну константу дисоціації  $K_d$ , що демонструє спорідненість зонду до мембран, та максимальну флюоресценцію  $F_{\max}$ , що вказує на максимальну кількість сайтів зв'язування АНС на поверхні мембрани.

Як видно з рис. 2, б, за присутності калікс[4]арену С-107 відбувається гасіння флюоресценції зонду АНС за різних його концентрацій. При цьому використання двох концентрацій 50 і 100 мкМ калікс[4]арену С-107 зумовлювало майже однаковий ефект.

Розраховані значення уявної константи дисоціації  $K_d$  вказують на неістотні зміни спорідненості мембран до АНС. Натомість максимальний рівень флюоресценції зонду знижується за присутності калікс[4]арену С-107 у 1,5 разів. Зазначені зміни вказують на пониження кількості центрів взаємодії з зондом на поверхні мембрани,



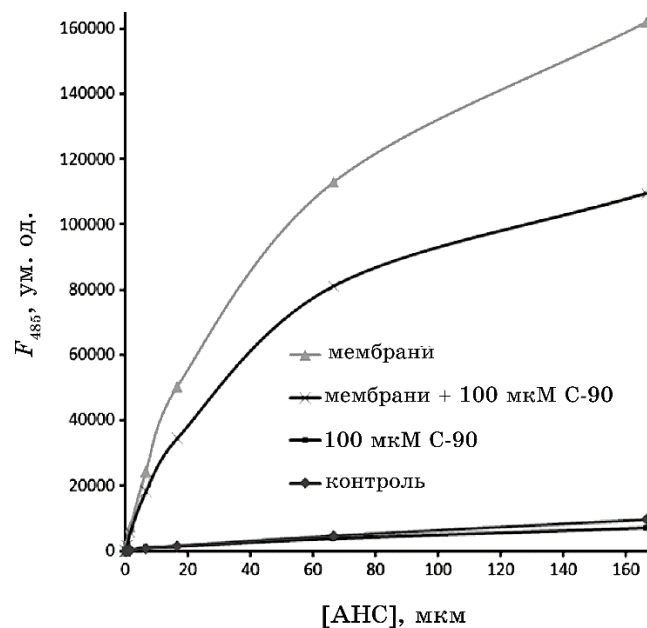
**Рис. 2.** Вплив каліксарену С-107 на залежність флюоресценції зонду АНС від його концентрації за присутності (а) та відсутності (б) мембранної фракції (типовий експеримент).<sup>2</sup>

що може бути зумовлено перебудовою мембранної структури таким чином, що відбувається закривання певної кількості сайтів взаємодії з АНС без зміни спорідненості решти сайтів до зонду. Можна припустити зміни полярності та/або поверхневого заряду під дією калікс[4]арену С-107.

Аналогічним чином були проведені дослідження мембранотропних властивостей калікс[4]арену С-90. Оскільки вплив каліксарену С-107 у різних концентраціях на флюоресценцію був майже однаковим, у випадку калікс[4]арену С-90 ми вирішили використати у дослідженнях його лише одну максимальну концентрацію 100 мкМ. На відміну від калікс[4]арену С-107, калікс[4]арен С-90 здатний безпосередньо впливати на флюоресценцію АНС за відсутності мембранної фракції (рис. 3).

Проте даний вплив є неістотним порівняно з флюоресценцією зонду, зв'язаного з мембранами, і тому ми можемо нехтувати ним. Крім того, для підсилення різниці у флюоресценції зв'язаного та вільного зондів було збільшено у два рази кількість мембранної фракції у досліджуваних зразках. Вірогідно, що ця обставина привела також до зміни величин характеристичних параметрів взаємодії зонду з мембранами (дані не наведено). Проте, у будь-якому випадку порівняння їх ми проводили лише за аналогічних умов.

Як видно з рис. 3, вплив калікс[4]арену С-90 є подібним до впли-



**Рис. 3.** Вплив каліксарену С-90 на залежність флюоресценції зонду АНС від його концентрації (типовий експеримент).<sup>3</sup>

ву калікс[4]арену С-107 (рис. 2). При цьому зміни уявної константи дисоціації  $K_d$  відсутні, а максимальна флюоресценція зонду знижується також у 1,5 рази під впливом калікс[4]арену С-90. Тому для пояснення такого ефекту також можна вказати аналогічні припущення стосовно змін мембранного мікрооточення після взаємодії з калікс[4]ареном С-90.

Одержані результати вказують на можливі зміни як рідинно-кристалічного стану мембран, так і їхнього поверхневого заряду під впливом високих концентрацій калікс[4]аренів С-107 і С-90, що, в свою чергу, може опосередковано впливати на  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРазу та  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРаду відповідно. Проте наведені дані також вказують на зв'язування з мембранами обох калікс[4]аренів, адже вказані зміни можуть відбуватися лише внаслідок змін складу мембран, оскільки решта параметрів, здатних викликати подібні ефекти (рН, температура тощо), є сталими для всіх дослідів. Тобто калікс[4]арени С-107 і С-90 вбудовуються в мембрани і таким чином викликають описані зміни. Можливо, що саме така зв'язана з мембраною форма калікс[4]аренів інгібує відповідні ензими. Саме таким чином калікс[4]арени С-107 і С-90 можуть взаємодіяти не лише з позамембранними доменами інтегральних білків, а й з їхніми трансмембранними ділянками. Оскільки як  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРаза, так  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРаза є інтегральними білками, у випадку інгібування їх, відповідно, калікс[4]аренами С-107 і С-90, вказаний механізм їхньої взаємодії може також реалізовуватися та бути основою інгібіторного ефекту відповідних калікс[4]аренів.

Таким чином, результати цієї роботи можуть бути корисними для розробки на основі каліксаренів С-107 і С-90 ефективних інгібіторів  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРази та  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРази відповідно. Вказані інгібітори матимуть важливе значення для з'ясування мембранних механізмів катіонного обміну у гладеньких м'язах, зокрема під час вивчення ролі ПМ у забезпеченні електромеханічного спряження в них, а також в регуляції йонного гомеостазу в гладеньком'язових клітинах. Крім того, каліксарени С-107 і С-90 є перспективними для створення фармакологічних препаратів на їхній основі, здатних модулювати активність зазначених ензимів і відповідних фізіологічних функцій за патологічних станів.

#### 4. ВИСНОВКИ

Калікс[4]арени С-107 і С-90 знижують флюоресценцію зонду АНС у плазматичних мембранах гладеньком'язових клітин.

Пониження флюоресценції зонду АНС під впливом каліксаренів відбувається за рахунок пониження максимальної флюоресценції зонду без істотних змін спорідненості мембран до зонду, тобто без конкурування каліксаренів з АНС за зв'язування з мембраною.

Калікс[4]арени С-107 та С-90 вбудовуються у плазматичні мембрани та змінюють їхню супрамолекулярну структуру.

## ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА—REFERENCES

1. R. V. Rodik, V. I. Boyko, O. B. Danylyuk, K. Suwinska, I. Tsymbal, N. Slinchenko, and V. Kalchenko, *Tetrahedron Letters*, **46**, No. 43: 7459 (2005); <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2005.07.069>.
2. T. O. Veklich and S. O. Kosterin, *The Ukrainian Biochemical Journal*, **77**, No. 2: 66 (2005) (in Ukrainian); Т. О. Векліч, С. О. Костерін, *Укр. біохім. журн.*, **77**, № 2: 66 (2005).
3. M. M. Bradford, *Anal. Biochem.*, **72**, No. 1: 248 (1976).

---

<sup>1</sup>*O. V. Palladin Institute of Biochemistry, N.A.S. of Ukraine,  
9, Leontovych Str.,  
UA-01030 Kyiv, Ukraine*

<sup>2</sup>*Institute of Organic Chemistry, N.A.S. of Ukraine,  
5, Murmans'ka Str.,  
UA-02660 Kyiv, Ukraine*

<sup>1</sup> Fig. 1. Structure formulas of investigated compounds.

<sup>2</sup> Fig. 2. The effect of calix[4]arene C-107 on fluorescence dependence on the ANS probe concentration in presence (a) and absence (b) of membrane fraction (representative result).

<sup>3</sup> Fig. 3. The effect of calix[4]arene C-90 on fluorescence dependence on the ANS probe concentration (representative result).