



УДК 577.127.2

## ВЛИЯНИЕ АНАЛОГОВ МИНЕРАЛОКОРТИКОИДОВ НА Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ЗАВИСИМУЮ АТФ-АЗУ

© 2002 г. А. В. Камерницкий<sup>#</sup>, Е. А. Смоленский, Г. М. Makeев, И. В. Весела,  
Н. М. Мирсалихова, А. М. Турута, Н. С. Зефирова

*Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН,  
117913, Москва, ГСП-1, Ленинский просп., 47*

Поступила в редакцию 13.09.2001 г. Принята к печати 07.12.2001 г.

Изучено влияние 42 стероидных соединений ряда 20-кетопрегнана, конденсированных в 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -положениях с гетероциклами, на активность Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-зависимой АТФ-азы из почки свиньи. Показано, что изученные соединения можно разделить на две группы. Вещества первой группы стимулируют АТФ-азу при низких концентрациях (10<sup>-8</sup>–10<sup>-7</sup> М) и ингибируют ее при высоких концентрациях (10<sup>-4</sup> М), тогда как вторая группа веществ стимулирует натриевый насос при любых концентрациях. Этот факт объяснен кооперативным характером действия тетрамера АТФ-азы: после связывания с лигандом первого центра тетрамера его конформация изменяется, и остальные центры связывания изменяют свою специфичность. Проведено компьютерное исследование представленного набора соединений и получена математическая модель зависимости их активности от строения заместителей с высоким коэффициентом корреляции и с удовлетворительной прогностической способностью. Этим подтверждено структурное родство изученных соединений в отношении их взаимодействия со связывающими центрами АТФ-азы. Метод дескрипторного анализа, примененный в работе, – это новый, ранее не использовавшийся вариант аппроксимации; он основан на использовании в качестве дескрипторов символьных переменных.

*Ключевые слова: аналоги минералокортикоидов, Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-зависимая АТФ-аза, регуляция, количественная зависимость структура–активность (QSAR), дескрипторный анализ.*

### ВВЕДЕНИЕ

Известно, что природные минералокортикоиды и их аналоги неоднозначно влияют на работу Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-зависимой АТФ-азы [1]. Так, если дезоксикортикостерон и некоторые его производные, начиная с концентраций 10<sup>-7</sup>–10<sup>-6</sup> М, вызывают ингибирование натриевого насоса, которое усиливается дозозависимо, то альдостерон при всех изученных концентрациях (10<sup>-7</sup>–10<sup>-4</sup>) вызывает только ее стимуляцию, которая при повышении концентрации вначале растет, а затем выходит на плато и перестает зависеть от концентрации лиганда. Исследование наборов синтетических полиоксистероидов показало [2–5], что многие из них стимулируют Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-зависимую АТФ-азу при низких концентрациях (10<sup>-7</sup>–10<sup>-6</sup> М) и начинают ее ингибировать при повышении концентрации. Более того, оказалось, что некоторые из изученных соединений, так же как и природный альдостерон, даже при высоких концентрациях продолжают стимулировать натриевый насос клетки. При этом наличие или отсутствие такого обращенного эффекта четче прослеживается на соединениях, влияние которых на активность АТФ-

азы относительно слабо. Возможно, что такой переход от стимуляции к ингибированию может происходить и в случае высокоактивных ингибиторов, но уже при очень низких (10<sup>-9</sup>–10<sup>-8</sup> М) концентрациях лиганда, которые недоступны для изучения.

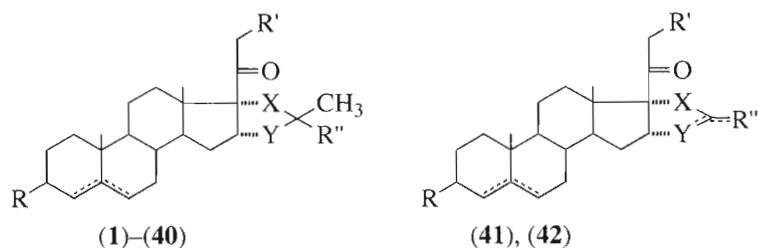
### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мы предприняли исследование влияния на функционирование Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-зависимой АТФ-азы набора аналогов минералокортикоидов, которые обладают низкой активностью в данном тесте. Эти соединения были синтезированы нами ранее [6]; они несут в 16,17-положениях гетероцикл и обладают 20-карбонильной группой. Ожидалось, что низкое сродство этих лигандов к связывающему центру (или центрам) АТФ-азы сдвинет переход от стимуляции к ингибированию в область более высоких концентраций лиганда и позволит проследить сущность этого явления.

Полученные результаты представлены в табл. 1. Приведенные данные, по-видимому, подтверждают предположение о том, что начальное взаимодействие стероидного лиганда (с 10<sup>-7</sup>–10<sup>-6</sup> М) с интактной АТФ-азой вызывает в зависимости от сродства лиганда стимуляцию натриевого насоса (соединения (2)–(5), (7)–(10), (16), (20)–(23), (24),

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (095) 137-73-31; факс: (095) 135-53-28; эл. почта: li@ioc.ac.ru).

**Таблица 1.** Влияние стероидов, конденсированных по 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -положению на активность Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-зависимой АТФ-азы из почки свиньи в зависимости от их концентрации



Соединение	R	Положение $\Delta$ -связи	R'	R''	X	Y	Концентрация стероида, M			
							$1 \times 10^{-7}$	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-4}$
(1)	OH	5	H	CH <sub>3</sub>	O	O	-0.5	-3.4	-15.3	-18.7
(2)	O	4	H	CH <sub>3</sub>	O	O	+1.3	+2.2	-2.7	-3.4
(3)	O	1.4	H	CH <sub>3</sub>	O	O	+0.8	0	-1.4	-3.6
(4)	OH	5	OAc	CH <sub>3</sub>	O	O	+4.2	+4.2	-1.0	-1.4
(5)	OAc	5	OAc	CH <sub>3</sub>	O	O	+4.2	0	-7.1	-31.4
(6)	O	4	OAc	CH <sub>3</sub>	O	O	+1.4	+2.2	+2.9	+5.1
(7)	O	4	OH	CH <sub>3</sub>	O	O	+1.2	+0.9	-5.7	-8.5
(8)	OH	5	H	CH <sub>3</sub>	S	O	+2.1	-13.5	-25.2	-57.3
(9)	O	4	H	CH <sub>3</sub>	S	O	+4.2	-1.4	-9.8	-43.7
(10)	O	1.4	H	CH <sub>3</sub>	S	O	+0.4	+2.8	+1.4	-15.5
(11)	O	4	OH	CH <sub>3</sub>	S	O	-5.1	-9.2	-20.4	-34.5
(12)	OH	5	H	CH <sub>3</sub>	O	NH <sub>2</sub> Cl	+5.5	+3.1	+1.6	+1.6
(13)	OH	5	H	CH <sub>3</sub>	O	NHO'	-1.2	-3.7	-5.8	-9.5
(14)	OH	5	H	CH <sub>3</sub>	O	NAc	-4.2	-7.3	-9.6	-0.2
(15)	OAc	5	H	CH <sub>3</sub>	O	NAc		-9.8	-17.8	-9.2
(16)	OH	5	H	CH <sub>3</sub>	NH	O	+4.1	+1.0	-13.1	-29.3
(17)	OAc	5	H	CH <sub>3</sub>	NH	O	+6.0	+2.2	+2.9	+3.6
(18)	O	4	H	CH <sub>3</sub>	NH	O	+7.2	+7.2	+1.5	+1.4
(19)	O	4	H	CH <sub>3</sub>	N → O	O	-11.4	-12.2	-15.3	-16.4
(20)	OH	5	OAc	CH <sub>3</sub>	NH	O	+1.6	-5.7	-10.7	-32.8
(21)	OAc	5	OAc	CH <sub>3</sub>	NH	O	+12.0	+11.2	+2.4	-24.6
(22)	O	4	OAc	CH <sub>3</sub>	NH	O	+2.9	+2.9	+2.9	-7.2
(23)	OH	5	H	CH <sub>3</sub>	NH	NH <sub>2</sub> Cl	+16.1	+9.8	+0.7	-14.0
(24)	OAc	5	H	CH <sub>3</sub>	NH	NAc	-9.7	-11.8	-19.4	-22.3
(25)	OH	5	H	C=N	O	N	+3.0	+1.0	-7.8	-7.8
(26)	O	4	H	C=N	O	N	-15.2	-16.9	-16.9	-19.7
(27)	OH	5	OH	C=N	O	N	+4.0	+9.4	-1.3	-1.7
(28)	O	4	OH	C=N	O	N	-1.6	-4.1	-5.8	-7.4
(29)	OH	5	OAc	C=N	O	N	+10.1	+14.8	+16.2	+16.8
(30)	OAc	5	OAc	C=N	O	N	+10.1	-1.3	-6.7	-5.2
(31)	O	4	OAc	C=N	O	N	+6.6	+7.9	+13.0	-8.2
(32)	OH	5	H	N=C	N	O	+1.3	+8.1	+9.4	+14.8
(33)	O	4	H	N=C	N	O	+14.7	+10.1	+9.8	+0.3
(34)	OH	5	OH	N=C	N	O	+20.5	+21.5	+12.1	+10.7
(35)	O	4	OH	N=C	N	O	+1.9	+3.5	+3.0	+3.1
(36)	OH	5	OAc	N=C	N	O	+4.9	+4.2	+3.3	+5.7
(37)	OAc	5	OAc	N=C	N	O	+8.0	+7.0	+4.2	-1.9
(38)	O	4	OAc	N=C	N	O	+4.1	+1.6	+0.8	+0.8
(39)	OH	5	H	C=N	S	N	+7.3	+2.1	-5.2	-10.5
(40)	O	4	H	C=N	S	N	-9.4	-12.5	-11.4	-25.0
(41)	OH	5	H	H <sub>2</sub> N	S	N	+6.9	+5.6	-5.4	-7.7
(42)	OAc	5	H	NAc	S	NAc	+0.6	+3.2	+7.9	-15.9

Степень изменения активности в процентах (+ стимуляция, - ингибирование).

(27), (30)–(31), (37), (39), (41)–(42)), которая при повышении концентрации либо переходит в его ингибирование, либо только снижается до определенного уровня, не переходя в ингибирование фермента (соединения (6), (12), (17)–(18), (29), (32)–(36), (38)). Относительно соединений (1), (11), (13), (19), (24), (26), (28) и (40) можно предположить, что они также могут проявлять начальное стимулирующее действие, но их стимулирующие концентрации ниже тех, которые нами изучены. Таким образом, подтверждается наличие среди стероидных производных, способных взаимодействовать с  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -зависимой АТР-азой, двух типов соединений: одни способны переходить от стимуляции АТР-азы к ее ингибированию, а другие неспособны к такому переходу даже при высоких концентрациях. Этот факт позволяет высказать следующие предположения:

1. Изучаемая АТР-аза функционирует в мембране в виде тетрамера, и, возможно, в интактном состоянии ее минералокортикоидсвязывающие центры ориентированы на стимуляцию переноса  $\text{Na}^+$ -иона. Однако после связывания лиганда с одним из связывающих центров происходит конформационная перестройка остальных связывающих центров с обращением их действия. На такую перестройку, ведущую к изменению гидрофобности связывающих центров АТР-азы и обусловленную кооперативным эффектом, указывал еще А.А. Болдырев [1].

2. Имеются и могут быть синтезированы такие стероиды, которые способны специфически взаимодействовать только с интактными связывающими центрами, то есть при всех концентрациях обеспечивать стимуляцию натриевого насоса клетки, как это происходит в случае альдостерона.

3. Регулировку активности натриевого насоса в организме может обеспечивать конкурентное действие минералокортикоидов обоих этих типов.

Для проверки высказанных предположений следовало попытаться отыскать те детали строения соединений каждого из этих двух типов, которые отделяют один тип от другого. Что касается структурных особенностей обоих типов изученных соединений, которые видны невооруженным глазом, то единственное на что можно обратить внимание – это то, что препараты основной группы, проявившей тенденцию к сохранению способности стимулировать натриевый насос (соединения (29), (32)–(36), особенно вещества (29) и (32), показавшие наиболее достоверные результаты), обладают конденсированным гетероциклом, уплощенным из-за наличия двойной связи  $\text{C}=\text{N}$ . В то же время у активных ингибиторов (8) и (9) планарность 16,17-конденсированного гетероцикла сильно искажена из-за включения в него объемистого атома серы.

Это наблюдение, несомненно, существенно, однако, как показывает рассмотрение данных, сведенных в табл. 1, зависимость направленности и величины влияния на активность  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -зависи-

мой АТР-азы представленных в ней соединений от их структуры определяется не только стереохимией кольца  $D$  и его заместителей; она значительно сложнее. Для попытки выявить эту зависимость мы предприняли исследование данного набора структур компьютерными методами и с этой целью привлекли обычные методы количественного описания связи структура–активность (QSAR).

Стероидные соединения, сведенные в табл. 1, формально можно представить в упрощенном виде как некий вектор:

$$S_i = (R_i, R'_i, R''_i, X_i, Y_i), \quad (1)$$

где  $i$  – это номер соединения в табл. 1, а в качестве составляющих для каждой координаты выступает один из заместителей, представленных в соответствующих столбцах табл. 1. Например, соединение (8) в табл. 1, у которого  $i = 8$ ,  $R = \text{OH}$ ,  $R' = \text{H}$ ,  $R'' = \text{CH}_3$ ,  $X = \text{S}$  и  $Y = \text{O}$ , может быть представлено вектором  $S_8 = (\text{OH}, \text{H}, \text{CH}_3, \text{S}, \text{O})$ ; то же справедливо и для других соединений. При этом с самого начала мы не включили в число координат вектора (1) столбец  $\Delta$  – положение двойной связи в кольцах  $A/B$ , поскольку оно неразрывно связано с заместителем  $R$  (кислородная функция в положении 3): при  $R = \text{O}$  двойная связь всегда в положении 4, а при  $R = \text{OH}$  или  $\text{OAc}$  она всегда в положении 5.

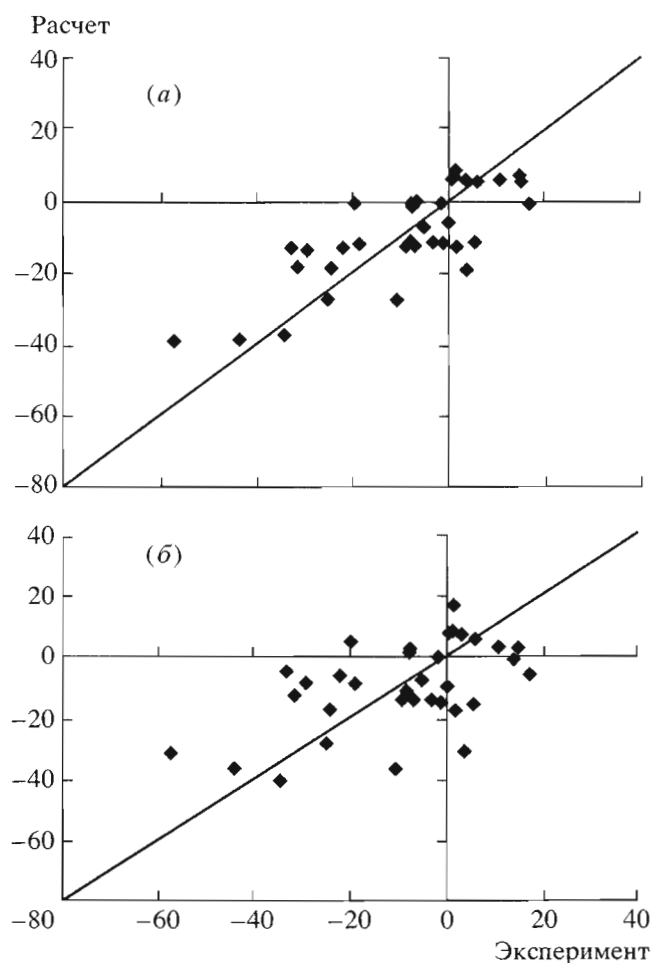
На данной стадии исследования были также исключены из рассмотрения 3-кето-1,4-диены (3) и (10) и соединения (13) и (19), содержащие нитроксильную и  $N$ -оксидную группировки, поскольку для них слишком мало данных для определения с достаточной достоверностью параметров модели. На том же основании были исключены и соединения (41) и (42) с амино- и ациламинозаместителями в 16,17-гетероцикле. В результате в исходной базе данных из 42 соединений ( $N = 42$ ) осталось только 36, отвечающих выражению (1).

Соединения (1)–(19) (с учетом исключенных соединений) можно рассматривать как выборку, более однородную по структуре, поэтому некоторые расчеты выполнялись только для базы (1)–(19), а остальные – для базы данных (1)–(40) (то есть, для 15 и 36 соединений соответственно).

Казалось бы, самый простой путь – это построить линейную модель вида:

$$P_i = a_0 + \sum a^{R_j} f_i(R_j) + \sum a^{R'_j} f_i(R'_j) + \sum a^{R''_j} f_i(R''_j) + \sum a^{X_j} f_i(X_j) + \sum a^{Y_j} f_i(Y_j), \quad (2)$$

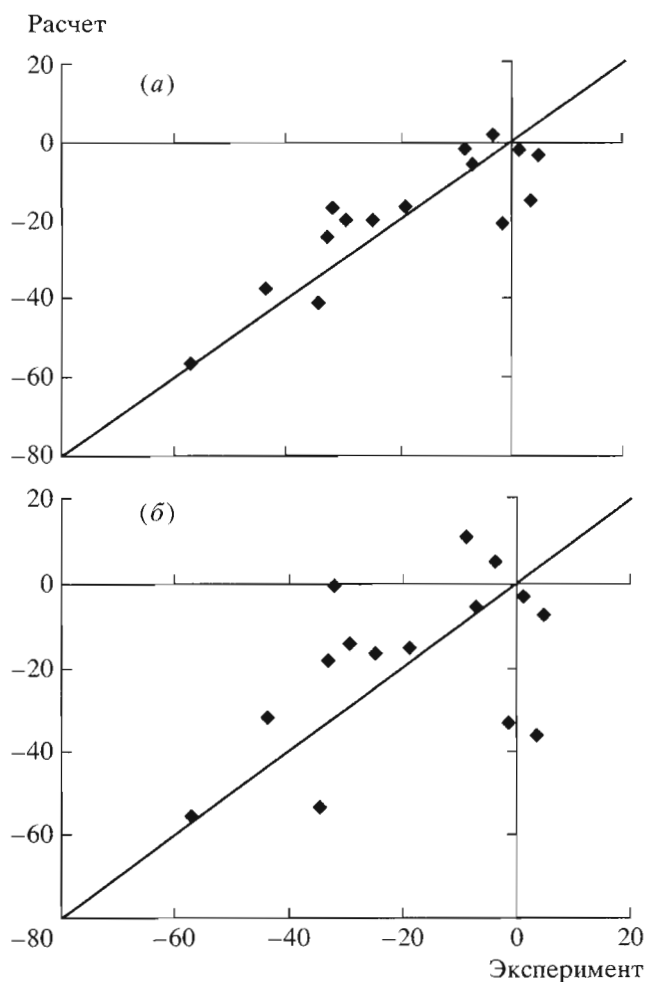
где  $P$  – вектор изменения активности,  $i$  – номер соединения (1, ..., 36), а величины  $a^{R_j}$  имеют смысл вкладов, приходящихся на соответствующие заместители. Обозначим через  $Z_j$  символы заместителей ( $R_j, R'_j, R''_j$ ). Функции  $f_i(Z_j)$  превращаются в 1, если заместитель  $Z_j$  содержится в соответствующем соединении.



**Рис. 1.** Математическая модель влияния стероидов на активность АТФ-азы ( $N = 36$ ,  $r^2 = 0.600$ ,  $n = 17$ ) на единичных (линейных) дескрипторах (а) и результат скользящего контроля ( $N = 36$ ,  $Cr-r^2 = 0.186$ ,  $n = 17$ ) (б).

ошем положении молекулы с вектором  $S_i$  и превращаются в 0 в противном случае.

По сути эти функции являются  $\delta$ -функциями Кронекера, но не для числовых, а для символьных индексов. Следует, однако, заметить, что попытка применить уравнение (2) для описания рассматриваемой базы данных с помощью метода наименьших квадратов с самого начала обречена на неудачу, причем даже не потому, что она содержит слишком много (17) параметров, не считая свободного члена, но уже в силу того, что определитель матрицы Грамма обратится при этом в нуль. Это вытекает из того, что сумма элементов каждого из столбцов (трех для заместителей R, R' и R'' или четырех для заместителей X и Y)  $S(Z_j)$  равна единице и все они равны между собой (не считая свободного члена), то есть, мы имеем линейные зависимости. Кроме того, очевидно, что уравнение (2) представляется все же слишком примитивным для решения рассматриваемой задачи. Тем не менее мы решили эту задачу, приняв



**Рис. 2.** Математическая модель влияния стероидов на активность АТФ-азы ( $N = 15$ ,  $r^2 = 0.73$ ,  $n = 9$ ) на линейных дескрипторах (а) и результат скользящего контроля ( $N = 15$ ,  $Cr-r^2 = 0.153$ ,  $n = 9$ ) (б).

в каждой из сумм уравнения (2) одну из составляющих равной нулю. Полученные результаты для  $N = 36$  представлены на рис. 1а и 1б. При этом мы имеем коэффициент корреляции ( $r^2$ ) равный 0.600 и число дескрипторов ( $n$ ) равное 17. Для  $N = 15$  результаты представлены на рис. 2а и 2б (где  $n = 9$ ).

Прогностичность построенных моделей была проверена методом скользящего контроля (cross-validation), состоящим в том, что для всей базы данных соединений, относящихся к соответствующей выборке (15 или 36 структур), поочередно выбрасывается по одному соединению, параметры модели для оставшихся структур рассчитываются вновь, а свойства выброшенного соединения предсказываются и находятся величины  $r^2$ . Результаты такого скользящего контроля представлены на рис. 1б–4б. Следует еще раз подчеркнуть, что все точки на этих рисунках рассчитаны путем их поочередного исключения из модели и каждая точка в скользящем контроле представляет результат прогноза в соответствии с рассма-

Таблица 2. Зависимость биологических свойств стероида от заместителя R

R			R'	R''	X	Y
ОН	ОАс	О				
-57.3(8)	-	-43.8(9)	H	CH <sub>3</sub>	S	O
-32.8(20)	-24.6(21)	-7.2(22)	ОАс	CH <sub>3</sub>	NH	O
-29.3(16)	+3.6(17)	+1.4(18)	H	CH <sub>3</sub>	NH	O
-18.7(1)	-	-3.4(2)	H	CH <sub>3</sub>	O	O
-10.5(39)	-	-25.0(40)	H	C=N	S	N
-7.8(25)	-	-19.7(26)	H	C=N	O	N
-1.7(27)	-	-7.4(28)	ОН	C=N	O	N
-0.2(14)	-9.2(15)	-	H	CH <sub>3</sub>	O	NAc
-1.4(4)	-31.4(5)	+5.2(6)	ОАс	CH <sub>3</sub>	O	O
+5.7(36)	-1.9(37)	+0.8(38)	ОАс	N=C	N	O
+10.7(34)	-	+3.1(35)	ОН	N=C	N	O
+14.8(32)	-	+0.3(33)	H	N=C	N	O
+16.8(29)	-5.2(30)	-8.2(31)	ОАс	C=N	O	N

Примечание: цифры в скобках – номера соединений из табл. 1.

триваемой моделью. Таким образом, коэффициент корреляции для такого прогноза (скользящий коэффициент корреляции), который мы будем обозначать как  $Cr-r^2$ , характеризует прогностическую ценность модели. Важно отметить, что если коэффициент  $r^2$  при увеличении числа параметров в модели монотонно повышается и достигает единицы (при равенстве числа независимых параметров и числа экспериментальных точек), то коэффициент  $Cr-r^2$  в этих же условиях проходит через максимум и затем уменьшается до 0. Поэтому модель становится максимально прогностичной и максимально точной при числе параметров, отвечающем максимуму коэффициента  $Cr-r^2$ .

Чтобы понять, почему модель (2) работает плохо, следует проследить изменения активностей, происходящие при изменениях лишь в одном месте молекулы, например, при изменениях заместителя R, и выяснить, обнаруживаются ли при этом какие-либо закономерности. Рассмотрим табл. 2, которая позволяет в наглядном виде представить зависимость величины  $P$  от заместителя R. В этой таблице данные расположены в таком порядке, чтобы можно было наглядно увидеть, как меняется величина  $P$  с изменением R (это заместители O, ОН и ОАс) при условии неизменности остальных заместителей. При этом мы пренебрегаем различиями, вносимыми тригональной структурой углеродных атомов C3 и C4 (в  $\Delta^4$ -3-кетонах) и C6 (в  $\Delta^5$ -3-спиртах), поскольку общий тип молекулы при этом сохраняется. Легко можно видеть, что при замене ОН на О для некоторых неизменных комбинаций остальных заместителей величина  $P$  уменьшается (на -30.7 для пары соединений (16)/(18)), а затем следует монотонный рост, вплоть до увеличения разности до +25.0 (для пары соединений (29)/(31)). В то же время, если рассматривать те же показатели  $P$  для пар заместителей

ОН и ОАс, то, хотя искажения скелета в этом случае практически отсутствуют, изменения  $P$  все равно попадают в интервал между +32.9 (для пары (16)/(17)) и -22.0 (для пары (29)/(30)). И это при том, что весь интервал изменения величин  $P$  заключен в диапазон от -57.3 до +16.8.

Столь же значительный интервал изменений наблюдается, если варьировать только заместитель R' (табл. 3). Так, при замене R'=H на ОАс, величина изменения  $P$  лежит между -24.6 (пара (25)/(29)) и +28.2 (пара (17)/(21)).

Подобные отклонения от монотонности, рассмотренные в работах [7–9], свидетельствуют о том, что элементы вектора (1), взятые по отдельности, не могут быть дескрипторами в линейной модели. Однако вектор (1) однозначно описывает строение соединения  $i$ , и, следовательно, величины  $P_i$ , определяемые строением молекулы (т.е. набором всех заместителей R, R', R'', X и Y), полностью зависят от этого вектора. Становится очевидным, что эта зависимость более сложна и не укладывается в рамки обычных построений метода QSAR (рис. 1а, 1б, 2а и 2б).

Итак, поскольку линейная модель не работает, то для получения более точных приближений следует рассмотреть члены более высокого порядка, используя разложение, математически обоснованное в работах [10, 11]. В данном исследовании с этой целью взяты билинейные члены ("двойки") и трилинейные члены ("тройки"), учитывающие вклады двух и трех дескрипторов соответственно. Возможны также члены 4-го порядка ("четверки"), которые нами не рассматривались. Напрашивается естественное предположение, что величина  $P$  есть функция "двоек", "троек" и т.д., образованных из координат этого вектора. При этом, правда, возникает проблема, как найти эти комбинации, так как для заместителей, указанных в

Таблица 3. Зависимость биологических свойств стероида от заместителя R'

R'			R	R''	X	Y
H	ОН	ОAc				
-43.7(9)	-34.5(11)	-	O	CH <sub>3</sub>	S	O
-29.3(16)	-	-32.8(20)	ОН	CH <sub>3</sub>	NH	O
-19.7(26)	-7.4(28)	-8.2(31)	O	C=N	O	N
-18.7(1)	-	-1.4(4)	ОН	CH <sub>3</sub>	O	O
-7.8(25)	-1.7(27)	+16.8(29)	ОН	C=N	O	N
-3.4(2)	-8.5(7)	+5.1(6)	O	CH <sub>3</sub>	O	O
+0.3(33)	+3.1(35)	+0.8(38)	O	N=C	N	O
+1.4(18)	-	-7.2(22)	O	CH <sub>3</sub>	NH	O
+3.6(17)	-	-24.6(21)	OAc	CH <sub>3</sub>	NH	O
+14.8(32)	+10.7(34)	+5.7(36)	ОН	N=C	N	O

Примечание: цифры в скобках – номера соединений из табл. 1.

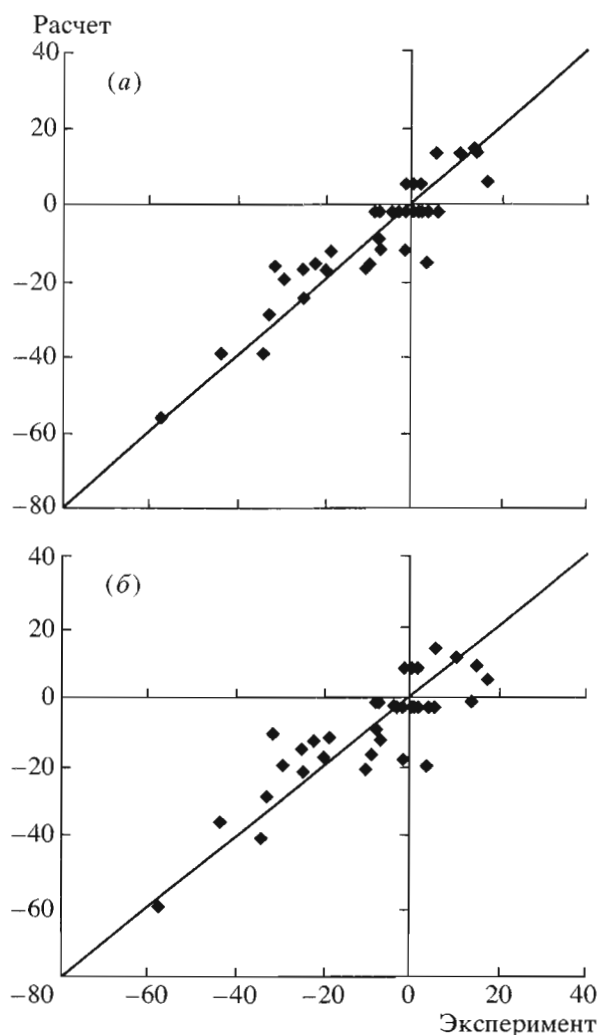
табл. 1, можно получить 115 “двоек”, 387 “троек”, а число “четвоек” уже будет превосходить число возможных вариантов соединений табл. 1 с теми же заместителями (теоретически можно построить 432 такие структуры). Поскольку проверить все возможные комбинации выделенных для этой задачи дескрипторов невозможно, мы выполнили дескрипторный анализ каждого из наборов “двоек” и “троек” по отдельности и выбрали наиболее информативные наборы. При этом для оценки информативности или “полезности” каждого набора, который в свою очередь можно рассматривать как потенциальный дескриптор, была взята функция, описанная в работе одного из авторов [12]. В этой работе было предложено некоторое обобщение дисперсии, названное “химической дисперсией”, при этом отношение новой дисперсии к обычной и дает меру информативности дескриптора. Не останавливаясь на деталях нашего метода (его естественно назвать “дескрипторным анализом”, и он будет подробно описан в отдельной статье), приведем только результаты, полученные при его использовании.

Результаты, полученные для “двоек”, представлены на рис. 3а ( $r^2 = 0.835$  при  $N = 36$  и  $n = 8$ ) и 3б (скользящий контроль). Если модель идеальна (что для экспериментально измеряемых величин неосуществимо), то все точки должны лежать на диагонали, проведенной слева вверх, при этом  $r^2 = 1$ . Для приближенных моделей экспериментальные точки отклоняются от диагонали на расстояние (по вертикали), соответствующее разнице между экспериментальными и расчетными результатами. Точки, хаотично рассыпанные по всей плоскости, соответствуют коэффициенту  $r^2$ , близкому к нулю, точки, сгруппированные вдоль диагонали, означают повышение величины  $r^2$  (рис. 1а–3а). То же относится и к расчетам скользящего контроля (рис. 1б–3б). Как видно, расчеты по единичному элементу (рис. 1а, 1б, 2а и 2б) мало убедительны, тогда как учет “двоек” (рис. 3а и 3б) заметно повышает качество модели.

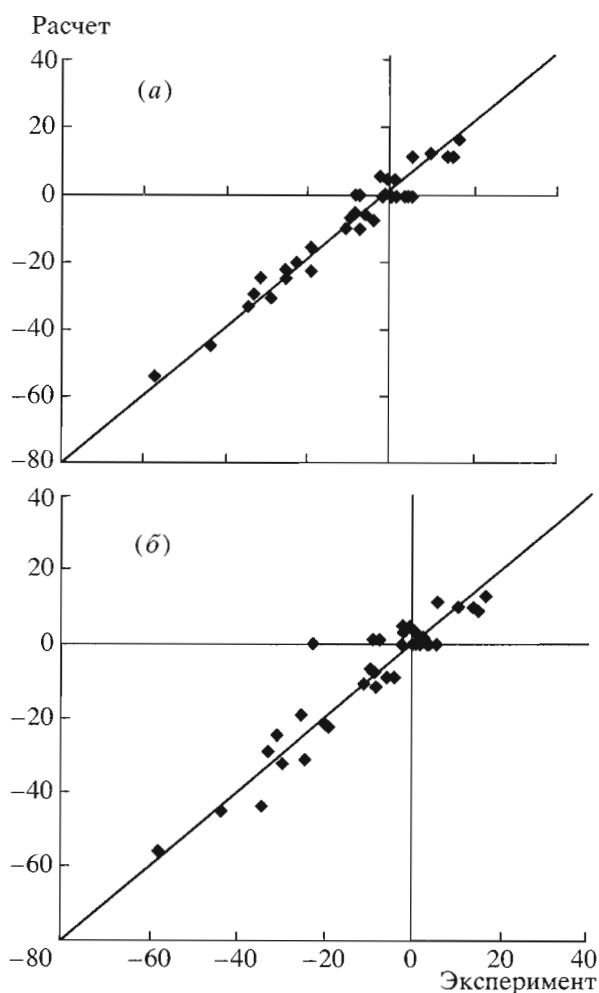
Еще более показательные результаты дает учет “троек”. После добавления “троек” получаем для расчетной формулы  $r^2 = 0.959$  при  $n = 11$  и  $N = 36$  и результаты, представленные на рис. 4а и 4б (скользящий контроль). Для “двоек” и “троек” при увеличении числа дескрипторов ( $n$ ) величина  $r^2$  монотонно возрастает, стремясь к единице. Однако величина  $r^2$  для скользящего контроля проходит при увеличении  $n$  через максимум и затем начинает уменьшаться. Поэтому число дескрипторов для модели с удовлетворительной прогностической способностью не должно превышать числа дескрипторов, соответствующих этому максимуму. Такую модель (рис. 5 и 6) можно использовать для прогноза активности неизученных соединений, то есть, для  $432 - 36 = 396$  гипотетических структур, относящихся к исследованному типу соединений. Следует отметить, что модель с “тройками” показывает хорошую точность уже для меньшего числа параметров:  $r^2 = 0.846$  при  $n = 7$  и  $N = 36$  и  $r^2 = 0.886$  при  $n = 8$  и  $N = 36$ .

Все представленные выше расчеты зависимости влияния изученных соединений на активность  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -зависимой АТФ-азы от строения выполнены для ее максимальной концентрации ( $10^{-4}$  М). Результаты расчетов для “троек”, приведенные на рис. 4а и 4б (для скользящего контроля), демонстрируют применимость дескрипторного анализа при построении модельного ряда соединений, даже для такого сложного (и, по-видимому, меняющего знак в процессе нарастания концентрации лиганда) кооперативного свойства, как влияние на комплексный мембранный рецептор.

На рис. 4б имеется лишь одна точка (соответствующая соединению (24)), которая заметно выпадает при прогнозировании. Это единичное отклонение дает основание считать, что рассмотренный ряд соединений, который включает в значительной степени только вещества, проявляющие всего лишь тенденцию воздействия на конечный результат активности  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -зависимой АТФ-азы, структурно близок к истинным лиган-



**Рис. 3.** Математическая модель влияния стероидов на активность АТФ-азы ( $N = 36$ ,  $r^2 = 0.835$ ,  $n = 8$ ) на линейных и квадратичных (билинейных) дескрипторах (а) и результат скользящего контроля ( $N = 36$ ,  $Cr-r^2 = 0.709$ ,  $n = 8$ ) (б).

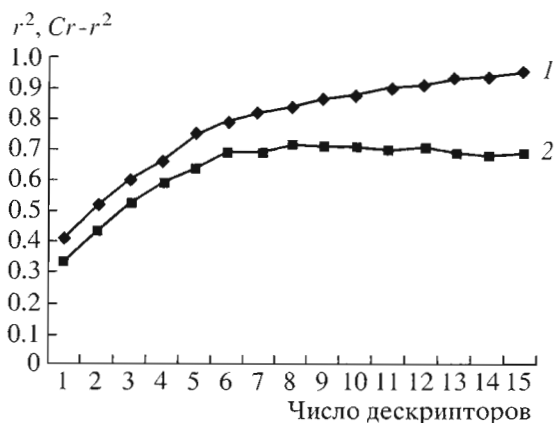


**Рис. 4.** Математическая модель влияния стероидов на активность АТФ-азы ( $N = 36$ ,  $r^2 = 0.959$ ,  $n = 11$ ) на линейных, квадратичных и кубических дескрипторах (а) и результат скользящего контроля ( $N = 36$ ,  $Cr-r^2 = 0.880$ ,  $n = 11$ ) (б).

дам этого рецептора и дальнейшее изучение структурных особенностей входящих в него членов может выявить параметры строения молекул аналогов минералокортикоидов, ответственных за строго избирательное (стимулирующее натриевый насос клетки) действие альдостерона и подобных соединений. С этой целью мы планируем продолжить расчеты для других концентраций в случае соединений с наиболее выраженными биологическими функциями, выявить "сигнатуры", обеспечивающие отсутствие перехода влияния от стимуляции к ингибированию, и осуществить синтез и опытную проверку таких стероидов.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве объектов при исследовании эффекта на  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -зависимую АТФ-азу из почки сви-



**Рис. 5.** Поведение коэффициента корреляции  $r^2$  (1) и коэффициента скользящего контроля  $Cr-r^2$  (2) в зависимости от числа параметров. Лучшая модель на линейных и квадратичных дескрипторах по  $Cr-r^2$  при  $n = 8$ .

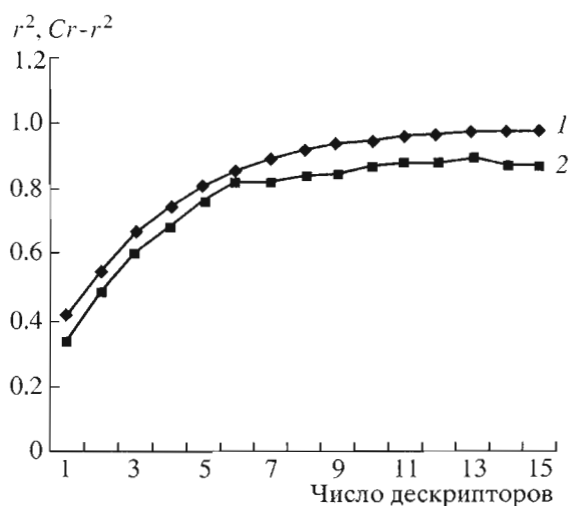


Рис. 6. Поведение коэффициента корреляции  $r^2$  (1) и коэффициента скользящего контроля  $Cr-r^2$  (2) в зависимости от числа параметров. Лучшая модель на всех дескрипторах по  $Cr-r^2$  при  $n = 11$ .

ны (обычный объект исследования) был использован набор стероидов с гетероциклом (диоксалидиновым, оксазолидиновым, тиазолидиновым, пиразолидиновым и др.), конденсированным в положениях 16 $\alpha$ , 17 $\alpha$  (42 соединения); их синтез был ранее разработан в ИОХ РАН [3]. Влияние стероидных соединений на Na/K-зависимую АТФ-азу определялось по изменению способности ее образца, подвергнутого преинкубации со стероидом, расщеплять АТФ с выделением неорганического фосфата. Изучение эффекта этих соединений проводилось на образце АТФ-азы, выделенной из микросомальной фракции мозгового слоя почки свиньи (удельная активность 1500 мкмоль  $P_i$  на 1 мг белка в час) по ранее описанной методике [2]. Степень

влияния испытуемых соединений на активность АТФ-азы измерялась для концентраций стероида от  $1 \times 10^{-8}$  до  $1 \times 10^{-4}$  М и выражалась в изменении активности (%) по отношению к контролю.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 99-03-32887).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Болдырев А.А. // Транспортные АТФ-азы. Итоги науки и техники. Биофизика. М.: ВИНТИ, 1985. Т. 17. С. 5–222.
2. Камерницкий А.В., Решетова И.Г., Мирсалихова Н.М., Умарова Ф.Т. // Биохимия. 1982. Т. 47. С. 956–960.
3. Камерницкий А.В., Решетова И.Г., Мирсалихова Н.М. // Химия природн. соед. 1983. № 5. С. 605–608.
4. Камерницкий А.В., Решетова И.Г., Мирсалихова Н.М., Леви В.Г., Чернобутова Е.И. // Биохимия. 1984. Т. 49. С. 316–320.
5. Камерницкий А.В., Решетова И.Г., Мирсалихова Н.М., Уварова Н.И., Атопкина Л.Н. // Биоорг. химия. 1984. Т. 10. С. 666–669.
6. Камерницкий А.В., Турута А.М. // Хим.-фарм. журн. 1992. Т. 26. С. 57–65.
7. Randić M., Wilkins C.L. // J. Phys. Chem. 1979. V. 83. P. 1525–1540.
8. Klein D.J., Babic D. // J. Chem. Inf. Comput. Sci. 1997. V. 37. P. 656–660.
9. Смоленский Е.А., Маслова Л.К., Шпилькин С.А., Зефирова Н.С. // Докл. АН. 1999. Т. 368. С. 219–222.
10. Сейфер А.Л., Смоленский Е.А. // Журн. физ. химии. 1963. Т. 37. С. 2657–2661.
11. Смоленский Е.А. // Журн. физ. химии. 1964. Т. 38. С. 1288–1291.
12. Смоленский Е.А. // Докл. АН. 1999. Т. 356. С. 767–773.

## The Effect of Mineralocorticoid Analogues on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-Activated ATPase

A. V. Kamernitsky<sup>#</sup>, E. A. Smolenskii, G. M. Makeev<sup>†</sup>, I. V. Vesela,  
N. M. Mirsalikhova, A. M. Turuta, and N. S. Zefirov

<sup>#</sup>Phone: +7 (095) 137-7331; fax: +7 (095) 135-5328; e-mail: li@ioc.ac.ru

Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 47, GSP-1 Moscow, 117913 Russia

The effect of 42 steroids of the 20-ketopregnane series with heterocycles fused in positions 16 $\alpha$  and 17 $\alpha$  on the activity of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-activated ATPase from pig kidney was studied. It was shown that the studied compounds could be divided into two groups. The compounds from the first group stimulate the ATPase at low concentrations ( $1 \times 10^{-8}$ – $1 \times 10^{-7}$  M) and inhibit it at high concentrations ( $1 \times 10^{-4}$  M). The second group of compounds stimulated the sodium pump at either concentration. This is explained by the cooperative action of the ATPase tetramer: after the reaction of its first binding site with the ligand, the tetramer changes the conformation and specificity of its other binding sites. Computer analysis of this series of compounds was carried out and a mathematical model of the dependence of their activities on the structure of their substituents was obtained with a high correlation coefficient and a satisfactory predictive power. This confirmed the structural similarity of the studied compounds with respect to their interaction with the ATPase binding sites. The method of descriptor analysis that was applied in this study is a new variant of approximation; it is based on the use of symbol variables as descriptors. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 3; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* analogues of mineralocorticoids, Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-activated ATPase, quantitative structure–activity relationship (QSAR), descriptor analysis