

# Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

© Коллектив авторов, 2013

Л. В. Татьянаенко, Н. П. Коновалова, О. В. Доброхотова, И. Ю. Пихтелева,  
Д. В. Мищенко, Б. С. Федоров, И. В. Выстороп

## ВЛИЯНИЕ ЦИКЛИЧЕСКИХ ГИДРОКСАМОВЫХ КИСЛОТ НА ОСНОВЕ ГЛИЦИНА И D,L-АЛАНИНА НА АКТИВНОСТЬ ГИДРОЛАЗ $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА И ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ ЦИКЛИЧЕСКОГО ГУАНОЗИНМОНОФОСФАТА

Институт проблем химической физики РАН, Московская область, г. Черноголовка, Россия; e-mail: mdv@icp.ac.ru

Исследовано влияние циклических гидроксамовых кислот (ЦГК) на основе глицина и D,L-аланина на ферментативную активность  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы саркоплазматического ретикулума ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы СР) и фосфодиэстеразы циклического гуанозинмонофосфата (ФДЭцГМФ). ЦГК I ( $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$ ), II ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$ ), III ( $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$ ), IV ( $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2$ ), V ( $\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2$ ), VI ( $\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2$ ) являются модуляторами активности фермента  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы СР. При этом соединения I – VI в различной степени разобщают гидролитическую и транспортную функции  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы СР, нарушая соотношение внутри- и внеклеточных ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , что влияет на адгезию метастатических клеток к эндотелию капилляров. Соединения IV и VI имеют наибольший индекс ингибирования метастазов (ИММ %) меланомы В-16, равный 33 и 81 % соответственно, что коррелирует с уменьшением коэффициента трансмембранного переноса  $\text{Ca}^{2+}$  в везикулы СР, равного для IV — 0,75 и VI — 0,5 по сравнению с соотношением  $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{АТФ}]$  в контроле, равным 1,4. ЦГК I – VI не влияют на функцию ФДЭцГМФ. Полученные данные по-

зволяют прогнозировать потенциальные антиметастатические препараты в ряду ЦГК.

**Ключевые слова:**  $\text{Ca}^{2+}$ -активирующая- $\text{Mg}^{2+}$ -зависимая АТФаза саркоплазматического ретикулума; фосфодиэстераза цГМФ; константа ингибирования; гидролиз АТФ; активный транспорт ионов кальция; циклические гидроксамовые кислоты.

Гидроксамовые кислоты (ГК, R'CONROH) характеризуются широким спектром биологической активности [1], в частности, ингибируют рост экспериментальных опухолей [2]. Известно также, что ГК являются ингибиторами ряда металлоферментов (например, матричных металлопротеиназ [3] и гистондеацетилаз [4]), вовлеченных в различные процессы опухолевой трансформации клетки. С другой стороны, ряд химических соединений антиметастатического действия ингибирует транспортную функцию фермента  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы СР, что нарушает баланс внутри- и внеклеточных ионов кальция [5 – 8] и уменьшает адгезию метастатических клеток к эндотелию капилляров [9]. Ингибирование ФДЭцГМФ приводит к накоплению цГМФ, являющегося вторичным месседжером, влияющим на вазодилататорный, антигипертензивный и антиагрегационный эффекты в живых организмах [10]. Целью настоящего исследования является изучение модуляции активности  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы СР и ФДЭцГМФ под влиянием химических соединений нового класса — ЦГК на основе глицина и D,L-аланина.

### Экспериментальная часть

В работе использовались альбумин человека, имидазол, цГМФ, нуклеотидаза (яд кобры), АТФ производства фирмы “Sigma”, гистидин, диметилсульфоксид (ДМСО), этилендиаминтетраацетат (ЭДТА), трихлоруксусная кислота (ТХУ), сахароза, соли  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{CaCl}_2$ , оксалат натрия, молибдат аммония фирмы “Реахим” (Россия), после соответствующей дополнительной очистки.

Синтез ЦГК I – VI описан в работах [11 – 14]. ЦГК получены реакцией региоселективной циклоконденсации глицингидроксамовой или D, L-аланингидроксамовой кислот с ацетоном (I, II) [11, 12], 1-метилпиперидоном-4 (III, IV) [14] или триацетонамином (V, VI) [13] соответственно.

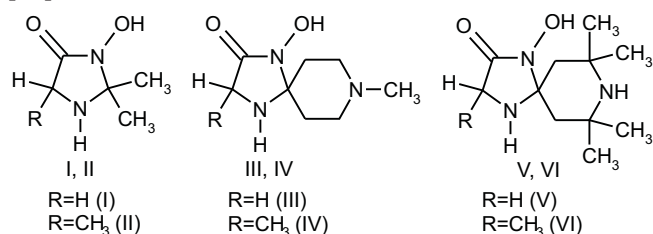


Таблица 1  
Влияние ЦГК I – VI на гидролитическую и транспортную функции фермента Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-АТФазы СР

Соединение	Торможение активности Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> -АТФазы СР, изменения по сравнению с контролем (контроль 100 %)					
	Концентрация соединения, мкМ					
	10	10	1,0	1,0	0,1	0,1
	Активный транспорт Ca <sup>2+</sup>	Гидролиз АТФ	Активный транспорт Ca <sup>2+</sup>	Гидролиз АТФ	Активный транспорт Ca <sup>2+</sup>	Гидролиз АТФ
I	18 ± 2	18 ± 1	20 ± 2	14 ± 1	18 ± 2	0
II	63 ± 6*	12 ± 3	33 ± 3	0	26 ± 3*	0
III	60 ± 6*	12 ± 1	30 ± 4	6 ± 0,6	28 ± 4*	0
IV	70 ± 6*	16 ± 1	39 ± 3	16 ± 10*	29 ± 2*	10 ± 1
V	65 ± 8*	10 ± 1	31 ± 3	6 ± 0,6	30 ± 5*	0
VI	86 ± 8*	28 ± 3*	70 ± 7	18 ± 2*	66 ± 7*	13 ± 1

а) n = 6 (число опытов с каждым исследованным соединением);

б) \* p < 0,01 по сравнению с контролем;

в) в качестве контроля принимали 100 % активность фермента без добавления изучаемого химического соединения.

Фермент Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-АТФазу СР выделяли из белых мышц задних конечностей кроликов по описанной методике [15]. Мышцы помещали в физиологический раствор со льдом (на 100 г мышц брали 0,5 л раствора), содержащий 10 мМ ЭДТА при pH 7,5. Затем ткани мышц измельчали ножницами и помещали в среду, содержащую 10 мМ гистидина, 0,1 мМ ЭДТА в 10 % сахарозе, pH 7,0, и гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера. Полученный гомогенат центрифугировали 20 мин при 10000 g на центрифуге К 32М. Надосадочную жидкость отфильтровывали через 6 слоев марли. Фильтрат центрифугировали 60 мин при 36000 g. Полученный осадок суспендировали в среде, содержащей 0,6 М КСl и 10 мМ гистидина при pH 7,0 – 7,2, а затем измельчали в гомогенизаторе Поттера. К полученному гомогенату добавляли альбумин человека и инкубировали при постоянном перемешивании при 4 °С в течение 10 ч. Затем гомогенат центрифугировали

ли 90 мин при 40000 g. Средний желеобразный слой суспендировали в среде, содержащей 10 мМ гистидина, 0,1 мМ ЭДТА в 30 % сахарозе, pH 7,0. Полученную Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-АТФазу замораживали при 77° К. Удельная активность Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-АТФазы составляла 15000 нМ неорганического фосфата, образовавшегося за 1 мин инкубации на 1 мг белка. Концентрацию белка определяли по модифицированной методике Лоури [16].

Гидролитическую активность Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-АТФазы измеряли по методу [15]. Реакционная среда содержала 4 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2,5 мМ имидазола, 100 мМ NaCl, 5 мМ оксалата Na, 0,04 мг белка, 3 мМ АТФ, pH 7,2. Реакцию инициировали добавлением 0,1 мМ CaCl<sub>2</sub>. Активность Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-АТФазы определяли по степени изменения pH среды, так как в результате указанной реакции соотношение протонов и фосфат-ионов составляет 1:1. Гидролитическую активность Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-АТФазы рассчитывали из тангенса угла наклона кинетической кривой гидролиза АТФ. Об активном транспорте ионов Ca<sup>2+</sup> судили по изменению угла наклона кривой гидролиза АТФ, т.е. по скорости изменения концентрации ионов кальция в инкубационной среде до полного поглощения везикулами СР. Изменение гидролитической и транспортной функций Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-АТФазы СР под действием изучаемых препаратов I – VI определяли в зависимости от их концентрации. Относительную активность фермента рассчитывали по формуле:

$$I\% = \frac{A_0 - A}{A_0} \cdot 100\%,$$

где I — относительная активность, A<sub>0</sub> — содержание неорганического фосфата в контрольной пробе, A — содержание неорганического фосфата в опытной пробе.

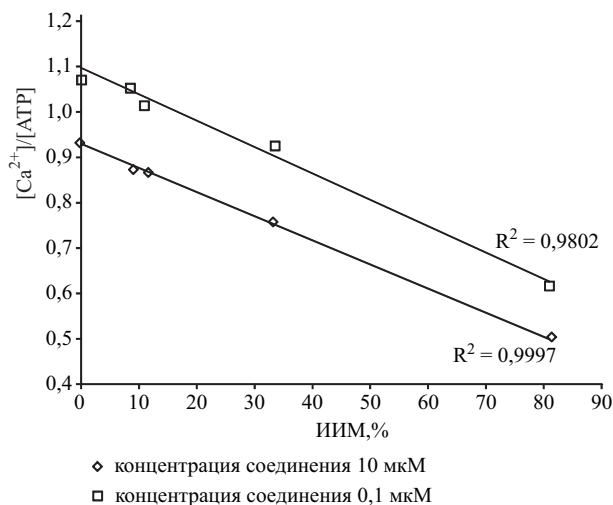
Фермент ФДЭцГМФ выделяли из коры головного мозга крыс линии Вистар [17]. Ткань головного мозга гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера в 10-кратном по весу количестве охлажденного трис-буфера, pH 7,5. Гомогенат центрифугировали в течение 1 ч при 40000 g на центрифуге К 32М. Супернатант

Таблица 2  
Влияние ЦГК I – VI на активный транспорт ионов кальция через мембрану СР, гидролиз АТФ ферментом Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-АТФазой СР и ингибирование экспериментальных метастазов меланомы В-16 в опытах *in vivo*

Соединение	Торможение активного транспорта Ca <sup>2+</sup> и гидролиза АТФ Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> -АТФазой СР в единицах удельной активности									ИИМ, %
	Концентрация соединения, М									
	Активный транспорт Ca <sup>2+</sup>			Гидролиз АТФ			Отношение [Ca <sup>2+</sup> ]/[АТФ]			
	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	
I	1,1 ± 0,1	1,15 ± 0,1	1,25 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,35 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,05 ± 0,1	0,93 ± 0,1	–
II	1,5 ± 0,15	1,85 ± 0,2	1,9 ± 0,2	1,7 ± 0,17	1,8 ± 0,18	1,8 ± 0,2	0,88 ± 0,08	1,02 ± 0,1	1,05 ± 0,1	9
III	1,5 ± 0,15	1,8 ± 0,2	1,95 ± 0,2	1,6 ± 0,15	1,7 ± 0,15	1,8 ± 0,2	0,93 ± 0,1	1,06 ± 0,1	1,08 ± 0,1	0
IV	1,2 ± 0,12	1,5 ± 0,15	1,8 ± 0,2	1,6 ± 0,1	1,75 ± 0,18	1,9 ± 0,2	0,75 ± 0,08	0,86 ± 0,8	0,95 ± 0,08	33
V	1,56 ± 0,16	1,9 ± 0,2	1,9 ± 0,2	1,8 ± 0,19	1,88 ± 0,19	1,88 ± 0,18	0,87 ± 0,1	1,01 ± 0,1	1,01 ± 0,1	12
VI	0,75 ± 0,1	0,98 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,5 ± 0,17	1,5 ± 0,15	1,75 ± 0,18	0,5 ± 0,05	0,65 ± 0,05	0,61 ± 0,06	81

Отношение [Ca<sup>2+</sup>]/[АТФ] в контроле равно 1,4.

n = 6 (число опытов с каждым исследованным соединением).



Зависимость антиметастатической активности ЦГК от степени ингибирования активного транспорта кальция ( $R^2$  — величина достоверности аппроксимации).

тант, содержащий ФДЭ цГМФ, замораживали в жидком азоте. Удельная активность фермента составляла 7 мкМРi/мг белка в минуту. Активность ФДЭ цГМФ в контрольной и опытной пробах определяли по количеству образовавшегося неорганического фосфата [17]. К 1 мл 0,2 М *трис*-буфера (рН 7,6) добавляли аликвоту раствора ФДЭ цГМФ, содержащего 1 мг белка. Исследуемые препараты добавляли в виде растворов в ДМСО в концентрациях 10, 1 и 0,1 мкМ. Через 30 мин преинкубации при комнатной температуре добавляли субстрат — 0,1 мМ цГМФ. Пробы выдерживали в течение 20 мин при 30 °С, после чего их помещали на 3 мин в кипящую водяную баню. Затем в охлажденные до комнатной температуры пробы добавляли по 50 мкг яда кобры и выдерживали при 30 °С в течение 10 мин. Реакцию останавливали добавлением в каждую пробу по 0,2 мл 55 % трихлоруксусной кислоты, затем реакционную смесь центрифугировали 5 мин при 10000 g. Количество неорганического фосфата, накопившегося в процессе ферментативной реакции, определяли спектрофотометрическим методом при длине волны  $\lambda = 735$  нм с использованием спектрофотометра “Specord M-40”.

Меланому В16 трансплантировали под кожу бока мышам-гибридам BDF, массой 22 – 24 г согласно стандартной методике [18]. Трансплантант содержал  $5 \cdot 10^6$  опухолевых клеток. Препараты II – IV вводили в виде водных растворов внутривентриально на 2 – 8 сут после трансплантации опухоли в разовой дозе 400 мг/кг. Оценку эффекта проводили на 28 сут после трансплантации. Критерием эффективности терапии служил индекс ингибирования метастазов (ИИМ), учитывающий частоту и интенсивность метастазирования [18]:

$$\text{ИИМ}\% = \frac{(A_k \cdot B_k) - (A \cdot B)}{A_k \cdot B_k} \cdot 100\%,$$

где  $A_k$  — частота метастазирования в контрольной группе;  $A$  — частота метастазирования в опытной группе;  $B_k$  — среднее число метастазов в контрольной группе;  $B$  — среднее число метастазов в опытной группе.

### Результаты и их обсуждение

Действие соединений I – VI на гидролитическую и транспортную функции фермента  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -АТФазы СР исследовалось после 5 мин преинкубации. Растворы соединений готовились непосредственно перед добавлением их в реакционную среду. Как видно из табл. 1, практически все производные ЦГК являются модуляторами функции  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -АТФазы СР. Они преимущественно тормозят активный транспорт ионов  $Ca^{2+}$  через мембрану СР, разобщая гидролитическую и транспортную функции фермента. Исключение составляет соединение I, практически не влияющее на работу  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -АТФазы СР. Соединения IV и VI в концентрации 10 мкМ тормозят активный транспорт ионов  $Ca^{2+}$  на  $70 \pm 6$  и  $86 \pm 8$  % и гидролиз АТФ на  $16 \pm 1$  и  $28 \pm 3$  % соответственно. Разобщение гидролитической и транспортной функций  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -АТФазы СР при действии исследуемых ЦГК показывает, что при гидролизе 1 молекулы АТФ в везикулы СР переносится меньшее количество ионов кальция, чем в норме. Теоретическое соотношение  $[Ca^{2+}]/[АТФ]$  (удельных скоростей транспорта  $Ca^{2+}$  и удельной активности гидролиза АТФ) равно 2, что соответствует переносу 2 ионов  $Ca^{2+}$  при гидролизе 1 молекулы АТФ. Возникающее при этом изменение соотношения вне- и внутриклеточного кальция, безусловно, вызывает нарушение агрегации тромбоцитов, их связи с метастазирующими клетками, а в конечном итоге предотвращает адгезию последних к стенкам сосудов [9]. В табл. 2 приведены данные соотношения  $[Ca^{2+}]/[АТФ]$  для всех исследованных соединений. Как видно из табл. 2, соотношение  $[Ca^{2+}]/[АТФ]$  у всех исследованных соединений отличается от контроля, равного 1,4. Так, соотношение  $[Ca^{2+}]/[АТФ]$  для соединения V равно 1,1, что близко к значению контроля, у IV оно равно 0,95, VI имеет соотношение  $[Ca^{2+}]/[АТФ]$  равное 0,6 при физиологической концентрации  $10^{-7}$  М. В табл. 2 приведены данные по индексу ингибирования метастазов меланомы В-16 исследуемыми соединениями. Как видно из табл. 2, индекс ингибирования метастазов равен 33, 12 и 81 для соединений IV, V и VI соответственно. То есть наблюдается корреляция ИИМ меланомы В-16 и коэффициента трансмембранного переноса ионов  $Ca^{2+}$  в везикулы саркоплазматического ретикулума.

На рисунке представлены данные по взаимосвязи параметров ИИМ % и соотношения  $[Ca^{2+}]/[АТФ]$ . Таким образом, полученные данные подтверждают ранее сделанный вывод [5] о том, что одним из важных механизмов антиметастатического действия препаратов является ингибирование активного транспорта ионов кальция через биологические мембраны, сопровож-

дающегося разобщением гидролитической и транспортной функций фермента  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы СР. Полученные данные позволяют прогнозировать анти-метастатическую активность исследованных соединений и рекомендовать соединение VI в качестве перспективного лекарственного препарата антиметастатического спектра действия. Наши исследования также показали, что ГК слабо влияют на функцию ФДЭц ГМФ.

## ЛИТЕРАТУРА

1. C. J. Marmion, D. Griffith and K. B. Nolan, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **15**, 3003 – 3016 (2004).
2. R. Hoekstra, Falm Eskens, J. Verweij, *The Oncologist*, **6**, 415 – 427 (2001).
3. M. Whittaker, C. D. Floyd, P. Brown, A. J. Gearing, *Chem Rev.*, **99**, 2735 – 2776 (1999).
4. T. A. Miller, D. J. Witter and S. Belvedere, *J. Med. Chem.*, **46**, 5097 (2003).
5. Л. В. Татьянаенко, Н. П. Коновалова, Г. Н. Богданов и др., *Ж. биомед. химии*, **52**(1), 52 – 61 (2006).
6. Н. П. Коновалова, Л. М. Волкова, Л. В. Татьянаенко и др., *Вопр. онкологии*, **43**(3), 369 (1997).
7. N. P. Konovalova, L. M. Volkova, L. V. Tatyanyenko, et al., *Neoplasma*, **44**(6), 361 – 365 (1997).
8. N. P. Konovalova, L. M. Volkova, L. V. Tatyanyenko, et al., *Sensitization Newsletter*, **4**, 2 (1997).
9. В. Г. Граник, Н. Б. Григорьев, *Оксид азота (NO). Новый путь к поиску лекарств*, Вуз. книга, Москва (2004).
10. I. J. Fidler, *Cancer Res.*, **50**(19), 6130 – 6138 (1990).
11. И. В. Выстороп, З. Г. Алиев, Н. Ю. Андреева, и др., *Известия АН. Сер. хим.*, 180 – 181 (2000).
12. I. V. Vystorop, K. A. Lyssenko, V. N. Voznesensky, et al., *Mendeleev Commun.*, **12**, 193 – 196 (2002).
13. И. В. Выстороп, Н. П. Коновалова, Ю. В. Нелюбина и др., *Известия АН, Сер. хим.*, 127 – 134 (2010).
14. I. V. Vystorop, N. P. Konovalova, T. E. Sashenkova, et al., *Mendeleev Commun.*, **21**(5), 239 – 241 (2011).
15. В. Б. Ритов, В. И. Мельгунов, П. Г. Комаров и др., *Докл. АН СССР*, 233, 727 – 733 (1977).
16. Д. Бэйли, *Методы химии белков*, Мир, Москва (1980).
17. Р. Е. Либензон, Т. Т. Щецолдина, О. С. Ватолнина, *Вопросы мед. химии*, **4**, 526 – 530 (1977).
18. Н. П. Коновалова, С. А. Гончарова, Л. М. Волкова и др., *Вопр. онкологии*, **49**, 71 – 75 (2003).

Поступила 22.03.12

## THE EFFECT OF CYCLIC HYDROXAMIC ACIDS DERIVED FROM GLYCINE AND D, L-ALANINE ON THE ACTIVITY OF $\text{Ca}^{2+}$ HYDROLASES AND $\text{Mg}^{2+}$ ATPASE OF SARCOPLASMIC RETICULUM AND PHOSPHODIESTERASE OF CYCLIC GUANOSINE MONOPHOSPHATE

L. V. Tat'yanyenko, N. P. Konovalova, O. V. Dobrokhotova, I. Yu. Pikhteleva, D. V. Mishchenko\*, B. S. Fedorov, and I. V. Vystorop

Institute for Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow oblast, 142432 Russia;

\* e-mail: mdv@icp.ac.ru

The effect of cyclic hydroxamic acids (CHAs) derived from glycine and D, L-alanine on the enzymatic activity of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase of sarcoplasmic reticulum (SR  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase) and phosphodiesterase of cyclic guanosine monophosphate (cGMP PDE) has been investigated. CHAs I ( $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$ ), II ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$ ), III ( $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$ ), IV ( $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2$ ), V ( $\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2$ ), and VI ( $\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2$ ) are modulators of the SR  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase enzyme activity. Compounds I – VI separate the hydrolytic and transport functions of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase to various degrees, thus violating the ratio of extra- and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  ions that affects the adhesion of metastatic cells to a capillary endothelial tissue. Compounds IV and VI show maximum values of the index of metastases inhibition (IMI, %) for melanoma B-16 (amounting to 33 and 81%, respectively), which correlates with decreasing coefficient of transmembrane transfer of  $\text{Ca}^{2+}$  ions to SR vesicles (equal to 0.95 for IV and 0.5 for VI) as compared to the  $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{ATP}]$  ratio of 1.4 in the control. At the same time, CHAs I – VI do not affect the cGMP PDE function. The obtained experimental data allow potential antimetastatic drugs in the CHA family to be predicted.

**Keywords:**  $\text{Ca}^{2+}$ -activating- $\text{Mg}^{2+}$ -dependent ATPase of sarcoplasmic reticulum; phosphodiesterase of cyclic guanosine monophosphate; inhibition constant; ATP hydrolysis; active transport of calcium ions; cyclic hydroxamic acids