

УДК.576.32/36 (045)

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ДЕЙСТВИЯ АЛКАЛОИДОВ КАРАКОЛИНА И 14-АЦЕТИЛКАРАКОЛИНА НА ГЛАДКОМЫШЕЧНЫЕ КЛЕТКИ АОРТЫ¹Мирзаева Ю.Т., ²Тўланова Д.Т., ¹Усманов П.Б.¹Институт биофизики и биохимии при

Национальном университете Узбекистана.

²Наманганский государственный университетYmirzayeva@mail.ru

Резюме: Было изучено влияние дитерпеноидного алкалоида караколина и его производного 14-О-ацетилкаролина на сократительную активность гладкомышечных клеток аорты крысы. Эти результаты позволяют предположить, что изученные алкалоиды расслабляли аорту крысы, подавляя транспорта ионов Ca^{2+} через потенциал-зависимых и рецептор-управляемые Ca^{2+} -каналов. Релаксанта́нный эффект этих алкалоидов имел доза-зависимый характер, и при повышении их концентрации степень подавления сокращений препаратов аорты, индуцированных КС1 и фенилэфрином заметно возрастала.

Гладкомышечные клетки сосудов в основном состоят из медиального слоя кровеносных сосудов, которые подвергаются механическому воздействию и давлению кровотока и поддерживают тонус и сопротивление сосудов. Гладкомышечные клетки сосудов не только имеют нормальные клеточные функции, поддерживают свои внутренние свойства и геометрию сосудов, но также требуют некоторых важных действий для участия в регуляции биомеханических и биохимических свойств кровеносных сосудов [1]. Кроме того, гладкомышечные клетки сосудов изменяют объем сосудов и местное кровяное давление и постоянно регулирует физическую и геометрическую форму камеры крови в ответ на кровяное давление и механическую стимуляцию. [2,3].

Ионы Ca^{2+} играют ведущую роль в регуляции сократительной и функциональной активности гладкой мускулатуры кровеносных сосудов, которые обеспечивают нормальную деятельность сердечно – сосудистой системы, в целом [4]. Кальций является стимулятором многих клеточных функций, и в физиологических условиях внутриклеточный кальций присутствует в ГМК для регуляции многих различных биофизических и биохимических процессов. [5]. В связи с этим, нарушения в регуляции Ca^{2+} гомеостаза являются основной причиной патогенеза ряда заболеваний сердечно-сосудистой системы, включая сердечную недостаточность, инфаркт миокарда, гипертонию и инсульты [6].

Сократительная активность гладкомышечных клеток (ГМК) зависит, от ионов $[Ca^{2+}]_i$, однако механизмы, участвующие в её регуляции у ГМК имеют свои особенности. При этом, доминирующую роль, также играют потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы плазмалеммы, активация которых, обеспечивает поток ионов Ca^{2+} в цитоплазму ГМК, количество которого достаточно для инициации

сократительного процесса [7]. Помимо потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов поступление Ca^{2+} из внеклеточной среды в ГМК обеспечивают также запас – оперируемые и рецептор-управляемые Ca^{2+} -каналы, а также $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник [8]. При этом, обязательным условием для активации запас-оперируемых каналов, является истощение запасов ионов Ca^{2+} в СР. Как следует из названия, работа рецептор-управляемых Ca^{2+} -каналов контролируется рецепторами, которые взаимодействуя со специфическими гормонами и медиаторами управляют работой этих каналов [9]. При этом медиаторы и гормоны через специфические рецепторы активируют G белки, которые управляют работой различных ионных каналов и ферментов.

Целью: наших исследований является изучение действия 14-О-ацетилкараколина, полученного синтезом на основе алкалоида караколина, на сократительную активность гладкомышечных клеток аорты крысы.

Ранее нами было показано, что дитерпеноидный алкалоид караколин (рис.1.А.), выделенный из растений *Aconitum karakolikum* R, обладает слабым гипотензивным и антиаритмическим действием [10, 11]. При этом было обнаружено, что замена гидроксильной группы углеродного атома С-14 караколина на ацетильную группу, придаёт его производному 14-О-ацетилкараколину выраженную гипотензивную активность (рис.1.Б.)

В связи с этим с целью установления зависимости гипотензивной активности 14-О-ацетилкараколина от его структуры нами были выполнены сравнительные исследования действия караколина и 14-О-ацетилкараколина на сократительную активность ГМК аорты крысы.

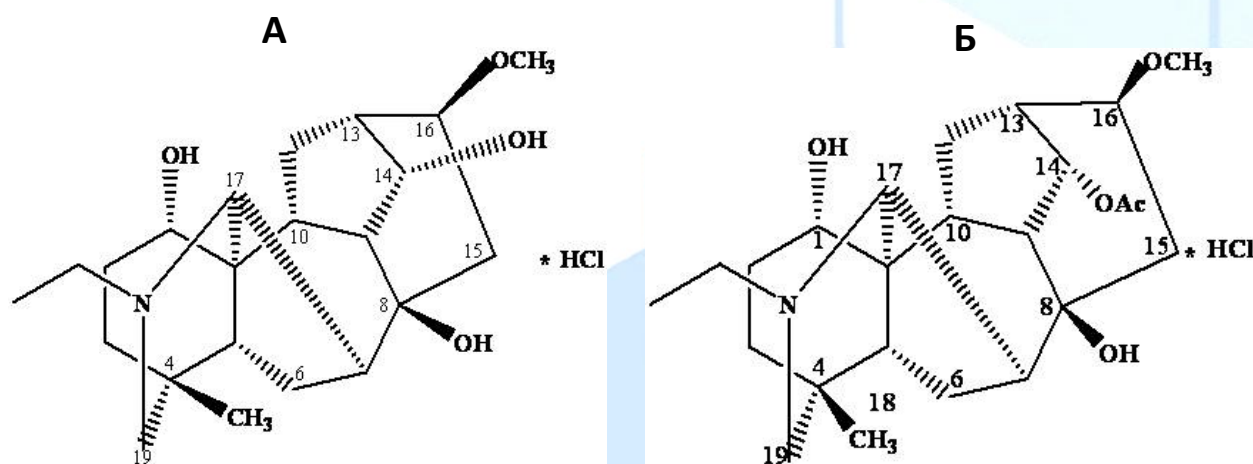


Рис.1. Химическая структура алкалоидов караколина (А) и 14-О-ацетилкараколина (Б).

Методы исследования и материалы. В экспериментах использовались изолированные препараты гладкомышечных сегментов аорты белых беспородных крыс (200-250 г). Крысы забивались с помощью цервикальной дислокации, вскрывали грудную клетку, извлекали аорту и помещали ее в физиологический раствор Кребса, следующего состава (мМ): NaCl-120,4; KCl-5;

NaHCO_3 -15,5; NaH_2PO_4 -1,2; MgCl_2 -1,2; CaCl_2 -2,5; $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ -11,5; pH 7,4. Аорту очищали от жировой и соединительной ткани и нарезали на сегменты в виде колец шириной 3-4 мм. Отпрепарированный сегмент аорты помещали в специальную экспериментальную камеру объемом 5 мл, где с помощью серебряной проволоки фиксировали между штоком электромеханического преобразователя (FT.03, Grass, США) и основанием камеры. Экспериментальная камера перфузировалась оксигенированным карбогеном (95% O_2 , 5% CO_2) раствором Кребса при постоянной температуре 37°C. Перед экспериментом сегменты аорты предварительно растягивали нагрузкой 1 г и промывали физиологическим раствором в течение 60 минут для достижения равновесия. Сокращения препаратов аорты вызывали внесением в экспериментальную камеру ФЭ (1 мкМ) или гиперкалиевым раствором (KCl, 50 мМ), путем эквимольного замещения им NaCl в растворе Кребса. В экспериментах также использовались бескальциевые растворы, для чего из раствора Кребса исключали ионы Ca^{2+} , а для связывания их следов добавляли ЭГТА (1 мМ). Сократительную активность препаратов аорты регистрировали с помощью усилителя РИТ (Grass, США) и самописца Endim 621,02 (Германия).

В работе использовали фенилэфрин (ФЭ), верапамил и ЭГТА фирмы Sigma (St. Louis, Mo., США).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы OriginPro 7.5 (OriginLab Corporation; США). При этом амплитуда сокращений выражалась в % от максимального сокращения (принятого за 100%), индуцированного ФЭ или гиперкалиевым раствором и рассчитывалась как среднее арифметическое значение для 5-6 различных экспериментов. Статистическую значимость различий между контрольными и опытными значениями определяли для ряда данных, используя парный t-тест. Значения $p < 0.05$ указывают на статистически значимые различия.

В таком состоянии кольца аорты выдерживались в течение 60 минут для достижения равновесия. К каждому препарату прикладывали начальное натяжение, соответствующее 1г. Сокращения препарата аорты индуцировали гиперкалиевым раствором (KCl 50 мМ) или 1 мкМ фенилэфрином (ФЭ). Сокращения препаратов регистрировали с помощью самописца марки (Endim 621.02). Величину изменений силы сокращений препарата оценивали в процентах от контроля, принятого за 100%.

Результаты и их обсуждение. В предварительных экспериментах было обнаружено, что караколин и 14-О-ацетилкараколин в широком диапазоне концентраций не влияют на базальный тонус препаратов аорты крысы. Однако в дальнейших экспериментах нами было обнаружено, что исследуемые алкалоиды эффективно расслабляют препараты аорты крысы, предварительно сокращенные 50 мМ KCl, т.е. обладают релаксантным действием. При этом релаксантное действие было более выражено у 14-О-ацетилкараколина и начинало проявляться уже при его концентрации 5 мкМ, у караколина было менее выражено и проявлялось только при его концентрации 50 мкМ. Релаксантное действие 14-О-ацетилкараколина имело дозо-зависимый характер, и при

увеличении концентрации алкалоида в диапазоне 5-35 мкМ сила сокращения препарата аорты крысы, индуцированная 50 мМ KCl снижалась от $12,1 \pm 4,2$ до $90 \pm 4\%$ (рис.2,Б). Величина $EC_{50\%}$, концентрация при которой 14-О-ацетилкараколин расслаблял препарат аорты на 50%, составляла 16,9 мкМ. В отличие от 14-О-ацетилкараколина зависимость релаксантного действия караколина от его концентрации была менее выражена и максимальное расслабление препарата аорты до $38,3 \pm 4,1\%$ наблюдалось при концентрации 200 мкМ (рис.2,А).

Релаксантный эффект этих алкалоидов имел доза-зависимый характер, и при повышении их концентрации степень подавления сокращений препаратов аорты, индуцированных гиперкалиевыми растворами, заметно возрастала. Эти данные указывают на то, что 14-О-ацетилкараколин более чем караколин в 3 раза эффективнее расслабляет препараты аорты в условиях гиперкалиевой контрактуры.

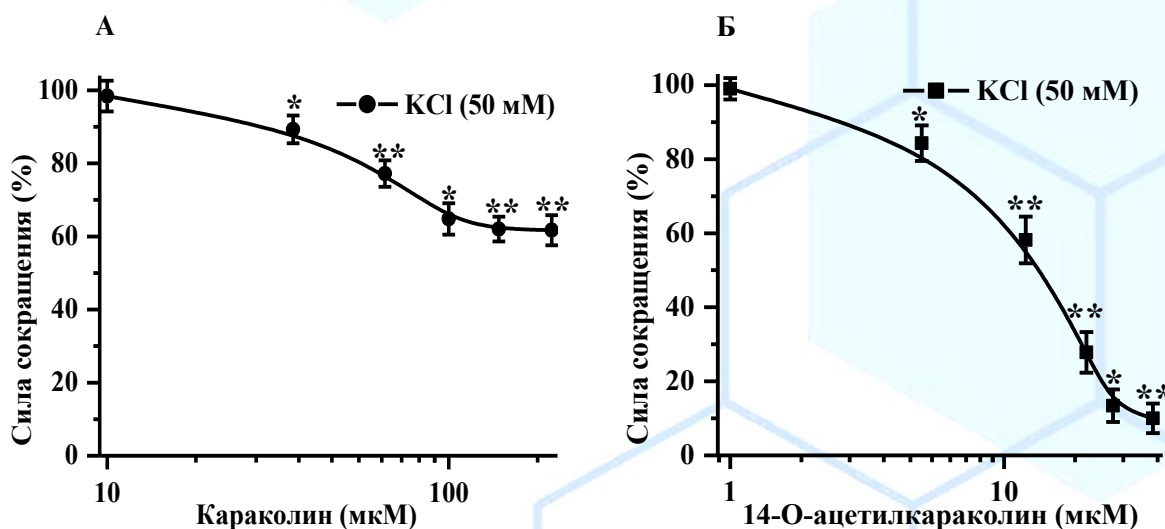


Рис.2. Влияние алкалоидов караколина(А) и 14-О-ацетилкараколина (Б) на сокращения аорты гиперкалиевым (50 мМ KCl) раствором Кребса. По оси ординат сила сокращения аорты, выраженная в процентах от силы, индуцированной 50 мМ KCl, принятой за 100%. По оси абсцисс -концентрация алкалоидов. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; $n = 6-7$).

Учитывая то, что KCl-индуцированное сокращение аорты крысы в основном обеспечивается активацией потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов плазмолеммы ГМК и ионами Ca^{2+} поступающим по ним [12], можно предположить, что наблюдаемое релаксантное действие караколина как и 14-О-ацетилкараколина возможно реализуется в результате блокирования им этих каналов. При этом, блокируя эти каналы и подавляя поступление ионов Ca^{2+} в ГМК караколин, по-видимому, вызывает снижение внутриклеточного уровня ионов Ca^{2+} , которое и приводит к релаксации препаратов аорты крысы. Для

проверки этого предположения нами была изучена зависимость релаксантного действия караколина от концентрации ионов Ca^{2+} в среде инкубации. Известно, что в растворах не содержащих ионы Ca^{2+} гиперкалиевые растворы не вызывают сокращений препаратов аорты, а кумулятивное добавление ионов Ca^{2+} в этих условиях сопровождается развитием сокращений, которые достигают контрольной амплитуды при 2.5 мМ CaCl_2 [13].

В этих экспериментах нами было обнаружено, что при инкубации препаратов аорты крысы в бескальциевых растворах Кребса в присутствии караколина и 50(мМ) KCl, добавление ионов Ca^{2+} также стимулировало развитие сократительных ответов, которые, однако, по амплитуде были значительно меньше, по сравнению с ответами, регистрируемых в контроле в отсутствие караколина (рис. 3.).

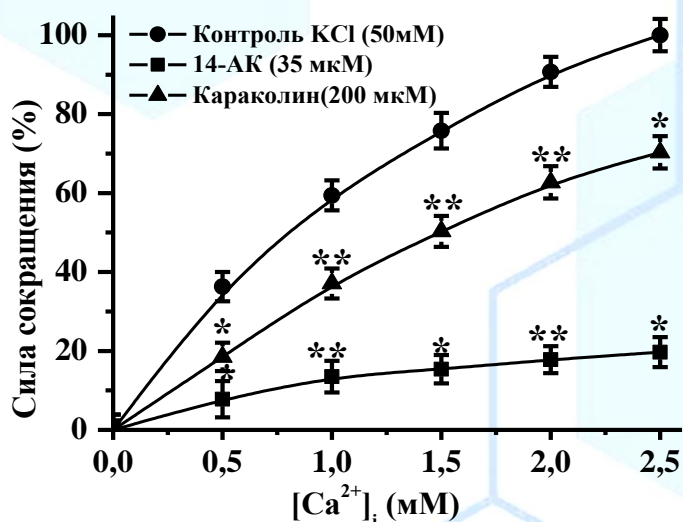


Рис. 3. Зависимость релаксантного действия алкалоидов 14-О-ацетилкараколина и караколина от $[\text{Ca}^{2+}]_0$ и состояния потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов L-типа. Влияние 14-О-ацетилкараколина и караколина на сокращения аорты крысы, индуцированные кумулятивным добавлением CaCl_2 в растворы Кребса не содержащих ионы Ca^{2+} . По оси ординат - сила сокращения аорты, выраженная в процентах от силы, индуцированной 50 мМ KCl и принятой за 100%. По оси абсцисс-концентрация CaCl_2 (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; n = 5).

В частности, в присутствии 200 мкМ караколина добавление в бескальциевый раствор 2,5 мМ CaCl_2 , вызывало сокращение препарата аорты, которое было на $29,7 \pm 4,1\%$ меньше сокращения регистрируемого в отсутствие алкалоида. В аналогичных экспериментальных условиях в присутствии 14-О-ацетилкараколина (35 мкМ) добавление 2,5 мМ CaCl_2 , вызывало сокращение, которое по амплитуде было на $80,3 \pm 4,1\%$ меньше, по сравнению с сокращением в контроле без алкалоида.

Результаты этих экспериментов убедительно свидетельствуют о том, что релаксантное действие исследуемых алкалоидов в условиях КСI-индуцированной контрактуры связано с подавлением транспорта ионов Ca^{2+} из внеклеточной среды в цитоплазму ГМК через потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы плазмалеммы. Для подтверждения взаимодействия исследуемых алкалоидов с потенциал-зависимыми Ca^{2+} -каналами плазмалеммы ГМК нами были выполнены эксперименты со специфическим блокатором этих каналов-верапамилем [14].

Как показали результаты этих экспериментов верапамил сам эффективно расслабляет препараты аорты крысы, предварительно сокращенные гиперкалиевыми растворами, путем подавления поступления ионов Ca^{2+} в ГМК аорты крысы. В частности, добавление в среду инкубации 0,1 мкМ верапамила ($IC_{50\%}$) сопровождалось расслаблением препарата аорты до $50 \pm 2,2\%$ (Рис.4).

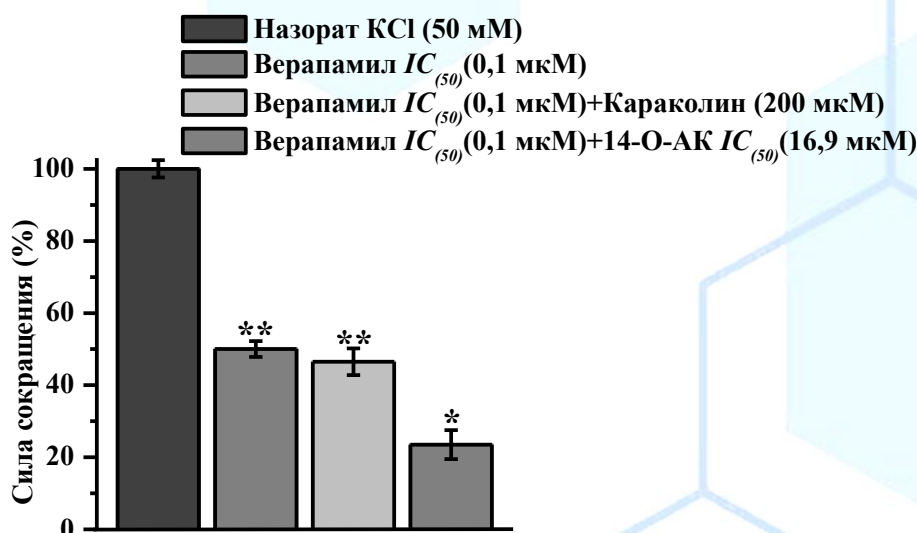


Рис.4. Влияние верапамила на релаксантное действие 14-О-ацетилкараколина и караколина. Сила сокращения препарата аорты крысы, индуцированной 50 мМ КСI, принята за 100 %. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; $n = 4-5$).

Добавление 200 мкМ караколина на фоне этого эффекта верапамила, не вызывало дополнительного расслаблению препаратов аорты крысы, в то время как 14-О-ацетилкараколин (16,9 мкМ) (концентрация соответствующая его значению $IC_{50\%}$), в аналогичных условиях, вызывал дополнительное расслабление препарата аорты крысы до $26,5 \pm 4,1\%$ (Рис.4).

Отсутствие эффекта караколина в присутствии верапамила свидетельствует о том, что его релаксантное действие в основном обусловлено подавлением поступления ионов Ca^{2+} в ГМК через потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы. В отличие от этого способность 14-О-ацетилкараколина дополнительно расслаблять препараты аорты на фоне эффекта верапамила указывает на то, что в основе его релаксантного действия лежит не только подавление поступления ионов Ca^{2+} через потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы, но и его влияние и на другие пути поступления ионов Ca^{2+} в цитоплазму ГМК. Действительно нами было

показано, что релаксантное действие 14-О-ацетилкараколина сохраняется и на препаратах аорты крысы, предсокращенные агонистом α -адренорецепторов фенилэфрином (ФЭ), развитие которых обеспечивается ионами Ca^{2+} поступающим не только через потенциал-зависимые, но и через рецептор-управляемые Ca^{2+} -каналы, а также высвобождаемыми из СР [15,16].

Вместе с тем нами было обнаружено, что караколин и в условиях ФЭ-индуцированной контрактуры способен расслаблять препараты аорты, однако его релаксантный эффект как и в условиях КС1-индуцированной контрактуры, был менее выражен по сравнению с эффектом 14-О-ацетилкараколина (рис.5.А). При этом следует отметить, что релаксантный эффект 14-О-ацетилкараколина в условиях ФЭ-индуцированной контрактуры также имеет дозо-зависимый характер и при его концентрации 5 мкМ он вызвал расслабление препарата аорты на $18,6 \pm 4,3\%$, а максимальное расслабление до $88,1 \pm 4,1\%$ наблюдалось при его концентрации 50 мкМ. (рис.5.Б). Результаты этих экспериментов свидетельствуют о том, что релаксантное действие 14-О-ацетилкараколина, в условиях ФЭ-индуцированной контрактуры, в основном обусловлено его влиянием на транспорт ионов Ca^{2+} через рецептор-управляемые Ca^{2+} -каналы плазмалеммы и их высвобождение из СР ГМК.

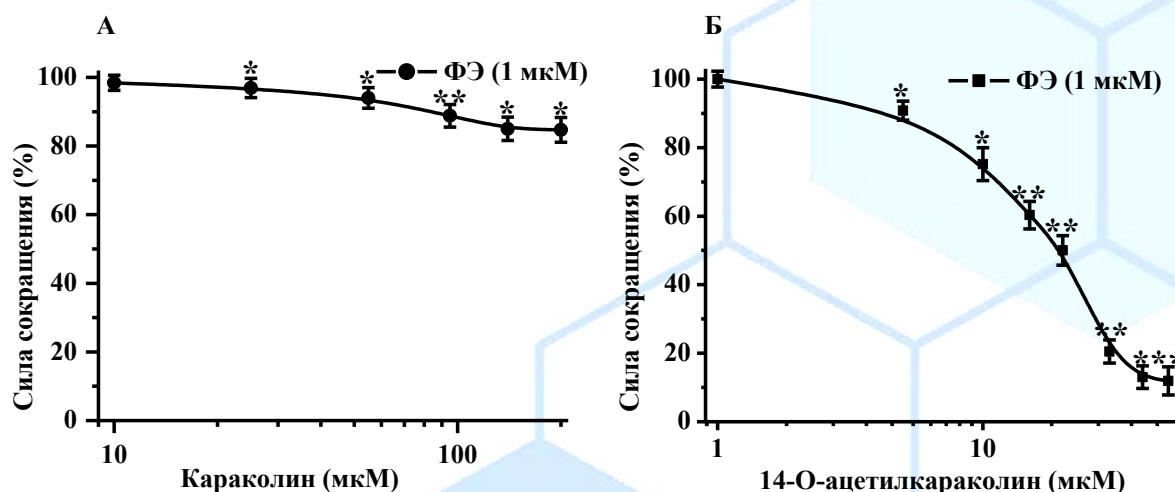


Рис.5. Релаксантные действие караколина (А) и 14-О-ацетилкараколина (Б) в условиях ФЭ-индуцированной контрактуры аорты крысы. Сила сокращения препарата аорты крысы, индуцированная 1 мкМ ФЭ, принята за 100%. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; $n = 6-7$).

Таким образом, анализ полученных данных показывают, что алкалоиды караколин и его производное 14-О-ацетилкараколин обладают релаксантной активностью и расслабляют препараты аорты крысы предварительно сокращённые гиперкалиевым раствором и фенилэфрином. При этом, релаксантное действие 14-О-ацетилкараколина более выражено и имеет явный дозо-зависимый характер. Релаксантное действие караколина, в условиях КС1-

индуцированной контрактуры, подавлялось с верапамилом, что свидетельствует о том, что его эффекты в основном обусловлены блокированием потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов ГМК. В отличие от караколина эффекты 14-О-ацетилкараколина сохранялись в присутствии верапамила, и он одинаково эффективно расслаблял препараты аорты крысы в условиях КС1 (50мМ) контрактуры.

Заключение. Эти данные свидетельствуют о том, что в реализации релаксантного действия 14-О-ацетилкараколина принимают участие множественные механизмы, включая блокаду потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов (в условиях КС1-индуцированной контрактуры), подавление транспорта ионов Ca^{2+} через рецептор-управляемые Ca^{2+} -каналы и их высвобождения из СР (в условиях ФЭ-индуцированной контрактуры). Не вызывает сомнения то, что эти особенности релаксантного действия 14-О-ацетилкараколина обусловлены наличием в его структуре ацетилной группы у углеродного атома С-14 ликоктонинового скелета, которое у караколина занимает ОН-группа.

Ключевые слова: аорта, гладкомышечная клетка, саркоплазматический ретикулум, фенилэфрин, Ca^{2+} канал, караколин, ацетилкараколин.

ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Li, N., Sanyour, H., Remund, T., Kelly, P., and Hong, Z. (2018). Vascular extracellular matrix and fibroblasts-coculture directed differentiation of human mesenchymal stem cells toward smooth muscle-like cells for vascular tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C* 93, 61–69. doi: 10.1016/j.msec.2018.07.061.
2. Hartman, C. D., Isenberg, B. C., Chua, S. G., and Wong, J. Y. (2016). Vascular smooth muscle cell durotaxis depends on extracellular matrix composition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113, 11190–11195. doi: 10.1073/pnas.1611324113.
3. Leloup, A. J. A., Van Hove, C. E., De Moudt, S., De Meyer, G. R. Y., De Keulenaer, G. W., and Franssen, P. (2019). Vascular smooth muscle cell contraction and relaxation in the isolated aorta: a critical regulator of large artery compliance. *Physiol. Rep.* 7:e13934. doi: 10.14814/phy2.13934.
4. O'Rourke B., Kass D.A., Tomaselli G.F., Kääb S., Tunin R., Marbán E. Mechanisms of altered excitation-contraction coupling in canine tachycardia-induced heart failure // *Circ. Res.* – 1999. – V. 84. – P. 562-570.
5. Huang, H., Sun, Z., Hill, M. A., and Meininger, G. A. (2018). A calcium mediated mechanism coordinating vascular smooth muscle cell adhesion during KCl activation. *Front. Physiol.* 9:a1810. doi: 10.3389/fphys.2018.01810.
6. Pogwizd S.M., Qi M., Yuan W., Samarel A.M., Bers D.M. Upregulation of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger expression and function in an arrhythmogenic rabbit model of heart failure // *Circ. Res.* – 1999. – V. 85. – P. 1009-1019.
7. Cribbs L.L. Vascular Smooth Muscle Calcium Channels. Could T be a target // *Circ. Res.* – 2001. – V. 89. – P. 560-567.
8. Sanders K.M. Signal transduction in smooth muscle: mechanisms of calcium handling in smooth muscles // *J. Appl. Physiol.* – 2001. – V. 91. – P. 1438-1449.

9. Jaggar J.H., Porter V., Nelson M.T. Calcium sparks in smooth muscle // *Am. J. Physiol.* – 2000. V. 278. – P. 235-256.
10. Джахангиров, Ф.С. Садритдинов, И.Хамдамов. Докл. АНУз ССр №1, с.32- 34. (1976) К фармакологии алкалоидов караколина и аконифина.
11. Джахангиров Ф.Н. Султаходжаев М.Н. Салимов Б.Т. Дитерпеноидные алкалоиды как новый класс антиаритмических средств. Взаимосвязь структура-активность. *Химия природ соединений* // 1997. №2, с.254-270.
12. Ratz P., Berg K., Urban N., Miner A. Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2005. – V. 288. – P. C769-C783.
13. Nishimura K., Ota M., Ito K. Existence of two components in the tonic contraction of rat aorta mediated by α_1 -adrenoceptor activation // *British Journal of Pharmacology.* – 2002. – V. 102. – P. 215-221.
14. Cleary L., Vandeputte C., Kelly J.G., Docherty J.R. Actions of R- and S-verapamil and nifedipine on rat vascular and intestinal smooth muscle // *Auton. Autacoid. Pharmacol.* – 2004. – V. 24. – P. 63-67.
15. Sanders K.M. Signal Transduction in Smooth Muscle. Invited Review: Mechanisms of calcium handling in smooth muscles // *J. Appl. Physiol.* – 2001. – V. 91. – P. 1438-1449.
16. Karaki H., Ozaki H., Hori M., Mitsui-Saito M., Amano K., Harada K., Miyamoto S., Nakazawa H., Sato K. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle // *Pharmacol. Reviews.* – 1997. – V. 49. – P. 157-230.