



УДК: 576.32.36(045)

Юлдузхон МИРЗАЕВА,

Институт Биофизики и биохимии при НУУз, 1 курс докторант (DSc)

E-mail: Ymirzayeva@mail.ru.

Пулат УСМАНОВ,

Институт Биофизики и биохимии при НУУз, зав.лаб.д.б.н.профессор

Дилноза ИСМАИЛОВА,

Институт химии растительных веществ им. акад. С.Ю.Юнусова,

АН РУз, 2 курс докторант (DSc).

Бурхон ЭЛМУРАДОВ,

Институт химии растительных веществ им. акад.

С.Ю.Юнусова, АН РУз, к.ф.д. профессор

Шохидахон ИСАЕВА,

Андижанский государственный Университет 2-курс магистрант

Саида МУРАТОВА

Национальный Университет Узбекистана преподаватель кафедры

«Общей и нефтегазовый химии»,

Рецензент: Д.Х.Мирхамитова, декан факультета металлургии и химических технологий Алмалыкского филиала ТГТУ имени И.А.Каримова, д.х.н., профессор.

INFLUENCE OF 4-AMINO-5-(2-AMINOPHENYL)-2,4-DIHYDRO-3H-1,2,4-TRIAZOLO-3-THIONE ON $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - EXCHANGER OF SMOOTH MUSCLE CELLS OF THE RAT AORTA

Abstract

The aim of this investigation has been determination of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in vasorelaxation induced by 4-amino-5-(2-aminophenyl)-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazolo-3-thione (D-378), in rat aortic rings. It was found that D-378 has a relaxant activity and in dependence of concentration, inhibits aortic ring contraction induced by low Na^+ solution and ouabain. Comparison of obtained results showed that D-378 suppressed aortic ring contraction induced by these two procedures in almost the same extent and with approximately similar IC_{50} values. Because the contractions induced by the low Na^+ solution and ouabain were mainly due increasing Ca^{2+} influx mediated by the reverse mode of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, these data indicate that the inhibitory effect of D-378 results from a direct blockade of Ca^{2+} influx through exchanger. Taken together, these results provide some evidence that D-378 strongly inhibits Ca^{2+} influx through the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, suggesting that this effect of triazole may also be related to its vasodilating activity. The fact that D-378 has a significant ability to block the influx of Ca^{2+} through the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger may be important in some pathological conditions when the exchanger operating in reverse mode has caused Ca^{2+} overload and therefore may increase overall vasoconstriction.

Key words: aortic smooth muscle, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, ouabain, choline chloride.

4-АМИНО-5-(2-АМИНОФЕНИЛ)-2,4-ДИГИДРО-3Н-1,2,4-ТРИАЗОЛО-3-ТИОН (Д-378)НИНГ КАЛАМУШ АОРТАСИГА ВАЗОРЕЛАКСАНТ ТАЪСИРИДА $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ АЛМАШИНУВЧИНИНГ РОЛИ

Аннотация

Ушбу тадқиқотнинг мақсади каламуш аортаси халқаларида 4-амино-5-(2-аминофенил)-2,4-дигидро-3Н-1,2,4-триазоло-3-тион (Д-378)нинг вазорелаксат таъсирида $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ алмашинувчининг ролини ўрганиш эди. Биз тадқиқот давомида (Д-378) триазолининг каламуш аортаси препаратининг вазорелаксат таъсир эффекида $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -алмашинувчи тизим иштироки борлигини аниқладик. Ушбу тажрибалар махсус экспериментал Na^+ иони камайтирилган ва оуабайн мавжуд шароитларда ўрганилди. Навбатдаги тажриба натижалари шуни кўрсатдики, Na^+ -сиз эритма ва оуабайн ёрдамида юзага келган аорта қисқаришлар кучини Д-378 бир хил самарали сустайтиради ва бунинг тасдиғи уларнинг ярим максимал IC_{50} қийматларини яқинлигидир. Ушбу олинган натижалар, Д-378 нинг $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ алмашувчи орқали Ca^{2+} оқимини сезиларли равишда камайтириб, триазолнинг бу таъсири унинг томирларини кенгайтирувчи фаоллигига ҳам боғлиқ бўлиши мумкин деб тахмин қилиш имконини беради. Демак, Д-378 нинг $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ алмашувчи орқали Ca^{2+} оқимини ингибирлаш хусусияти, тескари режим фаолиятидаги $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ алмашинувчи Ca^{2+} нинг ортикча юкланишига олиб келадиган ва шунинг учун умумий томир торайиши кучайиши мумкин бўлган баъзи патологик шароитларда муҳим бўлиши мумкин.

Калит сўзлар: аорта силлиқ мускуллари, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ алмашинувчи, оуабайн, холин хлорид.

ВЛИЯНИЕ 4-АМИНО-5-(2-АМИНОФЕНИЛ)-2,4-ДИГИДРО-3Н-1,2,4-ТРИАЗОЛО-3-ТИОНА НА $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - ОБМЕННИК ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК АОРТЫ КРЫС

Аннотация

Целью данного исследования было изучение роли $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменника в вазорелаксации, индуцированной 4-амино-5-(2-аминофенил)-2,4-дигидро-3Н-1,2,4-триазоло-3-тионом (Д-378), в кольцах аорты крыс. Показано, что Д-378 имеет релаксатную активность и в зависимости от концентрации ингибирует сокращение колец аорты, вызванное раствором с низким содержанием Na^+ и оуабайном. Установлено, что Д-378 подавляет сокращение колец аорты, вызванное этими

двумя процедурами, практически в одинаковой степени и с примерно схожими значениями IC_{50} . Поскольку сокращения, вызванные раствором с низким содержанием Na^+ и оубаином, были в основном связаны с усилением притока Ca^{2+} , опосредованным обратным режимом обменника Na^+/Ca^{2+} , эти данные указывают на то, что ингибирующий эффект Д-378 является результатом прямой блокады притока Ca^{2+} через этот обменник. Полученные результаты предоставляют определенное доказательство того, что Д-378 сильно ингибирует приток Ca^{2+} через Na^+/Ca^{2+} -обменник, предполагая, что этот эффект триазола также может быть связан с его сосудорасширяющей активностью. Тот факт, что Д-378 обладает значительной способностью блокировать приток Ca^{2+} через Na^+/Ca^{2+} -обменник, может быть важен при некоторых патологических состояниях, когда обменник, работающий в обратном режиме, вызывает перегрузку Ca^{2+} и, следовательно, может усиливать общую вазоконстрикцию.

Ключевые слова: гладкие мышцы аорты, Na^+/Ca^{2+} -обменник, оубаин, холин хлорид.

Введение. Na^+/Ca^{2+} -обменник обуславливает перенос ионов, которые обменивают Na^+ и Ca^{2+} либо в режиме оттока Ca^{2+} , либо в режиме их притока, в зависимости от мембранного потенциала и трансмембранных ионных градиентов. В артериальных гладкомышечных клетках обменник Na^+/Ca^{2+} как предполагают, участвует в поддержании сосудистого тонуса, регулируя концентрацию цитозольного Ca^{2+} . Недавние фармакологические и генно-инженерные исследования показали, что режим притока Ca^{2+} в его сосудистый Na^+/Ca^{2+} -обменник типа 1 (NCX1) участвует в патогенезе солевой гипертензии [1].

Na^+/Ca^{2+} -обменник может обеспечивать транспорт ионов Ca^{2+} в двух направлениях, в клетку и из неё, что весьма важно для поддержания внутриклеточного баланса Ca^{2+} в ГМК и их сократительной активности [2].

Наряду с этим при изменении концентрационных градиентов ионов Na^+ и Ca^{2+} и мембранного потенциала Na^+/Ca^{2+} -обменник может работать в обратном режиме и переносить ионы Ca^{2+} внутрь клетки и увеличивая их внутриклеточную концентрацию в ГМК, вызывать их сокращение [3].

Для оценки роли обменника Na^+/Ca^{2+} в обеспечении релаксирующего действия триазола Д-378 изучали его влияние на сокращения препаратов аорты, индуцированные модифицированными растворами Кребса, не содержащими ионов Na^+ . Замена нормального раствора Кребса на модифицированный холинхлорид сопровождается быстрым развитием сокращения, которое достигает предела в течение 15 мин. При этом максимальная амплитуда этого сокращения составила $55,4 \pm 4,1\%$ от контроля индуцированного фенилэфрином (1мкМ). Препараты аорты могут длительное время находиться в таком сокращённом состоянии и после промывания нормальным раствором Кребса способны восстанавливать базальный тонус.

Ранее было показано, что Д-378 обладает релаксantным действием [4]. Модификация молекулы триазола заменой оксадиазольного кольца на триазольное, сопровождалось существенным увеличением релаксantной активности Д-378 (рис.1).

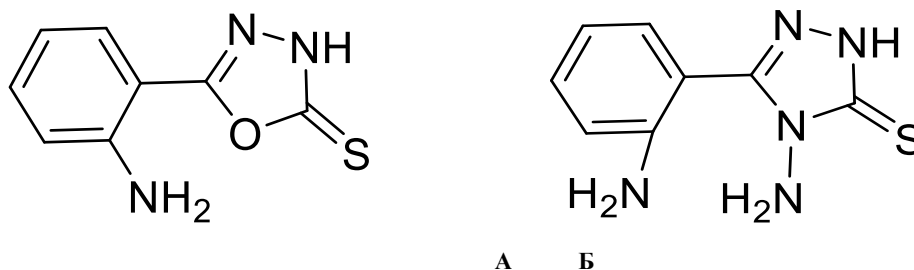


Рис. 1. Структурная формула А) оксадиазола Д-115 и Б) триазола Д-378

Как было установлено, такая модификация молекулы оксадиазола приводит также к заметному усилению релаксantного действия Д-378, которое обусловлено уменьшением $[Ca^{2+}]_i$ в ГМК.

Исходя из этого, целью настоящих исследований было исследование Д-378 на транспорт ионов Ca^{2+} через Na^+/Ca^{2+} -обменник, который играет важную роль в регуляции $[Ca^{2+}]_i$ в ГМК [5]. В работе использовали фенилэфрин верапамил, глюкозу и ЭГТА, $NaHCO_3$, $MgCl_2$, $CaCl_2$ фирмы Sigma (USA), $NaCl$, KCl , NaH_2PO_4 (Россия), ДМСО и гидразингидрат нового производного 4-амино-5-(2-аминофенил)-2,4-дигидро-3Н-1,2,4-триазоло-3-тиона (чистота 97%) получали в Институте химии растительных веществ им. акад. С.Ю. Юнусова.

Материалы и методы исследования. Исследования проводили на изолированных препаратах аорты крыс, которые выделяли из белых беспородных крыс (200-250 г). После удаления соединительной ткани и жира, аорту нарезали на сегменты в виде колец шириной 2-3 мм, которые закрепляли с помощью серебряной проволоки в экспериментальной камере объемом 5 мл, которая регулярно перфузировалась физиологическим раствором Кребса следующего состава (мМ): $NaCl$ –118; KCl –4,8; $MgSO_4$ –1,2; KH_2PO_4 –1,2; $CaCl_2$ –2,5; $NaHCO_3$ –25; глюкоза–11; pH 7,4. Раствор Кребса оксигенировали карбогеном (O_2 –95%, CO_2 –5%) при температуре $37 \pm 0,5^\circ C$. Препараты аорты выдерживали в течение 60 мин. для обеспечения равновесия, и регистрировали их сократительную активность датчиком натяжения Grass FT.03 (США) и самописцем Endim 621,02 (Германия).

Результаты и их обсуждение. Ранее нами было обнаружено, что триазол Д-378 обладает релаксantной активностью и эффективно расслабляет препараты аорты крысы, предварительно сокращенные гиперкалиевым раствором и фенилэфрином. В тоже время релаксantное действие Д-378 зависело от концентрации ионов Ca^{2+} в среде инкубации, и заметно подавлялось нифедипином – специфическим блокатором потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов. Эти данные свидетельствовали о том, что в основе релаксantного действия Д-378 лежит подавление транспорта ионов Ca^{2+} в ГМК и последующее снижение $[Ca^{2+}]_i$ в них [4]. Учитывая то, что Na^+/Ca^{2+} -обменник играет важную роль в регуляции $[Ca^{2+}]_i$ в ГМК [5], не исключалось, что релаксantное действие Д-378 связано также с его влиянием на функцию Na^+/Ca^{2+} -обменника. В гладкомышечных клетках сосудов Na^+/Ca^{2+} -обменник, как и Ca^{2+} -АТФазы, как полагают, способствует

экструзии Ca^{2+} из цитозоля в процессе релаксации [5,6]. В гладких мышцах сосудов $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменник может в основном отвечать за вытеснение Ca^{2+} для поддержания их гомеостаза. Однако имеется мало информации о сосудистом $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменнике, по сравнению с таковым сердечным.

Для изучения влияния Д-378 на транспорт ионов Ca^{2+} через $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник ГМК использованы следующие стандартные экспериментальные приёмы, позволяющие оценивать функциональную активность $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника. Известно, что удаление ионов Na^+ из раствора Кребса, заменой их на эквимольный холинхлорид, индуцирует сокращение препаратов аорты, которое обусловлено поступлением ионов Ca^{2+} в ГМК через $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник [7]. Аналогично, оубаин вызывает сокращение препаратов аорты, которое также обусловлено поступлением ионов Ca^{2+} в ГМК через $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник, в результате изменения режима его работы [8], вызванного блокированием Na^+/K^+ -АТФазы и увеличением концентрации ионов Na^+ . Как показали наши контрольные эксперименты, замена нормального раствора Кребса на раствор без ионов Na^+ , вызывает незамедлительное сокращение препаратов аорты, которое в течение 10-15 мин. достигает максимальной амплитуды, составляющей $70,1 \pm 4,3\%$ от сокращения индуцируемого 1 мкМ фенилэфрина (принятого за 100%). В этих условиях, добавление блокатора потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов верапамила (10 мкМ), сопровождалось уменьшением силы сокращения препаратов аорты, индуцируемых без Na^+ -растворами, с $70,1 \pm 4,3$ до $53,4 \pm 3,6\%$. Такое уменьшение силы сокращения препаратов аорты, индуцированных раствором не содержащим Na^+ находит своё объяснение подавлением верапамилом поступления ионов Ca^{2+} в ГМК через потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы.

Результаты этих контрольных экспериментов свидетельствуют о том, что развитие сокращений препаратов аорты, индуцированные Na^+ -растворами в присутствии верапамила, в большей степени обеспечиваются ионами Ca^{2+} , поступающих в ГМК через $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник.

В результате проведения исследования, выявлено, что триазол Д-378 заметно подавляет сокращения препаратов аорты, индуцируемые без Na^+ -растворами. При этом эффект Д-378 имел дозозависимый характер и при его концентрации 35 мкМ сила сокращения препарата аорты, индуцируемая без Na^+ -раствором, уменьшалась на $5,4 \pm 4,1\%$, а при его концентрации 150 мкМ наблюдалось максимальное уменьшение на $35 \pm 4,8\%$ по сравнению с контролем, полученного в присутствии 10 мкМ верапамила и принятого за 100% (рис. 2.).

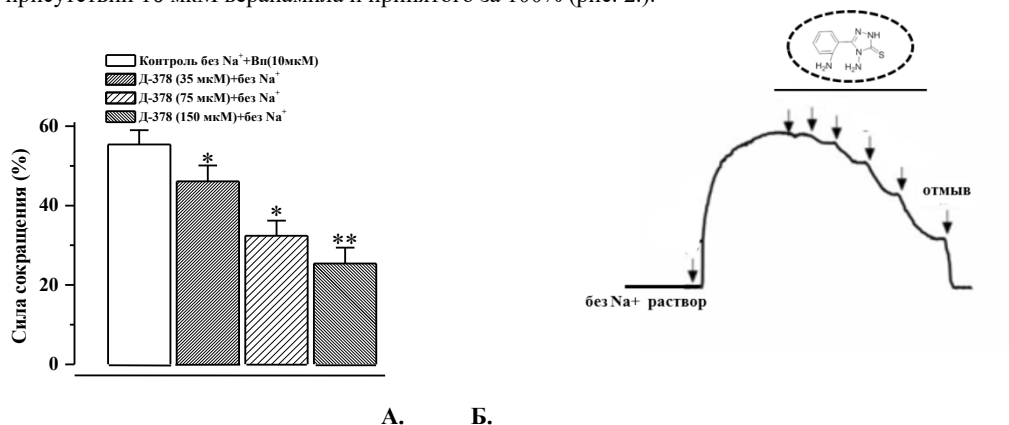


Рис.2. А). Влияние триазола Д-378 на сокращения препаратов аорты крысы, индуцированные раствором Кребса без ионов Na^+ . По оси ординат сила сокращения аорты, выраженная в процентах от контроля, полученного при действии без Na^+ -раствора в присутствии верапамилом (10 мкМ) и принятого за 100%. Во всех случаях $P < 0,05$ ($n = 4$). Б) – типичная кинетика реакции кольца аорты на добавки исследуемого соединения в растворе без Na^+ ; справа вверху (Б) приведена структурная формула Д-378. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; $n = 4$).

Дополнительное подтверждение взаимодействия триазола Д-378 с $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменником ГМК было получено в экспериментах с сердечным гликозидом оубаином, который в концентрации 20 мкМ (в присутствии 10 мкМ верапамила) вызывал максимальное сокращение препаратов аорты до $76,4 \pm 3,4\%$. Как показали результаты этих экспериментов Д-378 и в этих условиях эффективно подавляет сокращения препаратов аорты, индуцируемые оубаином. При этом эффект Д-378 также имел дозозависимый характер и при концентрации 50 мкМ он снижал силу сокращения препаратов аорты на $48 \pm 3,5\%$, а при 250 мкМ вызывал максимальное подавление на $72 \pm 4,4\%$ от контроля (рис.3.).

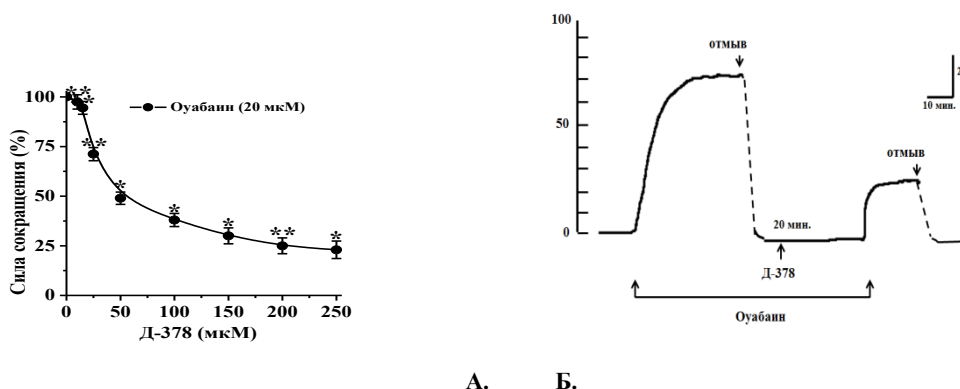


Рис.3. А) Влияние алкалоида Д-378 на сокращения препаратов аорты крысы, индуцированные оуабаином (20 мкМ) в растворах Кребса;

По оси ординат сила сокращения препаратов аорты, выраженная в процентах от контроля, полученного при действии оуабаина (20 мкМ), в присутствии верапамила (10 мкМ) и принятого за 100%. Во всех случаях $P < 0,05$ ($n = 4$).

Б) Записи эффекта Д-378 на сокращения аорты, индуцированные оуабаином (20 мкМ).

Таким образом, результаты этих экспериментов подтверждают, что триазол Д-378 эффективно подавляет сокращения препаратов аорты, индуцированные без Na^+ -растворами Кребса и оуабаином. Учитывая то, что развитие сокращений в этих условиях обусловлено в основном поступлением ионов Ca^{2+} в ГМК через $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменник, можно заключить, что наблюдаемый нами эффект Д-378, связан с подавлением поступления ионов Ca^{2+} в ГМК через $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник.

В целом, данные полученные в проведенных исследованиях указывают на то, что в основе вазорелаксантного действия Д-378 лежит не только его взаимодействие с потенциал-зависимыми Ca^{2+} -каналами, но и его влиянием на функцию $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника ГМК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Takahiro Iwamoto, Vascular $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger: implications for the pathogenesis and therapy of salt-dependent hypertension., *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290: R 536–R545, 2006.
2. Филипсон К.Д., Николл Д.А.: Натриево-кальциевый обмен: молекулярная перспектива. *Annu Rev Physiol* 2000, 62: 111–133.
3. Hinata M, Yamamura H, Li L, Watanabe Y, Watano T, Imaizumi Y, Kimura J. Стехиометрия обмена $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ составляет 3:1 в желудочковых миоцитах морской свинки. *Дж. Физиол.* 2002 г.; 545 : 453–461.
4. Mirzayeva Yu. T., Ismailova D.S., Usmanov P.B., Rejabboeva N. L., //The effect of D-115 oxadi-azole and D-378 triazole on the contractile activity of rat aortic smooth muscle segments// *British View* ISSN 2041-3963. Volume 7 Issue2 2022 DOI 10.5281/ Universal impact factor 8.528 SJIF 2022: 4.629. P.85-91
5. Blaustein MP, Lederer WJ. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev* 1999; 79: 763–854.
6. Quednau BD, Nicoll DA, Philipson KD. The sodium/calcium exchanger family-SLC8. *Pflugers Arch* 2004; 447: 543–548.
7. Zhang J, et al. Knockout of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in smooth muscle attenuates vasoconstriction and L-type Ca^{2+} channel current and lowers blood pressure. *Am. J. Physiol.* 2010, 298, p.1472–1483.
8. Assaf Arnon, John M. Hamlyn and Mordecai P. Blaustein, Ouabain augments Ca^{2+} transients in arterial smooth muscle without raising cytosolic Na^+ . Department of Physiology, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, 2000, 679-691.