

С. К. БОГУС<sup>1</sup>, П. А. ГАЛЕНКО-ЯРОШЕВСКИЙ<sup>1</sup>, А. В. УВАРОВ<sup>1</sup>, К. Ф. СУЗДАЛЕВ<sup>2</sup>

## ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНОГО ИНДОЛА SS-68 НА ГЛАДКОМЫШЕЧНЫЕ КЛЕТКИ ИЗОЛИРОВАННОЙ ТРАХЕИ МОРСКИХ СВИНОК

<sup>1</sup>Кафедра фармакологии ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Россия, 350063, г. Краснодар, ул. Седина, 4; тел. (8612) 262-34-99. E-mail: kybfarma@rambler.ru;  
<sup>2</sup>кафедра химии природных и высокомолекулярных соединений химического факультета ЮФУ, Россия, 344090, г. Ростов-на-Дону, ул. Зорге, 7; тел. 8-918-856-71-00. E-mail: konsuz@gmail.com

Соединение SS-68 оказывает *in vitro* расслабляющее влияние на гладкие мышцы колец трахеи морской свинки. Такое действие является  $\beta_2$ -адреноселективным, а характер его проявления зависит от способа стимуляции препарата трахеи. Продолжительность действия соединения SS-68 не так длительно (около 15 мин на восстановление тонуса после воздействия концентрации  $10^{-7}$  М и около 60 мин после максимальной концентрации) по сравнению с суперселективным  $\beta_2$ -адреномиметиком индакатерола малеатом (тонус колец трахеи после отмывания не восстанавливался). Амплитуда расслабления гладких мышц под влиянием соединения SS-68 в концентрации  $10^{-7}$  М составила около 47% от амплитуды расслабления, вызываемого индакатерола малеатом.

*Ключевые слова:* соединение SS-68, гистамин, серотонин, ацетилхолин, изолированная трахея морских свинок,  $\beta_2$ -адренорецепторы.

S. K. BOGUS<sup>1</sup>, P. A. GALENKO-YAROSHEVSKY<sup>1</sup>, A. V. UVAROV<sup>1</sup>, K. F. SUZDALEV<sup>2</sup>

## THE INFLUENCE OF INDOL DERIVATIVE SS-68 ON SMOOTH MUSCLE CELLS OF INSULATED TRACHEA OF GUINEA PIGS

<sup>1</sup>Department of pharmacology of the ISBEI HPE «Kuban state medical university» of the Ministry of health of the Russian Federation, Russia, 350063, Krasnodar, Sedin str., 4; tel. (8612) 262-34-99. E-mail: kybfarma@rambler.ru;  
<sup>2</sup>department of chemistry of natural and macromolecular compounds of chemistry faculty of the SFU, Russia, 344090, Rostov-on-Don, Zorge str., 7; tel. 8-918-856-71-00. E-mail: konsuz@gmail.com

The substance SS-68 relaxes smooth muscles cells of tracheal rings of guinea pig *in vitro*. Such effect is selective for  $\beta_2$ -adrenergic receptors, and type of this influence depends on method of stimulation on insulated trachea. The duration of effect substance SS-68 is not so long (about 15 min for toning after this exposure in concentration  $10^{-7}$  M or about 60 min after maximum concentration in compare to super selective  $\beta_2$ -adrenomimetic substance indacaterol maleate (the tonus of tracheal rings after washing away the substance SS-68 was not resorted). An amplitude of relaxation smooth-muscle cells on influence of the substance SS-68 in concentration  $10^{-7}$  M is about 47% of the amplitude of relaxation witch has been maded by indacaterol maleate.

*Key words:* substance SS-68, histamine, serotonin, acetylcholine, insulated trachea of guinea pigs,  $\beta_2$ -adrenergic receptors.

### Введение

В ранее проведенных нами исследованиях было показано, что производное индола с лабораторным шифром SS-68 обладает выраженным антиаритмическим [3] и антиангинальным [2] действием, а также проявляет  $\alpha$ - и  $\beta$ -адреноблокирующие свойства [1].

Известно, что одним из побочных явлений  $\beta$ -адреноблокаторов является бронхоконстрикторное действие, однако отдельные представители этой группы веществ, например целипролол, наряду с  $\beta_1$ -адреноблокирующим эффектом могут проявлять  $\beta_2$ -адреностимулирующие свойства, оказывая при этом бронхолитическое действие [4].

Цель исследования – выявление возможного  $\beta_2$ -адреномиметического действия соединения SS-68 в условиях моделирования бронхоспазма.

### Материалы и методы исследования

Для проведения экспериментов была избрана трахея морских свинок, которая является наиболее адекватной моделью исследования сократительной активности мускулатуры дыхательных путей [6].

Животные подвергались эвтаназии путём декапитации с последующим обескровливанием. Выделенная трахея переносилась в буферный раствор Кребса следующего состава (в мМ): 133 NaCl, 16,3 NaHCO<sub>3</sub>, 4,7 KCl, 1,05 MgCl<sub>2</sub> × 6H<sub>2</sub>O, 1,38 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,75 CaCl<sub>2</sub>, 7,82 глюкоза, 10 HEPES (pH 7,4), при комнатной температуре. Кольцевые препараты с гладкомышечными полосами были получены в процессе препарирования трахеи под визуальным микроскопическим (МБС-2) контролем.

Полученные кольца трахеи размещались на крючках в проточной термостатированной при 35° С камере. Для получения оптимальных условий сокращения препаратам придавалось изначальное натяжение, составляющее около 2 г. Предварительно препараты на протяжении 1 часа подвергались подготовительной «раскачке» в виде 3 циклов сокращения/расслабления, вызванных гистамином, серотонином или ацетилхолином.

Регистрацию сократительной активности изолированных колец трахеи производили при помощи емкостных датчиков напряжения («Danish Myo Technology», «Aarhus», Дания), сигнал от которых усиливался и фильтровался, далее преобразовывался в аналогово-цифровом преобразователе «LabTrax 4/16», записывался и обрабатывался при помощи компьютерной программы «DataTrax2» («World Precision Instruments, Inc.», США).

Бронхолитическое действие оценивали по степени расслабления предварительно сокращенных препаратов, выраженной в процентах. В качестве

стимулирующих агентов использовались гистамин (30 мкМ), серотонин (10 мкМ) и ацетилхолин (10 мкМ). В качестве дополнительных подтверждений участия  $\beta_2$ -адренорецепторов в реализации бронхорасслабляющего действия исследуемого вещества были применены современные суперселективные антагонист (бутоксамин) и агонист (индакатерола малеат)  $\beta_2$ -адренорецепторов в концентрациях 0,1 и 1 мкМ.

В исследованиях были использованы ацетилхолин, бутоксамин, серотонин, гистамин, HEPES (все «Sigma Chemicals Co. St. Lois, MO», США), индакатерола малеат («Novartis International AG», Швейцария).

Полученные данные подвергались статистической обработке при помощи программ «Origin 6.1» («OriginLab Corporation», США) и «EXEL 5.0» (Microsoft, США).

### Результаты и обсуждение

Существует множество способов стимуляции гладких мышц дыхательных путей в зависимости от целей исследований и поставленных задач. Наши испытания соединения SS-68 были проведены в трех сериях опытов с различными видами стимуляции (гистамином, серотонином, ацетилхолином). Такой выбор обусловлен наиболее частым повышением уровня этих агентов при развитии патологических состояний, сопровождающихся бронхоспазмом.

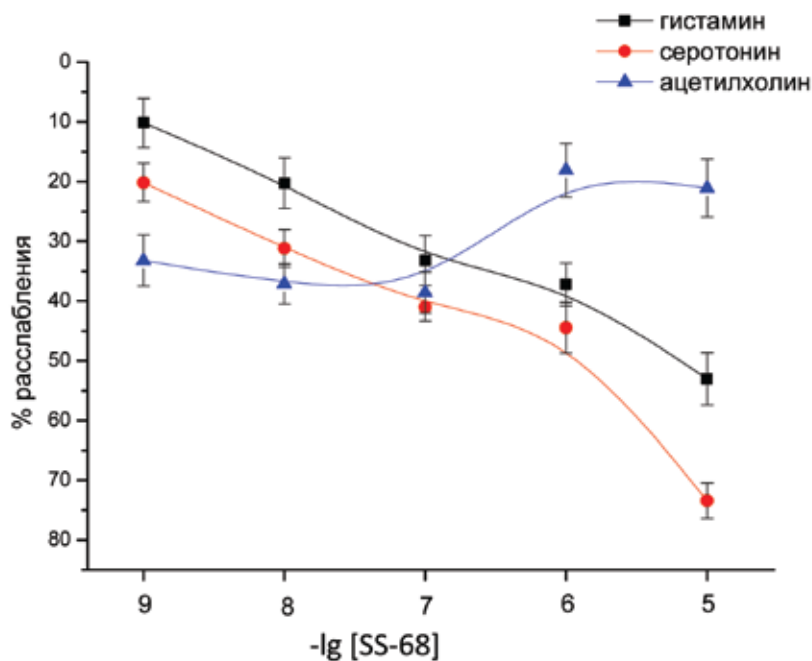
Результаты исследований представлены в таблице и на рисунке.

**Гистаминовая стимуляция.** На фоне сокращения, вызванного аппликацией 30 мкМ гистамина, ступенчатое повышение концентрации соединения SS-68 в концентрациях 10<sup>-9</sup>–10<sup>-5</sup> М приводило к последовательному расслаблению препаратов трахеи. Следует отметить проявление двухфазного характера релаксирующего влияния, а именно: быстрое расслабление с последующим частичным восстановлением тонуса. Такая реакция начинала регистрироваться уже

### Влияние соединения SS-68 на тонус гладкомышечных клеток трахеи морской свинки, предварительно сокращенных гистамином, серотонином и ацетилхолином

Констриктор	Концентрация соединения SS-68, М				
	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>
Гистамин, 30 мкМ	10,21±4,110	20,28±4,256	33,215±4,190	37,23±3,573	53,01±4,380
Серотонин, 10 мкМ	20,17±3,190	31,18±3,120	41,04±2,330	44,45±4,250	73,40±2,960
Ацетилхолин, 10 мкМ	33,2±4,300	37,11±3,359	38,60±3,420	18,11±4,493	21,11±4,850

**Примечание:** результаты представлены как % расслабления гладкомышечных клеток от уровня их сокращения, вызванного констриктором.



Кривые «доза – эффект» для расслабляющего действия соединения SS-68, полученные на изолированных препаратах гладких мышц колец трахеи морских свинок на фоне различных способов их предварительной активации

во время воздействия соединения SS-68 в концентрации  $10^{-8}$  М, возрастала с увеличением его концентрации и может быть истолкована как проявление феномена десенситизации.

**Стимуляция серотонином.** Реакции гладкомышечных клеток колец трахеи на расслабляющее влияние соединения SS-68 на фоне стимуляции серотонином (10 мкМ) были наиболее показательными (и наиболее легко интерпретируемыми).

**Ацетилхолиновое сокращение.** Расслабление колец трахеи под влиянием соединения SS-68 на фоне ацетилхолиновой (10 мкМ) стимуляции было наиболее любопытным. Как и в случае с гистамином, реакция расслабления была двухфазной (сильное расслабление/восстановление), но степень восстановления тонуса, следующего за расслаблением, зачастую превышала базовый уровень стимуляции.

Для того чтобы убедиться в возможности участия  $\beta_2$ -адренорецепторов в процессе расслабления и дать предварительную сравнительную оценку соединению SS-68, мы применили суперселективный  $\beta_2$ -адреномиметик длительного действия индакатерола малеат в концентрациях  $10^{-7}$  и  $10^{-6}$  М.

Далее для подтверждения влияния соединения SS-68 на  $\beta_2$ -адренорецепторы мы использовали селективный  $\beta_2$ -адреноблокатор бутоксамин в концентрациях 0,1 и 1 мкМ.

Установлено, что расслабляющее действие соединения SS-68 на фоне блокады  $\beta_2$ -адренорецепторов бутоксамином и стимуляции препаратов трахеи гистамином или ацетилхоли-

ном не регистрировалось. Полученные в этой серии опытов данные свидетельствуют о том, что расслабляющее влияние соединения SS-68 осуществляется посредством стимуляции  $\beta_2$ -адренорецепторов.

Значения  $pD_2$ , рассчитанные для гистамина и серотонина, составили  $6,71 \pm 0,17$  и  $7,32 \pm 0,21$  М соответственно. Для ацетилхолинового сокращения  $pD_2$  не рассчитывалась.

В результате проведенных нами экспериментов были получены данные, представляющие как научный, так и практический интерес. Расслабляющее действие соединения SS-68 подтвердилось в трех сериях опытов с различными способами стимуляции колец трахеи морских свинок и оказалось дозозависимым. Характер проявления расслабляющего влияния соединения SS-68 был различным в каждой конкретной серии, что связано, очевидно, с различными механизмами активации сократительного аппарата гладких мышц. Так, в случае ацетилхолинового сокращения снижение тонуса в ответ на соединение SS-68 быстро сменялось восстановлением прежнего уровня или даже превышало его. Известно, что конформационные изменения  $M_3$ -холинорецепторов, посредством которых передается действие ацетилхолина в гладкомышечных клетках дыхательных путей, приводят к активации G-белков. Активированная  $\alpha$ -субъединица гетеротримера Gq стимулирует мембраносвязанную фосфолипазу C, гидролизующую фосфатидилинозитол 4,5-бифосфат на инозитол 1,4,5-трифосфат ( $IP_3$ ) и диацилглицерол (DAG).  $IP_3$  путь приводит к освобождению  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных запасников. Существуют также

сведения о возможности прямой стимуляции  $Ca^{2+}$  каналов L-типа активированными  $M_3$ -холинорецепторами, что также приводит к повышению уровня внутриклеточного кальция. DAG вызывает активацию протеинкиназы C, а ряд ее изоформ обладает способностью прямо фосфорилировать актин-связывающие белки кальпонин, облегчая тем самым актомиозиновое взаимодействие или же влияя на актомиозиновое связывание через киназу легкой цепи миозина [7, 8]. Соединение SS-68, очевидно, оказывает влияние посредством комплекса реакций, связанных с  $\beta_2$ -адренорецепторами, а определяющими факторами расслабления гладких мышц трахеи являются его влияние на уровень внутриклеточного  $Ca^{2+}$  и фосфорилирования киназы легкой цепи миозина.

Серотониновое сокращение стимулируется активацией  $5-HT_{2A}$  рецепторов, которые также считаются сопряженными с Gq-белком, и дальнейшим гидролизом фосфоинозитидного комплекса. Однако именно для гладкомышечных клеток трахеи морской свинки были показаны отсутствие связи  $5-HT_{2A}$  с гидролизом 4,5-бифосфата и непосредственное участие активированных  $5-HT_{2A}$  как в повышении внутриклеточного уровня  $Ca^{2+}$ , так и в стимуляции протеинкиназы C [7, 9]. Реакция на соединение SS-68 у гладкомышечных клеток колец трахеи, стимулированных серотином, была наиболее ярко выраженной, а ее характер может быть следствием отсутствия дополнительных путей регуляции сокращения, кроме как общих для  $\beta_2$ -адрено- и  $5-HT_{2A}$ -рецепторных структур.

Гистаминовая стимуляция опосредуется влиянием на  $H_1$ -рецепторы, являющиеся также связанными с системой Gq-белка, и дальнейшим расщеплением 4,5-бифосфата [7]. Характер действия соединения SS-68 на серотониновое сокращение в определенной степени схож с реакцией при ацетилхолиновой стимуляции, что объясняется общностью путей стимуляции, но в то же время он не так ярко выражен. Причиной этого может быть существование в гладких мышцах дыхательных путей гистаминовых  $H_3$ -рецепторов [5], стимуляция которых оказывает расслабляющее влияние.

Следует упомянуть наличие в гладкомышечных клетках дыхательных путей киназы G-протеинсвязанного рецептора, кратковременная стимуляция которой может приводить к эффекту, схожему с десенсibilизацией и к преходящему расслаблению.

Подтверждением влияния соединения SS-68 непосредственно на  $\beta_2$ -адренорецепторы послужило устранение каких-либо проявлений расслабления препаратов трахеи после воздействия селективного блокатора  $\beta_2$ -адренорецепторов бутоксамина даже в малой концентрации ( $10^{-7}$  M).

Таким образом, соединение SS-68 оказывает in vitro расслабляющее влияние на гладкие мышцы

трахеи морской свинки. Такое действие является  $\beta_2$ -адреноселективным, а характер его проявления зависит от способа стимуляции трахеи. Продолжительность действия соединения SS-68 не столь выражена (около 15 мин на восстановление тонуса после воздействия концентрации  $10^{-7}$  M и около 60 мин после максимальной концентрации) по сравнению с суперселективным  $\beta_2$ -адреномиметиком индакатерола малеатом (тонус колец трахеи после отмывания не восстанавливался). Амплитуда расслабления гладких мышц колец трахеи под влиянием соединения SS-68 в концентрации  $10^{-7}$  M составила около 47% от амплитуды расслабления, вызываемого индакатерола малеатом.

Производное индола соединения SS-68 синтезировано в рамках государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации № 4.129.2014/К.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Богус С. К., Галенко-Ярошевский П. А., Духанин А. С., Шимановский Н. Л. Влияние производного индола SS-68, обладающего антиаритмическими и антиангинальными свойствами, на  $\alpha_1$ -,  $\beta_1$ - и  $\beta_2$ -адренорецепторы // Новые технологии. – Майкоп, 2012. – Вып. 4. – С. 232–235.
2. Богус С. К., Галенко-Ярошевский П. А. Исследование антиангинальных свойств производного индола SS-68 // Новые технологии. – Майкоп, 2012. – Вып. 4. – С. 265–269.
3. Богус С. К., Галенко-Ярошевский П. А., Суздальев К. Ф. Антиаритмическая активность производного индола SS-68 при желудочковых и предсердных формах нарушений ритма сердца // Новые технологии. – Майкоп, 2012. – Вып. 4. – С. 274–279.
4. Машковский М. Д. Лекарственные средства. – М.: Новая волна: издатель Умеренков, 2010. – 16-е изд., перераб., испр. и доп. – 1216 с.
5. Cardell L. O., Edvinsson L. Characterization of histamine receptors in guinea-pig lung: evidence for relaxant histamine  $H_3$  receptors in the trachea // Br. j. pharmacol. – 1994. – Vol. 111 (2). – P. 445–454.
6. Muccitelli R. M., Tucker S. S., Hay D. W. et al. Is the guinea pig trachea a good in vitro model of human large and central airways? Comparison on leukotriene-, methacholine-, histamine- and antigen-induced contractions // J. pharmacol. exp. ther. – 1987. – Vol. 243 (2). – P. 467–473.
7. Peter J. Barnes, K. Fan Chung, Clive P. Page. Inflammatory mediators of asthma: An update // Pharmacological reviews. – 1998 – Vol. 50 (4). – P. 515–582.
8. Roffel A. F., Meurs H., Elzinga C. R., Zaagsma J. Characterization of the muscarinic receptor subtype involved in phosphoinositide metabolism in bovine tracheal smooth muscle // Br. j. pharmacol. – 1990. – Vol. 99. – P. 293–296.
9. Watts S. W., Cox D. A., Johnson B. G. et al. Contractile serotonin-2A receptor signal transduction in guinea pig trachea: importance of protein kinase C and extracellular calcium but not phosphoinositide hydrolysis // J. pharmacol. exp. ther. – 1994. – Vol. 271 (2). – P. 832–844.