УДК 577.352.4; 615.256; 615.3

М. А. Мохорт[1], І. В. Геращенко[1], О. А. Шкрабак[2], Ю. Ю. Мазур[2], Т. О. Векліч[2]

Похідні імідазо [1,2-а]азепінію як модифікатори скоротливої активності міометрія

[1]ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», м. Київ
[2]Інститут біохімії імені О. В. Палладіна НАН України, м. Київ

Ключові слова: похідні імідазо[1,2-а] азепінію, Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРаза, Na^{+}, K^{+}-АТРаза, Mg^{2+}-АТРаза, Ca^{2+}-АТРаза, плазматична мембрана, гладеньком'язові клітини, міометрій, окситоцин

Важлива роль у забезпеченні скорочення гладеньких м'язів належить АТР-гідролазним ензиматичним системам [2, 3]. У плазматичній мембрані, яка має селективну проникність для різноманітних речовин, міститься ряд Mg^{2+}-залежних АТРаз, що забезпечують внутрішньоклітинний іонний гомеостаз. До них належать: транспортна Ca^{2+}, Mg^{2+}-АТРаза, яка забезпечує активний Mg^{2+}, АТР-залежний транспорт Ca^{2+} у позаклітинне середовище; уабаїнчутлива Na^{+}, K^{+}-АТРаза, що здійснює енергозалежне протилежно спрямоване перенесення іонів Na^{+} та K^{+} із клітини та в клітину відповідно; уабаїнрезистентна, так звана «базальна», Mg^{2+}-АТРаза, котра ймовірно бере участь у регуляції концентрації протонів у позаклітинному та внутрішньоклітинному просторах; Ca^{2+}-АТРаза, яка проявляється за наявності в середовищі інкубації Ca^{2+} і АТР у мілімолярних концентраціях, але за відсутності іонів Mg^{2+} [4].

Порушення скоротливої функції гладенького м'яза матки (міометрій) у жінок часто стає причиною різноманітних патологій: слабкості пологової діяльності, спонтанних абортів, передчасних пологів, викиднів, атонії, гіпо- і гіпертонусу матки [5]. Часто такі патології супроводжуються порушеннями функціонування мембранозв'язаних систем переносу катіонів та відповідно скоротливої активності гладенького м'яза матки. Тому перспективним є пошук фармакологічних сполук, здатних модифікувати скоротливу функцію міометрія у випадку зазначених патологічних станів.

У цьому аспекті, зокрема, представляють інтерес похідні імідазо[1,2-а] азепінію. У ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» було проведено скринінг на спазмолітичну, а саме токолітичну активність похідних імідазо[1,2-а]азепінію [1].

Досліджені сполуки були синтезовані у відділі синтезу фізіологічно активних речовин ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» під керівництвом доктора фарм. наук А. М. Демченка.

Мета дослідження – порівняти вплив деяких похідних імідазо[1,2-а] азепінію на скоротливу активність матки та на активність чотирьох функціонально різних АТРаз гладенького м'яза матки: транспортну Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРазу, уабаїнчутливу Na^{+}, K^{+}-АТРазу, «базальну» Mg^{2+}-АТРазу та Mg^{2+}-незалежну Ca^{2+}-АТРазу плазматичних мембран.

Матеріали та методи. *А. Структура ІФТ-176, ІФТ-208 та ІФТ-211.* Структурні формули похідних імідазо[1,2-а] азепінію представлено на рисунку 1.

Б. Фізіологічні дослідження. Фізіологічні дослідження були проведені у відділі фармакології серцево-судинних засобів ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України».

Дослідження токолітичної активності сполук ІФТ-176, ІФТ-208, ІФТ-211 були виконані на 9 лабораторних щурах, розведення ПП «Біомодельсервіс». Поздовжні смужки міометрія вирізали із рогів матки щурів після декапітації під легким ефірним наркозом відповідно до міжнародних рекомендацій (етичного кодексу) з проведення

© Колектив авторів, 2014

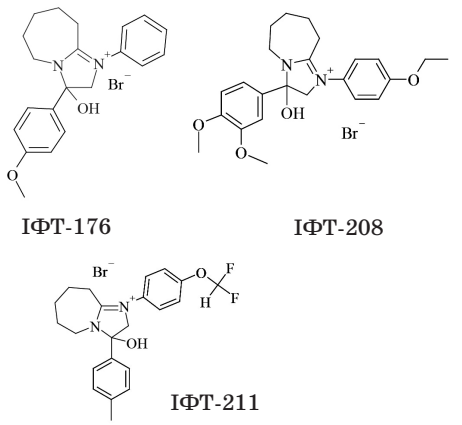

Рис. 1. Похідні імідазо[1,2-а]азепінію, що проявляють токолітичну активність

медико-біологічних досліджень з використанням тварин (1985 р.).

Ізольовані препарати міометрія розміщували в проточній камері (швидкість протоку 0,7 мл/хв), що наповнювали розчином Кребса наступного складу (у ммоль/л): NaCl – 132; KCl – 4,7; $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ – 1,4; $NaHCO_3$ – 16,3; $CaCl_2$ – 2,5; $MgCl_2 \cdot 2H_2O$ – 1,05; глюкоза – 6,5. Аерацію розчину здійснювали карбогеном (газова суміш 5 % CO_2 / 95 % O_2).

Тонічне напруження викликали окситоцином (0,1 МО/мл), який додавали до розчину Кребса. Досліджувані сполуки розчиняли в диметилсульфоксиді з подальшим розведенням розчином Кребса до концентрацій 0,1; 1; 10 мкмоль/л. Аплікацію досліджуваних сполук здійснювали протягом 15 хв у порядку наростання концентрацій.

Силу скорочувальних реакцій вимірювали в ізометричному режимі за допомогою ємнісних тензометричних датчиків (FTK-0,1). Запис скорочень здійснювали на персональному комп'ютері із застосуванням програми DataTrax2 за допомогою аналогово-цифрового перетворювача Lab-Trax-4/16 (World Precision Instruments).

На механограмах скорочення-розслаблення міометрія вимірювали горизонтальні та вертикальні параметри за схемою, описаною раніше [1]. Серед горизонтальних параметрів вимірювали тонус (силовий параметр, який вимірювали в грамах) та часові параметри, такі як час фази скорочення та час фази розслаблення, інтервал між скороченнями. Усі часові параметри вимірювали в секундах. Вимірювали також один вертикальний параметр – амплітуду скорочення, яку виражали в грамах.

В. Біохімічні дослідження. Біохімічні дослідження були проведені у відділі біохімії м'язів Інституту біохімії імені О. В. Палладіна НАН України (зав. відділом – чл.-кор. НАН України проф. С. О. Костерін).

Фракцію плазматичних мембран гладеньком'язових клітин матки виділяли з міометрія свині, як було описано раніше [6].

Уміст білка в мембранній фракції визначали методом M. Bredford із використанням реакції з реактивом Кумасі – G250 [7].

Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРазну активність визначали у фракції плазматичних мембран клітин міометрія за температури 37 °С у середовищі (об'єм – 0,4 мл), яке містило (ммоль/л): 3 АТР, 3 $MgCl_2$, 25 NaCl, 125 KCl, 1 ЕГТА, 20 Hepes-tris-буфер (pH 7,4), 1 NaN_3 (інгібітор АТР-ази мітохондрій [8]), 1 уабаїн (селективний інгібітор Na^+,K^+-АТРази [9]), 0,1 мкмоль/л тапсигаргін (селективний інгібітор Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази ендо(сарко)-плазматичного ретикулуму [8]) і 0,1 % дигітонін (фактор перфорації плазматичної мембрани [18]). Час інкубації – 5 хв. Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРазну активність розраховували за різницею між величинами АТРазних активностей за присутності та відсутності в середовищі інкубації 0,95 ммоль/л $CaCl_2$. Розрахунки, що були виконані із використанням комп'ютерної програми «MAXCHEL», свідчать про те, що за даних фізико-хімічних та концентраційних умов середовища інкубації концентрація вільних йонів Са (суто Ca^{2+}) становила 1 мкмоль/л.

«Базальну» Mg^{2+}-АТРазну активність визначали у фракції плазматичних мембран клітин міометрія за температури 37 °С у середовищі (об'єм – 0,4 мл), яке містило (ммоль/л): 1 АТР, 3 $MgCl_2$, 125 NaCl, 25 KCl, 1 ЕГТА, 20 Hepes-tris-буфер (pH 7,4), 1 NaN_3, 1 уабаїн, 0,1 мкмоль/л тапсигаргін і 0,1% дигітонін. Час інкубації – 4 хв.

«Базальну» Mg^{2+}-АТРазну активність розраховували як різницю між кількістю Рі, що утворився в середовищі інкубації в присутності та відсутності фракції плазматичної мембрани, з урахуванням поправки на вміст ендогенного Рі в мембранному препараті.

Na^+, K^+-АТРазну активність визначали в тому самому середовищі та розраховували за різницею між величинами АТР-азних активностей за відсутності та в присутності 1 ммоль/л уабаїну, Ca^{2+}-АТРазну активність плазматичних мембран клітин міометрія визначали за температури 37 °С у середовищі (об'єм – 0,4 мл), яке містило (ммоль/л): 3 АТР, 150 KCl, 1 ЕГТА, 20 Hepes-tris-буфер (pH 7,4), 1 NaN_3, 1 уабаїн, 0,1 мкмоль/л тапсигаргін і 0,1 % дигітонін. Час інкубації – 5 хв. Ca^{2+}-АТРазну активність розраховували за різницею між величинами АТРазних активностей за присутності та відсутності в середовищі інкубації 3 ммоль/л $CaCl_2$.

У всіх експериментах фіксували кількість білка мембранної фракції в пробі – 20–30 мкг. Ензиматичну реакцію ініціювали введенням до середовища інкубації аліквоти (50 мкл) суспензії плазматичних мембран, а зупиняли – додаванням до інкубаційної суміші 1 мл «стоп»-розчину наступного складу: 1,5 моль/л натрій оцтовокислий, 3,7 % формальдегід, 14 % етанол, 5 % ТХУ, pH 4,3 (за температури 8 °С). Кількість продукту реакції Рі визначали за методом W. Rathbun et V. Betlach.

У дослідах з вивчення впливу ІФТ-176, ІФТ-208 та ІФТ-211 (100 мкмоль/л) на Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРазну активність використовували стандартне середовище інкубації, що було описане вище, до якого додавали аліквоту розчинів ІФТ-176, ІФТ-208 та ІФТ-211. У дослідах використовували концентрований (20 ммоль/л) розчин вказаних речовин в ДМСО, який далі розводили водою до необхідної концентрації.

Статистичний аналіз одержаних даних проводили із залученням стандартних методів з використанням t-критерію Стьюдента. Кінетичні та статистичні розрахунки здійснювали з використанням програмного забезпечення MS Exel.

У роботі застосовували наступні реактиви: АТР, Hepes, уабаїн, тапсигаргін («Sigma», США), трис-гідроксиметил-амінометан («Reanal», Угорщина), дигітонін («Merck», Німеччина), ЕГТА («Fluka», Швейцарія). Інші реактиви вітчизняного виробництва класифікації «чда» та «хч».

Результати та їх обговорення. Гладенько-м'язовий орган матка має фазово-циклічний характер скорочень та розслаблень (рис. 2). Для встановлення наявності токолітичної активності нами було обрано 5 параметрів, серед яких горизонтальні параметри – тонус, час фази скорочення, час фази розслаблення, інтервал між циклами скорочення, та один вертикальний – амплітуда скорочення. Зміна досліджуваних параметрів представлена в таблиці.

Для структури з одним оксиметильним радикалом (ІФТ-176) при накопичувальній концентрації 10 мкмоль/л не було відмічено статистично вірогідних змін аплітуди фазних скорочень міометрія. При введенні до відповідної структури ще двох оксиметильних радикалів (ІФТ-208) амплітуда, хоча й мала тенденцію до зменшення, але не зазнавала статистично достовірних змін. При заміні радикалів у двох

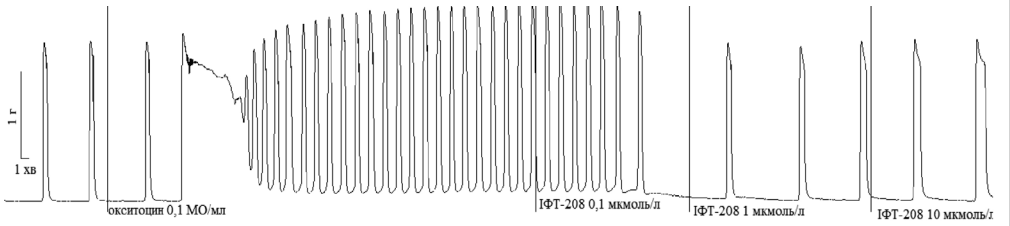

Рис. 2. Оригінальний запис скорочень міометрія за впливу накопичувальних концентрацій ІФТ-208 на фоні окситоцинової констрикції (0,1 МО/мл)

Таблиця

Параметри токолітичної активності досліджуваних сполук, n = 6

Шифр сполуки	Накопичувальні концентрації досліджуваних сполук та вихідні дані на окситоцин	Параметри токолітичної активності				
		Амплітуда скорочення, г	Час фази скорочення, с	Час фази розслаблення, с	Інтервал між циклами скорочення, с	Тонус, г
ІФТ-208	Окситоцин 0,1 МО/мл	1,000 ± 0,150	20,20 ± 1,52	23,63 ± 1,57	11,69 ± 0,95	0,236 ± 0,009
	0,1 мкмоль/л	0,800 ± 0,210	17,49 ± 1,41	20,80 ± 0,91	26,22 ± 15,11	0,216 ± 0,006
	1 мкмоль/л	0,700 ± 0,200	14,12 ± 1,00§	29,32 ± 3,60	83,20 ± 20,82§	0,171 ± 0,013#
	10 мкмоль/л	0,800 ± 0,360	15,45 ± 3,40	37,85 ± 2,74#	112,20 ± 27,93§	0,156 ± 0,024§
ІФТ-176	Окситоцин 0,1 МО/мл	0,424 ± 0,036	15,79 ± 0,69	22,44 ± 0,81	5,83 ± 0,66	0,540 ± 0,025
	0,1 мкмоль/л	0,467 ± 0,045	18,17 ± 0,99Δ	22,93 ± 0,95	8,57 ± 0,95Δ	0,366 ± 0,034#
	1 мкмоль/л	0,460 ± 0,046	17,19 ± 0,98	29,10 ± 1,41#	8,54 ± 0,75*	0,332 ± 0,032#
	10 мкмоль/л	0,424 ± 0,051	18,24 ± 1,06Δ	35,72 ± 2,83#	8,18 ± 0,66*	0,254 ± 0,020@
ІФТ-211	Окситоцин 0,1 МО/мл	0,220 ± 0,014	13,60 ± 0,42	18,90 ± 0,42	5,10 ± 0,39	0,400 ± 0,050
	0,1 мкмоль/л	0,190 ± 0,011	16,10 ± 0,68*	18,20 ± 0,43	4,20 ± 1,62	0,300 ± 0,040
	1 мкмоль/л	0,130 ± 0,013#	17,40 ± 0,76#	18,70 ± 0,41	4,50 ± 0,60	0,300 ± 0,050
	10 мкмоль/л	0,110 ± 0,010@	14,70 ± 1,14	13,50 ± 0,43@	5,00 ± 0,42	0,300 ± 0,040

*Примітка. @P ≤ 0,001 відносно контролю (окситоцин 0,1 МО/мл); #P ≤ 0,01 відносно контролю (окситоцин 0,1 МО/мл); §P ≤ 0,02 відносно контролю (окситоцин 0,1 МО/мл); *P ≤ 0,05 відносно контролю (окситоцин 0,1 МО/мл); ΔP ≤ 0,1 відносно контролю (окситоцин 0,1 МО/мл); n – кількість ізольованих поздовжніх смужок міометрія*

бензольних кільцях (пара положення) на оксидифторметильний та метильний (ІФТ-211) максимальне зниження амплітуди сягало 50,000 ± 0,024 % ($p \leq 0,001$; n = 6) за концентрації 10 мкмоль/л. Це може свідчити про більшу спорідненість до окситоцинових рецепторів саме структури ІФТ-211 порівняно зі структурами ІФТ-176 та ІФТ-208.

Уведення до структури додаткових оксиметильних радикалів викликало протилежний ефект за показником часу фази скорочення. Так, наприклад, для структури ІФТ-176 (-O-CH_3) відмічено тенденцію до подовження часу фази скорочення зі збільшенням накопичувальних концентрацій, у той час як для сполуки ІФТ-208 зафіксовано, навпаки, тенденцію до зменшення цього часового параметра за аналогічних умов.

ІФТ-211 за умов накопичувальних концентрацій не впливав статистично достовірно на час фази скорочення, а час фази розслаблення скорочував на 28,00 ± 0,87 % ($p \leq 0,001$; n = 6) при накопичувальній концентрації 10 мкмоль/л.

Аналогічне подовження часу фази розслаблення було характерне для сполук з оксиметильними радикалами ІФТ-176 та ІФТ-208 при накопичувальній концентрації 10 мкмоль/л, на 59,00 ± 3,64 % ($p \leq 0,01$; $n = 6$) та 60 ± 4,31 % ($p \leq 0,01$; $n = 6$) відповідно.

ІФТ-211 не змінював не тільки вертикальний параметр – амплітуду, але й не було відмічено статистично достовірної різниці для інтервалів між фазами скорочення, тоді як для структур ІФТ-176 та ІФТ-208 відмічено значний вплив на цей параметр. Наприклад, для структури з одним оксиметильним радикалом (ІФТ-176) характерне збільшення інтервалу при накопичувальній концентрації 10 мкмоль/л між фазами скорочення на 40,00 ± 1,32 % ($p \leq 0,05$; $n = 6$), а при включенні до імідазоазепінового ядра ще двох оксиметильних радикалів відбувається збільшення зазначеного часового параметра більше ніж у 10 разів ($p \leq 0,02$; $n = 6$) за накопичувальної концентрації 10 мкмоль/л (див. табл).

За результатами скринінгових досліджень токолітичної активності похідних імідазо[1,2-а]азепінію нами було встановлено залежність між збільшенням часових параметрів фазових скорочень міометрія відносно контролю та наявністю в досліджених структурах оксиметильних і оксиетильних радикалів. Було припущено, що значне збільшення часових параметрів залежить від наявності в структурі похідних імідазо[1,2-а]азепінію атомів оксигену та нітрогену, які здатні утворювати водневі зв'язки.

Аналогічне збільшення при введенні в структуру більшої кількості оксиметильних радикалів відмічено й для горизонтального параметра – тонусу. Сполуки ІФТ-176 та ІФТ-208 знижували тонус поздовжніх смужок міометрія на фоні окситоцинової констрикції на 47,000 ± 0,027 % ($p \leq 0,001$; $n = 6$) та 66,000 ± 0,033 % ($p \leq 0,02$; $n = 6$) відповідно (за накопичувальної концентрації 10 мкмоль/л). Тенденція до зниження тонусу під впливом сполуки ІФТ-211 не була статистично значимою.

Ураховуючи, що в структурі багатьох лікарських засобів, які дотепер використовуються як токолітики, присутній оксиметильний радикал (папаверин – 4 радикали, індометацин – 1 радикал) та оксиетильний (дротаверин – 4 радикали, атозибан – 1 радикал), ми вважаємо за доцільне використання цих радикалів в дизайні нових структур для створення нових ефективних і безпечних для матері й плода токолітичних лікарських засобів.

Однак наявність токолітичних властивостей у досліджених сполук не знімає численних питань стосовно молекулярних та клітинних механізмів дії на скоротливу активність матки.

Опираючись на відомий факт про вплив окситоцину на клітини міометрія шляхом часткового інгібування активності Ca^{2+}-помпи, Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази плазматичної мембрани [19] та активації Ca^{2+}-помпи саркоплазматичного ретикулуму міометрія [20], ми зробили припущення про те, що досліджені сполуки можуть впливати на зазначені вище Ca^{2+}-помпи.

Добре відомо, що багато процесів життєдіяльності клітини контролюються за допомогою іонів Са, і саме тому в клітині у стані спокою концентрація цитоплазматичного Ca^{2+} є низькою, на відміну від концентрацій позаклітинного Ca^{2+}. Дуже важливу роль у процесі підтримання низьких концентрацій клітинного Ca^{2+} відіграє Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРаза плазматичних мембран – іонна помпа, яка здатна переносити Ca^{2+} через плазматичну мембрану, проти 10 000-кратного градієнта концентрації [11]. У незбудженій клітині Ca^{2+}-помпа компенсує пасивний потік кальцію, який спрямований до міоцитів, а також видаляє з клітин Ca^{2+} після м'язового скорочення, підтримуючи фізіологічну концентрацію іонів Са в цитоплазмі клітини [3]. У наших дослідах середнє значення питомої активності Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази плазматичної мембрани становить 3,4 ± 0,3 мкмоль Рі/мг білка за 1 год ($p \leq 0,05$; $n = 7$).

Na^{+},K^{+}-АТРаза – інтегральний транспортний білок плазматичної мембрани клітин більшості тканин тварин [12]. Na^{+},K^{+}-АТРаза плазматичної мембрани відповідає за встановлення і збережен-

ня електрохімічного градієнта іонів Na та K в клітинах. Цей ензим транспортує Na^+ і K^+, використовуючи енергію гідролізу АТР. При гідролізі 1 молекули АТР відбувається електрогенний обмін $3Na^+$ з внутрішньоклітинного простору на 2 K^+ з позаклітинного простору [13, 14]. У наших дослідах середнє значення питомої ензиматичної активності Na^+,K^+-АТРази складає 10,2 ± 0,7 мкмоль Рі/мг білка за 1 год (M ± m; $p \leq 0,05$; n = 7).

«Базальна» Mg^{2+}-АТРаза є маркерним ензимом плазматичних мембран гладеньких м'язів, що має досить високу ензиматичну активність. Не виключають, що в гладеньком'язових клітинах матки Mg^{2+}-АТРаза виконує роль своєрідного pH-чутливого ензиматичного сенсора і є фактором контролю концентрації протонів H^+ у міоплазмі [15, 16]. У наших дослідах середнє значення питомої ензиматичної активності «базальної» Mg^{2+}-АТРази складає 18,1 ± 1,2 мкмоль Рі/мг білка за 1 год відповідно (M ± m; $p \leq 0,05$; n = 7).

У плазматичній мембрані міоцитів матки виявлено Ca^{2+}-АТРазу, яка є відмінною від Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази. Її активність проявляється за наявності в середовищі інкубації Ca^{2+} і АТР у мілімолярних концентраціях на тлі відсутності іонів Mg^{2+} [17, 18]. Ca^{2+}-АТРаза є низькоафінною до активуючого катіона – константа активації іонами Ca (K_{Ca}) дорівнює 1 ммоль/л [18]. У наших дослідах середнє значення питомої ензиматичної активності Ca^{2+}-АТРази складає 12,7 ± 2,0 мкмоль Рі/мг білка за 1 год (M ± m; $p \leq 0,05$; n = 7).

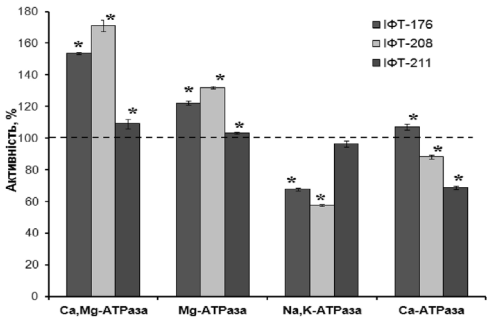

Рис. 3. Вплив ІФТ-176, ІФТ-208 та ІФТ-211 (100 мкмоль/л) на АТР-гідролазні активності в плазматичній мембрані клітин міометрія (n = 5)

*Примітка. За 100 % прийнято значення питомої ензиматичної активності в контролі (за відсутності ІФТ-176, ІФТ-208 та ІФТ-211 у середовищі інкубації); *P ≤ 0,05 відносно контролю.*

При дослідженні впливу похідних імідазо[1,2-а]азепінію ІФТ-176, ІФТ-208 та ІФТ-211 (100 мкмоль/л) на чотири АТР-гідролази плазматичної мембрани – транспортну Ca^{2+}, Mg^{2+}-АТРазу, Na^+, K^+-АТРазу, Mg^{2+}-АТРазу та Ca^{2+}-АТРазу, було встановлено, що ці сполуки в концентрації 100 мкмоль/л по-різному впливають на активність вказаних АТРаз (рис. 3).

ІФТ-176 та ІФТ-208 виявилися ефективними активаторами Ca^{2+}, Mg^{2+}-АТРази, у їхній присутності ензиматична активність зростає на 53,6 ± 0,7 % і 71,1 ± 3,62 % відповідно порівняно з контролем ($p \leq 0,05$; n = 5). ІФТ-211 майже не впливає на Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРазну активність (109,0 ± 2,8 % відносно контролю).

Подібним чином досліджувані сполуки (ІФТ-176, ІФТ-208 та ІФТ-211) впливають і на активність Mg^{2+}-АТРази плазматичної мембрани: 122,1 ± 01,3 %; 132,0 ± 0,8 % та 103,3 ± 0,5 % відповідно порівняно з контролем ($p \leq 0,05$; n = 5).

Що ж стосується активності Na^+,K^+-АТРази, то сполуки ІФТ-176 та ІФТ-208 виявили інгібуючий вплив на її активність: 67,7 ± 0,8 % та 57,6 ± 0,6 % відповідно порівняно з контролем ($p \leq 0$,05; n = 5). Сполука ІФТ-211 не впливала на активність даної АТРази (96,3 ± 1,9 %).

Сполуки ІФТ-208 та ІФТ-211 пригнічують активність Ca^{2+}-АТРази до 88,1 ± 1,4 % та 68,7 ± 1,1 % відповідно порівняно з контролем ($p \leq 0,05$; n = 5). Сполука ІФТ-176 майже не впливає на активність даної АТРази (106,9 ± 1,9 %).

Інгібування скорочень, викликаних окситоцином, у дослідженнях *in vitro* на ізольованих смужках рогів матки щурів можна пов'язати з активацією Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРази, що, у свою чергу, блокує один із етапів біохімічного механізму впливу окситоцину на внутрішньоклітинний кальцієвий гомеостаз у міометрії.

Висновки

1. Похідні імідазо[1,2-а]азепінію, а саме ІФТ-211, ІФТ-208, ІФТ-176, проявляють токолітичні властивості. У дослідженнях *in vitro* встановлено, що при накопичувальній концентрації 10 мкмоль/л сполука ІФТ-208 ефективно збільшувала інтервал між скороченнями, ІФТ-176 знижувала тонус ізольованих смужок міометрія, ІФТ-211 удвічі зменшувала амплітуду скорочення.

2. При дослідженні впливу похідних імідазо[1,2-а]азепінію на активність АТРаз у фракції плазматичних мембран клітин міометрія (транспортну Ca^{2+}, Mg^{2+}-АТРазу; Na^{+}, K^{+}-АТРазу; Mg^{2+}-АТРазу та Ca^{2+}-АТРазу) було встановлено, що сполуки ІФТ-176 та ІФТ-208 активують Ca^{2+}, Mg^{2+}-АТРазу та Mg^{2+}-АТРазу й інгібують Na^{+}, K^{+}-АТРазу, а сполука ІФТ-211 інгібує Ca^{2+}-АТРазу.

1. *Мохорт М. А.* токолітичної активності похідних імідазо[1,2-а]азепінію / Мохорт М. А., Геращенко І. В. // Досягнення біології та медицини. – 2013. – Т. 22, № 2. – С. 6–11.
2. *Бабич Л. Г.* Свойства кальциевого насоса эндоплазматического ретикулума гладкомышечных клеток / Бабич Л. Г. // Укр. біохім. журн. – 1999. – Т. 71, № 2. – С. 20–27.
3. *Kosterin S. O.* Kinetics and energetics of Mg^{2+}, ATP-dependent Ca^{2+}transport in the plasma membrane of smooth muscle cells / Kosterin S. O. // Нейрофизиология / Neurophysiology. – 2003. – Т. 35, № 3/4. – С. 215–228.
4. *Кушкевич М. В.* Физиологический прион и активность Na+,K+- и Ca^{2+}-АТРаз плазматической мембраны клеток продолговатого мозга крыс разного возраста / Кушкевич М. В., Влизло В. В., Мартин Ю. В. // Укр. біохім. журн. – 2013. – Т. 85, № 2. – С. 52–58.
5. Uterine contractility / Ed. by R.E. Garfield.-Serano Simposia, VSA, Norwill, Massachuses. – 1990. – 388 p.
6. Выделение и характеристика фракции плазматических мембран миометрия свиньи / Кондратюк Т.П., Быченюк С.Ф., Прищепа А.А. [и др.] // Укр. биохим. журн. – 1986. – Т. 58, № 4. – С. 50–56.
7. Functionally separate intracellular Ca^{2+} stores in smooth muscle / Flynn E. R. M., Bradley K. N., Muir T. C., McCarron J. G. // J. Biol. Chem. – 2001. – V. 276, № 39. – P. 36411–36418.
8. Mechanisms of ouabain toxicity / Valente R. C., Capella L. S., Monteiro R. Q. [et al.[// FASEB J. – 2003. – V. 17, № 12. – P. 1700–1702.
9. *Векліч Т. О.* Катіонна специфічність системи акумуляції Ca^{2+} в мітохондріях клітин міометрія / Векліч Т. О., Костерін С. О., Шинлова О. П. // Укр. біохім. журн. – 2002. – Т. 74, № 1. – С. 42–48.
10. *Rathbun W.* Estimation of enzymically produced orthophosphate in the presence of cysteine and adenosine triphosphate / Rathbun W., Betlach V. // Anal. Biochem. – 1969. – V. 28, № 1–3. – P. 436–445.
11. *Пестов Н. Б.* Регуляция Ca^{2+}АТР азы плазматических мембран / Пестов Н. Б., Дмитриев Р. И., Шахпаронов М. И. // Успехи биологической химии. – 2003. – Т. 43. – С. 99–138.
12. Carnosine prevents necrotic and apoptotic death of rat thymocytes via ouabain sensitive Na/K-ATPase / Smolyaninova L. V., Dergalev A. A., Kulebyakin K. Y. [et al.] // Cell Biochem Funct. – 2013. – V. 31, № 1. – P. 30–35.
13. *Karpova L. V.,* Akkuratov E. E., Brodskaia O. M., Boldyrev A. A. // Biofizika. – 2010. – V. 55, № 6. – P. 1022–1029.
14. S-glutathionylation of the Na,K-ATPase catalytic alpha subunit is a determinant of the enzyme redox-sensitivity / Petrushanko I. Y., Yakushev S., Mitkevich V. A., Kamanina Y. V. [et al.] // J. Biol. Chem. – 2012. – V. 287, № 38. – P. 195–205.
15. *Данилович Г. В.* Ідентифікація та характеристика «базальної» Ca^{2+}-незалежної Mg^{2+}-залежної АТР-гідролазної ферментативної активності у фракції плазматичних мембран гладенько-м'язових клітин / Данилович Г. В., Костерін С. О. // Укр. біохім. журн. – 2001. – Т. 73, № 6. – С. 30–40.
16. Кінетичне тлумачення pH-залежності ферментативної активності «базальної» Mg^{2+}-АТРази сарколеми гладенького м'яза / Костерін С. О., Векліч Т. О., Прилуцький Ю. І., Бориско П. О. // Укр. біохім. журн. – 2005. – Т. 77, № 6. – С. 37–45.
17. *Михайлова М. В.* Значение приспособительных модификаций в эволюции / Михайлова М. В., Гонтарева Н. Б., Нестеров В. П. // Журн. эволюц. биохим. и физиол. – 1992. – Т. 28, № 4. – С. 447–453.
18. *Magocsi M. T.* Ca^{2+} or Mg^{2+} nucleotide phosphohydrolases in myometrium: two ecto-enzyme / Magocsi M., Penniston J. T. // Biochim. Biophys. Acta. – 1991. – V. 1070, № 1. – P.163–172.
19. *Шинлова О. П.* Влияние окситоцина на кальциевый насос сарколеммы миометрия / Шинлова О. П., Фомин В. П., Костерин С. // Укр. биохим. журн. – 1987. – Т. 59, № 2. – С.75–79.
20. Mg^{2+} Ca^{2+} в эндоплазматическом ретикулуме / Шлыков С. Г., Бабич Л. Г., Ровенец Н. А., Костерин С. А. // Укр. биохим. журн. – 1996. – Т. 68, № 5. – С.25–34.

Н. А. Мохорт, И. В. Геращенко, А. А. Шкрабак, Ю. Ю. Мазур, Т. А. Веклич

Производные имидазо[1,2-а]азепиния как модификаторы сократительной активности миометрия

Цель работы – провести сравнительное исследование влияния некоторых производных имидазо[1,2-а]азепиния на сократительную активность матки и активность АТФаз плазматических мембран клеток миометрия. По результатам исследования токолитической активности среди производных имидазо[1,2-а]азепиния была установлена зависимость между увеличением временных параметров сокращения и тонусом, а также наличием в исследованных структурах оксиметильных и оксиэтильных радикалов. Было установлено, что значительное увеличение временних параметров фазных сокращений миометрия зависит от наличия в структуре производных имидазо[1,2-а] азепиния атомов кислорода и азота, которые способны образовывать водородные связи. Исследование действия производных имидазо[1,2-а]азепиния на активность АТФаз плазматической мембраны миометрия продемонстрировало, что соединения ИФТ-176, ИФТ-208 активируют Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРазу и ингибируют Na^{+},K^{+}-АТРазу. Поэтому ингибирование сокращений мышечных полосок рогов матки, вызваных окситоцином, можно связать с активацией Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРазы, что, в свою очередь, блокирует один из этапов биохимического механизма влияния окситоцина на внутриклеточный кальциевый гомеостаз в миометрии. В структуре многих лекарственных препаратов, которые используются как токолитики на сегодняшний день, присутствует оксиметильный и оксиэтильный радикалы. Мы считаем целесообразным использование этих радикалов в дизайне новых структур при создании новых эффективных и безопасных лекарственных средств, способных модулировать сократительную функцию матки при определенных патологиях.

Ключевые слова: производные имидазо[1,2-а]азепиния, Ca^{2+},Mg^{2+}-АТРаза, Na^{+},K^{+}-АТРаза, Mg^{2+}-АТРаза, Ca^{2+}-АТРаза, плазматическая мембрана, гладкомышечные клетки, миометрий, окситоцин

N. A. Mochort, I. V. Gerashchenko, A. A. Shkrabak, Yu. Yu. Mazur, T. O. Veklich

The derivatives of imidazo[1,2-a]azepine as modifiers of myometrium contractile activity

Preterm birth is a major contributor to perinatal mortality and morbidity worldwide. Tocolytic agents are drugs used to inhibit uterine contractions and to prevention preterm delivery. In this study we investigated the effects of the derivatives of imidazo[1,2-a]azepinium on oxytocin-induced contractions in the rat uterus in vitro and ATPases activity in myometrium cell's plasma membrane. Contractile activity was studied isometrically and analysis of contractions was performed by the calculation of the basal tone, amplitude, interval between cycles of reduction, the phase of contraction and relaxation. Spontaneously active myometrium was activated with oxytocin which was added to the tissue bath solution. After oxytocin administration the derivatives of imidazo[1,2-a]azepinium (0,1; 1; 10 μM) were added to the bath solution too. We investigated the activity of Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPase, Na^{+},K^{+}-ATPase, Mg^{2+}-ATPase, Ca^{2+}-ATPase on the myometrial cell plasma membrane suspension. Student`s t-test was used for statistical analysis. It has been found out that observed increasing in time parameters and tone depend on oxymethyl and oxyethyl residues in structures studied. It was suggested that remarkable increasing in time parameters depends on presence of oxygen and nitrogen atoms which can form hydrogen bonds with hydrogen in chemical structures of derivatives of imidazo[1,2-a]azepinium. The date obtained shown that derivatives of imidazo[1,2-a]azepinium IFT-176, IFT-208 activate Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPase and inhibit Na^{+},K^{+}-ATPase. The inhibition uterine horn's muscle stripes contractions caused by oxytocine may be due to Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPase activation. It is bloks one biochemical pathway oxytocine influence on calcium homeostasis of myometrium.

Key words: imidazo[1,2-a]azepinium derivatives, Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPase, Na^{+},K^{+}-ATPase, Mg^{2+}-ATPase, Ca^{2+}-ATPase, plasma membrane, smooth muscle cells, myometrium, oxytocine

Надійшла: 10.02.2014 р.

Контактна особа: Геращенко Інна Василівна, аспірант, відділ фармакології серцево-судинних засобів, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Ежена Потьє, м. Київ, 03680. Тел.: + 38 0 44 456 82 90. Електронна пошта: InnaGer@bk.ru