

**ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ ВА МИКРОБИОЛОГИЯ
ИНСТИТУТИ ҲУЗУРИДАГИ ФАН ДОКТОРИ ИЛМИЙ
ДАРАЖАСИНИ БЕРУВЧИ 14.07.2016.В.01.03 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ
КЕНГАШ
БИООРГАНИК КИМЁ ИНСТИТУТИ**

ЗАЙНАБИДДИНОВ АНВАР ЭРКИНЖОНОВИЧ

**15-АЦЕТОКСИАЗОМЕТИН АТИЗИН ВА 15-ГИДРОКСИАЗОМЕТИН
АТИЗИН ДИТЕРПЕНОИД АЛКАЛОИДЛАРИНИНГ ИНОТРОП
ТАЪСИРИНИ ҚИЁСИЙ ТАВСИФЛАШ**

03.00.08 – Одам ва ҳайвонлар физиологияси
(биология фанлари)

ДОКТОРЛИК ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ

ТОШКЕНТ– 2016

УДК:591.1+611.018.63

Докторлик диссертацияси автореферати мундарижаси
Оглавление автореферата докторской диссертации
Content of the abstract of doctoral dissertation

Зайнабиддинов Анвар Эркинжонович

15-ацетоксиазометин атизин ва 15-гидроксиазометин атизин дитерпеноид
алкалоидларининг инотроп таъсирини қиёсий тавсифлаш.. 3

Зайнабиддинов Анвар Эркинжонович

Сравнительная характеристика инотропного действия дитерпеноидных
алкалоидов 15-ацетоксиазометин атизина и 15-гидроксиазометин
атизина..... 29

Zaynabiddinov Anvar Erkinjonovich

Comparative characterization of inotropic effects of diterpenoid alkaloids
15-acetoxyazomethine atisine and 15-hydroxyazomethine atisine 55

Эълон қилинган ишлар рўйхати

Список опубликованных работ

List of published works..... 77

**ИНСТИТУТИ ҲУЗУРИДАГИ ФАН ДОКТОРИ ИЛМИЙ
ДАРАЖАСИНИ БЕРУВЧИ 14.07.2016.В.01.03 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ
КЕНГАШ
БИООРГАНИК КИМЁ ИНСТИТУТИ**

ЗАЙНАБИДДИНОВ АНВАР ЭРКИНЖОНОВИЧ

**15-АЦЕТОКСИАЗОМЕТИН АТИЗИН ВА 15-ГИДРОКСИАЗОМЕТИН
АТИЗИН ДИТЕРПЕНОИД АЛКАЛОИДЛАРИНИНГ ИНОТРОП
ТАЪСИРИНИ ҚИЁСИЙ ТАВСИФЛАШ**

03.00.08 – Одам ва ҳайвонлар физиологияси
(биология фанлари)

ДОКТОРЛИК ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ

ТОШКЕНТ– 2016

Докторлик диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси хузуридаги Олий аттестация комиссиясида № 30.06.2015/B2015.2.B166 рақами билан рўйхатга олинган.

Докторлик диссертацияси Биоорганик кимё институтида бажарилган.

Диссертация автореферати уч тилда (Ўзбек, рус, инглиз) Илмий кенгаш веб-саҳифаси www.nuu.uz ва «ZiyoNet» ахборот таълим тармоғида (www.ziyo.net.uz) жойлаштирилган.

Илмий маслаҳатчи:

Усманов Пулат Бекмуратович
биология фанлари доктори, профессор

Расмий оponentлар:

Мирходжаев Улугбек Зокирович
биология фанлари доктори, профессор

Кучкарова Любовь Салижановна
биология фанлари доктори, профессор

Матчанов Азат Таубалдиевич
биология фанлари доктори, профессор

Етакчи ташкилот:

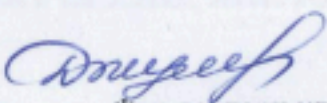
Андижон давлат университети

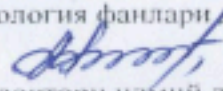
Диссертация химояси Ўзбекистон Миллий университети ва Микробиология институти хузуридаги 14.07.2016.B.01.03 рақами Илмий кенгашнинг «9» декабрь 2016 соат 10⁰⁰ даги мажлисида бўлиб ўтди. (Манзил: 100174, Тошкент ш., Олмазор тумани Университет кўчаси 4-уй, Биология факультети мажлислар зали. Тел.: +99871 227 12 24, факс: +99871 246 02 24, e-mail: pauka@nuu.uz).

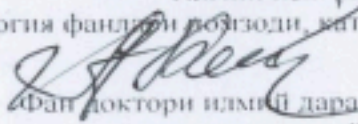
Докторлик диссертацияси билан Ўзбекистон Миллий университети ахборот-ресурс марказида таништириш мумкин (06 рақами билан рўйхатга олинган). Манзил: 100174, Тошкент ш. Олмазор тумани, Университет кўчаси, 4-уй, ЎзМУ Маъмурий биноси, 2-кават, 4-хона. Тел.: (+998 71) 236-46-55; факс: (+998 71) 246-02-24.

Диссертация автореферати 2016 йил «23» ноябрь да тарқатилди
(2016 йил _____ даги № _____ рақами реестр баённомаси).



 Г.Н. Джуманийозов
Фан доктори илмий даражасини берувчи
Илмий кенгаш раиси
биология фанлари доктори, профессора

 З.А. Маматов
Фан доктори илмий даражасини берувчи
Илмий кенгаш илмий котиби
биология фанлари фойзоди, катта илмий ходими

 К.Т. Алмат
Фан доктори илмий даражасини берувчи
Илмий кенгаш хузуридаги илмий семинар раиси
биология фанлари доктори, профессора

КИРИШ (докторлик диссертацияси аннотацияси)

Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати. Бутун дунёда кардиология ва фармакологиянинг муҳим вазифаси “тўсатдан рўй берадиган кардиоген ўлим” хавфи омиллари орасида етакчи ўринни эгаллаб турган юрак аритмияларини олдини олиш ва даволашнинг янги ёндашувларини излаб топиш ҳисобланади. Юрак аритмияларининг патогенези асосида қўзғалувчанлик, автоматизм ва ҳаракат потенциалининг (ХП) ҳосил бўлиши учун жавобгар бўлган кардиомиоцитларнинг электрофизиологик хоссаларини бузилиши ётади. Шу муносабат билан юрак аритмияларини олдини олиш ва даволашнинг замонавий концепциясида мазкур бузилишларни коррекциялашнинг янги ёндашувларини ишлаб чиқиш учун янги авлод антиаритмик воситаларини яратиш етакчи ўринни эгаллайди.

Мустақилликка эришгандан сўнг республикамизда маҳаллий хомашёдан юқори самарадор доривор воситаларни яратиш ва миллий фармацевтика бозорини сифатли дори-дармон воситалари билан юқори даражада таъминлашга қаратилган кенг кўламли чора-тадбирларни бажаришга қаратилган илмий-тадқиқот ишлари ташкил этилиб муайян натижаларга эришилди. Алоҳида қайд этиш лозимки, маҳаллий хомашёдан олинадиган доривор препаратлар (ўсимликлардан олинадиган дитерпеноид алкалоидлар) юрак қон-томир касалликларини даволашда кенг фойдаланилмоқда.

Ҳозирги кунда бутун дунёда юрак аритмияларини даволашнинг янги ёндашувларини ишлаб чиқиш учун истиқболли бўлган потенциал фармакологик фаолликка эга, ўсимликдан ажратиб олинган бирикмаларни излаб топиш долзарб вазифа ҳисобланади. Бугунги кунга келиб, мазкур бирикмалар ёрдамида юрак аритмияларининг ҳужайравий ва молекуляр механизмлари ва уларни даволашнинг энг истиқболли нишонлари ҳақида муҳим маълумотлар олинган. Бундан ташқари, мазкур бирикмалар туфайли бу нишонларнинг фармакологик регуляциясини муҳим жиҳатлари аниқланган бўлиб, бу уларнинг функционал ҳолати модуляциясини самарали усулларини ишлаб чиқиш имконини берди. Умуман олганда ўсимликдан ажратиб олинган бирикмаларни ўрганиш жараёнида қимматли маълумотлар олинган бўлиб, улар юрак ритми бузилишларини даволаш учун янги истиқболли препаратларни ишлаб чиқиш ва яратишда сезиларли тараққиётни таъминлаб берди. Юқорида айтиб ўтилганлар нуктаи-назаридан, диссертация мавзуси жуда долзарб ва зарур ҳисобланади, чунки дитерпен алкалоидларининг инотроп таъсир механизмнинг ўзига хос жиҳатларини тавсифлашда олинган натижалар хавфли ножўя таъсирлардан холи бўлган самарали антиаритмик воситаларнинг янги авлодини яратишга ёрдам бериши мумкин.

Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2011 йил 28 ноябрдаги ПҚ-1652-сон «Соғлиқни сақлаш тизимини ислоҳ қилишни янада чуқурлаштириш чора-тадбирлари тўғрисида»ги ва 2014 йил 1 августдаги ПҚ-1855-сон «Ўзбекистон Республикасининг 2013 йилги инвестиция дастури

диссертация тадқиқоти муайян даражада хизмат қилади.

Тадқиқотнинг республика фан ва технологиялари ривожланиши нинг асосий устувор йўналишларига боғлиқлиги. Мазкур тадқиқот республика фан ва технологиялари ривожланишининг VI «Тибиёт ва фармакология» устувор йўналишига мувофиқ бажарилган.

Диссертация мавзуси бўйича хорижий илмий тадқиқотлар шарҳи¹. Юрак аритмияларини даволашнинг янги ёндашувларини ишлаб чиқишга йўналтирилган илмий изланишлар жаҳоннинг етакчи илмий марказлари ва олий таълим муассасалари, жумладан, Колумбия, Калифорния, Нью-Йорк университетларида (АҚШ), Кёльн университети (Германия), Юта штати (АҚШ), Калгари (Канада) ва Вандербилта (АҚШ), шунингдек Биоорганик кимё ва Ўсимлик моддалари кимёси институтларида (Ўзбекистон) олиб борилмоқда.

Юрак аритмияларини даволашнинг замонавий ёндашувларини ишлаб чиқиш соҳасида жаҳонда олиб борилган тадқиқотлар натижасида қатор, жумладан, қуйидаги илмий натижалар олинган: юрак ритми бузилишларининг молекуляр механизмлари ҳақидаги билимлар сезиларли даражада кенгайиб, бу юрак аритмияларига ташҳис қўйиш, даволаш ва олдини олишнинг энг самарали ёндашувлари ишлаб чиқилган (Колумбия университети); аритмиянинг турли типлари патогенези билан боғлиқ бўлган юрак дефектли хужайраларининг функционал муҳим тизимлари тавсифланган (Кёльн университети); аритмияларнинг турли хил фармакотерапиясида сезиларли тараққиётга эришилиб, самарали антиаритмик воситалар яратилган (Калифорния университети); аритмияларни даволашнинг замонавий усуллари ишлаб чиқилган бўлиб, унда асосий рол антиаритмик воситаларнинг янги авлодини яратиш учун энг истиқболли нишон бўлиб қолаётган тезкор Na^+ каналларнинг блокаторлари ишлаб чиқилган (Калгари университети ва Юта штати).

Дунёда юрак аритмияларини даволашнинг замонавий ёндашувларини ишлаб чиқишда бир қатор, жумладан, қуйидаги устувор йўналишларда илмий тадқиқот ишлари олиб борилмоқда: юрак аритмияларининг турли типлари асосидаги хужайравий ва молекуляр механизмлар таҳлил қилиш; юрак аритмияларининг патогенезида ион каналларининг роли аниқлаш; юрак ритми бузилишларини даволаш учун янги молекуляр нишонларни аниқлаш; юрак ритми бузилишларини даволаш учун оқилona дизайн ва истиқболли препаратларининг янги авлодини яратиш учун янги ёндашувлар ишлаб чиқиш.

Муаммонинг ўрганилганлик даражаси. *Aconitum* ўсимлик туркумидан ажратиб олинган дитерпеноид алкалоидлари ҳозирги вақтда янги

¹ Диссертация мавзуси бўйича хорижий илмий-тадқиқотлар шарҳи. Zipes DP et al (2006): Guidelines for management of sudden cardiac death. U.S. National Institute of Health, <http://www.circulationaha.org>; Sampson K.J., Kass R.S. (2011). Anti Arrhythmic Drugs (Chapter 29). In: *Goodman & Gilman's Pharmacological Basis for Therapeutics. 11e.* McGraw-Hill; Antzelevitch C, Burashnikov A (2011): Overview of basic ва бошқа манбалар асосида ишлаб чиқилган.

фаоллиги учун жавобгар бўлган энг муҳим структуравий жиҳатлари дунёнинг етакчи лабораторияларида батафсил ўрганилган. Бунда энг фаол дитерпеноид алкалоидларининг умумий структуравий элементлари C-4 углерод атомидаги ацетилантранил ёки аминобензой кислоталарининг, C-1, C-14 ва C-16 даги метокси гуруҳларининг ва C-8 гидроксил гуруҳларининг қолдиқлари эканлиги аниқланган. Шу билан бирга C-14 гуруҳидаги бензол гуруҳи ва азот атомининг асослиги ҳам мазкур алкалоидларнинг антиаритмик фаоллигини таъминлаш учун ўта муҳим эканлиги кўрсатилган. Мазкур бирикмалар антиаритмик таъсирининг электрофизиологик механизми яхши ўрганилган ва асосан потенциалга боғлиқ Na^+ каналларининг блокадасидан келиб чиқади. Бундай блокаданинг асосий самараси юрак ҳаракат потенциали тезлигининг пасайиши бўлиб, у унинг тарқалиш тезлигининг секинлашуви ва эффектив рефрактерлик даврининг ошиши билан бирга бориб, юрак қўзғалувчанлигининг пасайишига олиб келади. Бироқ, Na^+ каналларининг блокадаси Ca^{2+} ионлари транспортига шундай таъсир қилиши мумкин бўлиб, бунда Na^+ концентрациясининг пасайиши кардиомиоцитларда Ca^{2+} миқдорининг камайишига ва ундан кейинги юрак мушаги қисқариш фаоллигининг пасайишига замин яратиши мумкин. Юрак мушаги қисқариш фаоллигининг пасайиши ёки манфий инотроп самара 1 синф барча антиаритмик препаратларининг ўзига хос жиҳати бўлиб, шу туфайли улардан фойдаланиш юракнинг ҳайдовчи функциясини пасайиб кетишига олиб келгани учун чекланган. Шунинг учун, мазкур синф антиаритмик воситаларидан юрак ритмининг бузилишларини даволаш учун фойдаланишда эришилаётган ютуқларга қарамасдан манфий инотроп самараси кам бўлган нисбатан самарали ва хавфсиз препаратларни янги авлодини яратишга бўлган ўткир зарурат сақланиб қолмоқда. Шу муносабат билан замонавий изланишлар мавжуд дитерпен алкалоидларининг молекулаларини модификациясини ўз ичига олувчи муқобил ёндашувларга қаратилган бўлиб, у уларнинг фойдали хоссаларини сақлаб қолиши ва номақбуллари йўқотишни таъминлаши зарур бўлиб, бу минимал манфий инотроп самарага эга Na^+ каналига самарали таъсир кўрсатувчи бирикма олиш имконини беради.

Диссертация мавзусининг диссертация бажарилган илмий тадқиқот муассасасининг илмий-тадқиқот ишлари билан боғлиқлиги. Диссертация

тадқиқоти Биоорганик кимё институтининг фундаментал ва амалий илмий-тадқиқот дастури режасининг ФА-ФЗ-Т144 «Юрак ва силлиқ мушак хужайраларининг ион каналлари модуляциясининг механизмларини табиий биологик фаол бирикмалар билан ўрганиш» (2007-2011 йй.); ФА-А 12-Т068

«Табиий биологик фаол бирикмаларнинг ион каналлари ва биологик мембраналарнинг рецепторлари билан ўзаро таъсирининг скрининги ва структуравий-функционал жиҳатларининг тавсифига комплекс ёндашувни ишлаб чиқиш» (2009-2011 йй.); ФА-Ф6-Т083 «Биологик фаол бирикмалар – юрак ва силлиқ мушак хужайраларида Ca^{2+} -гомеостазининг

модуляторларини излаш ва тавсифлаш» (2012-2016 йй.); ФА-А11-Т057 «Табиий ва сунъий биологик фаол бирикмаларнинг юқори самарали скрининг

марказини яратиш» (2015-2017 йй.) лойиҳалари доирасида бажарилган

Тадқиқотнинг мақсади 15-ГАА ва 15-ААА дитерпен алкалоидларининг инотроп эффектларини тавсифлаш ва 15-АААда антиаритмик ва манфий инотроп фаолликлари орасида боғлиқлик мавжуд эмаслигининг сабабини аниқлашдан иборат.

Тадқиқотнинг вазифалари:

15-ГАА ва 15-ААА алкалоидларининг каламуш юраги папилляр мускул қисқариш фаоллигига таъсирини тадқиқ қилиш ва уларнинг таъсирларини концентрацияга боғлиқлигини ўрганиш;

15-ГАА ва 15-ААА алкалоидларининг инотроп эффектларини стимуляция частотасига боғлиқлигини тадқиқ қилиш ва қўзғатишнинг турли частоталарида улар томонидан келтирилиб чиқариладиган папилляр мускул қисқариш кучи ўзгаришининг ўзига хос хусусиятларини ўрганиш;

15-ГАА ва 15-ААА алкалоидларининг каламуш юраги папилляр мускулларининг изометрик қисқаришнинг кинетик параметрларига ($+dF/dt_{\max}$ – қисқаришнинг ривожланиш тезлиги, $dF/dt_{\max}$ – бўшашиш тезлиги, $T_{\text{умум}}$ – қисқариш-бўшашиш циклининг вақти, $T_{1/2}$ – ярим бўшашиш вақти) таъсир қилиш таҳлилини ўтказиш; бу параметрларнинг ўзгариш характерини баҳолаш ва бу ўзгаришлар асосида бўлган эҳтимолий механизмларни аниқлаш;

Сарколемманинг потенциалга боғлиқ Ca^{2+} -ва Na^{+} - каналларига 15-ГАА ва 15-ААА алкалоидлар таъсирининг ўзига хос хусусиятларини ўрганиш, бу каналлар блокранишининг (ингибирлаш) ўзаро боғлиқлигини, кардиомиоцитлардаги ҳужайра ичи $[\text{Ca}^{2+}]_i$ миқдорининг камайиши, ва папилляр мускуллар қисқариш фаоллигининг пасайиш таҳлилини ўтказиш;

СР даги Ca^{2+} ионлар миқдорининг ўзгариш динамикасига 15-ГАА ва 15-ААА алкалоидлар таъсирини тадқиқ қилиш, СР даги Ca^{2+} ионлар миқдорининг ўзгариши билан алкалоидлар инотроп фаоллигининг боғлиқлигини ва бу ўзгаришлардаги $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -алмашинувчи тизимнинг ролини баҳолаш;

15-ГАА ва 15-ААА алкалоидлар инотроп таъсирининг ўзига хос хусусиятлари, унинг алкалоидлар структурасига боғлиқлик томонини қиёсий таҳлил қилиш ва уларнинг инотроп таъсир механизмидаги тафовутлар ва 15-ААА нинг манфий инотроп ва антиаритмик фаоллиги ўртасидаги боғлиқлик йўқлиги сабабининг асосий мазмунини шакллантириш.

Тадқиқотнинг объекти *Aconitum zeravshanicum* турига мансуб ўсимликдан ажратиб олинган атизин дитерпен алкалоидининг ҳосилалари 15-ГАА ва 15-ААА алкалоидлари ҳисобланади.

Тадқиқотнинг предмети – 15-ГАА ва 15-ААА алкалоидларининг инотроп таъсирини ўзига хослиги, уларнинг структурага боғлиқлиги ва буни таъминлашда кардиомиоцитларнинг Ca^{2+} - транспорт тизимларининг роли.

Тадқиқотнинг усуллари. Диссертация ишида, юрак мускулатурасининг қисқариш ва функционал фаоллигини қайд этиш ва

таҳлилини ўтказиш учун замонавий электрофизиология усулларида фойдаланилди. Барча экспериментал маълумотлар OriginPro 7.5 (OriginLab Corporation; АҚШ) компьютер дастури ёрдамида йиғилган ва ишлов берилган.

Тадқиқотнинг илмий янгилиги қуйидагилардан иборат:

15-ГАА ва 15-ААА алкалоидларининг инотроп таъсирининг ўзига хос жиҳатлари, уларнинг структуралари билан ўзаро алоқалари ва уларнинг мусбат ва манфий инотроп фаоллигининг асосида ётувчи асосий механизмлар аниқланган;

15-ААА нинг антиаритмик фаоллиги ошишини таъминловчи C-15 углерод атомидаги ОН-гурухини CH_3O -гурухига алмаштириш йўли билан 15-ГАА структурасининг модификацияси унинг манфий инотроп фаоллигини кучайтирмасдан, аксинча, пасайишига олиб келиши аниқланган;

15-ААА паст концентрацияларда (3-8 мкМ) ва кўзғатишнинг паст частоталарида (0,1-1 Гц) мусбат инотроп таъсирни намоён қилса, нисбатан юқори концентрацияларда (>8 мкМ) ва кўзғатишни юқори частоталарида (>1 Гц) фақат манфий инотроп таъсири аниқланган;

15-АААнинг мусбат инотроп таъсири β -адренорецепторлар ва потенциалга боғлиқ Ca^{2+} каналларининг фаоллашувига боғлиқ бўлмаган Ca^{2+} -ташувчи тизимлар томонидан таъминланувчи саркоплазматик ретикулумдаги Ca^{2+} ионларининг концентрациясининг ошишига боғлиқлиги аниқланган;

15-ГАА ва 15-АААларнинг манфий инотроп таъсири асосан Na^+ -каналларининг блокадасига боғлиқ бўлиб, у Ca^{2+} -ташувчи тизимлар функциясининг бузилиши билан бирга кечиб, кейинчалик кардиомиоцитларда Ca^{2+} ионларининг миқдори пасайиши ва уларнинг қисқариш фаоллиги тушиб кетиши аниқланган;

15-ААА ва 15-ГАА алкалоидларининг манфий инотроп фаолликлари орасидаги фарқлар уларнинг структурасидаги ўзига хос жиҳатлар ва кардиомиоцитлардаги Ca^{2+} пасайиш даражасини белгилаб берувчи Na^+ -каналлари блокадасининг турлича самарадорлигига боғлиқлиги исботланган;

15-ААА инотроп ва антиаритмик таъсири орасида бевосита корреляциянинг мавжуд эмаслиги, эҳтимол, унинг Na^+ -каналларини блокранишига таъсири кам бўлиши, шунингдек унда мусбат инотроп фаолликнинг мавжудлигига боғлиқ эканлиги исботланган.

Тадқиқотнинг амалий натижалари. Мазкур тадқиқотларнинг натижалари дитерпеноид алкалоидлари инотроп таъсирининг ўзига хос хусусиятлари, уларнинг структурага боғлиқлиги ҳақидаги тасаввурларни сезиларли даражада кенгайтириб, ҳавфсиз ва нисбатан самарали антиаритмик воситаларни яратиш учун назарий асос ҳисобланади.

Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги экспериментал маълумотлар тадқиқотнинг замонавий компьютерлашган электрофизиологик усуллардан фойдаланган ҳолда олинганлиги билан асосланади. Ишдаги

Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти. Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти келтирилган маълумотлар дитерпеноид алкалоидларининг инотроп таъсир механизмлари ҳақидаги фундаментал билимларнинг ривожланишига муҳим ҳисса ҳисобланади.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти дитерпеноид алкалоидларининг инотроп таъсири билан боғлиқ механизмларнинг янги тафсилотларини очиб беради ва муҳим амалий аҳамиятга эга бўлган алкалоидларнинг структураси ва уларнинг инотроп фаоллиги орасидаги ўзаро алоқаларни тушунишга имкон берди. Мазкур тадқиқотнинг натижалари жиддий ножўя таъсирлардан холи бўлган хавфсиз ва юқори самарали антиаритмик воситаларни оқилона дизайни ва янги авлодини яратиш учун илмий асосни сезиларли даражада кенгайтди.

Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши. Маҳаллий хомашёдан антиаритмик воситаларнинг янги авлодини яратиш учун ишлаб чиқилган структуравий-функционал тавсияномалар асосида:

самарали антиаритмик препаратлар олишни таъминловчи ва уларнинг манфий инотропли фаоллигини пасайтиришга ёрдам берувчи дитерпеноид алкалоидларни структуравий модификациялашнинг нисбатан оптимал бўлган ёндашувлар «Узфармсаноат» ДАК фаолиятига жорий этилган («Узфармсаноат» ДАКнинг 2016 йил 14 ноябрдаги БА-06/2069-сон маълумотномаси). Илмий тадқиқотлар натижаси юрак етишмовчилигида, мусбат инотроп эффекти аниқланган 15-ААА алкалоидининг бу хоссаси, унинг манфий инотроп фаоллигини чегаралаб, ўзининг антиаритмик таъсирининг ошишига ёрдам берувчи янги антиаритмик воситаларни яратиш имконини беради;

15-ацетоксиазометин атизин ва 15-гидроксиазометин атизин дитерпеноид алкалоидларининг инотроп таъсири бўйича олинган натижалар ФА-Ф5-Т084 «Митохондриялар ион транспорти ва метаболик жараёнлар биорегуляторларининг меъёр ва патологиядаги таъсирини тавсифлаш» илмий лойиҳасида (БКИ, 2012–2016 йй.), яъни митохондрияларда $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -алмашинувчи тизими орқали кирувчи Ca^{2+} ионларига таъсир этиб, улардаги Ca^{2+} ионлари гомеостазини регуляция қилишда фойдаланилган (Фан ва технологияларни ривожлантиришни мувофиқлаштириш қўмитасининг 2016 йил 22 ноябрдаги ФТК-03-13/828-сон маълумотномаси). Илмий натижаларнинг қўлланилиши митохондрияларда $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -алмашинувчи тизимини дисфункцияси туфайли уларда Ca^{2+} гомеостази бузилишларини регуляция қилиш имконини берган.

Тадқиқот натижаларининг апробацияси. Диссертация материаллари қуйидаги халқаро ва миллий илмий-амалий конференцияларда тақдим қилинган: «Биоорганическая химия и биотехнология» (Пущино, Россия 2011); «Актуальные проблемы патофизиологии» (Санкт-Петербург, Россия 2011); «Табиий бирикмалар кимёсининг долзарб муаммолари» (Тошкент, 2011-2012); «Биоорганик кимё ривожланишининг долзарб муаммолари»

Россия, 2012, 2014-2015); «Фундаментальная наука и клиническая медицина» (Санкт-Петербург, Россия, 2015); «Euromedica» (Ганновер, Германия, 2015) халқаро тиббий конгрессида; ва «Актуальные проблемы современной медицины и фармации» (Минск, Беларусь, 2016).

Тадқиқот натижаларининг эълон қилиниши. Диссертация мавзуси бўйича 28 та илмий ишлар chop этилган, жумладан, Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг докторлик диссертациялари асосий илмий натижаларини chop этиш тавсия этилган илмий нашрларда 11 та мақола, жумладан, 9 таси республика ва 2 таси хорижий илмий журналларда нашр этилган.

Диссертациянинг ҳажми ва тузилиши. Диссертация таркиби кириш, тўртта боб, хулоса, фойдаланилган адабиётлар рўйхатидан иборат. Диссертациянинг ҳажми 162 бетни ташкил этган.

ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

Кириш қисмида мавзунинг долзарблиги ҳамда зарурияти асосланган, тадқиқотнинг мақсади ва вазифалари, объект ва предметлари тавсифланган, республика фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига мослиги кўрсатилган, тадқиқотнинг илмий янгилиги ва амалий натижалари баён қилинган, олинган натижаларнинг илмий ва амалий аҳамияти очиқ берилган, тадқиқот натижаларини амалиётга жорий қилиниши, нашр этилган ишлар ва диссертация тузилиши бўйича маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг биринчи **“Юрак аритмияларини тадқиқ қилишнинг замонавий ҳолати ва истиқболлари”** бобида юракнинг электрик ва механик фаоллиги ҳақида, шунингдек Ca^{2+} ионларининг электр механик жуфтлашишдаги ва юрак ритмининг генерацияси ва регуляциясидаги етакчи роли ҳақидаги умумий маълумотлар берилган. Бундан ташқари юрак аритмиялари ва юракнинг бошқа патологиялари ривожланишида Ca^{2+} гомеостази бузилишининг асосий роли, шунингдек уларни коррекциялашнинг янги ёндашувлари ва юрак қон томирлари касалликларини олдини олиш ва даволашнинг истиқболли стратегиялари келтирилган.

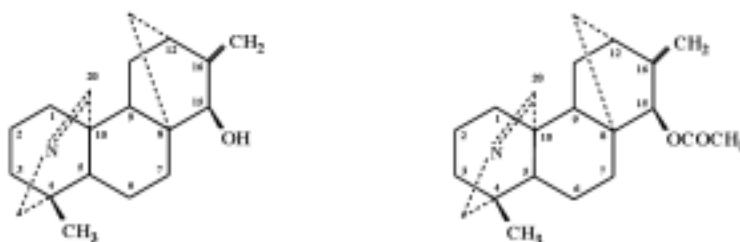
Иккинчи **“Қаламуш юраги папилляр мушагининг қисқариш фаоллигини ўрганиш”** бобида қаламуш юраги папилляр мускулининг қисқариш фаоллигини тадқиқ қилишнинг усуллари тавсифланиб, кардиомиоцитлар Ca^{2+} -транспорт тизимининг функционал фаоллигини баҳолашнинг экспериментал ёндашувлари, шунингдек математик ишлов бериш ва маълумотларнинг статистик таҳлили баён қилинган.

Учинчи **“15-гидроксиазометин атизин (15-ГАА) дитерпеноид алкалоидининг қаламуш юраги папилляр мускули қисқариш фаоллигига таъсирини тавсифлаш”** бобида 15-ГААнинг қаламуш юраги

тадқиқ қилишнинг натижалари келтирилган.

15-ГАА алкалоидининг каламуш юраги папилляр мускулининг қисқаришига таъсирининг ўзига хос жиҳатлари. 15-ГАА ва 15-ААА алкалоидлари *Aconitum zerafvshanicum* ўсимлигидан ажратиб олинган, антиаритмик таъсирга эга бўлган атизин дитерпен алкалоидининг ҳосилалари ҳисобланади (Кодирова и др, 2010). 15-ААА алкалоидининг атизин скелетидаги С-15 углерод атомининг ОН-гуруҳ ўрнига СН₃О-гуруҳининг мавжудлиги билан фарқ қилиб, яққол намоён бўлувчи антиаритмик таъсирга эга (1-расм).

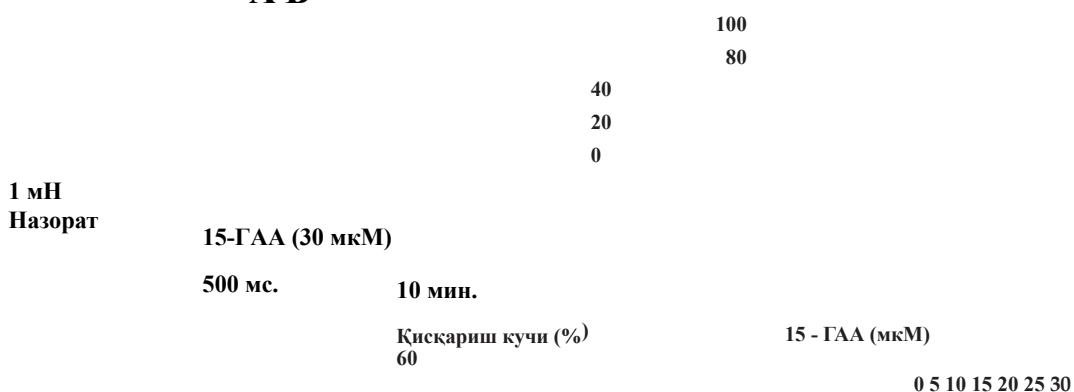
А Б



1-расм. 15-гидроксиазометин атизин (А) ва 15-ацетоксиазометин атизин (Б) дитерпеноид алкалоидларининг структураси.

Шу билан бирга бундай модификациянинг натижасида 15-ГААга нисбатан яққолроқ намоён бўлган манфий инотроп таъсирнинг 15-АААда камайиши рўй беради. Бунда 15-ГАА алкалоидининг бу таъсири папилляр мускулнинг қисқариш кучи максимал 30 мкМда назоратдан $7,3 \pm 2,1\%$ гача пасайганда, дозага боғлиқ табиатга эганлиги аниқланган (2-расм, Б).

А Б



2-расм. 15-ГАА алкалоидининг каламуш юраги папилляр мускулининг қисқариш фаоллигига таъсири.

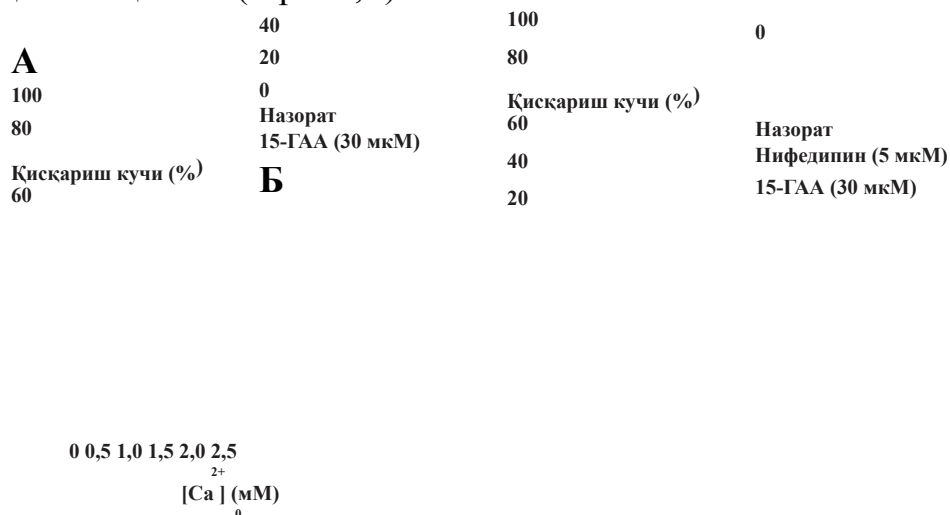
А. Папилляр мускули қисқаришининг ва 15-ГАА манфий ионотроп таъсирининг оригинал записи. Б. 15-ГАА таъсирининг концентрациясига боғлиқлиги. Ординат ўқида –

ифодаланган. Барча ҳолатларда $P < 0,05$, ($n=6$).

15-ГАА максимал таъсирини ярмини (ED_{50}) келтириб чиқарган концентрацияси 8,7 мкМни ташкил қилди ва у 3 Гц дан юқори бўлган кўзғатиш частоталарида яққол намоён бўлгди.

Юрак мускулининг қисқариш фаоллиги кардиомиоцитларда Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) ионларининг ҳужайра ичи концентрацияси билан аниқланиши муносабати билан (Bers, 2008), алкалоиднинг кузатиловчи таъсири кардиомиоцитларда Ca^{2+} ионлари концентрациясининг пасайишидан дарак бериши мумкин. Бу тахминни текшириш учун инкубация муҳитида Ca^{2+} ионлари концентрациясини ошишида 15-ГААнинг папилляр мускул қисқаришининг ривожланишига таъсири ўрганилди.

Бунда инкубацион муҳитда Ca^{2+} ионлари концентрациясини ошишига боғлиқ ҳолда папилляр мускулининг қисқариш кучи сезилари даражада пасайди (3-расм, А). Мазкур тажриба шароитлари муносабати билан папилляр мускули қисқариш кучининг ошиши асосан потенциалга боғлиқ Ca^{2+} каналларидан кириб келувчи Ca^{2+} ионлари орқали таъминланади, мазкур натижалар шуни кўрсатадики, алкалоиднинг бу таъсири кардиомиоцитларга кириб келувчи Ca^{2+} ионларининг тормозланиши билан боғлиқ. 15-ГАА бундай таъсирининг кўшимча исботи Ca^{2+} каналларининг селектив блокатори бўлган нифедипин билан ўтказилган тажрибаларда олинган бўлиб, унинг иштирокида алкалоиднинг таъсири сезилари даражада пасайган бўлсада, қисман сақланиб қолган (3-расм,Б).



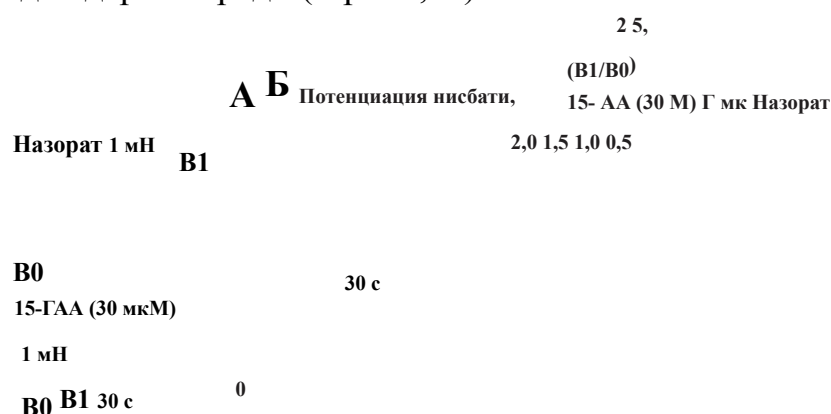
3-расм. 15-ГАА алкалоидини манфий ионотроп таъсирининг Ca^{2+} ионлари концентрацияси ва потенциалга боғлиқ Ca^{2+} -каналлари ҳолатига боғлиқлиги. А.15-ГААнинг $[Ca^{2+}]_o$ ионлари ошишида индуцирланган папилляр мускул қисқарувчанлигига таъсири. Б. Нифедипиннинг МИЭга 15-ГАА таъсири. Ордината ўқида – мускул қисқариш кучи, 100% деб қабул қилинган максималга нисбатан фоизда ифодаланган. Барча ҳолларда $P < 0,05$, ($n=4-6$).

Ушбу тажриба натижалари шундан гувоҳлик берадики, 15-ГАА яққол намоён бўлган МИЭга эга бўлиб, унинг асосида кардиомиоцитларда Ca^{2+} ионлари миқдорининг пасайиши ётиб, у сарколемманинг потенциалга

боғлиқ Ca^{2+} каналлари орқали Ca^{2+} ионлари кириб келишини тормозланиши натижасида келиб чиқади.

15-ГАА алкалоидининг кардиомиоцитлар саркоплазматик ретикулуми Ca^{2+} ионлари транспортига таъсири.

Юқорида МИЭ алкалоид нифедипин иштирокида тўлиқ тормозланмаслиги кўрсатилган бўлиб, бу унинг амалга ошишида потенциалга боғлиқ Ca^{2+} каналларидан ташқари, кардиомиоцитларнинг бошқа Ca^{2+} ташувчи тизимлари ҳам иштирок этишини кўрсатади. Бунда 15-ГАА нинг бу таъсири унинг саркоплазматик ретикулум (СР) Ca^{2+} ионлари транспортига таъсири билан боғлиқ бўлиши мумкин, у кардиомиоцитлар ва миокарднинг қисқариш фаоллигида $[\text{Ca}^{2+}]_i$ регуляциясида етакчи ролни ўйнайди (Bers, 2000). Бундан ташқари 15-ГАА алкалоидининг бундай таъсирнинг мумкинлиги ҳақида у томонидан қўзғатишнинг паст частоталарида (<1 Гц), юрак мускулларининг қисқариши асосан СР дан ажралиб чиқувчи Ca^{2+} ионлари томонидан таъминланадиган шароитларда тормозланиши билвосита гувоҳлик беради (Honerjager, 2005; Marks, 2000; Satoh et al., 2000). Бу тахминни текшириш учун 15-ГАА нинг СР да Ca^{2+} ионларининг тўпланиши ва ажралиб чиқиши жараёнларини ўрганиш имконини берувчи юрак мускулларининг ўзига хос жиҳати пост-рест потенциясига таъсири ўрганилган. Аниқланишича, муайян тинчлик давридан сўнг юрак мускулларининг қисқариш кучи СР да мунтазам қўзғатишга қараганда кўпроқ Ca^{2+} ионларининг миқдори қўшимча тўпланиши натижасида сезиларли даражада ошиб, улар мускул қисқаришининг кучайиши ёқир потенциясини таъминлайди (Bers et al. 1993). Каламуш юрагининг папилляр мускулида ўтказилган назорат тажрибаларида В1 биринчи қисқариш амплитудаси 30 сониялик тинчлик давридан кейин 100% деб қабул қилинган В0 стационар даражадан $189,7 \pm 6.2$ % гача ошди (4-расм, А). Бунда инкубация муҳитига 15-ГААнинг киритилиши (30 мкМ) В1 биринчи қисқариш амплитудасининг $10,2 \pm 4,1$ % гача тушиб кетиши билан давом этди ва бу ҳолат алкалоиднинг СР да Ca^{2+} ионлари тўпланишини пасайтириб, тинчликнинг потенцирловчи таъсирини тормозлашидан дарак беради (4-расм, А).



4-расм. 15-ГАА алкалоидининг каламуш юраги пост-рест потенциясига таъсири. А. 15-ГААнинг папилляр мускулларининг пост-рест потенциясига таъсирини кўрсатувчи оригинал записи. Б. 15-ГААнинг потенция

нисбатига таъсири (B1/B0). Ордината ўқида –B1/B0 нисбати. Барча ҳолларда $P<0,05$, ($n=5$).

Бироқ, 4-расм, А да кўриниб турганидек, 15-ГАА алкалоиди иштирокида ҳам тинчлик давригача қайд қилинадиган папилляр мускули стационар қисқаришларининг (B0) амплитудаси пасайиб кетади. Папилляр мускулининг стационар қисқаришларига алкалоиднинг бу таъсири унинг томонидан юқорида кўрсатилган сарколемманинг потенциалга боғлиқ Ca^{2+} -каналлари орқали Ca^{2+} ионларининг кардиомиоцитларга кириб келишининг тормозланиши билан тушунтирилади (3-расм).

Кардиомиоцитларга потенциалга боғлиқ Ca^{2+} -каналлари орқали кириб келувчи Ca^{2+} ионлари кейинчалик СРнинг юкламаси учун фойдаланилиши ҳисобга олинса (Bers, 2000), 15-ГАА алкалоидларининг пост-рест потенциянинг тормозлаши унинг кардиомиоцитларда Ca^{2+} ионлари ташиш тизимига таъсирини кўрсатади. 15-ГААнинг пост-рест потенцияга таъсир механизмини аниқлаш учун унинг Ca^{2+} ионларининг юклама жараёни ва бинобарин СР ҳажмини акси ҳисобланган потенция нисбатига (B1/B0) таъсири таҳлил қилинди (Mill et al., 1992; Bers et al., 1993). Бунда 15-ГАА иштирокида (30 мкМ) потенция нисбатининг қиймати $1,89 \pm 0,10$ дан $1,39 \pm 0,13$ гача пасайиши аниқланди (4-расм, Б). Бу натижалар шундан гувоҳлик берадики, 15-ГАА томонидан юзага келувчи B1 амплитудасининг камайиши СР га Ca^{2+} ионлари юкламасининг пасайиши ва натижада улар миқдорининг камайиши билан боғлиқ. Юрак мускули қисқарувчанлик фаоллигининг шунга ўхшаш тормозланиш механизми 1 синфга мансуб антиаритмик воситаларнинг таъсири асосида ҳам ётади.

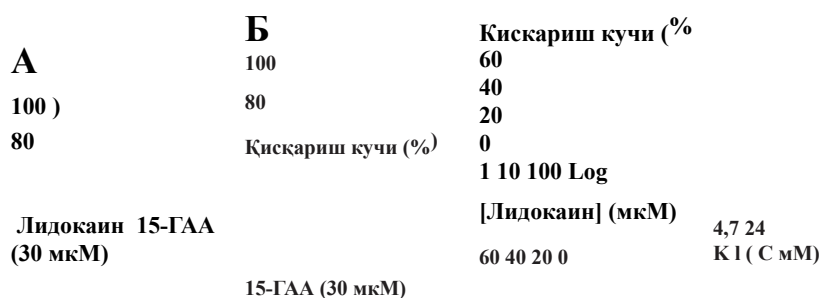
15-ГАА алкалоиди МИЭ амалга оширишда кардиомиоцитлар сарколеммасининг потенциалга боғлиқ Na^{+} -каналларининг роли. 1 синф антиаритмик воситаларнинг таъсири асосида юракнинг ўтказувчи тизимида ҳаракат потенциалининг кўтарилувчи фаза ривожланиш тезлигининг пасайиши, тарқалишининг секинлашуви ва кўзғалишнинг тормозланиши билан давом этувчи сарколемма потенциалга боғлиқ Na^{+} -каналларининг блокадаси ётади (Mitchell, 2015; Stoelting, 1999). Шу билан бирга антиаритмик воситалар мазкур синфининг баъзи вакиллари яққол намоён бўлган МИЭ билан характерланиб, унинг асосида шунингдек потенциалга боғлиқ Na^{+} -каналларининг блокадаси ҳам ётади (Heubach and Schule, 1998). Бунда улар Na^{+} -каналларини блоклаб, кардиомиоцитларда Na^{+} ионларининг хужайра ичи концентрациясини пасайишига замин яратади, бу ҳолат $[\text{Ca}^{2+}]_i$ миқдорининг пасайиши ва юрак мускули қисқарувчанлик фаоллигининг пасайиши билан бирга боради (Navada et al., 1994). Шу сабабли 15-ГАА алкалоидининг таъсирини таъминлашда потенциалга боғлиқ Na^{+} -каналларининг ролини аниқлаш учун унинг антиаритмик воситаларнинг I синфга мансуб, мазкур каналларнинг специфик блокатори ҳисобланган лидокаин иштирокида папилляр мускули қисқаришига таъсири ўрганилди

(Sheu and Lederer, 1985). Бунда унинг ED_{50} қийматига мос келувчи 15 мкМ концентрациядаги лидокаин иштирокида 15-ГАА алкалоидининг папилляр мускули қисқаришига таъсири $92,7 \pm 5,4\%$ дан (назорат лидокаинсиз)

15

$72,6 \pm 6,3\%$ гача пасайиб кетиши аниқланди. Шу билан бирга инкубация муҳитида 15-ГАА алкалоидининг мавжуд шароитда лидокаин учун доза самара эгри чизиклари унинг максимал таъсирини ўзгартирмаган холда деярли параллел равишда чапга силжиши аниқланди (5-расм, А). Бунда 30 мкМ 15-ГАА иштирокида лидокаин учун ED_{50} қиймати 15 мкМ дан 4,1 мкМ гача пасайиб, алкалоид ва лидокаин таъсирининг аддитив табиатли эканлигидан далолат беради. Бундан ташқари лидокаин учун унинг максимум таъсир самараси ўзгармаган холда доза-эффект эгри чизигининг алкалоид иштирокида параллел равишда силжиши унинг лидокаин билан битта нишон, яъни кардиомиоцитларнинг Na^+ -каналлари учун рақобатда эканлигини кўрсатади.

15-ГАА алкалоиди МИЭни таъминлашда Na^+ -каналларининг эҳтимолий ролини қўшимча равишда текшириш учун унинг деполяризация томонидан Na^+ -каналлари инактивацияси шароитида муҳитда KCl концентрациясини 24 мМ гача ошириш йўли билан таъсири ўрганилди (Catterall, 2003).



5-расм. 15-ГАА алкалоидининг инотроп таъсирини потенциалга боғлиқ Na^+ -каналлари ҳолатига боғлиқлиги. А. 15-ГААнинг лидокаин доза эффект эгри чизигига таъсири. Б. 15-ГААнинг Na^+ -каналларини деполяризация орқали меъёр ва инактивацияда таъсири (24 мМ, KCl). Ордината ўқида – мускул қисқариши кучи, 100% деб қабул қилинган максималга нисбатан фоизда ифодаланган. Барча ҳолларда $P < 0,05$, ($n=4$).

5-расм, Б да кўрсатилган натижалардан кўриниб турганидек, Na^+ -каналларининг интактивацияси шароитларида 15-ГАА алкалоиди нормал Кребс эритмасида олинган натижалар назоратга нисбатан солиштирганда ($92,7 \pm 2,4\%$) папилляр мускули қисқаришини фақат $63,7 \pm 5,6\%$ га камайтирди. Бу натижалар лидокаин билан олинган натижалар билан бир қаторда 15-ГАА алкалоидининг МИЭни таъминлашда Na^+ -каналлари муҳим рол ўйнашидан далолат беради. Бунда Na^+ -каналларини блокаб ва кардиомиоцитларда Na^+ ионлари миқдорини пасайтирган алкалоид Ca^{2+} ионларининг Na^+/Ca^{2+} -алмашинувчи тизим орқали чиқиб кетишининг кучайишига замин яратиб,

уларнинг цитоплазма ва СР даги микдорини пасайтириши мумкин (Bers, 2000).

15-ГАА алкалодининг кардиомиоцитларда Na^+/Ca^{2+} -алмашинувчи тизим орқали таъминланувчи Ca^{2+} ионлари транспортига таъсири. Юқорида кўрсатиб ўтилганидек, 15-ГАА алкалоиди Na^+/Ca^{2+} -алмашинувчи тизим муҳим рол ўйнайдиган СРга Ca^{2+} ионларининг йиғилиш жараёнини акс эттирувчи папилляр мускулларнинг пост-рест потенциясини сезиларли даражада тормозлаб қўяди (Bers and Christensen, 1990). Шу муносабат билан 15-ГАА алкалоидининг МИЭ кейинги тавсифи учун унинг Na^+/Ca^{2+} -алмашинувчи тизим орқали кардиомиоцитларга кириб келувчи Ca^{2+} ионлари билан таъминланувчи модификацияланган Кребс эритмаси ва юрак гликозиди оуабайн билан индуцирланувчи папилляр мускулларнинг қисқаришига таъсири ўрганилди (Blaustein and Santiago, 1977). Бунда 15-ГАА алкалоиди модификацияланган Кребс эритмаси ва Na^+ ионларининг паст микдори билан (35 мМ) индуцирланувчи папилляр мускулларнинг қисқариши самарали равишда тормозланди.

Алкалоиднинг бу таъсири дозага боғлиқ табиатга эга бўлиб унинг 30 мкМ концентрациясида, назоратдан ($72.6 \pm 4.8\%$) қисқариш кучини $11.6 \pm 3.1\%$ гача пасайиб кетиши кузатилди, унинг ED_{50} қиймати эса 16.9 мкМ ни ташкил қилди (6-расм, А). Ушбу натижалар Кребснинг модификацияланган эритмаси томонидан индуцирланувчи папилляр мускул қисқаришини 15-ГАА алкалоиди томонидан камайиши унинг Na^+/Ca^{2+} -алмашинувчи тизим орқали кириб келувчи Ca^{2+} ионларига таъсири билан боғлиқ бўлиши мумкинлигидан далолат беради.

Na 35 М (м)		Оуабайн (20 мк) М 15-ГАА 30 мк (М)	
А Б 15- () ГАА 30 мкМ			
100	0	80	0
80	+		
Қисқариш кучи (%)	КВ-R7943+15- 30 М ГАА (мк)	Қисқариш кучи (%)	КВ-R7943+15- 30 М ГАА (мк)
60	КВ-R7943 (20,6) мкМ	60	КВ-R7943 (20,6) мкМ
40	100	40	
20		20	

6-расм. Модификацияланган Кребс эритмаси (А) ва оуабайн (Б) томонидан индуцирланган каламуш юраги папилляр мускулининг қисқаришига 15-ГАА алкалоидининг таъсири. *Модификацияланган Кребс эритмаси таркибидаги NaCl 35 мМга камайитирилиб, унинг осмолярлиги эквимоляр концентрациядаги холин хлоридини қўйиши билан ушлаб турилган. Ордината ўқида - мускул қисқариш кучи, 100% деб қабул қилинган максималга нисбатан фозда ифодаланган. Барча ҳолларда $P < 0,05$, ($n=4$).*

Ушбу тахминни тажрибалард, 15-ГААнинг модификацияланган Кребс эритмаси билан индуцирланган папилляр мускули қисқаришига таъсири

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -алмашинувчи тизимнинг специфик блокатори KB-R7943 иштирокида ўрганилди (Sato, 2000). Бу тажрибаларда муҳитда 20,6 мкМ KB-R7943 мавжуд шароитда, модификацияланган Кребс эритмаси томонидан индуцирланган папилляр мускулларнинг қисқариш кучи ярмига пасайганда, алкалоиднинг таъсири ҳам сезилари даражада камайди. Бу натижалар шуни кўрсатадики, модификацияланган Кребс эритмаси томонидан индуцирланган папилляр мускули қисқариш кучини 15-ГАА алкалоиди томонидан камайиши Ca^{2+} ионларининг кириб келишини камайиши билан боғлиқ. Худди шунга ўхшаб 15-ГАА алкалоиди оуабаин томонидан индуцирланувчи папилляр мускулларининг $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -алмашинувчи тизим орқали кириб келувчи Ca^{2+} -ионлари томонидан таъминланувчи қисқаришини тормозлаган (Rossoni et al., 2006). Бунда алкалоиднинг мазкур таъсири дозага боғлиқ табиатга эга бўлиб, қисқаришлар амплитудасининг 30 мкМ концентрациясида назоратга нисбатан ($68.6 \pm 3.6\%$) максимал ($6.9 \pm 3.1\%$) камайитириши, ва унинг ED_{50} -15,8 мкМни ташкил қилди. Бундан ташқари, 15-ГААнинг оуабаин томонидан индуцирланган папилляр мускулнинг қисқаришига таъсир самараси KB-R7943 иштирокида ҳам сезилари даражада пасайган бўлиб, бу унинг кардиомиоцитларга $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -алмашинувчи тизим орқали Ca^{2+} ионларининг кириб келишига таъсирини яна бир бор исботлайди. Мазкур тажрибалар натижаларини таҳлили шуни кўрсатдики, 15-ГАА алкалоиди деярли бир хил таъсирга ва ED_{50} нинг яқин қийматлари билан модификацияланган Кребс эритмаси ва оуабаин томонидан индуцирланган папилляр мускулларнинг қисқаришларини тормозлайди. Мазкур турли хил методлар томонидан индуцирланган папилляр мускулларнинг қисқариши $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -алмашинувчи тизим орқали кириб келувчи Ca^{2+} ионларига боғлиқ бўлишини ҳисобга олиб, 15-ГАА алкалоиди МИЭтини таъминлашда улар томонидан $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -алмашинувчи тизим орқали кириб келувчи Ca^{2+} ионларининг камайиши муҳим рол ўйнайди деб хулоса чиқариш мумкин. Алкалоиднинг $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -алмашинувчи тизимига бундай таъсири иккита турли хил методлар томонидан индуцирланган, унинг KB-R7943 специфик блокатори иштирокида папилляр муускули қисқаришига таъсири сезилари даражада пасайиб кетиши билан исботланади.

Диссертациянинг “15-ацетоксизометин атизин дитерпеноид алкалоидининг каламуш юраги папилляр мускули қисқариш фаоллигига таъсирини тавсифлаш” боби 15-АААнинг мусбат ва манфий таъсирларини ўзига хос хусусиятларини ўрганишга бағишланган.

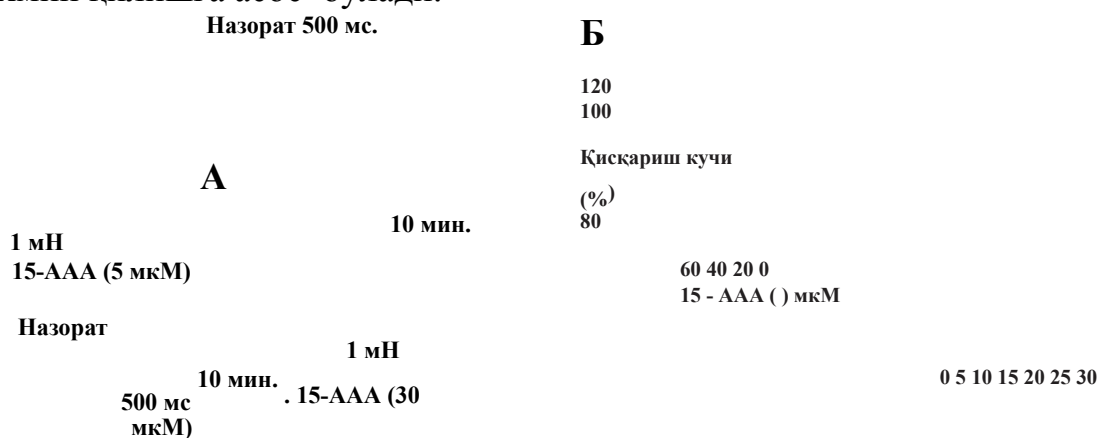
15-АААнинг папилляр мускулига таъсири 15-ГААдан фарқ қилиб, икки томонлама характерга эга бўлиб, 15-ААА паст концентрацияларида (<8 мкМ) ва қўзғатишнинг паст частоталарида (0,1-1 Гц) у папилляр мускул қисқариш кучини оширади, юқори концентрация ва қўзғатиш частоталарида эса аксинча, уни тормозлаб қўяди.

15-ААА алкалоидининг мусбат инотрон таъсирининг ўзига хос хусусиятлари. Инкубация муҳитига 5 мкМ 15-ААА алкалоидининг

киритилиши папилляр мускул қисқариш кучининг стационар қисқаришлар назорат даражасидан $21,8 \pm 3,2\%$ га ошиши билан кечади (7-расм). Юрак

18

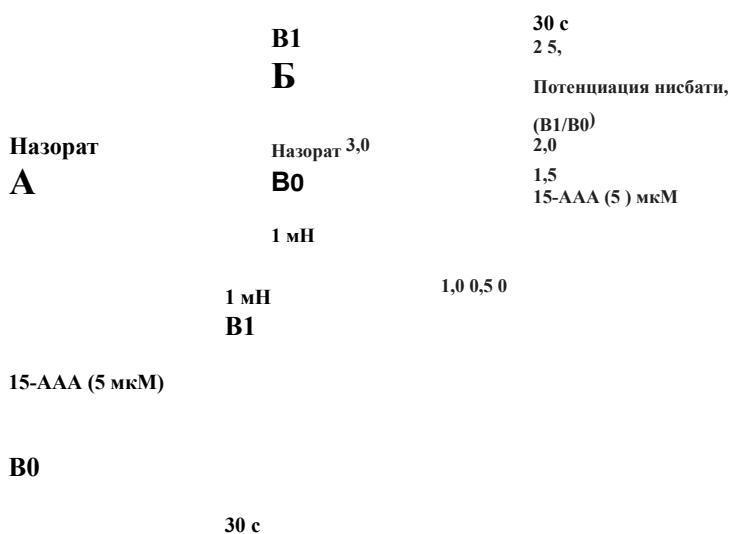
мускули қисқариш кучининг бундай ошиши ёки мусбат инотроп таъсири МИТ қатор катехоламинлар (адреналин, норадреналин) таъсири учун хос бўлиб, у кардиомиоцитларда $[Ca^{2+}]_i$ нинг ошишига боғлиқ. Катехоламинларнинг бундай таъсири β -адренорецепторларнинг стимуляцияси туфайли таъминланиб, улар аденилатциклазани фаоллаштиради ва цАМФ фаоллашишини кучайтирган ҳолда Ca^{2+} ионларининг сафарбар этилишига ва $[Ca^{2+}]_i$ нинг ошишига замин яратади ва бунинг натижасида юрак мускули қисқаришларининг кучайиши рўй беради (Bers, 2000). Бу маълумотлар худди шунга ўхшаш механизм 15-ААА алкалоидининг МИТ асосида ётиши мумкин деб тахмин қилишга асос бўлади.



7-расм. 15-ААА алкалоиди инотроп таъсирининг унинг концентрацияларига боғлиқлиги. А. 5 ва 30 мкМ 15-ААА инотроп таъсирининг оригинал записи. Б. 15-АААнинг папилляр мускул қисқаришларига таъсирини унинг концентрациясига боғлиқлиги. Ордината ўқида - мускул қисқариш кучи, 100% деб қабул қилинган максимал нисбатан фойдаланган. Барча ҳолларда $P < 0,05$, ($n=6$).

Бироқ, алкалоиднинг бу таъсири β -адренорецепторларнинг специфик блокатори бўлган пропранолол иштирокида ҳам сақланиб қолиб, бу 15-ААА алкалоидининг МИТ β -адренорецепторлар ва аденилатциклаза тизимининг фаоллашувига боғлиқ эмаслигидан гувоҳлик беради. Шу билан бирга, 15-АААнинг таъсири Ca^{2+} -каналларининг потенциалга боғлиқ блокатори – нифедипин иштирокида ҳам кузатилган бўлиб, мазкур каналлар орқали Ca^{2+} ионларининг кириб келиши орқали фаоллашувини мустасно этади. Шу билан бирга, 15-ААА алкалоидининг МИТ кўзғатишнинг паст частоталарида (0,1-1 Гц), юрак мускулининг қисқариши асосан СР дан ажралиб чиқувчи Ca^{2+} ионлари ҳисобига таъминланувчи шароитларда кузатилди (Maier et al., 1997) ва тахмин қилиш мумкинки, унинг амалга ошишида СР даражасидаги худди шунга ўхшаш механизм иштирок этади. Бу тахминни текшириб кўриш учун 15-АААнинг худди юқорида кўрсатилганидек, папилляр мускулнинг пост-рест потенцияциясига таъсири ўрганилиб, у Ca^{2+} ионларини СР га йиғилиши ва ажралиб чиқиш

жараёнларини акс эттиради. Бунда муҳитда 15-ААА (5 мкМ) иштирокида В1 биринчи қисқаришнинг амплитудаси 30 сониялик тинчлик давридан кейин назоратдан $76,6 \pm 8,1\%$ га ошди (8-расм, А). Шу билан бирга, мазкур шароитларда стационар қисқаришлар амплитудасининг бирмунча кўтарилиши ҳам кузатилиб, у В1 га нисбатан бироз пастроқ бўлиб, нисбий потенция қийматини $(2,20 \pm 0,18)$ (В1/В0) назорат даражасига нисбатан $1,89 \pm 0,10\%$ га сезилари даражада ошишидан далолат беради (8-расм, Б). Шу билан бирга, потенция нисбати қийматини ошиши Ca^{2+} ионларининг СР йиғилиш жараёнини кўрсатгичи бўлиб (Mill, 1992), 15-ААА алкалоидининг потенцирловчи таъсири Ca^{2+} нинг СР да йиғилишининг ва қўшимча ошишининг кучайишига боғлиқ бўлиб, у папилляр мускул қисқаришининг кучайишини таъминлайди. Юқорида таъкидлаб ўтилганимиздек, СР да Ca^{2+} ионлари миқдорининг регуляциясида $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -алмашинувчи тизим муҳим рол ўйнаб, улар кардиомиоцитларга Ca^{2+} ионлари кириб келишини таъминлайди ва уларнинг СР даги йиғилишини ошириб, юрак мускулининг қисқарувчанлик фаоллигининг ошишига имкон беради (Bers and Christensen, 1990; Shattock et al., 2015).



8-расм. 15-ААА (5 мкМ) ни каламуш юраги папилляр мускулининг пост-рест потенциясига таъсири. А. 15-АААнинг (5 мкМ) папилляр мускул пост-рест потенциясига таъсирини тасвирловчи ёзув. Б. 15-АААнинг потенция нисбатига (В1/В0) таъсири. Ордината ўқида – В1/В0 нисбати. Барча ҳолларда $P < 0,05$, ($n=5$).

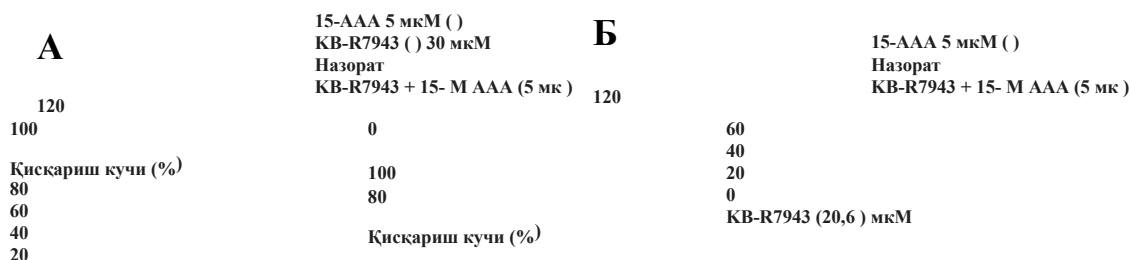
Бунда Ca^{2+} ионларининг кардиомиоцитлардан чиқиб кетишини таъминловчи $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -алмашинувчи тизимнинг асосий функциясидан ташқари, ҳар бир қисқариш актидан кейин у шунингдек ҳаракат потенциали платосининг тушиб кетиш вақтида уларнинг кириб келишида ҳам иштрок этади (Bers, 2015). Бундан ташқари юрак гликозидлари келтириб чиқарадиган мусбат инотроп таъсир ҳам $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -алмашинувчи тизим орқали кириб келадиган Ca^{2+} ионлари орқали таъминланади ва бунинг натижасида

кардиомиоцитларда Na^+ ионларининг хужайра ичи даражаси пасаяди (Nishio et al., 2002). Бу маълумотларни $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -алмашинквчи тизимга 15-

20

АААнинг потенцирловчи таъсирини таъмилашдаги эҳтимолий ролини ҳисобга олган ҳолда унинг специфик блокатори – КВ-Р7943 мочевино ҳосиласи иштирокида унинг самаралари ўрганилди. Бунда КВ-Р7943 нинг максимал таъсир концентрацияси иштирокида (30 мкМ), $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -

алмашинувчи тизим тўлиқ блокаб қўйилган шароитда муҳитга 5 мкМ 15-АААнинг киритилиши алкалоиднинг потенцирловчи таъсирининг ривожланишига олиб келмади (9-расм, А). Шу билан бирга мазкур тажрибаларда аниқланилдики, КВ-Р7943нинг паст концентрацияларида - $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - алмашинувчи тизимнинг функцияси қисман сақланиб қолганда 15-ААА потенцирловчи таъсир келтириб чиқаришга қобилиятли бўлади (9-расм, Б).



9-расм. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - алмашинувчи тизимнинг специфик блокатори КВ-Р7943нинг 15-ААА алкалоидининг потенцирловчи эффектига таъсири. 15-АААнинг 30 мкМ (А) ва 20,6 мкМ (Б) КВ-Р7943 иштирокида папилляр мускул қисқаришига таъсири. Ордината ўқида - мускул қисқариш кучи, 100% деб қабул қилинган максималга нисбатан фойизларда ифодаланган. Барча ҳолларда $P < 0,05$, ($n=6$).

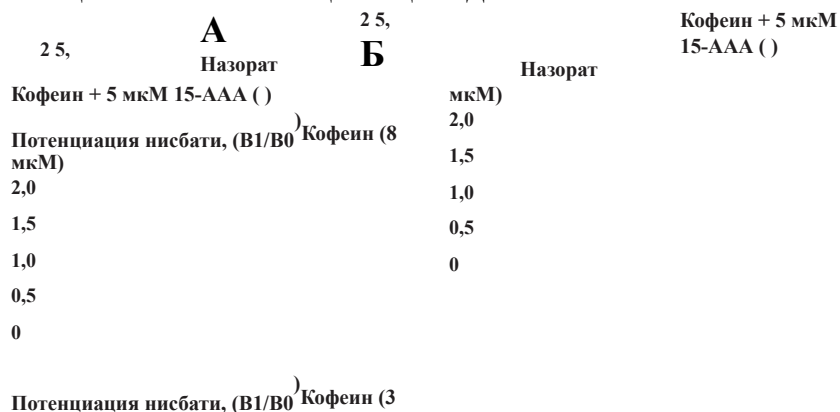
Бу тажрибаларнинг натижалари шундан гувоҳлик берадики, 15-ААА нинг потенцирловчи таъсирини амалга оширишда, афтидан, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - алмашинувчи тизим томонидан етказиб берилувчи Ca^{2+} ионлари иштирок этиб, улар кейинчалик СР кириб, папилляр мускул қисқаришининг кучайишига замин яратади.

15-ААА потенцирловчи таъсирининг бу каби механизмини исботлаш учун Ca^{2+} ионларининг йиғилиши ва СР га ажралиб чиқиши жараёнларини ўрганишда кенг қўлланиладиган кофеин иштирокида унинг таъсирлари ўрганилди. Кофеин СРдан Ca^{2+} ионлари ажралиб чиқишининг кучли стимулятори бўлиб, бунинг натижасида тинчлик ҳолатида уларнинг яна СРга

кайтадан йиғилиш жараёнлари жиддий бузилади (Stephenson, 2008). Дарҳақиқат, 10-расмда кўрсатилганидек, 8 мкМ кофеин иштирокида потенцияция нисбатининг қиймати $1,89 \pm 0,10$ дан 1 гача тушиб кетди, бу ҳолат пост-рест потенцияцияни таъминловчи механизм ишламаслигидан далолат бериб, бунинг натижасида СРга Ca^{2+} ионларининг кириб келиши

21

тўхтайди. Бунда шу нарса аниқландики, кофеин таъсири фонида 15-АААнинг (5 мкМ) қўшилиши папилляр мускул нормал реакциясининг тикланишига олиб келмайди, бу алкалоиднинг потенцирловчи таъсири Ca^{2+} ионларини СР да тўпланишини таъминловчи жараёнлар билан боғлиқ бўлса керак. Бу тахмин кофеиннинг паст концентрациялари билан пост-рест потенцияциянинг қисман тормозланиши шароитларида 15-ААА (5 мкМ) таъсирини ўрганишда ўз исботини топди. Бунда 3 мкМ кофеин иштирокида потенцияция нисбатининг қиймати $1,4 \pm 0,12$ га тушиб кетса, 15-ААА нинг (5 мкМ) қўшилишида унинг $1,74 \pm 0,14$ га ошиши кузатилади (9-расм, Б). Бу натижалар пост-рест потенцияцияни таъминловчи механизмнинг қисман ишлаши шароитларида 15-ААА алкалоиди потенцирловчи эффектининг индуцирланиш қобилиятини сақлаб қолади.



10-расм. Кофеиннинг 15-ААА алкалоидини потенцирловчи эффектига таъсири. 15-АААнинг 8 мкМ (А) ва 3 мкМ (Б) кофеин иштирокида папилляр мускул потенцияцияси нисбатига таъсири. Ордината ўқида – потенцияция нисбати (B1/B0). Барча ҳолларда $P < 0,05$, ($n=5$).

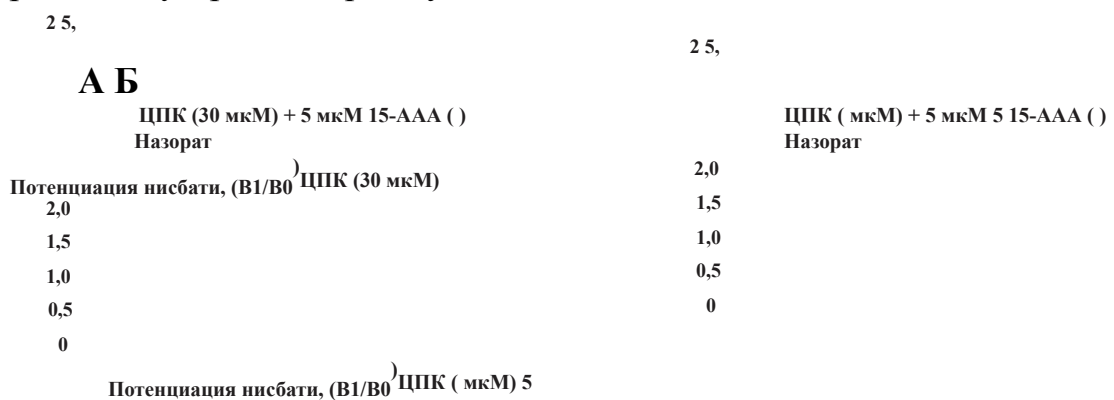
Ушбу тажриба натижалари 15-ААА алкалоидининг потенцирловчи эффекти эҳтимол, Ca^{2+} ионларининг СР га йиғилиш жараёнларининг модификацияси билан боғлиқ бўлиши мумкин. 15-ААА алкалоидининг СР га Ca^{2+} ионларининг йиғилиш жараёнларига таъсирини таърифлаш мақсадида Ca^{2+} -АТФазанинг селектив ингибитори бўлган, асосан Ca^{2+} ионларини СР га йиғилишини таъминлайдиган циклопиазон кислотаси (ЦПК) иштирокида унинг эффектлари ўрганилди (Takahashi et al., 1995). Бу тажрибаларда муҳитга 30 мкМ ЦПКнинг қўшилиши потенцияция нисбатининг 1 гача тушиб кетиши билан давом этиб, бу Ca^{2+} -АТФазанинг ингибирланиши ва СР га Ca^{2+} ионларининг йиғилишини тормозланиши натижасида пост-рест потенцияциянинг бузилишидан дарак беради (11-расм, А).

Бу шароитларда 15-ААА (5 мкМ) нинг қўшилиши худди кофеин билан

ўтказилган тажрибалардаги каби пост-рест потенциянинг қайта тикланиши билан бормаган, бу алкалоиднинг потенцирловчи таъсирини Ca^{2+} ионларини СР га йиғилишини таъминловчи жараён билан боғлиқлигини кўрсатади. Шу билан бирга бу тажрибаларда ЦПКнинг паст

22

концентрацияларида пост-рест потенция қисман сақланиб қолса, 5 мкМ 15-АААнинг кўшилиши потенция нисбати қийматининг $1,5 \pm 0,11$ дан $1,72 \pm 0,12$ гача ошиши билан кечади (11-расм ,Б). Бу натижалар 15-ААА нинг потенцирловчи эффекти Ca^{2+} ионларининг СРга йиғилиш жараёнининг фаоллашуви ва охиргисида унинг миқдорини ошиши билан боғлиқ бўлиб, бу папилляр мускулнинг қисқаришларини кучайишига ёрдам беради. Юрак мускули қисқариш фаоллигининг стимуляциясини шунга ўхшаш механизми *Aconitum* авлодига кирувчи ўсимликдан ажратиб олинган аконитин алкалоиди учун хос бўлиб, унинг асосида потенциалга боғлиқ Na^+ каналларининг модификацияси ётади (Wright,2002; Zhou et al.,2013). Бунда аконитиннинг Na^+ каналлари билан ўзаро таъсирлашуви натижасида



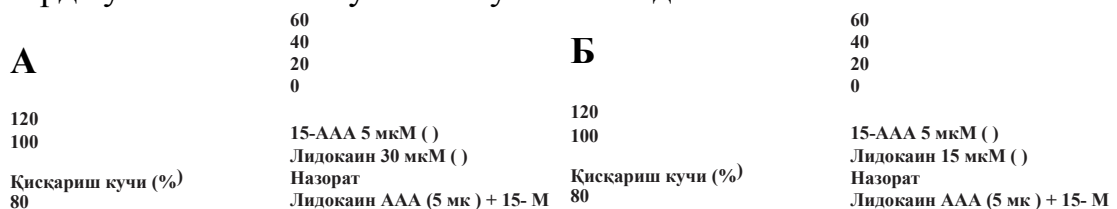
11-расм. Циклопиазон кислотасининг 15-ААА алкалоидини потенцирловчи эффектига таъсири. 15-АААнинг 30 мкМ (А) ва 5 мкМ (Б) ЦПК иштирокида папилляр мускул потенция нисбтига таъсири. *Ордината ўқида – потенция нисбати (V1/V0). Барча ҳолатларда $P < 0,05$, (n=5).*

уларнинг инактивация механизми бузилиши аниқланган бўлиб, бу кардиомиоцитларга Na^+ ионларининг киришини кучайишига ва уларнинг мембранасининг барқарор деполяризациясининг ривожланишига олиб келади. Барқарор деполяризация, ўз навбатида Ca^{2+} ионларининг сафарбар этилишини таъминловчи жараёнларнинг фаоллашувига ва кардиомиоцитларда улар даражасининг кўпайиб кетишига олиб келади, бу ҳолат эса юрак мускули қисқаришининг кучайишига ва улар ритмининг бузилишига олиб келади. 15-ААА ва аконитин молекулаларининг структуравий тузилишидаги ўхшашликни ҳисобга олиб, 15-АААнинг потенцирловчи эффекти аконитин таъсир механизмига ўхшаган механизм билан таъминланса керак деб тахмин қилиш мумкин. Шу сабабли бу тахминни текшириб кўриш учун аконитинни юрак мускулини қисқариш фаоллигига таъсирини ва ундан келиб чиқадиган аритмияни олдини оладиган лидокаин иштирокида 15-ААА (5 мкМ) нинг эффектлари ўрганилди (Antzelevitch, 2014). Тажрибаларда лидокаиннинг максимал таъсир концентрацияси фонида 15-ААА (5 мкМ) ни кўшиш

папилляр мушак қисқариш кучига сезиларли таъсир кўрсатмади (12-расм, А). Бу шароитларда 15-ААА нинг потенцирловчи эффектининг йўқлиги, афтидан лидокаиннинг максимал таъсир концентрацияси иштирокида Na^+ -каналларининг барчаси

23

банд бўлмагани учун уларнинг алкалоид билан таъсирлашуви қийинлашади ва шунинг учун унинг эффекти намоён бўлмаслиги билан тушунтирилиши мумкин. Бу лидокаиннинг ED_{50} (15мкМ) га мос келувчи концентрациясидан фойдаланиб ўказилган тажрибаларда ўз исботини топган бўлиб, бунда папилляр мускулнинг қисқариш кучи назорат даражасининг ярмига тушиб кетган. Бунда 15-ААА (5 мкМ) алкалоиди мазкур шароитларда папилляр мускули қисқариш кучини оширади, бироқ у лидокаин йўқлигидагига нисбатан пастроқ бўлади (12-расм, Б). Бу натижалар шундан гувоҳлик берадики, 15-ААА нинг потенцирловчи эффекти унинг Na^+ каналлари билан ўзаро таъсири туфайли амалга ошиб, бунинг натижасида кардиомиоцитларга Na^+ ионларининг кириб келиши фаоллашади, пировардида уларда Ca^{2+} ионлари миқдори ортиб, папилляр мускулнинг қисқариши кучаяди. Эхтимол 15-ААА нинг бу эффекти аконитиннинг баъзи-бир структуравий элементлар билан умумийлиги, хусусан сирка кислотасининг мавжудлигига боғлиқ бўлиб, шу сабабли Na^+ каналлари билан ўзаро алоқа ва МИЭ нинг ривожланишига замин яратувчи жараёнлар фаоллашади. Бунда 15-ААА томонидан унинг паст концентрациялари ишлатилганда МИЭ нинг пайдо бўлиши, афтидан юқори концентрацияларда у МИЭ дан устун турувчи манфий инотроп эффектни келтириб чиқариши билан тушунтрилиши мумкин ва шунинг учун бундай шароитларда унинг намоён бўлиши кузатилмайди.



12-расм. 15-ААА алкалоидини потенцирловчи эффектига лидокаиннинг таъсири. 15-АААнинг 30 мкМ (А) ва 15 мкМ (Б) лидокаин иштирокида папилляр мускул қисқаришига таъсири. Ордината ўқида - мускул қисқаришининг кучи, 100% деб қабул қилинган максималга нисбатан фойизда ифодаланган. Барча ҳолларда $P < 0,05$, ($n=6$).

Шундай қилиб, 15-ААА алкалоидининг мусбат инотроп эффектини ўрганиш жараёнида олинган маълумотларнинг таҳлилидан унинг ривожланиши асосида юрак мускули қисқаришининг кучайишини таъминловчи

кардиомиоцитларга Na^+ ионларининг кириб келишини кучайиши ва Ca^{2+} ионлари сафарбар қилиниши жараёнларининг фаоллашуви

24

билан кечувчи Na^+ каналлари функциясининг модификацияси ётиши маълум бўлади.

15-ААА алкалоидининг манфий инотроп эффектининг ўзига хослиги. Юқори концентрацияларда (≥ 8 мкМ) ва қўзғатиш частоталарида (≥ 1 Гц) 15-ААА алкалоиди папилляр мускули қисқариш фаоллигини сезиларли даражада пасайтиради. Алкалоиднинг бу эффекти доза-боғлиқ бўлиб, 30 мкМ концентрацияда папилляр мускулнинг қисқариш кучи назоратдан $13,9 \pm 4,9\%$ гача пасайди. Бунда 15-ААА максимал эффектининг ярмини чақирадиган концентрацияси 16,7 μM бўлиб, у қўзғатишнинг юқори частоталарида яққол намоён бўлди. Бу натижалар юқори концентрацияларда 15-ААА алкалоиди 15-ГАА дагига нисбатан камроқ намоён бўлган манфий инотроп эффектини (МИС) намоёйиш этган. Буни кейинги ўрганишда 15-АААнинг эффекти аниқланди ва у инкубация муҳитида Ca^{2+} ионлари концентрациясига боғлиқ бўлиб, уларнинг концентрацияси ошган пайтда у ҳам кучаяди. Бу натижалар

Бу натижалар 15-ААА алкалоидининг манфий инотроп эффекти эҳтимол унинг кардиомиоцитларга Ca^{2+} ионларининг кириб келишига таъсири билан боғлиқ бўлса керак. Бу тахминни текшириб кўриш учун 15-АААнинг бу эффектига потенциалга боғлиқ Ca^{2+} каналларининг блокатори нифедипиннинг таъсири ўрганилди. Бунда 5 мкМ нифедипин иштирокида 15-ААА алкалоиди худди Ca^{2+} каналларининг блокатори мавжуд бўлмаган шароитдаги каби папилляр мускулларнинг қисқаришини тормозлаб қўяди. Бу натижалардан манфий инотроп эффекти нифедипин иштирокида сезилари даражада тушиб кетган 15-ГАА дан фарқ қилиб, 15-ААА нинг МИЭ кардиомиоцитларнинг потенциалга боғлиқ Ca^{2+} каналлари орқали Ca^{2+} кириб келиши тормозланишга кам даражада боғланган. Шу муносабат билан 15-ААА юқори концентрацияларини папилляр мускулнинг пост-рест потенцияга таъсири ўрганилган бўлиб, у СР даражадасида Ca^{2+} ионлари транспортини таъминловчи жараёнларни акс эттиради. Бунда 15-ААА (30 мкМ) пост-рест потенция жараёнини сезилари даражада тормозлаши аниқланган бўлиб, потенция нисбати катталигининг (V_1/V_0) назорат кўрсаткичидан 1,89 ва 1,47 га тушиб кетиши бундан гувоҳлик беради. Бу натижалар 15-ААА нинг МИЭ эҳтимол СР да Ca^{2+} ионларининг йиғилишининг пасайиши ва СР да улар миқдорининг камайиши билан боғлиқ. СР да Ca^{2+} ионлари миқдorigа 1 синфга мансуб антиаритмик воситалар таъсир қилиб, у потенциалга боғлиқ Na^+ -каналларининг блокадаси натижасида таъминланади (Neubach and Schule, 1998). Шу муносабат билан Na^+ -каналининг 15-ААА алкалоидини МИЭ таъминлашдаги ролини аниқлаш учун лидокаин иштирокида унинг таъсири ўрганилди. Бунда лидокаиннинг ED_{50} қийматига мос келувчи 15 мкМ лидокаин иштирокида 15-ААА алкалоидининг МИЭ $17,3 \pm 4,1\%$ мартага камайди. Бундан ташқари деполяризация орқали

Na⁺-каналларининг инактивацияси шароитларида 15- ААА алкалоидининг МИЭ 54,3±4,7% га пасайди. Бу натижалар лидокаин билан олинган натижаларга билан бир қаторда 15-ААА алкалоидининг МИЭ таъминлашда кардиомиоцитларнинг Na⁺-каналлари муҳим рол ўйнашидан дарак беради. Бунда шуни таъкидлаш зарурки, шунга ўхшаш тажрибаларда

25

лидокаин ва Na⁺-каналларининг инактивацияси кам даражада 15-ГАА алкалоидининг МаИЭ сига таъсир қилган. Бу натижалар шундан гувоҳлик берадики, 15-ААА алкалоидининг МаИЭ амалга оширишда унинг кардиомиоцитларни Na⁺-каналлари билан ўзаро таъсири муҳим рол ўйнайди. Бунда Na⁺-каналларини блок қилган ҳолда ва кардиомиоцитларда Na⁺-ионлари миқдорини пасайтириб 15-ААА Na⁺/Ca²⁺-алмашинувчи тизими орқали Ca²⁺ ионларининг чиқиб кетишига ва уларнинг цитоплазмада ва СР да миқдорининг пасайиб кетишига олиб келади (Bers, 2000). Бу тахминни текшириб кўриш учун асосан Na⁺/Ca²⁺-алмашинувчи тизим орқали кардиомиоцитларга кириб келувчи Ca²⁺ ионлари орқали таъминланадиган 15-ААА ни Кребс ва юрак гликозиди оуабаиннинг модификацияланган эритмаси билан индуцирланган папилляр мускулнинг қисқаришига таъсири ўрганилди (Blaustein and Santiago, 1977). Бу тажрибаларда 15-ААА Кребс ва оуабаин модификациялаган эритмаси билан индуцирланган папилляр мускулнинг қисқаришини самарали тормозлаши аниқланди.

Бунда 15-ААА нинг бу самараси дозага боғлиқ бўлиб, 30 мкМ да алкалоид Кребс ва оуабаиннинг модификацияланган эритмаси билан индуцирланган қисқаришни 16,1±3,7% гача ва ЕД₅₀ 18,1 билан 17,4 мкМ қийматларида 15,4±3,8% гача кучайтирган. Кребс ва оуабаиннинг модификацияланган эритмаси билан индуцирланган папилляр мускулнинг қисқариши Na⁺/Ca²⁺-алмашинувчи тизим орқали кириб келувчи Ca²⁺ ионлари билан таъминланиб, бу натижалар 15-АААнинг мазкур эффекти Ca²⁺ ионларининг кардиомиоцитларга киришининг бу йўлини тормозлашга боғлиқлигидан гувоҳлик беради. Na⁺/Ca²⁺-алмашинувчи тизим орқали Ca²⁺ ионларининг кириб келишига 15-АААнинг таъсирини қўшимча равишда исботлаш унинг блокатори KB-R7943 иштирокида ўтказилган тажрибаларда олинган бўлиб, унинг иштирокида эффектлар ва 10,7±2,6% гача камайган. Бу натижалар 15-ААА алкалоиди томонидан Кребс ва оуабаиннинг модификацияланган эритмаси билан индуцирланган папилляр мускулнинг Na⁺/Ca²⁺-алмашинувчи тизим Ca²⁺ ионлари кириб келишининг пасайишига боғлиқлигининг яққол исботидир.

Умуман олганда, олинган маълумотларни таҳлил қилиш шуни кўрсатдики, 15-ААА ва 15-ГАА алкалоидлари инотроп фаолликка эга бўлиб, у кардиомиоцитларда Ca²⁺ ионлари транспортининг модификациясига боғлиқ. Бунда 15-ААА ва 15-ГААларнинг манфий инотроп эффекти кардиомиоцитларда Ca²⁺ ионлари миқдорининг пасайиши ва уларнинг қисқарувчанлик фаоллигини тормозланиши билан бирга борувчи, Ca²⁺-ташувчи тизими функциясининг модификациясига замин яратувчи Na⁺-

каналларининг блокадасига боғлиқлиги аниқланган. Шу билан бирга, 15- ААА мусбат инотроп эффектининг асосида кардиомиоцитларда Ca^{2+} ионлари миқдорининг ошиши ва уларнинг қисқарувчанлик фаоллигини кучайиши билан бирга борувчи, Ca^{2+} -ташувчи тизими функциясининг модификациясига замин яратувчи Na^{+} -каналларининг фаоллашуви ётиши кўрсатилган. 15-ААА ва 15-ГАА алкалоидлари инотроп фаолликларидаги аниқланган фарқлар улар структуравий тузилишининг ўзига хосликлари билан боғлиқ деб тахмин

26

қилиниб, у Na^{+} -каналлари ҳолатининг модуляция ҳолатини ва Ca^{2+} -ташувчи тизим функцияси модификациясини белгилаб беради.

ХУЛОСА

1. Биринчи марта 15-ГАА ва 15-ААА дитерпеноид алкалоидларининг ўзига хос хусусиятлари таърифланган ва уларнинг манфий ва мусбат фаолликлари асосида ётувчи механизмлар ўрганилган.
2. Биринчи марта 15-ААА нинг антиаритмик фаоллигининг ошишини таъминловчи С-15 углевод атомидаги ОН-гурухини CH_3O -гурухига алмаштириш йўли билан 15-ГАА структурасининг модификацияси унинг манфий инотроп фаоллигини кучайтирмасдан, аксинча, пасайишига олиб келиши аниқланган.
3. 15-ГАА ва 15-АААнинг манфий инотроп эффекти асосан Na^{+} -каналларининг блокадаси билан боғлиқ бўлиб, у кардиомиоцитлардаги Ca^{2+} ионлари даражасининг пасайишига олиб келувчи Ca^{2+} -ташувчи тизимлари функциясининг модификациялари билан бирга амалга ошиши аниқланган.
4. 15-ГАА ва 15-ААА алкалоидларининг манфий инотроп эффектини таъминлашда $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -алмашинувчи тизим муҳим рол ўйнаб, унинг Na^{+} -каналлари блокадаси ва Na^{+} ионлари миқдорининг пасайиши шароитида фаоллашуви кардиомиоцитлардан Ca^{2+} ионларининг чиқиб кетишининг кучайиши кўрсатилган.
5. Биринчи марта 15-ГАА ва 15-ААА алкалоидлари каламуш юрагининг пост-рест потенциясини тормозлаб қўйиши аниқланиб, саркоплазматик ретикулумга Ca^{2+} ионлар йиғилишининг пасайиши, уларнинг манфий инотроп эффектини таъминлашга муҳим ҳисса қўшади.
6. Биринчи марта 15-ААА паст концентрацияларда (3-8 мкМ) ва кўзгатишнинг паст частоталарида (0,1-1 Гц) мусбат инотроп эффект намоён қилиши ва кардиомиоцитларда Ca^{2+} ионлари даражасининг ва уларнинг саркоплазматик ретикулумдаги миқдорининг ошиши натижасида каламуш юраги папилляр мускулининг қисқариш кучини ошиши аниқланди.
7. 15-ААА нинг мусбат инотроп эффекти асосида Na^{+} -каналларининг фаоллашуви ётиши аниқланиб, у кардиомиоцитларда Na^{+} ионлари миқдорининг ошишига ва каламуш юраги папилляр мускули

қисқаришларининг кучайишини таъминловчи Ca^{2+} ионларининг сафарбар қилинишига замин яратади.

8. 15-ААА нинг мусбат инотроп самарасини таъминлашда $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -алмашинувчи тизим муҳим рол ўйнаши кўрсатилиб, унинг кардиомиоцитлардаги Na^+ -каналлари миқдори ошишидаги фаоллашуви Ca^{2+} ионларининг саркоплазматик ретикулумга кириб келишига ва йиғилишининг кучайишига олиб келади.

27

9. 15-ААА ва 15-ГАА алкалоидлари манфий инотроп фаолликлари орасидаги фарқ уларнинг структуравий тузилмасидаги ўзига хосликлар билан боғлиқлиги кўрсатилиб, у Na^+ -каналлари ҳолатининг модуляцияси хусусиятини ва кейинчалик Ca^{2+} -ташувчи тизим функциясининг модификациясини белгилаб беради.
10. 15-ААА нинг инотроп ва антиаритмик таъсири орасидаги бевосита корреляциянинг йўқлиги, унинг Na^+ -каналларини блоклаш эффектининг пасайиши, шунингдек мусбат инотроп фаоллиги билан боғлиқ бўлиши мумкин.

ЗАЙНАБИДДИНОВ АНВАР ЭРКИНЖОНОВИЧ

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИНОТРОПНОГО
ДЕЙСТВИЯ ДИТЕРПЕНОИДНЫХ АЛКАЛОИДОВ
15-АЦЕТОКСИАЗОМЕТИН АТИЗИНА И 15-ГИДРОКСИАЗОМЕТИН
АТИЗИНА**

**03.00.08 – Физиология человека и животных
(биологические науки)**

АВТОРЕФЕРАТ ДОКТОРСКОЙ ДИССЕРТАЦИИ

ТАШКЕНТ – 2016

Тема докторской диссертации зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан за №№ 30.06.2015/B2015.2.B166.

Докторская диссертация выполнена в Институте биоорганической химии

Автореферат диссертации на трех языках (узбекский, русский, английский) размещён на веб-странице Научного совета (www.nsu.uz) и Информационно-образовательном портале «ZiyoNet» (www.ziynet.uz).

Научный консультант: Усманов Пулат Бекмуратович
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: Мирходжаев Улугбек Зокирович
доктор биологических наук, профессор
Кучкарова Любовь Салижановна
доктор биологических наук, профессор
Матчанов Азат Таубалдиевич
доктор биологических наук, профессор

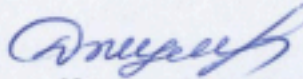
Ведущая организация: Андijanский государственный университет

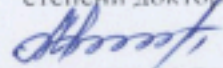
Защита диссертации состоится «9» декабрь 2016 года в «10⁰⁰» часов на заседании Научного совета 14.07.2016.B.01.03 при Национальном университете Узбекистана и Институте микробиологии (адрес: 100174, г.Ташкент, Алмазарский район, ул. Университетская 4, конференц-зал Биологического факультета. Тел.: (+998 71) 227 12 24, факс: (+998 71) 246 02 24, e-mail: nauka@nuu.uz).

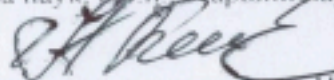
С докторской диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Национального университета Узбекистана (зарегистрирована под № 06). Адрес: 100174, г.Ташкент, Алмазарский район, ул. Университетская 4, Административное здание НУУз, 2-й этаж, 4-й каб. Тел.: (+998 71) 246-02-24.

Автореферат диссертации разослан «23» ноябрь 2016 г.
(протокола рассылки №___ от «___» _____ 2016 г.).



 Г.Н. Джуманиязова
Председатель Научного совета по присуждению учёной степени доктора наук, д.б.н. проф.

 З.А. Маматова
Член Научного совета по присуждению учёной степени доктора наук, д.б.н., старший научный сотрудник

 К.Т. Алматов
Член Научного семинара при Научном совете по присуждению учёной степени доктора наук, д.б.н., проф.

ВВЕДЕНИЕ (аннотация докторской диссертации)

Актуальность и востребованность темы диссертации. Во всём мире важнейшей задачей кардиологии и фармакологии является разработка новых подходов профилактики и лечения сердечных аритмий, которые занимают ведущее место среди факторов риска «внезапной кардиогенной смерти». В основе патогенеза сердечных аритмий лежат нарушения электрофизиологических свойств кардиомиоцитов, ответственных за возбудимость, автоматизм и формирование потенциала действия (ПД). В связи с этим ведущее место в современной концепции профилактики и лечения сердечных аритмий отводится созданию нового поколения антиаритмических средств.

После обретения независимости в республике организация научно исследовательских работ, направленных на создание новых высокоэффективных лекарственных средств из местного сырья и проведенные масштабные мероприятия по обеспечению национального фармацевтического рынка качественными лекарственными средствами на высоком уровне привели к определенным результатам. При этом особо важно отметить лекарственные препараты, получаемые из местного сырья (дитерпеноидные алкалоиды растительного происхождения), которые широко используются при лечении сердечно-сосудистых заболеваний.

На сегодняшний день во всем мире актуальной задачей является поиск соединений растительного происхождения, обладающих потенциальной фармакологической активностью, перспективной для разработки новых подходов к терапии сердечных аритмий. С помощью этих соединений получены важные сведения о клеточных и молекулярных механизмах сердечных аритмий и наиболее перспективных мишенях для их лечения. Более того, благодаря этим соединениям удалось установить важные особенности фармакологической регуляции мишеней, что позволило разработать эффективные способы модуляции их функционального состояния. В целом, в процессе изучения соединений растительного происхождения, были получены ценные сведения, которые обеспечили существенный прогресс в разработке и создании новых перспективных препаратов для лечения нарушений сердечного ритма. В свете вышесказанного, тема диссертации является весьма актуальной и востребованной, так как данные полученные при характеристике особенностей механизма инотропного действия дитерпеноидных алкалоидов, способствуют созданию нового поколения эффективных антиаритмических средств, лишённых опасных побочных эффектов.

Данное диссертационное исследование в определенной степени служит выполнению задач, предусмотренных в Указах Президента Республики Узбекистан №ПП-1652 от 28 ноября 2011 года «О мерах по дальнейшему углублению реформирования системы здравоохранения» и №РР- 1855 и от 21 ноября 2012 года «Об Инвестиционной программе Республики Узбекистан

на 2013 год», а также в других нормативно-правовых документах, принятых в данной сфере.

Соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий республики. Данное исследование выполнено в соответствии с приоритетным направлением развития науки и технологий республики VI «Медицина и фармакология».

Обзор зарубежных научных исследований по теме диссертации¹. Научные исследования, направленные на разработку современных подходов лечения сердечных аритмий осуществляются в ведущих научных центрах и высших образовательных учреждениях мира, в том числе, в Колумбийском, Калифорнийском, Нью-йоркском университетах (США), в университетах Кёльна (Германия), штата Юта (США), Калгари (Канада) и Вандербилта (США), а также в Институтах биоорганической химии и Химии растительных веществ (Узбекистан).

В результате исследований, проведенных в мире в области разработки современных подходов лечения сердечных аритмий получен ряд научных результатов, в том числе: установлены молекулярные механизмы нарушений сердечного ритма, что обеспечило разработку наиболее эффективных подходов диагностики, лечения и профилактики сердечных аритмий (Колумбийский университет); охарактеризованы функционально важные системы сердечных клеток с дефектами, с которыми связан патогенез различных типов аритмий (университет Кёльна); достигнут существенный прогресс в фармакотерапии различных видов аритмий и созданы эффективные антиаритмические средства (Калифорнийский университет); разработаны современные методы лечения аритмий, где особая роль уделяется блокаторам быстрых Na^+ каналов, которые остаются наиболее перспективными мишенями для создания нового поколения антиаритмических средств (Университеты Калгари и штата Юта).

В мире при разработке современных подходов лечения сердечных аритмий проводятся исследования по ряду приоритетных направлений, в том числе: анализируются клеточные и молекулярные механизмы, лежащие в основе различных типов сердечных аритмий; выясняется роль ионных каналов и рецепторов в патогенезе сердечных аритмий; устанавливаются новые молекулярные мишени для адекватного лечения нарушений сердечного ритма; создаются предпосылки для рационального дизайна нового поколения перспективных препаратов для лечения нарушений сердечного ритма.

Степень изученности проблемы. Дитерпеноидные алкалоиды, выделенные из растений рода *Aconitum*, в настоящее время рассматриваются в качестве наиболее перспективных соединений для разработки нового поколения антиаритмических средств. Важнейшие структурные особенности

¹ Обзор зарубежных научных исследований по теме диссертации Zipes DP et al (2006): Guidelines for management of sudden cardiac death. U.S. National Institute of Health, <http://www.circulationaha.org>; Sampson K.J., Kass R.S. (2011).

этих алкалоидов, ответственные за их антиаритмическую активность, детально изучены в ведущих лабораториях мира. При этом было установлено, что общими структурными элементами наиболее активных дитерпеноидных алкалоидов являются остатки ацетилантраниловой или аминобензойной кислот у атома углерода C-4, метокси групп у C-1, C-14 и C

16, и гидроксильной группы у C-8. Вместе с тем, показано, что бензольная группа у C-14 и основность атома азота также очень важны для обеспечения антиаритмической активности этих алкалоидов. Электрофизиологический механизм антиаритмического действия этих соединений хорошо изучен, и в основном обусловлен блокадой потенциал-зависимых Na^+ каналов. Основным эффектом такой блокады является снижение скорости деполяризации потенциала действия сердца, которое сопровождается замедлением скорости его распространения и увеличением эффективного рефрактерного периода, что приводит к снижению возбудимости сердца. Однако, блокада Na^+ каналов может влиять и на транспорт ионов Ca^{2+} так, что уменьшение концентрации Na^+ может способствовать уменьшению содержания Ca^{2+} в кардиомиоцитах и последующему снижению сократительной активности сердечной мышцы. Снижение сократительной активности сердечной мышцы или отрицательный инотропный эффект, является характерным свойством всех антиаритмических препаратов 1 класса, благодаря которому их использование ограничено в связи с тем, что он способствует подавлению нагнетательной функции сердца. Поэтому, несмотря на успехи в использовании этого класса антиаритмических средств в терапии нарушений сердечного ритма, сохраняется острая необходимость в создании нового поколения более эффективных и безопасных препаратов с менее выраженным отрицательным инотропным эффектом. В связи с этим современные исследования сосредоточены на альтернативных подходах, включая модификацию существующих молекул дитерпеноидных алкалоидов, которая должна обеспечить сохранение их полезных свойств и удаление нежелательных, что позволит получить соединение, эффективно действующее на Na^+ каналы с минимальным отрицательным инотропным эффектом.

Связь темы диссертации с научно-исследовательскими работами института, где выполнена диссертация. Диссертационное исследование выполнено в рамках фундаментальных и прикладных научно-исследовательских программ Института биоорганической химии: ФА-ФЗ-T144 «Изучение механизмов модуляции ионных каналов сердечных и гладкомышечных клеток природными биологически активными соединениями» (2007-2011гг.); ФА-A-12-T068 «Разработка комплексного подхода, скрининга и характеристики структурно-функциональных особенностей взаимодействия природных биологически активных соединений с ионными каналами и рецепторами биологических мембран (2009-2011гг.); ФА-Ф6-T083 «Поиск и характеристика биологически активных соединений–модуляторов Ca^{2+} -гомеостаза в клетках сердечных и гладких

высокоэффективного скрининга биологически активных соединений природного и синтетического происхождения» (2015-2017гг.). **Целью исследования** является характеристика инотропных эффектов дитерпеноидных алкалоидов 15-ГАА и 15-ААА и выяснение причины отсутствия корреляции между антиаритмической и отрицательной инотропной активностью у 15-ААА.

Задачи исследования:

исследовать действие алкалоидов 15-ГАА и 15-ААА на сократительную активность папиллярной мышцы сердца крыс и изучить зависимость их эффектов от концентрации;

исследовать влияние частоты стимуляции на инотропные эффекты алкалоидов 15-ГАА и 15-ААА и изучить их особенности при различных частотах стимуляции;

исследовать влияние алкалоидов 15-ГАА и 15-ААА на кинетические параметры изометрического сокращения папиллярной мышцы ($+dF/dt_{\max}$ – скорость развития сокращения, $-dF/dt_{\max}$ – скорость расслабления, $T_{\text{общ}}$ – время цикла сокращение-расслабление, $T_{1/2}$ – время полурасслабления), оценить характер их изменений и возможные механизмы, лежащие в их основе;

исследовать действие алкалоидов 15-ГАА и 15-ААА на потенциал зависимые Ca^{2+} - и Na^{+} -каналы, изучить взаимосвязь между блокадой этих каналов, уменьшением $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в кардиомиоцитах и подавлением сократительной активности папиллярной мышцы;

исследовать влияние алкалоидов 15-ГАА и 15-ААА на содержание ионов Ca^{2+} в СР, оценить связь между его изменением и инотропным эффектом алкалоидов и роль $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -обменника при этом;

провести сравнительный анализ взаимосвязи между инотропной активностью алкалоидов 15-ГАА и 15-ААА и их структурой, сформулировать положения о возможных причинах различия в их инотропном действии и отсутствия корреляции между антиаритмической и отрицательной инотропной активностью 15-ААА;

Объектом исследования являлись алкалоиды 15-ГААА и 15-ААА, производные дитерпеноидного алкалоида атизина, выделенного из растения вида *Aconitum zeravshanicum*.

Предметом исследования – является изучение особенностей инотропных эффектов алкалоидов 15-ГАА и 15-ААА, их зависимость от структуры и роли Ca^{2+} -транспортирующих систем кардиомиоцитов в их обеспечении.

Методы исследования. В диссертации использованы современные электрофизиологические методы регистрации и анализа сократительной и функциональной активности сердечной мускулатуры. Все экспериментальные данные собирались и обрабатывались с помощью компьютерной программы OriginPro 7.5 (OriginLab Corporation; США).

Научная новизна исследования заключается в следующем: установлены особенности инотропных эффектов алкалоидов 15-ГАА и 15-ААА, их взаимосвязь со структурой и основные механизмы, лежащие в

34

основе их положительного и отрицательного инотропного действия; обнаружено отсутствие влияния модификации структуры алкалоида 15-ГАА, путем замены ОН-группы у атома углерода С-15 на CH_3O -группу, на отрицательную инотропную активность алкалоида 15-ААА; установлена зависимость характера инотропного эффекта алкалоида 15-ААА от используемой концентрации, который при низких концентрациях (3-8 мкМ) и низких частотах стимуляции (0,1-1 Гц) вызывал положительный, а при высоких концентрациях (>8 мкМ) и частотах стимуляции (>1 Гц) отрицательный инотропный эффект;

обнаружена зависимость положительного инотропного эффекта алкалоида 15-ААА от поступления ионов Ca^{2+} в саркоплазматический ретикулум, которое обеспечивают Ca^{2+} -транспортирующие системы, не связанные с активацией в-адренорецепторов и потенциал-зависимых Ca^{2+} каналов;

установлена связь между отрицательным инотропным эффектом алкалоидов 15-ГАА и 15-ААА и блокадой Na^+ -каналов, которая сопровождается нарушением транспорта ионов Ca^{2+} и снижением их содержания в кардиомиоцитах;

обнаружены различия в отрицательной инотропной активности алкалоидов 15-ААА и 15-ГАА, которые обусловлены особенностями их структуры и различной эффективностью блокады Na^+ -каналов, определяющей степень нарушения транспорта ионов Ca^{2+} и снижения их уровня в кардиомиоцитах;

установлено отсутствие прямой корреляции между инотропным и антиаритмическим действием 15-ААА, обусловленное менее эффективной блокадой Na^+ каналов и его способностью индуцировать положительный инотропный эффект;

Практические результаты исследования существенно расширяют представления об особенностях инотропных эффектов дитерпеноидных алкалоидов, их зависимости от структуры и являются теоретической базой для создания нового поколения безопасных и более эффективных антиаритмических средств.

Достоверность результатов исследования. обосновывается тем, что экспериментальные данные получены с применением современных компьютеризированных электрофизиологических методов исследования. Выводы в работе сделаны на основе результатов, обработанных с использованием современных методов математической статистики.

Научная и практическая значимость результатов исследования. Теоретическая значимость диссертации заключается в том, что данные представленные в ней являются существенным вкладом в развитии

фундаментальных знаний о механизмах инотропного действия дитерпеноидных алкалоидов.

Практическая значимость полученные данные раскрывают новые детали механизмов, ответственных за инотропные эффекты дитерпеноидных алкалоидов и позволяют понять взаимосвязь между структурой алкалоидов и

35

их инотропной активностью, что имеет важное практическое значение. Результаты этих исследований существенно расширили научную базу для рационального дизайна и создания нового поколения безопасных и высокоэффективных антиаритмических средств, лишенных серьезных побочных эффектов.

Внедрение результатов исследования. На основе разработанных структурно-функциональных рекомендаций для создания нового поколения антиаритмических средств из местного сырья:

Наиболее оптимальные подходы структурной модификации дитерпеноидных алкалоидов обеспечивающие получение эффективных антиаритмических препаратов и способствующие снижению их отрицательной инотропной активности внедрены, в деятельность ГАК «Узфармсанонат» (справка БА-06/2069 от 14 ноября 2016 г. ГАК «Узфармсанонат»). Результаты научных исследований дают возможность для создания новых антиаритмических средств, через способность алкалоида 15-ААА вызывать положительный инотропный эффект, который ограничивая его отрицательную инотропную активность, способствует повышению антиаритмического действия при сердечной недостаточности;

Результаты, полученные по инотропному действию дитерпеноидных алкалоидов 15-ацетоксиазометин атизина и 15-гидроксиазометин атизина использованы в проекте ФА-Ф5-Т084 “Характеристика эффектов биорегуляторов транспорта ионов митохондрий и метаболических процессов в норме и при патологии” (ИБОХ, 2012-2016 йй.), а именно воздействуя на Ca^{2+} ионы через $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник в митохондриях, для регуляции гомеостаза Ca^{2+} ионов в них (справка Комитета по координации развития науки и технологии ФТК-03.13/828 от 22 ноября 2016 года). Использование научных результатов дало возможность регуляции нарушений Ca^{2+} гомеостаза в митохондриях через дисфункцию системы $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника в них.

Апробация работы. Основные положения диссертации были представлены на международных и республиканских научно-практических конференциях: «Биоорганическая химия и биотехнология» (Пушино, Россия 2011); «Актуальные проблемы патофизиологии» (Санкт-Петербург, Россия 2011); «Актуальные проблемы химии природных соединений» (Ташкент, 2011-2012); «Актуальные проблемы развития биоорганической химии» (Ташкент, 2013); «Экспериментальная и теоретическая биофизика» (Пушино, Россия 2012, 2014-2015); «Фундаментальная наука и клиническая медицина» (Санкт-Петербург, Россия 2015); Международном медицинском конгрессе «Euromedica» (Ганновер, Германия 2015); и «Актуальные проблемы современной медицины и фармации» (Минск, Беларусь, 2016).

Опубликованность результатов исследования. По теме диссертации опубликованы 28 научных работ. Из них 11 научных статей, в том числе 9 в республиканских и 2 в зарубежных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов докторских диссертаций.

36

Структура и объем диссертации. Структура диссертации состоит из введения, четырех глав, заключения, списка использованной литературы. Объем диссертации составляет 162 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обосновывается актуальность и востребованность проведенного исследования, цель и задачи исследования, характеризуются объект и предмет, показано соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий республики, излагаются научная новизна и практические результаты исследования, раскрываются научная и практическая значимость полученных результатов, внедрение в практику результатов исследования, сведения по опубликованным работам и структуре диссертации.

В первой главе диссертации **«Современное состояние и перспективы исследования сердечных аритмий»** представлен подробный обзор литературы, включающий общие сведения о механизмах электрической и механической активности сердца, а также о ведущей роли ионов Ca^{2+} в электромеханическом сопряжении, в генерации и регуляции сердечного ритма. Кроме того, приведены сведения о ключевой роли нарушений Ca^{2+} гомеостаза в развитии сердечных аритмий и других патологий сердца, а также новых подходах их коррекции и перспективных стратегиях профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний.

Во второй главе **«Изучение сократительной активности папиллярной мышцы сердца крысы»** подробно описаны методы исследования сократительной активности папиллярной мышцы сердца крысы, изложены экспериментальные подходы оценки функциональной активности Ca^{2+} -транспортирующих систем кардиомиоцитов, а также методы математической обработки и статистического анализа данных.

В третьей главе **«Характеристика эффектов дитерпеноидного алкалоида 15-гидроксиазометин атизина (15-ГАА) на сократительную активность папиллярной мышцы сердца крысы»** приведены результаты исследования действия 15-ГАА на сокращения папиллярной мышцы сердца крысы, индуцируемые электрической стимуляцией.

Особенности действия алкалоида 15-ГАА на сокращения папиллярной мышцы сердца крысы. Алкалоиды 15-ГАА и 15-ААА, производные дитерпеноидного алкалоида атизина, выделенного из растения *Aconitum zeraifshanicum*, обладают высокой антиаритмической активностью (Кодирова и др., 2010). Показано, что алкалоид 15-ААА, отличающийся от 15-ГАА наличием CH_3O -группы у углеродного атома С-15 в его атизиновом скелете,

вместо ОН-группы, обладает более выраженным антиаритмическим действием (рис.1). Вместе с тем обнаружено, что в результате такой модификации происходит снижение отрицательного инотропного действия 15-ААА, которое более выражено у 15-ГАА (Зайнабиддинов и др.,2011). При этом было установлено, что этот эффект алкалоида 15-ГАА имеет доза-

37

зависимый характер с максимумом при 30 мкМ, когда сила сокращения папиллярной мышцы снижалась до $7,3 \pm 2,1\%$, от контроля (рис.2, Б). Концентрация 15-ГАА, которая вызывала половину его максимального эффекта (ED_{50}), составляла 8,7 мкМ, и этот эффект был наиболее выражен при частотах стимуляции выше 3 Гц.

А Б

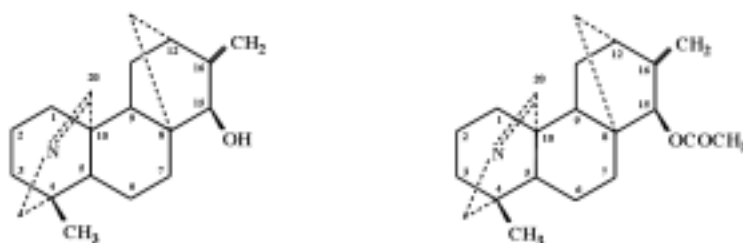


Рис. 1. Структура дитерпеноидных алкалоидов 15-гидроксиазометин атизина (А) и 15-ацетоксиазометин атизина (Б).

В связи с тем, что сократительная активность сердечной мышцы, определяется внутриклеточной концентрацией ионов Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) в кардиомиоцитах (Bers, 2008), наблюдаемый эффект алкалоида может свидетельствовать о снижении содержания ионов Ca^{2+} в кардиомиоцитах. Для проверки этого предположения было изучено влияние 15-ГАА на развитие сокращений папиллярной мышцы, при увеличении концентрации ионов Ca^{2+} в среде инкубации.

А Б

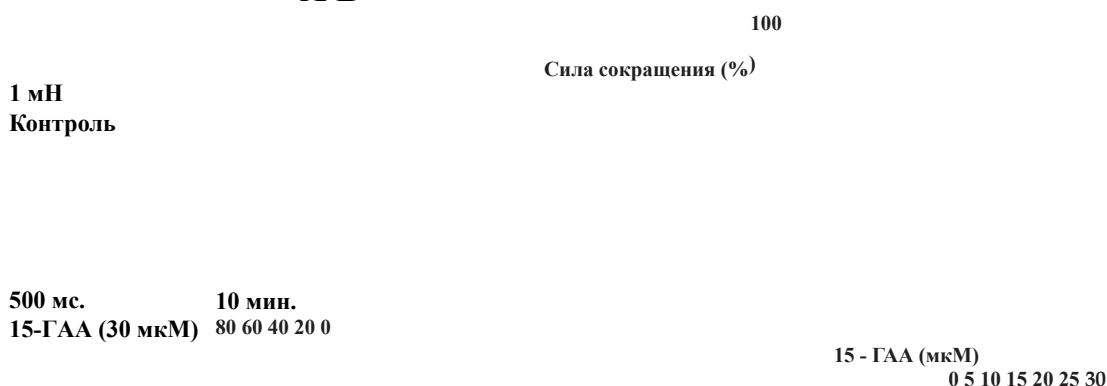


Рис. 2. Влияние алкалоида 15-ГАА на сократительную активность папиллярной мышцы сердца крысы. А. Оригинальная запись сокращений

папиллярной мышцы иллюстрирующая отрицательный инотропный эффект 15-ГАА. Б. Зависимость эффекта 15-ГАА от его концентрации. По оси ординат – сила сокращения мышцы, в процентах от максимальной, принятой за 100%. Во всех случаях $P < 0,05$, ($n=6$).

При этом было обнаружено, что в присутствии 15-ГАА рост силы сокращения папиллярной мышцы, в ответ на увеличение концентрации

38

ионов Ca^{2+} в среде инкубации существенно снижается (рис.3,А). В связи с тем, что в этих экспериментальных условиях увеличение силы сокращения папиллярной мышцы обеспечивается в основном ионами Ca^{2+} , поступающими через потенциал-зависимые Ca^{2+} каналы, эти результаты указывают на то, что этот эффект алкалоида связан с подавлением этого пути поступления ионов Ca^{2+} в кардиомиоциты. Дополнительное подтверждение такого действия 15-ГАА, было получено в экспериментах с нифедипином, селективным блокатором потенциал-зависимых Ca^{2+} каналов, в присутствии которого, эффект алкалоида также существенно снижался, но частично сохранялся (рис.3,Б).

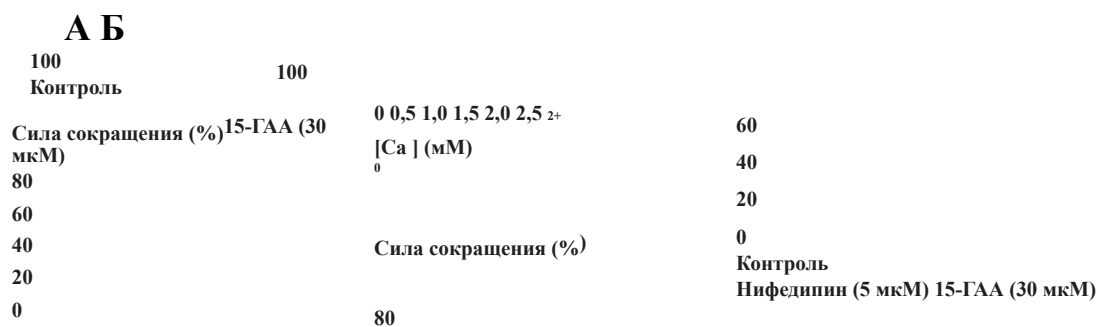


Рис. 3. Зависимость отрицательного инотропного эффекта алкалоида 15-ГАА от концентрации ионов Ca^{2+} и состояния потенциал зависимых Ca^{2+} -каналов. А. Влияние 15-ГАА на сокращения папиллярной мышцы индуцируемые при увеличении $[\text{Ca}^{2+}]_o$. Б. Влияние нифедипина на отрицательный инотропный эффект 15-ГАА. По оси ординат – сила сокращения мышцы, выраженная в процентах от максимальной, принятой за 100%. Во всех случаях $P < 0,05$, ($n=4-6$).

Результаты этой серии экспериментов свидетельствуют о том, что 15- ГАА обладает выраженным отрицательным инотропным эффектом (ОИЭ), в основе которого лежит уменьшение содержания ионов Ca^{2+} в кардиомиоцитах, которое происходит в результате подавления алкалоидом их поступления через потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы сарколеммы.

Влияние алкалоида 15-ГАА на транспорт ионов Ca^{2+} в

саркоплазматическом ретикулуме кардиомиоцитов. Выше было показано, что ОИЭ алкалоида в присутствии нифедипина подавляется не полностью, что указывает на то, что в его реализации наряду с потенциал-зависимыми Ca^{2+} каналами, участвуют и другие Ca^{2+} -транспортирующие системы кардиомиоцитов. При этом, этот эффект 15-ГАА может быть связан с его влиянием на транспорт ионов Ca^{2+} на уровне саркоплазматического ретикулума (СР), который играет ведущую роль в регуляции $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в кардиомиоцитах и сократительной активности миокарда (Bers, 2000). Более того, о возможности такого действия алкалоида 15-ГАА, косвенно свидетельствует подавление им сокращений при низких частотах стимуляции

39

(<1 Гц), в условиях, когда сокращения сердечной мышцы в основном обеспечиваются ионами Ca^{2+} , высвобождаемыми из СР (Honerjager, 2005; Marks, 2000; Satoh et al., 2000). Для проверки этого предположения, было изучено влияние 15-ГАА на пост-рест потенциацию, характерную особенность сердечной мышцы, позволяющей изучать процессы накопления и высвобождения ионов Ca^{2+} в СР. Установлено, что после определенных периодов покоя, сила сокращения сердечной мышцы существенно возрастает, в результате накопления дополнительного количества ионов Ca^{2+} в СР, большего чем при регулярной стимуляции, которые и обеспечивают усиление или потенциацию сокращения мышцы. (Bers et al. 1993). В контрольных экспериментах, на папиллярной мышце сердца крысы, амплитуда первого сокращения B_1 после 30 секундного периода покоя возрастала от стационарного уровня B_0 , принятого за 100%, до $189,7 \pm 6.2\%$ (рис.4,А). При этом было обнаружено, что внесение в среду инкубации 15-ГАА (30мкМ), сопровождается существенным снижением амплитуды первого сокращения B_1 до $10,2 \pm 4,1\%$, что свидетельствует о том, что алкалоид подавляет потенцирующий эффект покоя, вероятно снижая накопление ионов Ca^{2+} в СР (рис.4, А).

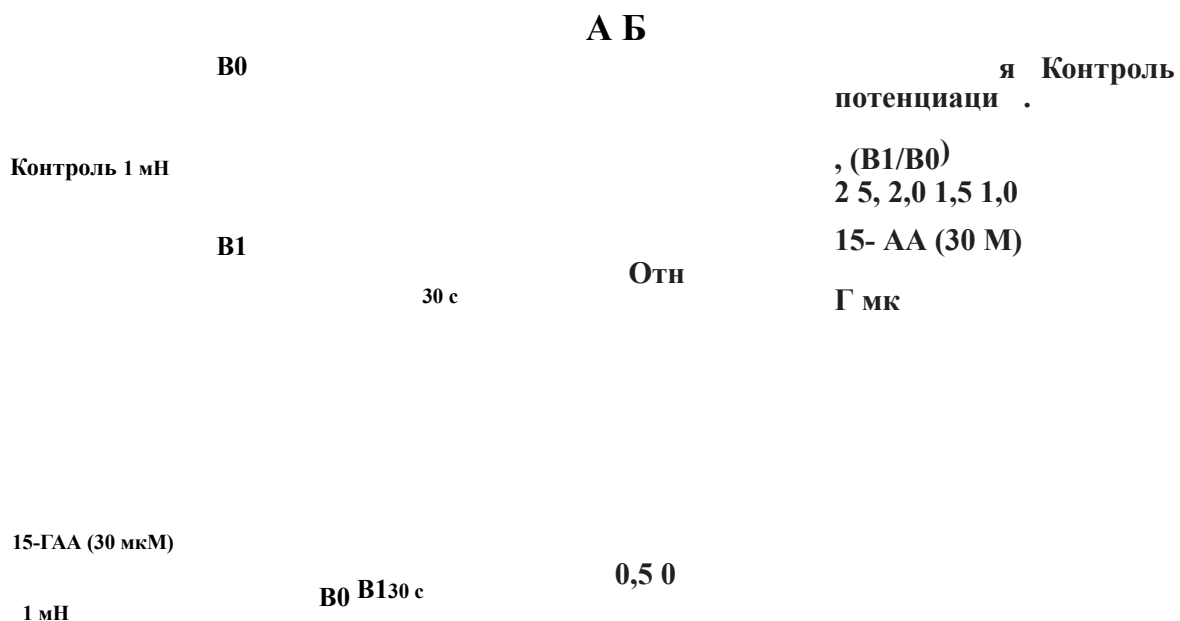


Рис. 4. Влияние алкалоида 15-ГАА на пост-рест потенциацию папиллярной мышцы сердца крысы. А. Оригинальные записи иллюстрирующие эффекты 15-ГАА на пост-рест потенциацию папиллярной мышцы. Б. Влияние 15-ГАА на относительную потенциацию ($V1/V0$). По оси ординат – отношение $V1/V0$. Во всех случаях $P < 0,05$, ($n=5$).

Однако, как видно из рис.4, А, в присутствии алкалоида 15-ГАА, также существенно снижается амплитуда стационарных сокращений ($V0$) папиллярной мышцы, регистрируемых до периода покоя. Этот эффект алкалоида на стационарные сокращения папиллярной мышцы объясняется

40

подавлением им поступления ионов Ca^{2+} в кардиомиоциты, через потенциал зависимые Ca^{2+} -каналы сарколеммы, как было показано выше (рис.3). Учитывая то, что ионы Ca^{2+} , поступающие в кардиомиоциты через потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы, в дальнейшем используются для загрузки в СР (Bers, 2000), подавление алкалоидом 15-ГАА пост-рест потенциации указывает на его влияние на эти системы транспорта ионов Ca^{2+} в кардиомиоцитах. Для уточнения механизма действия алкалоида 15-ГАА на пост-рест потенциацию было проанализировано его влияние на относительную потенциацию ($V1/V0$), которая является отражением состояния процесса загрузки ионов Ca^{2+} и, соответственно, емкости СР (Mill et al., 1992; Bers et al., 1993). При этом было установлено, что в присутствии 15-ГАА (30мкМ) значение относительной потенциации уменьшается с $1,89 \pm 0,10$ до $1,39 \pm 0,13$ (рис.4, Б). Эти результаты свидетельствуют о том, что подавление амплитуды $V1$, вызываемое алкалоидом 15-ГАА, обусловлено снижением загрузки ионов Ca^{2+} в СР и уменьшением их содержания в последнем. Аналогичный механизм подавления сократительной активности сердечной мышцы лежит в основе действия антиаритмических средств 1 класса.

Роль потенциал-зависимых Na^+ -каналов сарколеммы кардиомиоцитов в реализации ОИЭ алкалоида 15-ГАА. В основе действия антиаритмических средств 1 класса лежит блокада потенциал-зависимых Na^+ -каналов сарколеммы, которая сопровождается снижением скорости развития восходящей фазы потенциала действия, замедлением его распространения и подавлением возбудимости проводящей системы сердца (Mitchell, 2015; Stoelting, 1999). Вместе с тем, некоторые представители антиаритмических средств 1 класса характеризуются выраженным ОИЭ, в основе которого также лежит блокада потенциал-зависимых Na^+ -каналов (Heubach and Schule, 1998). При этом блокируя Na^+ -каналы, они способствуют уменьшению внутриклеточной концентрации ионов Na^+ в кардиомиоцитах, которое сопровождается снижением уровня $[Ca^{2+}]_i$ и подавлением сократительной активности сердечной мышцы (Navada et al., 1994). В связи с этим для выяснения роли потенциал-зависимых Na^+ -каналов, в обеспечении эффектов алкалоида 15-ГАА, было изучено его действие на сокращения папиллярной мышцы в присутствии лидокаина, специфического блокатора этих каналов,

относящегося к антиаритмическим средствам I класса (Sheu and Lederer, 1985). При этом было обнаружено, что в присутствии 15 мкМ лидокаина, концентрации соответствующей его значению ED_{50} , эффект алкалоида 15-ГАА на сокращения папиллярной мышцы уменьшался с $92,7 \pm 5,4\%$ (контроль без лидокаина) до $72,6 \pm 6,3\%$. Вместе с тем, было установлено, что при наличии в среде инкубации алкалоида 15-ГАА кривые доза-эффект для лидокаина смещаются почти параллельно влево, без существенного изменения величины его максимального эффекта (рис.5, А). При этом величина ED_{50} для лидокаина, в присутствии 30 мкМ 15-ГАА, уменьшалась с 15 мкМ до 4,1 мкМ, что свидетельствует об аддитивном характере действия алкалоида и лидокаина. Более того, параллельное смещение кривой доза-

41

эффект для лидокаина, без изменения максимума его эффекта, в присутствии алкалоида, указывает на его конкуренцию с лидокаином за одну мишень т.е. Na^+ -каналы кардиомиоцитов. Для дополнительной проверки возможной роли Na^+ -каналов, в обеспечении ОИЭ алкалоида 15-ГАА, были изучены его эффекты в условиях инактивации Na^+ -каналов, деполяризацией, которую вызывали путем увеличения концентрации KCl в среде до 24 мМ (Catterall, 2003).

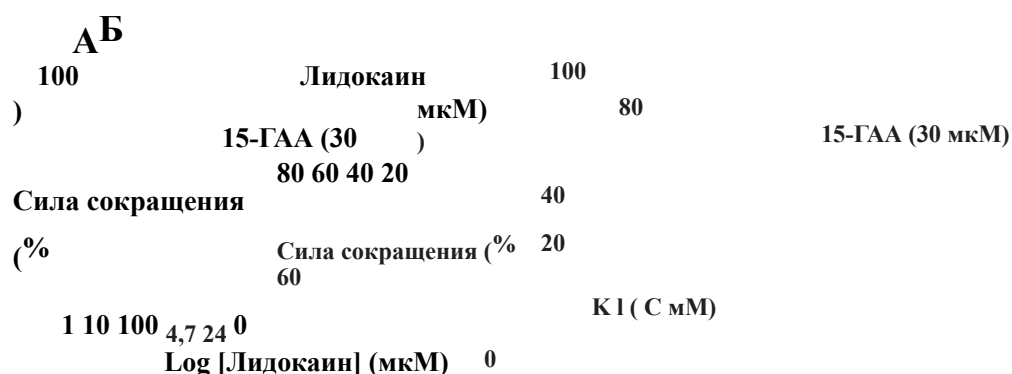


Рис. 5. Зависимость отрицательного инотропного эффекта алкалоида 15-ГАА от состояния потенциал-зависимых Na^+ -каналов. А. Влияние 15-ГАА на кривые доза-эффект лидокаина. Б. Эффекты 15-ГАА в норме и при инактивации Na^+ каналов деполяризацией (24 мМ, KCl). По оси ординат – сила сокращения мышцы, выраженная в процентах от максимальной, принятой за 100%. Во всех случаях $P < 0,05$, ($n=4$).

Как видно из результатов, представленных на рис 5,Б в условиях инактивации Na^+ -каналов, алкалоид 15-ГАА подавляет сокращения папиллярной мышцы всего на $63,7 \pm 5,6\%$, по сравнению с контролем ($92,7 \pm 2,4\%$), полученным в нормальном растворе Кребса. Эти результаты наряду с результатами, полученными в экспериментах с лидокаином, свидетельствуют о том, что в обеспечении ОИЭ алкалоида 15-ГАА важную роль играют Na^+ -каналы кардиомиоцитов. При этом, блокируя Na^+ -каналы, и

уменьшая содержание ионов Na^+ в кардиомиоцитах, алкалоид может способствовать усилению выведения ионов Ca^{2+} через $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник и снижать их содержание как в цитоплазме, так и в СР (Bers, 2000).

Влияние алкалоида 15-ГАА на транспорт ионов Ca^{2+} обеспечиваемый $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменником кардиомиоцитов. Выше было показано, что алкалоид 15-ГАА заметно подавляет пост-рест потенцию папиллярной мышцы, которая отражает процесс закачки ионов Ca^{2+} в СР, в котором важную роль играет $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник (Bers and Christensen, 1990). В связи с этим для дальнейшей характеристики ОИЭ алкалоида 15-ГАА были изучены его

42

эффекты на сокращения папиллярной мышцы, индуцируемые модифицированным раствором Кребса и сердечным гликозидом оубаином, которые в основном обеспечиваются ионами Ca^{2+} поступающими в кардиомиоциты через $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник (Blaustein and Santiago, 1977). При этом было обнаружено, что алкалоид 15-ГАА эффективно подавляет сокращения папиллярной мышцы, индуцируемые модифицированным раствором Кребса с пониженным содержанием ионов Na^+ (35 мМ). Этот эффект алкалоида имел доза-зависимый характер и максимальное снижение амплитуды сокращений до $11.6 \pm 3.1\%$, от контрольного уровня ($72.6 \pm 4.8\%$), наблюдалось при его концентрации 30 мкМ, а значение ED_{50} составляло 16.9 мкМ (рис.6, А). Из полученных результатов следует, что подавление алкалоидом 15-ГАА сокращений папиллярной мышцы, индуцируемых модифицированным раствором Кребса, может быть обусловлено его влиянием на поступление ионов Ca^{2+} через $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник.

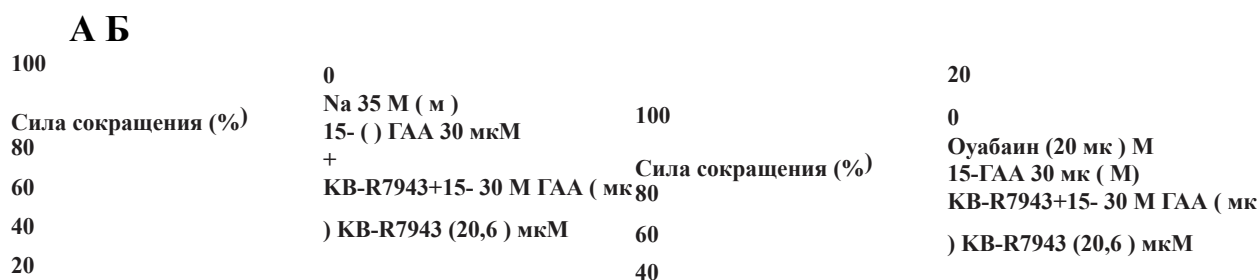


Рис. 6. Влияние алкалоида 15-ГАА на сокращения папиллярной мышцы сердца крысы, индуцируемые модифицированным раствором Кребса (А) и оубаином (Б). Модифицированный раствор Кребса содержал 35 мМ NaCl , осмолярность поддерживалась добавлением эквимольной концентрации холинхлорида. По оси ординат – сила сокращения мышцы, выраженная в процентах от максимальной, принятой за 100%. Во всех случаях $P < 0,05$, ($n=4$).

Это предположение нашло подтверждение в экспериментах, в которых эффекты 15-ГАА на сокращения папиллярной мышцы, индуцируемые модифицированным раствором Кребса, изучались в присутствии специфического блокатора $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника KB-R7943 (Satoh, 2000). В этих экспериментах, при наличии в среде 20,6 мкМ KB-R7943, когда амплитуда сокращений папиллярной мышцы, индуцированных модифицированным раствором Кребса уменьшалась на половину, эффект алкалоида заметно снижался. Эти результаты указывают на то, что подавление алкалоидом 15-ГАА сокращений папиллярной мышцы,

43

индуцируемых модифицированным раствором Кребса, обусловлено снижением поступления ионов Ca^{2+} в кардиомиоциты через $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник. Аналогичным образом алкалоид 15-ГАА подавлял сокращения папиллярной мышцы, индуцируемые оуабаином, которые также обеспечиваются ионами Ca^{2+} поступающими через $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник (Rossoni et al., 2006). При этом этот эффект алкалоида, также имел дозозависимый характер и максимальное подавление амплитуды сокращений от контрольного уровня ($68.6 \pm 3.6\%$) до $6.9 \pm 3.1\%$, наблюдалось при его концентрации 30 мкМ и значении ED_{50} -15.8 мкМ. Более того, этот эффект 15-ГАА на сокращения папиллярной мышцы, индуцируемый оуабаином, также заметно снижался в присутствии KB-R7943, что дополнительно указывает на его влияние на поступление ионов Ca^{2+} в кардиомиоциты через $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник. Анализ результатов этих экспериментов показал, что алкалоид 15-ГАА почти одинаково эффективно и с близкими значениями ED_{50} подавляет сокращения папиллярной мышцы, индуцируемые модифицированным раствором Кребса и оуабаином. Учитывая то, что сокращения папиллярной мышцы, индуцируемые этими различными методами, обусловлены ионами Ca^{2+} поступающими через $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник, можно заключить, что в обеспечении ОИЭ алкалоида 15-ГАА важную роль может играть подавление им поступления ионов Ca^{2+} через $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник. Такое действие алкалоида на $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник подтверждается существенным снижением его эффектов на сокращения папиллярной мышцы, индуцируемые двумя различными методами, в присутствии его специфического блокатора KB-R7943.

В четвёртой главе диссертации **«Характеристика эффектов дитерпеноидного алкалоида 15-ацетоксизометин атизина (15-ААА) на сократительную активность папиллярной мышцы сердца крысы»** посвящена изучению особенностей положительного и отрицательного инотропного действия 15-ААА.

В отличие от 15-ГАА, эффект 15-ААА на сокращения папиллярной мышцы имел двоякий характер и при низких концентрациях 15-ААА (–8 мкМ) и низких частотах стимуляции (0,1–1 Гц) он увеличивал силу сокращения папиллярной мышцы, а при высоких концентрациях и частотах

стимуляции, наоборот подавлял её.

Особенности положительного инотропного действия алкалоида 15-ААА. Внесение в среду инкубации 5 мкМ алкалоида 15-ААА сопровождается ростом силы сокращения папиллярной мышцы, которая увеличивается на $21,8 \pm 3,2\%$, от контрольного уровня стационарных сокращений (рис.7). Такое увеличение силы сокращения сердечной мышцы или положительный инотропный эффект (ПИЭ), характерно для действия ряда катехоламинов (адреналин, норадреналин), которое обусловлено увеличением $[Ca^{2+}]_i$ в кардиомиоцитах. Этот эффект катехоламинов обеспечивается благодаря стимуляции в-адренорецепторов, которые активируя аденилатциклазу и увеличивая продукцию цАМФ, способствуют мобилизации ионов Ca^{2+} и увеличению $[Ca^{2+}]_i$, в результате которого происходит усиление

44

сокращений сердечной мышцы (Bers, 2000). Учитывая это можно было предположить, что аналогичный механизм, возможно, лежит в основе ПИЭ алкалоида 15-ААА. Однако, было обнаружено, что этот эффект алкалоида сохранялся и в присутствии пропранолола, специфического блокатора в адренорецепторов, что свидетельствуют о том, что ПИЭ алкалоида 15-ААА не связан с активацией в-адренорецепторов и аденилатциклазной системы. Вместе с тем этот эффект 15-ААА наблюдался и в присутствии блокатора потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов нифедипина, что исключает активацию им поступления ионов Ca^{2+} через эти каналы. В связи с тем, что ПИЭ алкалоида 15-ААА наблюдается только в области низких частот стимуляции (0,1–1 Гц), в условиях, в которых сокращения сердечной мышцы обеспечиваются в основном ионами Ca^{2+} высвобождаемым из СР (Maier et al., 1997), можно предположить, что в его реализации задействован аналогичный механизм на уровне СР.

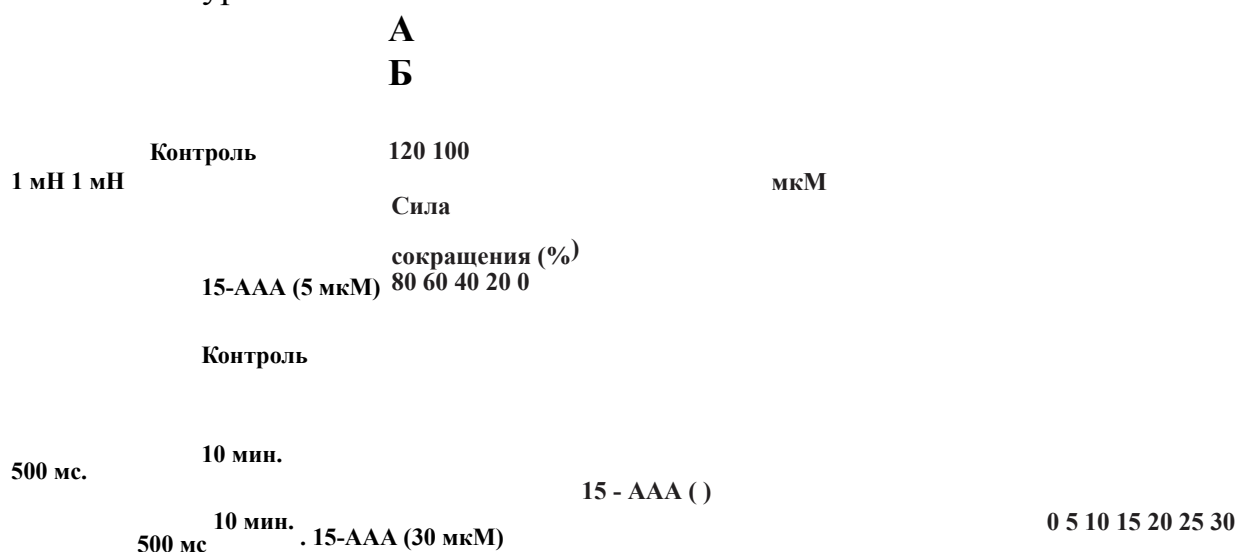


Рис.7. Зависимость инотропных эффектов алкалоида 15-ААА от его концентрации. А. Оригинальные записи иллюстрирующие инотропные эффекты 5 и 30 мкМ 15-ААА. Б. Зависимость действия 15-ААА на сокращения папиллярной мышцы от его концентрации. По оси ординат – сила сокращения мышцы, выраженная в процентах от

максимальной, принятой за 100%. Во всех случаях $P < 0,05$, ($n=6$).

Для проверки этого предположения было изучено влияние 15-ААА (5 мкМ) на пост-рест потенциацию папиллярной мышцы, которая как было показано выше, отражает состояние процессов загрузки и высвобождения ионов Ca^{2+} в СР. При этом было обнаружено, что при наличии в среде 15- ААА (5 мкМ), амплитуды первого сокращения В1, после 30 секундного периода покоя, увеличивается на $76,6 \pm 8,1\%$, от контрольного уровня, полученного до добавления алкалоида (рис.8, А). Вместе с тем, в этих условиях также наблюдалось некоторый рост амплитуды стационарных

сокращений (В0), который был менее выражен по сравнению с В1, о чем

45

свидетельствует существенное увеличение величины относительной потенциации (В1/В0) до $2,20 \pm 0,18$, по сравнению с контролем $1,89 \pm 0,10$ (рис.8, Б). В связи с тем, что увеличение величины относительной потенциации, является показателем процесса загрузки ионов Ca^{2+} в СР (Mill, 1992), можно было предположить, что потенцирующий эффект алкалоида 15-ААА, возможно обусловлен увеличением загрузки и дополнительным накоплением ионов Ca^{2+} в СР, которые и обеспечивают усиление сокращений папиллярной мышцы. Выше уже отмечалось, что важную роль в регуляции содержания ионов Ca^{2+} в СР играет $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник, который обеспечивая поступление ионов Ca^{2+} в кардиомиоциты и увеличивая их загрузку в СР, способствует усилению сократительной активности сердечной мышцы (Bers and Christensen, 1990; Shattock et al., 2015). При этом установлено, что наряду с основной функцией $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника, обеспечивающей выведение ионов Ca^{2+} из кардиомиоцитов, после каждого акта сокращения, он также участвует в их поступлении во время развития плато потенциала действия (Bers, 2015).

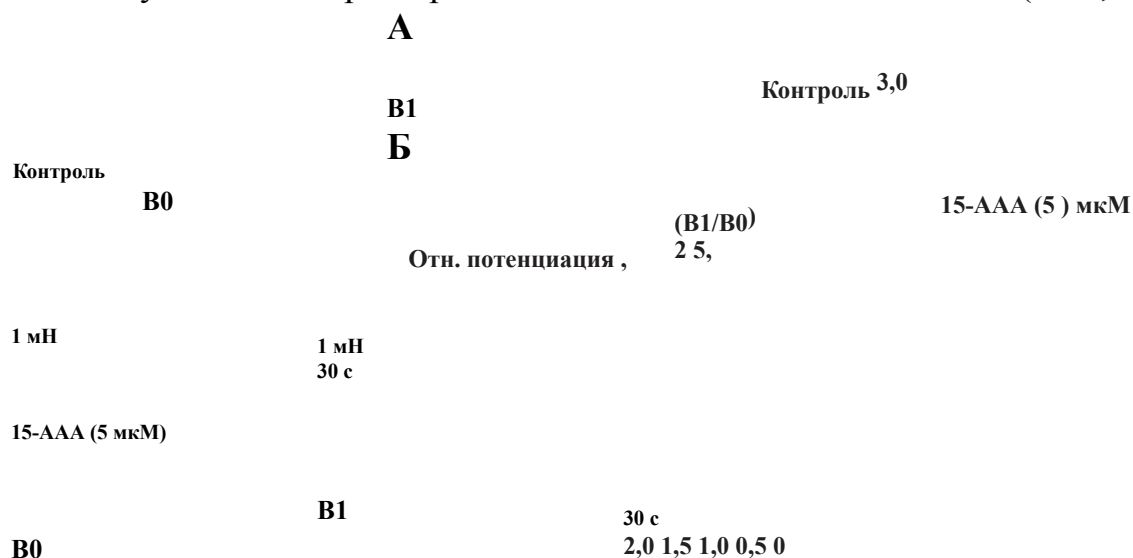


Рис.8. Влияние 15-ААА (5мкМ) на пост-рест потенциацию папиллярной мышцы сердца крысы. А. Оригинальные записи иллюстрирующие эффект 15-ААА (5 мкМ) на пост-рест потенциацию папиллярной мышцы. Б. Влияние 15-

ААА на относительную потенциацию ($B1/B0$). По оси ординат – отношение $B1/B0$. Во всех случаях $P < 0,05$, ($n=5$).

Более того, положительный инотропный эффект, вызываемый сердечными гликозидами, также обеспечивается ионами Ca^{2+} , поступающими через Na^+/Ca^{2+} -обменник, в результате изменения направления его работы (Nishio et al., 2002). В связи с этим для подтверждения роли Na^+/Ca^{2+} - обменника в обеспечении потенцирующего действия 15-ААА, были изучены его эффекты в присутствии его блокатора KB-R7943. При этом было

46

обнаружено, что в присутствии максимально эффективной концентрации KB-R7943 (30мкМ), в условиях, когда Na^+/Ca^{2+} -обменник полностью заблокирован, внесение в среду 5 мкМ 15-ААА не сопровождается развитием потенцирующего эффекта алкалоида (рис.9, А). Также было обнаружено, что при низких концентрациях KB-R7943, когда функция Na^+/Ca^{2+} -обменника частично сохраняется, 15-ААА был способен вызывать потенцирующий эффект, который однако был менее выражен, по сравнению с его эффектом в отсутствии KB-R7943 (рис.9,Б). Результаты этих экспериментов могут свидетельствовать о том, что в реализации потенцирующего эффекта 15- ААА, по-видимому, участвуют ионы Ca^{2+} обеспечиваемые Na^+/Ca^{2+} - обменником, которые в дальнейшем поступая в СР способствуют усилению сокращения папиллярной мышцы.

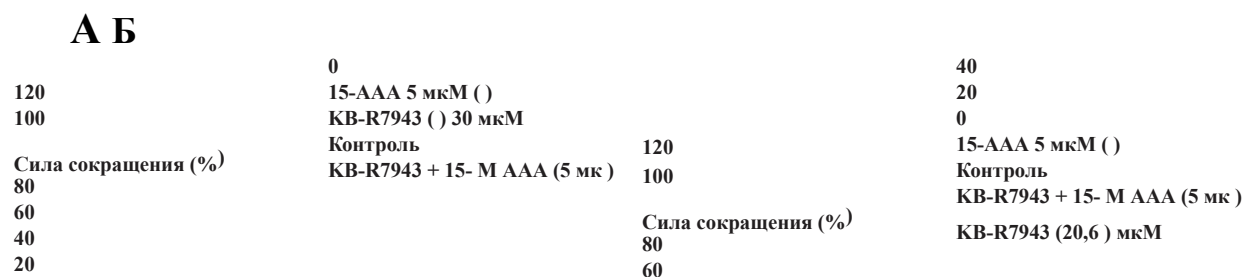


Рис.9. Влияние специфического блокатора Na^+/Ca^{2+} -обменника KB R7943 на потенцирующий эффект алкалоида 15-ААА. Влияние 15-ААА (5 мкМ) на сокращение папиллярной мышцы в присутствии 30 мкМ (А) и 20,6 мкМ (Б) KB R7943. По оси ординат – сила сокращения мышцы, выраженная в процентах от максимальной, принятой за 100%. Во всех случаях $P < 0,05$, ($n=6$).

Для подтверждения такого механизма потенцирующего действия 15-ААА были изучены его эффекты в присутствии алкалоида кофеина, который широко используется при изучении процессов загрузки и высвобождения

ионов Ca^{2+} в СР. Кофеин является мощным стимулятором высвобождения ионов Ca^{2+} из СР, в результате которого серьезно нарушается процесс их обратной загрузки в СР (Stephenson, 2008). Действительно, как показано на рис.10, А в присутствии 8 мкМ кофеина, величина относительной потенциации уменьшается с $1,89 \pm 0,10$ до 1, что свидетельствует о том, что механизм, обеспечивающий пост-рест потенцию не функционирует, в результате отсутствия поступления ионов Ca^{2+} в СР. При этом обнаружено, что добавление 15-ААА (5 мкМ) на фоне действия кофеина, не

сопровождается восстановлением нормальной реакции папиллярной мышцы

47

на тест покоем, что может указывать на то, что потенцирующий эффект алкалоида возможно связан с процессами, обеспечивающими накопление ионов Ca^{2+} в СР. Это предположение нашло подтверждение при изучении эффектов 15-ААА (5 мкМ) в условиях частичного подавления пост-рест потенциации, низкими концентрациями кофеина. При этом было обнаружено, что в присутствии 3 мкМ кофеина, когда величина относительной потенциации снижается до $1,4 \pm 0,12$, добавление 15-ААА (5 мкМ) сопровождается её увеличением до $1,74 \pm 0,14$ (рис.9, Б). Эти результаты указывают на то, что в условиях частичного функционирования механизма, обеспечивающего пост-рест потенцию, алкалоид 15-ААА сохраняет способность индуцировать потенцирующий эффект, хотя в меньшей степени, чем в условиях отсутствия кофеина.

А Б 2 5,

Контроль Кофеин + 5 мкМ 15-ААА () 2 5,		Кофеин + 5 мкМ 15-ААА ()	
Контроль			
Отн. потенция, (В1/В0)Кофеин (8 мкМ)		2,0	
2,0		1,5	
1,5		1,0	
1,0		0,5	
0,5		0	
0			
Отн. потенция, (В1/В0)Кофеин (3 мкМ)			

Рис.10. Влияние кофеина на потенцирующий эффект алкалоида 15-ААА. Влияние 15-ААА (5 мкМ) на относительную потенцию папиллярной мышцы в присутствии 8 мкМ (А) и 3 мкМ (Б) кофеина. По оси ординат относительная потенция (В1/В0). Во всех случаях $P < 0,05$, ($n=5$).

Результаты этих экспериментов могут свидетельствовать о том, что потенцирующий эффект алкалоида 15-ААА возможно связан с модификацией процесса загрузки ионов Ca^{2+} в СР. С целью дальнейшей характеристики действия алкалоида 15-ААА на процесс загрузки ионов Ca^{2+} в СР были

изучены его эффекты в присутствии циклопиазоновой кислоты (ЦПК), селективного ингибитора Ca^{2+} -АТФазы СР, которая в основном обеспечивает загрузку ионов Ca^{2+} в СР (Takahashi et al., 1995). Внесение в среду 30 мкМ ЦПК сопровождалось снижением величины относительной потенциации до 1, что свидетельствует о нарушении процесса пост-рест потенциации в результате ингибирования Ca^{2+} -АТФазы и подавления загрузки ионов Ca^{2+} в СР (рис.11,А). Добавление в этих условиях 15-ААА (5мкМ), как и в экспериментах с кофеином, не сопровождалось восстановлением пост-рест потенциации, что также может указывать на связь

48

потенцирующего действия алкалоида с процессом, обеспечивающим загрузку ионов Ca^{2+} в СР. Вместе с тем, в этих экспериментах было обнаружено, что при использовании низких концентраций ЦПК, при которых пост-рест потенция частично сохраняется, добавление 5мкМ 15-ААА сопровождалось увеличением величины относительной потенциации с $1,5 \pm 0,11$ до $1,72 \pm 0,12$ (рис.11,Б). Результаты указывают на то, что потенцирующий эффект 15-ААА может быть обусловлен активацией процесса загрузки ионов Ca^{2+} в СР и увеличением их содержания в последнем, что и способствует усилению сокращений папиллярной мышцы. Подобный механизм стимуляции сократительной активности сердечной мышцы характерен для алкалоида аконитина, выделенного из растений рода *Aconitum*, в основе которого лежит модификация потенциал-зависимых Na^+ каналов (Wright,2002; Zhou et al.,2013). При этом установлено, что в результате взаимодействия аконитина

2 5,	2 5,
А Отн. потенция, (В1/В0)ЦПК (мкМ) 5	
Контроль	
ЦПК + 5 мкМ 15-ААА ()	1,5
Отн. потенция, (В1/В0)ЦПК	1,0
(30 мкМ)	0,5
2,0	0
	2,0 1,5 1,0 0,5 0
	Контроль
	ЦПК + 5 мкМ 15-ААА ()

Рис.11. Влияние циклопиазоновой кислоты на потенцирующий эффект алкалоида 15-ААА. Влияние 15-ААА (5 мкМ) на относительную потенцию папиллярной мышцы в присутствии 30 мкМ (А) и 5 мкМ (Б) ЦПК. По оси

ординат относительная потенцияция ($B1/B0$). Во всех случаях $P<0,05$, ($n=5$).

с Na^+ каналами нарушается механизм их инактивации, что приводит к усилению поступления ионов Na^+ в кардиомиоциты и развитию стойкой деполяризации их мембран. Стойкая деполяризация, в свою очередь, способствует активации процессов, обеспечивающих мобилизацию ионов Ca^{2+} , что приводит к чрезмерному их накоплению в кардиомиоцитах и нарушению нормальной сократительной сердечной мышцы. Учитывая большое сходство в структурной организации молекул 15-ААА и аконитина, предполагалось, что потенцирующий эффект 15-ААА, возможно обеспечивается механизмом, подобным механизму действия аконитина. В связи с этим для проверки этого предположения, были изучены эффекты 15-ААА (5 мкМ) в присутствии лидокаина, который предотвращает эффекты аконитина на сократительную активность сердечной мышцы и вызываемую

49

им аритмию (Antzelevitch, 2014). В этих экспериментах добавление 15-ААА (5 мкМ) на фоне действия максимально эффективной концентрации лидокаина (30 мкМ), не оказывало существенного влияния на силу сокращений папиллярной мышцы (рис.12,А). Отсутствие потенцирующего действия 15-ААА в этих условиях по-видимому, объясняется тем, что в присутствии максимально эффективной концентрации лидокаина, когда почти все Na^+ каналы заняты, их взаимодействие с алкалоидом затрудняется и поэтому его эффект не проявляется. Это находит подтверждение в экспериментах, в которых была использована концентрация лидокаина, соответствующая его значению ED_{50} (15мкМ), при которой сила сокращений папиллярной мышцы снижалась на половину от контрольного уровня. При этом было обнаружено, что в этих условиях алкалоид 15-ААА (5мкМ) увеличивает силу сокращения папиллярной мышцы, но не в такой степени, как в отсутствии лидокаина (рис.12,Б).

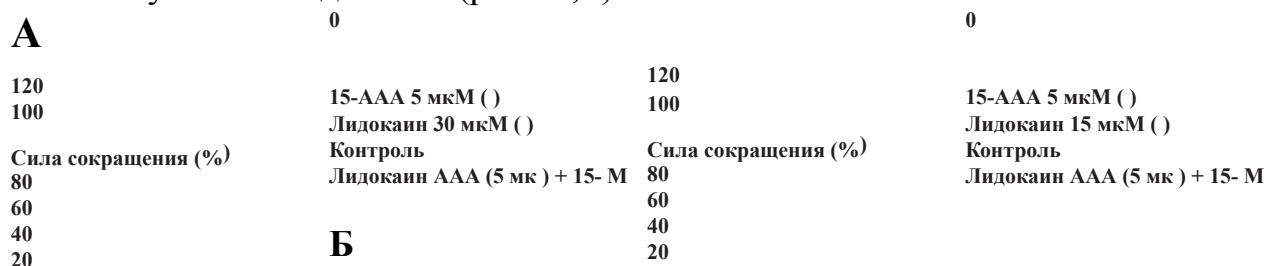


Рис.12. Влияние лидокаина на потенцирующий эффект алкалоида 15-ААА. Влияние 15-ААА (5 мкМ) на сокращение папиллярной мышцы в присутствии 30 мкМ (А) и 15 мкМ (Б) лидокаина. По оси ординат – сила сокращения мышцы, в процентах от максимальной, принятой за 100%. Во всех случаях $P<0,05$, ($n=6$).

Эти результаты свидетельствуют о том, что потенцирующий эффект 15-ААА возможно обеспечивается благодаря его взаимодействию с Na^+ каналами, в результате которого активируется поступление ионов Na^+ в кардиомиоциты, сопровождаемое увеличением в них содержания ионов Ca^{2+} и усилением сокращений папиллярной мышцы. По-видимому, этот эффект 15-ААА обусловлен общностью его некоторых структурных элементов с аконитином, в частности наличием остатка уксусной кислоты, благодаря которой обеспечивается взаимодействие с Na^+ каналами и последующая активация процессов, способствующих развитию ПИЭ. При этом, проявление ПИЭ алкалоидом 15-ААА только при использовании его низких концентраций по-видимому объясняется тем, что при высоких концентрациях он вызывает ОИЭ, который преобладает над ПИЭ, и поэтому в этих условиях его проявление не наблюдается. Таким образом, из анализа

50

данных, полученных в процессе изучения ПИЭ алкалоида 15-ААА следует, что в основе его развития лежит модификация функции Na^+ каналов, сопровождаемая увеличением поступления ионов Na^+ в кардиомиоциты и активацией процессов мобилизации ионов Ca^{2+} , которые и обеспечивают усиление сокращений сердечной мышцы.

Особенности отрицательного инотропного эффекта алкалоида 15-ААА. При высоких концентрациях (≥ 8 мкМ) и частотах стимуляции (≥ 1 Гц), алкалоид 15-ААА существенно подавлял сократительную активность папиллярной мышцы. Этот эффект алкалоида 15-ААА имел доза-зависимый характер и при концентрации 30 мкМ сила сокращения папиллярной мышцы снижалась до $13,9 \pm 4,9\%$ от контроля. При этом концентрация 15-ААА, которая вызывала половину его максимального эффекта (ED_{50}) составляла 16,7 мкМ и он был наиболее выражен при высоких частотах стимуляции. Эти результаты свидетельствуют о том, что при высоких концентрациях алкалоид 15-ААА также проявляет отрицательный инотропный эффект (ОИЭ), который однако менее выражен, чем у 15-ГАА. При дальнейшем изучении этого эффекта 15-ААА было обнаружено, что он зависит от концентрации ионов Ca^{2+} в среде инкубации и существенно возрастает при её увеличении. Эти результаты указывают на то, что ОИЭ алкалоида 15-ААА возможно связан с его влиянием на поступление ионов Ca^{2+} кардиомиоцитов. Для проверки этого предположения было изучено влияние на этот эффект 15-ААА блокатора потенциал-зависимых Ca^{2+} каналов нифедипина. При этом было обнаружено, что в присутствии 5 мкМ нифедипина алкалоид 15-ААА также эффективно, как и в условиях отсутствия блокатора Ca^{2+} каналов, подавляет сокращения папиллярной мышцы. Из этих результатов следует, что в отличие от 15-ГАА, ОИЭ которого существенно снижался в присутствии нифедипина, ОИЭ 15-ААА в меньшей степени связан с подавлением поступления ионов Ca^{2+} через потенциал-зависимые Ca^{2+} каналы кардиомиоцитов. В связи с этим для дальнейшей характеристики ОИЭ алкалоида 15-ААА было изучено влияние

его высоких концентраций на пост-рест потенциацию папиллярной мышцы, которая отражает процессы, обеспечивающие транспорт ионов Ca^{2+} на уровне СР. При этом было обнаружено, что 15-ААА (30 мкМ) существенно подавляет процесс пост-рест потенциации, о чем свидетельствует снижение величины относительной потенциации (V_1/V_0) от контрольного значения 1,89 до 1,47. Эти результаты указывают на то, что ОИЭ алкалоида 15-ААА, возможно обусловлен снижением загрузки ионов Ca^{2+} в СР и уменьшением их содержания в последнем. Такое действие на содержание ионов Ca^{2+} в СР, характерно для антиаритмических средств 1 класса, которое обеспечивается в результате блокады потенциал-зависимых Na^+ -каналов (Heubach and Schule, 1998). В связи с этим, для выяснения роли Na^+ -каналов в обеспечении ОИЭ алкалоида 15-ААА, были изучены его эффекты в присутствии лидокаина. При этом было обнаружено, что в присутствии 15 мкМ лидокаина, концентрации соответствующей его значению ED_{50} , ОИЭ алкалоида 15-ААА уменьшался на $17,3 \pm 4,1\%$. Более того, в условиях инактивации Na^+ -каналов деполяризацией,

51

также наблюдалось снижение ОИЭ алкалоида 15-ААА на $54,3 \pm 4,7\%$. Эти результаты наряду с результатами, полученными в экспериментах с лидокаином, свидетельствуют о том, что в обеспечении ОИЭ алкалоида 15-ААА важную роль играют Na^+ -каналы кардиомиоцитов. При этом следует отметить, что в аналогичных экспериментах с 15-ГАА, лидокаин и инактивация Na^+ -каналов в меньшей степени влияли на его ОИЭ. Результаты свидетельствуют о том, что в реализации ОИЭ алкалоида 15-ААА важную роль играет его взаимодействие с Na^+ -каналами кардиомиоцитов. При этом, блокируя Na^+ -каналы и уменьшая содержание ионов Na^+ в кардиомиоцитах, 15-ААА может способствовать усилению выведения ионов Ca^{2+} через $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник и снижению их содержания как в цитоплазме, так и в СР (Bers, 2000). Для проверки этого предположения были изучены эффекты 15-ААА на сокращения папиллярной мышцы, индуцируемые модифицированным раствором Кребса и сердечным гликозидом оуабаином, которые в основном обеспечиваются ионами Ca^{2+} , поступающими в кардиомиоциты через $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник (Blaustein and Santiago, 1977). В этих экспериментах было обнаружено, что 15-ААА эффективно подавляет сокращения папиллярной мышцы, индуцируемые модифицированным раствором Кребса и оуабаином. Этот эффект 15-ААА имел доза-зависимый характер и при 30 мкМ алкалоид снижал сокращения, индуцируемые модифицированным раствором Кребса и оуабаином, до $16,1 \pm 3,7\%$, и $15,4 \pm 3,8\%$, со значениями ED_{50} 18,1 и 17,4 мкМ, соответственно. Учитывая то, что сокращения папиллярной мышцы, индуцируемые модифицированным раствором Кребса и оуабаином, обеспечиваются ионами Ca^{2+} , поступающими через $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник, полученные данные могут свидетельствовать о том, что этот эффект 15-ААА обусловлен подавлением этого пути поступления ионов Ca^{2+} в кардиомиоциты. Дополнительное подтверждение влияния

15-ААА на поступление ионов Ca^{2+} через $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник было получено в экспериментах с его блокатором KB-R7943, в присутствии которого его эффекты на сокращения папиллярной мышцы, индуцируемые модифицированным раствором Кребса и оуабаином, уменьшались на $11,5 \pm 2,1\%$ и $10,7 \pm 2,6\%$, соответственно. Полученные результаты являются убедительным свидетельством того, что подавление алкалоидом 15-ААА сокращений папиллярной мышцы, индуцируемых модифицированным раствором Кребса и оуабаином, обусловлено снижением поступления ионов Ca^{2+} в кардиомиоциты через $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник.

В целом, анализ полученных данных свидетельствует о том, что алкалоиды 15-ГАА и 15-ААА обладают выраженной инотропной активностью, которая обусловлена модификацией транспорта ионов Ca^{2+} в кардиомиоцитах. При этом установлено, что отрицательный инотропный эффект 15-ГАА и 15-ААА, в основном, обусловлен блокадой Na^+ -каналов, которая способствует модификации функции Ca^{2+} -транспортирующих систем, сопровождаемой снижением содержания ионов Ca^{2+} в кардиомиоцитах и подавлением их сократительной активности. Вместе с тем

показано, что в основе положительного инотропного эффекта 15-ААА лежит

52

активация Na^+ -каналов, которая способствует модификации функции Ca^{2+} -транспортирующих систем, сопровождаемой увеличением содержания ионов Ca^{2+} в кардиомиоцитах и усилением сократительной активности сердечной мышцы. Предполагается, что обнаруженные различия в инотропной активности алкалоидов 15-ААА и 15-ГАА обусловлены особенностями их структурной организации, которая определяет характер модуляции состояния Na^+ -каналов и последующую модификацию функции Ca^{2+} -транспортирующих систем.

ВЫВОДЫ

1. Впервые охарактеризованы особенности инотропных эффектов дитерпеноидных алкалоидов 15-ГАА и 15-ААА и изучены механизмы, лежащие в основе их отрицательной и положительной инотропной активности.
2. Впервые установлено, что модификация структуры 15-ГАА, путем замены ОН-группы у атома углерода С-15 на CH_3O -группу, обеспечивающая повышение антиаритмической активности 15-ААА, не сопровождается усилением его отрицательной инотропной активности, а наоборот, приводит к её снижению;
3. Установлено, что отрицательный инотропный эффект 15-ГАА и 15-ААА в основном обусловлен блокадой Na^+ -каналов, которая сопровождается модификацией функции Ca^{2+} -транспортирующих систем, способствующей снижению уровня ионов Ca^{2+} в кардиомиоцитах.
4. Показано, что важную роль в обеспечении отрицательного инотропного эффекта алкалоидов 15-ГАА и 15-ААА играет $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник, активация

которого в условия блокады Na^+ -каналов и уменьшения содержание ионов Na^+ , усиливает выведение ионов Ca^{2+} из кардиомиоцитов. 5. Впервые установлено, что алкалоиды 15-ГАА и 15-ААА подавляют пост-рест потенциацию папиллярной мышцы сердца крысы, что свидетельствует о том, что снижение загрузки ионов Ca^{2+} в саркоплазматический ретикулум, вносит существенный вклад в обеспечение их отрицательного инотропного эффекта. 6. Впервые обнаружено, что 15-ААА при низких концентрациях (3-8 мкМ) и низких частотах стимуляции (0,1-1 Гц) проявляет положительный инотропный эффект и увеличивает силу сокращений папиллярной мышцы сердца крысы в результате увеличения уровня ионов Ca^{2+} в кардиомиоцитах и их содержания в саркоплазматическом ретикулуме. 7. Установлено, что в основе положительного инотропного эффекта 15- ААА лежит активация Na^+ -каналов, которая способствует увеличению уровня ионов Na^+ в кардиомиоцитах и мобилизации ионов Ca^{2+} , обеспечивающих усиление сокращений папиллярной мышцы сердца крысы. 8. Установлено, что в обеспечении положительного инотропного эффекта 15-ААА, важную роль играет $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник. активация которого при увеличении уровня ионов Na^+ -каналов в кардиомиоцитах, способствует

53

усилению поступления и загрузки ионов Ca^{2+} в саркоплазматический ретикулум.

9. Показано, что различия в отрицательной инотропной активности алкалоидов 15-ААА и 15-ГАА обусловлены особенностями их структурной организации, которая определяет характер модуляции состояния Na^+ -каналов и последующую модификацию функции Ca^{2+} -транспортирующих систем.

10. Показано, что отсутствие прямой корреляции между инотропным и антиаритмическим действием 15-ААА, вероятно, обусловлено его сниженной эффективностью блокирования Na^+ каналов, а также, наличием у него положительной инотропной активности;

**SCIENTIFIC COUNCIL 14.07.2016.B.01.03 ON AWARD OF SCIENTIFIC
DEGREE OF DOCTOR OF SCIENCE AT THE NATIONAL UNIVERSITY
OF UZBEKISTAN AND INSTITUTE
OF MICROBIOLOGY
INSTITUTE OF BIOORGANIC CHEMISTRY**

ZAYNABIDDINOV ANVAR ERKINJONOVICH

**COMPARATIVE CHARACTERIZATION OF INOTROPIC EFFECTS OF
DITERPENOID ALKALOIDS 15-ACETOXYAZOMETHINE ATISINE
AND 15-HYDROXYAZOMETHINE ATISINE**

**03.00.08 – Human and animal physiology
(biological sciences)**

ABSTRACT OF DOCTORAL DISSERTATION

TASHKENT – 2016

The theme of the doctoral dissertation is registered by the Supreme Attestation Commission at the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan under number № 30.06.2015/B2015.2.B166.

The doctoral dissertation has been carried out at Institute of Bioorganic Chemistry

The abstract of the dissertation is posted in three languages (Uzbek, Russian and English) on the webpage of the Scientific Council (www.nuu.uz) and on the website of "ZiyoNet" information and education portal (www.ziynet.uz)

Scientific consultant: **Usmanov Pulat Bekmuratovich**
Doctor of Biological sciences, professor

Official opponents: **Mirhodjaev Ulugbek Zokirovich**
Doctor of Biological sciences, professor
Kuchkarova Lybov Solijanovna
Doctor of Biological sciences, professor
Matschanov Azat Taulbayevich
Doctor of Biological sciences

Leading organization: **Andijan State University**

The defense of the dissertation will take place on 09 December 2016 at 10⁰⁰ at the meeting of the Scientific Council No.14.07.2016.B.01.03 at the National University of Uzbekistan: Institute of Microbiology (Address: 100174, Tashkent, 4 University street, conference hall of Biology faculty of the National University of Uzbekistan. Tel.: (+99871) 227-12-24; fax: (+99871) 246-53-71; (+99871) 246-02-24; e-mail: nauka@nuu.uz).

Doctoral dissertation could be reviewed at the Information-resource center of the National University of Uzbekistan (registration No 06). Address: 100174, Tashkent, 4 University street, Administrative Building of the National University of Uzbekistan. Tel.: (+998 71) 236-46-55; fax: (+998 71) 246-02-24.

The abstract of the dissertation is distributed on 23 November 2016.
(Registry record No ____ dated "____" _____ 2016).



G.I. Djumaniyaz

G.I. Djumaniyaz

Chairman of the Scientific council on award of scientific degree of doctor of science Dr.B.S., professor

Z.A. Mamatov

Z.A. Mamatov

Scientific secretary of the Scientific council

Holder of scientific degree of doctor of science, PhD, senior research

K.T. Alma

K.T. Alma

Chairman of the scientific seminar under the Scientific council on award of scientific degree of doctor of science Dr.B.S., professor

INTRODUCTION (annotation of the doctoral dissertation)

The urgency and relevance of the dissertation theme. All over the world the development of new prophylaxis approaches and cardiac arrhythmias treatment is the most important problem of cardiology and pharmacology occupies a leading place among factors of “sudden cardiogenic death” risk. Disorders of electrophysiological properties of cardiomyocytes, responsible for excitability, automatism and action potential formation (AP) underlies on the basis of pathogenesis of cardiac arrhythmias. In this respect, leading place in the modern concept of prophylaxis and cardiac arrhythmias treatment is given to creation of new generation anti-arrhythmic drugs.

After finding of independence, in the republic organization of the scientific research pointed at creating of high-performance drugs from local raw materials and large-scale measures on ensuring national pharmaceutical market with high quality drugs at a high level led to certain results. Meanwhile, it is important to note drugs derived from local materials (phytogenous diterpenoid alkaloids), that are widely used in the treatment of cardiovascular diseases.

As of today, all over the world actual problem is to search for herbal compounds with potential pharmacological activity, perspective for the development of new approaches of the treatment of cardiac arrhythmias. With the help of these compounds it was obtained important information on cellular and molecular mechanisms of cardiac arrhythmias, and the most promising targets for their treatment. Moreover, thanks to these compounds it was managed to establish important features of the pharmacological regulation of targets that allowed the development of effective methods of their functional state modulation. In general, in process of herbal compounds study, valuable information was obtained, which provided substantial progress in the development and creation of new promising drugs for the treatment of cardiac arrhythmias. In the light of the aforesaid, the dissertation theme is very relevant and in demand, as data, obtained from characteristics of features of the inotropic action mechanism of diterpenoid alkaloids contribute to the creation of a new generation effective anti-arrhythmic agents, lack in dangerous side effects.

This dissertation research to a certain degree serves for fulfillment of the tasks, stipulated in the Decrees of the President of Uzbekistan №PP-1652 from November 28, 2011 “About measures on further deepening of the reform in the public health system” and №PP- 1855 from November 21, 2012, “About Investment Program of the Republic of Uzbekistan for 2013”, as well as in other legal instruments adopted in this area.

Relevance of the research to the priority areas of science and technology development of the republic. This study was performed in accordance with the priority areas of science and technology of the Republic - VI. “Medicine and Pharmacology”.

Review of international scientific research on the topics of dissertation¹.

Research focused on the development of modern approaches of cardiac arrhythmias therapy are carried out in the leading scientific centers and higher educational institutions of the world, including Columbia, California and New York Universities (USA), in the Universities of Koln (German), Utah (USA), Calgary (Canada) and Vanderbilt (USA), as well as in the Institutes of Bioorganic chemistry and Chemistry of Plant substances (Uzbekistan).

As a result of research carried out in the world in the area of the development of modern approaches of cardiac arrhythmias treatment a number of data have been obtained, including: it was established molecular mechanisms of heart rate disorders, that contributed to the development of better diagnostic approaches, treatment and prophylaxis of cardiac arrhythmias (Columbia University); it was characterized functionally important systems of cardiac cells with defects, which is connected the pathogenesis of various types of arrhythmias (University of Köln); it was reached essential progress in pharmacotherapy of different types of arrhythmias and developed the effective anti-arrhythmic drugs (the University of California); it was developed the modern methods of arrhythmias treatment, where special emphasis is placed on a special role is devoted to blockers of fast Na^+ channels, which remains as the most promising targets for developing of new generation antiarrhythmic drugs (Universities of Calgary and Utah).

In the world, at the development of new approaches for treatment of cardiac arrhythmias are carried out investigations in a number of priority areas, including: it is analyzed cellular and molecular mechanisms, underlying of different types of cardiac arrhythmias; it is found out the role of ion-channels and receptors in the pathogenesis of cardiac arrhythmias; it is established new molecular targets for the adequate treatment of heart rate disorders; it is created prerequisites for rational design of new promising drugs for the treatment of heart rate disorders.

Degree of study of the problem. The diterpenoid alkaloids, isolated from plants of *Aconitum* genera, at present are considered as the most promising compounds for development of antiarrhythmic drugs of new generation. Major structural features of these alkaloids, responsible for their antiarrhythmic activity are studied in detail in the leading laboratories of the world. Meanwhile, it was found that common structural elements of the most active diterpenoid alkaloids are the residues of acetylanthranilic or amino benzoic acid in the atom of C-4, methoxy groups on C-1, C-14 and C-16, and hydroxyl group on C-8. At the same time, it was shown that benzoyl group at C-14 and the basicity of the nitrogen atom are also very important for the ensuring of antiarrhythmic activity of these alkaloids. The electrophysiological mechanism of the antiarrhythmic action of

¹Review of foreign scientific research on the subject of the thesis is prepared. Zipes DP et al (2006): Guidelines for management of sudden cardiac death. U.S. National Institute of Health, <http://www.circulationaha.org>; Sampson K.J., Kass R.S. (2011). Anti Arrhythmic Drugs (Chapter 29). In: *Goodman & Gilman's Pharmacological Basis for Therapeutics*. 11e.

these compounds was well studied, and is mainly related to the blockage of the voltage-gated Na^+ channels. The main effect of such blockage is the reduction of the rate of depolarization of the cardiac action potential that accompanied by retardation of its distribution rate and increases the effective refractory period, that leads to reducing of cardiac excitability. However, the blockage of Na^+ channels may alter Ca^{2+} transport so that a decrease Na^+ concentration can promote decrease of Ca^{2+} content in cardiomyocytes, resulting in decrease of contractile activity of heart muscles. The depression of cardiac contractility or the negative inotropic effect is a characteristic property of all 1 class antiarrhythmic drugs, owing to their use is limited in connection with it, that it promotes depression of cardiac force-pump function. Therefore, despite the current success in using of this class of antiarrhythmic drugs in therapies of heart rate disfunctions, there is still a pressing need for the development of new generation of more efficacious and potentially safer antiarrhythmic drugs with less negative inotropic effect. In connection with it, modern investigations are focused on alternative approaches include the modification of existing molecules of diterpenoid alkaloids to maintain positive properties while removing undesirable ones, that led to get a compound which more potent affect to Na^+ channels with minimal negative inotropic effect.

Connection of the theme of dissertation with the scientific-research works of the higher educational institution, where the dissertation is conducted. The dissertation research was performed within the framework of fundamental and applied scientific-research program of Institute of Bioorganic Chemistry: FA-F3-T144 "The study of mechanisms of cardiac ion channels modulation and smooth muscle cells by natural biologically active compounds" (2007-2011); FA-A12-T068 "Development of a complex approach, screening and characterization of structural and functional features of the interaction of biologically active compounds with ion channels and receptors of biological membranes" (2009-2011); FA-F6-T083 "Searching and characterization of biologically active compounds - modulators of Ca^{2+} homeostasis in cardiac and smooth muscle cells" (2012-2016); FA-A11-T057 "Development of the center for high-performance screening of biologically active compounds of natural and synthetic origin" (2015-2017).

The aim of research work is characterization of inotropic effects of diterpenoid alkaloids 15-HAA and 15-AAA and clarify of the reasons for the lack of correlation between the negative inotropic and antiarrhythmic activity in 15-AAA.

The tasks of research work:

to investigate the effect of alkaloids 15-HAA and 15-AAA on contractile activity of rat papillary cardiac muscles and study of dependency of their effects from concentration.

to investigate the effect of stimulation frequency on the inotropic effect of 15-HAA and 15-AAA and explore the characteristics of their changes at different stimulation frequencies;

to investigate the effect of the alkaloids 15-HAA and 15-AAA on the kinetic parameters of isometric contraction of papillary muscle ($+dF/dt_{\max}$ - the velocity of contraction development, $-dF/dt_{\max}$ – maximum velocity of relaxation, T_{com} – time of contraction-relaxation cycle, $T_{1/2}$ – half-maximal relaxation time), evaluate the nature of their changes and possible mechanisms underlying them;

to investigate the effect of alkaloids 15-HAA and 15-AAA on voltage-dependent Ca^{2+} - and Na^{+} - channels, study the relationship between the blockade of these channels, decreasing $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in cardiomyocytes, and the suppression of the contractile activity of the papillary muscles;

to investigate the effect of alkaloids 15-HAA and 15-AAA on the Ca^{2+} content in the SR, evaluate the relationship between its change and inotropic effect of alkaloids and the role of $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in this case;

to provide a comparative analysis of the relationship between the inotropic activity of alkaloids 15-HAA and 15-AAA and their structure, formulate the regulations about the possible reasons of differences in their inotropic action and the lack of correlation between antiarrhythmic and negative inotropic activity of 15-AAA.

The objects of study are the alkaloids 15-HAA and 15-AAA, derivatives of diterpenoid alkaloid atisine, isolated from plant of *Aconitum zeravshanicum* genus.

Subject of research – is study of inotropic effects features of alkaloids 15- HAA and 15-AAA, their relationship from structure and role of Ca^{2+} -transport systems of cardiomyocytes in their ensuring.

Methods of research. In the dissertation the modern electrophysiological methods for the recording and analyzing of contractile activity of cardiac muscle. All experimental data were collected and processed with the help of computer software OriginPro 7.5 (OriginLab Corporation; USA).

Scientific novelty of the dissertation work is as follows:

it was stated features of inotropic effects of 15-HAA and 15-AAA alkaloids, their structure-activity relationship and basic mechanisms underlying their the positive and negative inotropic activity;

it was revealed the lack of effect of 15-HAA alkaloid structure modification of the 15-HAA, by replacing OH group on the carbon atom C-15 with CH_3O group on negative inotropic activity of alkaloid 15-AAA;

it was found the dependence of inotropic effect character of alkaloid 15-AAA from used concentration, which at low concentrations (3-8 μM) and low stimulation frequencies (0.1-1 Hz) exerts a positive, but at higher concentrations ($>8 \mu\text{M}$) and higher stimulation frequencies ($>1\text{Hz}$) produced only a negative inotropic effect;

it was revealed the dependence of positive inotropic effect of 15-AAA from Ca^{2+} ions entering into the sarcoplasmic reticulum, which provides Ca^{2+} - transport systems not associated with β -adrenergic receptors and voltage-dependent Ca^{2+} channels;

it is established a connection between negative inotropic effects of 15-AAA and 15-HAA and blockage of Na^{+} -channels, which accompanies with disorders Ca^{2+}

ions transport and decrease of their content in the cardiomyocytes;

60

it was revealed the differences in the negative inotropic activity of the alkaloid 15-AAA and 15-HAA, which conditional on features of their structure and different potency to blockade of Na^+ -channels, which determines the rate of disorder of Ca^{2+} ions transport and decline of their level in the cardiomyocytes;

it was established the lack of a direct correlation between the inotropic and antiarrhythmic action of 15-AAA, conditional on less effective blockade of Na^+ channels and its ability to induce the positive inotropic effect.

Practical results of the study considerably expand the understanding of features of inotropic action of diterpenoid alkaloids, their dependence on structure and are a theoretical basis for the development of a new generation of safe and more effective antiarrhythmic drugs.

Reliability of the results is based on the fact that the experimental results were obtained by using modern computerized electrophysiological methods of investigation. The conclusions were made based on the results that have been processed using modern methods of mathematical statistics.

The scientific and practical value the study results. Theoretical significance of the dissertation consists of the data presented in it are an important contribution to the development of fundamental knowledge about the mechanism of inotropic action of diterpenoid alkaloids.

The obtained data open up new details of mechanisms responsible for the inotropic effects of diterpenoid alkaloids and allow understanding the relationship between structure of alkaloids and their inotropic activity that is of great practical importance. The results of these studies considerably expanded the scientific basis for the rational design and development of new generation of safe and highly effective antiarrhythmic drugs devoid of serious side effect.

Implementation of the research results. On the basis of the developed structural-functional recommendations for the development of antiarrhythmic drugs of a new generation from local raw materials:

the most appropriate approaches of structural modification of diterpenoid alkaloids provide the obtaining of effective antiarrhythmic drugs and promote to eliminate their negative inotropic activity (certificate №BA-06/2069 from November 14, 2016 of “Uzfarmsoat” SJSC) give a great opportunity for development new antiarrhythmic drugs from ability of alkaloid 15-AAA to cause positive inotropic effect, which limiting its negative inotropic effect promote the increase of antiarrhythmic action at cardiac failures;

The results, obtained on inotropic effect of diterpenoid alkaloids 15-acetoxymethine atisine and 15-hydroxymethine atisine were used in the project FA-F5-T084 “Characterization of bioregulators in ions transport of mitochondria and metabolic processes in the norm and at pathology” (IBOC, 2012-2016), videlicet effecting on Ca^{2+} ions via $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger in mitochondria for

the regulation of Ca^{2+} ions homeostasis in them (certificate of the Committee for coordination of science and technology development FTK-03-13/828 from November 22, 2016). Usage of scientific results gave the opportunity the regulation of Ca^{2+} homeostasis disorders in mitochondria via dysfunction of

61

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger system in them.

Approbation of the work. The main regulations of the dissertation were presented at the international and republican scientific and practical conferences: “Bioorganic Chemistry and Biotechnology (Pushchino, Russia 2011); “Actual Problems of Pathophysiology” (St. Petersburg, Russia 2011); “Actual Problems of Chemistry of Natural Compounds” (Tashkent, 2011-2012); “Actual Problems of Development of Bioorganic Chemistry” (Tashkent, 2013); “Experimental and Theoretical Biophysics” (Pushchino, Russia 2012, 2014-2015); “Fundamental Science and Clinic Medicine” (Saint-Petersburg, Russia 2015); at the International Medical Congress «Euromedica» (Hannover, Germany 2015); and “Actual Problems of Modern Medicine and Pharmacy” (Minsk, Belarus, 2016).

Publication of the research results. 28 scientific works were published on the theme of the dissertation. Of these 11 scientific articles, recommended by the Supreme Attestation Commission of the Republic of Uzbekistan for publishing basic scientific results of doctoral dissertations including 9 national and 2 international journals.

The structure and volume of the thesis. The dissertation consists of an introduction, four Chapters, Conclusion, references. The volume of the dissertation is 162 pages.

MAIN CONTENT OF DISSERTATION

In the introduction of the dissertation, the topicality and relevance of the research are substantiated, the aim and objectives of the research, its object and subject are formulated, its conformity with the priorities of development of science and technology of the Republic of Uzbekistan is shown, the scientific novelty and practical results of the research are formulated, the theoretical and practical significance of the obtained results are revealed, practical applications of the research results are noted, and information on published works and dissertation structure are provided.

In the first chapter “**Current status and future perspective in investigation of cardiac arrhythmias**” a detailed review of the literature dealing with the electrical and mechanical activity of the heart, the crucial role of Ca^{2+} ions in excitation-contraction coupling and in the generation and regulation of heart rate and rhythm is presented. The information on the key role of Ca^{2+} homeostasis in the regulation of excitability and contractility of the heart, as well as the mechanisms involved in its maintenance also is provided. In addition recent findings how defective Ca^{2+} homeostasis contributes to cardiac arrhythmias, as well as, a promising strategies to correct these defects which have opened up exciting possibilities for the development of novel and superior approaches to the treatment of arrhythmias are described.

The second chapter, **"The study of the contractile activity of the papillary muscles of rat heart"**, describes in details methods used to assess the inotropic effect of alkaloids on left ventricular papillary muscles from rats, as well as their effect on isometric force, rate of force development, time parameters, post-rest

62

potentiation, positive inotropic interventions produced by Ca^{2+} and norepinephrine. The inotropic effects of alkaloids were also studied in the presence of lidocaine, nifedipine, KB-R7943, propranolol, phentolamine and cyclopiazonic acid, a Na^+ -, Ca^{2+} -channels, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger, β , α -adrenoreceptors and SR Ca^{2+} -ATPase blockers and inhibitors, respectively.

In the third chapter, **"The characterization of inotropic effects of diterpenoid alkaloid 15-hydroxyazomethine atisine (15-HAA) on the contractile activity of the papillary muscles of rat heart"** the results of research studies of the effect of 15-HAA on contraction of rat papillary muscle driven by electrical stimuli are presented.

Features of the alkaloid 15-HAA action on rat papillary muscle contraction. The 15-hydroxyazomethine atisine (15-HAA) and 15-acetoxyazomethine atisine (15-AHA) a diterpenoid alkaloid atisine derivatives, isolated from Aconitum plant species, possess a pronounced antiarrhythmic effect (Kodirova et al., 2010). It was shown that the alkaloid 15-AHA, characterized by the presence of CH_3O group at carbon atom C-15 in its skeleton instead OH group has a more pronounced antiarrhythmic action (Fig.1).

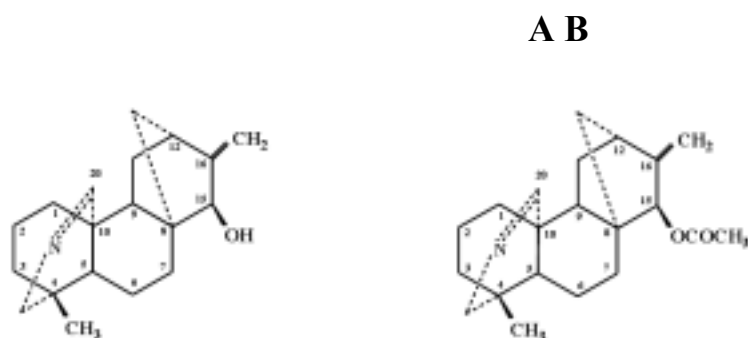


Fig. 1. Chemical structure of the 15–hydroxyazomethine atisine (A) and 15-acetoxyazomethine atisine (B).

However, we have found that such modification of structure of 15-HAA followed by decrease of the negative inotropic effect of 15-AHA, which is more pronounced in the 15-HAA. It was found that this effect of 15-HAA has a dose dependent manner with a maximum at 30 μM , when the force of the papillary muscle contraction was reduced to $7.3 \pm 2.1\%$, from the control (Fig. 2, B). The concentration of 15-HAA, which caused half of its maximal effect (ED_{50}) was 8.7 μM , and this effect of the alkaloid was more pronounced at stimulation frequencies above 3 Hz. Because the cardiac muscle contraction strongly depend on the concentration of intracellular Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in the cardiomyocytes (Bers, 2008), the

observed effect may indicate that 15-HAA reduce the content of Ca^{2+} in cardiomyocytes. To test this assumption the dependence of the effect of 15-HAA on the concentration of Ca^{2+} in the incubation medium was studied. It was found

63

that in the presence of 15-HAA the increase in the force of contraction of the papillary muscle in response to increased Ca^{2+} concentration is substantially reduced (Fig.3, A).

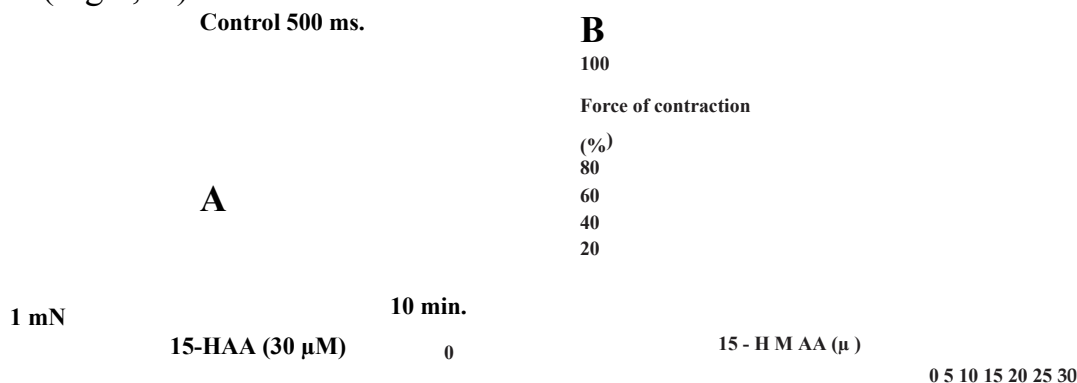


Fig. 2. Effect of alkaloid 15-HAA on the amplitude of contraction in rat papillary muscle. A. original tracing, representing the effect of 15-HAA on the papillary muscle contraction. B. Concentration-dependent effect of 15-HAA on the papillary muscle contraction. Results are plotted as mean (SEM) percentage of control, taken as 100%. $P < 0,05$, ($n=6$).

Considering that under these experimental conditions, an increase in force of contraction of the papillary muscles is provided mainly by Ca^{2+} influx through the voltage-dependent Ca^{2+} channels, these results indicate that the effect of 15-HAA is related to the blockage of these channels. Additional support for such action of 15-HAA was obtained in experiments with nifedipine, a selective blocker of voltage-dependent Ca^{2+} channels in the presence of which the effect of 15-HAA also significantly decreased, but partly preserved (Fig. 3, B).

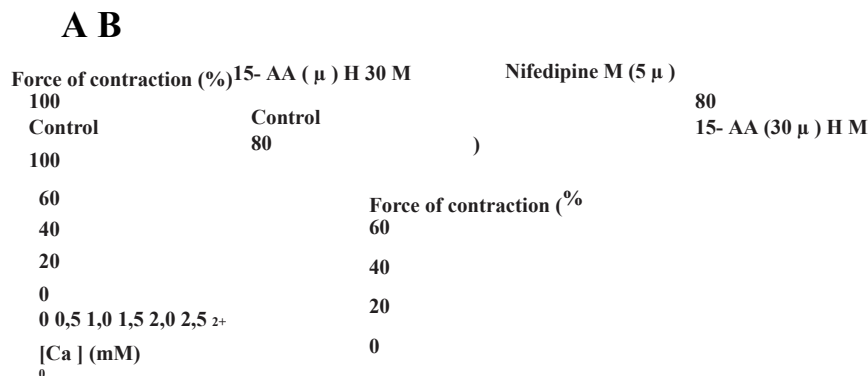


Fig. 3. Effects of extracellular concentration of Ca^{2+} and nifedipine on inhibitory action of alkaloid 15-HAA on rat papillary muscle contraction. A. Effect of 15-HAA on papillary muscle contraction induced by elevated $[\text{Ca}^{2+}]_o$. B. Effect of 15-HAA (30 μM) on the papillary muscle contraction in the presence of 5 μM nifedipine. Results are plotted as mean (SEM) percentage of control, taken as 100%. $P < 0,05$, ($n=4-6$).

These results indicate that 15-HAA has a marked negative inotropic effect (NIE), which is related to the reduction of Ca^{2+} content in cardiomyocytes due to suppression of its influx through voltage-dependent Ca^{2+} -channels.

Effect of the alkaloid 15-HAA on Ca^{2+} transport in the sarcoplasmic reticulum of cardiomyocytes. Above it was shown that the NIE of 15-HAA not suppressed completely in the presence of nifedipine, indicating that in its implementation along with a voltage-dependent Ca^{2+} channels may also have involved other Ca^{2+} -transport systems. In particular, this effect of 15-HAA can be associated with its action on the transport Ca^{2+} in the sarcoplasmic reticulum (SR), which plays a key role in the regulation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in cardiomyocytes and contractile activity of the myocardium (Bers, 2000). To test this hypothesis, we studied the effect of 15-HAA on the post-rest potentiation, a characteristic property of cardiac muscle, which allows to study the processes of accumulation and release of Ca^{2+} ions in the SR. It was found that after a period of rest, the force of contraction of the heart muscle increases significantly due to the accumulation of additional amounts of Ca^{2+} in the SR, more than with regular stimulation, which provide enhancement or potentiation of muscle contraction (Bers et al.1993). In control experiments on rat papillary muscle the amplitude of the first contraction B1 after a 30-second rest period increased from a steady level of B0 (which is taken as 100%) up to $189,7 \pm 6.2\%$ (Fig. 4, A).

B

A

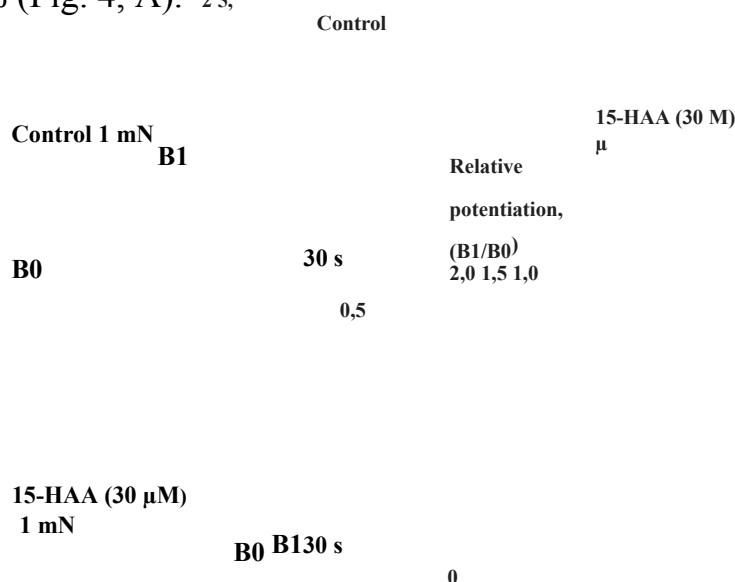


Fig. 4. Effects of alkaloid 15-HAA on post-rest contractile behavior in rat papillary muscle. *A. Original tracings representing the effect of 15-HAA (30 μM) on post-rest potentiation. B. The effect of 15-HAA (30 μM) on relative potentiation of contraction (the ratio B1/B0). Results are reported as mean ± SEM (n=5). *P<0.05, compared to control.*

It was found that the application of 30 μM 15-HAA, accompanied by a significant reduction in the amplitude of B1 to $10.2 \pm 4.1\%$ of control, indicating that the alkaloids inhibit the potentiating effect of rest, probably reducing the

accumulation of Ca^{2+} in SR (Fig.4, A). Taking into account that Ca^{2+} influx through voltage-dependent Ca^{2+} channels, are then used to load the SR (Bers, 2000), suppression by 15-HAA post-rest potentiation indicates that its effect may be associated with modification of Ca^{2+} transport in SR. To further clarify the mechanism of action of 15-HAA on post-rest potentiation its effect on the relative potentiation (B1/B0) was analyzed, which reflects the process of Ca^{2+}

65

accumulation and, accordingly, capacity of SR (Mill et al, 1992;. Bers et al., 1993). In these experiments application of 30 μM 15-HAA produced significant decrease in relative potentiation from 1.89 ± 0.10 to 1.39 ± 0.13 (Fig.4, B). These results indicate that the suppression of the amplitude B1 caused by 15-HAA may be related to the reduced loading of Ca^{2+} ions into SR and a subsequent decrease in their content of the latter. A similar mechanism of suppression of cardiac muscle contractile activity underlies the action of antiarrhythmics of class 1.

The role of sarcolemmal voltage-dependent Na^+ -channels in the implementation of NIE of alkaloid 15-HAA. The negative inotropic effect of some class 1 antiarrhythmic drugs, provided by inhibition of Na^+ channels and subsequent impairment of Ca^{2+} handling which reduced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and depressed the contraction force of cardiac muscle (Navada et al., 1994; Heubach and Schule, 1998). The blockage of Na^+ -channels with these antiarrhythmic drugs causes a decrease in the depolarization rate of the action potential, slows conduction velocity and reduces the excitability of the heart tissue (RodeHeubach and Schule, 1998 Navada et al., 1994). At the same time all the class 1 antiarrhythmic drugs exert significant negative inotropic effect related to Na^+ -

channels blockage and the subsequent decreases in the intracellular Ca^{2+} concentration (Schlepper, 1989; Navada et al., 1994). Therefore, to clarify the role of the voltage-dependent Na^+ -channels in the effects of 15-HAA its effect on contraction of papillary muscle in the presence of lidocaine, a specific blocker of these channels were studied (Sheu and Lederer, 1985). As was found in these experiments lidocaine significantly decreased the inhibitory effect of 15-HAA on the papillary muscle contraction. In addition, it was shown that in the presence of 15-HAA the dose-response curves for lidocaine shifted to the left without substantially changing the magnitude of its maximal effect (Fig. 5, A).

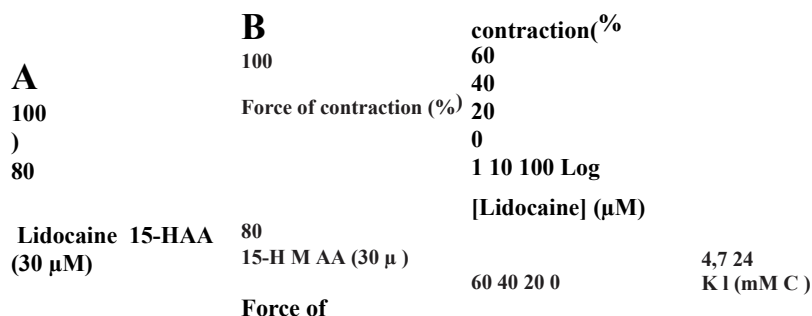


Fig. 5. The dependence of negative inotropic effect of the alkaloid 15-HAA on the state of voltage-dependent Na^+ -channels. A. Effect of 15-HAA (30 μM)

on the dose-response curves of lidocaine. B. Effects of 15-AA (30 μ M) on papillary muscle contraction in normal and modified Krebs solution (24 mM, KCl). Results are plotted as mean (SEM) percentage of control, taken as 100%. $P<0,05$, ($n=4$).

66

The value of ED_{50} for lidocaine in the presence of 30 μ M 15-HAA, decreased from 15 μ M to 4.1 μ M, indicating the additive actions of the alkaloid and lidocaine. Moreover, the parallel displacement dose response curve for lidocaine, without altering its maximum effect in the presence of 15-HAA indicates its competition with lidocaine for one target i.e. Na^+ -channels. To further verify the possible role of Na^+ -channels in NIE of 15-HAA, its effects were studied in condition where Na^+ -channels were inactivated by depolarization, induced by 24 mM KCl (Catterall, 2003). As seen from the results shown in Fig.5, B, in these conditions the inhibitory effect of 15-HAA on papillary muscle contraction reduced from $92,7\pm2,4\%$ (control obtained in normal Krebs solution) to $63.7\pm5.6\%$. These results together with the results obtained in experiments with lidocaine indicate that Na^+ -channels plays important role in providing NIE of 15- HAA. Thus, by blocking of Na^+ -channels and reducing the intracellular concentration of Na^+ in cardiomyocytes 15-HAA apparently could alter Ca^{2+} transport through the Na^+/Ca^{2+} exchanger, that reduces their content in the SR, resulting in the depression of contractile force of papillary muscle.

Effect of the alkaloid 15-HAA on Ca^{2+} transport provided by the Na^+/Ca^{2+} exchanger. Above it was shown that the 15-HAA markedly suppresses post-rest potentiation in papillary muscles, which reflects the process of Ca^{2+} accumulation in the SR. Since Ca^{2+} content in SR is directly associated with functional state of Na^+/Ca^{2+} exchanger (Bers and Christensen, 1990), these data may suggest that the inhibition of the exchanger may also be involved in the NIE of 15-HAA. Therefore, to test this hypothesis we examined the effects of 15-HAA on the contractions of rat papillary muscle induced by low Na^+ solution and ouabaine, which are mainly due to the Ca^{2+} entry via Na^+/Ca^{2+} -exchanger (Blaustein and Santiago, 1977).

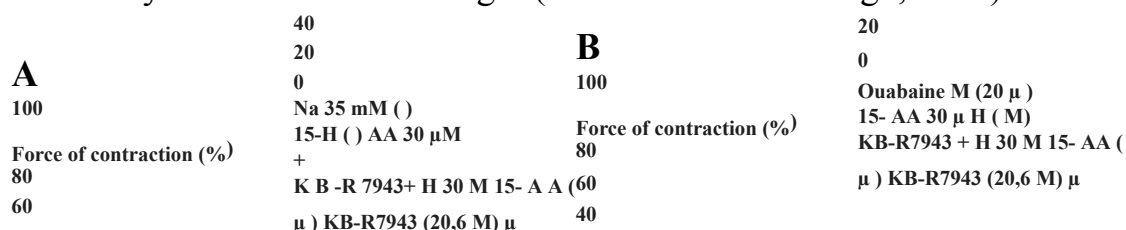


Fig.6. Effect of alkaloid 15-HAA on rat papillary muscle contraction induced by low Na^+ Krebs solution and ouabaine. A. Effect of 15-HAA on papillary muscle contraction induced by low Na^+ solution obtained by replacing the NaCl with equimolar choline chloride. B. Effect of 15-HAA on papillary muscle contraction induced

by ouabaine (20 μM). Results are plotted as mean (SEM) percentage of control, taken as 100%. $P < 0.05$, ($n=4$).

67

In these experiments was observed that 15-HAA dose-dependently inhibited the force of contraction increased by low Na^+ solution and at 30 μM maximally reduced it from $72.6 \pm 4.8\%$ to $11.6 \pm 3.1\%$ (Fig.6, A). The ED_{50} value of 15-HAA, a concentration producing 50% of maximal inhibition, determined graphically, was $16.9 \pm 3.9 \mu\text{M}$. These results indicate that 15-HAA potently inhibits the force of contraction induced by low Na^+ solution, suggesting that this inhibitory effect of alkaloid is due to the blockage of Ca^{2+} influx via $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger. This suggestion was confirmed in experiments in which the effects of 15-HAA on papillary muscle contraction, induced by low Na^+ solution, were studied in the presence of a specific blocker of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger KB-R7943 (Sato, 2000). In these experiments, in the presence of 20.6 μM KB-R7943, when the amplitude of the papillary muscle contractions, induced by low Na^+ solution was reduced by half, significantly reduced the effect of the alkaloid, application of 15-HAA on top of KB-R7943 further reduced the force of contraction, but to a much lesser extent, than that obtained in the absence of KB-R7943 (Fig.6, A). These results confirm the hypothesis that the inhibitory effect of 15-HAA is due to the blockage of Ca^{2+} influx via $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger. Similar inhibitory effect of 15-HAA was observed in papillary muscles contracted by ouabaine, which also are mainly due to the Ca^{2+} entry via $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger (Rossoni et al., 2006). Under these conditions 15-HAA in similar dose-dependent manner inhibited the force of contraction increased by ouabaine and at 30 μM maximally reduced it from $68.6 \pm 3.6\%$ to $6.9 \pm 3.1\%$ with ED_{50} -15.8 μM (Fig.6,B). In addition, it was found that this effect of 15-HAA on contraction induced by ouabaine, significantly reduced in the presence of KB-R7943, indicating that it suppresses due the Ca^{2+} influx via $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger. Analysis of the obtained results showed that the 15-HAA inhibited the force of contraction induced by low Na^+ solution and ouabaine almost to the same extent and with nearly equal ED_{50} value. Thus, a similar inhibitory action of 15-HAA on the force of contractions induced by two different procedures which activates Ca^{2+} influx via $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger provides the clear evidence that these effects of alkaloid are a result of direct blockage of Ca^{2+} influx through this exchange mechanism. The potency of 15-HAA to block of Ca^{2+} influx via $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger was further confirmed in the experiments with KB-R7943, which significantly attenuated the inhibitory effects of 15-HAA on the force of contraction increased by two different procedures. Taking into account that the contraction of the papillary muscle, induced by these different methods, mainly is due to the Ca^{2+} influx through the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, it can be concluded that the blockage of Ca^{2+} influx via $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger may also be involved in the negative inotropic effect of 15-HAA. Such action of 15-HAA on $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger is confirmed by significant reduction its effects on the papillary muscle contraction, induced by two different methods, in the presence of KB-R7943.

Chapter IV «**Characterization of the effects of diterpenoid alkaloid 15-acetoxiasometin atisine (15-AAA) on the contractile activity of the papillary muscle of the rat heart**» is devoted to the study of the features of positive and negative inotropic effects of 15-AAA.

68

In contrast to 15-HAA, the 15-AAA at low concentration (1-8 μM) and at low stimulation frequency (0,1-1 Hz) produced a transient moderate positive inotropic effect, whereas at the higher concentrations and at higher stimulation frequency also produced negative inotropic effect.

Characteristics of the positive inotropic action of the alkaloid 15-AAA. Application of 5 μM 15-AAA in incubation solution accompanied by an increase in the force of papillary muscle contraction, which increased by $2 \pm 3,2\%$, from the control level (Fig. 7). The increase in the force of contraction of cardiac muscle or a positive inotropic effect (PIE), produced by catecholamines, such as adrenaline and noradrenaline, which is due mainly to the increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in cardiomyocytes. This effect of catecholamines provided by stimulation of β adrenoreceptors, which activates adenylate cyclase and production of cAMP, which in turn promotes the mobilization of Ca^{2+} , resulted in enhancement of cardiac muscle contraction (Bers, 2000). These data suggested that a similar mechanism may underlie the PIA of alkaloid 15-AAA. However, it has been found that this effect of 15-AAA was maintained in the presence of propranolol, a specific blocker of β -adrenoreceptors, that indicate that the PIA produced by this alkaloid is not associated with the activation of β -adrenoreceptors and adenylate cyclase system. In addition, this effect of 15-AAA was also observed in the presence of nifedipine, indicating that activation of Ca^{2+} influx through potential dependent Ca^{2+} -channels not involved in their PIE.

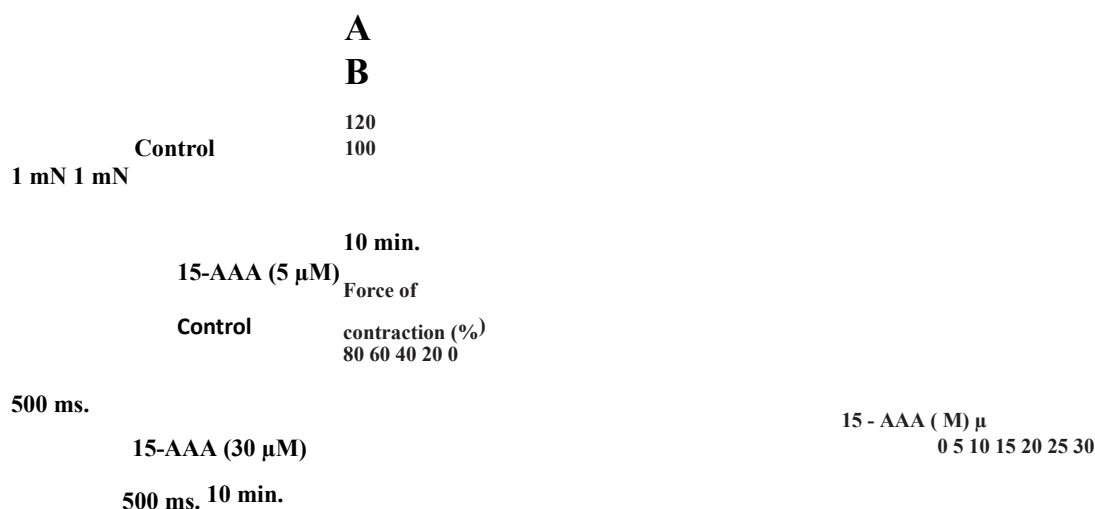


Fig. 7. The dependence of the mode of inotropic action of the alkaloid 15-AAA on concentration. *A. Original tracing, representing the effect of 15-AAA on the papillary muscle contraction. B. Concentration-dependent effect of 15-AAA on the papillary muscle contraction. Results are plotted as mean (SEM) percentage of control, taken as 100%. $P < 0,05$, ($n=6$).*

Moreover, because this effect of 15-AAA was observed only at low stimulation frequencies (0.1 - 1 Hz), in the conditions in which the cardiac muscle contraction is provided mainly by Ca^{2+} released from the SR (Maier et al, 1997) it is suggested that it is provided by modification of SR function. Therefore, to examine the effect

69

of 15-AAA on storage and release functions of SR their effects on post-rest potentiation (PRP) of contraction in rat papillary muscle were studied. As it is illustrated in Fig.8, A the amplitude of the first contraction B1 after rest was 189.7 ± 6.2 % in comparison with the amplitude of B0 before rest (taken as 100%), providing a ratio B1/B0 1.89 ± 0.10 . After application of 15-AAA (5 μM) the

A B		
	B0	Relative potentiation, (B1/B0)
Control		2,0
B1	1 mN	1,5
Control 3,0	30 s	15-AAA (5 Mμ)
	2 5,	
	1 mN	1,0 0,5 0
	B1	
15-AAA (5 μM)		
B0		
	30 s	

Fig.8. Effect of alkaloids 15-AAA on post-rest potentiation in rat papillary muscle. A. Original tracings representing the effect of 15-AAA (5 μM) on post-rest potentiation. B. The effect of 15-AAA (5 μM) on relative potentiation of contraction (the ratio B1/B0). Results are reported as mean $\pm$ SEM ($n=5$). * $P<0.05$, compared to control.

amplitude of B1 increased by $76,6 \pm 8.1\%$, of control obtained in absence of 15-AAA (Fig.8, A). At the same time, in these conditions the amplitude of B0 also simultaneously increased, however, this increase of B0 was less pronounced in comparison with the B1, as evidenced by a substantial increase in the relative potentiation (B1/B0) from $1,89 \pm 0,10$ to 2.20 ± 0.18 (Fig.8, B). Considering, that the increase in the relative potentiation, reflects the loading of Ca^{2+} into SR (Mill, 1992), it could be assumed that the potentiating effect of 15-AAA, possibly is due to the increased loading and subsequent additional accumulation of Ca^{2+} in SR. Above it was noted that an important role in the regulation of Ca^{2+} content in the SR plays a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger, which by transferring Ca^{2+} in cardiomyocytes, contributes to their load into SR (Bers and Christensen, 1990; Shattock et al., 2015). Although it is widely accepted that $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger is the dominant Ca^{2+} efflux mechanism, there is data regarding the possible contribution of reverse mode of exchanger to Ca^{2+} influx in cardiomyocytes. Conditions that favour reverse $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger include a positive membrane potential and increased

intracellular Na^+ , the conditions that may exist during the early phases of the cardiac action potential (Bers, 2002). Moreover, the positive inotropic effect induced by cardiac glycosides, also is provided by Ca^{2+} entering through the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger, as a result of reversing the direction of its work (Nishio et al., 2002). Therefore, to further elucidate the possible role of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger in the potentiating effect of 15-AAA its effect have been studied in the presence of KB-R7943 a specific blocker of exchanger. In these experiments it was found that

70

in the presence of a maximally effective concentration of KB-R7943 (30 μM), when the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger was completely blocked, application of 5 μM 15-AAA is not accompanied by development of potentiating effect of 15-AAA (Fig. 9, A).

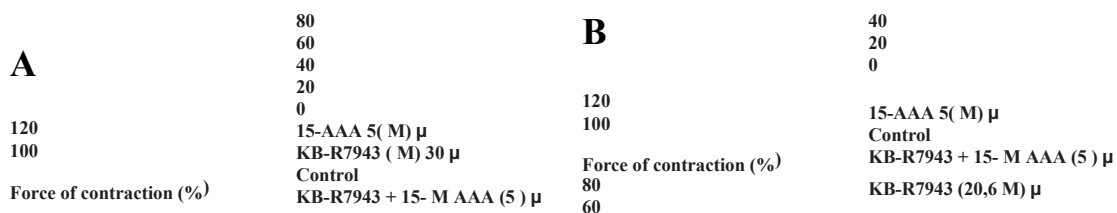


Fig.9. Effect of KB-R7943, a specific blocker of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger, on potentiating action of alkaloid 15-AAA. Effects of 15-AAA (5 μM) on papillary muscle contraction in the presence of 30 μM (A) and 20,6 μM (B) KB-R7943. Results are plotted as mean (SEM) percentage of control, taken as 100%. $P<0,05$, ($n=6$).

At the same time, in the experiments with low concentrations of KB-R7943, when the function $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger is partially preserved, 15-AAA was able to induce the potentiating effect which, however, was less pronounced as compared to its effect in the absence of KB-R7943 (Fig.9, B). These results suggest that the potentiating effect of 15-AAA, might be due to Ca^{2+} influx through $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger, which further promote its entering into SR resulted in enhancing the contraction of the papillary muscle. To confirm this suggestion, the potentiating effect of 15-AAA have been studied in the presence of caffeine, which is widely used in assessing loading and release function of SR. Caffeine is a powerful stimulant of the release of Ca^{2+} from the SR which seriously disrupted the process of their return into SR and its capacity in terms of rest (Stephenson, 2008). Indeed, as shown in Fig.10, A in the presence of 8 μM caffeine the relative potentiation significantly decreases from 1.89 to 1, indicating that the mechanism providing post-rest potentiation completely damaged due to lack of Ca^{2+} influx into the SR.

It was found that the application of 15-AAA (5 μM) in these conditions is not accompanied by restoration of normal reactions of papillary muscle to rest test.

These results indicate that the potentiating effect of the 15-AAA possibly is associated with the modification of process providing the accumulation of Ca^{2+} in the SR. This is confirmed in the experiments with low concentrations of caffeine (20,6 μM), when the function $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger is partially preserved, in which application of 15-AAA (5 μM) accompanied by increase of the relative potentiation from 1.4 to 1,74 (Fig.10, B).

71

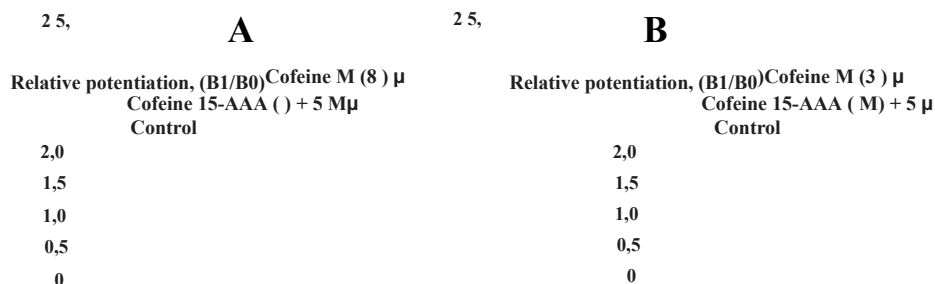


Fig.10. Effect of alkaloid 15-AAA on relative potentiation in rat papillary muscle in the presence of caffeine. *Effects of 15-AAA (5 μM) on relative potentiation in the presence of 8 μM (A) and 3 μM (B) caffeine. Relative potentiation (B1/B0) are reported as mean (SEM) . $P < 0,05$, (n=5).*

These results indicate that when post-rest potentiation is partially preserved the 15-AAA can cause potentiating effect, although to a lesser extent than in the absence of caffeine. These results together with the results obtained in the experiments with KB-R7943 indicate that potentiating effect of 15-AAA is associated with modification of loading Ca^{2+} into SR. To obtain a better insight into the mechanisms by which 15-AAA enhanced post-rest potentiation we further investigated its effects in the presence of cyclopiazonic acid (CPA), a selective inhibitor of SR Ca^{2+} -ATPase (SERCA2). In these experiments application of 30 μM CPA significantly decreased both B0 and B1, as well as, the ratio B1/B0, indicating that post-rest potentiation was complete abolished due to inhibition of Ca^{2+} -ATPase and suppression Ca^{2+} load into SR (Fig.11, A). Application of 15- AAA (5 μM) on top of 30 μM CPA, when post-rest potentiation completely

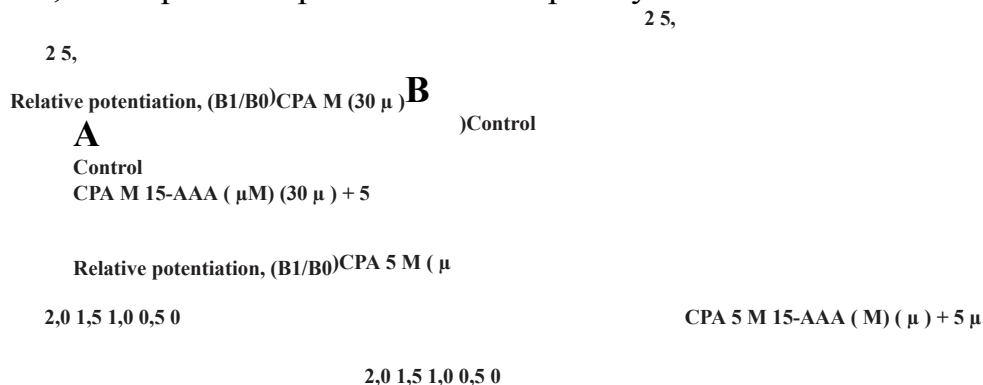


Fig.11. Effect of alkaloid 15-AAA on relative potentiation in rat papillary muscle in the presence of cyclopiazonic acid. *Effects of 15-AAA (5 μ M) on relative potentiation in the presence of 8 μ M (A) and 3 μ M (B) caffeine. Relative potentiation (B1/BO) are reported as mean (SEM). $P<0,05$, (n=5).*

abolished, did not provide it recovery, indicating that potentiating effect of the 15-AAA associated with loading of Ca^{2+} into SR. However, in the presence of low

72

concentrations of CPA (5 μ M), at which post-rest potentiation partially preserved, application of 5 μ M 15-AAA accompanied by increase of the relative potentiation from 1.5 to 1,72 (Fig.11, B). Based on these data we conclude that the potentiating effect of 15-AAA could be explained either by increase in Ca^{2+} accumulation in SR during the rest period or by increase in Ca^{2+} available for release from SR. Similar potentiation of cardiac muscle contraction caused by aconitine, alkaloid isolated from plants of the genus *Aconitum*, which is associated with modification of the voltage-dependent Na^+ channels (Wright, 2002; Zhou et al, 2013.). The aconitine by prolonging the open state of Na^+ -channels may induce intracellular Na^+ accumulation and intracellular Ca^{2+} overload which eventually result in increased contractions of the cardiac muscle (Wright, 2002). Taking into account the similarities in the structural organization of the 15-AAA and aconitine, we can assume that the potentiating effect of 15-AAA may be provide a mechanism similar to the mechanism of action of aconitine. In this regard, to test this we studied effects 15-AAA (5 μ M) in the presence of lidocaine, which prevents the effect of aconitine on the contractile activity of the heart muscle and arrhythmia caused by them (Antzelevitch, 2014).

In these experiments, application of 15-AAA (5 μ M) in the presence of maximally effective concentration of lidocaine (30 μ M), did not produced potentiating effect (Fig. 12, A). Lack potentiating effect of 15-AAA in these conditions, apparently due to the presence of a maximally effective concentration of lidocaine, when nearly all Na^+ channels are blocked and was unavailable for alkaloid. However, in the presence of 15 μ M lidocaine, when the force of contraction of papillary muscle was reduced by half, 15-AAA (5 μ M) increases it, but not to the same extent as in the absence of lidocaine (Fig. 12, B).

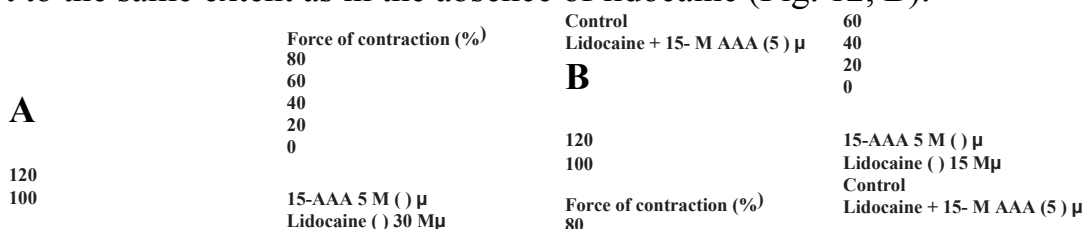


Fig.12. Effect of lidocaine on potentiating action of alkaloid 15-AAA in rat papillary muscle. *Effect of 15-AAA (5 μ M) on papillary muscle contraction in the presence of 30 μ M (A) and 15 μ M (B) lidocaine. Results are plotted as mean (SEM) percentage of control, taken as 100%. $P < 0,05$, ($n=6$).*

Thus, data obtained in these studies indicate that the potentiating effect of 15-AAA, mainly is related to modification of Na^+ channel function which followed by depolarization of the cardiomyocyte membranes allowing mobilization of Ca^{2+} , resulting in an increase in contractile activity of cardiac muscle.

Characteristics of the negative inotropic effect of the alkaloid 15-AAA. At high concentrations ($\geq 8 \mu\text{M}$) and stimulation frequencies ($\geq 1 \text{ Hz}$), the alkaloid 15-AAA significantly suppressed the contractile activity of the papillary muscles. This effect of the 15-AAA had a dose-dependent manner and at a concentration of 30 μM the force of contraction decreased to $13,9 \pm 4,9\%$, from the control. The concentration of 15-AAA, which caused half of its maximal effect (ED_{50}) was 16.7 μM , and this effect was more pronounced at high frequencies of stimulation. These results indicate that at high concentration the 15-AAA also produced negative inotropic effect (NIE), which, however, is less pronounced than that of 15-HAA.

During further study of this effect of 15-AAA it was found that it depends on extracellular concentration of Ca^{2+} suggesting that it may be provided by blockage of potential-dependent Ca^{2+} -channels. However, it was found that nifedipine to a lesser extent affected the effect of 15-AAA on papillary muscle contractile activity than the effect of 15-HAA. These results may indicate that, unlike the NIE of 15-HAA which is substantially decreased in the presence of nifedipine, the NIE of 15-AAA to a lesser extent related to the blockade of voltage-dependent Ca^{2+} channels. Therefore, to further characterize the NIE of 15-AAA its effect on post-rest potentiation of papillary muscle was investigated. In these experiments it was found that in the presence of 30 μM 15-AAA the relative potentiation still well preserved, as evidenced by the some decrease in B1/B0 from 1.89 to 1.47. These results may indicate that the NIE of 15-AAA at least in part, can be explained by its simultaneous inhibition of Ca^{2+} influx and impairment of Ca^{2+} loading in the SR. Such action on the Ca^{2+} content in the SR is typical for 1 class antiarrhythmics, which is provided by the blockade of voltage-dependent Na^+ -channels (Heubach and Schule, 1998). Therefore, to further clarify the role of Na^+ -channels in the NIE of 15-AAA, its effects have been studied in the presence of lidocaine. In these

experiments it was found that in the presence of 15 μM lidocaine, concentration corresponding to its ED_{50} value, the NIE of 15-AAA decreased by $17,3 \pm 4,1\%$. Moreover, the inactivation of Na^+ -channels by depolarization, also accompanied by decrease NIE of 15-AAA by $54,3 \pm 4,7\%$. These results together with the results obtained in experiments with lidocaine indicate that Na^+ -channels plays important role in providing NIE of 15-AAA. Thus, by blocking of Na^+ -channels and reducing the intracellular concentration of Na^+ in cardiomyocytes 15-AAA apparently could alter Ca^{2+} transport through the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, that reduces their content in the SR, resulting in the depression of contractile force of papillary muscle. To test this, we examined the effects of 15-AAA on the contractions of rat papillary muscle induced by low Na^+ solution and ouabaine. In these experiments was observed that 15-AAA (30 μM) dose-dependently inhibited the force of contraction, induced by low Na^+ solution and ouabaine, to $16,1 \pm 3,7\%$, and $15,4 \pm 3,8\%$ with ED_{50} values 18,1 and 17,4 μM , respectively. Considering, that the contraction of the papillary muscle, induced by a modified Krebs solution and

74

ouabain, provided mainly by Ca^{2+} entering via $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, these results may indicate that the effect of 15-AAA is caused by the suppression of this pathway of Ca^{2+} influx in cardiomyocytes.

Further confirmation the blockage by 15-AAA of Ca^{2+} influx via $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger has been obtained in experiments with KB-R7943, in the presence of which the effects of alkaloid on low Na^+ solution and ouabaine induced contraction are decreased by $11,5 \pm 2,1\%$ and $10,7 \pm 2,6\%$, respectively. These results provide additional evidence that the suppression by 15-AAA the contractions induced by a modified Krebs solution and ouabain, is mainly due to the blockage of Ca^{2+} via $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger.

Thus, the analysis of the data showed that the alkaloids 15-HAA and 15-AAA have inotropic activity, which is due mainly to a modification of the Ca^{2+} transport in cardiomyocytes. It was found that the negative inotropic effect of 15-HAA and 15-AAA is mainly due to the blockade of Na^+ -channels, which accompanied by inhibition of Ca^{2+} influx and subsequent decreases in the amount of Ca^{2+} being taken up and released by SR, resulting in depression of contractile activity of cardiac muscle. One possible explanation for the biphasic effect of 15-AAA is as follows: at low concentration it by activation of SR Ca^{2+} load, may result in an increase amount of Ca^{2+} available for release, resulting in enhancement of cardiac muscle contraction; at higher concentration, it by inhibition of Ca^{2+} influx and impairment of SR function may result in a decrease amount of Ca^{2+} released by SR, resulting in depression of contractile activity of cardiac muscle. It is assumed that the observed differences in the inotropic activity of alkaloids 15-HAA and 15-AAA are due to the peculiarities of their structural organization, which determines the nature and rates of the modification of Na^+ -channel function and subsequent modulation of Ca^{2+} transport systems in cardiomyocytes.

CONCLUSIONS

1. The peculiarities of inotropic effects of diterpenoid alkaloids 15-HAA and 15-AAA, as well as, underlying mechanisms of their negative and positive inotropic activity are characterized for the first time;
2. For the first time it was found that the modification of the structure of 15- HAA, by replacing the OH group at carbon atom C-15 on CH₃O-group, which increase antiarrhythmic activity of 15-AAA, is not accompanied by increasing its negative inotropic activity, but on the contrary, leads to its reduction;
3. It was established that the negative inotropic effect of 15-HAA and 15-AAA is mainly due to the blockade of Na⁺-channels, which is accompanied by inhibition of Ca²⁺ influx and subsequent decreases in the amount of Ca²⁺ released by SR, resulting in depression of contractile activity of cardiac muscle;
4. It was shown that an important role in providing negative inotropic effect of 15-HAA and 15-AAA plays a Na⁺/Ca²⁺ exchanger, activation of which by blockade of Na⁺-channels and reduction Na⁺ content, promotes Ca²⁺ extrusion from the cardiomyocytes;

75

5. For the first time found that the 15-HAA and 15-AAA significantly suppress the post-rest potentiation, suggesting that the reduction of Ca²⁺ loading in the SR would contribute to their negative inotropic effect;
6. For the first time it was found that 15-AAA at low concentrations (3-8 μM) and low stimulation frequencies (0.1-1 Hz) produced the positive inotropic effect which is due to increased content of Ca²⁺ in the cardiomyocytes and in SR.
7. It is established that the positive inotropic effect of 15-AAA is due to the activation of Na⁺-channels and subsequent mobilization of Ca²⁺ may resulted in enhancement of cardiac muscle contraction;
8. It was found that in the providing the positive inotropic effect of 15-AAA, an important role is played by Na⁺/Ca²⁺ exchanger, activation of which by increased level of Na⁺ in cardiomyocytes, enhances loading of Ca²⁺ in the SR.
9. It was shown that the differences in the negative inotropic activity of the 15- HAA and 15-AAA are due to the peculiarities of their structural organization, which determines the nature and rates of the modification of Na⁺-channel function and subsequent modulation of Ca²⁺ transport systems in cardiomyocytes.
10. It was shown that the absence of a direct correlation between the inotropic and antiarrhythmic action of 15-AAA may be due to the reduced Na⁺ channel blocking efficacy, as well as, a superimposed positive inotropic activity which may be operative in its antiarrhythmic effect.

ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ
LIST OF PUBLISHED WORKS
I бўлим (I часть, I part)

1. Зайнабиддинов А.Э., Хушматов Ш.С., Усманов П.Б., Салимов Б.Т. Характеристика инотропной активности производных дитерпенового алкалоида атизина, 15-гидроксиазометин атизина и 15-ацетоксиазометин атизина // Узбекский биологический журнал – Ташкент, 2011г. - №6. – С.13-16. (03.00.00, №5)
2. Зайнабиддинов А.Э., Хушматов Ш.С., Салимов Б.Т., Усманов П.Б. Антиаритмическая и инотропная активность дитерпеноидных алкалоидов 15-ацетоксиазометин атизина и 15-гидроксиазометин атизина // Доклады Академии наук Республики Узбекистан – Ташкент, 2012 г. - №3. – С.57-60. (03.00.00, №6)
3. Зайнабиддинов А.Э., Жумаев И.З., Салимов Б.Т., Усманов П.Б. Действие дитерпеноидных алкалоидов 15-ацетоксиазометин атизина и 15-гидроксиазометин атизина на Ca^{2+} -транспортирующие системы папиллярной мышцы сердца крысы // Узбекский биологический журнал – Ташкент, 2013 г. - №4. – С.10-13. (03.00.00, №5)
4. Зайнабиддинов А.Э., Усманов П.Б., Салимов Б.Т. 15-ацетоксиазометин атизин ва 15-гидроксиазометин атизин дитерпеноид алкалоидларининг юрак

мускули қисқариш параметрларига таъсир механизмини ўрганиш // Ўзбекистон Миллий университети хабарлари – Тошкент, 2013 й. - №4/2. – 15-17 б. (03.00.00, №9)

5. Зайнабиддинов А.Э., Рустамов Ш.Ю., Салимов Б.Т., Усманов П.Б. Ўсимлик алкалоидлари–15-ацетоксиазометин атизин ва 15-гидроксиазометин атизиннинг каламуш юраги папилляр мускули $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -алмашинувчи тизимига таъсири // Инфекция, иммунитет ва фармакология журналы – Тошкент, 2014 й. - №6. – 72-75 б. (03.00.00, №7)

6. Зайнабиддинов А.Э., Салимов Б.Т., Усманов П.Б. Дитерпен қатори алкалоидлари - 15-ацетоксиазометин атизин ва 15-гидроксиазометин атизин алкалоидларининг папилляр мускул қисқариш фаоллигида антиаритмик таъсирини ўрганиш // Фармацевтика журналы – Тошкент, 2014 й. - №4. – 102-106 б. (03.00.00, №2)

7. Zaynabiddinov A.E., Salimov B.T., Usmanov P.B. 15-atsetoksiazometin atizin o'simlik alkaloidining kalamush yuragi papillary muskuli qisqarish faolligiga musbat inotrop ta'siri // O'zbekiston biologiya jurnali – Toshkent, 2015 y. - №2. – 10-13 б. (03.00.00, №5)

8. Зайнабиддинов А.Э., Рустамов Ш.Ю., Салимов Б.Т., Усманов П.Б. 15-ацетоксиазометин атизин ва 15-гидроксиазометин атизин дитерпеноид алкалоидларининг папилляр мускул қисқариш фаоллигига таъсирида $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -алмашинувчи тизимнинг роли // Назарий ва клиник тиббиёт журналы – Тошкент, 2015 й. - №1. – 26-29 б. (03.00.00, №4)

77

9. Zaynabiddinov A.E., Usmanov P.B., Salimov B.T. Effect of 15-hydroxyazomethine atisine, a diterpenoid alkaloid atisine derivative, on $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger mediated contraction of rat papillary muscle // European science review – Austria, Vienna 2015. – №5-6. – P.7-11. Европа мамлакатлари нашрлари (03.00.00, №6)

10. Зайнабиддинов А.Э., Рустамов Ш.Ю., Салимов Б.Т., Усманов П.Б. Атизин дитерпен алкалоид ҳосилалари – 15-цетоксиазометин атизин ва 15-гидроксиазометин атизиннинг инотроп ва антиаритмик таъсирини қиёсий тавсифлаш // Инфекция, иммунитет ва фармакология журналы – Тошкент, 2016 й. - №2. – 390-395 б. (03.00.00, №7)

11. Zaynabiddinov A.E., Usmanov P.B. Effect of 15-hydroxyazomethine and 15-acetoxiazomethine, diterpenoid alkaloid atisine derivatives, on post-rest potentiation in rat papillary muscle // European science review – Austria, Vienna 2016. – №5-6. – P.9-13. Европа мамлакатлари нашрлари (03.00.00, №6)

II бўлим (II часть, II part)

12. Зайнабиддинов А.Э., Хушматов Ш.С., Усманов П.Б., Салимов Б.Т. Зависимость антиаритмической активности производных дитерпенового алкалоида атизина - 15-гидроксиазометин атизина и 15-ацетоксиазометин атизина от их структуры // Научная конференция по биоорганической химии и

биотехнологии «X чтения памяти академика Юрия Анатольевич Овчинникова» Сборник тезисов. Москва – Пушкино, 2011 г. - С. 25.

13. Зайнабиддинов А.Э., Хушматов Ш.С., Усманов П.Б., Салимов Б.Т. Изучение механизма действия алкалоида 15-гидроксиязометин атизина на сократительную активность миокарда крысы // Актуальные проблемы патофизиологии. Материалы XVII межгородской конференции молодых ученых. Санкт-Петербург, 2011 г. - С.59-60.

14. Зайнабиддинов А.Э., Хушматов Ш.С., Усманов П.Б., Салимов Б.Т. Изучение механизма действия алкалоида 15-ацетоксиязометин атизина на сократительную активность папиллярной мышцы крысы // Докладов конференции молодых ученых, посвященной памяти акад. С.Ю.Юнусова. программа и тезисы - Ташкент, 2011 г. - С. 36.

15. Зайнабиддинов А.Э., Хушматов Ш.С., Усманов П.Б., Салимов Б.Т. Действие растительного алкалоида 15-ацетоксиязометин атизина на транспорт Ca^{2+} в саркоплазматическом ретикулуме кардиомиоцитов крысы // Научная конференция по биоорганической химии и биотехнологии «X чтения памяти академика Юрия Анатольевич Овчинникова» Сборник тезисов. Москва – Пушкино, 2011 г. - С. 26.

16. Зайнабиддинов А.Э., Хушматов Ш.С., Усманов П.Б., Салимов Б.Т. Влияние 15-ацетоксиязометин атизина на сократительную активность папиллярной мышцы крысы // Республиканская научно – практическая конференция «Проблемы ботаники, биоэкологии, физиологии и биохимии растений» сборник тезисов докладов - Ташкент, 2011 г. - С. 49.

78

17. Зайнабиддинов А.Э., Хушматов Ш.С., Усманов П.Б., Салимов Б.Т. Изучение механизма инотропного действия алкалоида 15-ацетоксиязометин атизина // Материалы конференции молодых ученых «Актуальные проблемы химии природных соединений», посвященной памяти акад. С.Ю.Юнусова. Ташкент, 2012 г. - С.70.

18. Зайнабиддинов А.Э., Хушматов Ш.С., Усманов П.Б., Салимов Б.Т. 15-ацетоксиязометин атизин ва 15-гидроксиязометин атизин дитерпеноид алкалоидларининг миокард ион каналларига таъсир механизмини ўрганиш // Академик А. Қосимов таваллудининг 75 йиллигига бағишланган “Ўзбекистонда биотехнологиянинг ривожланиши ва истиқболлари” мавзусидаги илмий-амалий анжуман. Андижон, 2012 й. - С. 141-142.

19. Зайнабиддинов А.Э., Усманов П.Б., Салимов Б.Т. Инотропные эффект алкалоидов 15-гидроксиязометин атизина и 15-ацетоксиязометин атизина // Международная конференция молодых ученых. Экспериментальная и теоретическая биофизика. Сборник тезисов - Пушкино, 2012 г. - С.176.

20. Зайнабиддинов А.Э., Салимов Б.Т., Усманов П.Б. Изучение механизма влияния дитерпеноидных алкалоидов 15-ацетоксиязометин атизина и 15-гидроксиязометин атизина на сократительную активность сердечной мышцы // Международной научной конференции Актуальные проблемы развития Биоорганической химии. Сборник тезисов - Ташкент, 2013 г. - С.51-52. 21.

- Зайнабиддинов А.Э., Салимов Б.Т., Усманов П.Б. Действие растительных алкалоидов 15-ацетоксиазометин атизина и 15- гидроксиазометин атизина на сократительную активность папиллярной мышцы сердца крысы // Международная конференция молодых ученых. Экспериментальная и теоретическая биофизика. Сборник тезисов - Пущино, 2014 г. - С.105-107.
22. Зайнабиддинов А.Э., Антиаритмическая активность 15- ацетоксиазометин атизина и 15-гидроксиазометин атизина // XVIII международная медико-биологическая конференция молодых исследователей. «Фундаментальная наука и клиническая медицина - человек и его здоровье» Санкт-Петербург, 2015 г. - С.199-200.
23. Зайнабиддинов А.Э., Салимов Б.Т., Усманов П.Б. Механизм отрицательного инотропного эффекта дитерпеноидного алкалоида 15-гидроксиазометин атизина и 15-ацетоксиазометин атизина // Международная конференция молодых ученых. Экспериментальная и теоретическая биофизика. Сборник тезисов - Пущино, 2015 г. - С.21-22.
24. Зайнабиддинов А.Э., Влияние дитерпеноидных алкалоидов-15-ацетоксиазометин атизина и 15-гидроксиазометин атизина на сократительную активность папиллярной мышцы сердца крыс // XVIII международная медико-биологическая конференция молодых исследователей. «Фундаментальная наука и клиническая медицина - человек и его здоровье» Санкт-Петербург, 2015 г. - С.200-201.
25. Зайнабиддинов А.Э., Рустамов Ш.Ю., Салимов Б.Т., Усманов П.Б. Ўсимлик алкалоидлари–15-ацетоксиазометин атизин ва 15-гидроксиазометин атизиннинг папилляр мускул қисқариш фаоллигида антиаритмик таъсири

79

- ўрганиш // Тошмухамедов Бекжон Ойбекович 80-йиллик таваллудига бағишланган “Физик кимёвий биологиянинг долзарб муаммолари” мавзусидаги илмий-амалий анжуман – Тошкент, 2015 й. - 111-112 бет. 26.
- Zaynabiddinov A.E., Usmanov P.B. Comparison of the inotropic effects of 15–hydroxyazomethine atisine and 15-acetoxyazomethine atisine-derivatives of the diterpenoid alkaloid atisine // Internationaler medizinischer kongress. EuroMedica - Hannover, 2015. – P.95.
27. Zaynabiddinov A.E., Usmanov P.B. Antiarrhythmic and inotropic effects of the 15-acetoxyazomethine atisine and 15-hydroxyazomethine atisine, some derivatives of diterpenoid alkaloid atisine // LXX Международная научно практическая конференция студентов и молодых ученых. Актуальные проблемы современной медицины и фармации - Минск, 2016 г. - С.1255.
28. Зайнабиддинов А.Э., Усманов П.Б., Рустамов Ш.Ю. 15- гидроксиазометин атизин дитерпеноид алкалоидининг папилляр мускул қисқариш фаоллигига таъсирида $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -алмашинувчи тизимнинг роли // Соғлиқни сақлаш ва қишлоқ хўжалигининг долзарб муаммоларини ечишда биоорганик кимёнинг роли. Ёш олимлар республика конференцияси. Тошкент 2016 й. – 78Б.

