

Гіпотензивна дія фракцій екстрактів біомаси культури тканин раувольфії зміїної

О.С. Хромов¹, Н.В. Добреля¹, О.В. Паршиков¹, І.І. Конвалюк², О.А. Бєда^{3,2},
Л.П. Можилевська², С.М. Ярмолюк², А.І. Соловійов¹, В.А. Кунах²

¹ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України»;

²Інститут молекулярної біології і генетики НАН України;

³Наукова установа ТОВ «Науково-сервісна фірма «ОТАВА», Київ; e-mail: konvalyuk.i.i@gmail.com

Культура тканин раувольфії зміїної (Rauwolfia serpentina Benth. - R. serpentina) є альтернативним джерелом отримання понад 20 індольних алкалоїдів, що мають антиаритмічну, гіпотензивну, психотропну, протизапальну дію. Метою роботи було виявити гіпотензивну активність 5 фракцій екстрактів біомаси культури тканин R. serpentina (штам К-27М) з різними комбінаціями алкалоїдів. Для реалізації цієї задачі використовували метод культури тканин рослин in vitro, аналіз індольних алкалоїдів із застосуванням вискоєфективної рідинної хроматографії, визначення дії фракцій на гладенькі м'язи грудного відділу аорти щурів in vitro та їх впливу на артеріальний тиск при внутрішньовенному введенні in vivo. Фракції екстрактів штаму К-27М R. serpentina, виділяли з сухої або із живої біомаси. Виявлено, що ефект та направленість дії фракцій залежали від відсоткового вмісту та складу алкалоїдів. Встановлено, що фракція 1, яка містила аймалін та ацетилаймалін (масовий відсоток суми алкалоїдів – 2,2%) та фракція 2, у якій були аймалін, раукафріцин та ацетилаймалін (масовий відсоток суми алкалоїдів – 6,4%) проявляли констрикторну (судинозвужувальну) дію на кільця грудної аорти щурів. В умовах in vitro виявлено релаксуючу дію фракції 4, яка містила воміленін, ацетилаймалін, метилаймаліцин, аймаліцин та рауфлоридин (масовий відсоток суми алкалоїдів – 65,0%) та фракції 5, в якій переважав ацетилаймалін, з додатковим вмістом воміленіну, метилаймаліцину та аймаліцину (47,4%). Показано короткочасну гіпотензію тривалістю 15–30 с після одноразового введення щуром фракцій 4 та 5. Середній тиск крові при цьому знижувався на 25–30% від початкового значення. Встановлено, що п'ять фракцій екстрактів штаму К-27М R. serpentina проявляли констрикторну або релаксуючу дію на судини залежно від кількісного та якісного складу індольних алкалоїдів.

Ключові слова: культура тканин Rauwolfia serpentina; індольні алкалоїди тонус судин; середній артеріальний тиск крові.

ВСТУП

У ХХІ ст. артеріальна гіпертензія залишається провідною медико-соціальною проблемою внаслідок значної розповсюженості. Сучасний арсенал лікарських засобів для лікування серцево-судинних захворювань надзвичайно великий, однак важливим завданням є пошук перспективних біологічно активних сполук рослинного походження, які б мали гіпотензивну дію та мінімальні побічні ефекти [1, 2].

Особливий інтерес викликає тропічна рослина раувольфія зміїна (*Rauwolfia serpentina*

Benth. – *R. serpentina*), у коренях якої накопичується понад 50 індольних алкалоїдів, (аймалін та його похідні, резерпін, йохимбін, серпентин, раухімбін тощо), що мають антиаритмічну, гіпотензивну, психотропну, протизапальну дію [1, 3]. Зокрема, аймалін проявляє нейролептичну активність, помірно знижує артеріальний тиск, посилює коронарний кровообіг, має негативний іонотропний ефект і помірну адренолітичну дію. Його застосовують і при лікуванні периферичних і церебральних судинних захворювань [3].

© Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, 2023

© Видавець ВД “Академперіодика” НАН України, 2023

ISSN 2522-9028 *Фізіол. журн.*, 2023, Т. 69, № 4

Зважаючи на те, що *R. serpentina* є рідкісною лікарською рослиною, перспективним способом одержання рослинної сировини є культура тканин *in vitro*, яка дає змогу цілий рік отримувати асептичну, екологічно чисту біомасу з цільовими біологічно активними сполуками, за якістю навіть кращу за сировину [4, 5].

В Інституті молекулярної біології і генетики НАН України створено високопродуктивний штам К-27 культури тканин *R. serpentina*. У результаті комплексних досліджень виявили, що клітинна біомаса штаму накопичує понад 20 індольних алкалоїдів [4, 6]. Встановлено судинорозширювальну, α -адреноблокувальну [7] та заспокійливу дію [8] екстракту клітинної біомаси штаму К-27. Водночас методами клітинної селекції отримано більш продуктивний штам культури тканин *R. serpentina* – К-27М, який накопичує понад 2% індольних алкалоїдів та понад 3% суми алкалоїдів у перерахунку на суху біомасу. Наступним етапом було вивчення фізіологічної активності фракцій, виділених із біомаси цього штаму, які відрізняються за кількісним та якісним складом індольних алкалоїдів.

Метою нашої роботи було дослідити дію на тонус судин п'яти фракцій біомаси культури тканин *R. serpentina* з різними комбінаціями алкалоїдів.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на 66 дорослих самцях білих лабораторних щурів масою 190 ± 15 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію ДУ «Інститут фармакології та токсикології АМН України». Всі маніпуляції з тваринами проводили відповідно до Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006) та Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (1986). Тварин виводили з експерименту введенням

летальної дози уретану (800 мг на 100 г маси тіла; внутрішньовенно). Усі тварини методом випадкової вибірки були розділені на групи по 6 особин у кожній.

Матеріалом для дослідження була біомаса отриманого у відділі генетики клітинних популяцій Інституту молекулярної біології і генетики НАН України та культивованого в умовах *in vitro* високопродуктивного штаму К-27М культури тканин *R. serpentina*. Умови його вирощування та висушування клітинної біомаси описано в літературі [9].

Приготування фракцій алкалоїдів. Для проведення скринінгових досліджень гіпотензивної активності було отримано 5 фракцій екстрактів клітинної біомаси штаму К-27М *R. serpentina* з різним якісним та кількісним вмістом індольних алкалоїдів.

Фракції 1, 2 та 3 виготовляли з сухої біомаси: наважку 50 г біомаси подрібнювали до консистенції борошна, доливали 5 мл водного аміаку та 10-кратною за масою кількістю таких екстрагентів відповідно: 25%-го етанолу для фракції 1, 70%-го етанолу для фракції 2 та етилацетату для фракції 3. Суспензію перемішували за кімнатної температури протягом 24 год. Нерозчинний осад відфільтровували і промивали залишок на фільтрі відповідним розчинником. Маточний розчин випаровували на роторному випаровувачі у вакуумі водоструменевого насоса. Залишок після випаровування зважували і передавали на аналіз біологічної активності.

Фракції 4 та 5 виділяли хроматографічною очисткою екстракту, отриманого з живої біомаси штаму К-27М *R. serpentina* на 65–75-й день росту. Частину (2 кг) біомаси відділяли від залишків живильного середовища і подрібнювали до стану рідкої суспензії. Підкислювали її 5%-м розчином хлористоводневої кислоти, слідкуючи за тим, щоб значення рН наблизилося до 1. Нерозчинний матеріал відділяли фільтрацією. До отриманого маточного розчину додавали гідроксид натрію у кількості еквівалентній доданій раніше хлористоводневій кислоті та

додатково 50 г карбонату натрію. Потім додавали 250 мл етилацетату, 50 мл ізопропанолу та струшували ємність. Екстракцію повторювали двічі. Після видалення розчинника випаровуванням у вакуумі отримали близько 30 г вихідного екстракту. Первинний екстракт фракціонували за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі, елюент – хлористий метилен:метанол 95:5. Таким чином первинний екстракт вдалося розділити на дві фракції: фракція 4 виходила з колонки першою, фракція 5 – одразу за фракцією 4. Залишки після випарювання елюенту з фракцій мали вигляд жовтуватого скла.

Якісний та кількісний склад фракцій досліджували з використанням вискоефективного рідинного хроматографа з мас-спектрометричною детекцією Agilent 1260 Infinity II. Хроматографування проводили на колонці із фазою C18 та градієнтним елююванням (вода:ацетонітрил, сенсibilізатор – 0,1%-ва мурашина кислота).

Для калібрування було використано розчини (по 70 мг/л) як основу аймаліну та воміленіну. Хроматограми будували за струмом іонів $[M+H]^+$ для кожного алкалоїда та

порівнювали площі хроматографічних піків із площами піків стандартів. Для алкалоїдів, відмінних від аймаліну чи воміленіну, вміст розраховували за співвідношенням площ хроматографічних піків цих алкалоїдів до піків стандартів, в припущенні однакової іонізації для структурно подібних алкалоїдів. Кількісний вміст індольних алкалоїдів у фракціях екстрактів наведено в табл. 1. За загальною сумою алкалоїдів фракції можна розподілити таким чином: $4 > 5 > 3 > 2 > 1$.

Знеболювання щурам проводили за допомогою внутрішньоочеревинного введення суміші хлоралози і уретану (1:10 за масою; 30 мг/кг за хлоралозою). Тварин у хірургічній стадії наркозу розташовували на термостабілізованому операційному столі, в дистальній відділі кінцівок підшкірно вводили електроди для реєстрації електрокардіограми (ЕКГ) у другому стандартному відведенні.

Залежно від завдання виконували торакотомію з подальшою екстирпацією серця та виділенням аорти або проводили операційну підготовку – трахеостомію, катетеризацію лівої загальної сонної артерії, правої яремної вени. Ліву яремну вену та ліву загальну

Таблиця 1. Кількісний вміст індольних алкалоїдів у 5 фракціях екстрактів з клітинної біомаси культури тканин *R. serpentina*

Алкалоїд, %*	$[M+H]^+$	Фракція				
		1	2	3	4	5
Ацетилаймалін	369	0,55	1,44	4,98	9,18	33,03
Воміленін	351	0	0,16	5,12	42,53	6,40
Метилаймаліцин	367	0	0,29	0,72	8,00	5,28
Аймаліцин	353	0	0	0,37	3,35	2,02
Аймалін	327	1,54	2,15	10,97	0	0,67
Раукафріцин	513	0,10	1,49	4,02	0	0
Рауфлорідин	383	0	0,44	1,28	1,98	0
Метилаймалін	343	0	0,40	1,07	0	0
Диацетилаймалін	410	0	0	0,48	0	0
Загальна сума, %*		2,2	6,4	29,0	65,0	47,4

*Масові відсотки у фракції; вміст воміленіну та аймаліну визначали прямим вимірюванням, вміст інших алкалоїдів – припускаючи однакову іонізацію із аймаліном, за співвідношенням інтенсивностей іонів у мас-спектрі.

сонну артерію катетеризували тefлоновими катетерами, про цьому вводили гепарин з розрахунку 50 од/100 г маси тіла.

Дослідження скоротливої активності кільцевих сегментів грудної аорти щурів. Судини видаляли у щурів відразу після евтаназії та зберігали в охоложеному розчині Кребса такого складу (ммоль/л): NaCl – 132; KCl – 4,7; NaH₂PO₄ – 1,4; MgCl₂ – 1,0; CaCl₂ – 1,8; NaHCO₃ – 25; глюкози – 6,5; pH 7,4 підтримували за допомогою газової суміші (5% CO₂, 95% повітря). Ізольовані фрагменти торакального відділу аорти очищували від жирової та сполучної тканини, розрізали на кільця до 1 мм, які розміщували у проточній камері (1 мл) з розчином Кребса (36°C) і розтягували на металевих гачках з попереднім навантаженням (0,5–1,0 г, 5–10 мН). Скоротливу активність кілець реєстрували в ізометричному режимі за допомогою тензодатчиків (FTK-0.1, Україна), адаптера LabTrax 4-CDA («WPI», США) та програмного забезпечення DataTrax 2 («WPI», США).

Дослідження проводили на фрагментах судин після стабілізації їх скоротливої активності протягом 40–60 хв, а максимальну відповідь під дією 60 ммоль/л KCl у розчині Кребса приймали за 100% у подальших розрахунках амплітуди скорочень (% KCl). Реакції кілець досліджували відповідно до двох експериментальних протоколів. По-перше, вимірювали амплітуду скорочення кілець під дією фенілефрину (10⁻⁶ моль/л) та рівень ендотеліозалежного розслаблення фенілефринових скорочених сегментів (відсотки) під дією ацетилхоліну (10⁻⁶ моль/л). По-друге, в окремих експериментах вимірювали амплітуду реакції кілець аорти (дозозалежне скорочення або розслаблення), попередньо скорочених фенілефрином (відсотки), за наявності розчинника (20% ДМСО, розведення 1:10000–1:30), аймаліну або однієї з 5 фракцій, які додавали у розчин Кребса послідовно з інтервалом 10 хв, з поступовим підвищенням концентрації від 10⁻⁷ до 3·10⁻⁵ ммоль/л.

Розчини аймаліну (контроль) та всіх

фракцій готували в однаковій масовій концентрації розчиненням однакових наважок аймаліну та сухих фракцій у 20% ДМСО. Концентрація вказаних фракцій – 400 мг/л. Додавання ДМСО до розчинника зумовлене низькою розчинністю алкалоїдів у воді. Оскільки він є складовою розчинника фракцій алкалоїдів і відомий як вазорелаксант [10], була проведена окрема серія дослідів для оцінки дилататорної дії цієї речовини вивченням гіпотензивних властивостей розчинів на кільцевих сегментах грудної аорти щурів та в дослідах *in vivo*.

Дослідження гіпотензивної дії та реєстрація тиску крові у щурів. Враховуючи виражену гіпотензивну дію ДМСО, в окремій серії дослідів оцінювали його вплив у різних дозах на тиск крові. Надалі вивчали зміни тонуусу судин під дією референтної речовини (аймалін) та вибраних тест-зразків 5 фракцій сумішей алкалоїдів при внутрішньовенному введенні. Тиск крові у лівій загальній сонній артерії визначали датчиком тиску ISOTEC («HSE», Німеччина) за допомогою підсилювача DBA, тип 660 («HSE», Німеччина). Результати оцифровували аналогово-цифровими конверторами PowerLab 4/30 («ADInstruments», Австралія) та ADC («HSE», Німеччина). Отримані сигнали обробляли за допомогою програми «Chart5» («ADInstruments», Австралія).

Аналіз та статистична обробка отриманих результатів. Статистичну обробку і графічне оформлення результатів дослідження проводили за допомогою програми Origin Pro 21.0 («Origin Lab Co», США), Exel («Microsoft», США) та Statistica 8 («Stat Soft Inc.», США). Фактичний матеріал було оброблено методами варіаційної статистики. Проводили тест на нормальність розподілу Шапіро-Уїлка. У деяких випадках розподіл отриманих величин не відповідав нормальному, але для полегшення сприйняття вони представлені у вигляді середнього ± похибки середнього ($m \pm SE$). Для попарного порівняння двох незалежних вибірок використовували кри-

терій Манна-Уїтні, залежних – Вілкоксона. Множинні порівняння проводили за допомогою критерію Краскела-Уолліса ANOVA. Значення напівмаксимальної ефективної дози (ЕД₅₀) і амплітуд максимального розслаблення для залежностей доза-ефект були отримані із апроксимації експериментальних результатів кривою Хілла, що побудована за методом найменших квадратів. Для оцінки значущості відмінностей (аналіз таблиць спряженості) використовували точний тест Фішера. Відмінності вважали статистично достовірними, якщо $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Додавання ДМСО до розчину для перфузії вже у розведенні 1:1000 (0,4 мг/л) супроводжувалося значним зниженням тонуусу судинних препаратів. Подальше підвищення його концентрації в інкубаційній камері призводило до ще більшого розслаблення сегментів артерії (табл. 2). При використанні аймаліну значний релаксуючий ефект виникав лише при його концентрації 12 мг/л у розчині. Додавання в перфузійний розчин фракцій 1 і 2 практично не впливало на зміни тонуусу судинних препаратів. Враховуючи наявність ДМСО у складі розчинника, є підстави вважати, що ці фракції, з високою ймовірністю, чинять судинозвужувальний вплив на кільця

грудної аорти шурів. Фракції 3, 4 та 5 викликають зниження тонуусу судинних препаратів (отже мають гіпотензивні властивості), який перевищує дію ДМСО (дивію табл. 2).

Для визначення мінімальної (ЕД₂₀) та напівмаксимальної (ЕД₅₀) ефективних доз 5 фракцій, проведено апроксимацію отриманих величин кривою Хілла, що побудована за методом найменших квадратів. Слід зазначити, що значних відмінностей ЕД₂₀ і ЕД₅₀ алкалоїдів, що вивчаються щодо ДМСО та аймаліну не виявлено.

Ця обставина змусила нас провести додаткову серію досліджень для виявлення впливу усіх фракцій на величину тиску крові у шурів *in vivo*. Враховуючи появу значних відмінностей між ДМСО та п'ятьма фракціями, мінімальна доза для всіх речовин була 0,4 мг/л, та у перерахунку становила 0,0028 мг/1000 г маси тіла шура.

Внутрішньовенне введення тваринам ДМСО, як і в умовах *in vitro*, призводило до дозозалежного зниження середнього артеріального тиску крові (САТ), але вже через 10 хв він відновлювався до початкового значення. Такий ефект слід враховувати при наступній оцінці гіпотензивної активності 5 фракцій алкалоїдів.

Відомо, що за умов внутрішньовенного введення фармакологічна дія аймаліну

Таблиця 2. Вплив різних розведень розчинів диметилсульфоксиду (ДМСО), аймаліну та фракцій алкалоїдів на тонуус судинних препаратів ($m \pm SE$; $n = 6$)

Концентрація	Речовина						
	ДМСО	Аймалін	Фракція 1	Фракція 2	Фракція 3	Фракція 4	Фракція 5
Початкове значення	79,9±8,4	107,9±10,4	105,1±11,2	111,0±11,3	109,9±12,2	93,3±7,0	110,6±11,3
0,04 мг/л (1:10000)	65,6±5,2	107,2±2,7**	114,2±4,3**	123,4±6,2**	106,1±6,0**	73,6±0,8***	119,1±10,0**
0,4 мг/л (1:1000)	53,8±4,3*	105,8±7,3**	106,2±1,7**	117,4±9,3**	103,0±5,5**	56,4±1,9***	97,4±3,7**
4 мг/л (1:100)	50,5±8,5*	97,6±8,2**	97,4±1,6**	114,7±18,4**	66,2±6,2***	28,4±2,1***	48,6±5,4***
12 мг/л (1:30)	40,7±11,6*	80,4±6,0**	110,1±13,3**	97,8±15,2**	27,7±1,5***	-6,7±0,0***	23,2±1,0***

* $P < 0,05$ порівняно з початковим значенням; ** $P < 0,05$ порівняно зі ДМСО; *** $P < 0,05$ порівняно з аймаліном.

проявляється через 15–30 хв, тому період спостереження за тваринами обмежували 30 хв. Введення розчину аймаліну призводило до значних змін тиску крові в перші 10 хв спостереження: короточасної гіпотензії та подальшого зростання САТ до значення, яке перевищувало початкове та зберігалось до введення наступної дози аймаліну або до кінця досліді (табл. 3).

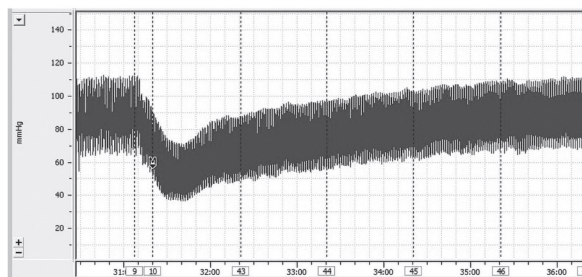
Слід зазначити, що виражена короточасна гіпотензія, як у момент введення аймаліну, спостерігалась у фракції 4 та 5 (рис. 1). Тривалість цього феномену незалежно як від самої фракції, так і дози, що вводилася, становила 15–30 с. Середній тиск крові знижувався на 25–30% від свого початкового значення.

Внутрішньовенне введення фракції 4 також супроводжувалося короточасним зниженням тиску крові, яке змінювалося його поступовим зростанням (див. рис. 1). При застосуванні доз 0,0028 та 0,028 мг/кг це збільшення ставало суттєвим уже через 15 хв після введення та зберігалось до кінця всього періоду спостереження. При введенні максимальної дози САТ зростав до початкових значень та зберігався на цьому рівні. На відміну від цього, підвищення дози фракції 5 з мінімальної до 2,8 мг/кг викликало скорочення періоду зниження артеріального тиску. Надалі він підвищувався до значень, що істотно перевищують початкові (див. рис. 2, б).

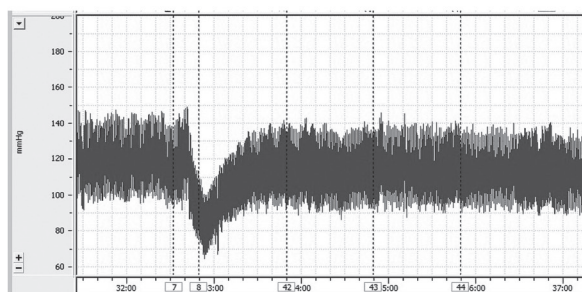
Відомо, що фармакологічні властивості препаратів на основі сировини з *R. serpentina*

за умов тривалого введення різноманітні: вони впливають на центральну нервову

Аймалін, 28 мг/кг



Фракція 4, 28 мг/кг



Фракція 5, 28 мг/кг

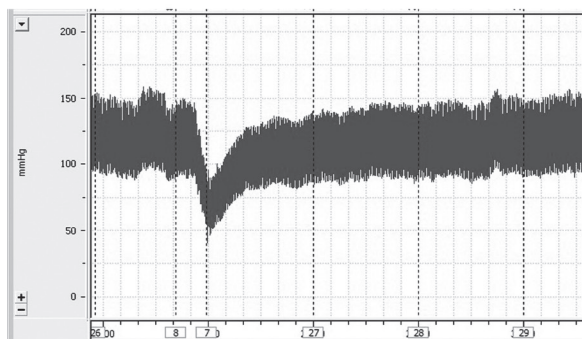


Рис. 1. Типові записи змін артеріального тиску під впливом аймаліну та фракцій 4 і 5

Таблиця 3. Вплив аймаліну на зміни середнього артеріального тиску (мм рт. ст.), вимірюваного інвазивно ($m \pm SE$; $n = 6$)

Доза, мг/кг	Початкове значення	Час, хв			
		5	10	15	30
0,0028	119,6±4,5	130,6±3,5	133,2±6,7	149,6±2,7*	148,0±1,8*
0,028	131,6±6,4	112,4±7,6	109,2±11,9	150,2±2,4*	152,3±2,4*
0,28	134,0±11,6	135,5±8,8	146,7±6,4	164,1±1,7*.*.*.*	154,5±3,5
2,8	125,1±6,4	124,6±6,8	134,4±5,8	130,7±8,5 [#]	148,1±1,1*

* $P < 0,05$ порівняно з початковим значенням; ** $P < 0,05$ порівняно з дозою 0,0028 мг/кг; *** $P < 0,05$ порівняно з дозою 0,028 мг/кг; [#] порівняно з дозою 0,28 мг/кг.

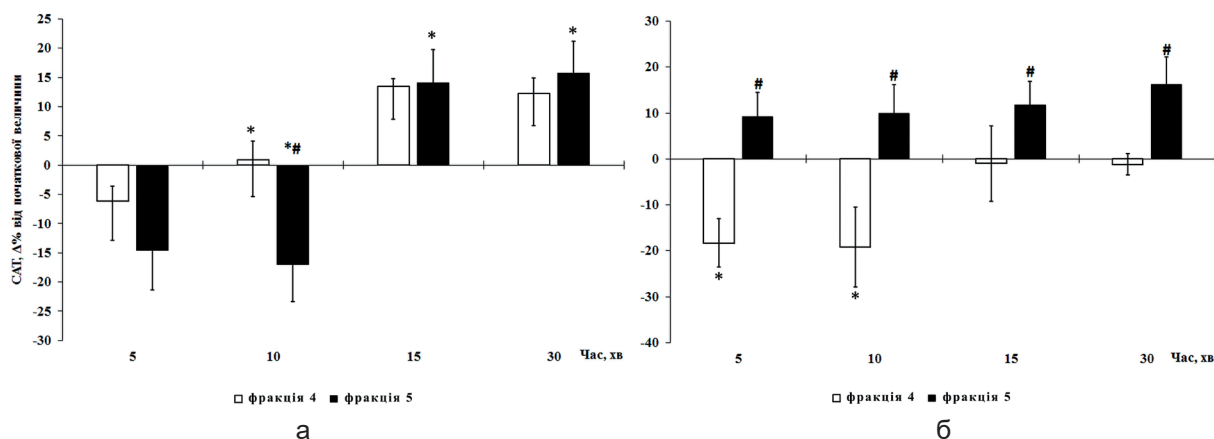


Рис. 2. Зміни середнього артеріального тиску при введенні різних доз фракцій 4 (1) та 5 (2): а – 0,0028 мг/кг; б – 2,8 мг/кг; * $P < 0,05$ щодо початкового значення; * $P < 0,05$ порівняно між групами

систему, мають м'яку гіпотензивну, адренолітичну, седативну дію, що зумовлено переважно специфічними властивостями суми індольних алкалоїдів та їх похідних, наявних у рослинній біомасі [11, 12]. Зокрема, аймаліцин має симпатолітичну активність, блокує α -рецептори, посилює мозковий кровообіг, входить до складу гіпотензивних препаратів [3]. Воміленін є проміжною хімічною речовиною в біосинтезі аймаліну. Резерпін уповільнює серцеві скорочення та розширює артерії внаслідок зниження тонуусу симпатичної нервової системи. Ресцинамін має м'яку гіпотензивну дію внаслідок інгібування ангіотензинперетворюючого ферменту [3, 13].

За результатами проведених досліджень ми виявили наявність констрикторної активності у фракціях 1 і 2, виділених з сухої біомаси. Фракція 1 містила аймалін та ацетилаймалін (масовий відсоток суми алкалоїдів 2,2%), у фракції 2 переважали аймалін, ацетилаймалін та раукафріцин (масовий відсоток суми алкалоїдів 6,4%). Водночас фракції 4 та 5, виділені з живої біомаси, проявляли короткочасну релаксуючу дію. Фракції 4 (масовий відсоток суми алкалоїдів 65,0%) та 5 (масовий відсоток суми алкалоїдів 47,4%) є близькими за якісним складом, основою обох є ацетилаймалін та воміленін (9 та 42% відповідно у фракції 4 та 33 і 6% відповідно

у фракції 5). Обидві виділені фракції збіднені аймаліном, однак містять у переважаючій кількості аймаліноподібні алкалоїди.

Раніше нами виявлено судинорозширювальну дію сумарного екстракту біомаси *R. serpentina* штаму К-27 (сумарний вміст алкалоїдів у перерахунку на суху біомасу культивованих клітин становив 2,8%, у тому числі вміст аймаліну та аймаліноподібних алкалоїдів – 1,6% від сухої маси [6] у дозах 0,0288–28,8 мкг/мл [7]. Окрім того, при проведенні доклінічних досліджень на щурах-альбіносах Shah та ін. показано антигіпертензивні, судинорозширювальні та антигіперліпідемічні терапевтичні властивості сумарного метанольного екстракту *R. serpentina* [14].

У результаті проведених досліджень виявлено, що 5 фракцій екстрактів біомаси культури тканин *R. serpentina* володіли констрикторною або релаксуючою дією на судини залежно від кількісного та якісного вмісту індольних алкалоїдів у екстракті. Можна припустити, що поєднання індивідуальних індольних алкалоїдів у фракціях мають різну біологічну дію на тонус судин порівняно з дією сумарного екстракту клітинної біомаси *R. serpentina*, що потрібно врахувати при проведенні подальших фармакологічних досліджень БАС, які можуть бути використані

при лікуванні гіпертензивних та гіпотензивних станів.

ВИСНОВКИ

1. Вивчено вплив на тонус судин та тиск крові п'яти фракцій екстрактів культури тканин *Rauwolfia serpentina* (штам К-27М), виділених з сухої або із живої біомаси, які відрізнялись умовами екстрагування, кількісним та якісним складом індольних алкалоїдів. Виявлено, що направленість дії та ефект залежали від відсоткового вмісту та складу алкалоїдів у фракції.

2. Встановлено, що фракція 1, яка містила аймалін та ацетилаймалін (масовий відсоток суми алкалоїдів – 2,2%) та фракція 2, у якій були аймалін, раукафріцин та ацетилаймалін (масовий відсоток суми алкалоїдів – 6,4%) проявляли констрикторну (судинозвужувальну) дію на кільця грудної аорти щурів.

3. В умовах *in vitro* виявлено релаксуючу дію фракції 4, яка містила воміленін, ацетилаймалін, метилаймаліцин, аймаліцин та рауфлоридин (масовий відсоток суми алкалоїдів – 65,0%) та фракції 5, в якій переважав ацетилаймалін, з додатковим вмістом воміленіну, метилаймаліцину та аймаліцину (47,4%).

4. Показано короткочасну гіпотензію тривалістю 15–30 с після одноразового внутрішньовенного введення щурам фракцій 4 та 5. Середній тиск крові при цьому знижувався на 25–30% від початкової величини.

*Робота виконана в рамках проекту № 0120U104577 «Розробка засад біотехнологічного виробництва нових гіпотензивних і протиаритмічних алкалоїдів раувольфії зміної *Rauwolfia serpentina* Benth.» за конкурсом «Наука для безпеки людини та суспільства» Національного фонду досліджень України на 2020-2021 рр.*

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or

financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.

O.S. Khromov¹, N.V. Dobrelia¹, O.V. Parshikov¹, I.I. Konvalyuk², O.A. Bieda^{3,2}, L.P. Mozhylevska², S.M. Yarmoluk², A.I. Soloviev¹, V.A. Kunakh²

THE HYPOTENSIVE ACTIVITY OF DIFFERENT FRACTIONS OF THE EXTRACTS FROM TISSUE CULTURE BIOMASS OF *RAUWOLFIA SERPENTINA* BENTH

¹ State Institution «Institute of Pharmacology and Toxicology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine»;

² Institute of Molecular Biology and Genetics of the NAS of Ukraine;

³ Scientific service company «OTAVA» LLC, Kyiv; e-mail: konvalyuk.i.i@gmail.com

Tissue culture of *Rauwolfia serpentina* is an alternative source of more than 20 indole alkaloids that have antiarrhythmic, hypotensive, psychotropic, and anti-inflammatory effects. The paper was aimed at determining the hypotensive activity of five fractions (containing different combinations of alkaloids) of the extracts from the biomass of *R. serpentina* tissue culture (K-27M line). To achieve this aim the following methods were used: *in vitro* plant tissue culture, HPLC analysis of indole alkaloids, assessment of the effects of fractions on the smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta *in vitro* and on the blood pressure after intravenous administration *in vivo*. The five fractions of the extract from cell biomass of *R. serpentina* (K-27M line) were isolated from dried or live biomass and differed in both qualitative and quantitative compositions. The direction of action and the magnitude of the effect were found to depend on the percentage composition of alkaloids in the fraction. It was shown that fraction 1 containing ajmaline and acetyljmaline (total alkaloids content of 2.2%) and fraction 2 containing ajmaline, raucaffricine, and acetyljmaline (total alkaloids content of 6.4%) exerted vasoconstrictor effects on thoracic aorta muscles. Fraction 4 containing vomilenine, acetyljmaline, methylajmalicine, ajmalicine, and raufloridine (total alkaloids content of 65%) and fraction 5 containing mainly acetyljmaline with lesser amounts of vomilenine, methylajmalicine, and ajmalicine (total alkaloids content of 47.4%) were found to have a relaxing activity *in vitro*. Intravenous administration of fractions 4 and 5 resulted in a short-time (15–30 s) hypotension, with blood pressure drop by 25% to 30%. All the 5 fractions of the extracts from *Rauwolfia serpentina* K-27M line demonstrated either vasoconstrictor or relaxing effects depending on the alkaloids type and content. Key words: tissue culture; *Rauwolfia serpentina*; indole alkaloids; vascular tonus; average blood pressure (ABP).

REFERENCES

1. Singh M, Kaur R, Rajput R, Mathur G. Evaluating the therapeutic efficiency and drug targeting ability of alkaloids present in *Rauwolfia serpentina*. *Int J Green Pharm*. 2017;11(3):132-42.
2. Kravchuk O, Goshovska Yu, Korkach Yu, Sagach V. Garlic lowers blood pressure and reduces oxidative stress by increasing plasma h2s content in patients with arterial hypertension. *Fiziol Zh*. 2020;66(4):55-63. [Ukrainian].
3. Kumar S, Kumari D, Singh B. Genus *Rauwolfia*: a review of its ethnopharmacology, phytochemistry, quality control/quality assurance, pharmacological activities and clinical evidence. *Ethnopharmacology*. 2022;295:115327.
4. Kunakh VA. Biotechnology of medicinal plants. Genetic, physiological and biochemical basis. Kyiv: Logos. 2005 [Ukrainian].
5. Mukherjee E, Gantait S, Kundu S, Sarkar S, Bhattacharyya S. Biotechnological interventions on the genus *Rauwolfia*: recent trends and imminent prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019;103:7325-54.
6. Bieda OA, Konvaliuk II, Mozhylevska LP, Lukashov SS, Kunakh VA, Yarmoluk SM. Determination of content of indole alkaloids in cell biomass of *Rauwolfia serpentina* Benth. ex Kurz tissue culture. *Current Iss Pharm Med: Sci Pract*. 2021;14(1):73-8 [Ukrainian].
7. Monchak IL, Konvalyuk II, Balanda AO, Lukashov SS, Matiushok VI, Kunakh VA, et al. Study of the vasodilatory effect of extract from tissue culture biomass of *Rauwolfia serpentina* benth. *Farm Zh*. 2021;3:71-80. [Ukrainian].
8. Yadlovskiy OY, Demchenko AM, Konvalyuk II, Mozhylevska LP, Bieda OA, Matiushok VI, et al. Study of the sedative effect of extract from tissue culture biomass of *Rauwolfia serpentina*. *Farm Zh*. 2021;2:78-86. [Ukrainian].
9. Yadlovskiy OY, Demchenko AM, Konvalyuk II, Mozhylevska LP, Bieda OA, Yarmoluk SM, et al. Acute and subacute toxicity study of biomass of *Rauwolfia serpentina* benth. Tissue culture as a source of antiarrhythmic and hypotensive alkaloids. *Pharmacol Drug Toxicol*. 2021;16(4):281-92. [Ukrainian].
10. Kaneda T, Sasaki N, Urakawa N, Shimizu K. Endothelium-dependent and -independent vasodilator effects of dimethyl sulfoxide in rat aorta. *Pharmacology*. 2016; 97:171-6.
11. Soni R, Jaiswal S, Bara JK, Saksena D. The use of *Rauwolfia serpentina* in hypertensive patients. *IOSR J Biotechnol Biochem*. 2016 Jun;2(5):28-32.
12. Rukachaisirikul T, Chokchaisiri S, Suebsakwong P, Suksamrarn A, Tocharus CA. New ajmaline-type alkaloid from the roots of *Rauwolfia serpentina*. *Nat Prod Commun*. 2017;12(4):495-8.
13. Mohammed AE, Abdul-Hameed ZH, Alotaibi MO, Bawakid NO, Sobahi TR, Abdel-Lateff A, et al. Chemical diversity and bioactivities of monoterpene indole alkaloids (MIAs) from six Apocynaceae genera. *Molecules*. 2021;26(2):488.
14. Shah SMA, Naqvi SAR, Munir N, Zafar S, Akram M, Nisar J. Antihypertensive and antihyperlipidemic activity of aqueous methanolic extract of *Rauwolfia serpentina* in albino rats. *Dose Response*. 2020;18(3): 1559325820942077.

*Матеріал надійшов
до редакції 28.03.2023*