

УДК 616.12-008.318-092.9:615.222.07

ББК 54.101+52.81

Б-74

Богус Саида Казбековна, кандидат медицинских наук, врач-кардиолог Муниципального бюджетного учреждения здравоохранения городская больница №2 Краснодарского муниципального лечебно-диагностического объединения, т.: 79184686026, e-mail: Sayda_777@mail.ru;

Галенко-Ярошевский Павел Александрович, член-корр. РАМН, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования "Кубанский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, т.: (861)2623499, т. 79284292122, e-mail: kybfarma@rambler.ru;

Духанин Александр Сергеевич, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры молекулярной фармакологии и радиобиологии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования "Национальный исследовательский медицинский университет" им. Н.И. Пирогова Минздравсоцразвития России, т.: 89161117929, e-mail: das03@rambler.ru;

Шимановский Николай Львович, член-корр. РАМН, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой молекулярной фармакологии и радиобиологии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования "Национальный исследовательский медицинский университет" им. Н.И. Пирогова Минздравсоцразвития России, т.: 89166503149, e-mail: shiman@rsmu.ru.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРОИЗВОДНОГО ИНДОЛА SS-68 И ИВАБРАДИНА НА КАЛЬЦИЕВУЮ ПРОВОДИМОСТЬ I_f /HCN КАНАЛОВ ВЕНТРИКУЛЯРНЫХ КАРДИОМИОЦИТОВ КРЫСЫ
(рецензирована)

Проведено сравнительное изучение влияния производного индола SS-68 и ивабрадина на кальциевую проводимость I_f /HCN каналов вентрикулярных кардиомиоцитов крыс.

Показано, что соединение SS-68 ингибирует вход кальция через HCN каналы, обладая ивабрадин-подобным действием. Полученные данные свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения влияния соединения SS-68 на пейсмекерную активность сердца в опытах *in vivo*.

Ключевые слова: ионы кальция, частота сердечных сокращений, регуляция ритма сердца, кардиомиоциты, производные индола SS-68, ивабрадин.

Bogus Saida Kazbekovna, Candidate of Medicine, a cardiologist of Municipal budget health care institution city hospital № 2 of the Krasnodar Municipal Medical Diagnostic Association, tel.: 79184686026, e-mail: Sayda_777@mail.ru;

Galenko-Yaroshevsky Pavel Alexandrovich, corresponding member of RAMS, Doctor of Medicine, professor, head of the Department of Pharmacology of the SBEI HPE "Kuban State Medical University" of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, tel.: (861) 2623499, e-mail: kybfarma@rambler.ru;

Dukhanin Alexander Sergeevich, Doctor of Medicine, professor, professor of the Department of Molecular Pharmacology and Radiobiology of the SBEI HPE "National Research Medical University" named after N.I. Pirogov of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, tel: 89161117929, e-mail: das03@rambler.ru;

Shimanovsky Nikolai Lvovich, corresponding member of RAMS, MD, professor, head of the Department of Molecular Pharmacology and Radiobiology of the SBEI HPE "National Research Medical University" named after N.I. Pirogov of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, tel: 89166503149, e-mail: shiman@rsmu.ru.

A COMPARATIVE STUDY OF THE INFLUENCE OF INDOLE DERIVATIVES SS-68 AND IVABRADINE ON CALCIUM CONDUCTIVITY OF I_f / HCN CHANNELS OF VENTRICULAR CARDIOMYOCYTES OF RATS
(Reviewed)

A comparative study of the effect of indole derivatives SS-68 and ivabradine on calcium conductivity of I_f / HCN channels of ventricular cardiomyocytes of rats has been made.

It is shown that the compound SS-68 inhibits the entry of calcium through HCN channels, having ivabradine-like effect. The obtained results suggest the need for further studying the effects of compound SS-68 on pace make cardiac activity in experiments *in vivo*.

Keywords: calcium ions, heart contraction rate, heart rate regulation, cardiomyocytes, indole derivatives SS-68, ivabradine.

Частота сердечных сокращений является важным фактором риска у больных с ишемической болезнью сердца и хронической сердечной недостаточностью [1]. В связи с тем, что кардиальная проводящая система генерирует и синхронизирует сокращения сердца, её дисфункция может приводить к аритмиям и нарушениям проводимости различных степеней тяжести, вплоть до внезапной смерти [2]. Ритм сердца регулируется механизмом спонтанной диастолической деполяризации синоатриального узла, который в свою очередь определяется работой активирующегося при гиперполяризации ионного канала I_f [3]. Четыре изоформы данного канала HCN (hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel) различаются не только своим распределением в тканях сердца и нервной системы, но и кинетикой, амплитудой и другими электрофизиологическими свойствами [4]. Получены прямые доказательства, что I_f /HCN каналы являются переносчиком ионов не только K^+ и Na^+ , но и Ca^{2+} [5].

Ключевым механизмом, через который симпатическая нервная система осуществляет регуляцию ЧСС, является модуляция I_f тока цАМФ. Нейромедиатор адренергических синапсов, норадреналин, за счет стимуляции активности аденилатциклазы и выработки цАМФ, увеличивает I_f ток. Циклический АМФ действует непосредственно на f-канал и способствует его открытию за счет смещения мембранного потенциала к более положительному значению. Медиатор парасимпатической нервной системы ацетилхолин, напротив, подавляет выработку цАМФ, тем самым, смещая мембранный потенциал в сторону отрицательных значений и снижая вероятность открытия f-каналов [6].

В последние годы создан новый класс препаратов – I_f -ингибиторы, пока единственным представителем которого является ивабрадин [7]. В ряде крупных исследований показана его антиангинальная активность при стабильной стенокардии напряжения. В настоящее время ивабрадин применяется для лечения стабильной стенокардии при непереносимости или противопоказаниях к применению β -адреноблокаторов [8].

Таким образом, I_f /HCN каналы можно отнести к высокопотенциальным молекулярным мишеням антиангинального и антиаритмического действия кардиотропных средств.

Полученные нами данные [9] относительно антиаритмической активности нового производного индола с лабораторным шифром SS-68 на различных экспериментальных моделях *in vivo* указывает, что одной из его возможных мишеней действия являются HCN-каналы (каналы, активируемые гиперполяризацией мембраны) кардиомиоцитов.

Целью работы явилось сравнительное изучение влияния соединения SS-68 и ингибитора I_f /HCN-каналов ивабрадина на кальциевую проницаемость, покоящихся и стимулированных кардиомиоцитов крысы.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использованы следующие реактивы и лекарственные препараты: $CdCl_2$, $NiCl_2$ фирмы "Fluka"; HEPES, NaCl, KCl, $CaCl_2$, NaH_2PO_4 , $MgSO_4$, ЭГТА, тапсигаргин ("Sigma-Aldrich"); Fura-2/AM ("Calbiochem"); $MnCl_2$, дигитонин, изопротеронол, кофеин, адреналин ("Serva"); ивабрадин (Oril Industrie, Франция); HCl, NaOH (отечественного производства марки хч). Все растворы готовили на воде, очищенной с помощью установки "Millipore" (США).

Выделение кардиомиоцитов из левого желудочка сердца, процедура нагружения клеток зондом Fura-2/AM и регистрация флуоресценции описаны нами ранее [10, 11]. Для расчета внутриклеточной концентрации кальция пользовались формулой:

$$[Ca^{2+}]_{цит} = K (R - R_{min}) / (R_{max} - R),$$

где R_{min} и R_{max} – представляют отношения интенсивности флуоресценции при длине волны возбуждения 340 и 380 нм (F_{340}/F_{380}) соответственно при нулевой и насыщающей концентрациях Ca^{2+} , а коэффициент K определяется как $K_{дисс} (F_o/F_s)$; F_s – флуоресценция при 380 нм Fura-2, свободной от кальция, F_o – флуоресценция при 380 нм комплекса зонда с Ca^{2+} . Значение $K_{дисс}$ – равновесной константы диссоциации Fura-2 с Ca^{2+} – определяли в модельных опытах, используя раствор Fura-2. Рассчитанная с помощью анализа Скотчарда величина $K_{дисс}$ составила 140 нМ.

Расчет доверительных интервалов экспериментальных значений и оценку достоверности различий между ними проводили с помощью параметрического t-критерия Стьюдента при уровне значимости, равном 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Полученные нами данные указывают, что в покоящихся клетках диастолическая концентрация свободных ионов кальция в саркоплазме поддерживается на уровне 125-145 нМ ($n = 6$). В основном это определяется работой Na/Ca-обменника, локализованного в сарколемме. Ингибирование его активности специфическим блокатором амилоридом (40 мкМ) приводило к достоверному повышению базального $[Ca^{2+}]_{цит}$ в среднем до величины 210 нМ ($n = 4$). В состоянии покоя небольшое количество Ca^{2+} поступает в клетку через K-каналы, выброс кальция из миоплазмы обеспечивается Na/Ca-антипортом. Потенциал-зависимые Na- и Ca-каналы закрыты. Об этом

свидетельствуют следующие данные: 1) входу кальция в кардиомиоциты препятствовали селективные блокаторы К-каналов 4-аминопиридин (10 мМ) и тетраэтиламмоний (5 мМ); 2) «фоновый» входящий ток ионов кальция не чувствителен к избирательным антагонистам Са-каналов кардиомиоцитов - верапамилу, двухвалентным металлам (1 мМ NiCl₂, 0,2 мМ CdCl₂).

Сравнительное исследование влияния соединения SS-68 и ивабрадина на содержание Са²⁺ в покоящихся кардиомиоцитах не выявило достоверного изменения Са-ответа клеток в диапазоне концентраций 10-100 мкМ (рис. А).

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что исследуемые вещества не изменяют компарментализацию внутриклеточного Са²⁺ в нестимулированных интактных клетках.

Для стимуляции I_f/HCN каналов кардиомиоцитов использовали аналог цАМФ – дибутирил-цАМФ, способный проникать через плазматические мембраны клеток (1 мМ). В условиях стимуляции, вызванной инкубацией клеток с дибутирил-цАМФ, наблюдали значительные сдвиги Са-обмена кардиомиоцитов. Определенный диастолический уровень Са²⁺ был выше, чем в интактных клетках (ΔСа = 45 нМ). В наших исследованиях с целью ингибирования I_f/HCN каналов использовали препарат ивабрадин, который в концентрации 50 мкМ подавляет их активность на 80%.

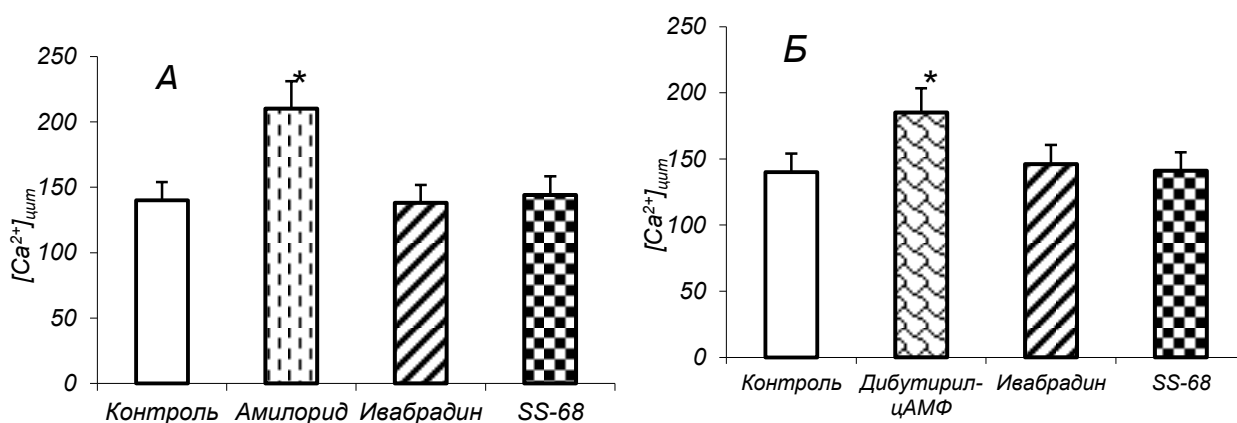


Рис. Изменения внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция ($[Ca^{2+}]_{цит}$) в цитоплазме покоящихся (А) и стимулированных (Б) кардиомиоцитов под влиянием соединения SS-68 и ивабрадина

* - достоверные отличия от контрольных значений.

Активация каналов цАМФ вызывает увеличение $[Ca^{2+}]_{цит}$, которое мы регистрировали с использованием флуоресцентного индикатора Са²⁺ – зонда FURA-2. Разница между базальным уровнем $[Ca^{2+}]_{цит}$ в интактных и стимулированных клетках (ΔСа) равнялась в среднем 45 нМ (рис. Б). Ивабрадин (50 мкМ) достоверно подавлял цАМФ-индуцированный подъем внутриклеточной концентрации ионов кальция в стимулированных клетках. В условиях стимуляции инкубация кардиомиоцитов с соединением также SS-68 (10-100 мкМ) приводила к дозозависимому уменьшению $[Ca^{2+}]_{цит}$.

Для того, чтобы исключить влияние на $[Ca^{2+}]_{цит}$ других Са-токов (I_{Ca,T}, I_{Ca,L}), Na/Ca-обмена и Са-канала саркоплазмы в контрольные образцы предварительно вносили нифедипин 10 мкМ, эфонидипин 10 мкМ, KB-R79435 10 мкМ и 6-карбоксиэозин 10 мкМ [12, 13].

Следовательно, действие соединения SS-68 на диастолический ток Са²⁺ имеет прямой характер, поскольку определяется ингибированием транспорта Са²⁺ в клетку через I_f/HCN каналы кардиомиоцитов.

Таким образом, сравнительная характеристика Са-блокирующих свойств соединения SS-68 и ивабрадина свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения влияния соединения SS-68 на пейсмекерную активность сердца в опытах in vivo для оценки перспективности нового соединения.

Предложенный нами экспериментальный подход для определения проводимости ионов кальция через HCN каналы кардиомиоцитов может быть использован при дальнейших исследованиях патогенетических механизмов предсердных аритмий и возможностей их фармакологической коррекции. Присутствие кальциевого тока в канале I_f/HCN, как универсального клеточного мессенджера, имеет важное значение для понимания механизмов развития сердечно-сосудистых заболеваний и состояний, а также в исследованиях аритмогенных свойств канала I_f. Одним из патогенетических механизмов предсердного аритмогенеза может быть проведение тока Са²⁺ через канал I_f, подтвержденное активацией канала цАМФ и ингибированием блокатором канала I_f ивабрадином и соединением SS-68.

Литература:

1. Barbutti A., Baruscotti M., DiFrancesco D. The pacemaker current: from basic to the clinics // *J. Cardiovasc Electrophysiol.* 2007. Vol. 18. P. 342-347.
2. Atrial fibrillation is associated with increased spontaneous calcium release from the sarcoplasmic reticulum in human atrial myocytes / Hove-Madsen L. [etc.] // *Circulation.* 2004. Vol. 110. P. 1358-1363.
3. A hyperpolarization-activated inward current (I_f) in ventricular myocytes from normal and failing human hearts / Hoppe U.C. [etc.] // *Circulation.* 1998. Vol. 97. P. 55-65.
4. DiFrancesco D., Camm J.A. Heart rate lowering by specific and selective I(f) current inhibition with ivabradine: a new therapeutic perspective in cardiovascular disease // *Drugs.* 2004. Vol. 64, №16. P. 1757-1765.
5. Direct evidence for calcium conductance of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels and human native I_f at physiological calcium concentrations / Michels G. [etc.] // *Cardiovascular Research.* 2008. Vol. 78. P. 466-475.
6. Critical role for hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 2 in the AIF-mediated apoptosis / Norberg E. [etc.] // *EMBO Journal.* 2010. Vol. 29. P. 3869-3878.
7. Therapeutic effects of I_f blockade: Evidence and perspective / Borer J.S. [etc.] // *Pharmacological Research.* 2006. Vol. 53. P. 440-445.
8. Borer J.S. Antianginal and antiischemic effects of ivabradine, an I_f inhibitor, in stable angina // *Circulation.* 2003. Vol. 107. P. 817-822.
9. Антиаритмическая активность новых производных индола / С.К. Богус [и др.] // IV съезд фармакологов России "Инновации в современной фармакологии": материалы съезда, Казань, 18-21 сентября 2012 г. М.: Фолиум, 2012. С. 23.
10. Evaluation of Na-blocking properties of rinocaine and its combinations with low molecular weight polymers in the isolated cardiomyocytes of rats / Khankoeva A.I. [etc.] // *Biull Eksp Biol Med.* 1997. Dec. Vol. 124, №12. P. 649-651.
11. Khankoeva A.I., Dukhanin A.S., Galenko-Iaroshevskii P.A. Determination of cardiomyocyte transmembrane potential with potential-sensitive fluorescent probes // *Biull. Eksp. Biol. Med.* 1998. Nov. Vol. 126, №11. P. 594-597.
12. Actions of mibefradil, efonidipine and nifedipine block of recombinant T- and L-type Ca channels with distinct inhibitory mechanisms / Lee T.S. [etc.] // *Pharmacology.* 2006. Vol. 78. P. 11-20.
13. Calcium influx through I_f channels in rat ventricular myocytes / Xiao Yu. [etc.] // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2007. March. Vol. 292, №3. P. 1147-1155.

References:

1. Barbutti A., Baruscotti M., DiFrancesco D. The pacemaker current: from basic to the clinics // *J. Cardiovasc Electrophysiol.* 2007. Vol. 18. P. 342 - 347.
2. Atrial fibrillation is associated with increased spontaneous calcium release from the sarcoplasmic reticulum in human atrial myocytes / Hove-Madsen L. [etc.] // *Circulation.* 2004. Vol. 110. P. 1358 - 1363.
3. A hyperpolarization-activated inward current (I_f) in ventricular myocytes from normal and failing human hearts / Hoppe U.C. [etc.] // *Circulation.* 1998. Vol. 97. P. 55 - 65.
4. DiFrancesco D., Camm J.A. Heart rate lowering by specific and selective I(f) current inhibition with ivabradine: a new therapeutic perspective in cardiovascular disease // *Drugs.* 2004. Vol. 64, № 16. P. 1757 - 1765.
5. Direct evidence for calcium conductance of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels and human native I_f at physiological calcium concentrations / Michels G. [etc.] // *Cardiovascular Research.* 2008. Vol. 78. P. 466-475.
6. Critical role for hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 2 in the AIF-mediated apoptosis / Norberg E. [etc.] // *EMBO Journal.* 2010. Vol. 29. P. 3869 – 3878.
7. Therapeutic effects of I_f blockade: Evidence and perspective / Borer J.S. [etc.] // *Pharmacological Research.* 2006. Vol. 53. P. 440 - 445.
8. Borer J.S. Antianginal and antiischemic effects of ivabradine, an I_f inhibitor, in stable angina // *Circulation.* 2003. Vol. 107. P. 817 - 822.
9. Antiarrhythmic activity of indole derivatives / Bogus S.K. [and oth.] // IV Congress of Pharmacologists of Russia "Innovations in modern pharmacology": materials of the Congress, Kazan, 18 - 21 September 2012. M.: Folium, 2012. P. 23.
10. Evaluation of Na-blocking properties of rinocaine and its combinations with low molecular weight polymers in the isolated cardiomyocytes of rats / Khankoeva A.I. [etc.] // *Biull Eksp Biol Med.* 1997. Dec. Vol.

124, № 12. P. 649 - 651.

11. Khankoeva A.I., Dukhanin A.S., Galenko-Iaroshevskii P.A. Determination of cardiomyocyte transmembrane potential with potential-sensitive fluorescent probes // *Biull. Eksp. Biol. Med.* 1998. Nov. Vol. 126, №11. P. 594-597.

12. Actions of mibefradil, efonidipine and nifedipine block of recombinant T-and L-type Ca channels with distinct inhibitory mechanisms / Lee T.S. [etc.] // *Pharmacology.* 2006. Vol. 78. P. 11 - 20.

13. Calcium influx through If channels in rat ventricular myocytes / Xiao Yu. [etc.] // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2007. March. Vol. 292, № 3. P. 1147 – 1155.