

УДК 616.12-008.9-085-092.9:615.222.07
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-кор. 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-кор. 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 ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРОИЗВОДНОГО ИНДОЛА SS-68,
АМИОДАРОНА И ДРОНЕДАРОНА НА ИОННЫЙ ГОМЕОСТАЗ
В КАРДИОМИЦИТАХ КРЫСЫ**
(рецензирована)

Проведено сравнительное изучение влияния нового производного индола SS-68, амиодарона и дронедарона на ионный гомеостаз покоящихся и стимулированных кардиомиоцитов крысы.

Установлено, что соединение SS-68 подавляет входящий Na^+ - и Ca^{2+} ионные токи, оказывает наиболее значимое действие на K^+ -ответ кардиомиоцитов; обладает преимущественно свойствами антиаритмических препаратов III класса:

Ключевые слова: кардиомиоциты, Na^+ -, Ca^{2+} - и K^+ ионные токи, производное индола соединение SS-68, амиодарон, дронедарон.

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.

**COMPARATIVE STUDY OF THE INFLUENCE OF INDOLE DERIVATIVE SS-68,
AMIODARONE AND DRONEDARONE
ON ION HOMEOSTASIS IN CARDIOMYOCYTES OF RATS**
(Reviewed)

A comparative study of the effects of a new derivative of indole SS-68, amiodarone and dronedarone on the ionic homeostasis of resting and stimulated rat cardiomyocytes has been conducted. It has been found that the compound SS-68 inhibits the incoming Na^+ and Ca^{2+} ion currents, has the most significant effect on K^+ -response of cardiomyocytes, has the advantageous properties of class III antiarrhythmic drugs:

Keywords: cardiac myocytes, Na⁺, Ca²⁺ and K⁺ ion currents, indole derivative compound SS-68, amiodarone, dronedarone.

К основным причинам развития аритмий относится ишемия миокарда. Индуцируемые гипоксией сдвиги внутриклеточного энергетического метаболизма вызывают изменения трансмембранных ионных потоков Na⁺, K⁺, Ca²⁺, приводящие к различным нарушениям автоматизма и проводимости кардиальных клеток. К числу важных аритмогенных факторов относятся: повышение диастолической концентрации свободных ионов Na⁺ и Ca²⁺ в цитоплазме кардиомиоцитов, снижение потенциала покоя плазматической мембраны клеток. В основе молекулярного механизма действия антиаритмических препаратов, как правило, лежит специфическое ингибирование активности ионных каналов для Na⁺, K⁺, Ca²⁺.

Ранее нами было показано, что новое производное индола с лабораторным шифром SS-68, синтезированное в НИИ физической и органической химии Южного федерального университета (г. Ростов-на-Дону), в условиях нарушений ритма сердца (НРС) периферического [на аконитиновой, хлоридкальциевой, хлоридбариевой, хлоридцезиевой, строфантиновой и адреналиновой моделях аритмий, а также при предсердных (вызванных разрушением синусового узла) и желудочковых (индуцированных инфарктом миокарда) формах НРС] происхождения в экспериментах на нелинейных крысах, кроликах, морских свинках, кошках и собаках проявляет выраженную антиаритмическую активность, превосходящую таковую (в зависимости от модели аритмии) референтные препараты – лидокаин, аймалин, этацин и амиодарон [1]. Соединение SS-68 проявляло в основном свойства антиаритмика III, а также I, II и IV классов согласно классификации Вогана-Вильямса [2].

Целью настоящей работы явилось сравнительное изучение влияния соединения SS-68, амиодарона и дронедафона на ионный гомеостаз, покоящихся и стимулированных кардиомиоцитов крысы.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использованы вещества и препараты: CdCl₂, NiCl₂ ("Fluka"); HEPES, NaCl, KCl, CaCl₂, NaH₂PO₄, MgSO₄, ЭГТА, тапсигаргин ("Sigma-Aldrich"); Fura-2/AM ("Calbiochem"); MnCl₂, дигитонин ("Serva"); HCl, NaOH (отечественного производства марки хч); амиодарон (Медицинские технологии НПФ, Россия), дронедафон (Sanofi-Aventis). Все растворы готовили на воде, очищенной с помощью установки "Millipore" (США).

Выделение кардиомиоцитов из левого желудочка сердца, процедуру нагружения клеток зондами Fura-2/AM и SBFI, регистрацию флуоресценции проводили по методам, описанным А.И. Khankoeva et al. [3, 4].

Концентрацию ионов натрия в саркоплазме рассчитывали по формуле:

$$[Na^+]_{цит} = Kd * k * (R - R_{min}) / (R_{max} - R),$$

где R – отношение флуоресценции при длинах возбуждающего света 340 нм (F₃₄₀) и 380 нм (F₃₈₀); R_{min} и R_{max} – то же при нулевой и насыщающей концентрации [Na⁺]_{цит} (150 mM); k – отношение интенсивности флуоресценции при 380 нм для свободного и связанного зонда (2,1±0,1); Kd – равновесная константа диссоциации комплекса зонд-Na, равная 20,8±1,4 mM.

Для расчета внутриклеточной концентрации кальция пользовались формулой:

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

где R_{min} и R_{max} представляют из себя отношения интенсивности флуоресценции при длине волны возбуждения 340 и 380 нм (F₃₄₀/F₃₈₀) соответственно при нулевой и насыщающей концентрациях Ca²⁺, 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 кальцием. Значение K_{дисс} – равновесной константы диссоциации Fura-2 с Ca²⁺ – определяли в модельных опытах, используя раствор Fura-2. Рассчитанная с помощью анализа Скетчарда величина K_{дисс} составила 140 нМ.

Оценку изменений внутриклеточной концентрации ионов калия в кардиомиоцитах с помощью флуоресцентного зонда RBFI проводили по методике, описанной Ru-Chi Shieh et al. [5].

Для моделирования условий гипоксии клетки инкубировали в течение 30 мин. при 37°C в среде, содержащей 0,5 mM KCN и 10 mM 2-дезоксиглюкозу.

Электрическую стимуляцию кардиомиоцитов осуществляли с помощью установки MacLab system (Австралия).

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

Влияние на Na^+ -каналы. Na^+ -каналы могут существовать в одном из трех возможных функциональных состояний: открытом, закрытом или инактивированном (рефрактерном). Лекарственные средства, относящиеся к I классу антиаритмиков, способны связываться с Na^+ -каналами, находящимися только в открытом и рефрактерном состояниях. Вследствие этого представители класса антиаритмических веществ блокируют только функционирующие Na^+ -каналы, причем, чем выше ЧСС, тем более выражен их фармакологический эффект.

В условиях наших экспериментов величина диастолической концентрации $[Na^+]_{цит}$ в покое кардиомиоцитах составила $7,9 \pm 0,5$ мМ ($n = 4$). Подъем внутриклеточной концентрации Na^+ индуцировали путем внесения в суспензию кардиомиоцитов KCN и 2-дезоксиглюкозы и через 30 мин. регистрировали выраженное повышение интенсивности флуоресценции при 340 нм, сопровождающееся снижением F_{380} . Исследование влияния SS-68, амиодарона и дронедаарона на индуцированный $[Na^+]_{цит}$ проводили в двух сериях экспериментов с использованием нестимулированных (1) и стимулированных (2) [электрическими импульсами (0,2-1,0 Гц, 10 мс, 60 мВ)] кардиомиоцитов.

1. В условиях экспериментальной гипоксии, вызванной KCN и 2-дезоксиглюкозой, новый повышенный уровень $[Na^+]_{цит}$ равнялся $16,3 \pm 1,5$ мМ ($n = 6$). Таким образом, разница между базальным уровнем Na^+ в интактных и неоксигенированных кардиомиоцитах (ΔNa) составила в среднем 8,4 мМ. Предварительное внесение SS-68, амиодарона и дронедаарона до конечной концентрации 10, 25 и 50 мкМ вызывает дозозависимое снижение ΔNa . При этом выраженность Na^+ -блокирующего эффекта примерно равна: SS-68, амиодарона и дронедаарона, взятые в концентрации 10 мкМ, достоверно ($p < 0,05$) ингибируют подъем натрия на 29, 35 и 27% соответственно.

2. Дифференцировать действие SS-68, амиодарона и дронедаарона удалось в экспериментах на стимулированных кардиомиоцитах.

Электрическая стимуляция клеток в течение всего периода "химической" гипоксии приводила к достоверному изменению $[Na^+]_{цит}$ как по отношению к контрольным образцам ($\Delta Na = 15,9 \pm 2,3$ мМ), так и в сравнении с нестимулированными миоцитами ($\Delta Na = 7,5 \pm 1,8$ мМ). Подъем $[Na^+]_{цит}$ не зависел от выбранной частоты электрических разрядов: стимуляция клеток током с частотой 0,2 или 1,0 Гц вызывала сходное по величине повышение уровня Na^+ .

Ингибирующее действие амиодарона на увеличение $[Na^+]_{цит}$ зависело не только от дозы, но и от частоты электрической стимуляции кардиомиоцитов (рис. 1А). Следует отметить, что глубина Na^+ -блокирующего эффекта амиодарона на стимулированных клетках была существенно больше, чем на нестимулированных во всем диапазоне концентраций.

Дронедаарон в меньшей степени ингибировал индуцированный $[Na^+]_{цит}$, также были выявлены отличия между активностью этого препарата при стимуляции током различной частоты (рис. 1Б).

Из представленных на рисунке С данных видно, что для SS-68, характерно амиодарон-подобное влияние на $[Na^+]_{цит}$. В зависимости от навязанной частоты стимуляции степень ингибирования соединения SS-68 натриевого тока достоверно отличалась.

Влияние на Ca^{2+} -каналы. В нормооксигенированных кардиомиоцитах диастолическая концентрация свободных ионов Ca^{2+} в саркоплазме поддерживается на уровне 12-145 нМ. 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. В состоянии покоя небольшое количество Ca^{2+} поступает в клетку через K^+ -каналы, выброс Ca^{2+} из миоплазмы обеспечивается Na/Ca-антипортом. Потенциал зависимые Na^+ - и Ca^{2+} -каналы закрыты. Об этом свидетельствуют следующие данные: 1) входу Ca^{2+} в кардиомиоциты препятствовали селективные блокаторы K^+ -каналов 4-аминопиридин (10 мМ) и тетраэтиламмоний (5 мМ); 2) "фоновый" входящий ток Ca^{2+} не чувствителен к избирательным антагонистам Ca^{2+} -каналов кардиомиоцитов – верапамилу, двухвалентным металлам (1 мМ $NiCl_2$, 0,2 мМ $CdCl_2$).

Исследование влияния SS-68, амиодарона и дронедаарона на содержание Ca^{2+} в покое кардиомиоцитах не выявило достоверного изменения Ca^{2+} -ответа клеток в диапазоне концентраций 10-100 мкМ.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что исследуемые вещества не изменяют компартментализацию внутриклеточного Ca^{2+} в нестимулированных интактных кардиомиоцитах.

При экспериментальной гипоксии, вызванной инкубацией клеток с D-глюкозой и KCN в течение 20 мин., наблюдали значительные сдвиги Ca^{2+} -обмена кардиомиоцитов. В условиях "химической гипоксии" определенный диастолический уровень Ca^{2+} был выше, чем в интактных клетках ($\Delta Ca = 62$ нМ). В гипооксигенированных клетках накапливаются кислые метаболиты,

снижается внутриклеточный рН и наблюдается ацидоз, активирующий Na/H-обмен. В наших исследованиях с целью ингибирования Na/H-обмена применялся этилизопропиламилорид (EIPA), который в концентрации 10 мкМ подавляет его активность примерно на 80%. Стимуляция работы Na/H-антипорта вызывает увеличение $[Na^+]_{цит}$, которое регистрировалось с использованием флуоресцентного индикатора Na^+ зонда SBF1-AM. Разница между базальным уровнем $[Na^+]_{цит}$ в интактных и гипоксигенированных клетках (ΔNa) равнялась в среднем 15 мМ, что соответствует превышению контрольных значений $[Na^+]_{цит}$ на 105-107%. Повышение внутриклеточного уровня Na^+ даже на 10% вызывает резкую активацию Na/Ca-обмена, при котором транспорт ионов меняет направление: 3 иона Na^+ из клетки выбрасываются наружу, один ион Ca^{2+} поступает в клетку извне. Следствием этого является увеличение $[Ca^{2+}]_{цит}$. Рост внутриклеточного содержания ионизированного Ca^{2+} – не только является аритмогенным фактором, но и запускает каскад сложных биохимических процессов, приводящих к структурным повреждениям и гибели кардиомиоцитов по некротическому пути.

В то же время в условиях гипоксигенации инкубация кардиомиоцитов с амиодароном или дронедароном (10-100 мкМ) приводила к дозозависимому уменьшению $[Ca^{2+}]_{цит}$.

Действие SS-68 на Ca^{2+} -гомеостаз имеет непрямой (опосредованный) характер, поскольку определяется ингибированием транспорта ионов Na^+ в клетку. Об этом свидетельствовали данные следующих экспериментов: а) замена внеклеточного Na^+ на эквивалентное количество Li^+ отменяла Ca^{2+} -блокирующий эффект SS-68, но не амиодарона; б) предварительное повышение $[Na^+]_{цит}$ за счет ингибирования активности Na^+/K^+ -АТФазы строфантином G (5 мкМ) потенцировало Ca^{2+} -блокирующий эффект SS-68. В этих условиях действие амиодарона на Ca^{2+} -обмен практически не изменялось. Таким образом, в отличие от SS-68, эффект амиодарона и дронедарона на $[Ca^{2+}]_{цит}$ в кардиомиоцитах складывается из их прямого влияния на Ca^{2+} -обмен и непрямого действия, реализуемого через механизм ингибирования Na^+ -зависимого подъема $[Ca^{2+}]_{цит}$.

Увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в кардиомиоцитах может быть опосредовано как активацией потенциал зависимых Ca^{2+} -каналов, так и открытием рецептор управляемых Ca^{2+} -каналов наружной плазматической мембраны и мембран саркоплазматического ретикулума. Вход внеклеточного Ca^{2+} через потенциал чувствительные каналы блокируют антиаритмические препараты IV класса – антагонисты Ca^{2+} -каналов (верапамил, дилтиазем и др.). Регулирующее влияние на Ca^{2+} -гомеостаз кардиомиоцитов антиаритмических препаратов II класса – блокаторов β -адренорецепторов определяется их способностью препятствовать активации лиганд зависимых Ca^{2+} -каналов.

Влияние на K^+ -каналы. Ограничения при регистрации K^+ тока с использованием флуоресцентного индикатора ионов K^+ PBF1 позволили нам оценить только качественные изменения внутриклеточного содержания $[K^+]_{цит}$.

Электрическая стимуляция кардиомиоцитов сопровождалась заметным снижением интенсивности флуоресценции зонда, регистрируемым в течение 2 мин. (рис. 2).

Соединение SS-68, амиодарон и дронедарон влияли как на абсолютные величины флуоресценции, так и динамику изменения флуоресценции PBF1 (рис. 3). В зависимости от выраженности K^+ -блокирующих свойств исследуемые вещества можно расположить в следующий ряд: SS-68 > дронедарон > амиодарон.

Таким образом, производное индола SS-68 и взятые в качестве референтных препаратов амиодарон и дронедарон в условиях нестимулированных кардиомиоцитов (как интактных, так и ишемизированных) вызывают практически равнозначное дозозависимое снижение в них концентрации $[Na^+]_{цит}$.

В случаях стимулированных кардиомиоцитов (интактных и ишемизированных) SS-68, амиодарон и дронедарон оказывают ингибирующее действие на увеличение $[Na^+]_{цит}$ как в зависимости от дозы, так и от частоты их электрической стимуляции, причем глубина Na^+ -блокирующего действия амиодарона на стимулированных клетках была существенно большей, чем на нестимулированных; SS-68 проявляло амиодаронподобное действие; дронедарон в меньшей степени ингибировал $[Na^+]_{цит}$ и так же, как амиодарон и SS-68, проявлял большую активность на стимулированных кардиомиоцитах.

В отличие от соединения SS-68, эффект амиодарона и дронедарона на $[Ca^{2+}]_{цит}$ в кардиомиоцитах складывается из его прямого влияния на Ca-обмен и непрямого действия, реализуемого через механизм ингибирования Na-зависимого подъема $[Ca^{2+}]_{цит}$.

По способности оказывать K^+ -блокирующее действие SS-68 превосходит дронедарон и амиодарон соответственно.

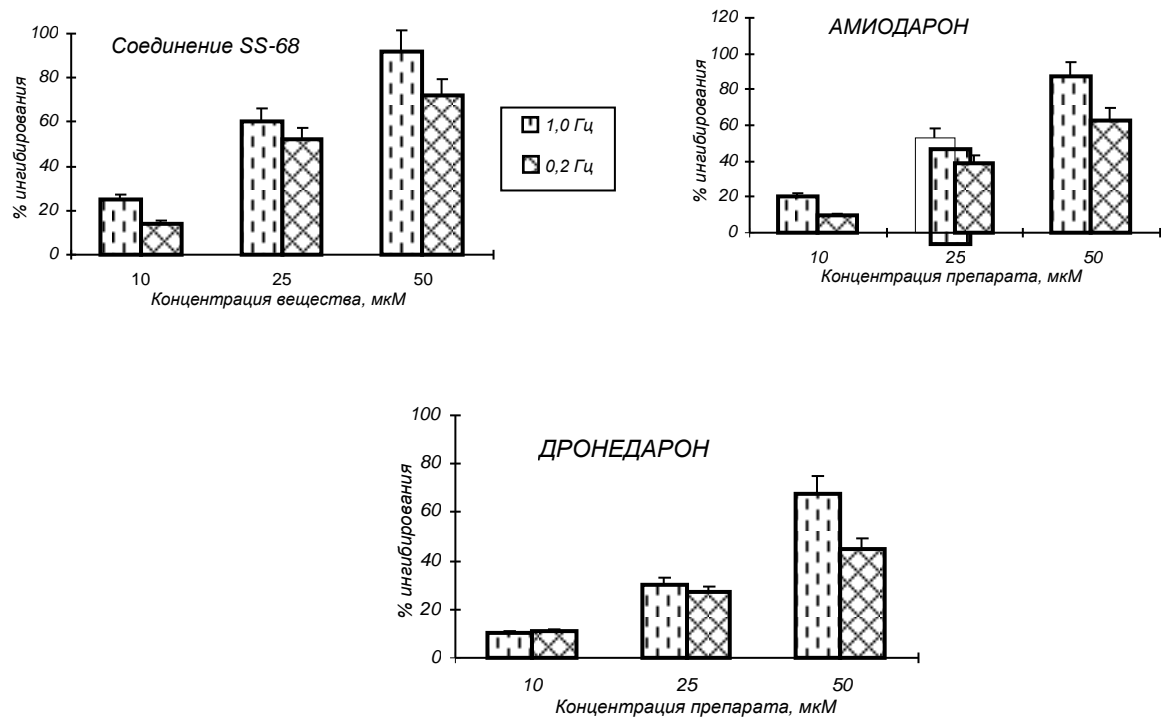


Рис. 1. Сравнительная эффективность Na^+ -блокирующего действия соединения SS-68, амиодарона и дронедарона в условиях экспериментальной гипоксии

Условия: кардиомиоциты стимулировали током с частотой 1,0 Гц и 0,2 Гц. По оси ординат – % ингибирования подъема $[\text{Na}^+]_{\text{цит}}$, вычисленный по формуле:

$$\{1 - (\Delta\text{Na}_0 / \Delta\text{Na}_k)\} \cdot 100\%$$

где ΔNa_0 и ΔNa_k – изменение внутриклеточной концентрации Na^+ за время 30-минутной инкубации в опытных (в присутствии блокатора Na^+ -каналов) и в контрольных образцах (в отсутствие исследованных веществ).

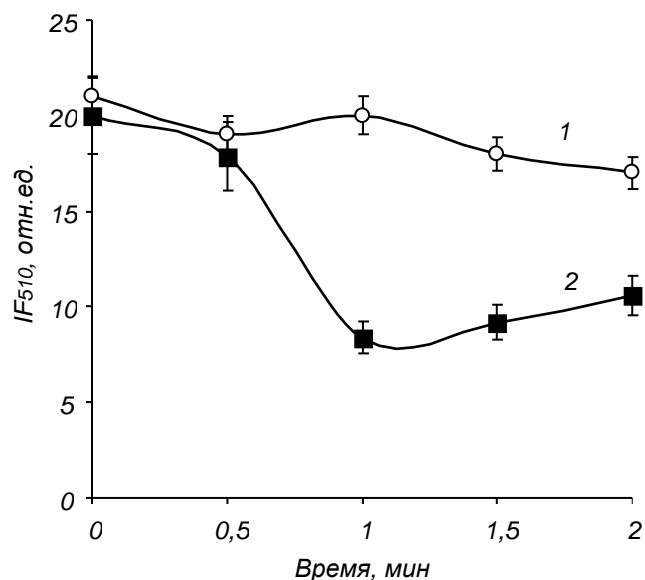


Рис. 2. Флуоресценция (510 нм) покоящихся (1) и стимулированных (2) (электрическими импульсами 1,0 Гц) кардиомиоцитов

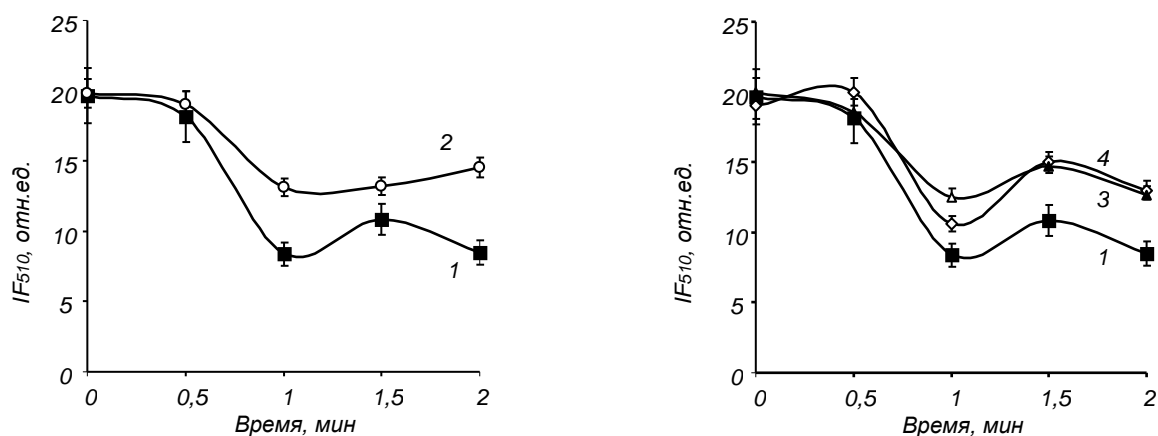


Рис. 3. Динамика изменений флуоресценции зонда PBF1 при электрической стимуляции кардиомиоцитов в отсутствие (1) и в присутствии SS-68 (2), дронадарона (3) и амиодарона (4), взятых в концентрации 50 мкМ

Литература:

1. 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.
2. Vaughan-Williams E.M. Classification of antiarrhythmic drugs // J. Cardiovasc. Pharmacol. 1992. Suppl. 2. P. SI-S7.
3. 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.
4. 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.
5. Lactate Transport in Mammalian Ventricle General Properties and Relation to K⁺ Fluxes / Ru-Chi Shieh [etc.] // Circulation Research. 1994. Vol. 74, №5. P. 829-838.

References:

1. Antiarrhythmic activity of new indole derivatives / Bogus S.K. // IV Congress of Pharmacologists of Russia "Innovations in modern pharmacology: materials of the Congress, Kazan, 18 - 21 September 2012. M.: Folium, 2012. P. 23.
2. Vaughan-Williams E.M. Classification of antiarrhythmic drugs // J. Cardiovasc. Pharmacol. 1992. Suppl. 2. P. SI-S7.
3. 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.
4. 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.
5. Lactate Transport in Mammalian Ventricle General Properties and Relation to K⁺ Fluxes / Ru-Chi Shieh [etc.] // Circulation Research. 1994. Vol. 74, № 5. P. 829 – 838.