

Изучение электрофизиологических механизмов действия соединения ЛМГ-124

Цорин И.Б.¹, Зинченко В.П.², Теплов И.Ю.², Косенков А.М.²,
Муринов Ю.И.³, Юнусов М.С.³, Крыжановский С.А.¹

¹ – ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», г. Москва

² – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки Российской академии наук (ИБК РАН), г. Пущино

³ – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Уфимский Институт химии Российской академии наук (УФИХ РАН), г. Уфа

Резюме. В экспериментах *in vitro*, выполненных на изолированных нейронах гиппокампа крыс, изучали электрофизиологические механизмы, лежащие в основе антиаритмической активности комплексного соединения ЛМГ-124, содержащего в своём составе антиаритмическое средство IC класса классификации Vaughan Williams — лаппаконитина гидробромид. В качестве препарата сравнения использовали прототип — лаппаконитина гидробромид. Электрическую активность нейронов регистрировали методом patch-clamp в конфигурации whole cell. Показано, что соединение ЛМГ-124 эффективно ингибирует быстрый входящий Na⁺ ток, протекающий через трансмембранные потенциал-зависимые быстрые Na⁺ каналы. Этот эффект соединения ЛМГ-124 реализуется на уровне открытого Na⁺ канала. Как следует из полученных данных, соединение ЛМГ-124, в отличие от лаппаконитина гидробромид, блокирует не только Na⁺ каналы, но частично и K⁺ каналы, в силу чего его можно отнести к антиаритмическим лекарственным средствам, потенциально обладающим свойствами антиаритмиков Ia класса, по классификации Vaughan Williams.

Ключевые слова: соединения ЛМГ-124, лаппаконитина гидробромид, patch-clamp, Na⁺ токи, K⁺ токи

The study of electrophysiological mechanisms of the action compounds LMG-124

Tsorin I.B.¹, Zinchenko V.P.², Teplov I.Yu.², Kosenkov A.M.², Murinov Yu.I.³, Yunusov M.S.³, Kryzhanovskii S.A.¹

¹ – FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

² – FSBI «Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences» (ICB RAS), Pushchino

³ – FSBI «Ufa Institute of Chemistry of the Russian Academy of Sciences» (UIC RAS), Ufa

Resume. *In vitro* experiments performed on the isolated rats hippocampal neurons, the antiarrhythmic activity electrophysiological mechanisms of the complex compound LMG-124 containing an antiarrhythmic agent of the class I by Vaughan Williams, Lappaconitine hydrobromide, were studied. As the reference preparation, a prototype, Lappaconitine hydrobromide, was used. The electrical activity of the neurons was recorded by the patch-clamp method in the whole cell configuration. It is shown that the compound LMG-124 effectively inhibits the fast incoming Na⁺ current flowing through transmembrane potential-dependent fast Na⁺ channels. This effect of the LMG-124 connection is realized at the level of the open Na⁺ channel. As follows from the data obtained, the LMG-124 compound, in contrast to Lappaconitine hydrobromide, blocks not only Na⁺ channels, but also partially and K⁺ channels, so that it can be attributed to antiarrhythmic drugs potentially possessing anti-arrhythmic properties of the Ia class by Vaughan classification Williams.

Keywords: LMG-124 compounds, Lappaconitine hydrobromide, patch-clamp, Na⁺ currents, K⁺ currents

Автор, ответственный за переписку:

Крыжановский Сергей Александрович – д.м.н., заведующий лабораторией фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»; 125315, г. Москва, ул. Балтийская, 8; тел.: +7 (495) 601-21-85; e-mail: SAK-538@yandex.ru

Введение

Лаппаконитин — алкалоид, получаемый из растения аконит белоустный (лат. *Aconitum leucostomum*) [1]. Созданный на его основе лекарственный препарат лаппаконитина гидробромид (син. аллапинин), согласно классификации Vaughan Williams, относится к антиаритмическим лекарственным средствам IC класса [2]. Антиаритмики IC класса — это т.н. мембраностабилизирующие препараты, являющиеся блокаторами трансмембранных потенциал-зависимых быстрых натриевых каналов [3]. Антиаритмическое действие этих препаратов основано на удлинении фаз быстрой деполяризации и медленной деполяризации [4, 5]. Эти фазы обеспечиваются работой

натриевых каналов. Фаза быстрой деполяризации обеспечивает генерацию потенциала действия, когда в процесс вовлекается большое количество высокопороговых потенциал-зависимых натриевых каналов. Фаза медленной деполяризации — это фаза, предшествующая генерации потенциала действия. В это время открываются низкопороговые потенциал-зависимые натриевые каналы [6]. Функция этих каналов — поднять потенциал мембраны до порога, достаточного для генерации потенциала действия. Таким образом, удлинение фазы быстрой деполяризации увеличивает продолжительность переднего фронта потенциалов действия, а удлинение фазы медленной деполяризации увеличивает интервалы между ними и снижает частоту сердечных сокращений [7].

Антиаритмики IC вызывают выраженное угнетение скорости деполяризации и амплитуды фазы 0 потенциала действия кардиомиоцитов и, как следствие этого, замедление процессов проведения и возбуждения в миокарде предсердий и желудочков.

В клинике лаппаконитина гидробромид применяют для лечения желудочковой и наджелудочковой экстрасистолии; пароксизмальной наджелудочковой тахикардии, в том числе и при синдроме Вольфа–Паркинсона–Уайта; пароксизмах трепетания и мерцания предсердий; пароксизмальной желудочковой тахикардии в случае отсутствия органических изменений миокарда [8, 9]. Однако он, так же как и другие антиаритмики IC класса, обладает большим количеством побочных эффектов, в том числе и проаритмическим действием [10].

Цель настоящего исследования — изучение особенностей электрофизиологических механизмов действия нового оригинального отечественного комбинированного антиаритмического лекарственного средства ЛМГ-124, содержащего в своём составе лаппаконитина гидробромид, однако отличающегося от него тем, что оно реализует свои антиаритмические эффекты в более низких дозах и тем самым потенциально менее токсично.

Методы

Первичная культура клеток гиппокампа

В работе использовали смешанную нейроглиальную культуру клеток гиппокампа, выделенную из мозга новорождённых (P1-3) крыс линии Вистар. После декапитации извлекали мозг и переносили его в чашку Петри с холодным раствором Версена на лёду. Мозг разрезали вдоль, удаляли сосудистые оболочки, средний и задний мозг. Извлекали гиппокамп и переносили в холодный раствор Версена. Далее ткань аккуратно измельчали ножницами и помещали в раствор Версена с добавлением 0,1% трипсина и инкубировали 10 мин при 37 °С на термошейкере при 600 об/мин. Затем кусочки ткани трижды отмывали нейробазальной средой (Neurobasal A) и диссоциировали путём энергичного пропускания через наконечник пипетки. Полученную суспензию центрифугировали 3 мин при 300 g. Супернатант удаляли, клетки ресуспендировали в нейробазальной среде с добавлением глутамина (0,5 мМ), Supplement B27 (2%), гентамицина (15 мкг/мл). Готовую суспензию помещали в стеклянные цилиндры со шлифованными торцами с внутренним диаметром 6 мм, поставленные на круглые покровные стекла диаметром 25 мм (VWR International), покрытые полиэтиленгликолем из расчёта 1 гиппокамп на 10 стекол и помещали в 35 мм чашки Петри (Greiner). В каждый цилиндр помещали 100 мкл суспензии клеток и оставляли на 1 ч для прикрепления в CO₂-инкубаторе при 37 °С. После этого цилиндры извлекали, а объём культуральной среды доводили до 1,5 мл. Дважды в неделю культуральную среду (2/3 объёма) меняли на

свежую. В экспериментах использовали клетки как возрастом 1–3 дня (до образования нейронных сетей), так и возрастом 9–14 дней культивирования (после образования нейронных сетей).

Patch-clamp регистрация в конфигурации «whole cell»

Электрическую активность нейронов регистрировали методом patch-clamp в конфигурации whole cell, с помощью усилителя Axopatch 200 B (Axon Instruments), ЦАП-АЦП конвертера DigiData 1440A и пакета лицензионных программ pClamp 10,2 (Axon Instruments). Все эксперименты выполнялись при 24–27 °С. В качестве внеклеточного раствора использовали среду Хенкса (мМ): NaCl — 139, NaHCO₃ — 4,17, NaH₂PO₄ — 0,4, KCl — 2,1, KH₂PO₄, CaCl₂ — 1,25, MgSO₄ — 1,25, HEPES — 8, D-глюкоза — 8, pH — 7,4 (для доведения pH использовался раствор NaOH). Внутриклеточный раствор для заполнения микроэлектродов имел следующий состав в мМ: метансульфонат калия — 145, KCl — 20, Hepes — 10, EGTA — 0,5, MgCl₂ — 1, pH = 7,2 (для доведения pH использовался раствор KOH). Сопротивление кончика пипетки 4,5–6 МОм. Рассматривались лишь клетки со значением сопротивления доступа не более 25 МОм.

Для исследования натриевых токов использовалась культура нейронов гиппокампа возрастом 1–3 дня. Для записи натриевых токов использовался внутриклеточный раствор, в котором все соли калия были заменены на соли цезия с целью ингибирования калиевых токов (для доведения pH использовался раствор CsOH). Записи производились в режиме фиксации потенциала. После добавки вещества на клетку подавались ступеньки напряжения — 30 мV (ток достигал максимальных значений у большинства клеток при этом стимуле) продолжительностью 50 мс, с интервалом 5 с на протяжении 5 мин. Для стандартизации значений токов, результаты записи с каждой клетки делились на ёмкость данной клетки.

Для исследования влияния препарата ЛМГ-124 и прототипа лаппаконитина гидробромид на вызванные потенциалы действия и интервалы между ними были использованы культуры возрастом 9–10 дней. Записи производились в режиме фиксации тока. На клетки подавались токовые стимулы различных значений (от 10 до 200 pA с шагом 5 pA), продолжительность стимуляции составляла 500 мс, интервалы между стимулами 5 с. Регистрацию напряжения производили до и после 5-минутной стимуляции, аналогично опытам по регистрации тока. Эксперименты с каждой концентрацией веществ были повторены не менее чем на 3 культурах. Растворы исследуемых веществ каждый раз готовились непосредственно перед экспериментом.

Соединение ЛМГ-124 и прототип лаппаконитина гидробромид были представлены для исследований Федеральным государственным бюджетным учреждением науки Уфимский институт химии Российской академии наук (УФИХ РАН).

Результаты

Изучение влияния соединения ЛМГ-124 на трансмембранный Na^+ ток

В предварительных экспериментах было показано, что как лаппаконитина гидробромид, так и ЛМГ-124, обладают способностью постепенно ингибировать Na^+ каналы. Натриевый канал плазматической мембраны возбудимых клеток может находиться в открытом, закрытом и инактивированном состояниях. При достижении порога активации он открывается и инактивируется через 1–2 мс. В этом состоянии он пребывает всё оставшееся время, пока мембрана остаётся деполяризованной. Согласно литературным данным, лаппаконитина гидробромид связывается с Na^+ каналом тогда, когда тот находится в открытом состоянии [12]. Поэтому при регистрации суммарного эффекта ингибирование натриевого тока развивается во времени. Соответственно, чем чаще происходит стимуляция клетки, тем больше каналов будет заблокировано. В связи с этим, для получения концентрационных зависимостей действия лаппаконитина гидробромид и ЛМГ-124 на натриевый ток, клетки предварительно инкубировали с исследуемыми соединениями от 0 до 20 мин. Для увеличения времени нахождения Na^+ каналов в открытом состоянии клетки подвергались стимуляции с различной частотой на протяжении 5 мин. Концентрации изучаемых соединений изменяли от 50 до 500 мкМ.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что соединение ЛМГ-124 эффективно блокирует быстрый входящий Na^+ ток в концентрациях вдвое меньше, чем прототип — лаппаконитина гидробромид: соответственно 125–150 мкМ и 250–500 мкМ. На рис. 1 показаны изменения Na^+ тока после 5 мин стимуляции (деполяризация — 30 мВ) с частотой 0,2 Гц в контроле

и в присутствии 250 и 500 мкМ лаппаконитина гидробромид или 125 и 150 мкМ ЛМГ-124.

Как видно из рис. 1, оба соединения ингибируют амплитуду быстрого Na^+ тока. Полное ингибирование Na^+ тока в этих условиях наблюдалось при 500 мкМ лаппаконитина гидробромид и при 150 мкМ ЛМГ-124.

Кинетику увеличения степени ингибирования регистрировали в течение 20 мин в присутствии различных концентраций соединений. На рис. 2А показано изменение амплитуды Na^+ тока во времени, в течение 20 мин, при измерении каждые 5 мин в присутствии различных концентраций соединений. Показано, что ингибирование увеличивается в течение 20 мин после аппликации исследуемых соединений. Исходная амплитуда Na^+ тока в каждом эксперименте была принята за 1. Полное ингибирование натриевого тока за 20 мин достигалось для лаппаконитина гидробромид при концентрации 500 мкМ, а для ЛМГ-124 — при 150 мкМ.

На рис. 2 демонстрируется постепенное нарастание степени ингибирования Na^+ тока в течение 20 мин при стимуляции 1 раз в 5 мин в присутствии различных концентраций лаппаконитина гидробромид (рис. 2А) или ЛМГ-124 (рис. 2В). Нарастание ингибирования во времени объясняется тем, что лаппаконитина гидробромид и его производное (ЛМГ-124) связывается с Na^+ каналом, когда тот находится в открытом состоянии, т. е. ингибирование происходит, главным образом, в момент стимуляции клетки.

Для изменения времени нахождения канала в открытом состоянии в следующем эксперименте оценивали степень ингибирования канала при увеличенной частоте стимуляции. На рис. 3 демонстрируется постепенное нарастание степени ингибирования Na^+ тока в течение 5 мин при стимуляции с частотой 0,2 Гц в присутствии различных концентраций лаппаконитина гидробромид (рис. 3А) или ЛМГ-124 (рис. 3В).

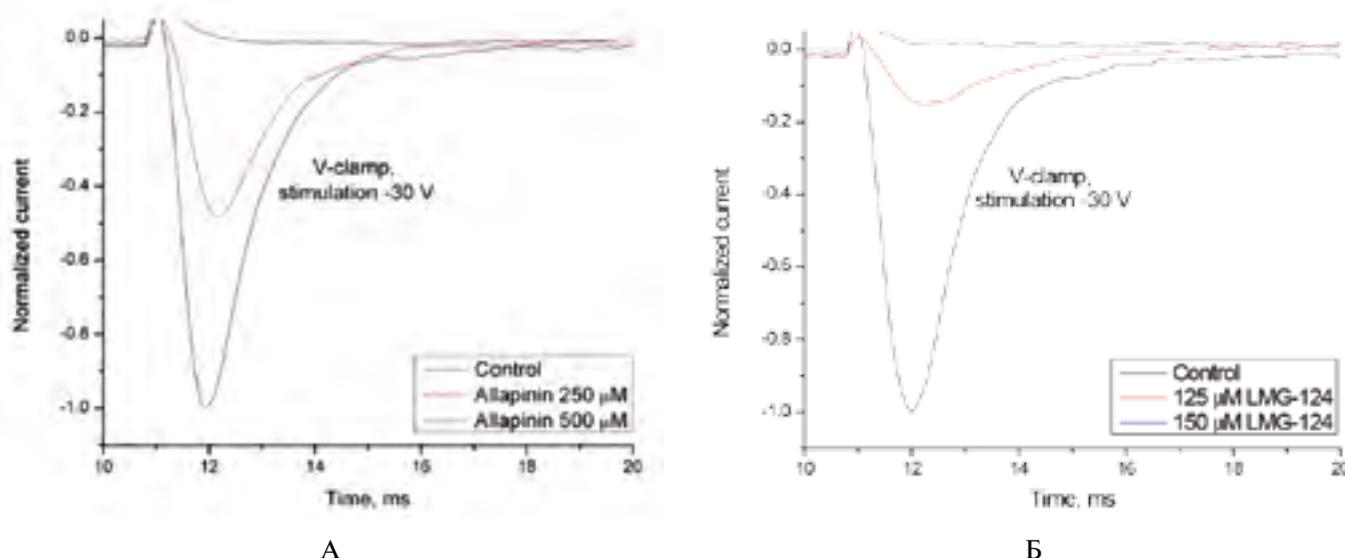


Рис. 1. Изменение входящего натриевого тока после 5 мин стимуляции (максимальная амплитуда тока в контроле принята за 1). В присутствии 250 и 500 мкМ лаппаконитина гидробромид (А) и 120–150 мкМ ЛМГ-124 (Б)

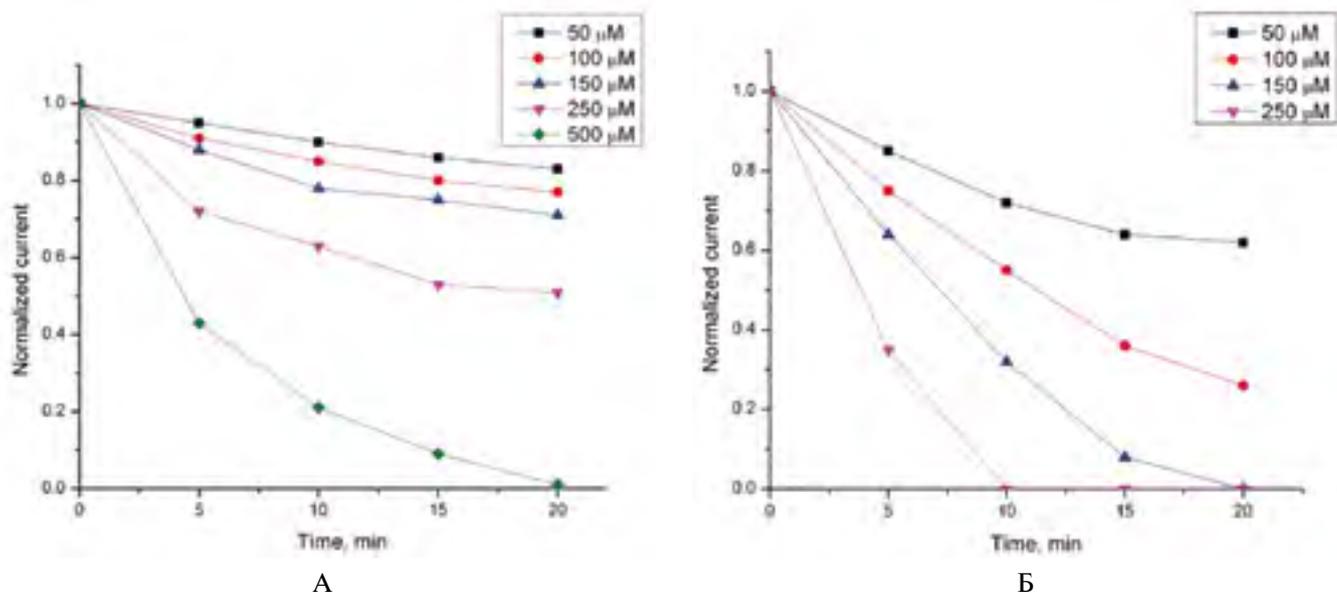


Рис. 2. Пассивное изменение амплитуды Na^+ тока в течение 20 мин. А – после добавки различных концентраций лаптаконитина гидробромида; Б – после добавки различных концентраций ЛМГ-124

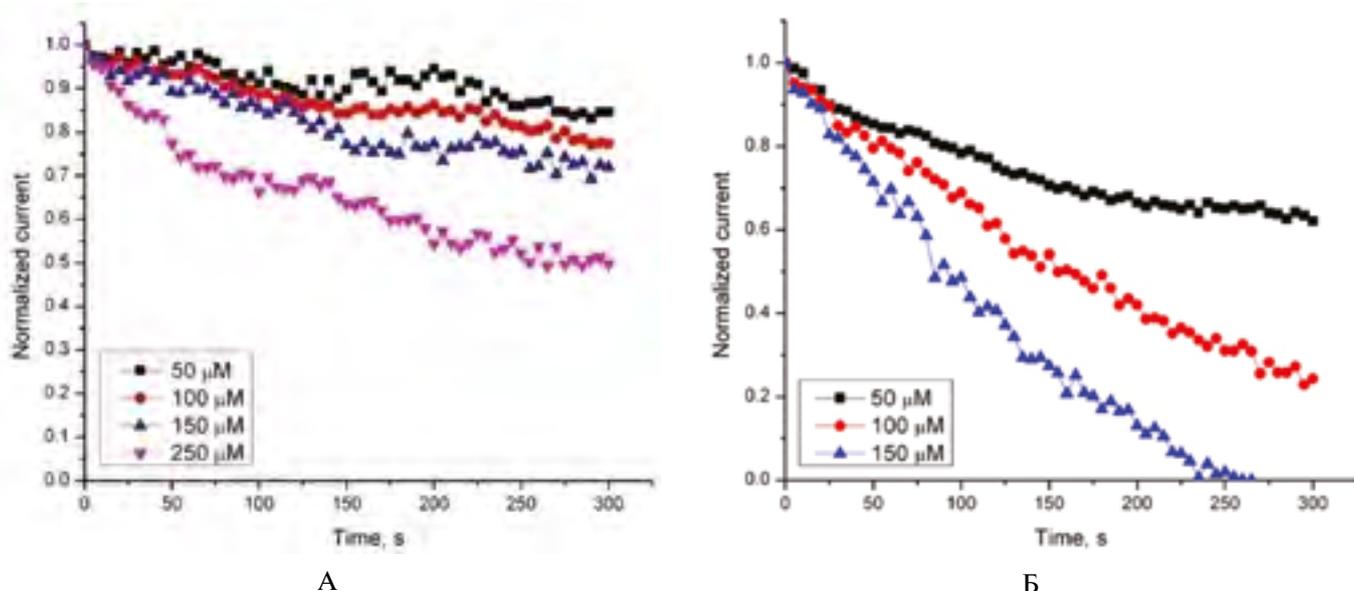


Рис. 3. Изменение амплитуды натриевого тока в течение 5 мин стимуляции с частотой 0,2 Гц. А – в присутствии 50, 100, 150 и 250 мкМ лаптаконитина гидробромида; Б – в присутствии 50, 100 и 150 мкМ ЛМГ-124

И что важно, как следует из рис. 4, ЛМГ-124 гораздо эффективней подавляет Na^+ ток, чем лаптаконитина гидробромид.

На рис. 4А, 4В суммированы данные зависимости эффекта ингибирования от концентрации для лаптаконитина гидробромида и ЛМГ-124 при низкой частоте стимуляции (4А). На рис. 4В эти же данные сравниваются с данными титровки при высокой частоте стимуляции. Как следует из полученных данных (рис. 4), максимальное ингибирование Na^+ канала достигается тем быстрее, чем чаще производится стимуляция.

Действие ЛМГ-124 на вызванные потенциалы действия

Для исследования влияния ЛМГ-124 на частоту и различные фазы потенциалов действия были использованы культуры нейронов гиппокампа возрастом 9–10 дней, в режиме фиксации тока. Производилась контрольная запись вызванных потенциалов действия, после чего на «запэчтенный» нейрон проводилась аппликация препарата, затем клетка подвергалась стимуляции на протяжении 5 мин (как в предыдущих экспериментах), далее запись вызванных потенциалов действия повторялась.

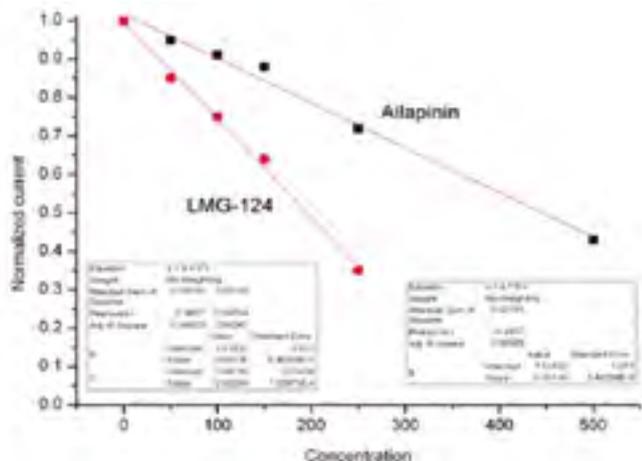


Рис. 4А. Линейная зависимость амплитуды Na^+ тока, измеренного через 5 мин инкубации с соединениями, от концентрации лаппаконитина гидробромид (чёрные квадраты) и ЛМГ-124 (красные кружочки). Здесь и далее в таблицах приведены данные линейной аппроксимации

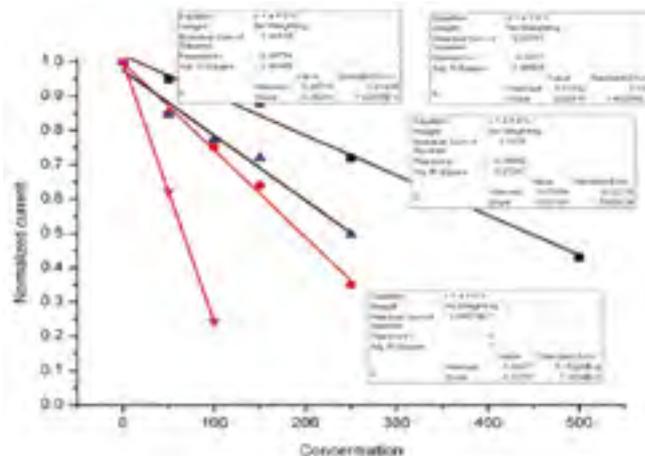
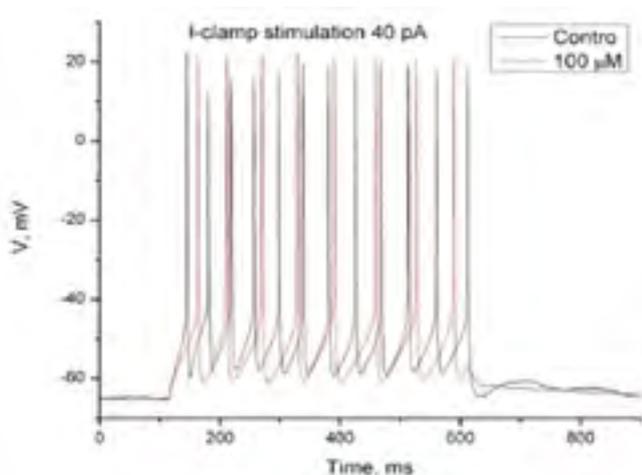
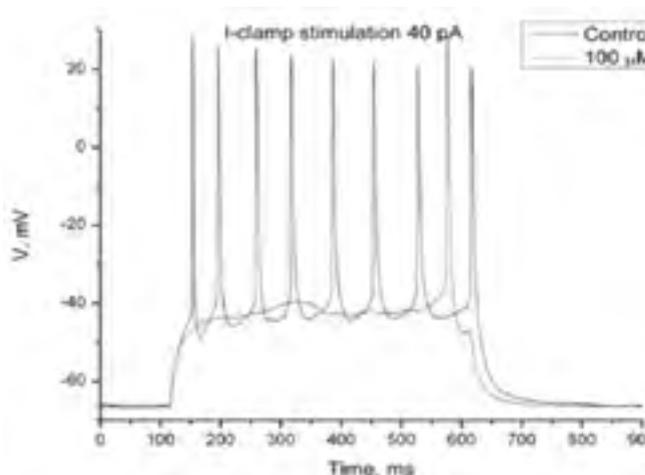


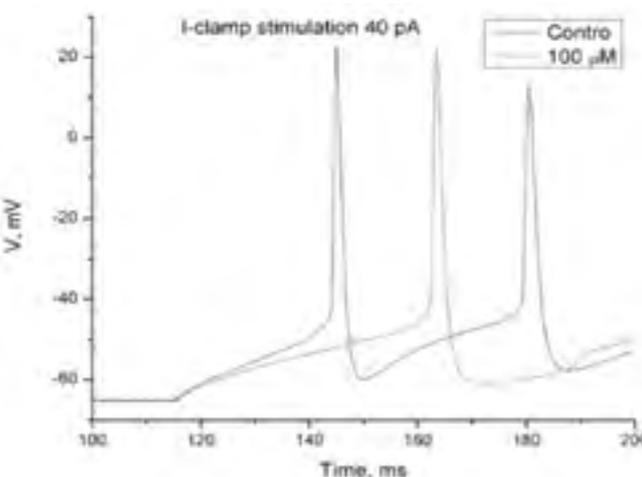
Рис. 4В. Линейная зависимость амплитуды Na^+ тока, измеренного через 5 мин инкубации с соединениями, при стимуляции 1/5 мин и 60/5 мин (треугольники) (лаппаконитина гидробромид – чёрные прямые), (ЛМГ-124 – красные прямые). Пересечения с «Х» наблюдается при более 130, 380, 500, 900 мкМ, соответственно



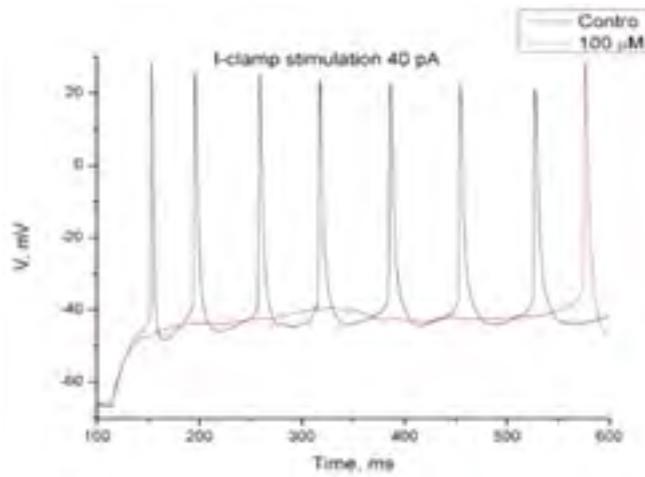
A1



B1



A2



B2

Рис. 5. Генерация потенциалов действия, вызванных деполяризующим током 40 пА в контроле и в присутствии 100 мкМ лаппаконитина гидробромид (А) и ЛМГ-124 (Б). На растянутом по времени рис. А2 видно, что соединения тормозят медленную фазу деполяризации без изменения амплитуды ПД. Показано, что в присутствии ЛМГ-124 (рис. Б2) требуется гораздо большее время до генерации первого потенциала действия

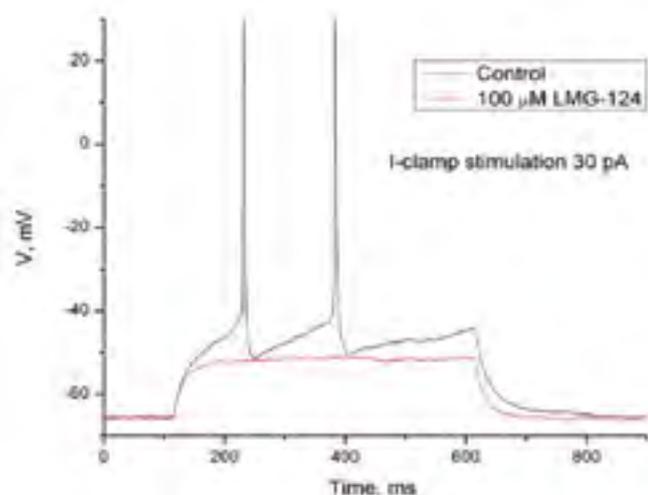


Рис. 6. Генерация ПД в контроле (control) и отсутствие генерации ПД на фоне 100 μM ЛМГ-124 (красная кривая) при постоянном токе 30 pA

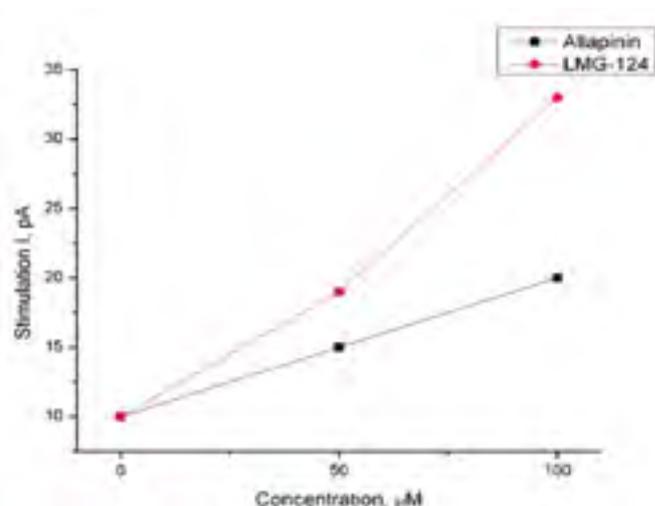


Рис. 7. Зависимость значений тока, необходимых для генерации клеткой 1-го потенциала действия, от концентрации препаратов

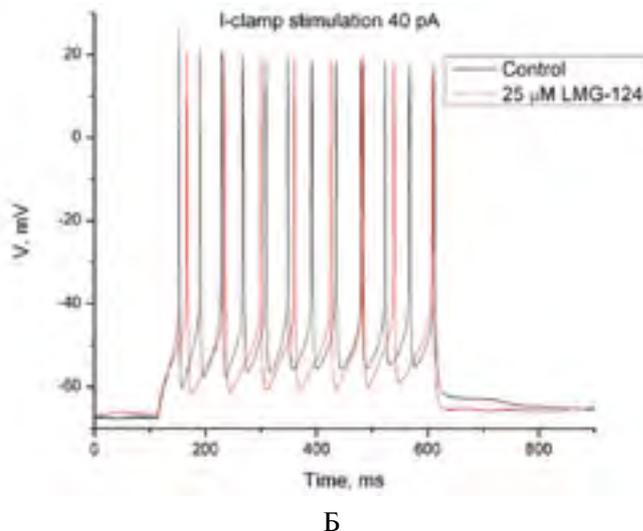
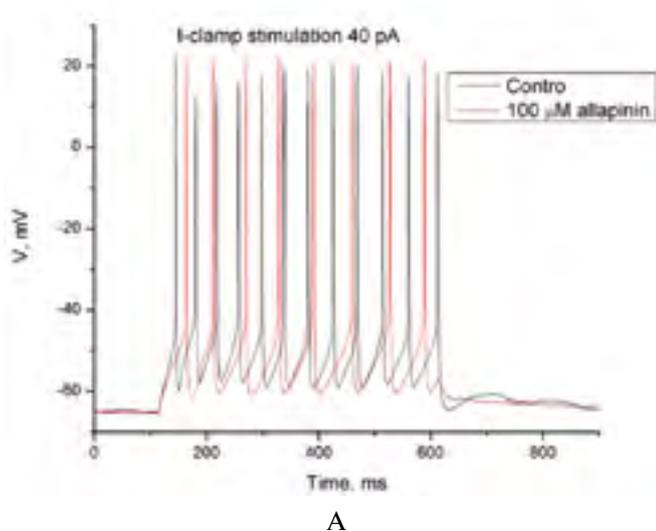


Рис. 8. Уменьшение частоты потенциалов действия в вызванной пачке в присутствии 100 μM лаптаконитина гидробромида (8А) и 25 μM ЛМГ-124 (8Б) при токе 40 pA

Как лаптаконитина гидробромид, так и ЛМГ-124 вызывают увеличение времени до генерации первого потенциала действия по сравнению с контролем. Это связано с замедлением медленной фазы деполяризации из-за блокировки Na^+ каналов. Как видно из рис. 6, ЛМГ-124 увеличивает время до генерации первого потенциала действия значительно сильнее. Таким образом, для деполяризации клетки до порогового уровня в присутствии соединений требуется больший токовый стимул, нежели в контроле (рис. 5, 6).

Это связано с тем, что в присутствии исследуемых соединений уменьшается число функционирующих Na^+ каналов и снижается проводимость мембраны клетки. На рис. 7 приведены зависимости значений

тока, необходимых для генерации клеткой первого потенциала действия, от концентрации лаптаконитина гидробромида и ЛМГ-124. Показано, что эффект наблюдается для всех концентраций соединений.

Уменьшение частоты потенциалов действия под действием соединений

ЛМГ-124, так же как и лаптаконитина гидробромид, вызывает уменьшение частоты потенциалов действия в пачке. Как видно из рис. 5 и 8, уменьшение частоты связано, в основном, с увеличением продолжительности фазы медленной деполяризации.

Необходимо отметить, что, в отличие от лаптаконитина гидробромида, ЛМГ-124 вызывает более вы-

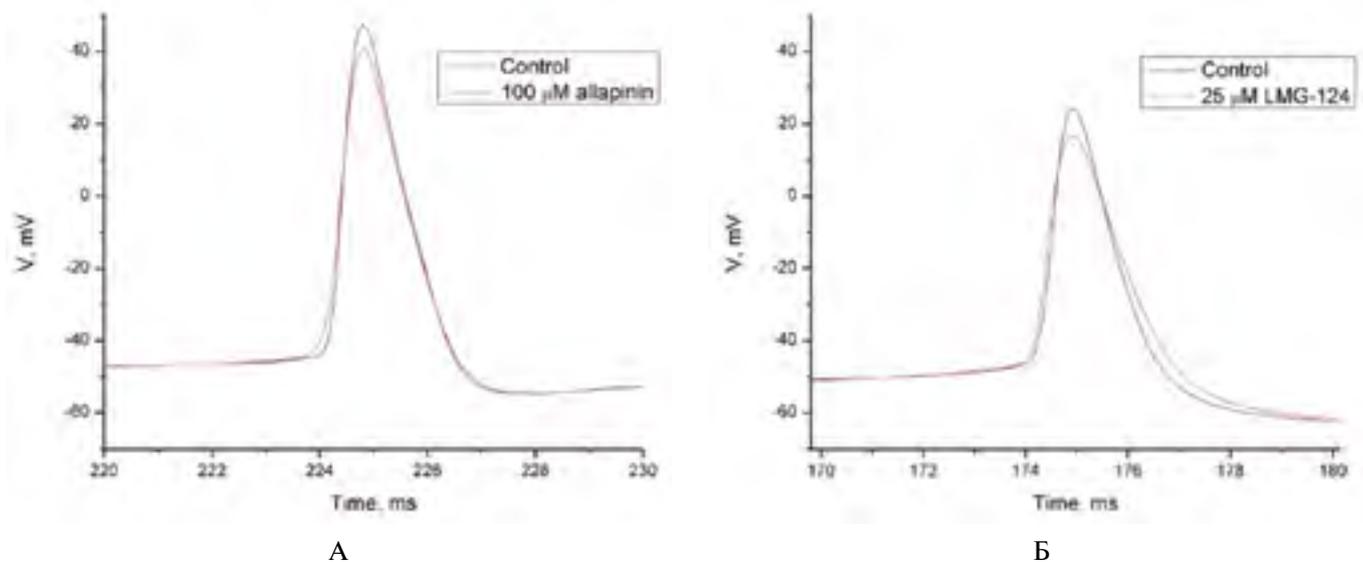


Рис. 9. Совмещение первых потенциалов действия в вызванной пачке в контроле (чёрные кривые) и в присутствии 100 мкМ лаппаконитина гидробромида (рис. 9А) и 25 мкМ ЛМГ-124 (рис. 9Б). В присутствии ЛМГ-124 заметно уменьшение крутизны, как в фазе деполяризации, так и в фазе реполяризации

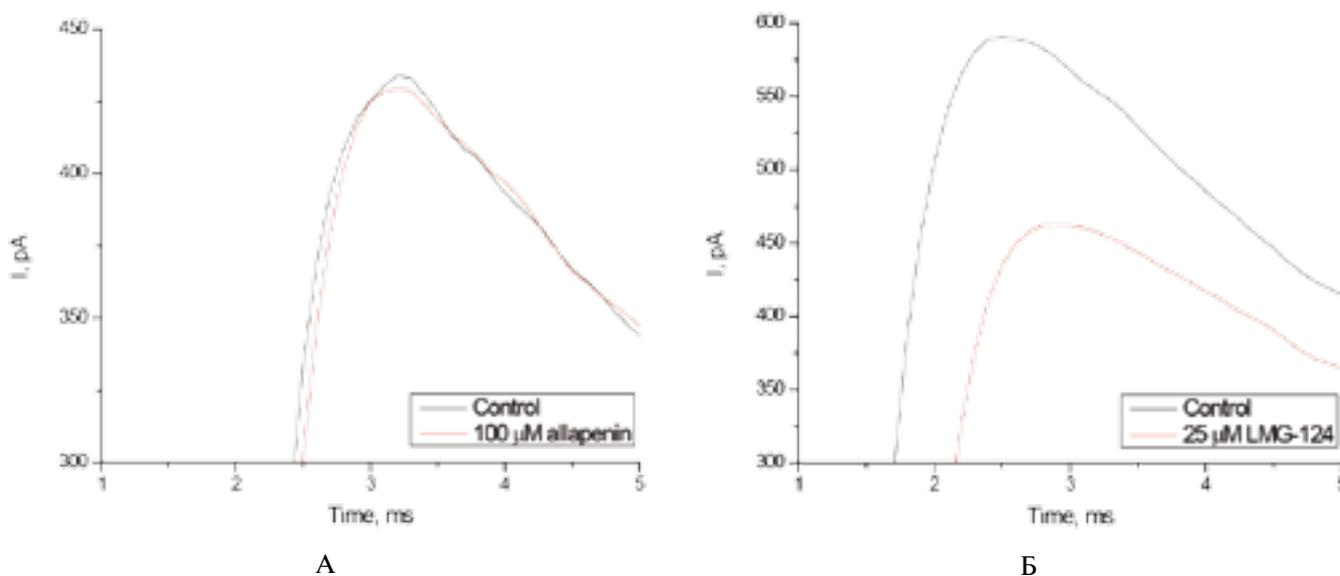


Рис. 10. Изменение выходящего калиевого тока в контроле (чёрные кривые) и в присутствии 100 мкМ лаппаконитина гидробромида и 25 мкМ ЛМГ-124 через 5 мин стимуляции. Видно, что ЛМГ-124 заметно подавляет калиевый ток

раженное увеличение продолжительности потенциала действия, связанное с замедлением фазы реполяризации, за которую отвечают и K^+ каналы (рис. 9).

Для доказательства этого предположения мы измерили калиевый ток в контроле и в присутствии соединений. На рис. 10 показано изменение K^+ токов в присутствии 100 мкМ лаппаконитина гидробромида и 25 мкМ ЛМГ-124 через 5 мин стимуляции. ЛМГ-124 вызывает заметное снижение амплитуды K^+ тока, в то время как лаппаконитина гидробромид практически не влияет на K^+ ток.

Выводы

1. Соединение ЛМГ-124 эффективно ингибирует быстрый входящий Na^+ ток, протекающий через трансмембранные потенциал-зависимые быстрые Na^+ каналы.

2. Обнаруженный эффект постепенного ингибирования Na^+ канала характерен для обоих соединений (лаппаконитина гидробромида и соединения ЛМГ-124) и указывает на то, что их ингибирующий эффект реализуется на уровне открытого Na^+ канала.

3. Выявленные концентрационные зависимости действия (доза—эффект) лаппаконитина гидробромида и соединения ЛМГ-124 на натриевый ток свидетельствуют о том, что эффективная доза соединения ЛМГ-124 во всех случаях в 2М-4 раза ниже, чем у лаппаконитина гидробромида.

4. Соединение ЛМГ-124 более эффективно, чем лаппаконитина гидробромид, ингибирует медленную

фазу деполяризации клеток, что приводит к уменьшению частоты потенциалов действия в пачке;

5. В отличие от лаппаконитина гидробромида, соединение ЛМГ-124 блокирует не только Na^+ каналы, но, частично и K^+ каналы, в силу чего его можно отнести к антиаритмическим лекарственным средствам, потенциально обладающим свойствами антиаритмиков Ia класса по классификации Vaughan Williams.

Литература

1. Соколов С.Ф. Аллапинин и современные подходы к лечению нарушений ритма сердца. РМЖ 2012, 4:177-184.
2. Свиридова Н.В., Самсонова И.В. Электрофизиологические эффекты и сфера клинического применения антиаритмического препарата аллапинин. Allapinin.ru/images/electrofis.pdf
3. Крыжановский С.А., Вититнова М.Б. Антиаритмические лекарственные средства. М.: Академия; 2008.
4. Соловьян А.Н., Михалева Т.В., Михалев К.А. Классификация и механизмы действия антиаритмических препаратов. Ліки України 2015, 190(4): 12-20.
5. Issa Z., Miller J., Zipes D. Clinical arrhythmology and electrophysiology: A companion to Braunwald's heart disease. 1st ed. Philadelphia: Saunders; 2012.
6. Sheets M.F., Fozzard H.A., Lipkind G.M., Hanck D.A. Sodium channel molecular conformations and antiarrhythmic drug affinity. Trends Cardiovasc Med 2010, 20 (1): 16–21.
7. Burashnikov A., Antzelevitch C. Role of late sodium channel current block in the management of atrial fibrillation. Cardiovasc Drugs Ther 2013, 27 (1): 79–89.
8. Соколов С.Ф., Джакханганов Ф.Н. Антиаритмический препарат аллапинин: Обзор результатов клинических исследований. Кардиология 2002, 42 (7): 96–102.
9. Соколов С.Ф., Бакалов С.А., Миронова Н.А., Рогова М.М., Малкина Т.А., Голицын С.П. Эффективность и безопасность аллапинина в кратко- и долгосрочной терапии пациентов с нормальным сердцем и желудочковой экстрасистолией. Кардиология 2014; 54 (1): 20–26.
10. Pratt C.M., Moye L.A. The cardiac arrhythmia suppression trial: background, interim results and implication. Am J Cardiol 1990; 65 (4): 20B–29B.
11. Greene H.L., Roden D.M., Katz R.J., Woosley R.L., Salerno D.M., Henthorn R.W. The cardiac arrhythmia suppression trial: first CAST ... then CAST-II. J Am Coll Cardiol 1992; 19 (5): 894–8.
12. Wright S.N. Irreversible block of human heart (hH1) sodium channels by the plant alkaloid lappaconitine. Mol Pharmacol 2001; 59 (2): 183–92.