

# Особенности антиаритмического действия соединения АЛМ-802

© Барчуков В. В.<sup>1</sup>, Зинченко В. П.<sup>2</sup>, Цорин И. Б.<sup>1</sup>, Теплов И. Ю.<sup>2</sup>, Столярук В. Н.<sup>1</sup>, Вититнова М. Б.<sup>1</sup>, Мокров Г. В.<sup>1</sup>, Крыжановский С. А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> — ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> — ФГБУН «Институт биофизики клетки Российской академии наук» (ИБК РАН), Пущино, Российская Федерация

**Аннотация. Введение.** Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) остаются одной из главных причин смерти во всем мире, ежегодно унося более 17 млн жизней. В связи с этим возникает актуальная задача — создание инновационных лекарств для борьбы с ССЗ. Одной из потенциальных мишеней для таких препаратов являются риадиноновые рецепторы 2 типа (RyR2), так как известно, что они играют важную роль в поддержании гомеостаза ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в кардиомиоцитах, а их аномальная активность играет одну из ключевых ролей в генезе нарушений сердечного ритма. **Цель исследования** — изучить механизмы, лежащие в основе антиаритмического действия АЛМ-802. **Методы.** На первом этапе были проведены эксперименты *in vivo* с использованием моделей аконитиновой, хлоридкальциевой, хлоридбариевой и реперфузионных аритмий для оценки антиаритмического эффекта соединения АЛМ-802. На втором этапе исследования в электрофизиологических экспериментах, выполненных на клетках гиппокампа новорождённых крыс, оценивали влияние соединения АЛМ-802 на потенциалзависимые трансмембранные ионные  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ - и  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы, а также его влияние на внутриклеточную концентрацию ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . В экспериментах, выполненных на изолированной полоске миокарда, оценивали влияние соединения АЛМ-802 на активность RyR2. **Результаты.** В экспериментах *in vivo* соединение АЛМ-802 (2 мг/кг, в/в) на вышеприведённых моделях проявляет выраженную антиаритмическую активность, сопоставимую/превосходящую такую, показанную для эталонных препаратов прокаинамид, верапамил и амиодарон. В экспериментах *in vitro* показано, что АЛМ-802 (69,8  $\mu\text{M}$ ) инициирует инактивацию ионных  $\text{K}^+$ - и  $\text{Na}^+$ -каналов и не влияет на активность ионных каналов  $\text{Ca}^{2+}$ . Соединение АЛМ-802 эффективно предотвращает увеличение концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле во время деполяризации. Кроме того, в экспериментах на изолированной полоске миокарда показано, что соединение АЛМ-802 ( $5 \times 10^{-5}$  М) блокирует RyR2. **Заключение.** Таким образом, по спектру антиаритмической активности соединение АЛМ-802 сочетает в себе свойства антиаритмических лекарственных средств IA или IC и III классов по классификации E.M. Vaughan Williams. Помимо этого, соединение АЛМ-802 проявляет антагонистическую активность в отношении RyR2. Последнее представляется также достаточно важным, поскольку известно, что в условиях патологии миокарда аномальная активность RyR2 инициирует диастолическую утечку ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из цистерн СПР, что влечёт за собой снижение инотропной функции левого желудочка сердца и значительно повышает риск развития злокачественных нарушений сердечного ритма.

**Ключевые слова:** соединение АЛМ-802; скрининговые модели аритмий; ионные  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ - и  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы; кофеин; RyR2

## Для цитирования:

Барчуков В. В., Зинченко В. П., Цорин И. Б., Теплов И. Ю., Столярук В. Н., Вититнова М. Б., Мокров Г. В., Крыжановский С. А. Особенности антиаритмического действия соединения АЛМ-802. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(3):56–67. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-3-56-67>

**Поступила:** 06.07.2023. **В доработанном виде:** 12.07.2023. **Принята к печати:** 24.07.2023. **Опубликована:** 30.09.2023.

## Features of the compound ALM-802 antiarrhythmic action

© Vladimir V. Barchukov<sup>1</sup>, Valery P. Zinchenko<sup>2</sup>, Iosif B. Tsoarin<sup>1</sup>, Ilya Yu. Teplov<sup>2</sup>, Valery N. Stolyaruk<sup>1</sup>, Marina B. Vititnova<sup>1</sup>, Grigory V. Mokrov<sup>1</sup>, Sergey A. Kryzhanovskii<sup>1</sup>

<sup>1</sup> — FSBI "Research Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> — Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences (ICB RAS), Pushchino, Russian Federation

**Abstract. Introduction.** Cardiovascular diseases (CVD) remain one of the leading causes of death worldwide, claiming over 17 million lives annually. This highlights the urgent need to develop innovative drugs to combat CVD. One potential target for such drugs is type 2 ryanodine receptors (RyR2), as they play an important role in maintaining ion homeostasis in cardiomyocytes, and their abnormal activity plays a key role in the genesis of cardiac arrhythmias. **Research objective** is to study the mechanisms underlying the antiarrhythmic action of ALM-802. **Methods.** In the first stage, *in vivo* experiments were performed using models of aconitine, calcium chloride, barium chloride arrhythmia, and reperfusion arrhythmias to evaluate the antiarrhythmic effect of the compound ALM-802. The second stage of the study involved electrophysiological experiments performed on hippocampal cells of newborn rats to evaluate the effect of the compound on voltage-gated transmembrane  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , and  $\text{Ca}^{2+}$  ion channels, as well as its effect on intracellular ion concentration of  $\text{Ca}^{2+}$ . Experiments performed on an isolated myocardial strip evaluated the effect of the compound ALM-802 on the activity of RyR2. **Results.** In *in vivo* experiments, the compound ALM-802 (2 mg/kg, iv) exhibits significant antiarrhythmic activity comparable/superior to that shown by the reference drugs procainamide, verapamil, and amiodarone on the models mentioned above. In *in vitro* experiments, it was shown that ALM-802 (69.8  $\mu\text{M}$ ) initiates the inactivation of  $\text{K}^+$  and  $\text{Na}^+$  ion channels and does not affect the activity of  $\text{Ca}^{2+}$  ion channels. The compound ALM-802 effectively prevents the increase of  $\text{Ca}^{2+}$  ion concentration in the cytosol during depolarization of contraction. In addition, experiments on isolated myocardial strips showed that the compound ALM-802 ( $5 \times 10^{-5}$  M) blocks RyR2. **Conclusion.** Thus, based on the spectrum of its antiarrhythmic activity, the compound ALM-802 combines the properties of antiarrhythmic drugs of class IA or IC and class III according to the E.M. Vaughan Williams classification. In addition, the ALM-802 compound exhibits antagonistic activity towards RyR2. The latter is also considered significant, as it is known that under conditions of myocardial pathology, abnormal activity of RyR2 initiates diastolic leakage of  $\text{Ca}^{2+}$  ions from the sarcoplasmic reticulum cisterns, which leads to a decrease in the inotropic function of the left ventricle of the heart and significantly increases the risk of developing malignant cardiac arrhythmias.

**Keywords:** ALM-802 compound; arrhythmia screening models;  $\text{Na}^+$ ;  $\text{K}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  channels; caffeine; RyR2

## For citations:

Barchukov VV, Zinchenko VP, Tsoarin IB, Teplov IYu, Stolyaruk VN, Vititnova MB, Mokrov GV, Kryzhanovskii SA. Features of the compound ALM-802 antiarrhythmic action. *Farmacokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(3):56–67. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-3-56-67>

**Received:** 06.07.2023. **Revision received:** 12.07.2023. **Accepted:** 24.07.2023. **Published:** 30.09.2023.

## Введение / Introduction

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) остаются наиболее распространённой причиной смерти во всём мире. Согласно результатам систематического метаанализа «Global Burden of Disease Study», оценившего глобальную, региональную и национальную летальность по 282 причинам смерти в 195 странах мира за период 1980–2017 год, ежегодная летальность от ССЗ в мире превышает 17 млн случаев [1]. Как следует из материалов этого анализа за десятилетие, предшествующее 2017 году, число людей, умирающих от ССЗ, увеличилось на 21 %, при этом на ишемическую болезнь сердца (ИБС) и инсульт приходится почти 50 и 35 % смертей от ССЗ, соответственно. В Европе от ССЗ ежегодно умирает около 4 млн человек, что составляет примерно 45 % от общей летальности, при этом на ИБС приходится 44 % смертей от ССЗ, а на цереброваскулярные болезни (в том числе инсульт) 25 % [2]. В РФ летальность от ССЗ также занимает первое место в структуре общей смертности.

Естественно, что поиск и последующее внедрение в широкую клиническую практику отечественных инновационных лекарственных средств представляется актуальной задачей. В этом плане интерес представляют соединения, влияющие на функциональную активность рианодиновых рецепторов 2 типа.

Хорошо известно, что во время деполяризации кардиомиоцитов из цистерн СПР происходит выброс в цитозоль ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , обеспечивающих инотропный ответ клетки. Одним из ключевых игроков в этом процессе являются рианодиновые рецепторы (RyRs), которые наряду с инозитолтрифосфатными рецепторами (IP3R) встроены в мембрану СПР и регулируют выброс ионов  $\text{Ca}^{2+}$  [3]. Известно, что сокращение кардиомиоцитов обусловлено скоординированным высвобождением ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из цистерн СПР и регулируется экспрессирующимися только в кардиомиоцитах рианодиновые рецепторы 2 типа (RyR2) [4]. В нормальных физиологических условиях открытие RyR2 и высвобождение ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из цистерн СПР происходит в ответ на поступление в цитозоль кардиомиоцитов ионов  $\text{Ca}^{2+}$  через LTCCs. Ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , высвобождаемые в цитозоль через RyR2-каналы, могут затем дополнительно стимулировать другие RyR2-каналы посредством механизма, называемого «индуцированное  $\text{Ca}^{2+}$  высвобождение  $\text{Ca}^{2+}$ » ( $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release, CICR) [5], поскольку высвобождающиеся ионы  $\text{Ca}^{2+}$  связываются с сайтом активации RyR2 [6]. Во время диастолы расслабление кардиомиоцитов происходит в основном в результате поглощения ионов  $\text{Ca}^{2+}$  СПР, которое происходит при участии  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы СПР (SERCA) и вытеснении из клетки ионов  $\text{Ca}^{2+}$  посредством  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  обменника ( $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  обменный белок или NCX), который «выталкивает» 1 ион  $\text{Ca}^{2+}$  в обмен на 3 иона  $\text{Na}^+$ . Другие системы, такие как кальциевый насос плазматической мембраны (Plasma Membrane

Calcium ATPase, PMCA) и митохондриальный  $\text{Ca}^{2+}$ -унипортер, играют незначительную роль в удалении ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из цитозоля кардиомиоцитов [7]. Следует учитывать, что даже в нормальных физиологических условиях во время диастолы незначительное количество ионов  $\text{Ca}^{2+}$  просачивается за пределы СПР через RyR2s, вместе с тем их преждевременное открытие имеет очень незначительную вероятность ввиду низкого цитозольного содержания ионов  $\text{Ca}^{2+}$  [7, 8]. Однако в условиях патологии диастолическая утечка ионов  $\text{Ca}^{2+}$  играет одну из ключевых ролей в формировании ХСН и инициации нарушений сердечного ритма.

В НИИ фармакологии имени В.В. Закусова в течение ряда лет ведутся поиски оригинальных инновационных лекарственных средств, обладающих широким спектром антиаритмической активности. В частности, в ряду линейных алкоксифенилтриазаалканов выявлено соединение N<sup>1</sup>–(2,3,4-триметоксибензил)-N<sup>2</sup>–{2-[(2,3,4-триметоксибензил)амино]этил}-1,2-этандиамина (шифр АЛМ-802), обладающее выраженной антиаритмической активностью.

**Цель настоящего исследования / Research objective** — изучение механизмов, лежащих в основе антиаритмического действия соединения АЛМ-802.

## Материалы и методы / Materials and Methods

**Животные / Animals.** Опыты проводили на белых беспородных крысах-самцах, изначальной массой 180–200 г, полученных из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», филиал «Столбовая». Условия содержания животных соответствовали ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» (Переиздание) и ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами» (Переиздание). Все работы с лабораторными животными были выполнены в соответствии с общепринятыми нормами обращения с животными, на основе стандартных операционных процедур, принятых в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова, международными правилами (European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC), в соответствии с «Правилами работы с животными», утверждёнными биоэтической комиссией ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (протокол №1 от 4 ноября 2016 г.).

## Эксперименты in vitro / In vitro experiments

**Электрофизиологические исследования.** 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 льду. 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 минуты при 300 g. Супернатант удаляли, клетки ресуспендировали в нейробазальной среде с добавлением глутамин (0,5 мМ), Supplement B27 (2 %), гентамицин (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 15 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 CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С. После этого цилиндры извлекали, а объём культуральной среды доводили до 1,5 мл. Каждые 3 дня заменяли 2/3 объёма культуральной среды на свежую.

Для анализа изменений мембранного потенциала в работе применяли электрофизиологический метод (пэтч-кламп) в конфигурации whole cell. Исследования проводились на УНУ «Флуоресцентная станция Axio Observer Z1» со встроенным микроинкубатором, электрофизиологической установкой «patch clamp», оснащённой высокоскоростной камерой Hamamatsu ORCA-Flas».

Круглое покровное стекло с культурой клеток монтировали в специальную измерительную камеру. Объём среды в камере составлял 1 мл. Реагенты применялись в непрерывном потоке раствора Хэнкса с помощью специальной перфузионной системы, которая позволяет быстро заменить раствор в камере. Добавление реагентов и отмывку проводили путём замены среды в десятикратном объёме с помощью системы, обеспечивающей перфузию со скоростью 15 мл/мин.

Пипетки изготавливали из мягкого молибденового стекла на пулере P-97 Flaming/Brown Micropipette Puller (Sutter Instrument Co). Сопrotивление полученных пипеток составляло 4–6 МОм. Пипетки заполняли специальным раствором для микропипеток с широкого конца при помощи шприца с пластиковым наконечником.

Для измерения потенциала мембраны нейронов ячейку с покровным стеклом, заполненную 1 мл раствора Хэнкса, устанавливали на заземлённый предметный столик микроскопа Axio Imager Z1. Микроскоп оснащён микроманипулятором для подвода пэтч-пипеток и расположен на столе с воздушной подушкой в камере Фарадея, для исключения механических воздействий

и электрических наводок во время экспериментов. В экспериментальную ячейку помещали индифферентный электрод и трубки перфузионной системы для подачи и отвода среды. Нейроны визуализировались в микроскоп, после чего к клетке микроманипулятором подводилась пэтч-пипетка. Изменения потенциала мембраны регистрировали в режиме фиксации тока, для чего использовался усилитель Axopatch 200B (Molecular Devices), АЦП Digidata 1440A и программное обеспечение pClamp10.2 (Molecular Devices).

Эксперименты проводились с использованием раствора для пэтч-пипетки, содержащего (в мМ) 5 KCl, 130 K-глюконат, 1 MgCl<sub>2</sub> × 6H<sub>2</sub>O, 0,25 EGTA, 4 HEPES, 2 Na<sub>2</sub>-АТФ, 0,3 Mg-АТФ, 0,3 Na-GTP, 10 Na<sub>2</sub>-фосфокреатин (305-310 mOsm, pH 7,2). Внеклеточный р-р Хэнкса, использованный для всех записей, содержал (в мМ): 156 NaCl, 3 KCl, 2 MgSO<sub>4</sub>, 1,25 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,4 CaCl<sub>2</sub>, 10 глюкозы и 10 HEPES, pH 7,35, при температуре 25–28 °С.

Для исследования влияния АЛМ-802 на изменение потенциала мембраны, вызванное активацией потенциалзависимых кальциевых каналов, были использованы культуры возрастом 12–13 дней. Записи производились в режиме фиксации тока. На клетки подавались токовые стимулы различных значений (от 10 до 200 пА с шагом 5 пА), продолжительность стимуляции составляла 1000 мс, интервалы между стимулами — 5 с. Эксперименты проводили в присутствии 100 нМ тетродотоксина во внеклеточном растворе, чтобы, ингибируя натриевые каналы, заблокировать генерацию потенциалов действия. В этих условиях величина ступеньки потенциала мембраны, вызванной токовой стимуляцией нейрона, помимо прочего зависит от активности трансмембранных потенциалзависимых Ca<sup>2+</sup>-каналов, если соединение АЛМ-802 оказывает действие на их активность, значение потенциала мембраны во время стимуляции должно меняться.

Для исследования действия соединения АЛМ-802 производили контрольные записи изменения потенциала мембраны при стимуляции, после чего через систему аппликации в экспериментальную камеру добавляли раствор Хэнкса, содержащий 69,8 мМ АЛМ-802 (данная концентрация эквивалентна эффективной дозе соединения АЛМ-802, определённой в экспериментах *in vivo* — 2 мг/кг, в/в [9, 10]) и производили повторную запись. Затем концентрации изучаемого вещества увеличивали в 2 и 3 раза. Эксперименты с каждой концентрацией соединения АЛМ-802 были повторены не менее чем на 3 культурах. Растворы соединения АЛМ-802 каждый раз готовились непосредственно перед началом эксперимента.

Уровень концентрации внутриклеточного кальция ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) оценивали с помощью двухволнового зонда Fura-2, по стандартной методике [11]. Для прокрайки клеток использовали эфир Fura-2AM в конечной концентрации 4 мкМ в растворе Хэнкса. На каждое стекло с культурой клеток добавляли 200 мкл свежее-

приготовленного раствора красителя и инкубировали в термостате 40 мин при 37 °С. После этого культуру промывали раствором Хенкса и инкубировали 10–15 мин.

Для измерений  $[Ca^{2+}]_i$  использовали систему анализа изображений на основе моторизованного микроскопа Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия), оснащённого высокоскоростной CCD-камерой Hamamatsu ORCA-Flash 2.8. Источником возбуждения флуоресценции служил ламповый осветитель Lambda DG-4 Plus (Sutter Instruments, США). Для возбуждения и регистрации флуоресценции Fura-2 мы использовали фильтр 21HE (Carl Zeiss, Германия) с фильтрами возбуждения BP340/30 и BP387/15. Регистрация динамики  $[Ca^{2+}]_i$  производилась с частотой 2 кадра в секунду.

**Эксперименты на изолированной полоске миокарда.** Наркотизированных животных (уретан 1300 мг/кг в/б) фиксировали в положении на спине, после чего быстро извлекали сердце и помещали его в чашку Петри с охлаждённым оксигенированным карбогеном (95 %  $O_2$  и 5 %  $CO_2$ ) раствором Кребса–Хенслайта (pH = 7,4). Состав раствора Кребса–Хенслайта в мМ: NaCl — 121; KCl — 4,69;  $KH_2PO_4$  — 1,1;  $NaHCO_3$  — 23,8;  $MgSO_4$  — 1,6;  $CaCl_2$  — 1,6; ЭДТА — 0,032; D-глюкоза — 8.

Параллельно продольной оси сердца крыс из правого предсердия иссекали полоску миокарда длиной 8–12 и шириной 1–2 мм, один конец которой крепили вертикально к нержавеющей металлическому стержню, а второй — к изометрическому датчику силы (Radnoti) при помощи лигатуры.

Полоску располагали таким образом, чтобы её середина оказалась между двумя платиновыми электродами, расположенными по бокам на расстоянии 2–3 мм от неё. Затем ткань помещали в резервуар объёмом 5 мл, заполненным раствором Кребса–Хенслайта, параметры которого описаны выше.

Сокращение полоски миокарда вызывали однократными прямоугольными импульсами (4 мс, 10 В, 1 Гц) с помощью электростимулятора HSE (Германия).

Период адаптации ткани перед исследованием длился 40–60 мин, в течение которого постепенно повышали температуру раствора (до 38,0 °С) и корректировали натяжение полоски до уровня, при котором она генерировала максимальную силу сокращения.

Для регистрации сокращений полосок использовали систему регистрации данных PowerLab 8/35, а для обработки полученных результатов — программное обеспечение LabChart 7 Pro.

**Статистический анализ.** Нормальность распределения полученных данных проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Так как выборки имели нормальное распределение, то для определения статистической значимости изменений использовали дисперсионный анализ повторных измерений с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Дункану. Полученные результаты представляли в виде средних арифметических и их стандартных ошибок. Изменения считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ .

## Эксперименты *in vivo* / *In vivo experiments*

**Аконитиновая модель аритмии.** Эксперименты проводили на нелинейных белых крысах-самцах массой 180–200 г. Наркотизированных уретаном (1300 мг/кг, в/б) животных фиксировали в положении на спине, проводили трахеостомию и подключали к аппарату искусственной вентиляции лёгких для мелких животных (Ugo Basele, Италия). Растворы аконитина, изучаемых соединений (в опытных группах) и физиологический раствор (в контрольной группе) вводили болюсом в бедренную вену, объём вводимой жидкости всегда составлял 1 мл на 1 кг массы животного. Политопную экстрасистолию (смешанная предсердно-желудочковая экстрасистолия) вызывали введением раствора аконитина (аконитина гидрохлорид, УФИХ РАН), который готовили *ex tempore* для применения в течение дня. При этом подбирали его минимальную дозу с таким расчётом, чтобы у всех животных контрольной группы в течение 5 минут после введения аконитина развивалась политопная экстрасистолия. Величина подобранной дозы составляла 30–40 мкг/кг. Перед началом эксперимента у животных регистрировали ЭКГ (II ст. отведение). За 2 минуты до введения аконитина вводили раствор изучаемого соединения или физиологический раствор и начинали непрерывную регистрацию ЭКГ до 20-й минуты после введения аконитина. Критерием антиаритмического действия изучаемого соединения считали эффект отсутствия политопной экстрасистолии в течение 10 и более минут после введения аконитина.

Животные были рандомизированы на 3 группы: 1-я ( $n = 10$ ) — контроль, 2-я ( $n = 6$ ) — АЛМ-802 (2 мг/кг, в/в) и 3-я ( $n = 6$ ) — эталонный для этой модели препарат прокаинамид (20 мг/кг, в/в.)

**Хлоридкальциевая модель аритмии.** Эксперименты проводили на нелинейных белых крысах-самцах массой 220–250 г. Наркотизированных уретаном (1300 мг/кг, в/б) крыс фиксировали в положении на спине. Растворы изучаемых соединений в опытных группах и физиологический раствор в контрольных группах вводили болюсом в бедренную вену, объём вводимой жидкости всегда составлял 1 мл на 1 кг массы животного. Фибрилляцию желудочков вызывали введением готового 10 % раствора  $CaCl_2$ . При этом подбирали минимальную дозу  $CaCl_2$  за счёт изменения объёма вводимого раствора, с таким расчётом, чтобы у всех животных контрольной группы развивалась фибрилляция желудочков, переходящая в асистолию, и наступала гибель животного. Величина подобранной дозы составляла 125–160 мг/кг (0,29–0,45 мл 10 %  $CaCl_2$ ). Перед началом эксперимента у животных регистрировали ЭКГ (II ст. отведение). За 2 минуты до введения  $CaCl_2$  вводили раствор изучаемого соединения или физиологический раствор и начинали непрерывную регистрацию ЭКГ вплоть до гибели животного (5 мин после наступления асистолии) либо до 5 мин после восстановления ритма.

Критерием антиаритмического действия изучаемого соединения считали эффект отсутствия нарушений ритма или восстановления нормального ритма после фибрилляции и выживание животного.

Животные были рандомизированы на 3 группы: 1-я ( $n = 9$ ) — контроль, 2-я ( $n = 6$ ) — АЛМ-802 (2 мг/кг, в/в) и 3-я ( $n = 6$ ) — эталонный для этой модели препарат верапамил (1 мг/кг, в/в).

*Хлоридбариевая модель аритмии.* Эксперименты проводили на нелинейных белых крысах-самцах массой 220–250 г. Наркотизированных уретаном (1300 мг/кг, в/б) животных фиксировали в положении на спине. Растворы изучаемых соединений в опытных группах и физиологический раствор в контрольных группах вводили болюсом в бедренную вену, объём вводимой жидкости всегда составлял 1 мл на 1 кг массы животного. Фибрилляцию желудочков вызывали бария хлоридом в дозе 32 мг/кг (использовали раствор в концентрации 3,2 %, приготовленный *ex tempore*). Перед началом эксперимента у животных регистрировали ЭКГ (II ст. отведение). За 2 минуты до введения  $\text{BaCl}_2$  вводили раствор изучаемого соединения или физиологический раствор и начинали непрерывную регистрацию ЭКГ вплоть до гибели животного (5 минут после наступления асистолии) либо до 5 минут после восстановления ритма. Критерием антиаритмического действия изучаемого соединения считали эффект отсутствия нарушений ритма или восстановления нормального ритма после фибрилляции и выживание животного.

Животные были рандомизированы на 3 группы: 1-я ( $n = 6$ ) — контроль, 2-я ( $n = 6$ ) — АЛМ-802 (2 мг/кг, в/в) и 3-я ( $n = 6$ ) — эталонный для этой модели препарат амиодарон (10 мг/кг, в/в).

*Модель реперфузионных аритмий.* Эксперименты проводили на нелинейных белых крысах-самцах массой 220–250 г. Наркотизированных уретаном (1300 мг/кг, в/б) животных фиксировали в положении на спине, проводили трахеостомию и подключали к аппарату искусственной вентиляции лёгких для мелких животных (Ugo Basele, Италия). Растворы изучаемых соединений в опытных группах и физиологический раствор в контрольных группах вводили болюсом в бедренную вену, объём вводимой жидкости всегда составлял 1 мл на 1 кг массы животного. Для воспроизведения реперфузионной аритмии перевязывали коронарную артерию с последующим снятием лигатуры. Для этого формировали хирургический доступ к коронарной артерии. Посредством торакотомии во втором и пятом межреберьях перевязывали маммарные артерии, внутренние грудные вены и производили гемистернэктомию с костэктомией 3- и 4-го ребра, вскрывали перикард и под левую коронарную артерию (или её крупные ветви), в области выхода артерии из-под ушка, подводили лавсановую лигатуру. Ишемию миокарда вызывали одномоментной перевязкой коронарной артерии, а через 7 минут ишемии лигатуру снимали. Раствор изучаемого соединения

или физиологический раствор вводили за 5 минут до реперфузии. Регистрацию ЭКГ (II ст. отведение) начинали за минуту до перевязки коронарного сосуда и продолжали в течение всего эксперимента. Затем подсчитывали число животных, у которых возникали жизнеугрожающие нарушения ритма сердца (фибрилляции желудочков или желудочковые тахикардии). Критерием антиаритмического действия изучаемого соединения считали эффект отсутствия жизнеугрожающих нарушений ритма.

Животные были рандомизированы на 4 группы: 1-я ( $n = 12$ ) — контроль, 2-я ( $n = 13$ ) — АЛМ-802 (2 мг/кг, в/в), 3-я ( $n = 8$ ) — эталонный для этой модели препарат верапамил (1 мг/кг, в/в) и 4-я ( $n = 6$ ) — эталонный для этой модели препарат прокаинамид (20 мг/кг, в/в).

*Статистический анализ.* Полученные результаты обрабатывали с помощью метода точной вероятности Фишера с учётом множественности сравнений.

## Результаты и обсуждение / Results and discussion

На первом этапе исследований оценивали антиаритмическую активность соединения АЛМ-802 на скрининговых моделях аритмий в сравнении с эталонными для этих моделей лекарственными средствами.

*Аконитиновая модель аритмии.* Хорошо известно, что аритмогенный эффект аконитина связан с его способностью изменять/искажать работу быстрых трансмембранных потенциалзависимых натриевых  $\text{Na}^+$ -каналов, встроенных в клеточную мембрану, преимущественно кардиомиоцитов предсердий. Аконитин имеет высокое сродство к сайту 2 на  $\alpha$ -субъединице  $\text{Na}^+$ -каналов [12]. В результате взаимодействия аконитина с каналом происходит подавление его конформационных изменений и канал переходит в открытое состояние и, как следствие этого, из-за постоянного притока ионов  $\text{Na}^+$  мембрана кардиомиоцитов остаётся деполяризованной, так как не может реполяризоваться. Из-за сильной деполяризации клетки проницаемость её мембраны резко возрастает и для ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , что влечёт за собой перегрузку ими кардиомиоцитов [13]. Помимо этого, имеются данные о том, что аконитин подавляет и селективность  $\text{Na}^+$ -каналов и через них вместо ионов  $\text{Na}^+$  в кардиомиоциты начинают транспортироваться ионы более крупного размера, например  $\text{NH}_4^+$  [14, 15]. Известно, что на данной экспериментальной модели наиболее эффективными являются антиаритмики I класса по классификации E.M. Vaughan Williams [16].

Результаты экспериментов представлены в табл. 1.

Как следует из полученных данных, в условиях настоящей модели соединение АЛМ-802 проявляет выраженную антиаритмическую активность, сопоставимую с таковой у эталонного препарата прокаинамида.

*Хлоридкальциевая модель аритмии.* Модель хлоридкальциевых аритмий как инструмент поиска лекарственных средств для лечения нарушений сердечного ритма широко используется с начала 50-х

Таблица 1

Влияние соединения АЛМ-802 и эталонного препарата прокаинамид на нарушения ритма сердца, вызываемые аконитина гидрохлоридом у крыс

Table 1

The effect of the compound ALM-802 and the reference drug procainamide on heart rhythm disorders induced by aconitine hydrochloride in rats

Соединение	Доза, мг/кг	Число крыс в группе	Число крыс с фибрилляцией желудочков и асистолией	<i>p</i> — по отношению к контролю
Контроль	—	10	10	—
АЛМ-802	2	6	0	0,0003
Прокаинамид	20	6	1	0,0027

годов XX века. Изначально полагали, что аритмии, инициируемые  $\text{CaCl}_2$ , носят центральный характер и связаны с гиперактивацией сосудодвигательного центра продолговатого мозга [17]. Однако эта концепция вызвала определённые возражения, поскольку  $\text{CaCl}_2$  инициировал нарушения сердечного ритма и в экспериментах на изолированном сердце [18]. Позднее было показано, что повышенная концентрация ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках синоатриального узла вызывает гиперполяризацию потенциала покоя, а также снижение возбудимости клеток Пуркинье, поскольку они имеют менее отрицательный пороговый потенциал [19]. Кроме того, было показано, что  $\text{CaCl}_2$  ускоряет реполяризацию клеток Пуркинье [20]. Это различие приводит к асинхронному восстановлению возбудимости в предсердиях и желудочках сердца, что может способствовать формированию аритмии по типу *reentry*. Следует отметить, что в 2020 году была опубликована статья Gou D. с соавт., из материалов которой следует, что  $\text{CaCl}_2$ -опосредованные аритмии связаны не с избыточным поступлением в кардиомиоциты экзогенных ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , а с активацией (гиперфосфорилированием) в них  $\text{Ca}^{2+}$ /кальмодулин-зависимой протеинкиназы II (CaMKII- $\delta$ ) [21]. Известно, что CaMKII- $\delta$ , преобладающая в кардиомиоцитах [22], является одним из ключевых игроков, регулирующих активность множества как цитозольных, так и ядерных мишеней [23]. В частности, избыточное аутофосфорилирование CaMKII инициирует аритмогенез как посредством ак-

тивации специфичных для кардиомиоцитов (RyR2) [24, 25], так и путём CaMKII-опосредованной, зависимой от фосфорилирования модуляции активности ворот инактивации  $\text{Na}^+v1.5$  каналов, также специфичных для кардиомиоцитов [26]. На данной модели аритмий обычно проявляют активность соединения, относящиеся к I и IV классам антиаритмиков по классификации E.M. Vaughan Williams [16].

Результаты экспериментов представлены в табл. 2.

Как следует из полученных данных, в условиях настоящей модели соединение АЛМ-802 проявляет выраженную антиаритмическую активность и превосходит таковую у эталонного препарата верапамил.

*Хлоридбариевая модель аритмии.* Хлоридбариевая модель аритмии как инструмент поиска лекарственных средств для лечения нарушений сердечного ритма достаточно часто используется с середины 60-х годов XX века [27]. К настоящему времени механизмы, за счёт которых хлорид бария инициирует развитие нарушений сердечного ритма, достаточно хорошо изучены. Показано, что ионы  $\text{Ba}^{2+}$  являются классическими проникающими блокаторами  $\text{K}^+$ -каналов [28]. Эффект «внешней блокировки» связан со способностью ионов  $\text{Ba}^{2+}$  селективно связываться с  $\text{K}^+$ -каналами в области их проницаемой поры [28]. Самая узкая часть проницаемой поры, её «селективный фильтр», образована высококонсервативным мотивом TVGYG, связанным с основными карбонильными атомами кислорода и направленным к центральному просвету

Таблица 2

Влияние соединения АЛМ-802 и эталонного препарата верапамил на нарушения ритма сердца, вызываемые кальция хлоридом у крыс

Table 2

The effect of the compound ALM-802 and the reference drug verapamil on heart rhythm disorders induced by calcium chloride in rats

Шифр соединения	Доза, мг/кг	Число крыс в группе	Число крыс с фибрилляцией желудочков и асистолией	<i>p</i> — по отношению к контролю
Контроль	—	9	9	—
АЛМ-802	2	6	0	< 0,001
Верапамил	1	6	2	0,015

поры. Расчёты рентгеновской кристаллографии и молекулярной динамики выявили пять сайтов связывания ионов вдоль узкой поры, от самого внешнего сайта S0 до самого внутреннего сайта S4. Теми же методами показано, что ионы  $Ba^{2+}$  могут связываться с сайтами S4 и S2 и тем самым препятствуют выходу ионов  $K^+$  в межклеточное пространство [29], что способствует нарушению процессов реполяризации/ постдеполяризации кардиомиоцитов и инициирует развитие злокачественных нарушений сердечного ритма. Также следует отметить, что ионы  $Ba^{2+}$ , блокируя трансмембранные потенциалзависимые  $K^+$ -каналы, не влияют на трансмембранный ток ионов  $Na^+$  [30]. Известно, что на данной экспериментальной модели наиболее эффективными являются антиаритмики III класса по классификации E.M. Vaughan Williams [16].

Результаты экспериментов представлены в табл. 3.

Как следует из полученных данных, в условиях настоящей модели соединение АЛМ-802 проявляет выраженную антиаритмическую активность и превосходит таковую у эталонного препарата амиодарон.

*Модель реперфузионных аритмий.* Безусловно, в условиях острой ишемии миокарда реперфузия целесообразна, поскольку позволяет не только восстановить доставку кислорода и питательных веществ, необходимых для поддержания нормального клеточного метаболизма, но и удалить из зоны ишемии накопившиеся в ней токсические продукты. Однако, как не парадоксально, реперфузия сама по себе может спровоцировать дальнейшее повреждение кардиомиоцитов, в частности инициировать развитие злокачественных нарушений сердечного ритма. Реперфузионное повреждение миокарда было впервые описано Робертом Дженнингсом в 1960 году [31]. Через 15–20 секунд после окклюзии коронарного сосуда кардиомиоциты переходят с аэробного на анаэробный гликолиз, который становится единственным значимым источником АТФ, однако это приводит к накоплению лактата и, следовательно, понижению внутриклеточного pH (до <7,0) вследствие накопления в цитозоле избыточного количества протонов [32]. Реперфузия сопровождается быстрым восстановлением внутриклеточ-

ного pH за счёт активации сарколеммального  $Na^+/H^+$  ионообменника, который «выталкивает» протоны из клетки в обмен на поступление в цитозоль ионов  $Na^+$  [32, 33]. Возникающее в результате этого увеличение содержания в цитозоле кардиомиоцитов ионов  $Na^+$ , в свою очередь, активирует сарколеммальный  $Na^+/Ca^{2+}$  ионообменник, что приводит к обмену внутриклеточных ионов  $Na^+$  на внеклеточные ионы  $Ca^{2+}$  [34]. Высокая скорость работы  $Na^+/Ca^{2+}$  ионообменника может в конечном итоге привести к перегрузке кардиомиоцитов ионами  $Ca^{2+}$ , которые, в частности, инициируют выработку АФК в митохондриях [35, 36]. Показано, что при реперфузии главным источником АФК становятся митохондрии, что происходит в результате открытия  $Ca^{2+}$ -зависимой неспецифической митохондриальной поры (mPTP). Главным активатором mPTP в условиях реперфузии являются ионы  $Ca^{2+}$ , при этом чувствительность к ионам  $Ca^{2+}$  многократно увеличивается в условиях сопутствующего реперфузии окислительного стресса [37]. Этот феномен получил название АФК-индуцированный выход АФК («ROS-induced ROS releas» (RIRR)) [38]. Избыточное накопление ионов  $Ca^{2+}$  и выработка АФК создают идеальную внутриклеточную среду для активации СаМКП, которая играет главную роль в генерации реперфузионных аритмий [39]. Свои аритмогенные эффекты СаМКП реализует посредством фосфорилирования и последующей активации RyR2 [40]. Известно, что на данной экспериментальной модели наиболее эффективными являются антиаритмики IA, IC и IV класса по классификации E.M. Vaughan Williams [16].

Результаты экспериментов представлены в табл. 4.

Как следует из полученных данных, в условиях настоящей модели соединение АЛМ-802 проявляет выраженную антиаритмическую активность и превосходит таковую у эталонных препаратов верапамил и прокаинамид.

Таким образом, результаты скрининговых экспериментов свидетельствуют о том, что соединение АЛМ-802 на всех использованных моделях проявляет выраженную антиаритмическую активность, в подавляющем большинстве случаев превосходящую таковую

Таблица 3

Влияние соединения АЛМ-802 и эталонного препарата амиодарон на нарушения ритма сердца, вызываемые бария хлоридом у крыс

Table 3

The effect of the compound ALM-802 and the reference drug amiodarone on heart rhythm disorders induced by barium chloride in rats

Шифр соединения	Доза, мг/кг	Число крыс в группе	Число крыс с фибрилляцией желудочков и асистолией	p — по отношению к контролю
Контроль	—	6	6	
АЛМ-802	2	6	1	0,03
Амиодарон	10	7	5	0,96

Влияние соединения АЛМ-802 и эталонных препаратов верапамил и прокаинамид на жизнеугрожающие нарушения ритма сердца, вызываемые окклюзией / реперфузией коронарной артерии у крыс

Table 4

The effect of the compound ALM-802 and reference drugs verapamil and procainamide on life-threatening cardiac rhythm disturbances induced by coronary artery occlusion/reperfusion in rats

Шифр соединения	Доза, мг/кг	Число крыс в группе	Число крыс с ЖТ и/или ФЖ	<i>p</i> — по отношению к контролю
Контроль	—	10	10	—
АЛМ-802	2	13	2	<0,001
Верапамил	1	8	3	0,0108
Прокаинамид	20	6	1	0,0151

у эталонных препаратов. Есть основания полагать, что соединение АЛМ-802 сочетает в себе свойства антиаритмиков I, III и IV класса по классификации E.M. Vaughan Williams, однако однозначный ответ на этот вопрос можно получить только в экспериментах *in vitro* при проведении электрофизиологических с использованием метода пэтч-кламп.

#### Эксперименты *in vitro* / *In vitro* experiments

*Изучение влияния соединения АЛМ-802 на трансмембранные Na<sup>+</sup>-, K<sup>+</sup>- и Ca<sup>2+</sup>-каналы*

Для исследования влияния соединения АЛМ-802 на трансмембранные Na<sup>+</sup>-, K<sup>+</sup>- и Ca<sup>2+</sup>-каналы производились контрольные записи вызванных потенциалов, после чего через систему аппликации в экспериментальную камеру производилась добавка раствора Хэнкса, содержащего 69,8 мМ АЛМ-802 (данная концентрация эквивалентна эффективной дозе соединения АЛМ-802 — 2 мг/кг, в/в, известной из экспериментов *in vivo*), и производилась повторная запись.

Показано, что соединение АЛМ-802 вызывает уменьшение амплитуды и частоты потенциалов действия, что может говорить об ингибировании трансмембранных потенциалзависимых ионных Na<sup>+</sup>- и инактивации K<sup>+</sup>-каналов.

Для оценки влияния соединения АЛМ-802 на трансмембранные потенциалзависимые ионные Ca<sup>2+</sup>-каналы были произведены аналогичные эксперименты в присутствии 100 нМ тетродотоксина во внеклеточном растворе. Когда заблокирована генерация потенциалов действия, величина ступеньки потенциала мембраны, вызванной токовой стимуляцией нейрона, помимо прочего зависит от активности трансмембранных потенциалзависимых ионных Ca<sup>2+</sup>-каналов, и, если соединение АЛМ-802 оказывает действие на их активность, значение потенциала мембраны во время стимуляции должно меняться. Эти изменения не были обнаружены ни при добавке 69,8 мМ соединения АЛМ-802, ни при двух- и трёхкратном увеличении его концентрации.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что соединение АЛМ-802 в условиях настоящего эксперимента инициирует инактивацию трансмембранных потенциалзависимых ионных K<sup>+</sup>- и Na<sup>+</sup>-каналов и не влияет на активность трансмембранных потенциалзависимых ионных Ca<sup>2+</sup>-каналов.

*Изучение влияния соединения АЛМ-802 на повышение внутриклеточной концентрации ионов Ca<sup>2+</sup>, вызванное деполяризацией*

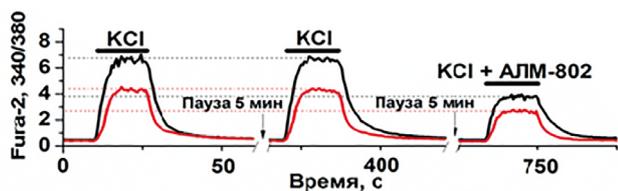
Известно, что интенсивная и постоянная деполяризация нейронов переводит их в гипервозбужденное состояние, которое характеризуется повышением внутриклеточной концентрации ионов Ca<sup>2+</sup>, вызванным как притоком ионов Ca<sup>2+</sup> в клетку через медленные трансмембранные потенциалзависимые ионные Ca<sup>2+</sup>-каналы (LTCCs), так и за счёт выброса ионов Ca<sup>2+</sup> из СПР, в результате чего происходит переключение нейронов в режим пачечной активности. Показано, что добавление в среду 35 мМ KCl приводит к сильной деполяризации всех клеток, при этом в их цитозоле повышается концентрация ионов Ca<sup>2+</sup>. Соединение АЛМ-802 (69,8 мМ) в существенной мере препятствует увеличению амплитуды кальциевого ответа, вызванного добавлением в среду KCl (рис. 1).

Таким образом, с помощью двухволнового зонда Fura-2 продемонстрировано, что соединение АЛМ-802 во время деполяризации эффективно препятствует повышению концентрации ионов Ca<sup>2+</sup> в цитозоле нейронов. Механизм этого эффекта соединения АЛМ-802 не ясен и требует дальнейшего изучения, однако поскольку было показано, что соединении АЛМ-802 не влияет на активность LTCCs, можно было предположить, что уменьшение под его влиянием кальциевого ответа при деполяризации мембраны обусловлено ингибированием соединением АЛМ-802 выброса ионов Ca<sup>2+</sup> из цистерн СПР.

Для ответа на этот вопрос было изучено влияние соединения АЛМ-802 на активность RyR2.

*Изучение влияния соединения АЛМ-802 на риаодиновые рецепторы*

Опыты по изучению влияния соединения АЛМ-802 на риаодиновые рецепторы проводили на изолированной полоске миокарда.



**Рис. 1.** Влияние АЛМ-802 на повышение концентрации внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , вызванное деполяризацией 35 мМ КСl в быстро (чёрная линия) и медленно (красная линия) отвечающих нейронах

**Fig. 1.** The effect of ALM-802 on the increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration induced by depolarization with 35 mM KCl in fast-responding neurons (black line) and slow-responding neurons (red line)

**Примечания:** Пример записей ответа быстро отвечающего (чёрная линия) и медленно отвечающего (красная линия) нейрона на добавку 35 мМ КСl. В контроле при повторных добавках с паузой в 5 минут амплитуда  $\text{Ca}^{++}$  ответа не меняется. Третья добавка КСl в присутствии 69,8  $\mu\text{M}$  АЛМ-802. Показано заметное снижение амплитуды  $\text{Ca}^{++}$ -ответа.

**Notes:** An example of the records of the response of a fast-responding (black line) and slow-responding (red line) neuron to the addition of 35 mM CSl. In the control, with repeated supplements with a pause of 5 minutes, the amplitude of the  $\text{Ca}^{++}$  response does not change. The third additive is KCl in the presence of 69.8  $\mu\text{M}$  ALM-802. A noticeable decrease in the amplitude of the  $\text{Ca}^{++}$  response is shown.

Таблица 5

**Влияние соединения АЛМ-802 ( $1 \times 10^{-5}$  М) на амплитуду сокращений (V) полоски миокарда правого предсердия крысы, вызываемого кофеином ( $5 \times 10^{-5}$  М)**

Table 5

**The effect of ALM-802 ( $1 \times 10^{-5}$  M) on the amplitude of contractions (V) of the strip of the right atrial myocardium in rats induced by caffeine ( $5 \times 10^{-5}$  M)**

Исходный уровень	Кофеин	
$0,117 \pm 0,018$ , $n = 6$	$0,239 \pm 0,039^*$	
Исходный уровень	АЛМ-802 $n = 6$	АЛМ-802 + кофеин
$0,132 \pm 0,040$ , $n = 6$	$0,049 \pm 0,012^*$	$0,024 \pm 0,006^*$

**Примечания:** Показаны средние арифметические и их стандартные ошибки; \* —  $p < 0,05$  по отношению к исходному уровню.

**Notes:** Arithmetic averages and their standard errors are shown; \* —  $p < 0.05$  relative to the initial level.

Результаты экспериментов представлены в табл. 5.

Как следует из полученных данных, агонист RyRs кофеин значимо ( $p < 0,05$ ) увеличивает амплитуду сокращений полоски миокарда. Соединение АЛМ-802 в существенной мере уменьшает амплитуду сокращений изолированной полоски миокарда ( $p < 0,05$ ) и полностью блокирует положительный инотропный ответ полоски на кофеин (см. табл. 5).

Результаты, полученные в этой серии, свидетельствуют о том, что соединение АЛМ-802 полностью блокирует положительный инотропный ответ агониста RyRs кофеина, что позволяет полагать, что соединению АЛМ-802 присущи свойства антагониста RyR2, поскольку в миокарде экспрессируются риадиноновые рецепторы только 2-го типа [4].

### Заключение / Conclusion

Таким образом, полученные результаты позволяют с большой долей уверенности говорить о том, что по спектру антиаритмической активности соединение АЛМ-802 сочетает в себе свойства антиаритмических лекарственных средств IA или IC и III классов по классификации E.M. Vaughan Williams и, согласно данным скрининговых экспериментов, по своей целевой активности преимущественно превосходит эталонные препараты прокаинамид и амиодарон. Помимо этого, соединение АЛМ-802 проявляет антагонистическую активность в отношении RyR2. Последнее представляется также достаточно важным, поскольку известно, что в условиях патологии миокарда аномальная активность RyR2 инициирует диастолическую утечку ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из цистерн СПР, что влечёт за собой снижение инотропной функции левого желудочка сердца и значительно повышает риск развития злокачественных нарушений сердечного ритма.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

**Барчуков Владимир Валерьевич**

e-mail: barchukov.pharm@yandex.ru  
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4229-3107>  
 SPIN-код: 6743-4280

н. с. лаборатории фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

**Vladimir V. Barchukov**

e-mail: barchukov.pharm@yandex.ru  
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4229-3107>  
 SPIN code: 6743-4280

Research scientist of laboratory of pharmacological screening FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

**Зинченко Валерий Петрович**

e-mail: vpz@mail.ru  
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1990-3803>  
 SPIN-код: 5114-0738

д. б. н., зав. лабораторией внутриклеточной сигнализации ИБК РАН, Пущино, Российская Федерация, Пущино, Российская Федерация

**Valery P. Zinchenko**

e-mail: vpz@mail.ru  
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1990-3803>  
 SPIN code: 5114-0738

Dr. Sci. (Biol.), Head of laboratory of intracellular signaling ICB RAS, Pushchino, Russian Federation

**Цорин Иосиф Борисович**

e-mail: tsorinib@yandex.ru  
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3988-7724>  
 SPIN-код: 4015-3025

д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

**Iosif B. Tsorin**

e-mail: tsorinib@yandex.ru  
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3988-7724>  
 SPIN code: 4015-3025

Dr. Sci. (Biology), Leading researcher of laboratory of pharmacological screening, FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

**Теплов Илья Юрьевич**

e-mail: t.i.y@mail.ru  
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8333-2294>  
 SPIN-код: 2478-5555

к. б. н., н. с. лаборатории внутриклеточной сигнализации ИБК РАН, Пущино, Российская Федерация, Пущино, Российская Федерация

**Илья Ю. Теплов**

e-mail: t.i.y@mail.ru  
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8333-2294>  
 SPIN code: 2478-5555

PhD, Cand. Sci. (Biology), Researcher of laboratory of intracellular signaling ICB RAS, Pushchino, Russian Federation

**Столярук Валерий Николаевич**

e-mail: vns539@yandex.ru  
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4779-427X>  
 SPIN-код: 3405-8229

к. м. н., с. н. с. лаборатории фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

**Valeriy N. Stolyaruk**

e-mail: vns539@yandex.ru  
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4779-427X>  
 SPIN code: 3405-8229

PhD, Cand. Sci. (Med.), Senior researcher scientist of laboratory of pharmacological screening FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

**Вититнова Марина Борисовна**

e-mail: MB-Vit@yandex.ru  
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7407-7516>  
 SPIN-код: 1901-8919

к. б. н., с. н. с. лаборатории фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

**Marina B. Vititnova**

e-mail: MB-Vit@yandex.ru  
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7407-7516>  
 SPIN code: 1901-8919

PhD, Cand. Sci. (Biology), Senior researcher scientist of laboratory of pharmacological screening FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

**Мокров Григорий Владимирович**

e-mail: g.mokrov@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2617-0334>

SPIN-код: 8755-7666

к. х. н., в. н. с. лаборатории тонкого органического синтеза отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

**Grigory V. Mokrov**

e-mail: g.mokrov@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2617-0334>

SPIN code: 8755-7666

PhD, Cand. Chemical Sci., Leading researcher of the fine organic synthesis laboratory at the drug chemistry department FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

**Крыжановский Сергей Александрович**

*Автор, ответственный за переписку*

e-mail: SAK-538@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2832-4739>

SPIN-код: 6596-4865

д. м. н., зав. лабораторией фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

**Sergey A. Kryzhanovskii**

*Corresponding author*

e-mail: SAK-538@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2832-4739>

SPIN code: 6596-4865

Dr. Sci (Med.), Head of laboratory of pharmacological screening FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

## Список литературы / References

- Roth GA. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018;392(10159):1736–1788. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)32203-7.
- Timmis A, Vardas P, Townsend N, et al. European Society of Cardiology: cardiovascular disease statistics 2021. *Eur Heart J*. 2022;43(8):716–799. DOI: 10.1093/eurheartj/ehab892.
- Santulli G, Lewis D, des Georges A, et al. Ryanodine Receptor Structure and Function in Health and Disease. *Subcell Biochem*. 2018;87:329–352. DOI: 10.1007/978-981-10-7757-9\_11.
- Nakai J, Imagawa T, Hakamat Y, et al. Primary structure and functional expression from cDNA of the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel. *FEBS Lett*. 1990;271(1-2):169–177. DOI: 10.1016/0014-5793(90)80399-4.
- Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol*. 1983;245(1):C1–14. DOI: 10.1152/ajpcell.1983.245.1.C1.
- Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002;415(6868):198–205. DOI: 10.1038/415198a.
- Benitah JP, Perrier R, Mercadier JJ et al. RyR2 and Calcium Release in Heart Failure. *Front Physiol*. 2021;12:734210. DOI: 10.3389/fphys.2021.734210.
- Terentyev D, Viatchenko-Karpinski S, Valdivia HH, et al. Luminal Ca<sup>2+</sup> controls termination and refractory behavior of Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release in cardiac myocytes. *Circ Res*. 2002;91(5):414–420. DOI: 10.1161/01.res.0000032490.04207.bd.
- Крыжановский С.А., Лихошерстов А.М., Цорин И.Б. и др. Скрининг кардиотропной активности в ряду α, ω-диарилметильных производных бис-(ω-аминоалкил)аминов. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2016;(2):10–13. [Kryzhanovskii SA, Likhosherstov AM, Tsorin IB et al. Screening of the compounds having cardiotropic activity among the α, ω-diarilmetil derivatives of bis-(ω-aminoalkyl)amines. *Farmakokinetika i Farmakodinamika*. 2016;(2):10–13. (In Russ.)].
- Мокров Г.В., Лихошерстов А.М., Барчуков В.В. и др. Исследование влияния положения метокси-группы на кардиотропную активность соединения АЛМ-802. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2019;(1):6–11. [Mokrov GV, Likhosherstov AM, Varchukov VV et al. Study of methoxy-group position influence on compound ALM-802 cardiotropic activity. *Farmakokinetika i Farmakodinamika*. 2019;(1):6–11. (In Russ.)]. DOI: 10.24411/2587-7836-2019-10033.
- Hayashi H, Miyata H. Fluorescence imaging of intracellular Ca<sup>2+</sup>. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1994;31(1):1–10. DOI: 10.1016/1056-8719(94)90023-x.
- Taylor CP, Meldrum BS. Na<sup>+</sup> channels as targets for neuroprotective drugs. *Trends Pharmacol Sci*. 1995;16(9):309–316. DOI: 10.1016/s0165-6147(00)89060-4.
- Gutsier UT, Gleitz J. The alkaloid 6-benzoylhetatisine inhibits voltage-gated Na<sup>+</sup> channels in rat brain synaptosomes. *Neuropharmacology*. 1998;37(9):1139–1146. DOI: 10.1016/s0028-3908(98)00114-2.
- Наумов А.П., Негуляев Ю.А., Носырева Е.Д. Изменение сродства кислотной группы натриевого канала к ионам водорода при действии аконитина. *Доклады АН СССР*. 1979;244(1):229–32. [Naumov AP, Neguliaev YA, Nosyreva ED. Changes in the affinity of the acidic group of the sodium channel for hydrogen ions following exposure to aconitine. *Dokl Akad Nauk SSSR*. 1979;244(1):229–232. (In Russ.)].
- Гриценко И.И., Зубов А.Н., Наумов А.П. Модификация натриевых каналов мембран клеток нейробластомы аконитином. *Цитология*. 1982;24(6):658–666. \* [Grishchenko II, Zubov AN, Naumov AP. Aconitine modification of cell membrane sodium channels of a neuroblastoma. *Tsitologiya*. 1982;24(6):658–666. (In Russ.)].
- Галенко-Ярошевский П.А., Каверина Н.В., Камкин А.Г. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению антиаритмических лекарственных средств. / под ред. Миронов А.Н. Бунатян Н.Д. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К; 2013:385–416. [Galenko-Yaroshevsky PA, Kaverina NV, Kamkin AG et al. Methodological recommendations for the preclinical study of antiarrhythmic drugs. Ed by Mironov AN, Bunatyan ND, et al. Guidelines for conducting preclinical studies of medicines. Part One. Moscow: Grif i K; 2012:385–416. (In Russ.)].
- Malinow MR, Battle FF, Malamud B. Nervous mechanisms in ventricular arrhythmias induced by calcium chloride in rats. *Circ Res*. 1953;1(6):554–559. DOI: 10.1161/01.res.1.6.554.
- Grumbach L, Howard JW, Merrill VI. Factors related to the initiation of ventricular fibrillation in the isolated heart; effect of calcium and potassium. *Circ Res*. 1954;2(5):452–459. DOI: 10.1161/01.res.2.5.452.
- Trautwein W. Generation and conduction of impulses in the heart as affected by drugs. *Pharmacol Rev*. 1963;15:277–332.
- Temte JV, Davis LD. Effect of calcium concentration on the transmembrane potentials of Purkinje fibers. *Circ Res*. 1967;20(1):32–44. DOI: 10.1161/01.res.20.1.32.
- Gou D, Pei X, Wang J, et al. Antiarrhythmic effects of ginsenoside Rg2 on calcium chloride-induced arrhythmias without oral toxicity. *J Ginseng Res*. 2020;44(5):717–724. DOI: 10.1016/j.jgr.2019.06.005.

22. Hoch B, Meyer R, Hetzer R, et al. Identification and expression of delta-isoforms of the multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res*. 1999;84(6):713–721. DOI: 10.1161/01.res.84.6.713.
23. Takla M, Huang CL, Jeevaratnam K. The cardiac CaMKII-Na(v)1.5 relationship: From physiology to pathology. *J Mol Cell Cardiol*. 2020;139:190–200. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2019.12.014.
24. McCauley MD, Wehrens XH. Ryanodine receptor phosphorylation, calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, and life-threatening ventricular arrhythmias. *Trends Cardiovasc Med*. 2011;21(2):48–51. DOI: 10.1016/j.tcm.2012.02.004.
25. Camors E, Valdivia HH. CaMKII regulation of cardiac ryanodine receptors and inositol triphosphate receptors. *Front Pharmacol*. 2014;5:101. DOI: 10.3389/fphar.2014.00101.
26. Wagner S, Dybkova N, Rasenack EC, et al. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na<sup>+</sup> channels. *J Clin Invest*. 2006;116(12):3127–3138. DOI: 10.1172/JCI26620.
27. Szekeres L, Papp JG. Experimental cardiac arrhythmias. Ed by Schmier J, Eichler O. Experimental Production of Diseases: Heart and Circulation. Handbook of Experimental Pharmacology. Vol. XVI/3. NY: Springer-Verlag; 1975:131–182.
28. Rohaim A, Gong L, Li J, et al. Open and Closed Structures of a Barium-Blocked Potassium Channel. *J Mol Biol*. 2020;432(17):4783–4798. DOI: 10.1016/j.jmb.2020.06.012.
29. Jiang Y, MacKinnon R. The barium site in a potassium channel by x-ray crystallography. *J Gen Physiol*. 2000;115(3):269–272. DOI: 10.1085/jgp.115.3.269.
30. Rowley CN, Roux B. A computational study of barium blockades in the KcsA potassium channel based on multi-ion potential of mean force calculations and free energy perturbation. *J Gen Physiol*. 2013;142(4):451–463. DOI: 10.1085/jgp.201311049.
31. Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, et al. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol*. 1960;70:68–78.
32. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest*. 2013;123(1):92–100. DOI: 10.1172/JCI62874.
33. Lemasters JJ, Bond JM, Chacon E, et al. The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes. *Exs*. 1996;76:99–114. DOI: 10.1007/978-3-0348-8988-9\_7.
34. Bond JM, Chacon E, Herman B, Lemasters JJ. Intracellular pH and Ca<sup>2+</sup> homeostasis in the pH paradox of reperfusion injury to neonatal rat cardiac myocytes. *Am J Physiol*. 1993;265(1 Pt 1):C129–137. DOI: 10.1152/ajpcell.1993.265.1.C129.
35. Mattiazzi A, Argenziano M, Aguilar-Sanchez Y, Mazzocchi G, Escobar AL. Ca<sup>2+</sup> Sparks and Ca<sup>2+</sup> waves are the subcellular events underlying Ca<sup>2+</sup> overload during ischemia and reperfusion in perfused intact hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 2015;79:69–78. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2014.10.011.
36. Bagheri F, Khori V, Alizadeh AM, et al. Reactive oxygen species-mediated cardiac-reperfusion injury: Mechanisms and therapies. *Life Sci*. 2016;165:43–55. DOI: 10.1016/j.lfs.2016.09.013.
37. Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, et al. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;287(4):C817–833. DOI: 10.1152/ajpcell.00139.2004.
38. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev*. 2014;94(3):909–950. DOI: 10.1152/physrev.00026.2013.
39. Ling H, Gray CB, Zamboni AC, et al. Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent protein kinase II  $\delta$  mediates myocardial ischemia/reperfusion injury through nuclear factor- $\kappa$ B. *Circ Res*. 2013;112(6):935–944. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.112.276915.
40. Becerra R, Román B, Di Carlo MN, et al. Reversible redox modifications of ryanodine receptor ameliorate ventricular arrhythmias in the ischemic-reperfused heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016;311(3):H713–724. DOI: 10.1152/ajpheart.00142.2016.