

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

¹Е.В.Блинова, ²С.Я.Скачилова, ¹Д.С.Блинов, ¹Л.Н.Сингх,
¹Ю.Н.Елизарова, ¹А.И.Мелешкин, ¹Е.А.Иванова, ¹Э.И.Салямова

АНТИАРИТМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НОВОГО АМИНОКИСЛОТСОДЕРЖАЩЕГО СОЕДИНЕНИЯ НИБЕНТАНА

¹ФГБУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва», Саранск,

²ОАО «Всероссийский научный центр по безопасности биологически активных веществ» Старая Купавна,
Россия

С целью исследования антиаритмической активности соединения рацемата нибентана с остатком L-глутаминовой кислоты выполнены опыты на 120 белых мышах обоего пола весом 18-20 г, 24 белых крысах обоего пола весом 180-220 г и 24 беспородных кошках обоего пола весом 2800-4000 г.

Ключевые слова: антиаритмические препараты, аконитиновая аритмия, окклюзионные и реперфузионные аритмии, соединения нибентана, острая токсичность.

To study the antiarrhythmic activity of L-glutamyl Nibentan racemate, experiments were carried out on 120 white mice of both sexes and the weight of 18-20 g, rats of both sexes and the weight of 180-220 g, as well as on 24 mongrel cats of both sexes and the weight of 2,800-4,000 g.

Key words: antiarrhythmics, aconitine arrhythmia, occlusion and reperfusion arrhythmias, Nibentan compounds, acute toxicity.

Крупными многоцентровыми исследованиями, проведенными на рубеже XX-XXI веков, была показана клиническая эффективность применения препаратов III класса (соталол, амиодарон) у больных, страдающих злокачественными желудочковыми аритмиями [1, 2]. При этом основным электрофизиологическим механизмом фармакологического действия представителей данной группы антиаритмиков является увеличение продолжительности потенциала действия клеток рабочего миокарда и проводящей системы сердца за счет замедления фазы реполяризации, что приводит к увеличению рефрактерных периодов и является важным механизмом в устранении аритмий, связанных с повторным входом возбуждения (re-entery) [3].

В нашей стране первым отечественным антиаритмиком III класса стал препарат нибентан, синтезированный во ВНИХФИ [3]. Однако, обладая высокой антиаритмической активностью, нибентан не лишен типичных проаритмогенных эффектов препаратов III класса (хотя их вероятность оказалась меньше, чем у аналогов), в связи с чем, для его применения требуются условия специализированных кардиологических палат и блоков интенсивного наблюдения. Недостатком нибентана является также его токсичность, не позволившая создать таблетированную лекарственную форму и использовать его не только для купирования, но и для профилактики рецидивов нарушений ритма сердца [4].

В этой связи перспективным направлением повышения эффективности и безопасности применения антиаритмиков является химическая модификация фармакологически активных веществ, позволяющая нивелировать нежелательное действие последних. Одним из таких примеров является соединение рацемата нибентана с остатком L-глутаминовой кислоты, исследованию антиаритмической активности которого и посвящена настоящая работа.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено на 120 белых мышах обоего пола весом 18-20 г и 24 белых крысах обоего пола весом 180-220 г, полученных из Филиала «Столбовая» ФГБУ НЦБМТ ФМБА, а также 24 беспородных кошках обоего пола весом 2800-4000 г, с соблюдением правил гуманного обращения с животными в соответствии с Приказом Минздравсоцразвития РФ от 23.08.2010 № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» [5].

В работе изучена субстанция (синтез и производство ОАО «ВНЦ БАВ», Россия) структурного аналога нибентана - L-глутамината-(RS)-нибентана (лабораторный шифр учреждения-разработчика - ЛХТ-01-14).

Острую токсичность соединений изучали при однократном внутрибрюшинном введении жидкой лекарственной формы ЛХТ-01-14, приготовленной ex tempore, белым лабораторным мышам. Показатель DL_{50} определяли с использованием пробит-анализа методом Миллера и Тейнтера [6]. Антиаритмическую активность ЛХТ-01-14 исследовали на следующих моделях нарушений ритма: 1) аконитиновой аритмии у крыс по Н.В.Кавериной и З.П.Сеновой [7] (при этом у наркотизированных тиопентал-натрием (40 мг/кг внутривенно) крыс моделировали предсердно-желудочковую аритмию внутривенной инъекцией нитрата аконитина (SIGMA, Швейцария) в дозе 40 мкг/кг); 2) ранней окклюзионной и реперфузионной аритмии у наркотизированных (тиопентал-натрий, 40 мг/кг внутривенно) и переведенных на искусственную вентиляцию легких («Rodent Ventilator» Ugo Basil, Италия) кошек по Б.Г.Сторожук [7].

Стартовую дозу исследуемого вещества определяли из расчета 5% от показателя DL_{50} , установленно для мышей, с учетом правил межвидового переноса

са доз [8]. Производили непрерывную регистрацию ЭКГ с помощью электрокардиографа ЭКТ-02 (Россия). Оценку тяжести нарушений ритма проводили по M.J.A.Walker и соавт. [9]. Во всех экспериментальных моделях в качестве препарата сравнения использовали структурный аналог испытуемого соединения - нибентан (субстанция, ОАО «ВНЦ БАВ», Россия). Режим дозирования препарата сравнения соответствовал таковому для исследуемого соединения.

Результаты исследования подвергались статистической обработке с использованием стандартных статистических пакетов программ Excel, Statistics 5,5 для Windows XP. Достоверность изменений изучаемых параметров оценивали с помощью непараметрического критерия «хи-квадрат» и методом t-критерия Стьюдента для зависимых и независимых выборок [10].

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Острая токсичность лекарственных средств является одним из основных параметров, характеризующих их безопасность. Показатель DL_{50} при внутрибрюшинном введении мышам для ЛХТ-01-14 составил в среднем $80,8 \pm 7,2$ (доверительный интервал от 70,9 до 90,8) мг/кг, что выше DL_{50} нибентана ($50,2 \pm 3,4$ мг/кг, $p=0,012$), и позволяет отнести изученное вещество к 3 классу токсичности по ГОСТ 12.1.007-76, то есть к классу умеренно-токсичных лекарственных веществ [11], токсичность которых расположена в диапазоне от 40-1250 мг/кг. С целью определения способности изученного соединения модифицировать ионное проведение по натриевым каналам изучили антиаритмическую активность ЛХТ-01-14 в сравнении с нибентаном на модели аконитиновой аритмии у крыс (табл. 1). Данная модель, кроме того, позволяет судить о широте терапевтического действия представляемого соединения и его ближайшего аналога. О широте терапевтического действия судили по величине антиаритмического индекса, определяемого как отношение DL_{50} при внутрибрюшинном способе введения к $ЭД_{50}$.

Проведенный эксперимент показал, что соединение рацемата нибентана с L-глутаминовой кислотой эффективно предотвращает формирование предсердной аритмии, вызванной внутривенным введением нитрата аконитина, следовательно, с высокой долей вероятности можно предположить, что веществу приписуя способность модифи-

цировать проводимость натриевых каналов [12]. При этом, значение антиаритмического индекса, рассчитанного для ЛХТ-01-14, превосходит таковой нибентана, следовательно, ЛХТ-01-14 обладает большей широтой терапевтического действия, чем сравниваемый аналог, что свидетельствует о большей его безопасности при сопоставимой активности.

В рамках исследования оценили эффективность профилактического внутривенного введения ЛХТ-01-14 и нибентана в условиях транзиторного ишемического и реперфузионного аритмогенеза, вызванного высокой перевязкой левой нисходящей коронарной артерии и ее последующей реперфузии у кошек (табл. 2). Введение исследуемого соединения в дозах 0,6 и 0,3 мг/кг (дозы пропорциональны 5% и 2,5% от показателя DL_{50} при внутрибрюшинном введении у мышей) позволило предотвратить ишемическую аритмию и ишемическую и реперфузионную фибрилляцию желудочков в 100% опытов (достоверно при сравнении с контролем при $p<0,05$) и достоверно снизить риск возникновения реперфузионной желудочковой аритмии - до 33%.

Таким образом, новое отечественное лекарственное вещество - соединение рацемата нибентана с L-глутаминовой кислотой менее токсично, чем струк-

Таблица 1.

Эффективность соединения рацемата нибентана ЛХТ-01-14 по предотвращению аконитиновой аритмии у крыс

№ п/п	Исследуемое соединение	Доза, мг/кг (% от DL_{50})*	Число животных		$ЭД_{50}$	АИ
			В опыте	Без НРС		
1	Контроль	-	10	0	-	-
2	Нибентан	1,15 (5)	10	8	0,68	73,5
3	Нибентан	0,46 (2)	10	4		
4	Нибентан	0,23 (1)	10	1		
5	ЛХТ-01-14	1,85 (5)	10	10	0,45	179,5
6	ЛХТ-01-14	0,74 (2)	10	6		
7	ЛХТ-01-14	0,37 (1)	10	4		

где, АИ - антиаритмический индекс, $ЭД_{50}$ - доза, вызывающая развитие эффекта у 50% животных (расчетная величина), * - доза рассчитана с учетом правил межвидового переноса доз [8].

Таблица 2.

Влияние соединения рацемата нибентана с L-глутаминовой кислотой на течение ранних окклюзионных и реперфузионных аритмий у кошек

Условия опыта, доза, мг/кг	Количество животных (%)					
	В опыте	Окклюзионная		В опыте	Реперфузионная	
		аритмия	ФЖ		аритмия	ФЖ
Контроль	10	10 (100%)	3 (30%)	7	7 (100%)	4 (65%)
Нибентан 0,4 мг/кг	6	0 (0%)*	0 (0%)	6	3 (50%)*	1 (17%)*
Нибентан 0,2 мг/кг	6	2 (33%)*	0 (0%)	6	4 (60%)*	2 (33%)*
ЛХТ-01-14 0,6 мг/кг	6	0 (0)*	0 (0%)	6	2 (33%)*	0 (0%)*
ЛХТ-01-14 0,3 мг/кг	6	0 (0)* ^a	0 (0%)	6	2 (33%)* ^a	0 (0%)* ^a

где, * - отличия от соответствующего контрольного значения достоверны при $p<0,05$ (критерий «хи-квадрат» Пирсона); ^a - различия при сравнении с нибентаном в сопоставимой дозе достоверны при $p<0,05$ (критерий «хи-квадрат» Пирсона); ФЖ - фибрилляция желудочков.

турный предшественник, обладает большей широтой терапевтического действия, а по силе и длительности антиаритмического эффекта на модели транзиторного

ишемического и реперфузионного аритмогенеза ЛХТ-01-14 сопоставим со своим структурным предшественником - нибентаном.

Исследование проведено при поддержке проекта (код проекта - 2859), выполняемого ФГБОУ ВПО «МГУ им. Н.П. Огарёва» в рамках Государственного задания на оказание услуг (выполнения работ) и гранта РФФИ 14-04-31104.

ЛИТЕРАТУРА

1. The ESVEM Trial: electrophysiological study versus electrocardiographic monitoring for selection of antiarrhythmic therapy of ventricular tachyarrhythmias // *Circulation*. - 1989. - Vol. 79. - P. 1345-1360.
2. The CASCADE Study :Randomized antiarrhythmic drug therapy in survivors of cardiac arrest in seattle // *Am. J. Cardiol*. - 1993. - Vol. 72. - P. 32-52.
3. Глушков Р.Г. Первый оригинальный отечественный антиаритмик III класса нибентан / Р.Г. Глушков, С.П. Голицын, Е.В. Дородникова и др. // *Вестник РАМН*. - 1998. - №4. - С. 38-44.
4. Майков Е.Б. Отечественные антиаритмические препараты III класса: от эксперимента до клиники / Е.Б. Майков, С.Ф. Соколов, С.П. Голицын и др. // *Кардиологический вестник*. - 2010. - Том 17. - №1. - С. 21-32.
5. Об утверждении правил лабораторной практики // *Российская газета*. - 2010. - Вып. 5319.
6. Беленький М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта / М.Л. Беленький. - Рига: Изд. АН ЛССР, 1963. - 130 с.
7. Экспериментальное изучение новых антиаритмических веществ: методические указания / Под. ред. чл.-
- корр. РАМН П.А. Галенко-Ярошевского. - Краснодар: Изд-во «Просвещение-Юг», 2012. - 98 с.
8. Freireich E.J. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey and man / E.J. Freireich, E.A. Gehan, D.P. Rall // *Cancer chemotherapy. repl.* - 1966. - Vol. 50. - № 4. - P. 219-244.
9. Walker M.J.A. Lambeth convention Guide-lines for the study of arrhythmias in ischemia, infarction and reperfusion / M.J.A. Walker, M.J. Curtis, D.J. Hearse // *Cardiovascular Research*. - 1988. - Vol. 22. - P. 447-455.
10. Закс Л. Статистическое оценивание. / Л. Закс. - М.: Статистика, 1976. - 598 с.
11. Березовская И.В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения / И.В. Березовская // *Химико-фармацевтический журнал*. - 2003. - Т. 37. - №3. - С. 32-34.
12. Юрвичус И.А. Формирование эктопического возбуждения в сердце под действием аконитина. II генерация осцилляторных колебаний мембранного потенциала и тока / И.А. Юрвичус, Л.В. Розенштраух // *Кардиология*. - 1980. - №8. - С. 61-65.

АНТИАРИТМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НОВОГО АМИНОКИСЛОТСОДЕРЖАЩЕГО СОЕДИНЕНИЯ НИБЕНТАНА

Е.В.Блинова, С.Я.Скачилова, Д.С.Блинов, Л.Н.Сингх, Ю.Н.Елизарова, А.И.Мелешкин, Е.А.Иванова, Э.И.Саямова

С целью исследования антиаритмической активности соединения рацемата нибентана с остатком L-глутаминовой кислоты проведены опыты на 120 белых мышах обоего пола весом 18-20 г и 24 белых крысах обоего пола весом 180-220 г, а также 24 беспородных кошках обоего пола весом 2800-4000 г. В работе изучена субстанция (синтез и производство ОАО «ВНЦ БАВ», Россия) структурного аналога нибентана - L-глутамината-(RS)-нибентана (лабораторный шифр учреждения-разработчика - ЛХТ-01-14). Острую токсичность соединений изучали при однократном внутрибрюшинном введении ЛХТ-01-14 белым лабораторным мышам. Показатель DL_{50} определяли с использованием пробит-анализа. Антиаритмическую активность ЛХТ-01-14 исследовали на моделях аконитиновой аритмии у крыс и ранней окклюзионной и реперфузионной аритмии у кошек. Стартовую дозу исследуемого вещества определяли из расчета 5% от показателя DL_{50} , установленного для мышей, с учетом правил межвидового переноса доз. В качестве препарата сравнения использовали нибентан.

Показатель DL_{50} для ЛХТ-01-14 составил в среднем $80,8 \pm 7,2$ (доверительный интервал от 70,9 до 90,8) мг/кг, что выше DL_{50} нибентана ($50,2 \pm 3,4$ мг/кг, $p=0,012$), и позволяет отнести изученное вещество к 3 классу токсичности. ЛХТ-01-14 эффективно предотвращало формирование предсердной аритмии, вызванной внутривенным введением нитрата аконитина, следовательно. При этом, значение антиаритмического индекса, рассчитанного для ЛХТ-01-14, превосходило таковой нибентана, следовательно, ЛХТ-01-14 обладает большей широтой терапевтического действия, чем сравниваемый аналог, что свидетельствует о большей его безопасности при сопоставимой активности. Введение ЛХТ-01-14 в дозах 0,6 и 0,3 мг/кг позволило предотвратить ишемическую аритмию и ишемическую и реперфузионную фибрилляцию желудочков в 100% опытов (достоверно при сравнении с контролем при $p<0,05$) и снизить риск возникновения реперфузионной желудочковой аритмии - до 33%. Таким образом, новое отечественное лекарственное вещество - соединение рацемата нибентана с L-глутаминовой кислотой менее токсично, чем структурный предшественник, обладает большей широтой терапевтического действия, а по силе и длительности антиаритмического эффекта на модели транзиторного ишемического и реперфузионного аритмогенеза ЛХТ-01-14 сопоставим со своим структурным предшественником - нибентаном.

ANTIARRHYTHMIC ACTIVITY OF A NOVEL AMINO-ACID-CONTAINING COMPOUND NIBENTAN

*E.V. Blinova, S.Ya. Skachilova, D.S. Blinov, L.N. Singh,
Yu.N. Elizarova, A.I. Meleshkin, E.A. Ivanova, E.I. Salyamova*

To study the antiarrhythmic activity of L-glutamyl Nibentan racemate, experiments were carried out on 120 white mice of both sexes and the weight of 18-20 g, rats of both sexes and the weight of 180-220 g, as well as on 24 mongrel cats of both sexes and the weight of 2,800-4,000 g. The substance of a structural analog of Nibentan, L Glutamate-(RS)-Nibentan, synthesized and manufactured by Russian Scientific Center for Safety of Biologically Active Compounds (manufacturer's ID code: LHT 01 14) was studied. The acute toxicity of the compounds was studied during a single intraperitoneal administration of LHT 01 14 to white laboratory mice. The DL50 index was assessed using the probit analysis. The LHT 01 14 antiarrhythmic activity was studied on the models of aconitine arrhythmia in rats as well as early occlusion/reperfusion arrhythmia in cats. The initial dose of the study compound was determined as 5% of murine DL50 taking the interspecies dose scaling into the account. Nibentan was used as a comparator.

DL50 for LHT 01 14 made up 80.8 ± 7.2 mg/kg (CI: 70.9-90.8 mg/kg), i.e., higher than that for Nibentan (50.2 ± 3.4 mg/kg, $p=0.012$) and permits one to consider the study compound as of Grade III of toxicity. LHT 01 14 effectively prevented development of atrial arrhythmia caused by administration of aconitine nitrate. The antiarrhythmic index calculated for LHT 01 14 is higher than that for Nibentan. Therefore, LHT 01 14 has a higher therapeutic safety than the comparator. This fact gives evidence of a higher safety of LHT 01 14 with the same activity. Administration of LHT 01 14 in doses of 0.6 mg/kg and 0.3 mg/kg prevented ischemic arrhythmia and ischemic/reperfusion ventricular fibrillation in 100% of experiments (statistically significant as compared with the control, $p<0.05$) and decreased the risk of reperfusion ventricular arrhythmia to 33%. Thus, the novel medication manufactured in Russia, Nibentan racemate compound with L-glutamyl, is less toxic than its structural predecessor, has a more considerable therapeutic window, and has a similar strength and duration of its therapeutic effect on the model of transient ischemic and reperfusion arrhythmogenesis as its structural predecessor, Nibentan.