

АНТИАРИТМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЗОНИПОРИДА (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

А. А. Спасов, Н. А. Гурова, А. С. Тимофеева, С. М. Сорокин¹

В экспериментах на крысах изучены антиаритмические свойства ингибитора Na^+/H^+ -обменника зонипорида. На модели 45-минутной ишемии миокарда с последующей 45-минутной реперфузией препарат в 2 раза снижал выраженность постреперфузионных нарушений ритма ($p \leq 0,05$). На модели 7-минутной ишемии миокарда с последующей 5-минутной реперфузией зонипорид предотвращал развитие фибрилляции желудочков в 71,43 % случаев, по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$). Соединение увеличивало порог электрических фибрилляций на 69,23 %, и сокращало время до восстановления ритма на 37,85 %.

Ключевые слова: Na^+/H^+ -обменник; зонипорид; постреперфузионные аритмии; порог фибрилляций.

ВВЕДЕНИЕ

Опасные для жизни нарушения ритма, такие как фибрилляция желудочков или блокада синусового и атриовентрикулярного узлов, являются одной из причин внезапной сердечной смерти [7, 12]. Прогноз и профилактика данных заболеваний у пациентов, имеющих в анамнезе ишемическую болезнь сердца или сердечную недостаточность, являются важными для продления и улучшения качества жизни. В этой области используются нефармакологические стратегии, такие как имплантация кардиовертера-дефибрилятора или катетерная абляция триггерных зон и проводящих путей [7, 11], так и фармакологические подходы уменьшения острого повреждения миокарда при ишемии миокарда [7, 9, 15].

В настоящее время для первичной профилактики опасных нарушений ритма разработана концепция upstream терапии (антиреמודирующей терапии) [7, 11, 12]. Она основана на способности неантиаритмических препаратов влиять на субстрат и факторы риска развития аритмий, тем самым модифицировать специфические пусковые механизмы, связанные с морфологическим ремоделированием, и предотвращать тахикардию, а значит снизить риск внезапной сердечной смерти. В первую очередь, к ним относятся ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента, статины, полиненасыщенные жирные кислоты [7, 12, 15]. И эта группа может расширяться [5, 16]. В настоящее время представляет интерес изучение антиаритмических свойств ингибиторов натрий-водородного обменника (NHE) [10, 15, 16]. В современной литературе опубликованы данные об антиаритмическом профиле таких избирательных блокаторов NHE как карипорид,

НОЕ-694, ВПВ-513, FR-168888 и др. на моделях переязки левой коронарной артерии с последующей реперфузией у экспериментальных крыс, собак, свиней, электрических фибрилляциях желудочков у крыс и стимуляции предсердий у собак [13, 14]. Данные соединения снижали вероятность развития ишемия-индуцированной желудочковой тахикардии и постреперфузионных фибрилляций желудочков, ослабляли электрофизиологическое ремоделирование, приводили к спонтанной дефибрилляции. В меньшей степени ингибиторы NHE оказались эффективны при экспериментальных аритмиях, в механизме которых лежит “ Ca^{2+} перегрузка” неишемического генеза, например вызванных катехоламинами или агонистами капша-опиоидных рецепторов [13, 14]. В литературе встречаются разрозненные данные об антиаритмических свойствах наиболее активного ингибитора NHE зонипорида.

Целью настоящего исследования явилось комплексное экспериментальное изучение антиаритмического и антифибрилляторного эффектов селективного ингибитора NHE зонипорида у крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты были выполнены на 32 крысах-самках и 34 крысах-самцах (белые беспородные крысы, ФГУП ПЛЖ “Рапполово” РАМН, ветеринарное свидетельство 247 № 0080153 от 28.11.2012), которых содержали в условиях вивария ВолгГМУ с естественным световым режимом на стандартной диете лабораторных животных в соответствии с ГОСТ Р 50258-92 (1993). Исследования проводили в соответствии с применимыми требованиями ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009, ГОСТ Р ИСО 5725-2002 и “Правил лабораторной практики”, утвержденных приказом Минздравоохранения РФ от 23 августа 2010 № 708н, с соблюдением “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях”. Все эксперименты были одобрены Этическим комитетом Волгоградского госу-

¹ ГБОУ высшего профессионального образования “Волгоградский государственный медицинский университет” Министерства здравоохранения Российской Федерации (ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России), 400131, Волгоград, пл. Павших борцов, 1.

дарственного медицинского университета, протокол № 126-2011 от 02 февраля 2011 г.

На первом этапе изучено влияние зонипорида на развитие и тяжесть экспериментальных нарушений ритма сердечных сокращений ишемического генеза [1]. Все исследования проводили в условиях наркоза (хлоралгидрат, 400 мг/кг, внутривенно), искусственной вентиляции легких, торакотомии, перикардотомии.

Длительную ишемию миокарда моделировали у крыс-самок ($n = 26$) массой 270 – 350 г путем перевязки общего ствола левой коронарной артерии (ЛКА) в течение 45 мин с последующей 45-минутной реперфузией. Зонипорид для изучения антиаритмической активности вводили за 10 мин до реперфузии. Тяжесть нарушения ритма сердечной деятельности оценивали по балльной шкале [4].

Антифибрилляторный эффект зонипорида изучали у крыс-самцов ($n = 22$) массой 380 – 450 г при кратковременной ишемии миокарда в течение 7 мин с последующей 5-минутной реперфузией. Препарат вводили за 5 мин до ишемии.

На втором этапе на крысах-самцах ($n = 12$) изучено влияние зонипорида на порог электрических фибрилляций желудочков (наркоз уретан 1,3 г/кг, внутривенно). Электрическую стимуляцию осуществляли сериями из 20 прямоугольных импульсов постоянного тока увеличивающейся интенсивности (длительность стимула — 4 мс, частота — 50 имп/с) с помощью имплантированных в миокард левого желудочка на расстоянии 0,5 см друг от друга двух позолоченных электродов электростимулятором HSE Stimulator II (HugoSachElektronik, Германия). За порог электрической фибрилляции желудочков принимали минимальную силу тока, вызывающую при двукратном повторении фибрилляцию желудочков [6]. Порог определяли через 5 мин после введения вещества с интервалом тестирующих импульсов 2 – 3 мин.

На третьем этапе изучено влияние зонипорида на основные параметры электрокардиограммы (ЭКГ) у интактных крыс-самок ($n = 6$) массой 220 – 250 г в условиях наркоза. Запись проводили до и через 5 мин после введения препарата. Оценивали продолжительность P, PQ, QRS, QT, QTc, RR в секундах, высоту R в мВ, ЧСС в уд/мин.

Во всех сериях исследований зонипорид (SIGMA, США) изучали в дозе 1 мг/кг при однократном внутривенном введении в объеме 0,1 мл на 100 г массы животного. В качестве контроля использовали растворитель (изотонический раствор натрия хлорида) в эквивалентных объемах.

Регистрацию ЭКГ производили во II стандартном отведении на компьютерном электрокардиографе “Поли-Спектр 8/В” (“Нейрософт”, Россия) или электрокардиографе ЭК 4Т-02 (Россия).

Тяжесть аритмий оценивали с помощью балльной системы [2].

Все статистические расчеты проводили с применением пакета прикладных программ Statistica для Windows 6.0, фирмы StatSoft, Inc. (США). Проводили попарное сравнение выборок с использованием U-критерия Манна — Уитни. Гипотезу о существовании различий между выборками принимали при уровне $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Аритмии представляют собой одну из форм повреждения миокарда. В раннюю 1а фазу ишемии (первые 10 мин) нарушения ритма возникают по механизму повторного вхождения возбуждающего импульса (re-entry). Это связано с замедлением деполяризации кардиомиоцитов в зоне ишемии. В раннюю 1b (последующие 10 – 60 мин) и позднюю (более 60 мин) фазы ишемии, а также при реперфузии развитие аритмий происходит не только по re-entry, но и при участии эктопического автоматизма [8].

Поэтому на первом этапе были изучены антиаритмические свойства зонипорида на моделях как длительной, так и кратковременной ишемии/реперфузии.

На модели длительной ишемии/реперфузии при перевязке левой коронарной артерии у животных развивались признаки ишемического повреждения миокарда: подъемы сегмента ST и снижение амплитуды зубца R, регистрировали наджелудочковые и желудочковые нарушения ритма. Динамика роста сегмента ST на этапах длительной ишемии/реперфузии миокарда у крыс представлена в табл. 1. Следует отметить, что у контрольных животных подъем сегмента ST сохранялся на достаточно высоком уровне как в период ишемии, так и в течение всего постреперфузионного периода,

Таблица 1. Влияние зонипорида при внутривенном введении в дозе 1 мг/кг на динамику подъема сегмента ST на этапах длительной ишемии/реперфузии миокарда у крыс (в мВ, $M \pm m$)

№	Соединение	n	Исходное значение	Ишемия, мин			Реперфузия, мин	
				5	30	45	5	45
1.	Контроль	12	0,11 ± 0,03	0,64 ± 0,08*	0,63 ± 0,05*	0,73 ± 0,10*	0,52 ± 0,05*	0,50 ± 0,03*
2.	Зонипорид	14	0,12 ± 0,03	0,60 ± 0,06*	0,69 ± 0,07*	0,66 ± 0,07*	0,48 ± 0,06*	0,36 ± 0,05**§

* — различия статистически значимы по сравнению с исходом ($p < 0,05$);

— различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p < 0,05$);

§ — различия статистически значимы по сравнению с ишемией 30 мин ($p < 0,05$).

что свидетельствует о дополнительном повреждающем действии реперфузии на миокард [8].

После введения зонипорида за 10 мин до реперфузии наметилась тенденция к снижению подъема сегмента ST. В постреперфузионный период данная тенденция продолжилась, и к 45 мин данный показатель снизился на 28 % по отношению к контролю и на 47,8 % по отношению к ишемии 30 мин ($p \leq 0,05$) (табл. 1). Полной нормализации уровня сегмента ST не происходило в обеих группах.

Во всех экспериментальных группах нарушения ритма в ишемический период составили в среднем 2,14 балла (табл. 2). В период реперфузии у контрольных животных произошло утяжеление форм развивающихся аритмий как на раннем (через 5 мин), так и на позднем (через 45 мин) этапах. Тяжесть нарушений ритма составила в среднем 2,42 балла.

После введения зонипорида наметилась тенденция к снижению тяжести аритмии. При балльной оценке аритмий, возникших в реперфузионный период, к концу периода наблюдения (45 мин) выраженность нарушений снизилась почти в 1,5 раза по отношению к контролю ($p \leq 0,05$) (табл. 2).

При изучении антифибрилляторного эффекта зонипорида на модели кратковременной ишемии/реперфу-

зии миокарда было показано, что в контрольной серии исследований фибрилляции желудочков развивались в 86,67 % случаев, при введении зонипорида за 5 мин до ишемии — в 28,57 % случаев.

Таким образом, зонипорид в дозе 1 мг/кг внутривенно показал антиаритмическую активность при его введении как до ишемии, так и перед реперфузией.

Порог электрических фибрилляций сердца в условиях ишемии миокарда снижается. При этом многие антиаритмические препараты в условиях ишемии увеличивают риск профибрилляторного действия [3, 8]. Поиск соединений с антифибрилляторными свойствами остается актуальной задачей. В период электрических стимуляций не происходит полноценного сокращения желудочков сердца, что приводит к развитию кратковременного ишемического повреждения, а следовательно, к активации натрий-водородного обменника [13, 14]. Поэтому, исходя из предварительно полученных данных, на втором этапе было решено изучить влияние зонипорида на порог фибрилляций.

У контрольной группы животных до и после введения физиологического раствора порог возникновения и продолжительность фибрилляций не изменились (табл. 3). Зонипорид вызвал повышение порога электрических фибрилляций по отношению к исходным

Таблица 2. Влияние зонипорида при внутривенном введении в дозе 1 мг/кг на тяжесть нарушений ритма на этапах длительной ишемии/реперфузии миокарда у крыс (в баллах, $M \pm m$)

№	Соединение	n	Исходное значение	Ишемия, мин			Реперфузия, мин		
				5	30	45	5	30	45
1.	Контроль	12	0,58 ± 0,23	2,17 ± 0,11	2,08 ± 0,15	2,33 ± 0,14	2,59 ± 0,15	2,25 ± 0,13	2,42 ± 0,15
2.	Зонипорид	14	0,64 ± 0,20	2,14 ± 0,18	2,07 ± 0,17	2,07 ± 0,17	2,00 ± 0,15	1,93 ± 0,20	1,64 ± 0,20*

* — различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Таблица 3. Влияние зонипорида при внутривенном введении в дозе 1 мг/кг на порог электрических фибрилляций желудочков сердца у крыс ($M \pm m$)

№	Соединение	n	Исходные фибрилляции		Фибрилляции после введения соединения	
			Порог, мА	Продолжительность, с	Порог, мА	Продолжительность, с
1.	Физиологический раствор	6	1,38 ± 0,24	78,75 ± 12,81	1,38 ± 0,24	63,75 ± 3,75
2.	Зонипорид	6	1,30 ± 0,12	72,40 ± 6,54	2,20 ± 0,58	45,00 ± 5,17*#

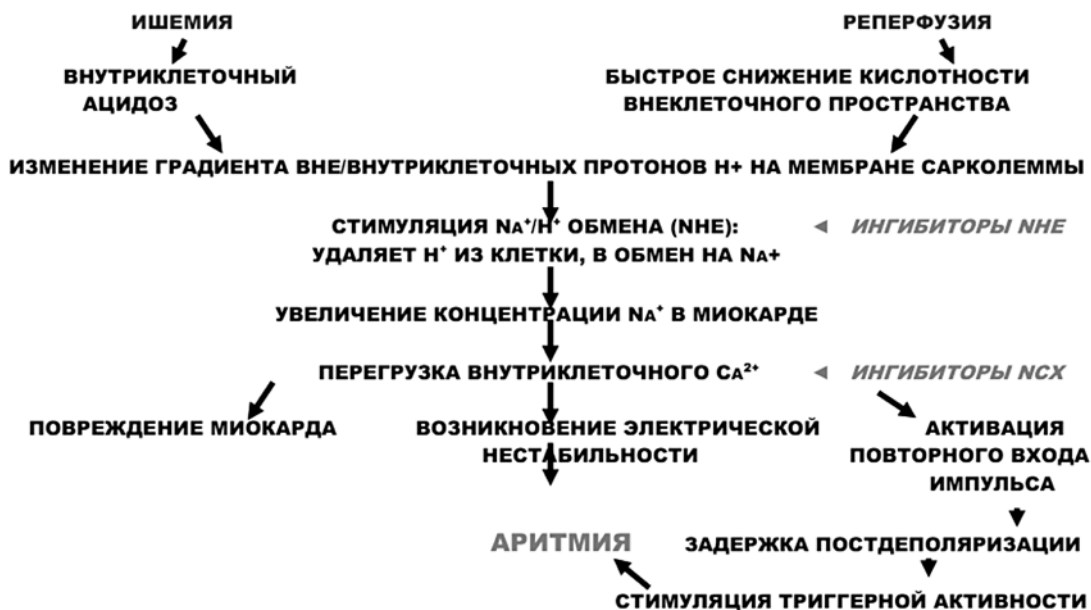
* — различия, статистически значимы по сравнению с исходом ($p < 0,05$);

— различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Таблица 4. Влияние зонипорида через 5 минут после внутривенного введения в дозе 1 мг/кг на основные параметры ЭКГ у наркотизированных крыс ($M \pm m$, n = 6)

Соединение	Показатель							
	P, с	PQ, с	QRS, с	QT, с	QTc, с	R, мВ	RR, с	ЧСС, уд/мин
Исходное значение	0,025 ± 0,002	0,047 ± 0,003	0,027 ± 0,002	0,071 ± 0,002	0,190 ± 0,004	0,200 ± 0,035	0,139 ± 0,006	433,00 ± 17,57
Зонипорид	0,027 ± 0,002	0,049 ± 0,001	0,026 ± 0,002	0,077 ± 0,002	0,201 ± 0,008	0,220 ± 0,042	0,150 ± 0,010	404,80 ± 27,15

* — различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p < 0,05$).



Механизм антиаритмического действия ингибиторов NHE при ишемии/реперфузии [12]. Примечание: NHE — натрий-водородный обменник, NCX — $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник

значениям на 69,2 %, по отношению к контролю — на 60 %. При этом время до восстановления нормального ритма сократилось как по отношению к исходному значению, так и к контролю на 37,8 ($p \leq 0,05$) и 29,4 % ($p \leq 0,05$) соответственно.

Таким образом, было показано наличие у зонипорида антифибрилляторных свойств.

Поскольку NHE является электронейтральной системой, ее ингибирование непосредственно не затрагивает сердечную электрическую деятельность. Поэтому косвенно исключить влияние ингибитора натрий-водородного обменника на потенциалзависимые каналы проводящей системы возможно при изучении изменений на ЭКГ.

При оценке влияния зонипорида на основные параметры ЭКГ у наркогизированных крыс статистически значимых изменений не выявлено (табл. 4). Отмечена тенденция к увеличению продолжительности зубца P и интервала PQ и, соответственно, снижению ЧСС. Это свидетельствует о возможном влиянии зонипорида на задержку проведения возбуждения по предсердиям. Подобные свойства ингибиторов NHE описаны в литературе [13]. Так, хотя карипорид не изменяет параметры ЭКГ, показано, что влияя на рефрактерный период предсердий и подавляя его укорочение, он купирует фибрилляции предсердий у собак. Предполагаемый механизм действия зонипорида связан с ограничением избыточного поступления кальция внутрь кардиомиоцитов при ишемии.

Процессы, происходящие в кардиомиоцитах как при ишемии, так и при реперфузии, приводят к изменению протонного градиента на мембране сарколеммы (рис. 1). Это стимулирует NHE, который осуществ-

ляет следующий обмен: водород выходит из клетки, а натрий, наоборот, входит в клетку. Вследствие этого происходит увеличение концентрации натрия в миокарде и, как результат этого, “перегрузка” внутриклеточного кальция. Избыток ионов кальция вызывает активацию механизма Ca^{2+} -entry, задержанных постдеполяризаций (триггерную активность), что приводит к развитию опасных для жизни тахиаритмий [8].

В наших исследованиях было показано, что селективный ингибитор NHE зонипорид оказался эффективным на экспериментальных моделях нарушения ритма сердца ишемического генеза. Препарат не оказывает прямого антиаритмического действия. Его эффекты в большей степени опосредованы кардиопротекторными свойствами. В ранее проведенных нами исследованиях [2] было показано, что зонипорид на модели 60-минутной ишемии и реперфузии уменьшает зону некроза, при этом наблюдается более низкий подъем тропонина I в крови. Современные антиаритмические препараты из группы блокаторов натриевых каналов или блокаторов кальциевых каналов показали низкую эффективность, а иногда и опасность применения у больных инфарктом миокарда [7, 11, 13]. Способность ограничивать кальциевую перегрузку дает возможность использовать ингибиторы NHE для предотвращения опасных нарушений ритма до и в период ишемии, также и в период реперфузии. Отсутствие влияния на проводящую систему сердца, а, следовательно, и возможного кардиодепрессивного действия, наличие кардиопротекторного действия у ингибитора NHE зонипорида делает натрий-водородный обменник привлекательной мишенью для поиска соединений для антиаритмической терапии.

ВЫВОД

Зонипорид при внутривенном введении как до, так и в период ишемии в дозе 1 мг/кг проявляет антиаритмические и антифибрилляторные свойства: в 2 раза снижает выраженность постреперфузионных нарушений ритма при длительной ишемии ($p \leq 0,05$), предотвращает развитие фибрилляции желудочков в 5,4 раза при кратковременной ишемии; увеличивает порог электрических фибрилляций желудочков на 60 %, сокращает время до восстановления ритма в 1,4 раза ($p \leq 0,05$) в экспериментах на животных.

Выражаем искреннюю благодарность сотрудникам НИИ фармакологии им. Закусова РАМН (Москва) С. А. Крыжановскому, В. Н. Столяруку, И. Б. Цорину за консультации по проведению исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. П. А. Галенко-Ярошевский, Н. В. Каверина, А. Г. Камкин и др., *Методические рекомендации по доклиническому изучению антиаритмических лекарственных средств*, в: Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая, Гриф и К, Москва (2012), сс. 385 – 416.
2. Н. А. Гурова, А. А. Спасов, А. С. Тимофеева и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **8**(76), 17 – 20 (2013).
3. Н. А. Гурова, А. А. Спасов, В. А. Анисимова, *Бюл. ФЦСКЭ им. В. А. Алмазова*, **5**, 5 – 9 (2012).
4. Н. А. Гурова, М. В. Харитоновна, Н. Г. Паньшин и др., *Волгоградский научно-мед. журн.*, **2**, 51 – 54 (2012).
5. А. А. Дьяков, В. Н. Перфилова, И. Н. Тюренков, *Вестник аритмологии*, **39**, 49 – 52 (2005).
6. С. А. Крыжановский, В. Н. Столярук, М. Б. Вититнова и др., *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, **3**(149), 290 – 293 (2010).
7. С. В. Моисеев, *Клин. фармакол. и тер.*, **3**(21), 19 – 24 (2012).
8. Н. В. Нарыжная, Л. Н. Маслов, *Бюл. ФЦСКЭ им. В. А. Алмазова*, **5**, 56 – 69 (2012).
9. В. И. Петров, А. А. Спасов, В. А. Анисимова, О. В. Кириллов, *Вестник РАМН*, **12**, 15 – 20 (2003).
10. А. А. Спасов, Н. А. Гурова, М. В. Харитоновна, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **1** (76), 43 – 48 (2013).
11. З. С. Шогенов, Н. И. Гайдукова, Н. Г. Потешкина, *Рос. кардиол. журн.*, **5**(91), 6 – 16 (2011).
12. L. Carlsson, G. Duker, I. Jacobson, *Trends Pharmacol Sci.*, **8**(31), 364 – 371 (2010).
13. K. Hashimoto, E. Nagasawa, B. M. Zhu, *Myocardial Ischemia and Preconditioning*, N. S. Dhalla, N. Takeda, M. Singh, A. Lukas (eds.), Kluwer Academic Publishers, Boston (2003), pp. 389 – 397.
14. M. Karmazyn, *Drug Develop. Res.*, **1**(55), 22 – 28 (2002).
15. S. Nanda, S. M. Siddique, M. W. Martinez, et al., *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov.*, **5**(1), 11 – 19 (2010).
16. I. Savelieva, *J. Camm, Europace*, **10**(6), 647 – 665 (2008).

Поступила 03.04.14

EXPERIMENTAL STUDY OF THE ANTIARRHYTHMIC PROPERTIES OF ZONIPORIDE

A. A. Spasov, N. A. Gurova, A. S. Timofeeva, and S. M. Sorokin

Volgograd State Medical University, plosch. Pavshikh Bortsov 1, Volgograd, 400131 Russia

The antiarrhythmic properties of the Na^+/H^+ -exchanger inhibitor zoniporide have been studied in experiments on rats. On the model of 45-min myocardial ischemia followed by 45-min reperfusion, the drug produced a significant (two-fold) decrease in the intensity of post-reperfusion arrhythmias ($p \leq 0.05$). On the model of 7-min ischemia followed by 5-min reperfusion, zoniporide prevented the development of ventricular fibrillation in 71.43% of cases as compared to control ($p \leq 0.05$). The drug also increased the threshold of electrical fibrillation by 69.23% and reduced the time to recovery of the heart rhythm by 37.85%.

Keywords: Na^+/H^+ -exchanger; zoniporide; post-reperfusion arrhythmia; fibrillation threshold