УДК 615.224, 615.216.001, 891.53

ОЦЕНКА АНТИАРИТМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ МОРФОЛИНОУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

И.П. Рудакова[1]*, О.В. Гашкова[1]

Резюме. Целью настоящего исследования явилось изучение антиаритмического действия новых продуктов органического синтеза. Изучена острая токсичность, антиаритмическая и проаритмическая активность этих соединений. Наиболее выраженный эффект был обнаружен при использовании соединений М-0 и М-18. Они проявили наибольшую антиаритмическую активность и минимальную токсичность. Соединение М-18 показало себя менее опасным, чем М-0, так как не выявило достоверно выраженного побочного аритмогенного действия.

Ключевые слова: аритмия, острая токсичность, эффективная антиаритмическая доза, аритмогенный эффект.

ASSESSMENT OF ANTIARRHYTHMIC ACTIVITY AND SAFETY OF NEW DERIVATIVES OF MORPHOLINOACETIC ACID

I.P. Rudakova[1]*, O. V. Gashkova[1]

Abstract. Study of the anti-arrhythmic influence of the new organic synthesis's products was the purpose of an actual research. Such characteristics of these compounds as acute toxicity, anti-arrhythmic and pro-arrhythmic activity were studied. The mostly strongly marked effect was discovered while using M-0 and M-18. These compounds showed the highest anti-arrhythmic activity and the lowest toxicity. It was also discovered that M-18 compound is less dangerous than M-0 one due to absence of the certainly expressed spill-over effect of an arrhythmogenic action.

Keywords: arrhythmia, acute toxicity, effective antiarrhythmic dose, arrhythmogenic effect.

1 – ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России), 614990, Россия, г. Пермь, ул. Полевая, 2

1 – Perm State Pharmaceutical Academy, Ministry of Health of Russia, 2, Polevaya str., Perm, 614990, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: perm@pfa.ru
Тел.: 8 (342) 233 55 01, 236 90 50

ВВЕДЕНИЕ

Нарушения сердечного ритма представляют собой одно из наиболее частых проявлений заболеваний сердечно-сосудистой системы. Они могут быть обусловлены как органическими поражениями сердца, так и его функциональными расстройствами. Механизмы развития аритмий различны, поэтому для их лечения необходимы лекарственные средства с широким спектром антиаритмического действия. В связи с этим совершенствование фармакологических методов устранения и предупреждения аритмий является важным направлением в борьбе с расстройствами ритма сердца [1]. При этом лечение нарушений ритма сердца с помощью антиаритмических препаратов нередко сопровождается побочными эффектами, так как многие антиаритмические средства в большей или меньшей степени характеризуются аритмогенным действием. Причиной могут быть большие дозы препарата, увеличение скорости его введения, взаимодействие с другими лекарственными средствами, заболевания печени и почек, нарушения электролитного баланса. По данным клинических наблюдений, вероятность развития аритмогенного эффекта составляет в среднем 10%. При этом проаритмическое действие может выражаться в усилении имеющейся аритмии и инициировании нового, до сих пор не наблюдаемого у данного пациента нарушения ритма [2, 3].

Целью настоящею исследования явилось изучение влияния новых производных морфолиноуксусной кислоты, синтезированных на кафедре общей и органической химии ПГФА и проявивших антиаритмические свойства, на наличие у них аритмогенного действия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оценку биологической активности соединений проводили в опытах на животных, полученных из питомника «Андреевка» Московской области. Животные содержались в типовом виварии с естественным 12-часовым светотеневым циклом при температуре воздуха 20±2 °С. Их питание осуществлялось в соответствии с нормами кормов для экспериментальных животных. У животных был неограниченный доступ к воде благодаря специальным поилкам для грызунов.

Предварительно производился санитарно-химический и бактериологический анализ воды. Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики (GLP) и приказу МЗ РФ № 199н от 01.04.2016 «Правила надлежащей лабораторной практики».

В опытах на мышах определяли острую токсичность соединений при внутривенном способе введения. Скрининговую оценку антиаритмической активности проводили на модели аритмии, вызванной внутривенным введением мышам обоего пола массой 22–25 г 3% раствора хлорида кальция [10% раствор в ампулах по 10 мл (ООО Фирма «БиоХимФарм», Россия)] в дозе 280 мг/кг [4]. Среднесмертельные и эффективные антиаритмические дозы определяли экспресс-методом по Прозоровскому [5]. Активность соединений оценивали по средней эффективной дозе ($ЭД_{50}$) и антиаритмическому индексу ($АИ=ЛД_{50}/ЭД_{50}$). Для дальнейшего изучения антиаритмической активности опыты проводились на модели явного нарушения сердечного ритма у бодрствующих крыс, вызванного внутривенным введением химического вещества; с этой целью была использована аконитиновая модель аритмии. Животным внутривенно вводили аконитин [порошок кристаллический во флаконах по 100 мг (Sigma-Aldrich, Китай)] в дозе 20 мкг/кг через 2 минуты после введения исследуемого вещества в дозе, равной $ЭД_{50}$. В ходе эксперимента оценку реакции сердца регистрировали с помощью электрокардиографа (ЭКГ) во II стандартном отведении [6]. Учитывали частоту гибели животных и продолжительность аритмии после введения соединения.

Для исследования аритмогенного действия соединения опыты проводились на нелинейных крысах обоего пола массой 180–250 г. Наркотизированные этиловым эфиром крысы фиксировались на операционном столе в положении на спине, затем у них регистрировалась ЭКГ во II стандартном отведении. Животные разделялись на 4 группы, в каждую из которых было включено 10 крыс. В 1-ю (контрольную) группу входили крысы, которым внутривенно вводили физиологический раствор по 0,2 мл в течение 2 с. ЭКГ регистрировали в момент введения раствора и в течение следующих 30 с. Во 2-ю группу включались животные, которым внутривенно вводили 1,5% раствор KCl [4% раствор для инъекций (ООО Фирма «БиоХимФарм», Россия)] в минимальной аритмогенной дозе 20 мг/кг в течение 2 с. ЭКГ у них регистрировалась непрерывно с момента введения KCl до восстановления синусового ритма. Крысам 3-й группы внутривенно вводили исследуемое соединение в эффективной антиаритмической дозе, а через 5 мин – 1,5% раствор KCl в дозе 20 мг/кг. ЭКГ регистрировали до восстановления синусового ритма. Крысам 4-й группы за 5 мин до введения 1,5% раствора KCl проводили инфузию препарата сравнения в эффективной антиаритмической дозе. ЭКГ также регистрировали до восстановления синусового ритма [6]. Учитывали частоту развития аритмий, их продолжительность и смертность животных.

В качестве препаратов сравнения использовались «Лидокаин» [2% раствор для инъекций (ОАО «Биохимик», Россия)] и «Верапамил» [раствор для внутривенного введения (ОАО «Биосинтез», Россия)].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием ЭВМ на базе программы STATISTICA 8.0. Результаты исследований обработаны статистически с определением t-критерия Стьюдента [7]. Данные представлены в виде выборочного среднего M, ошибки среднего m и достигнутого уровня значимости p. Минимальный уровень значимости различий принимали соответствующим $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Острая токсичность была исследована у 20 соединений в ряду производных морфолиноуксусной кислоты. Определение $ЛД_{50}$ позволило выявить вещества с минимальной токсичностью. При оценке антиаритмической активности на модели хлоридкальциевой аритмии для них были определены эффективные антиаритмические дозы. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Острая токсичность и антиаритмическая активность производных морфолиноуксусной кислоты при хлоридкальциевой аритмии у мышей

Соединение	$ЛД_{50}$, мг/кг	$ЭД_{50}$, мг/кг	АИ ($ЛД_{50}$ / $ЭД_{50}$)
М-0	231,0 (213,0±254,0)	6,4 (4,9±8,6)	36,1
М-1	32,5 (28,0±38,0)	Неактивно	
М-2	32,5 (28,0±38,0)	Неактивно	–
М-3	103,0 (88,0±118,0)	44,7 (37,0±59,0)	2,3
М-4	65,0 (53,0±80,0)	Неактивно	–
М-5	73,0 (53,0±100,0)	Неактивно	–
М-6	12,9 (11,0±15,0)	5,5 (4,0±7,5)	2,3
М-7	30,0 (24,0±38,0)	4,6 (3,3±6,3)	6,5
М-8	129,0 (110,0±150,0)	60,0 (48,0±74,0)	2,2
М-9	28,2 (23,0±34,0)	5,5 (4,0±7,5)	5,1
М-10	34,6 (25,0±48,0)	4,4 (3,2±6,0)	7,8
М-11	65,0 (53,0±80,0)	13,7 (10,0±19,0)	4,7
М-12	69,0 (50,0±95,0)	12,0 (10,0±15,0)	5,8
М-14	178,0(150,0±210,0)	54,7 (40,0±75,0)	3,3
М-15	103,0 (88,0±118,0)	29,3 (22,0±30,0)	3,5
М-16	129,0 (110,0±150,0)	89,0 (75,0±106,0)	1,4
М-17	129,0 (100,0±160,0)	44,7 (37,0±59,0)	2,9
М-18	146,0 (110,0±200,0)	11,2 (9,2±13,4)	13,0
М-19	258,0 (210,0±320,0)	35,5 (31,0±40,0)	7,2
М-20	65,0 (56,0±75,0)	Неактивно	–
Лидокаин	39,3 (34,2±44,5)	7,7 (5,9±9,4)	5,1
Верапамил	10,5 (8,5±12,5)	2,5 (1,8±3,5)	4,2

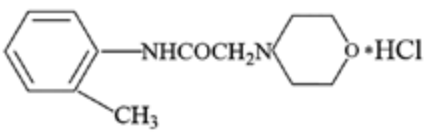
При исследовании острой токсичности соединений было установлено, что наиболее токсичным является соединение М-6, его $ЛД_{50}$ при внутривенном введении составила 12,9 мг/кг, что сравнимо с токсичностью верапамила, но на уровне лидокаина оно показало себя как более токсичное.

Вещества М-0, М-14, М-15, М-16, М-17, М-18 и М-19, относящиеся к производным морфолиноуксусной кислоты, проявили меньшую токсичность. $ЛД_{50}$ этих соединений составила 129-258 мг/кг, что значительно превосходило показатели препаратов сравнения. Минимальной оказалась токсичность соединения М-19, его среднесмертельная доза равнялась 258 мг/кг и превышала $ЛД_{50}$ лидокаина в 6,6 раза, а верапамила – в 24,6 раза.

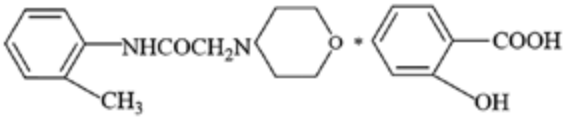
На основании показателей $ЛД_{50}$ и $ЭД_{50}$ определялся антиаритмический индекс изучаемых соединений. Из 20 исследованных соединений 5 веществ совсем не проявили антиаритмической активности, лишь у 8 из них (М-0, М-6, М-7, М-9, М-10, М-11, М-12, М-18) средние эффективные дозы были минимальны и составляли 4,4-13,7 мг/кг, остальные имели $ЭД_{50}$ в пределах от 35,5 до 60,0 мг/кг.

В результате максимальная широта терапевтического действия была обнаружена у соединений М-0 и М-18 [8], их АИ оказались наибольшими и равнялись 36,1 и 13,0 соответственно. Относительная активность большинства веществ по сравнению с лидокаином и верапамилом оказалась невысокой. Однако антиаритмический эффект соединения М-0 превосходил действие лидокаина в 7,1 и действие верапамила в 8,6 раза. Активность соединения М-18 оказалась выше в 2,5 раза по сравнению с лидокаином и в 3,1 раза по сравнению с верапамилом.

Для дальнейшего исследования были выбраны соединения, проявившие наибольшую антиаритмическую активность на модели хлоридкальциевой аритмии и обладающие наименьшей токсичностью, – орто-толуидид морфолиноуксусной кислоты (М-0) и синтезированная на его основе соль салициловой кислоты (М-18).



М-0



М-18

Данные, полученные при изучении антиаритмической активности соединений на аконитиновой модели, представлены в таблице 2.

В результате исследования было установлено, что после введения аконитина у всех животных возникало нарушение ритма сердца, продолжительность аритмии при этом составила 626,5 с. Предварительное введение препарата сравнения – лидокаина несколько увеличивало длительность аритмии по сравнению с контрольным результатом. Кроме того, лидокаин не предупреждал гибель крыс, смертность животных, погибших на фоне развившейся аритмии в среднем через 15 мин, составила 40%, что оказалось достоверно больше, чем в контроле. Введение верапамила также не предупреждало развитие аритмии, ее продолжительность не отличалась от контрольного показателя, однако данный препарат сравнения полностью предупреждал гибель животных в опыте.

Таблица 2.

Антиаритмическая активность исследуемых соединений в условиях аконитиновой аритмии у крыс

Соединения	Количество животных в опыте	Доза ($ЭД_{50}$), мг/кг	Продолжительность аритмии, с	Гибель, %
Контроль	10	–	626,5±95,2	10
М-0		6,4	508,0±67,2 p > 0,05 p′ > 0,05 p» > 0,05	0
М-18	10	11,2	650,5±138,6 p>0,05 p′>0,05 p′′>0,05	10
Лидокаин	10	7,7	929,7±263,5 p>0,05	40
Верапамил	10	2,5	561,0±92,7 p>0,05	0

Примечание: p – достоверность в сравнении с контролем;
p′ – достоверность в сравнении с лидокаином;
p′′ – достоверность в сравнении с верапамилом.

Средняя продолжительность аритмии, вызванной введением раствора аконитина, после предварительного введения соединений М-0 и М-18 также практически не отличалась от контрольного уровня. При этом при использовании соединения М-18 гибель животных на фоне развившейся аритмии наступала в 10% случаев, что несколько меньше по сравнению с данным показателем, полученным при введении ли-

докаина. Соединение М-0 показало результат, сопоставимый по данному показателю с активностью верапамила.

Именно у этих соединений была проведена оценка выраженности аритмогенного действия. Данные, полученные в результате опытов, отражены в таблице 3.

Установлено, что введение физиологического раствора животным не вызывало у них изменений ЭКГ. После внутривенного введения крысам 1,5% раствора хлористого калия у всех животных возникало нарушение ритма сердца, продолжительность которого достигала 36,5 с. При этом в контрольной серии опытов гибель на фоне развившейся аритмии не наступала.

Таблица 3.

Влияние исследуемых соединений на K^+-индуцированные нарушения ритма сердца у крыс

Соединение	Частота аритмии, %	Продолжительность аритмии, с	Выживаемость, %
Контроль (физиол. р-р)	0	0	100
Контроль (1,5% р-р KCl)	100	36,5±5,6	100
М-0	100	75,0 ± 15,7 p<0,05 p'>0,05 p''<0,05	100
М-18	100	53,0±18,9 p>0,05 p'>0,05 p''<0,05	100
Лидокаин	100	110,0±31,9 p<0,05	80
Верапамил	100	185,6±44,2 p<0,002	20

Примечание: p – достоверность по сравнению с контролем;
p' – достоверность по сравнению с лидокаином;
p'' – достоверность по сравнению с верапамилом.

На фоне предварительного введения и лидокаина, и верапамила аритмии, вызванные гипополяризацией плазматических мембран кардиомиоцитов, регистрировались в 100% случаев. При этом период от момента появления первых отклонений от нормы до восстановления синусового ритма по сравнению с контролем достоверно увеличивался. При использовании лидокаина время аритмии удлинялось в 3 раза, а при введении верапамила – в 5 раз, то есть эти препараты в значительной степени провоцировали усиление аритмии у подопытных животных. Кроме того, в этих сериях опытов отмечался низкий уровень выживаемости животных. Аритмии, усиливавшиеся при использовании лидокаина, заканчивались гибелью 20%, а верапамила – 80% животных.

При введении соединения М-0 частота появления аритмий, вызванных введением KCl, также не уменьшалась, а их продолжительность увеличивалась, данное вещество удлиняло время аритмии в 2 раза по сравнению с контрольными результатами, что было сопоставимо с эффектом лидокаина. В опытах с соединением М-18 частота появления аритмий снизилась на 20%, кроме того, не происходило достоверного по сравнению с контролем увеличения продолжительности нарушений ритма, этот показатель для исследуемого вещества оказался в 2 раза меньше, чем для лидокаина, а по сравнению с верапамилом был меньше в 3,5 раза. В опытах с введением животным соединений М-0 и М-18 смертность на фоне хлоридкалиевой аритмии не регистрировалась.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, было установлено, что новые производные морфолиноуксусной кислоты – М-0 и М-18 проявили выраженный антиаритмический эффект на модели хлоридкальциевой аритмии. При этом соединение М-18 показало себя как менее опасное по сравнению и с соединением М-0, и с известными противоаритмическими препаратами, так как не проявило достоверно выраженного побочного аритмогенного действия. Полученные результаты указывают на целесообразность проведения дальнейших углубленных фармакологических исследований для выявления механизмов действия данных соединений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Патофизиология сердечно-сосудистой системы / Под ред. Л. Лилли – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. 672 с.
2. О.Л. Бокерия. Медикаментозное лечение внезапной сердечной смерти // Анналы аритмологии. 2013. № 2. С. 101–110.
3. Руководство по кардиологии / Под ред. В. Н. Коваленко. – К.: Морион, 2008. 1424 с.
4. В.В. Горбунова, Н.П. Горбунов. Сравнительное изучение активности антиаритмическикх средств при хлоридкальциевой аритмии у мышей // Фармакология и токсикология. 1983. № 3. С. 48–50.
5. В.Б. Прозоровский, М.П. Прозоровская, В.М. Демченко. Экспресс-метод определения средней эффективной дозы и ее ошибки // Фармакология и токсикология. 1978. Т. 41. № 4. С. 497–502.
6. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. А. Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
7. В.Б. Прозоровский. Статистическая обработка результатов фармакологических исследований // Психофармакология и биологическая наркология. 2007. Т. 7. № 3–4. С. 2090–2120.
8. И.П. Рудакова, О.В. Гашкова, Б.Я. Сыропятов, С.В. Чащина, Л.А. Чекрышкина. Исследование антиаритмической активности производных морфолиноуксусной кислоты // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2015. № 11. С. 33–36.