

СОЕДИНЕНИЕ SS-68 ПОДАВЛЯЕТ ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ СТИМУЛЯЦИИ М3-ХОЛИНОРЕЦЕПТОРОВ В МИОКАРДЕ ЛЕВОГО ПРЕДСЕРДИЯ КРЫСЫ

¹Кафедра фармакологии Кубанского государственного медицинского университета,
Россия, 350063, г. Краснодар, ул. Седина, 4;

тел. + 7-928-429-21-22. E-mail: galenko.yarochevsky@gmail.com;

²кафедра физиологии человека и животных

Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова,

Россия, 119991, г. Москва, ул. Ленинские Горы, 1; тел. +7-916-603-05-02. E-mail: abram340@mail.ru;

³кафедра химии природных и высокомолекулярных соединений Южного федерального университета,

Россия, г. Ростов-на-Дону, ул. Зорге, 7; тел. + 7-918-856-71-00. E-mail: konsuz@gmail.com

В работе исследовалось действие соединения SS-68, обладающего яркими антиаритмическими свойствами, на выраженность электрофизиологических эффектов избирательной стимуляции М3-холинорецепторов в предсердном миокарде крысы. М3-рецепторы активировались мускариновым агонистом пилокарпином (10 мкМ) на фоне высокоселективного блокатора М2-холинорецепторов метоктрамина (100 нМ). При этом в изолированных препаратах левого предсердия регистрировалось уменьшение длительности потенциалов действия на $20 \pm 2,2\%$ от контрольной. SS-68 (10 мкМ) снижало выраженность укорочения потенциалов действия более чем в 2 раза – до $7,9 \pm 1,1\%$ от контрольной длительности. Также SS-68 существенно подавляло эффекты пилокарпина в отсутствие М2-блокатора. Таким образом, соединение SS-68 уменьшает как эффект совместной активации М2- и М3-рецепторов в предсердном миокарде, так и воздействие избирательной стимуляции М3-рецепторов.

Ключевые слова: сердце, потенциал действия, мускариновые рецепторы, пилокарпин, антиаритмик.

S. K. BOGUS¹, D. V. ABRAMCHKIN², K. F. SUZDALEV³, P. A. GALENKO-YAROSHEVSKY¹

THE COMPOUND SS-68 ATTENUATES ELECTROPHYSIOLOGICAL EFFECTS
OF M3 CHOLINORECEPTORS STIMULATION IN RAT LEFT ATRIAL MYOCARDIUM

¹Department of pharmacology the Kuban state medical university,

Russia, 350063, Krasnodar, Sedina str., 4; tel. +7-928-429-21-22. E-mail: galenko.yarochevsky@gmail.com;

²department of human and animal physiology of Lomonosov Moscow state university,

Russia, 119991, Moscow, Leninskie Gory, 1; tel. +7-916-603-05-02. E-mail: abram340@mail.ru;

³department of natural and high molecular compounds chemistry of southern Federal university,

Russia, Rostov on Don, Zorge str., 7; tel. +7-918-856-71-00. E-mail: konsuz@gmail.com

In the present study we have investigated influence of SS-68, which has been previously demonstrated to produce potent antiarrhythmic effects in mammalian myocardium, on the electrophysiological effects of selective M3 cholinoreceptors stimulation in rat atrial myocardium. M3 receptors were activated with muscarinic agonist pilocarpine (10 μ M) in the presence of highly selective blocker of M2 cholinoreceptors methoctramine (100 nM). In isolated left atrial preparations M3 stimulation produced reduction of action potential duration by $20 \pm 2,2\%$ of control duration. SS-68 (10 μ M) decreased intensity of action potential shortening more than twice – to $7,9 \pm 1,1\%$ of control action potential duration. SS-68 also suppressed action potential shortening produced by pilocarpine in the absence of M2 antagonist. Thus, compound SS-68 attenuates effect of joint activation of M2 and M3 receptors as well as the effect of selective M3 stimulation.

Key words: heart, action potential, muscarinic receptors, pilocarpine, antiarrhythmic drugs.

Парасимпатическая регуляция сердца чрезвычайно важна для его нормальной работы. Нейромедиатор ацетилхолин (АХ), выделяющийся из окончаний интрамуральных постганглионарных парасимпатических нейронов, является основным эффектором парасимпатической нервной

системы. Широко известно, что АХ действует на пейсмекерные и рабочие кардиомиоциты посредством мускариновых рецепторов второго подтипа (М2-рецепторов), вызывая, соответственно, отрицательный хроно- и инотропный эффекты [10]. Однако в последнее время появилось мно-

жество свидетельств существования в миокарде млекопитающих функционально активных холинорецепторов третьего типа (M3-рецепторов) [11, 16, 18]. Помимо важной кардиопротекторной функции M3-рецепторов, проявляющейся в условиях ишемии и реализуемой посредством активации антиапоптотических сигнальных путей [19], а также нормализации кальциевого гомеостаза [15], их стимуляция может существенно видоизменять конфигурацию электрической активности миокарда в нормальных, непатологических условиях.

Влияние активации M3-рецепторов на электрическую активность может быть особенно важным для предсердного миокарда, поскольку холинергические воздействия считаются одним из основных проаритмических факторов в суправентрикулярных отделах сердца [9]. В предсердном миокарде морской свинки [13, 17] и собаки [14] селективная стимуляция M3-рецепторов пилокарпином в присутствии блокатора M2-рецепторов метоктрамина приводит к уменьшению длительности потенциалов действия (ПД) за счет активации особого калиевого тока I_{KM3} , сходного с обычными токами задержанного выпрямления. В препаратах предсердного миокарда крысы [6] и мыши [7] избирательная M3-стимуляция также вызывает укорочение ПД, которое, по предварительным данным, обусловлено не увеличением калиевой проводимости, а ослаблением кальциевого тока L-типа.

Соединение SS-68 является производным индола, синтезированным в НИИ физической и органической химии Южного федерального университета. Помимо умеренной антиангинальной активности [1] было описано выраженное антиаритмическое действие SS-68 [2]. В частности, сильный антиаритмический эффект SS-68 был обнаружен в предсердиях собак в модели фибрилляции предсердий, вызванной высокочастотной стимуляцией. Механизмы антиаритмического воздействия SS-68 выяснены не в полной мере. В предсердном и желудочковом миокарде мыши SS-68 в концентрации 1 мкМ вызывает укорочение ПД, которое при увеличении концентрации до 10 мкМ и выше сменяется увеличением его длительности [8]. Такое дозозависимое видоизменение электрической активности обусловлено воздействием на целый ряд ионных токов, в первую очередь подавлением кальциевого тока L-типа, а в более высоких концентрациях – ультрабыстро калиевого тока I_{Kur} [8].

Важным механизмом антиаритмической активности может служить подавление холинергических влияний на суправентрикулярный миокард, описанное, в частности, для известного отечественного антиаритмика III класса нибентана [5]. В настоящей работе впервые демонстрируется способность SS-68 ослаблять эффекты мускари-

нового агониста пилокарпина, в том числе в условиях полной блокады M2-рецепторов, когда все холинергические эффекты реализуются за счет M3-рецепторов.

Материалы и методы исследования

В работе использовали четырехмесячных самцов белых нелинейных крыс ($n = 16$) массой 280–310 г. Животные содержались в виварии с 12-часовым искусственным освещением в течение 2 недель перед экспериментом в стандартных клетках T4 и получали воду и корм без ограничений. Крыс декапитировали, после чего быстро вскрывали грудную клетку, выделяли сердце и промывали раствором Тироде (состав в ммоль/л: NaCl 133,47; KCl 4,69; $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 1,35; $NaHCO_3$ 16,31; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,18; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 2,5; глюкоза 7,77), насыщенным карбогеном (газовая смесь 95% O_2 , 5% CO_2). Затем из сердца выделяли препарат ушка левого предсердия, который закрепляли в экспериментальной камере объемом 3 мл (температура 38° С, скорость потока раствора 10 мл/мин) эндокардиальной стороной вверх и стимулировали с помощью серебряных электродов с частотой 5 Гц в течение всего эксперимента.

ПД регистрировали стандартным методом внутриклеточного отведения биоэлектрической активности с помощью острых стеклянных микроэлектродов [12] сопротивлением 25–50 МОм, подключенных к усилителю «Neuroprobe-1600» («AM-Systems», США). Сигнал оцифровывался на аналогово-цифровом преобразователе E14-140 («L-Card», Россия) и записывался на компьютере с помощью программы «Powergraph v.3.3» («DiSoft», Россия). Обработку данных проводили в программе «MiniAnalysis v.3.0.1» («Synptosoft», США). При анализе записей определяли длительность ПД на уровне 50% и 90%-ной реполяризации (ДПД50 и ДПД90, соответственно), а также амплитуду ПД и величину потенциала покоя.

В экспериментах использовали 3 вещества: селективный блокатор M2-рецепторов метоктрамин, агонист M-рецепторов пилокарпин, обладающий небольшой специфичностью по отношению к M1- и M3-рецепторам по сравнению с M2- и M4-рецепторами, а также исследуемое SS-68. Метоктрамин и пилокарпин были заказаны в «Sigma» (США), SS-68 получено во НИИ физической и органической химии Южного федерального университета. Концентрации метоктрамина и пилокарпина были выбраны, исходя из данных предыдущих исследований [6, 7, 17].

Статистическую обработку результатов проводили в программе «Statistica v.6.0». При оценке достоверности различий для связанных выборок использовали критерий Вилкоксона, для несвязанных – критерий Манна-Уитни. Использование непараметрических критериев было обусловлено

малыми размерами выборок, не позволяющими гарантировать нормальность распределения.

Результаты исследования

В первой серии экспериментов оценивалось влияние SS-68 на эффект пилокарпина в отсутствие селективных блокаторов типов мускариновых рецепторов, то есть эффект, обусловленный активацией всех типов мускариновых рецепторов, присутствующих в миокарде. Сперва в течение 7 минут в экспериментальную камеру подавали раствор, содержащий пилокарпин (10 мкМ), затем после 20-минутной отмывки контрольным раствором подавали в течение 7 минут раствор SS-68 (10 мкМ), вслед за чем на фоне SS-68 апплицировали пилокарпин. В отсутствие SS-68 пилокарпин вызывал ярко выраженное уменьшение длительности ПД, измеренной как на уровне 50%-ной, так и на уровне 90%-ной реполяризации (рис. 1А, 3). Максимальный эффект пилокарпина развивался в течение около 250–300 сек. с момента начала

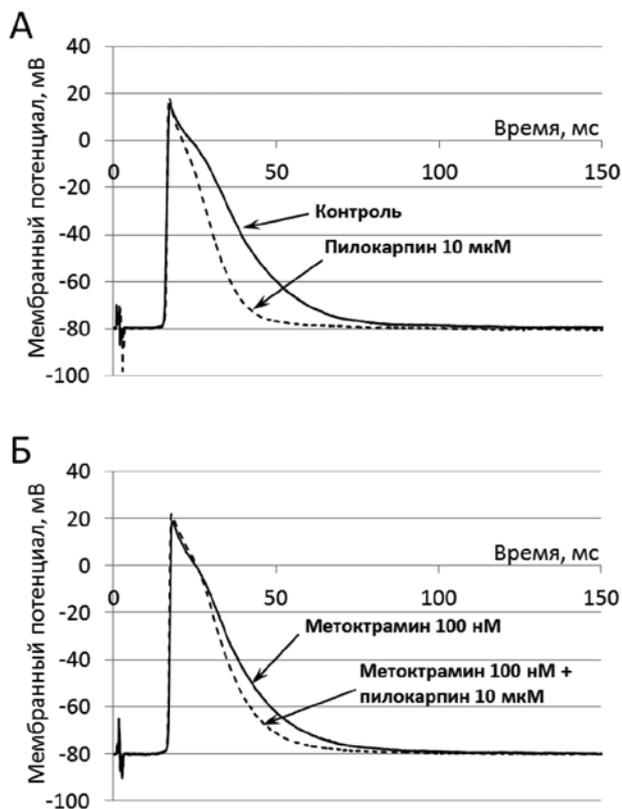


Рис. 1. Влияние SS-68 на электрофизиологические эффекты мускаринового агониста пилокарпина в препаратах левого предсердия крысы, работающих в навязанном ритме

Примечание: представлены оригинальные репрезентативные записи ПД, полученные в нормальных условиях (А) и на фоне 10 мкМ SS-68 (Б) перед аппликацией 10 мкМ пилокарпина и во время развития его максимального эффекта.

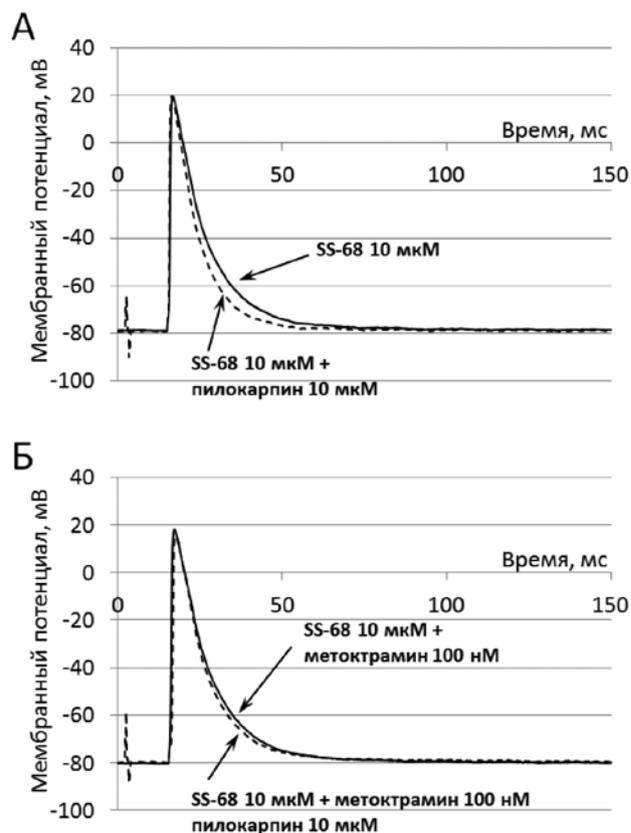


Рис. 2. Влияние SS-68 на электрофизиологические эффекты избирательной стимуляции М3-рецепторов в препаратах левого предсердия крысы, работающих в навязанном ритме

Примечание: представлены оригинальные репрезентативные записи ПД, полученные на фоне 100 нМ селективного М2-антагониста метоктрамина (А) и на фоне комбинации метоктрамина и 10 мкМ SS-68 (Б) перед аппликацией 10 мкМ мускаринового агониста пилокарпина и во время развития его максимального эффекта.

аппликации вещества, в дальнейшем мы будем обсуждать только максимальные значения эффектов пилокарпина. Амплитуда ПД, а также значения потенциала покоя под действием пилокарпина не изменялись.

На фоне SS-68 индуцированное пилокарпином укорочение ПД было выражено достоверно слабее, чем в норме (рис. 1, 3). Уменьшение ДПД50 было снижено на фоне SS-68 более чем в 2 раза, на 52,5%, а уменьшение ДПД90 – на 32%. Таким образом, SS-68 в концентрации 10 мкМ значительно ослабляет эффекты общей стимуляции мускариновых рецепторов в предсердном миокарде.

Во второй серии экспериментов для избирательной стимуляции М3-рецепторов использовали аппликацию пилокарпина в присутствии высокоселективного блокатора М2-рецепторов метоктрамина (100 нМ). Поскольку согласно ранним данным

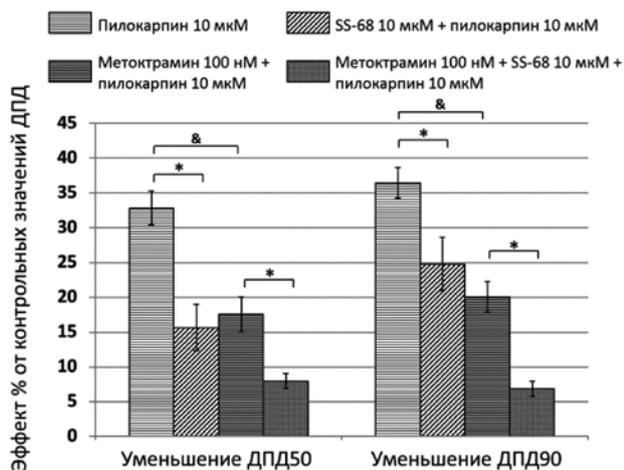


Рис. 3. Сравнение выраженности уменьшения длительности ПД на уровне 50%-ной и 90%-ной реполяризации под действием 10 мкМ пилокарпина в нормальных условиях, на фоне 10 мкМ SS-68, в условиях блокады M2-рецепторов метоктрамином (100 нМ), а также на фоне комбинированного воздействия метоктрамина и SS-68

Примечание: для всех столбцов $n = 8$. * – достоверность различия эффекта пилокарпина в отсутствие и на фоне SS-68, $p < 0,05$, тест Вилкоксона. & – достоверность отличия эффекта избирательной M3-стимуляции от общего эффекта пилокарпина, $p < 0,05$, тест Манна-Уитни.

[6, 7, 17] в кардиомиоцитах крысы функционально активные M1-рецепторы отсутствуют, а M4-рецепторы играют незначительную роль, можно считать, что в таких условиях пилокарпин активирует исключительно M3-рецепторы.

Важно отметить, что концентрация 100 нМ метоктрамина достаточна для полной блокады M2-рецепторов. Ранее показано, что увеличение концентрации до 500 нМ не влияет на выраженность эффектов пилокарпина [6]. Кроме того, известно, что эффекты пилокарпина при нанесении его на предсердия крысы и мышцы на фоне 100 нМ метоктрамина полностью блокируются селективным M3-антагонистом 4-DAMP [6, 7], а следовательно, опосредованы именно M3-рецепторами.

Эффект избирательной стимуляции M3-рецепторов был качественно сходен с действием пилокарпина в отсутствие блокаторов, однако выражен приблизительно в 2 раза слабее (рис. 2А, 3). На фоне 10 мкМ SS-68 укорочение ПД, вызванное M3-стимуляцией, было снижено на 66% для ДПД90 и на 55% для ДПД50 (рис. 2, 3). Таким образом, антихолинергическое действие SS-68 было в данном случае еще более выражено, чем в случае совместной активации M2- и M3-рецепторов.

Обсуждение

Полученные нами данные позволяют утверждать, что соединение SS-68, во-первых, снижает электрофизиологические эффекты совместной стимуляции M2- и M3-рецепторов, то есть оказывает общее антихолинергическое действие, а во-вторых, подавляет эффекты селективной активации M3-рецепторов в предсердном миокарде крысы. Подобное антихолинергическое действие не является уникальным для антиаритмических препаратов. В частности, оно описано для отечественных антиаритмиков нибентана и ниферидила [3, 4, 5]. Однако его можно объяснить как способностью вещества блокировать непосредственно мускариновые рецепторы, так и его воздействием на конечные звенья запускаемых этими рецепторами сигнальных каскадов, в частности, на ионные каналы, обуславливающие конфигурацию электрической активности.

Результаты наших предварительных экспериментов на предсердных кардиомиоцитах морской свинки указывают, что SS-68 способно подавлять калиевый ацетилхолинзависимый ток $I_{K_{ACh}}$. Однако снижение SS-68 эффекта от стимуляции M3-рецепторов нельзя объяснить его действием на $I_{K_{ACh}}$, так как этот ток активируется только при стимуляции четных мускариновых рецепторов (M2 и M4) [10]. Одно из возможных объяснений действия SS-68 помимо непосредственного блокирования M3-рецепторов может быть связано с его способностью уже в небольших концентрациях подавлять кальциевый ток L-типа [8]. Уменьшение кальциевого тока считается одним из возможных механизмов укорочения ПД при стимуляции M3-рецепторов, поэтому эффект от M3-стимуляции на фоне уже сниженного SS-68 кальциевого тока будет слабее. В целом имеющихся данных недостаточно для установления механизма антихолинергического действия SS-68, решение этой проблемы требует дальнейших детальных исследований.

Феномен антихолинергического действия SS-68 может представлять определенную практическую ценность в связи с тем, что усиление холинергических влияний на предсердный миокард является широко известным проаритмическим фактором [9]. При этом многие антиаритмики III класса на фоне активации мускариновых рецепторов теряют свою эффективность в связи с уменьшением вклада их мишени, калиевого тока задержанного выпрямления, в осуществление реполяризации.

Соединение SS-68 синтезировано в рамках государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации № 4.129.2014/К. Спектры ЯМР снимали в учебно-научной лаборатории резонансной спектроскопии кафедры химии природных и высокомолекулярных соединений Южного федерального университета.

ЛИТЕРАТУРА

1. Богус С. К., Галенко-Ярошевский П. А. Исследование антиангинальных свойств производного индола SS-68 // Новые технологии. – 2012. – № 4. – С. 265–269.
2. Богус С. К., Галенко-Ярошевский П. А., Суздальев К. Ф. Антиаритмическая активность производного индола SS-68 при желудочковых и предсердных формах нарушений ритма сердца // Новые технологии. – 2012. – № 4. – С. 274–279.
3. Федоров В. В., Иванова И. А., Глухов А. В. и др. Холинолитическая активность антиаритмического препарата III класса РФ-2 // Кардиология. – 2004. – Т. 44. № 7. – С. 62–66.
4. Федоров В. В., Розенштраух Л. В., Резник А. В. и др. Антиаритмическая активность препарата III класса РФ-2 на ваготонической модели фибрилляции предсердий // Кардиология. – 2004. – Т. 44. № 11. – С. 66–73.
5. Федоров В. В., Шарифов О. Ф., Розенштраух Л. В. и др. Механизм антиаритмического действия нибентана на экспериментальной модели ваготонической фибрилляции предсердий // Кардиология. – 1999. – Т. 39. № 3. – С. 45–56.
6. Abramochkin D. V., Suris M. A., Borodinova A. A. et al. M3 cholinergic receptors: new mediator of acetylcholine action on myocardium // Neurochem. j. – 2008. – Vol. 2. № 1–2. – P. 90–94.
7. Abramochkin D. V., Tapilina S. V., Sukhova G. S. et al. Functional M3 cholinergic receptors are present in pacemaker and working myocardium of murine heart // Pflugers arch. – 2012. – Vol. 464. № 4. – P. 523–529.
8. Bogus S. K., Abramochkin D. V., Galenko-Yaroshevsky P. A. et al. Effects of a new antiarrhythmic drug SS-68 on electrical activity in working atrial and ventricular myocardium of mouse and their ionic mechanisms // J. pharmacol. sci. – 2015. – Vol. 128. № 4. – P. 202–207.
9. Coumel P. Autonomic influences in atrial tachyarrhythmias // J. cardiovasc. electrophysiol. – 1996. – Vol. 7. – P. 999–1007.
10. Dhein S., Van Koppen C. J., Brodde O. Muscarinic receptors in the mammalian heart // Pharmacol. res. – 2001. – Vol. 44. № 3. – P. 161–182.
11. Hang P., Zhao J., Qi J. et al. Novel insights into the pervasive role of M(3) muscarinic receptor in cardiac diseases // Cur. drug. targets. – 2013. – Vol. 14. № 3. – P. 372–377.
12. Hoffman B. F., Cranefield P. F. Electrophysiology of the heart. – New York: McGraw-Hill Book Company Inc., 1960.
13. Shi H., Wang H., Lu Y. et al. Choline modulates cardiac membrane repolarization by activating an M3 muscarinic receptor and its coupled K⁺ channel // J. membrane biol. – 1999. – Vol. 169. – P. 55–64.
14. Shi H., Wang H., Wang Z. M3 muscarinic receptor activation of a delayed rectifier potassium current in canine atrial myocytes // Life sci. – 1999. – Vol. 64. № 21. – P. 251–257.
15. Wang S., Han H. M., Jiang Y. N. et al. Activation of cardiac M3 muscarinic acetylcholine receptors has cardioprotective effects against ischaemia-induced arrhythmias // Clin. exp. pharmacol. physiol. – 2012. – Vol. 39. № 4. – P. 343–349.
16. Wang H., Lu Y., Wang Z. Function of cardiac M3 receptors // Auton. autac. pharmacol. – 2007. – Vol. 27. – P. 1–11.
17. Wang H., Shi H., Lu Y. et al. Pilocarpine modulates the cellular electrical properties of mammalian hearts by activating a cardiac M3 receptor and a K⁺ current // Br. j. pharmacol. – 1999. – Vol. 126. – P. 1725–1734.
18. Wang Z., Shi H., Wang H. Functional M3 muscarinic receptors in mammalian hearts // Br. j. pharmacol. – 2004. – Vol. 142. – P. 395–408.
19. Yang B., Lin H., Xu C. et al. Choline produces cytoprotective effects against ischemic myocardial injuries: evidence for the role of cardiac M3 subtype muscarinic acetylcholine receptors // Cel. physiol. biochem. – 2005. – Vol. 16. № 4–6. – P. 163–174.

Поступила 16.02.2016

С. Б. БОГДАНОВ, Е. А. ТЕРМАН, Ю. А. БОГДАНОВА

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАНЕВОГО ЛОЖА ПРИ ПРИЖИВЛЕНИИ ПОЛНОСЛОЙНОГО КОЖНОГО АУТОТРАНСПЛАНТАТА

ГБУЗ «Научно-исследовательский институт – Краевая клиническая больница № 1 имени профессора С. В. Очаповского» министерства здравоохранения Краснодарского края, Россия, 350086, г. Краснодар, ул. 1 Мая, 167; тел. (861) 252-72-58. E-mail: bogdanovsb@mail.ru; кафедра хирургии № 1 ФПК и ППС, общей и клинической патофизиологии ГБОУ КубГМУ Минздрава России, Россия, 350063, г. Краснодар, ул. Седина, 4

Разработаны хирургические методы оперативного лечения глубоких ожогов, создающие условия для приживления полнослойного кожного аутотрансплантата на гнойную рану. Изучены патоморфологические аспекты раневого ложа после иссечения грануляций и краев раны при приживлении полнослойного трансплантата у 5 пациентов. Проведены исследования фиброзного слоя грануляционной ткани.

Ключевые слова: патоморфология, кожа, пластика, ожоговая рана.

S. B. BOGDANOV, E. A. TERMAN, Y. A. BOGDANOVA