

ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ КОМПЛЕКСА АМИОДАРОНА ГИДРОХЛОРИДА С МОНОАММОНИЙНОЙ СОЛЬЮ ГЛИЦИРИЗИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Ощепкова Ю.И.*, Узбеков В.В.*, Жумаев И.З.**, Рустамов Ш.Ю.**, Усманов П.Б.**, Салихов Ш.И.*

*Институт биоорганической химии им. акад. А.С. Садыкова АН РУз,

**Институт биофизики и биохимии при национальном университете Узбекистана

XULOSA

Tadqiqotning maqsadi. GKMAT⁺ amiodaron GX(8:1) kompleksining liposomal shakldagi o'ziga xos faolligini o'rganish.

Materiallar va usullar. Amiodaronni liposomal shaklining papillaryar mushakning qisqarish va funktsional faolligiga hamda miokard faolligiga in vitro ta'sirini o'rganish izometrik rejimda mexanografiya texnikasi yordamida amalga oshirildi.

Olingan natijalar. Liposomal GKMAT-amiodaron GX (8:1) kompleksi olindi va uning antiaritmik va gipotenziv faolligi CaCl₂ tomonidan qo'zg'atilgan aritmiya modellarida liposomal GKMAT-amiodaron GX (8:1) kompleksi bilan solishtirganda aniqlandi. Liposomal GKMAT-amiodaron GX (8:1) kompleksi, liposomal GKMAT-amiodaron GX (8:1) kompleksi va nazorat guruhi bilan solishtirganda, aniqroq antiaritmik ta'sirga ega ekanligi, mushaklarning qisqarishini mos ravishda 10 ± 3.7 va $80\pm2.4\%$ ga tezroq tiklashi ko'rsatildi, bu esa Ca²⁺-kanallarining blokadasi bilan ta'minlanadi, bu esa kardiomiotsitlarda [Ca²⁺]_i darajasining pasayishi va yurak mushagining qisqarish faolligining pasayishi bilan birga keladi. Giperkalemiya keltirib chiqargan kalamushlarda aorta qon- tomir preparatlarining qisqarish faolligiga dozaga bog'liq ta'sirini o'rganish bo'yicha tajribalarda, giperkalemiya keltirib chiqargan aorta preparatining qisqarish amplitudasining (50 mM) GKMAT-Amiodarone GX (8:1) kompleksining liposomal shakli konsentratsiyasi 2 μ M dan 30 μ Mgacha oshgan nazorat guruhiga nisbatan 10.3 ± 3.9 dan $82.9\pm3.8\%$ gacha ishchonchli pasayishi aniqlandi.

Xulosa. Amiodaron preparatining ishlab chiqilgan liposomal shakli toksik ta'sirlarning sezilarli darajada kamayishi va yurak ritmini tiklash uchun zarur bo'lgan vaqtini qisqartirishga moyilligi tufayli istiqbolli antiaritmik preparatga aylanishi mumkinligi kutilmoqda.

Kalit so'zlar: yurak-qon tomir kasalliklari, amiodaron gidrochlorid, liposomal shakl, antiaritmik ta'sir, gipotenziv ta'sir, vazorelaksant ta'sir.

Аритмии осложняют течение острого инфаркта миокарда в 80-100% случаев, усугубляя явления левожелудочковой недостаточности, и являются самой частой причиной смерти на догоспитальном этапе

SUMMARY

The aim of the study. Study of the specific activity of the complex MASGA⁺ amiodarone HC(8:1) in liposomal form.

Material and research methods. The study of the effect of the liposomal form of amiodarone on the contractile and functional activity of the papillary muscle and on the activity of the myocardium in vitro was carried out using the mechanography technique in isometric mode.

Results. A liposomal MASGA-amiodarone HC (8:1) complex was obtained and its antiarrhythmic and hypotensive activity was determined in models of CaCl₂-induced arrhythmia in comparison with a liposomal MASGA-amiodarone HC (8:1) complex. It was shown that a liposomal MASGA-amiodarone HC (8:1) complex, in comparison with a liposomal MASGA-amiodarone HC (8:1) complex and the control, has a more pronounced antiarrhythmic effect, restoring muscle contractions by 10 ± 3.7 and $80\pm2.4\%$ faster, respectively, which is provided by the blockade of Ca²⁺ channels, accompanied by a decrease in the [Ca²⁺]_i level in cardiomyocytes and a decrease in the contractile activity of the heart muscle. In experiments to study the dose-dependent effect on the contractile activity of aortic vascular preparations in rats induced by hyperkalemia, a reliable decrease in the amplitude of contraction of the aortic preparation induced by hyperkalemia (50 mM) was found from 10.3 ± 3.9 to $82.9\pm3.8\%$ compared to the control with an increase in the concentration of the liposomal form of the MASGA-Amiodarone GHC (8:1) complex from 2 μ M to 30 μ M.

Conclusion. It is expected that the designed liposomal form of the drug amiodarone may become a promising antiarrhythmic drug, due to a noticeable reduction in toxic effects and a pronounced tendency to reduce the time required to restore heart rhythm.

Keywords:cardiovascular diseases, amiodarone hydrochloride, liposomal form, antiarrhythmic effect, hypotensive effect, vasorelaxant effect.

[3, 6]. Около 10% больных, выживших после инфаркта миокарда, умирают в течение года от аритмий [2]. Нарушения сердечного ритма вносят значительный вклад в патогенез сердечно-сосудистых заболеваний

и смертность, поэтому антиаритмическая терапия является одним из важнейших направлений современной кардиологии. Арсенал антиаритмических препаратов постоянно пополняется новыми антиаритмическими средствами. Возможности лечения и профилактики различных видов сердечной патологии, обусловленных нарушениями ритма, расширяются. Однако побочные эффекты ААП являются основной причиной, ограничивающей их применение.

Амиодарона гидрохлорид (Ам ГХ) – эффективный и широко применяемый антиаритмический препарат, относится к III классу антиаритмических препаратов (блокирование калиевых каналов), однако ему присущи свойства всех четырех классов (блокирование натриевых каналов, неконкурентное β -адреноблокирующее действие, подавление медленных кальциевых каналов и α -блокирующий эффект) [5]. Основным недостатком амиодарона является риск развития множества экстракардиальных побочных эффектов, которые при длительном приеме препарата наблюдаются у 10-52% больных.

Ранее нами были получены комплексы амиодарона гидрохлорида с глицерризиновой кислотой (ГК) иmonoаммонийной солью глицерризиновой кислоты (МАСГК) в мольном соотношении 1:2, 1:4, 1:8 [8] и изучена их биологическая активность на моделях CaCl_2 -индуцированной аритмии в сравнении с амиодароном ГХ [7]. Было показано, что эффект комплекса МАСГК+амиодарон ГХ (8:1) на 70% ($p \leq 0,01$) больше по сравнению с чистым амиодароном.

С целью дальнейшего совершенствования препарата, а также снижения терапевтической дозы предполагалось получение комплекса МАСГК+амиодарон ГХ (8:1) в липосомальной форме и изучение ее свойств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Синтез комплекса МАСГК+амиодарон ГХ 8:1 (w:w) проводили в соответствии с [13].

Получение липосом, нагруженных комплексом МАСГК+амиодарон ГХ 8:1 (w:w) Липосомы с инкорпорированным комплексом МАСГК+амиодарон ГХ 8:1 (w:w) получали методом диспергирования липидного слоя. Аликвоту раствора фосфатидилхолина в спирте или хлороформе известной концентрации, а также навеску холестерина, взятые в весовом соотношении 5:2, соответственно, помещали в круглодонную колбу и добавляли необходимое количество комплекса в виде его раствора в метаноле. Растворители упаривали на роторном испарителе, добавляли хлороформ для полного растворения всех компонентов и медленно, без применения водяной бани, упаривали его так, чтобы компоненты образовали тонкую пленку на поверхности колбы. Полученную липидную пленку гидратировали 1-2 мл изотонического фосфатно-солевого буфера Дюльбекко (ФСБД) без добавления ионов кальция и магния при постоянном перемешивании на вибромешалке до образования дисперсии молочно-белого цвета. Объем доводили

ФСБД до 3-5 мл, эмульсию центрифугировали 3-5 мин при 5000-6000 об/мин, супернатант отбрасывали, осадок диспергировали в ФСБД, процедуру повторяли. Готовые липосомы диспергировали для хранения и дальнейшего использования в ФСБД, либо переводили в раствор Кребса-Рингера [11].

Регистрация функциональной активности. Изучение влияния исследуемых соединений на сократительную и функциональную активность папиллярной мышцы и на активность миокарда в условиях *in vitro* осуществляли с применением методики механографии в изометрическом режиме с помощью преобразователя силы сокращения мышцы типа F30 (Модель D-79232; HSE, Германия), сигнал с датчика натяжения подавался на усилитель (ТАМ-А, HSE, Германия) и регистрировался в цифровом формате (Logger_Lite*.gmb) при помощи аналого-цифрового преобразователя (LabPro Logger Lite 1.2, Vernier Software & Technology, Beaverton, США) со специальным программным обеспечением в компьютере IBM PC [4].

Аритмия вызывалась инъекцией раствора CaCl_2 (140 мг/кг, внутривенно), и регистрировались случаи фибрилляции желудочков, желудочковой экстрасистолии и желудочковой тахикардии. Сократительную активность сердечной мышцы оценивали в изометрическом режиме с помощью разработанной программы [4].

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ OriginLab OriginPro v.6.1 (США). Для выявления достоверности изменений до и после влияния комплексных соединений использовали парный *t*-критерий Стьюдента. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,01$ и $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для эффективной коррекции аритмических повреждений сердца необходимо создание транспортных систем для адресной доставки фармакологических препаратов в зоны повреждения. Одним из направлений в этом аспекте является разработка транспортных контейнеров для фармацевтических препаратов на основе использования липосом [12].

В наших предыдущих исследованиях [13] при изучении дозозависимого действия комплекса МАСГК+амиодарон ГХ (8:1) на сократительную активность папиллярной мышцы сердца крысы было установлено, что 30 мкМ (рис.1) снижают силу сокращения мышцы на 97,2±3,9% по сравнению с контролем. МАСГК+амиодарон ГХ (8:1) в липосомальной форме в концентрации 25 мкМ уменьшает силу сокращения мышц на 98,4±3,9% по сравнению с контролем (рис. 1).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что комплекс МАСГК+амиодарон ГХ (8:1) в липосомальной форме проявляет более выраженное действие по сравнению с МАСГК+амиодарон ГХ (8:1).

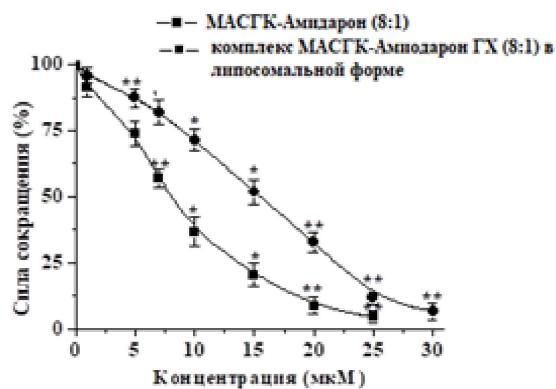


Рис. 1. Влияние комплексов амиодарона гидрохлорида на силу сокращения папиллярной мышцы сердца крысы *in vitro*. По оси ординат — сила сокращения папиллярной мышцы, выраженная в процентах от контроля, принятого за 100%, по оси абсцисс — концентрация амиодарона (мкМ). Во всех случаях (*- $p<0,05$; **- $p<0,01$). Частота стимуляции 1 Гц ($t=+36\pm0,5^{\circ}\text{C}$; $n=5$).

Для оценки особенностей антиаритмического действия комплекса МАСГК-амиодарон ГХ (8:1) в липосомальной форме было изучено его влияние на модели CaCl_2 -индуцированной аритмии в сравнении с комплексом МАСГК-амиодарон ГХ (8:1). Было установлено, что в присутствии 30 мкМ МАСГК-Амиодарона ГХ (8:1), восстановление сокращений мышцы происходило в течении 3 мин после его внесения в среду инкубации (рис. 2А). Более выражен-

ным эффектом на фоне CaCl_2 (10 мМ) - индуцированной аритмии обладал комплекс МАСГК-амиодарон ГХ (8:1) в липосомальной форме (25 мкМ), в присутствии которого восстановление сокращений мышцы наблюдалось в течении 2 мин после ее внесения в среду инкубации. Также, наряду с антиаритмическим действием комплекса в липосомальной форме, было установлено, что амплитуда сокращения мышц восстанавливалась до 90% (рис. 2Б).

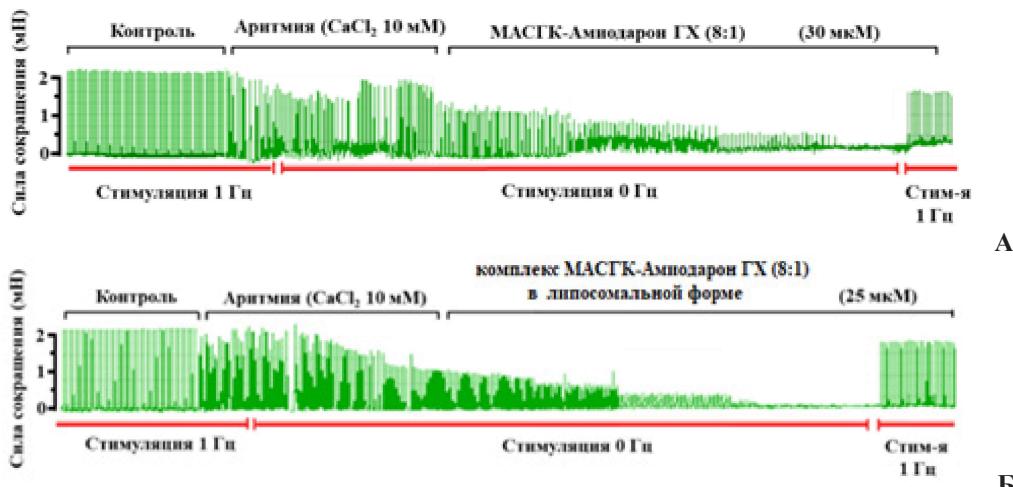


Рис. 2. Влияние соединений на CaCl_2 (10 мМ)-индуцированную аритмию на папиллярной мышце крысы в условиях *in vitro* (оригинальная запись). Частота стимуляции 1 Гц ($+36\pm0,5^{\circ}\text{C}$).

Результаты, полученные в процессе выполнения данной работы, свидетельствуют о том, что исследуемый комплекс МАСГК-амиодарон ГХ (8:1) в липосомальной форме обладает более выраженным антиаритмическим действием, которое обеспечивается благодаря блокаде Ca^{2+} -каналов, сопровождающей уменьшением уровня $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в кардиомиоцитах и снижением сократительной активности сердечной мышцы.

Ионы Ca^{2+} играют ключевую роль в сокращении и расслаблении гладких мышц, поддерживающих функцию сосудов, а также в контроле сосудистого тонуса, при котором внутриклеточная концентрация $[\text{Ca}^{2+}]_i$ обеспечивается различными

Ca^{2+} -транспортными системами расположены в плазмолемме клетки и саркоплазматическом ретикулуме. Дисфункция систем, регулирующих динамику содержания $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в гладкомышечных клетках, приводит к изменению сосудистого тонуса и развитию различных патологий, в том числе артериальной гипертензии. Поэтому эффект большинства гипотензивных средств основан на релаксирующей активности, связанной со снижением $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

В связи с этим был изучен гипотензивный потенциал комплекса МАСГК-Амиодарон ГХ (8:1) в липосомальной форме, для чего были изучены эффекты на тонус аорты крысы. Было обнаружено, что комплекс МАСГК-Амиодарон ГХ (8:1) в липосомальной фор-

ме уменьшает амплитуду сокращения препарата аорты, индуцированного раствором гиперкалиемии (50 мМ), в зависимости от дозы. В частности, было установлено, что влияние комплекса МАСГК-Амиодарон ГХ (8:1) в липосомальной форме на амплитуду сокращения препарата аорты снизилось с $10,3 \pm 3,9\%$ до

$82,9 \pm 3,8\%$ по сравнению с контролем в концентрации от 2 мкМ до 30 мкМ. При этом значение ED50 (концентрация, снижающая силу сокращения на 50% по сравнению с максимальной) комплекса МАСГК-Амиодарон ГХ (8:1) в липосомальной форме было равно 12,6 мкМ (рис. 3).

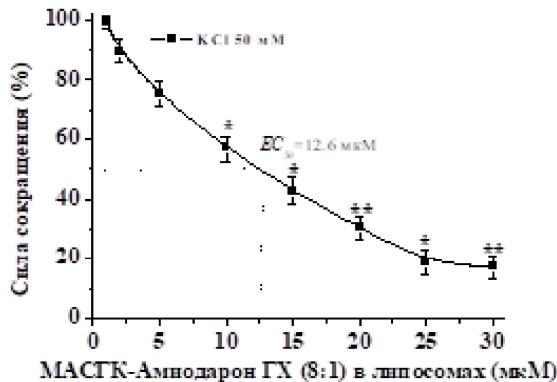


Рис. 3. Влияние комплекса МАСГК-Амиодарон ГХ (8:1) в липосомальной форме на индуцированную KCl (50 мМ) сократительную активность препарата аорта крыс *in vitro*. По оси ординат сила сокращения препарата аорты выражена в процентах, за 100% принята сила сокращения, вызванная 50 мМ KCl. По оси абсцисс - концентрация соединения (мкМ) (*p<0,05; **p<0,01; n=4).

По данным литературы, сокращение препарата гладких мышц аорты, индуцированное гиперкалиемией, происходит с увеличением уровня внутриклеточных ионов Ca^{2+} в результате активации потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов [10]. Как показано выше, вазорелаксантное действие комплекса МАСГК-Амиодарон ГХ (8:1) в липосомальной форме может быть связано со снижением активности потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов, что приводит к уменьшению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} .

Также в экспериментах, проведенных на препарате папиллярной мышцы сердца, было отмечено, что комплекс МАСГК-Амиодарон ГХ (8:1) в липосомальной форме оказывает антиаритмическое действие за счет модуляции потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов. Учитывая это, в следующих экспериментах исследовали влияние комплекса МАСГК-Амиодарон ГХ (8:1) в липосомальной форме на потенциалзави-

симые Ca^{2+} -каналы гладкомышечных клеток сосудов аорты.

С целью оценки участия потенциално-зависимых Ca^{2+} -каналов в вазорелаксантном эффекте комплекса МАСГК-Амиодарон ГХ (8:1) в липосомальной форме были проведены исследования в присутствии специфического блокатора Ca^{2+} -каналов - верапамила ($\text{IC}_{50}=0,1$ мкМ) [9]. Было отмечено, что в условиях инкубации верапамила ($\text{IC}_{50}=0,1$ мкМ) препарат гладких мышц аорты снижал силу сокращения, индуцированного гиперкалиемией, на $49,6 \pm 4,3\%$ по сравнению с контролем. При исследовании влияния полумаксимальной эффективной ($\text{IC}_{50}=12,6$ мкМ) концентрации комплекса МАСГК-Амиодарон ГХ (8:1) в липосомальной форме в этих условиях, было обнаружено, что сила мышечного сокращения дополнительно снижалась на $31,7 \pm 4,1\%$ (рис. 4).

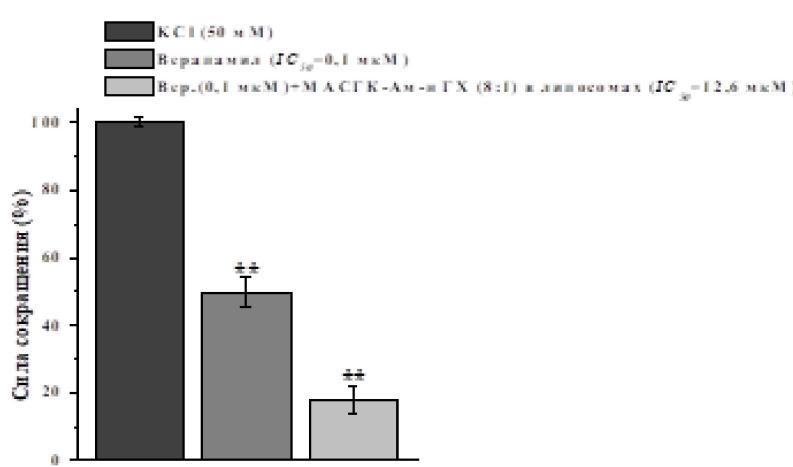


Рис. 4. Действие комплекса МАСГК-Амиодарон ГХ (8:1) в липосомальной форме и верапамила на сократительную активность аорты крысы, индуцированную KCl (50 мМ). По оси ординат сила сокращения препарата аорты выражена в процентах, силу сокращения выраженную 50 мМ KCl, принимали за 100% (**p<0,01; n=4).

Полученные результаты показали, что вазорелаксантный эффект комплекса МАСГК-амиодарон ГХ (8:1) при включении в липосомальные структуры связан с ингибиением Ca^{2+} -каналов L-типа в мембране ГМК аорты, что может быть связано с уменьшением поступления ионов Ca^{2+} в ГМК и снижением в количестве клеточного $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$.

Полученная липосомальная форма может стать перспективным антиаритмическим препаратом, обладающим более выраженным антиаритмическим эффектом, пролонгированным действием и уменьшенной токсичностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балтина Л.А., Кондратенко Р.М., Мустафина С.Р. и др. Способ получения глициризиновой кислоты из глицирама. Фармакологические свойства // Хим.-фарм. журнал. – 2001. – Т.35(1). – С.38-41.
2. Констант Дж. Клиническая диагностика заболеваний сердца – 2004.
3. Окороков А.Н. Диагностика болезней внутренних органов. – 2006 – Т.7.
4. Программа для ЭВМ «Анализ кинетики мышечного сокращения»: Государственное патентное ведомство РУз. Свидетельство №DGU 01873. 18.12.2009 г.
5. Сулимов В.А., Гиляров М.Ю. Амиодарон: особенности клинического применения // Русский медицинский журнал. – 2008. – Т.16. – №6. – с.375–81.
6. Сыркин А.Л., Добровольский А.В. Тактика лечения больных с постоянной формой мерцательной аритмии: современное состояние проблемы // Consilium medicum. – 2001. – Т.10. – С. 492-496.
7. Чазов Е.И. // Сердце: журнал для практикующих врачей. – 2002. – Т.1(1). – С. 6-8.
8. Юлдашев Х.А., Эсанов Р.С., Узбеков В.В. и др. Супрамолекулярные комплексы глициризиновой кислоты и ееmonoаммонийной соли с этацизин гидрохлоридом // Химия растительного сырья. – 2023. – № 4. – С. 249-257.
9. Cleary L., Vandepitte C., Kelly J.G., Docherty J.R. Actions of R and S verapamil and nifedipine on rat vascular and intestinal smooth muscle // Auton Autacoid Pharmacol. – 2004. – Vol. 24. – P.63-67.
10. Jackson W.F. Ion channels and vascular tone // Hypertension. – 2000. – Vol. 35. – P.173-178. doi: 10.1161/01.hyp.35.1.173.
11. Usmanov P.B., Jumayev I.Z., Rustamov Sh.Yu. et al. The Combined Inotropic and Vasorelaxant Effect of DHQ-11, A Conjugate of Flavonoid Dihydroquercetin with Isoquinoline Alkaloid 1-Aryl-6,7-Dimethoxy-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline // Biomed. & Pharmacol. J. – 2021. – V.14(2). – Pp.651-661.
12. Uzbekov V.V., Abdullaev B.F., Ziyaviddinov Zh.F. et al., Composition Development and Experimental Study of the Liposomal form of an Antiarrhythmic Drug // Pharm. Chem. J. – 2022. – Vol. 56. – No. 8. – P.1064-1069.
13. Yuldashev, K.A., Esanov, R.S., Saidullaeva, H.T. et al. Creation of Modified Forms of Amiodarone with Glycyrrhizic Acid and Its Monoammonium Salt and Study of Their Cytotoxicity on Hela Cells. // Pharm Chem J. – 2024. – V.57. – P.1726–1731.