

## МЕТОД ИЗУЧЕНИЯ АДЕНОЗИНОВОЙ А<sub>1</sub> РЕЦЕПТОРНОЙ АКТИВНОСТИ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ *IN VITRO*\*

А.А. Бригадирова<sup>1, 2</sup>, Я.В. Агацарская<sup>1, 2</sup>, Д.А. Салихов<sup>1</sup>, А.С. Нагих<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакологии и биоинформатики;

<sup>2</sup>ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр», лаборатория экспериментальной фармакологии

По результатам исследования воспроизведена и валидирована экспериментальная модель изучения аденозиновой А<sub>1</sub> рецепторной активности химических соединений на изолированных предсердиях мышей или крыс *in vitro*. Для подтверждения релевантности методики протестировали селективный антагонист аденозиновых А<sub>1</sub> рецепторов 8-циклопентил-1,3-дипропилксантин (DPCPX) в диапазоне концентраций от 10 пмоль/л до 0,1 мкмоль/л и рассчитали его полумаксимальную ингибирующую концентрацию.

**Ключевые слова:** аденозин, аденозиновые А<sub>1</sub> рецепторы, модель *in vitro*, 8-циклопентил-1,3-дипропилксантин (DPCPX).

DOI 10.19163/1994-9480-2019-2(70)-55-57

## METHOD *IN VITRO* FOR ADENOSINE A<sub>1</sub> RECEPTOR ACTIVITY OF CHEMICAL COMPOUNDS INVESTIGATION

A.A. Brigadirova<sup>1, 2</sup>, Ya.V. Agatsarskaya<sup>1, 2</sup>, D.A. Salikhov<sup>1</sup>, A.S. Nagikh<sup>1</sup>

<sup>1</sup>FSBEI HE «Volgograd State Medical University» of Public Health Ministry of the Russian Federation, Department of pharmacology and bioinformatics;

<sup>2</sup>SBI «Volgograd Medical Scientific Centre», Laboratory of experimental pharmacology

We reproduced and validated an experimental model on isolated atria from mice and rats to study *in vitro* adenosine A<sub>1</sub> receptor activity of compounds. The reliability of this method was confirmed in tests with 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX), a potent and selective antagonist for the adenosine A<sub>1</sub> receptor, in concentrations from 10 pM to 0,1 μM. The half-maximal inhibitory concentration of this substance was calculated.

**Key words:** adenosine, adenosine A<sub>1</sub> receptors, model *in vitro*, 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX).

Изучением возможностей использования аденозиновых рецепторов в качестве мишеней для создания новых различных групп лекарственных средств занимаются многие научные коллективы. При этом аденозиновые рецепторы являются отправной точкой для разработки новых фармакологических методов терапии различных заболеваний. Например, активация аденозиновых А<sub>1</sub>-рецепторов защищает сердце от дефицита кислорода и снижает частоту сердечных сокращений, в то время как активация А<sub>2</sub>-рецепторов может улучшать кровоток в сердце и снижать артериальное давление [5].

Авторы многочисленных доклинических исследований установили, что активация миокардиальных А<sub>1</sub>-рецепторов приводит к подавлению разнообразных патофизиологических процессов в миокарде, связанных с ишемическим и реперфузионным повреждениями, включая аритмогенез, коронарную и желудочковые дисфункции, острый инфаркт миокарда и хроническую сердечную недостаточность. Таким образом, появляется возможность создания новых способов фармакологической коррекции таких сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), как стенокардия, аритмии, ишемическое повреждение при остром коронарном синдроме или сердечная недостаточность. Например,

селективные А<sub>1</sub>-агонисты являются потенциальными кандидатами для создания лекарственных препаратов для лечения пароксизмальной суправентрикулярной тахикардии, стенокардии, гипертриглицеридемии, сахарного диабета 2-го типа, нейропатической боли [5, 6, 8].

Таким образом, данная область является благоприятной основой для разработки новых лекарственных средств, так как в настоящее время препараты с селективной аденозиновой А<sub>1</sub> активностью в клинической практике отсутствуют. Единственным известным агонистом аденозиновых А<sub>1</sub> рецепторов долгое время являлся сам аденозин. Аденозин, как стимулятор А<sub>1</sub>-рецепторов, разрешен к использованию в клинической практике для купирования пароксизмальной суправентрикулярной тахикардии (Аденокард®) [8]. Другие селективные агонисты А<sub>1</sub>-рецепторов в настоящее время находятся на различных стадиях клинических испытаний. Эффективность частичного агониста аденозиновых А<sub>1</sub>-рецепторов кападеносона оценивали у пациентов, страдающих фибрилляции предсердий, а также у больных стабильной стенокардией [4], а другого высокоселективного частичного агониста аденозиновых А<sub>1</sub>-рецепторов агониста неладеносона биаланата – у пациентов, страдающих хронической сердечной недостаточностью [7].

\*Исследование выполнено за счет гранта Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-415-343001).

Таким образом, весьма актуальным является поиск лекарственных соединений для профилактики и лечения социально-значимых ССЗ, в частности, – селективных лигандов аденозиновых  $A_1$  рецепторов, так как в настоящее время лекарственные средства с указанным механизмом действия отсутствуют в клинической практике.

Согласно информации из доступных опубликованных источников литературы в России отсутствуют работы, посвященные разработке метода для скринингового исследования аденозиновой  $A_1$  активности соединений на доступных препаратах изолированных тканей. В зарубежных работах описаны сложные модели *in vitro* с использованием изолированного перфузируемого сердца лабораторных грызунов [3], которые достаточно проблематично использовать для рутинного тестирования большого количества химических соединений.

## ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Учитывая актуальность создания новых лекарственных средств для терапии ССЗ представляется целесообразным воспроизвести модель *in vitro* и оптимизировать условия выполнения метода для скрининга химических соединений, потенциально влияющих на аденозиновые  $A_1$  рецепторы.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальная работа была проведена в соответствии с требованиями стандарта ISO/IEC 17025:2017, ГОСТ Р ИСО 5725-6-2002 и правилами лабораторной практики при проведении доклинических исследований в Российской Федерации в соответствии с «Принципами надлежащей лабораторной практики» [1] и «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» (Минздрав РФ, приказ № 199н от 1 апреля 2016 г.), с соблюдением директивы 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. Эвтаназию животных проводили согласно требованиям, изложенным в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1997).

Исследование проводили на 25 нелинейных крысах обоих полов массой тела 200–350 г и 25 нелинейных мышах обоих полов массой тела 18–30 г (ООО «НПК БиоТех»). Животных содержали в стандартных условиях вивария с естественным световым режимом при относительной влажности воздуха 40–50 % и температуре окружающего воздуха 22–24 °C на стандартной диете для лабораторных животных [2].

После умерщвления грызунов путем цервикальной дислокации у них извлекали сердце и изолировали оба предсердия. Изолированный препарат левого и правого предсердия фиксировали в ванночке установки для работы с изолированными органами, заполненной буферным раствором Кребса-Хенселейта (состав в ммоль/л: NaCl – 118,0;

KCl – 4,7;  $KH_2PO_4$  – 1,18;  $MgSO_4$  – 1,2;  $CaCl_2$  – 2,5;  $NaHCO_3$  – 25,0; глюкоза – 5,55; pH 7,4) с постоянной оксигенацией 95%  $O_2$  – 5%  $CO_2$  и термостатированием при 24 °C. Оценивали изменение хронотропизма изолированных предсердий, работающих в собственном ритме (без стимуляции), в ответ на введение аденозина (Sigma, США) в концентрациях 0,01–100 мкмоль/л, а также в присутствии или отсутствии селективного антагониста аденозиновых  $A_1$  рецепторов 8-циклопентил-1,3-дипропилксантина (DPCPX [Sigma, США]) в диапазоне концентраций от 10 пмоль/л до 0,1 мкмоль/л.

$A_1$ -блокирующее действие DPCPX оценивали по степени подавления индуцированного аденозином снижения хронотропизма изолированного препарата предсердий в сравнении с контрольным эффектом аденозина (в  $\Delta\%$ ). Сокращения регистрировали при помощи изометрического датчика TSD125C с диапазоном чувствительности 0–50 г в 4-канальной установке поддержания жизнедеятельности изолированных тканей DA100C (Biopac Systems, Inc., США). Последующий анализ параметров сокращения препарата проводили с помощью программы AcqKnowledge 4 (Biopac Systems, Inc., США). Измеряли количество сокращений изолированного препарата предсердий за 30-секундный интервал с последующим расчетом частоты сердечных сокращений.

Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи нелинейного регрессионного анализа для расчета отрицательных десятичных логарифмов полумаксимальной эффективной ( $pLogEC_{50}$ ) и полумаксимальной ингибирующей ( $pLogIC_{50}$ ) концентраций в программе GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования на изолированных препаратах предсердий мышей или крыс обнаружили, что добавление аденозина в концентрациях от 0,01 до 100 мкмоль/л вызывает дозозависимое снижение хронотропизма предсердий (Рис. 1).

На основании полученных результатов также рассчитали  $pLogEC_{50}$  аденозина, который составлял  $5,41 \pm 0,23$  или  $5,24 \pm 0,03$  для предсердий мышей и крыс соответственно.

На втором этапе исследования оценили подавление индуцированного аденозином снижения хронотропизма изолированных препаратов предсердий мышей или крыс на фоне добавления селективного антагониста аденозиновых  $A_1$  рецепторов DPCPX в широком диапазоне концентраций от 10 пмоль/л до 0,1 мкмоль/л и рассчитали его  $pLogIC_{50}$  (Рис. 2).

Рассчитанный  $pLogIC_{50}$  DPCPX составил  $8,45 \pm 0,12$  или  $9,39 \pm 0,08$  для предсердий мышей и крыс соответственно. Значения этого показателя согласовывались с ранее опубликованными данными об  $A_1$ -блокирующем действии DPCPX [9].

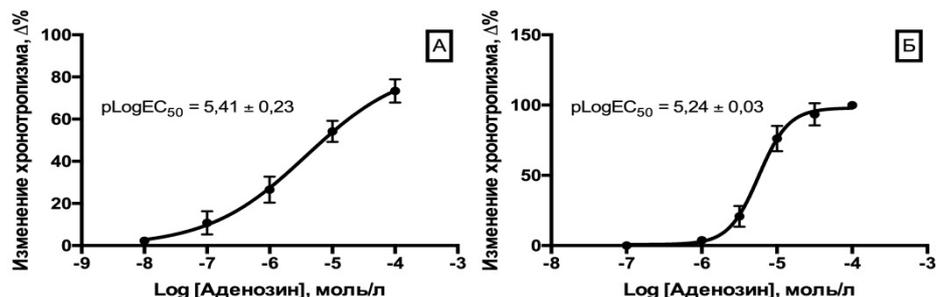


Рис. 1. Дозозависимый агонистический эффект аденозина в отношении  $A_1$  рецепторов изолированных препаратов предсердий мышей (А) или крыс (Б)

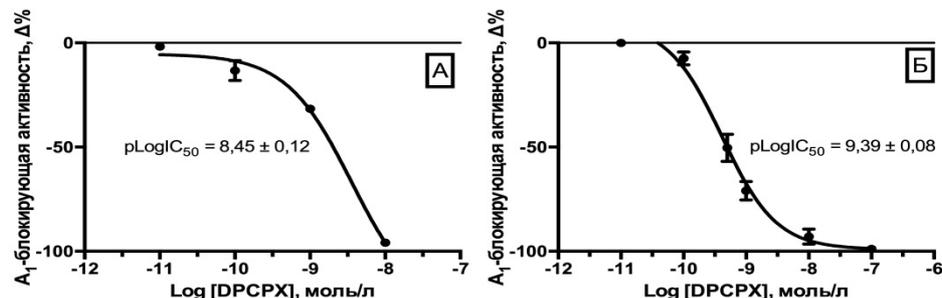


Рис. 2. Влияние селективного антагониста аденозиновых  $A_1$ -рецепторов 8-циклопентил-1,3-дипропилксантина (DPCPX) на индуцированное аденозином снижение хронотропизма изолированных препаратов предсердий мышей (А) или крыс (Б)

По результатам исследования на модели изолированных предсердий мышей или крыс *in vitro*  $EC_{50}$  аденозина существенно не различалась, а  $IC_{50}$  селективного антагониста аденозиновых  $A_1$  рецепторов DPCPX, полученная на предсердиях крыс, оказалась ненамного меньше, чем величина данного показателя, полученная на предсердиях мышей. На основании полученных результатов сделали вывод, что изолированные препараты левого и правого предсердий как крыс, так и мышей могут в равной степени использоваться для изучения аденозиновой  $A_1$  активности новых химических соединений *in vitro*.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования воспроизведена методика для изучения аденозиновой  $A_1$  активности соединений на модели *in vitro* и доказана ее релевантность. Также определены оптимальные дозы агониста аденозина для скрининга новых химических соединений с  $A_1$ -блокирующим действием. Данная методика может быть использована для тестирования новых веществ на наличие аденозиновой  $A_1$  активности.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- ГОСТ Р 33647-2015. Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP). Термины и определения / GOST R 33647-2015. Principy nadležashchej laboratornoj praktiki (GLP). Terminy i opredeleniya [Principles of Good Laboratory Practice (GLP). Terms and Definitions]. Введ. 2016-09-01. – М.: Стандартинформ, 2015.

- ГОСТ Р 50258-92. Комбикорма полнорационные для лабораторных животных. Технические условия / GOST R 50258-92. Kombikorma polnoracionnyye dlya laboratornyh zhivotnyh. Tekhnicheskie usloviya [Complete feed for laboratory animals. Technical conditions]. Введ. 1994-01-01. – М.: Изд-во стандартов, 1992.

- Albrecht-Küpper B.E., Leineweber K., Nell P.G. Partial adenosine  $A_1$  receptor agonists for cardiovascular therapies // *Purinergic Signal.* – 2012. – Vol. 8 (1). – P. 91–99.

- Baltos J.A., Vecchio E.A., Harris M.A., Qin C.X., Ritchie R.H., Christopoulos A., White P.J., May L.T. Capadenoson, a clinically trialed partial adenosine  $A_1$  receptor agonist, can stimulate adenosine  $A_{2B}$  receptor biased agonism // *Biochem. Pharmacol.* – 2017. – Vol. 135. – P. 78–89.

- Jacobson K.A., Gao Z.G. Adenosine receptors as the therapeutic targets // *Nat. Rev. Drug Discovery.* – 2006. – Vol. 5 (3). – P. 247–264.

- Manjunath S., Sakhare P.M. Adenosine and adenosine receptors: newer therapeutic perspective // *Indian J. Pharmacol.* – 2009. – Vol. 41 (3). – P. 97–105.

- Meibom D., Albrecht-Küpper B., Diedrichs N., Hübsch W., Kast R., Krämer T., Krenz U., Lerchen H.G., Mitterdorf J., Nell P.G., Süßmeier F., Vakalopoulos A., Zimmermann K. Neladenoson bialanate hydrochloride: a prodrug of a partial adenosine  $A_1$  receptor agonist for the chronic treatment of heart diseases // *Chem. Med. Chem.* – 2017. – Vol. 12 (10). – P. 728–737.

- Sachdeva S., Gupta M. Adenosine and its receptors as therapeutic targets: an overview // *Saudi Pharm J.* – 2013. – Vol. 21 (3). – P. 245–253.

- Schiebert E.M. Extracellular nucleotides and nucleosides: release, receptors, and physiological and pathophysiological effects. – Amsterdam: Academic Press. – London, 2003.

## Контактная информация

**Бригадирова Анастасия Андреевна** – к. м. н., ассистент кафедры фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ, м. н. с. лаб. экспериментальной фармакологии ГБУ ВМНЦ, e-mail: a.brigadirova@gmail.com