



## ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ-МИШЕНЕЙ 5-АМИНО-ЭКЗО-3-АЗАТРИЦИКЛО[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]ДЕКАН-4-ОНА НА МОДЕЛИ АРИТМИИ *in vivo*

© 2011 г. Ю. В. Вахитова\*\*, Е. И. Антипина\*, Р. С. Ямиданов\*, Р. Ю. Хисамутдинова\*\*,  
Ф. С. Зарудий\*\*, Н. Ж. Басченко\*\*, В. А. Докичев\*\*, Ю. В. Томилов\*\*\*, О. М. Нефедов\*\*\*

\* Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН,  
450054, Уфа, просп. Октября, 71

\*\* Учреждение Российской академии наук Институт органической химии Уфимского научного центра РАН, Уфа

\*\*\* Учреждение Российской академии наук Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва

Поступила в редакцию 13.05.2011 г. Принята к печати 23.05.2011 г.

Изучены молекулярные механизмы действия 5-амино-экзо-3-азатрицикло[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]декан-4-она (P-11), обладающего выраженной антиаритмической, ноотропной, противовоспалительной и анальгезирующей активностями. Моделирование нарушений ритма сердца осуществляли введением животным контрольной группы аритмогенного вещества аконитина в дозе 50 мкг/кг. Опытной группе крыс исследуемое соединение P-11 вводили внутривенно профилактически за 2 мин до введения аконитина в дозе 0.3 мг/кг. С целью идентификации генов-мишеней P-11 были использованы экспрессионные макрочипы Atlas™ Rat cDNA Expression Array (#7738-1; BD Biosciences, США). Сравнительный анализ изменений экспрессионного статуса генов в сердце крыс, индуцированных P-11 на фоне моделируемой *in vivo* аритмии, выявил 16 генов, воспроизводимого уровня экспрессии. Регулируемые препаратом гены кодируют белки внеклеточного матрикса (glypican 1, *Gpc 1*; tissue inhibitor of metalloproteinase 2, 3, *Timp2*, *Timp 3*), внутриклеточного сигналинга (rho GTPase activating protein 7, *Dlc 1*; protein tyrosine phosphatase 4a1, *Ptp4a 1*; phosphodiesterase 4D, *PDE4D*; P13-kinase regulatory subunit alpha, *PIK3R1*; guanine nucleotide binding protein alpha 12, *Gna 12*), гликолиза (phosphofructokinase 1, *Pfk 1*), межклеточного взаимодействия (junction plakoglobin, *Jup*), системы гемостаза (tissue plasminogen activator, *Plat*), мембранно-связанных насосов и транспортеров (Solute carrier family 16, member 1, *Slc 16a 1*; ATPase, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> transporting, *Atp 1a*), и других (*c-fos* proto-oncogene, *c-fos*; telomerase protein component 1, *tlp*; Annexin 1, *anxa 1*). Таким образом, полученные данные об избирательном влиянии P-11 на гены, продукты которых вовлечены в механизмы аритмогенеза, позволяют рассматривать это соединение в качестве перспективного средства патогенетически ориентированной фармакотерапии аритмий.

**Ключевые слова:** мостиковые соединения, 5-амино-экзо-3-азатрицикло[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]декан-4-он; антиаритмическая активность; экспрессионные биочипы; гены-мишени.

### ВВЕДЕНИЕ

По данным ВОЗ, в России смертность от сердечно-сосудистых заболеваний составляет 57% от общей смертности [1]. Среди них аритмии — одна из наиболее частых причин смерти кардиологических больных. Нарушения ритма и проводимости сердца занимают одно из ведущих мест в структуре сердечно-сосудистой заболеваемости и могут проявляться как самостоятельные нозологические формы или как осложнения при целом ряде заболеваний. Аритмия выявляется практически у каждого третьего пациента в кардиологической клинике. Современные

антиаритмические средства относятся к разным классам химических соединений и различаются по фармакологическим свойствам и по механизмам действия на электрофизиологические процессы в мембране миокардиальных клеток [2, 3]. Отметим, однако, что, несмотря на широкое применение в клинической практике, многие “классические” антиаритмики, такие как лидокаин, тримеканин, аймалин, новокаиномид и др., характеризуются невысокой антиаритмической активностью при различных формах аритмии, наличием гипотензивного и отрицательного инотропного действия, непродолжительностью антиаритмического эффекта, а также выраженными побочными эффектами, что значительно ограничивает область их использования.

В настоящее время разработка эффективных средств фармакокоррекции нарушений сердечного

Сокращения: ВОЗ — всемирная организация здравоохранения; ЭКГ — электрокардиограмма; ED<sub>50</sub> — 50%-я эффективная доза.

# Автор для связи (тел. +7 (347) 235-60-88; факс +7 (347) 235-60-88; +7 8917 3464049; эл. почта: juvv73@gmail.com).

Данные ОТ-ПЦР в режиме реального времени\*

Ген	Уровень экспрессии	Стандартная ошибка	95%-й доверительный интервал	<i>p</i>
<i>pgk</i>	1.000			
<i>c-fos</i>	0.555	0.518–0.581	0.509–0.582	<0.001
<i>tlp1</i>	0.816	0.717–0.892	0.699–1.007	0.113
<i>anxa1</i>	1.257	1.117–1.370	1.090–1.430	0.084
<i>Dlc1</i>	2.019	1.778–2.325	1.768–2.329	0.084
<i>Jup</i>	0.636	0.589–0.716	0.529–0.735	<0.000
<i>Pip4a1</i>	1.441	1.301–1.565	1.269–1.701	0.066
<i>PDE4D</i>	2.033	1.786–2.266	1.741–2.437	0.084
<i>Gna12</i>	0.532	0.463–0.605	0.452–0.631	0.035
<i>Gpc1</i>	1.540	1.247–1.807	1.160–2.095	0.031
<i>Slc16a1</i>	0.652	0.594–0.716	0.566–0.757	<0.001
<i>Atp1a</i>	0.560	0.500–0.607	0.489–0.611	0.033
<i>Plat</i>	2.114	1.956–2.293	1.831–2.416	0.084
<i>Timp2</i>	0.532	0.474–0.624	0.407–0.643	<0.001
<i>Timp3</i>	0.674	0.569–0.853	0.537–0.903	0.032
<i>Pfk1</i>	0.217	0.189–0.243	0.183–0.257	0.008
<i>PIK3R1</i>	0.563	0.453–0.675	0.418–0.717	<0.001

\* Данные нормализовали по уровню экспрессии гена “домашнего хозяйства” *pgk*. Уровень экспрессии в экспериментальных группах представлен относительно контрольных, принятых за 1.

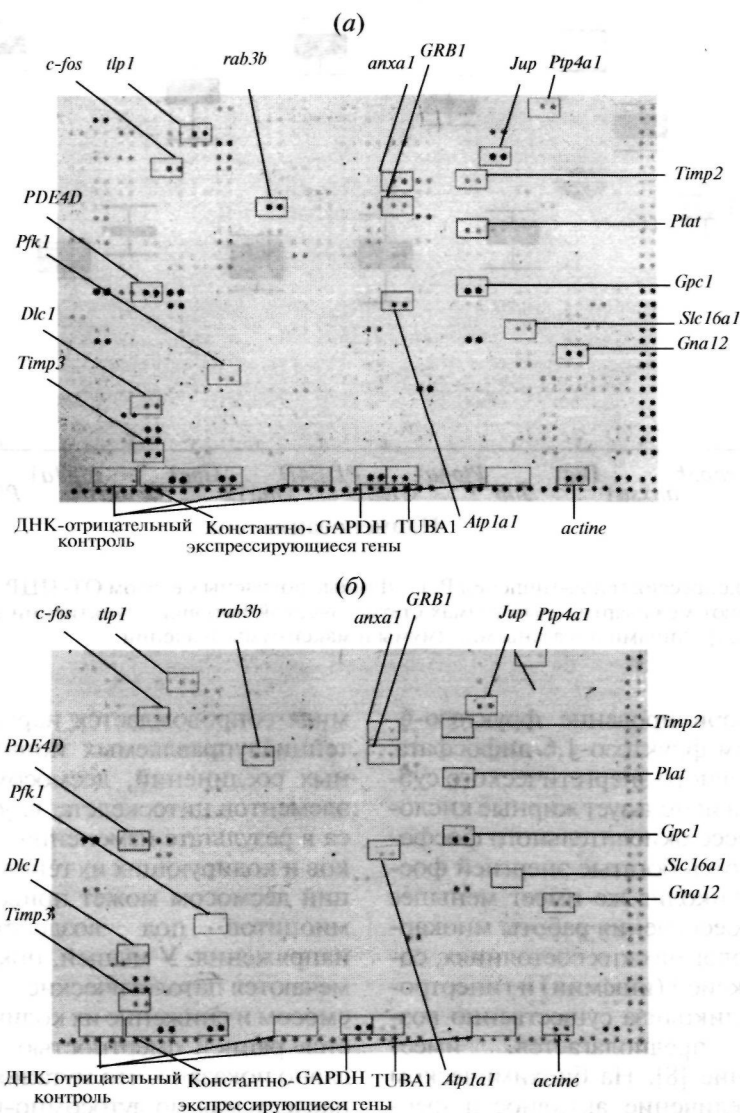
ритма идет в различных направлениях. Во-первых, актуальным направлением является изыскание эффективных и безопасных веществ с антиаритмической активностью среди новых классов химических соединений. Во-вторых, перспективным признается изучение молекулярных основ патогенеза различных аритмий и создание “таргетных” препаратов с детальным изучением механизмов их действия. В-третьих, разработка и создание современных антиаритмиков проводится с учетом комплексности и сложности патогенеза аритмий, что акцентирует внимание на поиске средств, обладающих комбинированной фармакологической активностью (антиаритмической, ноотропной, антиагрегационной и др.) и оригинальным механизмом действия [4].

Недавно нами было показано, что 3-аминопирролидин-2-он, сочленённый с норборнанным фрагментом [5-амино-экто-3-азатрицикло[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]декан-4-он (лабораторный шифр Р-11)], проявляет антиаритмическую, анальгетическую, ноотропную и противовоспалительную активности [5, 6]. В проведенных фармакологических исследованиях установлено, что антиаритмическая активность соединения проявляется на моделях, воспроизводящих различные нарушения ритма сердца, включая наиболее опасную для жизни – фибрилля-

цию. Принимая во внимание перспективность Р-11 в качестве потенциального антиаритмика с ноотропным и противовоспалительным эффектом, представляет интерес более глубокое изучение механизмов его действия. В нашей работе мы использовали метод молекулярной гибридизации на биочипах с целью поиска генов-мишеней 5-амино-экто-3-азатрицикло[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]декан-4-она на модели аритмии *in vivo*.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез 5-амино-экто-3-азатрицикло[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]декан-4-она проводили в соответствии с методикой, описанной ранее [5]. Поиск генов-мишеней исследуемого препарата осуществляли в условиях моделирования аконитиновой аритмии у крыс. В результате трех независимо проведенных гибридизаций на биочипе было идентифицировано 22 гена, изменяющих уровень экспрессии в сердце крыс при действии Р-11 в условиях экспериментального моделирования аритмии (рис. 1). Однако лишь для 16 удалось подтвердить изменения их экспрессии методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени (рис. 2, таблица). Как следует из литературных данных, а также аннотаций в базах данных, выявленные нами гены кодируют белки внеклеточного



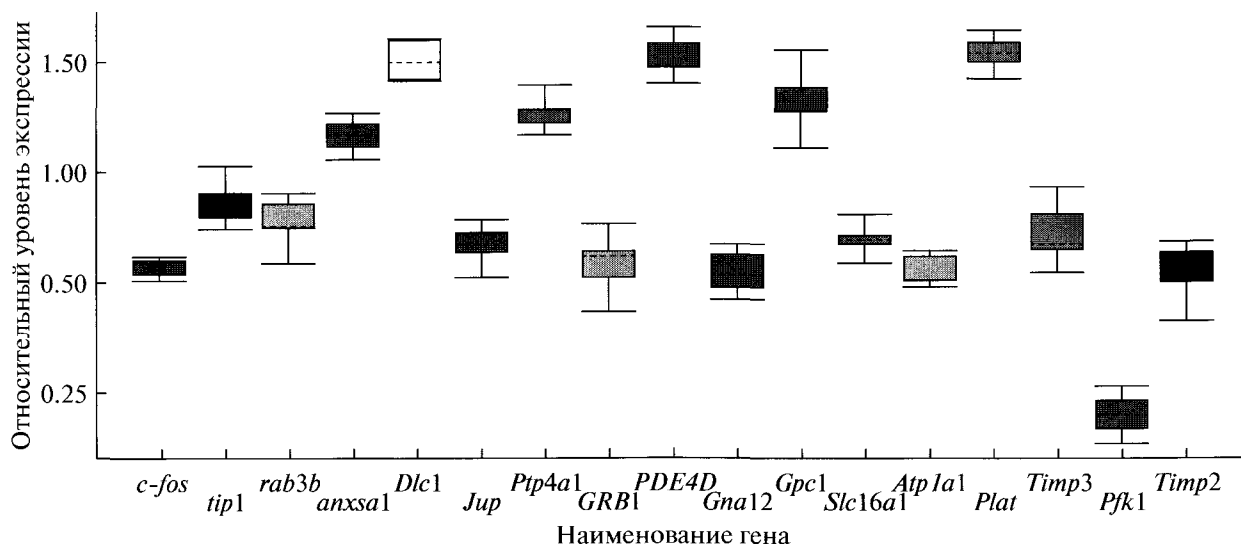
**Рис. 1.** Радиоавтографы гибридизации на Atlas™ Rat cDNA Expression Array. *a* – контроль; *б* – P-11. Линиями отмечены гены, дифференциально экспрессирующиеся в сердце в ответ на однократное введение P-11. Нижние прямоугольники обозначают положение контрольных сигналов: ДНК (отрицательный контроль); гены “домашнего хозяйства”.

матрикса (glypican 1, ген *Gpc1*; tissue inhibitors of metalloproteinase 2, 3, *Timp2*, *Timp3*), внутриклеточного сигналинга (rho GTPase activating protein 7, *Dlc1*; protein tyrosine phosphatase 4a1, *Ptp4a1*; phosphodiesterase 4D, *PDE4D*; PI3-kinase regulatory subunit alpha, *PIK3R1*; guanine nucleotide binding protein alpha 12, *Gna12*), гликолиза (phosphofruktokinase I, *Pfk1*), межклеточного взаимодействия (junction plakoglobin, *Jup*), системы гемостаза (tissue plasminogen activator, *Plat*), мембранно-связанных насосов и транспортеров (Solute carrier family 16, member 1, *Slc16a1*; ATPase, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> transporting, *Atp1a1*) и другие (*c-fos* proto-oncogene, *c-fos*; telomerase protein component 1, *tlp1*; Annexin 1, *anxa1*). Следует отметить, что принадлежность к функциональным группам генов, транскрипционная активность которых позитивно

или негативно регулируется P-11, весьма условна ввиду множественности и разнообразия их функций, выполняемых соответствующими белками в зависимости от типа клеток, но в то же время, несомненно, представляет интерес с точки зрения описания молекулярных механизмов, обуславливающих ответ на препарат.

#### Гены ферментов метаболических путей.

Однократное введение P-11 ингибирует экспрессию гена *Pfk1*, кодирующего ключевой регуляторный фермент гликолиза – фосфофруктокиназу I (PFK1, АТР: D-фруктоза-6-фосфат-1-фосфотрансфераза КФ 2.7.1.11). Известно, что PFK1 катализирует реакцию, лимитирующую общую скорость глико-



**Рис. 2.** Относительная экспрессия генов-мишеней P-11. Данные получены методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Боксы представляют межквартильный размах статистической выборки, пунктирами обозначен средний уровень генной экспрессии, границами показаны минимумы и максимумы значений.

лиза, а именно фосфорилирование фруктозо-6-фосфата с образованием фруктозо-1,6-дифосфата. В норме в качестве основного энергетического субстрата сердечная мышца использует жирные кислоты, из которых в процессе окислительного фосфорилирования генерируются богатые энергией фосфорные соединения, гликолиз же имеет меньшее значение в процессах обеспечения работы миокарда [7]. Однако, при патологических состояниях, сопровождающихся гипоксией (ишемией) и гипертрофией миокарда, роль гликолиза существенно возрастает, что, как предполагается, имеет компенсаторное значение [8]. На биохимическом уровне происходит увеличение активности ферментов различных стадий гликолиза, в частности фосфофруктокиназы и некоторых других. Наблюдаемое нами снижение экспрессии гена *Pfk1* под действием антиаритмического средства может свидетельствовать об ингибировании процессов гликолиза и нормализации энергообеспечения сердца.

#### *Гены белков межклеточного взаимодействия.*

Плакоглобин (*gamma-catenin*, *Junction plakoglobin*, ген *Jup*) — линкерный белок адгезионных межклеточных контактов и десмосом, выполняет структурную функцию, обеспечивает межклеточное взаимодействие, а также участвует в передаче внутриклеточных сигналов. В адгезионных контактах плакоглобин обеспечивает связывание *N*-кадгерина с актиновым цитоскелетом, а в десмосомах (промежуточные филаменты сердечной мышцы) — с десмином [9]. Известно, что изменение электрофизиологических параметров в клетках сердца и механических свойств кардиомиоцитов при арит-

миях сопровождается нарушениями функций потенциалуправляемых ионных каналов, адгезионных соединений, десмосом, щелевых контактов, элементов цитоскелета, внутриклеточного матрикса в результате изменения экспрессии многих белков и кодирующих их генов [10]. Нарушение функций десмосом может приводить к гибели кардиомиоцитов под воздействием механического напряжения. У мышей, нокаутных по гену *Jup*, отмечаются патологические изменения структуры десмосом и снижение их количества, что сопровождается ранней смертностью животных [11]. Не так давно показано, что мутация в гене *Jup* 2157del2TG, наследуемая по аутосомно-рецессивному типу, является этиологическим фактором болезни Накоса [12]. Кроме того, мутации гена *Jup* ассоциированы со случаями внезапной кардиогенной смертности, а также с другими наследственно-обусловленными аритмогенными кардиомиопатиями [13]. Таким образом, ген *Jup* является важной патогенетически значимой биомишенью. Влияние P-11 на экспрессию *Jup* позволяет предположить способность препарата оказывать влияние на функциональное состояние структурных компонентов межклеточных соединений и тем самым воздействовать на механизмы изменений межклеточных взаимодействий, индуцированных аритмией.

#### *Гены белков, участвующих в передаче внутриклеточных сигналов*

Фосфодиэстераза 4D (3',5'-цикло-AMP-5'-нуклеотидгидролаза, КФ 3.1.4.53; ген *PDE4D*) — фермент, специфично гидролизующий сAMP и сGMP. Фосфодиэстеразы активируются при активации

протеинкиназой А, обеспечивая таким образом включение механизмов обратной связи и защищая клетки от избыточного уровня сАМР. Мультигенное семейство фосфодиэстераз 4-го типа привлекает внимание исследователей в связи с синтезом большого числа селективных ингибиторов PDE4D, имеющих клиническое применение при таких заболеваниях как астма, депрессия, болезнь Паркинсона, Болезнь Альцгеймера [14]. Кроме того, установлено, что изоформы PDE4D (на сегодняшний день обнаружено и охарактеризовано более 20 изоформ данного фермента) играют важную роль в обеспечении пространственной компарментализации сАМР-зависимых сигнальных каскадов в клетках при взаимодействии с различными вспомогательными белками (scaffold proteins). Так, в частности, показано участие PDE4D в механизмах внутриклеточной передачи сигналов, инициированных  $\beta_2$ -адренорецепторами ( $\beta_2$ -АР) в кардиомиоцитах [15]. Таким образом, активность PDE4D вносит вклад в опосредованную  $\beta_2$ -адренорецепторами регуляцию сопряженности процессов возбудимости-сократимости кардиомиоцитов [16]. Известно, что катехоламины, обладая выраженным аритмогенным потенциалом, реализующимся посредством активации как  $\beta_1$ - так и  $\beta_2$  адренорецепторов сердца, играют важную роль в патогенезе нарушений ритма сердца, в связи с чем в терапии аритмий широко используются лекарственные препараты класса  $\beta$ -адреноблокаторов. Полученные нами данные о влиянии Р-11 на экспрессию гена *PDE4D* могут свидетельствовать о вовлечении сАМР-зависимых сигнальных путей в опосредовании фармакологических активностей препарата, а также предполагают участие  $\beta_2$ -адренорецепторного комплекса в механизмах антиаритмической активности исследуемого вещества.

Еще одной мишенью Р-11, вовлеченной в механизмы передачи внутриклеточных сигналов, является ген, кодирующий регуляторную субъединицу  $\text{p}85\alpha$  фосфоинозитид-3 киназы (АТР: 1-фосфатидил 1-D-мио-инозитол-4,5-дифосфат-3-фосфотрансфераза; КФ 2.7.1.153; ген *PIK3R1*). Данный фермент катализирует фосфорилирование 3-гидроксильной группы инозитольного кольца фосфадилнозитола (PI) с образованием его различных фосфорилированных производных, в частности PI-монофосфатов, PI-бифосфатов, PI-3,4,5-трифосфата, играющих важную роль в регуляции внутриклеточного уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках различного типа [17, 18].

Регуляторная субъединица фосфоинозитид-3 киназы стабилизирует и ингибирует активность каталитической субъединицы  $\text{p}110\alpha$  фермента [19]. Как показано в работе [20],  $\text{p}85\alpha$ -субъединица участвует в регуляции размеров сердца в процессе онтогенеза и в механизмах формирования физиологической гипертрофии миокарда в условиях по-

вышенных нагрузок. Можно предположить, что снижение уровня мРНК гена *PIK3R1* при введении Р-11 на фоне аконитиновой аритмии имеет компенсаторный характер и направлено на коррекцию функционального состояния сердечной мышцы.

Тирозинфосфатаза 4a1 (протеин-тирозинфосфатаза, тип IVA 1, КФ 3.1.3.48, ген *Ptr4a*) – интегральный компонент сигнальных каскадов, регулируемых факторами роста, дефосфорилирует рецепторные и нерцепторные тирозинкиназы. На данный момент накоплено много данных, свидетельствующих об высвобождении кардиомиоцитами различных ауто- и паракринных агентов, оказывающих влияние на различные аспекты метаболизма, сократительных функций, пролиферации, ангиогенеза и поддержания физиологических параметров ритмичности клеток сердца. К таким агентам относятся оксид азота (NO), ангиотензин, эндотелин, простаглицин, ангиопоэтин, а также факторы роста [21]. Подчеркивается, что нейротрофины секретируются кардиомиоцитами при воздействиях, сопровождающихся повышенными механическими нагрузками, гипоксией, оксидативным стрессом, повреждением сосудов и нарушениями целостности клеток сердца, осуществляя таким образом репаративные и защитные функции [22, 23]. Выявленное нами увеличение экспрессии гена *Ptr4a1* под действием Р-11 может указывать на регуляторное влияние препарата на процессы, инициируемые действием различных молекул, обладающих митогенным потенциалом.

#### *Гены, кодирующие белки мембранно-связанных насосов и транспортеров*

Как показывают результаты наших исследований, Р-11 оказывает влияние на экспрессию гена переносчика монокарбоновых кислот (Solute carrier family 16, member 1, MST1, ген *Slc16a1*). Данный транспортер осуществляет перенос через клеточные мембраны лактата, пирувата, гидроксипирувата, ацетоацетата и некоторых других молекул [24]. Известно, что в норме сердечная мышца потребляет лактат в качестве одного из энергетических субстратов, тогда как в условиях ишемии/гипоксии, как правило, происходит увеличение продукции лактата, что является маркером повреждения миокарда [25]. Увеличение экспрессии MST1 отмечается при продолжительных физических нагрузках, а также при усилении сократительной активности кардиомиоцитов, вызванной низкочастотной электрической стимуляцией [26]. Снижение уровня транскрипционной активности гена *Slc16a1* при действии Р-11 на фоне экспериментальной аритмии, вероятно, отражает защитный эффект препарата, направленный на нормализацию уровня лактата и других метаболитов.

$\text{Na}^+/\text{K}^+$ -зависимая АТР-аза (АТРase,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -переносящий, альфа-1-полипептид, ген *Atp1a1*) –

гетеродимерный интегральный белок плазматических мембран, осуществляющий АТФ-зависимый трансмембранный перенос  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  в клетках. Общепринято считать, что ингибирование  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -зависимой АТФ-азы сердца гликозидами, в частности, убаином и дигиталисом, приводит к возрастанию уровня  $\text{Na}^+$  внутри клетки с последующей активацией  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника, повышению высвобождения  $\text{Ca}^{2+}$  из саркоплазматического ретикула и увеличению силы сердечных сокращений (положительный инотропный эффект) [27]. Отметим, что антиаритмики других классов также обладают способностью ингибировать активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -зависимой АТФ-азы. В частности, бретелиум (III класс антиаритмических средств) ингибирует  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азу за счет связывания с экстраклеточным катионным сайтом белка [28]. Снижение уровня мРНК гена *Atp1a1* при действии Р-11 может свидетельствовать об участии  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -зависимой АТФ-азы в механизмах антиаритмической активности препарата, однако, лишь углубленные электрофизиологические исследования позволяют дать однозначный ответ о функциональной значимости взаимодействия Р-11 с данным белком.

#### Гены белков компонентов внеклеточного матрикса

В последние годы активно исследуются патогенез и возможности фармакокоррекции процесса ремоделирования миокарда при аритмиях различного происхождения. Ремоделирование миокарда характеризуется гипертрофией, дисфункцией кардиомиоцитов и чрезмерным депонированием компонентов внеклеточного матрикса, что сопровождается дезинтеграцией сократительного аппарата кардиомиоцитов, нарушениями проводимости импульсов и прогрессированием сердечной недостаточности [29, 30]. Поэтому, одним из направлений превентивной фармакокоррекции нарушений сердечного ритма является поиск средств, способных оказывать модулирующее влияние на компоненты экстраклеточного матрикса клеток сердца.

Известно, что экстраклеточный матрикс миокарда представлен гликозаминогликанами, фибриллярными структурными (коллаген, эластин) и адгезивными (фибронектин и ламинин) белками, компонентами базальной мембраны, а также биоактивными сигнальными молекулами [31]. Матриксные металлопротеиназы (ММП) – протеолитические ферменты, разрушающие функционально различные белки экстраклеточного матрикса. Активность металлопротеиназ контролируется эндогенными тканевыми ингибиторами (ТИМР), способными блокировать разрушение экстраклеточного матрикса. Нарушения баланса между содержанием металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов в миокарде приводит к нарушению изомерного состава компонентов внеклеточного мат-

рикса, к накоплению коллагенов и развитию фиброзной ткани в сердце [32, 33]. Экспериментальные данные, основанные на изучении роли ингибиторов металлопротеиназ на моделях-нокаутах по генам *Timp2* и *Timp3*, свидетельствуют о нарушениях функционирования кардиомиоцитов, возникающих при сниженной активности ТИМР. Так, показано, что дефицит ТИМР3 приводит к гипертрофии кардиомиоцитов, дилатации левого желудочка и систолической и диастолической сердечной дисфункции. Также отмечалась дегградация экстраклеточного матрикса, что сопровождалось разрывом межклеточных соединений между миоцитами и матриксом и приводило к дискоординации сердечных сокращений [34, 35].

В настоящее время эндогенные и синтетические ингибиторы металлопротеиназ рассматриваются в качестве перспективных агентов для терапии сердечно-сосудистых заболеваний, поскольку ингибирование ММП способствует сохранению целостности экстраклеточного матрикса кардиомиоцитов и предупреждает патологическое ремоделирование миокарда [36]. Выявленное в нашем исследовании ингибирование экспрессии генов *Timp2* и *Timp3* при действии Р-11 на фоне аконитиновой аритмии может иметь негативные последствия на структуру экстраклеточного матрикса кардиомиоцитов, и вносить вклад в проявление побочных эффектов препарата, однако, прояснение данного вопроса потребует дополнительных исследований.

Глипикан 1 (ген *Gpc1*) – является одним из структурных компонентов гепарансульфат-протеогликанов, заякоренных в плазматических мембранах фосфатидил-инозитольной связью [37]. Глипикан 1 экспрессируется исключительно в эндотелии сосудов и в гладкомышечных клетках сердца [38]. Хорошо известно, что глипиканы непосредственно участвуют в связывании различных секретируемых молекул – фактора роста фибробластов (FGF), эндотелиального фактора роста (EGF), интерлейкина 3 (IL 3) и других митогенов и цитокинов с их рецепторами, и вовлечены в процессы клеточного узнавания, роста, адгезии, поддержания целостности эндотелия и сосудистого гомеостаза [39]. Роль глипикана 1 в механизмах передачи митогенных сигналов заключается в увеличении аффинности ростовых факторов к их рецепторам за счет взаимодействия гепарансульфатных цепей глипикана с аминокислотными остатками рецепторов [40]. Кроме того, глипиканы вовлечены в регуляцию Wnt- и Hedgehogs-сигнальных путей [41]. Таким образом, активация экспрессии *Gpc1* в клетках сердца, вероятно, отражает эффекты Р-11 на функциональное состояние компонентов внеклеточного матрикса и регулируемые этими белками клеточные процессы, что косвенно подтверждает высказанные ранее предположения об участии митогенных факторов и сопряженных с ними сигнальных каскадов в реализации свойств препарата.

*Гены белков различных функций*

Тканевой активатор плазминогена (КФ 3.4.21.68; tPA; ген *Plat*) – секретируемая протеиназа, синтезируется в клетках эндотелия сосудов. tPA конвертирует плазминоген в активную форму плазмин – основной компонент плазменной фибринолитической системы. При появлении фибрина плазминоген и его активатор связываются с ним с образованием тройного комплекса, что приводит к активации плазминогена. В результате плазмин образуется прямо на поверхности фибринового студка; последний далее подвергается протеолитической деградации. В настоящее время рекомбинантный тканевой активатор плазминогена используется в лечении заболеваний, сопровождающихся повышенным тромбообразованием: инфаркт миокарда, тромбоэмболия лёгочной артерии и ишемического инсульта, улучшая клинический исход. Выявленное в нашем исследовании увеличение в 2 раза экспрессии гена *Plat* позволяет предполагать, что известные ранее антиагрегационные свойства P-11 могут быть обусловлены влиянием соединения на ключевой регуляторный фактор системы фибринолиза.

Полученные нами данные о спектре генов-мишеней P-11 позволяют, по крайней мере частично, охарактеризовать молекулярные механизмы действия этого соединения. Отметим, что на данный момент отсутствуют сведения о специфическом взаимодействии P-11 с тем или иным типом ионных каналов кардиомиоцитов, в связи с чем не представляется возможным обобщать электрофармакологические свойства соединения. Однако, как известно, помимо селективных трансмембранных ионных каналов, мишенями антиаритмических средств являются также электрогенные насосы и рецепторы плазматической мембраны кардиомиоцитов [42]. Можно предположить, что способность

P-11 оказывать влияние на экспрессию гена, кодирующего  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -зависимую АТФ-азу, вносит вклад в формирование антиаритмической активности соединения. Кроме того, изменения функционального состояния генов, кодирующих компоненты внутри- и внеклеточного матрикса клеток, вероятно, обеспечивают механизмы нормализации сердечного ритма при действии P-11. Влияние P-11 на экспрессию генов *Ptp4a1*, *PIK3R1*, *PDE4D*, *Gpc1*, белковые продукты которых участвуют во внутриклеточной передаче сигналов, позволяет с одной стороны, выявить новые, терапевтически значимые мишени

P-11, и, с другой – оценить участие различных систем сигнальной трансдукции в механизмах реализации фармакологической активности исследуемого соединения.

Таким образом, полученные экспериментальные данные о спектре генов, дифференциально регулируемых P-11 в сердце крыс после однократного

его введения на фоне аритмогенной модели, дают возможность оценить вклад различных генетических систем в реализацию фармакологических свойств препарата, выявить новые мишени действия исследуемого вещества и способствовать пониманию механизмов его действия.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

P-11 получали, как описано в работе [5].

Эксперименты проводили на беспородных крысах-самцах массой 200–250 г, полученных из “Питомника лабораторных животных” Филиала “Иммунопрепарат” ФГУП НПО “Микроген” МЗ РФ (Уфа). Все работы с использованием лабораторных животных были одобрены в Локальном Этическом комитете при ИБГ УНЦ РАН и проводились в соответствии с “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных № 755 от 12.08.1977”. Каждая экспериментальная группа состояла из 3 крыс. Аритмию у животных вызывали введением аконитина в дозе 50 мкг/кг в хвостовую вену (контрольная группа). Регистрировали нарушения ритма смешанного предсердно-желудочкового типа в течение 2 ч. Изучаемое вещество P-11 вводили внутривенно профилактически за 2 мин до введения аконитина в дозе 0.3 мг/кг ( $\text{ED}_{50}$ ) (опытная группа). За критерий антиаритмического эффекта принимали устранение развившейся аритмии, регистрируемой на ЭКГ. Животных забивали декапитацией через 1 ч после введения P-11 при условии восстановления синусового ритма.

После декапитации извлекали сердце, промывали в физиологическом растворе и затем растирали в ступках в жидком азоте. Препараты РНК выделяли с использованием “Trizol Reagent” в соответствии с протоколом фирмы-изготовителя (Invitrogen, США). Примеси ДНК удаляли обработкой ДНКазой I (Promega, США) с последующей фенольно-хлороформной очисткой. Количество и качество выделенных препаратов РНК контролировали дважды, до и после обработки ДНКазой, спектрофотометрически на спектрофотометре NanoDrop1000 (Thermo Scientific, США), а также путем электрофореза в 1.2% агарозном геле, содержащем 0.5 мкг/мл бромида этидия. Полученная РНК использовалась в реакции построения первой цепи кДНК, для гибридизации на чипах и количественной ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

Гибридизацию меченых кДНК, полученных из контрольных и опытных образцов, проводили на “Atlas™ Rat cDNA Expression Array” (7738-1; BD Biosciences, США) в соответствии с протоколами компании-изготовителя. На каждой положительно заряженной нейлоновой мембране иммобилизовано 588 амплифицированных фрагментов кДНК известных генов крысы, каждый из которых нанесен дважды. Результаты гибридизации анализировали с

использованием программ ImageQuant software 5.0 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, США), AtlasImage™ 2.0 (BD Biosciences, США) и Microsoft Excel (Microsoft corporation, США). Последовательности считались дифференциально экспрессирующимися, если соотношения нормализованных результатов опытного и контрольного вариантов различались не менее чем в 1.5 раза в каждой из трех независимо проведенных гибридаций. С помощью координатной сетки, предназначенной для определения позиций гибридационных сигналов на мембране, проводили идентификацию соответствующих генов. Полный перечень генов, представленных на мембранах, доступен на сайте [http://atlasinfo.clontech.com/atlasinfo/array/info-action.do?catalog\\_no=7738-1](http://atlasinfo.clontech.com/atlasinfo/array/info-action.do?catalog_no=7738-1).

кДНК для проведения количественной ОТ-ПЦР в режиме реального времени получали из 3–5 мкг суммарной РНК реакцией обратной транскрипции с использованием 0.5 мкг праймера (dT)<sub>12–18</sub> и 40 ед. акт. обратной транскриптазы M-MuLV в 30 мкл 250 mM Трис-НСl-буфера (содержащего 250 mM КCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM дитиотреитола, 10 ммоль/л каждого dNTP и 20 ед. РНКазина, pH 8.3), инкубацией в течение 1 ч при 37°C. Количественную ОТ-ПЦР в реальном времени проводили в приборе “iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System” (BioRad, США), используя интеркалирующий краситель SYBR Green I. Реакционная смесь в объеме 30 мкл содержала 15 мкл 2 × iQ™ SYBR® Green Supermix (100 mM КCl, 40 mM Трис, pH 8.4, dNTP – 0.4 mM каждый, 50 ед./мл iTaq ДНК-полимераз, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, SYBR Green I, 20 нМ флуоресцеин), 100–500 нМ прямой и обратный праймер, 2 мкл кДНК и деионизованную воду. Последовательности праймеров могут быть предоставлены по запросу. Определение относительного уровня мРНК исследуемых генов проводили с помощью модификации C(t)-метода в программе REST Tool V1.9.9 (Corbett Research, США).

Работа проводилась при финансовой поддержке ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 годы” (ГК 02.740.11.0290).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Информационный бюллетень № 317 // ВОЗ. 2009.
2. *Vaughan Williams E.M.* // *J. Clin. Pharmacol.* 1984. V. 24. P. 129–147.
3. *Каверина Н.В., Бердяев С.Ю., Кищук Е.П., Пасхина О.Е.* // *Вестник фармакологического комитета.* 1998. № 2. С. 11–19.
4. *Ross H.M., Kocovic D.Z., Kowey P.R.* // *Am. J. Geriatr. Cardiol.* 2005. V. 14(2). P. 62–67.
5. *Гарпинченко В.А., Яцынич Е.А., Петров Д.В., Карачурина Л.Т., Хисамутдинова Р.Ю., Н.Ж. Басченко, Докичев В.А., Томилов Ю.В.* // *Хим.-фарм. Журнал.* 2005. Т. 39. С. 9–11.
6. *Петров Д.В., Гарпинченко В.А., Шафикова Е.А., Зарудий Ф.С., Басченко Н.Ж., Хисамутдинова Р.Ю., Макара Н.С., Вахитов В.А., Вахитова Ю.В., Чжан Вейму, Алимбеков Р.И., Докичев В.А., Томилов Ю.В., Нефедов О.М.* 5-Амино-экто-3-азатрицикло[5.2.1.0<sup>2,6</sup>] декан-4-он, проявляющий антиаритмическую, противовоспалительную, анальгетическую и ноотропную активность. Патент РФ № 2281938 // Б.И. 2006. № 23.
7. *Mappu P.* // *Биохимия человека: Пер. с англ.* М.: Мир, 1993 (Murrey R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W. Harper’s Biochemistry, Twenty-first Edition, Appleton & Lange, 1988).
8. *Russell D.C., Lawrie J.S., Riemersma R.A., Oliver M.F.* // *Acta Med. Scand. Suppl.* 1981. V. 651. P. 71–81.
9. *Saffitz J.E.* // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2005. V. 1047. P. 336–344.
10. *Remme C.A., Bezzi C.R.* // *Cell Cycle.* 2010. V. 9. P. 1246–1252.
11. *Bierkamp C., Mclaughlin K.J., Schwarz H., Huber O., Kemler R.* // *Dev. Biol.* 1996. V. 180. P. 780–785.
12. *Kaplan S.R., Gard J.J., Protonotarios N., Tsatsopoulou A., Spiliopoulou C., Anastasakis A., Squarcioni C.P., McKenna W.J., Thiene G., Basso C., Brousse N., Fontaine G., Saffitz J.E.* // *Heart Rhythm.* 2004. V. 1. P. 3–11.
13. *Herren T., Gerber P.A., Duru F.* // *Clin. Res. Cardiol.* 2009. V. 98. P. 141–158.
14. *Houslay M.D., Schafer P., Zhang K.Y.* // *Drug Discov. Today.* 2005. V. 10. P. 1503–1519.
15. *Xiang Y., Naro F., Zoudilova M., Jin S.L., Conti M., Kobilka B.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. P. 909–914.
16. *Osadchii O.E.* // *Cardiovasc. Drugs Ther.* 2007. V. 21. P. 171–194.
17. *Leevers S.J., Vanhaesebroeck B., Waterfield M.D.* // *Curr. Opin. Cell Biol.* 1999. V. 11. P. 219–225.
18. *Cantley L.C.* // *Science.* 2002. V. 296. P. 1655–1657.
19. *Fruman D.A., Meyers R.E., Cantley L.C.* // *Annu. Rev. Biochem.* 1998. V. 67. P. 481–507.
20. *Luo J., McMullen J.R., Sobkiw C.L., Zhang L., Dorfman A.L., Sherwood M.C., Logsdon M.N., Horner J.W., DePinho R.A., Izumo S., Cantley L.C.* // *Mol. Cell Biol.* 2005. V. 25. P. 9491–9502.
21. *Caporali A., Emanuelli C.* // *Physiol. Rev.* 2009. V. 89. P. 279–308.
22. *Emanuelli C., Salis M.B., Pinna A., Graiani G., Manni L., Madeddu P.* // *Circulation.* 2002. V. 106. P. 2257–2262.
23. *Kawaguchi-Manabe H., Ieda M., Kimura K., Manabe T., Miyatake S., Kanazawa H., Kawakami T., Ogawa S., Suematsu M., Fukuda K.* // *Life Sci.* 2007. V. 81. P. 385–392.
24. *Bonen A.* // *Eur. J. Appl. Physiol.* 2001. V. 86. P. 6–11.
25. *Vandenberg J.I., Metcalfe J.C., Grace A.A.* // *Circ. Res.* 1993. V. 72. P. 993–1003.
26. *Bonen A., Tonouchi M., Miskovic D., Heddle C., Heikkila J.J., Halestrap A.P.* // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2000. V. 279. P. 1131–1138.
27. *Болдырев А.А.* // *Соросовский Образовательный журнал.* 1998. №4. С. 2–9.
28. *Helms J.B., Arnett K.L., Gatto C., Milanick M.A.* // *Blood Cells Mol. Dis.* 2004. V. 32. P. 394–400.



29. Kostin S., Klein G., Szalay Z., Hein S., Bauer E.P., Schaper J. // *Cardiovasc. Res.* 2002. V. 54. P. 361–379.
30. Nattel S., Maguy A., Le Bouter S., Yeh Y.H. // *Physiol. Rev.* 2007. V. 87. P. 425–456.
31. Espira L., Czubryt M.P. // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2009. V. 87. P. 996–1008.
32. Spinale F.G. // *Physiol. Rev.* 2007. V. 87. P. 1285–1342.
33. Vanhoutte D., Schellings M., Pinto Y., Heymans S. // *Cardiovasc. Res.* 2006. V. 69. P. 604–613.
34. Fedak P.W.M., Smookler D.S., Kassiri Z., Ohno N., Leco K.J., et al. // *Circulation.* 2004. V. 110. P. 2401–2409.
35. English J.L., Kassiri Z., Koskivirta I., Atkinson S.J., Di Grappa M., et al. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. P. 10337–10346.
36. Creemers E.E., Cleutjens J.P., Smits J.F., Daemen M.J. // *Circ. Res.* 2001. V. 89. P. 201–210.
37. Filmus J., Selleck S.B. // *J. Clin. Invest.* 2001. V. 108. P. 497–501.
38. Asundi V.K., Keister B.F., Stahl R.C., Carey D.J. // *Exp. Cell Res.* 1997. V. 230. P. 145–153.
39. Kirn-Safran C., Farach-Carson M.C., Carson D.D. // *Cell Mol. Life Sci.* 2009. V. 66. P. 3421–3434.
40. Song H.H., Shi W., Filmus J. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 7574–7577.
41. Filmus J., Capurro M., Rast J. // *Genome Biol.* 2008. V. 9. P. 224.
42. Sanguinetti M.C., Bennett P.B. // *Circ. Res.* 2003. V. 93. P. 491–499.

### Animal *in vivo* Model of Arrhythmia for Genes Target Identification for 5-Amino-Exo-3-Azatricyclo[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]Decan-4-One

Yu. V. Vakhitova\*\*, E. I. Antipina\*, R. S. Yamidanov\*, R. Yu. Khisamutdinova\*\*, F. S. Zarudy\*\*,  
N. Zh. Baschenko\*\*, V. A. Dokichev\*\*, Yu. V. Tomilov\*\*\*, and O. M. Nefedov\*\*\*

\* *Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Science Centre RAS, pr. Oktyabrya, 71, Ufa, 450054 Russia*

\*\* *Institute of Organic Chemistry of Ufa Science Centre RAS, Ufa;*

\*\*\* *N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry RAS, Moscow*

# *Phone: (+7 347) 235 60 88; fax: (+7 347) 235 60 88; e-mail: juvv73@gmail.com*

The goal of the current work is to study the molecular mechanisms underlay the action of 5- amino-exo-3-azatricyclo[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]decan-4-one (P-11) with combined antiarrhythmic, nootropic, anti-inflammatory and anaesthetic activities. The aconitine-induced experimental rat model of cardiac arrhythmia has been used in our study. Aconitine was administered once intravenously in a dose 50 µg/kg whereas experimental animal group received P-11 in a dose 0.3 mg/kg (the compound was injected intravenously 2 min before acute aconitine treatment). Expression macroarray (Atlas<sup>TM</sup> Rat cDNA Expression Array, #7738-1; BD Biosciences) was used to identify the target genes for P-11 compound. Comparative analysis of changes in the status of expression of genes in the heart of rats induced by P-11 against the simulated *in vivo* arrhythmia identified 16 genes that reproducibly alter the level of expression. These genes encode the extracellular matrix proteins (glypican 1, *Gpc1*; tissue inhibitor of metalloproteinase 2, 3, *Timp2*, *Timp3*); intracellular signaling molecules (rho GTPase activating protein 7, *Dlc1*; protein tyrosine phosphatase 4a1, *Ptp4a1*; phosphodiesterase 4D, *PDE4D*; PI3-kinase regulatory subunit alpha, *PIK3R1*; guanine nucleotide binding protein alpha 12, *Gna12*) and protein of intermediate junctions (junction plakoglobin, *Jup*), proteins involved in glycolysis (phosphofructokinase I, *Pfk1*) and hemostasis (tissue plasminogen activator, *Plat*), plasma membrane transporters (Solute carrier family 16, member 1, *Slc16a1*; ATPase, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> transporting, *Atp1a*), and ets. (*c-fos* proto-oncogene, *c-fos*; telomerase protein component 1, *tlp*; Annexin I, *anxa1*). Thus, the data about the selective effect of P-11 on genes whose products are involved in the arrhythmogenesis mechanisms, allow us to consider this compound as a promising means of pathogenetically oriented pharmacotherapy of cardiac arrhythmias.

*Keywords: bridged compounds; 5-amino-exo-3-azatricyclo[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]decan-4-one; antiarrhythmic activity; expression arrays; genes targets.*