

БЛОКАТОРЫ ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫХ НАТРИЕВЫХ КАНАЛОВ НА ОСНОВЕ АЗОБЕНЗОЛА С УПРАВЛЯЕМОЙ СВЕТОМ МЕСТНОАНЕСТЕТИЧЕСКОЙ И АНТИАРИТМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

© 2024 г. А.Н. Ноев*, **, #, С.Г. Коваленко***, ****, Э.Д. Гатаулина*****,
Е.А. Турчанинова***, В.Д. Джабраилов***, А.А. Аитова***, Д.А. Лихобабина*,
Ж.А. Сутемьева*, Ш.Р. Фролова***, ****, Л.Э. Руппель***, Д.А. Минаков*, Н.В. Суворов*,
П.В. Островерхов*, Ю.Л. Васильев*****, М.В. Николаев*****, В.А. Цвеляя***, ****, *****,
К.И. Агладзе***, ****, М.А. Грин*

*МИРЭА – Российский технологический университет, просп. Вернадского, 78, Москва, 119454, Россия

**Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена – филиал Национального
медицинского исследовательского центра радиологии МЗ РФ, 2-й Боткинский пр-д, 3, Москва, 125284, Россия

***Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
Институтский переулок, 9, Долгопрудный Московской области, 141701, Россия

****Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского,
ул. Щепкина, 61/2, Москва, 129110, Россия

*****Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
просп. Тореза, 44, Санкт-Петербург, 194223, Россия

*****Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова МЗ РФ
(Сеченовский Университет), Трубецкая ул., 8/2, Москва, 119048, Россия

*****Национальный исследовательский университет ИТМО,
Кронверкский просп., 49А, Санкт-Петербург, 197101, Россия

#E-mail: aleksej-noev@yandex.ru

Поступила в редакцию 04.03.2024 г.

После доработки 08.03.2024 г.

Принята к публикации 20.03.2024 г.

Работа посвящена синтезу новых управляемых светом блокаторов потенциал-зависимых натриевых Na_v -каналов на основе азобензола и изучению их местноанестетических и антиаритмических свойств. Действие этеркаина и двух его новых производных на нативные Na_v -каналы изучено *in vitro* с помощью метода пэтч-кламп на изолированных возбудимых клетках (нейронах и кардиомиоцитах) крыс, а также оценена их местная анестетическая активность на роговице глаза кролика *in vivo*. Выполнены исследования влияния полученных соединений на проводимость волн возбуждения в культурах кардиомиоцитов с использованием метода оптического картирования. Эффективная зависимость от света биологическая активность этеркаина и его производных позволяет рассматривать полученные соединения как потенциальные инструменты для управляемой светом местной анестезии, а также для неинвазивной абляции очагов аритмии в сердце в кардиологии.

Ключевые слова: фотофармакология, блокаторы Na_v -каналов, азобензолы, местные анестетики, антиаритмики.

DOI: 10.31857/S0006302924030144, EDN: OEXUZP

Блокаторы потенциал-зависимых натриевых (Na_v) каналов широко используются в медицине в качестве местных анестетиков и антиаритмиков [1–5]. К препаратам данного класса относятся лидокаин, прокаинамид, артикаин, бупивакаин и

др. Несмотря на повсеместное использование, указанные лекарственные средства обладают рядом побочных эффектов, в том числе системной токсичностью, обусловленной неселективным действием на различные изоформы Na_v -каналов, а также на другие молекулярные мишени [4–7]. Среди подходов к созданию более безопасных местных анестетиков и антиаритмиков можно выделить использование наноструктурирован-

Сокращения: ЯМР – ядерный магнитный резонанс, ДМСО-d6 – дейтерированный диметилсульфоксид, УФ – ультрафиолетовый.

ных средств доставки, использование пролекарств, а также создание агентов, биологическая активность которых может регулироваться под внешним воздействием, в том числе светом [8–12]. Последний подход получил название фотофармакологии [10, 11, 13].

Управляемые светом блокаторы Na_v -каналов нашли свое применение в качестве инструментов в различных фундаментальных исследованиях, в особенности в нейробиологии. Основными возможными областями применения управляемых светом блокаторов Na_v -каналов в медицине является разработка на их основе новых управляемых светом местных анестетиков, а также антиаритмиков. Использование подобных анестетиков позволяет ограничить область действия анестезии и снизить количество системных побочных эффектов [14–16]. В свою очередь, управляемые светом антиаритмики могут использоваться для интраоперационного определения участков, подлежащих модулированию с помощью процедуры абляции. Такой подход может позволить увеличить эффективность лечения аритмий и минимизировать количество необходимых инвазивных процедур [17–19].

К известным управляемым светом блокаторам Na_v -каналов относятся производные азобензола: QAQ и его производные [20–22], azoTAB и фотокантин [17, 18, 23], а также с-TAB на основе стильбена [19]. AzoTAB в исследованиях *in vitro* проявлял высокую цитотоксичность, что послужило поводом для создания его более безопасного аналога на основе стильбена – с-TAB, который, однако, блокировал проводимость в обеих (*цис*- и *транс*-) формах, таким образом, не обеспечивая необходимого управления светом [19]. В свою очередь, молекула QAQ неспособна проникать через мембраны клеток, что ограничивает возможность ее клинического применения [14, 17, 19, 20]. Таким образом, создание новых блокаторов Na_v -каналов на основе азобензола является весьма актуальной задачей.

Целью данной работы было получение новых блокаторов Na_v -каналов на основе азобензола и исследование их местноанестетических и антиаритмических свойств с использованием моделей *in vitro* и *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все использованные растворители были подготовлены и очищены по стандартным методикам. Для колоночной хроматографии был использован силикагель 40/60 (Merck, Германия). Аналитическую тонкослойную хроматографию проводили на алюминиевых пластинах с силикагелем Kieselgel 60 F245 (Merck, Германия). Спектры ядерного магнитного резонанса (ЯМР) заре-

гистрированы на спектрометре DPX300 (Bruker, США) в CDCl_3 , $\text{DMSO}-d_6$ (дейтерированном диметилсульфоксиде). Для калибровки использовали сигналы остаточных растворителей.

Исследования проводили с использованием самок и самцов крыс линии Wistar возрастом 3–4 суток (для исследований с использованием кардиомиоцитов) и 13–19 суток (для исследований с использованием нейронов головного мозга). В качестве анестезиометра использовали самостоятельно собранный прибор с фиксированной длиной нейлоновой лески ($l = 1.0$ см, $d = 0.125$ мм), сходный по конструкции с анестезиометром филламентного типа Cochet-Bonnet.

Химический синтез. Получение 4-(хлорацетамидо)-азобензола (соединения 3). Триэтиламин (0.565 г, 0.58 ммоль) добавили к раствору 4-аминоазобензола (соединение 2) (1.000 г, 5.07 ммоль) в 15 мл дихлорметана, смесь охладили до 0–5°C и добавили хлорацетилхлорид (0.625 г, 0.58 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 24 ч при комнатной температуре и после завершения реакции (контролировали с помощью тонкослойной хроматографии) экстрагировали этилацетатом (3×30 мл) из воды (100 мл). Органические слои объединили, промыли насыщенным раствором NaCl и осушили Na_2SO_4 (безв.). Растворитель был удален при пониженном давлении. Продукт использовали в следующей стадии без дополнительной очистки. Соединение 3 (в виде светло-коричневых кристаллов) было получено с выходом 97%. $R_f(\text{SiO}_2, \text{гексан/этилацетат} = 1:1) = 0.75$.

Спектр ^1H -ЯМР соединения 3 (Приложение, рис. S3) (300 МГц, CDCl_3) δ , м.д.: 8.41 (s, 1H, 1×NH), 7.98–7.89 (m, 4H, 4×CH), 7.74 (m, 2H, 2×CH), 7.54–7.47 (m, 3H, 3×CH), 4.23 (s, 2H, 1×CH₂). Спектр ^{13}C -ЯМР соединения 3 (Приложение, рис. S4) (75 МГц, CDCl_3) δ , м.д.: 164.0, 152.8, 149.8, 139.2, 131.1, 129.2, 124.1, 122.9, 120.3, 43.0. MS (ESI⁺) (Приложение, рис. S5) m/z : $[\text{M}-\text{H}]^+$, рассчитано 272.06, найдено 272.10.

Получение 4-((N-морфолино)ацетамидо)-азобензола (соединения 4a). К раствору соединения 3 (0.200 г, 1.01 ммоль) в ацетонитриле (4 мл) добавили морфолин (0.097 г, 1.11 ммоль). Через 5 мин к смеси добавили K_2CO_3 (0.420 г, 3.04 ммоль) и KI (0.168 г, 1.01 ммоль). Смесь перемешивали 4 ч при кипячении. После завершения реакции (контролировали с помощью тонкослойной хроматографии) растворитель был удален при пониженном давлении, после чего смесь экстрагировали этилацетатом (3×30 мл) из воды (100 мл). Органические слои объединили, промыли насыщенным раствором NaCl и осушили Na_2SO_4 (безв.). Растворитель был удален при пониженном давлении. Продукт был очищен колоночной хроматографи-

ей (SiO_2 , этилацетат). Итоговый выход соединения **4a** (в виде оранжевых аморфных кристаллов) составил 45 %. R_f (SiO_2 , этилацетат) = 0.55.

Спектр ^1H -ЯМР соединения **4a** (Приложение, рис. S6) (300 МГц, DMCO-d_6) δ , м.д.: 10.10 (s, 1H, $-\text{NH}$), 7.87–7.82 (m, 6H, $6\times\text{CH}$), 7.58–7.50 (m, 3H, $3\times\text{CH}$), 3.62 (t, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 3.16 (s, 2H, $1\times\text{CH}_2$), 2.48–2.49 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$). Спектр ^{13}C -ЯМР соединения **4** (Приложение, рис. S7) (75 МГц, DMCO-d_6) δ , м.д.: 168.6, 152.0, 147.6, 141.7, 131.0, 129.3, 123.5, 122.3, 119.6, 66.0, 62.0, 53.1. МС (ESI^+) (Приложение, рис. S8) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$, рассчитано 325.17, найдено 325.10.

Получение гидрохлорида 4-((N-морфолино)ацетамидо)-азобензола (соединения 4). К раствору соединения **4a** (0.050 г, 0.15 ммоль) в 6.0 мл Et_2O , охлажденному до 0°C , добавили 0.2 мл 1.25 М раствора $\text{HCl}/\text{Et}_2\text{O}$. Реакционную массу перемешивали 30 мин при 0°C , после чего продукт сконцентрировали при пониженном давлении. Соединение **4** (в виде светло-желтых кристаллов) было получено с количественным выходом. МС (ESI^+) (Приложение, рис. S9) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$, рассчитано 325.17, найдено 325.30.

Получение 4'-гидроксиазобензол-4-карбоновой кислоты (соединения 6). К раствору соединения **5** (5.00 г, 36.46 ммоль) в 6 мл воды добавили концентрированный водный раствор HCl (36.6%, 5 мл). Полученную смесь перемешивали при 0 – 5°C в течение 15 мин. Затем при 0 – 5°C добавили раствор NaNO_2 (2.52 г, 36.46 ммоль) в воде (6 мл) по каплям в течение 10 мин, после чего смесь перемешивали 30 мин при охлаждении. Затем раствор фенола (3.34 г, 36.46 ммоль) в NaOH (16%, 4.7 М, 15 мл) добавили к раствору соли диазотия по каплям в течение 10 мин. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 0 – 5°C , после чего pH раствора был доведен до 4.0. Выпавший осадок был отфильтрован, высушен и очищен при помощи перекристаллизации в этаноле. Выход соединения **6** (в виде темно-красных кристаллов) составил 48% (4.20 г). R_f (SiO_2 , ЭА + CH_3COOH) = 0.75.

Спектр ^1H -ЯМР соединения **6** (Приложение, рис. S10) (300 МГц, DMCO-d_6) δ , м.д.: 8.08 (d, 2H, $J = 8.6$ Гц, $2\times\text{CH}$), 7.77 (m, 4H, $4\times\text{CH}$), 7.00 (d, 2H, $J = 8.9$ Гц, $2\times\text{CH}$). Спектр ^{13}C -ЯМР соединения **6** (Приложение, рис. S11) (75 МГц, DMCO-d_6) δ , м.д.: 169.50, 162.58, 152.68, 144.77, 140.92, 129.97, 124.80, 121.05, 116.27. МС (ESI^+) m/z : $[\text{M} + 2\text{Na} + \text{H}]^+$, рассчитано для $(\text{C}_{13}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_3\text{Na}_2)^+$ 287.03, найдено 287.00.

Получение 2-(N-морфолино)-этил 4'-(2-(N-морфолино)-этокси)-азобензол-4-карбоксилата (соединения 7). К раствору соединения **6** (700 мг,

2.89 ммоль) в N,N -диметилформамиде (15 мл) добавили K_2CO_3 (1599 мг, 11.57 ммоль) при перемешивании. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 20 минут. В смесь добавили гидрохлорид N -(2-хлорэтил)-морфолина (1075 мг, 5.78 ммоль) и KI (480 мг, 2.89 ммоль), после перемешивали при кипячении 6 часов, а затем экстрагировали (вода/этилацетат). Органический слой был промыт насыщенным раствором NaCl и осушен с помощью Na_2SO_4 (безв.). Растворитель был удален при пониженном давлении. Продукт очищали с помощью колоночной хроматографии (SiO_2 , дихлорметан/метанол = 10:1), выход соединения **7** (в виде оранжевых кристаллов) составил 77% (112 мг). R_f (SiO_2 , дихлорметан/метанол = 10:1) = 0.58.

Спектр ^1H -ЯМР соединения **7** (Приложение, рис. S12) (300 МГц, хлороформ- d) δ , м.д.: 8.14 (d, 2H, $J = 8.8$ Гц, $2\times\text{CH}$), 7.91 (m, 4H, $4\times\text{CH}$), 7.01 (d, 2H, $J = 9.1$ Гц, $2\times\text{CH}$), 4.7 (t, 2H, $J = 5.9$ Гц, CH_2), 4.19 (t, 2H, $J = 5.7$ Гц, CH_2), 3.72 (m, 8H, $4\times\text{CH}_2$), 2.80 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 2.57 (m, 8H, $4\times\text{CH}_2$). Спектр ^{13}C -ЯМР соединения **7** (Приложение, рис. S13) (75 МГц, хлороформ- d) δ , м.д.: 166.03, 161.91, 155.48, 147.18, 131.36, 130.67, 125.27, 122.47, 115.00, 67.06, 67.00, 66.36, 62.64, 57.59, 57.21, 54.21, 53.97. МС (ESI^+) (Приложение, рис. S14) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$, рассчитано для $(\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_5)^+$ 469.24, найдено 469.40.

Получение 4'-(2-(N-морфолино)-этокси)-азобензол-4-карбоновой кислоты (соединения 8). К раствору соединения **7** (500 мг, 1.1 ммоль) в смеси растворителей диметилсульфоксид/вода = 6:1 (10 мл) был добавлен KOH (0.500 г, 8.9 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 4 ч при 90 – 100°C , после чего экстрагировали (вода/этилацетат с добавлением соляной кислоты). Органический слой был осушен с помощью Na_2SO_4 (безв.). Растворитель был удален при пониженном давлении. Выход соединения **8** (в виде оранжевых кристаллов) составил 62% (234 мг). R_f (SiO_2 , дихлорметан/метанол = 7:1) = 0.70. Спектр ^1H -ЯМР соединения **8** (Приложение, рис. S15) (300 МГц, DMCO-d_6) δ , м.д.: 8.11 (d, 2H, $J = 8.9$ Гц, $2\times\text{CH}$), 7.90 (m, 4H, $4\times\text{CH}$), 7.15 (d, 2H, $J = 9.1$ Гц, $2\times\text{CH}$), 4.21 (t, 2H, $J = 5.7$ Гц, CH_2), 3.58 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 2.73 (t, 2H, $J = 5.7$ Гц, CH_2), 2.49 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$).

Спектр ^{13}C -ЯМР соединения **8** (Приложение, рис. S16) (75 МГц, DMCO-d_6) δ , м.д.: 166.75, 161.80, 154.41, 146.20, 132.31, 130.52, 124.93, 122.16, 115.23, 66.13, 65.89, 56.83, 53.55. МС (ESI^+) (Приложение, рис. S17) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$, рассчитано для $(\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_4)^+$ 356.16, найдено 356.30.

Биологические исследования. Выделение пирамидных нейронов гиппокампа крыс и проведение исследований методом пэтч-кламп на нейронах. После анестезии севофлуораном животных декапировали. Мозг извлекали и помещали в холодный раствор (2–4°C) следующего состава (в мМ): NaCl – 124, KCl – 5, CaCl₂ – 1.3, MgCl₂ – 2, NaHCO₃ – 26, NaH₂PO₄ – 1.24, D-глюкоза – 10, pH 7.4, при аэрации карбогеном (95% O₂ + 5% CO₂). С помощью вибратора приготавливали поперечные срезы гиппокампа.

Пирамидные нейроны зоны CA1 изолировали методом вибродиссоциации. Токи, опосредованные активацией Na_v-каналов, регистрировали с помощью пэтч-кламп-усилителя ЕРС-10 (НЕКА Elektronik, Германия). Мембранные потенциалы клетки фиксировали на уровне –100 мВ. Для активации каналов использовали короткую (30 мс) деполаризирующую ступеньку до уровня –20 мВ. Периодичность стимуляции 10 с.

Состав внеклеточного раствора (в мМ): NaCl – 143, KCl – 5, CaCl₂ – 2.5, D-глюкоза – 10, TEA-Cl – 10, 4-AP – 4, CdCl₂ – 0.1, HEPES – 10, pH 7.4 (с помощью HCl), $t = 22\text{--}24^\circ\text{C}$. Пэтч-пипетки изготавливали из боросиликатного стекла (WPI). Состав раствора для заполнения пипеток (в мМ): CsF – 100, CsCl – 40, NaCl – 5, CaCl₂ – 0.5, ЭГТА – 5, HEPES – 10, pH 7.2 (с помощью CsOH), $t = 22\text{--}24^\circ\text{C}$. Вещества добавляли во внеклеточный раствор и подавали локально на клетку с помощью системы быстрой перфузии RSC-200 (BioLogic, Франция). В качестве источника монохроматического света использовали светодиоды (Mightex, Канада), которые с помощью световода подключали к инвертированному микроскопу Ti-2 (Nikon, Япония). Свет фокусировали в области тела нейрона с помощью объектива 40×. Эффекты веществ оценивали по соотношению $I_{\text{drug}}/I_{\text{control}}$, где I_{control} и I_{drug} – токи в контроле и в присутствии вещества соответственно. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение и получены как минимум из 5 экспериментов. Данные анализировали с помощью программы Origin 9.1 (OriginLab Corp, США).

Выделение клеточной культуры кардиомиоцитов. Был использован протокол двухдневной изоляции, базирующийся на существующем протоколе Worthington-Biochem. В первый день сердца извлекали из крысят (*Rattus norvegicus*, порода Wistar) в возрасте 2–4 суток и немедленно помещали в сбалансированный раствор Хэнкса, не содержащий ионов Ca²⁺ и Mg²⁺ (Cat. N 14180046, Gibco, США), на лед. Выделяли только ткань желудочков, отсекали около 50–60% исходной массы сердца, которая включала синоатриальный узел, предсердия и атриовентрикулярный узел. Выделенные желудочки измельчали на мелкие

кусочки и оставляли на 16 ч при температуре 4°C в растворе трипсина. На второй день клетки помещали в раствор коллагеназы (2/25 мкг/мл, Cat. N 17101015, Gibco, США) и перемешивали в течение часа при 37°C. Суспензию клеток помещали в матрас Т75 на 1 ч для предварительного посева и отделения фибробластов от культуры кардиомиоцитов. Затем клетки подсчитывали с помощью трипанового синего (Cat. N 15250061, Gibco, США) и концентрацию клеток доводили до 10⁶ кл./мл. Выделенные клетки из суспензии (содержащей ~70–80% кардиомиоцитов) высевали на покровные стекла, покрытые фибронектином (0.16 мг/мл, Cat. N 33016015, Gibco, США) в концентрации около 2.5·10⁵ кл./см² в случае выращивания монослоя клеток и в концентрации около 5·10⁴ кл./см² в случае одиночных изолированных кардиомиоцитов для работы по методу «пэтч-кламп». Образцы культивировали в культуральной среде DMEM с 10% фетальной бычьей сыворотки в течение первых 24 ч, затем среду меняли на DMEM с 5% фетальной бычьей сыворотки. После 3–5 суток культивирования монослои исследовали с помощью метода оптического картирования.

Проведение исследований методом «пэтч-кламп» на кардиомиоцитах. Токи потенциалзависимых ионных каналов изолированных кардиомиоцитов регистрировали электрофизиологическим методом «пэтч-кламп» в конфигурации «перфорированная целая клетка». Амфотерицин Б (Sigma Aldrich, США) использовали в качестве перфорирующего агента в концентрации 0.24 мг/мл.

Образцы с одиночными изолированными клетками помещали в камеру с внеклеточным раствором. Внеклеточный раствор для записи токов быстрых натриевых каналов I_{Na} содержал 20 мМ NaCl, 1.8 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, 120 мМ CsCl, 0.002 мМ низолдипина, 10 мМ глюкозы, 10 мМ HEPES, pH 7.4 (CsOH). Пипетку заполняли внутриклеточным раствором, содержащим 135 мМ CsCl, 10 мМ NaCl, 2 мМ CaCl₂, 5 мМ ЭГТА, 10 мМ HEPES, 5 мМ MgATP, pH 7.2 (CsOH).

Для экспериментов на одиночных клетках использовали установку «пэтч-кламп», которая состояла из следующих основных компонентов: цифровой преобразователь Digidata 1440A (Axon Instruments, Inc., США), усилитель Axopatch 200B (Axon Instruments, Inc., США), микроманипулятор MP-285 (Sutter Instrument, США), инвертированный микроскоп IX71 (Olympus, Япония), шумоподаватель HumBug (A-M-Systems, США), антивибрационная платформа AVTT75 (DeltaPix, Дания). Температуру внеклеточного раствора поддерживали в камере с помощью автоматиче-

ского регулятора температуры TC-324C (Warner Instruments, США). Для изготовления пипеток был использован пуллер микропипеток P-97 (Sutter Instrument, США), заготовки из боросиликатного стекла BF150-86-10 (Sutter Instrument, США), микрокузница Narishige MF-900 (Tritech Research, Inc., США)). Из боросиликатных заготовок вытягивали пипетки на пуллере с сопротивлением в среднем 3 МОм. Пипетку заполняли внутриклеточным раствором с амфотерицином Б (Sigma Aldrich, США) в качестве перфорирующего агента в концентрации 0.24 мг/мл. С помощью настроек усилителя емкостные компоненты были скомпенсированы. Окончание перфорации мембраны определяли по изменению емкостных токов, приблизительное время перфорации амфотерицином Б составило около 5 мин.

Протокол стимуляции Ramp для записи токов потенциалзависимых быстрых натриевых каналов I_{NaV} имел вид линейного увеличения потенциала от -120 до $+50$ мВ длительностью 200 мс. Сначала I_{NaV} с помощью данного протокола регистрировался в контроле. Затем медленно (для предотвращения разрыва контакта между пипеткой и клеткой) заменяли внеклеточный раствор в камере на внеклеточный раствор с исследуемым производным азобензола в *транс*-форме, приготовленный заранее. Затем после инкубации клетки в растворе с веществом в течение как минимум трех минут снова записывали I_{NaV} . Таким образом, были записаны токи I_{Na} в контроле и под действием *транс*-формы определенного производного азобензола на одной и той же клетке. Все эксперименты по регистрации токов под действием производных азобензолов (включая стадии добавления раствора с исследуемым веществом, инкубацией клетки и записи тока после воздействия вещества) проводили в темноте, чтобы избежать изменения конфигурации исследуемого вещества.

Емкость мембраны, измеренная с помощью программного обеспечения pCLAMP10.2, варьировала от 20 до 35 пФ. Все эксперименты проводили при комнатной температуре (22 – 24°C). Анализ и обработку данных проводили с использованием программ Clampfit 10.2 (Molecular Devices, США) и OriginPro 8.1 (OriginLab Corp., США).

Оптическое картирование на кардиомиоцитах. Для мониторинга активности и регистрации картины возбуждения 3–5-суточные монослои неонатальных кардиомиоцитов крысы загружали Ca^{2+} -чувствительным индикатором Fluo-4-AM (Cat. No F14201, Molecular Probes, США) на 30–45 мин. После окрашивания среду заменяли раствором Тирода (Cat. No T2145-10L, Sigma-Aldrich Co., США), подогретого до температуры 37°C ,

pH 7.4. Перед ультрафиолетовой (УФ) фотосенсибилизацией монослоев в среду добавляли соответствующие исследуемые вещества. Оптическое картирование культуры неонатальных крысиных желудочковых кардиомиоцитов проводили после визуального контроля на световом микроскопе для обнаружения сформировавшегося конфлюэнтного монослоя клеток со спонтанной сократительной активностью. Образец помещали на нагревательную пластину Thermoplate для поддержания физиологической температуры (37°C) в течение всего эксперимента. Для стандартизации условий эксперимента культуре подавали стимуляцию генератором импульсов посредством платинового электрода. Параметры импульса: длительность — 20 мс, амплитуда — 8 В, период между импульсами — 800 мс (1.25 Гц). Были проведены исследования для различной длительности периодов между импульсами — 400, 800 и 1000 мс. Для итоговых результатов использовали период в 800 мс.

Для контроля картины проведения волн возбуждения под воздействием фотосенсибилизаторов установка по оптическому картированию была дополнена ультрафиолетовым-светодиодом (~ 365 нм, модель LC-L1V3, Хамамацу, Япония). Свет в экспериментальную камеру подавали с помощью светодиодной головки (L11921, Хамамацу, Япония). Плотность мощности УФ-излучения составляла ~ 170 мВт/см² и измерялась с помощью измерителя мощности лазера Nova II P/N 7Z01550 (Ophir Spiricon Europe GmbH, Германия) на конце светодиодного головного устройства. Вся схема установки для экспериментов представлена в Приложении (рис. S1).

Ход эксперимента по регистрации волн возбуждения под воздействием фотосенсибилизирующих веществ:

1. Регистрация скорости проведения волны возбуждения при спонтанной активности культуры.
2. Регистрация скорости проведения волны возбуждения при стимуляции с помощью электродов с соответствующими характеристиками импульса.
3. Добавление 1 мкл исследуемого соединения в концентрации 50 мкМ в чашку Петри с образцом.
4. Фиксация электрофизиологической активности спустя 5, 10, 30, 60, 90 и 120 мин с момента добавления вещества до полной блокировки проведения волны возбуждения по образцу. Таким образом, удастся исследовать уменьшение скорости проводимости культуры (степени блокировки проведения волны возбуждения в образце). В некоторых случаях добавляли дополнительное количество вещества около 1 мкл (до 100 мкМ) исследуемого соединения, если в течение 30–

40 мин не произошла полная блокировка образца.

5. Облучение ультрафиолетовым светом (365 нм) в течение от 10 до 40 с в зависимости от вещества (подбор времени засветки осуществляли индивидуально для каждого соединения на пробных образцах) после полной блокировки активности и стимуляция культуры электродами.

6. Исследование восстановления скорости проведения волны возбуждения на культуре кардиомиоцитов под действием *цис*-формы вещества после засветки УФ в течение 160 мин с момента засветки при периодическом насыщении раствора CO_2 . Регистрацию скорости проведения осуществляли как для случая спонтанной активности, так и при стимуляции с помощью электродов.

7. Замена раствора Тироде (отмывка) после проведения исследований, регистрация спонтанной активности образца и активности со стимуляцией электродами. Отмывки повторяли 3 раза с интервалом около 15 мин для исследования восстановления скорости проводимости культуры после воздействия исследуемого соединения.

8. Очистка образца и фиксация с помощью 4%-го раствора параформальдегида для дальнейших исследований влияния вещества на структуру клеток.

Регистрация скорости происходила при следующих параметрах: разрешение 512×512 пикселей, 130 кадров в секунду.

Первичные данные после эксперимента по оптическому картированию представляли собой последовательность черно-белых изображений, снятых с заданной частотой и с заданным разрешением и образующих видеофрагмент. Далее происходила их обработка с помощью программы ImageJ и ее плагинов (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). При обработке удалялся шум и фоновая засветка, настраивалась контрастность. В программе Wolfram Mathematica 8 результаты представлялись в виде активационных карт. По видеоряду с помощью пространственно-временной развертки можно определить скорость проведения фронта волны по ткани (Приложение, рис. S2). Для этого на всех последовательных изображениях выбирали фиксированное направление и строили зависимость значения яркости для пикселя, принадлежащего этой линии, от номера изображения. С помощью пространственно-временной развертки строили карту, на которой по вертикали откладывали интенсивность пикселей на выбранной прямой, а со сдвигом по горизонтальной оси показывался тот же участок в следующие моменты времени, как количество кадров. Яркая полоса возбуждения отображает фронт волны во времени. Скорость волны считали следующим образом: строили касательную к полоске, которая иллюстрирует фронт волны, и

потом вычисляли тангенс получившегося угла наклона α как отношение размера и времени в единицах пикселей.

Некоторые кадры из видеоряда, как проход одной волны возбуждения по образцу, могут быть выбраны и суммированы на одном изображении в виде активационной карты: цветом обозначен фронт волны в конкретный момент времени. Вся тепловая шкала в данном случае будет обозначать количество кадров, прошедшее с момента инициации волны (обычно: от синего к красному). Шкала в секундах или в кадрах приводится совместно с изображением.

Исследование местноанестетической активности на роговице глаза кролика по методу Ренье. В исследовании использовали ненаркотизированных половозрелых кроликов-самцов породы Советская шиншилла массой 2–3 кг («КролИнфо», Орехово-Зуево, Московская обл., Россия). Животных содержали в стандартных условиях (влажность 50–60%, температура 19–22°C). В помещениях для содержания животных поддерживали 12-часовой цикл освещения, каждое животное содержалось в отдельной клетке). Животным был предоставлен *ad libitum* доступ к стандартному экструдированному комбикорму для кроликов «ЧАРА» (ЗАО «Ассортимент Агро», Тураково, Московская обл., Россия) и чистой питьевой воде, очистку которой проводили с использованием блочно-модульной системы «7 ТЕХНОКОМ» (ООО «7 ТЕХ», Москва, Россия). В качестве отрицательного контроля был выбран 4%-ный водный раствор Kolliphor® ELP, положительным контролем служил 2%-ный раствор лидокаина (Лидокаин, раствор для инъекций 2%, Борисовский завод медицинских препаратов, Беларусь). Для экспериментальных групп и для групп положительного контроля использовали по 4 животных ($n = 8$). Для групп отрицательного контроля использовали по 2 животных ($n = 4$) ввиду предполагаемого отсутствия эффекта и минимизации количества животных в эксперименте. Животных распределяли по группам случайным образом. Перед экспериментом животных фиксировали, оставляя голову свободной. Перед каждым экспериментом у животных выстригали ресницы и определяли базовый порог чувствительности роговицы глаза к тактильному воздействию с помощью анестезиометра.

Эксперименты с животными проводили в помещении с полностью затемненными окнами, в качестве освещения использовался источник света мощностью 50 Вт с длиной волны 625 нм, лежащей вне полос поглощения UV/Vis-спектра исследуемого соединения, находящийся на максимальном удалении от животного. В части экспериментов дополнительно использовали облучение светом с длиной волны 365 нм и выходной мощностью 200 мВт. Перед началом экспериментов со световым воздействием раствор ис-

следуемых соединений предварительно в течение 5 мин облучали светом с длиной волны 365 нм.

Определение чувствительности роговицы глаза кролика с использованием метода поверхностной анестезии (метод Ренье). Исследуемый раствор в объеме 0.2 мл инстиллировали в каждый конъюнктивный мешок. После этого определяли порог чувствительности роговицы глаза к тактильному воздействию. Первое определение проводили на 8-й минуте опыта и далее на 10, 12, 15, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 и 60-й минутах (всего 13 значений). Каждый раз отмечали минимальное число прикосновений одинаковой силы и ритма, вызывающее смыкание век (но не более 100). Индекс Ренье рассчитывали как сумму 13 значений в течение 60 мин по формуле:

$$\text{Индекс Ренье} = \sum_{i=1}^{13} n_i,$$

где n — количество прикосновений до смыкания век.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами был получен управляемый светом местный анестетик этеркаина гидрохлорид (соединение **1**, схема 1), показавший высокую эффективность и полную обратимость биологического эффекта на модели поверхностной анестезии на роговице глаза кролика [13, 14].

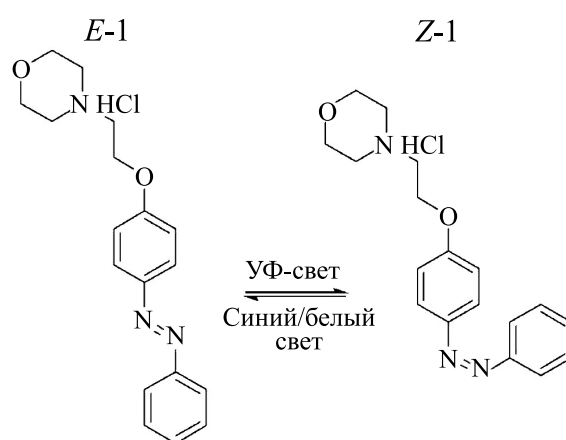


Схема 1. Фотоизомеризация гидрохлорида этеркаина (соединение **1**)

Этеркаин (соединение **1**) имеет в своей структуре линкер с атомом эфирного кислорода, однако большинство используемых в клинической практике местных анестетиков обладает амид-

ным линкером. С целью установления влияния природы линкера на биологическую активность нами был получен амидный аналог этеркаина (соединение **4**, схема 2).

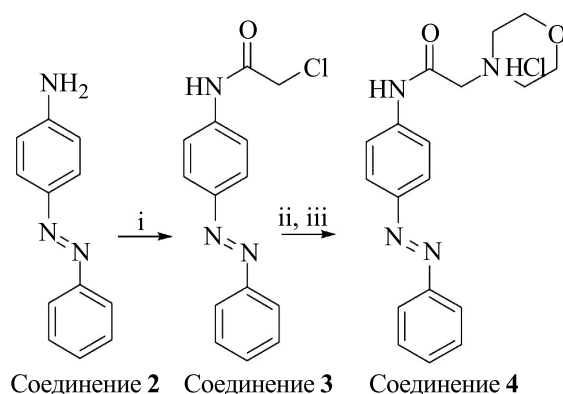


Схема 2. Получение гидрохлорида 4-((N-морфолино)ацетида)-азобензола (соединение **4**). Реагенты и условия: i) хлорацетилхлорид, триэтиламин, дихлорметан, 0–5°C, затем комн. темп.; ii) морфолин, K₂CO₃, KI, N,N-диметилформаид, кипячение; iii) 2M HCl/Et₂O, Et₂O, 0–5°C, 30 мин

Одним из недостатков этеркаина является его ограниченная растворимость в воде, что приводит к необходимости использования дополни-

тельных солюбилизаторов. С целью увеличения водорастворимости было получено 4'-карбоксиизопропанное производное этеркаина (соединение **8**, схема 3).

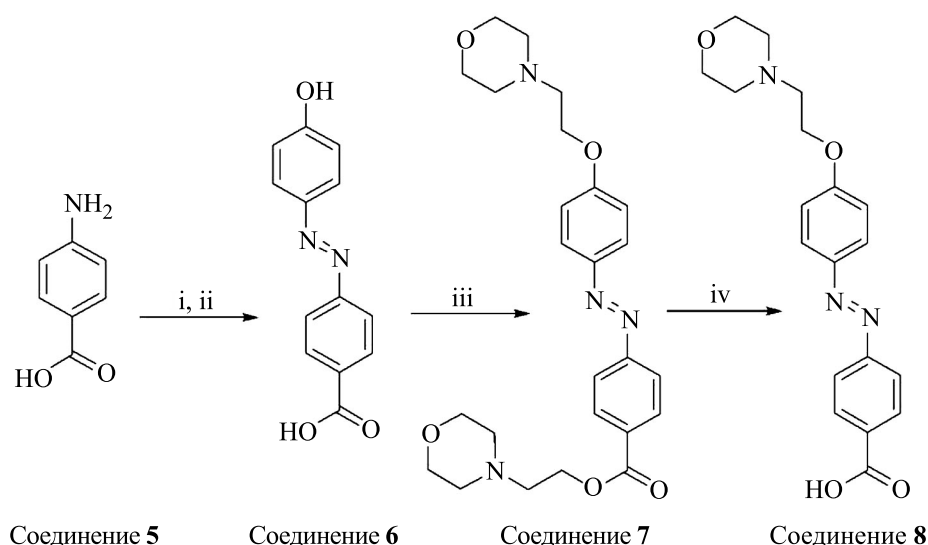


Схема 3. Получение 4'-карбоксиизопропанного производного этеркаина (соединение **8**). Реагенты и условия: i) HCl, NaNO₂, H₂O, 0–5 °С, 30 мин; ii) фенол, NaOH, H₂O, 0–5 °С, 1 ч; iii) KI, K₂CO₃, диметилформамид, кипячение, 6 ч; iv) KOH, диметилсульфоксид:H₂O = 6:1, 90–100 °С, 4 ч

При алкилировании 4-гидрокси-4'-карбоксиизопропана (соединение **6**) наблюдалось образование смеси продуктов замещения по фенольному и карбоксильному кислороду, а также образование ди-замещенного производного **7**. Поэтому селективное получение соединения **8** было реализовано за счет использования избытка алкилирующего агента с последующим гидролизом сложноэфирной связи. Структуры всех промежуточных и конечных соединений были подтвер-

ждены методами ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектроскопии, а также хромато-масс-спектрометрии.

Спектры поглощения соединений **1**, **4**, **8** с преобладанием *транс*- (в темноте) и *цис*-форм (при облучении 365 нм) приведены на рисунках 1а и 1б соответственно.

Исследование местноанестетических свойств производных этеркаина *in vivo*. Местноанестетический эффект полученных соединений был оценен на модели роговицы глаза кролика по методу

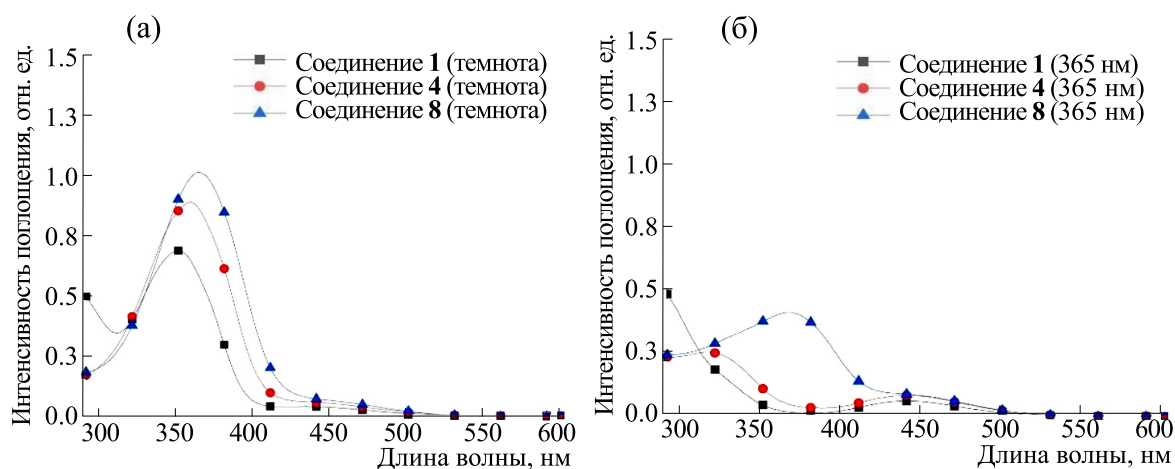


Рис. 1. UV/Vis спектры поглощения соединений **1**, **4** и **8** в диметилсульфоксиде: (а) — с преобладанием *транс*-формы (в темноте), (б) — с преобладанием *цис*-формы (при облучении светом 365 нм).

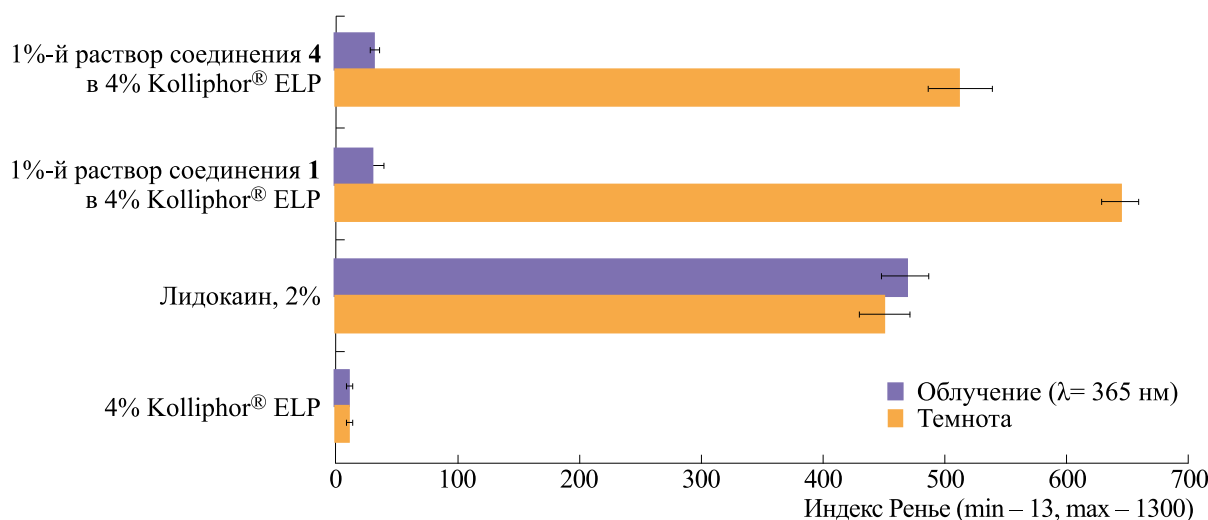


Рис. 2. Результаты исследования местноанестетической активности производных этеркаина по методу Ренье.

Ренье (рис. 2). Количественной оценкой является индекс Ренье, где максимальное значение (1300) свидетельствует о полной анестезии в течение 60 мин, а минимальное (13) — об отсутствии анестезии. Отрицательным контролем служит 4%-ный мицеллярный раствор Kolliphor® ELP, положительным — 2%-ный раствор лидокаина, активность которого не зависит от облучения. Этеркаин (соединение 1) и его производное 4 показывают высокие значения индекса Ренье в темноте (644 ± 30 ($n = 8$) и 512 ± 56 ($n = 8$) соответственно), резко снижающиеся при облучении УФ-светом (32 ± 16 ($n = 8$) и 33 ± 6 ($n = 8$) соответственно), в то время как для лидокаина отсутствовали различия в его значениях при облучении и без него (451 ± 40 ($n = 8$) и 469 ± 37 ($n = 8$) соответственно). Для соединения 8 не удалось добиться воспроизводимости значений индекса Ренье.

Производные 1 и 4 обладают значительным местноанестетическим эффектом, зависимым от облучения. Этеркаин с простым эфирным линке-

ром (1) обладает более выраженным местноанестетическим эффектом в *E*-форме, по сравнению с его амидным аналогом (соединение 4) ($p > 0.05$, непарный *t*-тест). Различия в местноанестетическом эффекте соединений 1 и 4 в *Z*-форме являются статистически не значимыми ($p > 0.05$, непарный *t*-тест). Соединение 8 проявляло волнообразный эффект и практически не обладало местноанестетическими свойствами ни в *E*-, ни в *Z*-форме.

С целью уточнения механизма действия соединений 1 и 4 были проведены электрофизиологические исследования *in vitro* на изолированных нейронах мозга крысы («пэтч-кламп»-регистрация трансмембранных токов в режиме фиксации потенциала, конфигурация «целая клетка»). На рис. 3 приведены примеры токов через Na_v -каналы в пирамидных клетках гиппокампа, вызванные короткой ступенькой деполяризации (от -100 мВ до $+20$ мВ). При экстраклеточной подаче веществ 1 и 4 амплитуда ответов уменьшалась, в концентрации 100 мкМ оба вещества вы-

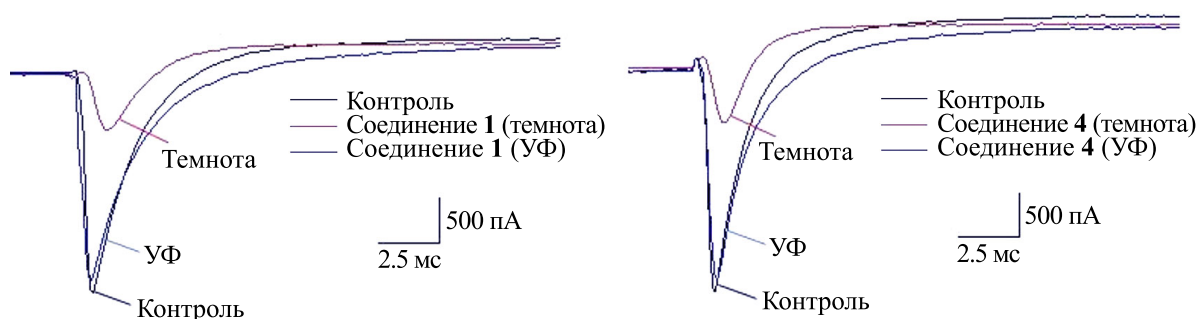


Рис. 3. Действие соединений 1 (а) и 4 (б) в концентрации 100 мкМ на нейрональные Na_v пирамидных клеток гиппокампа (регистрация методом «пэтч-кламп» трансмембранных токов в режиме «целая клетка») в *транс*- (в темноте) и *цис*- (при УФ-облучении) формах. Потенциал фиксации -100 мВ.

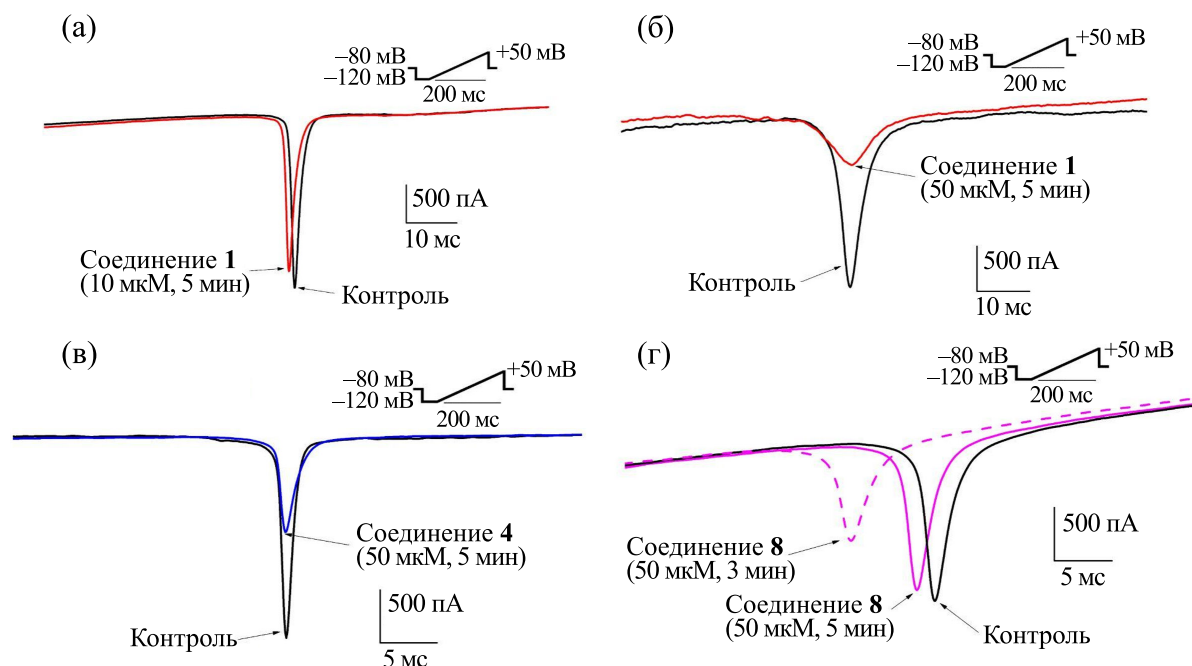


Рис. 4. Быстрый натриевый ток I_{NaV} в неонатальных кардиомиоцитах желудочков крыс в контроле (черная кривая) и под действием исследуемых веществ: (а) — соединение 1 (10 мкМ, через 5 мин), (б) — соединение 1 (50 мкМ, через 5 мин), (в) — соединение 4 (50 мкМ, через 5 мин), (г) — соединение 8 (50 мкМ, через 3 и 5 мин).

зывали глубокое сопоставимое угнетение токов ($I_{drug}/I_{control} = 0.17 \pm 0.07$ ($n = 6$) и $I_{drug}/I_{control} = 0.20 \pm 0.04$ ($n = 5$) соответственно, $p > 0.05$, непарный t -тест). При облучении монохроматическим светом ответ восстанавливался до контрольного уровня. Действие соединений было концентрационно-зависимым, величины IK_{50} в условиях без освещения составляли 38.75 ± 1.16 мкМ и 36.19 ± 1.15 мкМ для соединений 1 и 4 соответственно. В концентрациях выше 100 мкМ при облучении препарата нарушалась стабильность пэтч-кламп регистрации. По этой причине величины IK_{50} при облучении светом определены не были.

Таким образом, соединения 1 и 4 являются антагонистами нейрональных Na_v -каналов в условиях без освещения в микромолярных концентрациях. Кроме того, соединения практически полностью теряют активность при облучении УФ-светом, что свидетельствует о фотопереключаемом действии на ионные каналы.

Исследование антиаритмических свойств производных этеркаина. Следующим этапом работы было исследование антиаритмических свойств соединений 1, 4 и 8. Для этого были проведены пилотные серии экспериментов *in vitro* на крысиных кардиомиоцитах с использованием метода «пэтч-кламп» в конфигурации «целая клетка» (рис. 4).

Для исследования токов I_{Na} под действием соединений 1, 4 и 8 применялся протокол стимуляции Ramp, который представляет собой линейное увеличение потенциала от -120 до $+50$ мВ длительностью 200 мс. Сначала регистрировали контрольный I_{NaV} с помощью указанного протокола, а затем инкубировали клетку в растворе с веществом в течение 3 мин, после чего снова записывали I_{NaV} .

Было изучено действие соединения 1 на работу быстрых натриевых каналов в концентрации 10 мкМ, при этом отсутствовало значительное влияние этеркаина на амплитуду I_{NaV} (рис. 4а). В связи с этим в дальнейших экспериментах исследуемые соединения использовали в концентрации 50 мкМ.

После добавления соединения 1 в данной концентрации амплитуда натриевого тока I_{Na} уменьшилась на 70% (рис. 4б). В случае действия транс-формы соединения 4 ток I_{Na} уменьшился на 50% (рис. 4в). После добавления транс-формы соединения 8 (рис. 4г) наблюдалось уменьшение амплитуды I_{Na} спустя 3 мин после добавления вещества, однако вскоре амплитуда восстановилась практически до контрольного значения.

Таким образом, были записаны токи I_{Na} в контроле и под действием транс-формы производных 1, 4 и 8. Соединения 1 и 4 в концентрации 50 мкМ значительно уменьшали амплитуду тока

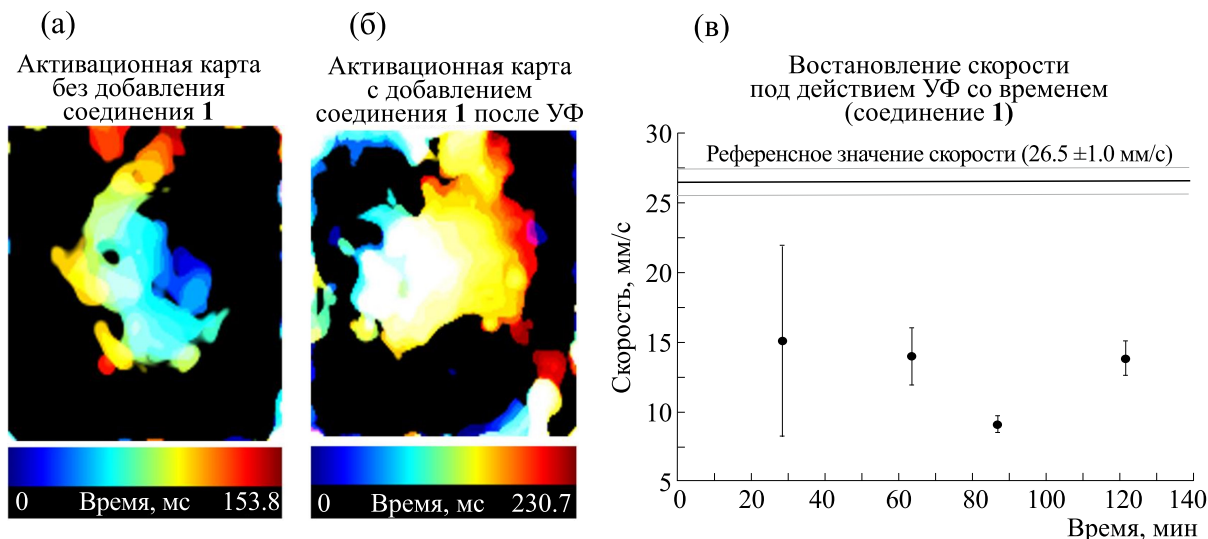


Рис. 5. Скорости проведения волны культурой кардиомиоцитов при добавлении соединения **1** с последующим УФ-облучением. (а) — Активационная карта образца до добавления азобензола (контроль). Тепловая временная карта от 0 до 153 мс. (б) — Активационная карта образца после воздействия УФ с соединением **1** (контроль). Тепловая временная карта от 0 до 230 мс. (в) — График зависимости скорости проведения волны возбуждения от времени после воздействия УФ на культуру ткани с добавлением соединения **1**, скорость проведения в мм/с, время — в мин.

I_{Na} , в то время как воздействие соединения **8** на клетку оказалось нестабильным.

Изучение волн возбуждения в культуре ткани при воздействии производных этеркаина. Для изучения управляемых светом антиаритмических свойств соединений **1**, **4** и **8** были проведены исследования методом оптического картирования на монослой желудочковых кардиомиоцитов крысы до и после воздействия ультрафиолетового излучения (365 нм).

Было изучено влияние соединения **1** на образцы проведение волны возбуждения в монослоях крысиных кардиомиоцитов. После добавления соединения **1** в концентрации 50 мкМ без облучения блокировка волны наступала через 20–40 мин после добавления вещества в зависимости от образца ($n = 6$, рис. 5б). Через 5 мин после достижения блокировки волны образец облучали УФ-светом, после чего измеряли скорость волны в культуре. В ходе оптимизации режима облучения было установлено, что для частичного восстановления проводимости необходимо облучение образца УФ-светом длительностью не менее 30 с. С момента облучения УФ началось восстановление скорости проведения в образце наблюдалось не менее чем через 20 ± 3 мин. На рис. 5 представлены примеры активационных карт волнового фронта, демонстрирующие прохождение волны возбуждения по образцу со временем (рис. 5а,б). На активационной карте продемонстрировано, что в контрольном образце волна проходит значительно быстрее, чем в исследуемом образце после облучения УФ-светом.

Контрольное значение скорости волны, измеренное до добавления азобензольного производного, составляло 26.5 ± 0.94 мм/с (рис. 5в). В примере показаны значения скоростей через 60, 90 и 120 мин после добавления соединения **1**. Скорости после УФ-облучения находились в диапазоне от 9 до 15 мм/с, в среднем скорость восстанавливалась на 48% (12.8 ± 2.3 мм/с). Во всех образцах после добавления соединения **1** наблюдалось постепенное снижение темпов восстановления скорости проведения волны возбуждения спустя час после облучения.

Таким образом, соединение **1** не проявляло аритмогенных свойств на протяжении всего эксперимента. После блокировки проводимости облучение образца УФ-светом позволяло вернуть скорость проведения волны возбуждения по образцу до 48% от контрольного значения, что свидетельствует об ухудшении проведения электромеханической волны кардиомиоцитами под действием данного азобензольного производного в течение времени эксперимента.

Далее были проведены аналогичные исследования с соединением **4** на 6 образцах. Время УФ-облучения в случае соединения **4** составило 10 с (подобрано в ходе оптимизации). Полная блокировка волны в кардиомиоцитах во всех образцах наблюдалась через 5–7 мин после добавления соединения **4**. После перевода соединения **4** в *цис*-форму путем облучения образца УФ-светом восстановление скорости волны проходило медленнее, чем для соединения **1**, и составляло около 30 мин. Измеренная скорость проведения волны после воздействия УФ составила не менее 30% от

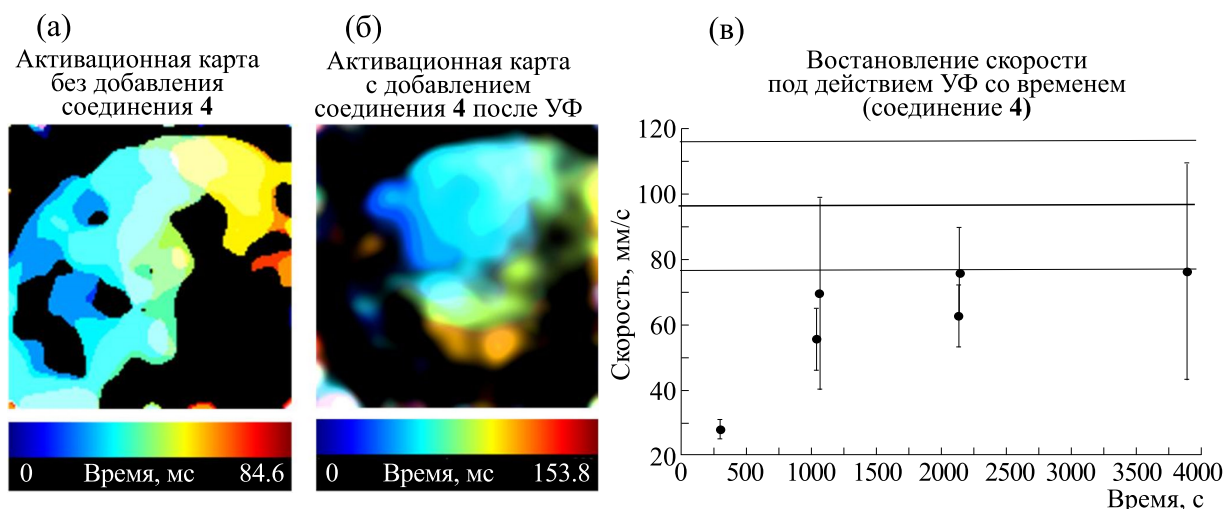


Рис. 6. Скорости проведения волны культурой кардиомиоцитов при добавлении соединения **4** с последующим УФ-облучением. (а) — Активационная карта образца до добавления азобензола (контроль). Тепловая временная карта от 0 до 84 мс. (б) — Активационная карта образца после воздействия УФ с добавлением соединения **4** (контроль). (в) — График зависимости скорости проведения волны возбуждения от времени после воздействия УФ на культуру ткани с добавлением соединения **4**.

контрольного значения. Максимальное восстановление скорости проведения в измерениях составляло порядка 85% от контрольных значений скорости, что является лучшим результатом среди трех рассмотренных азобензольных производных. Примеры активационных карт и графика восстановления скорости приведены на рис. 6.

Активационные карты (рис. 6а,б) демонстрируют незначительное снижение скорости при восстановлении скорости под действием соединения **4** в *цис*-конформации (после УФ-облучения). Для примера тенденции восстановления был взят образец с контрольной скоростью 97 ± 20 мм/с (рис. 6в). Для него проводили регистрацию скорости проведения волны возбуждения через 20, 30 и 60 мин. Финальное значение восстановления скорости для данного образца составляло 76 ± 14 мм/с.

Соединение **4** не проявляло аритмогенных свойств на протяжении всего эксперимента, что было продемонстрировано на активационных картах. Добавление соединения **4** к культуре кардиомиоцитов приводило к относительно быстрой (5–7 мин) обратимой блокировке проведения волны, при этом скорость постепенно восстанавливается после УФ-облучения и через час составляет около 78% от контрольного значения.

Эксперименты по исследованию скорости проведения волны с соединением **8** были проведены для 4 образцов. После добавления соединения **8** в концентрации 50 мкМ блокировка волны не наблюдалась в течение 30 мин, после чего концентрация вещества была увеличена в два раза. Для частичного восстановления возбуждения в случае соединения **8** потребовалось 30–40 с облу-

чения УФ-светом, что превышало показатели для остальных веществ. После УФ-облучения во всех образцах наблюдались реэнтри, выявлялись неоднородности в культуре кардиомиоцитов, на которых возникали устойчивые спиральные волны (рис. 7б). При этом в контроле у этих образцов фронт волны неразрывен (рис. 7а). Примеры активационных карт и возникновения реэнтри на образцах с добавлением соединения **8** представлены на рис. 7.

В части образцов через 30 мин после блокировки волны возбуждения и последующего облучения УФ-светом не происходило восстановления проведения волны возбуждения.

Таким образом, соединение **8** показало сильные аритмогенные свойства, по-видимому, за счет действия на межклеточные связи.

Сравнение соединений **1**, **4** и **8** на основе азобензола показало, что соединение **4** характеризуется большей скоростью проведения волны возбуждения после УФ-облучения по сравнению с соединением **1** (85 и 48% от контрольных значений соответственно), а соединение **8** проявляет аритмогенные свойства и с течением времени блокирует проведение волны в *цис*- и *транс*-формах.

ВЫВОДЫ

В рамках данной работы впервые были получены два новых производных местного анестетика этеркаина и исследованы их местноанестетическая и антиаритмическая активности. Методом «пэтч-кламп» на нативных крысиных кардиомиоцитах и нейронах головного мозга впервые показано, что этеркаин и его производные являются блокаторами

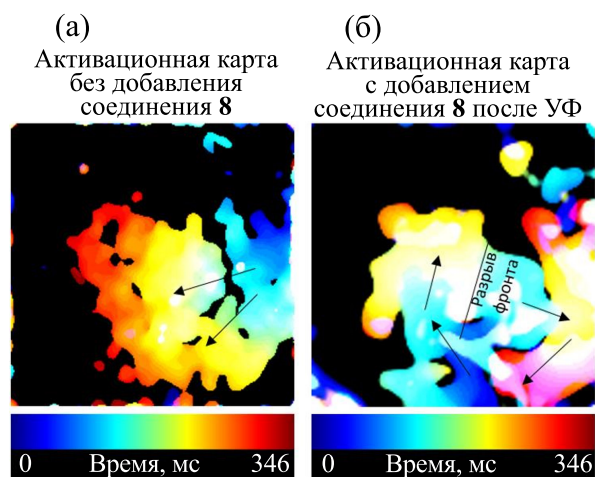


Рис. 7. Активационные карты проведения фронта волны в образце крысиных кардиомиоцитов: (а) — до добавления соединения 8, (б) — после добавления вещества соединения 8. Черными стрелками показано направление движения фронта волны во времени.

потенциал-зависимых натриевых каналов. Амидный аналог этеркаина обладает местноанестетическим эффектом *in vivo* на модели поверхностной анестезии, сравнимым с действием исходного этеркаина, что согласуется с результатами исследования данных соединений *in vitro* на нейронах крыс. Модификация этеркаина путем введения в структуру последнего карбоксильной группы в 4'-положение азобензола привела к практически полной потере местноанестетической активности *in vivo*, а также к появлению артимогенных свойств на культурах кардиомиоцитов.

Как этеркаин, так и его амидное производное способны обратимо блокировать проводимость волны возбуждения в культурах крысиных кардиомиоцитов, однако для амидного производного характерно более быстрое блокирование и более полное восстановление скорости волны возбуждения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Химический синтез был выполнен при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (ГЗ № 075-00701-24-07 от 03.04.2024; FSFZ-2024-0013). Биологические исследования с использованием нейронов выполнены при поддержке гос. задания ИЭФБ РАН (ГЗ № 075-00264-24-00). Физико-химические исследования полученных соединений были выполнены с использованием оборудования ЦКП РТУ МИРЭА при поддержке Минобрнауки России в рамках Соглашения № 075-15-2021-689 от 01.09.2021 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты на животных с использованием нейронов головного мозга проводили в соответствии с нормами биоэтики по протоколам, утвержденным комиссией по биоэтике ИЭФБ РАН (Протокол #1-19/2023). Проведенные эксперименты с использованием кардиомиоцитов соответствуют «Руководству по уходу и использованию лабораторных животных» (№ 85-23, редакция 1996 года) и одобрены Комитетом по наблюдению за животными и исследованиям МФТИ (протокол № А2-2012-09-02). Все манипуляции с животными, связанные с исследованием местноанестетической активности на кроликах, одобрены Биоэтическим комитетом МНИОИ им. П.А.Герцена (протокол № 32 от 22.12.2022) и выполнены в соответствии с национальными и международными правилами гуманного обращения с животными (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes, Council of Europe (ETS 123), Eighth Edition of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NRC 2011)) [24].

ПРИЛОЖЕНИЕ

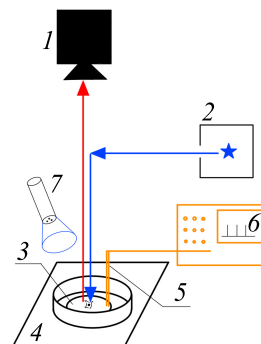


Рис. S1. Схема установки для оптического картирования: 1 – камера, 2 – ртутная лампа, 3 – образец, 4 – thermoplate, 5 – электроды, 6 – вид подаваемого импульса, 7 – УФ-диод.

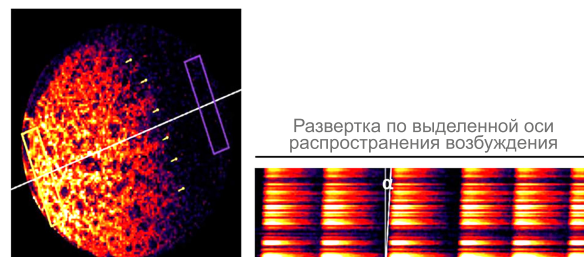
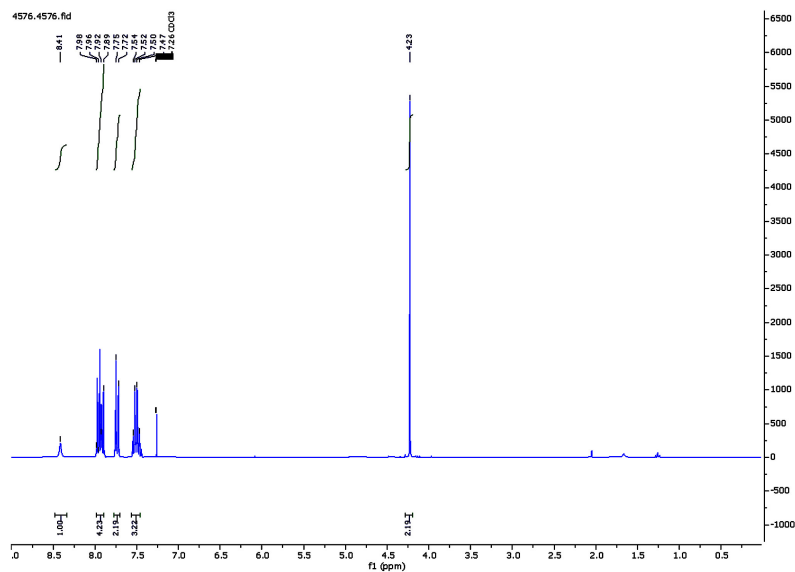
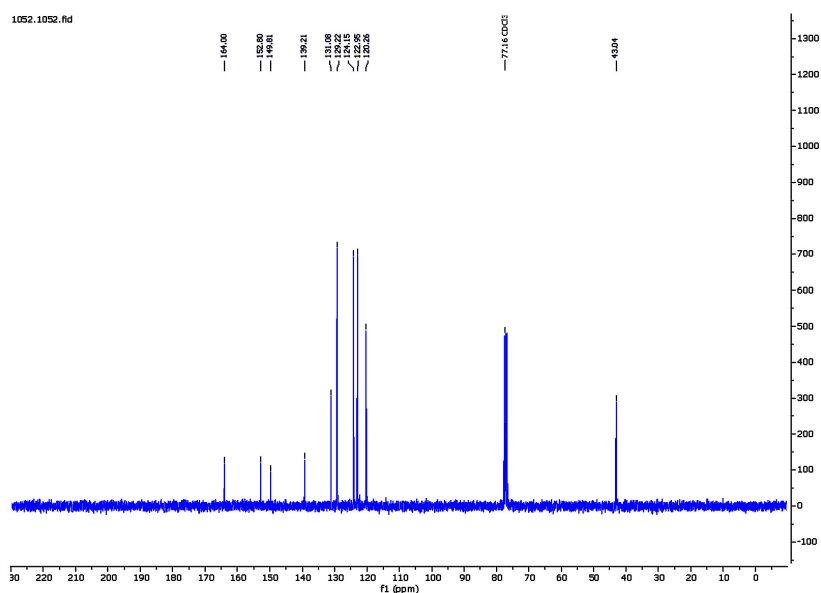
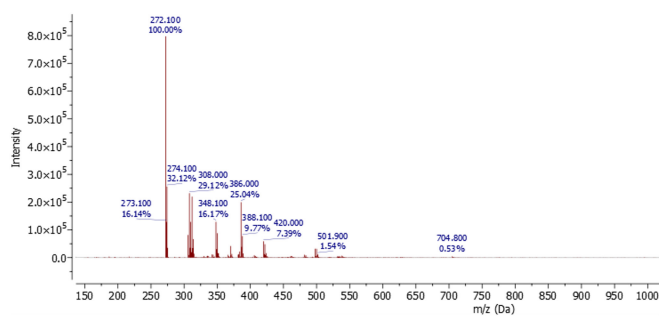
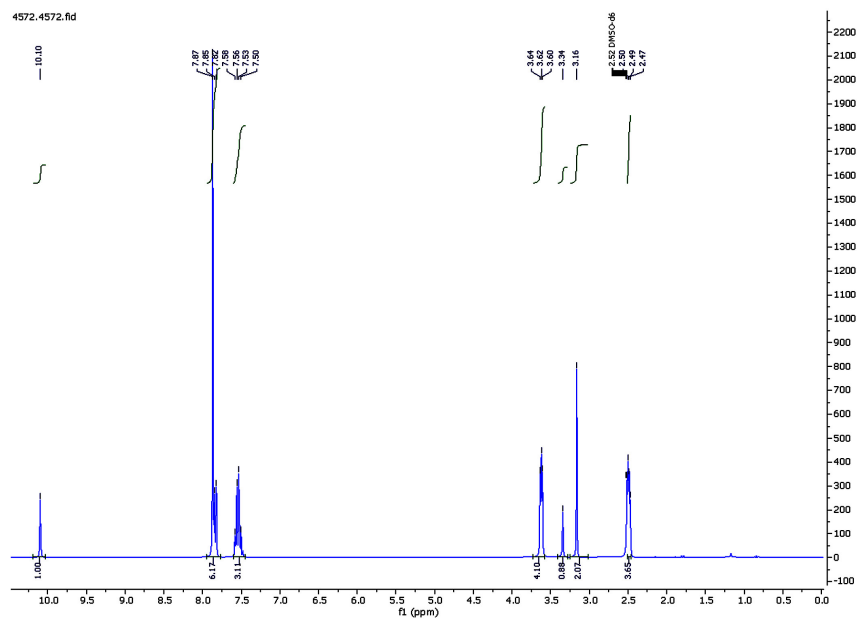
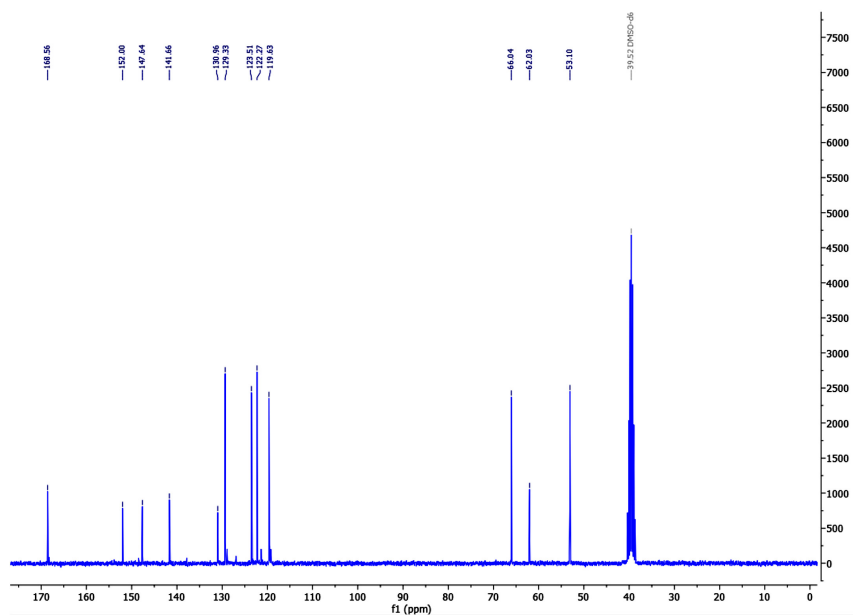
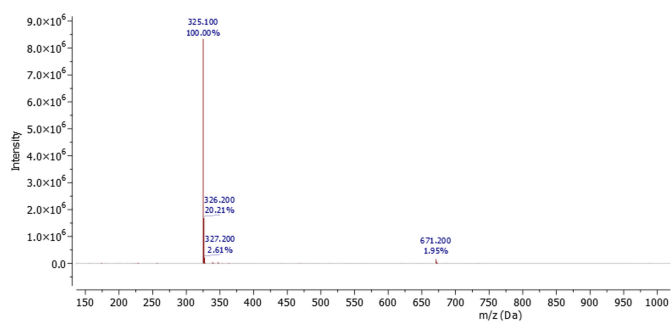


Рис. S2. Иллюстрация пространственно-временной развертки для определения скорости волны возбуждения по образцу монослоя.

Рис. S3. ^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3) спектр соединения 3.Рис. S4. ^{13}C -ЯМР спектр (300 МГц, CDCl_3) соединения 3.Рис. S5. Масс-спектр ESI $^-$ соединения 3.

Рис. S6. ^1H -ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6) спектр соединения **4a**.Рис. S7. Спектр ^{13}C -ЯМР (75 МГц, ДМСО- d_6) соединения **4a**.Рис. S8. Масс-спектр ESI^+ соединения **4a**.

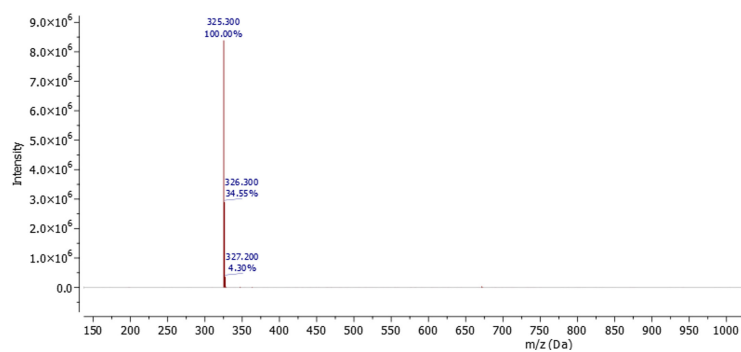


Рис. S9. Масс-спектр ESI^+ соединения 4.

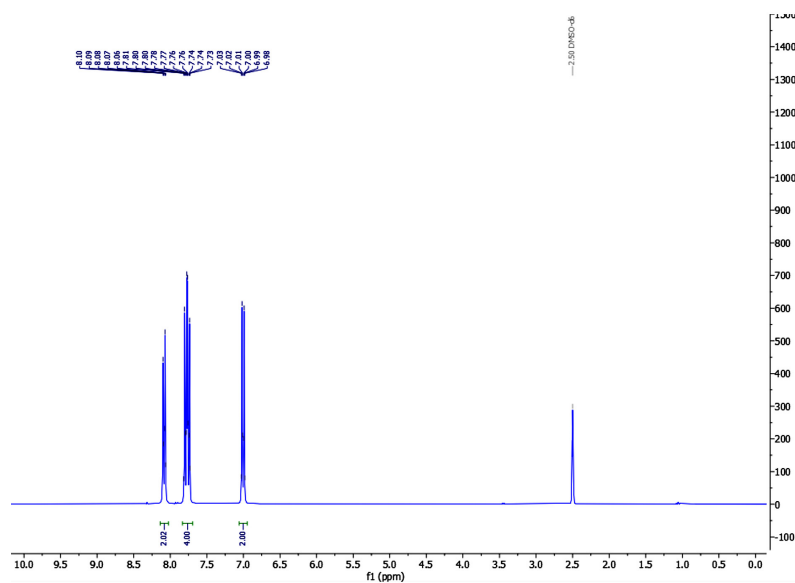


Рис. S10. ^1H -ЯМР спектр (300 МГц, DMSO-d_6) соединения 6.

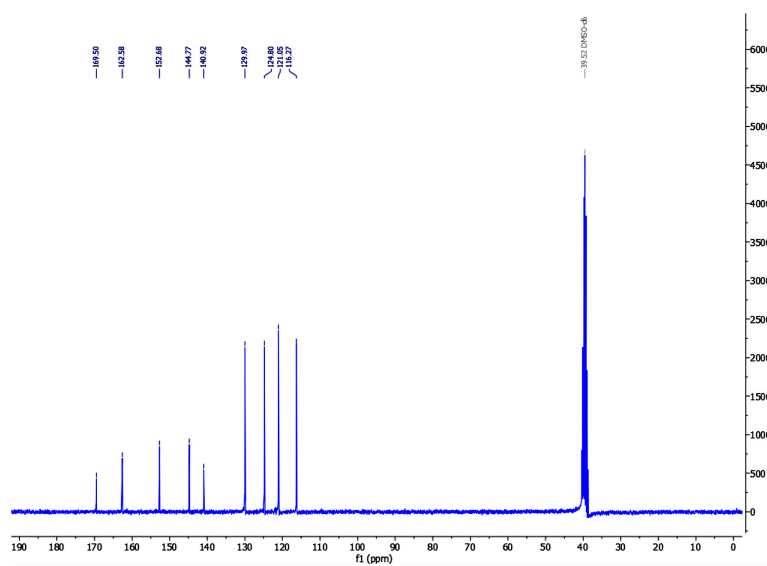
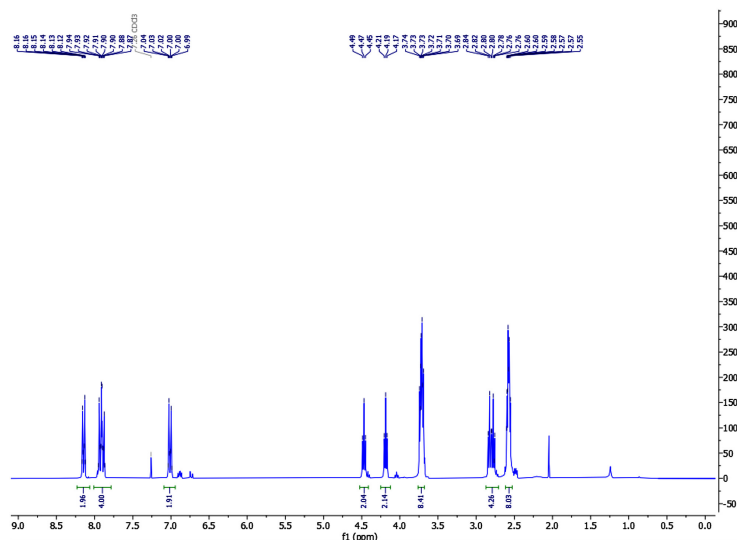
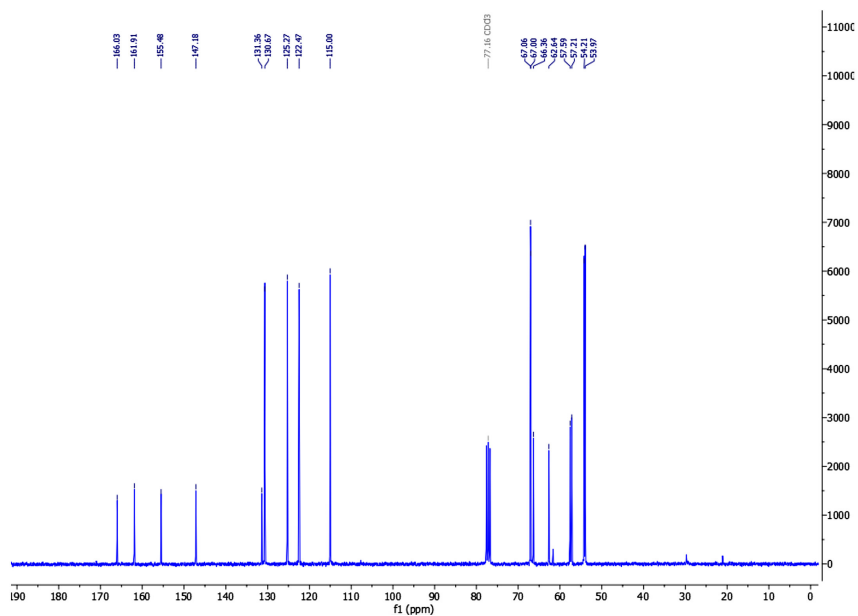
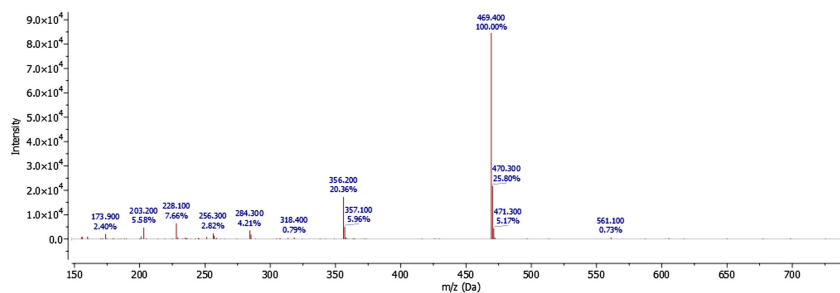
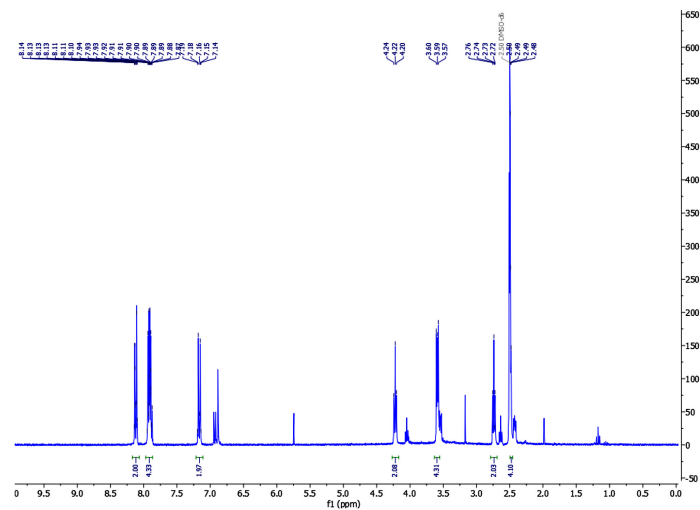
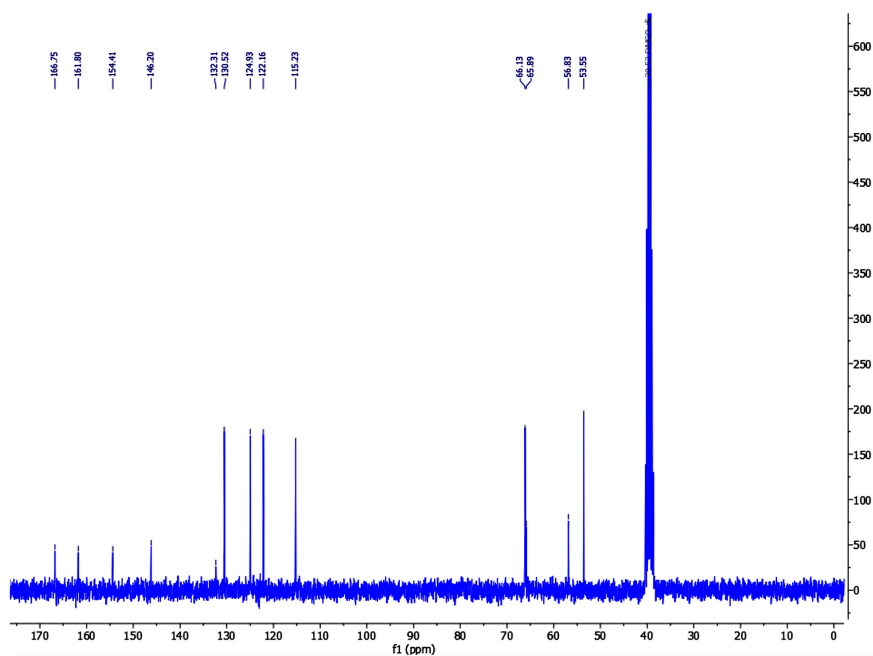
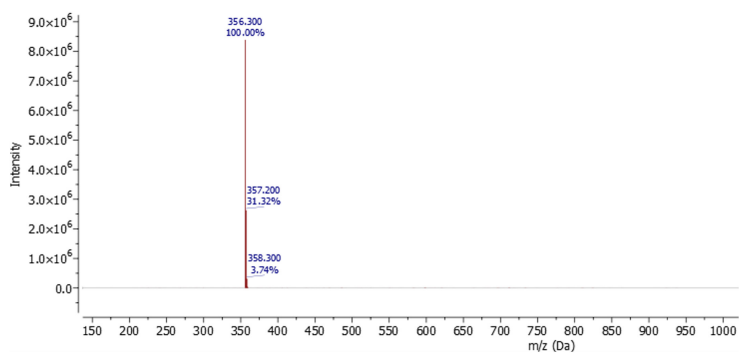


Рис. S11. ^{13}C -ЯМР спектр (75 МГц, DMSO-d_6) соединения 6.

Рис. S12. ^1H -ЯМР спектр (300 МГц, хлороформ- d_6) соединения 7.Рис. S13. ^{13}C -ЯМР спектр (75 МГц, хлороформ- d_6) соединения 7.Рис. S14. Масс-спектр ESI^+ соединения 7.

Рис. S15. ^1H -ЯМР спектр (300 МГц, ДМСО- d_6) соединения 8.Рис. S16. ^{13}C -ЯМР спектр (75 МГц, ДМСО- d_6) соединения 8.Рис. S17. Масс-спектр ESI^+ соединения 8.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Grant A. O. Sodium Channel Blockade as an Antiarrhythmic Mechanism. In *Antiarrhythmic Drugs: Mechanisms of Antiarrhythmic and Proarrhythmic Actions*, Ed. by G. Breithardt, M. Borggrefe, A. J. Camm, and M. Shenasa (Springer, Berlin–Heidelberg, 1995), pp. 3–22. DOI: 10.1007/978-3-642-85624-2_1
- Roden D. M. Pharmacology and toxicology of Na_v1.5-Class 1 antiarrhythmic drugs. *Card. Electrophysiol. Clin.*, **6** (4), 695–704 (2014). DOI: 10.1016/j.ccep.2014.07.003
- Lagan G. and McLure H. A. Review of local anaesthetic agents. *Curr. Anaesth. Crit. Care*, **15** (4–5), 247–254 (2004). DOI: 10.1016/j.cacc.2004.08.007
- Tikhonov D. B. and Zhorov B. S. Mechanism of sodium channel block by local anesthetics, antiarrhythmics, and anticonvulsants. *J. Gen. Physiol.*, **149** (4), 465–481 (2017). DOI: 10.1085/jgp.201611668
- Fozzard H. A., Sheets M. F., and Hanck D. A. The sodium channel as a target for local anesthetic drugs. *Front. Pharmacol.*, **2**, 1–6 (2011). DOI: 10.3389/fphar.2011.00068
- Arumugam S., Contino V., and Kolli S. Local anesthetic systemic toxicity (LAST) – a review and update. *Curr. Anesthesiol. Rep.*, **10** (2), 218–226 (2020). DOI: 10.1007/s40140-020-00381-x
- Gitman M. and Barrington M. J. Local Anesthetic Systemic Toxicity: A Review of Recent Case Reports and Registries. *Reg. Anesth. Pain Med.*, **43** (2), 1 (2018). DOI: 10.1097/AAP.0000000000000721
- Zhang W., Ji T., Li Y., Zheng Y., Mehta M., Zhao C., Liu A., and Kohane D. S. Light-triggered release of conventional local anesthetics from a macromolecular prodrug for on-demand local anesthesia. *Nat. Commun.*, **11** (1), 2323 (2020). DOI: 10.1038/s41467-020-16177-w
- Moradkhani M. R., Karimi A., and Negahdari B. Nanotechnology application to local anaesthesia. *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.*, **46** (2), 355–360 (2018). DOI: 10.1080/21691401.2017.1313263
- Fuchter M. J. On the promise of photopharmacology using photoswitches: a medicinal chemist's perspective. *J. Med. Chem.*, **63** (20), 11436–11447 (2020). DOI: 10.1021/acs.jmedchem.0c00629
- Velema V. A., Szymanski W., and Feringa B. L. Photopharmacology: Beyond Proof of Principle. *J. Am. Chem. Soc.*, **136** (6), 2178–2191 (2014). DOI: 10.1021/ja413063e
- Rozhkov K. I., Yagudaeva E. Y., Sizova S. V., Lazov M. A., Smirnova E. V., Zubov V. P., and Ischenko A. A. Characterization of iron-doped crystalline silicon nanoparticles and their modification with citrate anions for in vivo applications. *Fine Chem. Technol.*, **16** (5), 414–425 (2021). DOI: 10.32362/2410-6593-2021-16-5-414-425
- Broichhagen J., Frank J. A., and Trauner D. A roadmap to success in photopharmacology. *Acc. Chem. Res.*, **48** (7), 1947–1960 (2015). DOI: 10.1021/acs.accounts.5b00129
- Noev A., Kuznetsov N., Korenev G., Morozova N., Vasil'ev Y., Suvorov N., Diachkova E., Usachev M., Pankratov A., and Grin M. A Novel Photoswitchable Azobenzene-Containing Local Anesthetic Ethercaine with Light-Controlled Biological Activity In Vivo. *Int. J. Mol. Sci.*, **23** (10), 5352 (2022). DOI: 10.3390/ijms23105352
- Noev A., Morozova N., Suvorov N., Vasil'ev Y., Pankratov A., and Grin M. Development of a Dosage form for a Photoswitchable Local Anesthetic Ethercaine. *Pharmaceuticals*, **16** (10), 1398 (2023). DOI: 10.3390/ph16101398
- Gazerani P. Shedding light on photo-switchable analgesics for pain. *Pain Manag.*, **7** (2), 71–74 (2017). DOI: 10.2217/pmt-2016-0039
- Frolova S. R., Gaiko O., Tselaya V. A., Pimenov O. Y., and Agladze K. I. Photocontrol of Voltage-Gated Ion Channel Activity by Azobenzene Trimethylammonium Bromide in Neonatal Rat Cardiomyocytes. *PLoS One*, **11** (3), e0152018 (2016). DOI: 10.1371/journal.pone.0152018
- Nizamieva A. A., Kalita I. Y., Slotvitsky M. M., Berezhnoy A. K., Shubina N. S., Frolova S. R., Tselaya V. A., and Agladze K. I. Conduction of excitation waves and reentry drift on cardiac tissue with simulated photocontrol-varied excitability. *Chaos*, **33**(2), (2023). DOI: 10.1063/5.0122273
- Frolova S. R., Gorbunov V. S., Shubina N. S., Perepukhov A. M., Romanova S. G., and Agladze K. I. Stilbene derivative as a photosensitive compound to control the excitability of neonatal rat cardiomyocytes. *Biosci. Rep.*, **39** (1), 1–14 (2019). DOI: 10.1042/BSR20181849
- Mouroit A., Fehrentz T., Le Feuvre Y., Smith C. M., Herold C., Dalkara D., Nagy F., Trauner D., and Kramer R. H. Rapid optical control of nociception with an ion-channel photoswitch. *Nat. Methods*, **9** (4), 396–402 (2012). DOI: 10.1038/nmeth.1897
- Mouroit A., Herold C., Kienzler M. A., and Kramer R. H. Understanding and improving photocontrol of ion channels in nociceptors with azobenzene photo-switches. *Br. J. Pharmacol.*, **175** (12), 2296–2311 (2018). DOI: 10.1111/bph.13923
- Fehrentz T., Kuttruff C. A., Huber F. M. E., Kienzler M. A., Mayer P., and Trauner D. Exploring the Pharmacology and Action Spectra of Photochromic Open-Channel Blockers. *ChemBioChem*, **13** (12), 1746–1749 (2012). DOI: 10.1002/cbic.201200216
- Schoenberger M., Damijonaitis A., Zhang Z., Nagel D., and Trauner D. Development of a New Photochromic Ion Channel Blocker via Azologization of Fmocaine. *ACS Chem. Neurosci.*, **5** (7), 514–518 (2014). DOI: 10.1021/cn500070w
- National Research Council. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition*. Washington (National Academies Press, 2011). DOI: 10.17226/12910

Azobenzene-Based Voltage-Gated Sodium Channel Blockers with Light-Controlled Local Anesthetic and Antiarrhythmic Activity

A.N. Noev^{*, **}, S.G. Kovalenko^{***, ****}, E.D. Gataulina^{*****}, E.A. Turchaninova^{***},
V.D. Dzhabrailov^{***}, A.A. Aitova^{***}, D.A. Likhobabina^{*}, J.A. Sutemieva^{*},
S.R. Frolova^{***, ****}, L.E. Ruppel^{***}, D.A. Minakov^{*}, N.V. Suvorov^{*}, P.V. Ostroverkhov^{*},
Yu.L. Vasil'ev^{*****}, M.V. Nikolaev^{*****}, V.A. Tsvelaya^{***, ****, *****},
K.I. Agladze^{***, ****}, and M.A. Grin^{*}

^{*}MIREA — Russian Technological University, prosp. Vernadskogo 78, Moscow, 119454 Russia

^{**}P. Hertsen Moscow Oncology Research Institute — Branch of the National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, 2nd Botkinsky pr. 3, 125284 Moscow, Russia

^{***}Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University),
Institutskiy per. 9, Dolgoprudny, Moscow Region, 141701 Russia

^{****}M.F. Vladimirsky Moscow Region Research Clinical Institute, ul. Schepkina 61/2, Moscow, 129110 Russia

^{*****}I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences,
prosp. Thoreza 44, St. Petersburg, 194223 Russia

^{*****}I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University),
Trubetskaya ul. 8/2, Moscow, 119048 Russia

^{*****}ITMO University, Kronverksky prosp. 49A, St. Petersburg, 197101 Russia

The work is devoted to the synthesis of new light-controlled voltage-gated sodium (Na_v) channel blockers based on azobenzene and the study of their local anesthetic and antiarrhythmic properties. The effect of ethercaine and two of its new derivatives on native Na_v channels was studied *in vitro* using the patch-clamp method on isolated excitable cells (neurons and cardiomyocytes) of a rat, and local anesthetic activity of the compounds was evaluated on rabbit's eye cornea. Studies of the effect of the obtained compounds on the conductivity of excitation waves in cardiomyocyte cultures using the optical mapping method were performed. The effective light-dependent biological activity of ethercaine and its derivatives allows us to consider the resulting compounds as potential tools for light-controlled local anesthesia, as well as for non-invasive ablation of arrhythmia in the heart in cardiology.

Keywords: photopharmacology, Na_v channel blockers, azobenzenes, local anesthetics, antiarrhythmics