

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ БРАДИЗОЛА, АМИОДАРОНА, СОТАЛОЛА И ГИДРОКСИЗИНА НА КАЛИЕВЫЕ ИОННЫЕ КАНАЛЫ НЕЙРОНОВ МОЛЛЮСКА

Ю. Д. Игнатов¹, Н. В. Каверина², А. И. Вислобоков¹, А. А. Канидьева¹, К. Н. Мельников¹

С использованием метода внутриклеточного диализа и фиксации мембранного потенциала изучали влияние противоаритмических средств: нового препарата брадизола (производное 2-меркаптобензимидазола), амиодарона, соталола и анксиолитика гидроксизина при внеклеточном приложении в концентрациях 1, 10, 100 и 1000 мкМ на трансмембранный калиевый медленный ионный ток изолированных нейронов прудовика *Lymnaea stagnalis*. Установлено, что все вещества дозозависимо и обратимо подавляют калиевый ток и ускоряют кинетику его инактивации. По степени подавления тока при их действии в концентрации 100 мкМ препараты можно расположить в ряд: брадизол = гидроксизин > амиодарон > соталол. Изменяя неспецифические токи утечки, они оказывают влияние на стабильность мембраны. Высокая мембранотропная активность брадизола может лежать в основе его антиаритмического действия.

Ключевые слова: брадизол, амиодарон, соталол, гидроксизин, калиевый ионный ток, нейрон *Lymnaea stagnalis*

ВВЕДЕНИЕ

В основу классификации противоаритмических средств положено их влияние на макромолекулярные мембранные структуры — ионные каналы и рецепторы. Известно, что противоаритмические препараты 3 класса в основном подавляют потенциалзависимые выходящие калиевые каналы электровозбудимых мембран [6, 7, 10, 14] и таким образом удлиняют фазу реполяризации потенциалов действия кардиомиоцитов. Наиболее часто применяемые в России препараты этой группы — амиодарон (кордарон, “Sanofi Winthor”, Франция) и соталол (сотагексал, “HEXAL PHARMA”, Германия), который обладает и β-адреноблокирующей активностью [8]. Эти препараты используют в кардиологии для нормализации таких нарушений ритма, как суправентрикулярные и желудочковые аритмии. Замечено, что применение гидроксизина (атаракс, UCB, Бельгия) у больных с нервно-психическими расстройствами нормализует сопутствующие иногда нарушения сердечного ритма [18]. Мембранные механизмы подобного действия атаракса не исследованы.

В Институте фармакологии РАМН разработан препарат брадизол (производное 2-меркаптобензимидазола), обладающий антиаритмическим, противофибрилляторным и противоишемическим свойствами. Он может быть использован (при внутривенном введении) для купирования тахиаритмий различного генеза, в

том числе при ишемической болезни сердца [4]. Его мембранотропная активность также не изучена.

Целью данной работы было сравнительное изучение характера изменений выходящего калиевого медленного ионного тока электровозбудимой мембраны нейронов моллюска *Lymnaea stagnalis* под влиянием брадизола, амиодарона, соталола и гидроксизина.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования были неидентифицированные нейроны диаметром около 100 мкМ моллюска прудовика большого (*Lymnaea stagnalis*). Для получения изолированных жизнеспособных нейронов вырезанное из тела моллюска окологлоточное кольцо нервных ганглиев помещали на 40–50 мин в физиологический раствор для моллюсков с добавлением 0,25 % трипсина, а затем для отмывания трипсина — на 30–45 мин в физиологический раствор. Далее для получения изолированных нейронов под микроскопом вольфрамовыми иглами и с помощью полиэтиленовой пипетки осуществляли дезагрегацию нервных ганглиев. Через 40–60 мин после этого нейроны использовали для экспериментов. Остальные могли сохранять свои функциональные свойства в течение 1–3-х суток. Для экспериментов готовили растворы с различным ионным составом (таблица).

При регистрации калиевого медленного тока исходный фиксированный потенциал поддерживали на уровне — 100 мВ и сдвигали его до 30 мВ. При визуальном наблюдении с экрана осциллографа длительность импульса была 150–200 мс, а при регистрации токов на компьютере — 1000 мс.

Перфузирующий раствор подавали в камеру, где находился нейрон на полиэтиленовой микропипетке, т.е. к наружной стороне мембраны нейрона, а диализиру-

¹ Институт фармакологии им. А. В. Вальдмана Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, 197022, ул. Л. Толстого, 6/8.

² ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8.

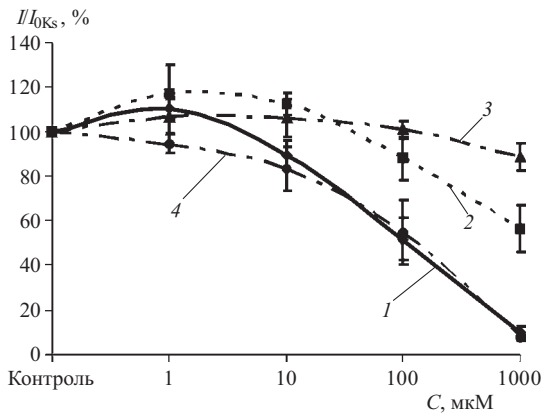


Рис. 1. Зависимости “концентрация-эффект” при действии амиодарона, брадизола, соталола и гидроксизина на калиевый медленный ток (I_{Ks}) нейронов прудовика.

1 — брадизол, 2 — амиодарон, 3 — соталол, 4 — гидроксизин.

ющий — внутрь этой пипетки, т.е. внутрь нейрона. В работе использовали методику внутриклеточного диализа и фиксации мембранного потенциала на целой клетке [2], помещаемой на полиэтиленовую пипетку. Эта модель является перспективной для мембранофармакологических исследований электровозбудимых клеток, в том числе и кардиомиоцитов.

Исследуемые вещества: брадизола гидрохлорид (РФ), кордарона гидрохлорид (кордарон, “Sanofi Winthrop”), соталол (сотатексал, “HEXAL”) и гидроксизин (атаракс, УСВ) в концентрациях 1; 10; 100 и 1000 мкМ добавляли в наружный (перфузирующий) раствор. Эффект развивался довольно быстро и стабилизировался через 2–3 мин, отмывание велось 5–7 мин. Кривые ионных токов вводили в компьютер и качественно оценивали кинетику их развития. Исходные величины ионных токов принимали за 100 %, а установившиеся при действии исследуемых веществ в различных концентрациях выражали в процентах к исходным (по 5–6 измерений) и обрабатывали статистически с использованием t -критерия Стьюдента. На основании полученных данных были построены зависимости “концентрация-эффект”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Основные данные об изменениях амплитуды калиевого ионного тока в виде зависимостей “концентрация-эффект” под влиянием брадизола, амиодарона, соталола и гидроксизина в различных концентрациях представлены на рис. 1. Значения амплитуды выходя-

щего калиевого медленного тока различных нейронов до действия брадизола были равны 25–50 нА (при тестирующем потенциале 30 мВ). Видно, что брадизол (рис. 1) при действии в концентрации 1 мкМ увеличивает калиевый ток, а в более высоких концентрациях — дозозависимо подавляет его вплоть до 10 % (1000 мкМ) от исходного уровня. Восстановление тока в процессе отмывания нейронов в течение 5–7 мин после действия в концентрации 1000 мкМ происходит не полностью (до 74,6 %). Неспецифические токи утечки мембраны под влиянием брадизола незначительно уменьшались (наблюдалась небольшая стабилизация мембран). Характер изменения медленного калиевого тока (снижение амплитуды, а также некоторое замедление активации и ускорение процесса инактивации тока при действии брадизола, т.е. усиление блокирования каналов во время довольно длительной тестирующей деполяризации — порядка 1–2 с) показан на рис. 2, а, кривая 2.

Амиодарон оказывает на медленный калиевый ток также двухфазное действие (рис. 1). Под влиянием препарата в низкой концентрации (от 1 до 50 мкМ) происходит его увеличение, причем оно более выраженное, чем под влиянием брадизола, а подавление начинается с концентрации 50–100 мкМ, достигая 56 % при действии в концентрации 1000 мкМ, что значительно меньше, чем при действии брадизола в такой же концентрации. Восстановление тока после отмывания препарата происходило до 82 % от исходного уровня. Под влиянием амиодарона наблюдалось обратимое ускорение процесса инактивации калиевого медленно-го тока (рис. 2, б, кривая 3).

Соталол (рис. 1) оказывал более слабое действие на калиевый ионный ток, чем брадизол и амиодарон. В диапазоне концентраций от 1 до 500–700 мкМ имела тенденция к увеличению амплитуды медленного калиевого тока и в концентрации 1000 мкМ соталол достоверно снижал её почти на 12 % от исходного уровня. При этом, как и при действии брадизола и амиодарона, под влиянием соталола наблюдалось ускорение процесса инактивации калиевого тока (рис. 2, в, кривая 2). Восстановление ионного тока после подавления тока в этой концентрации происходило медленно (за 5–7 мин) и лишь до 90 % от исходного уровня. Под влиянием амиодарона неспецифические токи утечки мембраны практически не изменялись, а под влиянием соталола — незначительно снижались, что указывает на мембраностабилизирующее действие препарата.

Ионный состав (в мМ) растворов для нейронов прудовика

Регистрируемые токи	NaCl	CsCl	CaCl ₂	MgCl ₂	KCl	трис-ОН	pH
<i>Внеклеточные (перфузирующие) растворы</i>							
Калиевые выходящие	100	—	2	1,5	5	2	7,5
<i>Внутриклеточные (диализирующие) растворы</i>							
Калиевые выходящие	—	—	—	—	120	2	7,4

Под влиянием гидроксизина (рис. 1) происходит только подавление ионного тока вплоть до 7 % от исходного уровня при концентрации 1000 мкМ. Обратимость такого подавления калиевого тока небольшая: через 15 мин отмыwania — всего до 35 % от исходного уровня. Под влиянием гидроксизина наблюдалось также выраженное ускорение инактивации калиевого тока (рис. 2, *з*, кривая 2 и 3). При отмывании кинетика ионного тока восстанавливалась очень медленно.

Таким образом, в работе получены сравнительные данные о влиянии бразидола, амиодарона и соталола на калиевый медленный ток электровозбудимой мембраны, что указывает на их различную мембранотропную активность, а также доказана возможность подавления этого тока бразидолом и гидроксизином. По степени подавления калиевого тока в порядке усиления их активности препараты можно расположить в ряд: бразидол = гидроксинин > амиодарон > соталол. Под влиянием этих препаратов происходило ускорение процесса инактивации, что свидетельствует как о возможном взаимодействии молекул этих веществ с инактивационными воротами ионных каналов, так и о том, что это взаимодействие происходит в открытом состоянии каналов. Различная степень восстановления калиевого тока после действия препаратов указывает на их различную силу связывания со структурами мембраны, причём меньшее восстановление тока говорит о большей силе связывания. Наиболее прочное связывание с мембраной осуществляется гидроксизином.

Механизмы действия многих противоаритмических препаратов реализуются на уровне ионных каналов клеточной мембраны [3, 12, 13, 15 – 17]. На основании полученных данных можно утверждать, что в проявлении противоаритмических свойств бразидола, амиодарона [9] и анксиолитика с противоаритмическими свойствами гидроксизина значительную роль играет подавление ими калиевого медленного ионного тока, а в действии соталола — его известная β -адреноблокирующая активность [6, 11]. Мембраностабилизирующее действие исследованных препаратов, показанное в данной работе, возможно, также лежит в основе их общего неспецифического противоаритмического действия на клетку. Значение изменений стабильности мембраны для её функционирования, которое бывает при действии многих факторов, можно проиллюстрировать на примере эффектов этанола. Он способен оказывать непосредственное воздействие на биологические мембраны [5], увеличивая текучесть последних (так называемое разжижающее или “флюидизирующее” действие). В результате такого воздействия меняется жидко-кристаллическое состояние мембран, в которых возрастает подвижность молекул липидов и белков. Изменения фазового состояния мембраны оказывают существенное влияние на процессы мембранного транспорта, на системы трансмембранной передачи информации, на активность мембраносвязанных ферментов. Таким образом, нельзя исключить и той

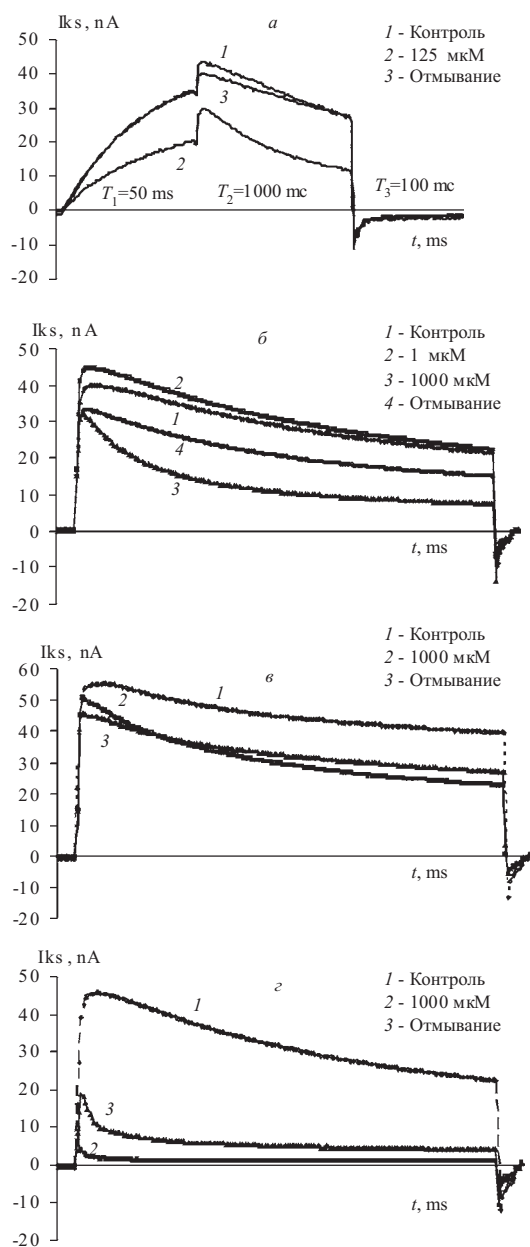


Рис. 2. Ускорение инактивации калиевого медленного тока (I_{ks}) нейронов пудовика под влиянием бразидола (*а*), амиодарона (*б*), соталола (*в*) и гидроксизина (*з*).

Для *б*, *в* и *з* $t = 1000$ ms.

возможности, что под влиянием исследованных нами препаратов наблюдавшиеся изменения стабильности мембраны могут привести к её новому жидко-кристаллическому состоянию и соответствующей модуляции активности различных макромолекулярных систем мембраны.

ВЫВОДЫ

1. Новый противоаритмический препарат бразидол, как и амиодарон, в концентрациях 1 – 1000 мкМ обладает двухфазным действием на трансмембранный калиевый медленный ионный ток соматической мембра-

ны нейронов. Бразидол дозозависимо и обратимо увеличивает (при действии в концентрации 1 мкМ) и снижает (при действии в концентрации 10 – 1000 мкМ) калиевый ток. По сравнению с амиодароном это подавление выражено в большей степени.

2. По силе подавления калиевого ионного тока исследованные вещества при действии в концентрации 100 мкМ можно расположить в ряд: бразидол = гидроксизин > амиодарон > соталол.

3. Гидроксизин в концентрациях 1 – 1000 мкМ обладает выраженным подавляющим (монофазным) действием на медленный калиевый ток, дозозависимо и обратимо снижая его амплитуду. При действии в концентрации 1000 мкМ это подавление происходит на 93 %.

4. Подавление калиевого ионного тока бразидолом, амиодароном, соталолом и гидроксизином сопровождается ускорением процесса его инактивации.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. И. Вислобоков, Ю. Д. Игнатов, *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*, **2**(1), 14 – 22 (2003).
2. П. Г. Костюк, О. А. Крышталь, *Механизмы электрической возбудимости нервной клетки*, Наука, Москва (1981).

3. З. И. Крутецкая, О. Е. Лебедев, Л. С. Курилова, *Механизмы внутриклеточной сигнализации*, Изд-во С.-Петербургского ун-та, Санкт-Петербург (2003).
4. Г. Г. Чичканов, В. П. Жердев, И. Б. Цорин и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **3**, 29 – 32 (2000).
5. Л. Х. Эйдус, *Биофизика живой клетки*, Пушино (1974), сс. 96 – 108.
6. F. Berger, U. Borchard, and D. Hafner, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, **340**, 696 – 704 (1989).
7. W. Han, L. Zhang, G. Schram, and S. Nattel, *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, **283**, 2495 – 2503 (2002).
8. S. H. Hohnloser and R. L. Woosley, *The new England Journal of Medicine*, **331**, 1, 31 – 38 (1994).
9. K. Kamiya, A. Nishiyama, K. Yasui, et al., *Circulation*, **103**, 1317 (2001).
10. J. Kiehn, D. Thomas, C. A. Karle, et al., *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, **359**, 212 – 219 (1999).
11. M. D. Lowe, D. L. Stone, and A. A. Grace, *Heart*, **79**, 518 – 520 (1998).
12. J. M. Nerbonne, *The Journal of Physiology*, **525**, 2, 285 – 298 (2000).
13. D. E. Pellegrini-Giampietro and F. Moroni, *Voltage-sensitive ion channels: modulation by neurotransmitters and drugs*, Press, Springer Verlag (1988).
14. M. C. Sanguinetti and N. K. Jurkiewicz, *J. Gen Physiol*, **96**, 195 – 215 (1990).

Поступила 24.09.04.

A COMPARATIVE STUDY OF THE EFFECT OF BRAZIDOLE, AMIODARONE, SOTALOL, AND HYDROXYZINE ON POTASSIUM IONIC CHANNELS OF MOLLUSKS NEURONS

Yu. D. Ignatov¹, N. V. Kaverina², A. I. Vislobokov¹, A. A. Kanid'eva¹, and K. N. Mel'nikov¹

¹ Val'dman Institute of Pharmacology, St. Petersburg State Medical University, ul. L'va Tolstogo 6/8, St. Petersburg, 197022 Russia;

² Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Science, Baltiyskaya ul. 8, Moscow, 125315 Russia

Intracellular dialysis and fixed membrane potential techniques were used to study the extracellular influence of antiarrhythmic drugs – brazidole (a new derivative of 2-mercaptobenzimidazole), amiodarone, sotalol, and hydroxyzine (a tranquilizer) in concentrations 1, 10, 100 and 1000 μM – on the slow potassium ionic transmembrane current in isolated neurons of *Lymnaea stagnalis* mollusks. All drugs produced a dose-dependent and reversible suppression of the potassium ion current and accelerated the inactivation kinetics. With respect to the degree of current suppression at 100 μM concentration, the preparations under study can be arranged in the following order: brazidole = hydroxyzine > amiodarone > sotalol. The drugs influence the membrane stability by changing nonspecific leak currents. The antiarrhythmic action of brazidole can be related to its high membranotropic activity.