

## МЕМБРАННЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ АНТИГИПОКСАНТОВ БЕМИТИЛА И АЛМИДА НА НЕЙРОНЫ МОЛЛЮСКОВ

А. И. Вислобоков, В. В. Марышева, П. Д. Шабанов<sup>1</sup>

На изолированных нейронах брюхоногого моллюска прудовика большого (*Lymnaea stagnalis*) исследовали мембранотропные эффекты антигипоксантов бемитила и алмида, структурно относящихся к производным тиобензимидазола. Оба соединения оказывали на ионные каналы обратимое, неизбирательное, дозозависимое, однофазное блокирующее действие в концентрациях 100 и 1000 мкмоль вплоть до полного подавления токов в концентрации 10 ммоль. Таким образом, бемитил и алмид являются активными мембранотропными соединениями, способными в довольно высоких концентрациях непосредственно менять проводимость натриевых, кальциевых и калиевых медленных ионных каналов возбудимых клеток. Антигипоксические защитные реакции на системном уровне организма, вероятно, связаны с тем, что бемитил и алмид в малых концентрациях способны гиперполяризовать мембрану клеток, активировать работу ионных каналов и стабилизировать генерацию потенциалов действия в гипоксических условиях, а в более высоких концентрациях — блокировать ионные токи, снижая возбудимость клеток и оказывая защитное от перегрузок действие.

**Ключевые слова:** бемитил, алмид, нейроны моллюска, ионные каналы (Na, K, Ca)

### ВВЕДЕНИЕ

Бемитил (2-этилтиобензимидазола гидробромид моногидрат) является перспективным фармакологическим средством, обладающим психостимулирующим действием. Бемитил повышает умственную и физическую работоспособность [1], уменьшает астенические проявления, вызванные утомлением, истощением, инфекцией или интоксикацией [1, 2], защищает мозг, миокард и печень от гипоксических повреждений [6, 7], активизирует антиоксидантные системы и синтез ферментов энергетического обмена, подавляет перекисное окисление липидов [5]. В то же время бемитил оказывает противоукачивающее действие [2], подавляет судороги разного генеза и потенцирует действие других противосудорожных препаратов [8]. Фармакологически менее изучен аналог бемитила алмид, представляющий производное бензимидазола с аллильным радикалом (аллилтиобензимидазол). Ранее было показано [1], что алмид выраженно стимулирует высшие функции мозга и по типу действия похож на бемитил, по некоторым видам активности превышая его. Структурное сходство бемитила и алмида с пуриновыми основаниями нуклеиновых кислот предполагало метаболический тип действия на клетки нервной и мышечной системы, что неоднократно было продемонстрировано в эксперименте и клинике [1, 5 – 8]. Несмотря на большое число публикаций по фармакологии бемитила и его аналогов, их влияние на мембранные процессы в возбудимых тканях не изучали. Это и явилось предметом настоящего исследования влияния бемитила и алмида на изолированные нейроны моллюсков.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования были нейроны брюхоногого моллюска прудовика большого (*Lymnaea stagnalis*). Ионные мембранные механизмы электрогенеза и закономерности функционирования нейронов моллюсков принципиально сходны с таковыми для нейронов других животных, в том числе и млекопитающих [4]. Возможность выделения изолированных клеток, длительное функционирование в опытах позволяют подробно изучать электрические явления на уровне потенциалозависимых ионных каналов возбудимой мембраны при действии фармакологических агентов. Для работы использовали неидентифицированные нейроны. Из тела моллюска вырезали окологлоточное кольцо нервных ганглиев, которое затем обрабатывали 0,25 % раствором трипсина в течение 40 мин [3]. Ферментативная обработка позволяет освободить поверхность мембраны нейронов от соединительной ткани, глиальных клеток и других диффузионных барьеров. После обработки ганглии помещали в раствор Рингер-К и через 15 мин их подвергали механическому разделению под бинокулярным микроскопом при помощи вольфрамовых игл и полиэтиленовой пипетки. Выделенные таким образом нейроны были жизнеспособны и сохраняли свои электрические характеристики в течение 1 – 3 сут.

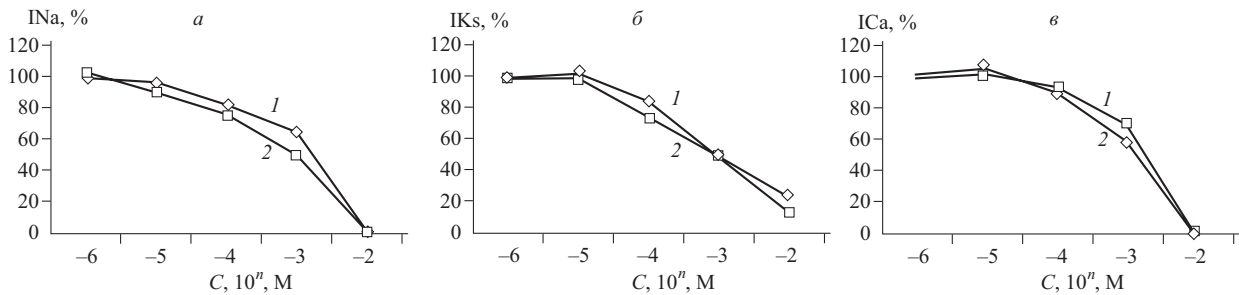
В работе использовали растворы со следующим ионным составом (ммоль): 1) наружные (перфузирующие) растворы для регистрации суммарного входящего тока (Рингер-К) — NaCl — 100; KCl — 5; CaCl<sub>2</sub> — 2; MgCl<sub>2</sub> — 1,5; Tris-OH — 2; pH 7,5 и кальциевого тока — CaCl<sub>2</sub> — 10; MgCl<sub>2</sub> — 1,5; CsCl — 100; Tris-OH — 2; pH 7,5; 2) внутриклеточные (диализирующие) растворы для регистрации суммарного выходящего калиевого тока — KCl — 120; Tris-OH — 2; pH 7,4 и кальциевого тока — CsCl — 120; Tris-OH — 2; pH 7,4.

Перфузирующий раствор подавали в камеру, где находился нейрон на полиэтиленовой микропипетке, а диализирующий — внутрь этой пипетки. Исследуемые вещества при регистрации кальциевых токов добавляли в перфузирующий раствор.

Для измерения трансмембранных ионных токов применяли метод внутриклеточной перфузии изолированных нейронов и фиксации мембранного потенциала [4, 9].

Для изготовления микропипетки с порой использовали тонкую полиэтиленовую трубку длиной 3 см, сгибали ее V-образно в струе горячего воздуха, и на сгибе тонкой стальной проволокой формировали выступ. Затем на вершине выступа под бинокулярной лупой иглой делали отверстие. Изготовленную микропипетку соединяли с системой трубочек для подачи диализи-

<sup>1</sup> Российская военно-медицинская академия МО РФ, Санкт-Петербург, 194044, ул. Лебедева, 6.



Зависимость “доза-эффект” при действии антигипоксантов на ионные токи.

*a* — натриевые, *б* — калиевые, *в* — кальциевые токи нейронов прудовика. По оси абсцисс — концентрация, по оси ординат — ионные токи. 1 — бемитил, 2 — алмид.

рующего раствора. По величине сопротивления (200 – 300 кОм) оценивали диаметр отверстия (3 – 5 мкм) и пригодность микропипетки для дальнейшей работы.

С раствором в полиэтиленовой микропипетке контактировал агаровый мостик с неполяризуемым хлор-серебряным электродом, с помощью которого поддерживался фиксированный потенциал. Второй такой же электрод, помещенный в камеру, использовали для регистрации ионных токов (с помощью усилителя-преобразователя “ток-напряжение”).

Изолированную живую клетку помещали на полиэтиленовую пипетку (в большинстве случаев при фиксированном потенциале — 100 мВ). В микропипетке создавали толчки отрицательного гидростатического давления, вследствие чего в области поры мембрана нейрона разрушалась и создавался электрический контакт неполяризуемого электрода, соединенного с усилителем фиксации потенциала, с внутриклеточным содержимым. При гиперполяризующем сдвиге мембранного потенциала на экране осциллографа были видны емкостные токи мембраны и неспецифический ток утечки, который вычитали из общего тока. При переключении тестирующего импульса на деполяризацию регистрировали входящий (натрий-кальциевый) и выходящий медленный калиевый токи.

После регистрации суммарных ионных токов производили замену внутриклеточного и наружного растворов на растворы для регистрации кальциевого тока (см. выше). Выделение чистых кальциевых токов с их стабильными параметрами, которые принимали за исходные значения (до действия вещества), происходило через 3 – 5 мин после полной замены растворов. Затем раствор в камере, где находился нейрон, заменяли на раствор с исследуемым веществом. Когда изменения ионных токов, вызванные влиянием вещества, стабилизировались (через 2 – 3 мин), вновь регистрировали величины токов (при действии вещества). После этого раствор заменяли на исходный и наблюдали динамику восстановления кальциевых токов.

#### Влияние бемитила и алмида в различных концентрациях ( $10^n$ , моль) на ионные токи нейронов прудовика (% от контроля — данные по 2 – 4 измерениям)

	Контроль	-6	-5	-4	-3	Отмывание	-2
<i>Натриевые токи</i>							
Бемитил	100	100	96	80	65	100 – 106	0
Алмид	100	102	90	75	50	100	0
<i>Кальциевые токи</i>							
Бемитил	100	100	102	94	70	100 – 110	0
Алмид	100	102	105	90	60	100	0
<i>Калиевые медленные токи</i>							
Бемитил	100	100	103	86	50	105 – 110	25
Алмид	100	100	100	75	50	100	15

Для изучения были взяты вещества, проявляющие антигипоксические свойства — бемитил и алмид, оказывающие также разностороннее влияние на нервную систему [2, 5 – 8]. Они использовались в виде субстанции. Молекулярная масса бемитила — 277, алмида — 244. Алмид растворяется в воде лучше бемитила, но бемитил растворяется также достаточно хорошо. В растворе они довольно устойчивы, pH растворов практически не изменяют и сохраняют свою активность при хранении в холодильнике в течение недели и более. Соединения изучали в концентрациях: 1, 10, 100 и 1000 мкмоль (от  $10^{-6}$  до  $10^{-2}$  моль) при действии на натриевые, кальциевые, медленные калиевые ионные токи и неспецифические токи утечки мембраны изолированных нейронов при внеклеточном приложении.

Кривые ионных токов визуально оценивали на экране осциллографа, вводили в компьютер и распечатывали на принтере. На основании полученных данных с помощью компьютера были построены зависимости “концентрация-эффект”. Последние были обработаны статистически с использованием *t*-критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Бемитил и алмид оказывают на ионные каналы обратимое, неизбирательное, дозозависимое, однофазное блокирующее действие. Кинетика ионных токов практически не изменяется (см. рисунок). Алмид оказывает более сильное действие, чем бемитил. При этом эффект развивается быстро (за десятки секунд) и снимается при отмывании также быстро (за 1 – 2 мин), что указывает, с одной стороны, на высокую проникающую способность препаратов проникать в мембрану и подходить к структурам ионных каналов и, с другой стороны — на невысокую степень связывания. Неспецифические токи утечки мембраны, свидетельствующие о стабильности мембран, практически не изменяются при регистрации кальциевых и медленных калиевых токов и незначительно возрастают (что указывает на дестабилизацию мембраны) при регистрации натриевых токов (когда в растворе отсутствуют ионы кальция). После действия антигипоксантов (при отмывании) довольно часто токи оказываются больше контрольных (таблица).

Полученные результаты свидетельствуют, что бемитил и алмид являются активными мембранотропными соединениями, способными в довольно высоких концентрациях непосредственно менять проводимость натриевых, кальциевых и калиевых медленных ионных каналов возбудимых клеток. Доказательством

служит довольно быстрое однофазное обратимое подавляющее ионные токи действие при концентрациях 100 и 1000 мкмоль вплоть до полного подавления токов в концентрации 10 ммоль. Интересными являются факты активирующего действия после этих концентраций или при действии в малых концентрациях 1 или 10 мкмоль. Быстрое проникновение в мембрану и подавление ионных токов, слабая степень связывания со структурами мембраны (быстрое отмывание), незначительность изменений неспецифических токов утечки мембраны указывают на слабую стабилизирующую и дестабилизирующую активность исследованных соединений. Антигипоксические защитные реакции на системном уровне организма, вероятно, связаны с тем, что бемитил и алмид в малых концентрациях способны гиперполяризовать мембрану клеток и активировать работу ионных каналов, стабилизировать генерацию потенциалов действия в гипоксических условиях, а в более высоких концентрациях — блокировать ионные токи, снижая возбудимость клеток, оказывая защитное от перегрузок действие. Блокирование калиевых ионных каналов может приводить к увеличению длительности потенциалов действия нейронов, усиленному выбросу медиаторов в синаптические структуры и активации межнейронных отношений, повышая надежность передачи и способствуя сохранению и закреплению следов.

## ВЫВОДЫ

1. Антигипоксанты бемитил и алмид являются активными мембранотропными соединениями, способными в довольно высоких концентрациях непосред-

венно менять проводимость натриевых, кальциевых и калиевых медленных ионных каналов возбудимых клеток.

2. Антигипоксические свойства бемитила и алмиды, вероятно, связаны с тем, что они в малых концентрациях способны гиперполяризовать мембрану клеток, активировать работу ионных каналов и стабилизировать генерацию потенциалов действия в гипоксических условиях, а в более высоких концентрациях — блокировать ионные токи, снижая возбудимость клеток и оказывая при этом защитное от перегрузок действие.

## ЛИТЕРАТУРА

1. В. М. Виноградов, Б. И. Криворучко, *Психофармакол. и биол. наркол.*, **1**(1), 27 – 37 (2001).
2. Л. А. Глазников, Л. Г. Буйнов, Д. В. Ястребов, П. Д. Шабанов, *Психофармакол. и биол. наркол.*, **2**(1 – 2), 225 – 230 (2002).
3. М. А. Костенко, *Цитология*, **4**(28), 1274 – 1278 (1972).
4. П. Г. Костюк, О. А. Крышталь, *Механизмы электрической возбудимости нервной клетки*, Москва (1981), 497 – 500.
5. О. П. Миронова, И. В. Зарубина, *Психофармакол. и биол. наркол.*, **2**(1 – 2), 219 – 224 (2002).
6. С. В. Оковитый, О. В. Иванова, *Психофармакол. и биол. наркол.*, **2**(1 – 2), 242 – 249. (2002).
7. С. В. Оковитый, О. В. Иванова, П. Д. Шабанов, *Наркология*, № 3, 19 – 24. (2002).
8. Т. Н. Саватеева, В. И. Гузева, Ю. А. Любимов и др., *Психофармакол. и биол. наркол.*, **2**(1 – 2), 219 – 224. (2002).
9. K. S. Lee, N. Akaike, and A. M. Brown, *J. Gen. Physiol.*, **71**, 489 – 507 (1978).

Поступила 27.09.02

## MEMBRANE MECHANISMS OF THE ANTIHYPOXANT EFFECT OF BEMITHYL AND ALMIDE STUDIED ON MOLLUSK NEURONS

A. I. Vislobokov, V. V. Marysheva, and P. D. Shabanov

St. Petersburg State Military Medical Academy, Ministry of Defense of the Russian Federation, ul. Lebedeva 6, St. Petersburg, 194044 Russia

Membranotropic effects of the antihypoxants bemithyl and almide, structural analogs of thiobenzimidazole, have been studied on the isolated neuronal preparations of *Lymnaea stagnalis* branchycephalic mollusk. Both drugs in a concentration range of 100 – 1000  $\mu$ M produced a reversible, dose-dependent nonselective single-phase blocking action upon the ion channels and completely blocked the channels at a concentration of 10 mM. Therefore, bemithyl and almide are active membranotropic compounds capable (in sufficiently high concentrations) of changing the conductivity of slow sodium, calcium, and potassium ion channels in excitable cells. The protective antihypoxant drug reactions on a systemic level of the organism are probably related to the fact that both drugs in small concentrations are capable of hyperpolarizing the cell membrane, activating the ion channel function, and stabilizing the action potential under hypoxia conditions; in greater concentrations, bemithyl and almide are capable of blocking ion currents, thus reducing the excitability of cells and protecting them from overstress.