НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

ВЛИЯНИЕ АФОБАЗОЛА НА ТРАНСМЕМБРАННЫЕ ИОННЫЕ ТОКИ НЕЙРОНОВ МОЛЛЮСКА

С. Б. Середенин[1], Ю. Д. Игнатов[2], А. И. Вислобоков[2], К. Н. Мельников[2], М. А. Яркова[1]

Изучали влияние анксиолитика афобазола (2-[2-(морфолино)этилтио]-5-этоксибензимидазола дигидрохлорида) в концентрациях 1, 10, 100 и 1000 мкМ на трансмембранный кальциевый, натриевый, калиевый медленный и быстрый ионные токи на изолированных нейронах прудовика *Lymnaea stagnalis*. Установлены дозозависимые обратимые эффекты препарата. В концентрациях 1 – 100 мкМ афобазол увеличивал все токи, а 100 – 1000 мкМ — их подавлял. Афобазол в больших концентрациях вызывал ускорение инактивации калиевого медленного тока и обратимо подавлял быстрый калиевый ток.

Ключевые слова: афобазол, ионный ток, нейрон, *Lymnaea stagnalis*

ВВЕДЕНИЕ

Афобазол – 2-[2-(морфолино)этилтио]-5-этоксибензимидазола дигидрохлорид синтезирован и фармакологически изучен в ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН [2, 6]. Установлены анксиолитические и нейропротекторные свойства препарата [1, 5, 6]. В основе механизма анксиолитического эффекта рассматривается его способность восстанавливать связывание в бензодиазепиновом участке ГАМК$_A$-рецепторного комплекса, нарушенное при эмоционально-стрессовых воздействиях [7]. Поскольку химическая структура афобазола не соответствует известным лигандам ГАМК$_A$-рецептора, можно полагать, что выявленный эффект опосредован мембранотропным влиянием, предотвращающим конформационные сдвиги в рецепторном комплексе, ведущие к снижению ГАМК трансмиссии и анксиогенезу [7]. Гипотезу подтверждает наличие у афобазола антирадикальных свойств, обнаруженных в модельных бесклеточных и клеточных системах [6].

Важнейшая функция биомембран состоит в регуляции ионного транспорта, влияющего как на рецепцию, так и на внутриклеточное проведение сигнала. Поэтому целью настоящей работы явилось изучение эффектов афобазола на трансмембранные ионные токи.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на изолированных нейронах моллюска *Lymnaea stagnalis* [3]. Объект позволяет изучать реакции потенциалзависимых каналов в течение часа. Имеются данные о сходстве мембранных механизмов электрогенеза нейронов моллюска с нейронами млекопитающих [4].

Из тела моллюска вырезали окологлоточное кольцо нервных ганглиев, которое помещали на 40 – 60 мин в раствор, предназначенный для регистрации суммарных токов с добавлением 0,25 % трипсина (таблица).

После этого освобожденные от соединительнотканных оболочек ганглии помещали в такой же раствор без трипсина и через 5 – 10 мин под бинокулярным микроскопом с помощью вольфрамовых игл и полиэтиленовой пипетки подвергали механическому разделению. Полученные таким образом нейроны были жизнеспособны и сохраняли электрические характеристики в течение 24 – 72 ч.

Перфузирующий раствор подавали в камеру, где находился нейрон на полиэтиленовой микропипетке, а диализирующий – внутрь этой пипетки. С раствором в полиэтиленовой микропипетке контактировал агаровый мостик с неполяризующим хлорсеребряным электродом, через который с помощью усилителей поддерживался фиксированный потенциал. Второй такой же электрод, помещенный в камеру, использовали для регистрации ионных токов с помощью усилителя – преобразователя “ток – напряжение”.

Изучали влияние афобазола на трансмембранный кальциевый, натриевый, медленный и быстрый калиевые токи при добавлении препарата в концентрациях 1, 10, 100 и 1000 мкМ. Субстанцию афобазола растворяли до концентрации 1000 мкМ, доводили pH до 7,5 добавлением трис-OH, затем последовательно разбавляли.

Изолированную живую клетку помещали на полиэтиленовую пипетку в большинстве случаев при фиксированном потенциале – 100 мВ. В микропипетке за счет создания толчков отрицательного гидростатического давления мембрана нейрона в области поры разрушалась, создавался электрический контакт внутри-

[1] ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.
[2] Институт фармакологии им. А. В. Вальдмана СПГМУ, Санкт-Петербург.

© 2005 Коллектив авторов

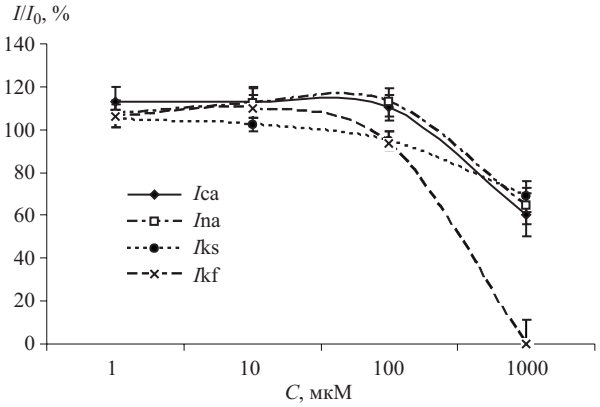

Рис. 1. Влияние афобазола в различных концентрациях на трансмембранные ионные токи нейронов прудовика.

Ica — кальциевые токи, *Ina* — натриевые, *Iks* — калиевые медленные, *Ikf* — калиевые быстрые; I/I_0, % — отношение амплитуд тока при действии афобазола (I) к току в контроле (I_0).

клеточного содержимого с неполяризующимся электродом, соединенным с усилителем фиксации потенциала. При гиперполяризующем сдвиге мембранного потенциала на экране осциллографа были видны емкостные токи мембраны и неспецифический ток утечки, который электронным усилителем вычитали из общего ионного тока. При переключении тестирующего импульса на деполяризацию регистрировали входящий (натрий-кальциевый) и выходящие (быстрый и медленный) калиевые токи.

После регистрации суммарных входящих ионных токов производили замену внутриклеточного (диализирующего) и наружного (перфузирующего) растворов на растворы для регистрации отдельного тока (таблица). Выделение кальциевого или натриевого токов со стабильными параметрами, которые принимали за исходные значения, происходило через 3 – 5 мин после полной замены растворов. Затем раствор в камере, содержащей нейрон, заменяли на раствор с афобазолом в минимальной концентрации. Когда через 2 – 3 мин изменения ионных токов стабилизировались, регистрировали установившиеся величины токов, отражающие действие препарата. Эффекты афобазола исследовали в порядке возрастания концентраций, затем раствор заменяли на исходный без афобазола, производя отмывку, и наблюдали динамику восстановления токов.

Ионый состав (в мМ) растворов для нейронов прудовика

Регистрируемые токи	NaCl	CsCl	$CaCl_2$	$MgCl_2$	KCl	трис-OH	pH
Внеклеточные (перфузирующие) растворы							
Суммарный входящий	100	–	2	1,5	5	2	7,5
Кальциевый входящий	–	100	10	1,5	–	2	7,5
Натриевый входящий	110	–	–	1,5	–	2	7,5
Калиевые выходящие	100	–	2	1,5	5	2	7,5
Внутриклеточные (диализирующие) растворы							
Входящие	–	120	–	–	–	2	7,4
Калиевые выходящие	–	–	–	–	120	2	7,4

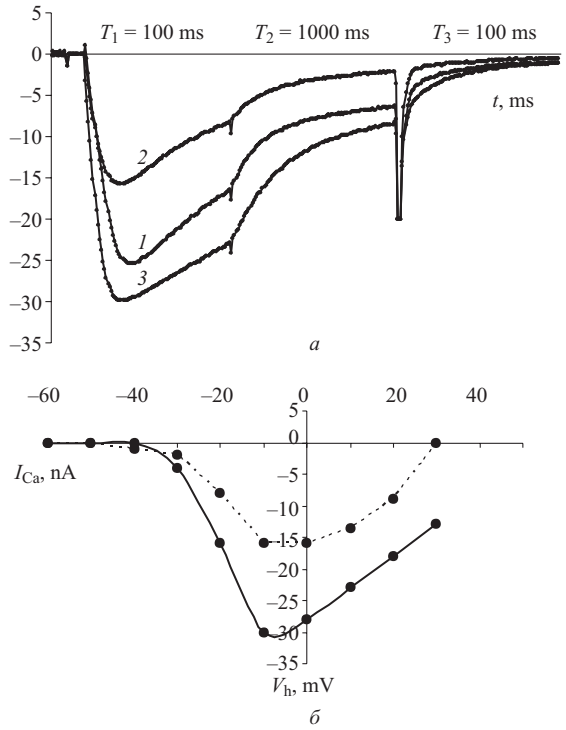

Рис. 2. Изменения кальциевых токов нейронов прудовика под влиянием афобазола в концентрации 1000 мкМ.

а — снижение амплитуды тока, неизменность кинетики под влиянием афобазола в концентрации 1000 мкМ и увеличение амплитуды тока после действия. *1* — контроль, *2* — афобазол, *3* — отмывание.
б — снижение амплитуды ионных токов и неизменность положения максимума вольт-амперной характеристики (верхняя кривая) на оси потенциалов. *Ica* — кальциевый ток, *Vh* — фиксированный потенциал на мембране.

Кривые ионных токов оценивали визуально на экране осциллографа, а также вводили в компьютер. На основании полученных данных были построены вольтамперные характеристики и зависимости концентрация – эффект. Исходные величины токов принимались за 100 %, а установившиеся при действии афобазола выражали в % от контроля. В экспериментах использовано 20 моллюсков и изучено 100 нейронов. Для каждой точки на кривой зависимости концентрация – эффект проведено не менее 5 – 6 измерений. При обработке результатов использовали набор статистических программ редактора Excel, определяли среднюю арифметическую (M) и доверительный интервал (tm) при $p = 95$ %, по которым строили соответствующие графики.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что афобазол в концентрациях от 1 до 1000 мкМ влияет на все исследованные ионные токи.

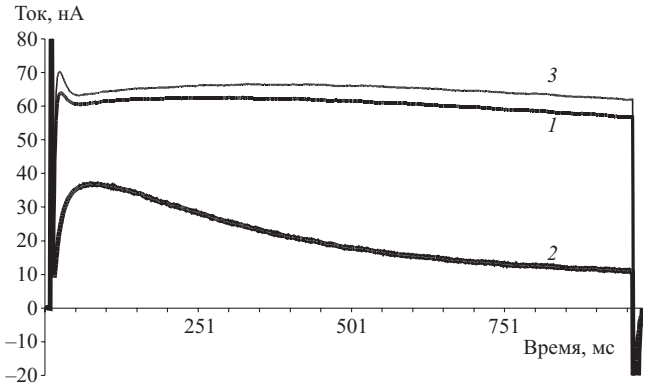

Рис. 3. Ускорение процесса инактивации (*2*) калиевого медленного тока нейрона прудовика под влиянием афобазола (1000 мкМ).

1 — контроль, *2* — влияние афобазола, *3* — отмывание.

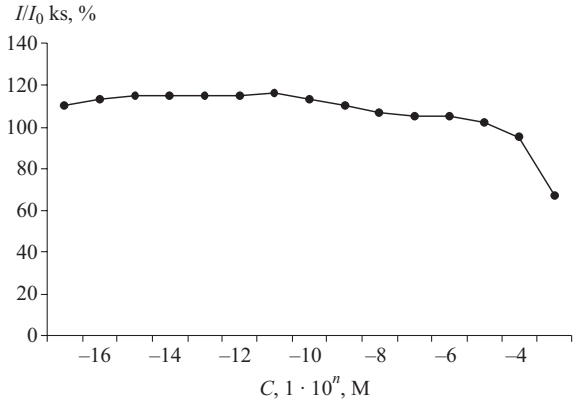

Рис. 4. Зависимость "концентрация-эффект" для калиевых медленных токов нейронов прудовика при действии афобазола в широком диапазоне концентраций.

В концентрациях 1 – 10 мкМ препарат вызвал их увеличение, а при добавлении 100 – 1000 мкМ — снижение (рис. 1).

Контрольные величины кальциевого тока составляли около 25 нА. Под влиянием афобазола в диапазоне концентраций 1 – 100 мкМ ток увеличивался, а в концентрации 1000 мкМ афобазол подавлял ток до 60,4 % от контроля. Через 20 – 40 с после отмывки величина тока составляла 118 %.

Пример влияния афобазола на амплитуду кальциевого тока и отсутствие изменений его кинетики представлен на рис. 2.

Регистрация вольт-амперных характеристик кальциевого тока позволила установить, что афобазол не смещает их максимум по оси потенциалов. Эти данные указывают на отсутствие изменений потенциала фиксированных зарядов мембраны вблизи кальциевых каналов. Визуально отмечено, что неспецифические токи утечки мембраны при действии афобазола в концентрациях 1 – 10 мкМ изменялись незначительно либо снижались, а при концентрациях 100 – 1000 мкМ — снижались, что отражает повышение стабильности мембраны.

Средние величины амплитуды натриевого тока в контрольных опытах составили около 15 нА. На рис. 1 показано, что влияние афобазола сходно с установленным влиянием на кальциевый ток. После отмывки натриевый ток также быстро восстанавливался, превышая исходные значения на 38,8 %.

Кинетика развития натриевого тока под влиянием афобазола не изменялась, как и не смещались по оси потенциалов вольт-амперные характеристики мембраны.

Принципиальных отличий во влиянии афобазола на параметры выходящих калиевого медленного и быстрого токов по сравнению с кальциевым и натриевым не выявлено (рис. 1). Однако при подавлении медленного калиевого тока происходило обратимое ускорение процесса его инактивации (рис. 3, кривая 2), что можно трактовать как усиление блокирования каналов во время довольно длительной (≈ 1 с) тестирующей деполяризации (рис. 3). Афобазол в концентрации 1000 мкМ снижал быстрый калиевый ток почти до 0. Тем не менее отмывка приводила к его быстрому восстановлению.

Таким образом, в действии афобазола в изученных концентрациях выявлена его высокая мембранная активность: в низких концентрациях — активирующее неизбирательное действие на все ионные токи, а при использовании высоких концентраций — подавляющее, но с большей эффективностью — калиевого быстрого тока.

В отдельной серии опытов изучено влияние афобазола на медленный калиевый ток в более широком диапазоне концентраций от 10^{-17} до 10^{-3} М (рис. 4). Эти результаты указывают на целесообразность дальнейшего изучения эффектов афобазола в низких концентрациях.

Другой экспериментальной находкой было наблюдение вариабельности ответов нейронов в зависимости от их исходного состояния, которое иногда можно было охарактеризовать по амплитуде исходных ионных токов и величинам неспецифических токов утечки мембраны. Данное наблюдение особенно интересно и требует углубленного исследования, поскольку основные мембранно-рецепторные эффекты афобазола установлены на препаратах, в которых были зафиксированы изменения, индуцированные стресс-воздействием [2].

Анализируя полученные результаты в целом, можно заключить, что афобазол обладает способностью модулировать трансмембранные ионные токи, не вызывая их необратимых изменений. Несмотря на блокирующие эффекты препарата в больших концентрациях, выявленных при изучении быстрых калиевых токов, пока невозможно сделать заключение о его избирательности действия на те или иные ионные каналы. Вместе с тем неспецифичность активирующего действия афобазола в малых концентрациях, установ-

ленная на ионных каналах неизмененных нейронов, позволяет предполагать возможность регуляторного влияния на ионный транспорт при возникновении его специфических изменений.

ВЫВОДЫ

1. Афобазол обладает мембранотропными свойствами, что проявляется в концентрационно-зависимом влиянии на кальциевые, натриевые и калиевые ионные токи.

2. Афобазол в концентрациях 100 – 1000 мкМ обратимо подавляет быстрые калиевые токи и ускоряет инактивацию медленных калиевых токов.

ЛИТЕРАТУРА

1. М. Г. Баласанян, *Автореф. докт. дис.*, Ереван, 2003.
2. Ю. А. Бледнов, С. Б. Середенин, В. Л. Савельев и др., Патент Российской Федерации № 2061686, *Бюлл. изобретений*, **16**, 1996.
3. М. А. Костенко, *Цитология*, **14**(28), 1274 – 1278(1972).
4. П. Г. Костюк, О. А. Крышталь, *Механизмы электрической возбудимомти нервной клетки*, Наука, Москва (1981).
5. Г. Г. Незнамов, С. А. Сюняков, Д. В. Чумаков и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **64**(2), 15 – 19 (2001).
6. С. Б. Середенин, Т. А. Воронина, Г. Г. Незнамов и др., *Вестн. РАМН*, **11**, 3 – 9 (1998).
7. S. B. Seredenin and Yu. A. Blednov, *A pharmacogenetic approach to the design of new selective*, *anxiolytic drugs*, in: *Biological Basis of individual Sensitivity to psychotripic drugs*, Seredenin S. B., Longo V., Gaviraghi G. (eds.), Graffham Press Ltd. Edinburg (1994), pp. 25 – 38.

Поступила 16.11.04

EFFECT OF AFOBAZOLE ON TRANSMEMBRANE ION CURRENTS IN MOLLUSK NEURONS

S. B. Seredenin[1], Yu. D. Ignatov[2], A. I. Vislobokov[2], K. N. Mel'nikov[2], and M. A. Yarkova[1]

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

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

The effect of anxiolytic afobazole (2-[2-morpholino)ethylthio]-5-ethoxybenzimidazole dihydrochloride) at concentrations of 1, 10, 100 and 1000 μM on transmembrane calcium, sodium, and potassium (slow and rapid) ion currents in isolated neurons of *Lymnaea stagnalis* mollusks have been investigated. Afobazole was found to produce a dose-dependent reversible action: the drug increased all ion currents at concentrations below 100 μM and inhibited all ion currents at concentrations from 100 to1000 μM. Afobazole at high concentrations accelerated the inactivation of slow potassium ion current and reversibly inhibited the fast potassium ion current.