

НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

ИЗМЕНЕНИЯ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ АФОБАЗОЛА

А. И. Вислобоков¹, Ю. Д. Игнатов¹, С. Б. Середенин²

Изучали влияние анксиолитика афобазола (производного 2-меркаптобензимидазола) в концентрациях 1, 10, 100 и 1000 мкМ на мембранный потенциал покоя (ПП), действия (ПД) и импульсную активность (ИА) нейронов изолированной ЦНС прудовика (*Lymnaea stagnalis*) и катушки (*Planorbarius corneus*). Использовали метод внутриклеточной регистрации. Установлено, что афобазол оказывает двухфазное зависимое от концентрации и обратимое действие. В первую фазу (1–100 мкМ) наблюдалась гиперполяризация на 5–8 мВ и во вторую (1000 мкМ) — деполяризация на 8–10 мВ. Соответствующие изменения параметров ПД и ИА были обусловлены уровнем ПП в силу их потенциалозависимости и вследствие ранее показанного прямого активирующе-подавляющего действия афобазола на ионные токи этих нейронов.

Ключевые слова: афобазол, мембранный потенциал, гиперполяризация, нейрон, *Lymnaea stagnalis*, *Planorbarius corneus*

ВВЕДЕНИЕ

Отечественный анксиолитик афобазол (5-этоксид-2-[морфолино]-этилтио]-бензимидазола дигидрохлорид), синтезированный и фармакологически изученный в НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, обладает сложным механизмом анксиолитического действия, обусловленным его способностью восстанавливать связывание в бензодиазепиновом участке ГАМК_A-рецептора, нарушенное вследствие стрессовых воздействий [6]. Однако поскольку сам афобазол не связывается с ГАМК_A-рецепторным комплексом [10], его способность восстанавливать функциональную активность ГАМК_A-рецептора, по всей видимости, опосредована высоким сродством препарата к σ_1 - и/или мелатониновым МТ1 и МТ3-рецепторам и/или способностью препарата подавлять активность MAO-A [5]. Помимо собственно анксиолитического действия, афобазол проявляет нейропротекторную и кардиопротекторную активность [3, 4, 9].

Цель данного исследования — изучение влияния афобазола в различных концентрациях на потенциал покоя (ПП) и потенциалы действия (ПД) нейронов ЦНС моллюска прудовика и катушки, находящихся в различном функциональном состоянии, поскольку нами ранее на нейронах моллюска было показано, что препарат вызывает зависимое от концентрации изменение трансмембранных ионных токов [7].

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

² Научно-исследовательский институт фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования были наиболее крупные (100–200 мкМ) нейроны висцерального и париетальных ганглиев изолированного окологлоточного кольца моллюсков — прудовика (*Lymnaea stagnalis*) и катушки (*Planorbarius corneus*). Эти ганглии являются удобной экспериментальной моделью для изучения влияния биологически активных веществ на ПП и ПД, а ионные механизмы генерации потенциалов в них сходны с таковыми, известными для теплокровных животных [1]. Длительное функционирование клеток в опытах (более одного часа) с введенным стеклянным внутриклеточным микроэлектродом (МЭ) позволяет подробно изучать реакции нейронов на различные воздействия [1].

Из тела моллюска вырезали окологлоточное кольцо, содержащее нервные ганглии, которое затем помещали в камеру объемом около 1 см³ с физиологическим раствором (в мМ/л): NaCl — 50; KCl — 2; CaCl₂ — 2; MgCl₂ — 1,5; трис-ОН — 10; pH — 7,5. Для регистрации электрофизиологических характеристик изучаемых нейронов использовали стеклянный МЭ, заполненный 2,5 М KCl, с сопротивлением 10–20 МОм [1].

Изучали динамику изменений ПП и ПД под влиянием афобазола при внеклеточном его приложении в концентрациях 1, 10, 100 и 1000 мкМ. Афобазол (субстанцию) растворяли до концентрации 1000 мкМ, pH раствора доводили до 7,5 путем добавления небольшого количества трис-ОН, затем концентрацию раствора снижали, последовательно разбавляя его в 10 раз.

После введения МЭ в визуальном выбранном с помощью бинокулярной лупы нейрон регистрировали внутриклеточные биопотенциалы в контроле и их из-

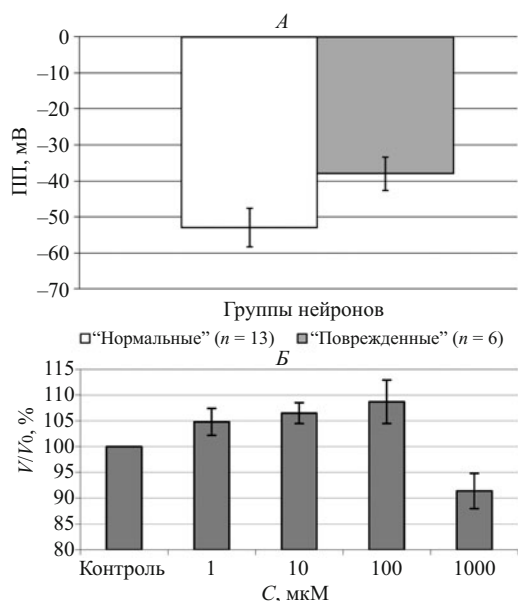


Рис. 1. Изменения потенциала покоя (ПП) нейронов прудовика и катушки под влиянием афобазола в различных концентрациях.

A — группы нейронов в контроле с различным исходным уровнем ПП. *B* — зависимость “концентрация — эффект” ($n = 8$).

По оси абсцисс — нейроны (*A*), концентрация (*B*), по оси ординат — уровень ПП (*A*), *B* — отношение величины ПП при действии афобазола (V) к контролю (V_0), в %; вертикальные отрезки — $M \pm \text{ДИ}$, $p < 0,05$ в сравнении с контролем.

менения при действии афобазола. Регистрацию электрофизиологических показателей начинали после стабилизации ионных токов (через 2–3 мин), вызванных добавлением в раствор афобазола в концентрации 1 мкМ. После этого наружный раствор заменяли на растворы с возрастающей концентрацией — 10, 100 и 1000 мкМ, а затем — на исходный раствор без афобазола (отмывание) и наблюдали динамику восстановления потенциалов.

Регистрируемые биопотенциалы фиксировали с помощью аналого-цифрового преобразователя L-791 (“L-Card”, Россия).

Полученные результаты обрабатывали с использованием статистической программы SPSS-17, при этом для проверки гипотезы о различиях между группами проводили непараметрический дисперсионный анализ Фридмана, а для доказательства различий между контролем и эффектами фармакологических средств в различных концентрациях — апостериорное попарное сравнение с использованием критериев Вилкоксона. При обработке результатов учитывали изменения электрофизиологических характеристик только тех нейронов, на которых они были получены при действии всех изучаемых концентраций афобазола ($n = 8$). На рисунках представлены значения средних арифметических и 95 % доверительные интервалы. Для построения графиков использовали пакет программ “Excel”.

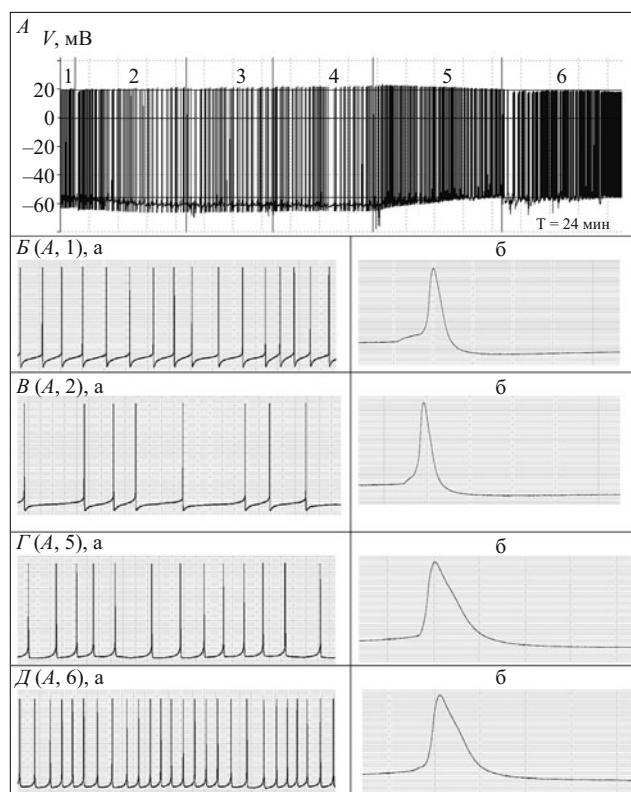


Рис. 2. Изменения электрической активности нейронов катушки с “хорошим” исходным уровнем функционального состояния под влиянием афобазола в различных концентрациях.

A: 1 — контроль, 2 — афобазол 1 мкМ, 3 — 10, 4 — 100, 5 — 1000, 6 — отмывание. Ниже — развернутые по времени фрагменты: а — ИА, б — форма ПД. *B* (*A*, 1) — контроль. *B* (*A*, 2) — афобазол 1 мкМ. *Г* (*A*, 5) — 1000 мкМ. *Д* (*A*, 6) — отмывание.

На всех фрагментах: по оси абсцисс — время (*A* — общее время записи 24 мин, *B*–*Д*, а — 1 деление по горизонтали = 500 мс, *B*–*Д*, б — 40 мс); по оси ординат — потенциал (для *B*–*Д* — 1 деление по вертикали = 8 мВ).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исходные величины ПП для разных нейронов прудовика и катушки варьировали в пределах от –30 до –60 мВ (рис. 1, *A*), в силу чего они были разделены на две группы. Нейроны первой группы — с ПП от –45 до –60 мВ ($-53 \pm 5,4$ мВ, $n = 13$) рассматривали как “нормальные” — в “хорошем” функциональном состоянии, поскольку они генерировали ПД с “овершутом” амплитудой от 50 до 90 мВ. Нейроны второй группы — с исходным ПП от –30 до –44 мВ ($-38 \pm 4,6$ мВ, $n = 6$) рассматривали как “поврежденные” — в “плохом” функциональном состоянии, поскольку они не могли генерировать ПД с овершутом, а генерировали низкоамплитудные градуальные ПД с амплитудой 20–35 мВ. Нейроны обеих групп в исходном состоянии могли быть и молчащими, и с различным характером импульсной активности (ИА): с регулярной или нерегулярной, с одиночной или пачечной.

При действии афобазола на “нормальные” нейроны ($n = 13$) наблюдали зависимые от концентрации изме-

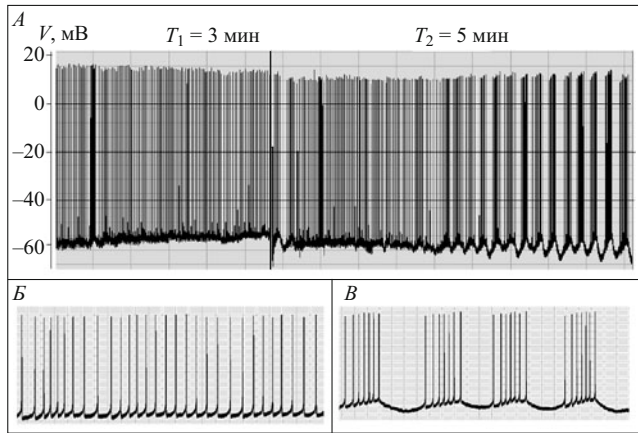


Рис. 3. Изменения характера электрической активности нейронов катушки с “хорошим” исходным уровнем функционального состояния под влиянием афобазола в концентрации 1000 мкМ и в последствии.

A: в начале ($T_1 = 3$ мин) — действие афобазола 1000 мкМ, далее ($T_2 = 5$ мин) — отмывание. *Б* — регулярная ИА при действии афобазола. *В* — пачечная — в последствии.

По оси абсцисс — время (*A* — общее время записи 8 мин, *Б* и *В* — 1 деление по горизонтали = 1 с); по оси ординат — потенциал (для *Б* и *В* — 1 деление по вертикали = 6 мВ).

нения ПП. Под влиянием афобазола в концентрациях 1 – 100 мкМ уровень ПП нейронов возрастал по абсолютной величине на 1 – 6 мВ, развивалась гиперполяризация, а при действии в концентрации 1000 мкМ — ПП снижался на 1 – 7 мВ, т.е. возникла деполяризация (рис. 1, *Б*). Эффекты стабилизировались через 2 – 3 мин от начала действия афобазола, были обратимыми и с гиперполяризующим последствием в течение 5 – 20 мин. Гиперполяризация проявлялась особенно выражено (до 10 мВ) при отмывании от афобазола в концентрации 1000 мкМ.

В качестве примера на рис. 2 демонстрируется характер изменений электрической активности “нормальных” нейронов под влиянием афобазола в различных концентрациях (*A*, 2 – 5) по сравнению с контролем (*A*, 1). В диапазоне концентраций 1 – 100 мкМ (*A*, 2, 3 и 4) наблюдалась гиперполяризация, на этом фоне происходило увеличение амплитуды ПД, снижение частоты ИА (*B* (*A*, 2), а) и уменьшение длительности ПД (*B* (*A*, 2), б). При действии афобазола в концентрации 1000 мкМ (рис. 2, *A*, 5) начиналась деполяризация нейрона, происходило снижение амплитуды ПД и следовой гиперполяризации, возрастала частота ИА (*Г* (*A*, 5), а) и увеличивалась длительность ПД (*Г* (*A*, 5), б). В начале отмывания нейронов от афобазола (рис. 2, *A*, 6) возникла небольшая гиперполяризация, амплитуда ПД еще не менялась, длительность ПД несколько сокращалась, происходило урежение ИА, а затем ИА из регулярной перестраивалась в пачечную с выраженным снижением амплитуды следовой гиперполяризации ПД. Затем ИА переходила вновь в регулярную (рис. 2, *Д* (*A*, 6), а) со сниженной длительностью ПД и амплитудой их следовой гиперполяризации (рис. 2, *Д*

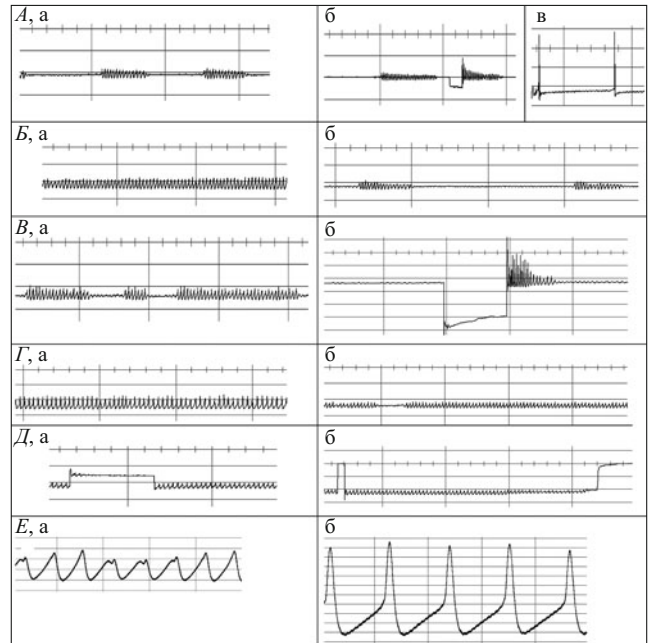


Рис. 4. Изменения электрической активности нейронов прудовика с “плохим” исходным уровнем функционального состояния под влиянием афобазола в различных концентрациях.

A: а — контроль, б — гиперполяризация током 2 нА, в — ПД нейрона в “хорошем” состоянии. *Б*, а — афобазол 1 мкМ, б — отмывание. *В*, а — отмывание после афобазола 100 мкМ, б — в начале афобазол 1000 мкМ (подавление активности) и восстановление активности после гиперполяризующего тока 4 нА. *Г* — отмывание афобазола 1000 мкМ. *Д*, а — влияние деполяризующего тока 2 нА и б — контроль нулевой линии (слева) и выведение МЭ (справа).

Е, а — крупно *A*, а (ИА в контроле) и б — крупно *Б*, а (ИА при активации афобазолом).

На всех фрагментах: по оси абсцисс — время (1 крупное деление по горизонтали для *A* – *Д* = 1 с, для *Е* = 100 мс); по оси ординат — потенциал (для *A* – *Д* — 1 деление по вертикали = 20 мВ, для *Е* = 4 мВ).

(*A*, 6), б). Более длительное отмывание приводит к восстановлению исходной ИА. Повторное действие афобазола на данном нейроне приводило к сходным реакциям.

Перестройка ИА после действия афобазола в концентрации 1000 мкМ из регулярной в пачечную особенно убедительно была зарегистрирована на нейроне катушки (рис. 3, *A* – *В*). Видно, что в течение трех минут действия афобазола развивалась деполяризация нейрона со снижением амплитуды ПД, а затем при отмывании через 2 – 3 мин, по мере развития гиперполяризации, возникали пачки ПД (рис. 3, *В*).

Изменения ПП “поврежденных” нейронов ($n = 6$) при действии афобазола были близки к таковым, зарегистрированным у “нормальных” нейронов (рис. 1), и также состояли в зависимой от концентрации их гипер- и деполяризации.

На рис. 4 приведены электрофизиологические реакции на афобазол “поврежденных” нейронов. В контроле при исходном ПП около –40 мВ регистрировали локальные пачки ПД с амплитудой около 10 мВ (*A*, а), однако после гиперполяризации через МЭ током 2 нА возникали потенциалы с увеличенной амплитудой (*A*,

б), что свидетельствует о снятии инактивации с части ионных каналов. Для сравнения с локальными ПД “поврежденных” нейронов в контроле на рис. 4 (А, в) показан ПД “нормального” нейрона с ПП около -50 мВ, амплитудой ПД немного более 60 мВ, ПД с “овершутом”. На “поврежденном” нейроне (контроль рис. 4, А, а) под влиянием афобазола в концентрации 1 мкМ (рис. 4, Б, а) развивалась гиперполяризация на $3-4$ мВ и амплитуда локальных ПД возрастала до 20 мВ, а пачечная ИА превращалась в непрерывную. После отмывания афобазола (Б, б) ИА возвращалась к исходной. Подобный эффект возникал от афобазола в концентрациях 10 и 100 мкМ. После отмывания афобазола в концентрации 100 мкМ (рис. 4, В, а) препарат в концентрации 1000 мкМ деполяризовал нейрон на $2-4$ мВ, а его ИА подавлялась (В, б). Однако после сильной гиперполяризации этого нейрона током 4 нА через МЭ опять возникали ПД, при этом первые из них были с высокой амплитудой и с “овершутом”. После длительного отмывания афобазола в течение $15-20$ мин наблюдались регулярные локальные ПД с амплитудой около 20 мВ (Г, а) и ПП около -50 мВ. Более длительное отмывание приводило к восстановлению локальных пачек ПД (Г, б), они регистрировались как и в контроле (А, а). Деполяризация этого нейрона через МЭ приводила к прекращению ИА, которая после нее восстанавливалась (Д, а).

Следует также отметить, что афобазол вызывал перестройку характера ИА. В качестве примера приведены изменения исходной регулярной одиночной импульсной активности нейрона под влиянием афобазола на пачечную (рис. 3) и пачечной — на регулярную одиночную активность (рис. 4).

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что афобазол обладает высокой мембранотропной активностью, проявляющейся в зависимой от концентрации гипер- и деполяризации нейронов, находящихся в различном функциональном состоянии, с соответствующими изменениями характеристик их ПД и ИА.

Представленные результаты об изменениях ПП (зависимые от концентрации гипер- и деполяризация) и соответствующие изменения параметров ПД нейронов моллюсков под влиянием афобазола демонстрируются впервые. Они коррелируют с ранее полученными нами данными об изменениях трансмембранных ионных токов этих нейронов при действии афобазола в тех же концентрациях [7], где показана как активация токов при концентрациях афобазола $1-100$ мкМ, так и их подавление при концентрации 1000 мкМ. Данные об увеличении амплитуд ионных токов и о снижении величин неспецифических токов утечки мембраны [7] при действии афобазола в низких концентрациях ($1-10$ мкМ) прямо коррелируют с наблюдаемой в этих экспериментах гиперполяризацией нейронов под влиянием афобазола в концентрациях $1-100$ мкМ, поскольку, вероятно, происходящее увеличение сопротивления мембраны приводит к увеличению вклада

компоненты электрогенного ионного насоса в величину ПП. Увеличение токов утечки мембраны при действии афобазола в концентрации 1000 мкМ [7] также прямо коррелирует с возникающей деполяризацией нейронов при действии афобазола в концентрации 1000 мкМ, вероятно, сопровождающейся снижением сопротивления мембраны и уменьшением электрогенной компоненты ПП. Не исключается модуляция афобазолом проводимости калиевых ионных каналов, определяющих ПП и неспецифические токи утечки.

Подобная деполяризация нейронов, как инактивационный механизм снижения ионных токов и показанное нами ранее прямое их подавление под влиянием афобазола в более высоких концентрациях [7], сходны с действием других токоподавляющих средств: местных анестетиков, противоаритмических и т.п. [1, 2], снижающих количество функционирующих каналов вследствие связывания молекул лекарственных средств со структурными образованиями ионных каналов [11–13].

Известно, что снижение амплитуд ионных токов клеток может быть обусловлено уменьшением частоты открывания ионных каналов и/или уменьшением времени, в течение которого одиночные ионные каналы находятся в открытом состоянии. Не исключено, что афобазол оказывает подобное действие, поскольку ранее было показано изменение кинетики трансмембранных ионных токов под его влиянием [8]. Изменение параметров ПД: амплитуды, длительности, следовой гиперполяризации и частоты ИА под влиянием высоких концентраций афобазола (1000 мкМ) может быть связано и с его способностью деполяризовать нейроны.

При регистрации электрической активности нейронов с различным исходным уровнем ПП нами показано сходное для них гипер- и деполяризующее действие афобазола, которое можно назвать активирующе-подавляющим. Этот эффект афобазола напоминает известное действие поляризующего тока, подаваемого на нейрон через МЭ, и приводящее к изменениям уровня ПП.

Перестройка характера импульсной активности нейронов под влиянием афобазола — от одиночной к пачечной и наоборот, вероятно, обусловлена изменением ПП и возможным действием афобазола на пейсмерные механизмы.

Мы полагаем, что мембранотропные эффекты афобазола, наблюдаемые при его применении в низких концентрациях ($1-100$ мкМ) — гиперполяризующее действие, способствующее снижению возбудимости нейронов и расширению их функциональных возможностей, а также показанная нами ранее активация трансмембранных ионных токов натрия, калия и кальция, протекающих через соответствующие трансмембранные потенциалзависимые ионные каналы, — могут вносить определенный вклад в анксиолитическое действие препарата.

Вместе с тем следует подчеркнуть, что молекулярные механизмы, лежащие в основе перечисленных электрофизиологических эффектов афобазола, не ясны и требуют дальнейшего изучения.

ВЫВОДЫ

1. Афобазол оказывает выраженное действие на электрическую активность нейронов, которое проявляется в изменениях мембранного потенциала покоя, потенциала действия и импульсной активности нейронов.

2. Изменения мембранных потенциалов под влиянием афобазола носят зависимый от концентрации характер — увеличение (активация — гиперполяризация) при действии в концентрациях 1 – 100 мкМ и обратимое снижение (подавление — деполяризация) — при действии в концентрации 1000 мкМ. Они сочетаются, соответственно, с активацией и подавлением параметров потенциала действия.

3. Под влиянием афобазола в концентрации 1000 мкМ наблюдается перестройка импульсной активности нейронов как от одиночной импульсной — к пачечной, так и от пачечной — к одиночной импульсной активности.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. И. Вислобоков, Ю. Д. Игнатов, П. А. Галенко-Ярошевский, П. Д. Шабанов, *Мембранотропное действие фарма-*

кологических средств, Санкт-Петербург — Краснодар (2010).

2. П. Г. Костюк, А. И. Вислобоков, П. А. Дорошенко, Е. А. Лукьянец, В. В. Манцев, *Биол. мембраны*, **5**(12), 1297 – 1303 (1988).
3. В. А. Крайнева, С. Б. Середенин, *Бюл. exper. биол.*, **149**(2), 165 – 168 (2010).
4. С. А. Крыжановский, В. Н. Столярук, М. Б. Вититнова, И. Б. Цорин, С. Б. Середенин, *Бюл. exper. биол.*, **149**(3), 290 – 293 (2010).
5. С. Б. Середенин, М. В. Воронин, *Экспер. и клин. фармакол.*, **72**(1), 3 – 11 (2009).
6. С. Б. Середенин, Т. А. Воронина, Г. Г. Незнамов и др., *Вестн. РАМН*, **11**, 3 – 9 (1998).
7. С. Б. Середенин, Ю. Д. Игнатов, А. И. Вислобоков и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **68**(5), 3 – 6 (2005).
8. А. И. Турилова, Т. Я. Можаяева, *Экспер. и клин. фармакол.*, **73**(5), 8 – 11 (2010).
9. И. Б. Цорин, И. П. Палка, Г. Г. Чичканов, *Экспер. и клин. фармакол.*, **72**(1), 41 – 45 (2009).
10. М. А. Яркова, *Автореф. дис. канд. мед. наук*, Москва (1996).
11. T. Narahashi, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **294**(1), 1 – 26 (2000).
12. J. Nargeot, M. E. Mangoni, *Arch. Mal. Coeur. Vaiss.*, **99**(9), 856 – 861 (2006).
13. J. Nilsson, M. Madeja, P. Arhem, *Mol. Pharmacol.*, **63**, 1417 – 1429 (2003).

Поступила 01.11.11

AFOBAZOLE EFFECT ON THE ELECTRICAL ACTIVITY OF NEURONS

A. I. Vislobokov¹, Yu. D. Ignatov¹, and S. B. Seredenin²

¹ Valdman Institute of Pharmacology, Pavlov Medical University, St. Petersburg, 197022, Russia

² Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Baltiiskaya ul. 8, Moscow, 125315, Russia

Changes in the membrane rest potential (RP), action potential (AP) and impulse activity (IA) in neurons of isolated central nervous system of *Lymnaea stagnalis* and *Planorbarius corneus* under the action of anxiolytic afobazole (2-mercaptobenzimidazole derivative) in 1, 10, 100 and 1000 μM concentrations have been studied using a microelectrode technique. It is established that afobazole produces a two-phase, dose-dependent and reversible effect on the electrical activity of neurons. Hyperpolarization by 5 – 8 mV in the first phase (1 – 100 μM) and depolarization by 8 – 10 mV in the second phase (1000 μM) have been observed. The corresponding changes in AP and IA parameters were due to the RP level changes related to their potential dependence and resulted from the direct activation – suppression action of afobazole on the neuron ionic currents.

Key words: Afobazole, membrane potential, hyperpolarization, neuron, *Lymnaea stagnalis*, *Planorbarius corneus*