

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Д.С.Блинов, Е.Д.Гогина, С.Я.Скачилова, В.П.Балашов,
Е.В.Блинова, Л.В.Ванькова, Л.В.Пивкина, Л.А.Белова

МЕМБРАННЫЕ МЕХАНИЗМЫ АНТИАРИТМИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ОТЕЧЕСТВЕННОГО ЦИТОПРОТЕКТОРА ЭТОКСИДОЛА

Мордовский государственный университет им. Н.П.Огарева, Саранск, Россия

С целью изучения возможных механизмов реализации антиаритмического действия этоксидаола выполнены опыты на беспородных кошках и на потенциалзависимых калиевых каналах задержанного выпрямления в изолированных нейронах из окологлоточного кольца ганглиев большого прудовика.

Ключевые слова: этоксидол, нарушения ритма сердца, эффективный рефрактерный период, адреналин, норадреналин, перекисное окисление липидов.

To study potential mechanisms of realization of antiarrhythmic effect of Ethoxidol, experiments on outbred cats and on potential-dependent delayed rectifier potassium channels in isolated neurons from peripharyngeal circle of ganglia of pond snail were carried out.

Key words: Ethoxidol, cardiac arrhythmias, effective refractory period, epinephrine, norepinephrine, lipid peroxidation.

В настоящее время, наряду с классическими антиаритмиками - блокаторами ионных каналов и рецепторов клеточных мембран кардиомиоцитов, в консервативной терапии нарушений ритма сердечной деятельности применяются так называемые средства метаболического типа действия [6]. Их назначение обосновывается, с одной стороны, возможностью снижения нежелательных эффектов традиционных антиаритмических лекарственных средств, а с другой, наличием синергизма в реализации фармакотерапевтического эффекта, зачастую, и собственным антиаритмическим действием [6].

Одним из представителей рассматриваемой группы метаболических препаратов является производное 3-гидроксипиридина, зарегистрированное в Российской Федерации под названием этоксидол. В результате многочисленных экспериментальных исследований этоксидаола было установлено, что помимо цитопротекторного, антиишемического и антигипоксического эффектов, препарату присуще антиаритмическое действие в условиях катехоламинового и ишемического - реперфузионного аритмогенеза [2]. В этой связи цель настоящего исследования заключается в изучении возможных механизмов реализации антиаритмического действия этоксидаола.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали субстанцию 3-гидрокси-6-метил-2-этилпиридина гемисукцината (этоксидаола) любезно предоставленную нам производителем ОАО «ВНЦ БАВ» (Россия). Влияние этоксидаола на возбудимость, рефрактерность предсердий и желудочков, автоматизм водителя сердечного ритма, проводимость волны возбуждения по предсердиям, атриовентрикулярному узлу и желудочкам изучали в опытах на половозрелых наркотизированных тиопентал-натрием (50 мг/кг внутривенно) и переведенных на управляемое дыхание кошках (n=7) по методу А.А.Котлярова

[5]. Стимуляцию сердца проводили с помощью кардиостимулятора Кордэлектро (Латвия) посредством платиновых электродов, наложенных на предсердия и желудочки. Регистрацию электрограммы проводили при помощи самописца ЭЛКАР-2А (Россия). Контрольная серия состояла из 10 животных.

Влияние этоксидаола на калиевую проводимость исследовали на потенциалзависимых калиевых каналах задержанного выпрямления в изолированных нейронах из окологлоточного кольца ганглиев большого прудовика, используя метод точечной фиксации потенциала [1, 8].

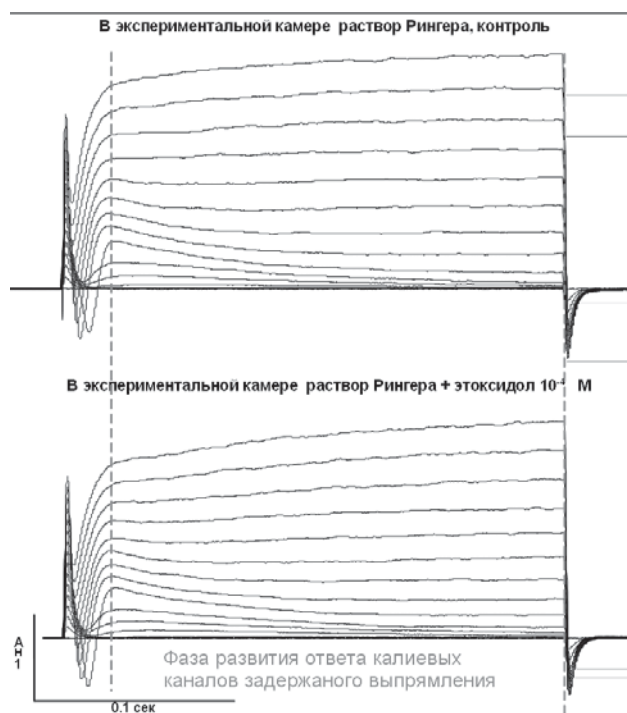


Рис. 1. Запись токов (прямоугольные импульсы длительностью 0,25 сек, напряжением от -70 до 80 мВ с шагом 10 мВ) через калиевые каналы нейрона прудовика в конфигурации «whole-cell».

Влияние этоксида (n=7) на содержание катехоламинов в миокарде беспородных кошек обоего пола с инфарктом миокарда оценивали флуориметрически по методу по У.Эшлера и Ф.Лимаико в модификации Э.Ш.Матлиной и В.В.Меньшикова (1967) [7] с использованием флуориметра ФМ-3МА (Россия).

Определение влияния субстанции этоксида (n=7) на интенсивность перекисного окисления липидов и антиоксидантную систему миокарда кошек с эк-

полученных изменений оценивали параметрическим (t-критерий Стьюдента) и непараметрическим (критерий χ -квадрат) методами для зависимых и независимых выборок [4].

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Электрофизиологические исследования на кошках (табл. 1) показали, что этоксидол не влияет на авто-

Динамика электрофизиологических параметров сердца кошек на фоне введения этоксида

	Серия	В % к исходу через ... после введения		
		10-20 мин.	20-30 мин.	40-50 мин.
PP	Контроль	111±6	121±4	128±5
	Этоксидол	107±4	114±7	116±7
ВВФСУ	Контроль	117±3	123±4	124±7
	Этоксидол	112±7	114±6	122±11
P	Контроль	100	100	100
	Этоксидол	100	103±3	106±7
PQ	Контроль	102±2	100	100
	Этоксидол	104±5	111±9	111±9
QRS	Контроль	103±3	103±3	103±3
	Этоксидол	103±11	108±8	108±8
ЭПП предсердий	Контроль	102±3	107±3	112±5
	Этоксидол	110±6	118±5	119±5
ЭПП АВ узла	Контроль	108±7	114±6	125±12
	Этоксидол	112±3	120±4	130±8
ЭПП желудочков	Контроль	103±4	108±4	120±5
	Этоксидол	120±5*	134±5*	145±7*
ПВ предсердий	Контроль	112±12	112±12	112±12
	Этоксидол	134±5	141±6*	142±8*
ПВ желудочков	Контроль	116±1	123±7	130±5
	Этоксидол	121±5	131±7	139±8

где, * - различия с контролем достоверны при $p < 0,05$; ЭПП - эффективный рефрактерный период, ВВФСУ - время восстановления функций синусового узла, АВ - атриовентрикулярный, ПВ - порог возбуждения.

спериментальным инфарктом миокарда проводили методом индуцированной хемиллюминесценции по Ю.А.Владимирову и соавт. [3] с использованием прибора «Emilite»-EL 1105 (США).

Этоксидол вводили животным внутривенно в дозе, пропорциональной 5% от показателя LD_{50} , определенного при внутрибрюшинном введении у мышей с учетом правил межвидового переноса доз по E.J.Freieich и соавт. [9]. В опытах на кошках доза составила 6,7 мг/кг.

Результаты исследования подвергались статистической обработке с использованием стандартных статистических пакетов программ Excel, Statistics 5,5 для Windows XP. Достоверность

материю номотоппного водителя ритма (продолжительность интервала PP и время восстановления функции синусового узла) и не угнетает проводимость по предсердиям, желудочкам и атриовентрикулярному соединению (длительность интервалов P, PQ, QRS). Соединение не вызывает изменения возбудимости предсердий и желудочков. Кроме того, вещество не влияет на продолжительность эффективного рефрактерного периода (ЭПП) предсердий и атриовентрикулярного узла, но увеличивает ЭПП желудочков - на 20% через 10 мин ($p < 0,05$) и на 34% через 30 мин ($p < 0,05$) после введения.

Эксперименты, проведенные методом точечной фиксации потенциала на потенциалзависимых калиевых каналах задержанного выпрямления, показали, что этоксидол не оказывает влияния на характеристики вышеуказанных каналов при его применении, как с внутренней, так и с наружной стороны клеточной мембраны в концентрациях вплоть до 10^{-4} М. В частности, на рис. 1 представлены записи токов через клеточную мембрану нейрона прудовика (эксперимент на целой клетке, конфигурация «whole-cell») при приложении к мембране ступеньки напряжения

Таблица 2.

Содержание катехоламинов в миокарде сердца кошек при экспериментальном инфаркте и действии этоксида

Объект исследования	Гормоны	Условия эксперимента	
		Контроль, нмоль/г	Этоксидол 6,7 мг/кг, нмоль/г
Желудочек, удаленная зона	адреналин	2,81±0,31	3,54±0,09*
	норадреналин	2,24±0,27	1,31±0,11*
Желудочек, зона ишемии	адреналин	7,36±0,31	2,88±0,28*
	норадреналин	1,17±0,14	3,39±0,13*
Предсердие	адреналин	0,56±0,17	0,69±0,17
	норадреналин	0,79±0,36	0,77±0,19

где, * - отличия от соответствующего показателя в контрольной серии достоверны при $p < 0,05$ (критерий t Стьюдента)

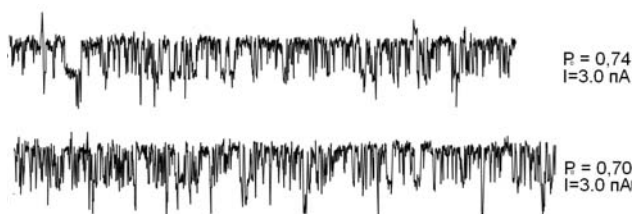


Рис. 2. Запись токов через фрагмент мембраны, содержащей 3 одиночных калиевых канала, где сверху - контроль, внизу - этоксидол 10^{-5} М.

от -70 мВ до 80 мВ с шагом 10 мВ длительностью 0,25 с (потенциал покоя клетки -70 мВ). Видно, что добавление 10^{-4} М субстанции этоксида не приводит к блокаде калиевых токов, протекающих через потенциалзависимые калиевые каналы задержанного выпрямления. Отмечается лишь небольшое уменьшение токов (порядка 15% для потенциала 80 мВ), что, скорее всего, вызвано временным ухудшением состояния клетки или изменением внутриклеточного ионного состава за счет диффузии раствора из пипетки. Данный процесс наблюдался в ходе всего эксперимента и являлся временной тенденцией.

На рис. 2 представлены записи калиевых токов через фрагмент клеточной мембраны, содержащей 3 одиночных потенциалзависимых калиевых канала, а также амплитуды токов одиночных каналов (I) и вероятности нахождения данных каналов в открытом состоянии (P_o , справа от соответствующих записей). Соединение в данном случае действует с внутренней стороны мембраны. Трансмембранный потенциал во всех случаях был равен 0 мВ. Видно, что применение этоксида в концентрации 10^{-4} М не оказывает заметного действия на активность каналов.

Поскольку в патогенезе нарушений ритма сердца при ишемическом повреждении миокарда ведущую роль играют гиперкатехоламинемия и чрезмерная активация свободнорадикальных процессов, мы изучили влияние этоксида на концентрацию адреналина и но-

радреналина и состояние системы липопероксидации в сердце кошек с острым инфарктом миокарда.

Исследование показало, что у животных с экспериментальной миокардиальной ишемией, в зоне повреждения левого желудочка концентрация адреналина достоверно возрастает с $2,81 \pm 0,31$ нмоль/г до $7,36 \pm 0,31$ нмоль/г (табл. 2). В то время как содержание норадреналина в зоне повреждения, напротив, имело тенденцию к снижению - с $2,24 \pm 0,27$ нмоль/г до $1,17 \pm 0,14$ нмоль/г. Как свидетельствуют полученные данные, внутривенное введение этоксида сопровождается статистически достоверным увеличением концентрации адреналина в зоне миокарда, удаленной от ишемии и, одновременно, снижением концентрации гормона в поврежденной зоне.

При анализе антиоксидантных свойств этоксида в условиях регионарной ишемии сердца у кошек обращает на себя внимание его способность сдерживать свободнорадикальные процессы в зоне повреждения. В участках миокарда, с ограничением кровоснабжения, интенсивность перекисного окисления липидов под влиянием субстанции препарата снизилась более чем в два раза. Антиокислительная активность в зоне повреждения на фоне этоксида активируется в 3,7 раз.

В интактной зоне миокарда животных, получавших этоксидол, показатель свободнорадикального окисления липидов существенно не отличался от контрольного значения и составил $8,90 \pm 1,02$ имп/с. Вероятно, в неповрежденной зоне нет необходимости в активации альтернативных путей окисления, так как сохраняется традиционный путь энергопродукции. В связи с этим, сохранение процессов липопероксидации на контрольном уровне может еще раз свидетельствовать об адаптивном, контролируемом характере перекисного окисления липидов.

Таким образом, учитывая полученные результаты, можно заключить, что в основе реализации антиаритмического эффекта этоксида лежит его способность увеличивать рефрактерность желудочков сердца. Подобное действие, по-видимому, происходит за счет влияния на трансмембранные ионные градиенты в результате подавления свободнорадикальных процессов дегградации мембран кардиомиоцитов и ограничения гуморальных адренергических воздействий на миокард. В то же время, возможно предположить, что рост концентрации норадреналина на фоне введения этоксида связан с повышением выживаемости симпатических терминалей в миокарде при ограничении зоны его повреждения.

Таблица 3.

Влияние этоксида (6,7 мг/кг) на свободнорадикальные процессы и антиоксидантную систему в различных отделах сердца кошек при экспериментальном инфаркте миокарда

Объект исследования	ПОЛ, имп/с		АОА, имп/с	
	контроль	этоксидол	контроль	этоксидол
предсердие	$4,98 \pm 1,36$	$4,39 \pm 1,79$	$4,78 \pm 1,99$	$22,37 \pm 9,58^*$
желудочек, удаленная зона	$10,5 \pm 1,69$	$8,90 \pm 1,02$	$3,2 \pm 0,34$	$19,27 \pm 3,54^*$
желудочек, зона ишемии	$42,9 \pm 4,88$	$16,2 \pm 1,26^*$	$13,6 \pm 2,92$	$52,5 \pm 2,02^*$

где, * - значения, различия которых при сравнении с контролем достоверны при $p < 0,05$; ПОЛ - перекисное окисление липидов; АОА - антиокислительная активность.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балашов В.П., Блинов Д.С., Казаченко В.Н. и др. Мембранные механизмы антиаритмического действия кватернидина // Бюлл. экспер. биол. и мед. - 2005. - Т. 139. - №6. - С. 656-660.
2. Блинов Д.С., Балашов В.П., Ванькова Л.В. и др. Противоаритмическая активность нового отечественного

- антигипоксанта этоксидола // Вестник аритмологии. - 2008. - №53. - С. 41-44.
3. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. - М.: «Наука», 1973. - 252 с.
4. Закс Л. Статистическое оценивание. М.: «Статистика», 1978. 598 с.
5. Котляров А.А. Изменение электрофизиологических параметров сердца при операции торакоперикардотомии в условиях эксперимента // Росс. кард. журн. - 2002. - №1. - С. 53-55.
6. Котляров А.А. Метаболическая кардиопротекция - эффективный метод профилактики побочных эффектов противоаритмических средств. - Саранск: Тип. «Красный Октябрь», 2004. - 160 с.
7. Матлина Э.Ш., Меньшиков В.В. Клиническая биохимия катехоламинов. - М.: «Медицина», 1967. - 304 с.
8. Сакман Б., Неер Э. Регистрация одиночных каналов. - М.: «Мир», 1987. - 448 с.
9. Freireich E.J., Cork A., Stass S.A. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agent in mouse, rat, dog, monkey and man // Cancer chemoter. repl. - 1966. - Vol. 50. - P. 219-244.

МЕМБРАННЫЕ МЕХАНИЗМЫ АНТИАРИТМИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ОТЕЧЕСТВЕННОГО ЦИТОПРОТЕКТОРА ЭТОКСИДОЛА

Д.С.Блинов, Е.Д.Гогина, С.Я.Скачилова, В.П.Балашов, Е.В.Блинова, Л.В.Ванькова, Л.В.Пивкина, Л.А.Белова

С целью изучения возможных механизмов реализации антиаритмического действия этоксидола проведены опыты на половозрелых наркотизированных тиопентал-натрием (50 мг/кг внутривентриально) и переведенных на управляемое дыхание кошках (n=7). Контрольная серия состояла из 10 животных. Влияние этоксидола на калиевую проводимость исследовали на нейронах из окологлоточного кольца ганглиев большого прудовика. Влияние этоксидола (n=7) на содержание катехоламинов в миокарде беспородных кошек обоего пола с инфарктом миокарда оценивали флуориметрически, влияния на интенсивность перекисного окисления липидов и антиоксидантную систему - методом индуцированной хемилюминесценции. Этоксидол не влиял на автоматию нотопопного водителя ритма и не угнетал проводимость по предсердиям, желудочкам и атриовентрикулярному соединению, не вызывал изменения возбудимости предсердий и желудочков, но увеличивает эффективный рефрактерный период желудочков. Этоксидол не оказывает влияния на характеристики потенциалзависимых калиевых каналов задержанного выпрямления. Внутривенное введение этоксидола сопровождается увеличением концентрации адреналина в зоне миокарда, удаленной от ишемии и, одновременно, снижением концентрации гормона в поврежденной зоне. В участках миокарда, с ограничением кровоснабжения, интенсивность перекисного окисления липидов под влиянием препарата снизилась более чем в два раза. Таким образом, в основе реализации антиаритмического эффекта этоксидола лежит его способность увеличивать рефрактерность желудочков сердца.

MEMBRANE MECHANISMS OF ANTIARRHYTHMIC EFFECT OF ETHOXIDOL, CYTOPROTECTOR INVENTED IN RUSSIA

D.S. Blinov, E.D. Gogina, S.Ya. Skachilova, V.P. Balashov, E.V. Blinova, L.V. Vankova, L.V. Pivkina, L.A. Belova

To study potential mechanisms of realization of antiarrhythmic effect of Ethoxidol, experiments on mature outbred cats narcotized with Thiopental Sodium (50 mg/kg intra-peritoneally) under controlled respiration (n=7) were carried out. The control group consisted of 10 animals. The effect of Ethoxidol on the potassium conduction was studied on neurons from peripharyngeal circle of ganglia of pond snail. The effect of Ethoxidol (n=7) on the concentration of catecholamine in the myocardium of cats of both sexes with the myocardial infarction was assessed with the aid of fluorometry; and the effect on the lipid peroxidation intensity, by the method of induced luminescence. Ethoxidol did not affect the nomotopic pacemaker automaticity, did not depress intra atrial, intra ventricular, and atrio ventricular conduction, did not cause changes in excitability of atria and ventricles, but prolonged the effective refractory period of the ventricles. Ethoxidol did not affect characteristics of potential-dependent delayed rectifier potassium channels. Intravenous administration of Ethoxidol is associated with an increase in the epinephrine concentration in myocardium located remotely to the ischemic site and simultaneously a decrease in the hormone concentration in the injured area. In the myocardial areas with an altered circulation, the lipid peroxidation intensity decreased more than twice. Thus, the antiarrhythmic effect of Ethoxidol is caused by its ability to increase refractoriness of the ventricles.