

УДК 616.83-08:615.222

**ВЛИЯНИЕ ПРОПРАНОЛОЛА, АМИОДАРОНА И ВЕРАПАМИЛА
НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ РЕЦЕПТОРОВ ЦНС,
СОПРЯЖЕННЫХ С G-БЕЛКАМИ**

¹Уваров А.В., ¹Туровая А.Ю., ¹Галенко-Ярошевский П.А., ²Духанин А.С., ¹Каде А.Х.

¹ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет»

Минздрава России, Краснодар, e-mail: alla_turovaya@rambler.ru;

²ГБОУ ВПО «Национальный исследовательский медицинский университет»

им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва

Исследование влияния антиаритмических препаратов пропранолола, амиодарона и верапамила на функциональную активность мембранных рецепторов ЦНС, сопряженных с G-белками, показало, что антиаритмик II класса пропранолол оказывает угнетающее действие на функциональную активность 5-HT₁ серотониновых рецепторов, P_{2y} пуриновых рецепторов и β-адренорецепторов, вызывая достоверные изменения внутриклеточной концентрации вторичных мессенджеров (циклического аденозинмонофосфата и инозитол-трифосфата) в синапсосомах вентролатерального отдела продолговатого мозга у кошек. Амиодарон (III класс) оказывает статистически значимый депримирующий эффект только на β-адренорецепторы симпатoadтивирующего центра. Верапамил (IV класс) не оказывает статистически значимого действия на исследуемые типы рецепторов. Влияние изученных препаратов на функциональную активность рецепторов, сопряженных с G-белками, может реализоваться в условиях *in vivo* преимущественно в форме превентивного центрального антиаритмического эффекта. Основой подобного действия являются направленные изменения внутриклеточной концентрации вторичных мессенджеров – циклического аденозинмонофосфата и инозитол-трифосфата, что наиболее характерно для пропранолола.

Ключевые слова: пропранолол, амиодарон, верапамил, центральные антиаритмические эффекты, 5-HT₁, 5-HT₂ рецепторы серотонина, P_{2y} пуриновые рецепторы, β-адренорецепторы

**THE INFLUENCE OF PROPRANOLOL, AMIODARONE AND VERAPAMIL
ON THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF THE CNS RECEPTORS,
CONJUGATED WITH G-PROTEINS**

¹Uvarov A.V., ¹Turovaya A.Y., ¹Galenko-Yaroshevsky P.A., ²Dukhanin A.S., ¹Kade A.K.

¹SBEI HPE «Kuban State Medical University» of the Ministry of Health of the Russian

Federation, Krasnodar, e-mail: alla_turovaya@rambler.ru;

²SBEI HPE «National Research Medical University» named after N.I. Pirogov of the Ministry

of Health of the Russian Federation, Moscow

The investigation of the influence of antiarrhythmic drugs propranolol, amiodarone and verapamil on the functional activity of membrane receptors of the CNS, conjugated with G-proteins, showed, that propranolol (antiarrhythmic class II) has a dampening effect on the functional activity of 5-HT₁ serotonin receptors, P_{2y} purine receptors and β-adrenergic receptors, causing significant changes in the intracellular concentration of second messengers (cyclic adenosine monophosphate and inositol triphosphate) in synaptosomes of medulla oblongata's ventrolateral section in cats. Amiodarone (III class) has a statistically significant depressive effect only on β-adrenergic sympathico-activating center receptors. Verapamil (IV class) has no statistically significant effect on the studied types of receptors. The influence of studied drugs on the functional activity of receptors, associated with G-proteins, can be realized in conditions *in vivo* primarily in the form of preventive central antiarrhythmic effect. The basis of such action are directed changes in intracellular concentration of the second messengers – cyclic adenosine monophosphate and inositol triphosphate, which is most characteristic of propranolol.

Keywords: propranolol, amiodarone, verapamil, central antiarrhythmic effects, 5-HT₁, 5-HT₂ serotonin receptors, P_{2y} purin receptors, β-adrenergic receptors

Проведенные ранее исследования [1, 2, 3] выявили способность антиаритмиков II, III и IV классов – пропранолола, амиодарона и верапамила – оказывать симпатингибирующий эффект в условиях модели центральной тахикардии, вызванной химической и электростимуляцией симпатoadтивирующего центра вентролатеральной поверхности продолговатого мозга (ВЛПМ) кошек. Вышеперечисленные препараты вызывали разнонаправленные изменения в содержании биогенных аминов (адреналина, норадреналина, дофамина, Л-ДОФА, серотонина), были способны подавлять вы-

работку возбуждающих и увеличивать содержание тормозных нейроаминокислот в продолговатом мозге у крыс [4, 5, 6]. При изучении влияния пропранолола, амиодарона и верапамила на рецепторные системы, принимающие участие в центральных механизмах регуляции сердечного ритма, к которым относятся мембранные рецепторы ЦНС, сопряженные с ионными каналами, установлено, что верапамил лимитирует повышение уровня Ca²⁺ в синапсосомах ВЛПМ, опосредованное активацией 5-HT₂ типа рецепторов серотонина и NMDA типа рецепторов глутамата. Амиодарон

уменьшает подъем уровня Ca^{2+} и Na^+ в синапсосах, связанный со стимуляцией NMDA типа рецепторов глутамата [7].

Учитывая полученные данные, представляло интерес исследовать влияние этих антиаритмиков на другое семейство мембранных рецепторов нейромедиаторов/нейромодуляторов ЦНС, локализованных в плазматических мембранах нейронов, работа которых сопряжена с активацией G-белков. Функциональная активность таких рецепторов может быть оценена путем регистрации изменений в синапсосах концентрации вторичных мессенджеров – циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) и инозитол-трифосфата (ИФ₃). Функция 5-HT₁ типа рецепторов серотонина и P_{2y} пуриновых рецепторов связана с ингибированием активности аденилатциклазы и последующим снижением внутриклеточной/ синапсосомальной концентрации вторичного мессенджера цАМФ [8]. Активация метаботропных рецепторов глутамата и 5-HT₂ типа рецепторов серотонина приводит к увеличению внутриклеточного/синапсосомального содержания вторичного мессенджера ИФ₃ [9]. Стимуляция β-адренорецепторов вызывает повышение внутриклеточной/синапсосомальной концентрации вторичного мессенджера цАМФ [10].

Целью исследования явилось сравнительное изучение влияния антиаритмиков различных классов – пропранолола (II), амиодарона (III) и верапамила (IV) на функциональную активность локализованных в плазматических мембранах нейронов рецепторов, сопряженных с G-белками.

Материалы и методы исследования

Везикулы плазматических мембран – синапсосомы – из ВЛПМ кошек получали методом дифференциального центрифугирования в градиенте перколлала [11]. Для определения содержания цАМФ в синапсосах использовали стандартные наборы фирмы «Amersham». Содержание ИФ₃ определяли радиометрически по Griffin [12].

Активацию рецепторов осуществляли путем внесения селективных агонистов соответствующих типов рецепторов в суспензию синапсосом, выделенных из ВЛПМ. Для оценки специфичности выявленных изменений в качестве контроля использовали избирательные антагонисты/ингибиторы изученных в работе рецепторных систем (табл. 1).

Расчет доверительных интервалов экспериментальных значений и оценку достоверности различий между ними проводили с помощью параметрического t-критерия Стьюдента при уровне значимости, равном 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

Влияние антиаритмических препаратов пропранолола, амиодарона и верапамила на функциональную активность 5-HT₁ типа

рецепторов серотонина оценивали по их действию на цАМФ-ответ синапсосом, индуцированный селективным лигандом 5-HT₁ рецепторов – соединением 8-ОН-DPAT. Добавление к суспензии синапсосом 8-ОН-DPAT в конечной концентрации 0,5 мкМ приводило к значимому снижению базальной концентрации цАМФ в среднем на 38%. Базальная [цАМФ]_{бн} в контрольных пробах составила $16,0 \pm 3,0$ пмоль/мг белка. Избирательный антагонист 5-HT₁ типа рецепторов серотонина спиперон (4 мкМ) нивелировал эффект селективного лиганда (рис. 1).

Таблица 1

Использованные в работе специфические лиганды различных типов рецепторов

Тип рецептора	Агонист	Антагонист
5-HT ₁	8-ОН-DPAT	Спиперон
5-HT ₂	α-Me-5HT	Метисергид
Met-Glu	D-AP4	MCPG
P _{2y}	АДФ	
β – AR	Изопротеренол	Пропранолол

С о к р а щ е н и я : 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin (8-ОН-DPAT); alpha-methyl-5-hydroxytryptamine (α-Me-5HT); D-2-amino-4-phosphonobutanoic acid (D-AP4); methyl-4-carboxyphenylglycine (MCPG).

Результаты сравнительного анализа действия пропранолола, амиодарона и верапамила на цАМФ-ответ синапсосом представлены на рис. 2.

Видно, что в этих условиях только пропранолол проявлял статистически значимую способность изменять цАМФ-ответ, опосредованный активацией 5-HT₁ типа рецепторов серотонина.

Эффект антиаритмических препаратов пропранолола, амиодарона и верапамила на функциональную активность 5-HT₂ типа рецепторов серотонина и метаботропный тип рецепторов глутамата изучали по их влиянию на изменение в синапсосах концентрации ИФ₃, индуцированное избирательными агонистами этих типов рецепторов – α-Me-5HT (30 мкМ) и D-AP4 (0,5 мкМ) соответственно.

Из данных, приведенных на рис. 3 и 4, видно, что все изученные вещества статистически достоверно не изменяли содержание этого вторичного мессенджера в синапсосах. На основании полученных результатов можно предположить, что указанные типы рецепторов не принимают участия в реализации центрального действия антиаритмических препаратов на активность симпатизирующего центра ВЛПМ.

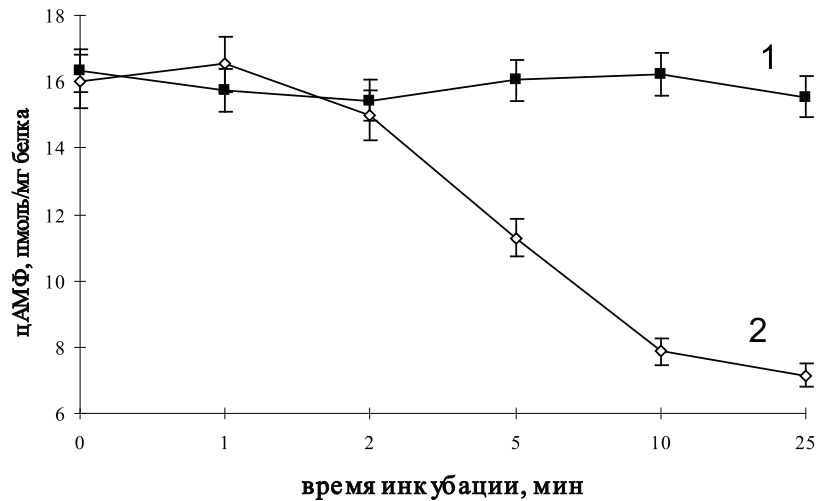


Рис. 1. Динамика изменения $[цАМФ]_{вн}$ на действие $0,5 \text{ мкМ}$ 8-OH-DPAT в отсутствии (1) и в присутствии $4,0 \text{ мкМ}$ спиперона (2)

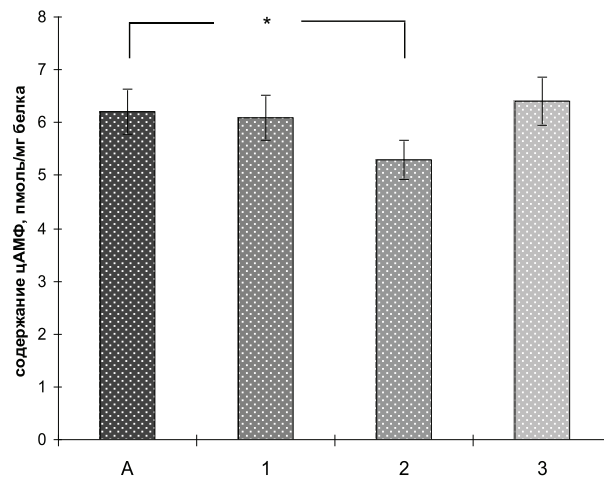


Рис. 2. Влияние антиаритмических препаратов верапамила 10 мкМ (1), пропранолола 30 мкМ (2) и амиодарона 20 мкМ (3) на $цАМФ$ -ответ, вызванный агонистом 5-HT_1 типа рецепторов серотонина 8-OH-DPAT (A): * – отмечены достоверные изменения ($p < 0,05$)

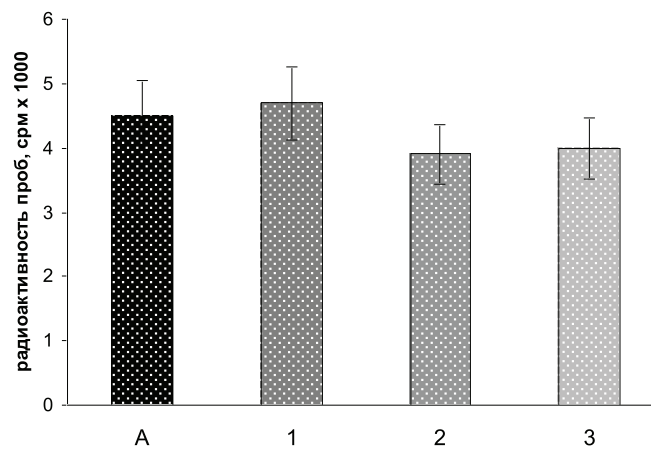


Рис. 3. Влияние антиаритмических препаратов верапамила 10 мкМ (1), пропранолола 30 мкМ (2) и амиодарона 20 мкМ (3) на IP_3 -ответ, вызванный агонистом 5-HT_2 типа рецепторов серотонина веществом $\alpha\text{-Me-5HT}$, 30 мкМ (A)

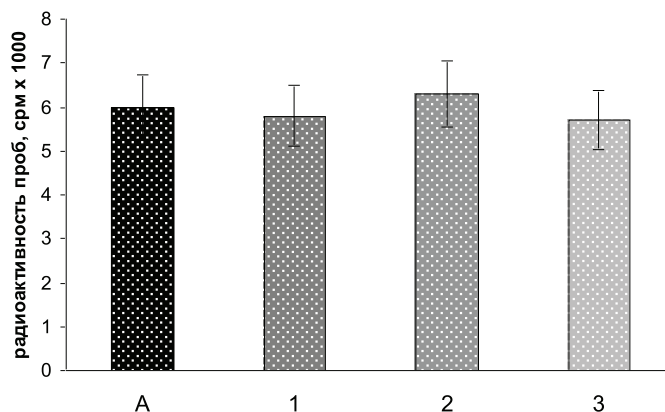


Рис. 4. Влияние антиаритмических препаратов верапамила 10 мкМ (1), пропранолола 30 мкМ (2) и амиодарона 20 мкМ (3) на IP_3 -ответ, вызванный агонистом метаботропного типа рецепторов глутамата соединением D-AP4, 0,5 мкМ (A)

Исследование влияния антиаритмических препаратов пропранолола, амиодарона и верапамила на функциональную активность β -адренорецепторов основано на определении их действия на содержание в синапсоммах вторич-

ного мессенджера цАМФ. На фоне действия избирательного лиганда этого типа рецепторов изопротеренола (10 мкМ) только пропранолол (30 мкМ) обладал способностью существенно подавлять цАМФ-ответ (рис. 5).

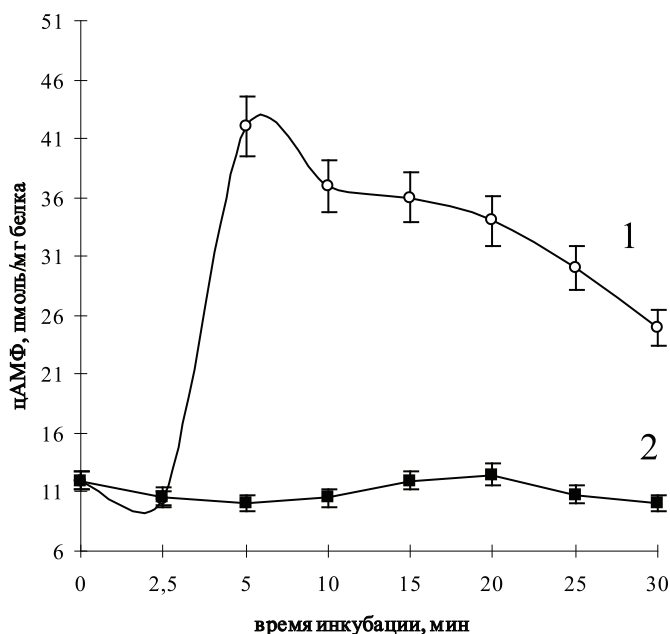


Рис. 5. Динамика изменения $[cAMP]_{\text{вн}}$ под действием 10 мкМ изопротеренола в отсутствие (1) и в присутствии 30 мкМ пропранолола (2)

Статистически достоверные эффекты амиодарона и верапамила на этой модели не выявлены (рис. 6).

Эффект антиаритмических препаратов амиодарона, пропранолола и верапамила на функциональную активность P_{2Y} пуриновых рецепторов изучали по их влиянию на

изменения концентрации цАМФ в синапсоммах, индуцированные 1,0 мкМ АДФ. Из данных, представленных на рис. 7, видно, что только пропранолол достоверно изменял цАМФ-ответ синапсомом. Активность амиодарона и верапамила на этой модели не отмечена.

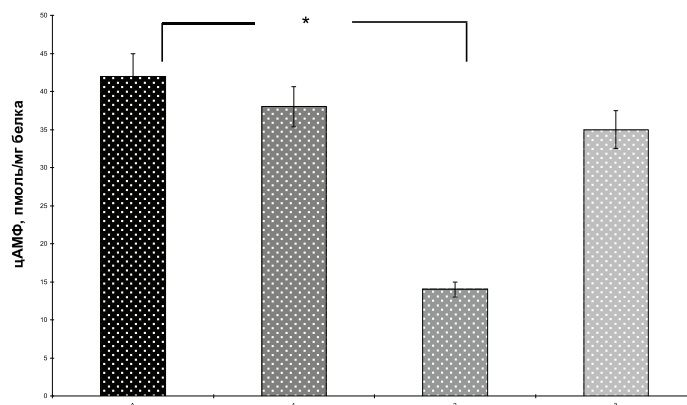


Рис. 6. Влияние антиаритмических препаратов верапамила 10 мкМ (1), пропранолола 30 мкМ (2) и амиодарона 20 мкМ (3) на цАМФ-ответ, вызванный агонистом β -адренорецепторов изопротеренолом (А): * – отмечены достоверные изменения ($p < 0,05$)

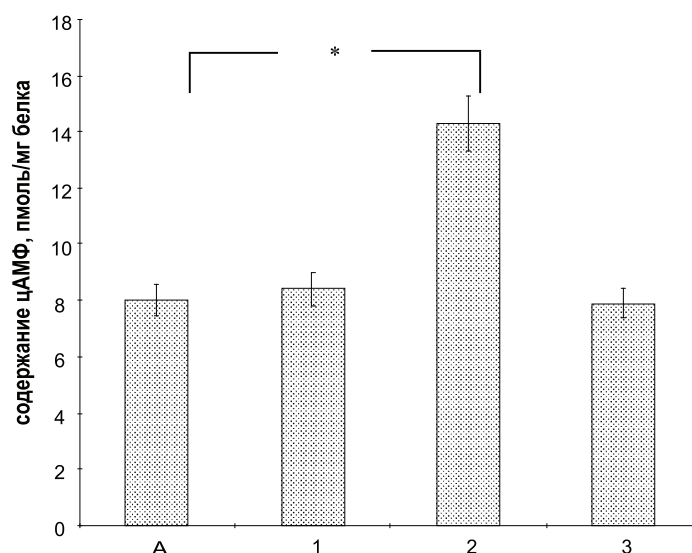


Рис. 7. Влияние антиаритмических препаратов верапамила 10 мкМ (1), пропранолола 30 мкМ (2) и амиодарона 20 мкМ (3) на цАМФ-ответ, вызванный агонистом P_{2U} пуриновых рецепторов АДФ, 1 мкМ (А): * – отмечены достоверные изменения ($p < 0,05$)

Таблица 2

Влияние исследованных антиаритмических соединений на функциональную активность различных типов рецепторов синапсом ВЛПМ

Антиаритмик	Тип рецепторов, сопряженных с G-белками				
	5-НТ ₁	5-НТ ₂	Met-Glu	β -AR	P_{2U}
Пропранолол	+			+	+
Амиодарон				+	
Верапамил					

Механизм реализации центрального эффекта антиаритмических препаратов возможен вследствие возникновения новых вариантов связывания эндогенных лигандов с наиболее оптимальными подтипами рецепторов, улучшения сопряжения мембранных рецепторов и G-белков, что влияет на функциональную активность рецепторов,

изменяющих систему вторичных внутриклеточных посредников.

Выводы

В результате изучения влияния антиаритмических препаратов пропранолола, амиодарона и верапамила на функциональную активность рецепторов,

сопряженных с G-белками выявлено, что антиаритмик II класса пропранолол оказывает угнетающее действие на функциональную активность β -адренорецепторов, 5-HT₁ серотониновых рецепторов и P_{2Y} пуриновых рецепторов, вызывая статистически достоверные изменения внутриклеточной концентрации вторичных мессенджеров (цАМФ и ИФ₃) в синапсоммах ВЛПМ.

Амиодарон (III класс) оказывает статистически значимый эффект только на β -адренорецепторы симпатизирующего центра продолговатого мозга.

Верапамил (IV класс) не оказывает статистически значимого действия на исследованные типы рецепторов.

Влияние изученных антиаритмических препаратов на функциональную активность рецепторов, сопряженных с G-белками, может реализовываться в условиях *in vivo* преимущественно в форме превентивного эффекта. Основой подобного действия являются направленные изменения внутриклеточной концентрации вторичных мессенджеров – циклического аденозинмонофосфата и инозитол-трифосфата. По результатам наших исследований такое свойство наиболее характерно для антиаритмического средства II класса пропранолола.

Список литературы

1. Турова А.Ю., Каде А.Х., Галенко-Ярошевский П.А. Экспериментальное моделирование центральной тахикардии путем стимуляции симпатизирующих нейронов вентролатерального отдела продолговатого мозга у кошек // Бюл. экспер. биол. – 2001. – Приложение 2. – С. 153–157.
2. Турова А.Ю., Каде А.Х., Галенко-Ярошевский П.А. Влияние некоторых антиаритмиков на центральные механизмы симпатической регуляции сердечного ритма у кошек // Бюл. экспер. биол. – 2001. – Приложение 2. – С. 89–93.
3. Каде А.Х., Турова А.Ю., Галенко-Ярошевский П.А., Уваров А.В., Губарева Е.А., Романова Е.И. Влияние пропранолола, амиодарона и верапамила на нарушения сердечного ритма центрального генеза // Фундаментальные исследования. – 2010. – № 1–С. 51–56.
4. Турова А.Ю., Галенко-Ярошевский П.А., Каде А.Х., Уваров А.В., Кигурадзе М.И., Хвятия Н.Г., Татулашвили Д.Р. Влияние верапамила и амиодарона на состояние симпатико-адреналовой системы и соотношение возбуждающих и тормозных аминокислот в продолговатом мозге крыс // Бюл. экспер. биол. – 2005. – Т. 139, № 6. – С. 632–634.
5. Турова А.Ю., Кигурадзе М.И., Галенко-Ярошевский П.А., Каде А.Х., Уваров А.В., Татулашвили Д.Р., Сукоян Г.В. Состояние симпатико-адреналовой системы и соотношения нейрональных аминокислот в продолговатом мозге крыс под влиянием неселективных β -адреноблокаторов // Бюл. экспер. биол. – 2005. – Т. 139, № 5. – С. 525–527.
6. Галенко-Ярошевский А.П., Турова А.Ю., Городжая Г.Г. Влияние RU-353 на содержание биогенных аминов, ацетилхолина и активность ацетилхолинэстеразы в миокарде и различных отделах головного мозга крыс // Бюл. экспер. биол. – 2002. – Приложение 2. – С. 58–62.
7. Турова А.Ю., Уваров А.В., Галенко-Ярошевский А.П., Духанин А.С., Каде А.Х. Влияние пропранолола, амиодарона и верапамила на функциональную активность рецепторов ЦНС, сопряженных с ионными каналами // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 12 (2) – С. 344–349.
8. Burnstock G. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system // *Nat Rev Drug Discov.* 2008 Jul;7(7):575–90.
9. Ciranna L. Serotonin as a modulator of glutamate- and GABA-mediated neurotransmission: implications in physiological functions and in pathology // *Curr Neuropharmacol.* 2006 Apr;4(2):101–14.
10. Chidlow G., Melena J., Osborne N.N. Betaxolol, a beta(1)-adrenoceptor antagonist, reduces Na(+) influx into cortical synaptosomes by direct interaction with Na(+) channels: comparison with other beta-adrenoceptor antagonists // *Br J Pharmacol.* 2000 Jun;130(4):759–66.
11. Dunkley P.R., Jarvie P.E., Robinson P.J. A rapid Percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes // *Nat Protoc.* 2008;3(11):1718–28.
12. Griffin H.D., Hawthorne J.N. Calcium-activated hydrolysis of phosphatidyl-myoinositol 4-phosphate and phosphatidyl-myoinositol 4,5-bisphosphate in guinea-pig synaptosomes // *Biochem J.* 1978 Nov 15;176(2):541–52.

References

1. Kade A.Kh., Turovaya A.Yu., Galenko-Yaroshevsky P.A. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2001, no SUPPL. 2, pp. 153–157.
2. Turovaya A.Yu., Kade A.Kh., Galenko-Yaroshevsky P.A. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2001, no SUPPL. 2, pp. 89–93.
3. Kade A.Kh., Turovaya A.Yu., Galenko-Yaroshevsky P.A., Uvarov A.V., Gubareva E.A., Romanova E.I. Fundamental research 2010, no 1, pp. 51–56.
4. Turovaya A.Yu., Galenko-Yaroshevsky P.A., Kade A.Kh., Uvarov A.V., Kiguradze M.I., Khvitiya N.G., Tatulashvili D.R. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2005, vol. 139, no 6, pp. 665–667.
5. Turovaya A.Yu., Kiguradze M.I., Galenko-Yaroshevsky P.A., Kade A.Kh., Uvarov A.V., Tatulashvili D.R., Sukoyan G.V. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2005, vol. 139, no 5, pp. 569–571.
6. Galenko-Yaroshevsky A.P., Turovaya A.Yu., Gorodzhaya G.G. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2002, no SUPPL. 2, pp. 58–62.
7. Turovaya A.Yu., Uvarov A.V., Galenko-Yaroshevsky P.A., Dukhanin A.S., Kade A.Kh. Fundamental research 2013, no 12 (2), pp. 344–349.
8. Burnstock G. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system // *Nat Rev Drug Discov.* 2008 Jul;7(7):575–90.
9. Ciranna L. Serotonin as a modulator of glutamate- and GABA-mediated neurotransmission: implications in physiological functions and in pathology // *Curr Neuropharmacol.* 2006 Apr;4(2):101–14.
10. Chidlow G., Melena J., Osborne N.N. Betaxolol, a beta(1)-adrenoceptor antagonist, reduces Na(+) influx into cortical synaptosomes by direct interaction with Na(+) channels: comparison with other beta-adrenoceptor antagonists // *Br J Pharmacol.* 2000 Jun;130(4):759–66.
11. Dunkley P.R., Jarvie P.E., Robinson P.J. A rapid Percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes // *Nat Protoc.* 2008;3(11):1718–28.
12. Griffin H.D., Hawthorne J.N. Calcium-activated hydrolysis of phosphatidyl-myoinositol 4-phosphate and phosphatidyl-myoinositol 4,5-bisphosphate in guinea-pig synaptosomes // *Biochem J.* 1978 Nov 15;176(2):541–52.

Рецензенты:

Макляков Ю.С., д.м.н., профессор, зав. кафедрой фармакологии и клинической фармакологии, ГБОУ ВПО РостГМУ Минздрава России, г. Ростов-на-Дону;

Быков И.М., д.м.н., профессор, зав. кафедрой фундаментальной и клинической биохимии, ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России, г. Краснодар.

Работа поступила в редакцию 18.02.2014.