

ИЗМЕНЕНИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ И ИОННЫХ ТОКОВ НЕЙРОНОВ МОЛЛЮСКОВ ПРИ ВНЕ- И ВНУТРИКЛЕТОЧНОМ ДЕЙСТВИИ СЕВОФЛУРАНА И ДЕСФЛУРАНА

А. И. Вислобоков, Э. Э. Звартай, Ю. С. Полушкин, В. В. Алферова, И. Г. Буханков

CHANGES IN INTRACELLULAR POTENTIALS AND ION FLUXES OF NEURONS OF MOLLUSKS BY EXTRACELLULAR AND INTRACELLULAR ACTION OF SEVOFLURANE AND DESFLURANE

A. I. Vislobokov, E. E. Zvartau, Yu. S. Polushin, V. V. Alferova, I. G. Bukhankov

ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» МЗ РФ

Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, RF

Проведены исследования изменений внутриклеточных потенциалов идентифицируемых интактных нейронов изолированной ЦНС моллюска катушки роговой (*Planorbarius corneus*) с помощью внутриклеточных микроэлектродов и ионных токов изолированных нейронов катушки и прудовика (*Lymnaea stagnalis*) в условиях фиксации потенциала под влиянием десфлурана в концентрациях 1 и 10 мМ (1,2 и 12 МАК) и севофлурана в концентрациях 1 и 5 мМ (2,27 и 11,36 МАК). Через 3–5 мин от начала действия анестетиков в одних нейронах развивалась незначительная гиперполяризация (на 2–5 мВ), а в других – деполяризация (до 10 мВ). При отмывании анестетиков в течение 5–10 мин возникала обратимая гиперполяризация.

Изменения ионных токов под влиянием анестетиков оказались более однородными, чем изменения биопотенциалов. При действии десфлурана и севофлурана в концентрации 1 мМ происходило подавление амплитуд натриевых, кальциевых и калиевых токов на 40%, при этом наблюдалось ускорение инактивации калиевых медленных токов. Под влиянием анестетиков в концентрации 5–10 мМ происходило подавление токов на 70–80%. Оно развивалось быстро (за 20–30 с), а после их действия восстановление амплитуд ионных токов было замедленным (за 5–15 мин) и не всегда достигало исходных величин. Внутриклеточное действие севофлурана не подавляло ионные токи, т. е. было неэффективным.

Ключевые слова: *Planorbarius corneus*, *Lymnaea stagnalis*, десфлуран, севофлуран, потенциал покоя, потенциал действия, импульсная активность, ионные токи.

Intercellular potentials changes of identifiable intact neurons in isolated CNS of great ramshorn (*Planorbarius corneus*) have been investigated with the help of intracellular microelectrodes and ion currents of isolated neurons of great ramshorns and pond snails (*Lymnaea stagnalis*) with the fixation of potential influenced by desflurane in concentrations of 1 and 10 mM (1.2 and 12 MAC) and sevoflurane in concentrations of 1 and 5 mM (2.27 and 11.36 MAC). In 3–5 minutes after the start of anesthetics' action some neurons developed insignificant hyperpolarization (for 2–5 mV), and some other developed depolarization (up to 10 mV). When anesthetics were being washed out for 5–10 minutes the reversible depolarization appeared.

Changes in ion currents under the influence of anesthetics were more homogeneous compared to changes in biopotentials. Desflurane and sevoflurane in 1 mM concentrations suppressed amplitudes of sodium, calcium and potassium currents by 40%, and inactivation of potassium low currents was speed up. Anesthetics in the concentration of 5–10 mM suppressed currents by 70–80%. It developed fast (for 20–30 seconds) and after this action the amplitudes restored slowly (for 5–15 minutes) and it failed to reach the initial values in all the times. Intercellular activity of sevoflurane did not suppress ion currents, i.e. it was ineffective.

Key words: *Planorbarius corneus*, *Lymnaea stagnalis*, desflurane, sevoflurane, resting potential, potential-action, impulse activity, ion currents.

Современные методики анестезии трудно представить без ингаляционных анестетиков (севофлуран, десфлуран, изофлуран, галотан и пр.), которые в качестве одного из компонентов используют как для индукции, так и для поддержания анестезии.

Показано, что они влияют на ретикулярную формацию, кору больших полушарий, клиновидное ядро и гиппокамп, а также подавляют передачу возбуждения на уровне нейронов спинного мозга [8, 10]. Основной «мишенью» для молекул ингаляционных

анестетиков считаются нейроны и их синаптические контакты в головном мозге. Полагают, что, помимо прямого влияния на нервную систему с развитием картины анестезии, ингаляционные фторсодержащие анестетики могут обладать эффектом «прекондиционирования» и повышать устойчивость клеток к ишемии [4, 12, 13].

Имеются сведения и о том, что некоторые анестетики вызывают развитие воспаления в мозговой ткани [18], которое, предположительно, может быть одной из причин послеоперационных когнитивных нарушений.

Несмотря более чем на 200-летнюю историю применения ингаляционных анестетиков, в понимании механизма их действия остаётся много неясного. Полагают, что на молекулярном уровне имеется много общего для всех ингаляционных анестетиков. Наибольшее признание и развитие получила мембранные теория общей анестезии, которая основывается на данных о влиянии анестетиков на ионные каналы, на ионную проницаемость мембран нервных клеток. Установлено также, что общие анестетики в дозах, которые существенно не влияют на электрогенез мембран нейронов, оказывают выраженное тормозящее действие на пре-синаптическом и постсинаптическом уровнях. Однако в деталях молекулярный механизм угнетения возбудимости нейронов и торможения транссинаптической передачи под влиянием анестетиков исследован недостаточно. Одно ясно, что конечный эффект действия ингаляционных анестетиков зависит от достижения терапевтической концентрации в ткани головного мозга, а синапсы являются ключевым звеном рефлекторных цепей и подвержены влиянию различного рода эндогенных и экзогенных факторов.

Основными электрофизиологическими параметрами функционального состояния нейронов являются потенциал покоя (ПП), потенциал действия (ПД), синаптические потенциалы и трансмембранные ионные токи. Уровень ПП характеризует состояние нейрона и существенно определяет его деятельность: возбудимость, генерацию ПД, межнейронные взаимоотношения. За последние 20–30 лет многостороннее влияние ингаляционных общих анестетиков на биологические объекты отражено в очень большом числе публикаций [9–15, 17–20]. Тем не менее сравнительных конкретных сведений об изменениях данных параметров под влиянием разных анестетиков на одном объекте в литературе недостаточно. Недостаточно и работ, отражающих эффекты последействия и восстановления функционального состояния нейронов после выведения анестетика. Поэтому исследования в этих направлениях по-прежнему представляют интерес.

Цель – с использованием экспериментальной модели нейронов моллюсков, позволяющей

изучать изменения их функционального состояния при действии фармакологических средств, получить собственные данные о динамике изменений биопотенциалов и ионных токов под влиянием ингаляционных анестетиков севофлурана и десфлурана.

Материалы и методы

В качестве исследуемых средств выбраны наиболее востребованные фторсодержащие общие анестетики десфлуран и севофлуран. Использованы экспериментальные подходы, апробированные в течение многих лет в отделе нейрофармакологии Института фармакологии им. А. В. Вальдмана ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» при изучении эффектов мембранных соединений различных групп [1, 3].

Микроэлектродные исследования проведены на идентифицируемых (100–200 мкм) интактных нейронах изолированной ЦНС (рис. 1а) моллюска катушки роговой (*Planorbis corneus*). В физиологический раствор вводили десфлуран и севофлуран до насыщения – около 10 мМ десфлурана и 5 мМ севофлурана [15], а затем разбавляли до 1 мМ и изучали их действие при внеклеточном приложении. Если анализировать эффекты десфлурана и севофлурана, показанные в литературе на нейронах моллюска прудовика [6] или мышечных клетках [18], и эффективные концентрации анестетиков, применяемые авторами, то в большинстве случаев они составляли около 1 МАК, хотя в условиях клиники величина МАК подбирается индивидуально. Значения величин МАК и их соотношения с используемыми концентрациями анестетиков следующие: для десфлурана 1 МАК = 7,2% = 0,83 мМ (и тогда 1 мМ = 1,2 МАК; 10 мМ = 12 МАК), а для севофлурана 1 МАК = 2,4% = 0,44 мМ (а 1 мМ = 2,27 МАК; 5 мМ = 11,36 МАК). Использовали и высокие концентрации анестетиков (около 10 МАК) в целях оценки их возможного токсического действия.

Эксперименты начинались с того, что из тела моллюска вырезали кольцо ганглиев и помещали в маленькую камеру с раствором объемом около 0,5 см³, содержащим (в мМ/л) NaCl – 50; KCl – 2; CaCl₂ – 4; MgCl₂ – 1,5; трис-ОН – 10; pH – 7,5. Для регистрации электрофизиологических характеристик нейронов использовали стеклянные микроэлектроды (МЭ), заполненные 2,5 М KCl, с сопротивлением 10–20 мОм [1, 2].

Эксперименты проведены на 11 экземплярах ЦНС, зарегистрированы электрическая активность и ее изменения при действии севофлурана и десфлурана на 24 нейронах педальных и висцерального ганглиев. При этом влияние каждого анестетика в различных концентрациях исследовали как на различных нейронах, так и на одном и том же нейроне.

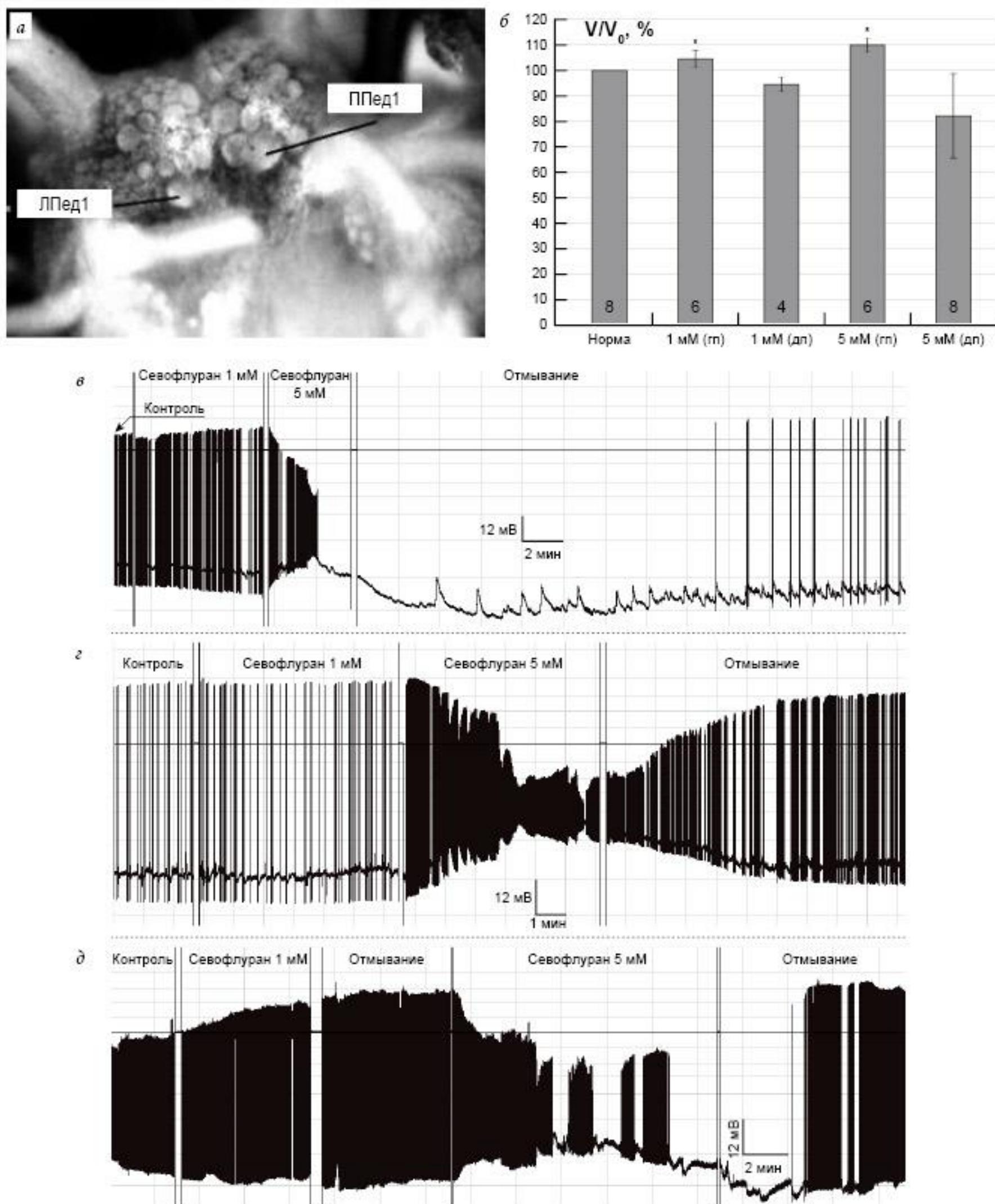


Рис. 1. Динамика изменений электрической активности нейронов катушки под влиянием севофлурана; а – идентифицируемые нейроны pedalных ганглиев ЦНС (ЛПед1 и ППед1); б – изменения потенциала покоя (дп – деполяризация, гп – гиперполяризация) нейронов под влиянием севофлурана в концентрациях 1 и 5 мМ (график построен на основании данных табл. 2); вертикальными отрезками обозначены доверительные 95%-ные интервалы, рассчитанные методом Бутстрапа для среднего арифметического. Цифры на столбиках гистограмм – количество воздействий. * – статистически значимые отличия от исходного значения (от нормы) на уровне $p < 0,05$ (парный тест Уилкоксона, FDR поправка на множественность сравнений). По оси ординат: V – ПП при действии СФ, V_0 – в норме; по оси абсцисс – концентрация; в – нейрон ППед1, г – нейрон ЛПед1, д – нейрон ЛПед1, но другой катушки и в «плохом» исходном функциональном состоянии (ПП около -45 мВ)

Оценивали динамику изменений ПП, импульсной активности (ИА) и параметров ПД.

При измерениях трансмембранных ионных токов применяли метод внутриклеточного диализа изолированных нейронов и фиксации мембранного потенциала [1, 3]. Для изготовления микропипетки с порой использовали тонкую полиэтиленовую трубку длиной 3 см, сгибаю ее V-образно в струе горячего воздуха, на сгибе тонкой стальной проволочки формировали выступ. Затем на вершине выступа под бинокулярной лупой иглой делали отверстие. Изготовленную микропипетку соединяли с системой трубочек для подачи диализирующего раствора (табл. 1). По величине сопротивления (200–300 кОм) оценивали диаметр отверстия (3–5 мкм) и пригодность микропипетки для работы.

Изолированную живую клетку помещали на полиэтиленовую пипетку, в которой создавали толчки отрицательного гидростатического давления, вследствие чего в области поры мембрана нейрона разрушалась и создавался электрический контакт неполяризующегося электрода, соединенного с усилителем фиксации потенциала, с внутриклеточным содержимым. Перфузирующий раствор (табл. 1), в который добавляли исследуемые вещества, подавался в камеру, где находился нейрон на полиэтиленовой микропипетке, а диализирующий, в который добавляли севофлуран, – внутрь этой пипетки.

Биопотенциалы регистрировали с помощью аналого-цифрового преобразователя (АЦП) фирмы «L-Card» L-791 (Россия). Ионные токи регистрировали с помощью другого АЦП-ЦАП и компьютерной программы Clamp, разработанной для этой цели.

Статистическую обработку изменений параметров электрической активности нейронов проводили с помощью фрагмента программы Bioactivity Recorder v5.32b [5], встроенной в программу для обслуживания АЦП L-791, а амплитуду ионных токов – с использованием статистической программы R [16]. Применён непараметрический тест Фридмана для связанных выборок. Анализ post hoc проведён в виде парных сравнений полученных измерений с исходной точкой (нормой) с помощью

непараметрического теста Уилкоксона для связанных выборок с поправкой FDR на множественность сравнений.

Результаты и обсуждение

Изменения биопотенциалов интактных нейронов изолированной ЦНС катушки.

1. Эффекты севофлурана. В контроле ПП нейронов составлял $-58,3 \pm 2,7$ мВ ($n = 17$), что свидетельствует об их «хорошем» функциональном состоянии. Изменения ПП для различных исследованных нейронов под влиянием анестетиков представлены в табл. 2. Севофлуран в концентрации 1 мМ вызывал незначительные и разнонаправленные изменения ПП: гиперполяризацию на $-4,8 \pm 5,3$ мВ (табл. 2, $n = 6$; рис. 1б) или столь же незначительную деполяризацию на $3,5 \pm 2,8$ мВ (табл. 2, $n = 4$; рис. 1г).

Перестраивалась ИА нейронов: при гиперполяризации наблюдалось её урежение, при деполяризации – учащение, возникали пачки ПД, параметры ПД изменялись незначительно. Изменения были обратимы. В концентрации 5 мМ севофлуран вызывал значительную (на $10,4 \pm 6,5$ мВ) деполяризацию (табл. 2, $n = 8$) с учащением ИА, существенным снижением амплитуд ПД, вплоть до прекращения активности (рис. 1в и 1г). На фоне длительного (более 5 мин) действия анестетика в 35% случаев в нейронах возникала гиперполяризация на $-5,7 \pm 1,4$ мВ (табл. 2, $n = 6$), которая в течение 5–7 мин продолжалась и при отмывании до $-6,6 \pm 2,1$ мВ (табл. 2, $n = 8$; рис. 1в). По мере отмывания севофлурана ПП постепенно восстанавливается до исходных величин, возникали редкие ПД с восстановлением характера ИА к контролю.

Полученные данные об изменениях ПП различных нейронов под влиянием СФ в концентрациях 1 и 5 мМ были разделены на 4 группы и представлены на рис. 1б: 1) нейроны, в которых возникала гиперполяризация при действии 1 мМ СФ – 1 мМ (гп); 2) деполяризация при действии 1 мМ – 1 мМ (дп); 3) гиперполяризация при действии 5 мМ – 5 мМ (гп) и 4) деполяризация

Таблица 1
Ионный состав растворов для изолированных нейронов (в мМ)

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

Таблица 2

Изменения ПП нейронов при действии и отмывании ингаляционных анестетиков (в мВ)

№ п/п	Нейрон	Контроль, ПП, мВ	Севофлуран			Десфлуран		
			1 мМ	5 мМ	Отмыв 5 мин	1 мМ	10 мМ	Отмыв 5 мин
1	ЛПед1	-63,1	+2 (-3,17)	0	0			
2	ППед1	-59,2	+3 (-5,07)	+6 (-10,14)	0			
3	ППед2	-59,6	-2 (+3,36)	+15 (-25,17)	+3			
4	ЛПед1	-69,5	-2 (+2,88)	0	-5			
5	ЛПед1	-60,1	+3 (-4,99)	+15 (-24,96)	-7			
6	ППед1	-49,4	-1,5 (+3,04)	+2 (-2,13)	-5			
7	ППед1	-49,4	+6 (-12,14)	+2 (-2,13)	0			
8	В1	-60,9	-4 (+6,57)	-4 (+6,57)	0	-1	-4	0
9	В1	-61,0		-6 (+9,84)	0			
10	ППед1	-60,9		-8 (+13,14)	-12		-4	-6
11	ЛПед1	-53,6	0	+25 (-46,64)	0		+7	-7
12	ППед1	-57,9		-6 (+10,36)	0	-1	+10	0
13	ППед1	-54,1	-3 (+5,54)	+8 (-14,79)	-6			
14	ЛПед1	-63,5	-3 (+4,72)	-5 (+7,87)	0		+9	-6
15	ППед1	-56,6		0	-4			
16	ЛПед1	-59,2		-5 (+8,45)	-8			
17	ППед3	-53,2		+10 (-18,80)	-7			

Примечание: ЛПед, ППед – левый и правый педальные ганглии, В – висцеральный; цифры – номера идентифицируемых нейронов. (+) – деполяризация нейрона, (-) – гиперполяризация, (0) – ПП на уровне контроля; в скобках – изменения в % к контролю.

при действии 5 мМ – 5 мМ (дп). На рис. 1г показана общая картина изменений электрической активности нейрона ЛПед1 под влиянием севофлурана, а результаты обработки этих изменений для нескольких дополнительных параметров – в табл. 3.

В ряде случаев при действии анестетика в концентрации 5 мМ развивалась только деполяризация нейронов, которая сохранялась и при отмывании (рис. 1г). На некоторых нейронах могла наблюдаться двоякая реакция – как де-, так и гиперполяризация.

На нейронах с низким исходным уровнем ПП (-45–50 мВ) севофлуран в концентрации 1 мМ, вследствие возникающей в них гиперполяризации, мог оказывать «восстанавливающее», активирующее действие (рис. 1д). При отмывании эффект усиливался. Из рисунка видно, что севофлуран в концентрации 5 мМ на этом нейроне вызывал деполяризацию, ИА подавлялась, на фоне увеличения частоты ПД их амплитуда снижалась, длительность ПД возрастала, возникали пачки ПД, и, вследствие развивающейся далее гиперполяризации, генерация

Таблица 3

Параметры изменений ИА нейрона ЛПед1, представленной на рис. 1г, под влиянием севофлурана

Параметры	Контроль (100%)	Концентрация, мМ		
		1	5	Отмывание
		%		
Средняя частота (имп/с)	0,24 ±0,30	64,50 ±46,7	1 659,47 ±1 223,3	452,81 ±416,7
Средний период (мс)	4 005 ±5 039,6	156,00 ±116,01	6,17 ±4,47	22,60 ±20,51
Средняя амплитуда (мВ)	85,4	102,00	51,68	81,50
Самый короткий интервал (мс)	144,6	233,96	58,23	101,24
Самый длинный интервал (мс)	17 651,2	115,18	18,14	53,55
Общее число ПД (n)	39	51	518	338

ПД прекращалась. При отмывании возникала более существенная гиперполяризация, после которой, по мере восстановления ПП к исходному уровню, генерация ПД восстанавливалась.

2. Эффекты десфлурана. Влияние десфлурана на электрическую активность нейронов было сходным с влиянием севофлурана. В концентрации 1 мМ десфлуран ($n = 2$) также вызывал незначительную гиперполяризацию (табл. 2, рис. 2а). В концентрации 10 мМ в нейронах возникала значительная (до 10 мВ) деполяризация ($n = 3$) с учащением ИА, снижением амплитуд ПД, прекращением активности (рис. 2а). Параметры ПД под влиянием десфлурана претерпевали существенные изменения: помимо снижения амплитуды, возрастала их длительность, при отмывании параметры ПД восстанавливались до исходных значений (рис. 2а, 1–3), возникала гиперполяризация и ИА постепенно приходила к норме. На некоторых нейронах (табл. 2, $n = 2$) влияние десфлурана в высокой концентрации после начальной деполяризации сопровождалось гиперполяризацией и особенно выражено – при отмывании (табл. 2, $n = 3$; рис. 2б).

Следует отметить, что под влиянием обоих анестетиков существенно перестраивался характер ИА (рис. 1 и 2).

3. Эффекты тетраэтиламмония (ТЭА).

В целях анализа и сравнения вариантов изменений электрической активности нейронов под влиянием севофлурана и десфлурана с эффектами некоторых других каналоблокирующих веществ проведены отдельные эксперименты ($n = 4$) с демонстрацией влияния на нейроны ТЭА в концентрации 10 мМ.

Под влиянием ТЭА (рис. 3) возникала небольшая деполяризация нейрона, возрастала частота ИА, снижалась амплитуда ПД и значительно (в 2–3 раза) увеличивалась их длительность (рис. 3, 1–3). Такое увеличение длительности ПД (при равном подавлении амплитуды ПД ТЭА и севофлураном) и отсутствие заметных изменений ПП, а также отсутствие гиперполяризации при отмывании ТЭА (рис. 3) было существенно отличным от действия анестетиков.

Изменения трансмембранных ионных токов изолированных нейронов прудовика и катушки. В предварительных экспериментах показано, что

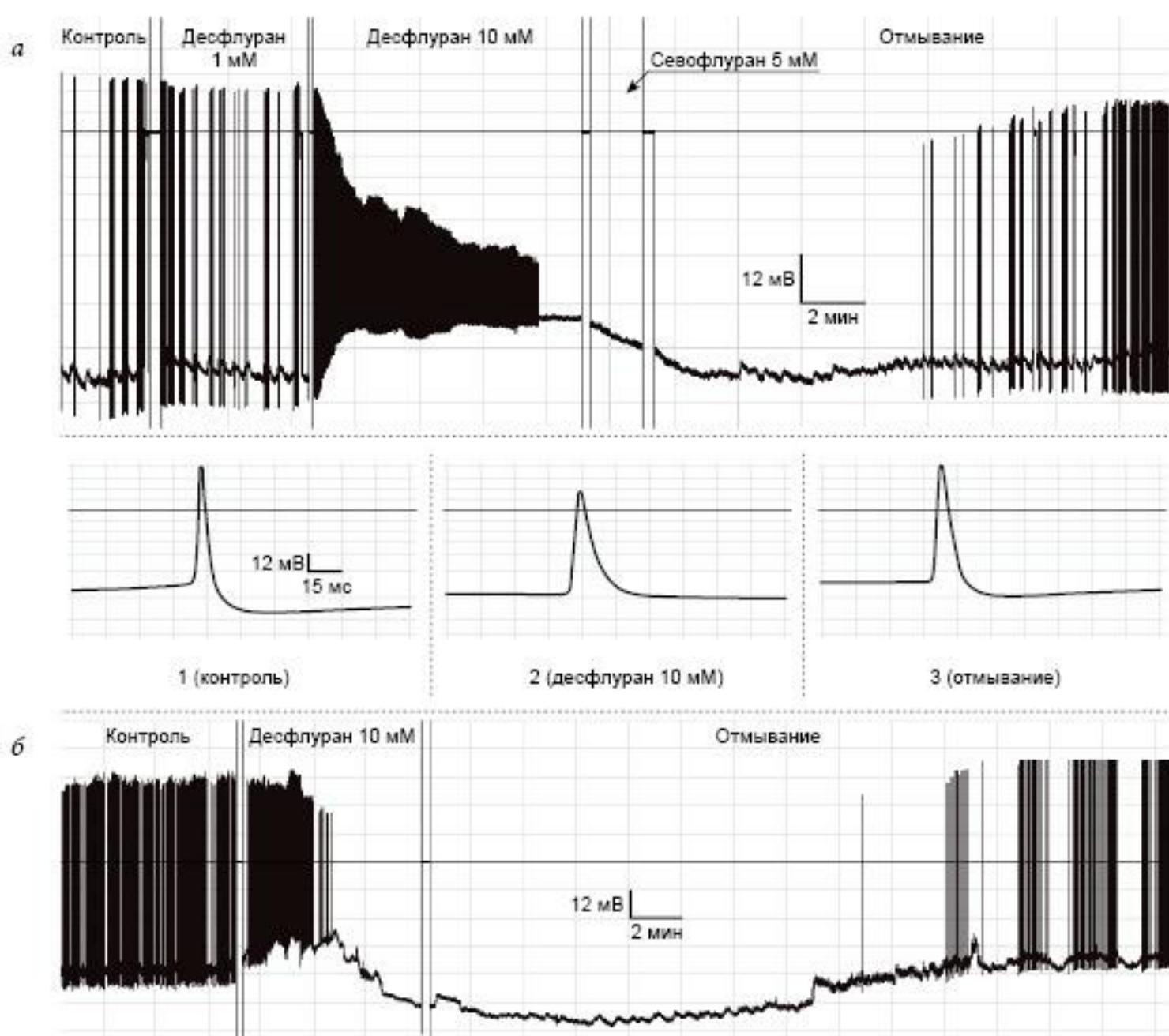


Рис. 2. Изменения электрической активности нейронов катушки под влиянием десфлурана; а – нейрон ПPed1; 1–3 – изменения параметров ПД нейрона (фрагмент записи на а – развертка во времени); б – нейрон LPed1

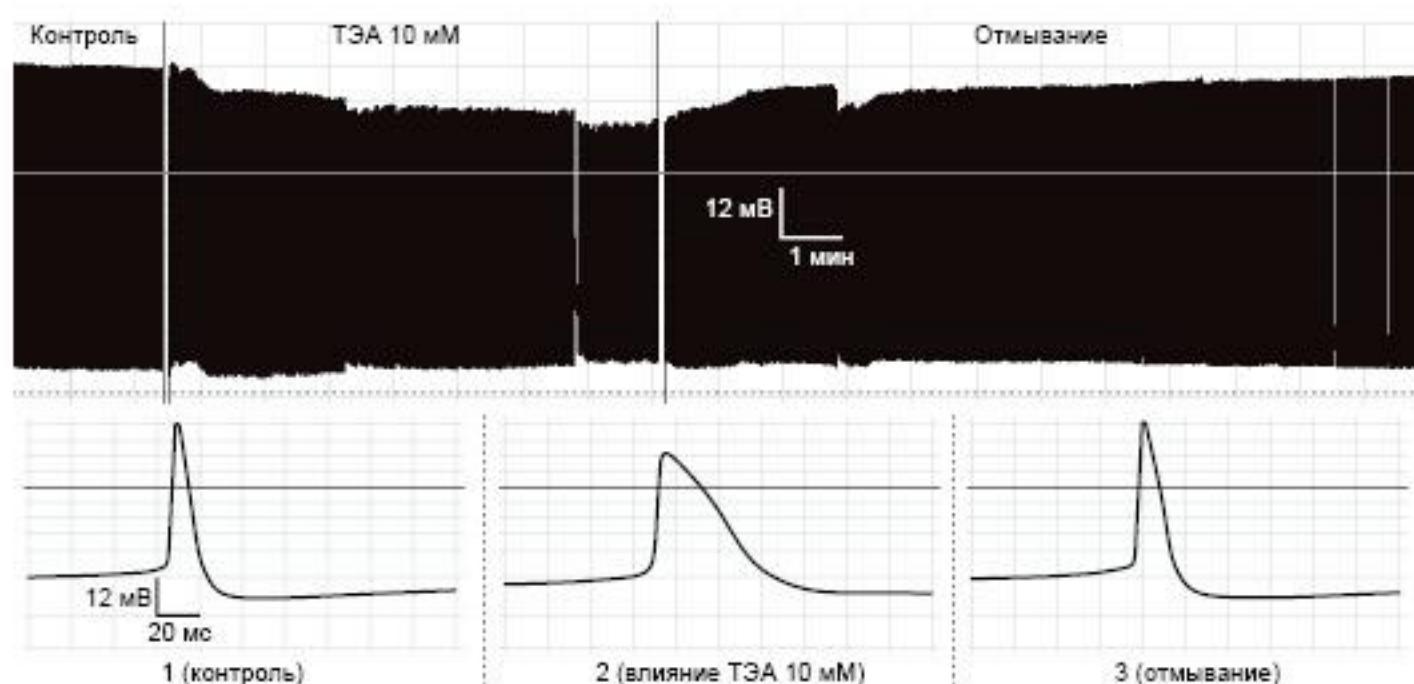


Рис. 3. Изменения электрической активности нейронов катушки под влиянием ТЭА. Нейрон ЛПед1; 1–3 – изменения параметров ПД нейрона (фрагменты записи сверху – развертка во времени)

реакции нейронов на действие севофлурана и десфлурана были похожими, поэтому в последующих экспериментах подробно изучали изменения ионных токов только под влиянием севофлурана в концентрациях 0,5; 1,0; 2,5 и 5 мМ. Изменения амплитуд суммарных входящих (натрий-кальциевых) и выходящих калиевых медленных токов представлены на рис. 4. Отчетливо видна зависимость подавления амплитуд всех токов от концентрации. Пример обратимого подавления натриевых токов показан на рис. 5а, а суммарных входящих натрий-кальциевых и выходящих калиевых медленных токов (без изменения их кинетики активации и инактивации) – на рис. 5б и 5в. Подавление выходящих быстрых калиевых токов показано на рис. 5в (в левой части рис.), а существенное ускорение инактивации калиевых медленных токов при действии севофлурана в концентрации 1 мМ – в правой части рис. 5в,

2 и почти полное подавление тока под его влиянием в концентрации 5 мМ – на рис. 5в, 3. Восстановление амплитуд ионных токов после действия севофлурана в концентрациях 0,5; 1 и 2,5 мМ до исходных значений происходит полностью за 5–8 мин, а в концентрации 5 мМ – за 10–15 мин и не полностью (до 70–80%).

В отдельной серии экспериментов на 4 изолированных нейронах севофлуран подавали с диализирующим внутриклеточным раствором (на внутреннюю сторону мембранны). Оказалось, что при этом он не оказывал подавляющего действия на ионные токи. Однако добавление севофлурана дополнительно и с наружной стороны приводило к подавлению токов в концентрации 1 мМ и тем более – в концентрации 5 мМ. Отмывание севофлурана с наружной и внутренней стороны мембранны нейронов приводило к частичному восстановлению

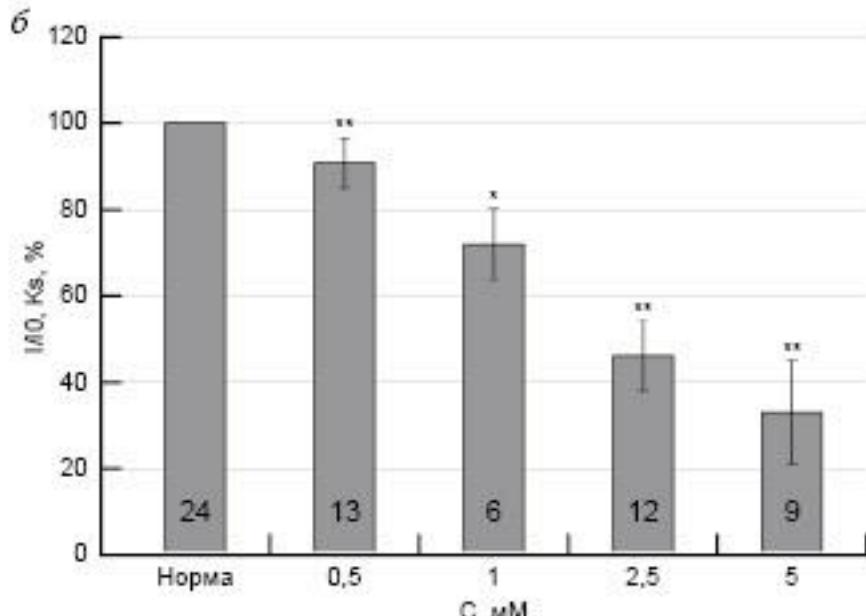
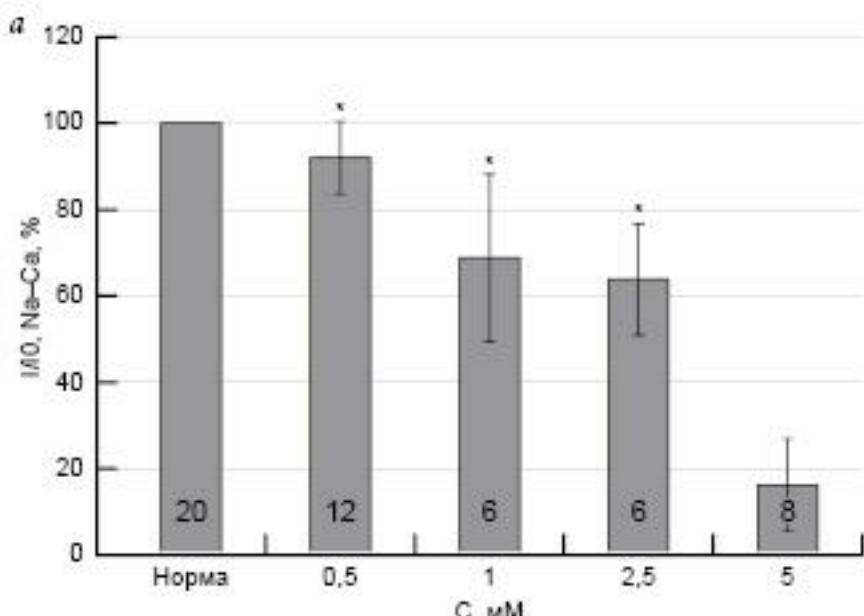


Рис. 4. Зависимости концентрация – эффект для входящих и выходящих токов при действии севофлурана; а – натрий-кальциевые токи; б – калиевые медленные токи. I – токи при действии, I_0 – в норме. Вертикальными отрезками обозначены доверительные 95%-ные интервалы, рассчитанные методом Бутстрэпа для среднего арифметического. Цифры на столбиках гистограмм – количество измерений. *, ** – статистически значимые отличия от исходного значения (от нормы) на уровне $p < 0,05$ или $p < 0,01$ (парный тест Уилкоксона, FDR поправка на множественность сравнений)

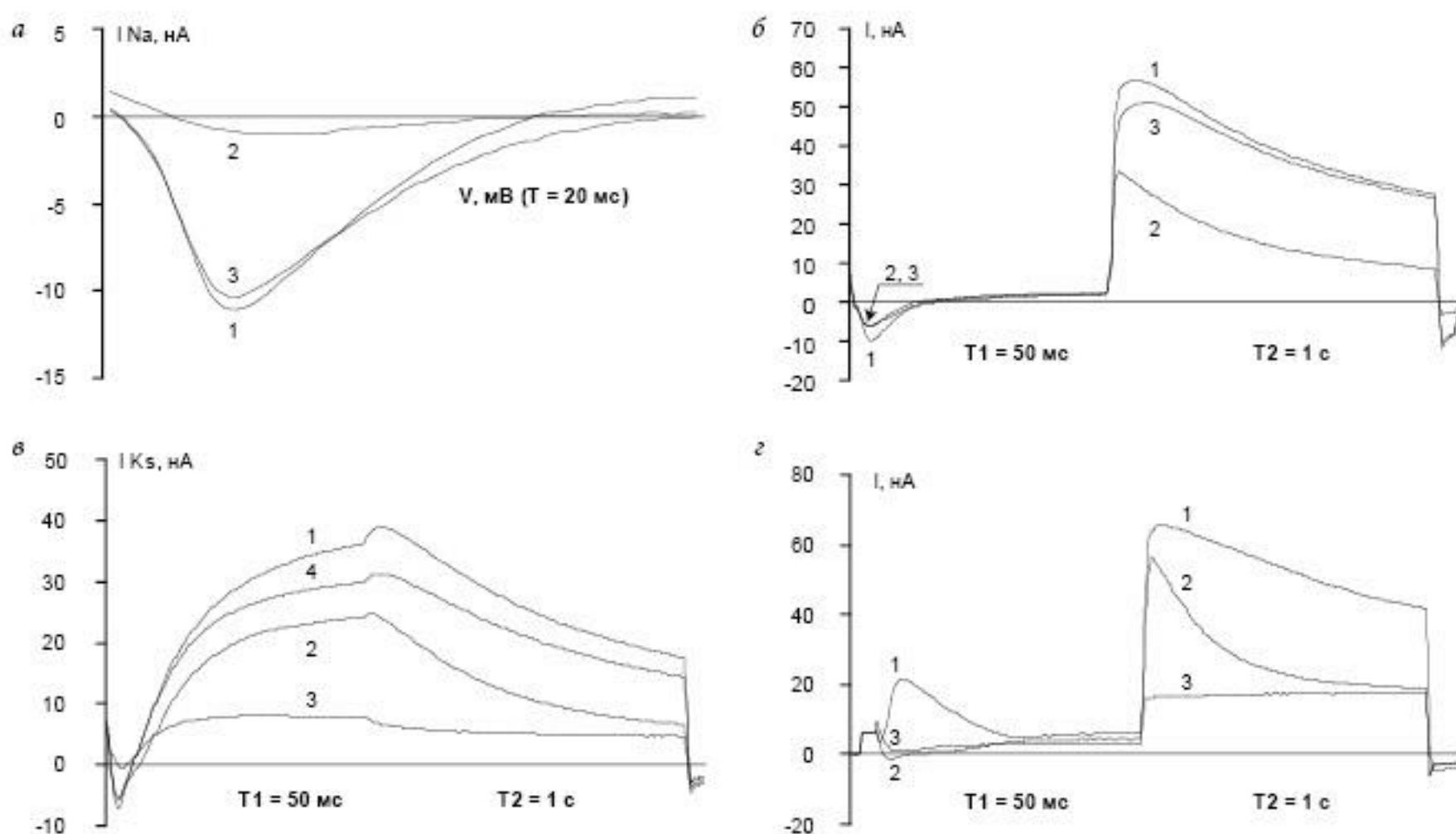


Рис. 5. Примеры изменений амплитуд и кинетики развития ионных токов под влиянием севофлурана; а – изменения натриевых токов; 1 – контроль, 2 – севофлуран 5 мМ, 3 – отмывание; б – входящие натрий-кальциевые (в левой части кривых) и выходящие медленные калиевые токи (в правой части); 1 – контроль, 2 – севофлуран 1 мМ, 3 – отмывание; в – характер изменений амплитуды и кинетики (активации и инактивации) калиевого медленного тока; 1 – контроль, 2 – 1 мМ, 3 – 5 мМ, 4 – отмывание; г – подавление севофлураном быстрого калиевого тока (в левой части кривых) и ускорение инактивации медленного калиевого тока (в правой части, кривая 2); 1 – контроль, 2 – 1 мМ, 3 – 5 мМ. По оси абсцисс – а – потенциал и время (пилообразное смещение потенциала от -40 до 10 мВ в течение 20 мс); б – время; по оси ординат – ионные токи. Поддерживаемый потенциал -90 мВ, тестирующие: на а – от -40 до 10 мВ, на б–г – 1-я ступенька (T1) – 0 мВ, 2-я (T2) – 30 мВ

ионных токов. Полного восстановления не происходило потому, что севофлуран в концентрации 5 мМ оказывал «повреждающее» действие на нейроны. Характерный пример таких эффектов представлен на рис. 6.

До настоящего времени не существует единой общепризнанной теории действия анестетиков [20]. По этой причине продолжают исследования их влияния на организм, в том числе на клеточно-молекулярном уровне, уточняют молекулярные

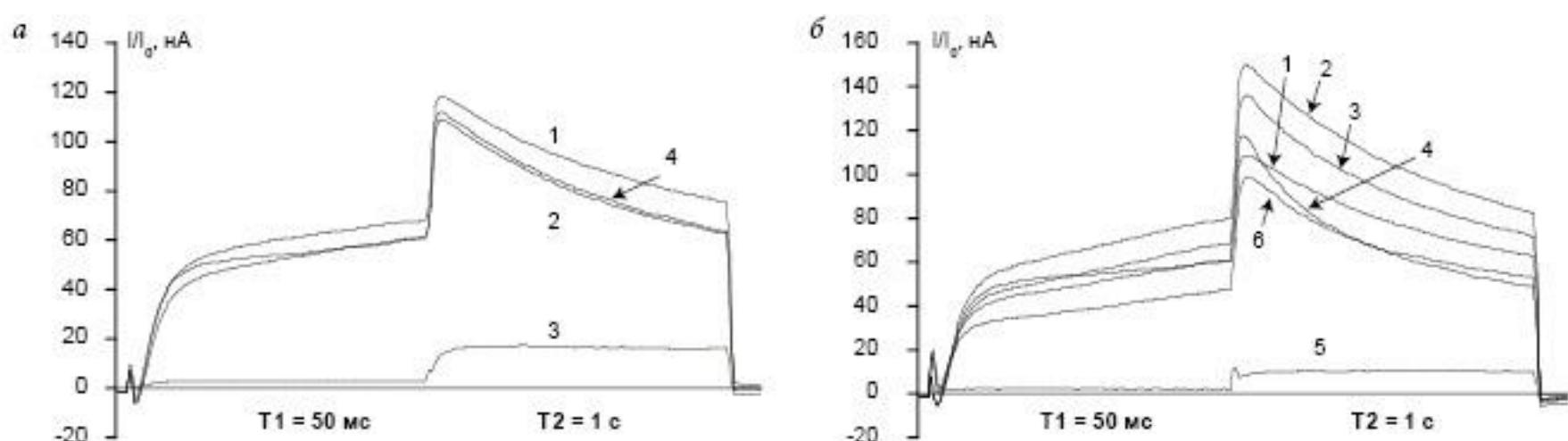


Рис. 6. Различия в подавлении ионных токов севофлураном при его действии с наружной (б) и внутренней (б) сторон мембранны нейронов; а – внеклеточное действие; 1 – контроль, 2 – СФ 1 мМ, 3 – 5 мМ, 4 – отмывание; б – внутриклеточное действие; 1 – контроль, 2 – СФ 5 мМ изнутри (2 мин), 3 – 5 мМ (3 мин), 4 – 5 мМ (4 мин) + СФ 1 мМ снаружи, 5 – 5 мМ (6 мин) + СФ 5 мМ снаружи, 6 – отмывание СФ изнутри и снаружи 3 мин. По оси абсцисс: время; по оси ординат – ионные токи. Поддерживаемый потенциал -90 мВ, тестирующие: 1-я ступенька (T1) – 0 мВ, 2-я (T2) – 30 мВ

механизмы и места связывания в клетке. Лиганд-зависимые ионные каналы, глициновые рецепторы, нейрональные никотиновые ацетилхолиновые рецепторы, рецепторы NMDA и глутамата, а также потенциалозависимые ионные каналы (кальциевые, калиевые и натриевые) рассматривают как молекулярные мишени [7, 9, 11, 14, 15] для различных ингаляционных анестетиков, подавляющих амплитуды потенциалов и ионные токи. Блокада пресинаптических ПД, связанных с Na^+ и Ca^{2+} -каналами, приводит к уменьшению выброса нейромедиаторов [7–11, 14, 15, 17, 19]. Характер подавления ионных токов различными ингаляционными анестетиками неодинаков. Например, для натриевых каналов по степени подавления они располагаются в ряд: галотан > изофлуран = севофлуран > энфлуран > десфлуран [15].

Гиперполяризация клеточных мембран при действии десфлурана и севофлурана может быть связана с активацией электрогенного транспорта ионов натрия, со снижением пассивной проницаемости мембраны к ионам натрия или увеличением проницаемости к ионам калия. Деполяризация клеток может объясняться подавлением электрогенной части в работе натрий-калиевого насоса и с изменениями пассивной проницаемости клеточных мембран к ионам натрия и калия, в особенности в концентрациях 5–10 мМ. Снижение частоты ИА при гиперполяризации клеток, вероятно, обусловлено снижением возбудимости клеток как вследствие самой гиперполяризации, так и блокированием анестетиками части каналов входящего тока для ионов натрия и кальция. Увеличение частоты ИА при деполяризации связано преимущественно с повышением возбудимости нейронов, со снижением критического уровня деполяризации для возникновения ПД. Отчасти последним обусловлена и генерация пачек импульсов под влиянием анестетиков, что может вести к усиленному выбросу медиаторов.

Подавление амплитуд ионных токов может происходить из-за непосредственного блокирования ионных каналов для соответствующих ионов (натрия, кальция и калия), нельзя исключить и насыщение анестетиками липидной фазы мембран и нарушение функций ионных каналов. Так, для натриевых каналов ($\text{NaV}1.4$) величина EC-50 для севофлурана составляет $1,21 \pm 0,03$ мМ, десфлурана – $1,68 \pm 0,09$ мМ [15], а в наших экспериментах для суммарных входящих токов (рис. 4а) порядка 3 мМ – различия не такие уж существенные. Ускорение инактивации калиевых медленных токов может прямо свидетельствовать о том, что при открывании каналов анестетики входят в открытые каналы и снижают амплитуду токов. Результаты наших экспериментов демонстрируют, что под влиянием ингаляционных анестетиков длительность ПД увеличивается в меньшей степени, чем при действии ТЭА, что можно объяснить тем,

что анестетики примерно в равной степени подавляют как натрий-кальциевые, так и калиевые токи, а ТЭА – преимущественно калиевые медленные токи (данные литературы и рис. 2а, 2 и рис. 3, 2).

В целом полученные результаты согласуются с известными из литературы фактами как по эффектам прямого воздействия на нервные клетки, так и по диапазону эффективных концентраций ингаляционных анестетиков. Однако неэффективность подавления ионных токов севофлураном при его внутриклеточном приложении к внутренней стороне мембранны нейронов по сравнению с его эффективностью при внеклеточном действии, на наш взгляд, является принципиально важным. Это означает, что мишенью для севофлурана на внутренней стороне мембранны нет или они недоступны. В литературе подобных фактов для севофлурана не обнаружили. На основании результатов настоящей работы и учитывая данные литературы можно говорить о тройственном электрофизиологическом действии севофлурана на нейроны: гиперполяризация клеток, незначительное подавление ионных токов (блокирование ионных каналов), снижение эффективности синаптических взаимодействий. В совокупности эти эффекты способствуют снижению возбудимости нейронов, подавлению активности нейронных сетей, притормаживанию («успокоению») их деятельности, что может быть ассоциировано со способностью препарата отключать сознание. Предложенная экспериментальная модель может быть использована для углубленного изучения клеточных механизмов действия ингаляционных анестетиков, а также для сравнительных исследований общих анестетиков разных групп и экстраполяции клеточных данных на системный уровень.

Выводы

- Ингаляционные анестетики десфлуран и севофлуран дозозависимо и обратимо изменяют электрическую активность нейронов моллюсков. В концентрации 1 мМ примерно равноэффективно для обоих анестетиков и обратимо они вызывают гипер- (на $6,3 \pm 2,3\%$ от контроля) или деполяризацию нейронов на $4,4 \pm 2,2\%$. При гиперполяризации снижается частота ИА, при деполяризации она возрастает, параметры ПД изменяются незначительно. На нейронах с низким исходным уровнем функционального состояния вследствие гиперполяризации анестетики в малой концентрации оказывают «активирующее» действие – улучшающее исходное состояние.

- Севофлуран в концентрации 5 мМ обратимо деполяризует нейроны на $9,4 \pm 2,2\%$ от контроля, при этом возрастает частота ИА, снижается амплитуда ПД, возрастает их длительность и иногда может полностью подавляться генерация ПД. На фоне

действия севофлурана в концентрации 5 мМ развивается обратимая гиперполяризация нейронов до $18,1 \pm 16,9\%$. Десфлуран в концентрации 10 мМ оказывает действие, подобное севофлурану в концентрации 5 мМ. При отмывании и после длительного (более 5 мин) действия анестетиков может возникать выраженная гиперполяризация нейронов.

3. Ингаляционные анестетики могут обратимо инициировать генерацию пачек ПД.

4. Севофлуран (как и десфлуран) в концентрациях от 0,5 до 5 мМ обратимо и в зависимости от концентрации примерно в равной степени подавляет натриевые, кальциевые и калиевые ионные токи (в концентрации 5 мМ – на 70–90% от контроля).

5. Севофлуран подавляет ионные токи только при его внеклеточном приложении (с наружной стороны мембранны) и неэффективен при внутриклеточном (с внутренней стороны) даже в концентрации 5 мМ.

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» Минздрава РФ
197022, г. Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, 6/8.
Тел. 8 (812) 499–71–02.

Вислобоков Анатолий Иванович

доктор биологических наук, заведующий отделом нейрофармакологии, старший научный сотрудник института фармакологии им. А. В. Вальдмана
E-mail: vislobokov@yandex.ru

Звартау Эдвин Эдуардович

доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии, директор Института фармакологии им. А. В. Вальдмана,
E-mail: zvartau@gmail.com, zvartau@spb-gnu.ru

Полушкин Юрий Сергеевич

член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой анестезиологии и реаниматологии, проректор по научной работе, руководитель научно-клинического центра анестезиологии и реаниматологии.
E-mail: polushin1@gmail.com

Алферова Владислава Владимировна

клинический ординатор кафедры анестезиологии и реаниматологии.

Буханков Иван Григорьевич

заведующий отделением анестезиологии-реанимации научно-клинического центра анестезиологии и реаниматологии.

Литература

1. Вислобоков А. И., Игнатов Ю. Д., Галенко-Ярошевский П. А. и др. Мембранотропное действие фармакологических средств. – СПб. – Краснодар: Просвещение-Юг, 2010. – 528 с.
2. Вислобоков А. И., Игнатов Ю. Д., Середенин С. Б. Изменения электрической активности нейронов под влиянием афобазола // Экспер. и клин. фарм. – 2012. – Т. 75, № 6. – С. 3–7.
3. Вислобоков А. И., Шабанов П. Д. Клеточные и молекулярные механизмы действия лекарств. – Серия: Цитофармакология. – Т. 2. – СПб.: Информ-Навигатор, 2014. – 624 с.
4. Лихвандцев В. В., Ильин Ю. В., Шмелева Е. А. и др. Влияние выбора метода анестезии на возникновение и развитие расстройств сознания в послеоперационном периоде у пациентов с церебро-васкулярной недостаточностью // Вестн. анестезиол. и реаниматол. – 2014. – № 6. – С. 5–15.
5. Толкунов Ю. А., Сибаров Д. А., Фролов Д. С. Активность первичных афферентных нейронов тонкой кишки при действии гистамина модулируется дефенсионом HNP-1 // Сенсорн. сист. – 2009. – Т. 23, № 1. – С. 79–86.
6. Namakawa T, Feng Z. P, Grigoriv N. et al. Sevoflurane induced suppression of inhibitory synaptic transmission between soma-soma paired Lymnaea neurons // J. Neurophysiol. – 1999. – Vol. 82, № 5. – P. 2812–2819.
7. Hemmings H. C. Neuroprotection by Na⁺ channel blockade // J. Neurosurg. Anesthesiol. – 2004. – Vol. 16. – P. 100–101.
8. Hemmings H. C. Sodium channels and the synaptic mechanisms of inhaled anaesthetics // British J. Anaesthesia. – 2009. – Vol. 103, № 1. – P. 61–69.
9. Hirota K, Fujimura J, Wakasugi M, Ito Y. Isoflurane and sevoflurane modulate inactivation kinetics of Ca²⁺ currents in single bullfrog atrial myocytes // Anesthesiol. – 1996. – Vol. 84, № 2. – P. 377–383.
10. Hirota K, Roth S. H. The effects of sevoflurane on population spikes in CA1 and dentate gyrus of the rat hippocampus *in vitro* // Anesth. Analg. – 1997. – Vol. 85. – P. 426–430.
11. Kamatchi G. L., Chan C. K., Snutch T. et al. Volatile anesthetic inhibition of neuronal Ca²⁺ channel currents expressed in Xenopus oocytes // Brain Res. – 1999. – Vol. 831. – P. 85–96.
12. Landoni G., Biondi-Zoccali G. G., Zangrillo A. et al. Desflurane and sevoflurane in cardiac surgery: a meta-analysis of randomized clinical trials // J. Cardiothoracic and Vascular Anesthesia. – 2007. – Vol. 21, № 4. – P. 502–511.
13. Landoni G., Fochi O., Tritapepe L. et al. Cardiac protection by volatile anesthetics // Minerva Anestesiol. – 2009. – Vol. 75, № 5. – P. 269–273.
14. Namba T, Ishii T. M., Ikeda M. et al. Inhibition of the human intermediate conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel, hIK1, by volatile anesthetics // Eur. J. Pharmacol. – 2000. – Vol. 395, № 2. – P. 95–101.
15. Ouyang W, Herold K. F., Hemmings H. C. Comparative effects of halogenated inhaled anesthetics on voltage-gated Na⁺ channel function // Anesthesiol. – 2009. – Vol. 110, № 3. – P. 582–590.
16. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria. – 2014. URL <http://www.R-project.org/>.
17. Weigt H. U., Kwok W. M., Rehmert G. C. et al. Voltagedependent effects of volatile anesthetics on cardiac sodium current // Anesth. Analg. – 1997. – Vol. 84. – P. 285–293.
18. Wu X, Lu Y, Dong Y. et al. The inhalation anesthetic isoflurane increases levels of proinflammatory TNF- α , IL-6, and IL-1 β // Neurobiol Aging. – 2012. – Vol. 33. – P. 1364–1378.
19. Wulf H., Ledowski T., Linstedt U. et al. Neuromuscular blocking effects of rocuronium during desflurane, isoflurane, and sevoflurane anaesthesia // Can. J. Anaesth. – 1998. – Vol. 45. – P. 526–532.
20. Young C. J., Apfelbaum J. L. Inhalational anesthetics: desflurane and sevoflurane // J. Clin. Anesth. – 1995. – Vol. 7. – P. 564–577.

References

- Vislobokov A.I., Ignatov Yu.D., Galenko-Yaroshevsky P.A. et al. *Membranotropnoye deistviye farmakologicheskikh sredstv.* [Membrane-acting action of pharmaceutical substances]. SPb., Krasnodar, Prosvetsheniye Yug Publ., 2010, 528 p.
- Vislobokov A.I., Ignatov Yu.D., Seredenin S.B. Changes of neuron electric activity under aphenobarbital action. *Eksper. i klin. farm.* 2012, vol. 75, no. 6, pp. 3-7. (In Russ.)
- Vislobokov A.I., Shabanov P.D. *Kletochnye i molekulyarnye mehanizmy deistviya lekarstv. Seriya: Tsitopharmacologiya.* [Cellular and molecular mechanisms of drug actions. Series: Cytopharmacology]. vol. 2, St. Petersburg, Inform-Navigator Publ., 624 p.
- Likhvatsev V.V., Ilyin Yu.V., Shmeleva E.A. et al. Impact of anesthesia method on beginning and progression of consciousness disorders in postoperative period in patients with cerebral vascular insufficiency. *Vestnik Anestesiologii i Reanimatologii*, no. 6, 2014, pp. 5-15. (In Russ.)
- Tolkunov Yu.A., Sibarov D.A., Frolov D.S. Action of primary afferent neurons of the small bowel is modulated by HNP-1 defensin by the histamine action. *Sensorn. Sist.*, 2009, vol. 23, no. 1, pp. 79-86. (In Russ.)
- Hamakawa T., Feng Z.P., Grigoriv N. et al. Sevoflurane induced suppression of inhibitory synaptic transmission between soma-soma paired Lymnaea neurons. *J. Neurophysiol.* 1999, vol. 82, no. 5, pp. 2812-2819.
- Hemmings H.C. Neuroprotection by Na^+ channel blockade. *J. Neurosurg. Anesthesiol.* 2004, vol. 16, pp. 100-101.
- Hemmings H.C. Sodium channels and the synaptic mechanisms of inhaled anaesthetics. *British J. Anaesthesia*. 2009, vol. 103, no. 1, pp. 61-69.
- Hirota K., Fujimura J., Wakasugi M., Ito Y. Isoflurane and sevoflurane modulate inactivation kinetics of Ca^{2+} currents in single bullfrog atrial myocytes. *Anesthesiol.* 1996, vol. 84, no. 2, pp. 377-383.
- Hirota K., Roth S.H. The effects of sevoflurane on population spikes in CA1 and dentate gyrus of the rat hippocampus *in vitro*. *Anesth. Analg.* 1997, vol. 85, pp. 426-430.
- Kamatchi G.L., Chan C.K., Snutch T. et al. Volatile anesthetic inhibition of neuronal Ca^{2+} channel currents expressed in Xenopus oocytes. *Brain Res.* 1999, vol. 831, pp. 85-96.
- Landoni G., Biondi-Zoccali G.L., Zangrillo A. et al. Desflurane and sevoflurane in cardiac surgery: a meta-analysis of randomized clinical trials. *J. Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*. 2007, vol. 21, no. 4, pp. 502-511.
- Landoni G., Fochi O., Tritapepe L. et al. Cardiac protection by volatile anesthetics. *Minerva Anestesiologica*. 2009, vol. 75, no. 5, pp. 269-273.
- Namba T., Ishii T.M., Ikeda M. et al. Inhibition of the human intermediate conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel, hIK1, by volatile anesthetics. *Eur. J. Pharmacol.* 2000, vol. 395, no. 2, pp. 95-101.
- Ouyang W., Herold K.F., Hemmings H.C. Comparative effects of halogenated inhaled anesthetics on voltage-gated Na^+ channel function. *Anesthesiol.* 2009, vol. 110, no. 3, pp. 582-590.
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria. 2014, URL <http://www.R-project.org/>.
- Weigt H.U., Kwok W.M., Rehmert G.C. et al. Voltagedependent effects of volatile anesthetics on cardiac sodium current. *Anesth. Analg.* 1997, vol. 84, pp. 285-293.
- Wu X., Lu Y., Dong Y. et al. The inhalation anesthetic isoflurane increases levels of proinflammatory TNF- α , IL-6, and IL-1 β . *Neurobiol Aging*. 2012, vol. 33, pp. 1364-1378.
- Wulf H., Ledowski T., Linstedt U. et al. Neuromuscular blocking effects of rocuronium during desflurane, isoflurane, and sevoflurane anaesthesia. *Can. J. Anaesth.* 1998, vol. 45, pp. 526-532.
- Young C.J., Apfelbaum J.L. Inhalational anesthetics: desflurane and sevoflurane. *J. Clin. Anesth.* 1995, vol. 7, pp. 564-577.