

СТАБИЛИЗАЦИЯ БИСЛОЙНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН МЕСТНЫМИ АНЕСТЕТИКАМИ

Л. Г. МИКАЕЛЯН, А. К. КАРАПЕТЯН

Ереванский физический институт ГКАЭ СССР

На основании экспериментальных кривых $I_{gr} \sim I(U)$, а также значений поверхностного натяжения и удельной электрической емкости БЛМ из общих липидов мозга и яичного фосфатидилэтаноламина вычислены значения линейного натяжения кромки поры γ . Характеризующего устойчивость БЛМ в электрическом поле в теории электрического пробоя мембран. Показано, что МА—тримеканин, пропранолол и бензокаин стабилизируют структуру БЛМ, увеличивая γ . Предполагается, что аналогичный механизм лежит в основе стабилизирующего действия АЛС на биологические мембраны.

$I_{gr} \sim f(U)$ փորձնական կորերի, ինչպես նաև ուղեղի բնօրգանուց իպոֆոսֆորիլ և ձիթ ֆոսֆատիդիլէթանոլամինից կազմված երկչափ իպոֆոսֆորիլ թաղանթների (I_{gr}) մադիերնությունից շարժանության և տեսակարար ուժաշուժան արժեքների հիման վրա հաշվված է անջրի եղրի զնային շարժանությունը γ որը, ըստ թաղանթների էլեկտրական իջման տեսության, էլեկտրական դաշտում ԱԼՄ կայունությունը բնութագրող հիմնական սարամետրն է։ Չորս է արված, որ տեղային աննստեռիկներ արհմեկախերը, պրոպրանոլոլը և բենզոկաինը կայունացնում են ԱԼՄ, մեծացնելով γ -ը։ Անալոգիկո է, որ կենսաբանական թաղանթների վրա ամֆիֆիլ դեղանյութերի կայունացնող ազդեցության իմքրում ընկած է էությունից մեխանիզմը։

The values of linear tension of pore edge γ , characterizing BLM stability of electric field in the theory of electrical breakdown of membranes are calculated on the basis of experimental curves $I_{gr} \sim f(U)$ and the values of surface tension and specific capacity of BLM composed of brain total lipids and egg prosophatidylethanolamine. The local anesthetics—trimecaine, propranolol and benzocaine — are shown to stabilize the BLM structure by increasing γ . It is assumed that the stabilizing action of amphiphilic drugs on biological membranes is based on an analogous mechanism.

Мембраны бислоиные липидные — местные анестетики.

Общим свойством амфифильных поверхностей—активных соединений, в том числе и лекарственных (МА, транквилизаторы, бета-адренергические блокаторы и др.), является их способность увеличивать устойчивость (стабилизировать) биологических мембран к различным типам лизиса при низких и уменьшать ее (дестабилизировать) при высоких концентрациях [22]. Поэтому, как правило, кривые доза—эффект имеют бифазный характер. Влияние высоких, дестабилизирующих концентраций амфифилов на биологические мембраны обычно необратимо, поскольку связано с солюбилизацией мембранных компонентов. В большинстве случаев фаза дестабилизации наблюдается при ККМ амфифилов [12].

Сокращения: МА—местные анестетики, БЛМ—бислоиные липидные мембраны, АЛС—амфифильные лекарственные соединения, ККМ—критическая концентрация микеллообразования

Молекулярный механизм стабилизирующего действия АЛС на биологические мембраны в настоящее время неизвестен. Существующие теории (текучесть мембраны [19], расширение мембраны [16], фазовые переходы [26]), хотя и базируются на прочном фундаменте многочисленных экспериментальных данных, подтверждающих справедливость правила Мейера-Овертона, тем не менее испытывают затруднения при объяснении эффектов низких, стабилизирующих концентраций АЛС на биологические мембраны (критический анализ этих теорий проведен недавно [13]).

Тот факт, что «мембранными стабилизаторами» являются соединения самой различной химической природы, указывает на неспецифический характер их действия на биологические мембраны и первичную «мишень» — липидный матрикс.

Плоские БЛМ являются относительно простой, удобной и адекватной модельной системой для изучения роли липидного матрикса биологических мембран в мембранотропных эффектах АЛС. Несмотря на это, систематические исследования этого вопроса в литературе отсутствуют. Исключение составляет, пожалуй, только работа Оки [18], в которой показано, что низкие концентрации МА прокаинового ряда увеличивают, а высокие — уменьшают сопротивление БЛМ по постоянному току и устойчивость к разрушающему действию асимметрично добавленных ионов кальция. Увеличение сопротивления БЛМ по постоянному току при действии низких концентраций тексабарбитала и тетракаина обнаружено также Пилучетти с соавт. [20]. Недавно нами было показано, что субклинические и близкие к клиническим концентрации пропранолола, дибукаина и лидокаина также увеличивают удельное электрическое сопротивление БЛМ [2]. В последние годы разработаны теория электрического пробоя мембраны и экспериментальные методы изучения физико-химического механизма этого процесса на БЛМ [9]. Используя метод изучения устойчивости БЛМ в электрическом поле, мы показали, что низкие концентрации АЛС увеличивают среднее время жизни (t) БЛМ при данном потенциале [3–5]. В работе [4] была проведена приближенная оценка изменения линейного натяжения кромки поры γ в мембране (см. формулу в разделе «Материал и методика») от концентрации бензокаина, которая показала удовлетворительное совпадение с ходом кривой зависимости $\lg t$ БЛМ от концентрации бензокаина.

В настоящей работе проведена более корректная оценка параметра γ в контроле и при действии трех МА — тримекана, пропранолола и бензокаина на устойчивость БЛМ в электрическом поле.

Материал и методика. Мембраны формировали нанесением капли липидного раствора на 1-миллиметровое отверстие в перегородке, разделяющей экспериментальную камеру из тefлона на два эквивалентных отсека. Исследовали мембраны из липидов или декан-гептаиловых растворов (20 мг липида в 1 мл растворителя) общих липидов мозга быка, выделенных по Мюллеру с соавт. [17], и яичного фосфатидилацетата производства Дальневосточного госуниверситета. Температура и электрический состав водных растворов даны в обыкновении к таблице. Время жизни (t) БЛМ определяли по обычной методике [9]. Степеньку постоянного напряжения подавали на БЛМ от генератора Г-6-28 с использованием хлорсеребряных электродов, непосред-

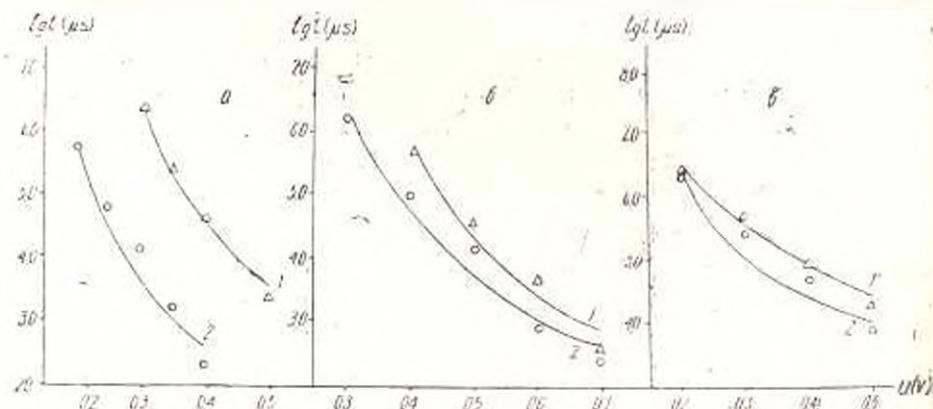
ственно контактирующих с раствором электролита. Регистрацию \bar{t} БЛМ проводили на запоминающем осциллографе С8-13. Процесс формирования БЛМ контролировали с помощью бинокляра МБС-2. Электрическую емкость БЛМ определяли на переменном токе частотой 159 Гц и амплитудой ± 20 мВ. Поверхностное натяжение (σ) мембран оценивали по изменению электрической емкости в условиях гидростатического давления через мембрану [1]. Аптечные препараты тримекаина гидрохлорида и пропранолол гидрохлорида вносили в водный раствор, в котором формировали мембраны. Кристаллический бензокаин из-за низкой растворимости в воде растворяли в метаноле и для приготовления конечного мембраноформирующего раствора смешивали с хлороформ-метанольным экстрактом липидов.

Вычисление величины линейного натяжения кромки поры в БЛМ проводили в соответствии с представлениями [9], согласно которым \bar{t} БЛМ в электрическом поле зависит от линейного натяжения:

$$\bar{t} \sim \Lambda \exp \left[\frac{\pi \gamma^2}{kT (\epsilon + 0.5 C U^2)} \right],$$

где kT — характерная тепловая энергия, C — удельная электрическая емкость, ϵ и $\epsilon_{\text{н}}$ — диэлектрические постоянные воды и гидрофобной области мембраны соответственно. Величину γ определяли по данной формуле из экспериментальных кривых $\lg \bar{t} \sim I(U)$ методом наименьших квадратов.

Результаты и обсуждение. На рисунке представлены кривые $\lg \bar{t} \sim I(U)$ в контроле и при действии тримекаина, пропранолола и бензокаина. Видно, что все препараты увеличивают \bar{t} БЛМ относительно контроля. Наиболее сильный эффект стабилизации наблюдается при действии $1,75 \times 10^{-5}$ М тримекаина на БЛМ из фосфатидилэтаноламина. На биослоях из общих липидов пропранолол в концентрации 10^{-4} М более эф-



Зависимость $\lg \bar{t}$ БЛМ от напряжения — сплошные линии — теоретические кривые, символы — экспериментальные точки: кружки — в отсутствие местных анестетиков, треугольники — в присутствии (а) $1,75 \times 10^{-5}$ М тримекаина, (б) 10^{-4} М пропранолола, (в) 10^{-3} М бензокаина. Мембраны из чистого фосфатидилэтаноламина (а) и общих липидов (б и в). Количество мембран на точку менее 20-ти; величина символов соответствует средне-квадратичному отклонению.

фективнее, чем бензокаин в концентрации 10^{-3} М. Необходимо отметить, что использованные концентрации анестетиков являются субклиническими или близкими к клиническим. Согласно литературным данным, их клинические концентрации соответственно равны: для тримекаина 10^{-4} М [8], пропранолола — $2,4 \times 10^{-4}$ М [21] и бензокаина — 10^{-3} М и более [25].

Выбор концентраций МА, использованных в настоящей работе, определяли либо величиной максимального эффекта стабилизации при получении кривой доза—эффект [4], либо заметным увеличением σ БЛМ при действии различных низких концентраций пропранолола и тримеканна.

Для вычисления величины γ необходимо знать значения величины σ и C БЛМ. Результаты измерений этих параметров даны в таблице. Из представленных данных видно, что σ БЛМ увеличивается в присутствии всех трех МА, причем тримеканн и бензокаин более эффективны, чем пропранолол. Полученные контрольные значения σ БЛМ из общих липидов— $1,75 \times 10^3$ и $3,5 \times 10^3$ Н/м в одном случае ниже, в другом—выше известных в литературе значений для этого липида ($2-3 \times 10^3$ Н/м) [19, 20]. Эти расхождения в величинах σ , как нам кажется, связаны с различным электролитным составом водных растворов, использованных нами в экспериментах с бензокаином и пропранололом, а также в водных растворах, в которых был определен этот параметр [6, 7].

Величины удельной электрической емкости, поверхностного натяжения и линейного натяжения кромки поры БЛМ в контроле и в присутствии трех местных анестетиков

Анестетик	$C_m \times 10^{-3}$ Ф/м ²	$\sigma_m \times 10^3$ Н/м	$\gamma \times 10^{-11}$ Н
Тримеканн *	$5,63 \pm 0,30$ ($5,04 \pm 0,06$)	$2,45 \pm 0,10$ ($1,3 \pm 0,3$)	1,29 (0,89)
Пропранолол **	$4,95 \pm 0,20$ ($3,42 \pm 0,40$)	$4,18 \pm 0,14$ ($3,5 \pm 0,3$)	1,6 (1,25)
Бензокаин ***	$2,6 \pm 0,11$ ($3,42 \pm 0,40$)	$4,40 \pm 0,33$ ($1,75 \pm 0,13$)	0,83 (0,73)

В скобках даны контрольные значения параметров БЛМ. * небуферный 0,1 М раствор КСl, температура 25°C, ** 0,1 М раствор КСl, К₂А фосфатный буфер, рН 7,2, температура—22°, *** 1 М КСl, три-НСl буфер, рН 7,2, ЭДГА (5×10^{-6} М), температура—22°.

В отличие от поверхностного натяжения удельная емкость БЛМ при действии МА изменяется неодинаково. Данные таблицы показывают, что тримеканн и пропранолол увеличивают, а бензокаин уменьшает значение этого параметра. Тем не менее оба результата согласуются с литературными данными. Тьен [23] показал, что пропранолол в концентрации 10^{-6} М увеличивает удельную электрическую емкость бислоев от 3,5 до $4,2 \times 10^{-3}$ Ф/м². С другой стороны, согласно Ашкрофту с соавт. [10], нейтральный бензиловый спирт уменьшает удельную емкость водитиловых бислоев на 15%. Такое разнонаправленное действие катионных (пропранолол и тримеканн) и нейтральных (бензиловый спирт и бензокаин) МА на удельную электрическую емкость липидных бислоев может быть связано с их различной локализацией в мембране [11, 14, 18].

Вычисление значений γ по кривым $a-v$ на рисунке с использованием значений σ и C показало, что все три МА увеличивают линейное натяжение кромки поры в БЛМ. Разность между «вытытыми» и контрольными величинами составляет соответственно: для тримеканна—0,4, пропранолола—0,35 и бензокаина—0,10. В пределах одного и то-

го же липида пропранолол более эффективен, чем бензокаин. Этот результат отражает относительную анестетическую эффективность этих препаратов. Вместе с тем близкие значения γ , полученные при действии тримеканна и пропранолола на БЛМ из различных липидов, также хорошо коррелирует с их анестетической потенцией.

Таким образом, результаты настоящей работы показывают, что низкие концентрации МА стабилизируют структуру плоских липидных бислоев, увеличивая их устойчивость в электрическом поле. Это увеличение устойчивости БЛМ связано с увеличением как поверхностного натяжения бислоев, так и, что более существенно, с возрастанием значения линейного натяжения кромки поры в БЛМ.

Полученные данные свидетельствуют в пользу липидной концепции стабилизирующего действия ЛЭС на биомембраны [15] и могут быть привлечены также для объяснения механизма местной анестезии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кругляков И. М., Ровин Ю. Г. Физикохимия черных углеводородных пленок. 33, М., 1978.
2. Михаелян Л. Г., Карапетян А. К., Курянн Е. И. Биолог. ж. Армении. 36, 566—570, 1983.
3. Михаелян Л. Г., Карапетян А. К., Аджян С. А. Биолог. ж. Армении. 38, 29—37, 1985.
4. Михаелян Л. Г., Карапетян А. К., Аджян С. А. Биолог. ж. Армении, 39, 241—244, 1986.
5. Михаелян Л. Г., Карапетян А. К., Аджян С. А. X Всесоюз. конф. по биохимии нервной системы, тезисы, 133. Горький, 1987.
6. Пекашев В. А., Берестовский Г. Н. Физико-химические свойства бимолекулярных липидных мембран. ВИНТИ № 1888-27 деп., 12. Пушкино, 1975.
7. Пастушенко В. Ф., Черномордик Л. В., Чизмаджев Ю. А. Биол. мембраны, 2, 813—819, 1985.
8. Прякишикова И. Т. Успехи в создании лекарственных средств. 227—270. М., 1973.
9. Чизмаджев Ю. А., Черномордик Л. В., Пастушенко В. Ф., Абилян Н. Г. Биофизика мембран, т. 2, Итоги науки и техники 161—266. М., 1982.
10. Ashcroft R. G., Coster H. G. L., Smith J. M. Nature, 269, 819—820, 1977.
11. Brasseur R., Ruyschaert J. M., Chantoin P. Biochem. Biophys. Acta, 815, 341—350, 1985.
12. Fernandez M. S. Biochem. Biophys. Acta, 597, 83—97, 1980.
13. Franks N. P., Lieb W. R. Nature, 300, 487—492, 1982.
14. Kelusky F., Smith J. C. Mol. Pharmacol., 26, 314—321, 1984.
15. Lee A. G. Nature, 262, 545—548, 1976.
16. Matubays V., Ueda J. Anesthesiology, 59, 541—546, 1983.
17. Mueller P., Rudin D. O. Laboratory Techniques in Membrane Biophysics (ed. by Passow H., Stampfl R.), 141—156, Springer-Verlag, Berlin, 1969.
18. Ohki S. Biochem. Biophys. Acta, 219, 18—1970.
19. Pang K. Y., Braswell B. L. M., Chang L., Somner T. F., Miller K. W. Mol. Pharmacol., 18, 84—90, 1980.
20. Peluchetti D., Ragazzi M., Goria A. Experientia, 31, 569—570, 1975.
21. Roth S., Seeman P. Nature, 213, 281—285, 1971.
22. Seeman P. Pharmacol. Rev., 24, 583—655, 1972.
23. Shi P., Tien Y. H. Biophys. Acta, 859, 125—143, 1986.
24. Shillito P., Michaels L. Biophys. Struct. Meth., 10—1—9, 1983.
25. Suracz-Kurtz G., Hanch C. P., Krupp J. Eur. J. Pharmacol., 11, 125, 1970.
26. Trachtel J. R. Anesthesiology, 46, 5—10, 1977.

Получено 29 III 1988 г.