

ИНГИБИРОВАНИЕ ЭКОНАЗОЛОМ Ca^{2+} - И Pb^{2+} -ЗАВИСИМОГО ВЫХОДА K^+ ИЗ ЭРИТРОЦИТОВ

А.В. ГЮЛЬХАНДАНЯН*, А.К. БЛБУЛЯН**, Б.Г. САРКИСЯН*

*Институт биохимии им. Г.Х.Бунятыана НАН Армении, 375014, Ереван

**Центр перинатологии, акушерства и гинекологии МЗ Армении, Ереван

Изучено действие имидазольного антимикотика эконазола на активность Ca^{2+} - и Pb^{2+} -зависимых K^+ -каналов в эритроцитах человека. В области исследованных концентраций (25-100 мкМ) эконазол дозозависимо ингибирует выход K^+ и вход H^+ , индуцированный как активаторами Ca^{2+} -зависимого K^+ -канала, пропранололом и ионофором A23187, так и ионами Pb^{2+} .

Մարդու էրիթրոցիտներում ուսումնասիրված է հակամիկոտիկ նյութի էկոնազոլի ազդեցությունը Ca^{2+} -ից և Pb^{2+} -ից կախված K^+ -ական կանալների ակտիվության վրա: Շետազոլված կոնցենտրացիաների տիրույթում (25-100 մկՄ) էկոնազոլը, դոզայից կախված, ճնշում է K^+ -ի ելքը և H^+ -ի մուտքը, ինդուցված ինչպես Ca^{2+} -ից կախված K^+ -ական կանալի ակտիվատորներով իոնոֆոր A23187-ով և պրոպրանոլոլով, այնպես էլ Pb^{2+} -ի իոններով:

The action of econazole on activity of Ca^{2+} - and Pb^{2+} -dependent K^+ channels of human erythrocytes was studied. In the region of investigated concentrations (25-100 μ M) the econazole depending on dose inhibited K^+ efflux and H^+ influx induced as both activators of Ca^{2+} -dependent K^+ channel, ionophore A23187 and propranolol, as well as by Pb^{2+} ions.

Эритроциты человека - эконазол - Ca^{2+} - и Pb^{2+} -зависимый K^+ -канал

Известно, что имидазольный антимикотический препарат эконазол (1-[2-(14-хлорфенил) метокси]-2-(2,4-дихлорфенил)этил]-1H-имидазол) ингибирует Ca^{2+} -транспортные пути в лимфоцитах [10], причем этот процесс осуществляется при взаимодействии эконазола с внешней стороной клеточной мембраны [2]. Эконазол является также сильным ингибитором K^+ -токов через мембрану гладких мышц [1].

При увеличении концентрации Ca^{2+} в эритроцитах открывается Ca^{2+} -зависимый K^+ -канал [4-8, 14]. Выход K^+ из эритроцитов происходит также под действием ионов Pb^{2+} [12]. В литературе нет данных относительно влияния эконазола на транспорт ионов Ca^{2+} и K^+ в эритроцитах. В связи с этим нами изучено действие эконазола на активность Ca^{2+} - и Pb^{2+} -зависимых K^+ -каналов в эритроцитах человека.

Материал и методика. Эритроциты из крови доноров получали центрифугированием и затем дважды промывали в 0,15 М растворе NaCl. При проведении опытов 0,1 мл плотно отцентрифугированных эритроцитов добавляли в ячейку с 1,9 мл среды, содержащей 150 мМ холинхлорид и 0,1 мМ KCl, при интенсивном размешивании на магнитной мешалке. При определении Ca^{2+} -зависимого выхода K^+ в среде инкубации присутствовал также 1 мМ $CaCl_2$. Различные соединения добавляли после 5-7 мин инкубации эритроцитов. Действие эконазола на Ca^{2+} - и Pb^{2+} -зависимую K^+ -проницаемость эритроцитов человека изучали в области концентраций антимикотика от 25 до 100 мкМ.

Концентрации ионов K^+ и H^+ в суспензии эритроцитов определяли K^+ - и H^+ -селективными электродами, подключенными к самописцам через милливольтметры. Калибровку электродов производили стандартными добавками KCl и HCl.

Эконазол, пропранолол, ионофор A23187, $Pb(NO_3)_2$ - фирмы "Sigma", холинхлорид - "Сетарол", остальные реактивы отечественного производства.

Результаты и обсуждение. Известно, что пропранолол является одним из активаторов Ca^{2+} -зависимого K^+ -канала в эритроцитах человека [3,14], причем выход K^+ сопровождается входом протонов внутрь [3].

На рис. 1. представлена типичная картина влияния эконазола на индуцированный пропранололом Ca^{2+} -зависимый выход K^+ из эритроцитов. Внесение пропранолола (0,2 мМ) в суспензию эритроцитов вызывает интенсивный выход K^+ из клеток и сравнительно небольшой противотранспорт H^+ (сплошные кривые). Скорость выхода K^+ под действием пропранолола в условиях, представленных на рис.1, составляет около 2,8 ммоль/мин. л клеток. (Ранее нами было показано, что отношение K^+/H^+ лежит в интервале 3-4 [3]). Предварительная инкубация эритроцитов с 75 мкМ эконазола практически полностью ингибирует выход K^+ и вход H^+ (штриховые кривые на рис.1). Как видно из рис. 1, сам эконазол вызывает небольшой выход K^+ из клеток. В случае предварительной инкубации клеток с 30 мкМ эконазола выход K^+ подавлялся на 75%, в то время как вход H^+ полностью ингибировался (данные не представлены).

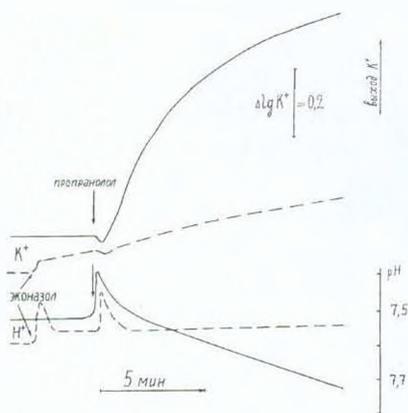


Рис. 1. Влияние эконазола на Ca^{2+} -зависимый K^+ -канал эритроцитов, индуцируемый пропранололом. 0,1 мл клеток внесены в 1,9 мл среды, содержащей 150 мМ холинхлорид, 0,1 мМ KCl и 1 мМ $CaCl_2$, $t = 25^\circ C$. Добавлены 0,2 мМ пропранолола и 75 мкМ эконазола.

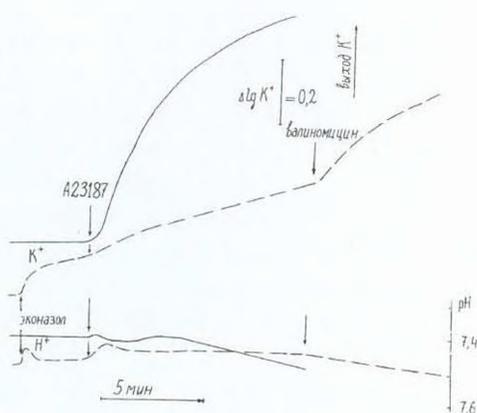


Рис. 2. Ингибирование эконазолом Ca^{2+} -зависимого K^+ -канала эритроцитов, индуцируемого ионофором A23187. Условия инкубации как в подписи к рис.1. Добавлены 10 мкМ A23187, 50 мкМ эконазола и 1 мкМ валиномицина.

Мы изучили также действие эконазола на ионные потоки, индуцируемые другим активатором Ca^{2+} -зависимого K^+ -канала - ионофором двухвалентных катионов A23187 (рис.2). Как и в случае с пропранололом, эконазол ингибировал Ca^{2+} -зависимый выход K^+ . Из рис.2 видно, что при внесении 50 мкМ эконазола выход K^+ и вход H^+ практически полностью подавлялись (сплошные кривые - контроль, штриховые кривые - действие эконазола). Последующее внесение переносчика ионов K^+ валиномицина снова приводило

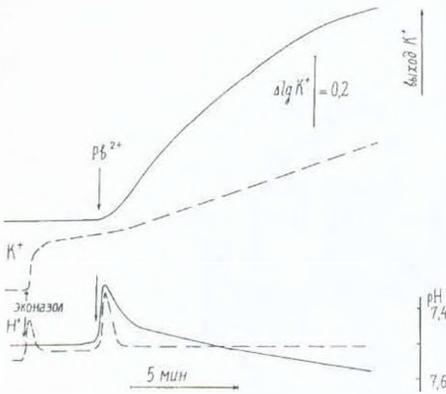


Рис.3. Действие эконазола на потоки ионов K^+ и H^+ , индуцируемые ионами Pb^{2+} . Условия инкубации как в подписи к рис.1, однако в среде отсутствует $CaCl_2$. Добавлены 20 мкМ $Pb(NO_3)_2$ и 30 мкМ эконазола.

к выходу K^+ . Как и в опыте с пропранололом, при инкубации эритроцитов с 25 мкМ эконазола, A23187-индуцированная K^+ -проницаемость подавлялась на 65%, а вход H^+ ингибировался полностью (данные не представлены).

Выход K^+ из эритроцитов происходит также под действием микромолярных концентраций ионов Pb^{2+} , причем этот процесс не зависит от присутствия ионов Ca^{2+} в среде. Мы проверили действие эконазола и на Pb^{2+} -зависимый выход K^+ из эритроцитов. Из рис.3 видно, что и в этом случае эконазол (30 мкМ) ингибирует Pb^{2+} -индуцируемый выход K^+ и вход H^+ .

Мы отмечаем, что эконазол может ингибировать в клетках различного типа как Ca^{2+} -транспортные пути, так и K^+ -токи [1,10]. И пропранолол, и A23187 активируют выход K^+ из эритроцитов, повышая внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} до определенной величины, хотя и механизм этого увеличения различен. Ионифор A23187 действует как переносчик, транспортирующий ионы Ca^{2+} по градиенту концентрации из внешнего пространства внутрь клетки (концентрация Ca^{2+} внутри эритроцитов порядка 10^{-7} М [9]). Механизм же индуцированного пропранололом входа Ca^{2+} внутрь клеток не вполне ясен. Есть данные об ингибировании пропранололом Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов [11], что может привести к увеличению результирующего потока Ca^{2+} в клетку. Кроме того, пропранолол увеличивает чувствительность канальных белков к Ca^{2+} [13]. Ca^{2+} -зависимый K^+ -канал в эритроцитах - это сложный комплекс, состоящий из системы транспорта Ca^{2+} и непосредственно K^+ -канала. Наши опыты показали, что эконазол может ингибировать как Ca^{2+} -зависимый выход K^+ , так и вызываемое ионами Pb^{2+} увеличение K^+ -проницаемости, не зависящее от ионов Ca^{2+} . Поэтому мы можем с уверенностью утверждать, что в эритроцитах эконазол ингибирует непосредственно K^+ -канал. Однако нельзя исключить также возможность влияния эконазола на систему транспорта Ca^{2+} в эритроцитах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bowles D.K., Dick G.M., Sturek M. Biophys. J. 70, A402, 1996.
2. Christian E.P., Togo J.A., Spencer K.T., Dargis P.G. Biophys. J., 68, A207, 1995.
3. Davtyan T.K., Gulkhandanyan A.V., Gambarov S.S., Avanesian L.A., Alexanyan Yu.T. Biochim. Biophys. Acta, 1297, 182-190, 1996.
4. Garcia-Sancho J., Sanchez J., Herreros B. Biochim. Biophys. Acta, 559, 118-130, 1979.

5. Gardos G. Biochim. Biophys. Acta, 10, 653-654, 1959.
6. Gyulkhandanyan A.V. Biol. Membr., 6(8), 1101-1114, 1993.
7. Lake W., Rasmussen H., Goodman D.P.B. J. Membr. Biol., 32, 93-113, 1977.
8. Lew V.L., Ferreira H.J. Curr. Top. Membr. Transp., 10, 217-277, 1978.
9. Lew V.L., Tsien R.Y., Miner C., Bookchip R.M. Nature, 296, 478-481, 1982.
10. Mason M.J., Mayer B., Hymel L.J. Am. J. Physiol., 33, 654-662, 1993.
11. Meltzer H.I., Kassir S. Biochim. Biophys. Acta, 755, 452-456, 1983.
12. Schwarz W., Keim H., Fehlau R., Fuhrmann G.F. Biochim. Biophys. Acta, 987, 32-36, 1989.
13. Shields M., Grygorczyk R., Fuhrmann G.F., Schwarz W., Passow M. Biochim. Biophys. Acta, 815, 223-233, 1985.
14. Szasz I., Sarcadi B., Gardos G. J. Membr. Biol., 35, 75-93, 1977.

Поступила 18.VII.1999

Биолог. журн. Армении, 2 (52), 1999

УДК 612.017.1

МЕМБРАНОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ АДРИАМИЦИНА И ЕГО КОМПЛЕКСОВ С Fe^{3+} , Cu^{2+} И Co^{2+}

Л.А. АВАНЕСЯН, Т.К. ДАВТЯН, Ю.Т. АЛЕКСАНИЯН

Институт эпидемиологии, вирусологии и медицинской паразитологии им. А.Б. Алексаняна, МЗ Армении, 375009, Ереван

Установлено, что адриамицин (АДР) и его комплексы с Fe^{3+} , Cu^{2+} и Co^{2+} способны индуцировать агрегацию и агглютинацию эритроцитов человека, резистентность эритроцитов барана (ЭБ) к комплементзависимому гемолизу, дегрануляцию тучных клеток крыс и синтез свободных радикалов в лимфоцитах человека. Комплексообразование АДР с вышеуказанными ионами металлов приводит к модуляции мембранотропной активности АДР.

Ցույց է տրված, որ ադրիամիցինը և նրա Fe^{3+} , Cu^{2+} և Co^{2+} մետաղային միացությունները ընդունակ են խթանելու մարդու էրիթրոցիտների ագրեգացիան և ագլյուտինացիան, ոչխարի էրիթրոցիտների ռեզիստենտակամոլությունը կոմպլեմենտ-կախյալ հեմոլիզի հանդեպ, առնետների գիրացած բջիջների դեգրանուլյացիան և ազատ ռադիկալների սինթեզը մարդու լիմֆոցիտներում: Ադրիամիցինի միացումը նշված մետաղային իոնների հետ բերում է նրա մեմբրանոտրոպ ակտիվության մոդուլյացիային:

It has been shown, that adriamycin and its metal complexes with Fe^{3+} , Cu^{2+} and Co^{2+} can induce human erythrocytes aggregation and agglutination, sheep erythrocytes resistance to complement-dependent hemolysis, rat mast cells degranulation and free radicals generation in human lymphocytes. Formation of adriamycin complexes with mentioned metal ions leads to the modulation of its membranotropic activity.

Адриамицин - металлокомплексы - агглютинация эритроцитов - дегрануляция тучных клеток - свободные радикалы

Изучение молекулярных механизмов действия различных лекарственных препаратов лежит в основе разработки эффективных и безопасных подходов к