

УДК616.857:615.217

ББК 56.13:52.81

Б-74

Богус Саида Казбековна, кандидат медицинских наук, врач-кардиолог Муниципального бюджетного учреждения здравоохранения городская больница №2 Краснодарского муниципального лечебно-диагностического объединения, т.: 79184686026, e-mail: Sayda_777@mail.ru;

Галенко-Ярошевский Павел Александрович, член-кор. РАМН, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования "Кубанский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, т.: (861)2623499, т. 79284292122, e-mail: kybfarma@rambler.ru;

Духанин Александр Сергеевич, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры молекулярной фармакологии и радиобиологии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования "Национальный исследовательский медицинский университет" им. Н.И. Пирогова Минздравсоцразвития России, т.: 89161117929, e-mail: das03@rambler.ru;

Шимановский Николай Львович, член-кор. РАМН, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой молекулярной фармакологии и радиобиологии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования "Национальный исследовательский медицинский университет" им. Н.И. Пирогова Минздравсоцразвития России, т.: 89166503149, e-mail: shiman@rsmu.ru.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРОИЗВОДНОГО ИНДОЛА SS-68, АМИОДАРОНА И ДРОНЕДАРОНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ РЕЦЕПТОРОВ ВЕНТРОЛАТЕРАЛЬНОЙ ПОВЕРХНОСТИ ПРОДОЛГОВАТОГО МОЗГА

(рецензирована)

Изучено влияние производного индола SS-68, обладающего антиаритмической активностью, амиодарона и дронедарона на функциональную активность различных типов рецепторов, сопряженных с ионными каналами G-белками синапсом вентролатеральной поверхности продолговатого мозга.

Показано, что SS-68 действует более избирательно на рецепторные структуры, особенно на β -адренорецепторы, чем амиодарон и дронедарон.

Ключевые слова: производное индола SS-68, амиодарон, дронедарон, продолговатый мозг, синапсомы.

Bogus Saida Kazbekovna, Candidate of Medicine, a cardiologist of Municipal budget health care institution city hospital № 2 of the Krasnodar Municipal Medical Diagnostic Association, tel.: 79184686026, e-mail: Sayda_777@mail.ru;

Galenko-Yaroshevsky Pavel Alexandrovich, corresponding member of RAMS, Doctor of Medicine, professor, head of the Department of Pharmacology of the SBEI HPE "Kuban State Medical University" of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, tel.: (861) 2623499, e-mail: kybfarma@rambler.ru;

Dukhanin Alexander Sergeevich, Doctor of Medicine, professor, professor of the Department of Molecular Pharmacology and Radiobiology of the SBEI HPE "National Research Medical University" named after N.I. Pirogov of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, tel.: 89161117929, e-mail: das03@rambler.ru;

Shimanovsky Nikolai Lvovich, corresponding member of RAMS, MD, professor, head of the Department of Molecular Pharmacology and Radiobiology of the SBEI HPE "National Research Medical University" named after N.I. Pirogov of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, tel.: 89166503149, e-mail: shiman@rsmu.ru.

COMPARATIVE RESEARCH OF THE INFLUENCE OF INDOLE DERIVATIVE SS-68, AMIODARONE AND DRONEDARONE ON FUNCTIONAL ACTIVITY OF VARIOUS TYPES OF THE MEDULLA VENTROLATERAL SURFACE RECEPTORS

(Reviewed)

The effects of indole derivatives SS-68, which has antiarrhythmic activity, amiodarone and dronedarone on functional activity of different types of receptors associated with ion channels G-proteins by the synaptosomes of ventrolateral surface of the medulla oblongata have been studied.

It has been shown that the SS-68 acts more selectively on the receptor structure, especially on the β -adrenergic receptors than amiodarone and dronedarone.

Keywords: indole derivative SS-68, amiodarone, dronedarone, medulla, synaptosomes.

Несмотря на успехи в разработке и применении новых антиаритмических препаратов, фармакотерапия нарушений ритма сердца (НРС) остается актуальной проблемой. Это связано со сложностью регуляции ритма сердца на различных уровнях. Действительно, нормализующее влияние на нарушенный ритм сердечных сокращений могут оказывать лекарственные средства (ЛС), относящиеся к разным классам химических соединений и принадлежащие к различным фармакологическим группам: анксиолитикам, холино- и адреноблокаторам, антиконвульсантам, препаратам, содержащим соли калия, антагонистам ионов кальция и др.

Изучение центральных свойств у антиаритмиков II-IV классов (согласно классификации E.M. Vaughan-Williams [1]) – пропранолола, амиодарона и верапамила – показало, что при внутривенном введении с последующей электростимуляцией симпатогенерирующего центра вентролатеральной поверхности продолговатого мозга (ВЛППМ) кошек наиболее значимый превентивный эффект проявляет амиодарон, а при химической стимуляции – пропранолол и верапамил. При аппликации препаратов на область симпатогенерирующего центра с последующей его электростимуляцией наиболее выраженным действием обладает пропранолол, а при химической стимуляции – амиодарон. Все исследованные препараты повышают содержание тормозных нейромедиаторов (глицина и ГАМК), а верапамил интенсивно подавляет синтез, возбуждающих нейромедиаторов (аспартата и глутамата) [2, 3].

Исходя из того, что производное индола SS-68 обладает выраженными антиаритмическими (устраняет НРС как периферического, так и центрального генеза), а также антиангинальными свойствами, характерными, как правило, для антиаритмиков III класса [4], представляло интерес исследовать влияние SS-68 и взятых в качестве референтных препаратов амиодарона и дронедрона на основные рецепторные системы ВЛППМ, принимающие участие в центральных механизмах регуляции НРС.

Целью данной работы явилось сравнительное исследование влияния соединения SS-68, амиодарона и дронедрона на функциональную активность (ФА) различных типов рецепторов, сопряженных с ионными каналами (5-HT₃, ГАМК_A и NMDA) и G-белками [5-HT₁, 5-HT₂, Met-Glu, β-адренорецепторы (β-АР)] синапсом ВЛППМ.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Синапсомы – везикулы плазматических мембран – из ВЛППМ кошек получали с помощью метода дифференциального центрифугирования в градиенте перколла [5]. Для оценки изменений внутриклеточной концентрации свободных Ca²⁺ и Na⁺ использовали специфические флуоресцентные индикаторы Fluo-3 и SBFI. Процедуры нагружения синапсом флуоресцентными зондами, расчет концентрации ионов в везикулах проводили по методикам, описанным в работах [6, 7]. Конечная концентрация зондов во внутривезикулярной среде составляла 5-7 мкМ. Концентрацию везикулярного ионизированного кальция ([Ca²⁺]_{вн}) рассчитывали по формуле [8]:

$$[Ca^{2+}]_{вн} = K_d (F_{max} - F_{530}) / (F_{530} - F_{min}),$$

где F_{530} – интенсивность флуоресценции образца при 530 нм; F_{max} – флуоресценция в условиях насыщения зонда Ca²⁺ и Na⁺, определяемая после внесения 30 мкМ дигитонина и 1мМ CaCl₂; F_{min} – интенсивность флуоресценции при нулевой (в присутствии 5 мМ ЭГТА и 5 мкМ A23187) концентрации Ca²⁺; K_d – равновесная константа диссоциации комплекса Fluo-Ca, равная 0,42 мкМ. Перед измерением включения Ca²⁺ пробы преинкубировали при 37°C в течение 30 мин. – времени, достаточном для достижения равновесия в системе среда-везикулы. Для вычисления количества Ca²⁺, накопленного в везикулах, в предварительных экспериментах был определен внутривезикулярный объем (W), который составил 92 мкл/мг белка.

Для перерасчета интенсивности флуоресценции зонда SBFI в [Na⁺]_{вн} выполняли процедуру калибровки как описано в работе [9]. Концентрацию Na⁺ в везикулах рассчитывали по формуле:

$$[Na^{+}]_{цит} = K_d \cdot k \cdot (R - R_{min}) / (R_{max} - R),$$

где R – отношение флуоресценции при длинах возбуждающего света 340 нм (F340) и 380 нм (F380); R_{min} и R_{max} – то же при нулевой и насыщающей концентрации [Na⁺]_{цит} (150 мМ); k – отношение интенсивности флуоресценции при 380 нм для свободного и связанного зонда (2,1±0,1); K_d – равновесная константа диссоциации комплекса зонд-Na, равная 20,8 ± 1,4 мМ.

Определение изменений содержания ионов хлора ([Cl⁻]_{вн}) в изолированных синапсоммах основано на использовании флуоресцентного индикатора Cl⁻, 6-метокси-N-этилхинолина йодида (MEQ). Условия нагружения зондом, проведения калибровочной процедуры были такие же, как в работе [10]. Флуоресценция образца везикул в среде, не содержащей хлор ([Cl⁻]_о = 0 мМ), была максимальной (F_{max}). Минимальное значение флуоресценции (F_{min}) определяли после инкубации везикул в течение 10 мин в присутствии 150 мМ KSCN и 25 мкМ валиномицина. Анион KSCN⁻ вытесняет Cl⁻ из комплекса с красителем, валиномицин служит в качестве ионофора, переносящего KSCN⁻ через плазматическую мембрану в везикулы. Для определения величины константы Штерна-Волмера экспериментальные данные представляли в координатах

$$F_0/F_{Cl^-}; [Cl^-],$$

где $F_0 = F_{\max} - F_{\min}$, F_{Cl} – значение флуоресценции при заданной концентрации Cl^- в среде ($[Cl^-]$). Везикулярную концентрацию хлора в опытных образцах рассчитывали на основании построенной калибровочной кривой, подставляя экспериментальное значение флуоресценции образцов.

Для определения содержания цАМФ в синапсоммах использовали стандартные наборы фирмы "Amersham". Содержание инозитол-трифосфата (ИФ₃) определяли радиометрически как описано в работе [11].

Активацию рецепторов осуществляли путем внесения в суспензию синапсом, выделенных из ВЛППМ, селективных агонистов соответствующих типов рецепторов (табл. 1). 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.

Сокращения: 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT); alpha-methyl-5-hydroxytryptamine (α -Me-5HT); CGS19755 (selfotel) = memantine; D-2-amino-4-phosphonobutanoic acid (D-AP4); methyl-4-carboxyphenylglycine (MCPG).

Таблица 1 - Используемые в работе специфические лиганды различных типов рецепторов

Тип рецептора	Агонист	Антагонист
5-HT ₁	8-OH-DPAT	Спиперон
5-HT ₂	α -Me-5HT	Метисергид
5-HT ₃	Хлорфенил-бигуанид	Ондансетрон
ГАМК _A	Мусцимол	Блокатор хлорного ионофора пикротоксин
NMDA	N-метил-D-аспартат	CGS 19755
Met-Glu	D-AP4	MCPG
β -AP	Изопротеренол	Пропранолол

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В первой части работы было изучено влияние SS-68, амиодарона, и дронедарона на ФА рецепторов, сопряженных с ионными каналами, ответ которых сопровождается изменением синапсомальной концентрации Ca^{2+} , Na^+ или Cl^- . К ним относятся: 5-HT₃ тип рецепторов серотонина, ГАМК_A тип рецепторов ГАМК, NMDA тип рецепторов глутамата.

Влияние SS-68, амиодарона и дронедарона на ФА 5-HT₃ типа рецепторов серотонина оценивали по их действию на Ca -ответ синапсом, индуцированный селективным лигандом 5-HT₃ рецепторов хлорфенил-бигуанидом.

Обнаружено, что добавление к суспензии синапсом хлорфенил-бигуанида в конечной концентрации 0,1 мкМ приводит к статистически достоверному 3-х кратному увеличению концентрации свободных Ca^{2+} . Базальная $[Ca^{2+}]_{\text{вн}}$ в контрольных пробах составила $84,0 \pm 9,0$ нМ. Избирательный антагонист 5-HT₃ типа рецепторов серотонина ондансетрон (1,0 мкМ) полностью устранял эффект селективного агониста хлорфенил-бигуанида (рис. 1). Результаты сравнительного анализа действия SS-68, амиодарона и дронедарона на Ca -ответ синапсом приведены на рисунке 2. Видно, что в этих условиях из исследуемых веществ только дронедарон статически значимо уменьшал подъем уровня Ca^{2+} , опосредованный активацией 5-HT₃ типа рецепторов серотонина.

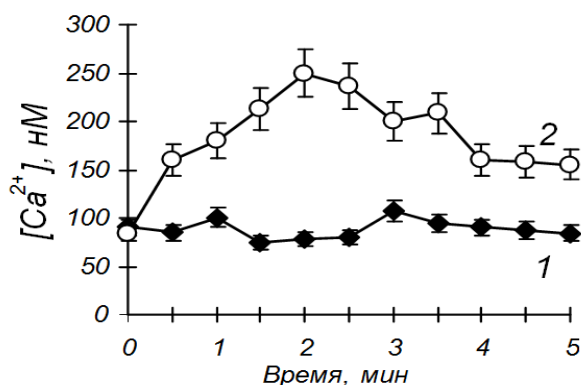


Рис. 1. Зависимость $[Ca^{2+}]_{\text{вн}}$ от действия 0,1 мкМ хлорфенил-бигуанида в отсутствие (2) и в присутствии 1,0 мкМ ондансетрона (1)

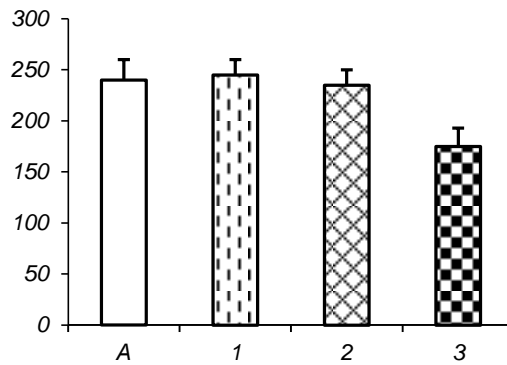


Рис. 2. Влияние SS-68 50 мкМ (1), амиодарона 50 мкМ (2) и дронедарона 50 мкМ (3) на Ca-ответ, вызванный агонистом 5-HT₃ типа рецепторов серотонина хлорфенил-бигуанидом (А)

Действие SS-68, амиодарона и дронедаронана ФА ГАМК_A типа рецепторов ГАМК исследовали по их влиянию на изменения концентрации Cl⁻ в синапсосамах, вызванные специфическим лигандом этих рецепторов мусцимолом. Внесение в суспензию синапсосом мусцимола в конечной концентрации 10 мкМ приводило к повышению концентрации свободных Cl⁻ до максимального значения 36 мМ. [Cl⁻]_{вн} в контрольных пробах в отсутствие индуктора составляла 14,0 ± 4,0 мМ. Блокатор хлорного ионофора пикротоксин (50 мкМ) подавлял стимулирующий эффект мусцимола (рис. 3). Статистически значимого влияния SS-68, амиодарона и дронедаронана Cl⁻-ответ синапсосом не обнаружено (рис. 4).

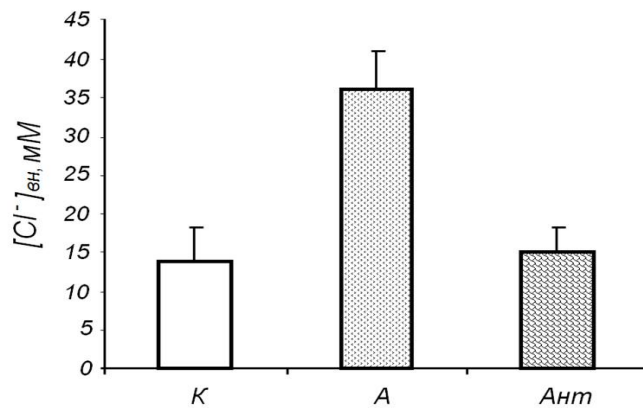


Рис. 3. Зависимость [Cl⁻]_{вн} от действия 10 мкМ мусцимола в отсутствие (А) и в присутствии 50 мкМ пикротоксина (Ант). К - контрольные пробы

* - отмечены достоверные изменения ($p < 0,05$).

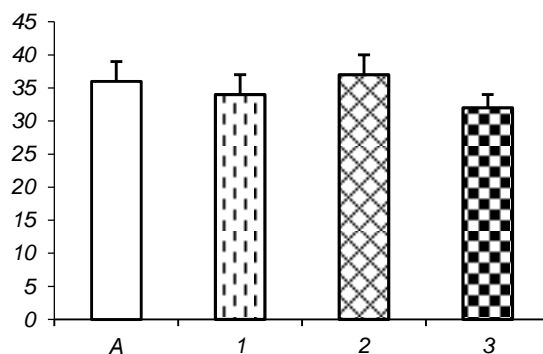


Рис. 4. Влияние SS-68 50 мкМ (1), амиодарона 50 мкМ (2) и дронедарона 50 мкМ (3) на Cl-ответ, вызванный агонистом ГАМК_A типа рецепторов ГАМК мусцимолом (А)

Исследование SS-68, амиодарона и дронедаронана ФАНMDA типа рецепторов глутамата включало определение их действия на содержание в синапсосамах свободных ионов Na⁺ и Ca²⁺. Избирательный лиганд этого типа рецепторов N-метил-D-аспартат (3 мкМ) достоверно увеличивал базальные значения концентрации катионов в 2,8 и 1,5 раза соответственно (рис. 5 и 7). Амиодарон и дронедарон в отличие от SS-68 значительно уменьшали выраженность Ca-ответа на N-метил-D-аспартат (рис. 6). В присутствии всех исследованных веществ достоверно снижался Na-ответ синапсосом, вызванный активацией NMDA рецепторов глутаматного типа (рис. 8).

Во второй части работы было изучено влияние SS-68, амиодарона и дронедарона на ФА рецепторов, сопряженных с G-белками, ответ которых сопровождается изменением синапсомальной концентрации вторичных мессенджеров ИФ₃ и циклического аденозинмонофосфата (цАМФ). К ним относятся: 5-НТ₁ и 5-НТ₂ типы рецепторов серотонина, метаботропный тип рецепторов глутамата и β-АР.

Влияние SS-68, амиодарона и дронедарона на ФА 5-НТ₁ типа рецепторов серотонина оценивали по их действию на цАМФ-ответ синапсом, индуцированный селективным лигандом 5-НТ₁ рецепторов соединением 8-ОН-ДРАТ. Установлено, что добавление к суспензии синапсом 8-ОН-ДРАТ в конечной концентрации 0,5 мкМ приводит к значимому снижению базальной концентрации цАМФ в среднем на 38%. Базальная [цАМФ]_{вн} в контрольных пробах составила 16,0±3,0 пмоль/мг белка. Избирательный антагонист 5-НТ₁ типа рецепторов серотонина спиперон (4 мкМ) нивелировал эффект селективного лиганда (рис. 9). Результаты сравнительного анализа действия SS-68, амиодарона и дронедарона на цАМФ-ответ синапсом суммированы на рисунке 10. Видно, что в этих условиях исследуемые вещества не проявляют активности.

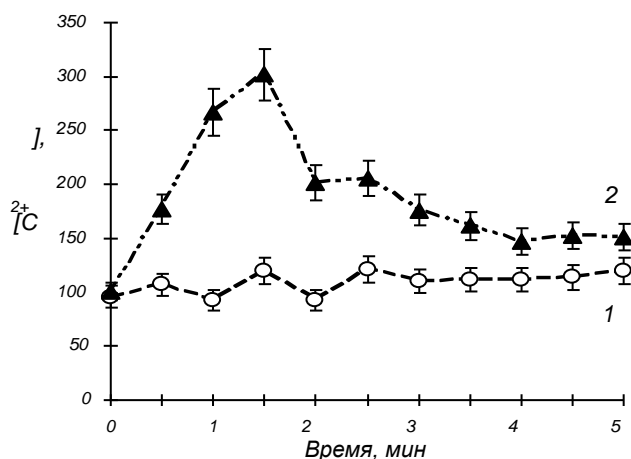


Рис. 5. Зависимость изменения $[Ca^{2+}]_{вн}$ от действия 3 мкМ N-метил-D-аспартата в отсутствие (2) и в присутствии 10 мкМ CGS 19755 (1)

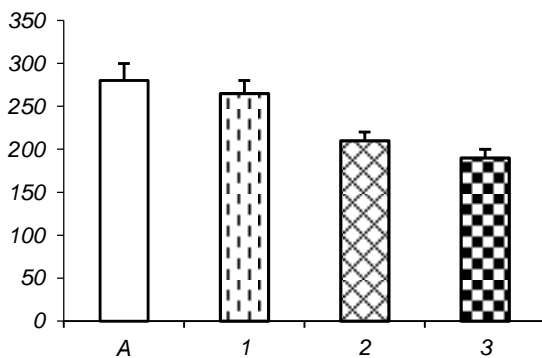


Рис. 6. Влияние соединения SS-68 50 мкМ (1), амиодарона 50 мкМ (2) и дронедарона 50 мкМ (3) на Ca-ответ, вызванный агонистом NMDA рецепторов глутамата N-метил-D-аспартатного типа (A)

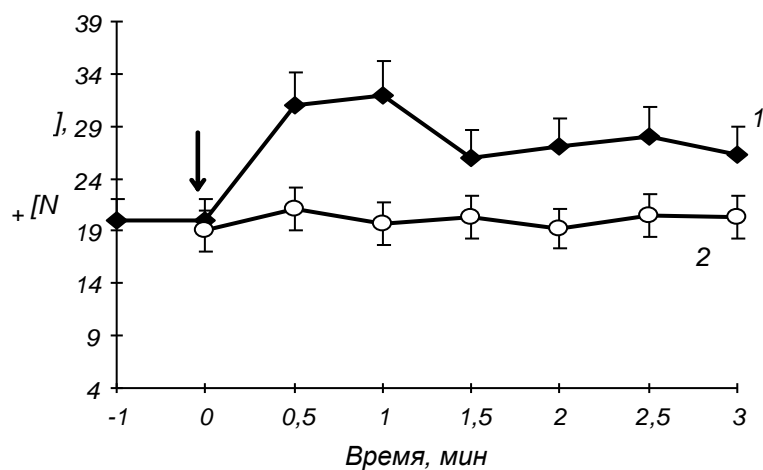


Рис. 7. Зависимость изменения $[Na^+]_{out}$ от действия 3 мкМ N-метил-D-аспартата в отсутствие (1) и в присутствии 10 мкМ CGS 19755 (2)
Стрелкой обозначен момент внесения препаратов.

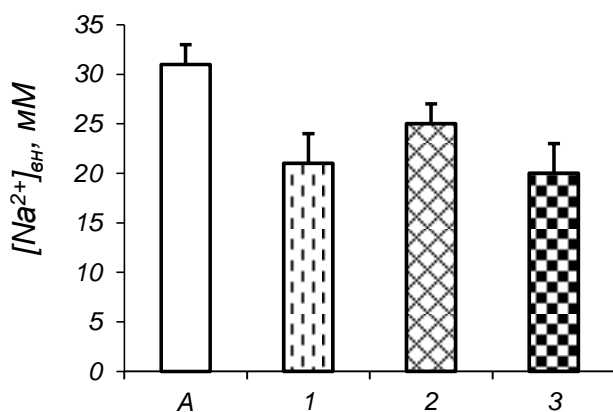


Рис. 8. Влияние соединения SS-68 50 мкМ (1), амидарона 50 мкМ (2) и дронедарона 50 мкМ (3) на Na^+ -ответ, вызванный агонистом NMDA рецепторов глутамата N-метил-D-аспартатного типа (A)

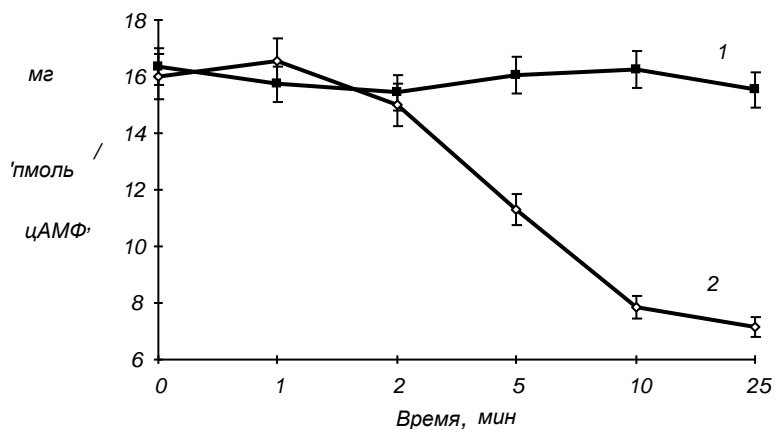


Рис. 9. Зависимость изменения $[цАМФ]_{in}$ от действия 0,5 мкМ 8-OH-DPAT в отсутствие (1) и в присутствии 4,0 мкМ спиперона (2)

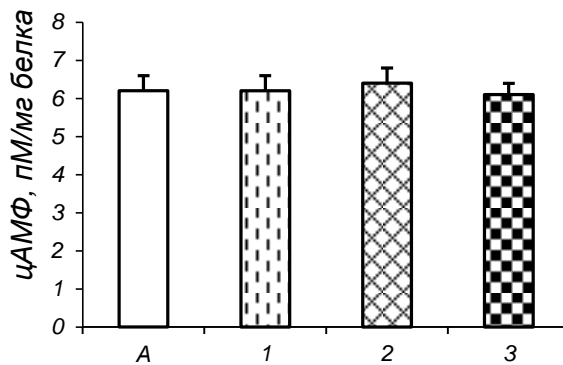


Рис. 10. Влияние соединения SS-68 50 мкМ (1), амиодарона 50 мкМ (2) и дронедарона 50 мкМ (3) на цАМФ-ответ, вызванный агонистом 5-НТ₁ типа рецепторов серотонина 8-ОН-DPAT (A).

Действие SS-68, амиодарона и дронедарона на 5-HT₂ типа рецепторов серотонина и метаботропный тип рецепторов глутамата изучали по их влиянию на изменения концентрации ИФ₃ в синапсосомах, индуцированные избирательными агонистами этих типов рецепторов – α-Me-5HT (30 мкМ) и D-AP4 (0,5 мкМ) соответственно. Из данных, приведенных на рисунках 11 и 12, видно, что все исследованные вещества достоверно не изменяли содержание этого вторичного мессенджера в синапсосомах. На основании полученных результатов можно предположить, что указанные типы рецепторов не принимают участия в центральном действии SS-68, амиодарона и дронедарона на активность симпатизирующего центра ВЛППМ.

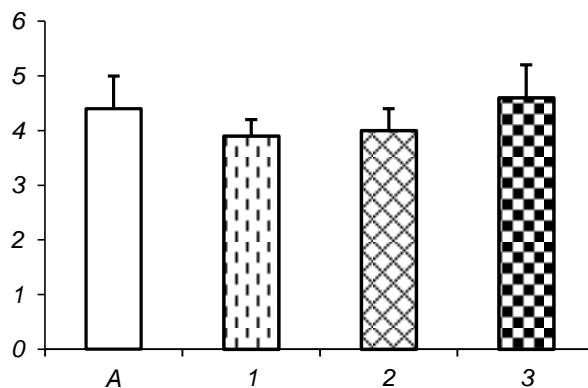


Рис. 11. Влияние соединения SS-68 50 мкМ (1), амиодарона 50 мкМ (2) и дронедарона 50 мкМ (3) на ИФ₃-ответ, вызванный агонистом 5-НТ₂ типа рецепторов серотонина веществом α-Me-5HT, 30 мкМ (A)

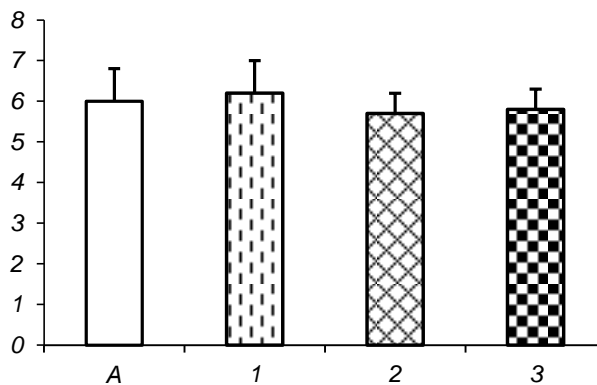


Рис. 12. Влияние SS-68 50 мкМ (1), амиодарона 50 мкМ (2) и дронедарона 50 мкМ (3) на ИФ₃-ответ, вызванный агонистом метаботропного типа рецепторов глутамата соединением D-AP4, 0.5 мкМ (A)

О влиянии SS-68, амиодарона и дронедарона на 5-HT₂ судили по данным определения их действия на содержание в синапсосомах вторичного мессенджера цАМФ. На фоне действия избирательного лиганда этого типа рецепторов изопротеренола (10 мкМ) дронедарон в концентрации 50 мкМ обладал способностью значительно подавлять цАМФ-ответ (рис. 13). Эффект дронедарона и SS-68 был достоверно более выраженным по сравнению с действием амиодарона (рис. 14).

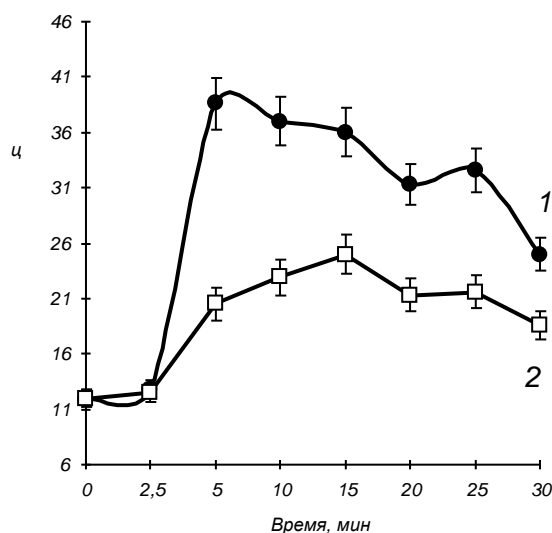


Рис. 13. Изменение $[цАМФ]_{вн}$ под действием 10 мкМ изопротеренола в отсутствие (1) и в присутствии 50 мкМ дронедафона (2)

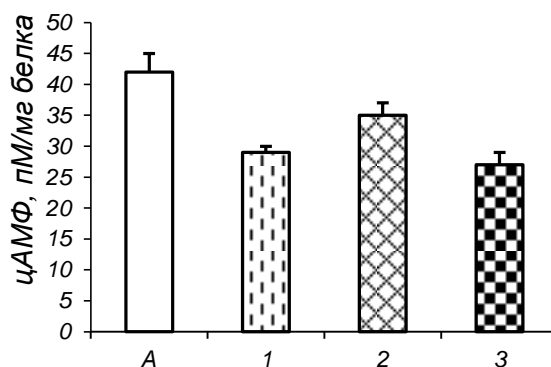


Рис. 14. Влияние соединения SS-68 50 мкМ (1), амиодарона 50 мкМ (2) и дронедафона 50 мкМ (3) на цАМФ-ответ, вызванный агонистом β -AP изопротеренолом (A)

Полученные данные свидетельствуют о вовлечении нескольких типов рецепторов, относящихся к различным семействам мембранных рецепторов нейромедиаторов ЦНС, в реализацию центрального действия SS-68, амиодарона и дронедафона. В то же время трудно предположить, что все описанные эффекты этих веществ обусловлены их прямым взаимодействием с узнающими сайтами рецепторов. Не обладая прямым аффинитетом к NMDA-рецепторам глутамата и различным типам рецепторов серотонина SS-68, амиодарон и дронедафон могут оказывать на них модифицирующее/аллостерическое действие, усиливая или ослабляя их способность к связыванию или передаче молекулярного сигнала на трансдуктор или эффектор [12, 13]. В свете современных представлений о веществах нового типа, не относящихся к прямым агонистам рецепторов, механизм действия исследованных нами веществ можно представить как эффект модулятора, аллостерически потенцирующего рецептор лиганда и активатора ионных каналов.

Можно полагать, что под влиянием SS-68, амиодарона и дронедафона происходят конформационные изменения мембранных рецепторов нейромедиаторов, сопряженных с ионными каналами, и их переход в конформацию открытого канала, что способствует ионным токам.

Механизм реализации центрального эффекта SS-68, амиодарона и дронедафона возможен также вследствие возникновения новых вариантов связывания эндогенных лигандов с наиболее оптимальными подтипами рецепторов, улучшения сопряжения мембранных рецепторов и G-белков, что влияет на ФА рецепторов, изменяющих систему вторичных внутриклеточных посредников.

Данные о влиянии SS-68, амиодарона и дронедафона на ФА различных типов рецепторов синапсом ВЛППМ суммированы в таблице 2.

Таблица 2 - Влияние SS-68, амиодарона и дронедарона на ФА различных типов рецепторов синапсом ВЛППМ

Исследованные вещества	Рецепторы, сопряженные с ионными каналами				Рецепторы, сопряженные с G-белками			
	5-HT ₃	ГАМК _A	NMDA		5-HT ₁	5-HT ₂	Met-Glu	β-AP
			Ca-ток	Na-ток				
Соединение SS-68				+				++
Амиодарон			+	+				+
Дронедарон	+		+	+				++

Таким образом, новое производное индола SS-68, обладающее высокой антиаритмической, а также антиангинальной активностью, по сравнению с амиодароном и дронедароном проявляет большую селективность в отношении центральных нейрхимических механизмов, которые могут быть вовлечены в регуляцию ритма сердечных сокращений. Соединение SS-68, в отличие от амиодарона и дронедарона, действует более избирательно на β-AP ВЛППМ, что позволяет высказать предположение о наличии у этого вещества преимуществ в аспекте развития меньшего числа побочных эффектов, связанных с изменением серотонинергической системы.

Литература:

1. Vaughan-Williams E.M. Classification of antiarrhythmic drugs // J. Cardiovasc. Pharmacol. 1992. Suppl. 2. P. SI-S7.
2. Влияние пропранолола, амиодарона и верапамила на нарушения сердечного ритма центрального генеза / А.Х. Каде [и др.] // Фундаментальные исследования. 2010. №1. С. 51-56.
3. Влияние верапамила и амиодарона на состояние симпатико-адреналовой системы и соотношение возбуждающих и тормозных аминокислот в продолговатом мозге крыс / А.Ю. Турова [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2005. Т. 139, №5. С. 525-527.
4. Антиаритмические средства: фармакотерапевтические аспекты, методы поиска и доклинического изучения / П.А. Галенко-Ярошевский [и др.]. Краснодар: Просвещение-Юг, 2012. 431 с.
5. Dunkley P.R., Jarvie P.E., Robinson P.J. A rapid Percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes // Nat. Protoc. 2008. Vol. 3, №11. P. 1718-1728.
6. Smith T.L. Regulation of intrasynaptosomal free calcium concentrations: studies with the fluorescent indicator, fluo-3 // Neurochem Int. 1990. Vol. 16, №1. P. 89-94.
7. Galván E., Sitges M. Characterization of the participation of sodium channels on the rise in Na⁺ induced by 4-aminopyridine (4-AP) in synaptosomes // Neurochem. Res. 2004. Feb. Vol. 29, №2. P. 347-355.
8. Minta A., Kao J.P.Y., Tsien R.Y. Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores // J. Biol. Chem. 1989. Vol. 264. P. 8171-8178.
9. Simultaneous measurement of intracellular Na⁺ and Ca²⁺ during K⁺-free perfusion in isolated myocytes / Hayashi H. [etc.] // Am. J. Physiol. 1994. Vol. 266, №2. Pt 1. P. C. 416-422.
10. Engblom A.C., Akerman K.E. Determination of the intracellular free chloride concentration in rat brain synaptosomes using a chloride-sensitive fluorescent indicator // Biochim. Biophys. Acta. 1993. Dec 12. Vol. 1153, №2. P. 262-266.
11. 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. Vol. 176, №2. P. 541-552.
12. Presynaptic antisymphathetic action of amiodarone and its metabolite desethylamiodarone / Haikerwal D. [etc.] // J. Cardiovasc. Pharmacol. 1999. Feb. Vol. 33, №2. P. 309-315.
13. 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. Vol. 130, №4. P. 759-766.

References:

1. Vaughan-Williams E.M. Classification of antiarrhythmic drugs // J. Cardiovasc. Pharmacol. 1992. Suppl. 2. P. SI S7.
2. Effect of propranolol, verapamil and amiodarone on the heart rhythm disorders of central genesis/ Kade A.H. [and oth.] // Basic research. 2010. № 1. P.51-56.
3. Effect of verapamil and amidarone on the state of sympathetic-adrenal system and the ratio of excitatory and inhibitory amino acids in the medulla of rats / Turovaya A.Y. [and oth.] // Bull. Exper. biol. and medicine. 2005. V.139. № 5. P. 525-527.
4. Antiarrhythmic drugs: pharmacological aspects, methods of search and pre-clinical study / Galenko-Yaroshevsky P.A. [and oth.]. Krasnodar: Education-South, 2012. 431 p.
5. Dunkley P.R., Jarvie P.E., Robinson P.J. A rapid Percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes // Nat. Protoc. 2008. Vol. 3, №11. P. 1718-1728.

6. Smith T.L. Regulation of intrasynaptosomal free calcium concentrations: studies with the fluorescent indicator, fluo-3 // *Neurochem Int.* 1990. Vol. 16, №1. P. 89-94.
7. Galván E., Sitges M. Characterization of the participation of sodium channels on the rise in Na^+ induced by 4-aminopyridine (4-AP) in synaptosomes // *Neurochem. Res.* 2004. Feb. Vol. 29, № 2. P. 347- 355.
8. Minta A., Kao J.P.Y., Tsien R.Y. Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores // *J. Biol. Chem.* 1989. Vol. 264. P. 8171 - 8178.
9. Simultaneous measurement of intracellular Na^+ and Ca^{2+} during K^+ -free perfusion in isolated myocytes / Hayashi H. [etc.] // *Am. J. Physiol.* 1994. Vol. 266, № 2. Pt 1. P. C. 416 - 422.
10. Engblom A.C., Akerman K.E. Determination of the intracellular free chloride concentration in rat brain synaptoneurosomes using a chloride-sensitive fluorescent indicator // *Biochim. Biophys. Acta.* 1993. Dec 12. Vol. 1153, №2. P. 262-266.
11. Griffin H.D., Hawthorne J.N. Calcium-activated hydrolysis of phosphatidyl-myo-inositol 4-phosphate and phosphatidyl-myo-inositol 4,5-bisphosphate in guinea-pig synaptosomes // *Biochem. J.* 1978. Nov.15. Vol. 176, № 2. P. 541- 552.
12. Presynaptic antisympathetic action of amiodarone and its metabolite desethylamiodarone / Haikerwal D. [etc.] // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1999. Feb. Vol. 33, №2. P. 309- 315.
13. Chidlow G., Melena J., Osborne N.N. Betaxolol, a beta(1)-adrenoceptor antagonist, reduces $\text{Na}(+)$ influx into cortical synaptosomes by direct interaction with $\text{Na}(+)$ channels: comparison with other beta-adrenoceptor antagonists // *Br. J. Pharmacol.* 2000. Jun. Vol. 130, №4. P. 759- 766.