



УДК 547.512:577.352.465

© 1991 г.

М. Ф. Киселев, Е. И. Мельник, Е. А. Воронцов,
А. Д. Кондратьев, С. Л. Кузнецов, А. Н. Лопатин,
Л. Н. Крюков

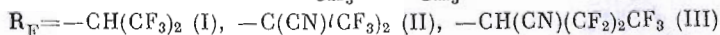
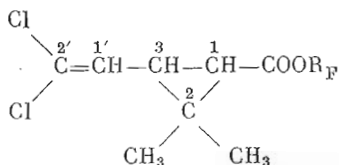
ВЛИЯНИЕ ФТОРСОДЕРЖАЩИХ ЭФИРОВ ПЕРМЕТРИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА КИНЕТИКУ ИНАКТИВАЦИИ НАТРИЕВОГО ТОКА В КЛЕТКАХ НЕЙРОБЛАСТОМЫ (NEURO-2a)

Научный центр по разработке и внедрению современных методов молекулярной диагностики Минздрава СССР, Москва

Осуществлен синтез ряда сложных эфиров перметриновой кислоты с полифторированными спиртами. Их влияние на кинетику инактивации натриевого тока в клетках нейробластомы (*Neuro-2a*) изучено методом локальной фиксации потенциала в режиме внутриклеточного диализа.

В настоящее время инсектициды пиретроидного ряда, представляющие собой, как правило, сложные эфиры 3-(2',2'-дигалоидвинил)-2,2-диметилциклопропан-1-карбоновых кислот, находят все более широкое применение. Сравнительно недавно установлено, что эти соединения — потенциальные нейротоксины, способные модифицировать натриевые каналы в электровозбудимых мембранах как насекомых, так и теплокровных животных [4—5]. Согласно общепринятой теории действия пиретроидов, модифицированные и немодифицированные этими веществами каналы могут одновременно присутствовать в мембране. Основным эффектом воздействия пиретроидов на натриевый канал является замедление скорости инактивации, что в свою очередь приводит к значительным изменениям в электрической активности возбудимых мембран на клеточном и более высоких уровнях организации. Хотя результат действия практически всех соединений этого ряда заключается в основном только в изменении кинетики функционирования натриевого канала, по своей эффективности пиретроиды довольно сильно различаются между собой.

Данная работа посвящена синтезу и исследованию действия на натриевые каналы клеток нейробластомы ряда новых пиретроидов — сложных эфиров *цис/транс*-3-(2',2'-дихлорвинил)-2,2-диметилциклопропан-1-карбоновой (перметриновой) кислоты с полифторированными алифатическими спиртами.



Соединение (I) получено этерификацией перметриновой кислоты 2-гидроперфторпропанолом-2 в среде ангидрида трифторуксусной кислоты. Этот метод является традиционным при синтезах фторсодержащих сложных эфиров [6]. Синтез соединений (II) и (III) осуществляли реакцией хлорангидрида перметриновой кислоты с калиевыми солями циангидринов гексафторацетона и перфтормасляного альдегида соответственно. Полученные вещества, представляющие собой сиропообразные жидкости, были выделены с помощью адсорбционной хроматографии на силика-

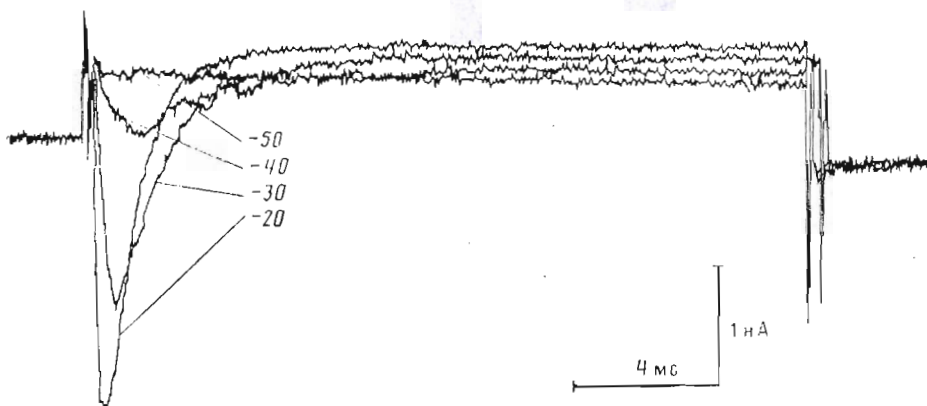


Рис. 1. Записи интегрального натриевого тока в ответ на скачкообразное изменение поддерживаемого потенциала -120 мВ до указанных величин (мВ). Регистрация токов проводилась через 10 мин после образования конфигурации «whole-cell». Компенсации тока утечки и последовательного сопротивления не проводились

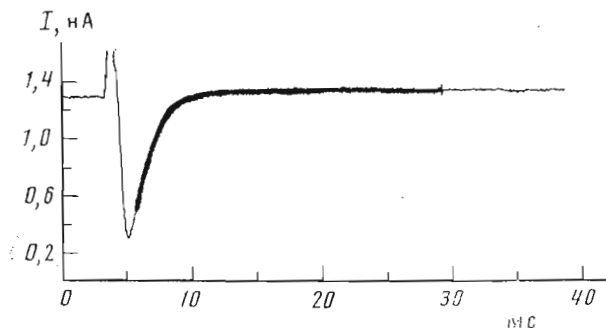


Рис. 2. Натриевый ток, зарегистрированный в контрольных условиях. Поддерживаемый потенциал -120 мВ, тестирующий потенциал $+100$ мВ, частота стимуляции 1 Гц. Выделенная линия — аппроксимация одной экспонентой

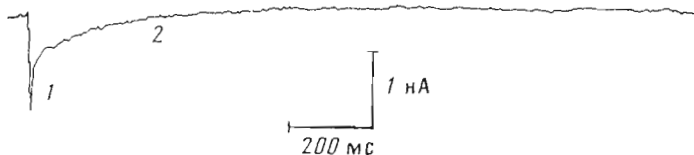


Рис. 3. Натриевый ток после обработки клетки соединением (I) в течение 25 мин. Сжатая шкала времени. Можно наблюдать быструю (I) и медленную (2) стадию инактивации. Поддерживаемый потенциал -120 мВ, тестирующий потенциал $+100$ мВ, частота стимуляции 0,1 Гц. (Сходная зависимость наблюдалась для соединения (III))

теле. Строение полученных пиретроидов было подтверждено результатами элементного анализа, а также ^1H - и ^{19}F -ЯМР-спектрами.

Эксперименты на клетках нейробластомы (*Neuro-2a*) проводили методом локальной фиксации потенциала (patch-clamp) в режиме внутриклеточного диализа. Пиретроиды добавляли во внеклеточный раствор в концентрации 100 мкМ в виде их растворов в диметилсульфоксиде (DMSO). Конечная концентрация DMSO во внеклеточном растворе не превышала 1% по объему, что не оказывало какого-либо влияния на натриевый ток и выживаемость клеток. На рис. 1 приведены записи интегрального натриевого тока в ответ на скачкообразное изменение поддерживаемого потенциала (-120 мВ) до указанных величин. Из-за довольно больших размеров клеток и, следовательно, большой поверхности мембраны переходный процесс перезарядки емкости мембраны лежит в диапазоне времени активации натриевого тока и не может быть заре-

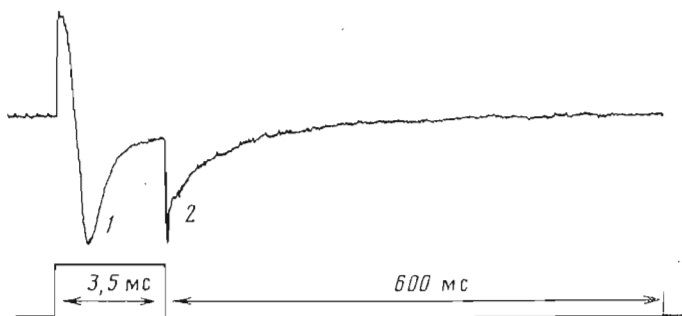


Рис. 4. Хвостовой ток (tail current) (участок 2) в ответ на выключение тестирующего импульса (участок 1) после обработки клетки соединением (I) в течение 20 мин. Поддерживаемый потенциал -100 мВ, тестирующий потенциал $+130$ мВ, частота стимуляции $0,1$ Гц. (Аналогично для соединения (III))

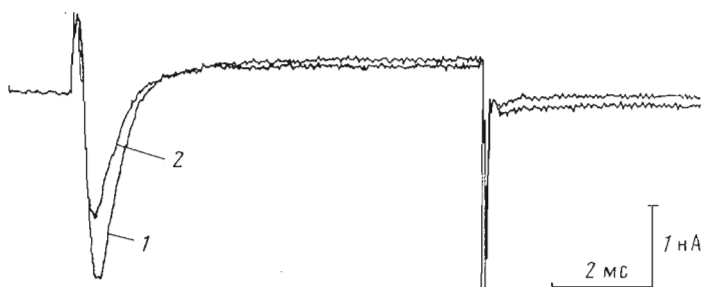


Рис. 5. Действие соединения (II) на амплитуду натриевого тока в течение 2 мин. 1 — запись интегрального натриевого тока в норме. Поддерживаемый потенциал -120 мВ, тестирующий потенциал $+100$ мВ, частота стимуляции 1 Гц. 2 — то же после обработки клетки соединением (II)

гистрирован с достаточной степенью точности. Однако процесс инактивации может быть измерен довольно надежно. Как можно видеть, в норме инактивация натриевого тока удовлетворительно описывается одной экспонентой (рис. 2). Через определенное время после добавления соединений (I) или (III) во внеклеточную среду кинетика инактивации натриевого тока значительно менялась. Появлялась медленная компонента инактивации с постоянной времени при потенциале $+20$ мВ около 200 мс (рис. 3). Соответственный хвостовой ток иллюстрирован на рис. 4. По сравнению с альфаметрином в той же концентрации эти соединения оказывали свое влияние гораздо медленнее. В данном эксперименте время модификации 50% каналов составляло около 30 мин. Соединение (II) практически не приводило к изменению процесса инактивации натриевого тока, однако в ряде опытов отмечалось некоторое уменьшение его амплитуды (рис. 5).

Таким образом, эфиры перметриновой кислоты и фторсодержащих спиртов подобно другим пиретроидам оказывают влияние на процесс инактивации натриевого тока электровозбудимых мембран и могут найти применение для исследования натриевых каналов.

Экспериментальная часть

Спектры ^1H - и ^{19}F -ЯМР регистрировали на спектрометре Bruker WP80 S (^1H ; 80 МГц; ^{19}F ; $75,398$ МГц). В качестве стандартов использовали тетраметилсилан и трифторуксусную кислоту. Элементный анализ проводили на С, Н, N-анализаторе Carlo Erba Strumentazione 1106. Для регистрации натриевого тока использовали усилитель ЕРС-7. Прием, хранение и обработку данных выполняли на компьютере IBM PC AT и модуле Microlink. Для колоночной хроматографии использовали сили-

кагель-60 (Fluka AG). Калиевые соли циангидринов гексафторацетона и перфтормасляного альдегида получали известными методами [6, 7].

2-Гидроперфторизопрпиловый эфир перметриновой кислоты (I). Смесь 0,93 г (5,53 ммоль) 2-гидроперфторпропанола-2, 0,9 г (4,31 ммоль) перметриновой кислоты и 6 мл ангидрида трифторуксусной кислоты кипятили 1 ч. Реакционную массу упаривали и остаток хроматографировали на колонке (2,8 × 7,0 см) с силикагелем. При элюировании гексаном получили 1,37 г (88,6%) соединения (I). ¹H-ЯМР (C₆D₆), δ, м. д.: 0,50; 0,62; 0,87; 1,00 (6H, 4с, 2CH₃), 0,90—1,87 (2H, м, 1-Н и 3-Н), 5,07; 6,15 (1H, 2д, 1'-H), 5,47—5,87 (1H, м, CH R_F). ¹⁹F-ЯМР (C₆D₆), δ, м. д.: —3,6 (6F, м, 2CF₃). Найдено, %: С 36,85; Н 2,78. C₁₁H₁₀Cl₂F₆O₂. Вычислено, %: С 36,79; Н 2,81.

2-Циано-перфторизопрпиловый эфир перметриновой кислоты (II). К суспензии 0,66 г (2,86 ммоль) калиевой соли циангидрина гексафторацетона в 9 мл бензола добавляли раствор 0,64 г (2,83 ммоль) хлорангидрида перметриновой кислоты в 3 мл бензола. Смесь кипятили 2,5 ч, охлаждали, промывали раствором NaHCO₃ и водой, после чего сушили Na₂SO₄. Вещество выделяли хроматографированием на колонке (2,8 × 7,0 см) с силикагелем. При элюировании четыреххлористым углеродом получили 0,45 г (41,8%) соединения (II). ¹H-ЯМР (C₆D₆), δ, м. д.: 0,47; 0,57; 0,82; 0,92 (6H, 4с, 2CH₃), 1,00—2,17 (2H, м, 1-Н и 3-Н), 5,00; 5,97 (1H, 2д, 1'-H). ¹⁹F-ЯМР (C₆D₆), δ, м. д.: —4,2 (6F, с, 2CF₃). Найдено, %: С 37,38; Н 2,42; N 3,75. C₁₂H₉Cl₂F₆NO₂. Вычислено, %: С 37,52; Н 2,36; N 3,65.

2-Циано-2-гидроперфторбутиловый эфир перметриновой кислоты (III) получали аналогично эфиру (II). При хроматографии на силикагеле в качестве элюента использовали смесь бензол — гексан (1 : 2). Из 0,41 г (1,78 ммоль) хлорангидрида перметриновой кислоты получили 0,19 г (26%) эфира (III). ¹H-ЯМР (CDCl₃), δ, м. д.: 1,27; 1,32; 1,37; 1,42 (6H, 4с, 2CH₃), 1,60—2,82 (2H, м, 1-Н и 3-Н), 5,65; 5,70 (1H, 2д, 1'-H), 5,95—6,15 (1H, м, CH R_F). ¹⁹F-ЯМР (CDCl₃), δ, м. д.: —51,8 и —48,3 (4F, с и дд, —CF₂—CF₂—), —3,0 (3F, м, CF₃). Найдено, %: С 37,70; Н 2,15; N 3,42. C₁₃H₁₀Cl₂F₇NO₂. Вычислено, %: С 37,52; Н 2,42; N 3,37.

Клетки нейробластомы (*Neuro-2a*) культивировали на среде MEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Клетки инкубировали при 37° С в увлажненной (100%) атмосфере, содержащей 5% CO₂ и 95% воздуха. Эксперименты проводили при 20° С, используя два основных раствора следующего состава (мМ): внутриклеточно — CsF (145), NaF (1,4), HEPES*·CsOH (5), pH 7,0, и внеклеточно — NaCl (140), CsCl (5), CaCl₂ (1,8), MgCl₂ (0,8), HEPES·NaOH (5), pH 7,4. Эксперименты на клетках нейробластомы проводили методом локальной фиксации потенциала в режиме внутриклеточного диализа [8].

После получения конфигурации «whole-cell» потенциал клетки поддерживали на уровне —100 или —120 мВ в течение 10 мин для установления кинетических параметров натриевого тока. Сопротивление пипеток, использованных в измерениях, варьировало от 1 до 3 МОм.

Перетронды добавляли во внеклеточный раствор в концентрации 100 мкМ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hamill O. P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F. J. // Pflugers Arch. 1981. В. 391. S. 85—100.
2. Lund A. E., Narahashi T. // Pestic. Biochem. and Physiol. 1983. V. 20. P. 203—216.
3. Casida J., Gammon D., Glickman A., Lawrence L. // Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1983. V. 23. P. 413—438.
4. Takeda K., Narahashi T. // Brain Res. 1988. V. 448. P. 308—312.
5. Weille J. R., Vijverberg H. P. M., Narahashi T. // Brain Res. 1988. V. 445. P. 1—41.
6. Гудайцкий М. Химия органических соединений фтора: Пер. с чешск. М.: ГНТИ хим. лит-ры, 1961. С. 175.

* HEPES — N-2-гидроксэтиллипразин-N-2-этансульфоновая кислота.

7. Беленький Г. Г., Власов В. М., Гребенщикова Г. Ф. и др. // Синтезы фторорганических соединений / Ред. Бнувиц И. Л., Якобсон Г. Г. М.: Химия, 1973. С. 58.
8. Лопатин А. Н., Кондратьев А. Д., Логинов Б. В., Мельник Е. И. // Биол. мембраны. 1988. Т. 5. № 7. С. 711-717.

Поступила в редакцию
11.V.1990

M. F. KISELEV, E. I. MELNIK, E. A. VORONTSOV, A. D. KONDRATYEV,
S. L. KUZNETSOV, A. N. LOPATIN, L. N. KRYUKOV

EFFECT OF FLUORO-CONTAINING ESTERS OF 3-(2,2-DICHLOROVINYL)-
2,2-DIMETHYLCYCLOPROPANECARBOXYLIC ACID ON THE KINETICS
OF INACTIVATION OF SODIUM CURRENT IN NEUROBLASTOMA
(NEURO-2A) CELLS

Research Center of Molecular Diagnostics, Ministry of Health of the USSR, Moscow

A synthesis of a number of esters of (\pm)-*cis, trans*-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylic acid with polyfluorinated alcohols was carried out. Their effect on kinetics of inactivation of sodium current in neuroblastoma (*Neuro-2a*) cells by the patch-clamp technique in the whole-cell configuration was investigated.