

Том 415, Номер 3

ISSN 0869-5652

Июль 2007

ДОКЛАДЫ АКАДЕМИИ НАУК

<http://www.naukaran.ru>
<http://www.mak.ru>



“НАУКА”

УДК 612.815: 612.014.42: 616-003.725

ВЛИЯНИЕ ТЕТРААЛКИЛАММОНИЕВОВОГО ПРОИЗВОДНОГО 6-МЕТИЛУРАЦИЛА ИЗ НОВОГО КЛАССА ИНГИБИТОРОВ АХЭ НА АМПЛИТУДУ ПОТЕНЦИАЛОВ КОНЦЕВОЙ ПЛАСТИНКИ МЫШЦ РАЗНОГО ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ТИПА В УСЛОВИЯХ ВЫСОКОЧАСТОТНОЙ СТИМУЛЯЦИИ НЕРВА

© 2007 г. К. А. Петров, И. В. Ковязина, В. В. Зобов, Э. А. Бухараева, В. С. Резник,
член-корреспондент РАН Е. Е. Никольский

Поступило 28.02.2007 г.

Ингибирование ацетилхолинэстеразы (АХЭ) приводит к накоплению ацетилхолина в синаптической щели, вызывая при ритмической стимуляции стойкую деполяризацию постсинаптической мембраны и быстрое снижение амплитуд потенциалов концевой пластинки (ПКП), что в конечном счете нарушает генерацию потенциала действия мышечного волокна [1]. При отравлении антиАХЭ-веществами эти явления приводят к гибели человека и животных прежде всего из-за нарушения работы дыхательной мускулатуры [2].

В Институте органической и физической химии им. А.Е. Арбузова синтезирован новый класс ингибиторов АХЭ – тетраалкиламмониевые производные 6-метилурацила, характеризующиеся высокой избирательностью в отношении коммерческих препаратов АХЭ млекопитающих ($k^0 = 7.6 \cdot 10^8 - 3.5 \cdot 10^9$ моль⁻¹ · мин⁻¹) [3, 4]. Существенной особенностью действия этих соединений у млекопитающих *in vivo* по сравнению с традиционными антиАХЭ-средствами из классов фосфорорганических ингибиторов – карбаматов и ониевого солей – является большой диапазон между дозами, в которых они парализуют мышцы конечностей при функциональной нагрузке, и летальными дозами, в которых они блокируют дыхательные мышцы ($LD_{50}/ED_{50} > 50$) [5, 6]. Среди тетраалкиламмониевых производных 6-метилурацила наиболее эффективным является

1,3-бис[5(диэтил-*o*-нитробензиламмоний)пентил]-6-метилурацилдигидробромид (соединение № 547), имеющий коэффициент фармакологической безопасности (LD_{50}/ED_{50}) до 300 в зависимости от вида животного [5, 6].

Исходя из того, что ингибиторы АХЭ, содержащие катионные группировки, практически не проникают через гематоэнцефалический барьер и основной их мишенью является нервно-мышечный синапс, можно предположить, что отказ от выполнения функциональной нагрузки без угнетения дыхания в присутствии соединения № 547 связан с его способностью в различной степени ингибировать АХЭ в синапсах локомоторных мышц и диафрагме – основной мышце, обеспечивающей дыхание у млекопитающих. В предыдущих исследованиях по регистрации миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) нами было показано, что соединение № 547 в синапсах двигательных мышц (*m. extensor digitorum longus* (EDL) и *m. soleus*) вызывало характерные для ингибирования АХЭ изменения амплитудно-временных параметров МПКП в концентрациях в 100 раз ниже, чем в дыхательной (diaphragma) [7].

Для того, чтобы выяснить может ли антихолинэстеразное действие данного соединения приводить к блокаде синаптической передачи возбуждения в дыхательной и локомоторных мышцах и объяснить различие между дозами, в которых они парализуют мышцы конечностей при функциональной нагрузке, и летальными дозами, в которых они блокируют дыхательные мышцы, в данной работе исследовали изменение амплитуд ПКП в условиях стимуляции нерва с частотами, характерными для активности исследуемых типов двигательных единиц *in vivo*.

Паттерны активности в мышцах разного функционального профиля *in vivo* существенно различаются. Так, *m. EDL* содержит преимущественно “быстрые” двигательные единицы, для

Казанский институт биохимии и биофизики
Казанского научного центра
Российской Академии наук
Институт органической и физической химии
им. А.Е. Арбузова
Казанского научного центра
Российской Академии наук, Казань
Казанский государственный медицинский
университет

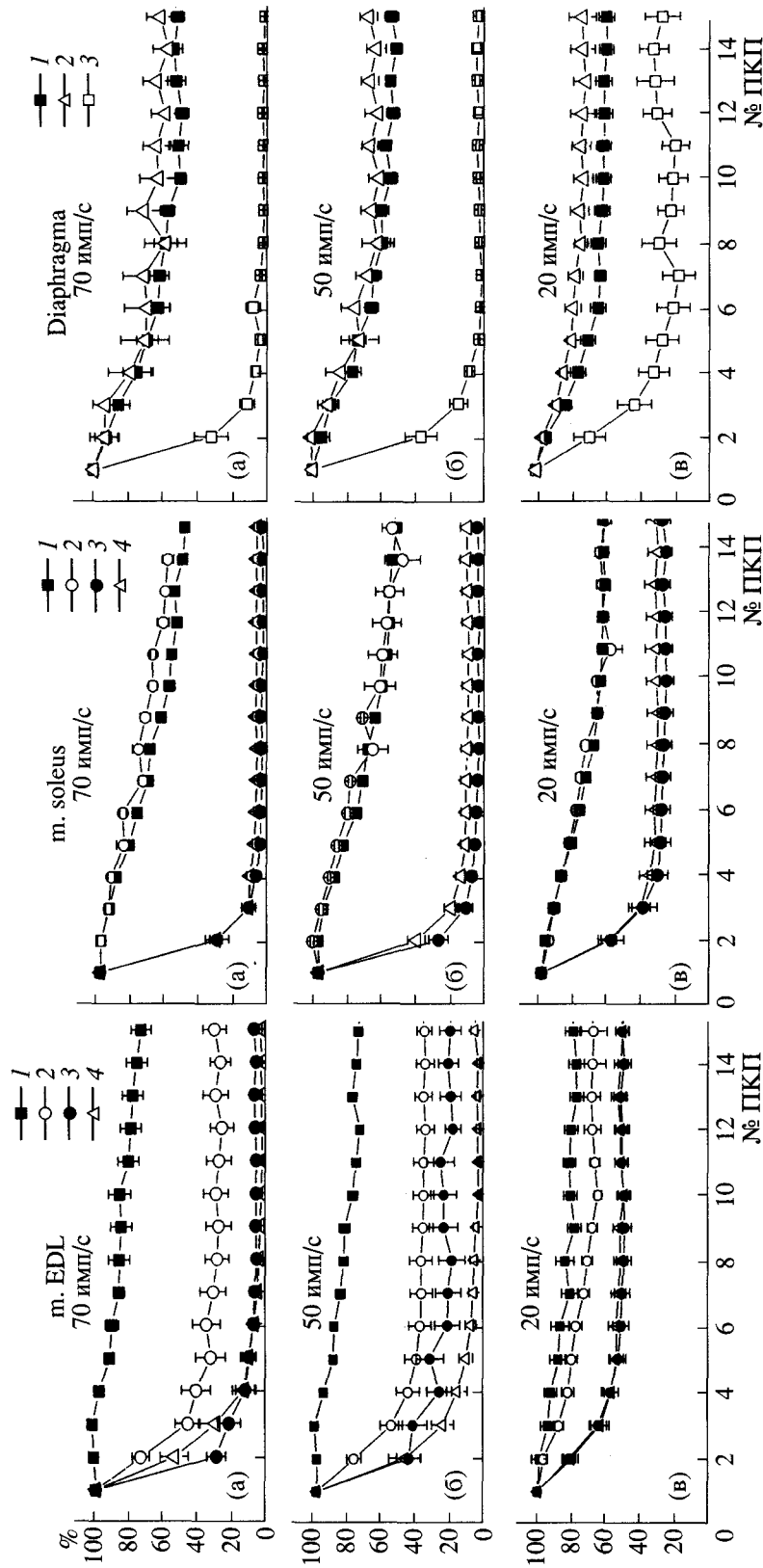


Рис. 1. Влияние соединения № 547 на депрессию амплитуд ПКП в условиях высокочастотной ритмической стимуляции нерва. По оси абсцисс – порядковый номер ПКП в пачке импульсов. По оси ординат – средняя амплитуда соответствующих ПКП, выраженная в процентах к амплитуде первого ПКП. (а – 70 имп/с, б – 50 имп/с, в – 20 имп/с). Для m. EDL и m. soleus: 1 – контроль, 2 – соед. № 547 $1 \cdot 10^{-9}$ моль/л, 3 – соед. № 547 $5 \cdot 10^{-9}$ моль/л, 4 – соед. № 547 $1 \cdot 10^{-8}$ моль/л; для диафрагма: 1 – контроль, 2 – соед. № 547 $1 \cdot 10^{-8}$ моль/л, 3 – соед. № 547 $1 \cdot 10^{-7}$ моль/л.

которых характерны короткие разряды с частотой 70–100 имп/с (5–10 в пачке); *m. soleus* содержит преимущественно “медленные” двигательные единицы, которые активны более длительное время с постоянной частотой 10–20 имп/с [8, 9], а двигательные единицы диафрагмы активны с частотой 10–50 имп/с [10].

Регистрацию ПКП при данных частотах стимуляции проводили на изолированных нервно-мышечных препаратах (*diaphragma*, *m. EDL*, *m. soleus*) белых беспородных крыс массой 250–300 г обоих полов. Изолированную мышцу помещали в экспериментальную ванночку, через которую протекал аэрированный карбагеном (45 мин) раствор Рингера–Кребса следующего состава (ммоль/л): NaCl 120.0, KCl 5.0, CaCl₂ 2.0, MgCl₂ 1.0, NaHCO₃ 11.0, NaH₂PO₄ 1.0, глюкоза 11.0, pH раствора поддерживали на уровне 7.2–7.4 при температуре 20 ± 2°C. Соединение № 547 было синтезировано в лаборатории химико-биологических исследований ИОФХ им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН. ПКП регистрировали с помощью стандартной микроэлектродной техники. Для предотвращения мышечных сокращений использовали блокатор Na⁺-каналов μ -conotoxin GШВ (Alamone Labs, Israel) в концентрации 2 · 10⁻⁶ моль/л. После предварительного усиления сигналы записывали на жесткий диск компьютера и анализировали с помощью оригинальной компьютерной программы. Поскольку известно, что депрессия амплитуд ПКП в условиях ингибирования АХЭ наиболее выражена в пределах первых 5–10 ответов в пачке [1], сравнивали амплитуды десятых ПКП в серии импульсов, в процентах по отношению к первому ответу в каждой мышце, при действии соединения № 547 в различных концентрациях. Амплитуду индивидуальных ПКП в пачке импульсов измеряли по отношению к уровню мембранного потенциала перед началом каждого ответа. Поправку Мартина для нелинейной суммации ПКП вычисляли, как описано в [11].

Добавление в перфузионный раствор соединения № 547 вызывало характерное для ритмической активности синапсов в условиях ингибированной АХЭ падение амплитуд ПКП на фоне стойкой деполяризации постсинаптической мембраны, при увеличении концентрации ингибитора переходящее в блок проведения. Хотя подобные явления наблюдались во всех исследованных мышцах, эффективность действия соединения № 547 в мышцах разного функционального типа существенно различалась. В *m. EDL* соединение № 547 в концентрации 1 · 10⁻⁹ моль/л вызывало падение амплитуд ПКП при частотах стимуляции 20, 50 и 70 имп/с (для 10-го сигнала до 60, 37 и 29% соответственно), в то время как в контроле амплитуда 10-го сигнала снижалась до 80, 78 и 86% (рис. 1, *m. EDL*). При увеличении концентрации соединения № 547 до 5 · 10⁻⁹ моль/л в *m. EDL* при

стимуляции с частотой 20 и 50 имп/с амплитуда 10-го ПКП падала до 50 и 25% соответственно. При частоте стимуляции 70 имп/с 10-й ПКП, как правило, отсутствовал, предположительно вследствие пресинаптического блока. При дальнейшем увеличении концентрации до 1 · 10⁻⁸ моль/л 10-й ПКП отсутствовал уже при частоте стимуляции 50 имп/с.

В синапсах *m. soleus* в присутствии концентрации 1 · 10⁻⁹ моль/л при всех исследуемых частотах стимуляции динамика изменения амплитуд ПКП не отличалась от наблюдаемой в контрольных условиях. При действии соединения № 547 в концентрации 5 · 10⁻⁹ моль/л и частоте стимуляции 20 имп/с амплитуда 10-го ПКП падала до 26% по сравнению с 65% в контроле. При частоте стимуляции нерва 50 и 70 имп/с 10-й ПКП отсутствовал (рис. 1, *m. soleus*).

В синапсах диафрагмы даже при концентрации соединения № 547 1 · 10⁻⁸ моль/л при всех частотах стимуляции динамика падения амплитуд ПКП не отличалась от наблюдаемой в контроле. При увеличении концентрации до 1 · 10⁻⁷ моль/л стимуляция двигательного нерва с частотой 20 имп/с вызывала падение амплитуды 10-го ответа до 22% по сравнению с 61% в контроле. При частотах стимуляции 50 и 70 имп/с в синапсах диафрагмы ответы на 10-й стимул исчезали (рис. 1, *diaphragma*).

Проведенные исследования показали, что в локомоторных мышцах (*m. EDL* и *m. soleus*) при частотах стимуляции, соответствующих физиологическим для этих мышц (70 и 20 имп/с), амплитуда ПКП падала более чем в 3 раза при действии соединения № 547 в концентрациях 1–5 · 10⁻⁹ моль/л, тогда как в дыхательной (при соответствующей частоте 20 имп/с) аналогичное падение ответов наблюдалось только при концентрации 1 · 10⁻⁷ моль/л. Следовательно, эффективность влияния соединения № 547 на амплитуду постсинаптических ответов в локомоторных мышцах оказалась примерно в 100 раз выше, чем в дыхательной мышце. Полное блокирование проведения возбуждения при различных режимах частотной стимуляции в дыхательной мышце в присутствии соединения № 547 наблюдалось в концентрации в 20 раз выше, чем в локомоторных мышцах. Полученные результаты свидетельствуют о том, что разная эффективность влияния соединения № 547 на депрессию амплитуд потенциалов концевой пластинки в синапсах дыхательной и локомоторных мышц может лежать в основе различий между дозами, вызывающими паралич мышц конечностей, и летальными дозами, блокирующими дыхание в экспериментах *in vivo*.

Работа поддержана грантами РФФИ № 07–04–01137, НИОКР АН РТ № 03–3.1–30/2006(Г) и Президента РФ “Ведущие научные школы” (№ 112.0/001/481).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Кривой И.И., Кулешов В.И., Матюшин Д.Л.* Нервно-мышечный синапс и антихолинэстеразные вещества. Л.: Изд-во ЛГУ, 1987. 238 с.
2. *Pore S., Karanth S., Liu J.* // Environ. Toxicol. and Pharmacol. 2005. V. 19. P. 433–446.
3. *Резник В.С., Аникиенко К.А., Курочкин В.К. и др.* // ДАН. 1998. Т. 362. № 1. С. 68–70.
4. *Аникиенко К.А., Бычихин Е.А., Курочкин В.К. и др.* // ДАН. 2001. Т. 376. № 6. С. 818–822.
5. *Зобов В.В., Петров К.А., Аслямова А.А. и др.* // Современ. пробл. токсикологии. 2004. Т. 3. С. 25–33.
6. *Зобов В.В., Петров К.А., Аслямова А.А. и др.* // ДАН. 2005. Т. 401. № 1. С. 120–123.
7. *Ковязина И.В., Петров К.А., Зобов В.В. и др.* // ДАН. 2004. Т. 399. № 5. С. 712–714.
8. *Hennig R., Lømo T.* // Nature. 1985. V. 214. P. 297–299.
9. *Wood S.J., Slater C.R.* // Progress Neurobiol. 2001. V. 64. P. 393–429.
10. *Kong F., Berger A.* // J. Appl. Physiol. 1986. V. 61. P. 1999–2004.
11. *Moyer M., van Lunteren E.* // J. Neurophysiol. 1999. V. 82. P. 3030–3040.