

Том 420, Номер 4

ISSN 0869-5652

Июнь 2008



ДОКЛАДЫ АКАДЕМИИ НАУК

журналу **75** лет

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



“НАУКА”

УДК 612.815:612.014.42:616–003.725

ВЛИЯНИЕ ТЕТРААЛКИЛАММОНИЕВОГО ПРОИЗВОДНОГО 6-МЕТИЛУРАЦИЛА НА ИНТЕНСИВНОСТЬ СПОНТАННОЙ И ВЫЗВАННОЙ СЕКРЕЦИИ АЦЕТИЛХОЛИНА ИЗ ДВИГАТЕЛЬНЫХ НЕРВНЫХ ОКОНЧАНИЙ

© 2008 г. К. А. Петров, И. В. Ковязина, В. В. Зобов, Э. А. Бухараева,
В. С. Резник, член-корреспондент РАН Е. Е. Никольский

Поступило 12.12.2007 г.

Важное место среди физиологически активных соединений занимают ингибиторы холинэстераз. Некоторые из них являются лекарственными препаратами и используются с целью увеличения эффективности синаптической передачи возбуждения в холинергических синапсах за счет продления времени пребывания молекул медиатора в синаптической щели и тем самым увеличения вероятности повторной активации рецепторов концевой пластинки [1]. Вместе с тем известно, что облегчение синаптического проведения развивается при ингибировании лишь части ацетилхолинэстеразы (АХЭ), при длительной и массивной инактивации фермента наблюдается угнетение синаптической передачи (курареподобный эффект) [2]. В основе этого эффекта могут лежать как пре-, так и постсинаптические механизмы. Постсинаптический механизм связан с развитием стойкой деполяризации концевой пластинки под влиянием эндогенного ацетилхолина, приводящей к инактивации натриевых каналов мембраны мышечного волокна или/и развитием десенситизации постсинаптических холинорецепторов. В основе пресинаптического механизма курареподобного действия лежит нарушение процесса выделения квантов ацетилхолина за счет активации пресинаптических холинорецепторов, контролирующих процессы экзоцитоза медиатора [3, 4]. Клиническое применение всех без исключения известных ингибиторов АХЭ существенно осложняется их чрезвычайно малой “фармакологической

безопасностью”, выражаемой как отношение летальной дозы к эффективной (LD_{50}/ED_{50}), обычно для этих препаратов не превышающее 5.0. Вследствие этого, с токсикологической точки зрения, они и “лечат” и “убивают” практически в одних и тех же дозах. Для расширения области применения ингибиторов АХЭ в медицинской практике актуальной является разработка новых соединений, характеризующихся высокой антиАХЭ активностью и вместе с тем фармакологической безопасностью [5]. Перспективным в связи с этим представляется синтезированный в Институте органической и физической химии им. А.Е. Арбузова новый класс ингибиторов АХЭ – тетраалкиламмониевые производные 6-метилурацила [6, 7]. Особенностью действия этих соединений у млекопитающих *in vivo* по сравнению с традиционными антиАХЭ средствами из классов фосфорорганических ингибиторов, карбаматов и ониевых солей является большой диапазон между дозами, которые парализуют мышцы конечностей при функциональной нагрузке, и летальными дозами, которые блокируют дыхательные мышцы ($LD_{50}/ED_{50} > 50$) [8, 9]. Среди тетраалкиламмониевых производных 6-метилурацила наиболее эффективным является 1,3-бис[5(диэтил-*o*-нитробензиламмоний)пентил]-6-метилурацилдидбромид (соединение № 547), имеющий коэффициент фармакологической безопасности около 300, в зависимости от вида животного [8, 9]. Ранее на нервномышечных препаратах локомоторных и дыхательной мышце крысы в условиях *in vitro* нами были выявлены различия в эффективности действия соединения № 547 на амплитудно-временные параметры миниатюрных потенциалов (МПКП) и токов концевой пластинки [10, 11]. В данной работе для оценки влияния соединения № 547 на состояние пресинаптического звена процесса передачи возбуждения было проведено исследование интенсивности спонтанной и вызванной квантовой секреции медиатора в синапсах мышц разного функционального профиля: локо-

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
Казанский государственный медицинский
университет

моторных (“быстрой” – *m. extensor digitorum longus* (*m. EDL*) и “медленной” – *m. soleus*) и мышц диафрагмы (“смешанной” – *diaphragma*) в присутствии соединения № 547.

Эксперименты проводили на изолированных нервно-мышечных препаратах белых беспородных крыс обоих полов массой 250–300 г. Изолированную мышцу с подходящим к ней нервом помещали в экспериментальную ванночку, через которую протекал аэрированный карбагеном (O_2 95%, CO_2 5%) раствор Рингера–Кребса следующего состава (ммоль/л): $NaCl$ 120.0, KCl 5.0, $CaCl_2$ 2.0, $MgCl_2$ 1.0, $NaHCO_3$ 11.0, NaH_2PO_4 1.0, глюкоза 11.0, pH раствора поддерживали на уровне 7.2–7.4 при температуре $20.0 \pm 0.5^\circ C$. Использовали соединение № 547, синтезированное в лаборатории химико-биологических исследований ИОФХ им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН. Вызванные стимуляцией двигательного нерва с частотой 0.5 имп/с потенциалы концевой пластинки (ПКП) и МПКП регистрировали с помощью стандартной микроэлектродной техники. После предварительного усиления сигналы записывали на жесткий диск компьютера и анализировали с помощью оригинальной компьютерной программы. Спонтанную квантовую секрецию ацетилхолина анализировали по средней частоте и гистограммам распределения межимпульсных интервалов МПКП. Квантовый состав ПКП оценивали в условиях пониженной концентрации Ca^{2+} (0.6 ммоль/л) и повышенной концентрации Mg^{2+} (6.0 ммоль/л) либо посредством деления средней амплитуды ПКП на среднюю амплитуду МПКП, либо методом “выпадения” [12, 13].

В исходных условиях интенсивность спонтанной квантовой секреции медиатора в *m. soleus* была достоверно ниже, чем в *diaphragma* и в *m. EDL*. Средняя частота МПКП составляла в *diaphragma* 1.9 ± 0.2 имп/с ($n = 8$), в *m. EDL* – 2.0 ± 0.1 имп/с ($n = 7$) и в *m. soleus* – 1.4 ± 0.1 имп/с ($n = 6$, $p < 0.05$) (рис. 1).

В *diaphragma* соединение № 547 в концентрациях $1 \cdot 10^{-9}$ моль/л и $1 \cdot 10^{-8}$ моль/л не вызывало достоверных изменений частоты МПКП, которая составила соответственно 1.9 ± 0.4 имп/с ($n = 8$, $p > 0.05$) и 1.8 ± 0.3 имп/с ($n = 7$, $p > 0.05$), и только при увеличении содержания ингибитора до $1 \cdot 10^{-7}$ моль/л наблюдалось снижение спонтанной секреции медиатора до 1.0 ± 0.4 имп/с ($n = 6$, $p < 0.05$) (рис. 1).

В *m. soleus* наблюдалось увеличение частоты МПКП в присутствии соединения № 547 в концентрациях $1 \cdot 10^{-9}$ и $1 \cdot 10^{-8}$ моль/л, тогда как при более высокой концентрации соединения частота МПКП уменьшалась до 1.0 ± 0.1 имп/с ($n = 6$, $p < 0.05$). В *m. EDL* эффект соединения № 547 наблюдался только начиная с концентрации $1 \cdot 10^{-8}$ моль/л,

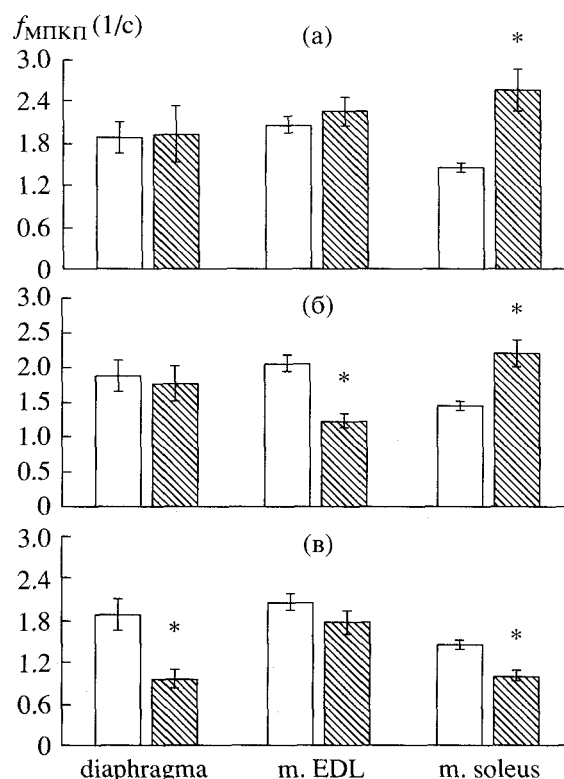


Рис. 1. Влияние соединения № 547 на частоту МПКП в синапсах мышц разного функционального типа. а – $1 \cdot 10^{-9}$; б – $1 \cdot 10^{-8}$; в – $1 \cdot 10^{-7}$ моль/л. Светлые столбики – контроль, заштрихованные – в присутствии соединения № 547.

когда средняя частота МПКП снижалась до 1.2 ± 0.11 имп/с ($n = 6$, $p < 0.05$) (рис. 1). Полученные данные свидетельствуют о различиях в эффективности концентрации соединения № 547, вызывающей изменение интенсивности спонтанной секреции квантов медиатора, которая оказалась примерно на два порядка выше для дыхательной мышцы, чем для локомоторных.

Средний квантовый состав ПКП составил соответственно в *m. soleus* 1.5 ± 0.2 ($n = 6$), в *m. EDL* 1.0 ± 0.1 ($n = 6$) и в *diaphragma* 2.0 ± 0.4 ($n = 6$). Вследствие достаточно высокой вариабельности исходных значений в разных синапсах даже одной и той же мышцы достоверных различий между квантовым составом в контроле в разных мышцах выявить не удалось. Так же как и для спонтанной секреции квантов, интенсивность вызванного освобождения в *diaphragma* оказалась менее чувствительна к влиянию соединения № 547, чем в локомоторных мышцах. В *diaphragma* достоверное снижение квантового состава (на 42%) наблюдалось только при действии соединения № 547 в концентрации $1 \cdot 10^{-7}$ моль/л, тогда как в *m. EDL* квантовый состав падал на 34% при его действии в концентрации $1 \cdot 10^{-8}$ моль/л. В *m. soleus* ингибитор оказывал эффект также в концен-

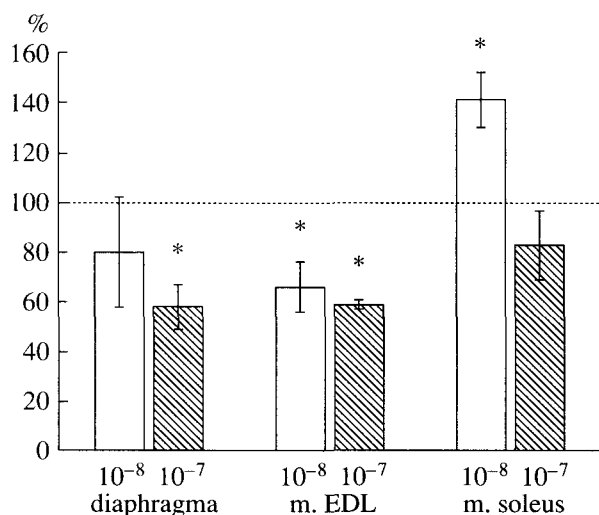


Рис. 2. Влияние соединения № 547 на квантовый состав ПКП в синапсах мышц разного функционального типа. По оси ординат – отношение значений квантового состава ПКП в присутствии ингибитора к квантовому составу в контроле, принятому за 100%. Светлые столбики – соединение № 547 в концентрации $1 \cdot 10^{-8}$ моль/л, заштрихованные – в концентрации $1 \cdot 10^{-7}$ моль/л.

трации $1 \cdot 10^{-8}$ моль/л, однако эффект был противоположной направленности (рис. 2).

Таким образом, концентрации соединения № 547, при которых наблюдались изменения интенсивности спонтанной квантовой секреции и квантового состава ПКП, в синапсах дыхательной мышцы были значительно выше, чем в синапсах локомоторных мышц.

Несмотря на то, что результаты проведенных экспериментов не позволяют говорить о конкретных молекулярных механизмах, обеспечивающих разную чувствительность моторных нервных окончаний мышц разного функционального профиля к соединению № 547, есть все основания полагать, что значительно меньшая чувствительность процессов, контролирующих вызванную

секрецию медиатора в дыхательной мышце, вносит вклад в обеспечение высокого показателя фармакологической безопасности данного соединения в экспериментах *in vivo*. Тот факт, что процесс спонтанной секреции также значительно более устойчив к действию соединения в синапсах диафрагмы, говорит о том, что конкретные механизмы более низкой чувствительности нервной дыхательной мышцы необходимо искать на тех этапах нейромедиации, которые являются общими для спонтанного и вызванного освобождения.

Работа поддержана грантами РФФИ (07-04-01137, 07-04-12097) и Президента РФ “Ведущая научная школа”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Машиковский М.Д.* Лекарственные средства. М.: Новая волна, 2005. 1206 с.
2. *Прозоровский В.Б.* Неантихолинэстеразные механизмы действия антихолинэстеразных средств. Л.: Медицина, 1976. 160 с.
3. *Hevron E., David G., Aron A., Yaari Y.* // *Neurosci. Lett.* 1986. V. 72. P. 87–92.
4. *Nikolsky E.E., Vyskocil F., Bukharaeva E.A. et al.* // *J. Physiol.* 2004. V. 560. Pt 1. P. 77–88.
5. *Eddleston M., Eyer P., Worek F.F. et al.* // *Lancet.* 2005. V. 366. № 9495. P. 1452–1459.
6. *Резник В.С., Аникиенко К.А., Курочкин В.К. и др.* // *ДАН.* 1998. Т. 362. № 1. С. 68–70.
7. *Аникиенко К.А., Бычихин Е.А., Курочкин В.К. и др.* // *ДАН.* 2001. Т. 376. № 6. С. 818–822.
8. *Зобов В.В., Петров К.А., Аслямова А.А. и др.* // *Соврем. пробл. токсикологии.* 2004. Т. 3. С. 25–33.
9. *Зобов В.В., Петров К.А., Аслямова А.А. и др.* // *ДАН.* 2005. Т. 401. № 1. С. 120–123.
10. *Ковязина И.В., Петров К.А., Зобов В.В. и др.* // *ДАН.* 2004. Т. 399. № 5. С. 712–714.
11. *Petrov K.A., Kovyazina I.V., Zobov V.V. et al.* // *Physiol. Res.* 2006. V. 55. № 5. P. 585–589.
12. *Del Castillo J., Katz B.* // *J. Physiol.* 1954. V. 124. P. 574–585.
13. *Martin A.R.* // *J. Physiol.* 1955. V. 130. P. 114–122.