

УДК 612.014.46:615.214:547.78

Т. В. Гамма, И. И. Коренюк, М. Ю. Баевский, А. А. Замотайлов, Л. А. Кобылянская

ЭФФЕКТЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ БЕНЗИМИДАЗОЛА И НЕКОТОРЫХ ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ НА ПАРАМЕТРЫ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ПОТЕНЦИАЛОВ НЕЙРОНОВ МОЛЛЮСКА

Литературные данные свидетельствуют о том, что дибазол и 5,6-диметилбензимидазол устраняют некоторые неврологические нарушения при экспериментальной травме головного мозга и могут быть использованы для профилактики болевого шока [1-3]. Кроме того, известно, что дибазол, бензимидазол и триазоло[3,2-а]бензимидазол обладают и противосудорожным действием [7-9]. Причем, вышеперечисленные эффекты, вызываемые данными соединениями, зависят от силы и типа их действия на центральную нервную систему (ЦНС) [10-12]. Следует отметить, что выводы о влиянии указанных веществ на ЦНС сделаны по эффектам, полученным после системного введения препаратов, что же касается механизмов их влияния, то они остаются малоизученными. Поскольку основным структурным элементом ЦНС является нейрон, мембрана которого может быть мишенью воздействия вышеуказанных веществ, то, очевидно, механизмы наблюдаемых эффектов могут быть раскрыты при изучении изменений характеристик электрических потенциалов нейронов. В связи с этим, в настоящей работе мы изучали влияние бензимидазола и некоторых его производных на параметры электрической активности идентифицированных нейронов моллюска.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты были проведены на идентифицированных нейронах ППа1, ППа2, ППа7 и неидентифицированных нейронах правого парietального и висцерального ганглиев улиток крымской популяции (*Helix albescens* Rossm) [7, 8]. Было изучено влияние 2-бензилбензимидазол гидрохлорида – фармпрепарата дибазола (1), бензимидазол гидрохлорида (2), 2-аминометилбензимидазол дигидрохлорида (3) и 2-циклопропанбензимидазола (4) на частотные и амплитудно-временные характеристики потенциалов нейронов. Эти вещества разводили в растворе Рингера того же состава, что омывал препарат. Диапазон концентраций апплицируемых соединений находился в пределах 10^{-6} - 10^{-2} М. В ванночку объемом 0,5 мл, в которой находился препарат ганглия, вводили 1 мл раствора вещества. Таким образом происходила полная замена раствора Рингера на тестируемый раствор определенной концентрации.

ЭФФЕКТЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ БЕНЗИМИДАЗОЛА И НЕКОТОРЫХ ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ НА ПАРАМЕТРЫ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ПОТЕНЦИАЛОВ НЕЙРОНОВ МОЛЛЮСКА

Внутриклеточно отводимые биопотенциалы усиливали с помощью универсальной физиологической установки УФУ-БКН (полоса пропускания 0-10 кГц) и через лабораторный интерфейс подавали на компьютер IBM PC. Регистрация временных и амплитудных параметров потенциалов нейронов (критического уровня деполяризации – КУД, восходящей и нисходящей фаз потенциала действия (ПД) и следовой гиперполяризации) и их обработка обеспечивалась компьютерной программой.

Наблюдение за импульсной активностью нейронов производилось на протяжении всего периода воздействия веществ. Наличие эффектов влияния соединений определялось по сопоставлению вышеуказанных параметров электрических потенциалов в фоне с таковыми, регистрируемыми через 0,5, 1 и 5 мин от момента аппликации вещества и от начала отмывания.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Была зарегистрирована активность 30 нейронов ППа1, 25 - ППа2, 20 - ППа7 и 30 неидентифицированных нейронов.

Для всех типов исследованных нейронов пороговые концентрации соединений 1-3 составили 10^{-5} М, а для соединения 4 – 10^{-4} М. При этом эффекты воздействия исследуемых производных бензимидазола были слабовыраженными.

Для выяснения динамики и зависимости эффектов соединений от дозы тестируемые вещества апплицировали в сверхпороговых концентрациях, при которых наблюдалось достаточно выраженное изменение анализируемых параметров потенциалов у всех типов исследованных нейронов.

Влияние *2-бензилбензимидазол гидрохлорида* (1). Эффект этого вещества в концентрации 10^{-4} М на нейрон ППа1 с фоновой пачечной активностью (рис. 1, А) наступал обычно через 100-120 с и выражался в модулировании пачечного ритма генерации ПД (рис. 1, Б). Наряду с изменением паттерна импульсации наблюдалось изменение и амплитудно-временных параметров потенциалов. В частности, уменьшались КУД на 4-6 мВ (30-35 %) и амплитуда ПД на 16-20 мВ (10-13 %) и увеличивалась его продолжительность: фаза деполяризации с 3,2-4,8 мс в фоне до 6,4-8 мс после воздействия и фаза реполяризации - с 7,4-9 мс до 30-35 мс соответственно. Кроме того, наблюдалось уменьшение амплитуды следовой гиперполяризации на 5-8 мВ и увеличивалась в 2-3 раза ее продолжительность. После отмывания раствором Рингера в течение 15-20 мин у 18-ти исследуемых нейронов ППа1 восстанавливались исходный пачечный ритм генерации и амплитудно-временные параметры потенциалов. У остальных 12-ти нервных клеток – наблюдалась только тенденция к группированию импульсов в пачки (рис. 1, В), а амплитудно-временные параметры за все это время не возвращались к исходному уровню. По-видимому, такое разнонаправленное (двойное) действие соединения может быть обусловлено тем, что хеморецепторы мембраны, взаимодействующие с данным веществом, имеют не один центр его связывания. Возможно, такую двойственность можно объяснить наличием разных классов рецепторов. У нейронов ППа2 и ППа7 в этой же концентрации вызывало несущественные изменения амплитудно-временных и частотных параметров потенциалов.

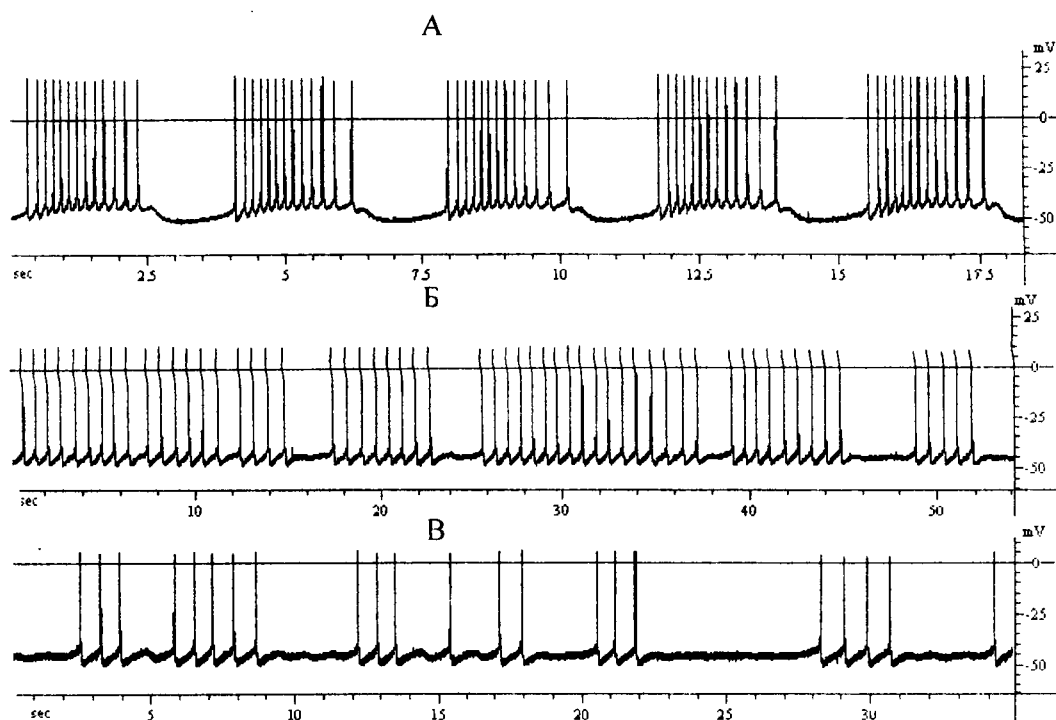


Рис. 1. Эффекты аппликации 2-бензилбензимидазол гидрохлорида в концентрации 10^{-4} М на электрическую активность нейрона ППа1: А – фоновая активность, Б – на 5 мин от момента аппликации вещества, В – на 5-ой мин от начала отмывания.

С увеличением концентрации 1 до 10^{-3} М у нейронов ППа1 и ППа2 эффект начинал развиваться уже на 20-40 с, то есть в 3-5 раз быстрее, и проявлялся в снижении: КУД на 20-35 % (по сравнению с фоном), амплитуды ПД – на 20-25 %, продолжительности фаз деполяризации и реполяризации – в среднем на 20 %, а также амплитуды следовой гиперполяризации – на 25 %. Несмотря на ингибирующую направленность действия вещества прекращения генерации импульсов на протяжении его экспозиции не происходило, а наоборот, у нейрона ППа1 увеличивалась частота импульсов в пачках при неизменной продолжительности межпачечного интервала. Данный факт позволяет предположить, что действие 1 на активность нейрона ППа1 не связано непосредственно с изменением МП, а обусловлено активацией специфических ионных каналов, ответственных за генерацию ритмоводящей пачечной активности. Данные каналы отличаются от обычных натриевого и калиевых, обеспечивающих генерацию ПД, и функционируют лишь в нейронах, генерирующих ритмоводящую активность [15]. После 15-20 мин отмывания фоновые параметры потенциалов не восстанавливались. Поскольку под действием соединения 1 в концентрации 10^{-3} М изменяются все компоненты потенциалов, то очевидным является его влияние на разные механизмы, обеспечивающие генерацию ПД и следовые процессы в клетке. В отношении нейронов ППа7 следует отметить, что воздействие 1 в концентрации 10^{-3} М также начинало проявляться спустя 20-30 с после аппликации и в течение 10-

12 с вызывало прекращение ими генерации ПД, которая не восстанавливалась при отмывании. Подобное отличие эффектов воздействия вещества в данной концентрации на разные нейроны может указывать на специфичность мембранных систем этих типов нервных клеток, которые, как известно [10, 11], обладают индивидуальными различиями ионных механизмов электрической активности и функциональной специфичностью.

При увеличении концентрации **1** до 10^{-2} М у всех исследуемых нейронов эффект наступал уже на 5-10 с воздействия и в течение 5-7 с нейроны теряли способность к импульсации. После 20-40 мин отмывания у нейронов ППа1 и ППа2 наблюдалось восстановление генерации, параметры которых существенно отличались от фоновых. У нейрона ППа7 импульсная активность после отмывания не восстанавливалась.

Эффект воздействия *бензимидазол гидрохлорида (2)*. Выраженные эффекты воздействия **2** проявлялись в концентрации 10^{-3} М. Так, у нейрона ППа7 по сравнению с фоном снижались КУД на 7-10 мВ (в среднем на 48 %) и амплитуда ПД – на 30-37 мВ. После 5 мин экспозиции **2** значения КУД и амплитуды ПД приближались к фоновым показателям, что, очевидно, может быть обусловлено десенситизацией рецепторов мембраны нейронов. Такая же направленность эффекта наблюдалась и у нейрона ППа1, КУД которого также снижался на 7-11 мВ, а у нейрона ППа2 – КУД увеличивался на 27-36 %. Следует отметить, что, несмотря на разнонаправленные влияния вещества на механизмы допороговой деполяризации разных типов нейронов, амплитуда ПД как идентифицированных, так и неидентифицированных клеток уменьшалась. Продолжительность восходящей и нисходящей фаз ПД у нейрона ППа7 существенно не изменялись, в то время как у нейрона ППа2 продолжительность фазы деполяризации ПД уменьшалась на 40-60 % от таковой в фоне, а у нейрона ППа1 – увеличивалась на 75-80 %. Продолжительность нисходящей фазы ПД у нейрона ППа2 увеличивалась в 1,5-3 раза, а у нейрона ППа1 уменьшалась в 1,1-1,2 раза.

В концентрации 10^{-2} М соединение **2** вызывало полное и необратимое угнетение импульсной активности у идентифицированных нейронов, которые на поляризацию их мембран деполяризующим током не отвечали. Обращает на себя внимание тот факт, что некоторые неидентифицированные нейроны, после введения в них микроэлектрода, проявляли импульсную активность. Это свидетельствует о специфичности нейронов, а именно о различных электрофизиологических свойствах клеток и их назначении [11].

Влияние *2-аминометилбензимидазол дигидрохлорида (3)*. Эффект воздействия **3** в концентрации 10^{-4} М у всех исследованных нейронов начинал проявляться через 15 – 20 с и выражался в том, что на фоне незначительной деполяризации мембраны увеличивалась в 2-2,5 раза частота генерации импульсов, амплитуда которых превышала фоновые значения на 20-25 мВ. В концентрации 10^{-3} М **3** у всех типов нейронов повышало на 10-15 мВ амплитуду ПД на фоне деполяризационного сдвига МП, на 2-4 мВ – КУД, на 3-6 мс – продолжительность восходящей и нисходящей фаз. При этом, амплитуда и продолжительность следовой гиперполяризации изменялись незначительно. После отмывания соединения в концентрациях 10^{-4} М и 10^{-3} М исходные параметры электрических потенциалов нейронов приближались к фоновым показателям.

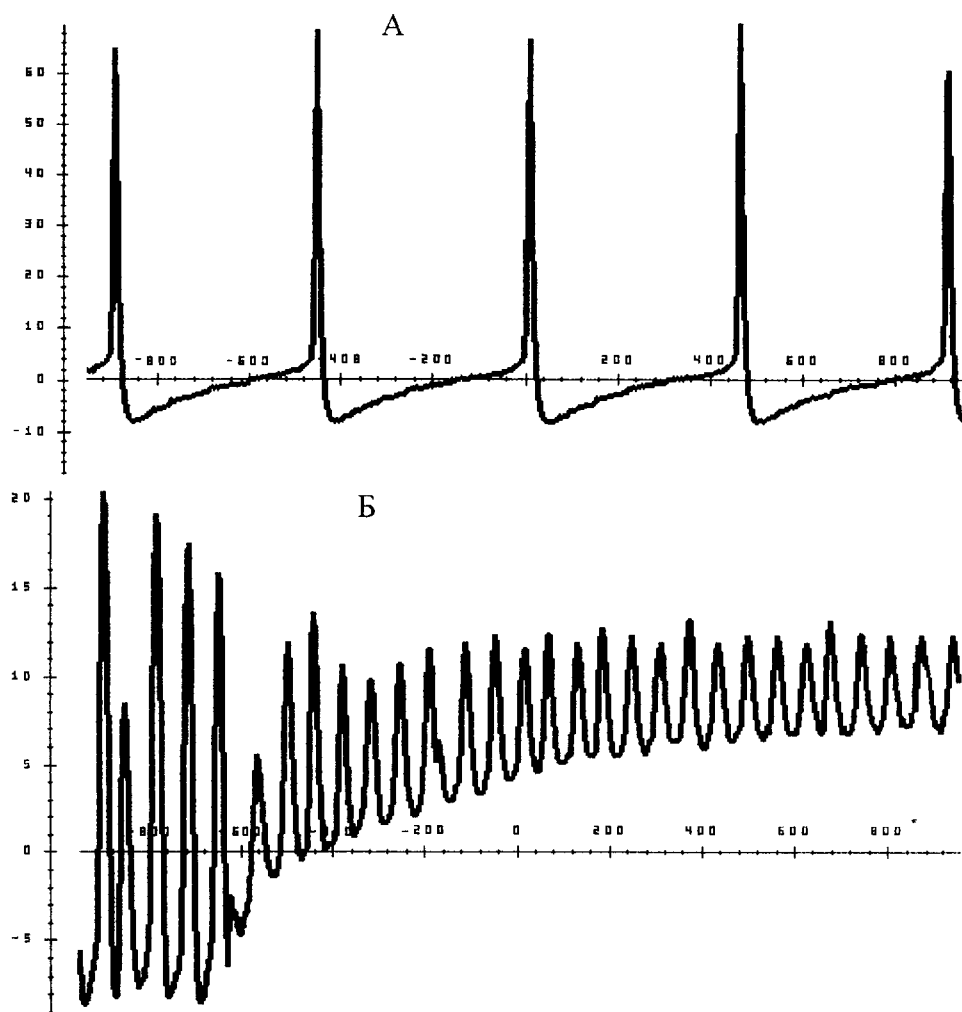


Рис.2. Влияние 2-циклопропанбензимидазола в концентрации 10^{-2} М на электрическую активность неидентифицированного нейрона висцерального ганглия: А – фоновая активность нейрона; Б – на 0,5 мин после аппликации вещества.

В концентрации 10^{-2} М **3** в течение 3-10 с приводило к полному угнетению импульсной активности нейронов, которая после отмывания постепенно восстанавливалась.

Влияние 2-циклопропанбензимидазола (**4**). Соединение **4** в концентрации 10^{-3} М (пороговая концентрация 10^{-4} М) у всех исследуемых типов нейронов увеличивало на 10-15 мВ амплитуду ПД, не изменяя его продолжительности. Следует отметить, что наиболее выраженные изменения были характерны для следовой можно полагать, что данное вещество может изменять проницаемость мембраны

**ЭФФЕКТЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ БЕНЗИМИДАЗОЛА И НЕКОТОРЫХ ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ
НА ПАРАМЕТРЫ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ПОТЕНЦИАЛОВ НЕЙРОНОВ МОЛЛЮСКА**

для ионов Na^+ , что приводит к увеличению амплитуды ПД и замедление развития следовой гиперполяризации, которая обусловлена работой калиевых и (или) хлорных каналов и активностью электрогенного насоса [18; 19].

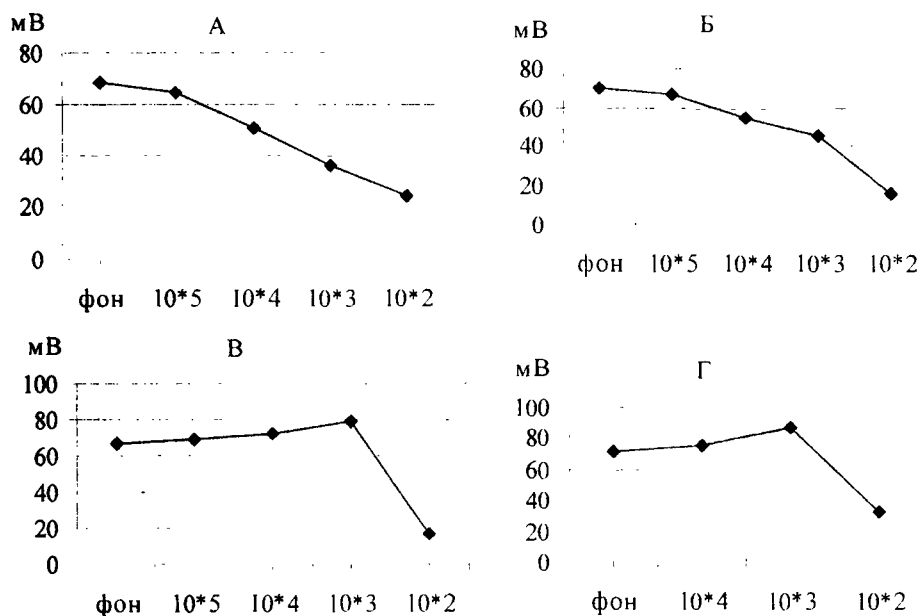


Рис. 3. Зависимость амплитуды ПД нейронов от концентрации тестируемого вещества: А – 2-бензилбензимидазол гидрохлорид; Б – бензилбензимидазол гидрохлорид; В – 2-аминометилбензимидазол дигидрохлорид; Д – 2-циклопропанбензимидазол.
По оси абсцисс обозначена концентрация исследуемого вещества.

При увеличении концентрации соединения 4 до 10^{-2} М в течение первых 5-10 с приводило на фоне деполяризации мембраны к резкому снижению амплитуды ПД с последующим полным прекращением импульсной активности нейронов (рис.2), которая после 20-40 мин отмывания не восстанавливается. Следовательно, соединение 4 в концентрации 10^{-2} М оказывает необратимое влияние на ионные механизмы мембраны нейронов, лежащие в основе ее электрических явлений.

При детальном анализе амплитудно-временных параметров у нейронов различных типов мы попытались определить зависимость изменения их значений от концентрации соединений. Наиболее четкая концентрационная зависимость была выявлена только в отношении амплитуды ПД, которая носила линейный характер (рис. 3). Как видно из рисунка (А, Б) у всех исследованных нейронов с увеличением концентрации 1 и 2 происходит постепенное снижение амплитуды ПД. Эффекты влияния 3 и 4 проявлялись, наоборот, в увеличении амплитуды ПД (рис. В, Г). Однако, концентрация веществ 10^{-2} М является токсической для всех нейронов о чем свидетельствует тот факт, что уже на 1 минуте экспозиции веществ происходит резкое снижение амплитуды ПД с последующим полным прекращением их генерации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как следует из результатов проведенных экспериментов, соединение 1 модулирует пачечную активность нейрона ППа1, уменьшая интервал между пачками ПД. Это может быть обусловлено влиянием соединения 1 на работу кальций-активируемых калиевых каналов мембраны исследуемой клетки, регулирующих межпачечный интервал, или на активность электрогенного натриевого насоса [13]. С другой стороны, исходя из того, что пачечная активность нейрона ППа1 имеет экзогенное происхождение и связана с кальцийзависимым высвобождением нейропептида из пресинаптических терминалей пептидэргического интернейрона [14], то нельзя исключить и опосредованное воздействие соединения 1 на интернейрон. Кроме того, модуляция пачечной активности нейрона под действием вещества может быть обусловлена и метаболическим изменением внутринеурональной концентрации циклических нуклеотидов [10]. Не исключено, что все эти механизмы могут быть задействованы одновременно.

Поскольку в низких концентрациях все исследованные соединения изменяют только параметры амплитуды ПД нейронов, можно считать, что наиболее чувствительным к их действию является входящий Na^+ -ток. Тот факт, что при увеличении дозы соединений наблюдались выраженные изменения и других параметров электрических потенциалов, может указывать на то, что данные вещества затрагивают и другие механизмы электрической активности нейронов. Необходимо отметить, что для нейронов моллюска оптимальными концентрациями тестируемых веществ являются 10^{-4} и 10^{-3} М.

Результаты наших экспериментов показали, что соединения 1, 2 и 4 в концентрации 10^{-2} М оказывают токсическое и необратимое действие на нейроны ППа1, ППа2 и ППа7. Это может быть обусловлено тем, что данные вещества образуют комплексы с поверхностными субстратами мембраны [15]. Тот факт, что при данной концентрации соединений определенная часть неидентифицированных нейронов сохраняет функциональную активность, указывает на неодинаковую хемочувствительность разных нейронов нервной системы улитки.

Таким образом, все исследованные нами производные бензимидазола вызывают изменения электробиогенеза нейронов ЦНС улитки. Касаясь механизмов взаимодействия исследованных веществ с мембранами идентифицированных и неидентифицированных нейронов, то они могут быть результатом изменения проницаемости мембраны конкретных нейронов и (или) влиянием соединений на синтез определенных компонентов транспортной системы мембраны. Поскольку электрическая активность многих клеток зависит и от их энергетического статуса, то нельзя исключить, что данные вещества могут конкурентно взаимодействовать с метаболитными рецепторами, через которые ряд нейромедиаторов регулируют активность ионных каналов. Следует помнить, что в реализации нейротропного эффекта этих веществ определенную роль могут иметь их физико-химические характеристики. Учитывая тот факт, что соединения 3 и 4 дозозависимо увеличивали амплитуду ПД, а соединения 1 и 2 – ее снижали, можно предположить, что данные вещества могут проявлять антидепрессантные и седативные свойства соответственно. Необходимо все-таки отметить, что для доказательства того или иного механизма действия производных бензимидазола необходимы дополнительные исследования.

люска указывают на то, что мембраны нейронов обладают выраженной специфичностью, которая может быть обусловлена характерной для каждого типа нейронов комбинацией ионных каналов. Это позволяет каждому нейрону отвечать специфическим манером на действие соединений. Сложная динамика влияния бензимидазола и его производных в различных концентрациях на функциональную активность нейронов позволяет сделать заключение о наличии нейротропного эффекта у всех исследованных соединений, которые можно будет использовать для регуляции возбудимости нейронов.

Список литературы

1. Шаймарданова Г.С., Камбург Р.А., Евстигнеева Р.П., Сергеева Н.В. Имидазол и его производные как биологически активные вещества // Хим-фарм. журнал, 1992, №3, с. 31-37.
2. Розин М.А. Фармакология патологических процессов. – Л.: Наука, 1951, с. 269-290
3. Розин М.А. Синтез белка и резистентность клеток. – Л.: Наука, 1971, с. 3-6.
4. Аносов Н.Н., Розин М.А., Прозерин, эзерин, дибазол и их применение в невропатологии Л.: Наука, 1956, с. 106.
5. Морозов И.С., Анисимова В.А., Авдюнина Н.И., Лукова О.А. и др. Синтез и нейропсихотропная активность адамантилзамещенных имидазо[1,2- α]бензимидазолов // Хим-фарм. журнал, 1988, №7, с. 815.
6. Липсон В.В., Десенко С.М., Орлов В.Д., Рындина Е.Н. и др. 1,4-дигидропиримидо[1,2- α]бензимидазолы и их биологическая активность // Хим-фарм. журнал, 1994, №2, с. 14-13.
7. Сахаров Д.А. Генеалогия нейронов. – М.: Наука, 1974. – с.37-70.
8. Коваль Л.М., Кононенко Н.И. Новые идентифицируемые нервные клетки виноградной улитки *Helix pomatia*, связанные с генерацией ритмоводящей активности // Журнал высшей нервной деятельности имени И. В. Павлова.- 1992.- Т.42.- №6.- С. 1124-1131.
9. Кононенко Н.И. Влияние теофиллина на электрическую активность нейрона ППа2 виноградной улитки // Нейрофизиология, Т.13, № 6, 1981, с. 655-657
10. Магура И.С. Проблемы электрической возбудимости нейрональной мембраны. Киев. «Наукова Думка», 1981, 208 с.
11. Иерусалимский В.Н., Захаров И.С., Палихова Т.С., Балабан П.М. Нервная система и картирование нейронов брюхоногого моллюска *Helix lucorum L.* // Журнал высшей нервной деятельности имени И. В. Павлова, 1992, Т. 42, №6, с. 1075-1089.
12. Магура И.С., Вихрева Л.А. Электроуправляемые калиевые каналы соматической мембраны нейронов моллюска // Нейрофизиология – 1984.- Т. 16. - №3. - С. 296-307.
13. Ходоров Б.И. Общая физиология возбудимых мембран. -М.: Наука, 1975. - 340 с
14. Кононенко Н.И., Костюченко О.В. Механизмы генерации ритмоводящей активности в идентифицированных нейронах виноградной улитки // Нейрофизиология. - 2001. - Т.33, №1. -С. 46-54.
15. Пирузян Л.А., Ковалев В.И., Лаврецкая Э.Ф., Ландау М.А. и др. Действие физиологически активных соединений на биологические мембраны. М.: Наука, 1974, 389 с.

Поступила в редакцию 10.09.2002 г.