

УДК 612.014.46:615.214:547.78

ЭФФЕКТЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ 2-ТРИФТОРМЕТИЛБЕНЗИМИДАЗОЛ ГИДРОХЛОРИДА НА ПАРАМЕТРЫ БИОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ МОЛЛЮСКА

Коренюк И.И., Гамма Т.В., Замотайлов А.А.

Разнообразие физико-химических свойств бензимидазолов определяет широкий спектр их биологической активности. Из литературы известно [1], что действие бензимидазолов проявляется в изменении состояния и функций молекулярных механизмов клеток, органов и всего организма. К настоящему времени синтезировано и проходит клиническое испытание большое количество производных бензимидазола с модификацией у второго атома углерода [2-7]. Одним из таких производных является 2-трифторметилбензимидазол гидрохлорид (ТФМБ).

Поскольку структурным элементом ЦНС есть нейрон, мембрана которого является основной мишенью воздействия биологически активных веществ, то, очевидно, что механизмы их эффектов могут быть раскрыты при изучении изменений электрических характеристик мембраны. В связи с этим целью работы было изучение эффектов воздействия ТФМБ на параметры биоэлектрической активности нейронов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проведены на идентифицированных нейронах ППа1 (n=14), ППа2 (n=15), ППа7 (n=10) и неидентифицированных нейронах правого париетального и висцерального ганглиев (n=21) моллюска *Helix albescens* Rossm. 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. Наблюдение за импульсной активностью нейронов производилось на протяжении всего периода воздействия веществ. Наличие эффектов влияния соединений определялось по сопоставлению временных и амплитудных параметров электрических потенциалов в фоне с таковыми, регистрируемыми через 0,5, 1 и 5 мин от моментов аппликации и отмывания вещества. Регистрация параметров биоэлектрической активности нейронов и их обработка обеспечивалась компьютерной программой «Action Potential» [9], позволяющей также производить непрерывную запись показателей уровня мембранного потенциала (МП) и потенциала действия ПД в течение заданного времени с возможностью получения первой производной одного или нескольких ПД любого фиксированного участка записи осциллограммы. Основное

внимание в настоящей работе уделено анализу частотных и амплитудно-временных характеристики потенциалов нейронов и первой производной ПД, которую использовали для оценки максимумов скорости нарастания и спада ПД [8], что позволяло выяснить, на какие механизмы генерации ПД влияет ТФМБ.

ТФМБ разводили в растворе Рингера того же состава, что омывал препарат до концентраций 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} и 10^{-2} М. Количество однократно выводимого из пипетки раствора вещества составляло 1 мл. Поскольку, при этом перекрывался проток раствора Рингера, а объем ванночки, в которой находился препарат, составлял 0,5 мл, то это обеспечивало полную замену физиологического раствора на тестируемый раствор.

Обработка результатов проводилась с использованием t-критерия Стьюдента для зависимых выборок в программе Statistica 5.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первоначально нами для всех типов исследованных нейронов была определена пороговая концентрация ТФМБ. Она составляла 10^{-5} М, и при этом эффект воздействия соединения был слабовыраженным. Необходимо отметить, что у разных типов нейронов на воздействие ТФМБ проявлялись неодинаковые ответные реакции, то есть вещество обладало гетеронаправленными эффектами.

Так, у нейрона ППа1 достаточно выраженный эффект ТФМБ в концентрации 10^{-4} М проявлялся через 10-20 с. Типичная форма реакции нейрона ППа1 на аппликацию соединения представлена на рис. 1. Как видно из рисунка эффект воздействия соединения заключался в снижении уровня МП и амплитуды ПД и увеличении частоты генерации импульсов (ЧГИ). При этом, не наблюдалось существенного изменения порога генерации ПД. Тот факт, что после аппликации ТФМБ на фоне снижения МП увеличивается ЧГИ указывает на увеличение проводимости мембраны для ионов Na^+ , а деполяризация мембраны свидетельствует о нарушении функционирования натрий-калиевого насоса [10]. К пятой минуте экспозиции ТФМБ МП и амплитуда ПД снижались (до $-65,4 \pm 1,1$ и $55,4 \pm 5,1$ мВ от фонового уровня $-70,2 \pm 2,7$ и $90 \pm 3,8$ мВ соответственно), а временной ход ПД не изменялся. При воздействии вещества постепенно снижался, а затем и вовсе отсутствовал овершут, который в фоне составлял $15,4 \pm 2,2$ мВ. Это, по-видимому, может свидетельствовать о снижении входящего натриевого тока и/или раннем возрастании проницаемости мембраны для ионов калия, в результате чего амплитуда ПД значительно снижается.

После отмывания в течение 20 мин деполяризация мембраны сменялась гиперполяризацией (до $-84 \pm 5,4$ мВ) и прекращением генерации ПД. Анализ скоростей нарастания и спада трансмембранных ионных токов (рис. 1, Б, внизу) позволил выяснить, что под влиянием ТФМБ в концентрации 10^{-4} М происходит постепенное снижение максимумов скоростей нарастания (от фоновых

ЭФФЕКТЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ 2-ТРИФТОРМЕТИЛБЕНЗИМИДАЗОЛ ГИДРОХЛОРИДА НА
ПАРАМЕТРЫ БИОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ МОЛЛЮСКА

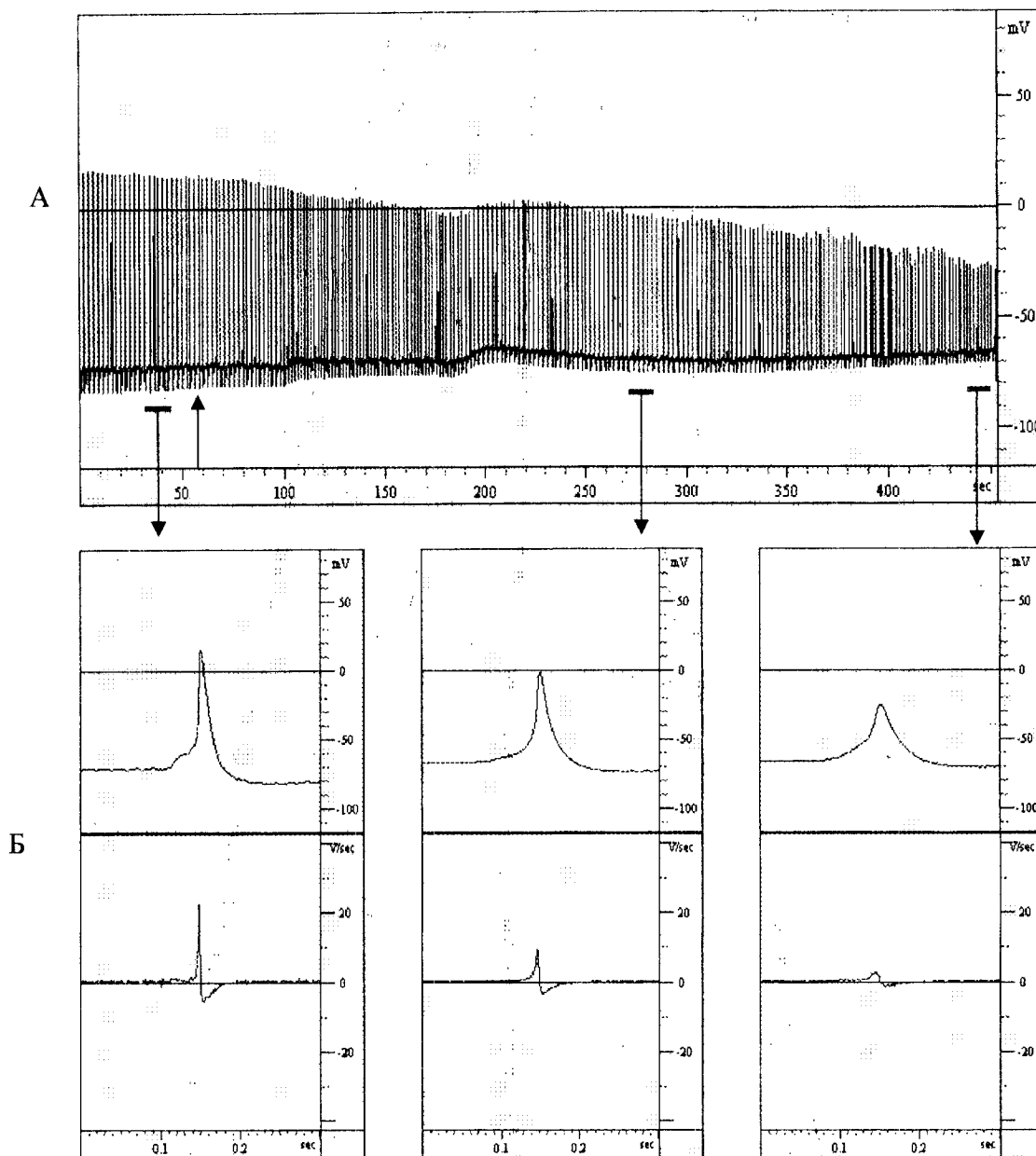


Рис. 1. Влияние 2-трифторметилбензимидазол гидрохлорида в концентрации 10^{-4} М на электрические потенциалы нейрона ППа1:

А – полная запись; Б – усредненные ПД (вверху) и их первая производная (внизу) соответствующих (\downarrow подчеркнутым жирной линией на А участкам осциллограммы при большей скорости развертки; \uparrow – момент аппликации вещества. По оси абсцисс на А и Б время в секундах, по оси ординат на А и Б, вверху, амплитуда ПД, мВ, на Б, внизу – скорость развития ПД, В/с.

23,0±1,4 до 3,4±0,8 В/с в опыте) и спада (от 7,2±1,3 до 1,1±0,4 В/с соответственно) ПД. Из приведенных данных следует, что к действию данного вещества чувствительными являются как входящие токи, которые, как известно [11], обеспечиваются ионами Na⁺ и Ca²⁺, так и выходящие K⁺-токи.

С увеличением концентрации ТФМБ до 10⁻³ и 10⁻² М у нейрона ППа1 также наступало угнетение импульсной активности, характер изменений был таким же, как и при концентрации ТФМБ 10⁻⁴ М, а время наступления эффекта уменьшалось пропорционально концентрации. При отмывании в течение 20 мин ТФМБ в концентрации 10⁻³ М МП увеличивался до -88,2±4,7, а в 10⁻² М – до -90,5±5,2 мВ и импульсная активность не восстанавливалась. Таким образом, ТФМБ первоначально изменяет функциональное состояние Na⁺-, Ca²⁺- и K⁺-каналов, а затем увеличивает и проводимость мембраны для ионов Cl⁻. При этом, стойкая гиперполяризация мембраны, мы полагаем, обусловлена необратимым связыванием молекул ТФМБ с рецепторными белковыми структурами мембраны. Не исключено, что это вещество изменяет вязкость мембраны, а именно, увеличивает текучесть ее липидной фазы, из-за изменения состава углеродных цепей жирных кислот в мембранных фосфолипазах, вследствие чего и происходит изменение функционального состояния ионных каналов и блокирование генерации ПД.

У нейронов ППа2, ППа7 и большинства (16-ти из 21) неидентифицированных клеток висцерального ганглия при аппликации ТФМБ в концентрации 10⁻⁴ М эффект начинал проявляться позже (через 40-60 с), чем у нейрона ППа1 и также выражался в снижении МП и увеличении ЧГИ. Отличием эффектов, наблюдаемых у этих нейронов было и то, что амплитуда их ПД снижалась незначительно (на 3,2±1,4 мВ 2,6±1,05 мВ соответственно) и сохранялся овершут (рис. 2). Как видно из рисунка 2, Б к действию ТФМБ чувствительны как Na⁺- так и K⁺- ионные токи, которые снижаются при экспозиции вещества.

С увеличением концентрации ТФМБ до 10⁻³ М у нейронов этих типов уменьшалось время наступления эффекта и, еще больше снижались МП, ЧГИ и амплитуда ПД. При этом у трех из 15-ти нейронов ППа2 были выявлены интересные особенности эффектов ТФМБ. Это заключалось в том, что через 180-200 с экспозиции вещества, на протяжении которых мембрана была деполяризована, МП резко достигал фонового уровня и, в течение 10-20 с прекращалась генерация ПД (рис. 3). Затем МП снова постепенно снижался и вместо нормальных ПД появлялись небольшой амплитуды с крутым передним фронтом «быстрые» пики (рис. 3, обозначены стрелками), которые по своим параметрам занимают промежуточное положение между ПД и локальным ответом. Амплитуда таких потенциалов варьировала от 4 до 20 мВ и была кратной наименьшему значению (4 мВ), а продолжительность составляла 10-30 мс. По мере деполяризации мембраны амплитуда этих пиков возрастала, однако они не достигали критического уровня деполяризации (КУД). Из этого следует, что ТФМБ при наружном приложении подавляет лавинообразное развитие на мембране сомы ПД, антидромно распространяющихся из активного локуса аксо-дендритного дерева. Кроме того, на фоне деполяризации мембраны у нейрона ППа2 среди этих быстрых пиков появлялись и медленные колебания МП.

ЭФФЕКТЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ 2-ТРИФТОРМЕТИЛБЕНЗИМИДАЗОЛ ГИДРОХЛОРИДА НА ПАРАМЕТРЫ БИОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ МОЛЛЮСКА

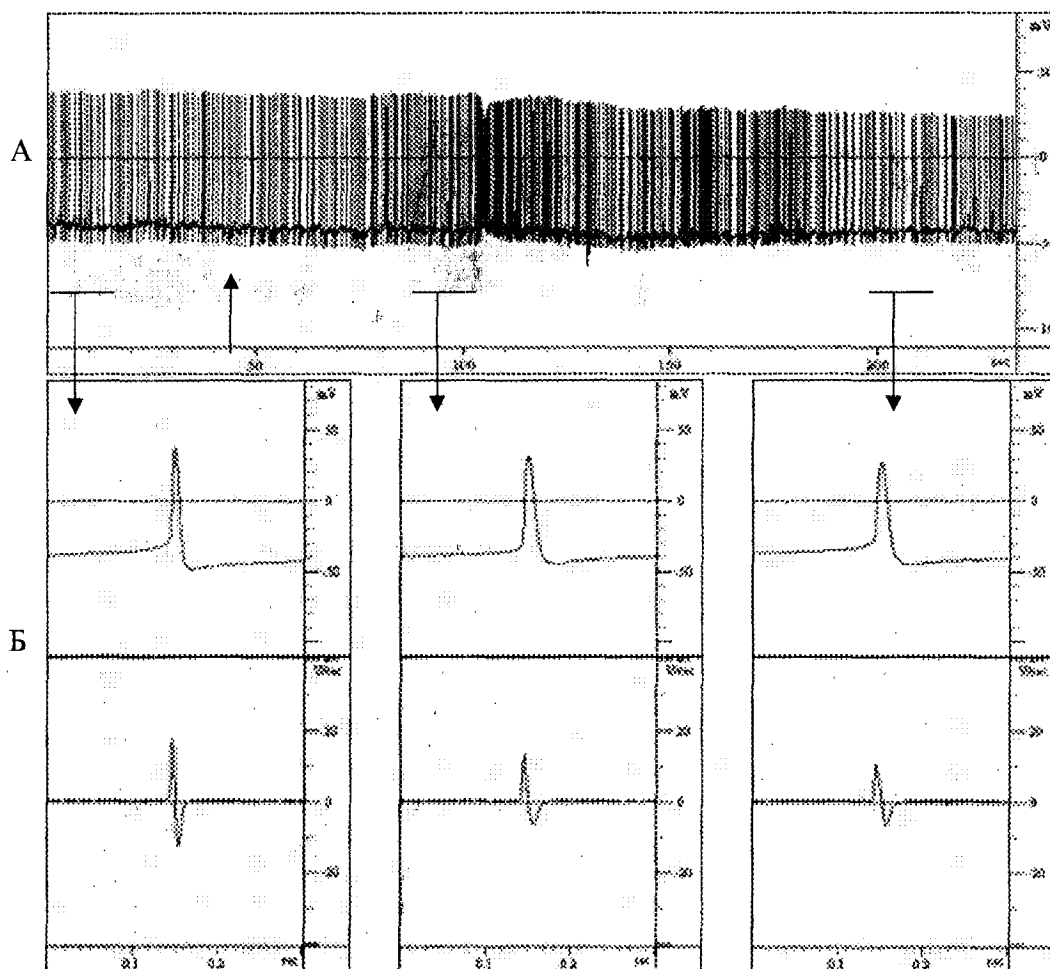


Рис. 2. Влияние ТФМБ в концентрации 10^{-4} М на электрическую активность нейрона ППа2. Обозначения такие же как и на рис. 1.

Причем, наблюдались как возбуждающие постсинаптические потенциалы (ВПСП), так и тормозные постсинаптические потенциалы (ТПСП). Амплитуда ВПСП и ТПСП находилась в пределах 5-15 мВ, а продолжительность – 20-100 мс. Со временем отдельные ВПСП достигали КУД и возникали одиночные, а затем и группы полноценных ПД (рис. 3, двойные стрелки). Важно отметить, что в фоне такие постсинаптические потенциалы не проявлялись. Исходя из этих данных мы полагаем, что у пейсмекерного нейрона ППа2 ПД могут иметь как эндо-, так и экзогенную природу. В случае эндогенной природы, ПД возникает в триггерной зоне аксо-дендритного дерева, а экзогенные ПД обусловлены трансинаптической активацией непосредственно мембраны сомы. Таким образом, полученные нами данные с большой долей вероятности позволяют считать, что на мембране пейсмекерных нейронов, по крайней мере, в нейроне ППа2, имеется как минимум

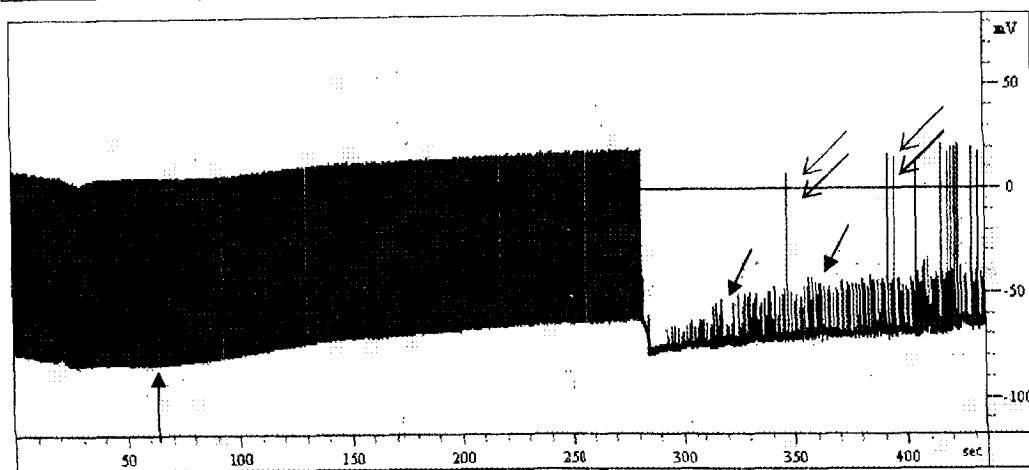


Рис. 3. Влияние 2-трифторметилбензимидазол гидрохлорида в концентрации 10^{-3} М на электрические потенциалы нейрона ППа2:

↑ – момент аппликации вещества, ↓ – «быстрые» пики, ↓↓ – полномерный ПД.

две, пространственно разделенные, с разными механизмами запуска ПД триггерные зоны.

При аппликации ТФМБ в концентрации 10^{-2} М через 40-55 с от момента аппликации происходило полное угнетение генерации ПД у всех исследованных нейронов, которое также было обусловлено ингибированием как входящих, так и выходящих трансмембранных ионных токов.

В течение 20 мин отмывания после воздействия ТФМБ в концентрациях 10^{-4} и 10^{-3} М значения МП и амплитуды ПД у нейронов ППа2, ППа7 и неидентифицированных нейронов ВГ приближались к фоновому уровню, а после 10^{-2} М – существенно отличались от исходных значений. Таким образом, эффект ТФМБ в концентрациях 10^{-4} и 10^{-3} М был обратимый, а в 10^{-2} М – токсический, частично обратимый.

Особого внимания заслуживает и тот факт, что через 45-60 с экспозиции ТФМБ в разных концентрациях наблюдалась инициация стандартных ПД у пяти молчащих неидентифицированных нейронов висцерального ганглия. Такие ПД наблюдались в течение всего периода экспозиции вещества, имели крутой передний фронт, им не предшествовали ВПСП, что свидетельствует об их эндогенном происхождении. Тот факт, что генерация ПД происходила не сразу после приложения ТФМБ, а через некоторое время (по-видимому, необходимое для проникновения вещества вглубь ганглия), на наш взгляд, свидетельствует о том, что у этих нейронов потенциалы возникают в триггерной зоне аксо-дендритного дерева. На это указывает и тот факт, что от начала отмывания проходит две-три минуты, а затем внезапно прекращается генерация ПД. Таким образом, есть основания считать, что у этих нейронов эффекты ТФМБ связаны с непосредственным его воздействием на мембрану аксо-дендритного дерева исследованных нейронов.

ЭФФЕКТЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ 2-ТРИФТОРМЕТИЛБЕНЗИМИДАЗОЛ ГИДРОХЛОРИДА НА ПАРАМЕТРЫ БИОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ МОЛЛЮСКА

В целом, результаты настоящей работы указывают на то, что даже на отдельных нейронах в относительно «простой» нервной системе улитки имеется обширное разнообразие механизмов их функционирования.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что 2-трифторметилбензимидазол гидрохлорид дифференцированно влияет на разные типы фоновоактивных и молчащих нейронов правого париетального и висцерального ганглиев. Это является еще одним подтверждением установившейся точки зрения, что каждый тип нервных клеток имеет разнообразные специфические рецепторы, различную направленность и сформированность внутриклеточных процессов.

2. Выявлено, что 2-трифторметилбензимидазол гидрохлорид может оказывать селективное влияние на разные участки мембраны одного и того же нейрона, то есть может облегчать аксо-соматические синаптические входы и угнетать развитие ПД в триггерном локусе аксо-дендритного дерева.

3. 2-трифторметилбензимидазол гидрохлорид может применяться в качестве химического агента для выявления наличия возбуждающих и тормозных синаптических входов на мембране сомы пейсмекерных нейронов и, следовательно, позволяет выявлять новые особенности интегративных процессов на соматической мембране.

Список литературы

1. Спасов А.А., Иежидца И.Н., Бугаева Л.И., Анисимова В.А. Спектр фармакологической активности и токсикологические свойства производных бензимидазола (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. – Т. 33, №5. – С. 6-17.
2. Бойко С.С., Жердяев В.П., Незнамов Г.Г. Роль фармакокинетики бемитила в реализации его терапевтической эффективности // Фармакология и токсикология. – 1991. – Т. 54, №2. – С. 64-66.
3. Бугаева Л.И., Спасов А.А., Веровский В.Е., Иежидца И.Н. Исследование от острой токсичности бемитила и бромметала // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2000. – Т. 63, №6. – С. 53-57.
4. Гамма Т.В., Коренюк И.И., Баевский М.Ю. Функциональное состояние нейронов ППa1 под влиянием дибазола и бемитила // Ученые записки ТНУ, серия «Биология, Химия». – 2003. – Т. 16 (55), №4. – С. 20-27.
5. Гамма Т.В., Коренюк И.И., Баевский М.Ю., Подмарева И.Р. Влияние бемитила на физиологическую реакцию крыс // Ученые записки ТНУ, серия «Биология, Химия». – 2005. – Т. 18 (57), №1. – С. 161-166.
6. Gamma T.V., Korenyuk I.I., Baevsky M.Yu., Ravaeva M.Yu., Pavlenko V.B. The Effect Of The Influence Of Some Benzimidazole Derivatives On The Components Of Mollusc's Neuron Potentials // J. Neurophysiology. – 2002. – Vol. 34, № 2/3. – P. 147-149.
7. Гамма Т.В., Коренюк И.И., Баевский М.Ю., Замотайлов А.А., Кобылянская Л.А. Эффекты воздействия бензимидазола и некоторых его производных на параметры электрических потенциалов нейронов моллюска // Ученые записки ТНУ, серия «Биология, Химия». – 2001. – Т. 16 (55), №1. – С. 20-27.
8. Кононенко Н.И., Костюченко О.В. Механизмы генерации ритмоводящей активности в идентифицированных нейронах виноградной улитки // Нейрофизиология – 2001. – Т. 33, №1. – С. 46-54.
9. Замотайлов А.А., Коренюк И.И. «Комп'ютерна програма для реєстрації, обробки і автоматизованого аналізу біоелектричних сигналів», Свідчення про реєстрацію авторського права на твір № 11642.
10. Хухо Ф. Нейрохимия. Основы и принципы. – М.: Мир, 1990. – 384 с.
11. Магура И.С. Проблемы электрической возбудимости нейрональной мембраны. – Киев: Наукова Думка, 1981. – 208 с.

Поступила в редакцию 25.10.2005 г