

ЗМІНИ МІНІАТЮРНИХ ПОТЕНЦІАЛІВ КІНЦЕВОЇ ПЛАСТИНКИ ТА ПОТЕНЦІАЛІВ СПОКОЮ М'ЯЗОВИХ ВОЛОКОН ПІД ВПЛИВОМ ХЛОРОФОСУ

С. Д. Ковтун

*Лабораторія експериментальної токсикології Всесоюзного інституту гігієни
і токсикології пестицидів, полімерних та пластичних мас, Київ*

Дослідження впливу фізіологічно активних хімічних речовин на синаптичні процеси дозволяють одержати певну інформацію щодо розуміння механізму дії синапсів, зокрема, виявлення особливостей активності ацетилхолінестераз та холінорецепторів.

Отже увагу дослідників привертають фосфорорганічні сполуки (ФОС), до яких належить і хлорофос, оскільки вони мають властивість пригнічувати дію ацетилхолінестерази, яка відіграє важливу роль у механізмі передачі збудження в міоневральному з'єднанні [1, 2]. Водночас існують дані, що свідчать про наявність впливу цих сполук на холінорецептори кінцевої пластинки. Проте ці дані одержані на підставі побічних показників дії ФОС на міоневральне з'єднання [3, 6, 7, 8].

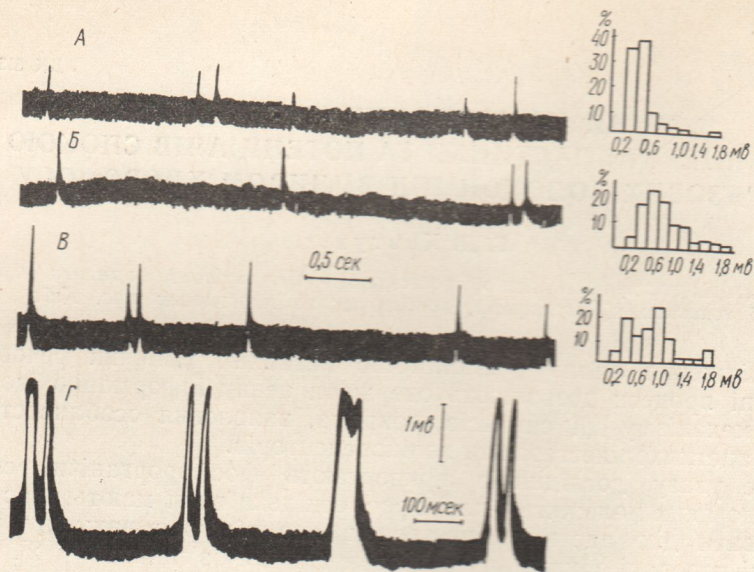
Ми детально досліджували це питання, застосовуючи внутріклітинну реєстрацію електричних потенціалів, що дозволяє вивчати фізіологічні процеси безпосередньо на синаптичних утвореннях.

Методика досліджень

Досліди проведені на білих щурах вагою 180—200 г. Функціональний стан синапсів окремих м'язових волокон оцінювали за спонтанними мініатюрними потенціалами кінцевих пластинок (МПКП), які відводили внутріклітинно від м'язових волокон сегментарного латерального м'яза хвоста *in vivo* [27]. Одноразово визначали і потенціал спокою (ПС) цих волокон. Тварин наркотизували уретаном внутріочеревинно по 1,5 г/кг ваги тіла. Після їх фіксації хвіст розташовували в спеціальній плексигласовій камері і заливали вазеліновим маслом, температуру якого підтримували в межах 35—36°С на протязі всього досліду. Шкіру хвоста на рівні 8—9 сегментів розтинали вздовж на 3—4 см, її краї закріплювали булавками на корковій дошечці. Потім обережно, щоб не пошкодити нервів і кровоносних судин, відпрепаровували латеральний м'яз; кінцеві пластинки на цьому м'язі в найбільшій кількості виявлені в потовщеній частині [25]. МПКП та ПС реєстрували електрофізіологічною установкою (конструкції майстерень ІЕМ АМН СРСР, Ленінград), яка має підсилювачі змінного струму з постійною часу 1 сек. Внутріклітинне відведення здійснювалось скляними мікроелектродами, заповненими 2,5 М розчином KCl з опором 7—25 Мом [5, 24]. Хлорофос вводили щурам у вигляді водного розчину безпосередньо в шлунок через рот з допомогою зонда. З чотирьох груп тварин одна була контрольною, в інших трьох групах хлорофос вводили відповідно по 425 мг/кг одноразово, та щодня по 42,5 і 8,5 мг/кг на протязі двох та шести місяців.

Результати досліджень

На м'язових волокнах контрольних щурів після проходження мікроелектрода крізь мембрану реєстрували ПС, який у середньому на 133 волокнах дорівнював $70 \pm 4,7$ мв з електронегативністю всередині клітини. В тих випадках, коли кінчик мікроелектрода перетинає мембрану поблизу від нервово-м'язового закінчення, з'являлися МПКП. Це короткотривалі зниження ПС, висхідна фаза яких досягала 1—2,5 мсек, а половина часу низхідної частини тривала близько 2 мсек.



МПКП м'язового волокна сегментарного латерального м'яза хвоста у щурів до та після введення хлорофосу.

А — МПКП контрольного щура (досвід від 19.VI 1969 р.), Б — МПКП після одноразового введення 425 мг/кг хлорофосу (досвід від 21.VI 1969 р.); В і Г — МПКП та тривалі розряди при щоденному введенні хлорофосу по 8,5 мг/кг на протязі шести місяців (досвід від 26.IX 1969 р.). Пояснення в тексті.

Середня амплітуда МПКП за підрахунками на 18 м'язових волокнах дорівнювала $0,4 \pm 0,06$ мв, а в окремих випадках досягала 1—2 мв. Амплітуда МПКП варіювала як на різних волокнах, так і при відведенні від одного і того ж волокна.

Частота появи МПКП також не була постійною, а змінювалась у різних випадках від одного до чотирьох на секунду. В середньому на 35 волокнах контрольних тварин вона дорівнювала $1,5 \pm 0,55$ на сек. Для прикладу наводимо осцилограму А на рисунку, де видно, що на протязі 4,0 сек виникло шість МПКП, це приблизно по 1,5 потенціали на сек. Водночас гістограма показує, що здебільшого МПКП мали амплітуду від 0,2 до 0,4 мв.

У щурів, яким одноразово вводили по 425 мг/кг хлорофосу, як видно з наведених у таблиці даних, відбувалось значне збільшення амплітуди МПКП, що в середньому на 20 волокнах досягла $0,65 \pm 0,15$ мв, це на 62% вище показників у контрольних тварин. Певні зміни при цьому спостерігалися і в частоті появи МПКП, а саме, відбувалось деяке її зниження (якщо у контрольних щурів вона становила 1,5 на сек, то після введення препарату знижувалась до $0,96 \pm 0,45$ на сек, тобто на 36%). Один з фрагментів такого дослідження наведено на осцило-

грамі *B*, на якій видно, що за один і той же проміжок часу виникло на два МПКП менше, ніж у контролі. Гістограма цього дослідів чітко показує на зміщення амплітуди МПКП в ділянку більших величин (0,6—1,2 мв). ПС у цих тварин на 46 волокнах досягає $77 \pm 7,4$ мв, що на 10% вище контрольних показників.

При багаторазовому введенні по 42,5 мг/кг препарату кожна тварина одержувала його на протязі двох місяців усього близько 2500 мг. Амплітуда МПКП в даних дослідів на 15 волокнах підвищувалась до $0,64 \pm 0,14$ мв, або на 60%, тоді, як частота на 18 волокнах знизилась до $0,8 \pm 0,3$ на сек, а це означає, що МПКП з'являлися на 53% рідше, ніж у контрольних тварин. Амплітуда ПС при цьому підвищувалась на 5% і становила на 35 волокнах $73 \pm 4,3$ мв. Отже, і в даному разі хлорофос викликав такі ж зміни МПКП, як і при введенні одноразово значної його кількості.

У тих дослідів, де багаторазово вводили відносно невеликі кількості хлорофосу (по 8,5 мг/кг), кожна тварина одержувала за шість місяців 1400 мг його. Результати показали, що МПКП з'являлися з частотою близькою до частоти у контрольних тварин, на 40 волокнах у середньому вона досягла $1,3 \pm 0,5$ на сек, що лише на 13% нижче контролю, але ця різниця виявилась статистично невірною.

МПКП м'язового волокна сегментарного латерального м'яза хвоста щурів до та після введення хлорофосу

Статистичні показники	Контроль	Кількість введенного хлорофосу в мг/кг		
		425	42,5	8,5

Частота МПКП

<i>n</i>	10	6	5	12
<i>M</i>	1,50	0,96	0,80	1,30
σ	$\pm 0,55$	$\pm 0,46$	$\pm 0,30$	$\pm 0,50$
<i>p</i>		$< 0,04$	$< 0,01$	$< 0,1$

Амплітуда МПКП в мв

<i>n</i>	6	6	5	5	8
<i>M</i>	0,40	0,65	0,64	0,90	0,41
σ	$\pm 0,06$	$\pm 0,15$	$\pm 0,14$	$\pm 0,24$	$\pm 0,09$
<i>p</i>		$< 0,01$	$< 0,01$	$< 0,01$	$< 0,1$

Величина ПС в мв

<i>n</i>	9	6	5	11
<i>M</i>	70	77	73	80
σ	$\pm 4,7$	$\pm 7,4$	$\pm 4,3$	$\pm 8,9$
<i>p</i>		$< 0,01$	$< 0,05$	$< 0,001$

Слід відзначити, що амплітуда МПКП у цих дослідів збільшувалась лише у п'яти щурів, а в останніх восьми вона залишалась такою ж, як у контрольних тварин. Заслугове на увагу той факт, що підвищення амплітуди МПКП під впливом малих кількостей хлорофосу досягало значних розмірів. Так, на різних м'язових волокнах вона була від 0,6 до 2,0 мв, а в середньому на 17 волокнах 0,9 мв, тобто на 122% вище, ніж у контрольних щурів (див. таблицю). Цікаво, що ці МПКП також перевищували амплітуду МПКП, які реєструвалися після введення тваринам навіть великих кількостей препарату. На рисунку, осцилограма *B*, наведено один з прикладів таких потенціалів. З гістограми добре видно, що максимальна кількість МПКП в даному досліді

мала амплітуду 1 мв, крім того з'явилась значна кількість (понад 5%) МПКП з амплітудою 2 мв.

У чотирьох випадках цієї групи дослідів спостерігалась ще і незвичайна спонтанна активність міоневрального синапсу у вигляді тривалих розрядів (40—80 мсек) з амплітудою 1—3 мв. Частота їх була приблизно такою ж, як і у контрольних тварин. Подібних потенціалів нам не вдалося спостерігати як при великих, так і при середніх кількостях введенного хлорофосу. Такі розряди потенціалів показані на осцилограмі Г. Потенціал спокою при дії цих відносно малих кількостей хлорофосу збільшувався до $80 \pm 8,9$ мв (за підрахунком на 87 волоконках), тобто на 14% більше контрольних показників.

Наведені дані свідчать про певну несталість ефекту після дії малих кількостей хлорофосу (8,5 мг/кг). Можливо це пояснюється тим, що такі кількості препарату являються граничними щодо їх впливу на нервово-м'язові з'єднання щурів. В такому разі набувають значення індивідуальні особливості окремих тварин щодо чутливості їх до хлорофосу. Більш резистентні з них не реагують на малу кількість хлорофосу, тоді як менш стійкі особи можуть давати певну відповідь, що ми і спостерігали в наших експериментах.

Обговорення результатів досліджень

Існують переконливі дані, що МПКП викликаються дією ацетилхоліну, який спонтанно виділяється нервовими закінченнями у вигляді квантів, на холінорецептор мембрани кінцевої пластинки [11, 12, 16, 17, 19, 20].

Збільшення амплітуди МПКП під впливом хлорофосу найбільш імовірно відбувається в результаті пригнічення активності ацетилхолінестерази, що створює сприятливі умови для посилення взаємодії ацетилхоліну з холінорецептором субсинаптичної мембрани і таким чином поглиблення процесу деполяризації її. При цьому не вдалося встановити прямої залежності між кількістю введенного препарату та величиною амплітуди МПКП. Можливо, відсутність такої залежності пов'язана з тим, що хлорофос, також як і інші ФОС разом з антихолінестеразною дією знижує чутливість холінорецептора до медіатора [3, 4, 6, 7, 8, 21, 26]. Але такий вплив чітко виявлявся лише при великій кількості введенного препарату [3, 8]. Тому значне збільшення амплітуди МПКП, та поява тривалих розрядів (осцилограми В і Г, на рисунку) спостерігалися переважно при малих кількостях хлорофосу, оскільки в даному разі в певній мірі пригнічувалась лише ацетилхолінестераза, тим часом як холінорецептор не втрачав чутливості до її медіатора. Зі збільшенням введенного хлорофосу разом з ацетилхолінестеразою пригнічувалась активність і холінорецептора. При такому співвідношенні виникали МПКП, які мали меншу амплітуду, ніж при невеликих кількостях хлорофосу, але вона була вище контрольних показників.

Виявлення в наших спробах тенденції до зниження частоти МПКП під дією хлорофосу свідчить про порушення механізму спонтанного виділення квантів ацетилхоліну нервовими закінченнями. Відомо, що цей процес регулюється мембранним потенціалом закінчень [13, 15, 18], зокрема показано, що підвищення поляризації мембрани супроводжується порідшенням МПКП [14, 21, 22, 23]. Під впливом хлорофосу ми спостерігали певну гіперполяризацію мембрани м'язових волокон, можливо причиною зменшення випадків появи МПКП є охоплення такою гіперполяризацією також і нервових закінчень. Така думка певною мірою підтверджується даними, одержаними в нашій лабораторії

Н. Р. Хоменко, яка спостерігала підвищення ПС мотонейронів під впливом хлорофосу [10].

Підвищення ПС м'язових волокон може бути зумовлено порушенням проникності їх мембрани до деяких іонів, особливо до іона калію, оскільки під впливом хлорофосу вміст калію в м'язових волокнах значно збільшується [9].

Отже, з наведених даних видно, що поряд з пригніченням активності ацетилхолінестерази хлорофос, при різних дозах та тривалості введення, також впливає безпосередньо на рецептор ацетилхоліну, і водночас спричиняє деяке зниження функції нервових закінчень міоневральних синапсів.

Питання про природу дії ФОС на холінорецептор в тому числі і хлорофосу ще не зовсім з'ясоване. Вважають, що цей вплив здійснюється переважно, через блокування аніонної групи холінорецептора. Проте, деякі автори показали, що подібний вплив властивий також ФОС, які в своїй будові не мають структур, що могли б взаємодіяти з аніонною ділянкою холінорецептора [3, 4, 6, 7, 8]. Автори прийшли до висновку, що в даному разі блокування відбувається за рахунок естеричної групи.

Одержані нами результати свідчать на користь такої точки зору, оскільки хлорофос має в своїй структурі лише таку групу, яка більш споріднена з естеричними ділянками холінорецептора.

Висновки

1. Амплітуда спонтанних мініатюрних потенціалів кінцевої пластинки збільшується під впливом хлорофосу.
2. Частота спонтанних мініатюрних потенціалів кінцевої пластинки зменшується при дії великих і середніх кількостей хлорофосу.
3. Під впливом хлорофосу збільшується величина потенціалу спокою м'язових волокон.

Література

1. Вашков В. И., Шнайдер Е. В.— Хлорофос, Медгиз, М., 1962.
2. Голиков С. Н., Розенгарт В. И.— Холинэстеразы и антихолинэстеразные вещества, «Медицина», 1964.
3. Данилов А. В., Рожкова Е. К.— В сб.: Гигиена и токсикол. пестицидов и клиника отравлений, К., «Здоров'я», 1965, 284.
4. Кабачник М. И., Брестина А. П., Михельсон М. Я.— О механизме физиол. действия фосфорорганических соединений, М., «Наука», 1965.
5. Костюк П. Г.— Микроэлектродная техника, К., 1960.
6. Рыболовлев Р. С.— Фармакол. и токсикол., 1952, 6, 30.
7. Рыболовлев Р. С.— В сб.: Матер. X Всес. конфер. фармакол., Волгоград, 1962, 309.
8. Рыболовлев Р. С.— В сб.: Гигиена и токсикол. пестицидов и клиника отравлений, К., «Здоров'я», 1965, 452.
9. Фудель-Осипова С. И., Ковтун С. Д., Родионов Г. А., Сокур А. И., Дишевски Х.— В сб.: Тез. XI Всес. съезда физиол., Л., 1970, 2, 68.
10. Хоменко Н. Р.— Физиол. журн. АН УРСР, 1971, XVII, 4, 527.
11. Шаповалов А. И.— Цитология, 1962, 4, 669.
12. Boyd J., Martin A.— J. Physiol., 1956, 132, 61.
13. Del Castillo J., Katz B.— J. Physiol., 1954, 124, 586.
14. Del Castillo J., Katz B.— Prog. Biophys., 1956, 6, 121.
15. Eccles J., Liley A.— Am. J. Physiol. Med., 1959, 38, 96.
16. Fatt P., Katz B.— J. Physiol., 1952, 117, 109.
17. Ginsborg V.— J. Physiol., 1960, 150, 707.
18. Hubbard J., Willis W.— J. Physiol., 1962, 163, 115.
19. Katz B.— Bull. Johns Hopk., Hosp., 1958, 257.
20. Katz B.— Proc. Roy. Soc. Biol., 1962, 155, 455.
21. Kimura M., Igarachi T., Swashita S.— Chem. Pharm. Bull., 1963, 11, 151.
22. Kraatz A., Trautwein W.— Arch. expt. Path. Pharm., 1957, 231, 419.

23. Liley A.—J. Physiol., 1956, 134, 427.
24. Ling G., Gerard R.—J. Cell. Comp. Physiol., 1949, 34, 383.
25. Roberts D., Tesleff S.—Acta anaesthesiol. Scand., 1965, 9, 165.
26. Roeder K., Kennedy N.—J. Pharm., 1955, 114, 211.
27. Steg G.—Acta, Physiol. Scand., 1964, 61, suppl., 225.

Надійшла до редакції
18.1 1971 р.

CHANGE IN MINIATURE END-PLATE POTENTIALS AND RESTING POTENTIALS OF MUSCLE FIBRES UNDER CHLOROPHOS EFFECT

S. D. Kovtun

*Laboratory of Experimental Toxicology, All-Union Institute of Hygiene
and Toxicology of Pesticides, Polymers and Plastics, Kiev*

Summary

Effect of chlorophos on the spontaneous miniature potential (MEPP) and resting potential (RP) of muscle fibres of the tail lateral muscle was studied in vivo in rats by means of the microelectrode technique.

The amplitude of MEPP increased by 60% after a single administration of chlorophos in a dose of 425 mg/kg per os and after daily administration of 42.5 g/kg for two months. Frequency of MEPP decreased by 36—53%.

After daily administration of 8.5 mg/kg of chlorophos during six months the amplitude of MEPP in some cases increased by 122%, as compared with the control, while the frequency did not change significantly. The above mentioned doses of chlorophos increased the resting potential of the muscle fibres by 4—14%.