

УДК 615.9—0 85.7

С. Д. Ковтун, Н. В. Кокшарева

ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДЕЙСТВИЯ РЯДА АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНЫХ ВЕЩЕСТВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО НЕРВА И НЕРВНО-МЫШЕЧНУЮ ПЕРЕДАЧУ ТЕПЛОКРОВНЫХ ЖИВОТНЫХ

Изучение физиологического механизма действия антихолинэстеразных веществ, применяемых в сельском хозяйстве, позволяет глубже понять природу интоксикации, возникающей при попадании их в организм, что необходимо для разработки научно обоснованных профилактических мероприятий, целенаправленной диагностики и изыскания новых перспективных антидотов. Общеизвестно, что главным в механизме действия фосфорорганических инсектицидов (ФОИ) является угнетение активности холинэстеразы, которое в конечном итоге приводит к развитию блока нервно-мышечной передачи возбуждения. Однако в опытах на изолированном нервно-мышечном препарате и на целом животном показано, что синаптический блок при этом не всегда коррелирует с изменением активности ацетилхолинэстеразы [2, 3, 6]. Вместе с тем, имеются данные, которые подтверждают предположение, что некоторые ФОИ могут оказывать влияние на функцию пре- и постсинаптических образований нервно-мышечного соединения [4, 7]. Хорошо известно, что многие ФОИ вызывают нейротоксические осложнения, обычно развивающиеся через 14—30 дней после перенесенного острого отравления [5, 13]. Однако их действие на функцию периферического нерва в острый период интоксикации изучено недостаточно. Поэтому в задачу исследования входило оценить влияние на функциональное состояние периферического нерва и нервно-мышечную передачу теплокровных животных ряда новых, широко применяемых в народном хозяйстве ФОИ: ДДВФ (диметилдихлорвинилфосфат), хостаквика (0, 0, 0-диметилфосфорил-6-хлор-бицикло-5, 2, 0-гепто-1, 5-диен), этафоса (0-этил-S-пропил-2, 4-дихлорфенилфосфат), валексона (0, 0-диэтилтиофосфорил-0/ α -цианобензальдоксим) в период острой интоксикации.

Методика исследований

Опыты проведены на 190 белых крысах, обоего пола, массой 180—230 г, при внутрибрюшинном уретановом наркозе (1 г/кг). Исследуемые препараты вводили внутривенно от одной до двух полужелудочных доз (LD_{50}) в виде 2—10% водных растворов. В опытные группы входило по шесть животных. Нервно-мышечную передачу возбуждения оценивали по способности икроножной мышцы воспроизводить потенциалы действия (ПД) как на одиночную, так и на ритмическую (30—300 Гц) стимуляцию при раздражении седалищного нерва максимальными электрическими стимулами длительностью 0,1 мс; по изменению частоты и амплитуды спонтанных миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП), длительности МПКП и вызванных ПКП латеральной мышцы 8—10 сегмента хвоста крысы. МПКП и ПКП отводили внутриклеточно по общепринятой методике [8]. Действие исследуемых ФОИ на периферический нерв определяли по скорости распространения возбуждения (СРВ), длительности абсолютной и относительной рефрактерной фазы (АРФ, ОРФ) вентрального нервного ствола крысы.

Для этого хвост фиксировали в специальной камере. После продольного разреза кожи хвоста отпрепаровывали проксимальный и дистальный концы нервного ствола на 10–20 мм, остальная часть нерва (обычно 40–50 мм) оставалась в окружающих тканях без существенного нарушения кровоснабжения. Для предохранения препарата от высыхания камеру заполняли вазелиновым маслом, температуру поддерживали в пределах 32–33 °С. Проксимальный отрезок нерва накладывали на раздражающие электроды, а дистальный конец — на отводящие. Раздражение нерва осуществляли электрическими стимулами супрамаксимальной силы. Во время опыта проводили контроль за сердечной деятельностью (по данным ЭКГ), при ухудшении состояния животных применяли искусственное дыхание.

Результаты исследований и их обсуждение

Установлено, что ДДВФ и хостаквик при пероральном введении белым крысам проявляют высокую токсичность: ЛД₅₀ составляет 40 и 155 мг/кг соответственно. Этафос относится к препаратам со средней токсичностью — ЛД₅₀ 320 мг/кг; валексон еще менее токсичен — ЛД₅₀ 1200 мг/кг.

У контрольных животных при раздражении седалищного нерва максимальными одиночными стимулами амплитуда ПД мышцы составляла 10 мВ ($\pm 0,93$). При раздражении ритмическими стимулами (100 Гц) амплитуда ПД мышцы после третьего стимула незначительно (на 10–15 %) снижалась (рис. 1, а).

Введение животным как ДДВФ (40 мг/кг), так и хостаквика (155 мг/кг) уже в первые минуты сопровождалось появлением у них видимых признаков интоксикации (тремор, судороги, экзофтальм) с последующим развитием блока нервно-мышечной передачи возбуждения. Как видно из рис. 1, б, уже через 10 мин после введения хостаквика за ПД мышцы на одиночное раздражение следовали слабые затухающие разряды, а амплитуда ПД увеличилась на 16 %. При ритмическом раздражении (100 Гц) наблюдались ответы лишь на три первых стимула с резким уменьшением двух последних. Между первым и вторым ПД наблюдался спонтанный разряд. Через 20 мин блокировалось проведение импульсов при частоте стимуляции 50 Гц, а амплитуда ПД на одиночное раздражение уменьшалась на 28 %. Спустя 30 мин проведение высокочастотных импульсов полностью блокировалось. Амплитуда одиночного сокращения уменьшилась на 64 % по сравнению с исходным уровнем, а на стимуляцию частотой 20 Гц регистрировались лишь два ПД (рис. 1, в). Через 40 мин возникал полный блок нервно-мышечной передачи (рис. 1, г). Гибель животных наступала в первые 40–60 мин после введения препарата.

Картина интоксикации под влиянием этафоса и валексона (в дозах ЛД₅₀) развивалась весьма медленно в течение первых 24 ч и была слабо выраженной: животные находились в угнетенном состоянии, наблюдалось слюно- и слезотечение, непроизвольное мочеиспускание и дефекация, периодический тремор конечностей. Для достижения более быстрого нарастания токсического эффекта данные препараты вводили за 1–2 ч до начала эксперимента в больших дозах, составляющих 2 ЛД₅₀. Анализ полученных данных показал, что этафос и валексон, в отличие от большинства ФОИ, не оказывают существенного влияния на нервно-мышечную передачу. В этом случае характер ПД существенно не отличался от контроля даже в период, когда клиническая картина интоксикации была ярко выражена; хотя при этом и отмечалось некоторое увеличение (на 18 %) ПД мышцы на одиночное раздражение и первых двух ПД при частоте стимуляции 100 Гц. Десятый и последующие ПД при частоте стимуляции 100 Гц снижались в среднем на 60 %. Интересно, что даже в период гибели животных вследствие прекращения

работы сердца при наличии нервно-мышечной передачи возбуждения.

Как видно из приведенных данных, уже в первые 10–15 мин после введения хостаквика отмечалось учащение МПКП. В течение 150 % по сравнению с исходным уровнем.

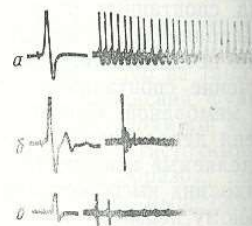


Рис. 1. Потенциалы действия в седалищном нерве до и после введения хостаквика. а — на одиночное и ритмическое раздражение; б — через 10 мин после введения хостаквика; в — через 30 мин после введения хостаквика; г — через 40 мин после введения хостаквика.

Рис. 2. Потенциалы концевой мышцы хвоста крысы при раздражении ритмическими стимулами (А) и спонтанные минимальные (Б2) в ответ на ритмическое раздражение. А1 — ПД до введения хостаквика; А2 — ПД после введения хостаквика; Б1 — ПД до введения хостаквика; Б2 — ПД после введения хостаквика.

работы сердца. Под влиянием этафоса и валексона амплитуда возбудительных потенциалов (ПД) снижалась по сравнению с исходным уровнем в течение всего опыта. В течение всего опыта и амплитуды МПКП были использованы для оценки состояния нервно-мышечной передачи.

Изменения частоты и амплитуды МПКП при введении препаратов

Препараты	Коэффициент
ДДВФ (ЛД ₅₀)	1,0
Хостаквик (ЛД ₅₀)	1,2
Этафос (2 ЛД ₅₀)	0,87
Валексон (2 ЛД ₅₀)	0,77

работы сердца при наличии искусственного дыхания полный блок нервно-мышечной передачи возбуждения не развивался.

Как видно из приведенных в табл. 1 данных, под влиянием ДДВФ уже в первые 10—15 мин происходило значительное увеличение амплитуды и учащение МПКП. При этом амплитуда возросла в среднем на 150 % по сравнению с исходной величиной, а частота более чем в че-

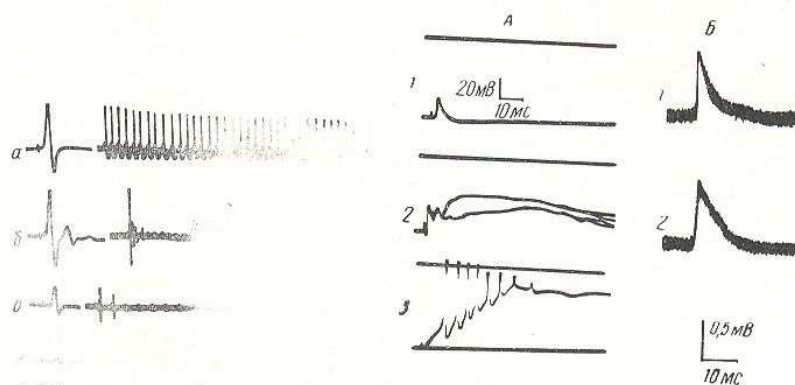


Рис. 1. Потенциалы действия икроножной мышцы крысы при непрямом раздражении до и после введения хостакика (155 мг/кг).

а — на одиночное и ритмическое (100 Гц) раздражение нерва до введения хостакика; б — через 10 мин после введения хостакика; в — на одиночное и ритмическое (20 Гц) раздражение через 30 мин после введения хостакика; г — на одиночное раздражение через 40 мин после введения хостакика.

Рис. 2. Потенциалы концевой пластинки (ПКП) сегментарной латеральной мышцы хвоста крысы при раздражении вентрального нервного ствола подпороговыми стимулами (А) и спонтанные миниатюрные потенциалы той же мышцы до (Б1) и после (Б2) введения хостакика (155 мг/кг).

А1 — ПКП до введения хостакика, потенциал покоя мышечного волокна (ПП) — 72 мВ; А2 — ПКП после введения хостакика в ответ на четыре одиночных стимула, ПП — 67 мВ; А3 — ПКП и ПД после введения хостакика, ПП — 63 мВ.

тыре раза. Под влиянием хостакика частота МПКП увеличилась на 140 %, а амплитуда возросла на 40 %. Однако в более поздние сроки действия этих ФОИ амплитуда МПКП, как правило, несколько уменьшалась по сравнению с исходной величиной. Этафос и валексон на протяжении всего опыта не вызывали достоверных изменений как частоты, так и амплитуды МПКП. Несмотря на то, что при регистрации МПКП был использован усилитель переменного тока, нам удалось

Таблица 1
Изменения частоты и амплитуды МПКП при введении белым крысам фосфорорганических инсектицидов

Препараты	Частота МПКП (в с)		Амплитуда МПКП (в мВ)	
	Контроль	Через 10—40 мин	Контроль	Через 10—40 мин
ДДВФ (ЛД ₅₀)	1,0±0,08	4,5±0,12 $p<0,001$	0,24±0,07	0,58±0,025 $p<0,01$
Хостакик (ЛД ₅₀)	1,2±0,06	2,8±0,14 $p<0,05$	0,38±0,09	0,54±0,08 $p<0,05$
Этафос (2 ЛД ₅₀)	0,87±0,12	1,1±0,46	0,59±0,07	0,54±0,1
Валексон (2 ЛД ₅₀)	0,77±0,18	0,72±0,11	0,55±0,03	0,51±0,05

выявить определенное (на 70—100 %) увеличение их длительности по сравнению с контролем при действии высокотоксичных ДДВФ и хостаквика (рис. 2, Б).

Внутриклеточное отведение потенциала в области концевой пластинки с применением усилителя постоянного тока показало, что их амплитуда и длительность после введения этих препаратов значительно возрастали. Как видно из рис. 2, А, 2 ПКП при воздействии хостаквика представляет собой большую по амплитуде и длительную (более 80 мс) деполяризацию постсинаптической мембраны. Во многих случаях вызванные ПКП при достижении критического уровня сопровождались ПД мышечного волокна, за которым следовал ряд спонтанных разрядов (рис. 2, А 3). Как видно, по мере нарастания деполяризации концевой пластинки, эти разряды уменьшались до полного исчезновения. Наблюдаемое учащение МПКП указывает на облегчение спонтанного выброса квантов ацетилхолина пресинаптической мембраной. Существенное повышение амплитуды и увеличение времени деполяризации постсинаптической мембраны как на спонтанно выделяемые кванты медиатора, так и в том случае, когда кванты ацетилхолина высвобождались в ответ на импульс, поступающий по двигательному нервному волокну, являются показателем усиления ионной проницаемости постсинаптической мембраны. Такие изменения поляризации постсинаптической мембраны обычно происходят под влиянием антихолинэстеразных веществ [9—12]. Уменьшение амплитуды МПКП после длительного воздействия ДДВФ и хостаквика, очевидно, связано с ослаблением чувствительности холинорецептора к ацетилхолину в результате курареподобного эффекта этих веществ.

Таблица 2
Изменения некоторых показателей функционального состояния периферического нерва крысы при воздействии ФОИ

Препараты	СРВ (м/с)		Длительность АРФ (мс)		Длительность ОРФ (мс)	
	Контроль	Через 30—90 мин	Контроль	Через 30—90 мин	Контроль	Через 30—90 мин
ДДВФ (ЛД ₅₀)	40±1,9	20,0±1,5 $p<0,001$	0,45±0,02	0,80±0,16 $p<0,05$	3,6±0,22	5,7±0,3 $p<0,01$
Хостаквик (ЛД ₅₀)	39±1,95	39,0±1,9	0,62±0,04	1,46±0,23 $p<0,01$	3,8±0,31	8,0±0,28 $p<0,001$
Этафос (2 ЛД ₅₀)	42,4±0,3	35,7±2,1	0,46±0,05	0,70±0,18	3,4±0,24	3,1±0,24
Валексон (2 ЛД ₅₀)	47,0±3,2	45,0±1,5	0,42±0,03	0,47±0,05	3,2±0,2	3,1±0,2

Влияние исследуемых препаратов на функциональное состояние периферического нерва представлено в табл. 2, из которой видно, что ДДВФ вызывало значительное (на 50 %) снижение СРВ. Под влиянием этафоса возникала лишь некоторая тенденция к снижению СРВ. Хостаквик и валексон не оказали влияния на этот показатель. Длительность ОРФ нерва при действии ДДВФ и хостаквика увеличивалась на 58 и 110 %, а АРФ на 77 и 135 % соответственно; максимальная сила раздражения при этом возросла на 35—40 %. Известно, что нейротоксические осложнения после острого отравления некоторыми ФОИ развиваются только через длительное время (примерно 2 нед). Механизм этих патологических измерений, по мнению некоторых авторов

[5, 13], связан с фосфо-обмена, демиелинизацией. В опытах резкое замедление указывает на потерю востыми быстропроводящими ОРФ и АРФ нерва. вают влияние на ионную увеличение АРФ, очевидно, ионов натрия через мембрану. нарушением тех процессов, протекающих в активном транспорте, изменение восстановительного прохождения нервного импульса.

Как видно из табл. 2, в верных изменений функции нерва. Отсутствие прямого влияния на гистохимическую картину также гистохимический анализ.

Таким образом, под влиянием нервно-мышечных антихолинэстеразных ДДВФ и хостаквика состояние пресинаптического и периферического этафоса и малых нарушениями.

1. Бадаева Л. Н. Системно-цидов (полихлоркамфена серия Б, № 3, с. 260—265).
2. Голиков С. Н., Розенгарт Л.: Медицина, 1970.—157 с.
3. Голиков С. Н., Заугольни 1970.—154 с.
4. Дишовски Х. Д., Казан И. ствия реактиватора дипир винилофосфата.— Фармак.
5. Зильбер Ю. Д. Нейротокс мышленной токсикологии.
6. Иванов Ю. Я. О механизмах холинэстеразы на наук.— Л., 1973.—21 с.
7. Ковтун С. Д., Кокшарева на спонтанную активность ДДВФ.— Бюл. эксперим.
8. Костюк П. Г. Микроэлектроды.— М., 1973.—117 с.
9. Castillo I., Katz B. Biophys. 1956, 6, p. 121—127.
10. Экклс Д. Физиология синапсов.— М., 1973.—117 с.
11. Falt P., Katz B. Spontaneous activity of the rat diaphragm. J. Physiol., 1952, 117, p. 209—228.
12. Liley A. W. An investigation of the rat. J. Physiol., 1952, 117, p. 209—228.
13. Олдридж У., Джонсон М. ротоксическое действие з. с. 271—275.

Всесоюзный институт гигиены и токсикологии пестицидов, и пластических масс, К.

[5, 13], связан с фосфорилированием белка, нарушением липидного обмена, демиелинизацией нервного волокна. Наблюдаемое в наших опытах резкое замедление СРВ в первые минуты действия ДДВФ указывает на потерю возбудимости, вероятно, в первую очередь толстыми быстропроводящими нервными волокнами. Увеличение длительности ОРФ и АРФ нерва говорит о том, что ДДВФ и хостаквик оказывают влияние на ионную проницаемость клеточной мембраны. Так, увеличение АРФ, очевидно, связано с изменением скорости перехода ионов натрия через мембрану нервного волокна, обусловленным нарушением тех процессов, которые принимают непосредственное участие в активном транспорте этих ионов. Удлинение ОРФ указывает на изменение восстановительных процессов в клеточной мембране после прохождения нервного импульса.

Как видно из табл. 2, после введения этафоса и валексона достоверных изменений функционального состояния нерва не происходило. Отсутствие прямого влияния валексона на нервную систему подтверждено также гистохимически [1].

Таким образом, полученные данные показали, что в период развития нервно-мышечного блока под влиянием высокотоксичных инсектицидов ДДВФ и хостаквика происходит нарушение функционального состояния пре- и постсинаптических образований нервно-мышечного соединения и периферического нерва. Механизм действия среднетоксичного этафоса и малотоксичного валексона не связан с данными нарушениями.

Л и т е р а т у р а

1. Бадаева Л. Н. Системно-структурные критерии нейротоксического действия пестицидов (полихлоркамфена и валексона) в эксперименте.— Доклады АН УССР, 1978, серия Б, № 3, с. 260—265.
2. Голиков С. Н., Розенгарт В. И. Холинэстеразы и антихолинэстеразные вещества.— Л.: Медицина, 1970.—157 с.
3. Голиков С. Н., Заугольников С. Д. Реактиваторы холинэстеразы.— Л.: Медицина, 1970.—154 с.
4. Дишовски Х. Д., Казан Ю. С., Ковтун С. Д. Электрофизиологический анализ действия реактиватора дипироксима при острой интоксикации 0, 0, диметил-2,2-дихлорвинилофосфата.— Фармакол. и токсикол., 1974, 37, с. 365—367.
5. Зильбер Ю. Д. Нейротоксическое действие ядов.— В кн.: Актуальные вопросы промышленной токсикологии.— Л., 1970, с. 129—145.
6. Иванов Ю. Я. О механизме блокирующего действия фосфорорганических ингибиторов холинэстеразы на нервно-мышечное проведение: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— Л., 1973.—21 с.
7. Ковтун С. Д., Кокишарева Н. В. Влияние нового реактиватора холинэстеразы ЛА-54 на спонтанную активность нервно-мышечных синапсов при острой интоксикации ДДВФ.— Бюл. эксперим. биол. и мед., 1974, № 1, с. 24—26.
8. Костюк П. Г. Микроэлектродная техника.— Киев: АН УССР, 1960.—126 с.
9. Castillo L., Katz B. Biophysical aspects of the neuromuscular transmission, Prog. Biophys. 1956, 6, p. 121—170.
10. Экклс Д. Физиология синапсов.— М.: Мир, 1966.—395 с.
11. Fatt P., Katz B. Spontaneous subthreshold activity of motor nerve endings.— J. Physiol., 1952, 117, p. 209—228.
12. Liley A. W. An investigation of spontaneous activity at the neuromuscular junction of the rat.— J. Physiol., 1957, 136, p. 595—605.
13. Олдридж У., Джонсон М. Побочный эффект фосфорорганических соединений: нейротоксическое действие замедленного типа.— Бюл. ВОЗ, 1971, 44, № 1—2—3, ч. 2, с. 271—275.

Всесоюзный институт гигиены
и токсикологии пестицидов, полимерных
и пластических масс, Киев

Поступила в редакцию
18. VII 1979 г.

S. D. Kovtun, N. V. Kokshareva

ELECTROPHYSIOLOGICAL ANALYSIS OF THE ACTION
OF A SERIES OF ANTICHOLINESTERASE SUBSTANCES
ON THE FUNCTIONAL STATE OF THE PERIPHERAL NERVE
AND NERVE-MUSCULAR CONDUCTION IN WARM-BLOODED ANIMALS

Summary

Experiments carried out with albino rats showed that high-toxic organophosphorus preparation DDVF and hostaqvic affect pre- and postsynaptic formation of myoneural synapsis already at the beginning of acute intoxication parallel with inhibition of synaptic cholinesterase. At the same time they disturb essentially the functional state of peripheral nerve (slow down the excitation potential propagation, prolong neural refractivity, increase irritation maximum). The mechanism of the action of the average- and low-toxic compounds (ethafos, valexon) has no essential relation to changes in nerve-muscular conduction of excitation and function of motor axons.

All-Union Research Institute of Hygiene
and Toxicology of Pesticides, Polymers and
Plastics, Kiev

УДК 612.73:613.815

И. А.

ДЕЙСТВИЕ АПАМИНА
НА АДРЕНЕРГИЧЕСКУЮ СИСТЕМУ

В предыдущих работах нами — полипептид пчелиного происхождения — апамин — описан как ингибитор неадренергической передачи торможения в ганглиях и также гиперполяризующее средство на фоне действия апамина с возникновением в мышечных мембранных потенциалах и серотониноблокаторах этих мышечных клеток желудка ВСП и АТФ-азы апамина. Апамин не блокирует в мышечных клетках

Недавно Бенкс и соавторы описали новые свойства апамина на мышечной полоске *taeni* и на нервных и α -адренергических клетках K^+ , стимулирует с помощью А-23187. При этом действие амидефина на митохондрии. На основании этих данных апамином упомянутых митохондрий на калиевую проводимость воспринимающую часть

Учитывая важность этого исследования действие апамина в гладких мышцах

Исследования проводились на срезах слепой кишки (продольной свинки) с помощью микровидеоанализа нервных образований, находившихся в течение 0,2—0,5

Результаты

В нормальных условиях слепой кишки гиперполяризующие тормозящие синапсы уменьшаются, а спонтанная активность адреналина сопровож-