

УДК 612.817.1

БИОХИМИЯ

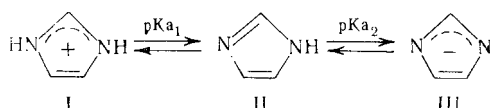
И. М. ГОТГИЛЬФ

ВЛИЯНИЕ ИМИДАЗОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ПЕРВНО-МЫШЕЧНЫЕ СИНАПСЫ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ pH СРЕДЫ

(Представлено академиком С. Е. Севериным 10 I 1972)

В ряде работ исследовалось влияние имидазола и некоторых его природных производных на нервно-мышечную передачу (¹⁻³). Установлено, что имидазол снимает утомление скелетных мышц, вызванное непрямым раздражением, и устраняет блок перво-мышечной передачи, создаваемый курареноподобными препаратами (⁴⁻⁷). В дальнейшем было показано, что имидазол увеличивает амплитуду потенциалов концевой пластинки (п.к.п.). Средняя амплитуда миниатюрных потенциалов концевой пластинки (м.п.к.п.) при этом существенно не меняется, а частота м.п.к.п. возрастает (⁸⁻¹⁰). Все эти факты позволяют считать, что имидазол влияет в основном на пресинаптические механизмы освобождения ацетилхолина нервными окончаниями.

Имидазол в растворе может существовать в трех формах: поэтому при



попытках исследования механизма действия имидазола естественно возникает вопрос о том, какая из этих форм ответственна за наблюдаемые эффекты. При физиологических значениях pH в заметных количествах присутствуют лишь I и II формы (для имидазола $pK_{a1} = 6,95$ (¹¹); $pK_{a2} = 14,6$ (¹²), меняя pH в пределах $pK_{a1} \pm 1$, можно добиться преимущественного содержания одной из этих форм. Ранее было показано изменение антикурарного действия некоторых имидазольных соединений при сдвиге pH в кислую сторону, однако механизм этого изменения оставался не вполне ясным (¹³).

Опыты ставились на перво-мышечных препаратах m. sartorius и m. cutaneus pectoris травяных лягушек Rana temporaria. Результаты, полученные на этих двух препаратах, совпадают. Использовали стандартный рингеровский раствор следующего состава (ммол.): Na^+ 116; K^+ 2,5; Ca^{2+} 1,8; Cl^- 122. Для создания pH 7,5—8,7 добавляли 2,4 ммоль NaHCO_3 , для pH 6—6,7 — смесь одно- и двузамещенного фосфата Na^+ и уксусной кислоты (по 2,5 ммоль). При регистрации п.к.п. к раствору добавляли 10—14 ммоль MgCl_2 при одновременном уменьшении Ca^{2+} до 1—1,2 ммоль, либо добавляли $4-6 \cdot 10^{-6}$ г/мл d-тубокурарина (Тбк). При добавлении Mg^{2+} или исследуемых веществ в концентрации выше 5 ммоль, соответственно уменьшали количество NaCl . П.к.п. и м.п.к.п. отводили внутриклеточно с помощью стеклянных микроэлектродов, заполненных 2,5 M KCl с сопротивлением 5—25 мегом. П.к.п. и м.п.к.п. фотографировали по кадрово с экрана катодного осциллографа. Среднее число квантов медиатора, выделяющееся на каждый импульс (m), рассчитывали: а) по

Таблица 1

Влияние имидазола, 2-метиимидазола и бензиимидазола на амплитуду п.к.п. и квантовый состав п.к.п. (m) при разных рН

	рН	Содержание I, %	Содержание формы II, %	Концентрация вещества ммол/л	В присутствии Mg^{2+}				В присутствии Tb^{3+}	
					изменение п.к.п., % к контролю, $\bar{x} \pm S_x$	число опытов	изменение m , % к контролю, $\bar{x} \pm S_x$	число опытов	изменение п.к.п., % к контролю, $\bar{x} \pm S_x$	число опытов
Раствор Рингера* Имидазол, $pK_{a_1} = 6,95$	6,7				74 ± 12	2	62 ± 12	2	81 ± 11	7
	6,0				45 ± 8	5	37 ± 6	5	77 ± 5	12
	8,0	8	92	1	150 ± 11	12	217 ± 47	5	130 ± 12	3
				3	199 ± 8	10			184 ± 15	9
				5	240 ± 31	6	393 ± 71	5		
				10	531 ± 74	10	684 ± 28	4	330 ± 39	5
	6,0	90	10	2	97 ± 17	2	106 ± 23	2		
				3					120 ± 31	3
				5	120 ± 21	3	133 ± 29	3	63 ± 7	1
				10					56 ± 7	6
2-Метилимидазол, $pK_{a_1} = 7,75$	8,7	10	90	1	230	1	240	1		
	8,2	26	74	2	190	1	225	1	159 ± 12	3
	6,7	92	8	1	94 ± 8	2	100	1	103	1
				2					93 ± 2	2
				3	81	1	102	1		
Бензиимидазол, $pK_{a_1} = 5,4$	7,5	1	99	1	130 ± 8	10	125 ± 19	6	180 ± 15	3
				2	275 ± 44	5	272 ± 13	3		
	6,7	5	95	1	167 ± 63	2	193 ± 87	2	193 ± 44	3
	6,0	20	80	1	148 ± 15	3	154 ± 12	3	163 ± 18	3

* Цифры даны в процентах к контролю при рН 8

Таблица 2

Влияние амидазола, 2-метиимидазола и бензиимидазола на частоту и амплитуду м.п.к.п.

	рН	Концентрация, ммол/л	Изменение частоты м.п.к.п., % к контролю, $\bar{x} \pm S_x$	Изменение амплитуды м.п.к.п., % к контролю, $\bar{x} \pm S_x$	Число опытов
Имидазол	8	2	158 ± 3	94 ± 3	2
		5	135 ± 5	94 ± 1	2
		10	167 ± 31	88 ± 3	16
2-Метилимидазол	8,7	5	92 ± 15	73 ± 8	5
		10	95 ± 5	97 ± 12	2
Бензиимидазол	7,5	2	190 ± 10	136 ± 6	7

отношению средней амплитуды п.к.п. к средней амплитуде м.п.к.п.; б) по коэффициенту вариации амплитуд п.к.п. (¹⁴, ¹⁵). Для п.к.п. с амплитудой больше 2 мВ использовали поправку на нелинейную суммацию единичных потенциалов (¹⁵). Процентное содержание форм I и II рассчитывали исходя из величины pK_{a_1} и формулы $pH = pK_{a_1} + \lg ([II]/[I])$.

Было исследовано влияние имидазола на амплитуду п.к.п. и m при рН 8, когда имидазол на 92% должен находиться в форме II и при рН 6, когда присутствует 90% формы I. При рН 8 имидазол во всех опытах уве-

личивал амплитуду п.к.п. и m . При рН 6 в большинстве опытов наблюдали уменьшение амплитуды п.к.п.; в четырех опытах амплитуда не менялась, а в двух несколько увеличивалась. Величина m либо не менялась, либо увеличивалась. Но даже в случае увеличения при сопоставлении эффектов одной и той же концентрации имидазола при рН 8 и рН 6 видно, что при рН 6 эффект выражен намного слабее (табл. 1). Известно, что изменение рН раствора, окружающего мышцу, с 7,5 до 4 само по себе приводит к уменьшению амплитуды п.к.п. за счет уменьшения выхода медиатора из нервных окончаний (¹⁶). Контрольные опыты с изменением рН раствора Рингера с 8 до 6,7 и 6 показали, что сдвиг рН в более кислую сторону и в этом случае приводит к уменьшению амплитуды п.к.п. и m (табл. 1). При рН 6 это уменьшение наиболее заметно в первые 20—30 мин. после смены рН, в дальнейшем изменение п.к.п. относительно невелико (рис. 1). Поэтому при работе с рН 6 исследуемые вещества добавляли через 25—30 мин. после выдерживания нервно-мышечного препарата при этом рН. Изменение эффекта имидазола при переходе к рН 6 могло быть следствием как изменения состояния ионизации самого имидазола, так и изменения тех молекулярных структур в нервном окончании, на которые воздействует имидазол. Для того чтобы выбрать между этими двумя возможностями, были исследованы производные имидазола, имеющие pK_a выше и ниже, чем у имидазола. Бензимидазол, pK_a которого 5,4 (¹¹), при рН 6 и выше должен находиться преимущественно в форме II. Оказалось, что действие бензимидазола при рН 6 лишь немного менее эффективно, чем при рН 6,7 или 7,5 (табл. 1). В то же время 2-метилимидазол ($pK_a = 7,75$ (¹¹)), который при рН 6,7 находится преимущественно в форме I, неэффективен при этом рН, сравнительно мало отличающемся от физиологического 7,4, тогда как при рН 8,2 и 8,7 это соединение (в форме II) увеличивает п.к.п. и m подобно имидазолу (табл. 1). Сопоставление эффектов имидазола, бензимидазола и 2-метилимидазола с количеством форм I и II при разных рН позволяет считать, что увеличение амплитуды п.к.п. и m связано с формой II.

Среди исследованных имидазольных соединений только имидазол увеличивал частоту м.п.к.п. (табл. 2), причем, как было показано в 4 опытах с одновременной регистрацией п.к.п. и м.п.к.п., это увеличение меньше, чем можно было ожидать исходя из увеличения квантового состава п.к.п. (увеличение m в процентах: 684 ± 28 , увеличение частоты м.п.к.п. в процентах $129 \pm \pm 9$). Возможно, что имидазольные производные воздействуют, главным образом, на фракцию м.п.к.п., зависимую от $[Ca]_n$, за счет увеличения вероятности выброса которой и возрастают п.к.п., и слабо влияют на Са-независимую фракцию м.п.к.п. Известно, что большая часть спонтанно возникающих м.п.к.п. у лягушки происходит из Са-независимой фракции (^{17, 18}).

Данные об изменении амплитуды м.п.к.п. свидетельствуют о разнообразии постсинаптических эффектов имидазольных соединений, так имидазол и 2-метилимидазол немного уменьшают амплитуду м.п.к.п., а бензимидазол увеличивает ее (табл. 2).

Изложенные факты свидетельствуют о воздействии имидазольных производных как на пресинаптические, так и на постсинаптические процессы в холинергическом синапсе. Пресинаптическое действие выражено гораздо более отчетливо, причем облегчающее влияние на освобождение ацетилхолина, очевидно, оказывает только неионизированная форма этих соединений.

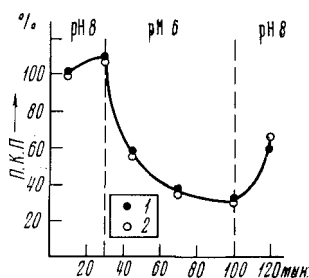


Рис. 1. Изменение амплитуды (I) и квантового состава (II) п.к.п. при изменении рН раствора

Автор благодарит С. Е. Северина и Л. Г. Магазаника за ценные советы и помощь и Т. И. Славнову за проведение опытов с м.п.к.п.

Институт эволюционной физиологии и биохимии
им. И. М. Сеченова
Академии наук СССР
Ленинград

Поступило
27 XII 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ С. Е. Северин и др., Биохимия, 28, 3, 510 (1963). ² С. Е. Северин, Усп. совр. биол., 59, 3, 165 (1965). ³ С. Е. Северин, Усп. совр. биол., 64, 2, 181 (1967).
⁴ Г. А. Соловьева, А. А. Болдырев, Вопр. мед. хим., 10, 4, 425 (1964).
⁵ А. А. Болдырев, Журн. эволюцион. биохим. и физиол., 1, 5, 398 (1965).
⁶ А. А. Болдырев, О влиянии имидазола и его природных производных на сократительную активность скелетной мускулатуры, Автореф. кандидатской диссертации, М., 1966. ⁷ А. А. Болдырев, Бюлл. эксп. биол. и мед., 66, 9, 51 (1968).
⁸ Г. И. Полетаев, Бюлл. эксп. биол. и мед., 70, 7, 14 (1970). ⁹ Г. И. Полетаев, Физиол. журн. СССР, 56, № 1, 64 (1970). ¹⁰ С. Е. Северин и др., ДАН, 194, № 2, 471 (1970). ¹¹ Т. Брюс, С. Бенкович, Механизмы биоорганических реакций, М., 1970. ¹² T. C. Bruice, J. L. Herz, J. Am. Chem. Soc., 86, 4109 (1964).
¹³ С. Е. Северин и др., ДАН, 179, № 1, 221 (1968). ¹⁴ J. del Castillo, B. Katz, J. Physiol. (London), 124, 560 (1954). ¹⁵ A. R. Martin, Physiol. rev., 46, № 1, 51 (1966). ¹⁶ J. del Castillo et al., J. Cell. Comp. Physiol., 59, № 1, 35 (1962).
¹⁷ P. Fatt, B. Katz, J. Physiol. (London), 117, 109 (1952). ¹⁸ J. I. Hubbard, J. Physiol. (London), 159, 507 (1961).