

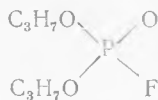
Г. Д. СМЕРНОВ

К ВОПРОСУ О МЕХАНИЗМЕ ДЕЙСТВИЯ
ДИИЗОПРОПИЛФТОРФОСФАТА

(Представлено академиком И. С. Бериташвили 17 VIII 1947)

Выводы о роли ацетилхолина (ацх) в передаче возбуждения в нервных и нервно-мышечных синапсах в значительной мере основываются на изучении физиологического эффекта от различных веществ, обладающих антихолинэстеразным действием. Такими веществами, прочно вошедшими в практику физиологических исследований, являются физостигмин и простигмин. Широко распространено мнение, что действие этих веществ полностью зависит от вызываемой ими инактивации холинэстеразы (¹), различия же в их действии, например, возбуждающее действие на центральную нервную систему физостигмина и угнетающее простигмина, а также различия в действии на нервно-мышечную передачу возбуждения, склонны объяснять неодинаковой проницаемостью клеточных мембран для третичного амина — физостигмина и четвертичного аммонийного основания — простигмина (^{2, 3}).

В последние годы интенсивно изучалось новое соединение, обладающее мощным антихолинэстеразным действием, диизопропилфторфосфат (дфф)



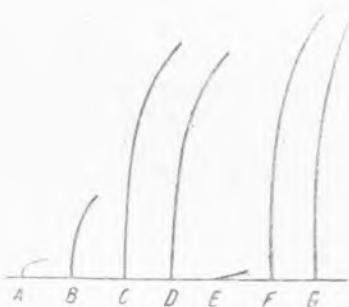
Это соединение необратимо инактивирует истинную и ложную холинэстеразы как *in vitro*, так и при введении в организм животного и по своему действию сходно с физостигмином (^{4, 5}). До настоящего времени нет указаний на действие дфф на другие тканевые ферменты кроме холинэстеразы.

Простое строение и химическая стойкость дфф, растворимость его в воде и в органических растворителях, необратимость инактивации холинэстеразы — все это делает дфф чрезвычайно ценным средством выключения энзиматического гидролиза ацх в тканях. Действительно, последние два года дфф использовался с этой целью в ряде физиологических исследований, в которых изучалось проведение возбуждения в нервном стволе (⁶⁻⁹), мышцах (¹⁰), нервных синапсах насекомых (¹¹), при рефлекторной передаче в центральной нервной системе (¹²), а также в клинической практике (¹³). При этом было обнаружено, что наряду с проявлениями, одинаковыми для дфф, с одной стороны, и препаратов типа физостигмина — простигмина, — с другой, в некоторых случаях наблюдается различие в действии этих веществ. Так, дфф оказался неэффективным при миастении; различно влияют дфф и физостигмин на синаптическую передачу у насекомых.

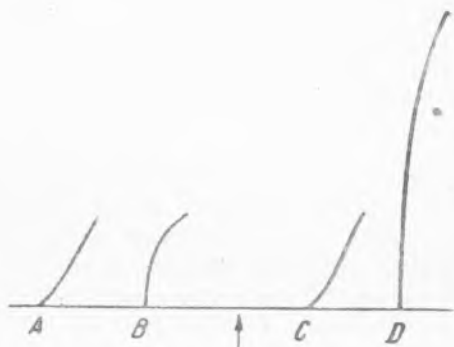
В связи с этим представляет интерес дальнейшее сравнительное исследование действия дфф и физостигмина на различные объекты. В качестве одного из таких объектов нами была использована прямая мышца живота лягушки, широко применяемая для количественного

определения ацх. Исследовалось влияние дфф и физостигмина на сократительную реакцию прямой мышцы живота на ацх, с одной стороны, и на нерасщепляемые холинэстеразой карбохолин и холин, с другой.

Методика. Опыты проводились в мае — июне 1947 г. на *Ranae temporariae*, выдерживаемых в течение 4—6 дней перед опытом при 2—3° С. Изолированная прямая мышца живота укреплялась общепринятым способом в высоком стаканчике, наполненном раствором Рингера. Верхний конец мышцы подвязывался к слабо нагруженному рычажку с соотношением плеч 1 : 8. Через раствор непрерывно пропускался воздух. Запись велась на медленно движущемся барабане кимографа, причем каждое сокращение регистрировалось в течение трех минут. Растворы применявшихся в опытах веществ вводились в стаканчик в количествах, не превышавших 0,3—0,5 мл, каждый раз до общего объема жидкости, равного 10 мл.



Фиг. 1. А — сокращение прямой мышцы живота лягушки от 0,05 γ ацх; В — та же доза ацх после 10 мин. воздействия дфф $5 \cdot 10^{-5}$; С и D — та же доза ацх после повторного воздействия дфф $1 \cdot 10^{-4}$; E — та же доза ацх после воздействия физостигмина $3 \cdot 10^{-5}$ 10 мин.; F и G — та же доза ацх после отмыwania физостигмина



Фиг. 2. А — сокращение прямой мышцы живота лягушки от 0,6 γ карбохолина; В — от 0,1 γ ацх; стрелка — воздействие дфф $5 \cdot 10^{-5}$ 25 мин.; С — карбохолин 0,6 γ ; D — ацх 0,1 γ

Результаты. Обработка мышцы дфф вызывает резкое повышение ее чувствительности к ацх. Степень сенсibilизации зависит от длительности воздействия и концентрации раствора. Максимальный эффект, наступающий через 20—30 мин. при концентрации дфф $1—2 : 10^4$, примерно того же порядка, что и при обработке физостигмином в концентрации $2—3 : 10^6$. Однако в то время как сенсibilизирующее действие физостигмина при отмыивании постепенно исчезает, действие дфф при этих условиях не меняется и, повидимому, является необратимым.

Максимальное действие дфф не усиливается последующей обработкой физостигмином в указанной выше концентрации, точно так же как и максимальное действие физостигмана не повышается при дополнительной обработке дфф. Однако при неполном эффекте от одного из этих веществ дополнительная обработка другим дает соответствующее усиление эффекта.

Своеобразный эффект наблюдается при воздействии на мышцу после дфф физостигмином в концентрациях более высоких, чем те, которые дают максимальную сенсibilизацию, а именно $2—3 : 10^5$. На свежей мышце физостигмин в этой концентрации вызывает лишь незначительное повышение чувствительности. После обработки мышцы

дифф физ. стимул в этой же концентрации резко угнетает реакцию мышцы на ацх (рис. 1). В некоторых случаях мышца перестает реагировать на количества ацх, в несколько раз превосходящие те, которые в начале опыта вызвали сокращение. Это угнетающее действие физостигмина исчезает при отмывании в течение 10—15 мин., причем восстанавливается повышенная реактивность мышцы, характерная для действия дфф.

Сенсибилизация прямой мышцы живота после дфф наблюдается только по отношению к ацх; реакция мышцы на карбохолин и холин не меняется (рис. 2, 3). В отличие от дфф физостигмин в концентрациях, дающих выраженную сенсибилизацию к ацх, унетает реакцию мышцы на карбохолин (рис. 4). Интересно отметить разницу в форме

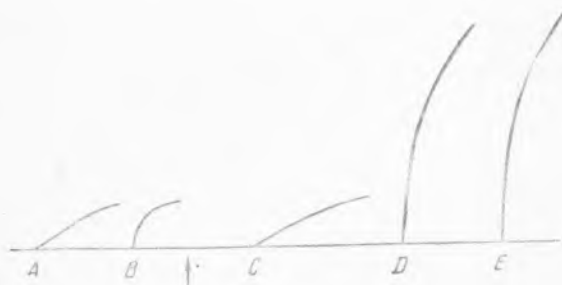


Рис. 3. А — сокращение прямой мышцы живота лягушки от 50 γ холина; В — от 0,1 γ ацх; стрелка — воздействие дфф $5 \cdot 10^{-5}$ 20 мин.; С — 50 γ холина; D и E — 0,1 γ ацх



Рис. 4. А — сокращение прямой мышцы живота лягушки от 0,6 γ карбохолина; В — 0,3 γ ацх; С — та же доза карбохолина после воздействия физостигмина $2 \cdot 10^{-6}$; D — 0,3 γ ацх

кривых сокращения при действии ацх, с одной стороны, и карбохолина и холина, с другой: в первом случае быстрый начальный подъем резко замедляется, при действии же карбохолина и холина сокращение нарастает медленно, почти по прямой линии, причем в зависимости от дозы меняется угол наклона этой линии. На приводимых кривых, записывавшихся каждый раз в течение трех минут, регистрировалась таким образом не максимальная высота сокращения, а его скорость. Для получения одинаковой высоты сокращения ацх, карбохолин и холин брались в концентрациях, относившихся друг к другу, как 1:2:500. Замедление скорости сокращения и отсутствие четкого максимума наблюдались и в ответ на ацх после обработки мышцы дфф или физостигмином. Можно предположить, что форма кривой сокращения при ацх отражает взаимодействие двух процессов: диффузии ацх во все более и более глубокие слои мышечных волокон и его разрушения находящейся в ткани холинэстеразой. Нарастание сокращения прекращается, когда эти процессы уравниваются друг друга. При действии на мышцу карбохолина и холина инактивация этих веществ отсутствует, и форма кривой сокращения зависит от постепенной диффузии этих веществ внутрь мышцы и постепенного вовлечения в сокращение все новых и новых волокон.

Приведенные наблюдения, показывающие, что дфф усиливает действие на прямую мышцу только ацх, но не карбохолина и холина, позволяют сделать вывод, что причина повышения чувствительности зависит от инактивации холинэстеразы в мышце. Тот же механизм лежит и в основе сенсибилизирующего действия физостигмина: на связывание дфф и физостигмина в тканях одними и теми же рецептивными группами указывают и другие наблюдения^(14,15). Однако

действие физостигмина не ограничивается, повидимому, холинэстеразой: об этом свидетельствует снижение сенсibilизации при повышении концентрации физостигмина и резкое угнетающее действие, обнаруживаемое в тех случаях, когда физостигмин применяется после дфф. Нахманзон⁽¹⁶⁾ указывает, что физостигмин тормозит не только холинэстеразу, но и аденозинтрифосфатазу. Возможно, что при условии разрушения холинэстеразы предшествующей обработкой дфф действие физостигмина на аденозинтрифосфатазу проявляется более сильно. Наши предварительные опыты показали, что резким угнетающим действием на сокращения прямой мышцы живота лягушки от ацх обладает Mg^{++} , также являющийся, согласно некоторым авторам, ингибитором аденозинтрифосфатазы⁽¹⁷⁾.

Таким образом, при использовании того или другого вещества, обладающего антихолинэстеразным действием, необходимо учитывать возможность влияния его также на другие процессы, участвующие в осуществлении реакции данной ткани на ацх. Согласно взглядам, развиваемым Коштоянцем⁽¹⁸⁾, синтез и разрушение ацх являются лишь звеньями в сложной и специфической для каждой ткани энзимохимической системе развития возбуждения. В случае сократительной реакции скелетной мышцы ацетилхолиновый цикл непосредственно связан с системой аденозинтрифосфорная кислота — аденозинтрифосфатаза. Двойственный характер действия физостигмина хорошо иллюстрирует это положение. С другой стороны, своеобразие действия антихолинэстеразных препаратов на различные объекты было показано Kahlson и Uvnäs⁽¹⁹⁾, изучавшими сократительную реакцию на ацх спинной мышцы лягушки, прямой мышцы живота лягушки и мускулатуры желудка лягушки при воздействии физостигмином, хинином и другими веществами, подавляющими активность холинэстеразы. Указанные авторы получили очень пеструю картину, необъяснимую одним лишь выключением холинэстеразы, и предположили существование неспецифической сенсibilизации тканевых рецепторов к ацх. Эти результаты, с нашей точки зрения, объясняются тем, что наряду с сенсibilизацией, связанной с выключением одной энзиматической системы, возможно также действие на другие процессы в направлении их стимуляции или угнетения.

Препарат дфф, обладая столь же выраженным, как и у физостигмина, антихолинэстеразным действием, но отличающийся от него по своему отношению к другим энзимохимическим системам, явится полезным средством для выяснения роли, принадлежащей ацх в передаче возбуждения и в сократительном акте.

Лаборатория эволюционной физиологии
Института эволюционной морфологии
им. А. Н. Северцова Академии Наук СССР

Поступило
17 VIII 1947

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ W. Feldberg, *Physiol. Rev.*, **25**, 596 (1945). ² A. Schweitzer, E. Stedman and S. Wright, *J. Physiol.*, **36**, 302 (1939). ³ K. Bernheim, *Interaction of Drugs and Cell Catalysis*, 1943. ⁴ A. Mazur and O. Bodansky, *J. Biol. Chem.*, **153**, 261 (1946). ⁵ A. Mazur and O. Bodansky, *ibid.*, **161**, 271 (1946). ⁶ F. Crescitelli, G. B. Koelle and A. Gilman, *J. Neurophysiol.*, **8**, 241 (1946). ⁷ J. H. Bullock, H. Grundfest, D. Nachmansohn, M. A. Rothenberg and K. Sterling, *ibid.*, **3**, 253 (1946). ⁸ J. H. Bullock, H. Grundfest, D. Nachmansohn and M. A. Rothenberg, *ibid.*, **13**, 63 (1947). ⁹ J. H. Bullock, H. Grundfest and D. Nachmansohn, *ibid.*, **14**, 11 (1947). ¹⁰ R. Couéteaux, H. Grundfest, D. Nachmansohn and M. A. Rothenberg, *Science*, **104**, 317 (1946). ¹¹ K. D. Roeder, N. K. Kennedy and E. A. Tomson, *J. Neurophysiol.*, **10**, 1 (1947). ¹² C. Heymans and R. Pannier, *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **62**, 229 (1946). ¹³ J. H. Comroe, J. Todd and G. B. Koelle, *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **87**, 281 (1946). ¹⁴ R. Koster, *ibid.*, **83**, 139 (1947). ¹⁵ G. B. Koelle, *ibid.*, **83**, 232 (1947). ¹⁶ D. Nachmansohn, *Currents in Biochemical Research*, Interscience Publ., New York, 1946. ¹⁷ М. Н. Любимова и Д. Певзнер, *Биохимия*, **6**, 178 (1941). ¹⁸ Х. С. Коштоянц, *Изв. АН СССР, сер. биол.*, № 2, 170 (1945). ¹⁹ G. Kahlson and B. Uvnäs, *Skand. Arch. Physiol.*, **78**, 40 (1938).