

Т.В. Балтина¹, к.б.н., В.В. Зобов², к.б.н., Н. И. Тимергалиева¹

ОСОБЕННОСТИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НОВОГО СЕЛЕКТИВНОГО ИНГИБИТОРА АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ

¹Казанский государственный университет,²Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова
КазНЦ РАН, Казань, Россия

Как известно, тетраалкиламмониевые соединения, в силу наличия в их структуре катионной группы, способны оказывать существенно более избирательное и сильное влияние на нервно-мышечную передачу, нежели на центральную нервную систему, кишечник и железы [1]. Кроме того, для некоторых из них (амбеноний, декаметоний, BW284c51 и др.) характерно специфическое взаимодействие с "периферическим анионным пунктом" (ПАП) ацетилхолинэстеразы (АХЭ; К.Ф. 3.1.1.7) и возможность дополнительного прироста в избирательности связывания с АХЭ [2].

Исследования В.С. Резника и соавт. [3], К.А. Аникиенко и соавт. [4] добавили к специфическому взаимодействию с ПАП, новый класс ингибиторов АХЭ — тетраалкиламмониевые производные 6-метилурацила, которые проявляют чрезвычайно высокую избирательность и необратимость связывания с АХЭ ($K^0=7,6 \cdot 10^8$ - $3,5 \cdot 10^9$ М⁻¹мин⁻¹) по сравнению с бутирилхолинэстеразой. При этом связывание с последней носит обратимый характер (pI_{50} 3,9-6,9) [3, 4]. Исследование *in vivo* выявило у некоторых из тетраалкиламмониевых производных 6-метилурацила нетипично высокую для ингибиторов АХЭ избирательность и длительность блокирующего действия в отношении локомоторных мышц — их "терапевтическая ширина" (LD_{50}/ED_{50}) в тесте "бег на третбане" (мыши, собаки) достигает 10,0-200,0 [5, 6].

Цель настоящего исследования заключалась в определении особен-

ностей влияния на электромиографические характеристики скелетных мышц крыс разного функционального типа одного из наиболее активных и избирательных в отношении АХЭ тетраалкиламмониевых производных 6-метилурацила — 1,3-бис[5(диэтил-о-нитробензиламмоний)пентил]-6-метилурацилдигбромида (лабораторный шифр "№ 547").

Материалы и методы исследования

Электромиографическое исследование состояния симметричных нейро-моторных систем проводили на нелинейных белых крысах обоего пола массой 130-150 г, содержащихся на стандартном рационе питания в условиях природного режима освещения. Опыты проводили в осенне-весенний период. В экспериментальные группы животных отбирали по методу случайных выборок.

У интактных крыс под общим эфирным наркозом до и через 5 и 60 мин после введения веществ в икроножную мышцу (*m.gastrocnemius*) и в симметричных параспинальных мышцах (*m.paraspinal*) с помощью игольчатых электродов регистрировали электрические ответы, вызванные раздражением седалищного нерва одиночными прямоугольными импульсами длительностью 0,5 мс. Стимуляцию осуществляли погруженным раздражающим электродом. Для нанесения стимула, усиления и регистрации ответов была использована экспериментальная установка на базе электромиографа МГ-42 ("Medicor", Венгрия) и ПК Pentium.

Для исследования состояния периферической части нервно-мы-

шечного аппарата регистрировали М-ответ *m.gastrocnemius* [7, 8] и полисинаптические ответы *m.paraspinal* крысы. Определяли порог возникновения и максимальную амплитуду мышечных ответов в течение 5 мин и 1 ч после введения соединения № 547 и прозерина (препарат сравнения), а также у группы животных (12 особей), которым внутрибрюшинно вводили физиологический раствор. Параметры мышечных ответов выражали в процентах от контроля — параметров ответов до введения растворов веществ (за 100% приняты значения параметров до введения веществ). Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Вещества вводили внутрибрюшинно в виде водных растворов в дозах, составляющих 1/30 и 1/100 ЛД₅₀ для соединения № 547 — 0,05 мг/кг (12 животных) и 0,015 мг/кг (19 крыс); для прозерина — 0,02 мг/кг (17 крыс) и 0,005 мг/кг (8 крыс).

Обработку результатов исследования проводили методом вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента с применением программы "Origin".

Результаты и их обсуждение

Субтоксические дозы прозерина и соединения № 547 вызывали у крыс типичную для ингибиторов холинэстераз картину отравления — мышечные фибрилляции, подергивания, хромодакриорея и др.

При введении крысам физиологического раствора в течение 3 ч регистрации не было обнаружено достоверных изменений параметров М-ответов *m.gastrocnemius* и *m.paraspinal*. Динамика дозо-зависимых эффектов соединения № 547 и прозерина на *m.gastrocnemius* во времени была различной, хотя и имела общий двухфазный характер (рис. 1, 2).

Результаты электромиографических исследований показывают, что в спектре действия соединения № 547 в дозе 1/30 ЛД₅₀ на двигательные ответы икроножной мышцы крысы присутствует существенно более выраженный, чем у прозерина, начальный угнетающий эффект (рост порогов через 5 мин после введения). Затем угнетающий эффект (в интервале 10 мин-1 ч после введения) сменяется существенно более выраженным, чем у прозерина, "облегчающим" эффектом (снижение

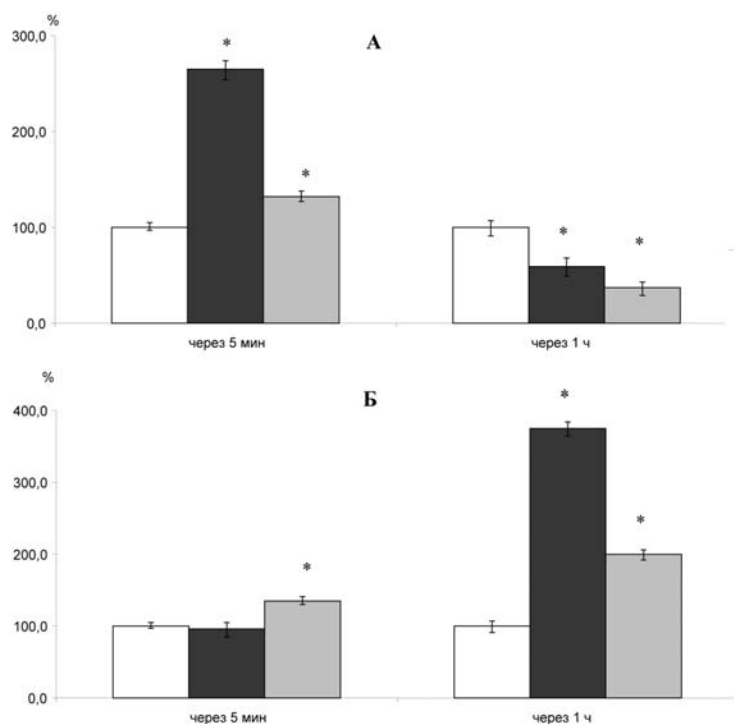


Рисунок 1. Изменения параметров М-ответа *m.gastrocnemius* крысы через 5 мин и 1 ч после введения веществ в дозе 1/30 ЛД₅₀.

А — изменение порога возникновения М-ответа икроножной мышцы, Б — изменение максимальной амплитуды М — ответа; светлые колонки — параметры после введения физиологического раствора; черные колонки — после введения соединения № 547; серые колонки — после введения прозерина; * — $P < 0,05$ по отношению к контролю.

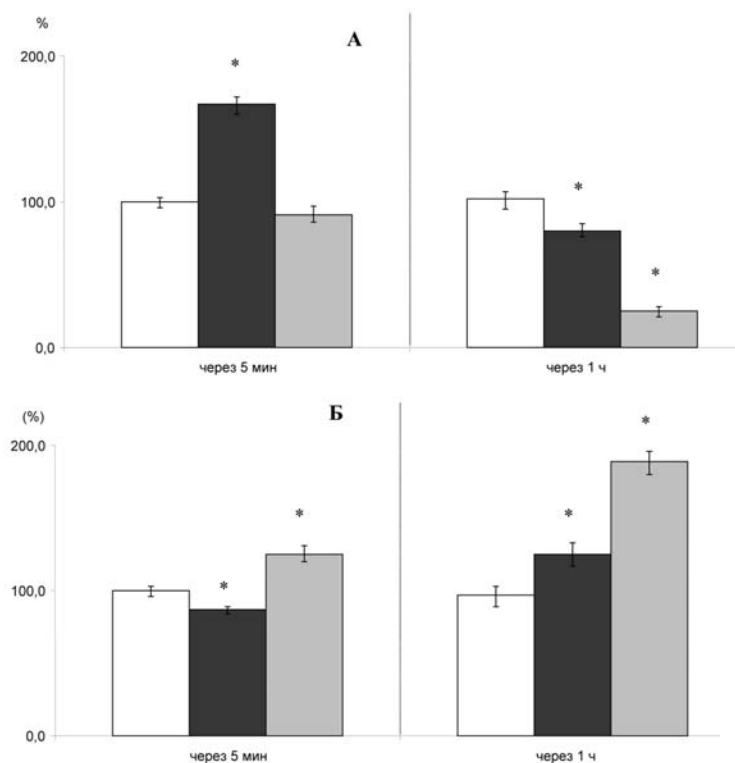


Рисунок 2. Изменения параметров М-ответа *m.gastrocnemius* крысы через 5 мин и 1 ч после введения веществ в дозе 1/100 ЛД₅₀. Обозначения — см. рис. 1.

порога и почти 4-кратный рост амплитуды М-ответов (рис. 1А и Б). Так, через 5 мин после введения соединения № 547 и прозерина происходило достоверное увеличение порогов М-ответа *m.gastrocnemius* (на 165% и 32%, соответственно). Через 1 ч после введения, напротив, наблюдалось достоверное снижение порогов М-ответа (на 41% и 63%, соответственно). Максимальная амплитуда М-ответа под действием соединения № 547 практически не изменялась, тогда как прозерин достоверно ее увеличивал (на 35%, рис. 1Б). Через 1 ч после введения соединения № 547 происходило почти четырехкратное увеличение амплитуды М-ответа, а прозерина — двукратный рост этого показателя.

Изученные вещества в дозе 1/100 ЛД₅₀ ослабляли как начальные угнетающие, так и последующие "облегчающие" эффекты. Однако "облегчающий" эффект прозерина был более выражен (рис. 2). Так из рис. 2А видно, что через 5 мин после введения соединения № 547 происходило достоверное увеличение порогов М-ответа *m.gastrocnemius* (на 67%) при отсутствии изменений при использовании прозерина. Через 1 ч после введения веществ наблюдалось достоверное снижение порогов М-ответа (на 20% и 75%, соответственно). Соединения № 547 вызывало достоверное снижение (на 13%), а прозерин — увеличение амплитуды М-ответов (на 25%, рис. 2Б). Через 1 ч после введения оба вещества достоверно увеличивали амплитуды М-ответа (на 25% и 89%, соответственно).

Угнетение М-ответов икроножных мышц в первые минуты после введения соединения № 547, возможно, связано с более быстрой и эффективной реализацией обратимых Н-холиноблокирующих свойств указанного соединения ($pK_B=6,6$) [5,9]. Динамика взаимодействия этого вещества с АХЭ ($k^0=3,5 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{мин}^{-1}$) сходна с тем, что наблюдается при действии тиохолиновых эфиров метилфосфоновой кислоты. При этом "наведение" молекулы соединения № 547 на АХЭ происходит медленно, но с течением времени прочность образующегося комплекса возрастает настолько, что восстановления активности фермента не происходит даже при его диализе и гель-фильтрации

("необратимое связывание") [4]. По нашим данным, доминирование антихолинэстеразных эффектов (или их последствий) может продолжаться более чем 1 сутки, проявляясь, например, в сохранение низких порогов, повышенной амплитуды и полифазности (до 7 фаз) М-ответов вплоть до появления дополнительных длинноталентных (до 22 мс) волн. Характерно, что соединение № 547 в дозе 1/30 ЛД₅₀ вызывает выраженную и длительную миорелаксацию мышц задних конечностей, проявляющуюся в неспособности мышей и собак выполнять физическую нагрузку в тесте "бег на тротбане" в течение 5 сут [5, 6].

При действии прозерина в дозе 1/100 ЛД₅₀ (с рК_B=3,0 и рI₅₀=6,6 по [1]) его антихолинэстеразный эффект в меньшей степени антагонизирован Н-холинолитическим, чем у соединения № 547, и, соответственно, более выражен "облегчающий" эффект (рис. 2).

Возможно, неспособность животных полноценно выполнять тестовый бег на тротбане является отражением процесса более глубокой и длительной, чем в случае прозерина, дисрегуляции гомеостаза нервно-мышечной передачи как в сторону ее угнетения (рост порогов и уменьшение амплитуды М-ответа), так и "облегчения" (уменьшение порогов и рост амплитуды М-ответа). Это предположение согласуется с результатами изучения эффектов соединения № 547 на амплитудно-временные параметры миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) в *m.extensor digitorum longus*, *m.soleus* и *m.diaphragma* крысы [9], которые свидетельствуют в пользу того, что указанное соединение уже в наномолярных концентрациях вызывает признаки необратимого ингибирования синаптической АХЭ, увеличивая амплитуду и длительность МПКП. Кроме того, в механизме действия соединения № 547 присутствует дополнительный обратимый (вероятно, Н-холинотоксирующий) компонент, снижающий амплитуду МПКП. При этом эффективность такого разнонаправленного (дисрегулирующего) действия на нервно-мышечный синапс существенно выше в локомоторных, нежели в дыхательной мышце.

Динамика дозозависимых эф-

фектов на полисинаптические ответы *m.paraspinal* во времени имела общий однофазный характер (рис. 3, 4). Из рис. 3А видно, что через 5 мин после введения соединения № 547 и прозерина в дозе 1/30 ЛД₅₀ происходило достоверное снижение порогов полисинаптических ответов *m.paraspinal* (на 77% и на 27%, соответственно), которое сохранялось и через 1 час. Прозерин увеличивал амплитуды полисинаптических ответов *m.paraspinal* (рис. 3Б). Через 1 ч после введения веществ высокие значения амплитуды полисинаптических ответов сохранялись, хотя и на более низком уровне

Из рис. 4А видно, что через 5 мин после введения изучаемых веществ в дозе 1/100 ЛД₅₀ происходило достоверное снижение порогов полисинаптических ответов *m.paraspinal* (на 80% и 16%, соответственно). Через 1 ч после введения соединения № 547 низкие значения порогов сохранялись (снижение на 38%), тогда как после введения прозерина

наблюдалось их полное восстановление. После введения обоих веществ наблюдалось увеличение амплитуды полисинаптических ответов *m.paraspinal* (на 83% и 14%, соответственно) (рис. 4Б). Через 1 ч после введения высокие значения амплитуды полисинаптических ответов сохранялись только у вещества № 547.

На наш взгляд, сочетание в одном веществе разнонаправленных фармакодинамических свойств (антиацетилхолинэстеразный/Н-холинотоксирующий компоненты) может приводить к разным последствиям в работе мышц. Так, с одной стороны, действие соединения № 547 и прозерина в дозах 1/30 и 1/100 ЛД₅₀ на полисинаптические ответы мышц спины может ограничиваться только лишь "облегчающими" эффектами (рис. 3, 4); при этом отмечается появление полисинаптических ответов *m.paraspinal* на контралатеральной стороне (эффект длится более 5 ч). В спектре действия соединения № 547 также

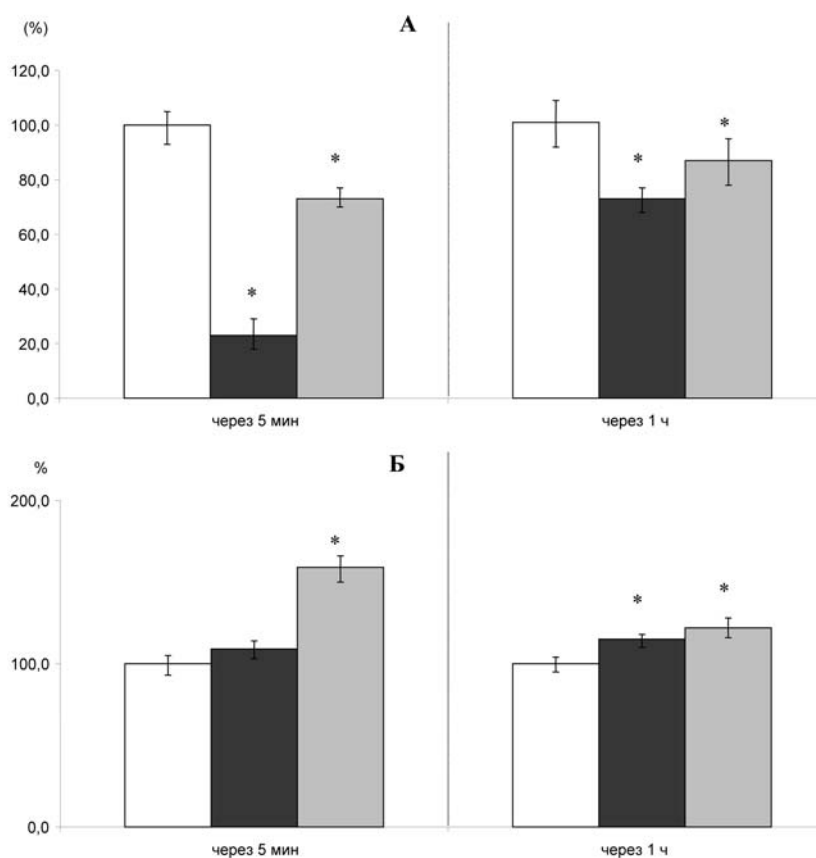


Рисунок 3. Изменения параметров полисинаптических ответов *m.paraspinal* крысы через 5 мин и 1 ч после введения веществ в дозе 1/30 ЛД₅₀.

А — изменение порога возникновения ответов *m.paraspinal* крысы, Б — изменение максимальной амплитуды ответов *m.paraspinal* крысы; остальные обозначения — см. рис. 1.

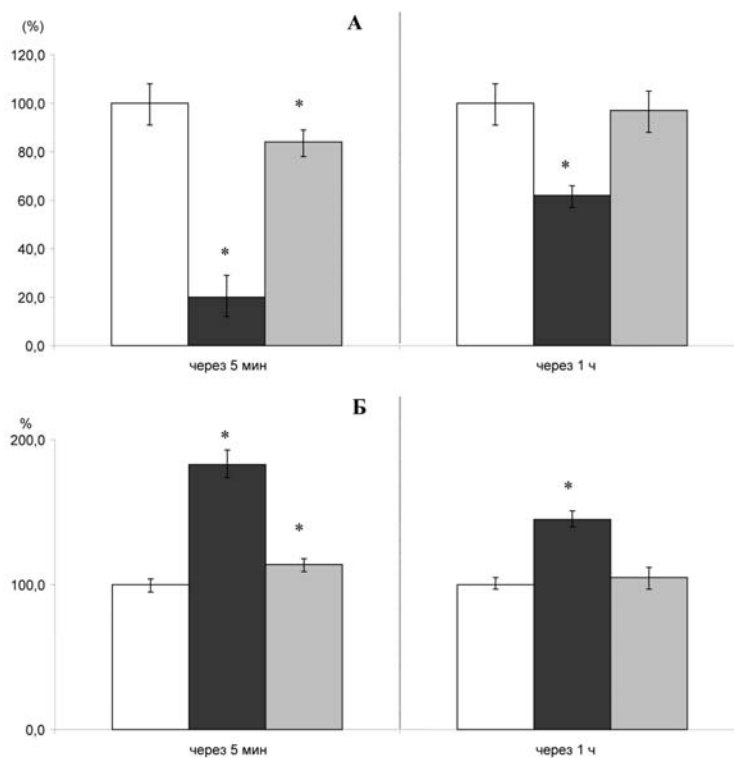


Рисунок 4. Изменения параметров полисинаптических ответов m.paraspinal крысы через 5 мин и 1 ч после введения веществ в дозе 1/100 ЛД₅₀. Обозначения – см.рис.3.

присутствует выраженный "облегчающий" эффект, проявляющийся в учащении дыхания и росте амплитудно-временных характеристик МПКП m.diaphragma in situ [5, 9]. С другой стороны, нервно-мышечный аппарат конечностей (m.gastrocnemius) под влиянием как "облегчающих", так и "угнетающих" доз вещества № 547 может терять способность воспроизводить высокую частоту стимуляции (т.е. терять лабильность). Это приводит к тому, что мышцы конечностей, в отличие от диафрагмы, не в состоянии полноценно осуществлять координированные двигательные акты (бег) с соответствующим избирательным и длительным выключением локомоторной функции без опасного для жизни угнетения дыхания [6]. Способность соединения № 547 (а также некоторых его структурных аналогов) избирательно влиять на работу локомоторных мышц может использоваться для временной иммобилизации животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Прозоровский В.Б., Саватеев Н.В. / Неантихолинэстеразные механизмы действия антихолинэстеразных средств. — Л.: Медицина, 1976. — 160 с.
2. Моралев С.М., Розенгарт Е.В. Современные представления о структуре и каталитических свойствах холинэстераз позвоночных и беспозвоночных (обзор) // Ж. эволюционной биохимии и физиологии. — 1999. — Т. 35, № 1, — С. 3-14.
3. Резник В.С., Аникиенко К.А., Курочкин В.К. и др. Новый класс ингибиторов холинэстераз: тетраалкиламмониевые производные 6-метилурацила и аллоксина // Доклады РАН. — 1998. — Т.362, № 1. — С. 68-70.
4. Аникиенко К.А., Бычихин Е.А., Курочкин В.К. и др. Новый класс ингибиторов холинэстераз — тетраалкиламмониевые производные 6-метилурацила: особенности взаимодействия с холинэстеразами разных групп животных // Доклады РАН. — 2001. — Т. 376, № 6. — С. 818-822.
5. Зобов В.В., Резник В.С., Акамсин В.Д., Галяметдинова И.В. Токсикологические свойства новых ониеых производных пиримидина. Тезисы докл. I-го съезда токсикологов России. — Москва, 1998. — С. 50.
6. Зобов В.В., Петров К.А., Асламова А.А. и др. Фосфорилированные и тетраалкиламмониевые производные ур-
7. Лехт Б.Н. Теоретическая и клиническая электромиография. — Л.: Наука, 1990.
8. Лехт Б.Н., Касаткина Л.Ф., Самоилов М.И., Санадзе А.Г. Электромиография в диагностике нервно-мышечных заболеваний. — Таганрог: Изд-во ТГУ, 1997. — 370 с.
9. Ковязина И.В., Петров К.А., Зобов В.В. и др. Особенности действия тетраалкиламмониевого производного 6-метилурацила на потенциалы концевой пластинки мышц разного функционального типа // Доклады РАН. — 2004. — Т. 399, № 5. — С. 712-714.

Т.В. Балтина, В.В. Зобов, Н. И. Тимергалиева

ОСОБЛИВОСТІ ПЕРИФЕРИЧНОЇ ДІЇ НОВОГО СЕЛЕКТИВНОГО ІНГІБІТОРУ АЦЕТИЛХОЛІНЕСТЕРАЗИ

У спектрі дії 1,3-біс[5(діетил-о-нітробензиламоніо)пентил]-6-метилурацилдіброміду (сполука № 547) у дозі 1/30 ЛД₅₀ на М-відповіді m.gastrocnemius щура присутній більш виражений, ніж у прозерину, початковий ефект пригнічення (ріст порога М-відповідей). Через 1 год виявляється більш виражений, порівняно з прозерином, "полегшуючий" ефект (зниження порога і майже 4-разовий ріст амплітуди М-відповідей). При дозі 1/100 ЛД₅₀ відбувається ослаблення як початкових пригнічуючих, так і наступних "полегшуючих" ефектів. Спектр дії сполуки № 547 і прозерину на полісинаптичні відповіді m.paraspinal щура обмежується тільки "полегшуючими" ефектами незалежно від дози і часу. Показано можливість розробки інгібіторів ацетилхолинэстеразы, здатних блокувати локомоторні м'язи без пригнічення дихання.

T.V. Baltina, V.V. Zobov, N.I. Timergalieva

THE PECULIARITIES OF PERIPHERAL ACTIVITY OF THE NEW SELECTIVE ACETHYLCHOLINESTERASE INHIBITOR

In the activity spectrum of 1,3-bis[5(diethyl-o-nitrobenzylammonio)pentyl]-6-methyluracildibromide (agent "No. 547") on rats' m.gastrocnemius in the 1/30 LD₅₀ dose showed the stronger oppressed initial effect on M-response (increasing of threshold) in comparison with proserine. In one hour the "facilitated" effect is shown stronger (the decreasing of the threshold and nearly 4-multiple increasing of M-responses amplitude) than proserine. Within the decreasing of the doses of the agent No. 547 and proserine to 1/100 LD₅₀ the weakening of the initial oppressed and the subsequent "facilitated" effects occurs. The activity spectrum of agent No. 547 and proserine on polysynaptic responses on rats' m.paraspinal is limited only with "facilitated" effects, not depending on doses and time passed after injection. The opportunity of developing of the acetylcholinesterase inhibitors, which can selectively block the locomotion muscles without breathing oppression, is shown.