



Исследование влияния нового класса ингибиторов ацетилхолинэстеразы на электрическую активность сердца

Д.В. АБРАМОЧКИН, К.А. ПЕТРОВ, В.В. ЗОБОВ, Л.О. ЯГОДИНА, Е.Е. НИКОЛЬСКИЙ,
Л.В. РОЗЕНШТРАУХ

Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН, Казань

Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, Казань; НИИ Экспериментальной кардиологии МЗСР РФ, Москва; Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1; Казанский государственный медицинский университет МЗСР РФ

The Study of Effects of a Novel Acetylcholinesterase Inhibitor on Electrical Activity of the Heart

D.V. ABRAMOCHKIN, K.A. PETROV, V.V. ZOBOV, L.O. YAGODINA, E.E. NIKOLSKY,
L.V. ROSENHTRAUKH

Moscow State University Leninskie gory, 119991 Moscow, Russia

Исследовали влияние представителя нового класса селективных ингибиторов ацетилхолинэстеразы (АХЭ) — 1,3-бис[5(диэтилАоА нитробензиламмоний) пентил]-6-метилурацилдибромида (соединение № 547) на длительность и ритм следования потенциала действия (ПА) в правом предсердии крысы, а также кинетику реакции, катализируемой АХЭ в гомогенатах скелетной (m. extensor digitorum longus) и сердечной мышцы крысы. Показано, что в отличие от «классических» ингибиторов АХЭ армина и прозерина соединение № 547 не оказывало достоверного влияния на конфигурацию ПА и частоту синусового ритма ни в одной из исследованных концентраций (1, 10 и 100 нМ). Исследуемый ингибитор относится к бесконкурентному типу, причем для соединения № 547 $K_1(\text{сердце})=3,6 \times 10^{-4}$ М, а $K_1(\text{EDL})=1,3 \times 10^{-8}$ М. Прозерин оказывает на реакцию сравнимое ингибирующее воздействие для сердца и скелетной мышцы, $K_1(\text{сердце})=0,73 \times 10^{-5}$ М, $K_1(\text{EDL})=0,4 \times 10^{-5}$ М. Таким образом, низкая чувствительность миокарда к этому соединению в электрофизиологических экспериментах не связана с меньшей доступностью синаптической АХЭ сердца по сравнению с АХЭ скелетных мышц, а реакция, катализируемая АХЭ сердца, действительно в значительной степени менее подвержена ингибированию соединением № 547.

Ключевые слова: нервно-мышечная передача, ингибиторы ацетилхолинэстеразы, электрическая активность сердца.

We have investigated effect of a representative of the novel class of selective acetylcholinesterase inhibitors A 1,3-bis[5(diethylAoA nitrobenzyl ammonio) penty]A6-methyluracildibromide (compound 547) on duration and rhythm of sequence of right atrial action potential (AP) as well as on kinetics of acetylcholinesterase catalyzed reaction in homogenates of skeletal muscle (m. extensor digitorum longus) and cardiac muscle in the rat. We have shown that contrary to classical acetylcholinesterase inhibitors armin and proserin none of studied concentrations (1, 10 and 100 M) of compound 547 exerts significant effect on AP configuration and rate of sinus rhythm. Compound 547 belongs to noncompetitive type with $K_1(\text{heart})=3.6 \times 10^{-4}$ M and $K_1(\text{EDL})=1.3 \times 10^{-8}$ M. Proserin exerts comparable inhibitory action on reaction in the heart and skeletal muscle, its $K_1(\text{heart})=0.73 \times 10^{-5}$ M and $K_1(\text{EDL})=0.4 \times 10^{-5}$ M. Thus low sensitivity of myocardium to compound 547 in electrophysiological experiments is not related to lesser availability of synaptic acetylcholinesterase in the heart compared with acetylcholinesterase in skeletal muscles but reaction catalyzed by cardiac acetylcholinesterase is actually to a substantial degree less prone to inhibition by compound 547.

Key words: neuro-muscular conduction; acetylcholinesterase inhibitors; electrical activity of the heart.

Ингибиторы ацетилхолинэстеразы (АХЭ) традиционно применяются в медицинской практике при заболеваниях, для лечения которых требуется продление действия ацетилхолина (АХ) в синаптической щели (глаукома, миастения Гравис, болезнь Альцгеймера). При передозировке ингибиторов происходит отравление антиацетилхолинэстеразными веществами, приводящее к гибели человека и животных, прежде всего из-за нарушения работы дыхательной мускулатуры и, кроме того, вследствие развития брадикардии, нарушения атриовентрикулярной проводимости, аритмий, бронхоконстрикции, повышения бронхиальной секреции [1]. Для расширения области применения ингибиторов АХЭ в медицинской практике актуальной является разработка новых, более безопасных соединений, способных оказывать целевой эффект без угнетения дыхания и пагубного влияния на параметры деятельности сердца [2]. В этой связи представляется перспективным синтезированный в Институте органической и физической химии им. А.Е.

Арбузова новый класс ингибиторов АХЭ — алкиламмониевых производных 6-метилурацила, характеризующихся высокой избирательностью в отношении препаратов АХЭ млекопитающих. Соотношение констант скоростей ингибирования АХЭ и бутирилхолинэстеразы (БуХЭ) у наиболее активных алкиламмониевых производных 6-метилурацила может достигать пяти порядков [3, 4]. Пороговая концентрация одного из наиболее эффективных производных 6-метилурацила — соединения № 547, вызывающая изменения амплитудно-временных параметров синаптических ответов, характерная для практически полного ингибирования АХЭ, в синапсах дыхательной мышцы оказалась в 20—100 раз больше, чем в синапсах локомоторных мышц [5]. Таким образом, можно считать, что синапсы диафрагмы (основной дыхательной мышцы млекопитающих) значительно более устойчивы к действию данного соединения, чем мышцы конечностей.

Цель данного исследования — сопоставление эффективности влияния алкиламмониевого производного 6-метилурацила с известными ингибиторами АХЭ фосфорорганической природы — армином и карбаматной — прозеринном на электрическую активность сердца. Поскольку чувствительность предсердного

© Коллектив авторов, 2008

© Кардиология, 2008

Kardiologia 2008; 12:34—41



миокарда к АХу выше, чем желудочкового, мы исследовали влияние ингибирования АХЭ на электрическую активность правого предсердия крысы.

Материал и методы

В работе были использованы 40 самцов белых беспородных крыс. Животных декапитировали под эфирным наркозом, немедленно вскрывали грудную клетку и выделяли сердце, которое промывали раствором Тироде (состав в ммоль/л: NaCl × 133,47; KCl 4,69; NaH₂PO₄ × 2H₂O 1,35; NaHCO₃ × 16,31; MgSO₄ × 7H₂O 1,18; CaCl₂ × 2H₂O 2,5; глюкоза 7,77), насыщенным карбогеном (газовая смесь 95% O₂, 5% CO₂). Правое предсердие, включающее синоатриальный узел, отсекали и помещали в камеру емкостью 3 мл, где препарат суперфузировався раствором Тироде при температуре 38°C со скоростью 10 мл/мин. Выделенный фрагмент миокарда закрепляли на дне камеры эндокардиальной стороной вверх, на протяжении всего эксперимента препарат работал в собственном ритме.

Для регистрации потенциала действия (ПД) применяли стандартный метод внутриклеточного отведения биоэлектрической активности с помощью стеклянных микроэлектродов сопротивлением 15–30 МОм. Сигнал оцифровывался на аналогово-цифровом преобразователе E14-140 (L-Card, Россия) и записывался на компьютере с помощью программы L-Graph v.1.0 (L-Card, Россия).

Обработку данных проводили в программе MiniAnalysis v.3.0.1 (Synaptosoft, США). Оценивали длительность ПД на уровне 50% и 90% реполяризации мембраны кардиомиоцита, а также частоту ПД, т.е. величину синусового ритма.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica v.6.0. При оценке достоверности различий для связанных выборок использовали критерий Вилкоксона, для несвязанных — критерий Манна—Уитни.

Биохимическое исследование активности АХЭ проводили с экстрактами сердца и *m. extensor digitorum longus* (EDL), полученными гомогенизацией в отношении 1:4 с буфером: 50 мМ трис-НСl, 2 мМ EDTA, 15 Tween 20, 1 М NaCl, pH 6,8 с последующим центрифугированием. Начальную скорость реакции определяли по наклону касательной к кинетической кривой продукт—время за первые 30 с от начала реакции. Регистрацию реакции осуществляли по методу Элмана [6] на спектрофотометре Perkin-Elmer λ25, измерения проводили при температуре 36°C и pH 8,0.

Результаты

В контроле, т.е. до действия ингибиторов АХЭ, длительность ПД на уровне 50% реполяризации составляла 19,3 ± 2,2 мс, на уровне 90% — 53,8 ± 4,5 мс, ритм следования ПД — 316,0 ± 8,2 имп/мин (n=40).

Фосфорорганический ингибитор АХЭ армин в концентрациях 100 нМ, 1 и 10 мкМ вызывал выраженное снижение длительности ПД на уровне 90% и 50% реполяризации (рис. 1, I, рис. 2, 3), а также замедление синусового ритма (см. рис. 2, 3). Согласно данным, представленным на рис. 2, эффект 1 мкМ армина развивался постепенно, при этом к 12–13-й минуте перфузии раствором ингибитора выраженность как укорочения ПД, так и замедления ритма выходила на относительно постоянный уровень. Подобная динамика развития эффектов

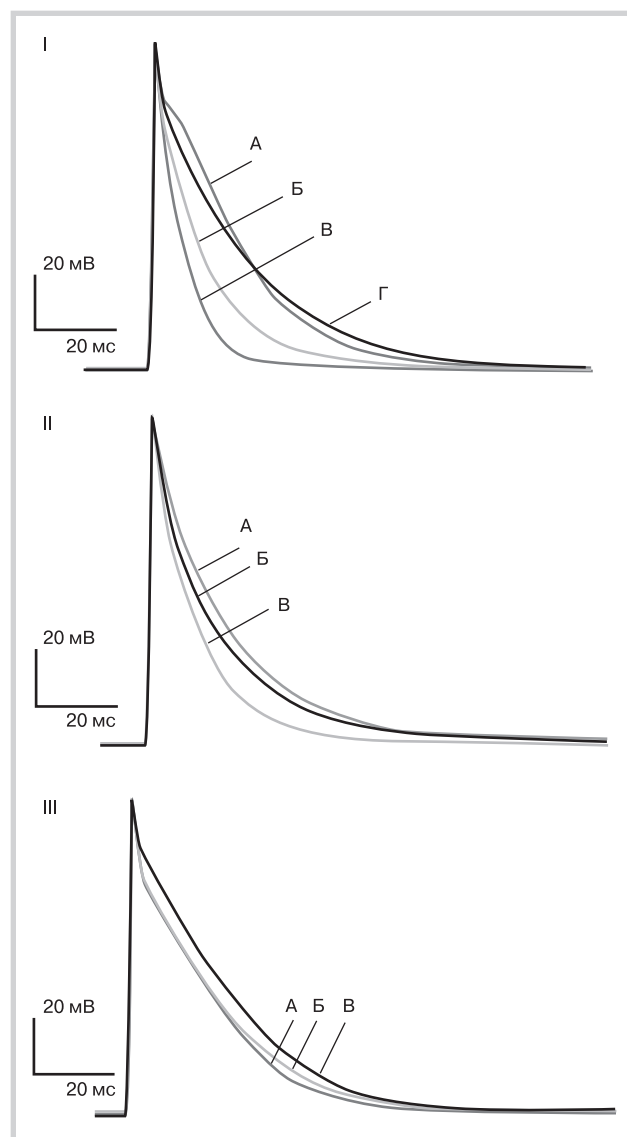


Рис. 1. Оригинальные записи, демонстрирующие изменение конфигурации ПД под действием армина (I), прозерина (II) и вещества № 547 (III) (приведены записи из трех отдельных экспериментов).

I: А — ПД в контроле; Б — ПД при действии 100 нМ армина (13-я минута); В — ПД при действии 1 мкМ армина (13-я минута); Г — восстановление исходной длительности ПД под действием 1 мкМ атропина (после обработки 1 мкМ армина). II: А — ПД в контроле; Б — ПД при действии 100 нМ прозерина; В — ПД при действии 1 мкМ прозерина. III: А — ПД в контроле; Б — ПД при действии 100 нМ вещества № 547; В — ПД при действии 10 мкМ iso-OMPA на фоне 100 нМ соединения № 547. ПД — потенциал действия.

была присуща и другим исследованным нами ингибиторам АХЭ, поэтому далее мы будем обсуждать только максимальные значения укорочения ПД и замедления ритма, т.е. полученные к 13-й минуте действия препарата. Результаты экспериментов с армином представлены на рис. 3.

Атропин (1 мкМ) — антагонист мускариновых холинорецепторов, устранял укорочение ПД на уровне 90% реполяризации (рис.1, см. рис. 3) и замедление ритма (см. рис. 3), а также сильно снижал величину укорочения ПД на уровне 50% реполяризации (см. рис. 1, см. рис. 3). Это дает основания считать, что описанные эффекты обусловлены АХ, накапливающимся в миокарде в результате подавления активности АХЭ.

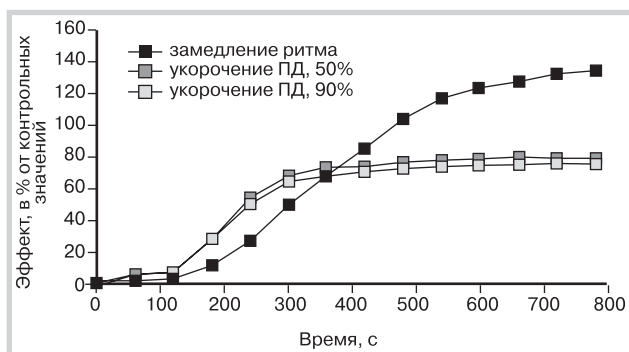


Рис. 2. Зависимость выраженности укорочения ПД и замедления ритма от времени перфузии 1 мкМ армина (усреднено по n=5). ПД — потенциал действия.

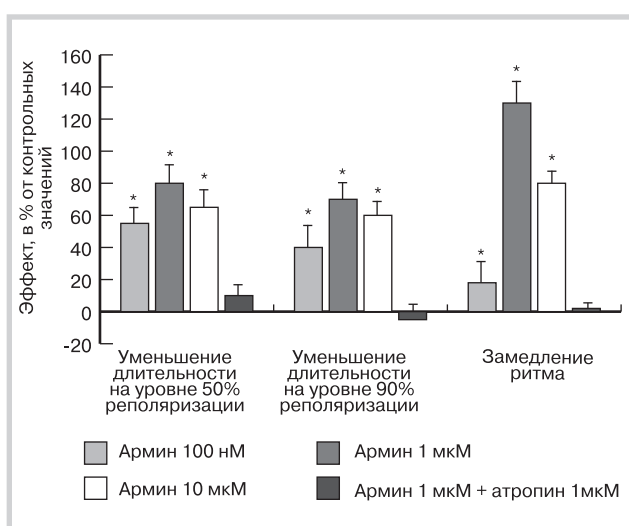


Рис. 3. Эффекты армина (100 нМ — n=5, 1 мкМ — n=5, 10 мкМ — n=4): укорочение ПД и замедление синусового ритма, а также их снятие 1 мкМ атропина (n=9). По оси ординат: соответственно величина укорочения ПД в % от длительности ПД в контроле и степень замедления ритма в % от частоты следования ПД в контроле. * — достоверность эффекта, тест Вилкоксона, p<0,05.

Отметим, что армин в концентрации 10 мкМ действовал на все три изучаемых параметра слабее, чем в концентрации 1 мкМ (см. рис. 3). По-видимому, это связано с холинолитическим действием высоких доз армина, вероятно, обусловленных его способностью связываться с мускариновыми рецепторами. Карбаматный ингибитор АХЭ прозерин (100 нМ, 1 и 5 мкМ) также вызывал достоверное дозозависимое укорочение ПД (рис. 1, II, рис. 4) и замедление ритма (см. рис. 4). Эти эффекты также снимались атропином. Таким образом, обычные ингибиторы АХЭ вызывали в предсердном миокарде крысы сходные эффекты, характерные для самого АХ и обусловленные, по-видимому, его накоплением в ткани.

Ранее нами было показано, что в присутствии соединения № 547 характерным для ингибирования АХЭ образом увеличивались амплитуда и постоянная времени спада постсинаптических ответов в диафрагме и мышцах конечностей крысы. В мышцах конечностей (EDL, soleus) максимальный эффект соединения № 547 давало в концентрации 5 нМ, тогда как в диафрагме эта концентрация составляла 100 нМ [5], $k_0 = 2,2 \times 10^9$ моль⁻¹мин⁻¹ (АХЭ эритроцитов человека) [4].

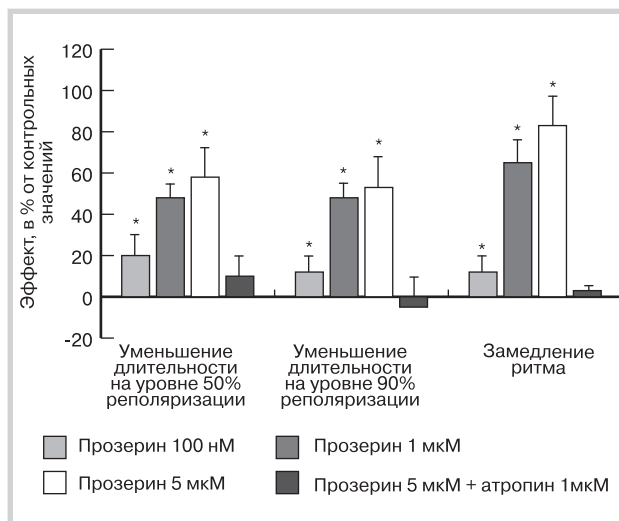


Рис. 4. Эффекты прозерина (100 нМ — n=5, 1 мкМ — n=5, 5 мкМ — n=4): укорочение ПД и замедление синусового ритма, а также их снятие 1 мкМ атропина (n=10). По оси ординат соответственно величина укорочения ПД в % от длительности ПД в контроле и степень замедления ритма в % от частоты следования ПД в контроле. * — достоверность эффекта, тест Вилкоксона, p<0,05.

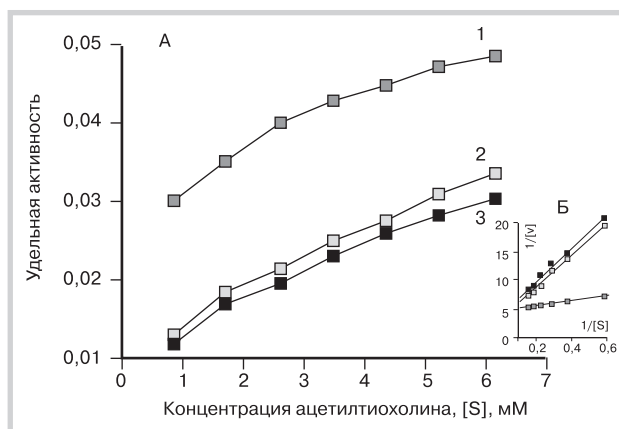


Рис. 5. Графики зависимостей, полученные по данным трех независимых выделений АХЭ. А — зависимость удельной активности АХЭ от концентрации субстрата АТХ, условия реакции. — контроль; 2 — 2×10^{-5} М iso-OMPA, $0,3 \times 10^{-4}$ М соединения № 547; 3 — 2×10^{-5} М iso-OMPA, $0,6 \times 10^{-5}$ М неостигмина, 50 мМ К-фосфатный буфер, pH 8,0, температура 36°С. Б — данные рис. А в координатах Лайнуивера—Берка. АХЭ — ацетилхолин; АТХ — ацетилтихолин.

В отличие от армина и прозерина соединение № 547 не оказывало достоверного влияния на конфигурацию ПД (рис. 1, III) или частоту синусового ритма (данные не приведены) ни в одной из исследованных концентраций (1, 10 и 100 нМ).

Поскольку традиционные ингибиторы АХЭ вызывают ярко выраженные эффекты АХ в предсердном миокарде, а соединение № 547 не оказывает такого действия, можно либо предположить существование диффузионных барьеров, специфичных для данного соединения, либо считать, что это вещество в исследованных концентрациях не ингибирует АХЭ в миокарде крысы в отличие от скелетной мускулатуры и эритроцитов.

Для проверки справедливости данного предположения было проведено исследование по оценке влияния различных концентраций соединения № 547 и прозерина на кинетику

реакции, катализируемой АХЭ в гомогенатах скелетной (EDL) и сердечной мышц крысы. Определяли характер зависимости скорости реакции от концентрации субстрата (ацетилтихолин) при разных концентрациях исследуемых ингибиторов. Графики зависимостей, полученные по данным трех независимых выделений АХЭ, представленные на рис. 5, имеют вид типичных кривых Михаэлиса—Ментен. Вклад БУХЭ в эстеразную активность исключали, добавляя к реакционной смеси iso-ОМРА — избирательный ингибитор БУХЭ. Полученные данные свидетельствуют, что исследуемый ингибитор относится к бесконкурентному типу, причем для соединения № 547 KI(сердце) = $3,6 \times 10^{-4}$ М, а KI(EDL) = $1,3 \times 10^{-8}$ М. Прозерин оказывает на наблюдаемую нами реакцию сравнимое ингибирующее воздействие для сердца и скелетной мышцы, проявляя сходные по значению константы ингибирования KI = $0,73 \times 10^{-5}$ М для сердца и KI = $0,4 \times 10^{-5}$ М для EDL.

Заключение

Таким образом, низкая чувствительность миокарда к 1,3-бис[5(диэтил-о-нитробензиламмоний) пентил]-6-

метилурацилдибромиду, зафиксированная нами в электрофизиологических экспериментах, не связана с меньшей доступностью синаптической ацетилхолинэстеразы сердца по сравнению с ацетилхолинэстеразой скелетных мышц, а следовательно, реакция, катализируемая ацетилхолинэстеразой сердца, действительно в значительной степени менее подвержена ингибированию 1,3-бис[5(диэтил-о-нитробензиламмоний) пентил]-6-метилурацилдибромидом. И хотя конкретные молекулярные механизмы, посредством которых реализуется разная чувствительность ацетилхолинэстеразы скелетных мышц и миокарда к производным 6-метилурацила, в настоящий момент неизвестны, исследования в данной области представляют как практический (в плане создания значительно более безопасных ингибиторов ацетилхолинэстеразы), так и общебиологический интерес (в плане выяснения возможных различий в молекулярном строении ацетилхолинэстеразы сердца и поперечно-полосатых мышц).

Работа поддержана грантами РФФИ № 07-04-01137, РФФИ № 07-04-12097

ЛИТЕРАТУРА

1. Pope C., Karanth S., Liu J. Pharmacology and toxicology of cholinesterase inhibitors: uses and misuses of a common mechanism of action. *Environ toxicol pharmacol* 2005;19:433—446.
2. Eddleston M, Eyer P, Worek F. et al. Differences between organophosphorus insecticides in human self-poisoning: a prospective cohort study. *Lancet* 2005;366:1452—1459.
3. Резник В.С., Аникиенко К.А., Курочкин В.К. и др. Новый класс ингибиторов холинэстераз: тетраалкиламмониевые производные 6-метилурацила и аллоказина. *ДАН* 1998;1:68—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. *ДАН* 2001;6:818—822.
5. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. Jr., Feather-Stone R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961;7:88—95.
6. Petrov K.A., Kovyazina I.V., Zobov V.V. et al. Different sensitivity of miniature endplate currents of the rat extensor digitorum longus, soleus and diaphragm muscles to a novel acetylcholinesterase inhibitor C-547. *Physiol Res* 2006;55:585—589.

Поступила 24.04.08