

УДК 612.815:612.014.42:616-003.725

## ОСОБЕННОСТИ ЭФФЕКТОВ ИНГИБИРОВАНИЯ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ГЛАДКОЙ И ПОПЕРЕЧНОПОЛОСАТОЙ МЫШЦ КРЫСЫ АЛКИЛАММОНИЕВЫМ ПРОИЗВОДНЫМ 6-МЕТИЛУРАЦИЛА

© 2013 г. А. Д. Никиташина, К. А. Петров, В. В. Зобов,  
В. С. Резник, академик Е. Е. Никольский

Поступило 29.11.2012 г.

DOI: 10.7868/S0869565213100289

На сегодняшний день ингибиторы фермента ацетилхолинэстеразы (АХЭ) широко используются в медицинской практике для фармакологической коррекции синаптических дефектов, лежащих в основе болезни Альцгеймера, миастении Гравис и других форм патологической мышечной слабости, а также для стимуляции гладкомышечных элементов кишечника и мочевого пузыря с целью усиления тонуса и стимуляции перистальтики [1, 2]. Кроме того, частичное ингибирование активности АХЭ применяется в анестезиологии для ускорения процесса выведения пациента из состояния блокады нервно-мышечной передачи возбуждения, обусловленной введением миорелаксантов антидеполяризующего типа (кураре и его аналоги) [3]. Эффективность антиАХЭ препаратов в этих случаях обусловлена их способностью потенцировать эффекты эндогенного ацетилхолина (АХ) за счет уменьшения скорости его ферментативного гидролиза. В этой ситуации молекулы медиатора, активировавшие холинорецептор, за счет продления времени их существования в синаптической щели способны возбуждать и другие холинорецепторы, что приводит к возрастанию амплитуды возбуждающего постсинаптического потенциала (ВПСП). В случае заболеваний, вызванных снижением плотности функционально активных холинорецепторов на постсинаптической мембране или уменьшением интенсивности секреции медиатора (миастения Гравис, синдром Ламберта–Итена, болезнь Альцгеймера и др.) [4, 5],

увеличение амплитуды ВПСП после ингибирования АХЭ восстанавливает способность ВПСП вызывать генерацию потенциала действия на постсинаптической клетке. При атонии кишечника и мочевого пузыря увеличение амплитуды ВПСП приводит к усилению сокращения гладкомышечных элементов, повышает тонус органов и усиливает перистальтику.

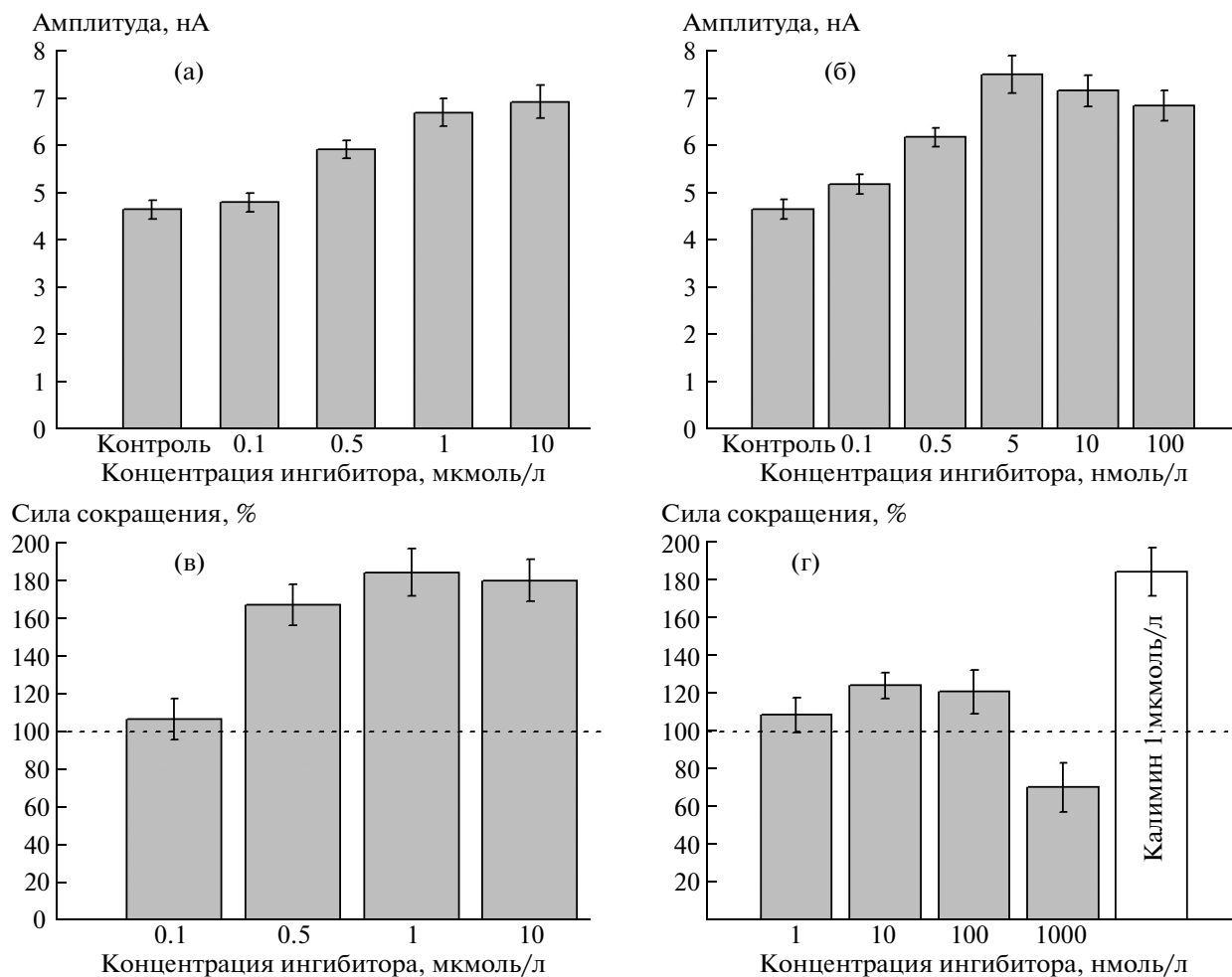
Однако широкое клиническое применение ингибиторов АХЭ требует большой осторожности, поскольку одновременно с воздействием на орган, функционирование которого требует в данный момент фармакологической коррекции, происходит инактивация фермента и в других органах, коррекции не требующих, что приводит к развитию множества побочных эффектов. Так, например, применение антиАХЭ препаратов для лечения синдромов патологической мышечной слабости может сопровождаться побочными эффектами, связанными с нарушением нормального функционирования сердечной мышцы, а также гладких мышц сосудов и кишечника [6].

Вышеописанных недостатков могли бы быть лишены ингибиторы АХЭ, более эффективные в отношении синапсов отдельных тканей. Однако до настоящего времени вещества с подобными свойствами описаны не были.

Ранее [7] при исследовании нового класса ингибиторов АХЭ – алкиламмониевых производных 6-метилурацила – нами было показано, что один из представителей данного класса 1,3-бис[5(диэтил-о-нитробензиламмоний)пентил]-6-метилурацилдигидробромид (С-547) проявлял избирательность действия в отношении АХЭ скелетной мускулатуры по сравнению с дыхательной мускулатурой. Также было показано, что соединение № С-547 ингибирует АХЭ сердечной мышцы в концентрациях, на два порядка больших, чем необходимо для полного ингибирования АХЭ в скелетной мышце [8]. Поскольку С-547 содержит в составе четвер-

*Казанский институт биохимии и биофизики  
Казанского научного центра Российской Академии наук  
Институт органической и физической химии  
им. А.Е. Арбузова Казанского научного центра  
Российской Академии наук, Казань*

*Казанский (Приволжский) федеральный университет  
Казанский государственный медицинский университет*



**Рис. 1.** Зависимость амплитуды МТКП, зарегистрированных в EDL, и силы сокращений препаратов мочевого пузыря крысы от концентрации ингибиторов АХЭ; а – EDL, калимин; б – EDL, С-547; в – мочевого пузыря, калимин; г – мочевого пузыря, С-547;  $n = 30$  для МТКП;  $n = 5$  для препаратов мочевого пузыря.

тичный азот, затрудняющий проникновение соединения через гематоэнцефалический барьер, то наиболее вероятные области его применения – лечение синдромов патологической мышечной слабости и атонии гладкой мускулатуры. Цель данного исследования – сопоставить эффективность С-547 и одного из широко применяющихся в клинике ингибиторов АХЭ – калимина – в отношении синапсов поперечнополосатых мышц по сравнению с синапсами гладких мышц.

Эксперименты проводили на изолированных препаратах мочевого пузыря и длинном разгибателе пальцев (*m. extensor digitorum longus* – *m. EDL*) белых беспородных крыс обоих полов массой 250–300 г. Животных декапитировали под эфирным наркозом и выделяли исследуемые органы. Изолированные мочевой пузырь и мышцу помещали в раствор Рингера–Кребса следующего состава (ммоль/л): NaCl – 120.0, KCl – 5.0, CaCl<sub>2</sub> – 2.0, MgCl<sub>2</sub> – 1.0, NaHCO<sub>3</sub> – 11.0,

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1.0, глюкоза – 11.0 (pH 7.2–7.4 при температуре 20 ± 2°C). Мочевой пузырь разрезали на полоски шириной 2–3 мм и длиной 10 мм и помещали в ванночку объемом 20 мл, заполненную раствором Рингера–Кребса, аэрируемого карбагеном. Для измерения сократительного ответа использовали датчик средней чувствительности Ugo Basile, модель № 7004. Сокращения анализировали с помощью компьютерной программы Virtual Chart Recorder 1024 × 768. Сокращения препаратов мочевого пузыря вызывали добавлением в омывающий препарат раствора АХ (100 мкмоль/л). Затем препараты “отмывали” раствором без медиатора и ожидали восстановления тонуса гладкой мускулатуры до уровня, предшествующего сокращению. Далее работали по следующему протоколу: препараты инкубировали в течение 20 мин в растворе, содержащем различные концентрации ингибитора, а затем определяли их реакцию на добавление АХ (100 мкмоль/л).

Миниатюрные токи концевой пластинки (МТКП) регистрировали с помощью стандартной микроэлектродной техники. Для предотвращения спонтанных мышечных сокращений, вызванных ингибированием АХЭ, в перфузионный раствор добавляли блокатор  $\text{Na}^+$ -каналов тетродоксин (0.1 мкмоль/л).

Достоверность анализируемых различий проверяли по критерию Стьюдента ( $p < 0.05$ ). С-547 был синтезирован в лаборатории химико-биологических исследований ИОФХ им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН. Пиридостигмин бромид (калимин) был приобретен в “Sigma-Aldrich”.

Исследования показали, что в контроле средняя амплитуда МТКП в синапсах m.EDL составляла  $4.6 \pm 0.2$  нА ( $n = 30$ ). Сокращения препаратов гладкой мускулатуры на аппликацию АХ составляли  $2.9 \pm 0.2$  г ( $n = 5$ ). Калимин вызывал характерное для ингибиторов АХЭ дозозависимое увеличение амплитуды МТКП в m.EDL в концентрации 0.1 мкмоль/л ( $n = 30$ ,  $p < 0.05$ ) (рис. 1а). Максимальное увеличение амплитуды МТКП наблюдалось в его концентрации 1 мкмоль/л и составляло 144% по сравнению с контролем ( $n = 30$ ,  $p < 0.05$ ). Пороговая концентрация калимина, вызывающая увеличение силы сокращений препаратов мочевого пузыря, так же как и в случае поперечнополосатой мышцы, составляла 0.1 мкмоль/л ( $n = 5$ ,  $p < 0.05$ ). Максимальное увеличение (на 85%) наблюдалось также в концентрации 1 мкмоль/л ( $n = 5$ ,  $p < 0.05$ ) (рис. 1в).

С-547 был значительно эффективнее калимина. Так, достоверное увеличение амплитуды МТКП на 12% было вызвано действием соединения концентрации 0.1 нмоль/л ( $n = 30$ ,  $p < 0.05$ ). Максимальное увеличение амплитуды токов наблюдалось при использовании концентрации С-547 5 нмоль/л и составляло 161% по сравнению с контролем ( $n = 30$ ,  $p < 0.05$ ) (рис. 1б). В экспериментах на мускулатуре мочевого пузыря С-547 не был эффективен даже в концентрации 1 нмоль/л ( $109.0 \pm 9.5\%$ ;  $n = 5$ ,  $p < 0.05$ ). При использовании С-547 в концентрации 10 нмоль/л было обнаружено достоверное увеличение силы сокращений полоски мочевого пузыря на  $124.6 \pm 6.8\%$  ( $n = 5$ ,  $p < 0.05$ ) (рис. 1г). Дальнейшее увеличение концентрации С-547 до 1 мкмоль/л вызывало снижение силы сокращений ниже контрольных значений (до  $70.7 \pm 13.1\%$ ;  $n = 5$ ,  $p < 0.05$ ).

Таким образом, максимально эффективные концентрации для С-547 на скелетной мышце и гладкой мускулатуре различаются в 2 раза, тогда как в случае с калимином такой разницы не наблюдается.

Полученные результаты показывают, что С-547 более эффективен в отношении АХЭ синапсов поперечнополосатых мышц по сравнению с синапсами гладкой мускулатуры. Такая особенность С-547 делает представителей данного класса соединений перспективными для дальнейших

исследований в качестве потенциальных лекарственных средств, предназначенных для лечения миастении Гравис и врожденных миастеноподобных состояний.

Дальнейшее изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе различий в эффективности ингибирования АХЭ в синапсах разных органов, позволит направленно синтезировать соединения с еще более выраженными органо- и тканеспецифическими свойствами.

Что может лежать в основе различий в эффективности С-547 в разных органах? Известно, что АХЭ существует в виде нескольких молекулярных форм, соотношение которых в разных органах сильно различается. В основе разнообразия молекулярных форм АХЭ лежат несколько процессов. Так, описаны несколько вариантов альтернативного сплайсинга гена АХЭ [9]. Кроме того, известны различия в посттрансляционных модификациях АХЭ, таких как гликозилирование и присоединение нескольких вариантов “якорной” субъединицы [10]. Как уже было отмечено, С-547 является первым кандидатом на роль органоспецифического ингибитора АХЭ. Однако причины избирательности действия данного соединения в отдельных органах в настоящее время не определены. Для поиска причин разной чувствительности АХЭ к С-547 нам представляется перспективным сосредоточиться на анализе различий в соотношении отдельных молекулярных форм АХЭ в гладкой и поперечнополосатой мышцах.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 12-04-32056-мол\_а, 12-04-33296-мол\_а\_вед и 11-04-01188, Президента РФ “Ведущие научные школы” НШ- 64631-2010.7.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lee J., Bang K., Jang P., et al. // Korean J. Hematol. 2010. V. 45. № 1. P. 62–65.
2. Brenner T., Nizri E., Irony-Tur-Sinai M., et al. // J. Neuroimmunol. 2008. V. 201/202. P. 121–127.
3. Ali H., Savarese J. // Anesthesiology. 1976. V. 45. № 2. P. 216–249.
4. James E., Caldwell M. // J. Critical Care. 2009. V. 24. P. 21–28.
5. Maddison P., Lang B., Mills K., Newsom-Davis J. // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 2001. V. 70. P. 212–217.
6. Ruff R., Lennon V. // J. Neuroimmunol. 2008. V. 201/202. P. 13–20.
7. Petrov K., Kovyazina I., Zobov V., et al. // Physiol. Res. 2009. V. 58. P. 149–153.
8. Abramochkin D.V., Petrov K.A., Zobov V.V., et al. // J. Cardiovasc. Pharmacol. 2009. V. 53. № 2. P. 162–166.
9. Ekstrom T.J., Klump W.M., Getman D., et al. // DNA Cell Biol. 1993. V. 12. № 1. P. 63–72.
10. Massoulié J. // Neurosignals. 2002. V. 11. № 3. P. 130–143.