

ЗАЩИТА МЫШЕЙ ИНГИБИТОРАМИ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ИЗ КЛАССА КАРБАМАТОВ ОТ ОТРАВЛЕНИЯ АРМИНОМ И ЗАВИСИМОСТЬ ОТ НЕКОТОРЫХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ

**В.Б.ПРОЗОРОВСКИЙ*, Л.В.ПАВЛОВА, И.М.СУСЛОВА,
А.В.САЗОНОВА, А.В.КОКУШКИНА**

Научно-исследовательский институт военной медицины МО РФ 195043 Санкт-Петербург, ул.Лесопарковая, д.4, факс 527-39-57

Испытана серия производных аминостигмина с различными заместителями при атоме азота во 2-м положении пиридинового кольца. Эффективность профилактики гибели мышечных тканей при отравлении армином у 5-ти веществ из 7-ми коррелирует с константой скорости карбамилирования ацетилхолинэстеразы в опытах *in vitro* и гидрофобностью. Предполагается, что в феномене защиты животных от токсического действия фосфорорганических соединений принимает участие "уходящая часть" молекулы карбаматов.

Ключевые слова: ингибиторы холинэстеразы, карбаматы, фосфорорганические соединения, профилактика отравлений.

ВВЕДЕНИЕ. Угроза применения химического оружия Ираком в зоне Персидского залива, террористические акты с использованием зарина в Японии, а также предстоящее уничтожение запасов боевых отравляющих веществ послужило причиной повышения интереса к использованию обратимых ингибиторов холинэстеразы (ХЭ) для профилактики отравлений фосфорорганическими соединениями (ФОС) [1-3]. Обнаружение возможности предупреждения необратимого связывания ХЭ ФОС путем предварительного воздействия физостигмином относится к 40-м годам [4,5]. С тех пор и до настоящего времени наиболее распространенной является теория экранирования фермента, согласно которой связывание ХЭ карбаматным ингибитором предохраняет фермент от фосфорилирования. Не связавшаяся с ХЭ часть ФОС элиминируется, а комплекс карбамат-фермент реактивируется за счет спонтанного декарбамилирования [6,7].

Согласно известным представлениям, взаимодействие ХЭ с ингибиторами [8], реакция исследуемых производных антихолинэстеразного препарата аминостигмина [9] с ферментом может быть записана в виде следующей схемы:

По мнению некоторых авторов [10,11], скорость декарбамилирования не зависит от "уходящей части", т.е. независима от ее строения и свойств. Следовательно, по теории экранирования уходящая часть не должна оказывать влияния на выраженность защитного эффекта карбаматов. Однако это утверждение основано на исследовании малого набора карбаматов, существенно



различных по строению их уходящей части. Целью данного исследования явилась оценка защитной эффективности ряда соединений, являющихся производными N,N-диметил(2-N',N'-диметил пиридил-3)карбамата (см. схему) и изучение зависимости коэффициента защиты мышей при отравлении армином от некоторых констант взаимодействия этих карбаматов с ацетил-ХЭ.

МЕТОДИКА. Испытанные соединения синтезированы в НИИ военной медицины и описаны ранее [12]. Опыты *in vitro* выполнены с использованием ацетил-ХЭ эритроцитов человека с удельной активностью 2Е/мг. В качестве субстрата использовали ацетилхолин иодид фирмы "Chemapol" (Чехословакия). Методы определения констант взаимодействия ингибиторов с ХЭ, а также коэффициентов распределения в системе октанол/буфер (КР) подробно описаны ранее [8,12].

В опытах *in vivo* использованы белые беспородные мыши самцы массой 17-21 г. С целью профилактики мышам подкожно вводили атропин в неэффективной дозе 2,5 мг/кг (1/2 минимальноэффективной дозы) и через 1 минуту внутривентриально используемый карбамат в разных дозах при постоянном объеме - 0,1 мл/10 г. Через 30 минут после атропина мышам внутривентриально вводили армин в дозе равной ЛД₉₉. Определяли дозы карбаматов, необходимые для предупреждения гибели 50 % животных - РД₅₀. В отдельных опытах определяли величины ЛД₅₀ изучаемых соединений. Все дозы определены табличным методом [13].

Коэффициент эффективности защиты (КЭ) вычисляли по отношению ЛД₅₀ к РД₅₀.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Полученные результаты приведены в табл.1. Согласно полученным данным, испытанные карбаматы различаются по всем показателям. Наибольшие различия выявлены при определении летальных доз - в 285 раз, что определяется не только их антихолинэстеразной активностью, но и особенностями фармакокинетики. В меньшей степени варьирует сродство к ХЭ - в 33 раза, эффективные дозы - в 20 раз и КР - 10 раз. Различия в скорости карбамилирования - 7 раз, декарбамилирования - 2,9 раза и эффективности - 5,2 раза не столь велики, однако не позволяют считать их несущественными.

В табл.2. приведены коэффициенты линейной корреляции, рассчитанные стандартным методом [14]. Коэффициенты вычисляли для всего ряда и для рядов с исключением соединения VII, у которого азот во 2-ом положении пиридинового цикла включен в кольцо, и соединения V, имеющего циклогексильный заместитель, то есть веществ некоторым образом выпадающих из гомологического ряда.

Корреляция КЭ с константой родства (Ka) незначима. Корреляции с константой скорости карбамилирования (обратная) невелика, но резко возрастает до больших величин при исключении соединения VII и, особенно, V и VII.

В укороченном ряду наблюдается тесная корреляция КЭ с коэффициентом распределения. Эффективность слабо коррелирует с константой скорости декарбамилирования, даже в ряду I-VI. При анализе полного ряда корреляция вообще отсутствует.

Таблица 1. Кинетические константы взаимодействия с ацетилхолинэстеразой, коэффициент распределения в системе октанол/буфер (*in vitro*), летальные и эффективные дозы, а также коэффициент эффективности защиты (опыты на мышах) производных аминостигмина

Соединения			Показатели				<i>in vivo</i>		
NN	R1	R2	Ka (10 ⁻⁷) М	Kc мин ⁻¹	K2c (10 ⁻²) мин ⁻¹	КР октанол/ буфер	ЛД50 в/б	РД50 в/б	КЭ= ЛД50: РД50
I	CH ₃	C ₄ H ₉	4,6	0,64	3,60	1,5	0,82	0,22	3,7
II	CH ₃	C ₅ H ₁₁	1,4	0,45	4,17	5,6	1,80	0,39	4,6
III	CH ₃	C ₆ H ₁₃	0,7	0,52	1,82	10,0	2,58	0,45	5,7
IV	CH ₃	C ₇ H ₁₅	0,2	0,30	3,09	11,0	1,03	0,16	6,4
V	CH ₃	C ₆ H ₁₁	28,0	0,11	3,17	5,4	137,0	33,4	4,1
VI	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	6,50	0,77	3,95	0,3	0,48	0,32	1,5
VII	(CH ₂) ₅		4,5	0,41	5,23	1,1	1,63	0,21	7,8

Таблица 2. Коэффициенты линейной корреляции между эффективностью - КЭ, константами сродства - K4a, карбамилирования K4c, декарбамилирования - K42c и гидрофобностью - КР (r+m4r)

Показатели	КЭ для разных рядов	
	I - VI	I - VII
Ka (10 ⁻⁷) М	-0,34 ± 0,47	- 0,30 ± 0,42
Kc мин ⁻¹	0,57 ± 0,41	- 0,50 ± 0,37
Kc* мин ⁻¹	- 0,92 ± 22 ***	- 0,82 ± 0,28 **
K2c (10 ⁻²) мин ⁻¹	- 0,54 ± 0,40	0,12 ± 0,44
КР	0,94 ± 0,17 ***	0,40 ± 0,40

Примечание: * - для ряда без вещества V, ** - p < 0,05, *** - p < 0,01

Таким образом, можно заключить, что поиск корреляционных отношений между КЭ и различными показателями следует проводить в строго гомологичных рядах. Достаточно к такому ряду добавить одно, тем более два соединения с резко отличающимся заместителем, как величина корреляции падает. Как было показано ранее, скорость карбамилирования и гидрофобность зависят от уходящей части карбаматов, которая взаимодействует с гидрофобными зонами фермента, регулирующими функцию активных центров [15,16]. Отсюда следует, что уходящая часть в течение большего или меньшего времени остается на поверхности ХЭ, оказывая влияние на защитный эффект.

Полученные данные не противоречат теории экранирования, тем более, что у вещества VII максимальная эффективность совпадает с максимальной скоростью декарбамилирования. Однако, очевидно, что эта теория не может быть принята в ее ортодоксальном изложении, особенно в том случае, когда учитываются иные возможности механизма защиты от гибели при отравлении ФОС, в частности, адаптацию или десенситизацию холинорецепторов, изменение свойств ионных каналов [17,18] и др.

ЛИТЕРАТУРА

1. Keeler R., Hurst Ch., Dunn J. (1992). J.Am.Med.Assoc. (5). 693-695.
2. Okumura T., Takasu N., Ichimatsu Sh. et al. (1996). Annals of Emerg. Med. 2. 129-135., 223-224.
3. Куценко С.А., Нечипоренко С.П., Прозоровский В.Б. и др. (1994). Росс. хим. ж. (2). 90-93.
4. Koelle G.B. (1946). J.Pharmacol. and Exp. Thez. (3). 232-237.
5. Angustinsson K.B., Nachwansohn D. (1948). J.Biol.Chem. 179. (2). 543-559.
6. Ellin R., Kaminskis A. (1985). J.Pharm.Pharmacol. (9). 633-635.
7. Somani S., Dube S. (1989). Int.J.Clin.Pharmacol. Ther.Toxicol. 27 (8). 367-387.
8. Меткалф Р.Л. (1972) Бюлл. ВОЗ. 44. (1-3), 44-78
9. Прозоровский В.Б., Розенгарт В.И., Ардабьева Т.В. и др. (1996). Биохимия. 61 (4). 690-696.
10. Greenspan C.M., Wilson J.B. (1970). Mol. Pharmacol. 6, 266-272.
11. Reiner E., Simeon-Rudolf V. (1966). Biochem. J. 98 (2). 501-505.
12. Прозоровский В.Б., Павлова Л.В., Белозерова Л.В. и др. (1994). Ж. прикл. хим. 67 .. (12). 2017-2021.
13. Прозоровский В.Б. (1998). Токсикол. вест. N1. 28-32.
14. Плохинский Н.А. (1961). Биометрия. Новосибирск. Сиб. отд. АН СССР.
15. Кабочник М.И., Абдувохабов А.А., Агабекова И.И. и др. (1970). Усп.химии. 39 (6). 1050-1073.
16. Quinn D.M. (1987). Chem. Rev. 87 (5). 1183-1255.
17. Кучушева Л.И., Розенгарт В.И., Шерстобитов О.Е. (1990). Укр. биохим. ж. 62 (1). 34-39.
18. Sherby S., Eldefrawi M. (1986). Mol. Pharmacol. 27 (3). 343-348.

Поступила 13.09.1998.

**PROTECTION OF MICE BY CHOLINESTERASE INHIBITORS OF THE CLASS OF
CARBAMATES AGAINST POISONING BY ARMINE AND ITS DEPENDENCE ON
CERTAIN PHYSICO-CHEMICAL INDICATORS**

**V.B.PROZOROVSKY, L.V.PAVLOVA, I.M.SUSLOVA,
A.V.SAZONOVA, A.V.KOKUSHKINA**

Military Medicine Research Institute, Ministry of Defense, Russian Federation. 195043,
St-Peterburg, Lesoparkovay 4, fax 527-39-57

A series of aminostigmine derivatives with various substituents at nitrogen in the second position of the pyridine ring, has been tested. The efficacy of preventing the death of mice poisoned by armine in five of the seven substances correlates with the constant of the rate of carbamylation of acetylcholinesterase in the in vitro experiments and with the hydrophobic nature. It is suggested that the phenomenon of protection of animals against the toxic effect of organophosphorous compounds involves the "leaving portion" of the molecule of carbamates.

Key Words: cholinesterase inhibitors, carbamates, organophosphorans compounds, prophylaxis of poisoning