

ФАРМАКОЛОГИЯ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

БИЗЕРИН — АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНОЕ СРЕДСТВО, ИЗБИРАТЕЛЬНО ВЛИЯЮЩЕЕ НА КИШЕЧНИК

В. Б. Прозоровский, Л. В. Павлова, И. М. Сусллова, А. В. Сазонова, Н. И. Щемелёва¹

Бизерин — оксалат гексаметилен-бис- [N-метилкарбаминовой кислоты-3-(2-диметиламинометил) пиридинового эфира]. Как ингибитор ацетилхолинэстеразы в опытах *in vitro* равен аминостигмину, в 2,5 и 6,7 раза менее активен, чем прозерин и дистигмин, но образует с ферментом более устойчивый комплекс. В 10–80 раз менее токсичен для лабораторных животных. По сравнению с прозеринном в 3–60 раз активнее на изолированном мочевом пузыре крыс и в 100–500 раз слабее по действию на спинную мышцу пиявок и скелетные мышцы мышей и крыс. Бизерин активно ингибирует холинэстеразу (ХЭ) кишечника морских свинок, при системном введении не угнетает ХЭ мозга мышей. Бизерин является длительно действующим периферическим м-холинопотенцирующим ингибитором ХЭ и активатором перистальтики.

Ключевые слова: бизерин, бис-аммонийные симметричные ингибиторы холинэстеразы, третичные ингибиторы холинэстеразы, токсичность ингибиторов холинэстеразы, стимуляция перистальтики кишечника

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в РФ для клинического применения в качестве средств активации гладких мышц кишечника и мочевого пузыря рекомендовано 3 обратимых ингибитора холинэстеразы (ХЭ): галантамин, прозерин и дистигмин [1]. Галантамин из-за дефицитности сырья практически недоступен, прозерин и дистигмин недостаточно избирательны. В соответствии с литературными данными [5, 6], предполагалось, что при удвоении молекулы аминостигмина можно повысить его влияние на гладкую мускулатуру, что было достигнуто при получении дистигмина (убретид), являющегося бис-пиридо-стигминовым производным. Бизерин как гексаметиленовое бис-производное аминостигмина [2] сопоставлен с наиболее близкими к нему аминостигмином, прозеринном и дистигмином.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Величины ЛД₅₀ определяли табличным методом [3]. Антихолинэстеразную активность *in vitro* оценивали на очищенной ХЭ эритроцитов человека. Константы взаимодействия с ферментом рассчитывали, используя автитратор ТТТ-1 фирмы “Radiometr” (Дания). Скорость декарбамилирования оценивали методом разведения. Активность ХЭ крови и гомогенатов тонкого кишечника и мозга определяли на спектрофотометре СФ-4 по методу Хестрина. Степень торможения фермента находили путём сравнения с контролем. Для общей ХЭ в качестве субстрата использован ацетилхолин, сывороточной ХЭ — бутирилхолин.

Потенцирующее и блокирующее действие препаратов оценивали по величине концентраций, необходимых для

изменения средства к ацетилхолину в 2 раза [4]. В качестве м-холинореактивного объекта использовали мочевую пузырь крысы, н-холинореактивного — спинную мышцу пиявки. Влияние на мышцы мышей и крыс определяли по величине доз, необходимых для возникновения фасцикуляций. Всего выполнено 6 серий опытов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Средние летальные и эффективные дозы бизерина и прозерина для животных при разных путях введения приведены в табл. 1.

Результаты определения анти-ХЭ активности *in vitro* на очищенной ХЭ эритроцитов человека приведены в табл. 2.

Таблица 1. Средние летальные дозы бизерина и прозерина (мг/кг), $M \pm m$ ($n = 8 - 12$)

Животные	Путь введения	Препараты		Отношение Б/П
		бизерин (Б)	прозерин (П)	
Белые мыши	в вену	10,4 ± 1,2	0,20 ± 0,02	50
	под кожу	17,5 ± 2,6	0,44 ± 0,06	40
	в мышцу	12,4 ± 2,3	0,40 ± 0,06	31
	внутрибрюшинно	13,5 ± 1,9	0,50 ± 0,07	27
Белые крысы	в мышцу	41,4 ± 8,4	0,46 ± 0,03	89
	внутрибрюшинно	22,4 ± 3,2	0,71 ± 0,07	32
Морские свинки	в вену	12,0 ± 1,0	—	—
Кошки	в мышцу	16,5 ± 0,9	1,50 ± 0,35	11
	в мышцу	8,9 ± 1,2	—	—

¹ НИИЦ (МБЗ) ГНИИИ Военной медицины МО РФ, Санкт-Петербург, 194045, ул. Лесопарковая, 4.

Таблица 2. Константы, характеризующие антихолинэстеразную активность препаратов на ацетилхолинэстеразе эритроцитов

Константы	Ингибиторы холинэстеразы			
	бизерин	аминостигмин	прозерин	дистигмин
Сродства — K_a (10^{-8} М)	14,0	11,0	10,0	1,0
Ингибирования — K_2 (10^{-7} М $^{-1}$ · мин $^{-1}$)	0,3	0,3	0,5	2,0
Карбамилирования — K_c (М · мин $^{-1}$)	0,2	0,3	0,5	0,2
Декарбамилирования — K_{2c} (10^{-2} М · мин $^{-1}$)	#	3,3	5,8	#

Примечание. # — не удается установить методом разведения.

Таблица 3. Молярные концентрации бизерина и прозерина при воздействии на мочевой пузырь крысы (М-ХР) и спинную мышцу пиявки (Н-ХР)

Вещество	Тип рецепторов	Показатели активности			
		P_2	P_{max}	МАС	A_2
Бизерин	М-ХР	$1,7 \cdot 10^{-8}$	$7,5 \cdot 10^{-6}$	30	$1,0 \cdot 10^{-4}$
Бизерин	Н-ХР	$1,5 \cdot 10^{-6}$	$3,0 \cdot 10^{-4}$	5	$> 5,0 \cdot 10^{-2}$
Прозерин	М-ХР	$6,3 \cdot 10^{-9}$	$1,5 \cdot 10^{-6}$	32	$1,3 \cdot 10^{-2}$
Прозерин	Н-ХР	$1,9 \cdot 10^{-7}$	$1,0 \cdot 10^{-6}$	60	$7,0 \cdot 10^{-3}$

Примечание. P_2 — сенситизация к ацетилхолину в 2 раза, P_{max} — концентрация максимальной сенситизации, A_2 — снижение чувствительности в 2 раза, МАС — относительная величина амплитуды максимального сокращения объектов.

Таблица 4. Средние эффективные дозы — $ED_{50} \pm m$ в мг/кг, вызывающие фасцикуляцию мышц при введении препаратов мышам под кожу и крысам в мышцу ($n = 8 - 10$)

Вещество	Тип рецептора	Животное	Дозы, вызывающие фасцикуляции — ED_{50}	Отношение доз (Б:П)
Бизерин	Н-ХР	мыши	6 (4 – 8)	–
Прозерин	Н-ХР	мыши	0,014 (0,011 – 0,015)	482
Бизерин	Н-ХР	крысы	4,5 (4,1 – 4,9)	–
Прозерин	Н-ХР	крысы	0,011 (0,009 – 0,013)	409,1

Таблица 5. Торможение (в % к контролю) активности общей ХЭ и сывороточной холинэстеразы (БХЭ) крови и тонкого кишечника морских свинок, $M \pm m$ ($n = 6$)

Вещество и доза, мг/кг	Объекты исследования			
	кровь и сыворотка		тонкий кишечник	
	ХЭ	БХЭ	ХЭ	БХЭ
Бизерин — 1 (1/12)	$30,6 \pm 10,8$	–	$29,9 \pm 12,2$	–
Бизерин — 2 (1/6)	$60,1 \pm 12$	$28,3 \pm 14,1$	$49,1 \pm 5,2$	$27,2 \pm 12,2$
Прозерин — 0,05 (1/4)	$48,0 \pm 6,4$	–	$25,9 \pm 8,8$	–
Убретид — 0,02 (1/4)	$31,7 \pm 12,3$	$25,9 \pm 13,4$	$27,9 \pm 3,7$	$21,5 \pm 8,2$

Бизерин является активным антихолинэстеразным веществом, приблизительно равным прозерину и аминостигмину, но на порядок менее активным, чем дистигмин. В отличие от прозерина и аминостигмина, но сходно с дистигмином реакция с ферментом трудно обратима.

Эффективные концентрации бизерина и прозерина определяли по кривым концентрация — амплитуда сокращения объекта (кишка, мышца) на воздействие ацетилхолина в возрастающих концентрациях (табл. 3).

Средние эффективные дозы, необходимые, для возникновения фасцикуляций у 50 % мышей и крыс, приведены в табл. 4. Дозы определяли табличным методом [3].

Бизерин в концентрации, на 2 порядка меньшей, чем прозерин, активней в отношении М-ХР, чем Н-ХР в 88 раз, а прозерин всего лишь в 30. Концентрации, в которых бизерин вызывает максимальный эффект в отношении М-ХР в 40 раз меньше, чем Н-ХР, а у прозерина эти концентрации равны. В максимальной концентрации бизерин вызывает сокращения большей амплитуды на кишечнике, а прозерин на скелетной мышце. Бизерин даже в относительно больших концентрациях на скелетной мышце практически не оказывает блокирующего действия, в то время как у прозерина такой эффект проявляется, причем на скелетной мышце в меньшей concentra-

Таблица 6. Угнетение активности холинэстеразы крови кошек (в % к исходной) в разные сроки после внутримышечного введения бизерина

Доза бизерина	Время после введения бизерина					
	0,5 ч	4 ч	1 сут	4 сут	6 сут	7 сут
2 мг/кг	42,6 ± 15,2	65,2 ± 13,6	43,9 ± 7,3	23,2 ± 17,5	–	–
5 мг/кг	49,5 ± 23,2	83,2 ± 20,3	61,9 ± 15,0	38,7 ± 23,9	22,5 ± 6,1	10,9 ± 9,8

ции. Следовательно, на изолированных органах бизерин проявляет большую избирательность действия на кишечнике, то есть является м-холинопопотенцирующим веществом. Если оценка производится только по величине P_2 , то прозерин оказывается почти на порядок эффективней бизерина на кишечнике, но он более чем на порядок токсичней. В дополнительных экспериментах показано, что бизерин (внутрибрюшинно) для мышей примерно в 20 раз менее токсичен, а фасцикуляции у мышей вызывает в дозах примерно в 200 раз больших, чем дистигмин.

Торможение ХЭ крови и гомогената кишечника морских свинок определяли методом потенциометрического титрования на автогитраторе Reometr при введении препаратов в вену в дозах, составляющих у бизерина 1/12 и 1/6, а у прозерина и убретиды — 1/4 ЛД₅₀. Животных забивали декапитацией через 3 ч после введения препаратов (табл. 5).

Активность бизерина на ХЭ крови и кишечника выше, чем у прозерина и убретиды. Учитывая отношение доз и токсичность, терапевтическая широта бизерина существенно больше. При этом эффективная доза бизерина меньше, а у прозерина больше дозы, необходимой для инициации фасцикуляций у мышей и крыс.

С целью установления центрального действия мышам вводили бизерин и физостигмин внутрибрюшинно в дозах, изоэффективных по угнетению ХЭ крови на 80 % — соответственно 4 и 0,4 мг/кг (дозы установлены графически интерполяцией); в каждой группе по 5 животных. Через 30 мин после введения препаратов мышам декапитировали, мозг без мозжечка извлекали и гомогенизировали на холоду. Угнетение ХЭ мозга при введении бизерина достигалось лишь при дозе 40 мг/кг (после атропинизации), а физостигмина в дозе 0,5 мг/кг. Коэффициенты распределения препаратов между буфером и октанолом, равные у бизерина 2,4, физостигмина 2 и прозерина 9, не позволяют связывать малую способ-

ность бизерина проникать в ткани мозга с величиной его липофильности.

Длительность действия бизерина при введении в мышцу оценена в опытах на кошках по торможению ХЭ цельной крови (метод Хестрина). В первые сутки забор крови проводили из ушной артерии у 6 кошек, в последующие дни из бедренной вены — по 3 кошки в сутки и на дозу. Результаты приведены в табл. 6.

Согласно полученным результатам бизерин в испытанных дозах (1/8, 1/3 ЛД₅₀) сохраняет тормозящее влияние на кишечник кошек в течение нескольких суток, что недостижимо для прозерина и галантамина.

ВЫВОДЫ

1. Бизерин является уникальным ингибитором холинэстеразы из группы карбаматов: будучи третичным производным азота, не проникает в мозг и вызывает преимущественно длительное торможение холинэстеразы кишечника.

2. Бизерин во много раз менее токсичен, чем прозерин, аминостигмин и дистигмин.

3. По избирательности активации кишечника и широте терапевтического действия бизерин существенно превосходит прозерин и дистигмин.

ЛИТЕРАТУРА

1. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, 15 изд., Т. 1 – 2, “Новая волна”, Москва (2005).
2. Л. В. Павлова, В. Б. Прозоровский, И. М. Суслова, А. Я. Кокушкина, *Хим.-фарм. журн.*, **3**(7), 56 (1999).
3. В. Б. Прозоровский, *Токсикол. вестник*, № 1, 28 – 32 (1988).
4. J. H. Gaddum, *Pharmacol. rev.*, № 9, 211 – 218 (1957).
5. A. Funke, F. Depierre, and M. Krucker, *Comp. rend. Acad. Sci. Paris*, **234**(7), 762 – 768 (1952).
6. E. Herzfeld, et al., *Wein. klin. Wschr.*, **69**(14), 245 – 248 (1957).

Поступила 07.09.09

BIZERINE: NEW ANTICHOLINESTERASE DRUG WITH SELECTIVE GASTROINTESTINAL ACTION

V. B. Prozorovskii, L. V. Pavlova, I. M. Suslova, A. V. Sazonova, and N. I. Shchemeleva

Scientific Research Institute of Military Medicine, Ministry of Defense of Russian Federation, ul. Lesoparkovaya, 4, S. Petersburg, 194045, Russia

Bizerine – oxalate of hexamethylene-bis-[N-methylcarbamoyl acid-3-(2-dimethylaminomethyl)pyridyl ether] exhibits the properties of acetylcholine esterase (AChE) inhibitor, being comparable in this respect in *in vitro* tests to aminostigmine. Bizerine is 2.5 and 6.7 times less active in these tests than proserine and distigmine, respectively, but it forms more stable complex with the enzyme. Bizerine is 10 – 80 times less toxic for laboratory mammals as compared to proserine; it is 3 – 60 times more active on the isolated urinary bladder of rats, but it is 100 – 500 times less effective on the spinal muscle of leeches and skeletal muscles of mice and rats. Bizerine actively inhibits intestinal cholinesterase (ChE) of guinea pigs. In systematic use, it does not inhibit brain ChE of mice. Bizerine is a prolonged peripheral muscarinic potentiating inhibitor of ChE and activator of intestinal peristalsis.

Key words: Bizerine, carbamate bis-ammonium symmetric ChE inhibitors, tertiary ChE inhibitors, toxicity of ChE inhibitors, stimulation of intestinal peristalsis