



УДК 615.2/3.015.4

Н.Д. ТАГАНОВИЧ, В.В. СЕНЧУК, В.П. КУРЧЕНКО, А.С. ЗАХАРЕВСКИЙ

МЕХАНИЗМЫ БИОТРАНСФОРМАЦИИ МИОРЕЛАКСАНТА КРАТКОСРОЧНОГО ДЕЙСТВИЯ ДИТОЛОНИЯ

The results of the study of short-termed active myorelaxant dytolony show the major role of liver hydroxylating system in possible mechanisms of biotransformation and decrease of its pharmacological activity. Among the possible biotransformation mechanisms, leading to the loss of myorelaxing properties of dytolony, the major role belongs to the N-dealkilating reactions. Non-specific acetylcholinesterase and other blood proteins are not involved in biotransformation of dytolony in conditions examined.

В лабораториях кафедры органической химии БГУ и кафедры фармакологии Минского мединститута на протяжении уже нескольких лет ведется изыскание высокоэффективных миорелаксирующих средств. Наиболее активным и перспективным для последующего изучения и возможного клинического применения признан дитолоний.

Экспериментальные фармакокинетические исследования дитолония определяются особенностями его циркуляции в организме. Изучение основных фармакокинетических процессов всасывания, распределения, биотрансформации и экскреции дитолония осложнены быстрым достижением и прекращением его фармакологического действия при внутривенном введении. Такое действие препарата обусловлено несколькими причинами. Во-первых, дитолоний, попадая в кровеносное русло, может расщепляться неспецифической ацетилхолинэстеразой крови или прочно связываться с компонентами крови, в первую очередь с альбумином, что снижает его фармакологический эффект. Другой причиной может быть ускоренная биотрансформация дитолония гидроксiliрующей системой печени.

С целью проверки этих предположений нами изучено влияние дитолония на активность ацетилхолинэстеразы крови, а также возможность изменения миорелаксирующих свойств препарата после его обработки сывороткой, плазмой и цельной кровью кроликов. Предпринято также исследование миорелаксирующих свойств дитолония после биотрансформации микросомальной системой окисления печени кроликов в условиях *in vitro* и фармакологического действия дитолония у животных с индуцированной фенobarбиталом натрия системой метаболизма ксенобиотиков.

Материал и методика

Микросомальную фракцию получали по общепринятой методике [1] из печени кроликов породы Шиншилла весом 2,5–3,0 кг.

В качестве индуктора микросомальной гидроксiliрующей системы использовали фенobarбитал натрия, водный раствор которого вводили внутрибрюшинно в дозе 50 мг/кг веса животных 1 раз в сутки на протяжении 5 сут.

При гидроксiliровании анилина инкубационная смесь содержала 0,05 М трис-HCl буфер, pH 7,54, 0,006 М $MgCl_2$, 0,001 М НАДФН, микросомальный белок в концентрации 0,8–1,6 мг/мл и 0,001 М анилина.

Реакцию начинали добавлением НАДФН и останавливали 30%-ной трихлоруксусной кислотой. Денатурированный белок осаждали центрифугированием при 2000 g в течение 10 мин. В супернатанте анализировали содержание *n*-аминофенола. Образующийся в процессе гидроксiliрования анилина *n*-амино-

фенол анализировали по методу [2]. К 3 мл супернатанта приливали 1 мл 1М Na_2CO_3 , встряхивали и добавляли 1 мл 2%-ного раствора фенола в 0,5 М NaOH . Смесь встряхивали и инкубировали при 30°C 60 мин. Величину оптической плотности при 630 нм измеряли прибором "Spekol ZV" (ГДР).

Опыты по исследованию окислительного N-деметилирования диметиланилина (ДМА) проводили в том же буфере, содержащем 0,08 М MgCl_2 , 0,5–1,0 мг/мл микросомального белка и 0,001 М ДМА. Реакцию начинали добавлением 0,001 М НАДФН и останавливали смесью равных объемов насыщенного раствора гидрата окиси бария и 25%-ного раствора сульфата цинка. Смесь центрифугировали при 5000 g 10 мин и в супернатанте определяли концентрацию формальдегида. Анализ формальдегида проводили по методике из [3]. К 1 мл супернатанта приливали равный объем реактива Nash (150 мл ацетата аммония, 0,6 мл ледяной уксусной кислоты и 0,4 мл ацетилацетона в 1000 мл раствора). Смесь термостатировали при 30°C 60 мин и измеряли оптическую плотность при 412 нм на приборе "Spekol ZV" (ГДР).

Спектральные анализы проводили на приборе "Spekord UV VIS" (ГДР). Концентрацию цитохрома Р-450 определяли методом, описанным в [4], по разностному спектру восстановленной формы с CO , используя коэффициент экстинкции, равный $91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, для разницы оптической плотности при 450 нм и 490 нм.

Активность НАДФН-цитохром Р-450 редуктазы определяли при 30°C по скорости восстановления цитохрома С, за концентрацией которого следили спектрофотометрически по изменению поглощения при 550 нм. Инкубационная смесь объемом 3 мл содержала 0,3 М трис- HCl буфер (рН 7,7), 50 мкМ цитохрома С и редуктазу. Реакцию начинали добавлением в кювету 100 мкМ НАДФН. При расчетах использовался коэффициент молярной экстинкции цитохрома С, равный $18,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [1].

Активность ацетилхолинэстеразы определяли по скорости гидролиза ацетилхолина [5].

Исследования миорелаксирующей активности дитолония проводили на кроликах по тесту "симптом склонения головы" (ССГ). Анализируемое соединение вводили внутривенно в виде 0,01%-ных растворов со скоростью 0,1 мл за 15 с [6].

Результаты и их обсуждение

На рис.1 представлена формула триметиламмонифенильная группировка дитолония, определяющая фармакологическую активность препарата. Стрелками указаны места возможного ее метаболизма. Дитолоний относится к миорелаксантам краткосрочного действия. Одним из возможных факторов, определяющих продолжительность нервно-мышечного блока, являются его ферментативные превращения под влиянием неспецифической холинэстеразы (КФ 3.1.1.8) и других ферментов крови. Выяснение возможности участия холинэстеразы крови в метаболизме дитолония проводилось двумя путями. Во-первых, оценивалось его влияние на активность холинэстеразы в условиях *in vitro*. Во-вторых, был предпринят ингибиторный анализ дитолонием активности холинэстеразы.

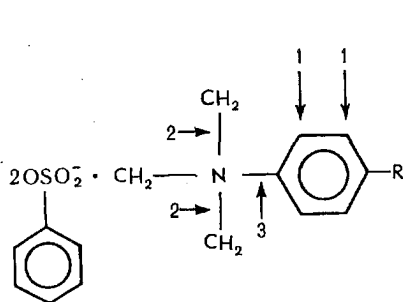


Рис.1. Ингибирование гидролиза ацетилхолина дитолонием

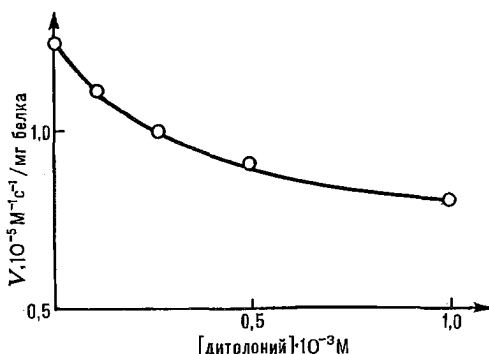


Рис.2. Возможные пути окисления триметиламмонифенильной группировки дитолония. Стрелками указаны места возможных реакций (пояснения в тексте)

Активность холинэстеразы (ХЭ) в крови кроликов определялась до введения дитолония по достижении миорелаксирующего эффекта и через 10 мин после его завершения (табл.1). Полученные результаты свидетельствуют о том, что

введение дитолония в дозах, вызывающих миорелаксирующий эффект, не приводит к изменению активности ХЭ крови.

Таблица 1

Активность холинэстеразы крови кролика при введении водного 0,01%-ного раствора дитолония со скоростью 0,1 мл/15 с	
Серии опытов (n=3)	Скорость гидролиза ацетилхолина вс·10 ⁻⁴ М, мин /мг
До введения дитолония	1,06±0,01
При миорелаксирующем эффекте	1,09±0,01
После восстановления нервно-мышечной проводимости (на 10-й минуте)	1,07±0,01

В условиях *in vitro* ингибирование холинэстеразной реакции плазмы крови кроликов достигалось лишь при концентрациях $5 \cdot 10^{-4} - 10^{-3}$ М (рис.2), что свидетельствует о низкой эффективности взаимодействия миорелаксанта с холинэстеразой и, вероятно, неэффективной ее роли в биотрансформации дитолония. К аналогичному выводу приходят и другие исследователи, изучавшие эту группу миорелаксантов [6].

Инкубация дитолония с цельной кровью, сывороткой или плазмой крови кроликов в течение 45 мин с последующим обратным внутривенным введением инкубационной смеси в организм экспериментальных животных не оказывает влияния на дозу препарата, необходимую для достижения симптома склонения головы (табл.2).

Таблица 2

Миорелаксирующая активность дитолония (0,01%-ный раствор), приготовленного на плазме, сыворотке и цельной крови кролика и подвергнутого инкубации при температуре 37°С в течение 30 мин	
Дитолоний 0,01%-ный раствор	Доза, вызывающая симптом склонения головы у кроликов (мг/кг)
Водный раствор	0,061
Цельная кровь	0,057
Плазма крови	0,055
Сыворотка крови	0,058

Полученные результаты свидетельствуют о том, что другие ферментные системы детоксикации лекарственных препаратов играют ключевую роль в продолжительности действия дитолония. Предполагаем, что метаболизм дитолония осуществляется гидроксилирующими системами печени, легких и почек.

Для выяснения возможности участия микросомальной гидроксилирующей системы печени в окислении дитолония в положениях 1, 2, 3 были проведены две серии опытов *in vivo*. В первой серии исследовалась миорелаксирующая активность дитолония по симптому склонения головы у кроликов, получавших фенobarбитал натрия. Во второй – кроликам вводился препарат дитолония, предварительно окисленный в присутствии НАДФН микросомами печени кроликов.

Хорошо известно, что введение животным полициклических ароматических углеводородов или барбитуратов вызывает индукцию ферментов монооксигеназной системы окисления печени, легких, почек. При этом барбитураты неспецифически повышают окислительный метаболизм практически всех липидорастворимых ксенобиотиков, в том числе и большинства лекарственных веществ. Осуществляется этот ускоренный метаболизм за счет роста удельного содержания различных форм цитохрома Р-450 [5,6,7].

Предполагалось, что основной процесс биотрансформации дитолония и снижения миорелаксирующей активности связан с его окислением монооксигеназной системой окисления печени. При таком допущении введение кроликам, получавшим фенobarбитал натрия, дитолония в дозе, необходимой для достижения миорелаксирующего действия, не должно вызывать этого эффекта, так как препарат будет быстро метаболизирован и в крови не будет его достаточной концентрации для достижения фармакологического эффекта.

В табл.3 представлены результаты опыта по индукции монооксигеназной системы печени фенobarбиталом натрия. У кроликов, получавших внутрибрюшинно в течение 5 дней фенobarбитал натрия в дозе 50 мг/кг массы, наблюдалось более чем 4-кратное увеличение цитохрома Р-450 в расчете на мг микро-

сомального белка и трехкратный рост активности НАДФН-цитохром С редуктазы. Такие изменения в составе белков системы микросомального окисления печени привели к значительному росту гидроксилазной и деметилазной активности, наблюдаемым при окислении анилина и диметиланилина.

Таблица 3

Индукрующий эффект фенобарбитала в микросомах печени кроликов

Микросомы кроликов	Цитохром Р-450, нмоль/мг белка	Активность НАДФН- цитохром С редуктазы, нмоль цитохрома С, восстановленного в 1 мин / 1 мг белка	Скорость N-деметилирования, нмоль НСНО в 1 мин / 1 мг белка	Скорость гидрокс- илирования анилина, нмоль л-аминофенола в 1 мин / 1 мг белка
Интактные	0,55	107,0	1,7	0,7
ФБ-индуцированные	2,36	340,0	5,4	1,27

Введение дитолония кроликам, получавшим фенобарбитал натрия, приводило практически к полной потере его миорелаксирующего действия вплоть до дозы 10 мг/кг при длительности введения 20 мин. Полученные данные подтверждают предположение о том, что деметилазная и (или) гидроксилазная ферментативная активность цитохрома Р-450 определяют окисление дитолония путями 1, 2 и приводят к ускорению этого процесса в печени не только у животных, получавших фенобарбитал натрия, но и у контрольных кроликов.

Во второй серии опытов дитолоний окислялся в присутствии НАДФН 30 мин при 30°C в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4) микросомами печени кроликов, индуцированных фенобарбиталом, и потом вводился внутривенно кроликам для выявления миорелаксирующего действия его метаболитов. Из полученных результатов следует (табл.4), что в присутствии НАДФН происходит биотрансформация дитолония микросомами печени, ведущая к резкому повышению дозы, необходимой для его фармакологического действия. Таким образом, подтвердилось предположение о ключевой роли монооксигеназной системы окисления в метаболизме дитолония.

Таблица 4

**Миорелаксирующая активность дитолония
(0,01%-ного водного раствора, скорость введения 0,1 мл за 15 с),
окисленного микросомами печени**

Серии опытов (n=3)	Симптом склонения головы (X+Sx)	
	ЭД (мг/кг, в/в)	длительность (мин)
Дитолоний	0,072±0,003	7,7±0,1
Дитолоний с микросомами	0,073±0,003	7,7±0,1
Дитолоний с микросомами и НАДФН	В объеме 5 мл не вызывает симптома склонения головы	

Анализ возможных путей окисления дитолония монооксигеназной системой окисления печени показывает, что реакции гидроксилирования ароматических колец (путь 1) не должны существенно менять характер миорелаксирующего действия [8].

Быстрая потеря фармакологической активности дитолония в результате биотрансформации микросомальной системой окисления может быть связана с реакцией N-деметилирования (путь 2), в результате которого образуется формальдегид. Нами определена скорость образования формальдегида при окислении дитолония в присутствии микросом печени кролика и НАДФН. Процесс окисления имел оптимум рН 7,2 и зависел от концентрации НАДФН и белка микросом печени кролика. В оптимальных условиях протекания реакции скорость деметилирования дитолония составила $1,5 \cdot 10^{-8}$ М, мин/мг белка микросом. Полученная скорость реакции близка с скоростям отщепления метильных групп у диметиланилина (2,5) и ряда других аминов [6]. Эти результаты свидетельствуют о протекании достаточно эффективного процесса деалкилирования дитолония в условиях *in vitro*. В этих условиях возможно протекание и других реакций окислительного деалкилирования и гидроксилирования [8,9].

В метаболических превращениях дитолония кроме цитохрома Р-450 могут принимать участие и другие гемопротеины: гемоглобин, иод-пероксидаза, простагландинсинтаза, способные вести реакции пероксидазного окисления в присутствии различных гидроперекисей. Эти гемопротеины находятся в различных тканях: в клетках крови, щитовидной железе, легких, почках и др. Для выявления возможного вклада пероксидазного окисления в метаболизм дито-

лония было проведено его окисление пероксидазой хрена (10^{-9} М) в присутствии гидроперекиси водорода (10^{-3} М) в 0,1 М цитратно-ацетатном буфере pH 5,5 с последующим определением миорелаксирующей активности продуктов реакции. Эффективная доза введенного препарата была равна дозе дитолония, полученной без его окисления. Экспериментальные данные позволяют заключить, что пероксидазное окисление не играет существенной роли в снижении фармакологического эффекта дитолония.

Проведенные исследования показывают, что дитолоний в ходе биотрансформации претерпевает изменения, в первую очередь посредством монооксигеназной системы окисления, ведущей к снижению его фармакологической активности.

Выводы

1. Гидроксилазная система окисления печени играет ключевую роль в биотрансформации дитолония и приводит к потере его фармакологической активности.

2. Реакции N-деметилирования дитолония являются важнейшим звеном его метаболизма.

3. Длительное введение больших доз барбитуратов снижает или полностью предотвращает фармакологическое действие дитолония в экспериментах на животных.

4. Пероксидазное окисление дитолония гемопротеинами и ацетилхолинэстераза крови не оказывают влияния на эффективность фармакологического действия дитолония.

Авторы выражают благодарность Л.С.Станишевскому за участие в обсуждении результатов работы.

1. Современные методы в биохимии / Ред. В.Н. Орехович. М., 1979. С.391.
2. Fujita T., Mannering G. // J. Biol. Chem. 1973. V.248. №24. P.8150.
3. Nash J. // Biochem. J. 1953. V.55. №3. P.416.
4. Omura T., Sato R. // J. Biol. Chem. 1964. V.249. №8. P.2370.
5. Hestrin J. // Biol. Chem. 1949. V.180. P.249.
6. Новые миорелаксанты / Под ред. Д.А.Харкевича М.: Медицина, 1983.
7. Метелица Д.И. Активация кислорода ферментными системами М., 1982.
8. Ляхович В.В., Цырлов И.Б. Индукция ферментов метаболизма ксенобиотиков. Новосибирск, 1981.
9. Лакин К.М., Крылов Ф.Ф. Биотрансформация лекарственных веществ М., 1981.
10. Головенко Н.Я. Механизм реакций метаболизма ксенобиотиков в биологических мембранах. Киев, 1981.

Поступила в редакцию 01.02.96.

УДК 579.841.11

А. ЭЛЬГАММУДИ (Ливия), А.М. КУЛЬБА.

КОНСТРУИРОВАНИЕ ПЛАЗМИДНОГО ВЕКТОРА ДЛЯ БАКТЕРИЙ AEROMONAS

The vector for cloning in bacteria *Aeromonas* was constructed on the base cryptic plasmid pAh372. 5,6 kb vector have kanamycin resistance gene as a selective marker and contain unical site for BgIII, Bsp119I, EcoRI, Eco147I, NdeI, PvuII, SspI, XhoI.

К настоящему времени разработано большое количество векторных систем, как универсальных, пригодных для клонирования генов в различных бактериальных системах, так и специализированных, т.е. использующихся только в определенной системе. Бактерии *Aeromonas* в молекулярно-генетическом плане изучены относительно слабо, одной из причин чего явилось отсутствие пригодных для них клонирующих векторов. Имеется лишь одно сообщение, в котором предлагается использовать в качестве потенциального вектора криптическую плазмиду pAER207 бактерий *A. hydrophila* размером 26 т.п.н. [1].

В настоящей работе предпринята попытка создания клонирующего вектора для бактерий рода *Aeromonas* с использованием идентифицированных у них плазмид.

Материал и методика

В работе использовали 52 штамма бактерий *Aeromonas*, выделенных из природных источников, и штамм *E. coli* DH-5. Для культивирования бактерий применяли полноценную среду, а также минимальную среду M9 [2].

Скрининг бактерий на наличие плазмид осуществляли по методу [3]. Плазмидную ДНК выделяли методом "кипячения" [4]. Обработку ДНК рестриктазами