

РОЛЬ МЕТАБОЛИТОВ МУСКАРИНОВОГО АНТАГОНИСТА МЕТАЦИНА В РЕГУЛЯЦИИ ВОСПАЛЕНИЯ

Член-корреспондент РАМН САПРОНОВ Н. С., НЕЖИНСКАЯ Г. И.,
ВЛАДЫКИН А. Л.

ГУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН»,
Санкт-Петербург

Сапронов Н. С., Нежинская Г. И., Владыкин А. Л. Роль метаболитов мускаринового антагониста метацина в регуляции воспаления // Мед. акад. журн. 2009. Т. 9. № 1. С. 28–32. ГУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН», Санкт-Петербург, 197376, ул. Академика Павлова, 12

Известно, что синтетические мускариновые антагонисты ипратропия бромид, тропсия хлорид и оксибутинина гидрохлорид, образуя фармакологически неактивные метаболиты, имеют незначительное количество побочных эффектов, по сравнению с мускариновыми антагонистами, метаболиты которых обладают фармакологической активностью. На модели четвертичного мускаринового антагониста метацина показано, что его метаболизм может проходить с разрывом сложноэфирной связи и образованием фармакологически неактивной 2-гидрокси-2,2-дифенилуксусной кислоты и фармакологически активного холина, который, как известно, является агонистом м- и н-холинорецепторов. Курсовое применение метацина способствует усилению его мускаринолитических эффектов, что связано с увеличением побочных эффектов. Однако однократное применение его с антихолинэстеразным препаратом является эффективным приемом предупреждения патохимической стадии анафилактического шока, а инициация метацином иммунного ответа (ненервные эффекты) приводит к снижению образования стрессовых язв при воздействии водоиммерсионного стресса. Полученные данные могут иметь значение для понимания механизма действия новых мускариновых антагонистов и возможности использования активности метаболитов в терапевтических целях.

Ключевые слова: мускариновый антагонист метацин, мускариновый и никотиновый агонист холин, анафилактический шок, водоиммерсионный стресс, В-лимфоциты.

Sapronov N. S., Nezhinskaya G. I., Vladykin A. L. Role of muscarinic antagonist methacine metabolites in regulation of inflammation // Med. Acad. Journ. 2009. Vol. 9. № 1. P. 28–32. Research Institute of Experimental Medicine of the RAMS, St. Petersburg, 197376.

It is known, that synthetic muscarinic antagonists ipratropium bromide, tropium chloride, oxybutynin chloride form pharmacologically inactive metabolites and have slight side effects compared with muscarinic antagonists, which metabolites possess pharmacological activity. On the model of the quaternary muscarinic antagonist methacine we revealed that this drug undergoes hydrolysis at the ester bond to yield pharmacologically inactive 2-hydroxy-2,2-diphenylacetic acid and pharmacologically active muscarinic/nicotinic cholinergic agonist choline. Long-term course administration of methacine increases its antimuscarinic effects, connected with side effects extension. However single administration of methacine with cholinesterase inhibitor is an effective procedure to pathochemical stage of anaphylactic shock prevention. Methacine-induced immune response (non-neuronal effects) limits stress ulcer formation under water immersion stress influence. Obtained data may be significant for mechanism of new muscarinic antagonists action understanding and for scope evaluation of drug metabolites activity therapeutic application.

Key words: muscarinic antagonist methacine, muscarinic and nicotinic agonist choline, anaphylactic shock, water immersion stress, B-lymphocytes.

Хорошо известно, что терапевтическую эффективность мускариновых антагонистов, показания к применению и частоту побочных эффектов, определяют кинетика взаимодействия препаратов с холинорецепторами разных подтипов, а также свойства их метаболитов [15]. Один из путей метаболизма антагонистов м-холинорецепторов, в химической структуре которых фармакоформные группы связаны сложноэфирной связью, может протекать по гидролитическому механизму с участием эстераз крови и печени [22]. Таким образом подвергается гидролизу синтетический четвертичный мускариновый антагонист ипратропия бромид, который является структурным аналогом алкалоида атропина. Он образует

фармакологически неактивные N-изопропилтропин, тропин и фенилгликолевую кислоту, имеет короткий период полураспада (1,6 часа) и минимальное проникновение в системный кровоток [20]. Метаболизм тропсия хлорида и оксибутинина гидрохлорида, являющихся производными фенилгликолевой кислоты, также протекает с разрывом сложноэфирной связи и образованием фармакологически неактивных дифенилгликолевой и фенилциклогексилгликолевой кислот [14]. Очевидно, что мускариновые антагонисты, метаболизм которых связан с разрывом сложноэфирной связи и образованием неактивных метаболитов, обладают меньшим числом побочных эффектов. Вполне вероятно, что использование дейс-

твия активного метаболита наряду с действием основного препарата может оказаться фармакологически эффективным приемом профилактики и терапии. Применение в качестве модели гидролиза по сложноэфирной связи мускаринового антагониста метацина (периферические эффекты), представляющего собой в химическом отношении [2-(бензилоилокси)этил]триметиламмония йодид и являющегося сложным эфиром бензиловой кислоты и холина [3], позволяет показать возможность с образованием фармакологически неактивной бензиловой кислоты и активного холина, который, как известно, является агонистом м- и н-холинорецепторов [9].

Целью работы являлось изучение метаболизма метацина, связанного с разрушением сложноэфирной связи в молекуле препарата, для оценки фармакологической активности его составляющих структур.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на крысах-самцах линии Вистар ($n=10$) массой 180–200 г, полученных из питомника «Рапполово» РАМН. Метацин (2 мг/кг) вводили однократно, внутривенно в 0,5 мл физиологического раствора. Крыс декапитировали через 30, 60, 90, 120 и 150 мин после инъекции препарата и получали плазму крови (центрифугирование гепаринизированной крови при 3000 об/мин в течение 10 мин).

Идентификацию метацина в плазме крови проводили методом жидкостной хроматографии высокого давления (ЖХВД). Плазму крови (1 мл) доводили до pH 10–11,25% раствором гидроксида аммония и экстрагировали 10-кратным объемом хлороформа (двукратно). Объединенный органический экстракт высушивали под потоком воздуха и получали сухой остаток щелочного хлороформного извлечения [11]. Полученные сухие остатки растворяли в элюенте и хроматографировали с использованием подвижной фазы ацетонитрил:фосфатный буфер (pH 3,5) в соотношении 55:45 на жидкостном хроматографе «Shimadzu-10A» (Япония), оснащенном УФ-детектором LC-10A с переменной длиной волны, коллектором фракций 440-LC и системным контроллером SCL-10AVP [19]. Хроматографическое разделение проводили на колонке Nucleosil C18 (150x4.6 мм, зернение 5 мкм) (Россия) при длине волны детектора 252, 258 и 264 нм. Скорость потока подвижной фазы составляла 1 мл/мин. Идентификацию метацина проводили, сравнивая время удерживания и УФ-спектры пробы с теми же параметрами внешнего стандарта. В качестве внешнего стандарта использовали метацин (Россия), который растворяли в подвижной фазе с концентрацией 0,1 мг/мл и хроматографировали в тех же условиях.

Наличие 2-гидрокси-2,2-дифенилуксусной кислоты в плазме крови определяли в кислом хлороформном извлечении. Для этого 1 мл плазмы крови подкисляли концентрированной хлористоводородной кислотой, доводя до pH 2, и также экстрагировали плазму дважды 10-кратным объемом хлороформа. Из объединенного органического экстракта получали сухой остаток кислого хлороформного извлечения [11]. Подтверждение структуры 2-гидрокси-2,2-дифенилуксусной кислоты осуществляли хромато-масс-спектрометрическим методом [17]. Для этого сухой остаток растворяли в 50 мкл этилацетата и записывали масс-спектр на хромато-масс-спектрометре Agilent 6890N (Agilent Technologies, США) с применением капиллярной колонки HP-5 MS с внутренним диаметром 0,25 мм и длиной 30 м. Температура колонки программировалась от 60 °C до 290 °C. Температура инжектора составляла 270 °C; температура интерфейса – 290 °C. В качестве газа-носителя использовали гелий со скоростью потока 1 мл/мин. Температура источника масс-селективного детектора с квадрупольным анализатором масс Agilent 5973N составляла 230 °C, энергия ионизации – 70 эВ. Полученные данные сравнивали с известными данными по хромато-масс-спектрометрическому анализу 2-гидрокси-2,2-дифенилуксусной кислоты (AIST: RIO-DB Spectral Database for Organic Compounds; http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi).

Количество антителообразующих клеток (АОК на 10^6 спленоцитов) определяли методом Jerne et al. [16] на модели первичного иммунного ответа: до иммунизации и на 5, 14, 21, 28-е сут после иммунизации крыс эритроцитами барана (10^8 эритроцитов на крысу). Препараты, мускариновый антагонист периферического действия метацин (2 мг/кг) или мускариновый и никотиновый агонист центрального действия холина альфосцерата (90 мг/кг) – вводили крысам однократно (внутрибрюшинно) одновременно с иммунизацией эритроцитами барана. Контролем служили крысы, иммунизированные эритроцитами барана и получившие физиологический раствор.

Результаты представлены в виде УФ- и масс-спектров, а оценки антителогенеза – в виде значения величины \pm SEM. Статистическую обработку материалов проводили с использованием t-критерия Стьюдента при помощи пакета программ «STATISTICA 6.0». Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация метацина в плазме крови методом ЖХВД показала, что максимумы его поглощения соответствуют диапазону длин волн детектора 252, 258 и 264 нм. Полученные данные согласуются с известными максимумами поглощения метацина (ще-

лочное хлороформное извлечение плазмы крови) [2]. На хроматограммах, полученных через 30, 60, 120 и 150 мин после введения метацина, определяется пик, хорошо отделяющийся от несорбируемых компонентов плазмы (время удерживания 3,260 мин). На хроматограммах внешнего стандарта метацина, снятых в тех же условиях, наблюдался пик вещества (время удерживания 3,257 мин). Правильность идентификации метацина подтверждалась также УФ-спектрами внешнего стандарта метацина, записанными во время хроматографии (после остановки потока), и пика, выявляемого на хроматограммах образцов плазмы крови крыс, получавших метацин. Как видно из рис. 1, нормированные УФ-спектры этих веществ полностью совпадали.

Таким образом, полученные данные показывают, что на хроматограммах, полученных с помощью ЖХВД, пик щелочного хлороформного извлечения плазмы крови крыс соответствует метацину.

Масс-спектрометрия кислого хлороформного извлечения плазмы крови крыс (через 40–60 мин), получавших метацин, показала, что в масс-спектре электронного удара этого соединения (рис. 2) не наблюдается пик молекулярного иона 2-гидрокси-2,2-дифенилуксусной кислоты с отношением массы к заряду (m/z) 228. Основные по интенсивности осколочные ионы масс-спектра представлены ионами с m/z 105 (100%), 183 (95,3%), 77 (68,1%), 51 (18,6%). На основе анализа данных о закономерности распада молекул карбоновых кислот при электронном ударе, свидетельствующих о том, что осколочному иону с m/z 105 соответствует состав $[C_6H_5CO]^+$, иону с m/z 183 – $[(C_6H_5)_2COH]^+$ [17], можно предположить,

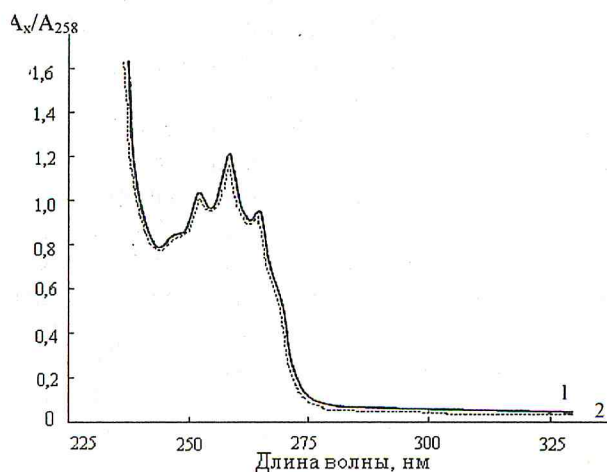


Рис. 1. Спектр поглощения метацина в плазме крови крыс, получивших препарат, по сравнению со стандартом.

Метацин (1) вводили за 1 час до взятия пробы; в исследование взят элюируемый при жидкостной хроматографии сухой остаток щелочного хлороформного извлечения плазмы крови крысы; A_x/A_{258} – поглощение элюируемого раствора метацина по отношению к стандарту (2) – 2% раствор метацина

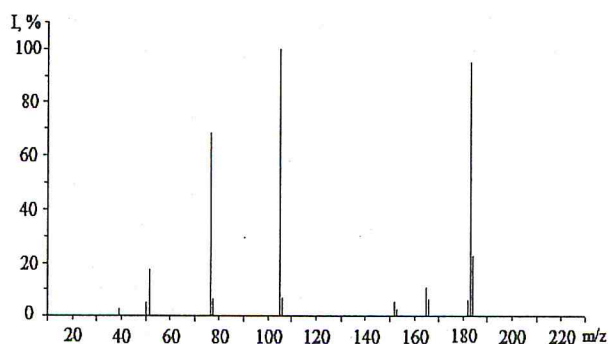


Рис. 2. Масс-спектр кислого хлороформного извлечения плазмы крови у крыс, получивших метацин

что их наличие в идентифицируемом спектре доказывает структуру 2-гидрокси-2,2-дифенилуксусной кислоты. Образование осколочных ионов с m/z 77 – $[C_6H_5]^+$ и m/z 51 – $[C_4H_3]^+$ является характерным для соединений, содержащих фенильный радикал [17]. Сравнение масс-спектра идентифицированной 2-гидрокси-2,2-дифенилуксусной кислоты с известными данными в открытой базе спектров органических соединений показало совпадение спектров на 97%.

Таким образом, состав установленных осколочных ионов подтверждает структуру 2-гидрокси-2,2-дифенилуксусной кислоты. Очевидно, что гидролиз метацина протекает с разрывом сложноэфирной связи и образованием фармакологически неактивной 2-гидрокси-2,2-дифенилуксусной кислоты и фармакологически активного холина.

В эксперименте на модели анафилактического шока у морских свинок показано, что применение метацина и антихолинэстеразного препарата неостигмина (за 40 и 15 мин до шока, соответственно) предупреждало развитие патохимической стадии шока. Анафилактический индекс реакции по четырехплюсовой системе Weigle составлял $0,4 \pm 0,01$ балла, в контроле – $4,0 \pm 0,0$ балла [18]. Можно предположить, что при введении легкометаболизирующегося метацина прессорный эффект холина, сопровождающийся блокадой м-холинорецепторов метацином, может объясняться усилением центральной и периферической холинергической нейротрансмиссии, которая, как известно [10], приводит к активации симпатoadреналовой системы и выбросу в кровеносное русло адреналина, норадреналина, вазопрессина, предупреждая таким образом брадикардию и отек легких. Известно, что холин проникает через гематоэнцефалический барьер в ЦНС как в нативном виде, так и в фосфолипидной форме (возможно, в виде фосфатидилхолина) [7], регулируя таким образом активность симпатoadреналовой системы в ЦНС и оказывая влияние на нервные структуры на периферии, в частности на лимфоциты. Оценка иммуотропного действия мускаринового антагониста метацина или мускаринового и никотинового аго-

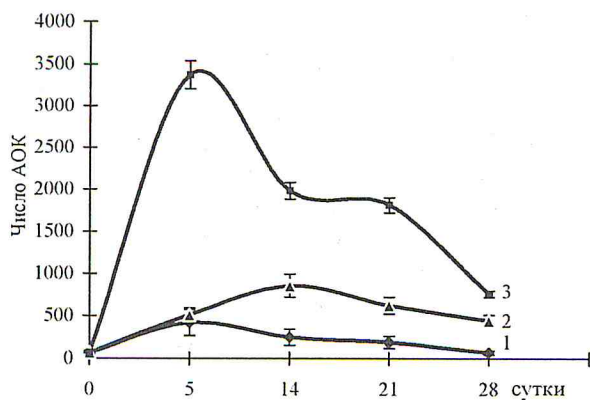


Рис. 3. Динамика антителогенеза спленоцитов крыс после введения препаратов.

Крыс иммунизировали эритроцитами барана и одновременно вводили в контроле (1) физиологический раствор, в опыте – метацин (2) или холина альфосцерат (3)

ниста холина альфосцерата (центральные эффекты), связанная с их влиянием на антителопродуцирующую функцию В-лимфоцитов, показала (рис. 3), что метацин увеличивает антителогенез при системном иммунном ответе (14-е сут после иммунизации и введения препарата), холина альфосцерат – при локальном его ответе (5-е сут). Вполне возможно, что ненервные эффекты метацина, вызванные блокадой м-холинорецепторов неиннервируемых клеток, в частности лимфоцитов, будут проявляться в блокировании развития иммунного ответа, предупреждая таким образом участие В-лимфоцитов в развитии анафилактической реакции. Подтверждается тем, что введение мускаринового агониста ацеклидина (периферические эффекты) приводит к существенному увеличению антителогенеза на 5-е сут после иммунизации и инъекции препарата [1], приводя к протектированию анафилаксии, связанному с увеличением агонального периода с 2 мин в контроле до 5 мин после применения препарата [4]. Также возможно, что стимуляция В-лимфоцитов холином, образующимся в результате метаболизма метацина, на фоне блокады их антителопродуцирующей функции (метацином) будет сопровождаться отсроченным развитием антителогенеза, таким образом снижая развитие стадии сенсibilизации при развитии анафилактического шока. Эти предположения требуют дальнейшего изучения. Кроме того, метацин, блокируя мускариновые рецепторы висцеральных органов, устраняет нежелательные побочные эффекты со стороны дыхательных путей (бронхоконстрикция) и сердца (брадикардия). Усиление только мускаринолитического действия (введение метацина за 30 или 40 мин до индукции шока) мало влияло на развитие анафилаксии [5]. Косвенно это подтверждается тем, что альтернативный метаболический путь N-деалкилирования оксибутина гидрохлорида, в котором

принимают участие цитохромом CYP3A4, приводит к образованию N-деэтилоксибутина, являющегося мускариновым антагонистом, который, наряду с высокой активностью оксибутина гидрохлорида, обуславливает относительно высокую частоту возникновения побочных эффектов, по сравнению с тропия хлоридом, не образующим активных метаболитов [12]. Множественность побочных эффектов, наблюдаемая при применении метацина: периферических – сухость во рту, тахикардия, дисфагия, запоры, задержка мочи, расширение зрачков, паралич аккомодации, повышение внутриглазного давления и др., центральных – влияние на психическую деятельность, – можно объяснить курсовым применением препарата, при котором преобладают мускаринолитические эффекты метацина. При появлении побочных эффектов предполагается увеличить интервал между введениями препарата или снизить его дозу [3]. Оценка ненейрональных эффектов антагонистов м-холинорецепторов, связанная с их влиянием на лимфоциты, позволяет учитывать иммунологическое звено патогенеза стрессовых язв. На модели водоиммерсионного стресса показано, что применение метацина за 14 сут (максимум антителообразующей активности В-лимфоцитов, инициированный введением метацина) до стресса лимитирует степень деструктивных поражений желудка, сопоставимую с эффектами блокады м-холинорецепторов, вызванными введением препарата за 30 мин до стресса [6]. Ненервные эффекты метацина могут являться важным компонентом в терапии и профилактике стрессовых язв, вызываемых травмой, хирургическим вмешательством, сепсисом [8].

Таким образом, хроматографическое и спектрометрическое исследование мускаринового антагониста метацина, являющегося сложным эфиром бензиловой кислоты и холина ([2-(бензилоилокс)этил]триметиламмония йодид), показало, что при разрыве сложноэфирной связи, начиная с 40–60-й мин, препарат образует два возможных метаболита – холин и 2-гидрокси-2,2-дифенилуксусную кислоту. Учитывая фармакологическую активность метаболита холина, который, являясь агонистом м- и н-холинорецепторов, будет влиять на холинергические механизмы воспаления, играющие, как известно [13], важную роль в терапии бронхиальной астмы, хронической обструктивной болезни легких, заболеваний желудочно-кишечного тракта и других заболеваний. Полученные данные могут также иметь значение для понимания механизма действия новых мускариновых антагонистов, являющихся производными диалкиламиноалкильных эфиров 2,2-дифенил-2-алкоксиуксусной кислоты и 2,2-дифенил-2-алкилтиоуксусной кислоты, которые, как показано [21], эффективны в терапии расстройств, связанных с дисфункцией холинергической системы.

Литература

1. Адо А.Д., Гольдштейн М.М., Кравченко С.А. Возможность взаимодействия β -адренергических и М-холинергических рецепторов на лимфоцитах мышей // Иммунология. 1996. №5. С. 71–72.
2. Лукьянчикова Г.И. Экстракционно-фотометрическое определение метацина // Фарм. журн. 1973. Т. 28. № 1. С. 49–54.
3. Машковский М.Д. Лекарственные средства. 15-е изд. М.: ООО «Новая Волна», 2007.
4. Нежинская Г.И., Назаров П.Г., Евдокимова Н.Р. и др. Холинергическая регуляция анафилактического шока: влияние С-реактивного белка // Цитокины и воспаление. 2004. Т. 3. № 1. С. 44–48.
5. Нежинская Г.И., Лосев Н.А., Назаров П.Г. и др. Влияние ацетилхолина и С-реактивного белка на регуляцию анафилактического шока у морских свинок // Экспер. и клин. фармакол. 2005. Т. 68. № 4. С. 49–52.
6. Нежинская Г.И., Лосев Н.А., Сапронов Н.С. Эффекты холинергических антагонистов при стрессе // Пат. физиол. и экспер. терапия. 2007. № 2. С. 12–13.
7. Allen D.D., Smith Q.R. Characterization of the blood-brain barrier choline transporter using the in situ rat brain perfusion technique // J. Neurochem. 2001. Vol. 76. P. 1032–1041.
8. Bhatia V., Tandon R.K. Stress and the gastrointestinal tract // J. Gastroenterol. Hepatol. 2005. Vol. 20. P. 332–339.
9. Cansev M., Yilmaz M.S., Ilcol Y.O. et al. Cardiovascular effects of CDP-choline and its metabolites: involvement of peripheral autonomic nervous system // Eur. J. Pharmacol. 2007. Vol. 577. № 1–3. P. 129–142.
10. Cavun S., Savci V., Ulus I.H. Centrally injected CDP-choline increases plasma vasopressin levels by central cholinergic activation. Fundam // Clin. Pharmacol. 2004. Vol. 18. P. 71–77.
11. Clarke's analysis of drugs and poisons; ed.3 / Moffat A.C., Osselton M.D., Widdop B., Galichet L.Y. (eds.). Pharmaceutical Press. 2004.
12. Epstein B.J., Gums J.G., Molina E. Newer agents for the management of overactive bladder // Am. Fam. Physician. 2006. Vol. 74. № 12. P. 2061–2068.
13. Goodman, Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics / Brunton L.L., Parker K.L., Blumenthal D.K., Buxton I.L.O. (eds.), 11th ed., McGraw-Hill, New York, 2008.
14. Guay D.R. Clinical pharmacokinetics of drugs used to treat urge incontinence // Clin. Pharmacokinet. 2003. Vol. 42. № 14. P. 1243–1285.
15. Huang F., Browne C.E., Wu W.M. et al. Design, pharmacokinetic, and pharmacodynamic evaluation of a new class of soft anticholinergics // Pharm. Res. 2003. Vol. 20. № 10. P. 1681–1689.
16. Jerne N., Henry C., Nordin A. et al. Plaque forming cells: methodology and theory // Transplant. Rev. 1974. Vol. 18. P. 130–191.
17. Mass spectrometry in medicinal chemistry / Wanner K.T. and Hofner G. (eds.). Wiley-Vch, Weinheim, 2007.
18. Nezhinskaya G.I., Vladykin A.L., Sapronov N.S. Cholinergic modulation of anaphylactic shock: plasma proteins influence // Life Sci. 2007. Vol. 80. P. 2342–2346.
19. Poole C.F. The essence of chromatography. Elsevier, Amsterdam, 2003.
20. Restrepo R.D. Use of inhaled anticholinergic agents in obstructive airway disease // Respir. Care. 2007. Vol. 52. № 7. P. 833–851.
21. Scapecchi S., Angeli P., Dei S. et al. SAR studies on the potent and selective muscarinic antagonist 2-ethylthio-2,2-diphenylacetic acid N,N-diethylaminoethyl ester // Arch. Pharm. (Weinheim). 1997. Vol. 330. № 5. P. 122–128.
22. Testa B., Mayer J.M. Hydrolysis in drug and prodrug metabolism. Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich, Switzerland, 2003.