



УДК 577.15.0.253

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЭЗЕРИНА И БАЙГОНА С
АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗой МОЗГА МЫШЕЙ
IN VIVO И IN VITROБАЛАШОВА Е. К., КУГУШЕВА Л. И.,
РОЗЕНГАРТ В. И., ШЕРСТОБИТОВ О. Е.Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова
АН СССР, Ленинград

Установлено, что при внутрибрюшинном введении мышам карбаматов эзерина и байгона в максимально переносимой дозе развивается торможение АХЭ мозга на 70—80%. Спонтанное восстановление активности происходит значительно медленнее при торможении фермента эзеринном по сравнению с байгоном (период полувосстановления 60 и 23 мин соответственно). При этом относительное содержание в мозгу эзерина было значительно выше, чем байгона. Восстановление активности АХЭ мозга мыши в опытах *in vitro* после угнетения эзеринном и байгоном при разбавлении в 300 раз происходило с одинаковой скоростью (период полувосстановления 14 мин);

К инсектоакарицидам, в основе действия которых лежит угнетение активности АХЭ в НС, относятся эфиры замещенных фосфорных кислот и эфиры метил- или диметилкарбаминової кислоты [1]. Хотя обе группы соединений имеют сходный механизм действия, который состоит в необратимом ацилировании серинового гидроксила активного центра фермента, между ними есть существенное различие. Фосфорилированная АХЭ, которая образуется в результате угнетения фосфорорганическими соединениями, представляет собой очень прочное соединение, которое в подавляющем большинстве случаев спонтанно не распадается и активность фермента не восстанавливается. В отличие от этого карбамилированная АХЭ, которая возникает при воздействии карбаматами, сравнительно легко декарбамилируется при разведении или отмывании избытка ингибитора и АХЭ вновь становится активной.

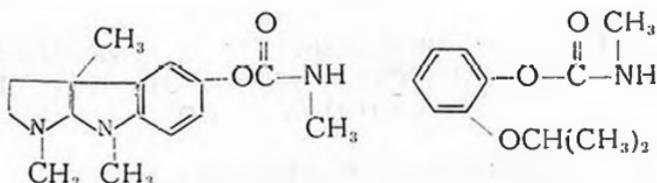
Вопросы декарбамилирования холинэстераз частично обсуждены в литературе [2, 3], однако почти нигде не производилось сопоставление данных, полученных *in vitro* и *in vivo* и совершенно отсутствуют сведения о связи изменения активности АХЭ мозга с содержанием карбаматов в мозгу.

Именно эти проблемы и явились предметом изучения в данной работе. Их значение не ограничивается теоретическими рамками, но имеет

и определенное практическое значение, так как позволяет приблизиться к пониманию закономерностей избирательности действия карбаматных инсектицидов.

Материалы и методы

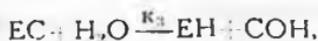
Опыты ставили на беспородных белых мышах. Объектами исследования служили эзерин (физостигмин) и байгон (пропоксур), имеющие следующее химическое строение:



Как видно из формул, оба вещества являются эфирами монометилкарбаминной кислоты, поэтому получающийся в результате их действия на АХЭ карбамилированный фермент имеет одинаковое строение.

В опытах *in vitro* гомогенат мозга (300 мг/мл) смешивали с эзеринном (конечная концентрация $1,5 \cdot 10^{-7}$ М) или с байгоном ($1,5 \cdot 10^{-5}$ М) и выдерживали 45 мин при 30° . В результате АХЭ оказывалась угнетенной на 70—80%. Ингибированный фермент разводили фосфатным буфером (рН 8,0) в 300 раз и инкубировали при 37° для реактивации. Предварительными опытами было установлено, что при таком разбавлении дополнительного угнетения АХЭ не происходит. Пробы для определения активности АХЭ брали каждые 5 мин в течение 30 мин. Активность фермента определяли методом Ellman и соавт. [4]. Субстратом служил ацетилтихолин бромид. Инкубацию с ним проводили 15 мин при 30° , рН 7,9.

Для оценки скорости декарбамилирования угнетенной АХЭ использовали два критерия: время полувосстановления активности, которое находили из графика зависимости активности АХЭ после разведения от времени; псевдомолекулярная константа скорости декарбамилирования ингибированной АХЭ из уравнения реакции.



где ЕС—карбамилированный фермент, ЕН—активный фермент, СОН—карбаминная кислота (разлагается). Величину k_3 определяли графически из зависимости $\ln \frac{V_0 - V_t}{V_0 - V_1}$ от времени t . Здесь V_0 —исходная активность АХЭ; V_t —активность фермента при максимальном угнетении карбаматом, V_1 —активность ко времени t после разбавления угнетенной АХЭ. Получаемый график носит прямолинейный характер и при этом

$$k_3 = \frac{1}{t} \cdot \ln \frac{V_0 - V_i}{V_0 - V_t} \quad [2].$$

Антихолинэстеразную эффективность карбаматов выражали в виде биомолекулярной константы (k_{II} $M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$) скорости ингибирования фермента [1].

В опытах *in vivo* эзерин и байгон вводили в эквитоксических дозах, примерно соответствующих максимально переносимым (эзерин—1,25 $\mu\text{моль/г}$, байгон—25 $\mu\text{моль/г}$). Через разное время мышей декапитировали и в мозгу определяли активность АХЭ и содержание карбаматов разработанным нами методом [5]. При этом для экстрагирования эзерина применяли воду, а для извлечения байгона—0,05%-ный раствор ТХУ. В качестве тест-фермента для определения антихолинэстеразной активности полученных экстрактов использовали препарат АХЭ из голов мух [5] и по калибровочным кривым оценивали содержание карбаматов в ткани мозга.

Результаты и обсуждение

Опыты in vitro. На рис. 1 представлен прямолинейный участок кривой восстановления активности АХЭ мозга мышей после ее угнетения байгоном и эзеринном и 300-кратного разведения. За 100%-ное угнетение принимали максимальное подавление активности фермента, которое удавалось достигнуть в выбранных условиях, и в соответствии с этим по графику определяли время, через которое активность АХЭ восстанавливалась на 50%. Для обоих ингибиторов оно оказалось одинаковым и составляло $14,0 \pm 0,5$ мин. Это совпадение не было неожиданностью, так как оба вещества являются эфирами монометилкарбамилновой кислоты и, как уже указывалось, образующиеся карбамиллированные ферменты имеют одинаковое строение.

Точно также одинаковыми оказались и константы декарбамиллирования k_3 , вычисленные на основании данных рис. 2. Для обоих карбаматов они были равны $0,050 \pm 0,002 \text{ мин}^{-1}$. В доступной нам литературе не удалось найти сведений о декарбамиллировании мозга мышей, но данные для АХЭ бычьих эритроцитов, голов мух и электрического органа электрического угря [2, 3, 6, 7] оказались сходными, хотя и несколько отличались от наших. Во всех примерах, перечисленных в литературе, время полувосстановления было несколько выше: в зависимости от температуры и рН: от 19 мин до 1,2 ч, а величина k_3 соответственно ниже: от 0,01 до $0,037 \text{ мин}^{-1}$.

Опыты in vivo. Данные об изменении активности АХЭ мозга после отравления мышей изученными карбаматами представлены на рис. 3, из которого видно, что, в отличие от опытов на гомогенатах мозга, здесь существуют выраженные различия между эффектами эзерина и байгона. После введения байгона максимальное угнетение АХЭ наступало через 2 мин и составляло $70 \pm 2\%$. Восстановление активности фермента на

50% происходило через 22 мин, то есть мало отличалось от данных, полученных *in vitro*. Совершенно иная картина наблюдалась после отравления мышей эзеринном: максимальное угнетение АХЭ происходило позже (через 7 мин), было несколько более высоким ($80 \pm 6\%$), а главное, значительно медленнее протекало восстановление активности угнетенной АХЭ—ее декарбамилирование. Полувосстановление достигалось только через 60 мин.

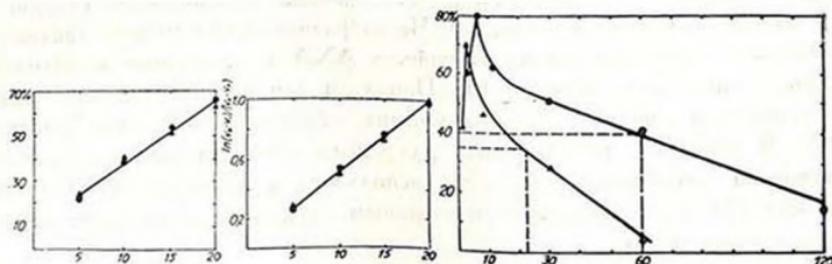


Рис. 1. Восстановление активности АХЭ мозга мыши (в %) после угнетения эзеринном (●) и байгоном (▲). Здесь и на рис. 2, 3 по оси ординат—время в мин

Рис. 2. Определение константы декарбамилирования после угнетения АХЭ мозга мыши эзеринном (●) и байгоном (▲)

Рис. 3. Угнетение АХЭ мозга мышей (в %) после внутрибрюшинного введения эзерина (●) или байгеса (▲)

При анализе полученных результатов мы руководствовались следующими соображениями. В целом организме, как и в гомогенатах мозга, декарбамилирование АХЭ может происходить только при условии удаления избытка ингибитора из среды. В условиях *in vitro* мы достигали этого разведением реакционной смеси в 300 раз, разведение же *in vivo* невозможно, и для удаления ингибитора можно использовать следующие способы: вымывание избытка ингибитора из мозга циркулирующей кровью и ферментативное разрушение ингибитора. Возможность второго способа была проверена нами с помощью 30-минутной инкубации эзерина и байгона с гомогенатами мозга и последующего определения антихолинэстеразной эффективности. В указанных условиях оба вещества совершенно не утрачивали своей способности ингибировать АХЭ. Это говорит о том, что по крайней мере гидролитического разложения обоих карбаматов не происходит, хотя выбранные условия опыта не позволяют исключить возможности окислительных превращений.

Для проверки первой возможности (удаление ингибитора путем циркуляции) мы поставили следующую серию опытов. Сразу после введения ингибиторов мышей декапитировали и отрезанные головы оставляли при комнатной температуре в течение 60 мин, после чего в мозгу определяли активность АХЭ. Оказалось, что при этом никакого восстановления активности фермента не происходит. Напомним (рис. 3), что у неповрежденных мышей за это время активность АХЭ после введения

байгона восстанавливалась полностью, а после введения эзерина—наполовину. Из этих опытов следует, что сохранение нормальной циркуляции является необходимым условием для удаления избытка ингибитора и связанного с этим декарбамиллирования угнетенной АХЭ.

Для выяснения причин различий между байгоном и эзериним, наблюдаемых *in vivo*, мы предприняли попытку определить содержание ингибиторов в мозгу через разное время после их введения в организм. Результаты этой серии опытов представлены в таблице. Как было указано, вещества вводили мышам в эквитоксических дозах, близких к максимально переносимым. Следует отметить, что существует соответствие между антихолинэстеразной эффективностью исследованных карбаматов и их токсичностью для мышей. Так, бимолекулярная константа ингибирования АХЭ мозга мышей для эзерина равнялась $1,6 \cdot 10^6$, а для байгона— $1,0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$

Таблица
Содержание карбаматов в мозгу мышей через разное время после внутрибрюшинного введения

Вводимое вещество	Доза нмоль/г	Абсолютное содержание в мозгу (нмоль/г)		Относительное содержание (% от равномерного распределения)	
		через 10 мин	через 30 мин	через 10 мин	через 30 мин
Байгон	25,0	$0,54 \pm 0,10$ (7)	0,07 (4)	2,2	0,3
Эзерин	1,25	$0,31 \pm 0,10$ (8)	$0,060 \pm 0,007$ (6)	24,8	4,8

Примечание. В скобках указано число опытов.

Так как эзерин значительно токсичнее байгона, его доза в абсолютном выражении была существенно ниже дозы байгона, поэтому трудно сравнивать абсолютное содержание введенных карбаматов. Для сопоставления результатов мы выбрали относительную величину—% от равномерного распределения. При этом за 100% принимают совершенно равномерное распределение, при котором содержание вещества в любой ткани равно введенной дозе (в нашем случае 25 нмоль/г для байгона и 1,25 нмоль/г для эзерина).

Из таблицы видно, что относительное содержание эзерина в мозгу значительно выше, чем байгона—примерно в 10 раз, а исчезновение байгона из мозга происходит быстрее, чем эзерина: за 20 мин содержание байгона уменьшается более чем в 7 раз, а эзерина—в 5 раз. Можно предположить, что более высокое относительное содержание эзерина и его медленное удаление из мозга служат причиной сравнительно медленного восстановления активности АХЭ мозга после введения этого карбамата.

REACTION OF EZERIN AND BIGONE WITH MICE BRAIN AChE IN VIVO AND IN VITRO

BALASHOVA E. K., KUGUSHEVA L. I., ROSENGART V. I.,
SHERSTOBITOV O. E.

I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry,
USSR Acad. Sci., Leningrad

Intraperitoneal injection of carbamates of ezerin or bigone (maximally tolerated dose) results in 70–80% inhibition of brain AChE in mice. Spontaneous recovery of enzyme activity takes place much more slowly in the case of ezerin compared to bigone ($t_{1/2}$ 60 and 23 min respectively); the relative level of ezerin in brain being much higher than that of bigone. In vitro studies recovery of AChE activity in mice brain tissue takes place with identical rate for ezerin and bigone— $t_{1/2}$ 14 min.

ЛИТЕРАТУРА

1. Голиков С. Н., Розенгарт В. И. Холинэстеразы и антихолинэстеразы насекомых. Л., 1964.
2. Aldridge W. N., Reiner E. Enzyme Inhibitors as Substrates (eds. A. Neuberger, E. L. Tatum), North-Holland Publ. Co, Amsterdam, London, 1972.
3. Main A. R. Pharm. Ther. v. 6, p. 529–629, 1979.
4. Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V., Featherstone R. M. Biochem. Pharmacol., v. 7, p. 88–95, 1961.
5. Балашова Е. К., Розенгарт В. И., Шерстобитов О. Е. Нейрохимия, т. 6, с. 303, 1987.
6. Greenspan C. M., Wilson J. B. Mol. Pharmacol. v. 6, p. 266–272, 1970.
7. Reiner E., Simeon-Rudolf V. Biochem. J. v. 98, p. 501–505, 1966.

Поступила 17 III 1988.