

МИНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
ИНСТИТУТ

УДК 615.22-036.12-056.3

Таганович
Наталья Дмитриевна

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДИТОЛОНИЯ – НОВОГО
МИОРЕЛАКСАНТА ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ

14.00.25 – фармакология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Минск 2000

Работа выполнена в центральной научно-исследовательской
лаборатории Минского государственного медицинского института

Научный руководитель – доктор медицинских наук,
профессор Захаревский А.С.

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук,
профессор Бушма М.И.

доктор медицинских наук,
профессор Кузьмицкий Б.Б.

Оппонирующая организация: Гомельский государственный
медицинский институт

Защита состоится «26» «апреля» 2000 года в 15⁰⁰ часов на заседании
совета [Д 03.18.08] по защите диссертаций на соискание ученой
степени доктора наук при Минском государственном медицинском
институте [220116, г.Минск, пр.Дзержинского, 83, тел. 272 55 98]

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Минского
государственного медицинского института

Автореферат разослан «24» «марта» 2000 г.

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций,
доктор медицинских наук,
профессор



В.А.Переверзев

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертации. Дальнейшее совершенствование современных методов общего обезболивания в значительной степени связано с созданием и внедрением в клиническую практику новых мышечных релаксантов. В связи с широким спектром показаний трудно представить возможность создания одного миорелаксанта, отвечающего всем требованиям. Современной анестезиологии необходимо три вида миорелаксантов: 1) вызывающие быстро развивающуюся нервно-мышечную блокаду (в течение 1 мин), но с коротким периодом действия (5-10 мин), которые могли бы использоваться путем продолжительной инфузии; 2) вызывающие быстро развивающуюся нервно-мышечную блокаду со средней продолжительностью действия (20-30 мин); 3) для обширных хирургических вмешательств – препараты с длительным периодом действия (30-150 мин), лишённые влияния на сердечно-сосудистую систему [45,153].

Постсинаптические недеполяризующие мышечные релаксанты заняли прочное место в арсенале лекарственных средств, широко применяемых в анестезиологической практике [61,62,66,77,92,127]. Считают, что для клинического применения они представляют наибольший интерес, поскольку вызывают быстрый эффект, устраняемый антагонистами, не кумулируют и максимально лишены побочных свойств [17,106].

За последние 10-15 лет в клиническую практику было внедрено несколько недеполяризующих миорелаксантов с высокой активностью и избирательностью действия: векуроний, атракурий, пипекуроний (ардуан) и теркуроний. Однако все они оказались препаратами со средней продолжительностью действия [17,61,62,66,77,92,101, 151]. Поэтому создание более совершенного недеполяризующего миорелаксанта короткого действия остается актуальной задачей.

Стремясь решить эту проблему, в Минском медицинском институте (кафедра фармакологии, лаборатория физиологии и экспериментальной патологии ЦНИЛ) были исследованы курареподобные свойства 44 соединений, представляющих собой новые бис-четвертичные аммониевые соли дикарбоновых кислот [6,7,8,9]. Все они были синтезированы на кафедре органической химии Белорусского государственного университета под руководством доктора химических наук, профессора Л.С. Станишевского.

Высокоактивным и перспективным для клинического применения признан бисбензолсульфонат N¹,N¹-дитолил-N¹,N¹-ди-(4-триметил-аммониобензил) амид адипиновой кислоты, названный **ДИТОЛОНИЕМ**. Непременным условием при решении вопроса о возможности использования дитолония, как и любого другого лекарственного препарата, в клинической практике в качестве миорелаксирующего средства является выяснение фармакокинетических, фармакодинамических его параметров и оценка безвредности.

Связь работы с крупными программами. Данная работа выполнялась в рамках республиканской межотраслевой научно-технической программы Комитета по фармацевтической и микробиологической промышленности РБ 43-01р «Создать новые эффективные лекарственные препараты» (срок выполнения – 1994г.-1995г.) и Республиканской программы концерна Белбиофарм 05.05. «Лекарственные средства» (срок выполнения 1997-2000 г.г.).

ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Цель исследования – завершить экспериментальную разработку нового периферического миорелаксанта недеполяризующего типа действия – дитолония: исследовать фармакокинетические и некоторые фармакодинамические параметры, оценить безвредность и подготовить материалы для клинических испытаний.

Задачи исследования:

1. Изучить возможность связывания дитолония белками плазмы крови и метаболического превращения в кровотоке;
2. Выяснить пути тканевого метаболизма дитолония и выведения из организма конечных продуктов биотрансформации;
3. Определить элементы зависимости «структура-действие» в ряду химических аналогов дитолония;
4. Оценить возможность комбинированного применения дитолония и дитилина с целью сокращения времени восстановления мышечной активности в послеоперационном периоде;
5. Получить дополнительные данные о подострой и специфической токсичности дитолония.

Методы проведенного исследования. Для решения поставленных задач были привлечены следующие методы: спектральные и флюоресцентные; препаративные (выделение микросомальной фракции из ткани печени, альбумина – из плазмы крови, метаболитов дитолония – из мочи); аналитические (определение гидроксиллирующей активно-

сти микросомальной системы окисления, интенсивности окислительного деметилирования, концентрации цитохрома P-450, активности NADPH-цитохром P-450 редуктазы, ацетилхолинэстеразы); фармакологические (симптом склонения головы у кроликов, блокада проводимости импульсов в нервно-мышечных синапсах в ответ на электрическое раздражение, определение острой и подострой токсичности); клинико-биохимические (соотношение белков, концентрация глюкозы, холестерина, мочевины, активности АСТ, АЛТ, щелочной фосфатазы в плазме крови); морфологические (макро- и световая микроскопия); иммунологические (эпи- и внутрикожное тестирование, реакции специфического лейкоцитоллиза, специфической агглютинации, специфической микропреципитации, спонтанной лейкоергии).

НАУЧНАЯ НОВИЗНА И ЗНАЧИМОСТЬ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Все данные исследований, приведенные в настоящей работе, были получены впервые и не имеют аналогов, поскольку у новосинтезированного соединения исследовались такие характеристики, которые ранее не были определены.

В частности, установлено, что дитолоний после внутривенного введения в кровотоке взаимодействует с белками плазмы и связывается с ними. Это связывание достигает максимального уровня через 20 мин после введения препарата и сохраняется в течение 1 часа. Показано, что в крови дитолоний не подвергается метаболическим превращениям под действием типичного участника этого процесса – ацетилхолинэстеразы. В клетках же важнейшим звеном метаболизма дитолония являются процессы деметилирования аммониевого центра и окисления бензильной группы посредством монооксигеназной системы окисления. Причем, именно эти процессы приводят к снижению миорелаксирующей активности препарата, в то время как пероксидаза, протеазы не оказывают влияния на эффективность его фармакологического эффекта. Вместе с тем, удалось выяснить, что в проявлении дитолонием миорелаксирующего действия значительную роль играет наличие при третичном атоме азота п-толилового радикала, а между третичным и четвертичным атомами азота – фенильной группировки. Установлено, что конечные продукты метаболизма дитолония: п-диметиламинобензойная, п-метиламинобензойная кислота и п-аминобензойная кислоты, - выводятся с мочой.

Были получены дополнительные аргументы в пользу перспективности использования дитолония в клинической практике. Так, при необходимости, в конце мышечной релаксации, вызванной дитолонием, можно использовать деполяризующий миорелаксант – дитилин, с целью продления эффекта миорелаксации и последующего сокращения выхода из блокады. Получены экспериментальные доказательства относительной безвредности дитолония для организма.

Практическая значимость полученных результатов состоит в том, что они существенно дополняют сведения, необходимые для обоснования возможности клинических испытаний дитолония в качестве миорелаксирующего средства.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ ДИССЕРТАЦИИ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

1. Дитолоний – антидеполяризующий миорелаксант короткого действия связывается с белками плазмы крови, в частности, с альбумином.
2. Метаболизм дитолония в организме осуществляется посредством деметилирования аммониевого центра и окисления бензильной группы внутриклеточной монооксигеназной системой окисления. Образующиеся конечные продукты: п-диметиламинобензойная, п-метиламинобензойная кислота и п-аминобензойная кислоты,- не обладают специфической активностью и выводятся из организма почками.
3. Время восстановления мышечной активности после блокады, вызванной дитолонием, сокращается при заключительном введении деполяризующего миорелаксанта - дитилина.
4. Специфическое миорелаксирующее действие дитолония зависит от наличия в его молекуле при третичном атоме азота п-толилового радикала, а также – фенильной группировки между третичным и четвертичным атомами азота.
5. Дитолоний лишен аллергенной активности и малотоксичен при повторных введениях.

Личный вклад соискателя. Изложенные в диссертации результаты получены соискателем лично и совместно с другими исследователями. Соискателем самостоятельно разработаны модели экспериментов, осуществлялось их выполнение, проведена обработка результатов и их анализ.

Синтез предполагаемых метаболитов дитолония и выделение конечных продуктов проведены совместно с профессором кафедры орга-

нической химии БГУ Л.С. Станишевским. Спектрально-флюоресцентные исследования проведены с участием научного сотрудника Института физики НАН РБ Е.И. Каролик. Выделение микросомальной фракции из ткани печени, определение активности микросомальных ферментов проведены совместно с доцентом кафедры биохимии БГУ В.П. Курченко. Морфологические исследования проведены совместно с профессором кафедры гистологии МГМИ А.А. Артишевским. Определение подострой токсичности и аллергенной активности дитолония проведено совместно с научным сотрудником лаборатории токсикологии НИИ санитарии и гигиены МЗ РБ В.В. Шевляковым и научным сотрудником ЦНИЛ МГМИ Л.А. Мелентович.

Научный руководитель, помимо постановки целей и задач исследования, оказывал консультативную помощь в разработке моделей, обсуждении и трактовке полученных результатов.

Апробация результатов диссертации. Основные положения диссертации были изложены на Международном симпозиуме «Экспериментальная фармакология – клинике», Винница-Киев, 1992г., Втором съезде Белорусского общества фотобиологов и биофизиков «Молекулярно-клеточные основы функционирования биосистем», Минск, 1996г., научной сессии Белорусского института усовершенствования врачей, Минск, 1997г., 15-ом Европейском симпозиуме по метаболизму лекарств, Йена (ФРГ), 1996г.

Опубликованность результатов. Основные положения изложены в 8 работах: 5 статей в журналах и сборниках, 3 тезисов докладов на международных и республиканских съездах и симпозиумах.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения (4 главы), заключения и списка литературы, включающего 173 источника. Работа изложена на 109 страницах, содержит 17 рисунков, 24 таблицы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. Объектом исследования являлось соединение – бисбензолсульфонат N¹, N¹ –дитолил- N¹, N¹ –ди-(4-триметиламмонийбензил)амид адипиновой кислоты, получившее название «дитолоний».

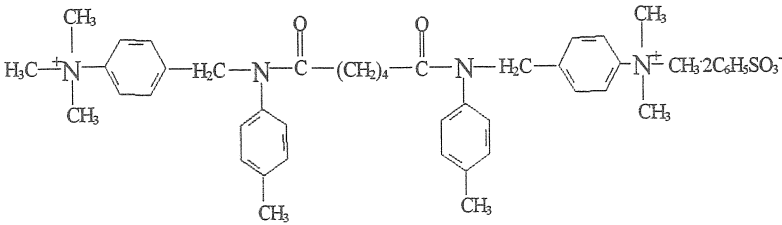


Рис.1. Структура дитолония

Предметом исследования было определение фармакокинетических его параметров (транспорт в крови, метаболизм в организме и выведение), фармакодинамических характеристик, связанных с выяснением роли отдельных структурных компонентов дитолония в проявлении миорелаксирующего действия, возможности комбинированного использования дитолония и дитилина, подострой токсичности и аллергенной активности.

Оценка связывания миорелаксанта белками плазмы крови производилась с помощью флюоресцентного метода. Исследовалось влияние дитолония на собственную флюоресценцию белков плазмы крови кроликов и зондовую флюоресценцию. В качестве флюоресцентного зонда использовался АНС (1-анилинонафталин-8-сульфонат). Для сравнения в ряде опытов оценивали связывающую способность белков плазмы крови при введении в организм экспериментальных животных дитилина, d-тубокурарина, предполагаемых метаболитов дитолония.

Механизм взаимодействия дитолония с белками плазмы крови определяли с использованием метода инфракрасной спектроскопии.

Для выяснения путей метаболизма дитолония и выведения его из организма были привлечены следующие методы: определение активности ацетилхолинэстеразы плазмы крови кроликов – по скорости гидролиза ацетилтиохолина; определение гидроксيليрующей активности микросомальной системы окисления из печени кроликов и способности её катализировать окислительное деметилирование – по реакции гидрокселирования анилина и деметилирования диметиланилина соответственно. В качестве индуктора микросомальной гидрокселирующей системы использовали фенобарбитал натрия, который вводили кроликам внутривенно в течение 5 суток. Дополнительно в микросомальной фракции оценивали концентрацию цитохрома Р-450 и активность NADPH-цитохром Р-450 редуктазы – спектрофотометрически.

Выведение дитолония почками и определение его метаболитов в моче исследованы в опыте на собаке. Из собранной мочи экстрагировали органическую фазу, которую разделяли градиентной хроматографией на колонке, заполненной кремниевой кислотой (10-20 мк). Идентификацию выделенных продуктов осуществляли тонкослойной хроматографией в присутствии свидетелей.

Оценку миорелаксирующей активности дитолония и других анализируемых соединений проводили в опытах на кроликах по тесту «симптом склонения головы» и на кошках – по проводимости в нервно-мышечных синапсах, посредством регистрации сокращений икроножной мышцы, вызываемых электрическим раздражением седалищного нерва. Анализируемые соединения вводили в краевую вену уха кролика в виде 0,01% водных растворов со скоростью 0,1 мл за 15 с. Кошкам соединения вводили в виде 0,05% водных растворов в бедренную вену со скоростью 0,1 мл за 30 с до развития полной нервно-мышечной блокады. Определяли время развития и длительность полной блокады, а также время восстановления нервно-мышечной проводимости до 25%, 50%, 75% и 95%-100% к исходному уровню. В качестве вспомогательного теста для оценки миорелаксирующей активности использовали показатели острой токсичности соединений для белых мышей, поскольку гибель животных происходит от гипоксии, развивающейся вследствие паралича дыхательной мускулатуры. Для этого метаболиты вводили в хвостовую вену в виде 0,0025% водного раствора. Определяли летальную дозу, вызывающую гибель 50% животных (ЛД₅₀)

Токсичность дитолония при многократном введении (подострая токсичность) оценивалась на белых крысах, которым на протяжении двух недель, через день, вводили препарат внутривенно в миорелаксирующих дозах (0,22 мг/кг и 0,33 мг/кг), не вызывающих полного выключения дыхательных мышц. Период наблюдения за животными после прекращения введения дитолония составлял 30 суток. После умерщвления животных декапитацией определяли весовые коэффициенты внутренних органов, клеточный состав и общие показатели крови, биохимические показатели сыворотки крови (соотношение белков, уровень холестерина, глюкозы, мочевины, активность щелочной фосфатазы, аспартат- и аланинаминотрансферазы (Колб В.Г., Камышников В.С., 1982).

Оценка аллергенной активности дитолония проводилась на моделях воспроизведения гиперчувствительности замедленного и немедленного типов: провокационного эпикутанного теста у морских свинок, а

также внутривенной разрешающей пробой с последующим учетом эритематозной реакции (Алексеева О.Г., Петкевич А.И., 1972). Обнаружение возможных специфических сдвигов в клеточном и гуморальном иммунном ответе организма на введение дитолония проводили по реакции специфического лейкоцитоллиза – РСЛЛ (комплементзависимая цитотоксичность) [Деува Л.А., Бару Р.В., 1978], реакции специфической агглютинации – РСАЛ [Вегенер З., 1987], реакции специфической микропреципитации – РСМП [Деува Л.А. и др., 1976]. Иммуномодулирующее (аутоиммунное) действие дитолония оценивали по реакции спонтанной лейкоэргии – РСЛ [Мац А.Н., 1964]. Статистическую обработку результатов проводили методом вариационной статистики с применением t-критерия Стьюдента. Для этого использовали пакет компьютерных программ Microsoft Excel.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимодействие дитолония с белками плазмы крови

Спектр флюоресценции белков в плазме крови кроликов имел максимум при 330нм. После введения животным дитолония $\lambda_{\text{макс}}$ флюоресценции белков плазмы, измеряемая сразу после забора крови, не изменялась, но заметно снижалась интенсивность флюоресценции, максимально через 20 мин после введения препарата. Добавление дитолония к раствору альбумина (предварительно выделялся гелехроматографией из плазмы крови кролика) приводило к изменению спектральных характеристик флюоресценции белка вплоть до концентрационного тушения флюоресценции при $\lambda_{\text{макс}} = 412\text{нм}$. При введении кроликам дитилина, d-тубокурарина, дитолония интенсивность зондовой флюоресценции АНС в плазме крови существенно снижалась во времени, но только для дитолония, введенного в дозе, равной или больше ЭД. Минимальное значение зарегистрировано через 20 мин после введения препарата (рис.2).

В инфракрасном спектре альбумина из плазмы крови кролика после введения дитолония произошло изменение интенсивности высокочастотной полосы 2965 см^{-1} , области частот $1450\text{-}1750\text{ см}^{-1}$, что свидетельствовало о конформационной перестройке белка. Полученные данные свидетельствуют о том, что дитолоний связывается с белками плазмы. Связывание обусловлено присоединением миорелаксанта вблизи радикала триптофана. В результате изменяется гидрофобная часть белковой молекулы и степень упорядоченности структуры белка.

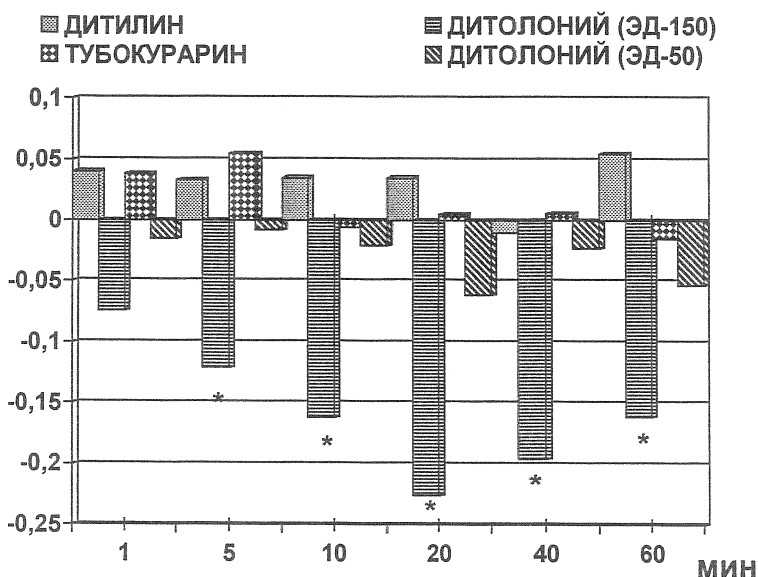


Рис.2. Динамика флюоресценции АНС в белках плазмы крови до и после введения исследуемых препаратов

По оси ординат - интенсивность флюоресценции, $I_{оп} - I_{исх} / I_{исх}$, (измерялась при λ возбуждения - 370 нм, λ регистрации - 490 нм). По оси абсцисс - время (мин) после введения препарата; * - статистически достоверные результаты ($P < 0,05$).

Пути метаболизма дитолония и его выведения из организма

Выяснение возможности участия холинэстеразы крови в метаболизме дитолония проводилось по оценке влияния миорелаксанта на активность фермента, а также способности дитолония сохранять после инкубации с плазмой крови миорелаксирующий эффект. Исследование показало, что ингибирование холинэстеразной реакции в плазме крови кроликов достигалось лишь при концентрациях дитолония $5 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-3} M$, а инкубация дитолония с цельной кровью, сывороткой или плазмой крови кроликов в течение 45 мин и последующим обратным введением инкубационной смеси в организм экспериментальных животных не сопровождалась изменением миорелаксирующей активности препарата (табл.1).

Таблица 1.

Миорелаксирующая активность раствора дитолония после инкубации с цельной кровью и её компонентами

Дитолоний	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

Примечание. 0,01% раствор дитолония смешивали с цельной кровью, плазмой или сывороткой крови и инкубировали 45 мин при температуре 37°C, после чего вводили в организм того же животного, от которого забиралась кровь.

Исходя из особенностей химического строения дитолония, наиболее вероятными ферментными системами для его внутриклеточного катаболизма были определены пероксидаза, протеазы и микросомальная оксигеназная система. Опыты *in vitro*, в ходе которых дитолоний подвергался окислению пероксидазой хрена, обработке протеолитическими ферментами (трипсином, химотрипсином или папаином) не сопровождались снижением его миорелаксирующей активности.

Дитолоний при контакте с микросомами печени кролика в присутствии NADPH подвергался дезметилированию с образованием формальдегида. Процесс имел оптимум pH 7,2 и зависел от концентрации NADPH и микросомального белка. Была определена скорость дезметилирования дитолония. Она составила $1,5 \cdot 10^{-8}$ Ммин/мг. Продукты дезметилирования дитолония были обнаружены в моче собаки после внутривенного введения ей дитолония в остром опыте. Всего за 4 ч эксперимента было введено 28,8 мг/кг дитолония. За это время объем мочи, собранной путем катетеризации мочеточников, составил 780 мл. Из этого объема в результате проведенной процедуры было выделено 42 мг п-диметиламинометилбензоата, 24 мг п-метиламинометилбензоата и 14 мг п-аминометилбензоата.

Полученные данные позволили сделать заключение о том, что распад дитолония в организме происходит, главным образом, за счет внутриклеточного дезметилирования аммониевого центра и окисления бензильной группы. Конечные метаболиты имеют следующее строение:



Миорелаксирующая активность возможных метаболитов дитолония. Вышеназванные и некоторые другие предполагаемые метаболиты дитолония были синтезированы и тестированы на предмет наличия у них миорелаксирующего действия. В дозах, в 10 и более раз превышающих эффективную дозу дитолония, они не вызывали расслабления мышц у кроликов. Результаты определения острой токсичности на мышах подтвердили, что указанные соединения в исследуемых дозах не оказывают парализующее влияние на дыхательную мускулатуру.

Некоторые элементы зависимости между химическим строением и фармакологическим действием в ряду амидов дикарбоновых кислот – структурных аналогов дитолония

В зависимости от химического строения все исследуемые соединения были объединены в пять отдельных групп (табл.2):

Таблица 2.

Миорелаксирующая активность исследованных соединений в опытах на кроликах и кошках

Исследуемые соединения – производные кислот	Кролики (ССГ)		Кошки (икроножная мышца)*	
	Доза мг/кг	Блок (мин)	Блок (мин)	Восстановление дыхания (мин)
I. Янтарная	0,10±0,01	6,6±0,2	14	16
II. Адипиновая (дитолоний)	0,07±0,03	4,0±0,5	10	11
III. Пробковая	0,16±0,016	11,8±0,3	23	21
IV. Себациновая	0,15±0,012	23,0±0,7	26	27
V. Терефталевая	0,08±0,004	22,0±0,5	13	15

* - исследуемые соединения вводились в одинаковых дозах (0,15 мг/кг)

Как видно из табл. 2, все сопоставляемые соединения в опытах на кроликах обладали миорелаксирующей активностью, которая существенно ниже у производных пробковой и себациновой кислот. Это подтвердили и результаты опытов на кошках.

Роль химических радикалов при третичном атоме азота молекулы дитолония (см. рис.1) оценивали сопоставлением активности соединений, производных адипиновой кислоты. Установлено, что миорелаксирующая активность соединений, содержащих метильный (соед. 415), циклогексильный (соед. 417) радикалы намного ниже, а вызываемая ими нервно-мышечная блокада значительно продолжительнее, чем у соединений, включающих *p*-толиловый (соед. 278) или *p*-метоксифенильный (соед. 418) радикалы.

Аналогичным образом определена роль химических радикалов при четвертичных атомах азота (катионные головки) в молекуле миорелаксанта. Полученные данные свидетельствуют о том, что миорелаксирующая активность соединений возрастает (доза соединения, вызывающая блокаду, уменьшается, а длительность блока увеличивается) при замене метильных групп на этильные. Наличие же двух метильных групп и бензильного радикала у четвертичного атома азота существенно не сказывается на специфической активности.

Схожие результаты были получены при исследовании соединений – производных терефталевой кислоты. Кроме того, на примере этих химических соединений была оценена роль групп, расположенных между третичными и четвертичными атомами азота. Установлено, что замена фенильной части молекулы на этильную снижает миорелаксирующую активность.

Взаимодействие дитолония с деполяризующим миорелаксантом – дитилином

Выяснение этого вопроса для миорелаксантов с разным механизмом действия представляет как теоретический, так и практический интерес. После повторного введения дитолония в одинаковых дозах период восстановления мышечной активности приблизительно равен длительности блокады, вызванной однократным введением миорелаксанта. В острых опытах на наркотизированных уретаном кошках с электрической регистрацией нервно-мышечной проводимости в икроножной мышце, исследовали миорелаксирующую активность дитилина (0,3 мг/кг), вводимого на заключительном этапе миорелаксации, обеспечиваемой дитолонием. Результаты показали, что и при такой последовательности введение дитилина сопровождается развитием

нервно-мышечной блокады, клинические характеристики которой остаются на уровне, присущем дитилину (выход из блокады составлял $7,8 \pm 1,3$ мин). Можно предположить, что испытанная в эксперименте схема применения миорелаксантов с разными механизмами действия и клиническими характеристиками может способствовать повышению качества проводимой миорелаксации.

Подострая токсичность и аллергизирующая активность дитолония
Длительное введение препарата (7-кратное, в течение 14 суток) крысам в дозах, составляющих 50% и 75% от ЛД₅₀, после исчезновения симптомов кратковременной миорелаксации, не сказывалось на поведении животных, не тормозило их рост, не влияло на функциональные показатели деятельности сердца (на основании результатов ЭКГ, ЧСС). Колебания количества лейкоцитов, эритроцитов, гемоглобина, гематокрита и лейкоцитарной формулы в крови, относительной массы сердца, легких, селезенки, печени, почек, надпочечников не отличались от таковых у контрольной группы животных. Результаты макро- и микроскопического исследования внутренних органов также заметно не отличались от нормы. В период наблюдения не претерпели заметных изменений и показатели (см. Материалы и методы) метаболизма в сыворотке крови.

К дитолонию не было установлено кожной гиперчувствительности, так как абсолютные (мм) и относительные (балл) величины ТОУ (теста опухания уха) в опыте и контроле не имели статистически значимых различий (табл. 3). Не отличались от контроля и показатели эритематозной реакции, толщины кожной складки как через 30 мин (гиперчувствительность немедленного типа – ГНТ), так и через 24ч (гиперчувствительность замедленного типа – ГЗТ) после проведения внутрикожной разрешающей пробы. Следовательно, препарат не проявляет способность вызывать аллергические реакции I и IV типа.

Уровень лейкоцитоза в ответ на гаптенную стимуляцию (табл. 4) у трех животных опытной группы превышал физиологическую норму (10%). Однако у двух из 9 контрольных животных также выявлялись запредельные сдвиги, а среднegrупповой показатель РСЛЛ в контроле даже несколько превышал таковой в опыте. РСАЛ как по количеству животных с положительным результатом (интенсивностью в 1 балл), так и по средним уровням в контроле и опыте была одинаковой.

Таблица 3.

Результаты провокационного эликутанного (ТОУ) и внутрикожного тестирования (ГЗТ, ГНТ)

Показатели	Группы сравнения	
	Контроль (n=9)	Опыт (n=10)
ТОУ (мм)	0,89 ± 0,33	0,9 ± 0,29
ТОУ (баллы)	0	0
ГНТ: по эритеме (через 30 мин), балл	1,22 ± 0,16	1,3 ± 0,16
ГЗТ: через 24 ч		
Толщина кожной складки (мм)	20,7 ± 4,82	21,83 ± 3,0
Эритематозная реакция (мм)	6,44 ± 0,4	6,2 ± 0,38

Таблица 4.

Результаты проведения тестов на проявление дитолонием аллергенного и иммуномодулирующего действия

Показатели	Статистические величины	Группы сравнения	
		Контроль (n=9)	Опыт (n=10)
РСЛЛ (реакция специфического лейкоцитоза), %	H*	2/9	3/10
	$X \pm S_x$	6,55 ± 3,51	6,16 ± 2,9
РСАЛ (реакция специфической агглютинации), балл	H*	1/9	1/10
	$X \pm S_x$	0,11 ± 0,12	0,1 ± 0,1
РСМП, log ² титров антигаптенных антител	H*	1/9	1/10
	$X \pm S_x$	0,22 ± 0,24	0,3 ± 0,32
РСЛ (реакция спонтанной лейкоергии), %	$X \pm S_x$	16,5 ± 2,4	16,0 ± 2,2

Примечание: H* - в числителе - количество животных с положительным результатом, в знаменателе - всего животных в группе

Полученные результаты свидетельствуют о том, что дитолоний не стимулирует образование агглютинирующих и комплементсвязывающих антител. То есть индукция этим препаратом аллергической реакции цитотоксического типа маловероятна.

При проведении реакции специфической микропреципитации (РСМП) только в сыворотке крови одного животного в каждой из сравниваемых групп отмечалось увеличение нефелометрической плотности (с титром 1:4 - 1:8). Средний уровень антигаптенных преципитирующих антител не отличался в опыте и контроле (табл. 4). Это указывает на низкую вероятность развития иммунокомплексного типа аллергических реакций на дитолоний.

Таким образом, иммуномодулирующий эффект дитолония, судя по уровню РАЛ и других определяемых клеточных реакций, не установлен.

Совокупность полученных данных позволяет охарактеризовать дитолоний как препарат антидеполяризующего типа действия с коротким периодом нервно-мышечной блокады. Будучи введен в организм, он подвергается в печени биотрансформации под действием оксигеназной ферментативной системы. Процессы дезметилирования и окисления бензильных колец дезактивируют миорелаксант. Конечные метаболиты выводятся из организма с мочой. Хотя не исключены и другие пути выведения. При использовании препарата, он хорошо сочетается с дитилином, если последний вводится для завершения миорелаксации после применения дитолония. Дитолоний нетоксичен и лишен аллергенной активности. Эти сведения дополняют характеристику препарата и подтверждают целесообразность проведения его клинических испытаний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Установлено, что дитолоний (N^1, N^1 -дитолил- N^1, N^1 -ди-(4-триметил-аммониобензол) амид адипиновой кислоты) при внутривенном введении взаимодействует с белками плазмы крови, главным образом, с альбумином. При этом изменяется пространственная структурная организация микроокружения в гидрофобной части молекул белков. Связывание с белками плазмы достигает максимума через 20 мин и сохраняется в течение 1 часа после введения миорелаксанта [2,5].
2. Доказано, что метаболизм дитолония осуществляется посредством дезметилирования аммониевого центра и окисления бензильной

- группы внутриклеточной монооксигеназной системой. Пероксидазное окисление, протеолитические ферменты, ацетилхолинэстераза крови не участвуют в метаболизме дитолония [6,7].
3. Показано, что конечными метаболитами дитолония являются п-диметиламинобензоат, п-метиламинобензоат и п-аминобензоат. Они не обладают миорелаксирующим действием и выводятся из организма с мочой.
 4. Установлено определяющее значение в развитии миорелаксирующего эффекта дитолония наличия в его структуре при третичном атоме азота п-толилового радикала, а также – фенильной группировки между третичным и четвертичным атомами азота. Отсутствие одной метильной группы у четвертичного азота и длина центральной углеродной части в молекуле дитолония существенно не сказываются на специфической активности миорелаксанта [4].
 5. Показано, что комбинированное последовательное применение дитолония с дитилином не оказывает существенного влияния на миорелаксирующие свойства, присущие каждому из этих препаратов. Введение дитилина в конце мышечной релаксации, вызванной дитолонием, можно рекомендовать для сокращения времени восстановления нервно-мышечной проводимости [1].
 6. По экспериментальным показателям, определяющим подострую токсичность и аллергенность, доказано, что дитолоний относится к малотоксичным соединениям [3,4].

Список основных работ, опубликованных по теме диссертации

1. Хиониди Э.А., Миклевич А.В., Таганович Н.Д. Взаимодействие дитолония с прозеринем и пимадином //Экспериментальна фармакология – клініці : тез. докл.- Вінниця-Київ.- 1992.-с.91-92.
2. Каролик Е.В., Иванов А.А., Жбанко Р.Г., Захаревский А.С., Мелентович Л.А., Хиониди Э.А., Таганович Н.Д. Исследование влияния периферического миорелаксанта на транспортную функцию альбумина плазмы крови с помощью флюоресцентного анализа: Сб.науч.ст. / Альбумин сыворотки крови в клинической медицине.- 1994.- Москва, Ириус.- С.116-119.
3. Хиониди Э.А., Таганович Н.Д. Миорелаксирующая активность дитолония при повторных введениях : Сб.науч.тр. /Актуальные проблемы биологии и медицины.- Минск, 1996.- т.3.- С.534-536.
4. Мелентович Л.А., Захаревский А.С., Хиониди Э.А., Буянова А.Н., Павлов О.Б., Таганович Н.Д. Изучение миорелаксирующей активно-

сти в ряду бисчетвертичных аммониевых солей амидов дикарбоновых кислот: Сб. науч. тр. /Актуальные проблемы медико-биологической науки.- Минск, 1997.- С.195-198.

5. Таганович Н.Д. Взаимодействие миорелаксанта короткого действия – дитолония с белками крови //Молекулярно-клеточные основы функционирования биосистем : Тез.докл. второго съезда Белорусского общ-ва фотобиологов и биофизиков.- Минск, 1996.- С.180.

6. Таганович Н.Д., Сенчук В.В., Курченко В.П. Механизмы биотрансформации миорелаксанта краткосрочного действия дитолония // Вестник Белорусского государственного университета, Сер.2.- 1997.- № 1.- С. 19-23.

7. Taganovich N.D., Senchuk V.V., Kurchenko V.P. Peculiarities of the genotoxic effects of a short-term muscle relaxant – ditolonium // Experimental and toxicologic pathology.- 1996.- V.48, N 5.- P.394.

8. Таганович Н.Д. Мышечные релаксанты – современное состояние проблемы //Медицинские новости.- 2000.- № 2.- с.16-22.



РЭЗЮМЭ

Тагановіч Наталля Дзмітрыеўна

ФАРМАКАЛАГІЧНЫЯ УЛАСЦІВАСЦІ ДЫТАЛОНІЯ – НОВАГА МІЯРЭЛАКСАНТА ПЕРЫФЕРЫЧНАГА ДЗЕЯННЯ

Ключавыя словы: міярэлаксант, транспарт, метабалізм, вывядзенне, структура, актыўнасць, таксічнасць.

Аб'ект даследавання: злучэнне – бісбензолсульфанат N^1, N^1 -дыталіл- N^1, N^1 -ды-(4-трыметыламоніабензіл)амід адыпінавай кіслаты, атрымаўшае назву «дыталоній».

Прадмет даследавання: вызначэнне фармакакінетычных (транспарт у крыві, метабалізм у арганізме, вывядзенне) і фармакадынамічных параметраў дыталонія (вызначэнне ролі асобных структурных кампанентаў у праяўленні міярэлаксуючага дзеяння, магчымасці камбінаванага выкарыстання дыталонія і дытыліна), яго падстрай і алергенай актыўнасці.

Мэта працы: скончыць эксперыментальную распрацоўку новага перыферычнага міярэлаксанта – дыталонія: даследаваць фармакакінетычныя і некаторыя фармакадынамічныя параметры, ацаніць бяшкоднасць і падрыхтаваць матэрыялы для клінічных выпрабаванняў.

Метады даследаванняў: фармакалагічныя, біяфізічныя, біяхімічныя, гематалагічныя, патамарфалагічныя, імуналагічныя, статыстычныя.

Атрыманыя вынікі і навізна: устаноўлена, што дыталоній у крыві звязваецца з бялкамі плазмы. Паказана важнасць для праяўлення прэпаратам міярэлаксуючага дзеяння наяўнасці у саставе малекулы п-талілавага радыкала і фенілавай групоўкі. Даказана, што найважнейшым звяном метабалізма з'яўляюцца працэсы дэзметыліравання амоніевага centru і акіслення бензільнай групы пры дапамозе ўнутрыклетачнай монааксігеназнай сістэмы акіслення. Устаноўлены канечныя метабаліты, якія выводзяцца з арганізма з мачой. Даказана мэтазгоднасць сучаснага выкарыстання дытыліна і дыталонія. Прэпарат нетаксічны пры шматразовым увядзенні, ён не праяўляе алергенай, аўтаімуннай актыўнасці.

Вобласць выкарыстання: фармакалогія, клінічная фармакалогія, анестэзіялогія.

РЕЗЮМЕ

Таганович Наталья Дмитриевна

«ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДИТОЛОНИЯ – НОВОГО МИОРЕЛАКСАНТА ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ»

Ключевые слова: миорелаксант, транспорт, метаболизм, выведение, структура, активность, токсичность.

Объект исследования: соединение – бисбензолсульфонат N¹, N¹ – ди-толил- N¹, N¹ –ди-(4-триметиламмониобензил)амид адипиновой кислоты, получившее название «дитолоний».

Предмет исследования: определение фармакокинетических (транспорт в крови, метаболизм в организме и выведение) и некоторых фармакодинамических параметров дитолония (выяснение роли отдельных структурных компонентов в проявлении миорелаксирующего действия, возможности комбинированного использования дитолония и дитилина), его подострой токсичности и аллергенной активности.

Цель работы: завершить экспериментальную разработку нового периферического миорелаксанта – дитолония: исследовать фармакокинетические и некоторые фармакодинамические параметры, оценить безвредность и подготовить материалы для клинических испытаний.

Метод исследования: фармакологические, биофизические, биохимические, гематологические, патоморфологические, иммунологические, статистические.

Полученные результаты и их новизна: Установлено, что дитолоний, в кровотоке связывается с белками плазмы. Показана важность для проявления препаратом миорелаксирующего действия наличия в составе молекулы п-толилового радикала и фенильной группировки. Доказано, что важнейшим звеном метаболизма дитолония являются процессы деметилирования аммониевого центра и окисления бензильной группы посредством внутриклеточной монооксигеназной системы окисления. Установлены конечные метаболиты, которые выводятся из организма с мочой. Доказана целесообразность совместного использования дитилина и дитолония. Установлено, что препарат нетоксичен при многократном введении, он не проявляет аллергенной и аутоиммунной активности.

Область применения: фармакология, клиническая фармакология, анестезиология

f

SUMMARY

Tahanovich Natalja Dmitrievna

PHARMACOLOGICAL PROPERTIES OF THE NEW NON-DEPOLARIZING NEUROMUSCULAR BLOCKING DRUG - DITOLONIUM

Key Words: myorelaxant, transfer, metabolism, excretion, structure, activity, toxicity.

Object of Studies: the substance – bisbenzolsulfonate N¹N¹-ditolil-N¹N¹-di(4-threemethylammoniumbenzoate)amid adipinate, also called “ditolonium”.

Subject of Studies: the determination of some pharmacokinetic (protein binding in blood, metabolism and elimination by organs) and pharmacodynamic properties of ditolonium (the role of its molecular components in myorelaxant activity, the possibility of combined use of ditolonium and succinylcholine), the evaluation of its chronic and allergic toxicity.

Study Goal: to complete the experimental elaboration of the new peripheric myorelaxant – ditolonium: to investigate its pharmacokinetic and some pharmacodynamic parameters, to evaluate its harmlessness and prepare materials for its clinical testing.

Study Methods: pharmacological, biophysical, biochemical, hematological, pathological, immunological, statistical.

The Obtained Results and their Novelty: ditolonium in blood binds to plasma proteins. p-tolil and phenyl group in ditolonium structure were shown to contribute to the neuromuscular blocking activity of the compound. The most important step in the metabolism of ditolonium is the process of demethylating ammonium centre and oxidating benzil group by the intracellular system of microsomal oxidation. Final metabolites of ditolonium were established. All of them, at least in part, are excreted in urine. The expediency of combined use of ditolonium and succinylcholine was proved, because it makes shorter the recovery from neuromuscular block. No toxic effects were manifested after repeated infusions of ditolonium. The compound has neither allergic nor autoimmune activity.

Area of Application: pharmacology, clinical pharmacology, anesthesiology.

f

Подписано в печать 20.03.2000. Формат 60x84/16. Бумага писчая.
Усл. печ. л. 116. Уч.-изд. л. 133. Тираж 100 экз. Заказ 109.

Издатель и полиграфическое исполнение –
Минский государственный медицинский институт
ЛВ № 410 от 08.11.99; ЛП № 51 от 17.11.97.
220050, г. Минск, ул. Ленинградская. 6.

f