

ФАРМАКОЛОГИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ

ГАМК_A-РЕЦЕПТОРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПРОТИВОИШЕМИЧЕСКОГО ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНОГО ЭФФЕКТА S-АМЛОДИПИНА НИКОТИНАТА

Г. А. Ким¹, Т. С. Ганьшина², Е. В. Васильева², Г. И. Ковалёв², Е. В. Курза²,
Д. В. Масленников², М. В. Покровский¹, Р. С. Мирзоян²

В опытах на крысах с регистрацией локального кровотока в коре большого мозга с помощью лазерного доплеровского флоуметра установлено, что амлодипина бесилат в меньшей степени, чем S-амлодипина никотинат, усиливает кровоснабжение мозга, подвергнутого глобальной преходящей ишемии. Показано, что специфический блокатор ГАМК_A-рецепторов бикикуллин устраняет сосудорасширяющий эффект S-амлодипина никотината в условиях ишемии мозга, что указывает на ГАМК-ергический механизм этого эффекта. Результаты радиолигандного анализа *in vitro* указывают на непосредственное взаимодействие S-амлодипина никотината и, в меньшей степени, амлодипина бесилата с ГАМК_A-рецепторами мозга. Нимодипин и амлодипина основание подобным свойством не обладают. Следовательно, S-амлодипина никотинат, наряду с влиянием на кальциевые каналы, воздействует на ГАМК_A-рецепторы.

Ключевые слова: S-амлодипина никотинат; амлодипина бесилат; амлодипина основания; нимодипин; мозговое кровообращение; глобальная преходящая ишемия мозга; бикикуллин; ГАМК_A-рецепторы; крысы.

ВВЕДЕНИЕ

Ранее установлено, что блокатор медленных кальциевых каналов S-амлодипина никотинат обладает избирательной цереброваскулярной активностью, так как в большей степени усиливает кровоснабжение мозга крыс в условиях ишемического поражения мозга, в отличие от интактных животных [1]. Для выяснения роли никотинового фрагмента в структуре S-амлодипина никотината в противоишемической активности препарата представляло интерес изучить в этих условиях амлодипина бесилат и сопоставить эффекты этих соединений.

Далее логично было исследовать механизм действия наиболее эффективной соли амлодипина на кровоснабжение ишемизированного мозга. Анализ целесообразно начать с изучения роли ГАМК-ергических механизмов в реализации противоишемической цереброваскулярной активности S-амлодипина никотината, так как наиболее выраженную цереброваскулярную активность при ишемии большого мозга проявляют препараты с ГАМК-ергическим механизмом действия [2–6, 8, 11].

В связи с изложенным целью работы явилось изучение влияния амлодипина бесилата на кровоснабжение ишемизированного мозга и сопоставление его эффекта с S-амлодипина никотинатом, а также изучение роли

ГАМК в механизме противоишемического цереброваскулярного действия наиболее эффективной соли амлодипина в сравнении с нимодипином.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты выполнены на 26 нелинейных крысах-самцах массой 250–300 г (питомник “Столбовая”), содержавшихся в условиях лабораторного вивария при 12-часовом световом режиме со свободным доступом к воде и стандартному корму. 18 животных группы были наркотизированы (хлоралгидрат, 350–400 мг/кг, внутривенно). Опыты проводили в соответствии с “Методическими рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств для лечения нарушений мозгового кровообращения и мигрени” [7]. Эксперименты выполнены с соблюдением этических правил гуманного обращения с животными, утвержденными Этической комиссией ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В. В. Закусова”. Животные разделены на следующие экспериментальные группы: 1 — изучение влияния амлодипина бесилата на локальный мозговой кровоток крыс в условиях глобальной преходящей ишемии ($n = 10$); 2 — изучение влияния S-амлодипина никотината на локальный мозговой кровоток крыс в условиях глобальной преходящей ишемии и через 30 мин после введения бикикуллина ($n = 8$); 3 — изучение методом радиолигандного анализа *in vitro* взаимодействия S-амлодипина никотината, амлодипина бесилата, амлодипина основания и нимодипина с ГАМК_A-рецепторами с использованием мембран мозга крыс ($n = 8$).

¹ ООО «Консорциум-Пик», Россия, 125047, Москва, Оружейный пер., д. 25, стр. 1.

² ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В. В. Закусова» РАМН, Россия, 125315, Москва, Балтийская ул., 8.

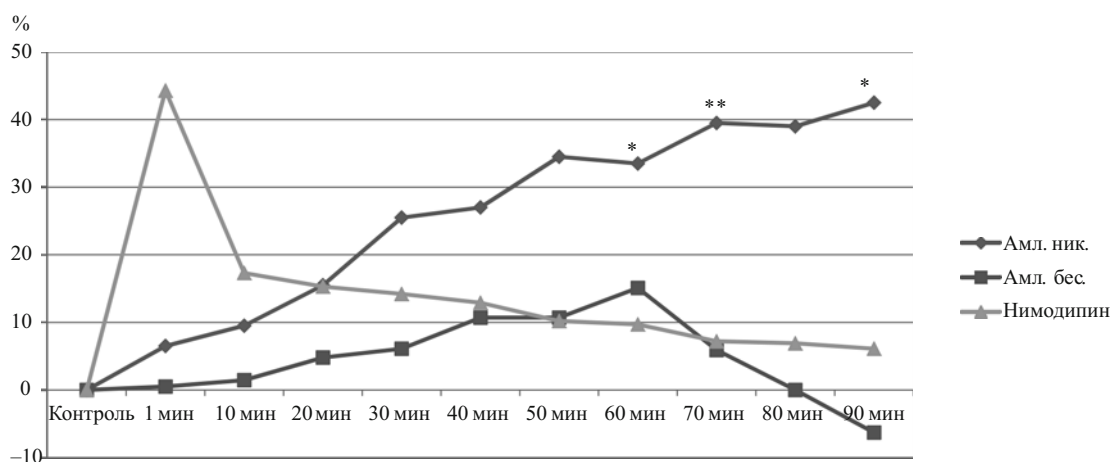


Рис. 1. Влияние S-амлодипина никотината (Амл.ник. 0,1 мг/кг, внутривенно), амлодипина бесилата (Амл.бес., 0,1 мг/кг, внутривенно) и нимодипина (0,03 мг/кг, внутривенно) на локальный кровоток в коре большого мозга крыс, перенесших глобальную переходящую ишемию.

По оси ординат — изменения локального мозгового кровотока, %; по оси абсцисс — время, мин.

* $p < 0,05$ — различие S-амлодипина никотината в сравнении с амлодипина бесилатом и нимодипином.

Состояние мозгового кровообращения у животных оценивали с применением методики лазерной доплеровской флоуметрии. Для регистрации локального мозгового кровотока в теменной области коры большого мозга крыс использовали флоуметр ALF-21 фирмы “Transonic System Inc.” (США). Игольчатый датчик флоуметра диаметром 0,8 мм устанавливали на теменной области коры с помощью микроманипулятора и коромысла. Одновременно регистрировали изменения артериального давления через предварительно введенный в бедренную артерию полиэтиленовый катетер. Запись показателей кровотока и артериального давления производили на полиграфе фирмы “БИОРАК” (США), соединенном с персональным компьютером. Глобальную ишемию у крыс вызывали 10-минутной окклюзией обеих общих сонных артерий с одновременным снижением артериального давления до 40 – 50 мм рт. ст. методом кровопускания с последующей реинфузией [7].

Приготовление мембранных препаратов, содержащих ГАМК_A-рецепторы фронтальной коры мозга крыс, и радиорецепторный анализ влияния веществ на специфическое связывание [³H]-SR 95531 (габазина) проводили по модифицированным методам [9, 10], опубликованным ранее [5]. Радиоактивность каждой пробы измеряли на сцинтилляционном счётчике Tri-Carb 2900 TR (PerkinElmer) с эффективностью счёта 42 – 45 %. Результаты обрабатывали с помощью программы GraphPad5.0 Prism.

Исследуемые вещества — амлодипина бесилат (0,1 мг/кг), и амлодипин (основание) фирмы “Shanghai Rokem International Trading Co., LTD”, S-амлодипина никотинат (0,1 мг/кг, производство ООО “ЭКО-ХИМ-ИННОВАЦИИ” по заказу ООО “Консорциум-ПИК”), нимодипин (0,03 мг/кг, фирма “BayerAG”, Германия), бикикуллин (0,5 мг/кг, фирма “Serva”) — в

виде водных растворов вводили через полиэтиленовый катетер в бедренную вену животных.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistika 8.0 (Statistika Inc., США). Нормальность распределения данных оценивали с помощью критерия Шапиро — Уилка. Для дальнейшей обработки данных использовали непараметрический двухвыборочный знаково-ранговый критерий Вилкоксона. Результаты рассматривали как значимые при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В первой серии опытов изучали влияние амлодипина бесилата (0,1 мг/кг, внутривенно) на локальный мозговой кровоток крыс в условиях глобальной переходящей ишемии. Показано, что амлодипина бесилат вызывает небольшое медленно нарастающее увеличение кровотока в коре мозга крыс, которое на 40 мин после введения препарата составляет 16 % (рис. 1). Повышение мозгового кровотока продолжается в течение 20 мин, затем кровоток возвращается к исходному уровню. К концу эксперимента наблюдается его дальнейшее снижение. Уровень артериального давления под влиянием амлодипина бесилата статистически значимо понижается на 8,2 % через 10 мин после его введения. Гипотензивный эффект амлодипина бесилата усиливается на протяжении всего периода наблюдения и к концу эксперимента составляет 25,7 %. Следовательно, выраженное снижение мозгового кровотока под влиянием амлодипина бесилата к концу эксперимента, по-видимому, обусловлено понижением уровня артериального давления.

Следует отметить, что под влиянием S-амлодипина никотината в той же дозе и в тех же условиях увеличение мозгового кровотока на 60 мин составляет 30,5 %, а к 90 мин — 42,5 % (рис. 1). В эти интервалы времени

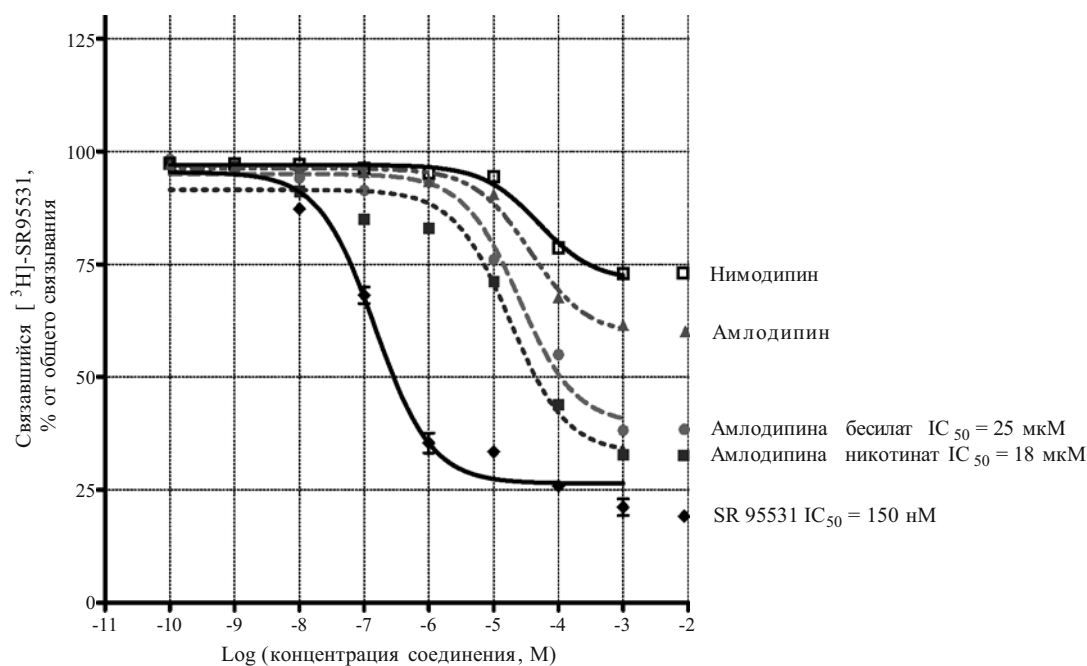


Рис. 2. Влияние амлодипина никотината, амлодипина бесилата, амлодипина (основание) и нимодипина на ГАМК_A-рецепторы мозга крыс в условиях *in vitro*.

По оси ординат — степень специфического связывания лиганда [³H]-SR 95531, % от общего связывания; по оси абсцисс — концентрация веществ, моль/л.

разница в цереброваскулярных эффектах между препаратами статистически значима при $p < 0,05$. Следовательно, по цереброваскулярной противоишемической активности амлодипина бесилат уступает S-амлодипина никотинату. Этим обусловлен выбор S-амлодипина никотината в качестве препарата для изучения механизма противоишемического эффекта.

В следующей серии опытов исследовали влияние S-амлодипина никотината на локальный мозговой кровоток крыс, подвергнутых глобальной преходящей ишемии после предварительного введения бикикуллина. Опыты показали, что в этих условиях S-амлодипина никотинат не вызывает существенных изменений локального мозгового кровотока, тогда как в контрольных опытах кровоток возрастал на 42,5%. Полученные данные указывают на ГАМК-ергический механизм цереброваскулярного противоишемического эффекта препарата. В этих же опытах S-амлодипина никотинат вызывает небольшое снижение уровня артериального давления.

Уместно отметить, что другой блокатор кальциевых каналов дигидропиридинового ряда нимодипин, который также усиливает кровоснабжение ишемизированного мозга (рис. 1), на фоне антагониста ГАМК_A-рецепторов бикикуллина проявляет сосудорасширяющую активность [6]. Можно полагать, что цереброваскулярный эффект нимодипина, в отличие от S-амлодипина никотината, не включает участие ГАМК_A-ре-

цепторов сосудов мозга, а осуществляется только за счет влияния на ионные каналы кальция.

Полученные данные явились основанием для детального изучения роли системы ГАМК в обнаруженных эффектах S-амлодипина никотината. В частности, в третьей серии опытов методом радиолигандного анализа *in vitro* изучена возможность S-амлодипина никотината непосредственно взаимодействовать с ГАМК_A-рецепторами с использованием мембран мозга крыс. В аналогичных условиях были исследованы амлодипина бесилат, амлодипин (основание) и нимодипин. Установлено, что S-амлодипина никотинат конкурирует за места специфического связывания [³H]-SR 95531 (габазина) с $IC_{50} = 18$ мкМ (рис. 2). Близкую степень сродства к ГАМК_A-рецепторам проявил амлодипина бесилат ($IC_{50} = 25$ мкМ), тогда как амлодипин и нимодипин оказались неактивными ($IC_{50} > 1$ мМ).

Таким образом, амлодипина бесилат вызывает небольшое увеличение локального мозгового кровотока у крыс, подвергнутых глобальной преходящей ишемии. Его эффект по выраженности уступает S-амлодипина никотинату. Анализ механизма действия S-амлодипина никотината с помощью бикикуллина указывает на участие ГАМК_A-рецепторов в реализации цереброваскулярного противоишемического действия препарата. Радиолигандный анализ *in vitro* на мембранах мозга крыс выявил непосредственную способность S-амлодипина никотината и в меньшей степени амлодипина бесилата вступать во взаимодействие с

ГАМК_A-рецепторами мозга. Другой блокатор кальциевых каналов нимодипин таким свойством не обладает. Существенно, что амлодипин также практически не конкурирует за места связывания [³H]-габазина. Следовательно, во взаимодействие с ГАМК_A-рецептором ткани мозга вступают только соли амлодипина и в большей степени S-амлодипина никотинат.

Таким образом, наряду с блокадой кальциевых каналов S-амлодипина никотинат способен взаимодействовать с ГАМК_A-рецепторами, что может лежать в основе его противоишемического цереброваскулярного действия.

ВЫВОДЫ

1. Амлодипина бесилат (0,1 мг/кг, внутривенно) вызывает небольшое (на 16 %) увеличение локального мозгового кровотока у крыс в условиях глобальной преходящей ишемии, которое сопровождается выраженной гипотензией.

2. Выявлен ГАМК-ергический компонент в механизме противоишемического действия S-амлодипина никотината (0,1 мг/кг, внутривенно), так как бикикуллин блокирует цереброваскулярный эффект вещества у крыс с глобальной преходящей ишемией мозга.

3. Результаты радиолигандного анализа *in vitro* свидетельствуют о непосредственном взаимодействии блокатора кальциевых каналов S-амлодипина никотината с бикикуллин-чувствительными ГАМК_A-рецепто-

рами мозга. В меньшей степени такое действие оказывает амлодипина бесилат, тогда как амлодипин (основание) и нимодипин подобной активностью не обладают.

ЛИТЕРАТУРА

1. Т. С. Ганьшина, Г. А. Ким, А. В. Гнездилова и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **77**(9), 3 – 7 (2014).
2. А. В. Гнездилова, Т. С. Ганьшина, Р. С. Мирзоян, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **73**(10), 11 – 13 (2010).
3. Д. В. Масленников, Т. С. Ганьшина, О. Н. Олейникова и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **75**(4), 13 – 16 (2012).
4. Р. С. Мирзоян, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **66**(2), 53 – 56 (2003).
5. Р. С. Мирзоян, Т. С. Ганьшина, А. В. Гнездилова и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **78**(1), 16 – 20 (2015).
6. Р. С. Мирзоян, Т. С. Ганьшина, Н. А. Хайлов и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **77**(3), 3 – 8 (2014).
7. Р. С. Мирзоян, М.Б. Плотников, Т. С. Ганьшина и др., *Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств для лечения нарушений мозгового кровообращения и мигрени. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств, Часть первая.*, Гриф и К, Москва (2012), сс. 480 – 487.
8. И. В. Силкина, Т. С. Ганьшина, С. Б. Середенин, Р. С. Мирзоян, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **68**(1), 20 – 24 (2005).
9. J. Hawkinson, M. Acosta-Burrue, C. Kimbrough, et al., *Eur. J. Pharmacol.*, **304**(1 – 3), 141 – 146 (1996).
10. Y. Ito, T. Koshiha, M. Doi, et al., *Synapse*, **10**(4), 326 – 333 (1998).
11. R. S. Mirzoyan, T. S. Gan'shina, D. V. Maslennikov, et al., *BioMed. Res. Intern.*, doi:10.1155 / 2014 / 586501 (2014).

Поступила 22.05.16

GABA_A RECEPTOR MECHANISM OF ANTI-ISCHEMIC CEREBROVASCULAR EFFECT OF S-AMLODIPINE NICOTINATE

G. A. Kim¹, T. S. Gan'shina², E. V. Vasil'eva², G. I. Kovalev², E. V. Kurza², D. V. Maslennikov², and R. S. Mirzoyan²

¹ Consortium-PIK Company, per. Oruzheinyi 25, Moscow, 125047 Russia

² V. V. Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315, Russia

Experiments on rats with global transient ischemia, in which local cerebral blood flow was monitored using a laser Doppler flowmeter showed that amlopidine besylate enhances the blood supply of damaged brain to lower degree than does S-amlopidine nicotinate. It is established that bicuculline (specific blocker of GABA_A receptors) removes the vasodilatory effect of S-amlopidine nicotinate under brain ischemia conditions, which is evidence of the GABA-ergic mechanism of this effect. The results of radioligand analysis *in vitro* indicate that S-amlopidine nicotinate (and amlopidine besylate to lower degree) directly interacts with the GABA_A receptors of brain. Nimodipine and amlopidine base do not produce a similar action. Consequently, S-amlopidine nicotinate, in addition to its effect on calcium channels, also influences GABA_A receptors.

Keywords: S-amlopidine nicotinate; amlopidine besylate; amlopidine base; nimodipine; cerebral blood flow; global transient cerebral ischemia; bicuculline; GABA_A receptor; rats.