

ВЛИЯНИЕ АНТАГОНИСТА ПОСТСИНАПТИЧЕСКИХ α_2 -АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ БЕДИТИНА НА УСТОЙЧИВОСТЬ КРЫС К СУДОРОЖНЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ И СОДЕРЖАНИЕ Ca^{2+} В ТКАНИ МОЗГА

Э. А. Ширинян, С. А. Арутюнян, А. А. Петросян, Г. А. Геворкян, Э. А. Маркарян, С. О. Вартанян, О. С. Медведев, Б. Т. Гарибджанян¹

При гемодинамических расстройствах предварительное введение бедитина в дозе 25 мг/кг полностью препятствует многократному повышению уровня $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в цитозоле клеток мозга крыс и приводит к усиленному захвату и накоплению Ca^{2+} в эндоплазматическом ретикулуме. В результате этого разница между содержанием свободного Ca^{2+} в цитозоле и связанного (секвестированного) в эндоплазматическом ретикулуме снижается в десятки раз. По кальций-связывающему эндоплазматическому ретикулуму свойству действие бедитина существенно отличается от эффектов верапамила.

Ключевые слова: бедитин, производное аминотиазолил-1,4-бензодиоксана, α_2 -адренорецепторы, судороги, отек мозга, Ca^{2+} блокатор

ВВЕДЕНИЕ

Бедитин — гидрохлорид 2-(2-амино-4-тиазолил)-1,4-бензодиоксана — новое производное бензодиоксана, блокирует сосудосуживающие реакции, вызванные агонистами α_2 -адренорецепторов, и повышает устойчивость организма к гипоксическо-ишемическим воздействиям [1]. В опытах на животных препарат существенно увеличивает скорость мозгового кровотока, понижает сопротивление сосудов и улучшает метаболические показатели в головном мозге при его ишемии [1, 3].

Известно, что приток Ca^{2+} в клетку и его высвобождение из внутриклеточных структур при судорогах оказывает отягочающее влияние на нервные клетки [24]. При этом блокаторы кальциевых каналов проявляют нейропротективное действие, ингибируют судорожные припадки различного генеза и тормозят развитие отека мозга, который является одним из важных патогенетических факторов в повреждении нейронов [9, 19].

Вышеприведенные предпосылки послужили основанием для изучения влияния бедитина на содержание кальция в ткани мозга и его противосудорожные свойства.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты по выявлению противосудорожного действия бедитина проведены на белых мышках на моделях антагонизма к электрошоку и коразолу [1], а также на крысах линии Крушинского – Молодиной (КМ), которые генетически предрасположены к развитию генерализованных судорог при звуковом раздражении. При действии непрерывного сильного звонка (110 – 115 Дб в течение 90 с) у животных регистрировали латентный период начала (в с) и степень (по 5-балльной шкале) двигательного возбуждения, которое обычно переходило в судорожный припадок [2]. В конце эксперимента проводили оценку итогового нарушения движений. В отдельных экспериментах на белых крысах изучали противосудорожную и проти-

воотечную активность бедитина при водной нагрузке. По балльной системе определяли количество животных с судорожными подергиваниями мускулатуры, парезами конечностей и судорожными припадками, число погибших крыс, а также отек мозга по соотношению массы мозга к массе тела [4].

Активность препарата исследовалась по изменению содержания $^{45}\text{Ca}^{++}$ во внутриклеточных структурах мозга на фоне общих гемодинамических сдвигов, наступающих при острой ишемии сердца, которую вызывали у бодрствующих крыс, переязывая переднюю нисходящую ветвь левой коронарной артерии. За 10 мин до операции животные получали бедитин (25 мг/кг внутривнутрибрюшинно) или верапамил (100 мкг/кг), а непосредственно после операции внутривнутрибрюшинно вводили 500 мкКю $[^{45}\text{Ca}]\text{CaCl}_2$ со специфической радиоактивностью 17,8 Кю/мг Ca^{2+} . Через 20 мин после окклюзии коронарной артерии животных декапитировали под легким эфирным наркозом. Выделение митохондрий, цитозоля, эндоплазматического ретикулума и определение в них радиоактивного $^{45}\text{Ca}^{++}$ проводили методами [13]. Тонус изолированных лоскутов мозговых сосудов, полученных из средней мозговой и базилярной артерий кошек (диаметр 0,7 – 1,2 мм), регистрировали методом L. Edvinsson и D. Krause [10].

Синтез бедитина разработан и осуществлен в ИТОХ НАН РА. В работе использованы клофелин производства “Sigma”, идазоксан – “Reckitt & Colman”, азепоксол — “Boehringer”, верапамил — “Орион”, $[^{45}\text{Ca}]\text{CaCl}_2$ – “Изотоп”. Крысы линии КМ выведены в лаборатории экспериментальных животных биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Бедитин проявляет выраженную противосудорожную активность к проконвульсантам различной этиологии. Так, при внутривнутрибрюшинном введении за 20 мин до нанесения электрического разряда бедитин проявляет антагонистическое действие как с максимальным электрошоком, так и с коразолом с ED_{50} равным 24 (19,2 ÷ 30) мг/кг и 54 (37,2 ÷ 78,3) мг/кг соответственно [1]. У крыс линии КМ, генетически предрасположенных к эпилептиформным припадкам, бедитин в дозе 25 мг/кг (в/б за 10 мин до звонка) вдвое удлиняет время наступления двигательного возбуждения животных, уменьшает их чрезмерную двигательную активность, а также полностью предотвращает развитие

¹ Лаборатория фармакологии сердечно-сосудистых средств (зав. — Э. А. Ширинян) Института тонкой органической химии НАН РА, Ереван, 375014, пр. Азатутяна, 26.

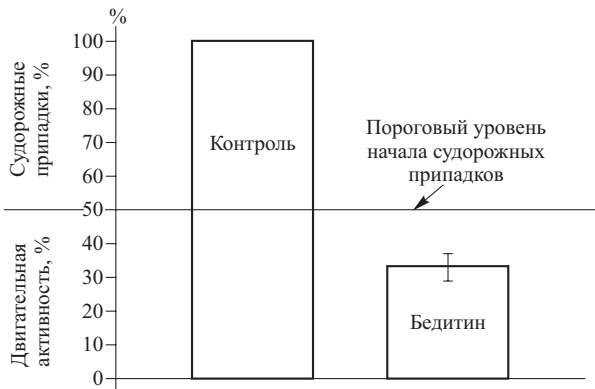


Рис. 1. Влияние бедитина на двигательную активность и судорожные припадки крыс линии КМ, подвергнутых звуковому раздражению.

аудиогенных судорог (рис. 1). Противосудорожный эффект бедитина нами получен и на модели судорог, наступающих вследствие осмотического отека мозга.

Известно, что при судорожных состояниях, наряду с гипертензией, наблюдаются значительные изменения гемодинамических показателей мозга [20], активация центральной катехоламинергической системы [18], сопровождаемая избыточным высвобождением нейромедиаторов в синаптическую щель и межклеточное пространство. Последующая активация адренорецепторов приводит к сужению сосудов, ишемии, дегенерации нервных клеток и отеку [8]. Имеются также бесспорные доказательства о вовлеченности в эти процессы α_2 -АР. Так, выявлено, что при судорогах, вызванных различными химическими факторами, селективные агонисты α_2 -АР (клонидин, тизанидин, ксилазин) увеличивали латентный период наступления судорог, уменьшали смертность животных и обладали выраженным противосудорожным действием [5, 23]. Наоборот, антагонисты α_2 -АР (идазоксан, йохимбин) потенцируют развитие судорог, а также блокируют профилактический эффект клонидина и других α_2 -адреномиметиков [6, 14]. Однако эти данные не раскрывают всей картины вовлеченности α_2 -АР в эти процес-

сы: так как, во-первых, эффекты вышеперечисленных соединений преимущественно рассматриваются в литературе с точки зрения механизмов опосредуемых α_2 -АР, локализованных пресинаптически, т.е. на изменения (в ту или иную сторону) процесса высвобождения нейромедиатора из нервного окончания; во-вторых, подавляющее большинство этих данных получены на моделях судорог, вызванных интоксикацией мозговой ткани химическими факторами; в-третьих, при изменении дозы α_2 -антагонистов их противосудорожное действие может смениться на проконвульсивное [27].

На модели судорог, наступающих вследствие осмотического отека мозга, была определена степень участия реакций, опосредуемых пре- и постсинаптически α_2 -АР, в устойчивости неврологического статуса крыс. Относительная избирательность воздействия достигалась селективной блокадой постсинаптических α_2 -АР бедитином, а также варьированием доз α_2 -агонистов (азепексол, клонидин) или α_2 -антагониста (идазоксан), действующих как на пре-, так и постсинаптическом уровне (табл. 1).

Как видно из табл. 1, полное предотвращение судорог и снижение показателя отека мозга (на 12 %) имеет место лишь при избирательной блокаде постсинаптических α_2 -АР бедитином. При одновременной блокаде пре- и постсинаптических α_2 -АР, в частности идазоксаном, величина противосудорожного действия снижается, по-видимому, ввиду наличия противодействующего процесса — блокады пресинаптических α_2 -АР, приводящая к подавлению механизма отрицательной ауторегуляции высвобождения медиатора. При сравнении противосудорожного действия низких и высоких доз α_2 -адреномиметиков (азепексол, клонидин), наряду с нарастанием дозы отмечается выраженная тенденция к повышению показателей судорожной активности животных и отека мозга. Подобное “извращение” эффектов α_2 -миметиков может быть следствием того, что возбуждающее действие α_2 -миметиков на постсинаптические α_2 -АР превалирует над их пресинаптическим действием, обеспечивающим угнетение высвобождения нейромедиаторов и уменьшение их концентрации у постсинаптических рецепторов. В литературе имеются данные как о способности в высоких дозах клонидина и азепексола снижать порог судорог, индуцируемых пентилентетразолом [12], так и о противосудорожных (при электрошоке) эффектах высоких доз α_2 -антагониста йохимбина [18].

Таким образом, результаты исследований позволили выявить, что антагонист α_2 -АР бедитин является одним из эффективных средств фармакологической защиты головного мозга при судорожных воздействиях различной природы. При этом важно отметить, что в отличие от других α_2 -позитивных веществ (клонидин, идазоксан), действующих на пре-, пост- и экстрасинаптическом уровне, противосудорожная активность

Таблица 1. Сопоставление противосудорожной и противоотечной активности α_2 -адренопозитивных веществ на модели осмотического отека мозга

Вещество, в/б	Доза, мг/кг	Противосудорожная активность, %	Показатель отека мозга (K_1), %
Бедитин	25	100*	- 12 ± 2,1*
Идазоксан	2	75,9 ± 9,5*	- 1,9 ± 4,5
Клонидин	0,1	55,1 ± 15,4*	- 6,8 ± 3,7
Клонидин	0,5	34,1 ± 20,1	+ 10,8 ± 2,9*#
Азепексол	0,1	29,5 ± 28,8	+ 0,6 ± 6,2
Азепексол	0,5	- 34,6 ± 19,2#	- 1,5 ± 4,8

Примечание. Различия достоверны по отношению: * — $p < 0,05$ к контролю; # — $p < 0,05$ к предыдущей дозе. Знаки (-) или (+) — соответственно процентное уменьшение или увеличение итоговой степени возникновения судорог и отека по отношению к контрольной группе. K_1 — отношение массы мозга к массе тела.

бедитина сопровождается снижением отека мозга [4, 7].

При анализе механизмов, определяющих противосудорожное и противоотечное действие бедитина нами также допускалась возможность наличия у препарата кальций-антагонистических свойств. Подобное основывалось на данных литературы о близкой пространственной связи между α_2 -АР и кальциевыми каналами [15], о модуляции α_2 -адренопозитивными веществами трансмембранного потока Ca^{2+} и его внутриклеточного гомеостаза [17], а также Ca^{2+} -антагонистической активности α_2 -адреноблокаторов [28]. Наряду с этим было постулировано, что сами антагонисты кальция (верапамил, флунаризин, нифедипин) в эквивалентных концентрациях взаимодействуют с α_2 -АР, угнетая опосредуемые ими сосудосуживающие реакции [29], а также обладают ярко выраженными противоотечными и противосудорожными свойствами [9, 16].

Изучение действия бедитина на тонус изолированных лоскутов мозговых артерий кошек показало, что в условиях резкого возрастания тонуса гладких мышц артерий, вызванного действием 10^{-4} М раствора хлористого калия, эквивалентный раствор бедитина способствует отчетливому расслаблению сосудистой полосы, подавляя тем самым калиевую контрактуру на $56,4 \pm 4,8$ %.

Представленные в табл. 2 данные о воздействии бедитина на уровень $^{45}\text{Ca}^{2+}$ во внутриклеточных структурах мозга при нарушении кровообращения в период острой ишемии миокарда указывают, что по эффекту предотвращать при дисциркуляции многократное накопление $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в цитозоле клетки, бедитин по блокирующему эффекту не уступает верапамилу.

Однако данные по захвату $^{45}\text{Ca}^{2+}$ митохондриями и, особенно, эндоплазматическим ретикуломом, а также по относительному распределению $^{45}\text{Ca}^{2+}$ во внутриклеточных структурах, указывают, что по механизму блокирующего действия кальций-антагонистическая активность бедитина, по-видимому, существенно отличается от действия классических антагонистов кальция. Как видно из табл. 2, бедитин почти в 3 раза увеличивает захват $^{45}\text{Ca}^{2+}$ эндоплазматическим ретикуломом, что приводит к значительному относительному перераспределению $^{45}\text{Ca}^{2+}$ внутри клетки, в результате

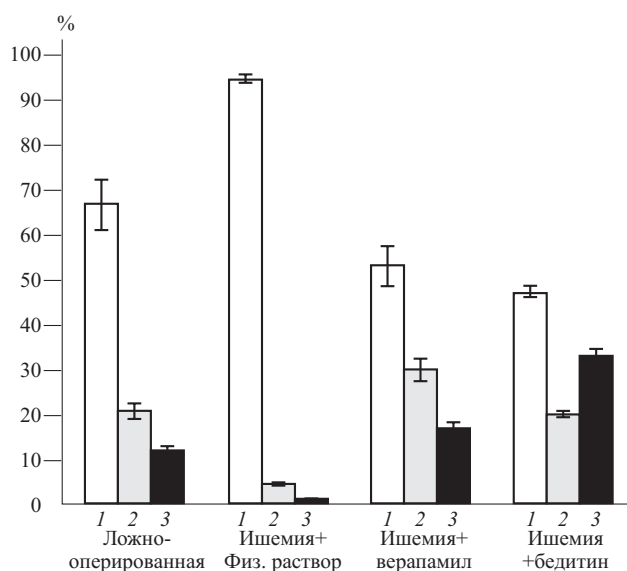


Рис. 2. Влияние бедитина и верапамила на распределение $^{45}\text{Ca}^{2+}$ во внутриклеточных структурах мозга в период острой ишемии миокарда (в процентах к внутриклеточному суммарному уровню принятому за 100).

1 — цитозоль, 2 — митохондрии, 3 — эндоплазматический ретикулум

чего резко снижается разница между содержанием $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в цитозоле и эндоплазматическом ретикулуме (рис. 2). Подобные сдвиги в гомеостазе внутриклеточного Ca^{2+} , бесспорно, способствуют проявлению положительных свойств (противосудорожное, сосудорасширяющее, противоотечное) бедитина, так как известно, что при ишемических состояниях имеет место критическое повышение интранейронального уровня свободного кальция [22], а вазоспазм и сокращение гладких мышц сосудов, также обусловлен увеличением Ca^{2+} в цитозоле.

Доказано, что важнейшим внутриклеточным регулятором баланса кальция является его захват и/или высвобождение из эндоплазматического ретикулума, который является основным внутриклеточным местом хранения Ca^{2+} [17]. Судорожные и ишемические воздействия, наоборот, приводят к угнетению способности захвата Ca^{2+} эндоплазматическим ретикуломом клеток мозга [22, 24]. При этом в цитозоле происходит суммирование количеств Ca^{2+} , проникающих в клетку извне (трансмембранно), и кальция, высвободившегося из эндоплазматического ретикулума.

Таблица 2. Влияние бедитина и верапамила на уровень $^{45}\text{Ca}^{2+}$ во внутриклеточных структурах мозга при нарушении кровообращения в период острой ишемии миокарда

Внутриклеточные структуры мозга	Ложная операция	Ишемия		
		физиологический раствор	верапамил	бедитин
Цитозоль	6551 ± 225	$42018 \pm 242^{##}$	$1919 \pm 25^{*#}$	$2152 \pm 23^{*#}$
Митохондрии	2046 ± 69	$1865 \pm 12^{##}$	$1079 \pm 17^{*#}$	$925 \pm 13^{*#}$
Эндоплазматический ретикулум	1179 ± 66	$508 \pm 6^{#}$	$604 \pm 11^{*#}$	$1473 \pm 24^{*#}$

Примечание. Различия достоверны по отношению: $^{##}$ — $p < 0,05$ и $^{#}$ — $p < 0,001$ к данным ложнооперированной группы; * — ($p < 0,001$) к данным нелеченной ишемизированной группы. Данные выражены в импульс \cdot мин $^{-1}$ \cdot мг $^{-1}$ белка.

Следовательно, бедитин, блокируя реакции, опосредуемые постсинаптическими α_2 -АР, ингибирует накопления Ca^{2+} в цитозоле.

О функции α_2 -АР модулировать процессы входа Ca^{2+} в клетку и его внутриклеточного гомеостаза указывают данные, полученные на изолированных нейронах шейного ганглия крыс [25], культуре клеток гладких мышц аорты [11] и портальной вене крыс [21]. При этом предполагается, что агонисты α_2 -АР (например, тизанидин) увеличивают чувствительность контрактных структур клеток к Ca^{2+} больше, чем селективные агонисты α_1 -АР [26]. Имеются также данные, что в отличие от α_1 -АР, α_2 -рецепторы (в частности, α_{2A} -популяция), не модулируют высвобождение Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума [17, 19].

Таким образом, полученные данные по кальций-антагонистической активности свидетельствуют, что бедитин обладает свойством не только блокировать K^+ -опосредуемый трансмембранный приток Ca^{2+} в клетку (через каналы, чувствительные к кальций-блокаторам), но и, подобно нитровазодилаторам и ц-АМФ [17], значительно увеличивать внутриклеточный захват Ca^{2+} и его изолирование эндоплазматическим ретикуломом.

ВЫВОДЫ

1. Селективная блокада постсинаптических α_2 -адренорецепторов 2-(2-амино-4-тиазолил)-1,4-бензодиазоксаном — (бедитин) является одним из эффективных подходов для фармакологической защиты головного мозга к экспериментальным проконвульсантным воздействиям различной природы — электрической, химической, осмотической и аудиогенной.

2. Бедитин, блокируя реакции опосредуемые постсинаптическими α_2 -адренорецепторами, ингибирует главные источники накопления Ca^{2+} в цитозоле — K^+ -опосредуемый трансмембранный вход Ca^{2+} и высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных структур.

ЛИТЕРАТУРА

1. С. О. Вартанян, Э. А. Маркрян, О. М. Мартиросян и др., *А. С. СССР*, № 1466220, 1988.
2. А. Л. Крушинский, Т. В. Рясина, В. Б. Кошелев, и др., *Физ. ж. СССР*, 75(11), 1576 – 1584 (1989).

3. С. А. Мирзоян, А. А. Петросян, С. А. Арутюнян и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, 63(4), 20 – 23 (2000).
4. В. М. Самвелян, *Экспериментальная терапия отека мозга*, Айастан, Ереван (1981).
5. S. P. Altenburg and M. B. Farah, *Pharmacol. Toxicol.*, 84(1), 29 – 33 (1999).
6. G. J. Amabeoku, *Experientia*, 49(10), 859 – 864 (1993).
7. M. Baldy-Moulinier, *Agressologie*, 23, 3 – 8 (1982).
8. H. Baran, K. Vass, H. Lassmann, and O. Hornykiewicz, *Brain Res*, 646(2), 201 – 206 (1994).
9. A. Charkabarti, H. K. Saini, and S. K. Garg, *Brain Res. Bull.*, 45(5), 495 (1998).
10. L. Edvinsson and D. Krause, *Brain Res.*, № 173, 89 – 97 (1979).
11. W. Erdbrugger, P. Vischer, H. J. Bauch, et al., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, № 22, 97 – 102 (1993).
12. A. Fletcher and A. Forster Elaine, *Eur. J. Pharmacol.*, 151(1), 27 (1988).
13. A. A. Galoyan, G. A. Kevorkian, et al., *Neurochemical Research*, 13(5), 493 – 498 (1988).
14. R. L. Gellman, J. A. Kallianos, and J. O. McNamara, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 241(3), 891 – 898 (1987).
15. F. R. Homaidan, M. E. El-Sabban, J. Wicks, et al., *J. Gen. Physiol.*, 88(6), 28a – 29a (1986).
16. S. Joseph, J. David, and T. Joseph, *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, 42(3), 383 – 388 (1998).
17. H. Karaki, H. Ozaki, M. Hori, et al., *Pharm. Rev.*, 49(2), 157 (1997).
18. R. Lasek, W. Fischer, and M. Muller, *Pharmazie*, 41(2), 128 – 130 (1986).
19. N. Lepretre, J. Mironneau, S. Arnaudeau, et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, № 268, 167 – 174 (1994).
20. A. Nehlig, M. Vergnes, E. Hirsch, et al., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 15(2), 259 – 269 (1995).
21. P. Pacaud and G. Loirand, *J. Physiol. (London)*, № 484, 549 – 555 (1995).
22. J. T. Parsons, S. B. Churn, R. J. DeLorenzo, *J. Neurochem.*, 68(3), 1124 – 1134 (1997).
23. M. R. Pelletier, and M. E. Corcoran, *Brain Res.*, 623(1 – 2), 29 – 35 (1993).
24. M. R. Pelletier, J. S. Wadia, L. R. Mills, and P. L. Carlen, *J. Neurophysiol.*, 81(6), 3054 – 3064 (1999).
25. G. G. Schofield, *Eur. J. Pharmacol.*, 180(1), 37 – 47 (1990).
26. I. Takayanagi, and S. Onozuka, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, № 68, 1329 – 1333 (1990).
27. Wi Hui-Quc, M. tullii, R. Samanin, and A. Vezzani, *Eur. J. Pharmacol.*, 138(3), 309 – 318 (1987).
28. Sh. Yano, K. Watanabe, Yu. Ito, et al., *J. Pharmacobio-Dyn.*, 10(3), 5 – 56 (1987).
29. P. A. van Zwitten and P. B. M. W. M. Timmermans, *Blood Vessels*, 24(5), 271 – 280 (1987).

Поступила 18.05.01

THE EFFECT OF THE POSTSYNAPTIC α_2 -ADRENORECEPTOR ANTAGONIST BEDITIN ON THE RESISTANCE TO PROCONVULSANT INFLUENCE AND THE CONTENT OF Ca^{2+} IN CEREBRAL INTRACELLULAR STRUCTURES OF RATS

E. A. Shirinyan, S. A. Arutyunyan, A. A. Petrosyan, G. A. Gevorkyan, E. A. Markaryan, S. O. Vartanyan, O. S. Medvedev, and B. T. Garibdzhanyan

Laboratory of Pharmacology of Cardiovascular Drugs, Institute of Fine Organic Chemistry, National Academy of Sciences of the Republic of Armenia, Azatutyan pr. 26, Yerevan, 375014 Armenia;

In rats with a hemodynamic disorder caused by acute myocardial ischemia, preliminary administration of beditin in a dose of 25 mg/kg fully prevents a manifold increase in the level of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ in the cytosol of brain cells and leads to enhanced trapping and accumulation of labeled calcium in endoplasmic reticulum. With respect to calcium binding in endoplasmic reticulum, the action of beditin substantially differs from that of verapamil.