

ФАРМАКОЛОГИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ

ГАМК-ЕРГИЧЕСКИЙ КОМПОНЕНТ В МЕХАНИЗМЕ ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНОГО ПРОТОВОИШЕМИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ДОКОЗАГЕКСАЕНОВОЙ КИСЛОТЫ

Р. С. Мирзоян¹, Т. С. Ганьшина¹, А. В. Гнездилова¹, Г. И. Ковалёв¹,
Ю. Ю. Фирстова¹, В. В. Безуглов², Н. М. Грецкая²

В опытах на крысах с регистрацией локального мозгового кровотока в коре большого мозга с помощью лазерного доплеровского флоуметра установлено, что докозагексаеновая кислота (ДГК) усиливает кровоснабжение мозга, подвергнутого глобальной преходящей ишемии, и не влияет на кровоток интактного мозга. Показано, что специфический блокатор ГАМК_A-рецепторов бикикуллин устраняет сосудорасширяющий эффект ДГК в условиях ишемии мозга, что указывает на ГАМК-ергический механизм этого эффекта. Результаты радиолигандного анализа *in vitro* указывают на возможность непосредственного взаимодействия ДГК с ГАМК_A-рецепторами сосудов мозга.

Ключевые слова: докозагексаеновая кислота (ДГК); мозговое кровообращение; глобальная преходящая ишемия мозга; бикикуллин; габазин; ГАМК_A-рецепторы.

ВВЕДЕНИЕ

Фармакологическая коррекция ишемического инсульта и нарушений мозгового кровообращения, в целом, направлена на улучшение кровоснабжения пораженной области мозга и восстановление адекватного поступления продуктов, необходимых для жизнедеятельности органа. Сосудистая патология мозга обусловлена не только изменениями сосудистой стенки, но и сдвигами в состоянии гемореологии и гемостаза. Поэтому патогенетическая терапия нарушений мозгового кровообращения включает использование препаратов, обладающих антиагрегантной активностью [7]. В этом аспекте представляет интерес докозагексаеновая кислота (ДГК), которая, являясь незаменимой полиненасыщенной жирной кислотой, входящей в состав фосфолипидных мембран ткани мозга, улучшает показатели вязкости крови, препятствует возникновению тромбозов, предупреждает развитие атеросклероза. ДГК принимает активное участие в обменных процессах мозга, в реализации нейрональной пластичности [17] и в функционировании нейромедиаторных систем [13, 18, 24, 40].

Важно отметить, что ДГК обладает выраженной нейропротекторной активностью. В условиях ишемии головного мозга, вызванной окклюзией средней мозговой артерии, ДГК увеличивает выживаемость крыс, уменьшает зону повреждения и восстанавливает неврологический статус [18, 21, 32]. Аналогичное дейст-

вие при окклюзии средней мозговой артерии у крыс наблюдается и при применении комбинации ДГК с альбумином [16]. Согласно данным [31], ДГК при внутривенном введении защищает мозговую ткань от повреждений и восстанавливает его функцию при компрессионном повреждении грудного отдела спинного мозга у мышей.

Наряду с нейропротекторной активностью, в литературе имеются сообщения о влиянии ДГК на кровоснабжение мозга. Показано, что ДГК при различных способах введения усиливает мозговое кровообращение у мышей [22], крыс [12], приматов [39] и здоровых добровольцев [25]. Вместе с тем длительное применение богатой полиненасыщенными жирными кислотами диеты вызывает понижение уровня мозгового кровотока у мышей [27], крыс [30] и здоровых испытуемых женщин [26].

Учитывая сосудорасширяющую активность ДГК, высказывается предположение о том, что ДГК, наряду с другими полиненасыщенными жирными кислотами, следует рассматривать в качестве фактора регуляции тонуса сосудов за счет взаимодействия между кровоснабжением, структурой и функцией мозга, а также реализации нейропротекторной активности [18, 31]. В частности, полагают [39], что увеличение мозгового кровообращения под влиянием ДГК обусловлено изменениями функциональной активности мозга и осуществляется за счет холинергических механизмов. Об этом свидетельствует способность антагониста м-холинорецепторов скополамина устранять увеличение мозгового кровотока в соматосенсорной коре большого мозга, вызванного вибрацией [15], и повышение уровня холина и ацетилхолина у гипертензивных крыс под влиянием ДГК [38].

¹ ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В. В. Закусова», 125315 Москва, Балтийская ул. 8

² ФГБУН Институт биорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

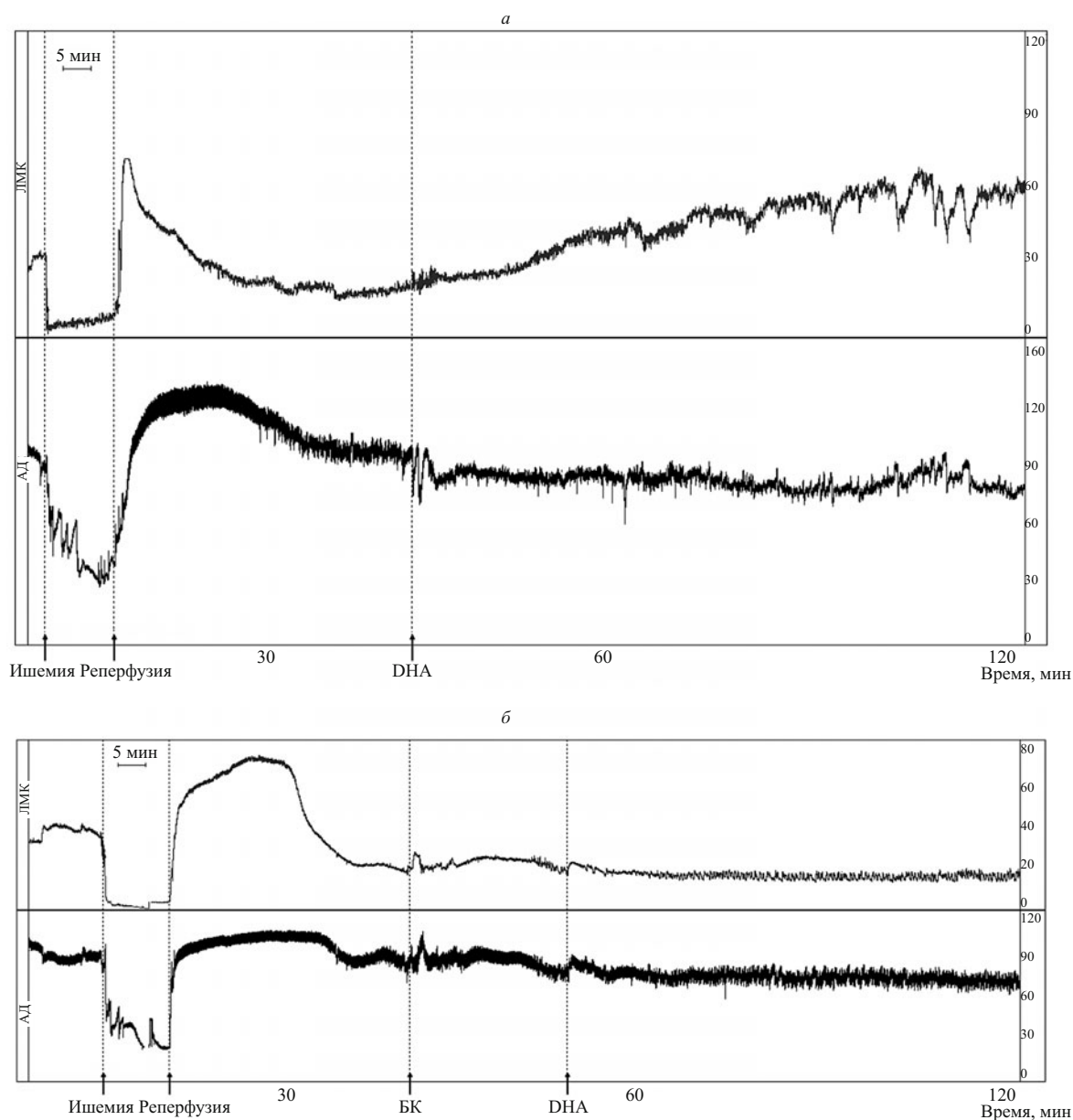


Рис. 1. Влияние ДГК (DHA, 1 мг/кг, внутривенно) на локальный мозговой кровоток (ЛМК) и артериальное давление (АД) у крыс после глобальной переходящей ишемии (а) и на фоне действия бичукуллина (БК, 0,5 мг/кг, внутривенно, б).

Имеются сообщения о влиянии ДГК на ГАМК_A-рецепторный комплекс в структурах мозга. Так, в экспериментах *in vitro* ДГК ослабляет нейровозбудимость срезов гиппокампа крыс [36], потенцирует связывание [³H]-мусцимола и [³H]-диазепама мембранами мозга [34, 37]. Показано также, что на клетках насекомых с экспрессированными ГАМК_A-рецепторами человека ДГК модулирует амплитуду пика ГАМК-индуцированного ионного ответа [19, 33]. Вместе с тем известно, что ГАМК понижает тонус сосудов мозга [9], а в них выявлены ГАМК_A-рецепторы [29] и ферменты её синтеза и катаболизма [10, 11].

В соответствии с этим целью настоящего исследования явилось сравнительное изучение влияния ДГК на кровоснабжение интактного и ишемизированного

мозга с анализом ГАМК-ергического компонента в механизме его действия.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на 36 нелинейных крысах-самцах массой 250–400 г, наркотизированных уретаном (1200 мг/кг, внутривенно). Регистрацию локального мозгового кровотока в теменной области коры головного мозга крыс проводили с помощью лазерного доплеровского флоуметра ALF-21 фирмы “Transonic System Inc.” (США). Для этой цели игольчатый датчик флоуметра диаметром 0,8 мм устанавливали на теменной области коры с помощью микроманипулятора и коромысла. Одновременно регистрировали изменения уровня артериального давления в

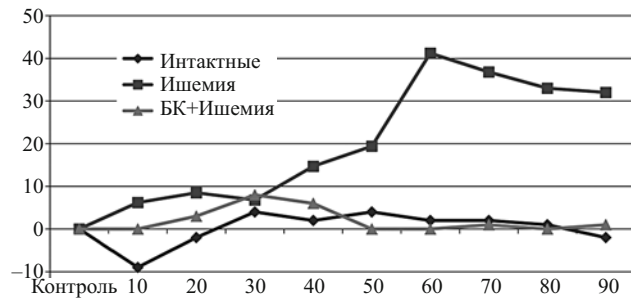


Рис. 2. Влияние ДГК (1 мг/кг, внутривенно) на локальный мозговой кровоток в коре головного мозга крыс интактных (Интактные), после глобальной переходящей ишемии (Ишемия) и на фоне действия бикукуллина (БК + Ишемия).

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

бедренной артерии. Для регистрации артериального давления в бедренную артерию вводили силиконовый катетер до уровня наружной подвздошной артерии. На основании данных датчиков кровотока и давления в реальном времени рассчитывали сопротивление сосудов. Запись показателей кровотока, артериального давления и сопротивления сосудов производили на полиграфе фирмы “ВЮРАК” (США), соединенным с персональным компьютером. Исследуемые вещества вводили через полиэтиленовый катетер в бедренную вену животных.

В работе использована модель глобальной переходящей ишемии головного мозга [35]. Согласно ранее полученным результатам, при указанной модели ишемии в наиболее уязвимой области мозга — стриатуме отмечается повышение содержания глутамата [1], а также снижение интенсивности свободнорадикального окисления и активности каталазы [6]. Последнее свидетельствует о выраженном повреждении мембранных структур указанного отдела мозга. Глобальную переходящую ишемию у крыс вызывали 10-минутной окклюзией с помощью зажимов обеих общих сонных артерий. Одновременно посредством кровопускания снижали уровень артериального давления до 40–50 мм рт. ст. Спустя 10 мин удаляли зажимы и кровь реинфузировали. Вещества вводили через 40–45 мин после глобальной переходящей ишемии мозга.

Радиорецепторный анализ возможного влияния ДГК на ГАМК_A-рецепторы проводили на препаратах мембран коры мозга крыс по модифицированным методам Ito, et al. [23] и Hawkinson, et al. [20]. После декапитации крыс структуры мозга немедленно замораживали в жидком азоте и хранили в низкотемпературном холодильнике при –85 °С. В день эксперимента фронтальную кору больших полушарий гомогенизировали в 20 объемах ледяного буфера (0,32 М сахара; рН 7,1) в гомогенизаторе “стекло — тефлон”. Гомогенат центрифугировали в ультрацентрифуге “Optima L-70K” (Beckman Coulter) в течение 10 мин

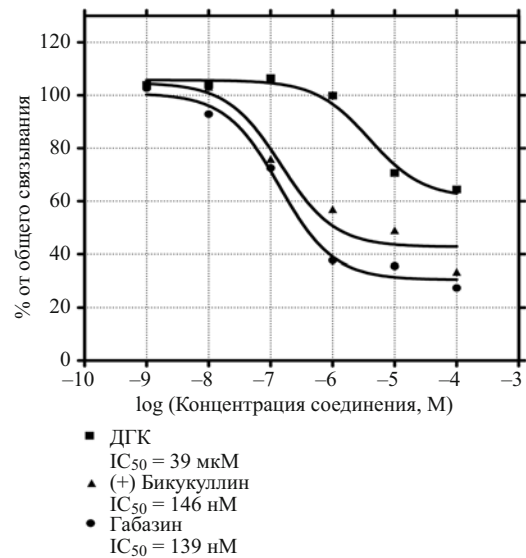


Рис. 3. Влияние соединений на *in vitro* связывание [³H-G]-SR 95531 ([³H-G]-габазина) с ГАМК_A-рецепторами коры мозга крыс.

при 1000 g. Супернатант повторно центрифугировали при 20000 g в течении 20 мин. Осадок ресуспендировали в 20 мл холодной дистиллированной воды и центрифугировали (8000 g 20 мин). Супернатант и желтый надосадочный слой вновь центрифугировали при 48000 g (20 мин). Осадок суспендировали в 0,05 М Tris-citrate буфере (рН 7,1) и центрифугировали при 48000 g 20 мин. Полученную мембранную фракцию замораживали и хранили при t –85 °С. В день эксперимента мембраны суспендировали в 40 объемах трис-цитратного буфера, центрифугировали 20 мин при 48000 g. Полученный осадок суспендировали в 40 объемах буфера и инкубировали при 24 °С в течение 30 мин и снова центрифугировали при 48000 g 20 мин. Концентрацию белка в образцах определяли по стандартной методике Лоури.

Для проведения радиолигандного анализа *in vitro* реакционную смесь, состоящую из 150 мкл буфера, 50 мкл [³H-G]-SR 95531, 250 мкл суспензии мембран мозга и 50 мкл изучаемых веществ — ДГК, (+)бикукуллина, SR 95531 (габазин), инкубировали при 0 °С в течение 45 мин. По окончании инкубации пробы фильтровали через стекловолокнистые фильтры GF/B (Whatman), фильтры просушивали и переносили во флаконы с 5 мл сцинтилляционной жидкости. Счет радиоактивности проводили на счетчике TriCarb 2900TR (“PerkinElmer”). Специфическое связывание рассчитывали как разницу между общим и неспецифическим связыванием, которое составляло 20 % от общего. Обработку результатов измерений осуществляли по программе GraphPad Prizm 5 Demo. Результаты выражали в виде IC₅₀ — концентрации, приводящей к 50 % ингибированию связывания [³H-G]-SR 95531 с рецептором.

Используемые вещества: (+) бикукуллин (TOCRIS Bioscience), докозагексаеновая кислота (Институт био-

логии моря им. А. В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток), 95531 (габазин — “Sigma Aldrich”), [$^3\text{H-G}$]-SR 95531 — 50 Кю/ммоль, (“PerkinElmer”, США).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistika 8.0 (Statistika Inc., США). При обработке данных использовали непараметрический двухвыборочный знаково-ранговый критерий Вилкоксона. Результаты рассматривали как значимые при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эксперименты, проведенные на интактных наркотизированных крысах, показали, что ДГК (1 мг/кг) при внутривенном введении не оказывает влияния на локальный мозговой кровоток в коре головного мозга крыс. При этом наблюдается статистически незначимое снижение уровня артериального давления.

Следующая серия опытов по изучению влияния ДГК на кровоснабжение мозга проводилась на крысах после глобальной преходящей ишемии. Оказалось, что у крыс после глобальной преходящей ишемии мозга ДГК в той же дозе вызывает постепенное увеличение локального мозгового кровотока, которое к 40 мин достигает достоверного значения (14,7 %), к 60 мин это увеличение составляет 41,2 % и далее кровоток остается повышенным до конца эксперимента (90 мин). Уровень артериального давления в этих опытах, начиная с 10 мин, снижается и остается пониженным до конца опыта (рис. 1, а, 2). Полученные данные указывают на то, что увеличение мозгового кровотока под влиянием ДГК обусловлено ее непосредственным влиянием на тонус сосудов мозга.

Таким образом, проведенное исследование показало, что ДГК увеличивает кровоток ишемизированного мозга, не оказывая влияния на кровоснабжение мозга интактных крыс. Следовательно, ДГК проявляет цереброваскулярную сосудорасширяющую активность у животных лишь в условиях ишемии мозга. Согласно результатам, полученным нами ранее, вещества с ГАМК-ергическим компонентом в механизме действия, в большей степени усиливают кровоснабжение ишемизированного мозга [2 – 5, 8]. Поэтому представлялось целесообразным исследовать эту сторону механизма цереброваскулярного эффекта ДГК в условиях глобальной преходящей ишемии головного мозга.

Для этой цели была проведена серия опытов, в которой изучали влияние ДГК на локальный мозговой кровоток у крыс, подвергнутых ишемическому воздействию на фоне действия блокатора ГАМК_A-рецепторов — бикикуллина. Установлено, что на фоне действия бикикуллина (0,5 мг/кг, внутривенно) ДГК теряет способность усиливать кровоснабжение ишемизированного мозга, т.е. анализатор блокирует сосудорасширяющий эффект полиненасыщенной жирной кислоты (рис. 1, б, 2). Следовательно, ГАМК-ергические механизмы сосудов мозга участвуют в реализации сосудорасширяющей активности ДГК.

Для проверки предположения методом радиолигандного анализа *in vitro* была изучена возможность ДГК непосредственно взаимодействовать с ГАМК_A-рецепторами с использованием мембран мозга крыс. Показано (рис. 3), что нерадиоактивный SR-95531 (габазин) вдвое уменьшает связывание [$^3\text{H-G}$]-SR 95531 на ГАМК-участке рецептора в концентрации 0,139 мкМ. Близкую эффективность демонстрирует другой конкурентный антагонист бикикуллин, величина IC_{50} которого составляет 0,146 мкМ. Внесение в среду инкубации препаратов мембран и радиоактивного лиганда [$^3\text{H-G}$]-SR 95531 различных концентраций ДГК обнаруживает у нее меньшую, но фармакологически значимую способность к конкуренции за места связывания ГАМК, характеризуемую величиной IC_{50} , равной 39 мкМ. Следовательно, ДГК может непосредственно взаимодействовать с ГАМК_A-рецепторами сосудов мозга, проявляя при этом бикикуллин-зависимое действие.

В настоящее время рассматриваются, в основном, два пути воздействия ДГК и некоторых других полиненасыщенных жирных кислот (в первую очередь — арахидоновой) на ГАМК-систему: рецепторный и мембранный. В пользу первого свидетельствуют такие факты, как возможность конкуренции за места связывания с известными участками ГАМК_A-рецепторного комплекса на мембранных препаратах в условиях *in vitro* [28, 34], а также бикикуллин- и пикротоксин-зависимость специфического эффекта *in vitro* и *in vivo* [19, 33, 36]. Вторая гипотеза основывается на фактах первичного взаимодействия с липидной фазой мембран, изменения физических свойств которых способны индуцировать конформационные сдвиги ГАМК_A-рецептора, ведущие к модуляции ионных каналов [14, 37].

Не исключается, впрочем, и третий вариант, включающий оба указанных выше механизма, при котором первичная мишень и/или знак модулирующего эффекта может определяться как действующей дозой экзогенной ДГК, так и тканевой концентрацией эндогенных полиненасыщенных жирных кислот, изменяющейся при сосудистой патологии мозга.

Таким образом, полученные результаты, а также способность ряда веществ с ГАМК-ергическим компонентом действия улучшать кровоснабжение мозга исключительно в условиях ишемии [2 – 5, 8] подтверждают гипотезу, согласно которой ГАМК следует рассматривать в качестве эндогенного сосудорасширяющего фактора при ишемическом поражении мозга.

ВЫВОДЫ

1. ДГК усиливает кровоснабжение мозга, подвергнутого глобальной преходящей ишемии, и не влияет на кровоток интактного мозга.
2. Специфический блокатор ГАМК_A-рецепторов бикикуллин устраняет сосудорасширяющий эффект ДГК

в условиях ишемии мозга, что указывает на ГАМК-ергический компонент в механизме этого эффекта.

3. Результаты радиолигандного анализа *in vitro* указывают на возможность непосредственного взаимодействия ДГК с ГАМК_A-рецепторами сосудов мозга.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. С. Байкова, И. А. Кадников, М. В. Воронин и соавт., *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, **151**(5), 526 – 529 (2011).
2. А. В. Гнездилова, Т. С. Ганьшина, Д. В. Масленников и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **74**(8), 28 – 31 (2011).
3. И. Н. Курдюмов, Т. С. Ганьшина, Н. Р. Мирзоян и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **71**(4), 26 – 29 (2008).
4. Д. В. Масленников, Т. С. Ганьшина, О. Н. Олейникова и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **75**(4), 13 – 16 (2012).
5. И. В. Силкина, Т. С. Ганьшина, С. Б. Середенин, Р. С. Мирзоян, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **68**(1), 20 – 24 (2005).
6. И. В. Силкина, Т. А. Зенина, С. Б. Середенин, Р. С. Мирзоян, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **69**(4), 47 – 50 (2006).
7. З. А. Суслина, М. М. Танащян, В. Г. Ионова, *Ишемический инсульт: кровь, сосудистая стенка, антитромботическая терапия*. Москва, Медицина (2005).
8. Р. С. Мирзоян, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **66**(2), 53 – 56 (2003).
9. С. А. Мирзоян, В. П. Акопян, *Фармакол. и токсикол.*, **5**, 572 – 574 (1967).
10. С. А. Мирзоян, Б. А. Казарян, В. П. Акопян, *Доклады АН СССР*, **190**(5), 1241 – 1243 (1970).
11. С. А. Мирзоян, Б. А. Казарян, В. П. Акопян, *Доклады АН СССР*, **214**(2), 465 – 468 (1974).
12. N. Blondeau, O. Petraut, S. Manta, et al., *Circ. Res.*, **101**, 176 – 184 (2007).
13. S. Chalon, L. Zimmer, D. Guilloteau, G. Durand, *Lipids*, **36**, 937 – 944 (2001).
14. M. Chisari, H.-J. Shu, A. Taylor, et al., *Br. J. Pharmacol.*, **160**, 130 – 141 (2010).
15. S. C. Cunnane, M. A. Crawford, *Comp. Biochem. Physiol. Part A. Mol. Integr. Physiol.*, **136**, 17 – 26 (2003).
16. T. N. Eady, L. Khoutorova, A. Obenaus, et al., *Neurobiol. Dis.*, **62**, 1 – 7 (2014).
17. A. A. Farooqui, *Beneficial Effects of Fish Oil on Human Brain*, DOI 10.1007 / 978-1-4419-0543-7 5, Springer Science Business Media, LLC (2009).
18. R. A. M. Haast, A. J. Kiliaan, *Prostaglandins Leukotrienes Essent. Fatty Acids* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.plefa.2014.01.002i>.
19. H. Hamano, J. Nabekura, M. Nishikawa, T. Ogawa, *J. Neurophysiol.*, **75**, 1264 – 1270 (1996).
20. J. Hawkinson, M. Acosta-Burrue, C. Kimbrough, et al., *Eur. J. Pharmacol.*, **304** (1 – 3), 141 – 146 (1996).
21. S.-H. Hong, L. Belayeva, L. Khoutorova, et al., *J. Neurol. Sci.* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2013.12.033>.
22. C. R. Hooijmans, C. E. Van der See, P. J. Dederen, et al., *Neurobiol. Dis.*, **33**, 482 – 498 (2009).
23. Y. Ito, T. Koshihara, M. Doi, et al., *Synapse*, **10**(4), 326 – 333 (1992).
24. N. Itokazu, Y. Ikegaya, M. Nishikawa, N. Matsuki, *Brain Res.*, **862**, 211 – 216 (2000).
25. P. A. Jackson, J. L. Reay, A. B. Scholey, D. O. Kennedy, *Biol. Psychol.*, **89**, 183 – 190 (2012).
26. L. J. Karhunen, R. I. Lappalainen, E. J. Vanninen, et al., *J. Neurol.*, **120**, 1675 – 1684 (1997).
27. J. Kitayama, F. M. Faraci, S. R. Lentz, D. D. Heistad, *Stroke*, **38**, 2136 – 2141 (2007).
28. J. A. Koenig, I. L. Martin, *Biochem. Pharmacol.*, **44**(1), 11 – 15 (1992).
29. D. N. Krause, E. Roberts, E. Wong, et al., *Brain Res. Bul.*, **5**, 173 – 177 (1980).
30. W. Li, R. Prakash, D. Chawla, W. Du, et al., *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **304**, R1001 – R1008 (2013).
31. S.-N. Lim, W. Huang, J. C. E. Hall, et al., *Experim. Neurology*, **239**, 13 – 27 (2013).
32. H. W. Lin, M. Perez-Pinzon, *CNS@Neurological Disorders-Drug Targets*, **12**(3), 316 – 324 (2013).
33. J. Nabekura, K. Noguchi, M.-R. Witt, et al., *J. Biol. Chem.*, **273**, 11056 – 11061 (1998).
34. M. Nielsen, M. R. Witt, H. Thogersen, *Eur. J. Pharmacol.*, **146**(2 – 3), 349 – 353 (1988).
35. A. P. Raval, Ch. Liu, B. R. Hu, *Rat Model of Global Cerebral Ischemia: The Two-Vessel Occlusion (2VO) Model of Forebrain Ischemia*, From: Animal Models of Acute Neurological Injuries, J. Chen (eds.), New York, Totowa, NJ (2009), pp. 77 – 86.
36. A. Y. Taha, T. Zahid, T. Epps, et al., *Brain Res.*, **1537**, 9 – 17 (2013).
37. R. Sogaard, Th. M. Werge, C. Bertelsen, et al., *Biochemistry*, **45**, 13118 – 13129 (2006).
38. H. Tsukada, T. Kakiuchi, I. Ando, et al., *Brain Res.*, **749**, 10 – 17 (1997).
39. H. Tsukada, T. Kakiuchi, D. Fukumoto, et al., *Brain Res.*, **862** (1 – 2), 180 – 186 (2000).
40. Y. Yua, Y. Wu, C. Patch, et al., *J. Nutritional Biochem.*, **24**, 1349 – 1358 (2013).

Поступила 02.10.14

GABA-ERGIC MECHANISM OF CEREBROVASCULAR AND ANTIISCHEMIC EFFECTS OF DOCOSAHEXAENOIC ACID

R. S. Mirzoyan¹, T. S. Gan'shina¹, A. V. Gnezdilova¹, G. I. Kovalev¹, Yu. Yu. Firstova¹, V. V. Bezuglov², and N. M. Gretskeya²

¹ Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, ul Baltiiskaya, 8, Moscow, 125315 Russia

² Shemyakin – Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

In experiments on rats, measurements of the local blood flow in the cortex of cerebrum with the aid of a laser Doppler flow meter showed that docosahexaenoic acid (DHA) enhanced the local cerebral circulation in animals with global transient cerebral ischemia, while not influencing that in intact animals. This vasodilatory effect of DHA in ischemized rats is blocked by bicuculline (specific GABA_A receptor blocker), which is indicative of a GABA-ergic mechanisms of the vascular tone regulation. The results of radioligand binding assay *in vitro* showed the possibility of direct DHA interaction with cerebrovascular GABA_A receptors.

Keywords: docosahexaenoic acid (DHA); cerebral circulation; global transient cerebral ischemia; bicuculline; gabasine; GABA_A receptors.