

ПРОСТАЯ МЕТОДИКА ПОИСКА ВЕЩЕСТВ С ГАМКв-МИМЕТИЧЕСКИМ ДЕЙСТВИЕМ

Ю. А. Ханина

Волгоградский государственный медицинский университет,
кафедра фармакологии и биофармации ФУВ

В статье предлагается новая методика для поиска веществ с ГАМКв-миметическим действием с использованием изолированного рога матки. Изучено влияние баклофена в условиях меняющейся внеклеточной концентрации ионов K^+ и Ca^{2+} в различных физиологических растворах.

Ключевые слова: ГАМКв-рецепторы, баклофен, изолированный рог матки, калий, кальций.

A SIMPLE METHOD OF SEARCHING FOR COMPOUNDS WITH GABA_B-MIMETIC ACTION

Y. A. Khanina

Volgograd State Medical University,
Department of pharmacology and biopharmacy of the DCE

The paper proposes a new method of searching for substances with GABA_B-mimetic action using the isolated uterus horn. We studied the effect of baclofen on changing extracellular concentration of K^+ and Ca^{2+} in a variety of physiological solutions.

Key words: GABA_B-receptors, baclofen, isolated uterus, potassium, calcium.

Метаботропные ГАМКв-рецепторы широко представлены в центральной нервной системе и в периферических автономных терминалях, а также в предсердиях, сосудах, кишечнике, миометрии. Это трансмембранные рецепторы, которые связаны через G-белки с калиевыми каналами [6]. Их активация вызывает ингибирование аденилатциклазной активности со снижением Ca^{2+} и повышением K^+ проводимости в нейрональной мембране. Кроме того, данные рецепторы напрямую связаны посредством G-белка с потенциалзависимыми кальциевыми каналами N- и P/Q-типов, которые вовлечены в процесс синаптического высвобождения нейромедиаторов [1, 5].

Иммунологические исследования показали наличие ГАМКв-рецепторов в желудочно-кишечном тракте (преимущественно в нейронах слизистой и мышечной оболочек кишечника, слизистой желудка) [4], при этом был выявлено уменьшение их количества по мере движения от верхних отделов ЖКТ к нижним [7]. Установлено, что агонист ГАМКв-рецепторов 3-амино-2-флуоропропил фосфиновая кислота предупреждает расслабление нижнего пищеводного сфинктера, что перспективно для лечения гастроэзофагеальной рефлюксной болезни [1].

Доказано присутствие ГАМКв-рецепторных комплексов на миометрии, предоставляет возможность использования данного объекта для выявления соединений с ГАМКв-ергическим действием [3]. Выявлено ингибирующее действие агонистов ГАМКв-рецепторов на сократительную активность изолированной матки [2, 8]. Утеролитическая активность агонистов ГАМКв-рецепторов делает перспективным поиск препаратов, применяемых при угрозе невынашивания беременности.

Спазмолитическую активность веществ определяют в исследованиях *in vitro*, используя различные методики, в том числе метод изолированных органов и тканей, регистрируя изменения механической активности органа или электрических потенциалов. Объектами исследования могут выступать крупные сосуды, кишечник и др. Наличие ГАМКв-рецепторов в миометрии делает возможным скрининг веществ со спазмолитическим действием при его использовании.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Создание простой методики поиска веществ с ГАМКв-миметическим действием с использованием изолированного рога матки крыс.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

При проведении исследования использовались следующие анализаторы: агонист ГАМКв-рецепторов баклофен «Sigma», блокатор калиевых каналов толбутамид «Sigma», блокатор кальциевых каналов нитрендипин «Sigma».

Исследование выполнено на рогах матки, полученных от половозрелых самок крыс линии Вистар массой 200—250 г в стадии диэструса. Животные перед экспериментом содержались в условиях вивария при естественном освещении на стандартной диете без ограничения доступа к воде и пище. Эксперименты проводили в соответствии с принципами биоэтики, правилами лабораторной практики (GLP), в соответствии с этическими нормами, изложенными в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1988), Приказом МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 «Об утверждении

правил лабораторной практики» и Приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.1977.

Животных наркотизировали раствором хлоралгидрата (интраперитонеально 400 мг/кг) и извлекали отрезок рога матки длиной 15—20 мм. Тщательно очищенный от соединительной ткани рог за 45 минут до начала эксперимента фиксировали в ванночке для изолированных органов, заполненной буферным раствором Кребса [118 ммоль/л NaCl, 4,7 ммоль/л KCl, 1,64 ммоль/л MgSO₄, 2,5 ммоль/л CaCl₂, 25 ммоль/л NaHCO₃, 1,25 ммоль/л NaH₂PO₄, 5,55 ммоль/л глюкозы (pH 7,4)], с постоянной аэрацией и термостатированием при 27 °С. Помимо этого использовались: гипокальциевый раствор Тироде [136,9 ммоль/л NaCl, 2,68 ммоль/л KCl, 0,9 ммоль/л CaCl₂, 1,05 ммоль/л MgSO₄, 11,9 ммоль/л NaHCO₃, 0,42 ммоль/л NaH₂PO₄, 5,55 ммоль/л глюкозы (pH 7,4)]; раствор де Жалона [154 ммоль/л NaCl, 5,63 ммоль/л KCl, 0,55 ммоль/л CaCl₂, 5,95 ммоль/л NaHCO₃, 2,775 ммоль/л глюкозы (pH 7,4)]. В течение периода адаптации и последующего эксперимента буфер в ванночке меняли каждые 15 мин.

Спонтанные и навязанные электрической стимуляцией сокращения рога матки регистрировали с помощью комплексной установки для изолированных органов: ванночка («Ugo Basile», Италия), изотонический датчик и самописец («Unigecord Ugo Basile», Италия); pH-метр («Измерительная техника», Россия). pH растворов в каждом эксперименте равнялась 7,4. Воздействие током на изолированный рог матки изучали в растворе Кребса, амплитуда составляла 50 В с частотой 0,25 Гц, длительность воздействия 10 с, повторный ток давали через 3 минуты после исходного.

Между каждым введением вещества препарат изолированного рога отмывался не менее 15—20 мин. Сокращения регистрировали с помощью изотонического датчика и самописца при изотонической нагрузке в 0,5 г. Об уровне ГАМКв-активности судили по изменению сократительной активности рога матки при введении агониста ГАМКв-рецепторов баклофена в концентрациях 10⁻⁷—10⁻³ моль/л по сравнению с исходным уровнем спонтанных сокращений (Δ %).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

После ввода баклофена в различных концентрациях наблюдалось снижение средней амплитуды спонтанных сокращений (h) в 93 % случаев. В 7 % случаев изменений не отмечалось.

При введении баклофена в концентрации 10⁻⁷ моль/л в большинстве случаев (75 %) снижение средней амплитуды спонтанных сокращений составляло до 30 % относительно исходного уровня и в среднем составило 16,6 %. При введении баклофена в концентрации 10⁻⁵ моль/л в 39 % случаев снижение средней амплитуды составило свыше 30 % и в 50 % случаев до 30 % относительно исходного уровня. Амплитуда спонтанных сокращений уменьшилась в среднем на 21 %.

При введении баклофена в концентрации 10⁻³ моль/л в 57 % случаев наблюдалось снижение средней амплитуды спонтанных сокращений свыше 30 % относительно исходного уровня, при этом в 14 % случаев — свыше 50 % (среднее значение — 33,6%).

В 82,5 % случаев наблюдалось снижение средней продолжительности сокращения (b) после ввода баклофена, при этом в 7,5 % случаев изменений не наблюдалось, а в 10 % — средняя продолжительность сокращения увеличилась. При введении баклофена в концентрации 10⁻⁷ моль/л снижение средней продолжительности сокращения в 83 % случаев составило до 30 %, в концентрации 10⁻⁵ моль/л снижение свыше 30 % наблюдалось уже в 50 % случаев, а в концентрации 10⁻³ моль/л — в 67 % случаев.

Если сравнивать средние площади пиков (S) исходных спонтанных сокращений и после введения баклофена, то в 97,5 % случаев выявлено уменьшение. При введении баклофена в концентрации 10⁻⁷ моль/л уменьшение средней площади пика составило в среднем 30,2 %, при концентрации 10⁻⁵ моль/л — 38,1 %, при концентрации 10⁻³ моль/л — 48,9 %.

Увеличение количества спонтанных сокращений (n) после ввода баклофена наблюдалось в 80 % случаев (32 из 40), не изменялось в 17,5 % (7 из 40), в 1 случае снизилось на 1. В концентрации 10⁻³ моль/л прирост количества сокращений составил в среднем 16,3 %, в концентрации 10⁻⁵ моль/л — 25,4 %, в концентрации 10⁻⁷ моль/л — 30,2 %. Следовательно, выявлен положительный хронотропный эффект, который обратно пропорционален концентрации баклофена.

Отрицательный инотропный эффект баклофена обусловлен активацией пресинаптических ГАМКв-рецепторов, связанных с потенциалзависимыми кальциевыми каналами, что приводит к уменьшению высвобождения нейротрансмиттеров и снижению поступления ионов Ca²⁺ в клетку, а также открытию постсинаптических калиевых каналов, повышением выхода ионов K⁺ из клетки и гиперполяризации мембраны.

Далее исследовалось влияние баклофена в условиях меняющейся внеклеточной концентрации ионов калия и кальция на спонтанное мышечное сокращение в различных физиологических растворах.

Изменения средней амплитуды спонтанных сокращений (h), средней продолжительности сокращений (b) и средней площади пика (S) в процентном соотношении при введении баклофена в различных концентрациях в трех физиологических растворах представлены в табл.

В растворе с максимальным содержанием ионов Ca²⁺ (раствор Кребса) среднее количество спонтанных сокращений за фиксированный промежуток времени составило 6,4, а прирост после ввода баклофена — 16 %, что можно связать с повышением возбудимости мембраны и сократительной активности при увеличении концентрации внеклеточного кальция. ГАМКв-миметическое действие баклофена приводит к снижению поступления ионов Ca²⁺ в клетку. Следует отметить наибольший

Изменения показателей спонтанных сокращений при вводе баклофена в различных физиологических растворах

Раствор	Концентрация 10^{-3}			Концентрация 10^{-5}			Концентрация 10^{-7}		
	% h	% b	% S	% h	% b	% S	% h	% b	% S
Жалона	-11	-33	-34	-20,9	-24	-38,4	-9,2	-20,5	-19,9
Кребса	-62,4	-3,9	-65,5	-18,3	-8,2	-32,6	-22,9	-19,5	-38,8
Тироде	-72	-11,4	-76,2	-27,6	-20,1	-43,6	-15,2	-21,5	-28,6

отрицательный инотропный эффект баклофена в концентрации 10^{-7} моль/л по сравнению с другими растворами.

При введении блокатора кальциевых каналов L-типа (нитрендипин) в концентрации 10^{-7} моль/л в растворе Кребса отмечалось снижение силы спонтанных сокращений (в среднем на 7 %), продолжительности сокращений (в среднем на 4 %) и средней площади пика (в среднем на 12 %). Количество спонтанных сокращений практически не изменилось. Эффект баклофена был менее выражен по сравнению с исходным: наблюдалось уменьшение количества сокращений, инотропное действие практически не изменилось.

В растворе Тироде со средним содержанием ионов K^+ и Ca^{2+} наблюдалось наибольшее количество исходных спонтанных сокращений (в среднем 9,7), их средний прирост после ввода баклофена составил 30 %. Отрицательный инотропный эффект баклофена был наибольшим в концентрациях 10^{-3} и 10^{-5} моль/л. Это вероятно связано с достаточным содержанием ионов Ca^{2+} для развития сокращения, а при данной концентрации ионов K^+ мембранный потенциал приближается к критическому уровню деполяризации, в результате повышается возбудимость мембраны клеток.

В растворе де Жалона (максимальная концентрация ионов K^+ и минимальная концентрация ионов Ca^{2+}) было выявлено наименьшее количество спонтанно возникающих сокращений (4,8), что связано с медленным выходом ионов K^+ из клетки и удлинением фазы реполяризации. При снижении концентрации внеклеточного кальция происходит истощение его запасов в саркоплазматическом ретикулуме, что ведет к уменьшению силы сокращений. Отрицательное инотропное влияние баклофена на спонтанные сокращения было выражено в меньшей степени по сравнению с другими растворами, но наблюдался положительный хронотропный эффект (прирост среднего количества сокращений составил 27 %).

Для изучения роли калиевых каналов в действии баклофена на миокард были выполнены исследования с введением блокатора калиевых каналов (толбутамид). В концентрации 10^{-7} моль/л в растворе де Жалона наблюдались следующие изменения: уменьшение количества спонтанных сокращений (в среднем на 14 %), силы сокращений (в среднем на 9 %), увеличение продолжительности сокращения (в среднем на 11 %), незначительное снижение средней площади пика (в среднем на 2 %). Эффект связан с накоплением ионов K^+ внутри клетки, уменьшением мембранного потенци-

ала, удлинением фазы реполяризации и снижением возбудимости. При сравнении эффекта баклофена после ввода блокатора калиевых каналов изначально в концентрации 10^{-7} моль/л было выявлено большее снижение силы сокращений (в среднем на 17 %, исходно — 14 %), но меньшее снижение продолжительности сокращения (в среднем на 9 %, исходно — 19 %). Прирост количества спонтанных сокращений составил в среднем 10,8 % (исходно — 33,7 %).

Можно сделать вывод, что ответ на введение агониста ГАМКв-рецепторов баклофена зависит от ионного состава физиологического раствора и работы ионных каналов, при этом при увеличении концентрации ионов Ca^{2+} усиливается инотропный, а при увеличении концентрации ионов K^+ — хронотропный эффект.

При введении блокатора кальциевых каналов эффект баклофена снижается, что согласуется с его механизмом действия. При введении блокатора калиевых каналов инотропный эффект усиливается из-за накопления внутриклеточного калия, но снижается хронотропный эффект баклофена.

Далее было проведено изучение влияния баклофена на сокращения, вызванные электростимуляцией. Регистрировали изначальные амплитуды навязанных электрической стимуляцией сокращений (исходное и повторное) в растворе Кребса, затем вводили баклофен в концентрации 10^{-7} моль/л и через 5 минут экспозиции воздействовали током.

При сравнении величин навязанных сокращений было выявлено снижение амплитуды сокращения после ввода баклофена в концентрации 10^{-7} моль/л в среднем на 17 %.

Также сравнивались величины исходного и повторного сокращения, выявилось следующее:

- снижение амплитуды повторного сокращения по сравнению с исходным составило в среднем 18 %, после ввода баклофена — 13 %;
- снижение длительности сокращений составило 25 %, после ввода баклофена — 12 %;
- площадь под кривой сокращения уменьшилась в исходном на 39 %, после ввода баклофена — на 22 %.

Следовательно, разница между двумя сокращениями (исходным и повторным) при вводе баклофена была менее выражена.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Изолированный рог матки можно использовать в качестве объекта для скрининга веществ с ГАМКв-

миметическим действием, оценивая влияния на амплитуду и количество спонтанных, а также навязанных электростимуляцией сокращений.

2. Выявлен дозозависимый эффект при введении агониста ГАМКв-рецепторов баклофена (с увеличением концентрации нарастает отрицательный инотропный эффект).

3. Солевой состав раствора, в котором находится изолированный орган, также оказывает влияние на ответ при введении баклофена. При этом наибольший инотропный эффект в концентрации 10^{-7} моль/л наблюдается в растворе Кребса с максимальным содержанием ионов Ca^{2+} , а хронотропный — в растворе де Жалона (максимальная концентрация ионов K^+). В растворе Тироде со средними концентрациями ионов K^+ и Ca^{2+} ино- и хронотропный эффекты были наиболее выражены в концентрациях 10^{-3} и 10^{-5} моль/л.

4. Блокада ионных каналов также оказывает влияние на действие баклофена, при этом усиление инотропного (но снижение хронотропного) эффекта наблюдается при блокаде калиевых каналов, а при блокаде кальциевых каналов — общее снижение действия баклофена.

ЛИТЕРАТУРА

1. Перфилова В. Н., Тюренков И. Н. ГАМКв-рецепторы: структура и функции // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2010. — Т.73, № 11. — С. 44—48

2. Сергеев П. В. Роль ГАМКергической системы в регуляции сократительной функции матки и направление поиска эффективных гравидопротекторов: Обзор / Сер-

геев П. В., Сизов П. И., Духанин А. С. // Эксперим. и клинич. фармакология. — 1995. — Т. 58, № 1. — С. 65—68.

3. Сизов П. И. Участие ГАМКА- и ГАМКБ-рецепторов в механизме торможения сократительной активности миомерия кроликов под влиянием ГАМК, АОУК и фенибута / Сизов П. И., Яснецов В. С. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 1990. — Т. СХ, № 11.0365-9615. — С. 503—504.

4. Hyland N. P. and Cryan J. F. A gut feeling about GABA: focus on GABAB receptors // Front. Pharmacol. — 2010. — Vol. — P. 1:124

5. Mintz I. M., Bean B. P. GABAB receptor inhibition of P-type Ca^{2+} channels in central neurons // Neuron. — 1993. — Vol. 10, № 5. — P. 889—898

6. Misgeld U., Bijak M., Jarolimek W. A physiological role for GABAB receptors and the effects of baclofen in the mammalian central nervous system // Prog. Neurobiol. — 1995. — Vol. 46, № 4. — P. 423—462.

7. Nakajima K., Tooyama I., Kuriyama K., Kimura H. Immunohistochemical demonstration of GABAB receptors in the rat gastrointestinal tract // Neurochem. Res. — 1996. — Vol. 21. — P. 211—215.

8. Riesz M., Erdo S.L. GABAB receptors in the rabbit uterus may mediate contractile responses // Eur J Pharmacol. — 1985. — Vol. 119 (3). — P. 199—204.

Контактная информация

Ханина Юлия Алексеевна — аспирант кафедры фармакологии и биофармации ФУВ, Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail: juliagolubeva@mail.ru