

УДК: 615.011.4

Небесна Т.Ю.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ФАРМАКОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ СТЕРЕОСЕЛЕКТИВНОСТІ S(-)-АМЛОДИПІНУ

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця (м. Київ)

Резюме. В роботі проведено експериментально-фармакологічне дослідження S(-)-амлодипіну порівняно з рацемічним препаратом за допомогою квантово-фармакологічних та міографічних методів. Встановлено, що відмінності в просторовому розташуванні функціональних груп зумовлюють наявність фармакологічної ефективності S-амлодипіну та її відсутність у R-енантіомеру. Результати міографічних експериментів обґрунтовують дані клінічних досліджень, згідно з якими доза S(-)-амлодипіну може бути знижена до 2,5 мг порівняно з 5 мг рацемічного препарату.

Ключові слова: амлодипін, фармакофор, ізольована аорта.

Вступ

Хіральність — це геометрична властивість жорсткого об'єкту (молекули) не співпадати з його дзеркальним відображенням. Два дзеркальні відображення хіральної молекули називають енантіомерами. Енантіомери існують попарно. Обидва енантіомери мають однаковий хімічний склад, і можуть бути однаково зображені в двохвимірному просторі, однак в хіральному оточенні, як наприклад рецептори і ферменти, вони проявляють різні властивості. Рацемат — це суміш рівних кількостей двох енантіомерів однієї речовини [6]. Хіральність в лікарських засобах найчастіше є результатом зв'язування вуглецевого атома з чотирма різними замісниками [3]. Окремі енантіомери інколи називають ізомерами або стереоізомерами. Два енантіомери одного лікарського засобу краще всього ідентифікуються на підставі їх абсолютної конфігурації або оптичного обертання. Абсолютна конфігурація в хіральному центрі позначається як R або S, щоб однозначно описати тривимірну структуру молекули. R походить від латинського слова *rectus* і означає вправо або за годинниковою стрілкою, S — від латинського *sinister* — вліво, або проти годинникової стрілки [6].

Різниця між дією двох енантіомерів лікарського засобу проілюстрована на рис. 1.

Прикладами вже впроваджених в клінічну практику "енантіо-чистих" препаратів є: левоміцетин, левофлоксацин, леводопа, езомепразол, левосальбутамол, R-ондансетрон, S-кетамін та ін. [2, 3]. Однак справжню революцію

енантіомери спричинили в кардіології. Зокрема в Україні доступними стали S-амлодипін, S-атенолол та S-метопролол. Для цих лікарських засобів показано відмінності в ефективності рацематів та лівообертаючих енантіомерів на рівні багаточетових клінічних досліджень [1, 3, 4]. Складніше пояснити фармакологічні молекулярні механізми, які лежать в основі стереоспецифічності даних лікарських засобів. Найбільш дослідженим з цієї точки зору є антагоніст повільних кальцієвих каналів дигідропіридинового ряду амлодипін.

Амлодипін проявляє різноманітні фармакологічні ефекти: гіпотензивний, органопротекторний (кардіо- та ангіопротекторний), знижує гіпертрофію лівого шлуночка, запобігає прогресуванню атеросклероза, не має негативного впливу на рівень електролітів, вуглеводний, ліпідний та пуриновий види обміну, знижує гіперреактивність бронхів [4, 8]. Амлодипін показаний для застосування при артеріальній гіпертензії хворим похилого віку, хворим з ішемічною хворобою серця, гіпертрофією лівого шлуночка, атеросклерозом сонних та коронарних артерій, вагітним. Амлодипін також застосовується за наявності протипоказань до прийому бета-адреноблокаторів [9, 11].

Клініко-фармакологічними дослідженнями встановлено, що S(-)-амлодипін має ряд важливих переваг порівняно з рацематом:

— доза S(-)-амлодипіну може бути знижена до 2,5 мг порівняно з 5 мг рацемічного препарату;

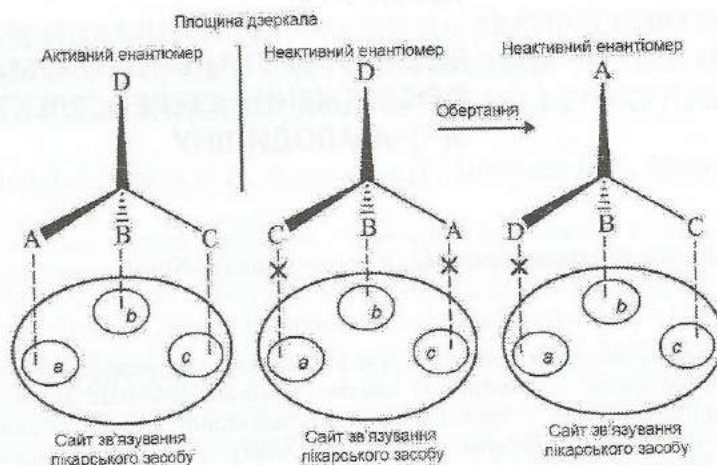


Рис. 1. Механізм стереоселективності на прикладі лікарського засобу рецепторного типу дії: ділянки лікарського засобу, позначені А, В та С, повинні взаємодіяти з відповідними ділянками сайту зв'язування а, b та с для того, щоб препарат проявив фармакологічний ефект; активний енантіомер препарату має тривимірну структуру, яка дозволяє таку взаємодію; на відміну від нього неактивний енантіомер при будь-якому розташуванні у просторі не може бути співставлений з сайтом зв'язування — за матеріалами [10] зі змінами

- S(-)-амлодипін має більшу тривалість періоду напіввиведення (49,6 г порівняно з 34,9 г для R-амлодипіну), а його кліренс має менші індивідуальні коливання, ніж кліренс R-ізомеру;
- S(-)-амлодипін має значно меншу частоту розвитку побічних ефектів (1,61%), зокрема набряків нижніх кінцівок. Встановлено, що R-амлодипін викликає надмірне утворення оксиду азоту, наслідком чого є дилатація прекапілярно-артеріолярної ланки судин нижніх кінцівок, через яку змінюється прекапілярний постуральний вазоконстрикторний рефлекс — важливий механізм, попереджаючий розвиток набряків нижніх кінцівок при вертикальному положенні тіла [1, 3, 4].

Метою даної роботи було дати теоретичне обґрунтування більш високої ефективності S(-)-амлодипіну порівняно з рацемічними препаратами за допомогою квантово-фармакологічних та міографічних методів.

Методи

I. Квантово-фармакологічні дослідження. Оптимізація геометрії (пошук найбільш стабільної конформації) молекул R- та S-амлодипіну проведені за методом функціонала густини (DFT) з використанням градієнтного гібридного функціонала B3LYP (трьохкомпонент-

ний функціонал Бекке і Лі-Янг-Парра). Розрахунки зарядів на атомах та значень електростатичного потенціалу досліджуваних молекул проводили з використанням програм PC GAMESS/FireFly 7.1. Для візуалізації молекул застосовували програму ChemCraft 1.5 (b286) [5].

II. Міографічні дослідження проводили на препаратах ізольованої аорти шурів-самців лінії Вістар (вагою 200–250 г). Аорту ізольовали та поміщали в аерований фізіологічний розчин наступного складу (мМ): NaCl 119; NaHCO₃ 25; KCl 4,7; KH₂PO₄ 1,18; MgSO₄ 1,17; CaCl₂ 1,5; глюкоза 11. Вирізували кільця шириною 2 мм та закріплювали на двох гачках (один нерухомий, інший — приєднаний до датчика скорочень) в ванночці для міографічних досліджень об'ємом 1 мл. Кільця аорти витримували в проточному фізіологічному розчині 45 хвилин при температурі 37°C перед початком експерименту. Скорочення викликали гіперкалієвим розчином (в якому NaCl був частково заміщений на KCl, концентрація KCl складала 80 мМ). Всі розчини подавались за допомогою перистальтичного насосу зі швидкістю 2,5 мл/хв. Період експозиції становив 2,5 хв, період відмивання 10 хв. Після досягнення повторюваності амплітуди скоро-

чень препарати аорти протягом 20 хв промивали фізіологічним розчином з рацемічним амлодипіном (концентрація $5 \cdot 10^{-7}$) або S(-)-амлодипіном (концентрація $2,5 \cdot 10^{-7}$). Після цього реєстрували повторні скорочення, викликані гіперкалієвим розчином. Силу скорочень оцінювали за площею під кривою скорочення, порівнювали відносно середнього максимального значення, прийнятого за 100%. Кожний дослід повторювали 8 раз, статистичну достовірність оцінювали за критерієм Фішера.

Результати та обговорення

За хімічною природою амлодипін — 3-етилловий-5-метиловий ефір 2-[(аміноетокси)-метил]-4-(орто-хлорфеніл)-1,4-дигідро-6-метил-3,5-піридиндикарбонової кислоти. Молекула амлодипіну є хіральною, асиметричним центром в молекулі амлодипіну є атом вуглецю C(17), позначений зірочкою на рис. 2.

На рис. 3 представлена молекула S(-)-амлодипіну в двох проекціях, а також нумерація "важких" атомів в молекулі амлодипіну (важкими називаються всі атоми, крім водневих), прийнята при квантово-хімічних розрахунках.

В попередніх дослідженнях препаратів 1,4-дигідропіридинового ряду показано, що для блокування кальцієвих каналів важливими фармакофорними фрагментами молекули виступають три гідрофобних ділянки, два акцептора водневого зв'язку та один фрагмент, здатний до поляризації з утворенням позитивно-зарядженої групи [7, 12]. Отже саме ці струк-

турні фрагменти в молекулі S(-)-амлодипіну мають специфічне просторове розташування, відмінне від правообертаючого ізомеру. Завданням даної роботи було встановити фармакофорні ділянки в молекулі S(-)-амлодипіну. Сучасні програмні засоби з комп'ютерного моделювання, які застосовуються в квантовій фармакології, дозволяють розрахувати більше 1000 видів молекулярних дескрипторів, правильний вибір яких дозволяє отримати ефективну фармакофорну модель для дослідження механізмів дії лікарських засобів. Однак найбільш інформативними молекулярними електронними дескрипторами є заряди на атомах та розподіл електростатичного потенціалу.

Використовуючи розраховані заряди стає можливим встановити фрагмент, здатний до поляризації з утворенням позитивно-зарядженої групи. Це атом азоту N(1), який має найбільший негативний заряд (-0,56 од. заряду) в молекулі амлодипіну. За хімічною природою амлодипін є органічною основою, до складу препаратів входять солі амлодипіну, такі як безилат, мезилат або малеат. Можна припустити, що утворення солі відбувається за участю атома азоту N(1), який після приєднання водню набуває позитивного заряду — одного з фармакофорних елементів блокаторів кальцієвих каналів дигідропіридинового типу.

Молекулярний електростатичний потенціал, як і заряди на атомах, застосовують для вивчення взаємодій електростатичної природи. На рис. 4 представлено розподіл електростатичного потенціалу в молекулі S(-)-амлодипіну та позначен-

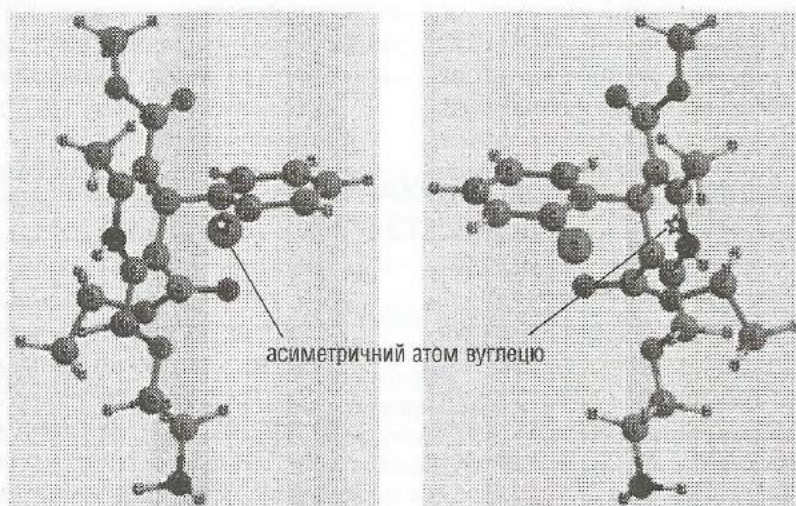


Рис. 2. Енантіомери амлодипіну: R- (ліворуч) та S- (праворуч)

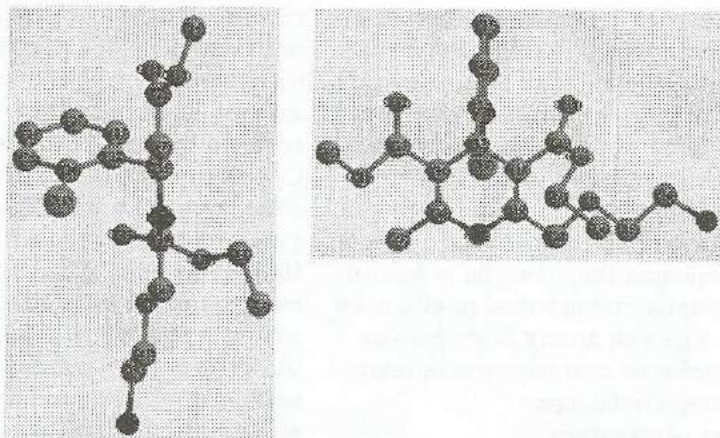


Рис. 3. Молекула S(-)-амлодипіну в двох проекціях та нумерація важких атомів в молекулі амлодипіну

но атоми кисню O(11) та O(12), що можуть бути протоновані. Заряди вказаних атомів кисню дорівнюють -0,24 (-0,51) та -0,29 (-0,56) од. заряду відповідно. Атоми кисню O(11) та O(12) виступають акцепторами водневого зв'язку в молекулі амлодипіну.

На рис. 5 представлені фармакофорні ділянки в молекулі амлодипіну, встановлені в результаті квантово-хімічних розрахунків: два акцептора водневого зв'язку (атоми кисню O(11) та O(12)), фрагмент, здатний до поляризації з утворенням позитивно-зарядженої групи (атом азоту N(1)) та три гідрофобні зони молекули.

При будь-якому обертанні у просторі молекули R-амлодипіну неможливо досягти такого розташування фармакофорних фрагментів, яке представлено на рис. 5, що зумовлює відсутність фармакологічної активності даного енантіомеру.

В результаті досліджень на препаратах ізольованої аорти шурів встановлено, що рацемічний препарат амлодипіну в концентрації $5 \cdot 10^{-7}$ М викликає зменшення сили скорочень до $25,26 \pm 4,14\%$, а S(-)-амлодипін в концентрації $2,5 \cdot 10^{-7}$ М зменшує силу скорочень до $28,27 \pm 4,28\%$ від початкового рівня (рис. 6).

Ефекти рацемічного препарату амлодипіну в концентрації $5 \cdot 10^{-7}$ М та S(-)-амлодипіну в концентрації $2,5 \cdot 10^{-7}$ М вірогідно не відрізняються. Таким чином, результати міографічних експериментів обґрунтовують дані клінічних досліджень, згідно з якими доза S(-)-амлодипіну може бути знижена до 2,5 мг порівняно з 5 мг рацемічного препарату.

Висновки

1) Фармакофорними ділянками в молекулі

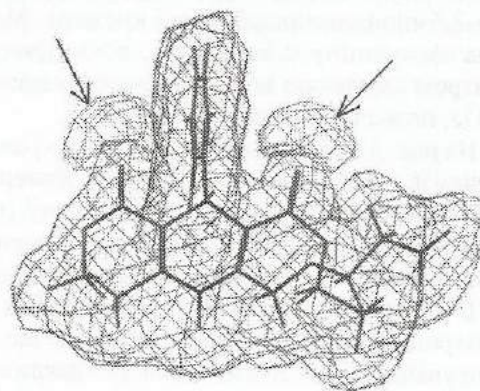


Рис. 4. Розподіл електростатичного потенціалу в молекулі S(-)-амлодипіну — стрілками позначено атоми кисню, здатні до протонування

амлодипіну є: два акцептора водневого зв'язку (атоми кисню O(11) та O(12)), фрагмент, здатний до поляризації з утворенням позитивно-зарядженої групи (атом азоту N(1)) та три гідрофобні зони молекули. Відмінності в просторовому розташуванні описаних функціональних груп зумовлюють наявність фармакологічної ефективності S-амлодипіну та її відсутність у R-амлодипіну.

2) Рацемічний препарат амлодипіну в концентрації $5 \cdot 10^{-7}$ М викликає зменшення сили скорочень ізольованої аорти до $25,26 \pm 4,14\%$, а S(-)-амлодипін в концентрації $2,5 \cdot 10^{-7}$ М зменшує силу скорочень до $28,27 \pm 4,28\%$ від початкового рівня, ефекти досліджених препаратів амлодипіну у вказаних концентраціях не відрізняються.

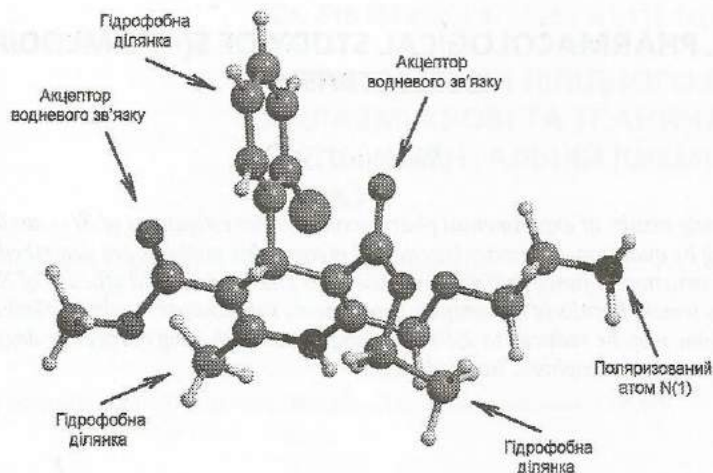


Рис. 5. Фармакофорні ділянки в молекулі S(-)-амлодипіну: два акцептора водневого зв'язку (атоми кисню O(11) та O(12)), фрагмент, здатний до поляризації з утворенням позитивно-зарядженої групи (атом азоту N(1)) та три гідрофобні зони молекули

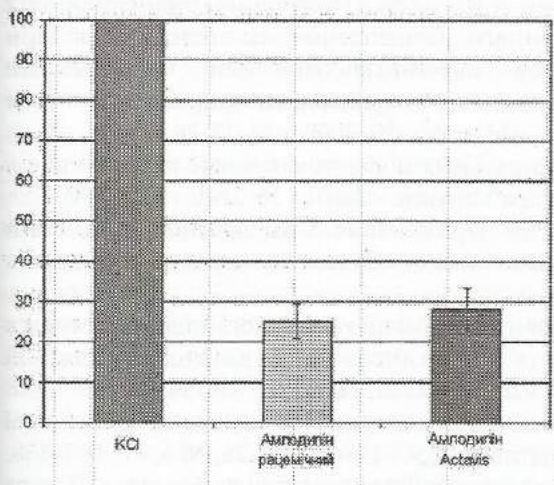


Рис. 6. Рацемічний препарат амлодипіну в концентрації $5 \cdot 10^{-7}$ М викликає зменшення сили скорочень аорти до $25,26 \pm 4,14\%$, а S(-)-амлодипін в концентрації $2,5 \cdot 10^{-7}$ М зменшує силу скорочень аорти до $28,27 \pm 4,28\%$ від початкового рівня, прийнятого за 100%; $p < 0,05$

3) Проведені квантово-фармакологічні та міографічні дослідження експериментально обґрунтовують на молекулярно-

му рівні більш високу клінічну ефективність S(-)-амлодипіну порівняно з рацемічними препаратами амлодипіну.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ФАРМАКОЛОГІЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СТЕРЕОСЕЛЕКТИВНОСТИ S(-)-АМЛОДИПИНА

Небесная Т.Ю.

Резюме. В работе проведено экспериментально-фармакологическое исследование S(-)-амлодипина по сравнению с рацемическим препаратом с помощью квантово-фармакологических и миографических методов. Показано, что отличия в пространственном расположении функциональных групп обуславливают наличие фармакологической эффективности S-амлодипина и ее отсутствие у R-энантиомера. Результаты миографических экспериментов обосновывают данные клинических исследований, согласно которым доза S(-)-амлодипина может быть снижена до 2,5 мг по сравнению с 5 мг рацемического препарата.

Ключевые слова: амлодипин, фармакофор, изолированная аорта

EXPERIMENTAL PHARMACOLOGICAL STUDY OF S(-)-AMLODIPINE STEREOSELECTIVITY

Nebesna T.Yu.

Summary. In the article results of experimental pharmacological investigations of S(-)-amlodipine in comparison with racemic drug by quantum-pharmacological and myographic methods are described. It was shown, that differences in spatial structure of functional groups cause high pharmacological efficacy of S(-)-amlodipine and its absence in R-enantiomer. Results of myographic experiments substantiate results of clinical trials: therapeutic dose of S(-)-amlodipine may be reduced to 2,5 mg in comparison with 5 mg of racemic drug.

Key words: amlodipine, pharmacophore, isolated aorta.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бобров В.А., Давыдова И.В., Медведенко О.И. и др. Применение S-амлодипина в лечении больных с мягкой и умеренной артериальной гипертензией // Здоров'я України. - 2007. - № 12/1. - С. 1-4.
2. Бредихина З.А., Новикова В.Г., Пашагин А.В. и др. Получение энантиоцистых лекарственных средств с помощью спонтанного расщепления на энантиомеры при кристаллизации // Материалы докладов научно-практической конференции "Биологически-активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения. - Новый свет, Крым, Украина. - Май 25 - 30, 2009. - С. 27-28.
3. Воронков Л.Г. Клиническое использование хиральных молекул как новое направление в кардиоваскулярной фармакотерапии // Здоров'я України. - 2007. - № 21-1. - С. 31-32.
4. Дядык А.И., Багрий А.Э., Шукина Е.В. и др. Применение S-амлодипина в лечении больных артериальной гипертензией и ишемической болезнью сердца // Здоров'я України. - 2008. - № 23-24. - С. 54-55.
5. Чекман І.С., Казакова О.О., Небесна Т.Ю. Квантово-хімічні та топологічні дескриптори в дослідженнях залежності "структура-активність" (огляд літератури та власних досліджень) // Журнал Академії Медичних Наук України. - 2008. - Т. 14, № 4. - С. 636-649.
6. Ariens E.J. Stereochemistry, a basis for sophisticated nonsense in pharmacokinetics and clinical pharmacology // European Journal of Clinical Pharmacology. - 1984. - Vol. 26, № 6. - P. 663-668.
7. Doddareddy M.R., Cho Y.S., Rhim H. et al. 3D pharmacophore based virtual screening of T-type calcium channel blockers // Bioorganic and Medicinal Chemistry. - 2007. - Vol. 15. - P. 1091-1105.
8. Estrada T.N., Soglietti H., Dimarco M. et al. Anti-ischemic properties of amlodipine, a new calcium antagonist, in patients with severe coronary artery disease: a prospective trial // Postgrad. Med. J. - 1991. - Vol. 67. - P. 52-53.
9. Lindgren P., Buxton M., Kahan T. et al. Economic evaluation of ASCOT-BPLA: antihypertensive treatment with an amlodipine-based regimen is cost effective compared with an atenolol-based regimen // Heart. - 2008. - Vol. 94. - P. 293-297.
10. McConathy J. Stereochemistry in Drug Action // J. Clin. Psychiatry. - 2003. - Vol. 5, №2. - P. 70-73.
11. Sawhney J.P.S., Agarwal P., Basu I. Efficacy and safety of a fixed-dose combination (FDC) of S-Amlodipine +S-Metoprolol versus FDC of Amlodipine + Metoprolol and FDC of Amlodipine + Atenolol in the treatment of patients with hypertension and angina pectoris (SMART-SESA study) // Cardiology Today. - 2008. - Vol. 12, № 4. - P. 182-186.
12. Triggle D. J. 1,4-Dihydropyridines as Calcium Channel Ligands and Privileged Structures // Cellular and Molecular Neurobiology. - 2004. - Vol. 23, № 3. - P. 293-303.