

УДК 612.18 + 612.143

О. С. Хромов, Н. В. Добреля

Інститут фармакології і токсикології АМН України, Київ

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ЗАСТОСУВАННЯ ФОСФАТИДИЛХОЛІНОВИХ ЛІПОСОМ ЯК НОВОГО ГІПОТЕНЗИВНОГО ЗАСОБУ

В експериментах на спонтанно гіпертензивних щурах показано, що фосфатидилхолінові ліпосоми (ФХЛ) як при одноразовому, так і при курсовому введенні щурам із генетично детермінованою артеріальною гіпертензією викликають достовірне зниження рівня артеріального тиску. Введення ФХЛ викликає нормалізацію дилататорної відповіді судин експериментальних тварин на стимуляцію вироблення ендogenous оксиду азоту. Крім того, ФХЛ усувають властиву артеріальній гіпертензії тканинну гіпоксію. Виявлена залежність гіпотензивної дії фосфатидилхолінових ліпосом від дози. Зроблено висновок про можливість застосування ФХЛ у комплексному лікуванні артеріальної гіпертонії.

O. S. Khromov, N. V. Dobrelya

Institute of Pharmacology and Toxicology AMN Ukraine, Kyiv

EXPERIMENTAL GROUNDS OF PHOSPHATIDYLCHOLINE LIPOSOMES USE AS A NEW ANTIHYPERTENSIVE DRUG

The experiments on the spontaneously hypertensive rats show that both single and long-term injections of phosphatidylcholine liposomes (PCL) cause a significant decrease in blood pressure. In the vessels of the experimental animals, PCL normalized the dilatory response to stimulation of endogenous synthesis of nitric oxide. Besides, PCL relieved a tissue hypoxia, which is typical for arterial hypertension. Such a hypotensive effect correlated with a dose of phosphatidylcholine liposomes. It has been concluded that PCL may be used in a complex treatment of arterial hypertension.

Вступ

Лікування артеріальної гіпертонії (АГ) залишається одним із найважливіших завдань сучасної медицини, що пов'язано з різноманітним механізмом розвитку захворювання [7]. Останнім часом стало відомо, що АГ пов'язана з розвитком окисного стресу (ОС). Виявлена висока кореляційна залежність між ОС і структурно-функціональними характеристиками міокарда і судин, яка свідчить про роль вільнорадикальних процесів у серцево-судинному ремоделюванні на різних етапах розвитку АГ [3; 6; 16]. Окисний стрес, що супроводжується значним збільшенням рівня вільних радикалів і що призводить до активації процесів перекисного окислення ліпідів, блокує синтез білка та нуклеїнових кислот, пригнічує гліколіз, сприяє роз'єднанню окисного фосфорилування, інгібує активність ферментів. Це спричиняє порушення функцій багатьох тканин, у тому числі і ендотелію судин, клітини якого мають здатність синтезувати та виділяти вазоактивні речовини як дилататорної (простациклін, оксид азоту), так і констрикторної природи (чинник активації тромбоцитів, тромбоксан A_2) [15; 19]. Активация вільнорадикальних процесів при артеріальній гіпертензії впливає на синтез і біодоступність ендogenous оксиду азоту

(NO^*), що призводить до збоченої відповіді гладком'язових клітин судин на дію дилаторних медіаторів і сприяє підтриманню високого рівня судинного тону [14].

Накопичені до теперішнього часу експериментальні дані вказують на те, що фосфатидилхолінові ліпосоми (ФХЛ), маючи антигіпоксичні та антиоксидантні властивості, здатні відновлювати функціональну активність ендотелію резистивних судин і, ймовірно, відновлювати синтез NO^* [1; 9]. Крім того, була показана здатність ФХЛ відновлювати скоротливу активність ізольованого препарату аорти щурів із генетично детермінованою артеріальною гіпертензією [17]. Раніше нами було виявлено гіпотензивну дію ФХЛ у спонтанно гіпертензивних щурів [4]. Метою даної роботи з'явилося встановлення діапазону доз, у яких ФХЛ надають гіпотензивну дію за рахунок впливу на ендотеліозалежні механізми регуляції тону судин при АГ.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження виконані на 10 дорослих нормотензивних білих щурах-самцях лінії Вістар-Кіото (НЩ, контрольна група) і 42 спонтанно-гіпертензивних щурах (СГЩ I–VII) масою 260 ± 25 г, розділених на 7 груп. Неінвазивне вимірювання артеріального тиску проводилося за допомогою комплексу Sphygmomanometer S-2 (HSE, Німеччина) [18]. Операційна підготовка, реєстрація параметрів гемодинаміки та визначення напруги кисню у тканинах виконані згідно з описаними у літературі методиками [4]. Як фосфатидилхолінові ліпосоми використаний фармакологічний препарат Ліпін ("Біолік", Україна). Останній є ліофілізованим фосфатидилхоліном, який при додаванні фізіологічного розчину утворює ліпосоми. Була визначена залежність гіпотензивного ефекту від дози та кратності введення ФХЛ. Ліпосоми вводили внутрішньочеревинно в дозах 1, 5, 10, 20, 30 і 50 мг/кг. У окремі серії дослідів оцінювали стан ендотелію резистивних судин контрольних і експериментальних тварин, а також кисневий баланс м'язових тканин при введенні оптимальної дози ФХЛ.

У тварин груп СГЩ II–VII неінвазивно вимірювали систолічний артеріальний тиск у хвостовій артерії, потім внутрішньочеревинно вводили ФХЛ у дозах 1, 5, 10, 20, 30, 50 мг/кг відповідно та проводили реєстрацію артеріального тиску (АТ) через різні проміжки часу протягом першої доби, а також на 2, 3, 4, 5, 6 та 7-у добу при курсовому введенні препарату. Надалі реєстрацію артеріального тиску проводили кожену добу до відновлення АТ до початкового рівня.

У тваринних груп НЩ і СГЩ I реєстрували початкові значення параметрів, що вивчалися, і внутрішньоартеріально вводили 1 мл 0,35–4,0 М розчину ацетилхоліну (Ах). Після відновлення САТ внутрішньовенно вводили ФХЛ 2 мг/100 г маси тіла, чекали нормалізації або стабілізації параметрів гемодинаміки та повторно вводили 1 мл 0,35–4,0 М розчину ацетилхоліну. Відзначали як величини максимальної зміни параметрів, що вивчалися, так і час до повернення показників до їх початкових значень. Результати досліджень подані у вигляді $M \pm m$. Для визначення достовірності відмінностей отримані дані оброблялися методами варіаційної статистики з використанням *t*-критерію Стьюдента. Достовірними вважалися зміни в довірчому інтервалі не менше 95 % або $p < 0,05$ [8].

Результати та їх обговорення

Одноразове внутрішньочеревинне введення спонтанно-гіпертензивним щурам ФХЛ, починаючи з дози 10 мг/кг, викликало достовірне зниження артеріального тиску (з $159,7 \pm 2,0$ до $137,8 \pm 4,4$ мм рт. ст., $p < 0,01$). При цьому АТ був достовірно нижчим за початковий рівень протягом 2,5 години. Подальше збільшення дози до

50 мг/кг не викликало посилення гіпотензивного ефекту, але збільшувало його тривалість до 8 годин. При курсовому внутрішньочеревинному введенні ФХЛ протягом 7 діб також зареєстровано достовірне зниження АТ починаючи з дози 10 мг/кг, що зберігалося впродовж 7 діб (з $159,7 \pm 2,0$ до $144,2 \pm 4,2$ мм рт. ст., $p < 0,01$). Подальше збільшення дози викликало посилення гіпотензивної дії з 9,7 до 20,1 %, що зберігалося 14 діб після відміни препарату. Достовірної відмінності у дії доз 20, 30 і 50 мг/кг не виявлено (рис. 1).

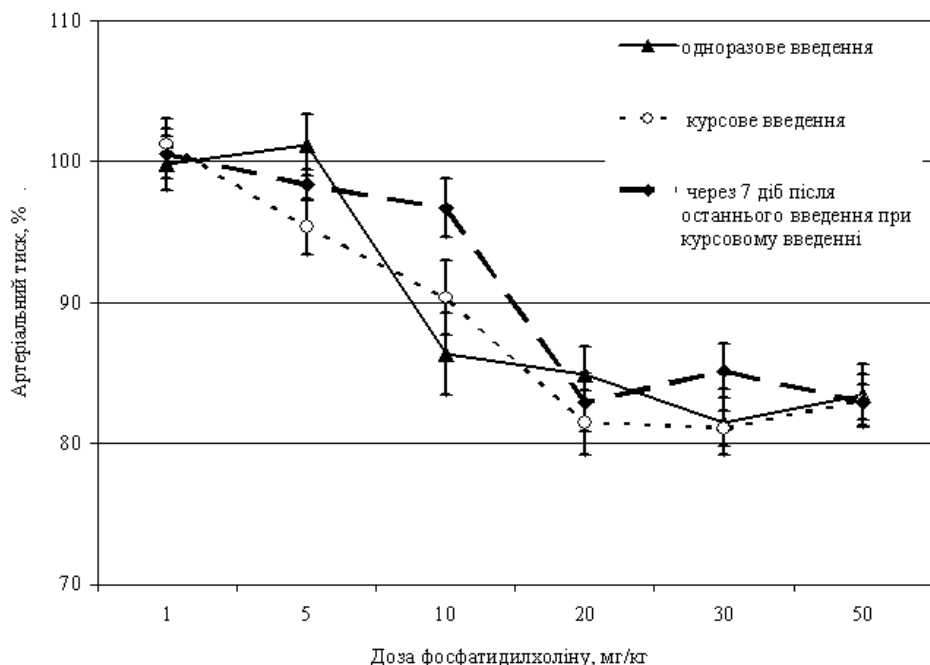


Рис. 1. Крива залежності “доза–ефект” впливу фосфатидилхоліну на рівень артеріального тиску у спонтанно-гіпертензивних щурів (100 % – початковий рівень АТ).

У гіпертензивних щурів, на відміну від нормотензивних, спостерігалися виражені артеріальна гіпертензія та понижений серцевий викид, периферична вазоконстрикція та низька напруга кисню в м’язових тканинах (табл. 1).

Таблиця 1

Відмінності параметрів кровообігу у нормотензивних і спонтанно-гіпертензивних щурів

Показники	Групи тварин		p
	нормотензивна	спонтанно-гіпертензивна	
Артеріальний тиск $С_{р}$, мм рт. ст.	$94,1 \pm 8,6$	$176,7 \pm 15,4$	$< 0,001$
Хвилинний об’єм крові, мл/хв.	$63,5 \pm 7,4$	$49,6 \pm 5,1$	$< 0,01$
Загальний периферичний опір судин, $мН.м.с^{-4}$	$118,5 \pm 12,3$	$285,1 \pm 28,6$	$< 0,001$
pO_2 т, мм рт. ст.	$24,1 \pm 2,4$	$13,9 \pm 1,5$	$< 0,01$

Внутрішньоартеріальне введення ацетилхоліну нормотензивним щурам викликало різке зниження загального периферичного опору судин (ЗПО) (з $118,5 \pm 12,3$ до $47,3 \pm 6,2$ $мН.м.с^{-4}$; $p < 0,001$), що супроводжувалося істотним зменшенням системного, і, отже, перфузійного тиску (середній артеріальний тиск – САТ – $94,1 \pm 8,6$ і $56,2 \pm 7,6$ мм рт. ст.; $p < 0,05$). У той же час хвилинний об’єм крові (ХОК) зростав (з $63,5 \pm 7,4$ до $95,0 \pm 9,9$ мл/хв.; $p < 0,05$). Незважаючи на збільшення серцевого викиду, спостерігалося значне (утричі) транзиторне зниження напруги кисню у м’язових ткани-

нах. Мабуть, зменшенням перфузійного тиску і пояснюється виникнення такої тканинної гіпоксії. Надалі відбувалося поступове відновлення параметрів, що вивчалися, до початкового рівня (рис. 2А, 3). Тривалість гіпотензивної реакції системного кровотоку на введення Ax складала $105,5 \pm 7,7$ с.

Добре відомо, що внутрішньовенне введення фосфатидилхолінових ліпосом не викликає змін системного кровотоку у здорових тварин [1]. Це було підтверджено і в нашому дослідженні (рис. 2А; 3). При повторному, після Ліпіну, введенні Ax зміни кровообігу у контрольних тварин були аналогічні до тих, що спостерігалися при першому введенні. У той же час загальна тривалість реакції кровообігу на Ax після ін'єкції ФХЛ була дещо більшою ($147,4 \pm 13,8$ с; $p < 0,05$).

У спонтанно-гіпертензивних, як і у щурів контрольної групи, при введенні Ax розвивалася периферична вазодилатація, що призводила до зниження САТ і збільшення серцевого викиду. У цьому випадку абсолютні значення ЗПО наближались до значень цього показника у тварин контрольної групи (з $285,1 \pm 28,6$ до $91,9 \pm 9,4$ і $118,5 \pm 12,3$ мН.м.с⁻⁴ відповідно). Збільшення серцевого викиду та зниження ЗПО супроводжувалося деяким зростанням pO_2 тканин (рис. 2Б; 3). Тривалість реакції системного кровообігу на введення Ax складала $60,8 \pm 6,3$ с.

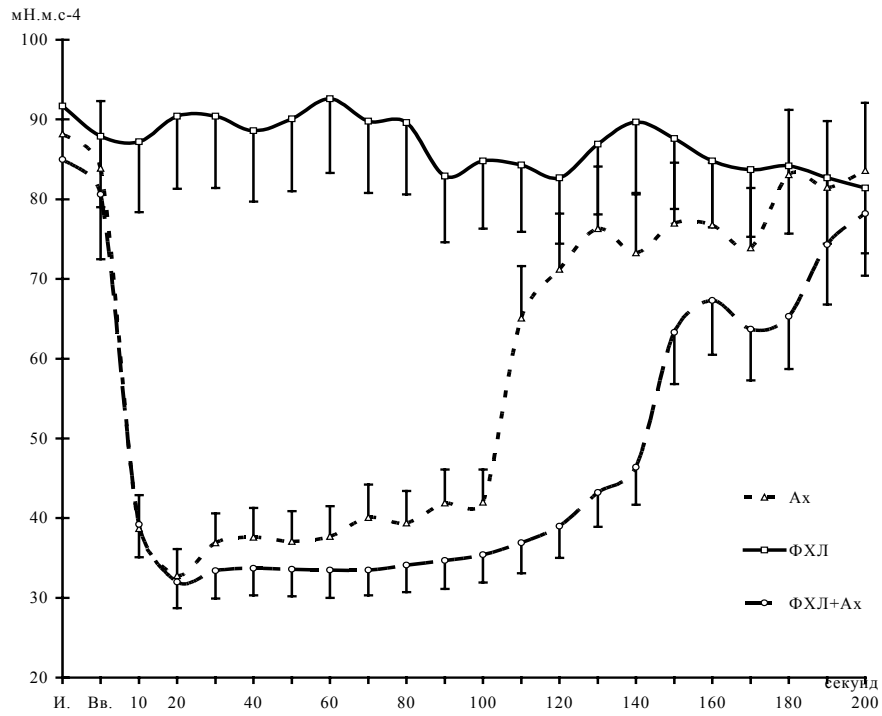
Введення ФХЛ тваринам експериментальної групи викликало принципово важливі зміни кровообігу. Це виражалось в практичній нормалізації як рівня САТ, так і ЗПО (рис. 2Б). Зростав і серцевий викид, наближаючись до своїх значень у нормотензивних тварин. Такий вплив ФХЛ на системний кровотік спостерігався нами протягом 180–200 хвилин. Слід зазначити повне відновлення оксигенації м'язових тканин у відповідь на введення ФХЛ (див. рис. 3). Повторне (після ФХЛ) введення Ax тваринам зі спонтанною гіпертензією приводило до відновлення та повної відповідності гіпотензивній реакції з такою у тварин контрольної групи (див. рис. 2Б). Разом із тим слід врахувати, що тривалість реакції системного кровообігу на Ax при цьому значно зростала (до $191,5 \pm 13,8$ с).

При обговоренні результатів дослідження слід зазначити відмінності реакції системного кровообігу у відповідь на введення Ax у нормо- і гіпертензивних щурів. При цьому зниження САТ у щурів дослідної групи порівняно з контрольними було більш вираженим. Мабуть, така відмінність може бути пояснена пониженою продукцією NO ендотеліоцитами, обумовленою функціональною недостатністю останніх.

Хочемо звернути увагу на відсутність суттєвих змін системного кровообігу та достовірне збільшення тривалості гіпотензивної реакції Ax після введення ФХЛ у нормотензивних щурів. Отримані дані можуть бути непрямим підтвердженням припущення про відновлення функціональної активності судинного ендотелію під впливом фосфатидилхолінових ліпосом, наведеного в роботах [10; 11; 13]. Достовірно нижчі значення САТ протягом тривалого відрізка часу у щурів експериментальної групи після введення ФХЛ і практично однакова реакція системного кровообігу на Ax , на наш погляд, також є наслідком нормалізації функціональної активності ендотелію.

Є певна складність оцінки змін рівня pO_2 у м'язових тканинах гіпертензивних щурів. Ми переконані у тому, що явище, яке спостерігалось, пов'язане, як мінімум, із двома причинами. По-перше – це відновлення функціональної активності ендотелію і/або відновлення чутливості ефекторних елементів судинних гладких м'язів. По-друге – практична нормалізація оксигенації тканин може бути обумовлена антигіпоксичними та антиоксидантними властивостями самих ФХЛ [1; 5; 9; 12].

А (нормотензивні щури)



Б (спонтанно-гіпертензивні щури)

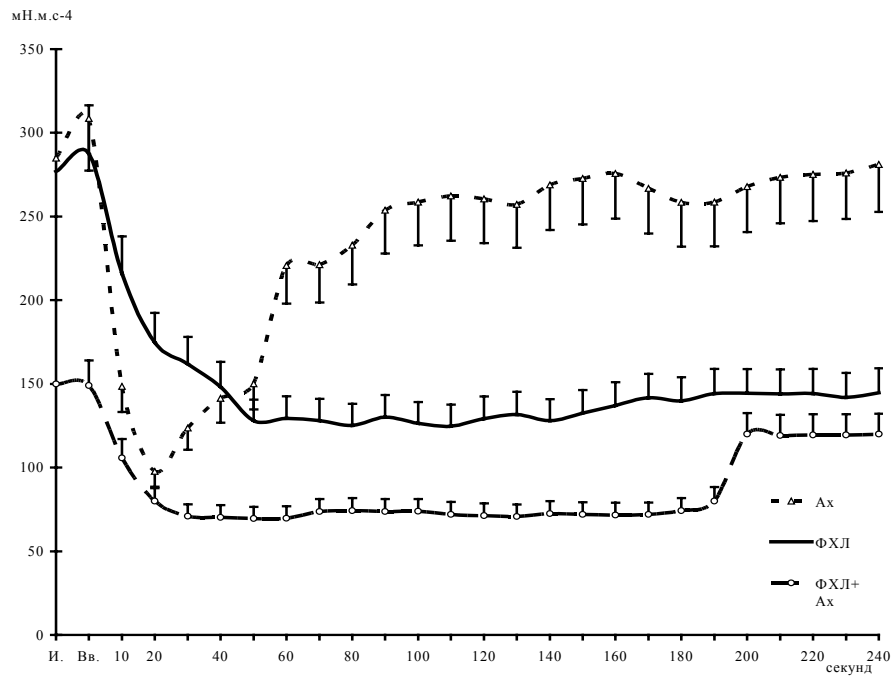


Рис. 2. Вплив ацетилхоліну (Ах) і фосфатидилхоліну (ФХЛ) на зміни загального периферичного опору судин (ЗПО)

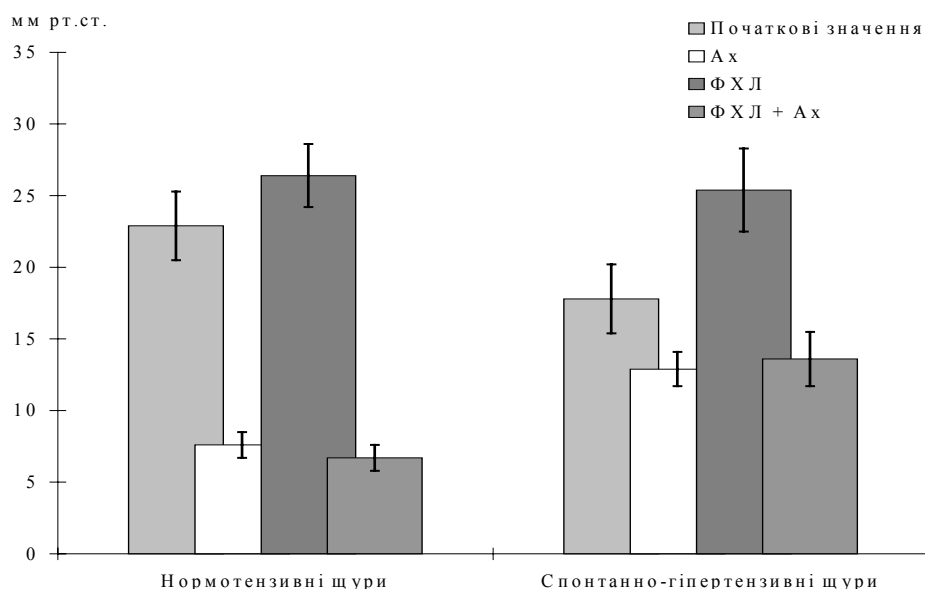


Рис. 3. Вплив ацетилхоліну та фосфатидилхоліну на зміни напруги кисню у м'язових тканинах.

Посилення деструктивних процесів у результаті розвитку окисного стресу при АГ може відбуватися при активації декількох описаних у літературі механізмів. Відомо, що деякі продукти вільнорадикального окислення ліпідів мають вазоконстрикторні властивості, можуть викликати порушення проникності судин і активно впливати на рівень артеріального тиску. Висока концентрація активних кисневих метаболітів, зокрема окислених ліпопротеїнів, знижує синтез *NO* і прискорює дегенерацію *NO* з утворенням пероксинітриду – цитотоксичної речовини, що має вазоконстрикторні властивості. Крім того, вільні радикали модифікують ендотеліальні *NO*-рецептори, зменшуючи їх чутливість. Також було показано, що тривала інфузія ангіотензину II, що призводить до підвищення артеріального тиску, провокує зростання концентрації супероксидного аніон-радикала [3]. У будь-якому з цих випадків фосфатидилхолінові ліпосоми мають захисний вплив на організм, заснований, ймовірно, на перериванні первинного посилення переокислення ліпідів в ендотелії судин, нормалізації кислотно-основного балансу та збільшенні активності антиоксидантів.

Висновок

Отримані дані показують принципову можливість використання фосфатидилхолінових ліпосом (Ліпіну) для лікування артеріальної гіпертонії.

Бібліографічні посилання

1. **Биохимический** эффект липосом при гипоксических состояниях различной этиологии / А. В. Стефанов, В. П. Пожаров, Т. Д. Миняйленко и др. // Вестник АМН СССР. – 1990. – № 6. – С. 47–51.
2. **Булгаков В. Г.** Влияние фосфолипидов различного состава на тонус коронарных сосудов и сократительную способность миокарда / В. Г. Булгаков, А. А. Моргун, М. В. Биленко // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 1987. – Т. 104, № 12. – С. 643–646.

3. **Зенков Н. К.** Окислительный стресс: биохимические и патологические аспекты / Н. К. Зенков, В. З. Ланкин, Е. Б. Меньшикова. – М.: МАИК «Наука/Интерпериодика», 2001. – 343 с.
4. **Зміни** скорочувальної функції судин при артеріальній гіпертензії різного генезу та її корекція за допомогою фосфатидилхолінових ліпосом / А. І. Соловійов, С. М. Тишкін, О. С. Хромов, О. В. Стефанов // Фізіол. журн. АН України. – 2002. – Т. 48, № 6. – С. 10–16.
5. **Касьянова О. В.** Влияние липосом на показатели перекисного окисления липидов и энергетичний метаболізм при стресі: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – К., 1993. – 20 с.
6. **Ковалева О. Н.** Роль оксидативного стресса в кардиоваскулярной патологии / О. Н. Ковалева, А. Н. Беловол, М. В. Заика // Журнал АМН Украины. – 2005. – Т. 11, № 3. – С. 660–671.
7. **Кушаковский М. С.** Артериальная гипертензия. – С-Пб: Фолиант, 2002. – 416 с.
8. **Лакин Г. Ф.** Биометрия. – М.: Высшая школа, 1973. – 343 с.
9. **Пожаров В. П.** Некоторые физиологические механизмы антигипоксического действия липосом / В. П. Пожаров, Т. Д. Миняйленко, А. В. Стефанов // Физиол. журн. СССР. – 1990. – Т. 76, № 7. – С. 897–902.
10. **Соловійов А. І.** Дослідження причинно-наслідкового зв'язку високого артеріального тиску і порушення функції ендотелію при гіпертензії / А. І. Соловійов, О. В. Базилук // Матеріали II конгресу патофізіологів України. – К., 1996. – С. 12–14.
11. **Соловійов А. І.** Ендотелій-залежні судинні реакції у кролів під час тривалої експериментальної гіперхолестеролемії / А. І. Соловійов, В. Ф. Сагач // Фізіол. журн. – 1994. – Т. 40, № 2. – С. 23–28.
12. **Стефанов А. В.** Использование липосом в медицине // Молек. биол. – 1980. – № 2. – С. 23–30.
13. **Стефанов А. В.** Влияние липосом на электрическую и сократительную активность сосудистых гладких мышц / А. В. Стефанов, А. И. Соловьев // Докл. АН СССР. – 1983. – Т. 273, № 1. – С. 227–230.
14. **Endothelial nitric oxide and superoxide dismutase in a model of genetic hypertension** / M. McIntyre, M. J. Brosman, C. A. Hamilton et al. // J. Vasc. Res. – 1997. – Vol. 34, S. 1. – P. 28.
15. **Luscher T. F.** The endothelium: Modulator of cardiovascular function / T. F. Luscher, P. M. Vanhoutte. – Boca Raton, USA: CRC Press, 1991. – P. 1–125.
16. **McIntyre M.** Endothelial function in hypertension. The role of superoxide anion / M. McIntyre, F. David, A. Dominiczak // Hypertension. – 1999. – Vol. 34, № 4. – P. 539–545.
17. **Phospholipid vesicles (liposomes) restore endothelium-dependent cholinergic relaxation in thoracic aorta from spontaneously hypertensive rats** / A. I. Soloviev, A. V. Stefanov, O. V. Baziluk, V. F. Sagach // J. Hypertension. – 1993. – N 11. – P. 623–627.
18. **Saline containing phosphatidylcholine liposomes possess the ability to restore endothelial function damaged resulting from G-irradiation** / A. I. Soloviev, A. V. Stefanov, S. M. Tishkin et al. // J. of Physiology and Pharmacology. – 2002. – Vol. 53, N 4. – P. 701–712.
19. **The role of nitric oxide in physiology and pathophysiology** / Eds. by H. Korpowski, H. Maeda. – Springer-Verlag, 1995. – 100 p.

Надійшла до редколегії 17.03.2007