

13. Яхнина Д. Н. Патобioхимические аспекты защитного действия α -токоферола при гипоксии: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.— М., 1980.— 40 с.
14. Bucher J. R. Pyruvate.— In: Methods of Enzymatic Analysis / Ed. A. U. Bergmeyer. New York, 1963, p. 253—259.
15. Costa L. E., Taguini A. S. Effect of chronic hypoxia on myoglobin, cytochromes and ubiquinone levels in the rat—Acta physiol. latinoamer., 1970, 20, N 2, p. 103—109.
16. Hohorst H. J. Lactate determination with lactic dehydrogenase and DPN.— In: Methods of Enzymatic Analysis / Ed. A. U. Bergmeyer. New York, 1963, p. 226—270.
17. Lin M., Siess M., Hoffmann Ph. C. The effective changes in functional activity on ubiquinone redox status in isolated atria.— Eur. J. Biochem., 1973, 37, N 2, p. 259—269.
18. Lochner A., Kotze J. C. N., Benade A. J. S., Gevers W. Mitochondrial oxidative phosphorylation in low-flow hypoxia role of free fatty acids.— J. Mol. and Cell. Cardiol., 1978, 10, N 9, p. 857—875.
19. Lowry O. N., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent.— J. Biol. Chem., 1951, 193, N 1, p. 265—275.
20. Nayler W., Fassold E. Hypoxia-induced changes in the ultrastructure and metabolism of cardiac muscle.— J. Mol. Med., 1977, 2, N 3, p. 289—308.
21. Ziegler D., Doeg K. A. Preparation and properties of succinate dehydrogenase coenzyme Q reductase (complex II).— Methods in Enzymology. New York, 1967, vol. 10, p. 231—235.

Ин-т биохимии АН УССР;
Киев. мед. ин-т;
Ин-т орган. химии АН УССР

Поступила 04.12.82

УДК 612.146

А. В. Стефанов, А. В. Дмитриева, М. И. Гуревич,
В. И. Бойко, Л. Я. Сазонова

ВЛИЯНИЕ ЗАКЛЮЧЕННОГО В ЛИПОСОМЫ ФЕНИЛЭФРИНА НА КАРДИО- И ГЕМОДИНАМИКУ В УСЛОВИЯХ БЛОКАДЫ АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ

В последнее десятилетие появились многочисленные данные об успешном применении бислойных фосфолипидных везикул (липосом) в качестве переносчиков лекарственных и биологически активных веществ [4, 6]. Показано, что мембрана липосом предохраняет заключенное в них вещество от гидролиза ферментативными системами организма, позволяет снизить дозы лекарственных препаратов, а значит, их токсичность, а также позволяет биологически активным веществам проникать в клетки, мембраны которых в обычных условиях для них непроницаемы [9].

Ранее нами было обнаружено, что заключение в липосомы смешанного адреномиметика норадреналина (НА) позволяет значительно пролонгировать его действие, и что действие липосомальной формы НА на кардиогемодинамику животных отличается от действия его водного раствора [3]. Для выяснения механизма действия инкапсулированных адреномиметиков мы провели исследование влияния заключенного в липосомы специфического α -адреномиметика фенилэфрина (ФЭ) на кардио- и гемодинамику в условиях избирательной и сочетанной блокады адренорецепторов.

Методика. Опыты проведены на 22 кошках под хлоралозно-уретановым наркозом (50 и 500 мг/кг, внутривенно).

У животных выделяли бедренную вену для введения исследуемых веществ и бедренную артерию, через которую в аорту вводили катетер для регистрации системного артериального давления (САД). Затем производили трахеостомию, и животных переводили на искусственное дыхание. По пятому межреберью проводили торакотомию и вскрывали перикард. Полость левого желудочка катетеризировали проколом через верхушку сердца. На луковицу аорты помещали манжеточный датчик электромагнитного флюометра РКЭ-2-БИ. В опытах регистрировали: частоту сердечных сокращений (ЧСС), минутный (МОК) и ударный (УОК) объемы крови, САД, конечно-диастолическое давление (КДД), давление в полости левого желудочка (Рлж), первую производную левожелудочкового давления (dP/dT), время достижения $dP/dT_{\max}$ (T_p), а также рас-

считывали общее периферическое сопротивление сосудов (ОПС), индекс сократимости Верагута (ИВ) [8], индекс расслабления (ИР) [1].

Регистрацию всех показателей проводили синхронно на многоканальном самописце НЗ38-6П. Изучаемые параметры записывали в покое и на пике реакции. Длительностью реакции считали время от момента введения препарата до возвращения регистрируемых показателей к исходному уровню.

Липосомы готовили по описанной нами ранее схеме из смеси лецитин : холестерин в соотношении 9 : 2 моль/моль. Смесь липидов, растворенных в хлороформе, высушивали в круглодонной колбе в вакуумном испарителе до полного удаления растворителя. К липиду добавляли раствор кристаллического ФЭ (20—40 мг/мл) в 17 мМ NaCl и встряхивали до полного эмульгирования. Образовавшуюся суспензию (30 мг липида в 1 мл) подвергали ультразвуковой обработке в дезинтеграторе УЗДН-1 в течение 2 мин при 4 °С с частотой 44 кГц. Несвязавшийся с липосомами ФЭ удаляли с помощью гель-фильтрации на сефадексе Г-50. Для определения количества ФЭ, заключенного внутри водной полости липосом, липид экстрагировали хлороформом (в соотношении хлороформ : водная фаза 1 : 2 v/v). В водной фазе определяли концентрацию ФЭ по поглощению при 280 нм с помощью калибровочной кривой, построенной на стандартных растворах кристаллического ФЭ. В качестве контроля использовали водную фазу после экстрагирования хлороформом липида липосом, не содержащих ФЭ.

В опытах применяли иммобилизованный в липосомах ФЭ и водный раствор ФЭ в эквивалентных дозах. Для блокады α -адренорецепторов использовали фентоламин (ФА) в дозе 2—3 мг/кг, для блокады β -адренорецепторов — пропранолол — 1 мг/кг. Для одновременной блокады α - и β -адренорецепторов применяли совместное введение этих блокаторов в тех же дозах.

Результаты. Латентный период реакции на введение водного раствора ФЭ составлял $(8,8 \pm 0,5)$ с. Пик реакции был зарегистрирован через $(25,8 \pm 7,3)$ с, реакция длилась $(6,8 \pm 0,43)$ мин. Свободный ФЭ вы-

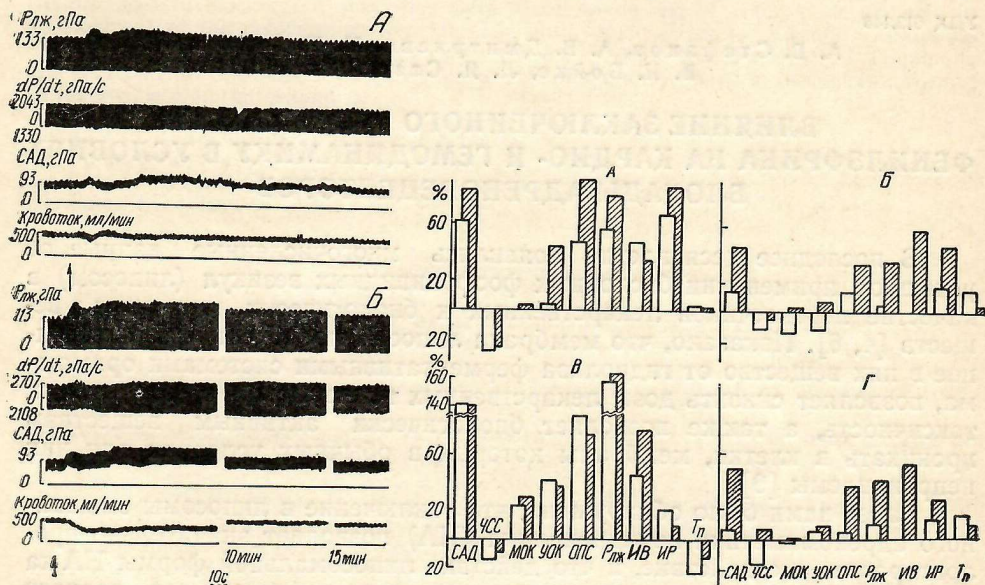


Рис. 1. Влияние введения свободного (А) и иммобилизованного (Б) ФЭ на показатели кардиогемодинамики intactных животных.

Стрелками обозначен момент введения препаратов.

Рис. 2. Изменение показателей кардио- и гемодинамики при введении свободного (светлые столбики) и инкапсулированного (заштрихованные столбики) ФЭ.

А — intactным животным; Б — в условиях блокады α -адренорецепторов; В — β -адренорецепторов; Г — α - и β -адренорецепторов.

зывал повышение САД с $(84,2 \pm 4)$ до $(136,6 \pm 11,8)$ гПа, ОПС с $(0,11707 \pm 0,00904)$ до $(0,17352 \pm 0,03523)$ Н·с·см⁻⁵ и достоверное увеличение индексов сократимости миокарда. Величины МОК и УОК не изменялись. После введения водного раствора ФЭ развивалась выраженная брадикардия, часто регистрировали аритмии (рис. 1, А).

Латентный период реакции на иммобилизованный в липосомах ФЭ составлял $(8,1 \pm 0,4)$ с. Максимум прессорной реакции был зарегистрирован только через $(86 \pm 4,3)$ с, общая продолжительность реакции составляла $(21,1 \pm 2,3)$ мин.

Имобилизованный ФЭ значительно увеличивал сократительную способность миокарда, причем в большей степени росли величины индекса расслабления: с $(17,4 \pm 1,5)$ до $(32,4 \pm 1,8)$ усл. ед. ЧСС достоверно снижалась, но аритмии отсутствовали. Инкапсулированный ФЭ вызывал большее, чем его водный раствор, увеличение САД до $(154,9 \pm 6,6)$ гПа и Рлж $(199,5 \pm 9,5)$ гПа по сравнению со $(111 \pm 4,7)$ гПа в состоянии покоя. Одновременно происходила более выраженная, чем при инфузии раствора ФЭ, периферическая вазоконструкция, — ОПС возрастало до $(0,22317 \pm 0,0283)$ Н·с·см⁻⁵ ($p < 0,001$). Введение заключенного в липосомы ФЭ вызывало рост УОК с $(2,43 \pm 0,14)$ до $(3,52 \pm 0,27)$ мл, но при наличии выраженной брадикардии МОК проявлял лишь тенденцию к увеличению (рис. 2, А).

Для выяснения механизма действия липосомального препарата были проведены исследования влияния иммобилизованного ФЭ на сердечно-сосудистую систему животных в условиях избирательной и одновременной блокады адreno-рецепторов.

Инфузия применявшихся для блокады α -адreno-рецепторов ФА приводила к снижению САД до $(50 \pm 2,5)$ гПа, Рлж до $(83,5 \pm 4,6)$ гПа и ОПС до $(0,0722 \pm 0,00722)$ Н·с·см⁻⁵. Происходила перестройка фазовой структуры систолы: увеличивалась скорость нарастания давления в левом желудочке и резко уменьшалась скорость расслабления. Величины МОК и УОК существенно не изменялись.

Введение животным на фоне блокады α -адreno-рецепторов водного раствора ФЭ приводило к незначительным колебаниям регистрируемых показателей, сходным с реакцией на введение небольшого объема жидкости (рис. 2, Б).

Латентный период реакции на инкапсулированный ФЭ на фоне блокады α -адreno-рецепторов составлял $(29 \pm 4,1)$ с. Максимум его достигался только через (123 ± 12) с, общая продолжительность реакции составила $(12 \pm 1,1)$ мин.

В отличие от водного раствора ФЭ, не влияющего на кардио- и гемодинамику, заключенный в липосомы ФЭ в условиях блокады α -адreno-рецепторов приводил к достоверному увеличению индексов сократимости миокарда, причем возрастал как ИВ с $(57,2 \pm 2,9)$ до $(89,7 \pm 6)$ с⁻¹, так и ИР с $(12,9 \pm 1,2)$ до $(20,8 \pm 0,8)$ усл. ед. Величина ЧСС не изменялась. Значительно увеличивались САД до $(71,8 \pm 3)$ гПа, Рлж до $(111,7 \pm 2,4)$ гПа и ОПС до $(0,0977 \pm 0,00671)$ Н·с·см⁻⁵. МОК и УОК существенно не изменялись (рис. 2, В).

Блокада β -адreno-рецепторов пропранололом приводила к значительному снижению сократительной способности миокарда. ИВ в частности уменьшался с $(51,9 \pm 3,3)$ до $(30,3 \pm 3)$ с⁻¹, САД снижалось до $(55,5 \pm 2,5)$ гПа, Рлж до $(79,7 \pm 4,5)$ гПа и ОПС до $(0,09214 \pm 0,00796)$ Н·с·см⁻⁵. МОК несколько уменьшался при отсутствии существенных изменений ЧСС.

При введении водного раствора ФЭ латентный период реакции составлял $(11,4 \pm 0,9)$ с. Пик инотропной реакции был зарегистрирован через $(70 \pm 12,5)$ с, длительность ее составила $(10,7 \pm 1,9)$ мин. Водный раствор ФЭ в условиях блокады β -адreno-рецепторов вызывал увеличение ИВ до $(44,4 \pm 7)$ с⁻¹ и ИР с $(21,6 \pm 7)$ до $(26,3 \pm 3,2)$ усл. ед. Значительно возрастали величины САД до $(133 \pm 1,3)$ гПа, Рлж до $(204 \pm 16,7)$ гПа и ОПС до $(0,1736 \pm 0,0313)$ Н·с·см⁻⁵. В то же время увеличение сократимости миокарда обеспечивало рост УОК и соответственно МОК при достоверно сниженной ЧСС (рис. 2, В).

Латентный период реакции сердечно-сосудистой системы животных на введение инкапсулированного ФЭ равен $(11,8 \pm 1,5)$ с. Максимум инотропной реакции достигался через $(114,5 \pm 13,4)$ с, а общая ее продолжительность составляла $(18,4 \pm 1,5)$ мин. Введение иммобилизованного ФЭ животным с предварительно блокированными β -адreno-рецепторами приводило к изменениям, сходным с развивающимися при инъекции его водного раствора. ИВ увеличивался до $(53,5 \pm 10,2)$ с⁻¹, что превосходило рост данного показателя при инфузии водного раствора ФЭ. Изме-

нения ЧСС были недостоверными. САД увеличивалось до $(133 \pm 4,5)$ гПа, Рлж до (208 ± 18) гПа и ОПС до $(0,16608 \pm 0,01273)$ Н·с·см⁻⁵. Значительное возрастание сократительной способности миокарда, несмотря на высокие показатели ОПС, приводило к достоверному росту УОК и МОК (рис. 2, В).

В следующей серии опытов были одновременно блокированы α - и β -адренергические рецепторы. Изменения кардио- и гемодинамики при сочетанной блокаде адренорецепторов были аналогичны сдвигам, происходившим при избирательной блокаде α и β -адренорецепторов.

Введение водного раствора ФЭ животным этой группы вызывало лишь кратковременные и слабо выраженные изменения регистрируе-

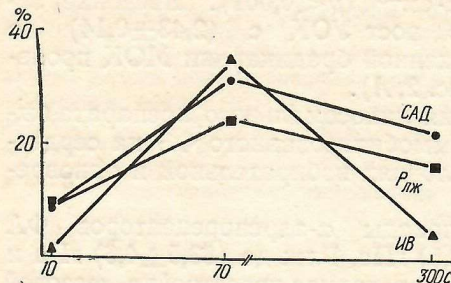


Рис. 3. Изменения САД, Р_{лж} и ИВ при введении водного раствора ФЭ через различные интервалы после инъекции липосом.

мых показателей кардио- и гемодинамики, напоминающие волнообразное увеличение при дополнительном введении небольшого объема жидкости.

В отличие от этого заключенный в липосомы ФЭ на фоне одновременной блокады адренорецепторов приводил к развитию положительной инотропной и вазопрессорной реакции с латентным периодом $(21,1 \pm 2,9)$ с, максимум ее достигался через (104 ± 17) с, а продолжительность была равна $(11,4 \pm 1)$ мин. Введение иммобилизованного ФЭ вызывало значительное увеличение ИВ с $(41,9 \pm 2,1)$ до $(63,7 \pm 8,2)$ с⁻¹ ($p < 0,01$) и ИР с $(19,8 \pm 2)$ до $(25,4 \pm 3,7)$ усл. ед., ЧСС изменялось недостоверно. Иммобилизованный в липосомах ФЭ увеличивал САД до $(71 \pm 7,3)$ гПа, Рлж до $(112 \pm 3,9)$ гПа и ОПС с $(0,07158 \pm 0,00648)$ до $(0,09736 \pm 0,00418)$ Н·с·см⁻⁵. Величины МОК и УОК не изменялись (рис. 2, Г).

В последней серии опытов на фоне сочетанной блокады адренорецепторов мы отдельно вводили липосомы и водный раствор ФЭ. Липосомы не оказывали заметного влияния на кардио- и гемодинамику исследованных животных. Раствор ФЭ, инъецированный через 10, 70, 300 с после липосом, вызывал положительную инотропную реакцию миокарда без изменений ЧСС, повышение САД и Рлж. Увеличение индексов сократимости и САД оказалось наибольшим при введении ФЭ через 70 с после липосом (рис. 3). Амплитуда возрастания регистрируемых показателей была близка к величине изменений, развивающихся при введении иммобилизованного ФЭ при полной блокаде адренорецепторов. Продолжительность реакции в среднем составляла 3 мин, что значительно ниже величины, зарегистрированной при инфузии ФЭ, заключенного в липосомы.

Обсуждение результатов. Ранее нами была показана возможность иммобилизации адреномиметиков внутри водной полости липосом, образованных различными фосфолипидами [3]. При этом включение смешанного адреномиметика НА колебалось от 600 до 800 мкг/мл, что соответствовало 8—10 % исходного количества препарата. В случае использования ФЭ включение составляло 300—500 мкг/мл или 2—3 % от исходной дозы вещества. Скорость выхода ФЭ из водной полости липосом составляла 30—40 % за 60 мин. Таким образом, введение в сосудистое русло ФЭ внутри водной полости липосом в дозе 200 мкг/кг позволяло создавать депо α -адреномиметика, который, диффундируя через мембрану липосом, будет постоянно поддерживать его супрапороговую концентрацию в кровяном русле. В наших опытах было обнаружено, что продолжительность инотропной и вазопрессорной реакции на инкапсулированный ФЭ составляла в среднем $(21,1 \pm 2,3)$ мин, то есть была в

3 раза более продолжительной, чем при введении свободного препарата. Необходимо также отметить, что время достижения максимума реакции также увеличивалось в 3 раза, что можно объяснить необходимостью определенного временного интервала для создания в сосудистом русле действующей концентрации ФЭ. Одинаковые латентные периоды реакций на свободный и иммобилизованный в липосомах ФЭ указывают, по-видимому, на наличие небольшой примеси свободного α -адреномиметика в липосомальном препарате, который успевает выйти из водной полости липосом за период времени от момента их получения до введения животным.

Кроме пролонгирования кардиостимулирующего и вазопрессорного действия ФЭ мы обнаружили и другое существенное отличие в действии липосомальной формы ФЭ. Сравнение величин индексов сократимости, зарегистрированных при введении свободного и инкапсулированного ФЭ, свидетельствует о более выраженном кардиостимулирующем эффекте липосомальной формы препарата. Эти данные нельзя объяснить несоответствием доз свободного и иммобилизованного препарата, так как водный раствор ФЭ в дозе 30 мкг/кг приводил к развитию аритмий, в то время как при введении инкапсулированного α -адреномиметика мы регистрировали брадикардию без нарушений ритма сердечных сокращений.

Кардиостимулирующее и вазопрессорное действие иммобилизованного ФЭ сохранялось и на фоне блокады α -адренорецепторов. При этом наблюдалось увеличение латентного периода реакции, что свидетельствует о полном блоке α -адренорецепторов, так как возможность прямой активации α -адренорецепторов отсутствует. Уменьшение продолжительности реакции на введение иммобилизованного ФЭ, а также менее выраженное, по сравнению с зарегистрированным у интактных животных, повышение САД и ОПС можно объяснить разницей в скорости выведения из кровяного русла α -адреноблокатора и α -адреномиметика, заключенного в липосомы.

Интересными данными, свидетельствующими о модификации действия иммобилизованного ФЭ, являются результаты, полученные на фоне блокады β -адренорецепторов. В этих условиях ФЭ, заключенный в липосомы, оказывал выраженный кардиостимулирующий эффект, однако, в отличие от свободного ФЭ, у него отсутствовало отрицательное хронотропное действие. Увеличение латентного периода и времени достижения максимального эффекта на сердечно-сосудистую систему животных в условиях блокады β -адренорецепторов при введении свободного и инкапсулированного ФЭ можно объяснить значительным снижением исходного состояния сократимости миокарда и ЧСС под влиянием β -антагониста пропранолола [2].

При сочетанной блокаде адренорецепторов действие ФЭ, заключенного в липосомы, на сердечно-сосудистую систему животных совпадает с его действием в условиях избирательной блокады α -адренорецепторов, т. е. наблюдается значительное увеличение латентного периода, времени достижения максимума реакции и снижение продолжительности реакции. При этом, как и при блокаде α -адренорецепции, зарегистрирован выраженный положительный инотропный и вазопрессорный эффект без хронотропной реакции сердца.

Опыты по раздельному введению липосом и водного раствора ФЭ позволили показать, что главную роль как в модификации действия иммобилизованного ФЭ на сердечно-сосудистую систему животных без блокады адренорецепторов, так и в восстановлении чувствительности адренорецепторов при их блокаде играют фосфолипиды мембраны липосом.

Необходимо отметить, что для снятия сочетанной блокады адренорецепторов липосомами необходим определенный временной интервал. Максимальная реакция на введение ФЭ наблюдалась при его введении через 70 с после инъекции липосом. Причем, как уменьшение, так и увеличение этого интервала снижало эффективность последующего вве-

дения α -агониста. Наиболее вероятным механизмом снятия блокады адренорецепции липосомами является сдвиг равновесия взаимодействия рецептор — антагонист за счет адсорбции антагониста на мембране липосом. Известно, что связывание антагонистов с адренорецепторами — процесс равновесный и обратимый [5]. Было показано, что некоторые антагонисты адренорецепторов хорошо связываются с мембраной липосом. Так пропранолол связывается с мембраной липосом с константой связывания 10^{-4} моль [7]. Простой расчет показывает, что моноамеллярные липосомы диаметром 50 нм (концентрация лецитина 10 мг/мл) при условии, что молекула лецитина на внешнем монослое имеет поверхность в 7,4 нм, а на внутреннем монослое 6,8 нм имеют общую поверхность 0,4 м². Таким образом, в наших экспериментах введенные липосомы имеют общую поверхность 1,2—1,6 м². Тогда интервал 70 с между введениями липосом и агониста, необходимый для развития максимальной реакции, можно объяснить необходимостью установления нового равновесия между связыванием антагониста с липосомами и адренорецепторами. Однако, в таком случае введение ФЭ после 70 с должно было давать постоянный по величине ответ. В наших опытах мы обнаружили, что инъекция ФЭ на фоне одновременной блокады адренорецепторов через 120, 300 с после введения липосом приводила к развитию менее выраженной реакции. Одной из причин этого может быть уменьшение со временем концентрации липосом в кровотоке.

Важным моментом при раздельном введении липосом и α -агониста ФЭ на фоне сочетанной блокады адренорецепторов является модификация ответной реакции сердечно-сосудистой системы. При этом наблюдается выраженный положительный инотропный эффект, увеличение ОПС без хронотропной реакции, т. е. эффект, аналогичный реакции на введение иммобилизованного в липосомах ФЭ в условиях одновременной блокады адренорецепторов. Эти результаты свидетельствуют о том, что липосомы, связываясь с мембранами клеток, могут качественно изменять конечный ответ эффектов на воздействие биологически активных веществ.

Необходимо также подчеркнуть, что предварительное введение липосом, восстанавливая чувствительность адренорецепторов к ФЭ и модифицируя его влияние на сердечно-сосудистую систему животных, не увеличивает продолжительности действия α -адреномиметика. Эти результаты еще раз подчеркивают, что для пролонгации действия α -адреномиметика ФЭ необходимо создание депо препарата в организме.

Таким образом, проведенные нами эксперименты показывают, что фосфолипиды мембраны липосом могут оказывать существенное влияние на действие лекарственных и биологически активных соединений, что необходимо учитывать при использовании липосом в медицине.

A. V. Stefanov, A. V. Dmitrieva, M. I. Gurevich,
V. I. Boiko, L. Ya. Sazonova

INFLUENCE OF PHENYLEPHRINE INTRAPPED IN LIPOSOMES ON CARDIOHEMODYNAMIC PARAMETERS UNDER ADRENERGIC RECEPTOR BLOCKADE

Intrapped phenylephrine (PE) causes an intensification of myocardial contractility, increase of blood pressure and vessel resistance without disturbance of systolic rhythm. The effect of intrapped PE lasted 3 times longer than the effect of free PE. It is shown that intrapped PE exerts its cardiostimulative effect under blockade of α - and β -adrenoreceptors. Administration of liposomes and phenylephrine solution against the adrenoreceptor blockade leads to rehabilitation of the adrenoreceptor sensitivity to phenylephrine.

A. A. Bogomoletz Institute of Physiology,
Academy of Sciences, Ukrainian SSR, Kiev