

**М.В. Шепетько,
А.І. Соловійов**

ПАРАДОКСАЛЬНЕ ПОЄДНАННЯ ЕФЕКТІВ ЛІПОСОМ: ПОСИЛЕННЯ КАТЕХОЛАМІНОВОЇ ВАЗОКОНСТРИКЦІЇ ТА ГІПОТЕНЗИВНА ДІЯ

ДУ «Інститут фармакології та токсикології» АМНУ
м. Київ

Ключові слова: ліпосоми,
фосфоліпіди, адренорецептори,
адреноміметики,
адреноблокатори, модуляція
ефекту

Key words: liposomes,
phospholipids, adrenoceptors,
adrenergic agonist, and antagonists,
modulation of effects

Резюме. Известно, что липосомы оказывают антигипертензивный эффект. В то же время, адренорецепторы являются липидозависимыми структурами. В данном исследовании рассматривается изменение сосудистой реактивности при помощи фосфолипидов. Мы изучали спонтанную активность воротной вены крысы в ответ на введение адренергических агонистов и антагонистов различной рецепторной направленности в присутствии и отсутствии фосфатидилхолиновых липосом (100 мкг/мл). Показано, что реакции воротной вены крыс на комбинированное введение фосфатидилхолиновых липосом и адренергически активных веществ имеют ряд особенностей, заключающихся в повышении величины максимальной реакции для альфа-адреномиметиков и для бета-адреноблокаторов. Наиболее значительное влияние липосомы продемонстрировали в отношении эффектов фенилэфрина и адреналина и для блокатора бета-адренорецепторов пропранолола. Величина их максимальной реакции увеличилась на $71,34 \pm 10,7\%$, $70,85 \pm 12,2\%$ и $99,5 \pm 28,3\%$. Таким образом, фосфатидилхолиновые липосомы усиливают ответы воротной вены на агонистов альфа-адренорецепторов и антагонистов бета-адренорецепторов. Весьма вероятно, что, вопреки их способности усиливать действие катехоламинов, с вазоконстрикторным действием, липосомы оказывают антигипертензивный эффект благодаря механизму, схожему с симпатомиметической активностью бета-блокаторов. Данное явление можно использовать в клинической фармакологии для разработки методов преодоления толерантности к бета-блокаторам.

Summary. It is well known that liposomes exert hypotensive action. The aim of this study was to clarify whether phosphatidylcholine liposomes are able to exert influence on vascular adrenoceptor responses. In this work spontaneous contractile activity of rat portal vein treated with different alpha- and beta-adrenoceptors agonists and antagonists, with and without phosphatidylcholine liposomes (100 mkg/ml) was studied. The most substantial effect was demonstrated by liposomes as for phenylephrine and adrenalin-epinephrine and for a blocker of beta-adrenoceptors-propranolol. Maximal response of β -adrenoceptors increased by $71,34 \pm 10,7$, $70,85 \pm 12,2\%$ and $99,5 \pm 28,3\%$ respectively. Thus, phosphatidylcholine liposomes enhance alpha-agonist-induced responses, as well as reaction for beta-antagonist in rat portal vein. It is likely that, despite their ability to enhance catecholamines action, which general vasoconstriction action, liposomes possess hypotensive effect due to mechanism similar to intrinsic sympathomimetic activity of beta-adrenoceptor blocking drugs. A given phenomenon may be used in clinical pharmacology for development of methods of overcoming of tolerance to beta-blockers.

Відомо, що фосфоліпідні везикули (ліпосоми) найчастіше використовують як носій для транспорту біологічно активних молекул до органів та клітин- мішеней. Але одна з важливих влас-

тивостей ліпосомального носія полягає в тому, що ліпосоми самі по собі не є біологічно інертним матеріалом. Множинні самостійні ефекти ліпосом комбінуються з ефектами лі-

карської речовини, що виражається в посиленні або послабленні останніх.

Відносно ефектів ліпосом складається дещо парадоксальна ситуація. З одного боку, численні літературні джерела указують на антигіпертензивний ефект ліпосом [2, 14] і, зокрема, препарату ліпін [5]. З іншого боку, ряд дослідників у своїх роботах демонструють, що ліпосоми посилюють дію катехоламінів [1, 3, 4], основним ефектом яких є вазоконстрикція, що дещо суперечить антигіпертензивній дії. Разом із цим, відомо, що під впливом бета-адреноблокаторів, безперечно ефективних при артеріальній гіпертензії, також відбувається підвищення рівня катехоламінів [10, 17].

Метою даної роботи було виявлення здатності фосфоліпідних ліпосом модулювати адренергічні реакції у гладких м'язах судинної стінки, а також уточнити уявлення про роль фосфоліпідів у функціонуванні адренергічних рецепторів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Методика реєстрації скоротливої активності. Досліди виконані на ізольованих препаратах ворітних вен (n=16) дорослих шурів-самців лінії Вістар вагою 250-300 г. Ворітна вена щура є адекватною моделлю резистивних судин і підходить як тест-об'єкт для вивчення адренорецепторів [18]. Застосована методика реєстрації скоротливої активності що була детально описана в роботі [7]. Реєстрували реакції ворітної вени на фенілефрин, клонідин та адреналін (агоністи альфа(1)-, альфа(2)-, альфа(1,2)-адренорецепторів, відповідно), празозин, (антагоністи альфа(1)- адренорецепторів), а також на добутамін (агоністи бета(1)-адренорецепторів), атенолол, бутоксамін та пропранолол (антагоністи бета(1)-, бета(2)-, та бета(1,2)-адренорецепторів) в присутності ліпосом (100 мкг/мл) та їх відсутності у буферному розчині.

Для побудови кривих доза-ефект використовувався ряд послідовних концентрацій (10^{-8} - 10^{-4} моль/л) для кожного з агоністів і антагоністів. Тривалість експозиції для кожної з концентрацій становила 3-5 хв.

Методика отримання ліпосом. Незаповнені фосфатидилхолінові ліпосоми були отримані шляхом висушування 10 % спиртового розчину лецитину на вакуумному випаровувачі з подальшим додаванням ізотонічного розчину NaCl та обробкою отриманої суспензії на ультразвуковому дезінтеграторі при частоті 22 КГц протягом 3 хв. Концентрація ліпосом у розчині (на основі розчину Кребса), що перфузував, становила 100 мкг/мл.

Розрахунки. Індивідуальні відповіді ізольованих ворітних вен на фармакологічні впливи при різних концентраціях оцінювали шляхом порівняння «інтегральної інтенсивності скоротливої активності» (ПА), за методикою, що описана в [12, 13]. Даний показник був використаний у зв'язку з варіабельністю частоти та амплітуди спонтанних скорочень ворітної вени. ПА є зведеним показником, що включає частоту, амплітуду та величину базального тону, чисельно дорівнює площі під кривою «сила скорочення (F) – час (t)» і відображає роботу, що виконана м'язом. ПА в присутності ліпосом порівнювали з рівнем активності у відсутності ліпосом шляхом побудови кривих залежності ПА (%) від концентрації речовини (log M).

Реактиви. У дослідах використовували фенілефрин, клонідин, адреналін, атенолол, бутоксамін, празозин та пропранолол (всі перераховані вище реактиви фірми Sigma, США), добутамін ("Гріндекс", Латвія), лецитин ("Біолек", Україна).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При спробі побудувати криву доза-ефект для зростаючих концентрацій ліпосом (від 20 до 1280 мкг/мл) нами було виявлено, що ліпосоми на спонтанну активність ворітної вени впливають не дозозалежним, а пороговим чином. Після досягнення порогової концентрації в 100 мкг/мл подальшої зміни ефекту не відбувалося. Дана концентрація ліпосом була обрана як робоча для всіх наступних дослідів. Реакції ворітної вени на адренергічні агоністи та антагоністи, що була оброблена ліпосомами, відрізнялися від ефектів інтактних тканин низкою особливостей, специфічних для кожного з типів сполук. Результати дослідження впливу ліпосом на ефекти адреноміметиків та блокаторів надані на рисунку 1.

При порівнянні дії ліпосом за величиною максимальної відповіді (E_{max}), найбільша їх активність відмічена по відношенню до ефектів альфа(1)-АМ фенілефрину (збільшення на $71,34 \pm 10,7\%$) та неселективного альфа(1,2)-АМ адреналіну (збільшення на $70,85 \pm 12,2\%$), и дещо менша активність для альфа-(2)-АМ клонідину (збільшення на $44,80 \pm 4,7\%$). Також значні зміни величини максимальної реакції відмічено при комбінованій дії ліпосом та бета(1)-АБ атенололу (2-кратне зниження E_{max}), (Рис 2). За даним критерієм ліпосоми не виявили активності по відношенню до бета(2)-АБ и достовірно підвищили значення E_{max} для пропранололу (збільшення удвічі) (рис 2).

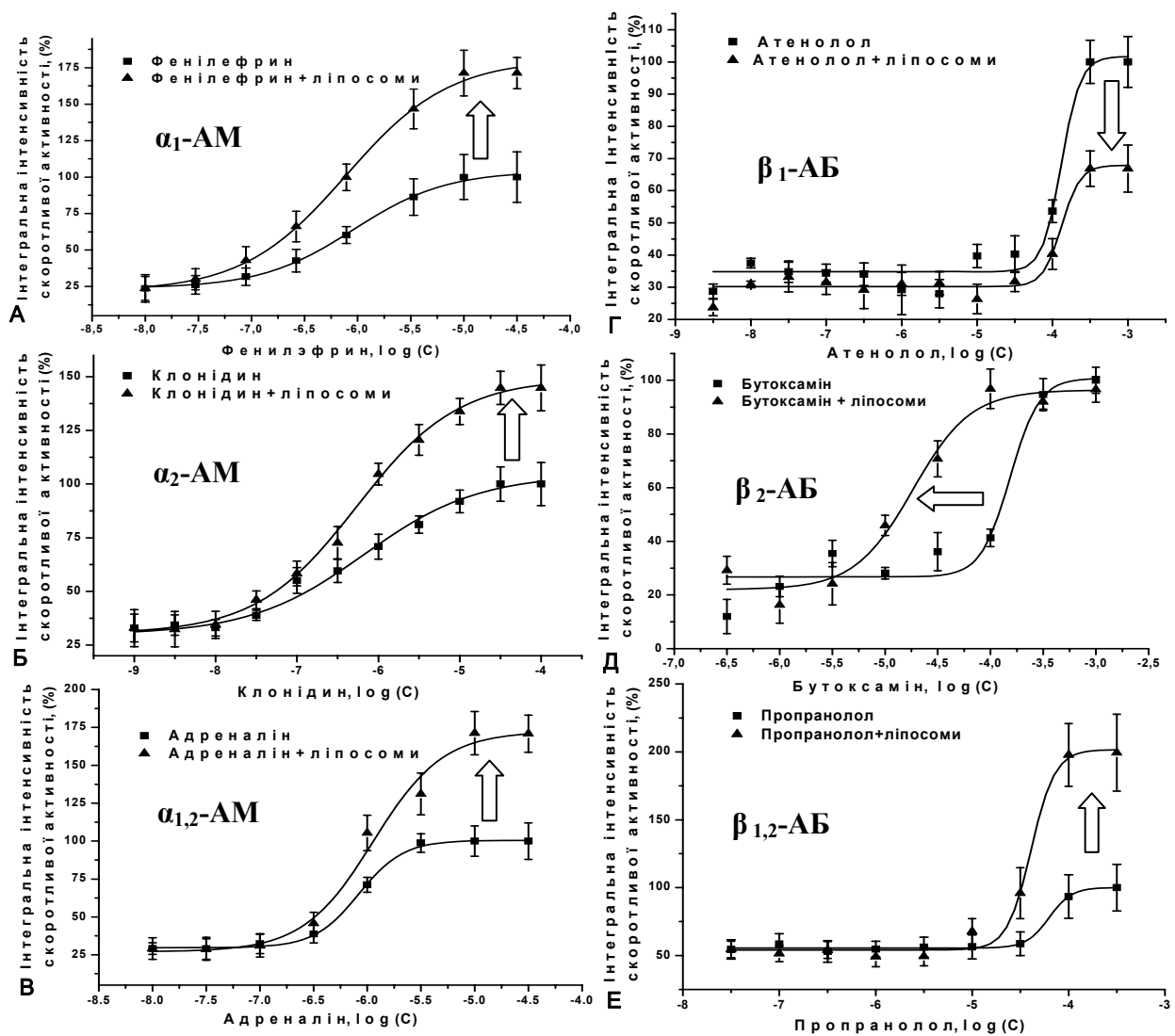


Рис.1. Вплив ліпосом (100 мкг/мл) на залежність доза-ефект для адренергічних агоністів та антагоністів різної рецепторної спрямованості на гладком'язових клітинах *v. Portae* (n=6; p<0,05 для кожного з дослідів)

Примітки: стрілкою показаний напрямок зміщення кривої доза-ефект після введення ліпосом. Позначення: АМ – адреноміметик; АБ – адреноблокатор

Порівнюючи напрямок зсуву кривих доза-ефект, необхідно відмітити, що дія ліпосом на ефекти агоністів всіх типів альфа-АР проявлялася зміщенням кривої доза-ефект вліво (рис. 1). Найбільш значний зсув кривої доза-ефект вліво відбувався для ефектів бета(2)-АБ (рис. 1 Д), причому величина E_{max} , достовірно не змінювалася (рис. 1).

Таким чином, при аналізі дії ліпосом по відношенню до адренергічно активних сполук можна помітити певну систему в змінах. Найбільш очевидними змінами, що відбуваються під впливом ліпосом, є: посилення відповідей альфа-АМ (на підставі зниження EC_{50} та збільшення їх E_{max}), а також посилення відповідей для неселективного блокатора бета-адренорецепторів.

Для визначення походження модулюючого ефекту нами була проведена наступна серія дослідів, у яких дане явище було відтворено в умовах блокади АР. Вивчення характеристик агоністу, виміряних у присутності антагоністу, широко застосовується для класифікації (рецепторної спрямованості дії речовини).

Установлено, що агоніст альфа-АР фенілефрин стимулює спонтанну скоротливу активність ворітної вени дозозалежним чином з EC_{50} $1,84 \times 10^{-6} \pm 2,81 \times 10^{-7}$ моль/л. У присутності $1,27 \times 10^{-4}$ (ED_{50}) антагоністу бета-адренорецепторів атенололу, EC_{50} для фенілефрину збільшилася до $1,25 \times 10^{-6} \pm 2,77 \times 10^{-7}$ (рис. 3 Б). Додавання ліпосом не викликало достовірних змін (рис. 3 Б), характерних для ефекту фенілефрину.

ефрину під впливом ліпосом у відсутності бета-блокатора (рис. 3 А). Тому можна констатувати відсутність зсуву кривої доза-ефект для альфа-

агоністу фенілефрину під дією ліпосом в умовах блокади бета-адренорецепторів.

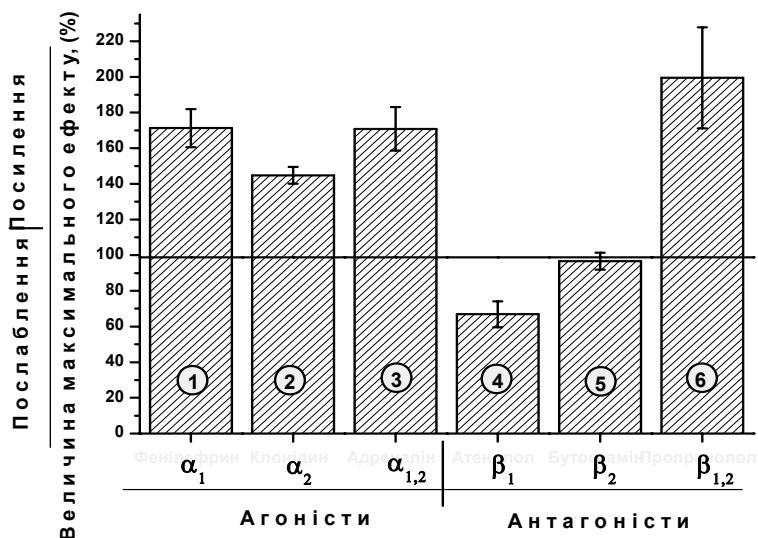


Рис. 2. Зміни величини максимальної реакції під впливом ліпосом (100 мкг/мл) для адренергічних агоністів та антагоністів різної рецепторної спрямованості. Значення вище за 100 вказують на посилення реакції, нижче – на послаблення. (n=6; p<0,05 в кожному з дослідів). Позначення: 1- фенілефрин; 2- клонідин; 3- адреналін; 4- атенолол; 5- бутоксамін; 6- пропранолол

На відміну від попереднього досліді, ми спостерігали зсув кривої доза-ефект для агоністу бета-АР в умовах блокади альфа-АР. Так, агоніст бета-АР добутамін викликав посилення спонтанної скоротливої активності ворітної вени дозозалежним чином з $EC_{50} 4,36 \times 10^{-5} \pm 1,85 \times 10^{-6}$ моль/л.

У присутності $1,41 \times 10^{-5} \pm 1,71 \times 10^{-6}$ (EC_{50}) блокатору альфа-АР празозину EC_{50} фенілефрину зменшувалася до $5,34 \times 10^{-5} \pm 1,65 \times 10^{-6}$.

Додавання ліпосом викликало збільшення EC_{50} фенілефрину до $4,76 \times 10^{-5} \pm 1,15 \times 10^{-6}$. Тобто можна заключити, що зсув кривої доза-ефект для добутаміну, що відбувається під впливом ліпосом (Рис. 4 А), не блокується антагоністом альфа-АР (Рис. 3 В). Одночасно також спостерігалися відповідні зміни величини максимальної реакції.

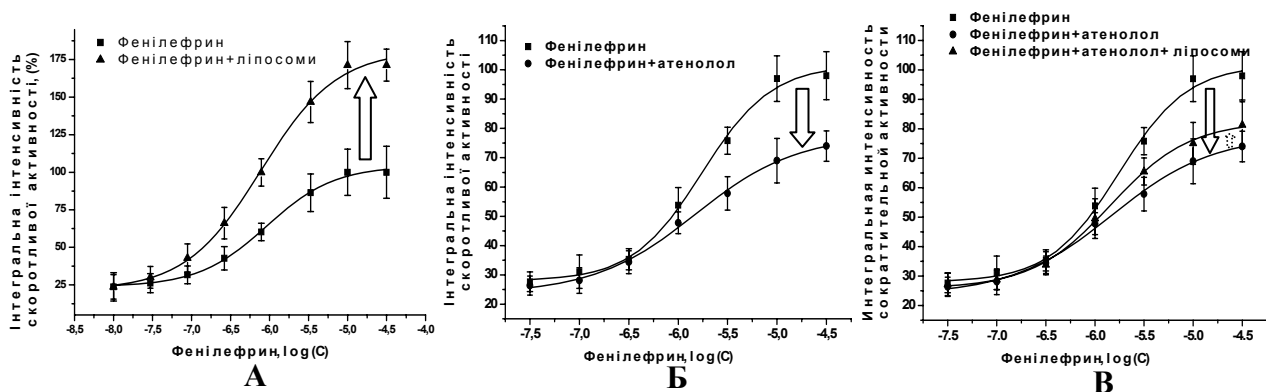


Рис. 3. Залежність доза – ефект для фенілефрину (А) , на фоні атенололу у відсутності (Б), у присутності ліпосом (В) на гладком'язових клітинах v. Portae (n=6; p>0,05 для кожного з дослідів)

Точки прикладення модифікуючого ефекту фосфоліпідів залишаються недостатньо вивченими. У літературі ми знайшли кілька можливих пояснень отриманому явищу: а) вплив на посилення вивільнення катехоламінів; б) вплив на up-/down-регуляцію адренорецепторів; в) вплив на конформацію активного центру ре-

цептора; г) алостерична модуляція рецепторів; д) збільшення ефективності ліганда; е) зміна внутрішньої симпатоміметичної активності. Перераховані можливі механізми більш детально були розглянуті в роботі [6]. Більш детально хотілося б зупинитись на механізмах, що, можливо, поєднують наші спостереження.

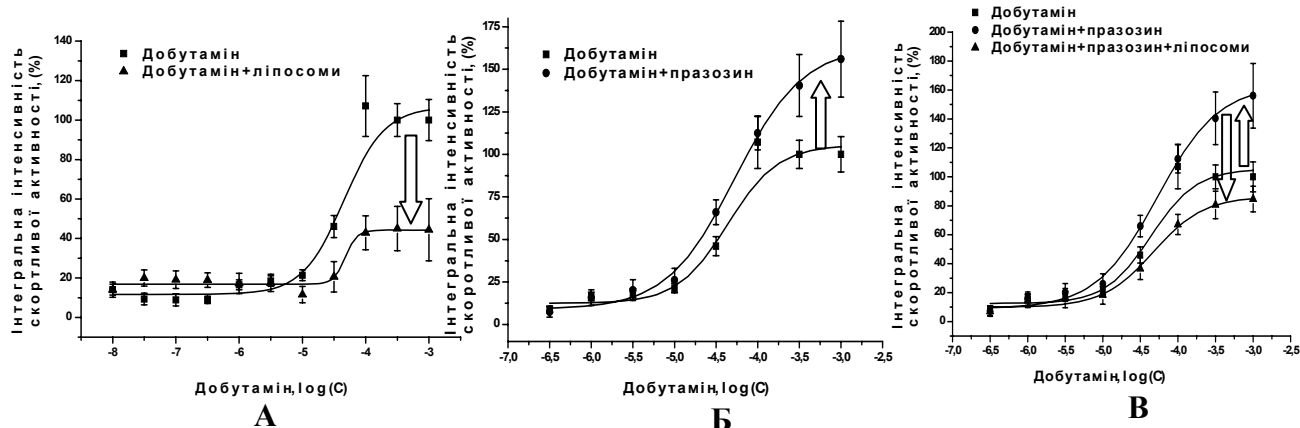


Рис. 4. Залежність доза – ефект для добутаміну (А), на фоні празозину у відсутності ліпосом (Б), у присутності ліпосом (В) на гладком'язових клітинах *v. Portae* (n=6; p>0,05 для кожного з дослідів)

Збільшення відповіді тканини на адреналіноподібні речовини може відбуватися в результаті посилення вивільнення запасів ендогенних катехоламінів. Відомо, що секреторні гранули медиатора під впливом нервового імпульсу вивільняються шляхом екзоцитозу із синаптичних пухирців [11]. Збудження закінчень адренергічних аксонів приводить до злиття мембрани деяких везикул із пресинаптичною мембраною аксону, після чого місце злиття розчиняється, вміст везикули вивільняється в синаптичну щілину [15]. Ліпосоми можуть сприяти злиттю синаптичних пухирців з пресинаптичною мембраною і цим збільшувати вивільнення медиатора. Але в такому випадку логічно очікувати, що ліпосоми самостійно будуть спричиняти адреналіноподібний ефект.

З іншого боку, відомо, що down-регуляція адренорецепторів відбувається у секвеструючих везикулах, що відокремлюють їх від поверхні плазматичної мембрани. Тому також цілком імовірно, що ліпосоми сприяють злиттю мембрани подібних везикул з постсинаптичною мембраною, після чого вміст везикули – на цей раз рецептор – з'являється на поверхні мембрани. Ресенситизація (up-регуляція) проявляється паралельним зміщенням кривої доза-ефект вліво [8], (як у випадку з бета(2)-АБ). Тобто, ліпосоми

можуть забезпечувати злиття секвеструючих везикул із мембраною, тим самим збільшуючи число активних рецепторів.

Встановлено, що ряд альфа-АБ та майже всі бета-АБ володіють постсинаптичною адреноміметичною дією, яка зберігається при спустошенні депо катехоламінів та може бути поясненою тільки наявністю у адреноблокаторів прямого катехоламіноподібного впливу на адренорецептори клітин виконавчих органів. Вищеподане явище позначається терміном «внутрішня симпатоміметична активність» (ВСА). ВСА – здатність блокаторів не тільки блокувати адренорецептори, але і частково стимулювати їх. Установлено, що така активність може бути спрямована на певний підтип адренорецепторів (селективна ВСА) або ж на обидва підтипи адренорецепторів (неселективна ВСА). Доречно зауважити, що завдяки ВСА пояснюється антигіпертензивний ефект бета-блокаторів [9, 17]. Не виключено, що 2-кратне підвищення величини максимальної реакції для бета-блокатора пропранололу та одночасне збільшення сили дії альфа-адреноміметиків під впливом фосфоліпідів, що продемонстровано в даному дослідженні, відбувається за рахунок зміни ВСА.

Значення даного спостереження украй клінічно важливе, оскільки не виключено, що за

допомогою ліпосом відбувається посилення скорочення гладких м'язів судин для базового рівня катехоламінів крові, що запускає компенсаторні механізми, які приводять до зменшення артеріального тиску (як результат рефлексу на підвищення кров'яного тиску з барорецепторів дуги аорти та каротидного синусу). І, якщо на системному рівні таке явище може бути пояснене рефлекторними впливами, то на рівні ізольованої судини цей механізм ще потребує встановлення. Однак, незалежно від механізму, дане явище можна використовувати у клінічній фармакології для розробки методів подолання толерантності до бета-блокаторів. До того ж, адреналінсенсibiliзуюча дія ліпосом змушує припускати в них антидепресивний ефект. Також дані, отримані в дослідженні, необхідно врахувати при розробці ліпосомальних форм адренергічно активних препаратів, оскільки ефекти носія можуть суттєво позначатися на активності доставляємої речовини, що доставляється.

ВИСНОВКИ

Фосфоліпіди беруть участь у модифікації активності адренорецепторних систем, що необ-

хідно враховувати при розробці ліпосомальних форм адренергічно активних препаратів.

Комбіноване введення фосфатидилхолінових ліпосом та адренергічно активних сполук виражається посиленням відповідей ворітної вени щурів на агоністів альфа-адренорецепторів, а також антагоністів бета-адренорецепторів.

Модулюючий ефект для агоністів-альфа-адренорецепторів, що відбувається під впливом ліпосом, блокується антагоністом бета-адренорецепторів.

Модулюючий ефект для агоністів-бета-адренорецепторів, що відбувається під впливом ліпосом, не блокується антагоністом альфа-адренорецепторів.

Антигіпертензивний ефект ліпосом, очевидно, пов'язаний саме з їх здатністю посилювати дію катехоламінів. За схожим механізмом діють блокатори бета-адренорецепторів, які сприяють викиду катехоламінів, але за рахунок рефлексу з барорецепторів аорти та каротидного синуса викликають зниження ЧСС і, як наслідок, знижують кров'яний тиск.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Влияние норадреналина заключенного в липосомы, на кардиогемодинамические показатели в условиях блокады адренергических рецепторов / А. В. Стефанов, А. В. Дмитриева, В. К. Лишко и др. // Докл. АН СССР. – 1983. – Т. 268, №5. – С.1270–1273.
2. Изменения сократительной сосудистой функции при артериальной гипертензии и их коррекция при помощи фосфатидилхолиновых липосом / А. И. Соловьев, С. М. Тишкин, А. С. Хромов и др. // Физиол. журн. – 2002. – Т.48, №6. – С.11–18.
3. Применение липосомальной формы адреналина для коррекции гипоксии нагрузки / В. Р. Тютюник, В. П. Пожаров, Т. Д. Миняйленко и др. // Физ. культура: наука и практика. – 1984. – №2. – С. 42–45.
4. Стефанов А. В. Об особенностях действия НА заключенного в липосомы, на системное артериальное давление / А. В. Стефанов, М. И. Гуревич, А. В. Дмитриева и др. // Физиол. журн. – 1980. – Т.26, № 1. – С.20–26.
5. Ткачук О.И. Экспериментальне обґрунтування гіпотензивної дії ліпіну // Вісник фармації. – 1998. – №2(18). – С.119–120.
6. Шепетько М. В. Модулююча дія екзогенних фосфоліпідів на ефекти адренотропних сполук // Матеріали ІІ Національного конгресу лікарів внутрішньої медицини "Дискусійні питання діагностики та лікування в клініці внутрішніх хвороб". – К., 2008. – 243–250с.
7. Шепетько М. В., Соловьев А.І. Фосфатидилхолінові липосоми підсилюють альфа-адренергічні відповіді спонтанно-активної ворітної вени // Ліки. – 2007. – №5–6. – с.110–116.
8. Benediktsdottir V. E., Curvers J., Gudbjarnason S. Time course of alterations in phospholipid fatty acids and number of beta-adrenoceptors in the rat heart during adrenergic stimulation in vivo // J. Mol. Cell. Cardiol. – 1999. – Vol.31. – P.1105–1115.
9. Hamilton T.C., Chapman V. Intrinsic sympathomimetic activity of beta-adrenoceptor blocking drugs at cardiac and vascular beta-adrenoceptors // Life Sci. – 1978. – Vol.23 N 8. – P.813–819.
10. Koganei H., Kimura T., Satoh S. Effects of beta adrenoceptor agonists and antagonists on adrenal catecholamine release in response to splanchnic nerve stimulation in anesthetized dogs: role of beta-1 and beta-2 adrenoceptors // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 1995. – Vol.273 N 3. – P.1337. – 1344.
11. Lucy J.A. The fusion of biological membranes // Nature. –1970. –Vol.227, N 5260. –P.815–817.
12. Phillip M. Neomycin inhibition of hormon-stimulated smooth muscle contractions in myometrial tissue // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1994. – Vol.205. – P.245–250.
13. Phillip M., Basa A. The effects of ruthenium red an inhibitor of calcium-induced release on basic myometrial contractions // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1996. – Vol.221. – P.656–661.
14. Phospholipid vesicles (liposomes) restore endothelium-dependent cholinergic relaxation in thoracic aorta from spontaneously hypertensive rats / A.I.

Soloviev, A.V. Stefanov, O.V. Bazilyuk et al. // *J. Hypertens.* 1993. – Vol.11, N6. – P.623–627.

15. Smith A. D. Cellular control of the uptake, storage and release of noradrenaline in sympathetic nerves // *Biochem. Soc. Symp.* – 1972. – Vol.36. –P.103–131.

16. Sugawara K., Takami N., Maemura S. Beta-adrenoceptor blocking agents release catecholamines from rat adrenal medulla // *Eur. J. Pharmacol.* – 1980. – Vol.62 N 4. – P.287–295.

17. Van Zwieten P. A. From alpha and beta to I1: an overview of sympathetic receptors involved in blood pressure control targets for drug treatment Pieter Van Zwieten // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* – 1996. – Vol.27. – P.S5–S10.

18. Vidal-Beretervide K., Castaneda L. The isolated rat portal vein as a model for studying beta-adrenoceptor agonists and antagonists // *J. Auton. Pharmacol.* – 1988. – Vol.8, N 3. – P 173–180.

