

Експериментальне обґрунтування використання ліпосомального препарату ліпіну як фрігопротектора

Н.А.Домар, С.Ю.Штриголь

Національний фармацевтичний університет, Інститут підвищення кваліфікації спеціалістів фармації,
кафедра технології ліків та клінічної фармакології з фармацевтичною опікою
Харків, Україна

У досліджах на мишах на моделі гострого загального охолодження вперше встановлено, що ліпін у діапазоні доз 400-734 мг/кг внутрішньоочередовинно чинить потужну захисну дію у вигляді зростання часу виживання. Максимальний ефект мала доза 734 мг/кг, яка була ефективною і при введенні у шлунок. Ацетилсаліцилова кислота (25 мг/кг) на відміну від бемітилу (50 мг/кг) також виявила фрігопротекторні властивості, проте її комбінація з ліпіном позбавлена захисної дії. Результати слугують обґрунтуванням доцільності використання ліпіну за новим показанням — для профілактики та лікування гострої холодової травми.

Ключові слова: холодова травма, фрігопротектори, ліпосомальні препарати.

ВСТУП

Холодова травма має поширеність у багатьох країнах, а вдосконалення її лікування є актуальним завданням медицини та фармації [9, 10, 12, 14]. Фармакологічний вплив на переносимість гіпотермії при загальних та місцевих холодових травмах передбачає два підходи. Перший — фармакологічна корекція температурного гомеостазу для того, щоб стабілізувати теплову рівновагу організму в умовах низької зовнішньої температури. Другий — підвищення резистентності тканин до подразнювальної та пошкоджуючої дії холоду за допомогою лікарських засобів (формування фрігорезистентності) для підтримки функції клітин навіть при вираженому охолодженні організму [4]. Тому препарати, які можуть застосовуватися як фрігопротектори, повинні діяти переважно на клітинному

(тканинному) рівні, що припускає можливість профілактики і пом'якшення впливу несприятливих чинників довкілля на будь-який орган.

Під впливом холодової травми порушуються структурно-функціональні властивості мембран. На сьогодні механізм подразливої дії холоду пояснюється прямою дією на клітини і загибеллю тканин, що настає внаслідок розладу кровообігу та іннервації. Руйнування тканин виникає внаслідок кристалізації води під впливом низької температури спочатку в міжклітинній рідині, а потім і всередині клітини. При цьому в клітинах різко зростає концентрація електролітів, що супроводжується руйнуванням клітинних мембран [1, 7]. Разом із цим під впливом екстремальних чинників (у тому числі й переохолодження) в організмі збільшується кількість вільних ненасичених жирних кислот — оптимального субстрату окислення й утворення перекисів, ліпідів, що являють собою групу токсичних продуктів вільнорадикального окислення (ВРО). Це зумовлює активацію ВРО з надмірним утворенням продуктів перекисного окислення ліпідів, що спричиняє пошкодження мембран клітинних структур, підвищення проникності мембран лізосом, інактивацію ферментів, формування патологічних станів тощо. Перешкоджає впливу ВРО система антиоксидантного захисту, яка забезпечує зв'язування та модифікацію активних метаболітів кисню [5].

Саме тому при холододійній травмі важливим заходом є застосування лікарських препаратів з метою стабілізації мембран. Можна вважати, що потужні мембранопротектори, антигіпоксичні засоби та антиоксиданти будуть сприяти формуванню фрігорезистентності, оскільки діють на клітинному рівні. До таких препаратів належить ліпосомальна форма фосфатидилхоліну — ліпін, який широко використовується у складі комплексної терапії в пульмонології, кардіології, акушерстві, гастроентерології, нефроло-

ТАБЛИЦЯ 1

**Групи тварин та препарати, які вони отримували для дослідження фрігопротекторної дії
в умовах гострого загального охолодження**

№ групи	Препарат, що вводили, доза	Кількість тварин, n	Спосіб введення
1	Контроль — холодний вплив	14	-
2	Ліпін 100 мг/кг + холодний вплив	5	Внутрішньоочеревинно
3	Ліпін 400 мг/кг + холодний вплив	5	Внутрішньоочеревинно
4	Ліпін 734 мг/кг + холодний вплив	7	Внутрішньоочеревинно
5	Ліпін 1000 мг/кг + холодний вплив	5	
6	Ліпін 734 мг/кг + холодний вплив	7	У шлунок
7	Ліпін 734 мг/кг + АСК 25 мг/кг + холодний вплив	5	Внутрішньоочеревинно
8	АСК 25 мг/кг + холодний вплив	8	Внутрішньоочеревинно
9	Бемітил 50 мг/кг + холодний вплив	10	Внутрішньоочеревинно

гії [8]. Широкий спектр дії ліпіну обумовлений, передусім, фосфоліпідною будовою ліпосом, що являють собою спрощену модель біологічної мембрани. Завдяки спорідненості за будовою з мембранами клітин людини та високої біодоступності, фосфоліпіди ліпіну здатні відновлювати уражені мембрани клітин, а, як відомо, пошкодження мембран — типовий механізм патогенезу багатьох захворювань. Крім цього застосування ліпосомальних препаратів дає можливість регулювати вивільнення лікарської речовини з ліпосомальної системи і розробляти пролонговані лікарські форми. Такі препарати мають абсолютну біосумісність та відсутність пірогенних, алергенних і токсичних властивостей при різних шляхах введення [11, 13].

Враховуючи викладене вище, об'єктом дослідження став вітчизняний препарат ліпін виробництва ЗАТ «Біолек» (Україна, м. Харків). В експерименті також використано препарати порівняння: субстанцію бемітилу, синтезовану в Інституті органічної хімії НАН України, ацетилсаліцилову кислоту (АСК) фірми «Bayer» (Німеччина).

Метою дослідження було експериментально обґрунтувати використання ліпіну як фрігопротектора залежно від дози та способу введення.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Експерименти проводили в стандартних умовах віварію у відповідності до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах». Вивчення фрігопротекторної дії ліпіну проводили на білих мишах-самцях із використанням моделі гострого загального охолодження при -18°C [6], у співставленні з препаратами порівняння АСК та бемітилом, відомими як фріго-

протектори [3, 4]. Тварини були вміщені до морозильної камери, в якій підтримувалася постійна температура -18°C та знаходилися там під час досліду в індивідуальних пластикових контейнерах.

Фрігопротекторну активність визначали за умов одноразового профілактичного введення препаратів (за 30 хв. до охолодження). Лабораторним тваринам ліпін вводили внутрішньоочеревинно (групи 2-5) та у шлунок через зонд (група 6) у вигляді ліпосомальної емульсії (розчинник — ізотонічний розчин натрію хлориду). Крім цього одній з груп тварин був введений ліпін у дозі 734 мг/кг внутрішньоочеревинно та АСК у дозі 25 мг/кг внутрішньоочеревинно з інтервалом 5 хв. (група 7). Препарати порівняння АСК та бемітил вводили також внутрішньоочеревинно одноразово (група 8, 9). АСК використовували в дозі 25 мг/кг. Доза бемітилу становила 50 мг/кг [2]. Контрольні тварини отримували відповідний об'єм 0,9% розчину натрію хлориду.

Лабораторні тварини (миші-самці масою 15-20 г) були розподілені на групи відповідно до препарату, який вони отримували, та його дози (табл. 1).

Як критерій фрігопротекторної дії обрано тривалість життя тварин в умовах холоду. Активність препаратів розраховували як відсоток збільшення часу життя під впливом холодової травми за формулою:

$$\text{Fr} = \frac{T_1}{T_0} * 100 - 100,$$

де Fr — фрігопротекторна активність (%); T_1 — середній час виживання тварин дослідної групи (хв.); T_0 — середній час виживання тварин контрольної групи (хв.).

Статистичну достовірність відмінностей розраховували за критерієм Стьюдента.

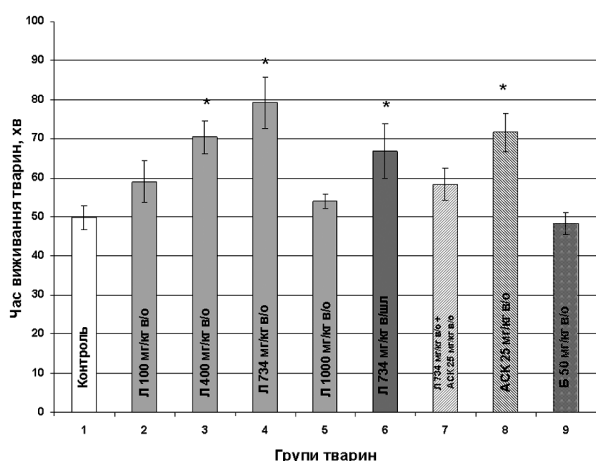


Рис. 1. Вплив дози ліпіну та способу його введення на час виживання під впливом загального гострого охолодження.

Примітки: Л – ліпін; АСК – ацетилсаліцилова кислота; Б – бемітил; в/о – введення внутрішньоочеревинно; в/шл – введення у шлунок; * – достовірні відмінності з контролем ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Достовірний захисний вплив ліпіну при холодовій травмі починався з дози 400 мг/кг (рис. 1).

Найбільш ефективна доза при внутрішньоочеревинному введенні склала 734 мг/кг. При цьому час виживання піддослідних тварин дорівнював $79,3 \pm 6,56$ хв. (група 4). Ані зменшення дози до 100 мг/кг, ані збільшення до 1000 мг/кг не призвело до помітного зростання фрігопротекторної активності (рис. 1). Тобто зі зростанням дози ліпіну до 734 мг/кг час виживання тварин зростає, але подальше підвищення дози недоцільне, оскільки фрігопротекторна активність зменшується. Таким чином, для подальших досліджень обрано дозу ліпіну 734 мг/кг. Літературні джерела свідчать про ефективність ліпосомальних препаратів при оральному застосуванні [8]. Ліпін також рекомендують приймати перорально при лікуванні захворювань шлунково-кишкового тракту. Завдяки ліпосомальній структурі лецитину (фосфатидилхоліну) в ліпіні та нанорозмірам часток препарат має високу біодоступність і при введенні його у шлунок, хоча фрігопротекторний ефект дещо слабший, тривалість життя тварин групи 6 склала $66,9 \pm 7,04$ хв., що вірогідно вище, ніж у контролі ($p < 0,05$), і не має статистично значущих відмінностей з показником, де ліпін вводили в тій самій дозі внутрішньоочеревинно.

Привертає увагу, що внутрішньоочеревинне введення ліпіну в дозі 734 мг/кг або АСК 25 мг/кг чинить виражений фрігопротекторний ефект (групи 4 та 8). Але при комбінованому застосуванні цих препаратів з інтервалом

у 5 хв. захисна дія різко зменшилася (час виживання групи 7 склав $58,4 \pm 4,21$ хв.). Вичерпних пояснень такого результату сьогодні навести навряд чи можливо. Не можна виключити несприятливу фармакокінетичну взаємодію. З'ясування механізму фрігопротекторної дії є завданням наступного етапу досліджень.

Бемітил, незважаючи на дані щодо його фрігопротекторної активності, в умовах використаної жорсткої моделі гострого загального охолодження не чинив захисного впливу: час виживання майже не відрізнявся від контрольного (рис. 1).

Таким чином, ліпін можна рекомендувати як фрігопротектор для парентерального та перорального застосування.

ВИСНОВКИ

1. На моделі гострого загального охолодження ліпін показав виражену фрігопротекторну активність при одноразовому профілактичному внутрішньоочеревинному введенні мишам у діапазоні доз 400-734 мг/кг. Зменшення дози до 100 мг/кг або збільшення до 1000 мг/кг усуває захисну активність.

2. Ліпін чинить фрігопротекторну дію і при введенні не тільки внутрішньоочеревинно, а й у шлунок.

3. Ацетилсаліцилова кислота в дозі 25 мг/кг одноразово внутрішньоочеревинно має фрігопротекторну дію, а бемітил (50 мг/кг) позбавлений її.

4. Комбіноване введення ліпіну та ацетилсаліцилової кислоти тваринам окремо внутрішньоочеревинно в ефективних дозах не чинить захисного ефекту в умовах загального гострого охолодження.

5. Результати слугують обґрунтуванням доцільності використання ліпіну за новим показанням — для профілактики та лікування гострої холодової травми.

ЛІТЕРАТУРА

1. Військова хірургія з хірургією надзвичайних ситуацій / За ред. В.Я.Білого. — Тернопіль: Укрмедкнига, 2004. — С. 130-139.
2. Квітчатая Г.І. Вестибулопротекторна активність і механізм дії бемітилу і етоксібензолу: Автореф. дис. ... к.мед.н.: 14.03.05. — Інститут фармакології і токсикології АМН України / Г.І.Квітчатая. — К., 2001. — 23 с.
3. Назаренко Н.А. Эффективность нестероидных противовоспалительных средств для профилактики и лечения холодовой травмы: Автореф. дис. ... д.мед.н.: 05.26.02, 14.00.25. Северный гос. мед. уни-

- верситет МЗ РФ / Н.А.Назаренко. — Архангельск, 2001. — 38 с.
4. Новиков В.С. Фармакологическая коррекция гипертермии и гипотермии / В.С.Новиков, Е.Б.Шустов, В.В.Горанчук // ЦЭМПИНФОРМ. — 2001. — №4 (46). — С. 15-16.
 5. Профілактика ішемічно-реперфузійного синдрому при загальному переохолодженні в експерименті / В.І.Зубков, Г.П.Хитрий, В.Д.Лук'янчук, А.С.Шаламай // Клінічна хірургія. — 2009. — №5. — С. 49-53.
 6. Увеличение продолжительности жизни мышей при остром охлаждении под воздействием препарата, выделенного из *Laminaria sacchara* / Ю.В.Дрозд, С.В.Бондаренко, В.В.Яснецов и др. // Биол. эксперим. биол. и мед. — 1991. — Т.111, №4. — С. 383-384.
 7. Шаповалов К.Г. Холодовая травма как причина стойкого изменения состояния микроциркуляторного русла // К.Г.Шаповалов, В.А.Сизоненко / Хирургия. — 2009.
 8. Швец В.И. Липосомы в фармации. Продукты нанобиотехнологии (продолжение) / В.И.Швец, Ю.М.Краснопольский // Провизор. — 2008. — №6. — С. 34-37.
 9. Ambiances termiques: travailler au froid / Y.Ganem, J.Pomian, L.Laborde et al. // Documents pour le Medecin du Travail. — 2006. — Vol. 107. — №3. — P. 279-295.
 10. Cold injury of amputated digits / U.Ahcan, B.Luzar, F.Bajrovic // Prevention of Cold Injury. — 2005. — №10. — P. 10-12. — Электронний ресурс: <http://www.rto.nato.int/abstract.asp>.
 11. In vivo monitoring of tissue pharmacokinetics of liposome/drug using MRI: illustration of targeted delivery / B.Viglianti, Sh.Abraham, Ch.Michelich et al. // Magnetic Resonance in Medicine. — 2004. — Vol. 51. — P. 1153-1162.
 12. Jia J. Cold injury to nerves is not due to ischaemia alone / J.Jia, M.Pollock, J.Jia // Brain. — 1998. — Vol. 121. — №1. — P. 989-1001.
 13. Liposomal drug delivery systems — clinical applications / P.Goyal, K.Goyal, S.Kumar [et al.] // Acta Pharm. — 2005. — Vol. 55. — P. 1-25.
 14. Tercan M. Decreased serum nitric oxide level in experimental frostbite injury: a preliminary study / M.Tercan, M.Bekerecioglu // Ann. Plast. Surg. — 2002. — Vol. 48. — №1. — P. 107-108.
- Н.А.Домар, С.Ю.Штрыголь. Экспериментальное обоснование использования липосомального препарата липина в качестве фригопротектора. Харьков, Украина.**
- Ключевые слова:** холодовая травма, фригопротекторы, липосомальные препараты.
- В опытах на мышцах на модели острого общего охлаждения впервые установлено, что липин в диапазоне доз 400-734 мг/кг внутрибрюшинно оказывает мощное защитное действие в виде увеличения времени выживания. Максимальный эффект проявила доза 734 мг/кг, которая была эффективной и при введении в желудок. Ацетилсалициловая кислота (25 мг/кг) в отличие от бемитила (50 мг/кг) также проявила фригопротекторные свойства, но ее комбинация с липином лишена защитного действия. Результаты служат обоснованием целесообразности использования липина по новому назначению — для профилактики и лечения острой холодовой травмы.*
- N.A.Domar, S.Yu.Shtrygol. Experimental study of the use of liposomal drug lipin as frigoprotector. Kharkiv, Ukraine.**
- Key words:** cold injury, frigoprotectors, liposomal drugs.
- In experiments on mice models of acute general cooling for the first time was found that lipin in dose of 400-734 mg/kg intraperitoneally exerts a powerful protective effect in the form of increased survival time. The maximum effect showed a dose 734 mg/kg that was effective at introduction into the stomach so. Acetylsalicylic acid (25 mg/kg) in contrast to bemitile (50 mg/kg) also showed frigoprotector properties, but its combination with lipine is devoid of protective action. The results serve as substantiation of usefulness of lipine on a new purpose — for prophylaxis and treatment of acute cold injury.*

Надійшла до редакції 11.06.2010 р.