

DOI: 10.30906/0869-2092-2019-82-5-20-23

ВЛИЯНИЕ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ УБИХИНОЛА НА РАЗВИТИЕ МОНОКРОТАЛИНОВОЙ ФОРМЫ ЛЕГОЧНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ НА КРЫСАХ

Ш. П. Абдуллаев¹, Т. А. Куропаткина^{1, 2}, Н. В. Панькова², М. М. Артемьева², В. Г. Макаров³, Н. А. Медведева², О. С. Медведев¹

Лёгочная гипертензия (ЛГ) — прогрессирующее заболевание, вызванное повышением сопротивления лёгочных сосудов и увеличением давления в лёгочной артерии. Развитие ЛГ сопровождается гипертрофией правого желудочка сердца и дисфункцией эндотелия лёгочных сосудов. Изучено влияние убихинола на развитие ЛГ. В экспериментах на крысах на модели монокроталиновой формы ЛГ показано, что трёхкратное внутривенное введение солюбилизированной формы убихинола снижает степень гипертрофии правого желудочка сердца и увеличивает эндотелий-зависимое расширение изолированных сегментов лёгочных сосудов.

Ключевые слова: лёгочная гипертензия; монокроталин; гипертрофия; эндотелиальная дисфункция; убихинол; изолированные лёгочные сосуды; крысы.

ВВЕДЕНИЕ

Лёгочная гипертензия (ЛГ) представляет собой хроническое заболевание, характеризующееся стойким повышением систолического давления в лёгочной артерии > 25 мм рт. ст. в покое и > 30 мм рт. ст. при нагрузке [4]. Одним из основных патофизиологических механизмов развития ЛГ является дисфункция эндотелия, выражающаяся в уменьшении синтеза сосудорасширяющих факторов (оксид азота, простаглицлины) и увеличении синтеза суживающих сосуды веществ (эндотелин-1, тромбоспандины) [14]. При хронической форме ЛГ характерные морфофункциональные изменения несут преимущественно воспалительный характер и включают процессы апоптоз-устойчивой пролиферации эндотелиальных и гладкомышечных клеток лёгочной артерии. Воспалительный процесс в эндотелиальных клетках увеличивает проницаемость эндотелиального слоя, снижает активность NO-синтазы и увеличивает чувствительность к вазоконстрикторам. Всё это приводит к сужению просвета артериол и компенсаторной гипертрофии правого желудочка (ПЖ) с последующим нарушением его функции [12, 16].

Природа эндотелиальной дисфункции является мультифакторной и связана с образованием активных форм кислорода (АФК) и развитием окислительного стресса [14]. В частности, взаимодействие АФК с оксидом азота (NO) — активным вазодилатором в сосудистом эндотелии — играет важную роль в определении причинно-следственной связи между окислительным стрессом и гипертонией. АФК нарушают работу NO-синтазы, вызывая синтез оксид-анион-радикала вместо NO [11]. Повы-

шенное количество АФК активирует NF-κB, который, в свою очередь, увеличивает экспрессию провоспалительных цитокинов TNF-α и ИЛ-6 [13, 17]. Таким образом, окислительный стресс и воспалительный процесс в эндотелиоцитах являются факторами патогенеза ЛГ.

Коэнзим Q10 (CoQ10) — эндогенное жирорастворимое вещество, являющееся важнейшим звеном в цепи переноса электронов и синтеза АТФ. Восстановленная форма CoQ10 — убихинол — обладает высокой антиоксидантной активностью, что объясняется его локализацией на внутренней мембране митохондрий — в непосредственной близости от места образования свободных радикалов [2]. Биологическая значимость убихинола определяется также и возможной противовоспалительной активностью [9, 13]. В настоящее время накапливается большое количество данных об эффективном применении убихинола при различных сердечно-сосудистых заболеваниях (ССЗ), сопряжённых с дисфункцией эндотелия, окислительным стрессом и развитием воспаления [10]. Одним из таких заболеваний является ЛГ. Проблемой применения препаратов CoQ10 является низкая биодоступность, составляющая от 0,1 до 3 % для различных лекарственных форм [7]. С целью более быстрого повышения концентрации препарата CoQ10 в крови создана водорастворимая лекарственная форма для внутривенного введения, которая была использована в данной работе.

Исходя из изложенного, мы предположили, что убихинол может оказать протекторное действие на развитие ЛГ. В связи с этим цель данной работы — изучение эффекта внутривенного введения убихинола на развитие ЛГ, вызванной монокроталином, в экспериментах на крысах линии Вистар.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании использовали самцов крыс линии Вистар массой 180 – 230 г (виварий НИИ общей патологии и патофизиологии, Москва). Манипуляции с живот-

¹ Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М. В. Ломоносова, Россия, 119991, Москва, Ломоносовский проспект, 27/1.

² Биологический факультет МГУ имени М. В. Ломоносова, Россия, 119192, Москва, ул. Ленинские горы, 1/12.

³ НПО «Дом фармации», Россия, 188663, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, Кузьмоловский пр., 245.

ними проводили согласно требованиям Council Directive 86/609/ЕЕС. Животных содержали в условиях 12-часового светового дня со свободным доступом к воде и пище.

Животные были разделены на 3 группы по 15 особей в каждой на основании массы и значений систолического артериального давления, измеренного плетизмографическим методом с хвоста. У всех животных моделировали монокроталиновую форму легочной гипертензии (МКТ-ЛГ). Для этого в 3 точки под кожу инъецировали водно-спиртовой раствор алкалоида монокроталина (МКТ) в общей дозе 60 мг/кг [3]. На 7 и 14 день после введения МКТ животным согласно их группе вводили в хвостовую вену вещества — водный раствор солюбилизированной субстанции убихинола в дозе 30 мг/кг (МКТ-У), растворитель для убихинола (МКТ-Р) и физиологический раствор (МКТ-Ф) в соответствующих равных объемах. Убихинол предоставлен НПО “Дом фармации”, Россия.

Через 3 недели после введения МКТ под уретановым наркозом (1,2, 0,6 г/мл) в остром опыте через яремную вену катетеризировали правый желудочек (ПЖ) с помощью полиэтиленового катетера РЕ50 (ЗАО “Медсил”, Россия) и измеряли систолическое правожелудочковое давление (СПЖД), по величине которого судили о развитии ЛГ.

Для измерения артериального давления (АД), частоты сердечных сокращений (ЧСС) и оценки коэффициента барорефлекса катетеризировали бедренную артерию катетером РЕ50 и бедренную вену катетером РЕ10. Запись и оцифровку сигнала регистрируемых гемодинамических показателей проводили с помощью 2 датчиков давления Statham (США), усилителя потенциалов и аналого-цифрового преобразователя L-Card E14–140 (Россия).

После измерений гемодинамических показателей животных декапитировали, выделяли сегмент лёгочной артерии третьего порядка. Изолированные сосуды перфузировали модифицированным физиологическим раствором Кребса — Хенслайта с постоянным расходом, который составлял 2 мл/мин для внутреннего протока и 4 мл/мин — для внешнего. О реакции сосудов судили по изменению перфузионного давления, которое регистрировали в программе Power Graph. Температуру раствора поддерживали на уровне 37–37,5 °С. Регистрацию перфузионного давления начинали после 20-минутной стабилизации сосуда. В качестве сосудосуживающего агента использовали растворы серотонина в диапазоне концентраций от 10^{-9} до 10^{-5} М, в качестве эндотелий-зависимого сосудорасширяющего агента — ацетилхолин (АЦХ) в диапазоне концентраций от 10^{-9} до 10^{-5} М, в качестве эндотелий-независимого сосудорасширяющего агента — Na-нитропруссид (НП) в диапазоне концентраций от 10^{-9} до 10^{-5} М.

Кроме выделения и использования сегментов сосудов, у животных измеряли массу внутренних органов (сердце, включая массу всех его камер, лёгкие, селезёнка, печень, почки, надпочечники и семенники). Для определения изменения массы ПЖ сердца использовали отношение массы ПЖ к массе тела животного (индекс гипертрофии ПЖ).

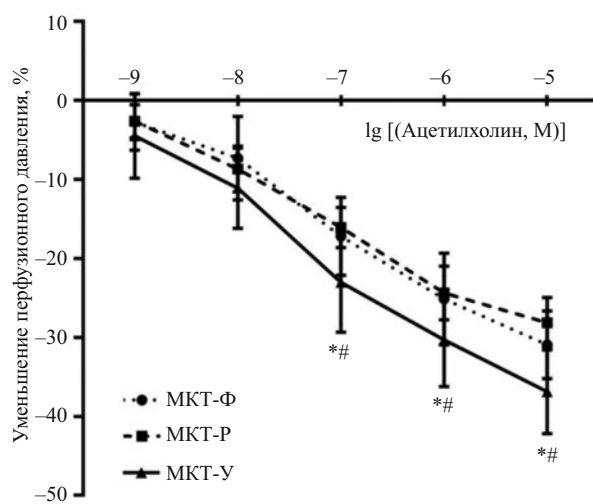


Рис. 1. Дозозависимая расширительная реакция изолированных сегментов легочных сосудов крыс популяции Вистар на ацетилхолин (10^{-9} – 10^{-5} М) на фоне серотонина ($3 \cdot 10^{-6}$ М): * — МКТ-У vs. МКТ-Р ($p < 0,05$); # — МКТ-У vs. МКТ-Ф ($p < 0,05$).

Статистическая обработка данных выполнена с использованием *t*-критерия Стьюдента, теста Манна — Уитни с помощью пакетов программ Statistica, 12 и Graph Pad Prism 7. Различия считали статистически значимыми при допустимой вероятности ошибки $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Основными проявлениями развития ЛГ является увеличение величины СПЖД и степень гипертрофии ПЖ. У нормотензивных животных величина СПЖД, измеренная у крыс под уретановым наркозом, составляет в среднем 30 мм рт. ст. [1]. Сравнение степени гипертрофии ПЖ и величины СПЖД показало, что у всех МКТ-животных развивается ЛГ. Сравнение этих величин между отдельными экспериментальными группами выявило статистически значимое уменьшение на 10,7 % индекса гипертрофии ПЖ в группе МКТ-У по сравнению с группой МКТ-Ф (табл. 1, $p < 0,05$). Сравнение показателей СПЖД между группами с МКТ-ЛГ не выявило достоверно значимых различий (табл. 1).

Одним из основных механизмов развития ЛГ является возрастание сосудистого тонуса и сосудистого сопротивления в легких, что приводит к увеличению СПЖД и гипертрофии ПЖ. Для изучения механизма протекторного

Таблица 1. Систолическое давление в ПЖ сердца (мм рт. ст.) и величина его гипертрофии у всех экспериментальных групп

Группа	СПЖД, мм рт. ст.	ПЖ/масса тела
Физиологический раствор (МКТ-Ф), $n = 13$	$44,5 \pm 1,9$	0,0008584
Растворитель (МКТ-Р), $n = 10$	$45,7 \pm 2$	0,0008682
Убихинол (МКТ-У), $n = 11$	$44,4 \pm 1,6$	0,0007662*

Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего; попарное сравнение групп по тесту Манна — Уитни ($p < 0,05$); * по сравнению с группой МКТ-Ф.

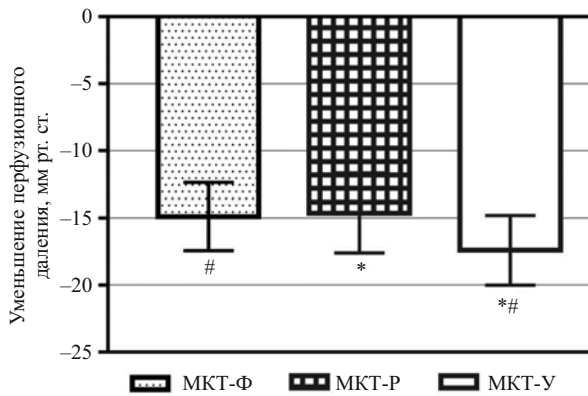


Рис. 2. Максимальная сосудорасширяющая реакция сегментов лёгочных сосудов крыс популяции Вистар на перфузию раствором ацетилхолина в концентрации $3 \cdot 10^{-6}$; * — МКТ-У vs. МКТ-Р ($p < 0,05$); # — МКТ-У vs. МКТ-Ф ($p < 0,05$).

действия убихинола на развитие гипертрофии ПЖ проводили изучение дозозависимой реакции изолированных перфузируемых сосудов на АЦХ и НП на фоне сужения, вызванного серотонином $3 \cdot 10^{-6}$ М. В перфузируемых легочных сосудах крыс из группы МКТ-У расширительный ответ на АЦХ в концентрации 10^{-7} М был на 43,4 и 34,1 % больше, чем в группах МКТ-Р и МКТ-Ф соответственно ($p < 0,05$). Статистически значимое увеличение сосудорасширяющего ответа в той же группе отмечалось также при концентрации АЦХ 10^{-6} М и составляло 24,4 и 20,7 % по сравнению с МКТ-Р и МКТ-Ф соответственно ($p < 0,05$). Значения вазодилатирующего ответа на АЦХ в изолированных легочных сосудах в группе МКТ-Р по сравнению с МКТ-Ф статистически не отличались (рис. 1).

Сравнение величин максимальной расширительной реакции сегментов сосудов на перфузию раствором АЦХ в концентрации 10^{-5} М показало наличие статистически значимых различий между группами. В группе МКТ-У максимальное расширение ($-17,4$ мм рт. ст.) на 22,2 % больше, чем в группе МКТ-Р ($-14,2$ мм рт. ст.), и на 16,6 % больше, чем в группе МКТ-Ф ($-14,9$ мм рт. ст.) (рис. 2). Согласно имеющимся представлениям, увеличение максимальной реакции на действующее вещество связано с увеличением количества активных рецепторов к нему [6]. По-видимому, более выраженный расширительный ответ на АЦХ в группе МКТ-У связан с увеличением активных рецепторов к АЦХ на эндотелии легочных сосудов.

Таблица 2. Величина EC_{50} и pD_2 для реакции на ацетилхолин ($10^{-9} - 10^{-5}$ М) изолированных перфузируемых легочных сосудов крыс всех экспериментальных групп

Группа	EC_{50}	pD_2 ($-\lg EC_{50}$)	n
Физиологический раствор (МКТ-Ф)	$1,088 \cdot 10^{-7}$	6,96	8
Растворитель (МКТ-Р)	$6,229 \cdot 10^{-8}$	7,21	10
Убихинол (МКТ-У)	$5,792 \cdot 10^{-8}$	7,24	11

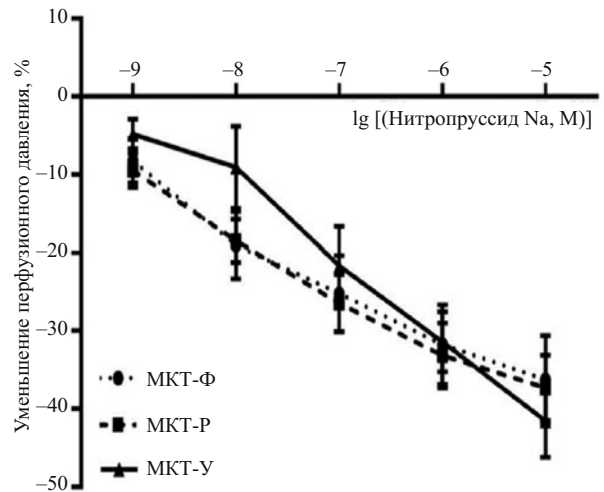


Рис. 3. Дозозависимая расширительная реакция изолированных сегментов легочных сосудов крыс всех экспериментальных групп в ответ на действие эндотелий-независимого сосудорасширяющего агента НП ($10^{-9} - 10^{-5}$ М) на фоне сужения, вызванного серотонином $3 \cdot 10^{-6}$ М.

Расчет EC_{50} не выявил статистически значимых различий между группами, что свидетельствует о том, что убихинол не влияет на чувствительность рецепторов к АЦХ (табл. 2).

Известно, что величина расширительной реакции на АЦХ определяется как функцией эндотелия, так и способностью гладких мышц отвечать расслаблением на оксид азота. Для дифференцировки этих механизмов изучали расширительную реакцию изолированных легочных сосудов на эндотелий-независимый донор NO — нитропруссид натрия в диапазоне концентраций $10^{-9} - 10^{-5}$ М (рис. 3). Как видно из рис. 3, достоверных различий в величине расширения на НП не выявлено. Таким образом, убихинол не влияет на чувствительность гладких мышц легочных сосудов к оксиду азота.

Монокроталин — токсический пирролидиновый алколоид, получаемый из семян растения *Crotalaria spectabilis*. В печени под действием ферментов семейства цитохрома P450 образуется его активный метаболит — монокроталин-пиррол, который селективно воздействует на эндотелий лёгочных сосудов, что приводит к ЛГ [15]. Точный механизм развития монокроталин-индуцированной ЛГ до конца не выяснен [15]. В одних работах предполагается, что монокроталин-пиррол напрямую воздействует на эндотелиальные клетки сосудов и вызывает развитие эндотелиальной дисфункции [5]. Другие исследователи склоняются к иницирующей роли процесса воспаления в развитии монокроталин-индуцированной ЛГ [17]. Стоит отметить, что и эндотелиальная дисфункция, и воспаление способствуют усилению сократительной активности гладких мышц, тромбозу, пролиферации и миграции ГМК сосудов, что лежит в основе патофизиологических механизмов возникновения ЛГ.

Возможным механизмом действия восстановленной CoQ10 при ССЗ, в том числе ЛГ, является его способность улучшать функцию эндотелия, способствуя развитию расширительных реакций [8]. Эндотелиальная дис-

функция отражает дисбаланс между продукцией расширяющих и суживающих факторов, что приводит к возрастанию сосудистого тонуса, сосудистого сопротивления и АД. В случае хронических нарушений, которые возникают при МКТ ЛГ, течение заболевания сопровождается увеличением массы ПЖ сердца, т.е. его гипертрофией.

Результаты исследования показывают, что убихинол при внутривенном введении способствует снижению степени гипертрофии ПЖ. Анализ изменения реактивности изолированных сосудов легких на эндотелий-зависимое сосудорасширяющее вещество АЦХ показал, что в группе животных с убихинолом наблюдается увеличение расширительной реакции, и эта реакция опосредуется состоянием эндотелия, так как эндотелий-независимое расширение между группами не отличается. Увеличение максимальной реакции в группе МКТ-У, а не ЕС₅₀, позволяет предположить, что эффект опосредуется увеличением количества активных рецепторов на эндотелии к АЦХ, а не их чувствительностью. Основываясь на данных о тесной связи процессов окислительного стресса, воспаления и, как результат, развития ЛГ [15, 17] можно предположить, что убихинол за счёт антиоксидантного действия способен снизить уровень окислительного стресса и последующего процесса воспаления, тем самым улучшить состояние эндотелия сосудов, что в конечном итоге приводит к уменьшению сосудистого сопротивления и, как результат этого, — уменьшению степени гипертрофии ПЖ. При этом, возможно, существует и прямое действие убихинола на структуру сердечной стенки. Для более полного объяснения механизмов действия убихинола на развитие ЛГ необходимы дальнейшие исследования.

ВЫВОДЫ

1. Убихинол (в вену) снижает степень гипертрофии ПЖ сердца у крыс при ЛГ, вызванной монокроталином.

2. Увеличение эндотелий-зависимого расширения в группе животных с МКТ ЛГ под влиянием убихинола может быть одним из факторов, опосредующих уменьшение гипертрофии ПЖ.

3. Положительный эффект убихинола обусловлен улучшением функции эндотелия сосудов лёгких у крыс с МКТ ЛГ, а не увеличением реактивности гладких мышц к оксиду азота.

ЛИТЕРАТУРА

1. Н. В. Панькова, М. М. Артемьева, Н. А. Медведева, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **82**(2), 53 – 57 (2019).
2. M. Bentinger, M. Tekle, G. Dallner, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **396**(1), 74 – 79 (2010).
3. R. Dumitrescu, S. Koebrich, E. Dony, et al., *BMC Pulm. Med.*, **8**, 25 (2008).
4. M. M. Hoeper, H. J. Bogaard, R. Condliffe, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **62**(25 Suppl), 42 – 50 (2013).
5. F. Jasmin, M. Lucas, P. Cernacek, J. Dupuis, *Circulation*, **103**(2), 314 – 318 (2001).
6. E. C. Johnstone, D. C. Owens, S. M. Lawrie, A. M. McIntosh, M. Sharp (eds.), *Companion to Psychiatric Studies*, 8th ed., Churchill Livingstone, London (2010).
7. E. I. Kalenikova, E. A. Goordetskaya, O. Yu. Kulyak, et al., *Pharm. Chem. J.*, **51**(110), 949 – 953 (2018).
8. A. Kumar, H. Kaur, P. Devi, V. Mohan, *Pharmacol. Ther.*, **124**(3), 259 – 268 (2009).
9. H. T. Liu, Y. C. Huang, S. Bin Cheng, et al., *Nutr. J.*, **15**(1), 85 (2016).
10. M. E. Madmani, A. Yusuf Solaiman, K. Tamr Agha, et al., *Cochrane Database Syst. Rev.*, **6**, CD008684 (2013).
11. T. Münzel, A. Daiber A, V. Ullrich, et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **25**(8), 1551 – 1557 (2005).
12. R. T. Schermuly, H. A. Ghofrani, M. R. Wilkins, F. Grimminger, *Nat. Rev. Cardiol.*, **8**(8), 443 – 558 (2011).
13. C. Schmelzer, I. Lindner, G. Rimbach, et al., *Biofactors.*, **32**(1 – 4), 179 – 183 (2008).
14. E. Schulz, T. Gori, T. Mu, et al., *Hypertens. Res.*, **34**, 665 – 673 (2011).
15. K. R. Stenmark, B. Meyrick, N. Galie, et al., *AJP Lung Cell. Mol. Physiol.*, **297**(6), 1013 – 1032 (2009).
16. T. Thenappan, M. L. Ormiston, J. J. Ryan, S. L. Archer, *B. M. J.*, **360**, 5492 (2018); DOI: <https://doi.org/10.1136/bmj.j5492>
17. Q. Wang, X. Zuo, Y. Wang, et al., *Vascul. Pharmacol.*, **58**(1 – 2), 71 – 77 (2013).

Поступила 21.02.19

INTRAVENOUS ADMINISTRATION OF UBIQUINOL INFLUENCES THE DEVELOPMENT OF MONOCROTALINE PULMONARY HYPERTENSION IN RATS

Sh. P. Abdullaev¹, T. A. Kuropatkina^{1,2}, N. V. Pan'kova², M. M. Artem'eva², V. G. Makarov³, N. A. Medvedeva², and O. S. Medvedev¹

¹ Department of Fundamental Medicine, Moscow State University, Lomonosovskii prosp. 27/1, Moscow, 119192 Russia

² Department of Biology, Moscow State University, Lomonosovskii prosp. 27/1, Moscow, 119192 Russia

³ Dom Farmatsii Co., ul. Zavodskaya 3/245, Kuzmolovo, Vsevolozhsk district, Leningrad oblast, 188663 Russia

Pulmonary hypertension (PH) is a progressive disease caused by an increase in the pulmonary vascular resistance and an increase in the pulmonary artery pressure. The development of PH is accompanied by hypertrophy of the right ventricle and endothelial dysfunction in the pulmonary vessels. The work was aimed at studying the effect of a soluble form of ubiquinol on the development of PH. Experiments on rats with a monocrotaline form of PH showed that triple intravenous administration of ubiquinol reduced the degree of right ventricular hypertrophy and increased the endothelium-dependent relaxation of isolated segments of pulmonary vessels.

Keywords: pulmonary hypertension; monocrotaline; hypertrophy; endothelial dysfunction; ubiquinol; isolated segments of pulmonary vessels; rats.