

ФАРМАКОЛОГИЯ СИСТЕМЫ КРОВИ

ВЛИЯНИЕ НЕБИВОЛОЛА НА КИСЛОРОДТРАНСПОРТНУЮ ФУНКЦИЮ КРОВИ

В. В. Зинчук, Н. В. Зинчук¹

Изучено влияние небиволола (30, 60, 90 мкмоль/л) на кислородтранспортную функцию крови путем инкубации ее образцов в течение 120 мин. Небиволол увеличивал значение $p50$ (pO_2 , соответствующее 50 % насыщению гемоглобина кислородом) при реальных значениях pH и pCO_2 на $4,3 \pm 0,8$ ($p < 0,05$) мм рт. ст. при самой низкой концентрации, а последующее двух- и трехкратное увеличение его концентрации повышало его величину на $7,5 \pm 1,1$ ($p < 0,01$) и $10,6 \pm 0,7$ ($p < 0,01$) мм рт. ст. соответственно, что отражает дозозависимый характер его действия. Уровень метгемоглобина и содержание нитрат/нитритов возрастало при росте концентрации препарата. Очевидно, изменения сродства гемоглобина к кислороду при действии небиволола через автономную внутриэритроцитарную систему регуляции кислородсвязывающих свойств крови. NO в этом случае выступает в качестве важного модификатора функциональных свойств гемоглобина.

Ключевые слова: небиволол, окись азота, кислород, кровь

ВВЕДЕНИЕ

В фармакологии относительно недавно появилась новая группа препаратов, которые способны увеличить продукцию NO в организме. Одним из них является небиволол, “атипичный” β -адреноблокатор, относящийся к “третьему” поколению, обладающий выраженными вазодилатирующими свойствами [5]. Однако многие опосредуемые NO фармакологические эффекты небиволола остаются не изученными [4]. Последние годы привлекает интерес многих исследований NO-зависимые механизмы изменения кислородсвязывающих свойств крови [14, 13]. В организме сродство гемоглобина к кислороду (СГК) в значительной степени определяет транспорт кислорода из альвеолярного воздуха в кровь, а затем на уровне капилляров — в ткань [10]. Его измерение является важным фактором компенсации кислородной недостаточности при различных патологических состояниях. Увеличение $p50$ благоприятствует увеличению потока кислорода в ткани в условиях нормоксии или умеренной гипоксии. В то же время его уменьшение может иметь благоприятное значение за счет антиоксидантного эффекта в условиях нарушенной утилизации кислорода тканями [3]. Среди важных направлений фармакотерапии в кардиологической практике являются методы по оптимизации кислородтранспортной функции крови [1]. Известно, что эналаприла малеат и лозартан в опытах *in vitro* вызывают тенденцию к повышению СГК при достоверном снижении $p50$ под влиянием лазартана в

концентрации 250 нг/мл [2]. В связи с изложенным представляются целесообразными поиск и разработка фармакологических путей коррекции кислородсвязывающих свойств крови для улучшения кислородного обеспечения тканей, а именно изучение эффекта небиволола на кислородтранспортную функцию крови.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние фармакологических препаратов на кислородтранспортную функцию крови проводили в опытах *in vitro*. Забор смешанной венозной крови у крыс осуществляли в условиях наркоза через правое предсердие. Исследуемые пробы крови забирали в предварительно охлажденный и промытый гепарином шприц. Раствор небиволола готовили на растворителе, состоящем из диметилсульфоксида и изотонического раствора NaCl (соотношение 1:1). К пробе крови (объем 5 мл) добавляли в каждой отдельной серии 0,1 мл раствора, содержащего атенолол в дозе 100 мкмоль/л, небиволол в дозах 30, 60, 90 мкмоль/л либо только 0,1 мл диметилсульфоксида и 0,9 % раствора NaCl (контроль), после чего проводили инкубацию образцов крови в водяной бане при 37° С в течение 120 мин. Атенолол как селективный β_1 -адреноблокатор применяли в качестве препарата сравнения. Величины pO_2 , pCO_2 и pH в исследуемых пробах крови определяли при 37° С с помощью микрогазоанализатора Synthesis-15 фирмы “Instrumentation Laboratory”. СГК оценивали по показателю $p50$ (pO_2 , соответствующее 50 % насыщению гемоглобина кислородом), определяемому расчетным методом при 37° С, pH 7,4 и pCO_2 40 мм рт. ст. ($p50_{\text{станд}}$). Затем рассчитывали $p50$ при реальных

¹ Кафедра нормальной физиологии (зав. — проф. В. В. Зинчук) Гродненского медицинского университета, Гродно, Беларусь, 230015, ул. Горького, 80, E-mail: zinchuk@grsmi.by.

значениях pH, $p\text{CO}_2$ и t °C ($p50_{\text{реал}}$) по формулам J. W. Severinghaus [12]. Положение кривой диссоциации оксигемоглобина рассчитывали по полученным значениям $p50$, используя уравнение Хилла. Кислотно-основное состояние крови определяли на основании номограмм Siggaard-Andersen по следующим показателям: реальный и стандартный избыток буферных оснований (ABE/SBE), стандартный бикарбонат (SBE), концентрация гидрокарбоната (HCO_3^-), общей углекислоты (TCO_2), стандартного бикарбоната (SBC).

Определение количества нитрит/нитратов в плазме и гемолизате крови проводили с помощью реактива Грисса [11]. Первоначально белки пробы осаждали 30 % ZnSO_4 . После центрифугирования супернатант инкубировали в течение 12 ч с металлическим кадмием для восстановления нитратов в нитриты. Затем добавляли реактив Грисса и спектрофотометрически определяли суммарную концентрацию нитритов в пробе. Концентрацию гемоглобина в крови оценивали фотометрически цианметгемоглобиновым методом на фотокалориметре КФК-2, в качестве реактива использовали раствор Драбкина. Содержание метгемоглобина (MetHb) и степень насыщения крови кислородом (SO_2) определяли спектрофотометрически. Полученные данные статистически обрабатывали общепринятым методом вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице представлены данные о влиянии небиволола на показатели кислородтранспортной функции крови. Величина $p50$ в контрольной пробе составила при стандартных и реальных значениях pH, $p\text{CO}_2$ и температуры $23,7 \pm 0,5$ и $37,2 \pm 0,5$ мм рт. ст. соответственно. Инкубация с атенололом достоверно не изменяла значения этих параметров. В то же время небиво-

лол увеличивал значения $p50_{\text{реал}}$ на $4,3 \pm 0,8$ ($p < 0,05$) мм рт. ст. при самой низкой концентрации, а последующее двух- и трехкратное увеличение его концентрации повышало его величину на $7,5 \pm 1,1$ ($p < 0,01$) и $10,6 \pm 0,7$ ($p < 0,01$) мм рт. ст. соответственно, что отражает дозозависимый характер его действия и сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина вправо (рис. 1). Величина $p50$ при стандартных значениях pH, $p\text{CO}_2$ и температуры возросла на $6,3$ ($p < 0,01$), $19,9$ % ($p < 0,01$) и $18,6$ % ($p < 0,01$) в сравнении с контролем, что отражает тенденцию его роста, обуславливая сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина вправо и более сложный механизм изменения кислородсвязывающих свойств крови, обусловленных изменением не только pH, $p\text{CO}_2$, но и другими факторами. Следует также отметить более высокие значения в опыте степени насыщения крови кислородом и $p\text{O}_2$ крови в сравнении с контролем.

Высокая терапевтическая эффективность селективных β_1 -адреноблокаторов в лечении сердечно-сосудистых заболеваний хорошо известна. Некоторые из них, такие как небиволол, обладают способностью улучшать функциональное состояние эндотелия сосудов, находящихся в условиях окислительного стресса, обусловленного гиперлипидемией [8], что связано с способностью предотвращать расщепление эндотелиальной NO-синтазы и активацию НАД-оксидазы нейтрофилов. Известно, что применение небиволола в терапии ИБС и гипертензии дает положительный эффект, реализуемый через СГК. Так, у больных артериальной гипертензией (стадия III) использование данного препарата увеличивало $p50_{\text{реал}}$ на $9,2$ % ($p < 0,05$), $p50_{\text{станд}}$ — на $8,3$ % ($p < 0,05$), содержание нитрат/нитритов при этом возрастало с $13,81 \pm 0,97$ до $19,14 \pm 1,2$ мкмоль/л ($p < 0,05$), что отражает, очевидно, NO-зависимую природу изменения СГК [9].

Влияние небиволола на показатели кислородтранспортной функции крови ($M \pm m$)

Параметр	Контроль	Атенолол, 100 мкмоль/л	Небиволол, мкмоль/л		
			30	60	60
Число животных	9	9	8	8	5
pH, ед.	$7,03 \pm 0,02$	$6,98 \pm 0,01$	$6,97 \pm 0,01^*$	$7,01 \pm 0,01$	$6,96 \pm 0,01^*$
$p\text{CO}_2$, мм рт. ст.	$47,1 \pm 1,8$	$52 \pm 1,2^*$	$51,8 \pm 1,6^*$	$52,3 \pm 2,0^*$	$61,4 \pm 2,5^*$
$p\text{O}_2$, мм рт. ст.	$26,3 \pm 1,4$	$26,6 \pm 0,9$	$32,3 \pm 1,3^*$	$39,0 \pm 4,0^{*\#}$	$38,6 \pm 2,9^{*\#}$
SBC, ммоль/л	$16,8 \pm 0,5$	$17,6 \pm 0,5$	$16,7 \pm 0,5$	$18,8 \pm 0,5^*$	$18,4 \pm 0,9$
SBE, ммоль/л	$-14,3 \pm 0,7$	$-14,3 \pm 0,9$	$-14,2 \pm 0,9$	$-15,6 \pm 0,9^*$	$-16,8 \pm 1,3$
ABE, ммоль/л	$-14,4 \pm 0,6$	$-14,7 \pm 0,7$	$-14,7 \pm 0,7$	$-16,2 \pm 0,7^*$	$-16,9 \pm 1,2$
TCO_2 , ммоль/л	$15,5 \pm 0,7$	$17,9 \pm 0,8$	$17,0 \pm 0,8$	$19,0 \pm 1,0^*$	$18,7 \pm 1,5$
HCO_3^- , ммоль/л	$14,9 \pm 0,6$	$14,8 \pm 0,8$	$13,8 \pm 0,8$	$17,8 \pm 0,9^*$	$16,3 \pm 1,3$
SO_2 , %	$28,2 \pm 1,9$	$26,2 \pm 1,3$	$33,4 \pm 1,5$	$39,9 \pm 2,4^\#$	$36,0 \pm 2,5$
MetHb, %	$0,1 \pm 0,1$	$0,0 \pm 0,0$	$0,2 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1^{*\#}$	$1,0 \pm 0,1^{*\#}$
$p50_{\text{реал}}$, мм рт. ст.	$37,2 \pm 0,5$	$38,6 \pm 0,7$	$41,5 \pm 0,9^*$	$44,7 \pm 1,3^{*\#}$	$47,8 \pm 0,7^{*\#}$
$p50_{\text{станд}}$, мм рт. ст.	$23,7 \pm 0,5$	$23,3 \pm 0,6$	$25,1 \pm 0,8$	$27,7 \pm 1,1^*$	$28,1 \pm 0,4^{*\#}$

Примечание. Изменения достоверны по отношению: * — к контролю, # — к небивололу (в дозе 30 мкмоль/л).

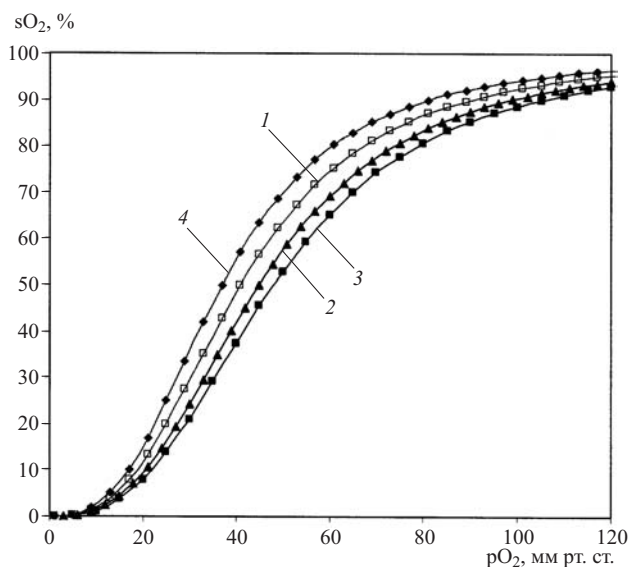


Рис. 1. Кривые диссоциации оксигемоглобина при реальных значениях pH, $p\text{CO}_2$ и температуры при инкубации с небивололом в дозе 30 (1), 60 (2), 90 (3) мкмоль/л, контроль — (4).

В экспериментальных условиях установлено, что небиволол вызывает высвобождение NO, образующегося из L-аргинина с помощью NO-синтазы. Точный механизм его влияния на высвобождение NO неизвестен, но он не связан с влиянием на β_1 -адренорецепторы. Предполагается, что данный препарат вызывает увеличение содержания внутриклеточного Ca^{2+} и усиление синтеза NO через нерцепторные механизмы [5]. Имеются сведения о том, что небиволол, подобно карведилолу, обладает антиоксидантными свойствами и приводит к стабилизации NO [4]. Антиоксидантная активность небиволола как в целой крови, так и в изолированных нейтрофилах носит дозозависимый характер. Атенолол, метопролол и карведилол в этом отношении обладают значительно меньшей эффективностью [8].

Возможны альтернативные источники образования NO по отношению к эндотелию. Так, предполагается наличие собственных механизмов синтеза NO в эритроцитах. Обнаружено методом иммуноблоттинга наличие в эритроцитах белков типа NO-синтазы [6]. Показано, что нормальные циркулирующие эритроциты содержат две изоформы NO-синтазы, не обладающие в обычных условиях каталитической активностью [7], хотя возможно, что незрелые эритроциты (эритробласты, ретикулоциты) могли бы экспрессировать их NO-синтазную активность, утрачивая ее по мере дифференциации. В этом аспекте важно отметить, что уровень метгемоглобина не изменялся при дозе препарата 30 мкмоль/л, но возрастал до $0,9 \pm 0,1$ ($p < 0,01$) и $1 \pm 0,1$ ($p < 0,01$) % при двух- и трехкратном росте концентрации препарата. Рост содержания нитрат/нитритов также отмечался при более высоких дозах небиволола в сравнении с контролем (рис. 2). Изменения этих параметров, очевидно, отражают активацию

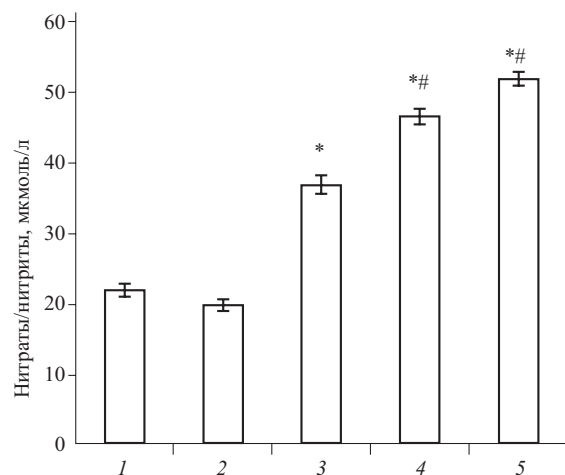


Рис. 2. Изменения концентрации нитратов/нитритов в плазме крови при инкубации в β -адреноблокаторах.

По оси ординат — концентрация нитратов/нитритов, мкмоль/л, по оси абсцисс — опытные группы: 1 — контроль, 2 — атенолол, 3 — небиволол в дозе 30 мкмоль/л, 4 — небиволол в дозе 60 мкмоль/л, 5 — небиволол в дозе 90 мкмоль/л.

Изменения достоверны по отношению: * — $p < 0,05$ к контрольной группе, # — $p < 0,05$ к небивололу (в дозе 30 мкмоль/л).

L-аргинин-NO системы. Это может быть дополнительным эффективным механизмом регуляции кислородсвязывающих свойств крови.

Внутриэритроцитарная автономная система обеспечивает адаптивное поведение кислородсвязывающих свойств крови при перестройке характера ее функционирования, в целом всей системы транспорта кислорода на различных ее уровнях. Представленные данные о характере изменения кислородсвязывающих свойств крови предполагают ее функционирование в условиях целого организма через механизм относительно автономной системы регуляции свойств крови. Существует тесная взаимосвязь мембранной организации клетки, ее метаболизма, физико-химических параметров внутренней среды и кислородсвязывающих свойств гемоглобина, отражающих, таким образом, интегративную деятельность клеток красной крови при действии на них всей суммы вне- и внутриэритроцитарных возмущений. Оценка эффекта небиволола на кислородсвязывающие свойства крови позволяет дополнить и переосмыслить механизм действия ряда гипотензивных препаратов этого класса с точки зрения воздействия на кровь с позиции модуляции продукции NO. Проведенные исследования демонстрируют новый аспект действия небиволола, реализуемый через коррекцию кислородтранспортной функции крови, что необходимо учитывать при терапии патологии сердечно-сосудистой системы.

ВЫВОДЫ

1. Небиволол при инкубации образцов крови изменяет кислородтранспортную функцию крови, что проявляется дозозависимым увеличением значения $p50$.

Это отражает сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина вправо.

2. Очевидно, изменения СГК при действии небивола опосредуются путем модификации автономной внутриэритроцитарной системы регуляции кислородсвязывающих свойств крови. NO в этом случае выступает в качестве важного модификатора функциональных свойств гемоглобина.

Данная работа выполнена частично благодаря финансовой поддержке Фонда фундаментальных исследований РБ (№ Б05 – 040).

ЛИТЕРАТУРА

1. С. В. Гацура, В. В. Гацура, *Компания спутник*, Москва (2005).
2. С. В. Гацура, В. В. Зинчук, *Экспер. и клин. фармакол.*, **67**(1), 19 – 21 (2004).
3. В. В. Зинчук, *Усп. физиол. наук*, **34**(2), 33 – 45 (2003).
4. J. Cockcroft, *Expert. Opin. Pharmacother.*, № 4, 893 – 8999 (2004).
5. L. J. Ignarro, *Blood. Suppl.*, 16 (2004).
6. B. C. Jubelin and J. L. Gierman, *Am. J. Hypertens.*, **9**, 1214 – 1219 (1996).
7. E. S. Kang, D. E. Miles, M. T. Tevlin, et al., *Am. J. Med. Sci.*, **321**(2), 113 – 123 (2001).
8. H. Mollnau, E. Schulz, A. Daiber, et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **23**(4), 615 – 621 (2003).
9. T. P. Pronko and M. A. Lis, *Thirteenth European Meeting on hypertension*, Milan (2003), S 53.
10. M. Samaja, *Respiration.*, **64**, 422 – 428 (1997).
11. K. Schulz, S. Kerber, and M. Kelm, *Nitric. Oxide.*, **3**(5), 225 – 234 (1999).
12. J. W. Severinghaus, *J. Appl. Physiol.*, **21**(5), 1108 – 1116 (1966).
13. V. V. Zinchuk and L. V. Dorokhina, *Nitric. Oxide.*, **6**(1), 29 – 34 (2002).
14. V. V. Zinchuk, T. P. Pronko, and M. A. Lis, *Clinical. Physiology & Nuclear Medicine.*, **24**, 205 – 211 (2004).

Поступила 02.06.06

EFFECT OF NEBIVOLOL ON THE BLOOD OXYGEN TRANSPORT

V. V. Zinchuk and N. V. Zinchuk

Grodno State Medical University, ul. Gor'kogo 80, Grodno, 230015, Belarus
e-mail: zinchuk@grsmi.by

The effect of nebivolol (30.0, 60.0, or 90.0 μM) on the blood oxygen transport was studied by incubation with blood samples for 120 min. Nebivolol increased the values of p_{50} ($p\text{O}_2$ at 50% hemoglobin saturation with oxygen) under real pH and $p\text{CO}_2$ (by 4.3 ± 0.8 mm Hg at the lowest concentration ($p < 0.01$)). The further (2- or 3- fold) growth in the concentration of nebivolol increased these values by 7.5 ± 1.1 and 10.6 ± 0.7 mm Hg, respectively (for both $p < 0.01$), thereby indicating the dose dependence of the drug effect. Greater drug concentration resulted in higher methemoglobin level and nitrate/nitrite content. The data can be explained by a change in the hemoglobin-oxygen affinity as a result of the influence of nebivolol through an autonomous intraerythrocyte system that regulates the blood oxygen-binding properties. In this case, NO acts as an important modifier of the hemoglobin function.