

Хныченко Л.К., Окуневич И.В., Лосев Н.А., Сапронов Н.С.

Исследование гиполипидемического свойства н-холинолитика бензогексония в эксперименте

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», отдел нейрофармакологии, 197376, Санкт-Петербург, ул. акад. И.П. Павлова, д. 12

Методика. Опыты проведены на 150 беспородных самцах крыс (230–250 г). Для моделирования дислипидемии (ДЛП) использовали 3 модели: однократное внутривнутрибрюшинное введение детергента тритона WR-1339; введение этанола; содержание на специальной гиперхолестеринемической (ГХС) диете в течение 21 дня. Животные были разделены на 4 группы: интактные; модель; бензогексоний + модель; гемфиброзил + модель. Крысы получали перорально бензогексоний (20 мг/кг) и препарат сравнения гемфиброзил (50 мг/кг). Определяли содержание общего холестерина (ОХС), триглицеридов (ТГ), холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП) в пробах сыворотки крови и печени, ОХС в аорте. Показатели ОХС, ТГ и ХС ЛПВП анализировали стандартизированными методами спектрофотометрически.

Результаты. Установлено, что в группе крыс, которым на фоне кормления ГХС вводили бензогексоний, в сыворотке крови снижалась концентрация ОХС и ТГ, а содержание ХС антиатерогенных ЛПВП увеличивалось. В печени уменьшался уровень ОХС и ТГ, в аорте ОХС ($p < 0.05$). Расчетный индекс атерогенности (ОХС — ХС ЛПВП / ХС ЛПВП) снижался.

Обсуждение. Полученные результаты свидетельствуют, что пероральное введение н-холинолитика бензогексония оказывает гиполипидемическое действие, проявляющееся снижением содержания липидов в сыворотке крови, печени и аорте.

Ключевые слова: холинергическая система; бензогексоний; дислипидемия.

Для цитирования: Хныченко Л.К., Окуневич И.В., Лосев Н.А., Сапронов Н.С. Исследование гиполипидемического свойства н-холинолитика бензогексония в эксперименте. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2016; 60(1): 36–39

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Khnychenko L.K., Okunevich I.V., Losev N.A., Saproinov N.S.

Hypolipidemic activity of N-cholinergic antagonist Benzohexonium in the experiments

FSBSI «IEM» Department of Neuropharmacology, Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of Experimental Medicine»; 12, ul. Akademika Pavlova, St. Petersburg, 197376, Russia

Methods: Experiments were carried out on outbred albino male rats ($n = 150$, 230–250 g). For modeling dislipoproteinemia (DLP) we used 3 models: single intraperitoneal injection of the detergent triton WR-1339; administration of ethanol; maintenance on a special hypercholesterolaemic diet (HD) during 21 days. Animals were divided into four groups: normal control, model group, gemfibrozil (Gfb) group, benzohexonium (Benz) group. Rats received per os benzohexonium (20mg/kg), reference drug gemfibrozil (50 mg/kg). We determined content of total cholesterol (TCh), triglycerides (TG) in samples of blood serum and liver, TCh in aorta. TCh, TG and Ch-HDL were analyzed spectrophotometrically using of standardized methods.

Results: Compared with model group the contents of TCh, TG in serum and liver were significantly decreased in model + Benz group, whereas Ch-HDL was raised in rats fed special HD ($P < 0.05$). Calculated index of atherogeneity (TCh — Ch-HDL) / (Ch-HDL) showed the positive effect.

Conclusion: The results obtained were shown the hypolipidemic activity of N-cholinergic antagonist Benzohexonium (20 mg/kg) lowered the content of lipids in blood, liver, and aorta.

Keywords: cholinergic system; benzohexonium; dislipoproteinemia

For citation: Khnychenko L.K., Okunevich I.V., Losev N.A., Saproinov N.S. Hypolipidemic activity of N-cholinergic antagonist Benzohexonium in the experiments. Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya. 2016; 60(1): 36–39. (In Russian).

For correspondence: Ludmila K. Khnychenko, Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher work «Federal

State Budgetary Scientific Institution «Institute of Experimental Medicine»; 12, ul. Akademika Pavlova, St. Petersburg, 197376, Russian Federation, e-mail: Ludmila.Konst83@mail.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Нарушение липидного и липопротеинового обмена тесно связано с прогрессированием гипертонической болезни, ишемической болезни сердца, атеросклероза и их осложнений [1—3]. Имеются доказательства чувствительности системы липолиза к холинергической стимуляции [4—6]. Так, в опытах на кроликах установлено, что введение ацетилхолина в ретикулярную формацию среднего мозга способствуют формированию атеросклеротического процесса в аорте [7], а инъекции н-холиноблокатора периферического действия бензогексоний эффективно предотвращают подъем уровня свободных жирных кислот (СЖК) в ответ на иммобилизацию крыс [8]. Известно, что бензогексоний применяется в клинике при бронхоспазмах, спазмах периферических сосудов, для купирования гипертонических кризов, для контролируемой гипотензии [9—11].

Цель исследования — изучение влияния н-холинолитика бензогексоний на изменение показателей липидного обмена в условиях экспериментальной дислипотеинемии.

Методика

Опыты проведены на 150 нелинейных белых крысах-самцах массой 230—250 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария при естественном освещении, свободном доступе к корму и питьевой воде.

Бензогексоний (ЛД₅₀ при пероральном введении на крысах 520 мг/кг) исследовали в дозе 20 мг/кг. Эта доза подобрана из нескольких (5, 10, 20, 25, 30 мг/кг) использованных в предварительных опытах с хроническим введением препарата как оптимально эффективная и не вызывающая побочных явлений. Для сравнения использовали известное гиполлипидемическое средство гемфиброзил в оптимальной для крыс дозе (50 мг/кг) в соответствии с методическими рекомендациями [12]. Гиполлипидемическое действие гемфиброзила обусловлено способностью преимущественно снижать уровень атерогенных липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП), включающих триглицериды (ТГ) [1].

Во всех опытах животные делились на 4 группы: 1-я — интактные; 2-я, 3-я, 4-я — опытные (с моделированной дислипотеинемией). Крысам 3-й группы вводили бензогексоний (20 мг/кг, субстанция, Россия), 4-й — гемфиброзил (50 мг/кг, субстанция, США) перорально через зонд.

Для индуцирования дислипотеинемии у крыс использовали: тритоновую гиперлипидемию (ГЛП), алкогольную гипертриглицеридемию (ГТГ) и алиментарную

дислипотеинемии (ДЛП) в соответствии с Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению фармакологических веществ» [12].

1. ГЛП вызывали однократным внутривенным введением детергента — тритона WR-1339 (225 мг/кг массы тела) [1, 12]. Эта скрининговая модель характеризуется быстрым и значительным увеличением уровня липидов в крови. Бензогексоний или гемфиброзил вводили одновременно с тритоном. Через 10 ч животных декапитировали и в сыворотке крови определяли содержание общего холестерина (ОХС) и триглицеридов (ТГ).

2. ГТГ моделировали однократным пероральным (через зонд) введением этанола (9 г/кг массы тела) в виде 50% раствора. Одним из определяющих моментов в развитии алкогольной гипертриглицеридемии является жировое повреждение печени. Бензогексоний или препарат сравнения крысы получали предварительно (до введения этанола) в течение 5 сут. Предварительное введение исследуемых веществ направлено на насыщение ими органов, связанных с метаболизмом липидов — печени и жировой ткани [12]. Через 8 ч после введения этанола животных декапитировали. В сыворотке крови и ткани печени определяли содержание липидов.

3. Алиментарную ДЛП индуцировали содержанием крыс на гиперхолестеринемической диете (ГХС), включающей дополнительно к стандартному рациону: 7,5% холестерина (ХС), 45% смеси животных жиров и подсолнечного масла (2:1), 500000 ЕД витамина D₃ в течение 21 сут. Животным опытных групп (3-й и 4-й) одновременно с кормлением ГХС ежедневно однократно вводили бензогексоний или препарат сравнения гемфиброзил соответственно. На 22-е сут. эксперимента перед забоем (за 18 ч) животных лишали пищи [12].

В сыворотке крови крыс определяли уровень общего холестерина (ОХС), ХС антиатерогенных липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), ТГ с помощью наборов реактивов на основе унифицированных методов согласно инструкции производителя (Vital Diagnostics, Россия). Величину индекса атерогенности рассчитывали по формуле А.Н. Климова (ОХС — ХС ЛПВП / ХС ЛПВП) [1].

Липиды аорты (ОХС) и печени (ОХС, ТГ) экстрагировали хлороформной смесью или изопропанолом соответственно, в экстрактах определяли содержание липидов [13].

Статистический анализ результатов исследования проведен с использованием пакета программ SPSS 11.5 [14]. Средние значения показателей сравнивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA test) при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования (табл. 1) показали, что через 10 часов после однократной инъекции детергента — тритона WR-1339 в сыворотке крови крыс возросла концентрация ОХС и ТГ в 5 и 12 раз соответственно в отличие от таковой у интактных животных, свидетельствующая о развитии значительной гиперлипидемии. У животных, которые одновременно с детергентом получали бензогексоний, нарушения липидного профиля крови становились менее выраженными: содержание ОХС и ТГ снижалось (на 36,8% и 43,6% соответственно) по сравнению с животными с гиперлипидемией (группа 2). Полученные результаты указывают на гиполлипидемическое свойство тестируемого препарата.

Из данных табл. 2 видно, что у крыс, через 8 ч после введения этанола, уровень ТГ в сыворотке крови увеличивался в 5,6 раза, а в печени — в 3,2 раза, что подтверждает развитие гипертриглицеридемии. Концентрация ТГ в крови и в печени животных, которые предварительно получали бензогексоний (группа 3) на 66,7% и 28,7% соответственно, оказалась ниже, чем у гипертриглицеридемических животных

(группа 2), что свидетельствует о гипотриглицеридемическом эффекте исследуемого препарата.

Результаты, полученные на скрининговых моделях ДЛП (ГЛП и ГТГ), явились основанием для более детального изучения гиполлипидемической активности бензогексония на специфической модели — хронической алиментарной ДЛП у крыс, которая характеризуется увеличением содержания липидов в крови, печени и аорте. Из результатов, представленных в табл. 3, видно, что у крыс, содержащихся на ГХС диете, увеличивался уровень ОХС и ТГ в сыворотке крови (в 2,2 и 2,8 раза), в печени (в 2,5 и 4,8 раза) соответственно и ОХС в аорте (1,9 раза). Одновременно снижалась концентрация ХС антиатерогенных ЛПВП (в 2 раза) по сравнению с интактными животными. Индекс атерогенности (ИА) возрастал более чем в 6 раз. Иная картина наблюдалась в группе крыс, которым на фоне кормления ГХС вводили бензогексоний. Так, в сыворотке крови снижалась концентрация ОХС (в 1,6 раза) и ТГ (в 3 раза), а содержание ХС антиатерогенных ЛПВП увеличивалось (в 2 раза). В результате снижения ОХС и повышения ХС ЛПВП величина холестерина ИА сокращалась в 4 раза по сравнению с таковой у крыс, получавших только ГХС диету. Кроме того, в печени уменьшался уровень ОХС и ТГ в 2,4 и 2,2 раза соответственно. В ткани аорты в 1,8 раза уменьшалось содержание ОХС. Следует отметить, что у животных, получавших одновременно с ГХС диетой бензогексоний, не наблюда-

Таблица 1

Влияние бензогексония на изменение уровня липидов в сыворотке крови крыс при моделировании тритоновой гиперлипидемии (ГЛП)

№ п/п	Группы животных	Липиды в сыворотке крови (ммоль/л)	
		ОХС	ТГ
1	Интактные	1,6 ± 0,06	0,7 ± 0,04
2	Тритон WR-1339	8,7 ± 0,43*	8,5 ± 0,18*
3	Бензогексоний + тритон WR-1339	5,5 ± 0,85**	4,8 ± 0,68**
4	Гемфиброзил + тритон WR-1339	5,0 ± 0,50**	4,2 ± 0,32**

Примечание. * — различия статистически значимы по сравнению с группой 1 при $p < 0,05$; # — различия статистически значимы по сравнению с группой 2 при $p < 0,05$.

Таблица 2

Влияние бензогексония на изменение уровня триглицеридов (ТГ) в сыворотке крови и ткани печени при моделировании алкогольной гипертриглицеридемии (ГТГ)

№ п/п	Группы животных	ТГ	
		Сыворотка крови (ммоль/л)	Печень (мг/г сырой ткани)
1	Интактные	0,58 ± 0,03	4,7 ± 0,8
2	Этанол	3,3 ± 0,21*	15,14 ± 0,92*
3	Бензогексоний + этанол	1,10 ± 0,08**	10,8 ± 0,51**
4	Гемфиброзил + этанол	0,95 ± 0,03**	10,1 ± 0,73**

Примечание. * — различия статистически значимы по сравнению с группой 1 при $p < 0,05$; # — различия статистически значимы по сравнению с группой 2 при $p < 0,05$.

Влияние бензогексония на изменение липидных показателей в сыворотке крови, печени, аорте и величину индекса атерогенности (ИА) при алиментарной дислипидемии (ДЛП) у крыс

№ п/п	Группы животных	Липиды в сыворотке крови (ммоль/л)			ИА	Липиды в ткани (мг/г сырой ткани)		
		ОХС	ТГ	ХС ЛПВП		Печень		Аорта
						ОХС	ТГ	ОХС
1	Интактные	1,55 ± 0,07	0,67 ± 0,03	0,60 ± 0,06	1,6	2,3 ± 0,1	3,5 ± 0,2	1,9 ± 0,1
2	ГХС диета	3,51 ± 0,05*	1,90 ± 0,05*	0,30 ± 0,01*	10,7	5,9 ± 0,1*	17,0 ± 0,5*	3,7 ± 0,5*
3	Бензогексоний + ГХС диета	2,14 ± 0,2 [#]	0,60 ± 0,01 [#]	0,61 ± 0,06 [#]	2,5	2,4 ± 0,1 [#]	7,6 ± 0,4 [#]	2,3 ± 0,2 [#]
4	Гемфиброзил + ГХС диета	2,70 ± 0,05 [#]	0,63 ± 0,03 [#]	0,62 ± 0,05 [#]	3,3	2,80 ± 0,1 [#]	7,5 ± 0,6 [#]	2,1 ± 0,2 [#]

Примечание. * — различия статистически значимы по отношению к 1-й группе при $p < 0,05$; [#] — различия достоверны по отношению ко 2-й группе при $p < 0,05$

лось статистически значимых различий в содержании ОХС, ТГ, ХС ЛПВП в крови, ОХС и ТГ в печени и ОХС в аорте по сравнению с группой животных, получавших гемфиброзил.

Таким образом, в условиях экспериментальной дислипидемии на крысах установлено, что пероральное введение н-холинолитика бензогексония оказывает гиполлипидемическое действие, проявляющееся в угнетении степени развития ДЛП, снижении содержания липидов в сыворотке крови, печени и аорте. Представленные результаты исследования явились основанием для получения патента РФ на «Средство, обладающее гиполлипидемическими свойствами» [15].

References

1. Klimov A.N., Nikulcheva N.G. *Lipids and lipoproteins metabolism and its damage. [Obmen lipidov i lipoproteidov i ego narusheniya]* St. Petersburg: Piter; 1999. (in Russian)
2. Siurin A.A., Kobozev G.V., Kulagin Iu.I., Safronova L.G., Anikin E.I., Kabeliuzhenko S.B. et al. Lipid peroxidation and change in the lipid fraction of plasma in patients with hypertonic disease. *Vopr Med Khim.* 1991; 37(2): 26-8. (in Russian)
3. Pena V.B., Bonini I.C., Antonini S.S. et al. Alpha 7-type acetylcholine receptor localization and its modulation by nicotine and cholesterol in vascular endothelial cells. *J. Cell Biochem.* 2011; 112 (11): 3276-88.
4. Andersson K., Arner P. Systemic nicotine stimulates human adipose tissue lipolysis through local cholinergic and catecholaminergic receptors. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2001; 25(8): 1225-232.
5. Barrantes F.J. Lipid effects on nicotinic acetylcholine receptor gating and kinetics: a structural-functional correlation. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1993; 26(6): 553-71.
6. Inanaga K., Ichiki T., Miyazaki R., Takeda K., Hashimoto T., Matsuura H. et al. Acetylcholinesterase inhibitors

attenuate atherogenesis in apolipoprotein E-knockout mice. *Atherosclerosis.* 2010; 213(1): 52-8.

7. Danilov G.E., Ibatov A.D. Experimental model of atherosclerosis induced by administration of acetylcholine into the reticular formation of the midbrain. *Bull Eksp Biol Med.* 1991; 111(4): 361-63. (in Russian)

8. Denisenko P.P. *Role of cholinergic systems in regulatory processes.* Moscow: Meditsina; 1980. (in Russian)

9. Mashkovsky M.D. *Medicines.* 16nd ed. Moscow: New wave; 2014. (in Russian)

10. Losev N.A., Sapronov N.S., Khnychenko L.K., Shabanov P.D. *Farmakologiya novykh holinergicheskikh sredstv (farmakologiya-klinike) [Farmakologiya novykh holinergicheskikh sredstv (farmakologiya-klinike)]* SPb: Art-Ekspress, 2015. (in Russian)

11. Khnychenko L.K., Bulion V.V., Sitnikova I.I., Losev N.A. New approach to treatment of a hypertensive illness. *Vrach.* 1994; (4): 25-6. (in Russian)

12. Mironov A.N., Bunatjan N.D. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv]* M.: Grif i K; 2012. (in Russian)

13. Okunevich I.V., Khnychenko L.K., Shabanov P.D. Vliyanie gipoksena na izmenenie pokazatelej lipidnogo obmena v usloviyakh jeksperimental'noj dislipidemii. *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoy terapii.* 2014; (3): 26-9. (in Russian)

14. Bryul A., Tsefel P. *Art of information processing of statistical data and restoration of the hidden regularities. Искусство обработки информации статистических данных и восстановление скрытых закономерностей [Iskusstvo obrabotki informatsii statisticheskikh dannykh i vosstanovlenie skrytykh zakonernostey]* Moscow — St. Petersburg — Kiev: Dia Soft; 2002. (in Russian)

15. Okunevich I.V., Khnychenko L.K., Losev N.A., Sapronov N.S. The means possessing hypolipidemic properties. Patent 2392933, RF; 2010. (in Russian)

Поступила 11.10.14

Сведения об авторах:

Окуневич Ирина Викторовна (Okunevich I.V.) канд. биол. наук, ст. науч. сотр.

Лосев Николай Андреевич (Losev N.A.), доктор мед. наук, профессор, рук. лаб. химии и фармакологии лекарственных веществ

Сапронов Николай Сергеевич (Sapronov N.S.), доктор мед. наук, профессор, чл.-корр. РАН, гл. науч. сотр., e-mail: sns@iemrams.ru