

## ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ СУЛЬФАТИРОВАННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ

В.Е.РЫЖЕНКОВ, М.А.СОЛОВЬЕВА, О.В.РЕМЕЗОВА, И.В.ОКУНЕВИЧ

НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург

В работе проведено сравнительное экспериментальное изучение гипополипидемического действия отечественных сульфатированных полисахаридов — сульфатов хитозана и сульфатпроизводных крилана и лютелана в опытах *in vitro* и в эксперименте на крысах с гиперлипидемией, вызванной различными способами. Установлено, что исследованные вещества эффективно связывают атерогенные липопротеиды в опытах *in vitro*, а при введении животным перорально обладают гипотриглицеридемическим действием и увеличивают уровень ЛПВП в сыворотке крови. Указывается, что наиболее целесообразно проводить дальнейшие исследования с веществами с молекулярной массой  $20-40 \cdot 10^3$  Д и содержанием серы 9—14%.

Известно, что сульфатированный полисахарид гепарин оказывает гипополипидемическое действие в эксперименте [1, 2, 3] и клинике [4]. Основным его свойством является активация фермента липопротеидлипазы (ЛПЛ), который гидролизует богатые триглицеридами (ТГ) липопротеиды (ЛП). Уменьшение уровня последних приводит к снижению вязкости крови, улучшению микроциркуляции, к усилению транспорта кислорода в ткани [5], уменьшению агрегации тромбоцитов [6] и, кроме того, способствует увеличению концентрации антиатерогенных ЛП высокой плотности (ЛПВП) [7]. В то время выраженное антикоагулянтное действие и быстрая инактивация гепарина, а также необходимость постоянного контроля за возможностью возникновения осложнений типа остеопороза и тромбоцитопении осложняют его применение при гиперлипидемиях. В связи с этим увеличился интерес к изысканию и изучению аналогов гепарина, лишенных побочных эффектов. Описан ряд гепариноподобных веществ, среди которых пентозанполисульфат, сульфополигликан, различные гепариноиды, полученные из слизистой кишечника животных, олигофрагменты гепарина, обладающие некоторой гипополипидемической активностью [8]. Так, декстрансульфат (MDS), примененный для лечения больных с гиперлипидемией, эффективно снижал содержание холестерина (ХС) и ТГ в крови и проявления ишемической болезни сердца [9]. Хондроитинполисульфат, примененный в клинике у больных атеросклерозом, заметно снижал уровень липидов (ХС на 20%, ТГ на 30%), при этом улучшались показатели электрокардиограммы и свертывающей системы крови [10].

В данной работе были изучены отечественные сульфатированные полисахариды — сульфаты хитозана (СХ), полученные химическим путем в Московской текстильной академии [11], и сульфатпроизводные крилана и лютелана (соответственно СК и СЛ), продукты микробиологического синтеза, полученные в Санкт-Петербургском химико-фармацевтическом институте [12].

Исследовано 14 СХ, отличающихся молекулярной массой и содержанием серы в молекуле (оно варьировало от 13,3 до 14,0%), а также 4 СК с содержанием серы 6—7% 6 СЛ с содержанием серы 3,7—9,4%.

**Методика.** Острая токсичность соединений изучена в опытах на мышцах-самцах массой 18—20 г. Животные получали вещества перорально через зонд и внутрибрюшинно в разных дозах.

Способность соединений связывать атерогенные ЛП сыворотки крови в опытах *in vitro* изучали турбидиметрическим методом [13]. Препаратом сравнения служил гепарин. Для изучения связывания атерогенных ЛП была использована гиперлипидемическая сыворотка крови человека с добавлением 0,025 М раствора кальция хлорида. Растворы гепарина и полисахаридов изучали в 1% концентрации [14].

Гиперлипидемию у крыс-самцов (массой 180—200 г) вызывали применением диеты, содержащей 3% ХС, 0,12% 6-метилтиоурацила и 30% прогретого подсолнечного масла [15]. Изучаемые вещества вводили в дозе 100 мг/кг перорально через зонд в течение 21 дня. После декапитации животных определяли содержание общего ХС, ТГ,  $\alpha$ -ХС в сыворотке крови, ХС и ТГ в печени, исследовали также спектр ЛП по методу Terpstra и соавт. [16] и содержание гидроперекисей в апо- $\beta$ -ЛП [17]. В серии опытов на крысах-

самцах массой 250—270 г гиперлипидемию вызывали, используя детергент тритон WR-1339. Triton инъецировали внутривенно однократно в дозе 225 мг/кг. Исследуемые вещества вводили в дозе 100 мг/кг в течение 3 дней накануне введения тритона, а также одновременно с ним — за 10 ч до декапитации и через 2 ч после введения тритона. В другой серии опытов гиперлипидемию вызывали введением 50% этанола крысам-самцам массой 240—260 г. Соединения вводили перорально в дозе 100 мг/кг в течение 3 дней до введения этанола и вместе с ним [15].

Полученные результаты обрабатывали методом вариационной статистики с использованием *t*-критерия Стьюдента.

**Результаты и обсуждение.** Данные, полученные при изучении связывания атерогенных ЛП исследованными соединениями в условиях *in vitro*, показали, что СХ были активнее гепарина. Их активность была связана с молекулярной массой. Если активность гепарина принять за 100%, то активность СХ с молекулярной массой от  $10 \cdot 10^3$  до  $58 \cdot 10^3$  Д варьировала от 118 до 140% соответственно. Самым активным оказался препарат СХ 18/300 (200% связывания) с высокой молекулярной массой —  $120 \cdot 10^3$  Д.

Исследованные сульфатированные производные крилана и лютелана отличались по содержанию серы (от 3,7 до 9,4%). Было установлено, что соединения с более высоким содержанием серы (7—9%) более эффективно связывают атерогенные ЛП (на 120—190%). Более активный СК №4 (содержание серы 7%) и СЛ №2 (содержание серы 9,4%) были избраны для дальнейшего изучения.

Исследование острой токсичности веществ показало, что LD 50 при пероральном введении колеблется от 2,7 до 5 г/кг, а при внутривенном введении — от 1,7 до 5 г/кг, причем менее токсичными были соединения с меньшей молекулярной массой.

Далее была изучена эффективность веществ в опытах на крысах с гиперлипидемией, индуцированной применением атерогенной гиперхолестеринемической (ГХС) диеты. Результаты опытов приведены в табл. 1 и 2.

Таблица 1.

Влияние СХ на развитие экспериментальной гиперлипидемии у крыс

Группа животных	Условия опыта	Сыворотка крови			Печень	
		ХС	ТГ	$\alpha$ -ХС	ХС	ТГ
		мг %			мг/г	
1-я	Контроль ( $n=6$ )	49,3 $\pm$ 1,7	35,6 $\pm$ 3,5	43,2 $\pm$ 3,5	2,8 $\pm$ 0,1	12,4 $\pm$ 1,0
2-я	ГХС-диета ( $n=10$ )	107,2 $\pm$ 5,5	30,1 $\pm$ 2,4	15,4 $\pm$ 1,6	50,1 $\pm$ 1,6	48,7 $\pm$ 6,7
3-я	ГХС-диета + СХ 20/10, м.м. $30 \cdot 10^3$ ( $n=8$ )	86,6 $\pm$ 9,42*	33,0 $\pm$ 3,9	22,0 $\pm$ 2,7*	43,0 $\pm$ 1,67*	14,4 $\pm$ 4,15*
4-я	ГХС-диета + СХ 18/10, м.м. $58 \cdot 10^3$ ( $n=8$ )	90,1 $\pm$ 12,2*	33,5 $\pm$ 3,4	19,6 $\pm$ 1,61*	49,4 $\pm$ 2,6	23,1 $\pm$ 6,42*
5-я	ГХС-диета + СХ 20/300, м.м. $120 \cdot 10^3$ ( $n=8$ )	99,0 $\pm$ 14,32	36 $\pm$ 4,95	22,5 $\pm$ 2,7*	47,6 $\pm$ 2,57	21,9 $\pm$ 1,27*

Таблица 2

Влияние СЛ на развитие экспериментальной гиперлипидемии у крыс

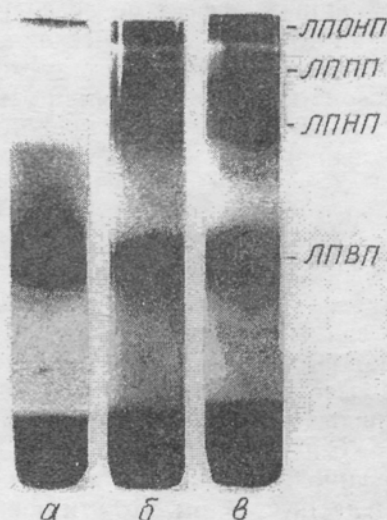
Группа животных	Условия опыта	Сыворотка крови			Печень	
		ХС	ТГ	$\alpha$ -ХС	ХС	ТГ
		мг %			мг/г	
1-я	Контроль ( $n=10$ )	38,6 $\pm$ 2,2	36,1 $\pm$ 3,3	34,6 $\pm$ 3,2	2,6 $\pm$ 0,05	14,2 $\pm$ 5,9
2-я	ГХС-диета ( $n=10$ )	142,2 $\pm$ 9,8	31,5 $\pm$ 3,7	11,5 $\pm$ 1,5	58,8 $\pm$ 1,8	51,6 $\pm$ 5,9
3-я	ГХС-диета + СЛ №2 ( $n=10$ )	113,7 $\pm$ 14,1	35,2 $\pm$ 3,9	16,2 $\pm$ 1,6*	55,9 $\pm$ 4,0	28,2 $\pm$ 3,4*

Как следует из данных табл. 1 и 2, при использовании ГХС-диеты у животных наблюдалось значительное увеличение содержания общего ХС в сыворотке крови — в 2—3 раза и в печени — в 18—22 раза. Содержание антиатерогенной фракции  $\alpha$ -ХС снижалось в 3 раза. Содержание ТГ в печени увеличивалось примерно в 4 раза, а в сыворотке несколько снижалось, что являлось следствием применения тиреодиспрессорного аген-

та 6-метилтиоурацила, без использования которого у крыс трудно вызвать гиперлипидемию.

Из табл. 1 видно, что введение изученных СХ перорально в дозе 100 мг/кг привело к достоверному снижению уровня общего ХС в сыворотке крови и способствовало повышению содержания  $\alpha$ -ХС на 27—40%, т.е. ХС антиатерогенной фракции ЛПВП. При этом отмечена тенденция к снижению уровня ХС в печени крыс и нормализации уровня ТГ в сыворотке крови. Положительное влияние СХ на ТГ печени было наиболее выраженным, причем это действие зависело от молекулярной массы соединений. Введение СХ с молекулярной массой  $30 \cdot 10^3$ Д привело к снижению уровня ТГ на 77% ( $p < 0,001$ ), а при увеличении молекулярной массы до  $58-120 \cdot 10^3$ Д — на 40—55%. Таким образом, введение вещества с меньшей молекулярной массой оказывало более выраженное действие.

Как следует из данных табл. 2, при применении СЛ в дозе 100 мг/кг перорально наблюдалось снижение содержания общего ХС в сыворотке крови на 20%. Содержание ТГ в печени снизилось на 45%, а содержание  $\alpha$ -ХС в сыворотке крови увеличилось на 40%.



Разделение ЛП сыворотки крови крыс при ультрацентрифугировании в ступенчатом градиенте плотности КВч.

А — интактные животные, Б — получавшие ГХС-диету, В — получавшие ГХС-диету + СХ 20/10 в дозе 100 мг/кг.

Изучение спектра ЛП сыворотки крови показало, что у животных, получавших ГХС-диету, увеличивалась интенсивность окрашивания зоны, соответствующей расположению атерогенных ЛП промежуточной плотности (ЛППП) и ЛП низкой плотности (ЛПНП), а также снижалась интенсивность полосы в зоне антиатерогенных ЛПВП. Введение вместе с ГХС-диетой сульфатов полисахаридов (в данном случае СХ 20/10) привело к уменьшению интенсивности полосы, соответствующей расположению ЛППП, и увеличению интенсивности и широты полосы ЛПВП. Результаты исследования антиоксидантной активности соединений показали, что в норме содержание гидроперекисей в апо-В-ЛП составляет 50%. При гиперлипидемии оно увеличивается до 97%, а применение, например, СЛ N2 привело к его снижению до 66%, что позволяет предположить наличие антиоксидантного действия у этого вещества.

В следующей серии опытов было изучено влияние сульфатов полисахаридов на развитие гиперлипидемии у крыс, вызванной введением детергента тритона WR-1339. Результаты опытов приведены в табл. 3.

При введении данного детергента животным наблюдается значительное увеличение уровня ТГ и в меньшей степени ХС в крови. Введение сульфатов полисахаридов обусловило задержку развития гиперлипидемии, отчетливо уменьшало содержание ТГ в



Таблица 3

Влияние сульфатов полисахаридов на развитие гиперлипидемии у крыс, вызванной введением детергента тритона WR=1339

Группа животных	Условия опыта	Сыворотка крови	
		ХС	ТГ
		мг %	
1-я	Контроль (n=8)	55,5±2,3	36,75±2,48
2-я	Тритон (n=6)	162,2±5,3	1849,5±32,7
3-я	Тритон + СХ 25/10, м.м. 22·10 <sup>3</sup> (n=8)	152,0±3,95	966,0±82,79*
4-я	Тритон + СХ 22/10, м.м. 42·10 <sup>3</sup> (n=8)	148,7±7,18	998,0±101,4*
5-я	Тритон + СХ 20/300, м.м. 120·10 <sup>3</sup> (n=8)	165,7±7,74	1600±129,78
6-я	Тритон + СХ #2, (n=10)	156,8±3,9	1021,4±96,8*

сыворотке крови (на 44—48%), наблюдалась также тенденция к снижению уровня ХС. Причем можно отметить, что эффективность изученных веществ, так же как и в предыдущих опытах, зависела от их молекулярной массы. Так, СХ с молекулярной массой 20—40·10<sup>3</sup>Д давали более выраженный эффект по сравнению с СХ с молекулярной массой 120·10<sup>3</sup>Д. Выраженное гипотриглицеридемическое действие сульфатов полисахаридов подтвердилось и в следующей серии опытов с гиперлипидемией, вызванной введением этанола. Известно свойство этанола увеличивать содержание ТГ в крови в результате их биосинтеза в печени и поступления в кровоток в виде ЛП очень низкой плотности (ЛПОНП) [18]. Под влиянием этанола возрастало содержание ТГ в печени (в 2 раза,  $p<0,05$ ). Содержание ХС увеличилось незначительно. Считается, что увеличение ХС в сыворотке происходит за счет  $\alpha$ -ХС [19]. При введении ХС с молекулярной массой 40·10<sup>3</sup>Д содержание ТГ в сыворотке уменьшалось на 35% ( $p<0,2$ ), а при введении СХ с молекулярной массой 120·10<sup>3</sup>Д — на 20% ( $p<0,2$ ). При введении СЛ N2 уровень ТГ снижался на 34%.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что исследованные сульфаты полисахаридов оказывают выраженное гипотриглицеридемическое действие и увеличивают уровень ЛПВП в сыворотке крови. Эти эффекты могут быть связаны со свойством препаратов активизировать ЛПЛ. Известно, что существует обратная корреляция между содержанием  $\alpha$ -ХС и ТГ в сыворотке крови [7], что обусловлено активностью ЛПЛ. Влияние СХ на липолитическую активность крови кроликов, установленное нами ранее [20], свидетельствует о том, что эти производные хитозана являются эффективными активаторами липолитических ферментов. Тенденцию к гипохолестеринемическому действию сульфатов полисахаридов можно объяснить снижением всасывания ХС в кишечнике, что было отмечено ранее [21]. Следует отметить, что в опытах *in vitro* наиболее активными были соединения с большей молекулярной массой. В эксперименте на животных большую активность проявили соединения с меньшей молекулярной массой — 20—40·10<sup>3</sup>Д. Это объясняется, по-видимому, тем обстоятельством, что вещества с большей молекулярной массой хуже всасываются в кишечнике. Если учесть также тот факт, что токсичность изученных соединений увеличивается с увеличением молекулярной массы, а активность зависит от степени сульфатирования, что подтверждается и другими авторами [22], то можно считать целесообразным проведение дальнейших исследований при использовании веществ с молекулярной массой 20—40·10<sup>3</sup>Д и содержанием серы 9—14%. Наличие дополнительного антиоксидантного действия у некоторых из изученных сульфосоединений также указывает на перспективность применения этих веществ в качестве возможных гиполипидемических средств.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Horlick L., Duff L.J. // Arch. Path. — 1954. — Vol. 57. — P. 417—419.
2. Meng H.C., Davis W.S. // Arch. Path. — 1955. — Vol. 60. — P. 276—280.
3. Seuter F. // Z. Kardiol. — 1989. — Bd 78. — Suppl. 6. — S. 117—119.
4. Michiaki Ejiri, Masatochi Fujita // Amer. Heart J. — 1990. — Vol. 119, N 2. — P. 248—253.
5. Engelberg H. // Advanc. exp. Med. Biol. — 1975. — Vol. 52. — P. 299.
6. Essien E.M., Kinlough-Rathbone R., Moore S., Mustard Y.E. // Thrombos. Diathes. Haemorrh. (Stuttg.). — 1975. — Vol. 34. — P. 600—608.

7. Nikkila E.A. // High Density Lipoproteins and Atherosclerosis / Eds. A.M. Gotto et al. — Amsterdam, 1978. — P. 177—193.
8. Jacues L.B. // Pharmacol. Rev. — 1980. — Vol. 31. — P. 99—166.
9. Goto Yuchiro, Kumagai Akira, Kuzuya Fumio et al. // J. Clin. Biochem. Nutr. — 1987. — Vol. 2, N 1. — P. 55—70.
10. Nakasawa K., Murata K. // International Symposium of Drugs Affecting Lipid Metabolism, 5-th. — Milan, 1974. — P. 74—75.
11. Горбачева И.Н., Скорикова Е.Е., Вихорева Г.А. и др. // Высоко-молекул. соединения. — 1991. — N9. — С. 17—19.
12. Форотынская С.Л. Получение и изучение некоторых гетерогликанов крептококков и их производных: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — СПб., 1993.
13. Климов А.Н., Ловягина Т.Н., Баньковская Э.Б. // Лаб. дело. — 1966. — N5. — С. 276—280.
14. Чистякова А.М., Корбелайнен Э.С., Коновалов В.И. и др. // Результаты и перспективы научных исследований микробных полимеров. — Л., 1984. — С. 173.
15. Климов А.Н., Рыженков В.Е. Экспериментальное изучение гипохолестеринемических и антиатеросклеротических средств: Метод. рекомендации. — М., 1988.
16. Terpstra N.M., Woodward G.H., Sancher-Muniz F.J. // Ann. Biochem. — 1981. — Vol. 5, N 3. — P. 149—151.
17. El-Saadani M., Esterbauer M., El-Sayed M. et al. // J. Lipid Res. — 1989. — Vol. 30, N4. — P. 627—630.
18. Hansson P., Nilsson-Ehle P. // Ann. Nutr. Metab. — 1983. — Vol. 27. — P. 328—335.
19. Crouse J.R., Grundy S.M. // J. Lipid Res. — 1984. — Vol. — P. 486—493.
20. Lafont H. // J. Nutr. — 1985. — Vol. 115, N 7. — P. 849—855.
21. Ofosu F.A., Modi G.J. et al. // Biochem. J. — 1987. — Vol. 248, M 3. — P. 889—896.

#### HYPOLIPIDEMIC ACTION OF SULFATED POLYSACCHARIDES

*V.E. Ryzhenkov, M.A. Solovyeva, O.V. Remesova, I.V. Okunevich*

Department of Biochemistry Institute of Experimental Medicine of Russian academy of Medical Science St. Peterberg, Acad. Pavlov Str., 12

In experiments on hyperlipidemic rats it was observed the hypolipidemic effect of new sulfated polysaccharides — chitosan, lutealan and krilan sulfates. More pronounced decrease was established in VLDL and increase of HDL after sulfated polysaccharides treatment. The most distinct efficiency exhibits preparation with molecular mass of  $20-40 \cdot 10^3$  D and the rate of sulfation 9—14%.