

ИССЛЕДОВАНИЕ ДОЗОЗАВИСИМОГО ХАРАКТЕРА ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ И ЭНДОТЕЛИОПРОТЕКТИВНЫХ ЭФФЕКТОВ АТОРВАСТАТИНА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Т.В. Долженкова¹
В.И. Якушев¹
А.А. Арустамова²
Е.А. Бесхмельницына¹
О.С. Гудырев¹
А.С. Белоус¹

¹⁾ Курский государственный
медицинский университет

²⁾ Белгородский государственный
университет

e-mail: vladi-yakus@yandex.ru

В лаборатории кардиофармакологии НИИ Экологической медицины КГМУ проведено изучение противовоспалительной, эндотелиопротективной активности ингибитора 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА редуктазы – аторвастатина в экспериментах на мышах и крысах. Полученные результаты позволили установить наличие у аторвастатина выраженной дозозависимой противовоспалительной активности. Наблюдается выраженная коррекция эндотелиальной дисфункции при применении аторвастатина в дозе 2,2 мг/кг. При этом применение аторвастатина в дозе 8,6 мг/кг не привело к достоверно более выраженному снижению коэффициента эндотелиальной дисфункции (КЭД), по сравнению с дозой 2,2 мг/кг.

Ключевые слова: аторвастатин, эндотелий, воспаление.

Ведущим фактором этиопатогенеза болезней сердца и сосудов в настоящее время считается дисфункция сосудистого эндотелия [2, 9, 12, 15, 23].

Дисфункция эндотелия характеризуется дисбалансом вазоконстрикторной и дилататорной способности сосудов, обусловленной нарушением баланса между вазодилатирующими факторами: оксид азота (NO) и простаглицлин I₂α (ПЦ I₂α) и вазоконстрикторными – эндотелином-1 и ангиотензинном-2 [7, 8, 9, 12, 13, 14].

Одной из причин, ведущих к развитию эндотелиальной дисфункции, является дислиппротеинемия – повышение уровня атерогенных плазменных липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и липопротеинов очень низкой плотности (ЛОНП) и снижение уровня липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) [1, 4, 6].

По современным представлениям эндотелий является основной мишенью атерогенеза. Липиды в норме не проникают через интиму, но барьерная функция эндотелия изменяется под воздействием таких факторов риска, как курение, гиперхолестеринемия, гиперинсулинемия, артериальная гипертензия, старение, менопауза, а также под влиянием системных и локальных медиаторов воспаления и реактивных форм кислорода [1, 4, 8, 11, 14].

Общепринятыми препаратами для лечения и профилактики коронарных болезней сердца атеросклеротического генеза, а также таких осложнений поражения сосудов как инфаркт миокарда и инсульт являются статины (ингибиторы 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА-редуктазы) [1].

В последние годы появилось много данных о плейотропных эффектах статинов, которые реализуются через липидзависимые механизмы, такие как: 1) улучшение функции эндотелия, что в итоге ведет к повышению вазодилатирующей способности периферических и коронарных сосудов и вызывает антиишемический эффект; 2) антипротеолитическое действие; 3) предотвращение развития болезни Альцгеймера и деменции сосудистого генеза; 4) противовоспалительные свойства и др. [1, 14].

Так, получены данные о протозовоспалительном действии статинов на модели коллагенового артрита у мышей [1]. При этом установлено, что симвастатин в дозе 40 мг/кг существенно снижает тяжесть артрита, снижает выраженность воспалительной инфильтрации синовиальной оболочки суставов. В эксперименте было установлено, что флувастатин, не оказывая существенного влияния на уровень липидов, может ослаблять действие таких стимуляторов воспаления, как лейкотриенВ₄ и фактор активности тромбоцитов (ФАТ) [1]. В 1999 году было установлено, что флувастатин и



симвастатин существенно ингибировали Анг-2, индуцированную секрецию интерлейкина-6 (ИЛ-6), что сопровождалось снижением уровня С-реактивного белка (СРБ) – важного маркера воспаления. На модели асептического воспаления, вызываемого инъекцией экстракта из ирландского мха было показано, что профилактический пероральный прием симвастатина за 1 ч до инъекции уменьшает выраженность отека на 48% [1, 8].

В этой связи, целью настоящего исследования явилось изучение дозозависимой противовоспалительной активности аторвастатина на модели асептического воспаления, эндотелиопротективных его эффектов при L-NAME-индуцированном дефиците оксида азота в эксперименте.

Методика исследования. Исследование противовоспалительной активности аторвастатина в опытах на мышах. Опыты проводились на белых лабораторных мышах массой 20-30 г. Воспалительный процесс моделировали путем введения флогистика (0,02 мл 4% раствора формальдегида) под ладонный апоневроз лапки мыши. В эксперименте были использованы следующие группы животных: 1) контрольная (n=10) – под апоневроз левой задней лапки мыши вводили 0,02 мл 4% раствора формальдегида, в правую лапку вводили 0,02 мл физиологического раствора за 4 часа до выведения из эксперимента; 2) аторвастатин (n=10) – 20 мг/кг; 3) аторвастатин (n=10) – 10 мг/кг; 4) аторвастатин (n=10) – 5 мг/кг. Аторвастатин вводили перорально в виде раствора из расчета 0,1 мл на 10 г. массы животного за 12 часов и за час до введения флогистика. Спустя 4 часа после введения флогистика на пике воспаления животных выводили из эксперимента путем наркотизирования диэтиловым эфиром. Противовоспалительное, антифлогистическое действие оценивали путем расчета ингибирующего эффекта исходя из средних значений процента прироста массы отечной лапки по отношению к массе интактной в контрольной и опытной группах животных по формуле: $(\Delta M_k - \Delta M_o) \times 100 / \Delta M_k$, где ΔM_k – прирост массы лапки у контрольной группы %; ΔM_o – прирост массы лапки у опытной группы %.

Исследование эндотелиопротективной активности аторвастатина в опытах на крысах. Опыты проводились на белых крысах самцах линии Wistar массой 200 – 250 г. Для моделирования эндотелиальной дисфункции N-нитро-L-аргинин метиловый эфир (L-NAME) вводился внутривентриально в дозе 25 мг/кг/сут. В эксперименте были использованы следующие группы животных: 1) интактные (n=10) – внутривентриальное введение 1% крахмального раствора в дозе 10 мл/кг в течение 7 суток, 2) контрольные (n=10) – внутривентриальное введение L-NAME в дозе 25 мг/кг 1 раз в сутки в течение 7 суток, 3) аторвастатин (n=10) – 2,2 мг/кг (в пересчете с 5 мг/кг у мышей по формуле Улановой), 4) аторвастатин (n=10) – 8,6 мг/кг (в пересчете с 20 мг/кг у мышей по формуле Улановой). Исследуемый препарат вводили внутривентриально, за 30 минут до введения L-NAME, один раз в день в течение 7 суток.

На 8 день от начала эксперимента под наркозом (хлоралгидрат 300 мг/кг) вводили катетер в левую сонную артерию для регистрации показателей артериального давления (АД), болюсное введение фармакологических агентов осуществляли в бедренную вену. Показатели гемодинамики: систолическое артериальное давление (САД), диастолическое артериальное давление (ДАД) и частоту сердечных сокращений (ЧСС) измеряют непрерывно посредством датчика TSD104A и аппаратно-программного комплекса MP100, производства Biopac System, Inc., США. Помимо измерения АД проводили ряд функциональных тестов с последующей оценкой изменения параметров гемодинамики (САД, ДАД, ЧСС) в ответ на внутривенное введение раствора ацетилхолина (АХ) в дозе 40 мкг/кг из расчета 0,1 мл на 100 г массы тела животного (ЭЗВД) [14], а также изменения параметров гемодинамики в ответ на внутривенное введение раствора нитропруссид натрия (НП) в дозе 30 мкг/кг из расчета 0,1 мл на 100 г массы тела животного (ЭНВД) [9].

Степень эндотелиальной дисфункции у экспериментальных животных, а также степень ее коррекции исследуемыми препаратами оценивали по расчетному коэффициенту эндотелиальной дисфункции (КЭД), представляющему собой отношение площади треугольника над кривой восстановления АД в ответ на введение НП (ЭНВД) к

площади треугольника над кривой восстановления АД в ответ на введение АХ (ЭЗВД) [10]. Для моделирования L-Name индуцированной эндотелиальной дисфункции осуществляли внутрибрюшинное введение N-нитро-L-аргининметилового эфира (L-NAME) в дозе 25 мг/кг белым крысам самцам линии Wistar массой 250-300 г в течение 7 дней.

Достоверность изменений абсолютных параметров определяли разностным методом вариационной статистики с нахождением средних значений сдвигов (M), средней арифметической ($\pm m$) и вероятности возможной ошибки (p) по таблицам Стьюдента. Различия оценивали как достоверные при $p < 0,05$. Статистические расчёты проводились с использованием программы Microsoft Excel 7.0.

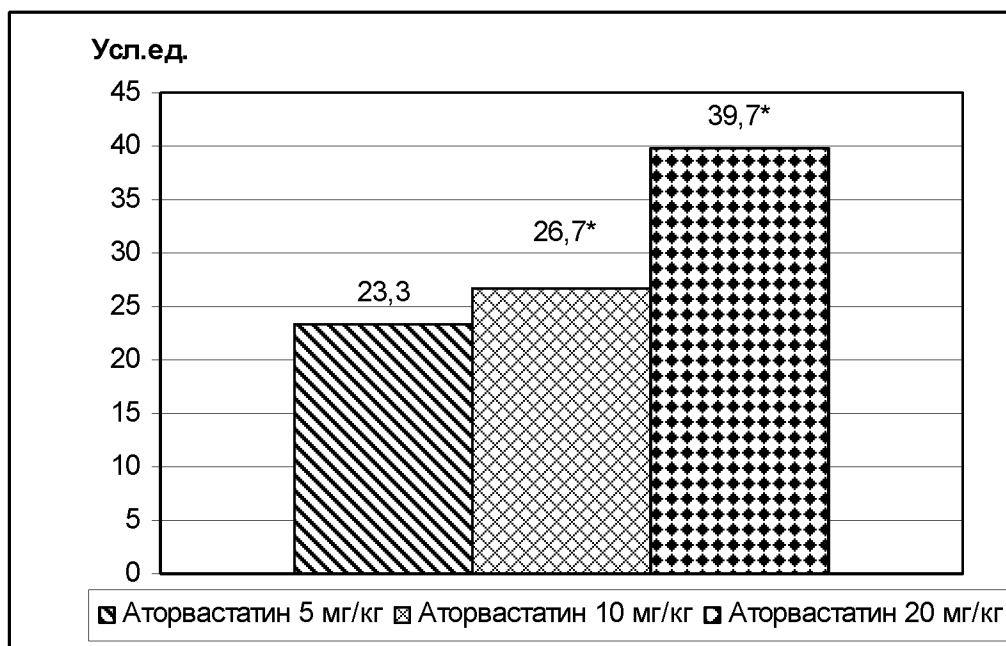


Рис. 1. Антифлогистическое действие аторвастатина в дозах 5, 10, 20 мг/кг при моделировании асептического воспаления у мышей (0,02 мл 4% раствора формальдегида под апоневроз левой задней лапки) по значению ингибирующего эффекта.

Примечание: *- $p < 0,05$ – в сравнении с аторвастатином 5мг/кг.

Результаты исследования. Результаты исследования противовоспалительного действия аторвастатина в опытах на мышах. Согласно дизайну исследования, в контрольной группе животных воспаление моделировали путем введения флогистика (0,02 мл 4% раствора формальдегида) под апоневроз левой задней лапки мыши за 4 часа до выведения животных из эксперимента.

Аторвастатин (Липтонорм®, ОАО «Фармстандарт лексредства») в дозах 5, 10, 20 мг/кг вводили внутривенно за 12 и за час до введения флогистика.

По протоколу, спустя 4 часа после введения флогистика наркотизированных животных выводили из эксперимента. Противовоспалительное (антифлогистическое) действие исследуемых доз аторвастатина представлено на рис. 1.

Установлено, что аторвастатин обладает выраженным дозозависимым эффектом при данной модели патологии.

Влияние исследуемых доз аторвастатина на исходные показатели артериального давления у наркотизированных крыс с моделированием L-NAME-индуцированной патологии представлены на рис.2.

Обнаружено, что аторвастатин не предотвращал развития выраженной гипертензии, и значения САД и ДАД были достоверно выше соответствующих значений интактных животных во всех сериях экспериментов (рис. 2).

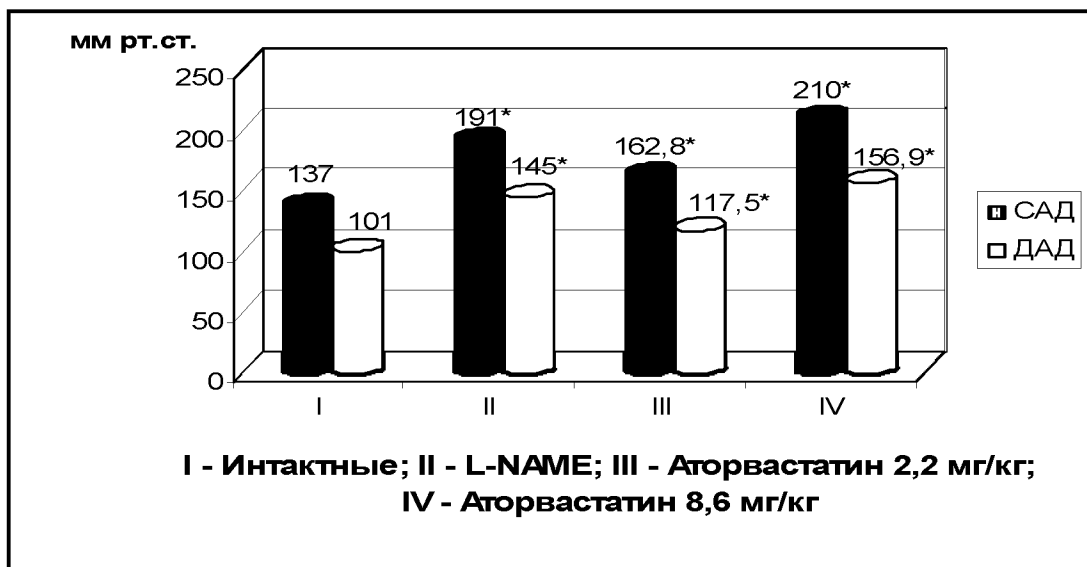


Рис. 2. Влияние аторвастатина в дозах 2,2 мг/кг и 8,6 мг/кг на АД систолическое и АД диастолическое при моделировании L-NAME (25 мг/кг внутривенно, однократно в течение 7 дней) индуцированного дефицита NO
Примечание: * – $p < 0,05$ – в сравнении с интактными.

Коэффициент эндотелиальной дисфункции. На рис. 3 представлены результаты функциональных проб на эндотелийзависимое (ацетилхолин 40 мкг/кг в/в) и эндотелийнезависимое (нитропруссид 30 мг/кг в/в) расслабление сосудов у животных с L-NAME индуцированной патологией на фоне лечения исследуемыми препаратами с последующим расчетом КЭД. Установлено, что аторвастатин в дозе 8,6 мг/кг снижает КЭД до $2,7 \pm 0,3$, в дозе 2,2 мг/кг до $2,8 \pm 0,5$.

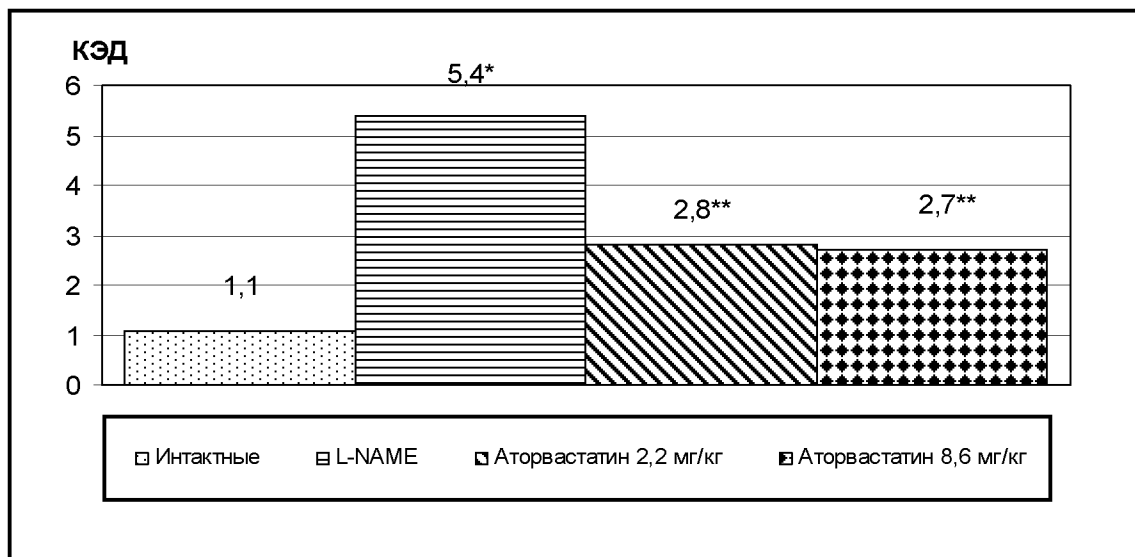


Рис. 3. Влияние аторвастатина в дозах 2,2 мг/кг и 8,6 мг/кг на коэффициент эндотелиальной дисфункции при моделировании L-NAME (25 мг/кг внутривенно однократно в течение 7 дней) индуцированного дефицита NO.

Примечание: * – $p < 0,05$ – в сравнении с интактными, ** – $p < 0,05$ – в сравнении с L-NAME.

Обращает на себя внимание, что аторвастатин в исследуемых дозах приводил к достоверному снижению КЭД на фоне L-NAME-индуцированной патологии. Однако по сравнению со значением КЭД у животных, получавших аторвастатин в дозе 2,2 и 8,6 мг/кг, не выявлено его достоверных различий, что свидетельствует об отсутствии у данного препарата дозозависимого эффекта.

Обсуждение результатов. В настоящее время для коррекции состояний, сопровождающихся воспалительными процессами, эндотелиальной дисфункцией, перспективными считаются ингибиторы 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА-редуктазы, обладающие кроме гиполипидемического, плейотропным, противовоспалительным и эндотелиопротективным эффектами, так как одними из главных механизмов, лежащих в основе эндотелиальной дисфункции, является снижение продукции и биодоступности NO при одновременном повышении уровня ЛОНП и ЛНП, снижении ЛВП и выбросе медиаторов воспаления [1, 13, 17].

Образование оксида азота в эндотелии зависит от сродства субстрата – L-аргинина и фермента эндотелиальной NO-синтазы. ЛОНП и ЛНП способны вызывать разобщение этого биохимического процесса, тем самым, приводя к его дефициту, а повышение локально действующих медиаторов воспаления вызывает повышение образования таких свободных радикалов, как супероксид-анион, который взаимодействуя с оксидом азота с образованием пероксинитрита, а он в свою очередь ответственен за нитрование тирозина, за общее и перманентное повреждение тканей за счет окисления гидроксильным радикалом, а также за развитие атеросклероза. NO и пероксинитрит способны препятствовать развитию атеросклероза, но при наличии атеросклероза развивается токсический эффект из-за накопления пероксинитрита в атеросклеротической бляшке [5, 14, 15, 16, 17].

Поэтому, стратегией понижения уровня и прогрессирования атеросклероза, вызванного указанными явлениями, заключается в использовании статинов с целью сохранения NO-индуцированных сигнальных путей в сосудах [1, 5, 7, 14].

Препарат, изученный в рамках данного исследования, обладая широким спектром фармакологических эффектов, оказывает мощное положительное влияние на основные звенья патогенеза различных заболеваний, связанных с такими процессами как дислипидемия, гиперхолестеринемия, гипертриглицеридемия, дисфункция сосудистого эндотелия и успешно используется в качестве средства комплексной терапии и профилактики атеросклероза и его осложнений.

Антивоспалительные эффекты аторвастатина могут быть осуществляться как посредством угнетения актин-обусловленной полимеризацией мембран, так и воздействием на интегрин-адгезирующие молекулы, а также снижением продукции провоспалительных цитокинов [1].

Указанные факты подтвердились в лаборатории кардиофармакологии НИИ Экологической медицины Курского государственного медицинского университета при изучении эндотелиопротективной, кардиопротективной, противовоспалительной активности широкого диапазона доз препарата аторвастатин (Липтонорм®, ОАО «Фармстандарт лексредства»).

Результаты исследования свидетельствуют о наличии у аторвастатина выраженного противовоспалительного эффекта, при этом он прямо пропорционален дозе препарата и максимален у мышей в дозе 20 мг/кг при двукратном введении согласно описанной методике.

Полученные результаты позволяют констатировать выраженную коррекцию эндотелиальной дисфункции при применении аторвастатина (Липтонорм®, ОАО «Фармстандарт лексредства»). При этом использование аторвастатина в дозе 2,2 мг/кг считается более целесообразным, так как нет достоверно более выраженного снижения КЭД при применении дозы 8,6 мг/кг. Значение КЭД в группе животных, получавших аторвастатин в дозе 2,2 мг/кг составило $2,8 \pm 0,5$; в группе животных, получавших аторвастатин в дозе 8,6 мг/кг, данный показатель составил $2,7 \pm 0,3$. В заключение можно сказать, что выяснение роли и конкретных механизмов взаимного влияния воспаления и дислипидемии в патогенезе эндотелиальной дисфункции, представляет не только теоретический интерес, но и несомненную практическую значимость. Рассмотренные выше и другие аспекты этой проблемы могут служить основой для разработки соответствующих профилактических и терапевтических мероприятий, направленных на предотвращение или устранение отмеченных нарушений — одного из ведущих факторов этиопатогенеза заболеваний сердечно-сосудистой системы.

Литература

1. Атрощенко, Е. С. Плейотропные эффекты статинов: новый аспект действия ингибиторов ГМГ-КоА-Редуктазы / Е. С. Атрощенко // Медицинские новости – 2004 -№3 – С. 59-66.
2. Гранник, В. Г. Оксид азота (NO). Новый путь к поиску лекарств / В. Г. Гранник, Н. Б. Григорьев. – М.: Вузовская книга, 2004. – 360 с.: ил.
3. Гурбанов, К. К. Сравнительная оценка антиишемического действия верапамила на разных моделях ишемии миокарда / К. К. Гурбанов // Фармакология и токсикология. – 1991. – Т.54, №4. – С. 21-23.
4. Климов, А. Н., Липопротеины, липопротеиндеми и атеросклероз / А. Н. Климов, Н. Г. Никульчева. – Л., 1984. – 166 с.
5. Маколкин, В. И. Артериальная гипертензия – фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний / В. И. Маколкин // Рус. мед. журн. – 2002. – Т.10, № 19. – С. 862-864.
6. Марков, Х. М. Оксид азота и сердечно-сосудистая система / Х. М. Марков // Успехи физиол. наук. – 2001. – Т. 32. – № 3. – С. 49-65.
7. Марков, Х. М. Простаноиды и атеросклероз / Х. М. Марков // Патологическая физиология. – №1. – 2004. – С. – 2-8.
8. Марков, Х. М. Сосудистые эффекты липопротеинов и оксид азота: клеточные и молекулярные механизмы / Х. М. Марков // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2006. – №3. – С. 2-7.
9. Покровский, М. В. Новый взгляд на коррекцию эндотелиальной дисфункции / М. В. Покровский // Российский журнал иммунологии. – 2006. – Т.9. – С. 60-61.
10. Репин, А. Н. Оценка кардиопротективного действия эмоксипина при тромболитической реперфузии миокарда / А. Н. Репин // Кардиология. – 1994. – Т. 3, № 34. – С. 4-7.
11. Соболева, Г. Н. Состояние эндотелия при артериальной гипертензии и других факторах риска атеросклероза (обзор литературы-2) / Г. Н. Соболева // Тер. арх. – 1999. – № 7. – С. 80-83.
12. Böger, R. H. Dietary L-arginine reduces the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits—comparison with lovastatin / R. H. Böger // Circulation 1997 Vol.96. – P. 1282–1290.
13. Frisbee, J. C. Impaired NO-dependent dilation of skeletal muscle arterioles in hypertensive diabetic obese Zucker rats / J. C. Frisbee // Am J Physiol Heart Circ Physiol. – 2001. – Vol.281. – P. H1304–H1311.
14. Herbst, U., Hydroxynonenal induces dysfunction and apoptosis in cultured endothelial cells / U. Herbst // J. Cell. Physiol. – 1999.-Vol. 181. -P. 295-303.
15. Landmesser, U., Pharmacological approaches to improve endothelial repair mechanisms / U. Landmesser // Circulation – 2004 – Vol. 109, N 21, suppl. 1. – P. II29-133.
16. Taniyama, Y., Complex multiplication of abelian varieties and applications to number theory / Y. Taniyama // Hypertension. – 2003. – Vol. 42, N 6. – P. 1075–1081.
17. Vladimirova-Kitova, L. D. Asymmetric dimethylarginine--mechanisms and targets for therapeutic management / L. D. Vladimirova-Kitova // Folia Med. – Plovdiv. 2008; Vol.50, № 1. – P.12-21.

RESEARCH OF ADDICTED TO A DOSE CHARACTER OF ANTI-INFLAMMATORY AND ENDOTHELIOPROTECTIVE EFFECTS OF ATORVASTATIN IN EXPERIMENT

T.V. Dolzhenkova¹

V.I. Yakushev¹

A.A. Arustamova²

E.A. Beshmelnitsyna¹

O.S. Gudyrev¹

A.S. Belous¹

¹⁾ *Kursk State Medical University*

²⁾ *Belgorod State University*

e-mail: vladi-yakus@yandex.ru

Studying is spent to laboratories of cardiofarmacology scientific research institute of Ecological medicine anti-inflammatory, endothelioprotective activity of inhibitor of 3-gidroksi-3-metilglutaril-CoA reductase – atorvastatin in experiments on mice and rats. The received results have allowed to establish presence at atorvastatin expressed dependent on a dose anti-inflammatory activity. The expressed correction endothelial dysfunction at application of atorvastatin in a dose of 2,2 mg/kg. Thus application of atorvastatin in a dose 8,6 mg/kg has not led to authentically more expressed decrease of quotient of endothelial dysfunction, in comparison with a dose of 2,2 mg/kg.

Key words: atorvastatin, an endothelium, an inflammation.