

УДК 616.13-004.6-097-092.4

Е.П. Турмова ¹, А.А. Григорюк ¹, Е.А. Бычков ¹, Е.В. Маркелова ¹, И.В. Чикаловец ²**ИЗУЧЕНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ ИММУНОМОДУЛЯТОРА «ГАЛАВИТ»
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ****Государственный медицинский университет (Владивосток)
Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (Владивосток)**

Изучение цитокинов и липидного спектра сыворотки крови проводилось у 20 крыс линии Вистар при гиперлипидемии и артериальной гипертензии в течение 6 месяцев. Определение цитокинов IL-1 β , IFN- γ , TNF- α IL-10 в сыворотке крови производили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов: Rat «R&D Diagnostics Inc.», USA. Содержание общего холестерина; триглицеридов; холестерина липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) исследовали с помощью стандартного колориметрического метода с использованием реагентов: «Ольвекс диагностикум» (Россия). Было выявлено увеличение уровней IL-1, IFN- γ , повышение содержания общего холестерина, липопротеинов высокой и низкой плотности, коэффициента атерогенности в крови животных. При назначении иммуномодулятора Галавит в модели атеросклероза, зарегистрировано снижение содержания IL-1, IFN- γ и нормализация липидного спектра крови.

Ключевые слова: атеросклероз, гиперлипидемия, цитокины, крысы

**STUDYING OF APPLICATION IMMUNOMODULATOR «GALAVIT»
AT EXPERIMENTAL ATHEROSCLEROSIS**E.P. Turmova ¹, A.A. Grigoryuk ¹, E.A. Bichkov ¹, E.V. Markelova ¹, I.V. Chihkalovets ²¹ Vladivostok State Medical University, Vladivostok² Pacific institute of bioorganic chemistry. Far Eastern Branch RAS, Vladivostok

The changes of the cytokines and lipidic spectrum at experimental hyperlipidemia and arterial hypertension was made at 20 rats «Vistar» during 6 months. As the material of research was the blood serum. The cytokines was made by the method solid-phase not competitive immune-enzyme analysis with the use of sets: Rat «R&D Diagnostics Inc.», USA. The content of the general cholesterol; triglycerides; LDL; HDL was investigated by the method of standard colorimetric analysis with the use of reagents «Olveks diagnosticum» (Russia). The increasing of the general cholesterol, LDL; HDL, atherogenic coefficient, IFN- γ and IL-1 β in blood of animals was revealed. At application of immunomodulator «Galavit» at experimental atherosclerosis the decreasing contains of IL-1, IFN- γ , the level of general cholesterol; LDL; HDL, atherogenic coefficient is fixed.

Key words: atherosclerosis, hyperlipidemia, cytokines, rats

Согласно современным представлениям о патогенезе атеросклероза большое значение отводится иммуноопосредованному воспалению в артериальной стенке [3, 9, 11]. Гипертензия и гиперхолестеринемия коррелируют с развитием атеросклеротического процесса. Являясь промоторными факторами, они усиливают пролиферацию гладкомышечных клеток, что стимулирует образованию атеросклеротических бляшек [1, 10]. Однако, нередко атеросклеротический процесс развивается у лиц с нормальным содержанием холестерина и даже при низких его концентрациях [6, 9]. Изменения реагирования эндотелия с клетками иммунной системы на уровне цитокинов является ранним проявлением атерогенеза. Цитокиновый дисбаланс влияет на образование, рост атеросклеротической бляшки и вносит свой вклад в ее дестабилизацию с дальнейшим тромбообразованием. При этом известно, что IL-6, IL-1 β и TNF- α — в физиологических концентрациях играют важную роль в регуляции иммунного ответа и тканевого гомеостаза, а в высоких концентрациях обладают многочисленными системными и локальными эффектами прогрессирования атеросклеротического процесса [9, 13]. Однако аспекты цитокиновой

регуляции атерогенеза остаются еще до конца не выясненными и, часто, противоречиво трактуются разными авторами [2, 3]. Подтверждена связь изменений уровней воспалительно-деструктивных биомаркеров нестабильности бляшек с разной степенью стеноза, распространенности и преимущественной локализацией атеросклеротических поражений [8]. Экспериментальная оценка воспалительного повреждения артериальной стенки, с позиций местного и системного цитокинового дисбаланса, влияющего на процессы миграции, активации и пролиферации Т-лимфоцитов, макрофагов и гладкомышечных клеток, позволит выявить и обосновать применение иммуотропных препаратов в регуляции иммунного воспаления при атеросклерозе.

Препарат «Галавит» (регистрационный номер: РN0000/03, химическая формула — 5-амино-1,2,3,4-тетрагидрофалазин-1,4-диона натрия соль) обладает как иммуномодулирующими свойствами, так и противовоспалительными свойствами, вследствие модуляции синтеза противовоспалительных цитокинов гиперактивированными макрофагами. Галавит влияет на синтез иммуноглобулинов, повышая их уровень и функциональную активность

при хронических воспалительных заболеваниях, возникающих на фоне вторичной иммунной недостаточности. Галавит ранее широко применялся в экспериментах на крысах при разной патологии [8, 11]. Доказана иммуномодулирующая эффективность галавита при эссенциальной артериальной гипертензии [1].

Крысы часто используются в моделировании гиперлипидемии, как фактора риска атеросклероза [4, 10, 15]. Их приобретение и содержание относительно недорого, животные просты в обращении, хорошо размножаются в неволе. Из всех экспериментальных животных у них лучше всего изучен метаболизм [5]. Разработка адекватной экспериментальной модели повреждения эндотелия является необходимым шагом в целях диагностики, профилактики и лечения атеросклероза. Учитывая особенности обменных процессов крыс, способность формированию их резистентности к жировой нагрузке, нами применено сочетание экзогенной гиперлипидемии, угнетение обменных процессов и артериальной гипертензии для создания наиболее выраженного атеросклеротического повреждения. Методика предполагает значительное нарушение процессов обмена холестерина.

Целью работы явилось: изучить влияние препарата «Галавит» на цитокиновый профиль и липидный спектр сыворотки крови крыс в модели экспериментального атеросклероза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования явились крысы линии Vistar — 30 голов, массой 350 г. Поставка крыс осуществлялась из вивария Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток. Опытная группа крыс — 20 голов, в течение 6 месяцев (180 суток), находились на диете с добавлением в корм холестерина, метилтиоурацила — 1 мг/кг и витамина Д в количестве 2,5 МЕ на кг массы тела крыс (моделирование гиперлипидемии (ГЛ) [4]. В целях создания артериальной гипертензии (АГ) — за 15 дней перед началом кормления животным была произведена операция: наложение лигатуры на почечную ножку правой почки нерассасывающимся шовным материалом и прошивание верхнего полюса левой почки (моделирование симптоматической реноваскулярной артериальной гипертензии), в модификации [14]. Животные опытной группы I — 10 крыс не получали иммуномодулирующей терапии. Опытная группа II — 10 крыс — перед выведением из эксперимента получали препарат «Галавит», в/м, в количестве — 1 мг на 1 кг веса животного, по схеме: 1 инъекция в день, в течение 10 дней, затем 1 инъекция в 3-е суток. Общий курс лечения составлял — 15 инъекций. Контролем служили 10 крыс, питающихся обычным кормом — группа III. Через 6 месяцев исследования животных каждой группы выводили из эксперимента под эфирным наркозом путем декапитации. Осуществляли забор сыворотки крови. Эксперимент проводился со строгим соблюдением требований Европейской конвенции

(Страсбург, 1986) по содержанию, кормлению и уходу за подопытными животными, а также выводу их из эксперимента и последующей утилизации. В постановке опытов руководствовались «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных, утвержденными на заседании этической комиссии НИИ нормальной физиологии им П.К. Анохина РАМН (Протокол № 1, 3 сентября 2005 г.), требованиями Всемирного общества защиты животных (WSPA) и Европейской конвенции по защите экспериментальных животных.

Содержание общего холестерина; триглицеридов; холестерина липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) исследовали с помощью стандартного колориметрического метода с использованием реагентов: «Ольвекс диагностикум» (Россия). Вычисляли коэффициент атерогенности (КА): общий холестерин - ЛПВП/ЛПВП. Определение цитокинов IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , IL-10 в сыворотке крови производили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов: Rat «R&D Diagnostics Inc.», USA. Для математической обработки полученных данных использовали программу StatPlus 2009. Сравнение средних значений в выборках осуществляли с помощью непараметрического U-критерия Вилкоксона — Манна — Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При экспериментальной ГЛ и АГ выявлено увеличение общего холестерина, ЛПВП, ЛПНП и КА. Отмечена хорошая переносимость препарата Галавит у крыс II группы. Применение иммуномодулятора способствовало достоверному снижению уровней общего холестерина, ЛПВП, ЛПНП и КА (табл. 1).

Выявлено увеличение уровня провоспалительных цитокинов: IL-1 β , IFN- γ и противовоспалительного цитокина — IL-10 в сыворотке крови крыс с гиперлипидемией и артериальной гипертензией. Данными литературы подтверждено проатерогенное действие IL-1 β и IFN- γ (табл. 2). Эти цитокины индуцируют активацию макрофагов, способствуют формированию дефектов функции рецепторов к ЛПНП и стимулируют прогрессирование атеросклероза [10, 11]. Известно, также, что при добавлении к нагруженным холестерином (ХС) макрофагам IFN- γ способен существенно влиять на соотношение ХС и эфиров холестерина, в сторону накопления последних, тормозить захват и удаление ХС из клеток с помощью ЛПВП, что приводит к трансформации макрофагов в пенистые клетки [13]. Увеличение значений IL-10 в опытной группе крыс, вероятно, объясняет компенсаторное противовоспалительное действие цитокина в условиях повышенной жировой нагрузки и циркуляторной гипоксии при артериальной гипертензии. Было выявлено, что IL-10 вызывает, по принципу отрицательной обратной связи, вызывает замедление продукции провоспалительных цитокинов, регулирует экспрессию ICAM-1 и VCAM-1 в IL-1 — активированных эндотелиальных клетках, снижает

Таблица 1

Состояние липидного спектра крыс

Группы крыс	Опытная группа I	Опытная группа II (Галавит)	Группа III (Здоровые крысы)
Холестерин, ммоль/л	6,1 (5,5–7,2) $p_{1-p_3} < 0,05$	1,8 (1,7– 2,2) $p_{1-p_2} < 0,05$	2,2 (1,9– 3,1)
Триглицериды, ммоль/л	0,7 (0,5–0,85)	0,65 (0,6–0,8)	0,46 (0,4–0,7)
ЛПВП, ммоль/л	1,5 (1,42–1,9)	1,0 (0,9–1,1) $p_{1-p_2} < 0,05$	1,1 (1,0 –1,5)
ЛПНП, ммоль/л	4,2 (3,8–5,4) $p_{1-p_3} < 0,05$	0,5 (0,5– 0,8) $p_{1-p_2} < 0,05$	0,9 (0,7– 1,4)
КА	3,1 (2,7– 4,4) $p_{1-p_3} < 0,05$	1,1 (0,9–1,8) $p_{1-p_2} < 0,05$	1,0 (0,9–1,2)

Примечание: данные представленные в виде Median (LQ–UQ). p_{1-p_2} – достоверность различий между I и II опытными группами, p_{1-p_3} – достоверность различий между группой I и III, p_{2-p_3} – достоверность различий между группой II и III.

Таблица 2

Уровень цитокинов в сыворотке крови крыс

Цитокины (пг/мл)	Опытная группа I	Опытная группа II (Галавит)	Группа III (Здоровые крысы)
IL-1 β	4,1 (4,1–4,02) $p_{1-p_3} < 0,05$	0,01 (0,01–1,83)	0,01 (0,01–0,01)
IFN- γ	16,3 (13,91–23,88) $p_{1-p_3} < 0,05$	4,41 (3,17–5,62) $p_{1-p_2} < 0,05$	1,93 (1,87–3,30)
TNF- α	0,30 (0,01–0,29)	0,29 (0,28–0,30)	0,27 (0,01–0,27)
IL-10	8,68 (2,37–26,42) $p_{1-p_3} < 0,05$	5,62 (5,62–21,61) $p_{2-p_3} < 0,05$	2,14 (2,01–2,16)

Примечание: данные представленные в виде Median (LQ–UQ). p_{1-p_2} – достоверность различий между I и II опытными группами, p_{1-p_3} – достоверность различий между группой I и III, p_{2-p_3} – достоверность различий между группой II и III.

выработку IL-8 и IL-6, ингибирует TNF – индуцированную или индуцированную фактором 2 роста фибробластов, пролиферацию гладкомышечных клеток аорты человека [13]. Доказано, что IL-10 приводит к значительному уменьшению активации NF-kB в эндотелии и экспрессии ICAM-1 и VCAM-1 после 10 дней богатой холестерином диеты [13]. Другие источники подтверждают, что IL-10 подавляет активность макрофагов, стимуляцию эндотелия модифицированными липопротеинами и высвобождение металлопротеиназ из макрофагов (ответственных за нестабильность бляшки). Он также стимулирует синтез тканевого ингибитора металлопротеиназы-1 моноцитами [6]. Зафиксировано снижение уровней IL-1 β и IFN- γ при применении галавита, что подтверждает данные литературы (табл. 2) [1, 12]. При воспалительных заболеваниях Галавит обратимо, на 6 – 8 ч, ингибирует избыточный синтез фактора некроза опухолей, ИЛ-1 и других провоспалительных цитокинов, активных форм кислорода гиперактивированными макрофагами. Нормализация функционального состояния макрофагов приводит к восстановлению их антиген-представляющей и регулирующей функции, снижению уровня аутоагрессии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования показали, что Галавит снижает степень выраженности воспалительного процесса при экспериментальном атеросклерозе и обладает способностью нормализовать показатели липидного обмена. Установленные противовоспалительные свойства Галавита вероятно обусловле-

ны ослаблением транскрипционной активности генов c-Fos или c-Jun3, что способствует ослаблению выработки макрофагами противовоспалительных цитокинов. Гиполипидемические свойства препарата могут быть обусловлены блокированием сквенджер-рецепторов, уменьшением экспрессии генов PPAR γ , а также генов белка FP-2-ацетилКоА-карбоксилазы, индуцированием экспрессии липопротеинлипазы, что стимулирует связывание жирных кислот, подавление дифференцировки адипоцитов и уменьшение накопления эндогенного жира [7]. Сочетание противовоспалительных и гиполипидемических свойств Галавита делают его включение в комплексную терапию атеросклероза патогенетически обоснованным. Необходимы дальнейшие исследования по изучению патогенетических свойств Галавита, разработке адекватных схем и режима его назначения для коррекции иммунных механизмов воспалительного процесса при атеросклерозе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Архипова С.Н., Литвицкий П.Ф., Стрижова Н.В., Ананченко В.Г. Влияние препарата с иммуномодулирующим действием «Галавит» на содержание в крови субпопуляций Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и естественных киллеров у пациентов с эссенциальной артериальной гипертензией // Человек и его здоровье. – 2010. – № 4. – С. 26 – 30.
2. Баранов А., Обухов А, Шаркова Н., Бузин А. Аторвастатин в лечении облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей // Врач. – 2007. – № 9. – С. 66 – 69.

3. Буркова Н.В., Эйнсмонт Ю.А., Нохрин С.П., Яковлев С.В. и др. Реакция цитокиновой сети больных с критической ишемией нижних конечностей на некоторые виды лечебного воздействия // Мед. иммунология. — 2006. — Т. 8, № 2–3. — С. 394–395.

4. Кропотов А.В. Влияние цимифуги даурской и калужницы лесной на некоторые показатели обмена липидов и половую систему (экспериментальное исследование); автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Владивосток, 1975. — 19 с.

5. Куликов В.А., Чиркин А.А. Особенности метаболизма липопротеинов у крыс // Патол. физиология и эксперимент. терапия. — 2004. — № 1. — С. 26–27.

6. Лутай М.И., Голикова И.П., Деяк С.И., Слободской В.А. Системное воспаление у пациентов с ишемической болезнью сердца: взаимосвязь с клиническим течением и наличием факторов риска // Украин. мед. журн. — 2006. — Т. 2. — С. 80–83.

7. Майстровский К.В., Запорожец Т.С., Раповка В.Г., Звягинцева Т.Н. и др. Коррекция липидного обмена у пациентов с облитерирующим атеросклерозом сосудов нижних конечностей сульфатированным полисахаридом из бурой водоросли *Fucus Evanescentis* // Тихоокеан. мед. журн. — 2010. — № 4. — С. 47–50.

8. Перегуд Д.И., Онуфриев М.В., Егорова Л.К., Жилон В.Х. и др. Иммуномодулятор галавит ослабляет проявления синдрома отмены морфина у крыс роль нитрергической системы мозга // Нейрохимия. — 2005. — № 3. — С. 187–194.

9. Рагино Ю.И., Чернявский А.М., Полонская Я.В., Цымбал С.Ю. и др. // Бюл. эксперимент. биологии и медицины. — 2010. — Т. 149, № 5. — С. 520–523.

10. Санникова А.А., Чучкова Н.Н., Гайсина Э.Ш. Иммуномодулирующее действие глюкозаминилдипептида при измененном липидном обмене и атеросклерозе // Вестн. уральской мед. акад. науки. — 2008. — № 1. — С. 64–66.

11. Шаврин А.П., Ховаева Я.Б., Черешнев В.А., Головской Б.В. Маркеры воспаления в процессе развития атеросклероза // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. — 2009. — Т. 8, № 3. — С. 13–15.

12. Ястребова С.А. Влияние иммуностимулятора галавит на морфо-функциональные структуры тимуса и селезенки // Физиология и здоровье человека: науч. тр. 1 съезда физиологов СНГ. — 2005. — Т. 2. — С. 112.

13. Allison B. Reiss, Amy D. Glass Atherosclerosis: immune and inflammatory aspects // Journal of investigative medicine. — 2006. — Vol. 54. N 3. — P. 123–131.

14. Helle F., Vagnes O.B., Iversen B.M. Angiotensin II-induced calcium signaling in the afferent arteriole from rats with two-kidney, one clip hypertension // Am. J. Physiol. Renal Physiol. — 2006. — Vol. 291. — P. 140–147.

15. Oyedemi S.O., Yakubu M.T. Afolayan A.J. Effect of aqueous extract of *Leonotis leonurus* (L.) R. Br. leaves in male Wistar rats // Human and Experimental Toxicology. — 2010. — N 29. — P. 377–384.

Сведения об авторах

Турмова Екатерина Павловна – доцент кафедры патологической физиологии ГБОУ ВПО Владивостокского государственного медицинского университета, кандидат медицинских наук (тел.: +7(4232) 45-07-00; e-mail: eturmova@mail.ru; e-mail: patphis-vl@mail.ru)

Григорюк Александр Анатольевич – доцент курса оперативной хирургии и топографической анатомии кафедры анатомии ГБОУ ВПО ВГМУ, кандидат медицинских наук (тел. моб.: +79024801713)

Бычков Евгений Александрович – аспирант кафедры патологической физиологии ВГМУ, врач сосудистый хирург ГКБ № 2 г. Владивостока (тел.: +7(4232) 45-07-00)

Маркелова Елена Владимировна – заведующая кафедрой патологической физиологии ГБОУ ВПО Владивостокского государственного медицинского университета, доктор медицинских наук, профессор (тел.: +7(4232) 45-07-00; e-mail: eturmova@mail.ru; e-mail: patphis-vl@mail.ru)

Чикаловец Ирина Владимировна – старший научный сотрудник лаборатории химии неинфекционного иммунитета ТИБОХ ДВО РАН, кандидат химических наук, доцент, (Тихоокеанский институт биоорганической химии) Дальневосточное отделение РАН (e-mail: science@pibc.dvo.ru)