

УДК 577.115:616.018.74-008.6-085-092.9

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ УРОВНЯ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ

© Маль Г.С.¹, Артюшкова Е.Б.², Григорьева Т.М.³, Каплина К.Р.²,
Каплин А.Н.⁴, Гладченко М.П.², Заугольникова Н.С.⁵

¹Кафедра фармакологии, ²научно-исследовательский институт экологической медицины, ³кафедра общей и биоорганической химии, ⁴кафедра патологической анатомии, ⁵кафедра патофизиологии Курского государственного медицинского университета, Курск

E-mail: drkaplin@rambler.ru

В настоящее время коррекция эндотелиальной дисфункции является важнейшим компонентом терапевтического лечения сердечно-сосудистых заболеваний. Применяемые препараты, используемые для патогенетического лечения, обладают широким спектром протективных эффектов, которые могут быть усилены комбинацией с ранее известным лекарственным средством магния оротат. В эксперименте на крысах ($n = 60$) нами была проведена оценка влияния препаратов розувастатин (Розарт) в дозировках 0,33 мг/кг/сут и 0,66 мг/кг/сут, магния оротат 100 мг/кг/сут и их комбинаций на уровень перекисных радикалов в сыворотке крови крыс при моделировании эндотелиальной дисфункции. В проведенном исследовании было отмечено снижение интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) до значений интактной группы животных при комбинированной терапии данными препаратами с меньшей дозой розувастатина.

Ключевые слова: сердечно-сосудистые заболевания, эндотелиальная дисфункция, перекисные радикалы, розувастатин, магния оротат.

PHARMACOLOGICAL CORRECTION OF LIPID PEROXIDATION LEVEL IN EXPERIMENTAL ENDOTHELIAL DYSFUNCTION

Mal G.S.¹, Artyushkova E.B.², Grigoreva T.M.³, Kaplina K.R.², Kaplin A.N.⁴, Gladchenko M.P.², Zaugolnikova N.S.⁵

¹Department of Pharmacology, ²Research Institute of Environmental Medicine, ³Department of General and Bioorganic Chemistry, ⁴Department of Pathological Anatomy, ⁵Department of Pathophysiology of Kursk State Medical University, Kursk

The correction of endothelial dysfunction is currently the most important component of cardiovascular therapy. The drugs used for pathogenetic treatment have a wide range of protective effects that can be enhanced by combining with the well-known drug Magnesium Orotate. We assessed the impact of 0.33 mg/kg/day and 0.66 mg/kg/day Rosuvastatin (Rozart) and 100 mg/kg/day Magnesium Orotate and their combined administration on lipid peroxidation level in rats' serum in experimental endothelial dysfunction. The study revealed that the combined use of low-dose Rosuvastatin and Magnesium Orotate can decrease lipid peroxidation level in rats' serum.

Keywords: endothelial dysfunction, cardiovascular disease, Rosuvastatin, Magnesium Orotate.

По данным Росстата в 2013 году смертность от сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) в Российской Федерации составила 55% от общего числа летальных исходов (525431 человек) среди трудоспособного населения [14].

В патогенезе и клинике артериальной гипертензии, атеросклероза и многих других патологий одним из важных аспектов считается нарушение структуры и функции эндотелия [2, 3]. При этих заболеваниях он предстает в роли первоочередного органа-мишени, поскольку эндотелиальная выстилка сосудов участвует в регуляции сосудистого тонуса, гемостаза, иммунного ответа, миграции клеток крови в сосудистую стенку, синтезе факторов воспаления и их ингибиторов, осуществляет барьерные функции. С современных позиций ключевым звеном в патогенезе ССЗ считается эндотелиальная дисфункция с дисбалансом между основными функциями эндотелия: вазодилата-

цией и вазоконстрикцией, ингибированием и содействием пролиферации, антитромботической и протромботической, антиокислительной и проокислительной активностью [4, 5, 9, 16].

Эндотелий вовлекается в патологический процесс на наиболее ранних стадиях. При этом интенсивная продукция перекисных радикалов нарушает баланс между защитными и повреждающими воздействиями на стенку сосуда. Свободные радикалы являются своеобразной ловушкой для молекул оксида азота (NO), блокируя его физиологическое воздействие на сосуды [7, 8].

Оксид азота – сигнальная молекула, которая осуществляет межклеточные взаимодействия и регулирует перекисное окисление липидов. В физиологических условиях оксид азота выступает в роли антиоксиданта, тормозит радикальные окислительные реакции, связываясь со свободными ионами двухвалентного железа, входящими в со-

став гема. При гиперпродукции активных форм кислорода происходит окисление липопротеидов, что способствует повышению синтеза кавеолина-1 и приводит к снижению образования оксида азота эндотелием [4, 7].

При активации свободнорадикальной активности происходит реакция супероксид-аниона с оксидом азота и образуется пероксинитрит, который служит пусковым фактором в развитии воспаления и повреждения тканей, по токсичности значительно превосходит оксид азота и лишает его биологического действия как антиоксиданта. Свое действие пероксинитрит реализует за счет инициации перекисного окисления липидов в мембранах и липопротеинах [6, 9, 15].

Распространенность основных факторов риска развития сердечно-сосудистых патологий и высокая степень смертности или инвалидизации при представленных нозологических единицах требуют активного изучения способов профилактики и лечения.

Современные методы лечения, основанные на применении статинов и цитопротекторов, получили большое распространение, но они не лишены недостатков в виде непереносимости больших доз препаратов [1, 11, 12]. В настоящее время является перспективным использование статинов в комбинации с макро- и микроэлементами, которые участвуют в метаболических реакциях [10]. Одним из таких макроэлементов является магний. Магний функционирует в организме как кофактор в более чем 300 известных ферментативных реакциях. Он обеспечивает гидролиз АТФ, регулирует гликолиз, уменьшая накопление лактата, участвует в окислении жирных кислот и активации аминокислот [10, 17, 18, 19].

Целью данного исследования является изучение влияния применения препарата Магнерот® (магния оротат) в дозе 100 мг/кг/сут при монотерапии и комбинированном применении с препаратом Розарт® (3-гидрокси-3-метилглутарил коэнзимА-редуктазы) в дозах 0,33 мг/кг/сут и 0,66 мг/кг/сут внутрижелудочно на интенсивность перекисного окисления липидов сыворотки крови крыс при экспериментальной эндотелиальной дисфункции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на 120 белых крысах-самцах линии Wistar массой 350-450 г, которые были разделены на 12 групп по 10 крыс в каждой группе:

группа № 1 – интактные животные;

группа № 2 – контрольные животные с моделированной эндотелиальной дисфункцией;

группа № 3 – контрольные + Розувастатин 0,33 мг/кг в течение 7 суток;

группа № 4 – контрольные + Розувастатин 0,33 мг/кг – 42 суток;

группа № 5 – контрольные + Розувастатин 0,66 мг/кг – 7 суток;

группа № 6 – контрольные + Розувастатин 0,66 мг/кг – 42 суток;

группа № 7 – контрольные + Магнерот 100 мг/кг – 7 суток;

группа № 8 – контрольные + Магнерот 100 мг/кг – 42 суток;

группа № 9 – контрольные + Магнерот 100 мг/кг + Розувастатин 0,33 мг/кг – 7 суток;

группа № 10 – контрольные + Магнерот 100 мг/кг + Розувастатин 0,33 мг/кг – 42 суток;

группа № 11 – контрольные + Магнерот 100 мг/кг + Розувастатин 0,66 мг/кг – 7 суток;

группа № 12 – контрольные + Магнерот 100 мг/кг + Розувастатин 0,66 мг/кг – 42 суток.

В экспериментальные группы были включены животные, прошедшие карантинный режим вивария Курского государственного медицинского университета, содержащиеся при световом режиме: 12 ч/12 ч светлый и темный цикл. Для получения статистически достоверных результатов экспериментальные группы животных были сформированы путем рандомизации со стратификацией по массе и проводимым манипуляциям. Все исследования проводились с соблюдением принципов, изложенных в «Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей» (Страсбург, 1986), и согласно правилам лабораторной практики РФ (приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г.).

Операции и все манипуляции с крысами проводились в условиях общего обезболивания путем внутрибрюшинного введения хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг животного.

Контрольной группе животных моделировали гиперлипидемию на фоне развития экспериментальной эндотелиальной дисфункции. С целью моделирования эндотелиальной дисфункции вводился внутрибрюшинно в дозе 25 мг/кг/сут в течение 7 дней N-нитро-L-аргинин метиловый эфир (L-NAME – неселективный блокатор NO-синтазы) [13].

Моделирование гиперлипидемии проводилось в соответствии с рекомендациями по изучению специфической активности новых веществ гиполлипидемического действия и/или антиатеросклеротического действия путем однократного внутрибрюшинного введения поверхностно-активного вещества Твин-80 в дозе 200 мг/100 г веса за 24 часа до выведения животных из эксперимента [6].

С целью предупреждения развития экспериментальной эндотелиальной дисфункции и ги-

перлипидемии экспериментальные животные получали статин 4-го поколения Розарт® (3-гидрокси-3-метилглутарил коэнзимА-редуктазы) производства «Актавис Лтд» Мальта, при монотерапии и комбинированном применении с препаратом Магнерот® в дозе 0,33 мг/кг/сут и в дозе 0,66 мг/кг/сут внутрижелудочно в течение 10 суток перед моделированием гиперлипидемии.

Препарат магния Магнерот® (магния оротат) производства «Вервагфарма» Германия вводили при монотерапии и комбинированном применении с препаратом Розарт® в дозе 100 мг/кг/сут внутрижелудочно в течение 10 суток предварительно введению Твин-80.

Интактной группе (I группа) внутрижелудочно вводили очищенную воду для инъекций из расчета 200 мг/кг/сут.

Расчет доз производили, используя коэффициент пересчета доз с взрослого человека на крыс массой 350-450 г согласно методическим указаниям, содержащимся в «Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ», под общей редакцией чл.-корр. РАМН, проф. Р.У. Хабриева (2005). Выбор и расчет доз для исследования гипоплипидемической активности производился методом эквивалентного межвидового переноса доз по площади тела с использованием коэффициента пересчета по Freireichetal., 1966.

Исследованные препараты вводились внутрижелудочно при помощи металлического атравматического зонда ежедневно в утренние часы один раз в сутки в объеме, рассчитанном исходя из массы тела крысы.

Объектом исследования служила сыворотка крови. Взятие крови проводили в количестве 5 мл. После свертывания кровь центрифугировали 10 мин при 1000 об/мин для уплотнения сгустка. Полученную сыворотку в количестве 1 мл сливали в чистую пробирку и смешивали с 0,9% раствором хлорида натрия в соотношении 1:9. Второе центрифугирование проводили в течение 20 мин при 5000 об/мин для окончательного осветления пробы. Для исследования отбирали верхний слой сыворотки.

Анализ проводили на приборе биохимиллюминетр БХЛ-06. Использовалась инструментальная методика: «Определение перекисного окисления липидов в биологических субстратах», 1991 г., разработанная НИЦ «Биоавтоматика» г. Нижний Новгород.

Исследовали индуцированную Fe^{2+} хемиллюминесценцию сыворотки крови. Метод индуцирования хемиллюминесценции перекисью водорода с сульфатом железа основан на каталитическом разложении перекиси ионами металлов с пере-

менной валентностью. В эксперименте определяли светосумму за 60 сек (S), величина которой коррелирует с интенсивностью свободнорадикальных процессов, и максимум быстрой вспышки (I_{max}), свидетельствующий о содержании гидроперекисей липидов.

Уровень ПОЛ оценивался по изменению в крови лабораторных животных значений максимальной интенсивности хемиллюминесценции и значения светосуммы.

При статистической обработке данных в программе Microsoft Excel 2010 рассчитывали среднее значение, величину стандартного отклонения. Статистические различия между экспериментальными группами оценивали при помощи t-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

Оценку влияния применения розувастатина, магния оротата и их комбинации осуществляли путем сравнения интенсивности хемиллюминесценции сыворотки крови. При моделировании гипертензии существенно повышались показатели максимальной интенсивности хемиллюминесценции проб и светосуммы по сравнению с результатами интактной группы животных на 17,29% и 19,95% соответственно (табл. 1).

Введение розувастатина в дозе 0,33 мг/кг в течение 7 и 42 суток не привело к достоверному снижению исследуемых показателей, лишь при использовании статина в дозе 0,66 мг/кг значения максимальной интенсивности и светосуммы хемиллюминесценции были сопоставимы со значениями интактной группы лабораторных животных. При проведении терапии препаратом Магнерот значения исследуемых показателей, сравнимые с интактной группой, были получены только при длительном применении (в течение 42 суток). Необходимо отметить, что комбинированное применение розувастатина в дозе 0,33 мг/кг и магния оротата в течение 42 суток также привело к достоверному снижению уровней прооксидантов сыворотки крови крыс до значений интактной группы.

Результаты, представленные в таблице 1, показывают, что при применении розувастатина в дозе 10 мг, значения максимальной интенсивности хемиллюминесценции сыворотки крови сопоставимы со значениями в группе интактных животных. При использовании магния оротата уровень максимальной интенсивности хемиллюминесценции достигает значений интактной группы только при длительном приеме в течение 42 суток. При изучении действия комбинации препаратов розувастатин и магнерот можно отметить,

Максимальная интенсивность хемилюминесценции (I_{\max}) и значение светосуммы (S) сыворотки крови экспериментальных животных на фоне моделирования эндотелиальной дисфункции и при фармакологической коррекции статинами, магния оротатом и их комбинацией

№ группы	Эксперимент	I_{\max} ($M \pm m$) мВ	S ($M \pm m$) мВ
1	интактные животные	556,2±8,5	9427±128
2	контрольные животные с моделированной эндотелиальной дисфункцией	652,4±6,2#	11307±49#
3	контрольные + Розувастатин 0,33 мг/кг – 7 суток	662,3±9,8#	11295±232#
4	контрольные + Розувастатин 0,33 мг/кг – 42 суток	659,8±9,7#	11359±241#
5	контрольные + Розувастатин 0,66 мг/кг – 7 суток	541,3±9,6*	9186±95*
6	контрольные + Розувастатин 0,66 мг/кг – 42 суток	551,9±11,5*	9581±108*
7	контрольные + Магнерот 100 мг/кг – 7 суток	656,2±8,9#	11535±126#
8	контрольные + Магнерот 100 мг/кг – 42 суток	562,5±9,6*	9157±133*
9	контрольные + Магнерот 100 мг/кг + Розувастатин 0,33 мг/кг – 7 суток	650,0±6,3#	10943±179#
10	контрольные + Магнерот 100 мг/кг + Розувастатин 0,33 мг/кг – 42 суток	542,8±13,9*	9447±172*
11	контрольные + Магнерот 100 мг/кг + Розувастатин 0,66 мг/кг – 7 суток	557,2±4,4*	10105±224*
12	контрольные + Магнерот 100 мг/кг + Розувастатин 0,66 мг/кг – 42 суток.	565,6±6,4*	9626±77*

Примечание: M – среднее значение, $\pm m$ – ошибка среднего, * – при $p < 0,05$ по сравнению с контролем, # – при $p < 0,05$ по сравнению с интактными животными.

что положительный эффект наблюдается уже при использовании статина в дозе 5 мг в течение 42 суток.

Данные эксперимента при определении светосуммы хемилюминесценции коррелируют со значениями максимальной интенсивности для соответствующих групп животных.

На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. Моделирование эндотелиальной дисфункции достоверно повышает интенсивность хемилюминесценции сыворотки крови крыс по сравнению с группой интактных животных.

2. При монотерапии препаратом Розарт в дозе 0,66 мг/кг наблюдается статистически достоверное снижение интенсивности хемилюминесценции до уровня интактной группы животных.

3. При комбинированном применении препаратов Розарт и Магнерот® достоверное снижение интенсивности хемилюминесценции до уровня интактной группы животных проявляется уже при дозе розувастатина 0,33 мг/кг при длительном применении (42 суток).

ЛИТЕРАТУРА

1. Артюшкова Е.Б., Маль Г.С., Хорунжая О.А., Крюков А.А., Гладченко М.П., Артюшкова Е.В., Татаринова И.А., Заугольникова Н.С. Фармакологическая коррекция экспериментальной гиперлипиде-

мии комбинированным применением препаратов магния оротата и розувастатина // Курский науч.-практ. вестн. «Человек и его здоровье». – 2015. – № 1 – С. 72-77.

2. Бувальцев В.И. Дисфункция эндотелия как новая концепция профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний // Международный медицинский журнал – 2001. – № 3 – С. 9-14.
3. Визир В.А., Березин А.Е. Роль эндотелиальной дисфункции в формировании и прогрессировании артериальной гипертензии. Прогностическое значение и перспективы лечения // Укр. мед. часопис. – 2000. – № 4. – С. 23-33.
4. Воробьева Е.Н., Шумахер Г.И., Осипова И.В. Роль дисфункции эндотелия в патогенезе атеросклероза // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2006. – № 5(6). – С. 129-136.
5. Долженкова Т.В., Якушев В.И., Покровский М.В., Покровская Т.Г., Бесхмельницкая Е.А., Гудырев О.С., Корокин М.В., Белоус А.С. Дозозависимые противовоспалительные, эндотелиопротективные, кардиопротективные эффекты аторвастатина // Курск. науч.-практ. вестн. «Человек и его здоровье». – 2010. – № 3. – С. 26-31.
6. Зотова И.В., Затеищikov Д.А., Сидоренко Б.А. Синтез оксида азота и развитие атеросклероза // Кардиология. 2002. – № 4. – С. 57-67.
7. Коркушко О.В., Лишневская В.Ю. Эндотелиальная дисфункция // Кровообіг та гемостаз. – 2003. – № 2. – С. 4-15.

8. *Кремец К.Г.* Эндотелиальная дисфункция и ее роль в патогенезе атеросклероза // Практическая ангиология. – 2009. – № 7(26). – С. 35-36.
9. *Лунач Н.М., Хлудеева Е.А., Лукьянов П.А.* Матриксные металлопротеиназы, оксидантный статус и дисфункция эндотелия с гиперхолестеринемией у пациентов с различными формами ишемической болезни сердца // Российский медицинский журнал. – 2010. – № 4. – С. 71-74.
10. *Морозова Т.Е., Дурнецова О.С.* Препараты магния в кардиологической практике // Мед. науч.-практ. журн. «Лечащий врач». – 2014. – № 4. – С. 98-101.
11. *Омельяненко М.Г., Суховой Н.А., Назаров С.Б., Плеханов В.Г.* Клиническое значение эндотелиальной дисфункции при остром коронарном синдроме без подъема сегмента ST у лиц в возрасте до 55 лет // Рос. кардиол. журн. – 2003. – № 4(42). – С. 36-40.
12. *Пименов Л.Т., Штицин А.Н.* Клинические и метаболические аспекты обмена магния у больных ишемической болезнью сердца // Курск. науч.-практ. вестн. «Человек и его здоровье». – 2010. – № 1. – С. 71-75.
13. *Покровский М.В., Кочкаров В.И., Покровская Т.Г.* Методические подходы для количественной оценки развития эндотелиальной дисфункции при L-NAME-индуцированной модели дефицита оксида азота в эксперименте // Российский журнал иммунологии. – 2006. – Т. 96. – С. 60-61.
14. Российский статистический ежегодник, 2014: стат. сб. / Федер. служба гос. статистики (Росстат); [редкол. Э.Ф. Баранов и др.]. – Офиц. изд. – М., 2014. – 89 с.
15. *Тумов В.Н.* Общность атеросклероза и воспаления: специфичность атеросклероза как воспалительного процесса (гипотеза) // Клиническая лабораторная диагностика. – 2006. – № 4. – С. 310.
16. *Allison B.R., Amy D.G.* Atherosclerosis: immune and inflammatory aspects // Journal of investigative medicine. – 2006. – Vol. 54, N 3. – P. 123-131.
17. *Jellinek H., Takacs E.* Course of the progression of experimentally induced arteriosclerotic vessel wall changes after treatment with magnesium orotate [in German] // Arzneimittelforschung. – 2000. – Vol. 50, N 12. – P. 1071-1077.
18. *Liao F., Folsom A., Brancati F.* Is low magnesium concentration a risk factor for coronary heart disease? The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study // Am Heart J. – 1998. – Vol. 136, N 3. – P. 480-490.
19. *Maier J.A.* Low magnesium and atherosclerosis: an evidence-based // Molecular Aspects of Medicine. – 2003. – Vol. 24, N 1-3. – P. 3-9.