



УДК 616.018.74-008.6-085.33

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ КАРДИО- И ЭНДОТЕЛИОПРОТЕКТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ МАКРОЛИДОВ

Е.С. ЧЕРНОМОРЦЕВА¹**М.В. ПОКРОВСКИЙ²****Т.Г. ПОКРОВСКАЯ²****Э.Н. ДУДИНА¹****Е.А. КОНОВАЛОВА¹****В.В. ГУРЕЕВ¹****Е.А. ШМЫКОВА²****Н.Н. ИСАЙЧЕНКО²****Т.А. ХАДИЕВА²**

На лабораторных животных проведено исследование кардиопротективных и эндотелиопротективных эффектов рокситромицина, азитромицина и мидекамицина при моделировании коронароокклюзионного инфаркта миокарда и эндотелиальной дисфункции. Исследуемые препараты эффективно дозозависимо снижают летальность и уменьшают зону некроза левого желудочка после коронароокклюзии, а также оказывают позитивный эффект на функционирование эндотелия.

Ключевые слова: рокситромицин, азитромицин, мидекамицин, инфаркт миокарда, L-NAME, коэффициент эндотелиальной дисфункции, эндотелиальная дисфункция.

¹⁾ Курский государственный
медицинский университет

²⁾ Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет

e-mail: cheses11@rambler.ru

В течение последнего десятилетия был достигнут существенный прогресс в лечении атеросклероза и его осложнений. Хотя этиология атеросклероза является поливалентной, многие важнейшие патофизиологические механизмы его развития известны, а другие интенсивно изучаются. Однако, несмотря на многочисленные работы, данная патология остается ведущей причиной инвалидизации и смертности населения. Дисфункция эндотелия в настоящее время рассматривается в качестве иницирующего фактора и ранней фазы развития атеротромбоза, а биохимические изменения (избыток свободных радикалов, сниженная активность NO-синтазы), лежащие в основе этого, относят к метаболическим нарушениям [11].

Таким образом, углубленное исследование фармакологических способов коррекции дисфункции эндотелия является крупной научной проблемой.

Оксид азота, как мощный эндогенный вазодилататор, принимает участие в регуляции системного и легочного сосудистого сопротивления и процессах коагуляции крови. Кроме того, он подавляет пролиферацию гладкомышечных клеток сосудов. В этой связи закономерным является тот факт, что при снижении выработки оксида азота активируются и перемещаются в ядро факторы транскрипции, неактивные в нормальной эндотелиальной клетке, что приводит к транскрипции генов, запускающих каскад реакций, ведущих к активации цитокинов (интерлейкина I и фактора некроза опухоли α) и экспрессии молекул адгезии (E-селектин, VCAM-1, ICAM-1) на поверхности эндотелиоцитов. Данные процессы стимулируют воспалительную реакцию в сосудистой стенке за счет увеличения связывания и трансэндотелиальной миграции лейкоцитов, таким образом, запуская атерогенез [6].

В этой связи, несомненно, актуальными являются фармакологические исследования, посвященные поиску эффективных лекарственных средств, обладающих эндотелиопротективной активностью.

Несмотря на очевидное значение воспалительной реакции при атеросклерозе, пусковой механизм ее не известен. В настоящее время внимание сосредоточено на инфекционных источниках как потенциальных инициаторах атеросклеротического поражения сосудов. Наряду с традиционными подходами к разработке средств профилактики и лечения эндотелиальной дисфункции как предшественника атеросклероза, разрабатываются и новые направления. Работами последних лет показана

роль инфекционного (цитомегаловирусы, Ch.Pneumoniae, H.Pylori) и воспалительного факторов в развитии и волнообразном течении атеросклероза [7]. Также выявлена эффективность макролидов в отношении снижения риска сердечно-сосудистой патологии. Высказывается предположение о первичности антибактериального компонента в реализации кардиопротективных эффектов макролидов [9].

Однако известные неантибиотические противовоспалительные, антиоксидантные и антикоагулянтные свойства этих антибиотиков позволяют предположить и альтернативную точку зрения на механизм защитного действия макролидов при ишемическом повреждении миокарда и эндотелиальной дисфункции [4, 15].

Исходя из вышеизложенного, существует необходимость исследования потенциальной роли и перспективности терапии макролидными препаратами с плейотропными эндотелиопротективными свойствами, как дополнения к существующим парадигмам коррекции дефицита оксида азота при сердечно-сосудистых заболеваниях. Последние сведения о неантибактериальных свойствах макролидов позволяют предпринять попытку медикаментозно оптимизировать экспериментальный инфаркт миокарда и эндотелиальную дисфункцию с помощью следующих препаратов: 14- членного макролида рокситромицина, 15- членного азалида азитромицина и 16- членного макролида мидекамицина.

Цель работы: изучение кардио- и эндотелиопротективных эффектов азитромицина, мидекамицина и рокситромицина при моделировании экспериментального дефицита оксида азота и коронароокклюзионного инфаркта миокарда у крыс.

Материалы и методы. Экспериментальное исследование проводилось на белых крысах – самцах линии «Wistar». У наркотизированных животных (хлоралгидрат 300 мг/кг), находящихся на искусственной вентиляции легких, вскрывали грудную клетку и лигировали переднюю нисходящую ветвь левой коронарной артерии на 1,0 – 1,5 мм ниже ушка предсердия. После перевязки проводили послойное ушивание раны. На 2-е сутки определяли массу некротизированной ткани в процентах от массы левого желудочка, путем взвешивания желудочка и некротизированной ткани. В качестве критериев оценки кардиопротективного действия препаратов служили: летальность животных и величина зоны некроза миокарда при его гравиметрическом определении через 24 часа после окклюзии.

Исследуемые препараты азитромицин (субстанция азитромицина моногидрата, серия 0001/2 (Chem-East LTD)), рокситромицин (Рулид® таб. 150 мг, Aventis/«HoechstMarionRoussel», Индия); мидекамицин (Макропен® таб. 400мг («KRKA», Словения)) вводились внутривенно однократно через зонд за 15 минут до коронароокклюзии в дозах 10 и 30 мг/кг. В опыт не брались животные, погибшие в первые 15 минут после коронароокклюзии.

Моделирование экспериментального дефицита азота проводили на животных второй серии. Блокатор эндотелиальной NO-синтазы N-нитро-L-аргинин метиловый эфир (L-NAME) вводился ежедневно один раз в сутки, внутривенно, в дозе 25 мг/кг.

На этом фоне животным каждой группе внутривенно вводили в малой дозе – 10 мг/кг и большей дозе – 30 мг/кг в течение недели азитромицин, мидекамицин и рокситромицин.

На 8-й день от начала эксперимента под наркозом вводили катетер в левую сонную артерию для регистрации показателей, болюсное введение фармакологических агентов осуществляли в правую бедренную вену. Показатели гемодинамики: систолическое артериальное давление (САД), диастолическое артериальное давление (ДАД) и частоту сердечных сокращений (ЧСС) измеряли непрерывно посредством датчика P23ID «Gould» США, аналогово-цифрового преобразователя (АЦП) ACD-12 и компьютерной программы «Віорас».

Для оценки реактивности сосудистого русла у животных проводили следующие пробы: эндотелийзависимую вазодилатацию (ЭЗВД) с внутривенным введением раствора ацетилхолина (АХ) в дозе 40 мкг/кг, эндотелийнезависимую вазодилатацию (ЭНЗВ) осуществляли внутривенным введением раствора нитропруссид натрия (НП) в дозе 30 мкг/кг из расчета 0,1 мл на 100 г. крысы.

При действии исследованных препаратов достоверность наблюдавшихся изменений параметров, как абсолютных, так и в процентах от исходного уровня,



определяли разностным методом вариационной статистики с нахождением средних значений сдвигов (M), средней арифметической (+m) и вероятности возможной ошибки (P) по таблицам Стьюдента. Различия оценивали как достоверные, начиная с $p < 0,05$. Для расчётов использовали программу для статистического анализа Microsoft Excel 7.0.

Результаты. Кардиопротективный эффект изучаемых препаратов оценивался по сравнению величины зоны некроза гравиметрическим методом на вторые сутки коронароокклюзии между экспериментальной группой животных без лечения, а также с лечением исследуемым препаратом в двух дозах. Также оценивалось влияние макролидов на смертность лабораторных животных в первые сутки после операции (табл. 1).

Таблица 1

Значения смертности и % некроза левого желудочка крыс в первые сутки после моделирования коронароокклюзионного инфаркта миокарда (ИМ) на фоне применения макролидных антибиотиков в дозах 10 и 30 мг/кг ($M \pm m$; %, $n=10$)

Серия	% смертности	% зоны некроза левого желудочка
Контроль	33,3±1,2	39,1±1,2
Азитромицин 30 мг/кг	11,1±1,1**	26,04±0,83*
Рокситромицин 30 мг/кг	12,5±1,5**	26,9±1,8**
Мидекамицин 30 мг/кг	22,2±1,1**	37,6±1,5**
Азитромицин 10 мг/кг	23,1±1,7*	28,9±1,2*
Рокситромицин 10 мг/кг	22,2±6,8*	33,1±0,3*
Мидекамицин 10 мг/кг	33,3±1,2	30,4±0,2*

Примечание: * – при $p < 0,05$ в сравнении с ИМ контрольной группой, не получавшей лечения; ** – при $p < 0,05$ в сравнении с соответствующим препаратом в дозе 10 мг/кг.

Исходя из полученных данных, следует, что используемые макролидные антибиотики рокситромицин и азитромицин существенно дозозависимо улучшали выживаемость животных в первые сутки после инфаркта миокарда по сравнению с контрольной группой. Мидекамицин в малой дозе не повлиял на выживаемость животных, значительно снизилась смертность крыс при применении его в большей дозе – 30 мг/кг.

При исследовании влияния препаратов на зону асептического некроза миокарда, нами получены следующие результаты (табл. 1). Объем некротизированного участка миокарда левого желудочка достоверно и дозозависимо уменьшился при приеме 14-членного макролида (рокситромицина) и 15-членного азалида (азитромицина), а 16-членный препарат мидекамицин оказал позитивный эффект в отношении снижения инфарцированной зоны только в малой дозе.

Наиболее эффективный в отношении снижения зоны некротизированного миокарда и улучшения выживаемости животных препарат азитромицин в дозе 30 мг/кг заметно снизил концентрацию ФНО α с $63,0 \pm 2,0$ до $45,3 \pm 1,4$ пг/мл. Таким образом, выявленное нами снижение уровня ФНО α в крови свидетельствует о противовоспалительном действии азитромицина уже к 2-м суткам острого инфаркта миокарда.

Для оценки степени эндотелиальной дисфункции мы рассчитывали «коэффициент эндотелиальной дисфункции (КЭД $^{\text{®}}$)», являющегося отношением площади ЭНВД восстановления АД в ответ на введение НП к площади ЭЗВД восстановления АД в ответ на введение АХ [2].

Рассчитывался КЭД $^{\text{®}}$ у каждого животного интактной группы и крыс после моделирования блокады NO-синтазы, и получили разницу КЭД $^{\text{®}}$ в 5 раз – соответственно $1,1 \pm 0,1$ у интактных и $5,4 \pm 0,6$ у животных, получавших L-NAME (табл. 2).

При применении азитромицина и рокситромицина имело место достоверное снижение КЭД $^{\text{®}}$ в обеих дозах, мидекамицин в данных условиях показал дозозависимый эффект и лучше проявил себя в большей дозе, нежели в меньшей. Полученные результаты свидетельствует о восстановлении баланса эндотелийзависимой и эндотелийнезависимой вазодилатации в условиях снижения активности ферментативного пути образования оксида азота при помощи представителей трех основных групп современных макролидов.

Показатели, отражающие коррекцию эндотелиальной дисфункции при моделировании дефицита оксида азота введением L-нитро-аргинин-метилового эфира (L-NAME) на фоне коррекции макролидными антибиотиками (M±m; n=10)

Группы животных	Коэффициент эндотелиальной дисфункции
Интактные	1,1±0,1
L-NAME (25 мг/кг)	5,4±0,6*
L-NAME (25 мг/кг)+азитромицин (30 мг/кг)	1,2±0,2**
L-NAME (25 мг/кг)+ рокситромицин (30 мг/кг)	1,1±0,1**
L-NAME (25 мг/кг)+ мидекамицин (30 мг/кг)	1,3±0,2**
L-NAME (25 мг/кг)+ азитромицин (10 мг/кг)	1,0±0,2**
L-NAME (25 мг/кг)+ рокситромицин (10 мг/кг)	1,2±0,2**
L-NAME (25 мг/кг)+ мидекамицин (10 мг/кг)	1,9±0,1**

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

Обсуждение результатов. Некротические процессы при инфаркте миокарда в значительной мере зависят от первоначального состояния реактивности и реализуются через изменения перекисного окисления липидов. По современным представлениям, инфаркт миокарда заживает через асептическое воспаление, проявляющееся выраженной воспалительной инфильтрацией зоны инфаркта. Усиление процессов свободнорадикального окисления липидов неизменно сопутствует ишемическому повреждению миокарда при коронароокклюзии.

Медикаментозная оптимизация инфаркта миокарда предполагает использование противовоспалительных и антиоксидантных средств. Исследуемые макролидные препараты, обладая противовоспалительными и антиоксидантными эффектами [4, 13], оказывали существенное благоприятное влияние на заживление инфарктированного миокарда, что проявляется в дозозависимом снижении летальности и уменьшении зоны некроза левого желудочка после коронароокклюзии в группах 14- и 15-членных макролидов. 16-членный препарат мидекамицин однозначной дозозависимости не продемонстрировал, в целом, показывая значимый кардиопротективный эффект. Механизм данных плейотропных эффектов макролидов реализуется при накоплении препарата непосредственно в очаге поражения, куда он попадает в высоких концентрациях внутри мигрирующих макрофагов.

Известно, что ФНО α , являясь одним из основных провоспалительных цитокинов, инициирует и поддерживает процессы воспаления, в частности стимулирует миграцию лейкоцитов в зону поражения. В свою очередь, активированные лейкоциты инфильтрируют миокард, высвобождая протеазы, свободные радикалы и провоспалительные цитокины. ФНО α и лейкоциты являются взаимостимулирующими факторами, ранее всего вовлекаемыми в воспалительный процесс. Повышенный уровень ФНО α также оказывает неблагоприятное влияние на миокард. Доказано его кардиодепрессивное действие и способность индуцировать апоптоз кардиомиоцитов [10]. Кроме того, ФНО α усиливает процессы патологического постинфарктного ремоделирования, вызывает дисфункцию ЛЖ, развитие сердечной недостаточности и является независимым фактором неблагоприятного прогноза после ИМ [17]. Нами выявлено снижение уровня ФНО α , что доказывает противовоспалительные свойства макролидов.

Немаловажный антиоксидантный механизм кардио- и эндотелиопротективного действия макролидов получен в ранее проведенных нами исследованиях [1].

Среди возможных механизмов изученного нами протективного действия антибиотиков при ЭД предполагаются следующие: ингибирование экспрессии или инактивация eNOS и снижение синтеза NO за счет прямых противовоспалительных, антиоксидантных, иммуномодуляторных и антитромботических свойств антибиотиков. Показано, что макролиды оказывают воздействие на фагоциты и, как следствие, снижают продукцию цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО α), лизосомальных ферментов, C-реактивного белка, фактора Виллебранда и активных форм кислорода, через которые реализуются эффекты ЭД [12, 13, 14]. Эти препараты активируют NOS, снижают активность ксантиноксидазы, малонового диальдегида, которые являются важными индикаторами оксидативного стресса при ЭД [3].



Результаты проведённых экспериментальных исследований при моделировании дефицита оксида азота подтверждают наличие эндотелиопротективного компонента фармакотерапевтического воздействия представителей группы современных макролидных антибиотиков, снизивших показатель КЭД в обеих дозах практически до уровня такового у интактных животных.

Выводы. Применение азитромицина, рокситромицина и мидекамицина в дозах 10 и 30 мг/кг в острый период инфаркта миокарда оказывает кардиопротективное действие, что выражается как в улучшении выживаемости, так и в ограничении зоны некроза левого желудочка. Дозозависимость отчетливо появилась в группах 14- и 15-членных макролидов.

Представители основных групп современных макролидных антибиотиков также проявили значимый эндотелиопротективный эффект на модели дефицита оксида азота, восстанавливая функцию поврежденного эндотелия.

Таким образом, применение 14-, 15- и 16-членных макролидных антибиотиков, независимо от химической структуры препарата, оказывает значительный позитивный эффект при ишемическом повреждении миокарда, а также в большой степени корригирует эндотелиальную дисфункцию, вызываемую повреждением в системе NO-синтазы, снижая показатель КЭД до уровня такового у интактных животных, что может быть использовано в качестве корректора эндотелиальной дисфункции и ишемических повреждений при сердечно-сосудистой патологии.

Литература

1. Пат. 2226101 RU, МКИз С2, А 61 К 31/7048. Способ ограничения зоны некроза при моделировании коронароокклюзионного инфаркта миокарда у животных с пониженным антиоксидантным фоном / Е.С. Черноморцева; Курский гос. мед. ун-т. – № 2002113836/14, Бюл. № 25. – 4 с.
2. Покровский, М.В. Методические подходы для количественной оценки развития эндотелиальной дисфункции при L-NAME-индуцированной модели дефицита оксида азота в эксперименте / М.В. Покровский, В.И. Кочкаров, Т.Г. Покровская // Кубан. науч. мед. вестн. – 2006. – № 10(91). – С. 72-77.
3. Aktan, B. Effect of macrolide antibiotics on nitric oxide synthase and xanthine oxidase activities, and malondialdehyde level in erythrocyte of the guinea pigs with experimental otitis media with effusion / B. Aktan, S. Taysi, K. Gümüştekin // Pol. J. Pharmacol. – 2003. – Vol. 55, № 6. – P. 1105-1110.
4. Anti-inflammatory and immunomodulating effects of clarithromycin in patients with cystic fibrosis lung disease / A.L. Pukhalsky, G.V. Shmarina, N.I. Kapranov et al. // Med. Inflamm. – 2004. – Vol. 13. – P. 111-117.
5. Culic, O. Anti-inflammatory effects of macrolide antibiotics / O. Culic, V. Erakovic, M.J. Parnham // Eur. J. Pharmacol. – 2001. – Vol. 429. – P. 209-229.
6. Diminished NO release in chronic hypoxic human endothelial cells / L. Ostergaard, E. Stankevicius, M.R. Andersen et al. // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2007. – Vol. 293, № 5. – P. 2894-2903.
7. Dunne, M. Infectious Agents and Cardiovascular Disease / M. Dunne // The Infectious Etiology of Chronic Diseases: Defining the Relationship, Enhancing the Research, and Mitigating the Effects – Washington, D.C.: The National Academic Press, 2004.
8. Gao, X. Inhibition of sulfur mustard-induced cytotoxicity and inflammation by the macrolide antibiotic roxithromycin in human respiratory epithelial cells / X. Gao, R. Ray, Y. Xiao // BMC Cell Biol. – 2007. – Vol. 24, № 8. – P. 17.
9. Gurfinkel, E. Inflammation, infection, or both in atherosclerosis: the ROXIS trial in perspective / E. Gurfinkel // J. Infect. Dis. – 2000. – Vol. 181, Suppl. 3. – P. S566-S568.
10. Liposomal delivery of heat shock protein 72 into renal tubular cells blocks nuclear factor- κ B activation, tumor necrosis factor- α production, and subsequent ischemia-induced apoptosis / K.K. Meldrum, A.L. Burnett, X. Meng et al. // Circ. Res. – 2003. – Vol. 92. – P. 293-299.
11. Pacher, P. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease / P. Pacher, J.S. Beckman, L. Liaudet // Physiol. Rev. – 2007. – Vol 87. – P. 315-424.
12. Parchure, N. Effect of azithromycin treatment on endothelial function in patients with coronary artery disease and evidence of Chlamydia pneumoniae infection / N. Parchure, E.G. Zouridakis, J.C. Kaski // Circulation. – 2002. – Vol. 105, № 11. – P. 1298-1303.



13. Sharma, S. Immunomodulatory effects of macrolide antibiotics in respiratory disease: therapeutic implications for asthma and cystic fibrosis / S. Sharma // Paediatr. Drugs. – 2007. – Vol. 9, № 2. – P. 107-118.
14. Tamaoki, J. Clinical implications of the immunomodulatory effects of macrolides / J. Tamaoki, J. Kadota, H. Takizawa // Am. J. Med. – 2004. – Vol. 117, Suppl. 9A. – P. 5S-11S.
15. The effect of clarithromycin on inflammatory markers in chronic obstructive pulmonary disease: preliminary data / I. Basyigit, R. Yildiz, S. Ozkara et al. // Ann. Pharmacother. – 2004. – Vol. 38, № 9. – P. 1400-1405.
16. Xue-Mei, O.U. Macrolides attenuate mucus hypersecretion in rat airways through inactivation of NF-Kb / O.U. Xue-Mei // Respirology. – 2008. – Vol. 11, Issue 1. – P. 63-72.
17. Zhang, H. Role of TNF-alpha in vascular dysfunction / H. Zhang, Y. Park, J. Wu // Clin. Sci. – 2009. – Vol. 116, № 3. – P. 219-230.

EXPERIMENTAL STUDY OF CARDIO- AND THE ENDOTHELIOPROTECTIVE ACTION OF MACROLIDES

E.S. CHERNOMORTSEVA¹

M.V. POKROVSKIY²

T.G. POKROVSKAYA²

E.N. DUDINA¹

E.A. KONOVALOVA¹

O.A. STAROSELTSEVA¹

V.V. GUREEV¹

E.A. SHMYKOVA²

N.N. ISAICHENKO²

T.A. HADIEVA²

The investigation of the cardioprotective and endothelioprotective effects of the macrolide antibiotics Roxithromycin, Azythromycin, Midecamycin with the simulation of the coronarocclusion myocardial infarction and endothelial dysfunction is carried out in laboratory animals. The preparations being investigated in effectively dose-dependent decreases lethality and decreases the zone of the necrosis of left ventricle after coronarocclusion, and also renders positive effect on the functioning of endothelium.

Key words: Roxithromycin, Azythromycin, Midecamycin, myocardial infarction, L-NAME, the coefficient of endothelial dysfunction, endothelial dysfunction.

¹⁾ *Kursk State Medical University*

²⁾ *Belgorod National Research University*

e-mail: cheses11@rambler.ru