



ЭФФЕКТИВНОСТЬ АЗИТРОМИЦИНА В КОРРЕКЦИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ВАСКУЛИТЕ

Е.С. ЧЕРНОМОРЦЕВА¹

М.В. ПОКРОВСКИЙ²

Т.Г. ПОКРОВСКАЯ²

Э.Н. ДУДИНА¹

Е.А. КОНОВАЛОВА¹

О.А. СТАРОСЕЛЬЦЕВА¹

О.В. ФИЛИППОВА²

В.А. РУЖЕНКОВ²

¹⁾ Курский государственный
медицинский университет

²⁾ Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет

e-mail: cheses11@rambler.ru

На лабораторных животных проведено исследование эндотелиопротективных эффектов азитромицина при моделировании реактивного поствакцинального васкулита.

Исследуемый макролидный антибиотик в значительной степени приводит к коррекции смоделированного патологического состояния.

Ключевые слова: азитромицин, васкулит, коэффициент эндотелиальной дисфункции, эндотелиальная дисфункция.

Эпидемиологические и клинические исследования позволяют предположить связь между инфекцией или воспалением и риском сердечно-сосудистых заболеваний [12].

В настоящее время обнаружено два типа связи: связь между хроническим вялотекущим воспалением/инфекцией и медленным процессом атерогенеза и связь между острой системной воспалительной реакцией и транзиторно повышенным риском острого сердечно-сосудистого заболевания. Последнее может быть основанием повышенной сердечно-сосудистой смертности и заболеваемости, наблюдаемой после инфекции дыхательных путей.

Предполагается, что изменения в эндотелиальной активности могут выявить связь между воспалением и риском острого сердечно-сосудистого заболевания. Отсутствие нормальных сосудорасширяющих, антиагрегантных свойств сосудистого эндотелия могут перевесить баланс в пользу спазма сосудов, тромбоза и воспаления и способствовать переходу от «стабильной» до «нестабильной» атеромы.

Несмотря на очевидное значение воспалительной реакции при атеросклерозе, пусковой механизм ее неизвестен. 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 [6].

Коррекция эндотелиальной дисфункции (ЭД) при сердечно-сосудистой патологии на сегодняшний день является одним из наиболее перспективных направлений. Точками приложения терапии ЭД являются восстановление равновесия провоспалительных и противовоспалительных медиаторов, обеспечивающих в норме оптимальное течение всех эндотелийзависимых процессов.

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 [5].

Последние сведения о неантибактериальных противовоспалительных, антиоксидантных и антикоагулянтных свойствах макролидов [3, 14] позволяют предпринять



попытку медикаментозно оптимизировать экспериментальную поствакцинально-васкулитную эндотелиальную дисфункцию с помощью 15-членного азалида азитромицина.

Цель работы. Изучение эндотелиопротективных эффектов азитромицина при моделировании экспериментальной поствакцинально-васкулитной эндотелиальной дисфункции.

Материалы и методы. Опыты проводили на кроликах самцах породы шиншилла массой 3,0-3,5 кг. Моделирование воспалительной реакции сосудов осуществляли путем введения вакцины *Salmonella Typhi* («Тифивак» вакцина брюшнотифозная спиртовая сухая, РN№ 000661/01, Санкт-Петербургский НИИ вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов) однократно подкожно в дозе 0,02 мл/кг. Температуру тела животного измеряли электронным термометром *per rectum* перед вакцинированием, через 8, 24, 36, 48 и 72 часа после вакцинации.

Через 8, 24, и 48 часов после вакцинации брались анализы крови из краевой вены уха. Сыворотка, полученная путем центрифугирования, была помещена в емкость и хранилась при -70°C для последующего измерения количества фактора некроза опухоли (ФНО α). Через 48 часов от начала эксперимента под наркозом вводили катетер в левую сонную артерию, болюсное введение фармакологических агентов осуществляли в бедренную вену. Посредством датчика TSD104A MP100 Systems и аппаратно-программной системы производства Biopac Systems Inc., USA, измеряли и непрерывно регистрировали показатели кардиогемодинамики: систолическое артериальное давление, диастолическое артериальное давление и частоту сердечных сокращений (ЧСС). Функциональные пробы: эндотелийзависимая вазодилатация (ЭЗВД) – внутривенное введение ацетилхолина, эндотелийнезависимая вазодилатация (ЭНВД) – внутривенное введение нитропруссиды натрия.

Исследуемый препарат зитромицин (субстанция азитромицина моногидрата, серия 0001/2 (Chem-East LTD)) вводился внутривенно через зонд за 15 минут до коронароокклюзии в дозе 30 мг/кг.

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 расчетов использовали программу для статистического анализа Microsoft Excel 7.0.

Результаты. Температура тела перед вакцинированием животных в среднем составляла $38,6 \pm 0,1^\circ\text{C}$. В течение 8 часов после вакцинации температура закономерно повышалась на $0,8^\circ\text{C}$, затем ее значение постепенно снижалось, что отражало динамику реактивных воспалительных изменений организма.

Уровень в плазме важнейшего регулятора воспалительных и иммунных процессов – провоспалительного цитокина ФНО α составлял $12,8 \pm 0,5$ пг/мл. Через 8 ч после назначения полисахаридной вакцины наблюдалось значительное увеличение уровня ФНО α до $61,0 \pm 6,3$ пг/мл. Затем, в исследованные промежуточные времена, этот показатель постепенно повышался и на вторые сутки эксперимента достигал значения $84,1 \pm 0,3$ пг/мл. В дальнейшем его содержание снизилось до $50,1 \pm 1,3$ пг/мл, что отражало интенсивность происходящих воспалительных реакций в организме.

Показатели гемодинамики были определены у интактных животных и у вакцинированных кроликов через 48 и 72 часов после введения вакцины. Вакцинация не оказала эффект на кровяное давление или уровень сердцебиения. Так, среднее артериальное давление у интактных кроликов составляло $104,7 \pm 3,2$ мм рт. ст., у вакцинированных животных существенно не изменилось – $114,4 \pm 4,2$ мм рт. ст. (48 часов) и $102,3 \pm 1,7$ мм рт. ст. (72 часа). ЧСС составляла $292,1 \pm 33,0$ уд./мин. в контрольной группе, $302,4 \pm 20,1$ уд./мин. (48 часов) и $300,1 \pm 53,0$ уд./мин. (72 часа) соответственно при вакцинации.

Дилатацию артериальных сосудов определяли после местного внутривенного вливания вещества, чье расширяющее действие зависит от функции сосудистого эндотелия – ацетилхолина (АХ), и вещества, чье действие напрямую расслабляет гладкую мускулатуру сосудов, – нитропруссиды натрия (НП). Ацетилхолин широко применяется для тестирования способности эндотелия генерировать сосудорасширяющие факторы; действует путем стимулирования продукции оксида азота в этом сосудистом слое. Пониженная действенность ацетилхолина в эндотелии наблюдается у пациентов с широким разнообразием сердечно-сосудистых заболеваний и была признана индикатором эндотелиальной дисфункции.

В данном исследовании время сосудистой реакции на ацетилхолин через 48 ч после вакцинации было подавлено на 52,2%. Следует отметить, что реакция на донор оксида азота (нитроглицерин) несколько увеличилась. Эффект эндотелийзависимой вазодилатации вернулся к нормальному уровню через 72 часа.



Показатель, характеризующий степень эндотелиальной дисфункции, – коэффициент эндотелиальной дисфункции (КЭД) составил $1,1 \pm 0,2$ усл. ед. у интактной группы, $3,9 \pm 0,5$ усл. ед. – через 48 часов у животных, получавших «Тифивак». Через 72 часа КЭД снизился до нормальных значений. Полученная на 2-е сутки вакцинации достоверная разница КЭД в 3,5 раза может свидетельствовать о возможности использования модели реактивного васкулита в оценке фармакологической коррекции эндотелиальной дисфункции (табл.).

Таблица

Влияние азитромицина в дозе 30 мг/кг на коэффициент эндотелиальной дисфункции и уровень ФНО α при моделировании поствакцинально-васкулитной эндотелиальной дисфункции ($M \pm m$, $n=10$)

Группы животных	Функциональная проба	САД	ДАД	Время сосудистой реакции, с	КЭД, усл. ед.	ФНО α , пг/мл
Интактные кролики	Исходные	$121,8 \pm 3,6$	$96,1 \pm 4,3$		$1,1 \pm 0,2$	$12,8 \pm 0,5$
	АХ	$70,2 \pm 2,4$	$54,1 \pm 2,9$	$72,8 \pm 5,0$		
	НП	$87,5 \pm 3,6$	$68,8 \pm 2,8$	$103,5 \pm 10,4$		
Вакцина (0,02 мл/кг)	Исходные	$126,5 \pm 6,0$	$107,5 \pm 3,9$		$3,9 \pm 0,5^{\#}$	$84,1 \pm 0,3^{\#}$
	АХ	$69,4 \pm 4,2$	$51,9 \pm 4,3$	$38,0 \pm 3,5^{\#}$		
	НП	$79,5 \pm 3,9^{\#}$	$53,4 \pm 2,2^{\#}$	$145,6 \pm 7,4^{\#}$		
Вакцина (0,02 мл/кг)+ азитромицин (30 мг/кг)	Исходные	$138,8 \pm 7,1$	$109,1 \pm 3,5$		$0,9 \pm 0,1^{##}$	$43,6 \pm 0,04^{##}$
	АХ	$79,5 \pm 5,1$	$54,0 \pm 2,4$	$82,9 \pm 7,2^{##}$		
	НП	$101,6 \pm 5,8^{##}$	$77,3 \pm 2,6^{##}$	$129,0 \pm 6,6^{##}$		

Примечание: $\#$ – $p < 0,05$ в сравнении с интактными; $##$ – $p < 0,05$ в сравнении с вакцинированными животными.

Концентрация в плазме провоспалительного цитокина ФНО α повысилась в 6,5 раза, и можно предположить, что ФНО α может быть важным цитокином, способствующим реакциям, наблюдаемым после этого вида вакцинации.

Животные на 2-е сутки вакцинации получали внутривенно азитромицин в дозе 30 мг/кг, при этом КЭД достоверно снижались и соответствовал значению $0,9 \pm 0,1$ усл. ед., что характеризует выраженное эндотелиопротективное действие азитромицина (табл.).

Противовоспалительная активность азитромицина подтверждалась данными о снижении содержания в крови ФНО α . Данный макролид достоверно понизил концентрацию провоспалительного цитокина на 51,8% (табл.).

Моделирование системного васкулита привело к развитию острого гломерулита в виде резкого увеличения количества в клубочках ядродержащих клеток – лейкоцитов, мезангиальных макрофагов, пролиферирующих эндотелиальных клеток. Введение азитромицина на фоне предварительного вакцинирования достоверно снижает степень иммуно-воспалительной реакции в клубочках почек.

Обсуждение результатов. Исследования в области молекулярной биологии, генетические исследования на животных позволили получить убедительные доказательства воспалительной теории атеросклероза [1]. В ответ на воспалительное повреждение клетки эндотелия активируются и экспрессируют различные цитокины – интерлейкин-1 (ИЛ-1), фактор некроза опухоли, а также хемокины (хемоаттрактант-протеин моноцитов MCP-1, ИЛ-8), факторы роста. Провоспалительные цитокины (ИЛ-1, ФНО α), секретируемые моноцитами или лимфоцитами, выполняют ключевую роль в привлечении лейкоцитов к эндотелию. ФНО α играет центральную роль в развитии острой фазы воспаления, стимулируя эндотелий к продукции адгезивных молекул, коагулянтов, увеличивая выработку фактора активации тромбоцитов и усиливая приток фагоцитов в очаг воспаления [8].

Учитывая вышеперечисленное, нами определялась концентрация ФНО α как основного информативного маркера воспаления.

В нашем эксперименте подкожная инъекция полисахаридной вакцины вызывала незначительную воспалительную реакцию у здоровых животных, сопровождающуюся повышением температуры тела и количества ФНО α в крови и развитием картины острого гломерулита почек в виде резкого увеличения количества в клубочках ядродержащих клеток, и привела к значительному, но временному подавлению зависимого от эндотелия расслабления артерий, о чем свидетельствует достоверное повышение КЭД через 48 часов после вакцинации в 3,5 раза с $1,1 \pm 0,2$ у интактной группы, до $3,9 \pm 0,5$ у вакцинированных животных. Эти результаты демонстрируют, что даже относительно слабая системная воспалительная реакция



приводит к значительным изменениям эндотелиальной функции, обычно связанной с повышенным риском сердечно-сосудистых заболеваний.

Механизмы, путем которых острое воспаление может нарушить зависимое от эндотелия расслабление, полностью не ясны. Одна из возможностей – в том, что определенные цитокины и фактор транскрипции нуклеарный фактор каппа-В (NF-κB) вызывают экспрессию индуцибельной изоформы синтазы оксида азота (iNOS) в стенке сосуда (изоформа, вызывающая значительную продукцию оксида азота, наблюдаемую при воспалении и сепсисе), и это значительное производство NO, совмещенное с генерированием супероксида, вызывает повреждение эндотелия [7]. Альтернативная возможность – в том, что цитокины вызывали понижение экспрессии конституциональной эндотелиальной NOS (eNOS).

Ингибиторное влияние ФНОα на ЭЗВД возможно посредством влияния не только на NO продукцию, но также блокировкой вазодилатации в ответ на арахидоновую кислоту (прекурсор синтеза простаноидов) [5, 9]. Предполагается также, что ФНОα может угнетать или извращать сосудистые реакции посредством разнообразных механизмов, а именно: уменьшения экспрессии субъединиц eNOS, ассоциированной с повышением содержания ее индуктивной формы (iNOS) в эндотелии и гладкомышечных клетках сосудов.

Среди возможных механизмов изученного нами протективного действия азитромицина 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, ФНОα), лизосомальных ферментов, С-реактивного белка, фактора Виллебранда и активных форм кислорода, через которые реализуются эффекты ЭД [10, 11, 13]. Эти препараты активируют NOS, снижают активность ксантиноксидазы, малонового диальдегида, которые являются важными индикаторами оксидативного стресса при ЭД [2].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об эффективном снижении КЭД и ФНОα под влиянием азитромицина у животных с моделированием поствакцинальной эндотелиальной дисфункции. Это может объясняться тем, что макролиды препятствуют понижению уровня регуляции эндотелиальной синтазы окиси азота, снижая количество провоспалительных цитокинов ФНОα, его стимулирующего. Антиоксидантные свойства азитромицина способствуют уменьшению действия повреждающих эндотелий факторов.

Дальнейшее изучение фармакологического действия макролидов позволит расширить диапазон показаний для назначения этих препаратов в качестве корректоров эндотелиальной дисфункции при сердечно-сосудистой патологии.

Выводы. Результаты демонстрируют, что вакцинация полисахаридной вакциной S. Turpi временно, но значительно нарушает способность артериального эндотелия производить эндогенные расширители сосудов в ответ на агонист, при этом наблюдались явления гломерулита в почках и рост уровня провоспалительного цитокина ФНОα в крови.

Азитромицин в дозе 30 мг/кг проявлял выраженное эндотелиопротективное действие на модели реактивной поствакцинально-вазкулитной эндотелиальной дисфункции, что выразилось в преобладании эндотелийзависимого расслабления сосудов и снижении коэффициента эндотелиальной дисфункции КЭД до уровня интактных животных, а также в достоверном снижении содержания индикатора острого воспаления ФНОα. Позитивные морфологические изменения в клубочках почек подтверждают протективный эффект азитромицина.

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.

Литература

1. Моисеев, В.В. Роль воспаления в процессах атерогенеза и в развитии сердечно-сосудистых осложнений / В.В. Моисеев // Врач. – 2003. – № 3. – С. 3-6.
2. 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.
3. 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.
4. Culic, O. Anti-inflammatory effects of macrolide antibiotics / O. Culic, V. Erakovic, M.J. Parnham // Eur. J. Pharmacol. – 2001. – Vol. 429. – P. 209-229.



5. 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.
6. 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.
7. Ialenti, A. Role of nuclear factor-kappaB in a rat model of vascular injury Naunyn Schmiedebergs / A. Ialenti, A. Ianaro, P. Maffia // *Arch. Pharmacol.* – 2001. – Vol. 364, № 4. – P. 343-350.
8. Intra-Arterial Tumor Necrosis Factor- α Impairs Endothelium-Dependent Vasodilatation and Stimulates Local Tissue Plasminogen Activator Release in Humans / S. Chia, M. Qadan, R. Newton et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2003. – Vol. 23, № 4. – P. 695-701.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Smeeth, L. The role of infection in cardiovascular disease: more support but many questions remain / L. Smeeth, J. P. Casas, and A. D. Hingorani // *Eur. Heart J.* – 2007. – Vol.28(10). – P. 1178-1179.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. Zhang, H. Role of TNF-alpha in vascular dysfunction / H. Zhang, Y. Park, J. Wu // *Clin. Sci.* – 2009. – Vol. 116, № 3. – P. 219-230.

AZITROMYCIN EFFECTS IN CORRECTION OF THE ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN EXPERIMENTAL VASCULITIS

E.S. CHERNOMORTSEVA¹

M.V. POKROVSKIY²

T.G. POKROVSKAYA²

E.N. DUDINA¹

E.A. KONOVALOVA¹

O.A. STAROSEL'TSEVA¹

O.V. FILIPPOVA²

V.A. RUZHENKOV²

¹⁾ *Kursk state medical university*

²⁾ *Belgorod state national research university*

e-mail: cheses11@rambler.ru

The investigation of the endothelioprotective effects of the macrolide antibiotic Azythromycin with the simulation of the reactive postvaccinal vasculitis is carried out in laboratory animals.

The analyzed macrolide antibiotic largely leads to correction of the simulated pathological condition.

Keywords: Azythromycin, vasculitis, coefficient of endothelial dysfunction, endothelial dysfunction.