

ИЗУЧЕНИЕ АНТИАТЕРОГЕННЫХ ЭФФЕКТОВ СИМВАГЛИЗИНА
НА МОДЕЛИ ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИИ У КРОЛИКОВЮ.И. Рагино¹, В.А. Вавилин², Н.Ф. Салахутдинов³,
С.И. Макарова², Е.М. Стахнева¹, О.Г. Сафронова²¹ Учреждение Российской академии медицинских наук
Научно-исследовательский институт терапии СО РАМН;² Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт
молекулярной биологии и биофизики СО РАМН;³ Учреждение Российской академии наук Новосибирский институт органической химии
им. Н.Н. Ворожцова СО РАН

На модели экспериментальной гиперхолестеринемии у кроликов показано, что сила гипохолестеринемического эффекта комплексного соединения симвастатина (СВ) с глицирризиновой кислотой — симваглизина (СВГ), в дозах, соответствующих в весовом эквиваленте 40, 66,5 и 100 мг/кг/сут СВ, равна той, что наблюдается для дозы СВ 200 мг/кг/сут. Снижение уровня общего холестерина крови через 20 дней приема препаратов составило 39, 36, 47 и 38 % соответственно в сравнении с контролем. Оцениваемая по активности креатинфосфокиназы в крови миотоксичность СВГ ниже, чем у СВ. Через 30 дней введения СВГ в указанных дозах этот показатель стал ниже в сравнении с таковым у СВ на 26, 24 и 29 % соответственно. СВГ в дозах, соответствующих в весовом эквиваленте 66,6 и 40 мкг/кг/сут СВ, обладает антиоксидантной активностью, вызывая снижение уровня продуктов перекисного окисления липидов в крови на 27–41 %, а также эффектом нормализации функции эндотелия, снижая в крови уровни фактора Виллебранда на 26–58 % и эндотелина-1 на 21–29 % в сравнении с СВ в дозе 200 мкг/кг/сут.

Ключевые слова: симваглизин, симвастатин, гиперхолестеринемия у кроликов, липидный профиль, печеночные ферменты, антиоксидантный эффект, эндотелиальная дисфункция.

ВВЕДЕНИЕ

Гиперхолестеринемия (ГХС) играет важную роль в патогенезе атеросклероза и ишемической болезни сердца (ИБС) [1], заболеваемость и смертность от которых остаются высокими в России [2]. Назначение препаратов, снижающих холестерин, является приоритетным в терапии ИБС и ГХС [3]. Наиболее эффективны в снижении уровня холестерина липопротеидов низкой плотности (ХС-ЛПНП) и смертности от атеросклероза и ИБС ингибиторы 3-гидрокси-3-метил-глутарил-СоА редуктазы (ГМГ-СоА редуктаза) (статины) [3, 4]. У многих статинов эффективная терапевтическая суточная доза обуславливает возникновение побочных эффектов — повышение печеночных ферментов аспаргиновой и аланиновой трансаминаз (АЛТ, АСТ), миалгию, миопатию с повышением креатинфосфокиназы (КФК) [5]. Поэтому проводится поиск новых статинов с более низкой суточной дозой, более безопасных, пролонгированного действия и эффективных по ХС-снижающему действию.

Наряду с гипохолестеринемическим эффектом важными являются и известные плейотропные эффекты статинов [6], в том числе антиоксидантный [6] и нормализующий функцию эндотелия [8]. Все это обуславливает актуальность поиска и создания новых отечественных препаратов с подобными свойствами.

Одним из подходов к созданию таких лекарств является комплексообразование известных фармаконов с природными комплексонами, в частности, с глицирризиновой кислотой (ГК) [9]. Усиление лекарственного эффекта в сравнении с исходными препаратами показано для комплексов ГК с бутадиионом, индометацином [9] и нифедипином [10]. Этот подход был использован при создании нового молекулярного комплекса симвастатина (СВ) с ГК со стехиометрией 1:4 — симваглизина (СВГ) [11, 12].

Цель настоящей работы — изучение холестеринснижающей эффективности и безопасности, а также антиоксидантного и нормализующего функцию эндотелия эффектов комплексного со-

единения симваглизина на экспериментальной модели ГХС у кроликов *in vivo*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперимент продолжительностью 80 дней проведен на самцах кроликов породы Серый гигант массой 2,5–3,0 кг. Животные содержались в отдельных клетках и имели свободный доступ к воде и пище. Для развития ГХС 25 животных в течение 30 дней получали диету, содержащую животный жир 5 % и ХС 3 % от веса пищи [13–15]. Далее кролики были разделены на пять равных групп и в период с 31 по 60 день эксперимента получали гипохолестеринемические соединения на фоне стандартной лабораторной диеты: группа 1 – контрольная, без вмешательства; группа 2 – СВ 200 мкг/кг/сут; группы 3, 4 и 5 – СВГ 1000, 666 и 400 мкг/кг/сут соответственно. В расчете на СВ, массовая доля которого в СВГ составляет 0,1 от молярного веса, дозы в 3-й, 4-й и 5-й группах соответствовали 100, 66,6 и 40 мкг/кг/сут, что в 2, 3 и 5 раз ниже дозы СВ в группе 2. Дозы вводили 1 раз в сутки *per os* в 1 % крахмальной суспензии. В период с 61 по 80 день эксперимента животные всех групп получали только стандартную лабораторную диету. Кровь забирали утром из ушной вены по 3 мл в точках «0, 30, 40, 50, 60, 70 и 80 дней» эксперимента. За 12 ч до забора крови животные лишались корма при сохранении доступа к воде.

Показатели липидного профиля сыворотки крови (общий ХС, холестерин липопротеидов высокой плотности (ХС-ЛПВП) и триглицериды (ТГ)) и активности в сыворотке аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ) и креатинфосфокиназы (КФК, фракция КК-Нас) определяли с использованием наборов «Biocon» (Германия) на биохимическом анализаторе «Labsystem» (Финляндия).

Уровень продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в сыворотке крови оценивали по концентрации ТБК-реактивных продуктов флюориметрическим методом [16] на спектрофлюориметре «SpectroFluor» (Bio-Rad, США). Активность параоксоназы (ПО) в сыворотке крови определяли в трис-НСI буфере, рН 8,0, фотометрическим методом [17].

О функции эндотелия судили по содержанию в сыворотке NO, которое определяли по количеству общего нитрита с использованием тест-систем для иммуноферментного анализа (ИФА) «R&D Systems», детекция при 540 нм, фактора Виллебранда, определяемого ИФА тест-системами «Technoclone», детекция при 450 нм, и эндотелина-1 (ИФА тест-система «Biomedica

Group», 450 нм). Все измерения проводили на ИФА-анализаторе «Multiscan EX» (Финляндия).

Статистическую обработку результатов осуществляли в лицензионной версии программы «SPSS for Windows» методами корреляционного и однофакторного дисперсионного (ANOVA) анализов с использованием критерия Даннета для множественного сравнения. Статистически достоверными считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание кроликов на холестеринной диете в течение первых 30 дней эксперимента привело к развитию выраженной ГХС ($2309,0 \pm 223,2$ мг/дл). Эффекты препаратов на липидные показатели изучали в динамике обратного развития ГХС в период после перевода животных на стандартную лабораторную диету. При этом чувствительность сравнений возрастает за счет снижения вклада ХС, поступающего алиментарным путем.

В контрольной группе снижение уровня общего ХС достигло статистической значимости в сравнении с исходным значением ГХС через 20 дней – на 35 % ($p < 0,01$). В то же время в группах 3–5 уже через 10 дней приема СВ и трех разных доз СВГ получено достоверное снижение уровня общего ХС на 30–36 % ($p < 0,01$). Важно отметить, что в группах, получавших СВГ и СВ, показатели снижения общего ХС были сходными, несмотря на то, что дозы СВГ были в 2, 3 и 5 раз меньше дозы СВ (рис. 1). Во всех опытных группах в сравнении с контрольной через 20 дней после приема препаратов наблюдалась достоверная сходная разница в снижении уровня общего ХС на 36–47 % ($p < 0,05$), что указывает на хорошую холестеринснижающую эффективность СВГ с учетом уменьшенных в 2–5 раз доз СВ в СВГ, не уступающую таковой у собственно СВ. Таким образом, сила воздействия СВГ превышает таковую у СВ.

Уровень ХС-ЛПВП в контрольной группе в динамике эксперимента не изменился. В группе СВ и в группе с максимальной дозой СВГ значимо повысился через 20 дней приема препаратов на 25–29 % ($p < 0,05$) в сравнении с показателем 30-го дня эксперимента ($29,8 \pm 3,0$ мг/дл), а через 30 дней введения препаратов уровень ХС-ЛПВП был достоверно выше на 20–26 % ($p < 0,05$) в сравнении с контролем. Влияния исследуемых препаратов на уровень ТГ крови в динамике эксперимента отмечено не было.

Наряду с ценным терапевтическим гипохолестеринемическим эффектом у статинов могут проявляться неблагоприятные свойства – гепато- и миотоксичность. У кроликов, получавших

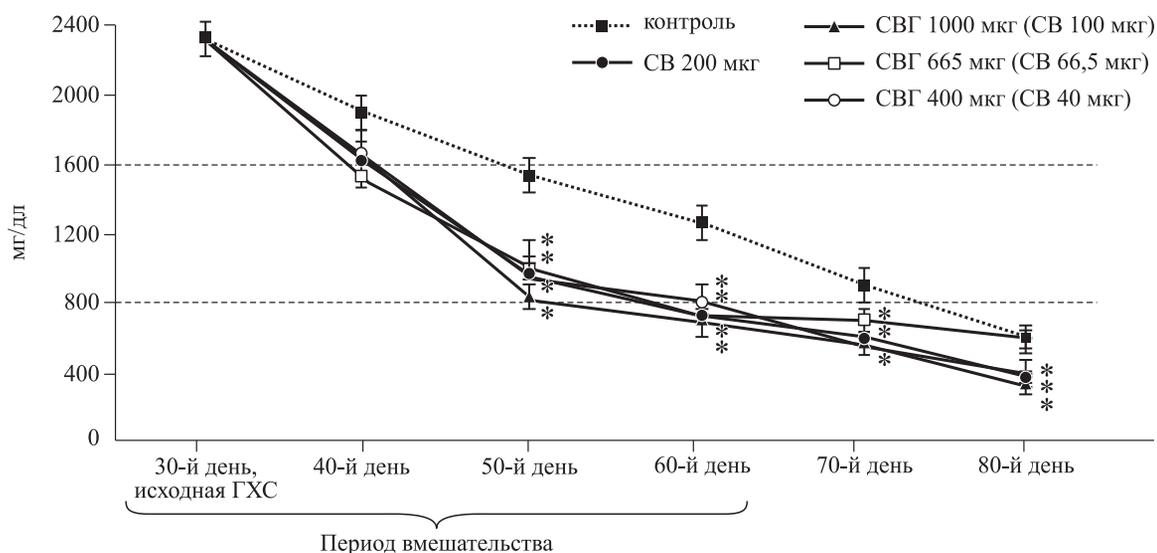


Рис. 1. Динамика изменения уровня общего ХС крови у кроликов с экспериментальной ГХС при введении симваглизина.

Здесь и на рис. 2–4 по оси ординат указаны суточные дозы симвастатина, симваглизина, по оси абсцисс — дни эксперимента, * — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой

СВ и СВГ, в ходе эксперимента нами не выявлено какого-либо повышения уровней печеночных АСТ и АЛТ в крови относительно показателей 30-го дня исследования ($89,2 \pm 8,7$ и $82,1 \pm 8,0$ ЕД/л соответственно), что указывает на отсутствие гепатотоксического влияния указанных доз исследуемых препаратов. В отношении СВГ необходимо отметить известный гепатопротекторный эффект ГК, заключающийся в снижении активности трансаминаз и липидных пероксидов в гепатоцитах [9].

Результаты измерения уровня активности фермента КФК в крови у кроликов в динамике эксперимента показали, что в группе СВ этот показатель уже через 10 дней приема препарата повысился на 27 % ($p < 0,01$) в сравнении со значением 30-го дня эксперимента и через 30 дней приема СВ был на 64 % выше, чем в контрольной группе. В трех группах, получавших СВГ, уровень КФК в динамике эксперимента повышался менее выражено. Повышение было недостоверным как в сравнении с исходными значениями, так и с показателями контрольной группы, а через 30 дней введения препаратов в группах, получавших СВГ, этот показатель был на 24–29 % ниже, чем в группе СВ (рис. 2). С учетом содержания СВ в СВГ можно говорить о сходстве в силе миотоксического эффекта этих двух соединений. Однако более сильный терапевтический эффект обеспечивает большую безопасность СВГ в сравнении с СВ.

Таким образом, СВГ является более эффективным и безопасным в сравнении с СВ гипохолестеринемическим соединением. Результаты работы подтверждают полученные ранее данные [9, 10] об эффекте фармакологического синергизма при комплексировании некоторых фармакологических соединений с ГК. В данном случае показана возможность снижения суточной дозы собственно СВ в комплексном соединении СВГ, приводящая к уменьшению побочных эффектов препарата при сохранении его эффективности.

Поскольку известно [7, 8], что СВ снижает активность окислительных процессов и нормализует функцию эндотелия у пациентов с ГХС и ИБС, мы исследовали антиоксидантный и нормализующий функцию эндотелия эффекты препаратов СВ и СВГ в этой экспериментальной модели.

Оценка антиоксидантных эффектов препаратов в динамике показала, что в группе СВ после 20 дней введения препарата и далее уровень продуктов ПОЛ в крови был ниже на 23–31 % ($p < 0,05$) в сравнении с контролем (рис. 3, а). В группах, получавших СВГ с уменьшенной в 3 и 5 раз дозой СВ, выраженное снижение этого показателя отмечено через 10 дней воздействия (в точке «40 дней») в сравнении с контролем на 21 и 37 % и в сравнении с группой СВ на 27 и 41 % соответственно ($p < 0,05$).

В связи с полученными результатами представлялось важным оценить активность ПО.

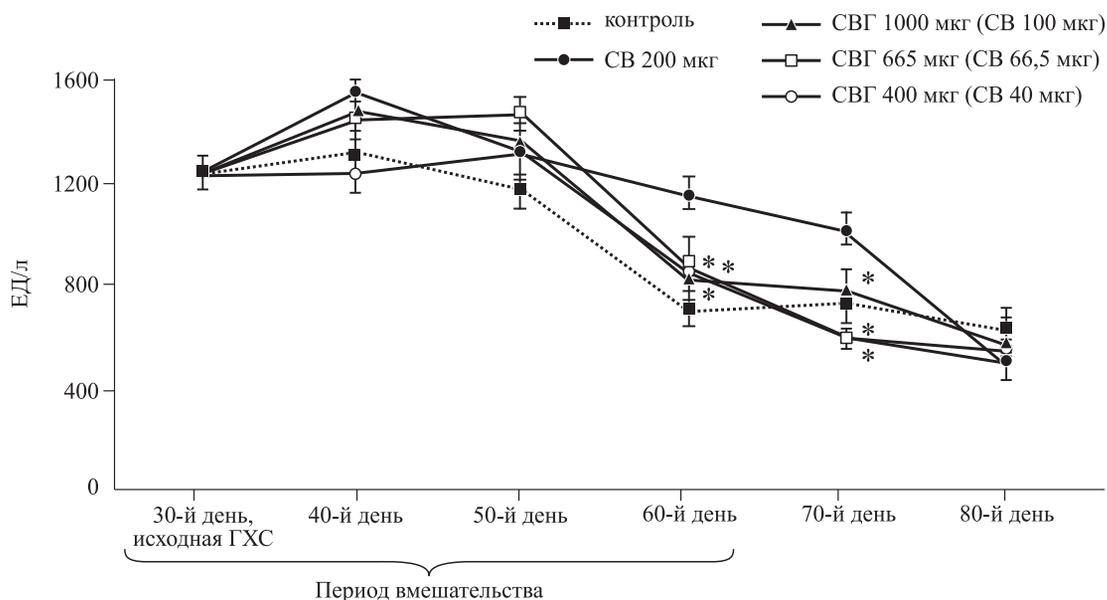


Рис. 2. Динамика изменения уровня КФК в крови у кроликов с экспериментальной ГХС при введении симваглизина

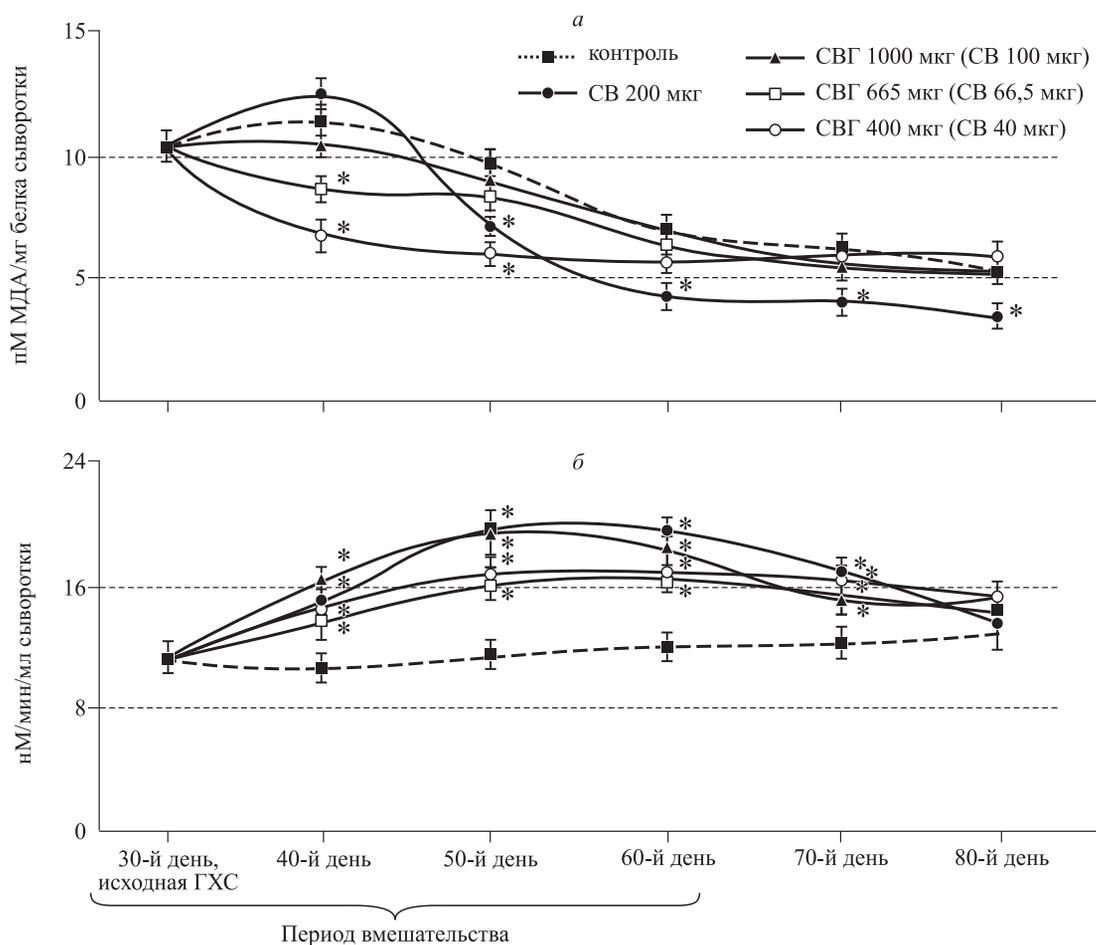


Рис. 3. Оценка антиоксидантного эффекта симваглизина по динамике изменения в крови уровня продуктов процесса ПОЛ (а) и активности параоксоназы (б) у кроликов с экспериментальной ГХС

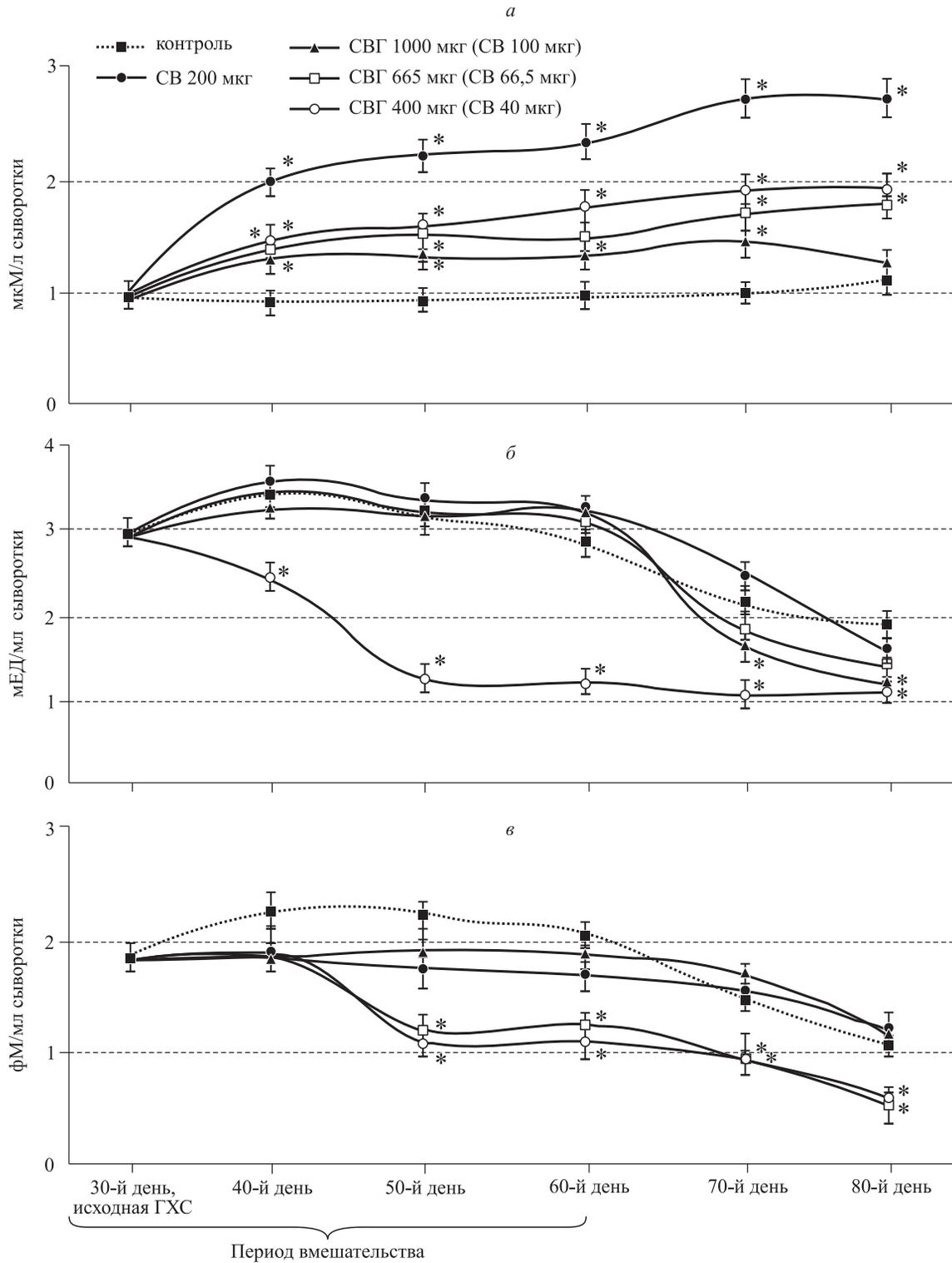


Рис. 4. Оценка нормализующего функцию эндотелия эффекта симваглизина по динамике изменения в крови уровней NO (а), фактора Виллебранда (б) и эндотелина-1 (в) у кроликов с экспериментальной ГХС

Этому связанному с ЛПВП антиоксидантному ферменту, способному при взаимодействии с частицами ЛПНП сдерживать их окислительную модификацию, придается важное значение в патогенезе атеросклероза [17]. На рис. 3, б видно, что в группе СВ и в трех группах СВГ со сниженными в 2, 3 и 5 раз дозами СВ выявлено сходное повышение ($p < 0,05$) этого показателя в сравнении с контролем на 42–60, 48–54, 29–39 и 37–45 % соответственно, что указывает на антиоксидантную активность всех исследованных доз СВГ.

Возможное влияние симваглизина на эндотелий мы оценивали по уровню в крови таких маркеров, как NO, являющийся основным вазодилататором, постоянно секретирующимся эндотелиоцитами, фактор Виллебранда (ФВ), выделяющийся эндотелиоцитами в кровь при их стимуляции, активации или повреждении, и эндотелин-1 (ЭТ1) – фактор, секреция которого при нормальной функции эндотелиоцитов не происходит, но резко увеличивается при их активации [8].

Результаты измерений NO свидетельствуют о том, что в группах СВ и СВГ этот показатель был выше ($p < 0,05$), чем в контрольной группе (рис. 4, а). Наибольшее его повышение в сравнении с контролем – более чем в 2 раза – наблюдалось в группе СВ, а в группах трех доз СВГ он был повышен в меньшей степени – на 34–41, 49–51 и 59–75 % соответственно ($p < 0,05$).

Оценки содержания ФВ не выявили различий между группами СВ и контрольной (см. рис. 4, б), но в группах СВГ со сниженными в 2–3 раза дозами СВ после 30 дней введения этот показатель стал ниже, чем в контроле и в группе СВ, на 22–26 и 26–33 % соответственно ($p < 0,05$). В группе СВГ с минимальной дозой СВ этот показатель на протяжении всего периода введения препаратов и после него был значимо ниже – на 51–61 и 58–64 % ($p < 0,05$) в сравнении с контролем и группой СВ соответственно.

Значимого влияния СВ и СВГ со сниженной в 2 раза дозой СВ на уровень ЭТ1 не выявлено (см. рис. 4, в). В период после 20 и 30 дней приема препаратов СВГ со сниженными в 3 и 5 раз дозами СВ этот показатель стал ниже, чем в контроле, на 32–40 и 38–44 % соответственно, и чем в группе СВ, на 21–27 и 29–32 % соответственно.

Корреляционный анализ выявил обратные связи между дозой СВ в СВГ и его эффектами по снижению в крови уровней продуктов ПОЛ (коэффициент корреляции r Пирсона = $-0,349$, r Спирмена = $-0,317$, $p < 0,01$), ФВ (r Пирсо-

на = $-0,289$, r Спирмена = $-0,271$, $p < 0,05$), ЭТ1 (r Пирсона = $-0,380$, r Спирмена = $-0,351$, $p < 0,01$) и повышению активности ПО крови (r Пирсона = $-0,237$, r Спирмена = $-0,212$, $p < 0,05$).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об антиоксидантной активности симваглизина. Вероятно, отчасти это является результатом повышения активности ПО крови, в основе которого лежит увеличение при введении СВГ содержания ХС-ЛПВП, отражающего увеличение количества частиц ЛПВП, с которыми связан этот фермент. СВГ обладает также эффектом нормализации функции эндотелия, который проявляется снижением в крови содержания ФВ и ЭТ1. Все эти эффекты симваглизина реализуются в области более низких, в сравнении с эквивалентом симвастатина, доз. Существенно, что антиоксидантный и эндотелия стабилизирующий эффекты симваглизина характеризуются иной, нежели описанной нами ранее прямой дозовой зависимостью гиполипидемического эффекта. Очевидно, различия в характере дозовых зависимостей этих и гиполипидемического эффектов обусловлены тем, что они реализуются с участием разных молекулярных мишеней. Последний, как показано нами, обусловлен способностью симваглизина ингибировать ГМГ-СоА-редуктазу – скорость-лимитирующий фермент в синтезе холестерина [11]. Опыт исследований биологических эффектов химических соединений свидетельствует о том, что отличные от линейной зависимости доза–эффект – U-образные и гормезис – имеют достаточно широкое распространение [18], но, несмотря на это, гораздо хуже изучены. Хотя полученные результаты не раскрывают мишеней, с участием которых реализуется эндотелия стабилизирующий эффект, они позволяют предположить, что он может быть достигнут в области более низких концентраций, чем холестеринснижающий эффект.

Работа поддержана грантом ФЦНТП Минпромнауки РФ № ИБ-37/02, 2004 г. и Интеграционным проектом СО РАН и СО РАМН № 053, 2006–2008 гг.

ЛИТЕРАТУРА

1. Anderson K., Castelli W., Levy D. // J. Am. Med. Assoc. 1987. Vol. 257. P. 2176–2180.
2. Оганов Р.Г., Масленникова Г.Я. // Кардиоваск. тер. профил. 2002. № 3. С. 4–8.
3. Диагностика и коррекция нарушений липидного обмена с целью профилактики и лечения атеросклероза. ВНОК // Кардиоваск. тер. профил. 2007. № 6. Приложение. 28 с.

4. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults // JAMA. 2001. Vol. 285. P. 2486–2497.
5. Puddu P., Puddu G.M., Muscari A. // Acta Cardiol. 2001. Vol. 56. P. 225–231.
6. Bellosa S., Ferri N., Arnaboldi L. et al. // Diabetes Care. 2000. Vol. 23. P. B72–B78.
7. Pereira E., Bertolami M., Faludi A. et al. // Free Radic. Biol. Med. 2004. Vol. 37, N 9. P. 1440–1448.
8. Landmesser U., Bahlmann F., Mueller M. et al. // Circulation. 2005. Vol. 111, N 18. P. 2356–2363.
9. Толстиков Г.А., Балгина Л.А., Шульц Э.Э., Покровский А.Г. // Биоорганическая химия. 1997. Т. 23, № 9. С. 691–703.
10. Толстикова Т.Г., Сорокина И.В., Брызгалов А.О. и др. // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. 2006. № 1. С. 55–58.
11. Вавилин В.А., Салахутдинов Н.Ф., Рагино Ю.И. и др. // Биомедицинская химия. 2008. Т. 54, вып. 3. С. 250–265.
12. Толстиков Г.А., Никитин Ю.П., Ляхович В.В. и др. Лекарственное средство с гиполипидемическим эффектом «Симваглизин» // Патент РФ № 2308947 // Бюл. Роспатент. 2007. № 30.
13. Hayashi T., Rani P.J.A., Fukatsu A. et al. // Atherosclerosis. 2004. Vol. 176. P. 255–263.
14. Ishida F., Watanabe K., Sato A. et al. // Biochem. Biophys. Acta. 1990. Vol. 1042, N 3. P. 365–373.
15. Kobayashi M., Ishida F., Takahashi T. et al. // Japan J. Pharmacol. 1989. Vol. 49. P. 125–133.
16. Schuh J., Fairclough G., Haschemeyer R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1978. Vol. 75. P. 3173–3179.
17. Mackness B., Mackness M., Arrol S. et al. // Atherosclerosis. 1998. Vol. 139. P. 341–349.
18. Eaton D.L., Klaassen C.D. Principles of Toxicology // Casarett Doulls Toxicology, McGraw-Hill. N.Y., 2001. P. 11–34.

STUDY OF ANTIATHEROGENIC EFFECTS OF SIMVAGLYZIN ON RABBIT'S HYPERCHOLESTEROLEMIA MODEL

Yu.I. Ragino¹, V.A. Vavilin², N.F. Salakhutdinov³, S.I. Makarova², E.M. Stakhneva¹, O.G. Safronova²

¹*Institute of Internal Medicine, Siberian Division, Russian Academy of Medical Sciences*

²*Institute of Molecular Biology and Biophysics, Siberian Division, Russian Academy of Medical Sciences*

³*N.N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences*

In cholesterol-fed rabbits with hypercholesterolemia it was revealed that complex of simvastatin (SV) with glycyrrhizic acid (1–4), simvaglyzin (SVG) had reduced effect on total blood cholesterol (CH) in appropriated equiponderant doses of SV 40, 66,5 and 100 mkg/kg/per day that was equal to such effect of SV 200 mkg/kg/per day. The decrease in total blood CH was 39, 36, 47 и 38 %, respectively, compared to control group after 20 day of drugs administration. Myopathic effect of SVG, evaluated by the blood activity of creatine kinase, was 26, 24 and 29 % lower in stated 3 doses of SVG, respectively, compared to SV dose after 30 day of drugs administration. Also, SVG had antioxidative effect result from reducing of blood lipid peroxidation level on 27–41 % and normalizing endothelium function effect result from reducing of blood levels of von Willebrand factor and endothelin-1 on 26–58 % and 21–29 %, respectively, in appropriated equiponderant doses of SVG 66,6 and 40 mkg/kg/per day that was equal to such effect of SV 200 mkg/kg/per day.

Keywords: simvaglyzin, simvastatin, hypercholesterolemia in rabbits, lipid profile, hepatic enzymes, antioxidant effect, endothelial dysfunction.

Статья поступила 27 марта 2010 г.