

СВЕРХМАЛЫЕ ДОЗЫ АНТИТЕЛ К VEGF КАК СРЕДСТВО КОРРЕКЦИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ

А.С. БЕЛОУС

*Курский государственный
медицинский университет*

e-mail: a.s.belous@mail.ru

Моделирование L-NAME-индуцированного дефицита оксида азота (внутрибрюшинным введением L-NAME в дозе 12,5 мг/кг в течение 28 дней) у крыс приводило к развитию эндотелиальной дисфункции. В условиях этой модели были выявлены выраженные эндотелиопротективные и кардиопротективные свойства сверхмалых доз антител к фактору роста эндотелия сосудов VEGF.

Ключевые слова: VEGF, эндотелий, оксид азота, L-Name.

Возможность неоваскуляризации ишемизированных тканей с помощью фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) доказана в многочисленных экспериментальных работах с помощью гистологических, ангиографических, радионуклидных методов на моделях ишемии миокарда и скелетных мышц у грызунов, собак, свиней и овец. Эти факторы роста использовали как в виде рекомбинантных белков, так и конструкций в плазмидном или аденовирусном векторе. Важной составляющей механизмов действия VEGF является активация эндотелиальной NO-синтазы.

В настоящее время приобретает особый интерес изучение сверхмалых доз (приготовленных по гомеопатической технологии) для коррекции эндотелиальной дисфункции. Антитела в сверхмалых дозах (потенцированные антитела) к эндогенному регулятору (антигену) не подавляют активность молекулы, а напротив, модифицируют ее. Этот феномен, открытый О.И. Эпштейном, М.Б. Штарком, воспроизведен в экспериментальных исследованиях, проведенных в НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН и НИИ молекулярной биологии и биофизики СО РАН, как на молекулярном, так и на системном уровнях с рядом антител к следующим веществам: мозгоспецифическому белку S-100, морфину, NO синтетазе, ОНО альфа, гистамину, холецистокинину, гамма-интерферону и др. [5, 6, 7].

Учитывая данные экспериментальных исследований феномена модифицирующего действия антител в сверхмалых дозах, можно предположить, что потенцированные антитела к фактору роста эндотелия VEGF будут обладать эндотелио- и кардиопротективными свойствами.

Целью настоящего исследования явилось изучение эндотелио- и кардиопротективных эффектов сверхмалых доз антител к VEGF на 28-дневной модели L-NAME-индуцированного дефицита оксида азота.

Методика исследования. Моделирование дефицита оксида азота осуществляли внутрибрюшинным введением N-нитро-L-аргининметилового эфира (L-NAME) в дозе 12,5 мг/кг в течение 28 дней (n=10 животных). Одновременно в течение 28 дней в группе из 10 животных проводили фармакологическую коррекцию дефицита оксида азота введением раствора сверхмалых доз антител к фактору роста эндотелия сосудов VEGF внутрижелудочно из расчёта 9 мл/кг/сут. (ежедневно в дозе 4,5 мл/кг 2 раза в сутки в течение 28 дней через 30 минут после введения L-NAME).

В эксперименте были выделены следующие группы животных: 1) интактные самцы (вводили дистиллированную воду); 2) контрольная группа (моделирование дефицита оксида азота внутрибрюшинным введением L-NAME в дозе 12,5 мг/кг в течение 28 дней); 3) L-NAME + сверхмалые дозы антител к фактору роста эндотелия сосудов VEGF.

На 29-й день эксперимента под наркозом (хлоралгидрат 300 мг/кг) на первом этапе исследования вводили катетер в левую сонную артерию, и регистрировали систолическое и диастолическое артериальное давление (АД), частоту сердечных сокращений. На втором этапе исследования вводили иглу в полость левого желудочка

через верхушку сердца для регистрации максимальной скорости сокращения и расслабления. Измерения производились и обрабатывались посредством датчика TSD104A и аппаратно-программного комплекса MP100 производства Biopac System, Inc., США.

Для изучения реактивности сосудистого русла при моделировании дефицита оксида азота регистрировали артериальное давление при эндотелийнезависимой и эндотелийзависимой вазодилатации. Эндотелийнезависимая вазодилатация осуществлялась посредством болюсного введения нитропруссид (НП) натрия (30 мкг/кг) в правую бедренную артерию [1], эндотелийзависимая – введением ацетилхолина (АХ) (40 мкг/кг) [8]. Далее высчитывали коэффициент эндотелиальной дисфункции (КЭД) по формуле: $KЭД = САД_{НП} / САД_{АХ}$, где САД НП – площадь треугольника над кривой восстановления АД, причём точками меньшего катета являются точка максимального падения АД и точка выхода уровня АД на плато при проведении функциональной пробы с введением нитропруссид, САД АХ – площадь треугольника над кривой восстановления АД при проведении пробы с ацетилхолином, причём за меньший из катетов принимают разность между точкой окончания брадикардического кардиального компонента и точкой восстановления АД. Этот показатель отражает изменение реактивности сосудистого русла при моделировании дефицита оксида азота и позволяет оценить степень коррекции эндотелиальной дисфункции [3, 4]. Для оценки функциональных возможностей миокарда у животных проводили нагрузочные пробы: пробу на адренореактивность (внутривенное введение адреналина гидрохлорида 1×10^5 моль/л, в дозе 0,1 мл/100 г) [2], нагрузку сопротивлением (пережатие восходящей аорты на 30 с).

Достоверность изменений абсолютных параметров определяли разностным методом вариационной статистики с нахождением средних значений сдвигов (M), средней арифметической ($\pm m$) и вероятности возможной ошибки (p) по таблицам Стьюдента. Различия оценивали как достоверные при $p < 0,05$. Статистические расчёты проводились с использованием программы Microsoft Excel 7.0.

Результаты исследования. В группе с моделированием L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции выявлено развитие артериальной гипертензии. В группе животных, получавших сверхмалые дозы антител к фактору роста эндотелия сосудов VEGF, не выявлено снижения показателей исходных значений АД (табл. 1).

В контрольной группе на фоне введения L-NAME происходило увеличение соотношения эндотелийнезависимой к эндотелийзависимой вазодилатации, при этом КЭД составлял $3,5 \pm 0,5$, в то время как у интактных крыс он составил $1,2 \pm 0,1$. В группе животных, получавших сверхмалые дозы антител к VEGF, КЭД составил $1,7 \pm 0,1$ (табл. 1).

Таблица 1

Показатели артериального давления и коэффициента эндотелиальной дисфункции при моделировании и коррекции L-NAME-индуцированного дефицита оксида азота ($M \pm m$, n=10)

Группы животных	САД, мм рт.ст.	ДАД, мм рт.ст.	КЭД
Интактные	$139,2 \pm 5,4$	$104,2 \pm 4,7$	$1,2 \pm 0,1$
Получавшие L-NAME (12,5 мг/кг) 28 дней (контроль)	$204,8 \pm 10^*$	$164,2 \pm 5,9^*$	$3,5 \pm 0,5^{**}$
Получавшие L-NAME + сверхмалые дозы антител к VEGF	$200,6 \pm 8,2$	$162,8 \pm 6,1$	$1,7 \pm 0,1^k$

Примечание: САД – систолическое артериальное давление, ДАД – диастолическое артериальное давление, ^{**} – достоверное различие с группой интактных животных ($p < 0,05$); ^k – достоверное различие с контрольной группой ($p < 0,05$).

Полученные результаты свидетельствуют о коррекции эндотелиальной дисфункции раствором сверхмалых доз антител к VEGF на модели L-NAME-индуцированного дефицита оксида азота, при отсутствии существенного влияния на развитие артериальной гипертензии.



При проведении пробы на адренореактивность в контрольной группе животных систолическое левожелудочковое давление оказалось значительно выше (281,1±6,5 мм рт. ст.), чем в группе интактных животных (199,8±9,9 мм рт. ст.). Введение сверхмалых доз поликлональных кроличьих антител к VEGF снижало систолическое левожелудочковое давление до 243,9±9,9 мм рт. ст. (табл. 2).

Таблица 2

Влияние сверхмалых доз поликлональных кроличьих антител к eNOS на функциональные возможности миокарда при проведении нагрузочных проб на фоне моделирования L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции (M±m, n=10)

Группа животных	Адренореактивность (мм рт.ст.)	Исчерпание миокардиального резерва (%)
Интактные	199,8±9,9	93,9 %
Получавшие L-NAME (12,5 мг/кг) 28 дней (контроль)	281,1±6,5 ^н	67,5 % ^н
Получавшие L-NAME + сверхмалые дозы антител к VEGF	243,9±9,9 ^н	97,1 % ^к

Примечание: ^н– достоверное различие с группой интактных животных (p<0,05); ^к– достоверное различие с контрольной группой (p<0,05).

В пробе на нагрузку сопротивлением рассчитывался показатель исчерпания миокардиального резерва, равный отношению прироста систолического левожелудочкового давления на 5 с пережатия аорты к приросту систолического левожелудочкового давления на 25 с пережатия аорты, выраженный в процентах.

В группе интактных животных этот показатель составил 93,9%, в контрольной группе – 67,5%. У животных, получавших сверхмалые дозы антител к VEGF, данный показатель не только достоверно отличался от контрольной группы, но и превосходил значения у интактной группы (97,1 %).

Таким образом, результаты исследования функционального состояния миокарда при проведении нагрузочных проб выявили отчетливое кардиопротективное действие сверхмалых доз антител к фактору роста эндотелия сосудов VEGF, выражающееся в снижении адренореактивности, падении систолического левожелудочкового давления при проведении пробы на нагрузку сопротивлением по сравнению с контрольными животными.

Проведенные исследования обнаружили, что сверхмалые дозы антител к фактору роста эндотелия сосудов VEGF обладают эндотелио- и кардиопротективными свойствами.

Результаты проведенного исследования позволяют рекомендовать дальнейшее клиническое изучение сверхмалых доз антител к фактору роста эндотелия сосудов VEGF для коррекции эндотелиальной дисфункции Перспективным является изучение данного раствора сверхмалых доз антител в комбинации с классическими антигипертензивными препаратами.

Литература

1. Новый взгляд на коррекцию эндотелиальной дисфункции / А.С. Белоус, М.В. Покровский, В.И. Кочкаров и др. // Russian Journal of Immunology (Official Journal of Russian Society of Immunology): материалы Рос. науч.-практ. конф. «Современные технологии в иммунологии: иммунодиагностика и иммунотерапия». – Курск, 2006. – С. 59-63.
2. Затейщикова, А.А. Эндотелиальная регуляция сосудистого тонуса: методы исследования и клиническое значение / А.А. Затейщикова, Д.А. Затейщиков // Кардиология. – 1998. – Т. 38, № 9. – С. 68-80.
3. 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 и др. // Кубанский научно-медицинский вестник. – 2006. – № 10. – С.72-77.
4. Пат. 2301015 Российская Федерация, МПК⁷ А61В 5/02. Способ оценки эндотелиальной дисфункции / Покровский М.В., Покровская Т.Г., Кочкаров В.И. и др.; заявители и патентообладатели Покровский М.В., Покровская Т.Г., Кочкаров В.И. – № 2005113243/14; заявл. 10.1.2006; опубл. 20.06.07, Бюл. № 17. – 7 с.: ил.



5. Сверхмалые дозы антител: закономерности действия *in vitro* при бипатическом введении на модели длительной посттетанической потенциации / О.И. Эпштейн, Н.А. Береговой, Т.М. Панкова и др. // Бюл. exper. биол. медицины. – 2003. – Прил. 1. – С. 20-23.

6. Эпштейн, О.И. Нейрофизиологические механизмы фармакологических эффектов потенцированных («гомеопатизированных») антител к мозгоспецифическому белку S-100: автореф. дис. ... канд. мед. наук / О.И. Эпштейн. – Томск, 1999. – 24 с.

7. Влияние потенцированной формы антител к мозгоспецифическому белку S-100 на интегративную деятельность мозга / О.И. Эпштейн, Т.М. Воробьева, О.Г. Берченко // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1999. – Т. 127, № 5. – С. 547-549.

8. Laursen, J.B. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension / J.B. Laursen, S. Rajagopalan, Z. Galis // Circulation. – 1997. – Vol. 95. – P. 588-593.

ULTRALOW DOSES OF ANTIBODIES TO VEGF, AS A MEANS OF CORRECTION OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION

A.S. BELOUS

Kursk State Medical University

e-mail: a.s.belous@mail.ru

Modelling of L-NAME – induced deficiency of nitric oxide (intraperitoneal administration of L-NAME at a dose of 12.5 mg / kg for 28 days) in rats led to the development of endothelial dysfunction. In this model marked cardioprotective and endothelioprotective properties of ultra-low doses of antibodies to vascular endothelial growth factor VEGF have been identified.

Key words: VEGF, the endothelium, nitric oxide, L-Name.