

КИРИЧЕНКО ТАТЬЯНА ВЛАДИМИРОВНА

ВЛИЯНИЕ АНТИЦИТОКИНОВОЙ ТЕРАПИИ НА ТЕЧЕНИЕ
АТЕРОСКЛЕРОЗА У ЛИЦ С РАННИМИ НЕВРОЛОГИЧЕСКИМИ
ПРОЯВЛЕНИЯМИ НЕДОСТАТОЧНОСТИ МОЗГОВОГО
КРОВООБРАЩЕНИЯ

14.03.03 - Патологическая физиология

14.01.11 – Нервные болезни

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2011

Работа выполнена в лаборатории клинической патологии мотонейрона и лаборатории клеточных механизмов атерогенеза Учреждения Российской АМН Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии РАМН.

Научный руководители:

доктор медицинских наук

Меркулова Дина Мироновна

доктор медицинских наук

Собенин Игорь Александрович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор

Малышев Игорь Юрьевич

доктор медицинских наук, профессор

Камчатнов Павел Рудольфович

Ведущее учреждение: Первый Московский Государственный Медицинский Университет имени И.М. Сеченова

Автореферат разослан «__» _____ 2010 г.

Защита диссертации состоится «__» _____ 2011 года в «__» часов на заседании Диссертационного Совета Д 001.003.01. при УРАМН НИИ общей патологии и патофизиологии Российской АМН по адресу: 125315, Москва, Балтийская ул., 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института.

Ученый секретарь

диссертационного Совета

кандидат медицинских наук

Л.Н. Скуратовская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Атеросклероз в настоящее время является важнейшей медико-социальной проблемой, так как лежит в основе патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний, составляющих более 50% в структуре смертности и являющихся ведущей причиной инвалидизации населения в большинстве развитых стран. По статистическим данным American Heart Association на 2007 г. Россия занимает первое место в мире по уровню смертности как от сердечно-сосудистых заболеваний в целом, так и от инсульта в частности.

Атеросклероз — полиэтиологическое заболевание, и длительное время считалось, что основным патогенетическим механизмом в формировании атеросклеротических поражений является модификация липидов крови и липидная инфильтрация сосудистой стенки. Однако с 80-х годов XX века было проведено большое количество исследований, посвященных изучению роли воспаления в атерогенезе [Ross R., 1999; Falk E., 2006]. В настоящее время существует обоснованное представление, что локальное асептическое воспаление играет важную роль в прогрессировании атеросклероза [Aidinian G. et al., 2006; Libby P., 2006]. При благоприятном течении воспалительного процесса развитие атеросклеротического поражения заканчивается репаративной фазой и формированием зрелой атеросклеротической бляшки, покрытой прочной фиброзной крышкой. При неблагоприятном течении процесса происходит формирование очага хронического воспаления, что морфологически проявляется нестабильной липофиброзной бляшкой, склонной к разрыву. Выработанная концепция формирования ранних атеросклеротических поражений позволяет осуществить разработку подходов к воздействию на основные патогенетические механизмы атерогенеза. Особого внимания заслуживает изучение синтеза и секреции цитокинов, являющихся первичными медиаторами воспаления. Не существует данных о том, каким образом подавление цитокинового звена воспаления влияет на естественное течение атеросклероза у человека, возможности применения противовоспалительного воздействия как патогенетического подхода к профилактике и терапии атеросклероза практически не изучены. Только своевременное начало патогенетической профилактики атеросклероза может предотвратить такие серьезные клинические осложнения атеросклероза, как ишемический инсульт, острый инфаркт миокарда, гангрена нижних конечностей. Существуют данные о том, что признаки атеросклероза, выявленные с помощью ультразвукового исследования сосудистой стенки, являются важными прогностическими факторами развития острых нарушений мозгового кровообращения в сердце и головном мозге [O'Leary D.H. et al, 1999; Bots M.L. et al, 2006]. Однако, нет данных о том, каким образом бессимптомный атеросклероз взаимосвязан с субклиническими изменениями в органах-мишенях, в частности, с ранними неврологическими проявлениями недостаточности мозгового кровообращения.

Цель исследования: изучение влияния подавления цитокинового звена воспаления на прогрессирование атеросклероза в сонных артериях при ранних неврологических проявлениях недостаточности мозгового кровообращения.

Задачи исследования:

1. Разработка подхода к изучению регуляции цитокинового звена воспаления на основе клеточной модели экспрессии медиаторов воспаления.
2. Разработка комбинации натуральных продуктов, обладающей антицитокиновым действием в условиях клеточной модели.
3. Изучение антиатерогенной активности полученной комбинации натуральных продуктов в условиях клеточной модели.
4. Изучение противовоспалительной эффективности разработанного подхода в животной модели острого асептического воспаления.
5. Изучение клинической эффективности разработанного подхода к антицитокиновой терапии при хронических воспалительных заболеваниях опорно-двигательного аппарата.
6. Изучение антиатеросклеротической эффективности разработанного подхода к антицитокиновой терапии на течение субклинического каротидного атеросклероза у лиц с ранними неврологическими проявлениями недостаточности мозгового кровообращения.
7. Изучение взаимосвязи течения атеросклероза и ранних неврологических проявлений недостаточности мозгового кровообращения в условиях антицитокиновой терапии.

Научная новизна. Впервые изучено влияние настоев лекарственных растений на экспрессию провоспалительных цитокинов — интерлейкина-1 (ИЛ-1), фактора некроза опухоли- α (ФНО- α) в клеточной культуре моноцитов-макрофагов крови человека. Выявлены натуральные компоненты, которые обладают благоприятным действием на экспрессию медиаторов воспаления — межклеточной молекулы адгезии (ICAM-1) молекулы главного комплекса гистосовместимости (HLA-DR), а также провоспалительных цитокинов ИЛ-1 и ФНО- α . Изучено действие различных комбинаций натуральных продуктов на эти параметры. Выявлено, что комбинация плодов бузины черной, цветков календулы обыкновенной и травы фиалки трехцветной обладает наибольшей антицитокиновой активностью в клеточной системе. Показано, что эта комбинация обладает антиатерогенным действием, т.е. снижает способность сыворотки крови вызывать накопление холестерина в клеточной культуре моноцитов-макрофагов крови человека. Впервые продемонстрировано, что данная комбинация натуральных продуктов способна оказывать противовоспалительное действие на уровне организма, что показано в животной модели асептического воспаления у крыс. Впервые показано, что эта растительная комбинация обладает клинической эффективностью в отношении воспалительных заболеваний суставов и позвоночника. Впервые показано, что комплекс бузины, календулы и фиалки при длительном приеме препятствует естественной прогрессии атеросклероза.

Совместно с В.А. Мясоедовой впервые продемонстрировано, что существует взаимосвязь между прямыми показателями атеросклероза (толщина интимо-медиального слоя сонных артерий) и минимальными изменениями в неврологическом статусе вследствие недостаточности мозгового кровообращения. Впервые было показано, что на фоне антицитокиновой терапии с использованием натурального комплекса лекарственных растений наблюдается корреляционная зависимость между прогрессированием атеросклероза (увеличением максимальной толщины комплекса интима-медия (КИМ)) и динамикой ранних неврологических проявлений недостаточности мозгового кровообращения.

Практическая значимость. Был разработан патогенетический подход к профилактике и терапии атеросклероза, основанный на подавлении цитокинового звена воспаления, который может применяться длительное время на ранних этапах развития атеросклеротических поражений в доклиническую фазу. Разработан и внедрен в практику натуральный препарат инфламинат на основе цветков календулы обыкновенной, травы фиалки трехцветной и плодов бузины черной в равном соотношении, обладающий антицитокиновой активностью. Препарат зарегистрирован в качестве биологически активной добавки к пище (санитарно-эпидемиологическое заключение №77.99.20.919.Б.000411.03.04. от 12.03.2004 г.; свидетельство о государственной регистрации №77.99.23.3.У.4656.5.09 от 18.05.2009 г.). Выявленная зависимость прямых показателей атеросклероза и ранних неврологических изменений, развивающихся вследствие недостаточности мозгового кровообращения, является обоснованием для проведения комплексного обследования пациентов с субклиническим атеросклерозом для предотвращения развития ишемического инсульта.

Положения, выносимые на защиту:

1. Натуральный препарат инфламинат на основе календулы, бузины и фиалки обладает антицитокиновым действием в культуре клеток, противовоспалительным действием в животной модели воспаления и имеет клиническую эффективность у больных с воспалительными заболеваниями опорно-двигательного аппарата.

2. Инфламинат подавляет атерогенность сыворотки крови человека, т.е. способность сыворотки крови вызывать накопление холестерина в культивируемых клетках, а также обладает антиатеросклеротическим действием у людей с субклиническим атеросклерозом сонных артерий.

3. Ранние неврологические проявления недостаточности мозгового кровообращения сопряжены с бессимптомным атеросклерозом, определяемым как увеличение толщины комплекса интима-медия сонных артерий.

4. Существует взаимосвязь между динамикой минимальной неврологической симптоматики недостаточности мозгового кровообращения и прогрессированием атеросклероза, а именно увеличением максимальной толщины КИМ.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на 75-м Конгрессе европейского атеросклеротического общества (Прага, 2005); 6-м Международном конгрессе по ишемической болезни сердца (Стамбул, 2005); 13-м Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2006); 14-м Международном симпозиуме по атеросклерозу (Рим, 2006); 76-м Конгрессе европейского атеросклеротического общества (Хельсинки, 2007); 16-м Международном симпозиуме по лекарствам, влияющим на обмен липидов (Нью-Йорк, 2007); 77-м Конгрессе европейского атеросклеротического общества (Стамбул, 2008); 15-м Международном симпозиуме по атеросклерозу (Бостон, 2009).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 16 научных работ в центральных академических, медицинских и международных изданиях.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 130 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных результатов и их обсуждения, практических рекомендаций, выводов и списка цитированной литературы. Работа содержит 29 таблиц, проиллюстрирована 6 рисунками. Библиография включает 219 ссылок на работы отечественных и зарубежных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выделение моноцитов проводили из крови здоровых мужчин и женщин в возрасте от 25 до 45 лет методом градиентного центрифугирования, и культивировали до их созревания в макрофаги [Adams D.O., 1979].

Для изучения влияния лекарственных средств на экспрессию провоспалительных цитокинов в модели *in vitro* в культуру клеток добавляли настои изучаемых натуральных продуктов. Для стимуляции экспрессии провоспалительных цитокинов в модели *in vitro* в культуральную среду также добавляли бактериальный липополисахарид. В модели *ex vivo* в культуру клеток добавляли сыворотку крови человека, полученную после приема этих лекарственных средств, в концентрации 10%. Контрольные клетки инкубировали в культуральной среде, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco). После инкубации в течение 24 ч оценивали уровень экспрессии медиаторов воспаления ИЛ-1, ФНО- α , ICAM-1 и HLA-DR в первичной культуре макрофагов методом иммуно-ферментного анализа.

В экспериментах по изучению антиатерогенного эффекта лекарственных средств в культуральную среду добавляли сыворотку крови человека после приема препаратов в концентрации 10%. Для контроля использовали культуральную среду, содержащую 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco). После инкубации в течение 24 ч содержание холестерина в контрольных и опытных культурах клеток определяли ферментативным методом с помощью коммерческих китов “Monotest” (Boehringer Mannheim GmbH, Германия).

В экспериментах по изучению противовоспалительной активности БАД инфламинат использовали животную модель асептического воспаления кожи крыс после криповреждения. В качестве препарата сравнения использовали НПВП диклофенак. Материал для приготовления гистологических образцов (участок кожи размером 1x2 см, параллельный позвоночнику) забирали в день операции и через 1, 2, 5 и 7 суток после нее. Окраску срезов на гематогенные клетки проводили с помощью моноклональных антител CDLC к Т- и В-лимфоцитам (Dako, США). Окраску срезов на тучные клетки проводили с помощью 0,05% раствора гистологического красителя толуидинового синего. Окраску срезов на коллаген проводили с помощью пикрофуксина. Общую толщину кожи и толщину сетчатого слоя кожи измеряли с помощью окуляр-микрометра на световом микроскопе “Jenaval” (Carlzeiss, Германия).

В пилотном клиническом исследовании противовоспалительной активности инфламната при хронических воспалительных заболеваниях опорно-двигательного аппарата приняли участие 11 человек со средним возрастом 45 лет. Срок наблюдения составил 20 дней.

В исследовании антиатеросклеротической эффективности инфламната при ранних неврологических проявлениях недостаточности мозгового кровообращения приняли участие 85 мужчин, средний возраст которых составил 63 года. Длительность наблюдения составила 2 года.

Для прямой количественной характеристики каротидного атеросклероза использовали метод ультразвукового сканирования сонных артерий в режиме высокого разрешения с последующим измерением толщины КИМ (комплекса интима-медия).

В исследование включали лиц с минимальными неврологическими проявлениями недостаточности мозгового кровообращения, не имеющих выраженных клинических проявлений атеросклероза, у которых по данным ультразвукового сканирования сонных артерий определялось утолщение КИМ более 1000 мкм.

Оценку сердечно-сосудистых рисков проводили с использованием модели Вейбулла и модели пропорциональных рисков Кокса. Расчетные риски корректировали в соответствии с поправкой для Московского региона.

Содержание общего холестерина и триглицеридов определяли ферментативным методом с помощью наборов Boehringer Mannheim (Германия). Содержание холестерина липопротеидов высокой плотности определяли также ферментативным методом после осаждения липопротеидов других классов с помощью преципитирующего реагента Boehringer Mannheim (Германия). Содержание холестерина липопротеидов низкой плотности определяли по формуле Фридевальда.

Неврологический статус оценивали по 4-бальной системе (0 баллов — отсутствие неврологического симптома, 3 балла — максимальная выраженность неврологического симптома). Для последующего анализа использовали интегральный показатель неврологического статуса, представляющий собой сумму баллов. При оценке неврологической

симптоматики учитывали субъективные жалобы участников исследования, а также определяли функцию черепно-мозговых нервов, показатели координации и статики, изменения в чувствительной и двигательной сферах, пирамидной системе.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного пакета SPSS версии 14.0 (SPSS Inc., США). Для сравнения распределений номинальных показателей использовали показатель хи-квадрат по Пирсону. Для межгрупповых сравнений непрерывных показателей использовали тест Манна-Уитни. Для оценки изменений непрерывных показателей в динамике внутри групп использовали парный тест Уилкоксона. Для оценки межгрупповых различий изменений непрерывных показателей использовали односторонний вариационный анализ. Данные представляли в виде средней величины и стандартной ошибки, при необходимости в скобках указывали стандартное отклонение и границы 95% доверительного интервала. Статистически значимым считали различие средних величин при $p < 0,05$. Графическое представление данных проводили с использованием пакета SigmaPlot версии 9.0 (SPSS Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Антицитокиновая эффективность различных натуральных компонентов и их комбинаций в условиях клеточной модели. При первичном скрининге в модели *in vitro* была изучена антицитокиновая активность 31 лекарственного растения. Фиалка, бузина, календула, боярышник и зверобой наиболее эффективно подавляли экспрессию ИЛ-1, т.е. на 15% и более от контрольного уровня.

В модели *ex vivo* было изучено влияние приема водных настоев лекарственных трав на способность сыворотки крови человека индуцировать экспрессию провоспалительных цитокинов ИЛ-1 и ФНО- α , межклеточной молекулы адгезии ICAM-1 и молекулы главного комплекса гистосовместимости HLA-DR в культуре клеток. Наиболее выраженным интегральным эффектом (среднее снижение экспрессии цитокинов в течение 8 часов после однократного приема настоя лекарственных трав) на экспрессию ИЛ-1 обладала бузина ($75,7 \pm 2,3\%$ от исходного уровня), на экспрессию ФНО- α – календула ($71,3 \pm 13,9\%$ от исходного уровня). Зверобой и календула с равной эффективностью подавляли способность сыворотки крови вызывать экспрессию HLA-DR (интегральный эффект в течение 8 часов составил $82,2 \pm 6,3\%$ и $82,6 \pm 5,5\%$ от исходного уровня, соответственно). Наиболее выраженным влиянием на экспрессию межклеточной молекулы адгезии ICAM-1 обладала фиалка (интегральный эффект в течение 8 часов $78,4 \pm 14,3\%$ от исходного уровня), аналогичным эффектом обладала календула ($80,2 \pm 5,0\%$ от исходного уровня). Наименее эффективным в отношении всех исследованных медиаторов воспаления явился боярышник.

На следующем этапе исследования проверили предположение о том, что при использовании различных комбинаций лекарственных трав может происходить взаимное потенцирование антицитокиновой активности. Наиболее эффективно экспрессия провоспалительных цитокинов снижалась при добавлении сыворотки, взятой после приема настоя комбинации бузины, календулы и фиалки. Интегральный показатель снижения экспрессии ИЛ-1 при применении данной комбинации составил $21,7 \pm 4,2\%$, экспрессии ФНО- α – $19,9 \pm 3,5\%$.

На основе исследованной комбинации лекарственных трав был разработан и зарегистрирован в качестве биологически активной добавки противовоспалительный препарат инфламинат, содержащий в качестве активных компонентов 165 мг цветков календулы обыкновенной, 165 мг плодов бузины черной и 165 мг травы фиалки трехцветной в одной капсуле (санитарно-эпидемиологическое заключение №77.99.20.919.Б.000411.03.04. от 12.03.2004 г.; свидетельство о государственной регистрации №77.99.23.3.У.4656.5.09 от 18.05.2009 г.).

Противовоспалительная и антиатерогенная активность БАД «Инфламинат» в модели ex vivo. В исследовании приняли участие 46 мужчин и женщин со средним возрастом 61 год, у которых по результатам первичного скрининга сыворотка крови вызывала экспрессию ИЛ-1 и ФНО- α , т.е. обладала провоспалительным потенциалом, а также вызывала накопление внутриклеточных липидов в культивируемых макрофагах крови человека, т.е. была атерогенной.

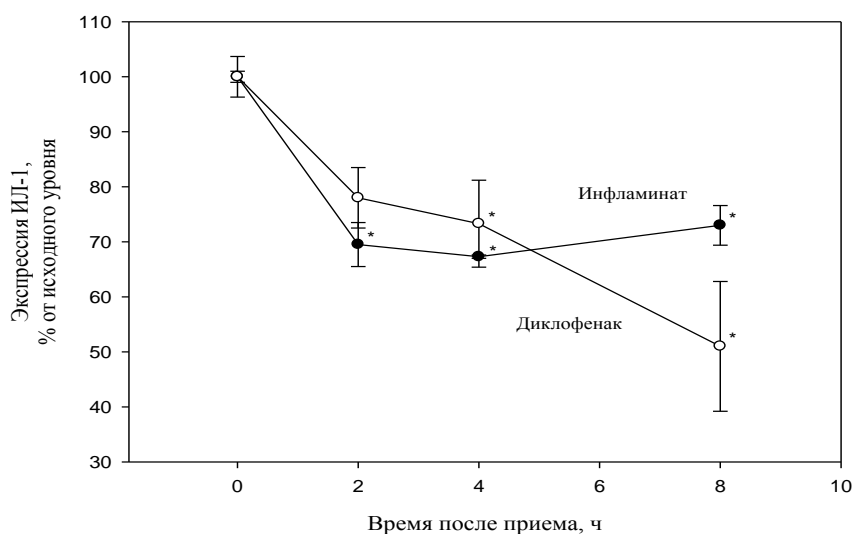


Рис.1. Снижение экспрессии ИЛ-1 после однократного приема диклофенака и инфламината.

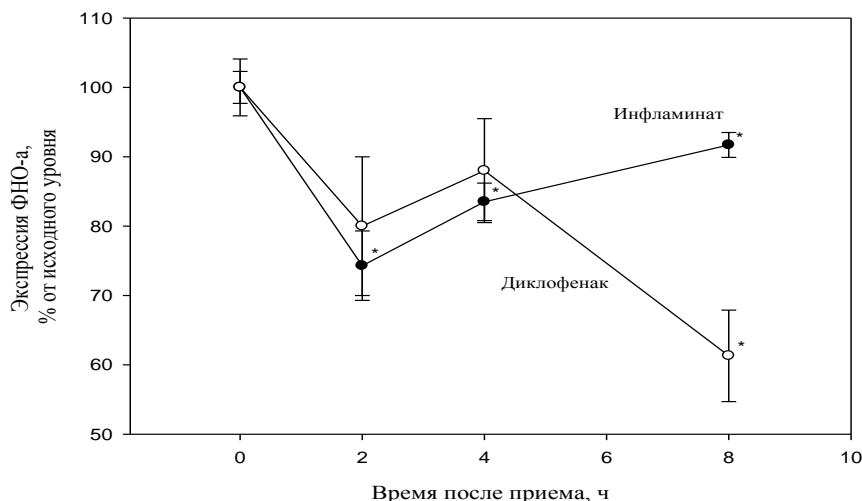


Рис.2. Снижение экспрессии ФНО-α после однократного приема диклофенака и инфламната.

Продемонстрировано, что прием инфламната вызывает снижение провоспалительного потенциала сыворотки крови человека в отношении цитокинов ИЛ-1 и ФНО-α, при этом антицитокиновый эффект инфламната сравним с активностью НПВП диклофенак (Рис.1,2). Интегральный показатель снижения экспрессии ИЛ-1 после приема инфламната составил $23,5 \pm 2,2\%$ ($p < 0,05$), экспрессии ФНО-α – $16,8 \pm 1,8\%$ ($p < 0,05$). Интегральный эффект диклофенака в отношении ИЛ-1 составил $32,6 \pm 10,2\%$ ($p = 0,003$), в отношении ФНО-α – $23,6 \pm 9,7\%$ ($p = 0,022$). Таким образом, интегральный показатель антицитокиновой активности инфламната составил $92,0 \pm 6,1\%$ ($p = 0,194$, н.д.) от активности диклофенака в отношении ИЛ-1 и $71,2 \pm 26,2\%$ ($p = 0,276$, н.д.) в отношении ФНО-α.

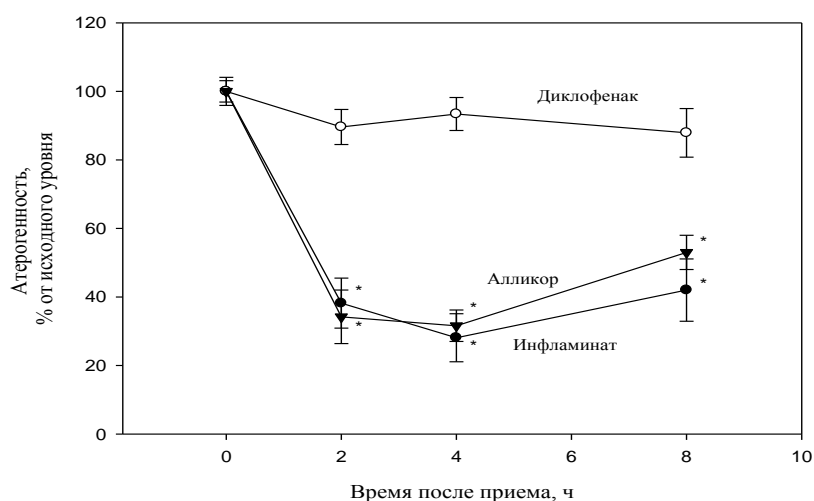


Рис. 3. Снижение атерогенности сыворотки крови после однократного приема диклофенака, алликора и инфламната.

При исследовании антиатерогенной активности инфламината показано, что после приема препарата способность сыворотки крови вызывать накопление внутриклеточного холестерина в культуре клеток снижается в среднем на $63,9 \pm 5,1\%$ ($p < 0,001$) за 8 часов, аналогичное действие оказывает алликор — препарат на основе чесночного порошка, используемый для сравнения по антиатерогенной активности (Рис.3). Диклофенак не обладает антиатерогенным эффектом в культуре клеток.

Противовоспалительная активность БАД «Инфламинат» на животной модели. Показано, что применение инфламината при асептическом воспалении приводит к существенному уменьшению сроков восстановления после криповреждения в отношении толщины кожи (Рис.4).

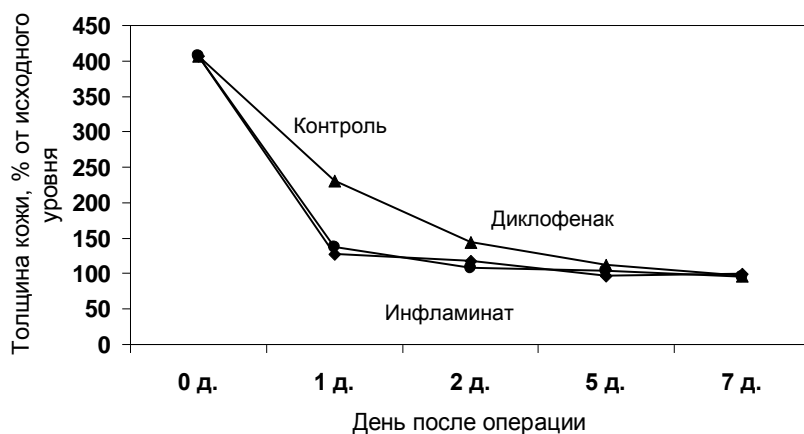


Рис. 4. Изменение толщины кожи у крыс после криповреждения на фоне приема инфламината в сравнении с диклофенаком.

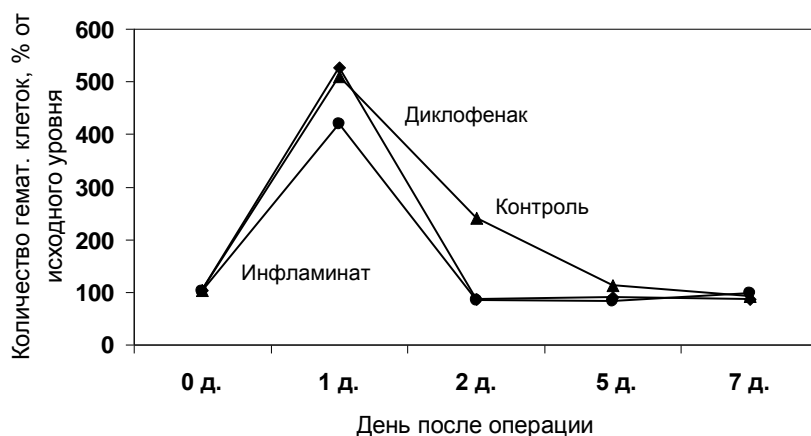


Рис. 5. Изменение количества гематогенных клеток в коже крыс после криповреждения на фоне приема инфламината в сравнении с диклофенаком.

Применение инфламината приводит к существенному уменьшению сроков восстановления количества гематогенных (Рис.5) и тучных (Рис.6) клеток. Противовоспалительная активность инфламината сравнима с эффектом НПВП диклофенак. Содержание коллагена в сетчатом слое кожи снижалось сразу после криотравмы на $16 \pm 4\%$. Далее содержание коллагена в области

криповреждения изменялось в одинаковой степени как в контрольной, так и в опытных группах, и восстанавливалось до прежних значений на 5-й день эксперимента.

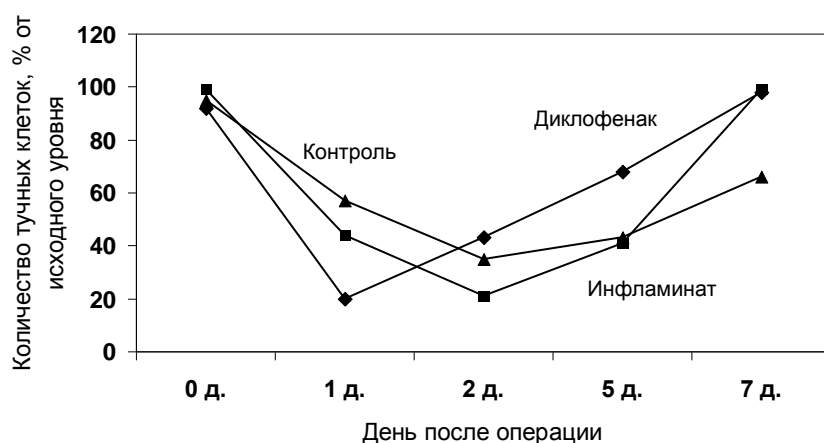


Рис. 6. Изменение количества тучных клеток в коже крыс после криповреждения на фоне приема инфламмината в сравнении с диклофенаком.

Клиническая эффективность БАД «Инфламминат» при хронических воспалительных заболеваниях опорно-двигательного аппарата. У участников исследования мониторировали биохимические показатели, параметры лейкоцитарной формулы, ревматоидный фактор, показатели клеточного и гуморального иммунитета, сывороточный уровень провоспалительных цитокинов. На фоне приема инфламмината не было продемонстрировано достоверного изменения этих показателей. Благоприятные изменения были отмечены среди клинических параметров, выражающиеся в сокращении количества пораженных суставов, снижении интенсивности болевого синдрома и изменении его характера (снижение частоты "резких" болей, преобладание "тянущих" болей постоянного характера после лечения).

Таблица 1.

Субъективная оценка эффективности препарата.

| Оценка эффективности | Количество человек | Z-критерий |
|-------------------------------------|--------------------|------------|
| полный эффект | 2 | -3,69 |
| хороший эффект, сопоставимый с НПВП | 1 | -2,38 |
| удовлетворительный эффект | 6 | -0,49* |
| нет эффекта | 2 | -3,67 |

При субъективной оценке эффективности препарата, используя 0-гипотезы, эффект инфламмината можно считать удовлетворительным, так его оценили человек из 11 (таблица 1).

Антиатеросклеротическая активность БАД «Инфламминат» при субклиническом атеросклерозе. Для изучения антиатеросклеротической

эффективности инфламината было проведено двойное слепое плацебо-контролируемое исследование, в котором приняли участие 85 мужчин средним возрастом 63 года, имеющих от одного до четырех мажорных факторов риска развития ишемической болезни сердца (прежде всего, гиперхолестеринемию и повышенное артериальное давление), средне-высокие и высокие степени риска инфаркта миокарда и внезапной коронарной смерти, не имеющих в настоящее время клинических признаков атеросклеротических заболеваний, но характеризующихся скрытым (субклиническим) атеросклерозом. У всех участников исследования средняя толщина данного слоя существенно превышала возрастную норму (650 мкм), а максимальная толщина слоя превышала 1000 мкм, что является прямым диагностическим критерием атеросклероза (таблица 2).

Таблица 2.

Прямые количественные показатели атеросклероза в исследуемых группах.

| Признак | Группа активного воздействия | Группа плацебо | Различия между группами, p |
|-------------------------------|------------------------------|---------------------|----------------------------|
| Средняя толщина КИМ, мкм | 943 (908-979) | 913 (867-959) | 0,290 |
| Максимальная толщина КИМ, мкм | 1099 (1055-1143) | 1055 (1101-1109) | 0,198 |
| Наличие АСБ, баллы | 1,02 (0,75-1,30) | 0,84 (0,53-1,15) | 0,381 |

Длительность наблюдения составила 2 года. Обследование проводилось 1 раз в 6 месяцев, у участников исследования оценивали соматический и неврологический статус, липидный профиль, проводили ультразвуковое исследование сонных артерий.

За время наблюдения у участников исследования в обеих группах была отмечена положительная динамика в отношении ряда клинических параметров. Так, статистически значимо снизился уровень систолического и диастолического артериального давления, отмечено достоверное уменьшение показателей липидного профиля — статистически значимо снизился уровень общего холестерина, триглицеридов, липопротеидов низкой плотности. Холестерин циркулирующих иммунных комплексов — маркер активности атеросклеротического процесса — практически не изменился в группе активного воздействия (-0,6 (-2,0; 0,8), $p=0,316$) и увеличился статистически достоверно в группе плацебо (1,9 (0,6; 3,2), $p=0,010$). Отмечалось также снижение прогностических рисков ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда, не достигшее, однако, уровня статистической значимости.

Наиболее важные данные получены в отношении прямых показателей каротидного атеросклероза. Скорость изменения толщины комплекса интима-медия достоверно отличалась в обеих группах ($p=0,031$ для средней толщины КИМ и $p=0,029$ для максимальной). Так, в группе плацебо скорость увеличения средней и максимальной толщины интима-медиального комплекса составила

19±4(23) мкм/год и 16±4(25) мкм/год, соответственно. В группе активного воздействия также отмечалось увеличение средней толщины КИМ, но с меньшей скоростью 5±5(32) мкм/год; максимальная толщина КИМ изменялась со скоростью 0±6(39) мкм/год. В таблице 3 представлены данные об изменении количественных показателей атеросклероза за время наблюдения участников исследования.

Таблица 3.

Изменения прямых количественных показателей атеросклероза у участников исследования.

| Показатель | Группа активного воздействия | Группа плацебо | p** |
|---|------------------------------|--------------------------|---------|
| Изменение средней толщины КИМ, мкм | 12 (-7; 32) p=0,104 | 41 (26; 54)* p=0,001 | 0,019** |
| Изменение максимальной толщины КИМ, мкм | 2 (-19; 26) p=0,577 | 28 (11; 45)* p=0,011 | 0,074 |
| Изменение выраженности АСБ, баллы | 0,1 (-0,1; 0,3) p=0,271 | 0 (-0,3; 0,3) p=0,783 | 0,482 |

* достоверное изменение показателей, $p < 0,05$;

** оценка достоверности различий между группами, выполнена по критерию Манна-Уитни.

Изменения средней и максимальной толщины КИМ в исследуемых группах представлены в графическом виде на рисунках 7 и 8.

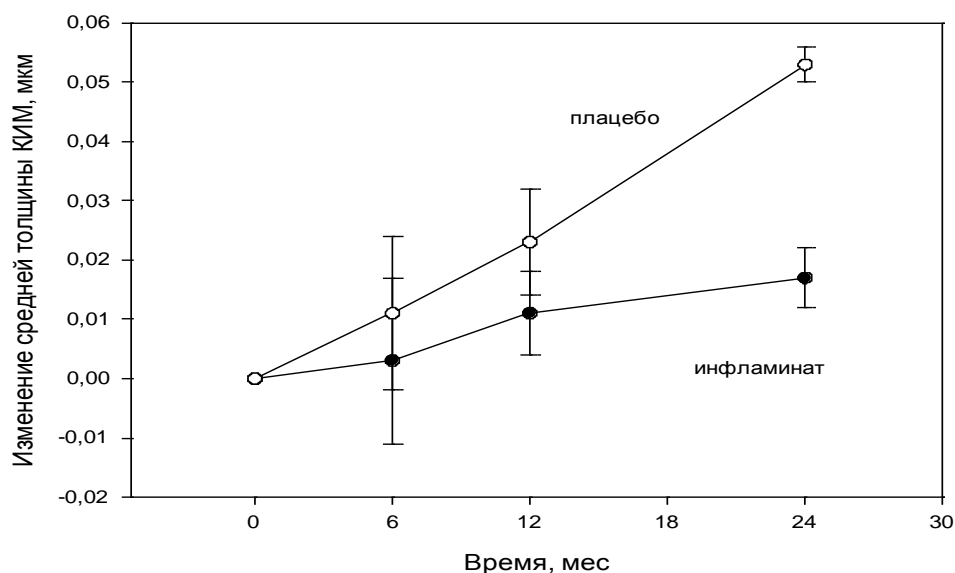


Рис. 7. Динамика изменения средней толщины КИМ за 2 года в исследуемых группах.

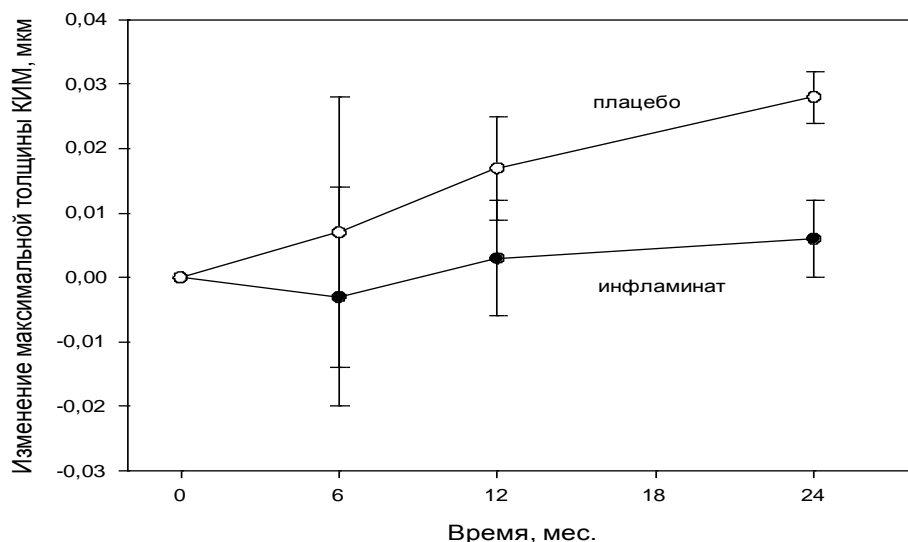


Рис. 8. Динамика изменения максимальной толщины КИМ за 2 года в исследуемых группах.

Таким образом, инфлимаинат обладает прямым антиатеросклеротическим действием, способствуя замедлению прогрессирования толщины КИМ — маркера ранних атеросклеротических поражений.

Взаимосвязь прямых показателей и факторов риска атеросклероза с ранними неврологическими проявлениями недостаточности мозгового кровообращения. Роль диффузного интимо-медиального утолщения сонных артерий в ранней диагностике цереброваскулярной патологии изучалась у участников исследования антиатеросклеротической эффективности инфлимаината. Исходно интегральный показатель неврологического статуса не различался между группами ($p=0,983$) и составил $10,4 \pm 1,4$ (9,7) в группе активного воздействия и $10,2 \pm 1,3$ (7,88) в группе плацебо. За два года наблюдения интегральный показатель неврологического статуса в группе активного воздействия увеличился на $4,8 \pm 1,1$ (6,8) балла ($p < 0,001$), а в группе плацебо на $3,2 \pm 0,9$ (4,6) балла ($p=0,002$), при этом достоверных отличий в динамике неврологической симптоматики между группами выявлено не было ($p=0,258$). Однако, несмотря на статистическую значимость, клинической значимости эти изменения не имели. Динамика основных параметров неврологического статуса в исследуемых группах представлена в таблице 4.

Был проведен анализ взаимосвязи интегрального показателя неврологического статуса с прямыми количественными характеристиками каротидного атеросклероза, который выявил корреляцию со средней и максимальной толщиной интимо-медиального слоя сонных артерий ($r=0,385$, $p=0,001$ и $r=0,342$, $p=0,001$, соответственно), но не с наличием атеросклеротических бляшек в бассейне сонных артерий ($p=0,761$). При анализе взаимосвязи интегрального показателя неврологического статуса с традиционными факторами риска сердечно-сосудистых и цереброваскулярных заболеваний выявлено отсутствие корреляции с уровнями систолического и диастолического артериального давления, общего холестерина, триглицеридов,

холестерина ЛПНП и ЛПВП, курением, сахарным диабетом, а также индексом массы тела ($p>0,05$). Выраженность неврологических симптомов коррелировала с возрастом ($r=0,477$, $p<0,001$).

Таблица 4.

Динамика основных параметров неврологического статуса.

| Параметры неврологического статуса, средний балл | Группа активного воздействия | | Группа плацебо | |
|--|------------------------------|--------------|----------------|--------------|
| | исходно | через 2 года | исходно | через 2 года |
| Субъективные жалобы | 1,9±0,2 | 1,8±0,2 | 1,9±0,3 | 1,6±0,2 |
| Нарушения черепно-мозговой иннервации | 0,5±0,1 | 0,6±0,1 | 0,6±0,1 | 0,6±0,1 |
| Симптомы орального автоматизма | 0,8±0,2 | 1,3±0,2* | 1,1±0,2 | 1,3±0,2 |
| Снижение чувствительности | 0,3±0,1 | 0,6±0,1* | 0,3±0,1 | 0,6±0,1* |
| Снижение мышечной силы | 0,01±0,01 | 0,1±0,06* | 0,05±0,04 | 0,1±0,05 |
| Гиперрефлексия | 1,3±0,3 | 2,7±0,4* | 1,8±0,3 | 2,5±0,3* |
| Патологические рефлекс | 2,6±0,5 | 3,4±0,5 | 2,1±0,4 | 2,6±0,4 |
| Повышение мышечного тонуса | 0,7±0,2 | 1,3±0,3* | 0,8±0,2 | 1,3±0,3* |
| Нарушения координации и статики | 0,7±0,3 | 2,4±0,3* | 1,3±0,3 | 1,8±0,3 |

- *достоверное изменение показателей, $p<0,05$.*

Таким образом, при совокупном анализе взаимосвязи интегральной оценки неврологического статуса, прямых показателей атеросклероза и традиционных факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний показано, что толщина интимо-медиального слоя сонных артерий является наиболее эффективным диагностическим маркером ранних неврологических нарушений.

Взаимосвязь изменений толщины КИМ с динамикой ранней неврологической симптоматики нарушения мозгового кровообращения в условиях антицитокиновой терапии. У участников проведенного исследования антиатеросклеротической эффективности инфламната изучали взаимосвязь естественного течения атеросклероза с динамикой ранней неврологической симптоматики недостаточности мозгового кровообращения. В результате показана корреляция изменений максимальной толщины КИМ с динамикой неврологической симптоматики (Рис. 9).

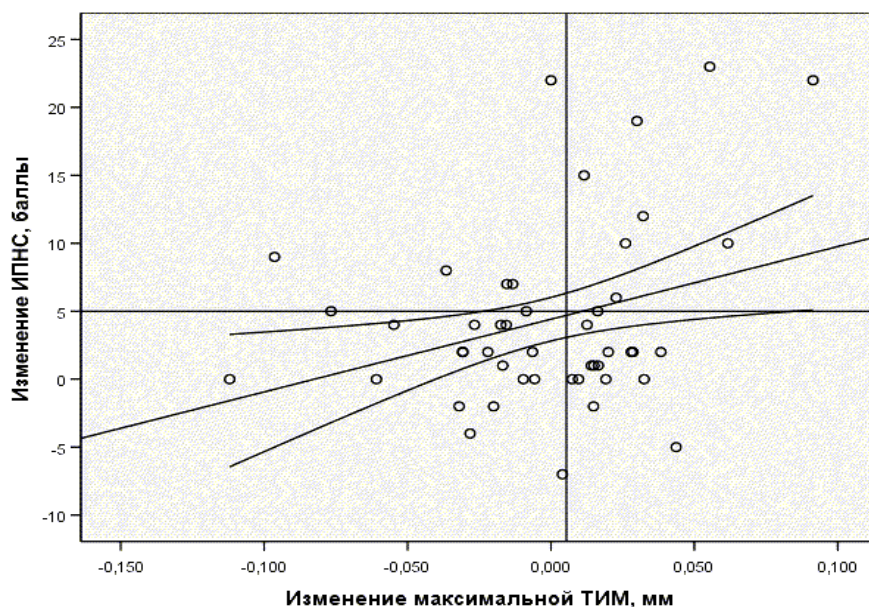


Рис. 9. Корреляция изменений максимальной толщины КИМ и интегрального показателя неврологического статуса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе был разработан терапевтический агент — натуральный препарат, обладающий антицитокиновым действием, — и изучена его эффективность при субклиническом атеросклерозе у лиц с ранними неврологическими проявлениями недостаточности мозгового кровообращения.

Клеточная модель *in vitro* широко используется для оценки антицитокиновой активности различных лекарственных средств и компонентов натурального происхождения [Yesilada E. et al., 1997; Barak V. et al., 2001]. На основе первичной культуры моноцитов-макрофагов крови человека мы использовали модель *ex vivo*, позволяющую оценивать антицитокиновую активность различных веществ и их метаболитов после усвоения и биотрансформации в организме человека. Этот подход позволил предположить, что в основе известного противовоспалительного действия ряда лекарственных трав лежит единый механизм, связанный с подавлением продукции провоспалительных цитокинов на клеточном уровне, а также разработать натуральный комплексный препарат, по своему антицитокиновому действию сравнимый с нестероидными противовоспалительными средствами, в частности, с диклофенаком. Обращает на себя внимание факт, что эффект инфламната наиболее выражен в первые 4 часа после приема, в то время как действие диклофенака развивается несколько позже и достигает максимума только через 8 часов. Возможно, это обстоятельство связано с различиями в фармакокинетике активных компонентов этих препаратов. Мы также показали,

что инфламинат обладает антиатерогенной активностью наряду с противовоспалительным действием.

На следующем этапе нашей работы мы исследовали противовоспалительную эффективность инфламината на животной модели воспаления. В условиях асептического воспаления толщина кожи при криповреждении существенно увеличивалась. Применение инфламината уже в первый день после криповреждения приводило к достоверному уменьшению отека, а в последующие дни – к полному устранению отека. Применение диклофенака также приводило к уменьшению отека уже в первый день после криповреждения, и к полному устранению отека в последующие дни. Полное восстановление пула положительно окрашенных тучных клеток происходило в одинаковые сроки при приеме инфламината и диклофенака. Оба препарата в равной степени останавливали инфильтрацию пораженной кожи гематогенными клетками уже на второй день после операции, то есть резко обрывали инфильтративную стадию воспаления, при этом различия между противовоспалительным действием двух препаратов недостоверны ($p=0,793$).

Таким образом, в ряде лабораторных исследований на моделях *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* нами был разработан и исследован препарат инфламинат с антицитокиновым и антиатерогенным механизмом действия, противовоспалительная эффективность которого была сравнима с эффектом нестероидного противовоспалительного препарата диклофенак. Следует отметить, что, например, препараты жирных кислот, обладающие антицитокиновой активностью в животной модели, оказались недостаточно эффективными при клинических испытаниях по результатам обзора работ, посвященных изучению противовоспалительной активности жирных кислот в лабораторных и клинических исследованиях [Blok W.L. et al., 1996]. Тем не менее, данные об эффективности инфламината в доклинических испытаниях явились обоснованием для проведения клинических исследований его противовоспалительной и антиатеросклеротической активности.

Далее в нашей работе мы исследовали клиническую противовоспалительную эффективность инфламината в пилотном исследовании у больных с воспалительными заболеваниями суставов и позвоночника. У участников исследовали большое количество иммунологических параметров — уровни воспалительных цитокинов, иммуноглобулинов, системные показатели клеточного иммунитета, антитела к ДНК, ревматоидный фактор. При субъективной оценке эффективности препарата участниками исследования отмечена положительная динамика в отношении характеристик болевого синдрома. Кроме того, мы отметили тенденцию к снижению уровня ФНО- α при иммунологическом обследовании участников, у двоих участников исследования на фоне лечения перестал определяться ревматоидный фактор. Очевидно, данные изменения не достигли уровня статистической значимости вследствие недостаточного объема выборки.

На следующем этапе нашей работы мы изучили влияние антицитокиновой терапии на развитие атеросклероза у человека. Несмотря на большое количество работ, посвященных изучению роли воспаления в патогенезе атеросклероза [Ross R., 1999; Libby P. et al., 2002], исследований влияния противовоспалительной терапии на течение атеросклеротического процесса практически не проводится. Очевидно, это связано с отсутствием подходящего терапевтического агента, эффективно подавляющего воспаление и при этом безопасного при длительном применении. В настоящее время для долговременной профилактики атеросклероза широко применяются препараты из группы ингибиторов ГМГ-КоА редуктазы (статины). Первоначально предполагалось, что их эффективность связана только с нормализацией липидного профиля, но последующие исследования в клеточных культурах и на животных моделях показали, что в значительной мере их эффект реализуется за счет подавления воспалительной реакции в сосудистой стенке [Paoletti R., 2004; Schonbeck U., 2004]. Однако, назначение статинов ограничено выраженными побочными явлениями, к тому же эти препараты не показаны пациентам с нормальными показателями липидов крови, которые, тем не менее, нуждаются в активной профилактике атеросклероза. Атеросклеротическое утолщение сосудистой стенки происходит с возрастом независимо от уровня липидемии [Lim T.K., 2008], следовательно, профилактическая терапия должна проводиться своевременно, в том числе у лиц с нормолипидемией.

Результаты проведенного исследования показали, что инфламинат обладает прямым антиатеросклеротическим действием, что проявляется в замедлении прогрессирования толщины интимо-медиального слоя в общих сонных артериях. Антиатеросклеротическое действие инфламината подтверждает и тот факт, что на фоне его приема не происходит увеличения уровня холестерина ЦИК, маркера активности атеросклеротического процесса, которое наблюдалось в группе, получающей плацебо. В обеих группах отмечена положительная динамика в отношении показателей липидного профиля и уровня систолического и диастолического артериального давления, что, вероятно, связано с выполнением диетологических рекомендаций и контролем АД. Мы не выявили корреляции прямых показателей атеросклероза и факторов риска, за исключением возраста. Однако, аналогичные данные были получены и в других исследованиях [Shimetani N., 2008]. Благоприятное действие инфламината на основные факторы сердечно-сосудистого риска приводит к снижению прогностического риска развития ишемической болезни сердца, инфаркта миокарда и внезапной коронарной смерти. При этом инфламинат обладает хорошей переносимостью, не вызывает побочных эффектов и явлений, что позволяет осуществлять его длительный прием.

Атеросклероз опасен своими клиническими проявлениями и осложнениями, такими как инфаркт миокарда, инсульт, гангрена нижних конечностей. Следует отметить, что в нашем исследовании принимали участие лица с субклиническим атеросклерозом, у которых ранее не диагностировались заболевания, ассоциированные с атеросклерозом. В ходе нашей работы мы

использовали нейрофизиологическую методику ультразвукового сканирования сонных артерий для мониторинга атеросклероза и оценили взаимосвязь атеросклероза с ранними неврологическими проявлениями недостаточности мозгового кровообращения. В этом исследовании мы выявили корреляционную зависимость между прямыми показателями атеросклероза и минимальными изменениями в неврологическом статусе. Наибольшей информативностью среди количественных показателей атеросклероза в отношении наличия ранних неврологических нарушений обладают средняя и максимальная толщина КИМ сонных артерий. По данным настоящего исследования наличие АСБ в бассейне сонных артерий и степень их выраженности не обладают информативностью. Возможно, последнее связано с относительно небольшим размером выборки в данном исследовании.

Совокупный анализ взаимосвязи интегральной оценки неврологического статуса, прямых показателей атеросклероза и традиционных факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний показал, что толщина интимо-медиального слоя сонных артерий является наиболее эффективным предиктором ранних неврологических нарушений. В современных публикациях существует большое количество данных подтверждающих тот факт, что толщина КИМ является важным прогностическим критерием развития острых нарушений мозгового кровообращения [Lorenz M.W. et al., 2007]. Согласно данным Роттердамского исследования, незначительное диффузное утолщение интимо-медиального слоя сонных артерий в пределах нормальных значений (до 900 мкм) существенно увеличивает прогноз первичного инсульта и является самостоятельным фактором риска независимо от наличия атеросклеротических бляшек в сонных артериях [Bots M.L. et al., 1997]. Однако, в литературе нам найти не удалось данных о взаимосвязи ранних неврологических симптомов недостаточности мозгового кровообращения и прямых показателей атеросклероза по результатам УЗИ сонных артерий.

Мы оценили взаимосвязь естественного течения атеросклероза с динамикой минимальной неврологической симптоматики недостаточности мозгового кровообращения в условиях антицитокинной терапии. Следует отметить, что мы обнаружили нарастание неврологической симптоматики, часть из произошедших за два года изменений достигли достоверности. Полученные нами данные говорят о диффузных изменениях в центральной нервной системе, характерных в условиях недостаточности мозгового кровообращения [Manolio T.A. et al., 1994]. Изменения максимальной толщины КИМ за 2 года коррелировали с изменениями интегрального показателя неврологического статуса.

Результаты проведенного исследования позволяют рекомендовать инфламинат в качестве нелекарственного натурального средства, предназначенного для массовой долговременной профилактики атеросклероза и заболеваний атеросклеротического генеза у людей без выраженных клинических проявлений. Кроме того, полученные нами данные являются обоснованием для проведения комплексного обследования лиц с

субклиническим атеросклерозом, в том числе с консультацией специалиста-невролога для предупреждения развития таких клинических осложнений атеросклероза как транзиторные ишемические атаки, острое нарушение мозгового кровообращения.

ВЫВОДЫ

1. Разработанная клеточная модель на основе первичной культуры моноцитов-макрофагов крови человека позволяет количественно определять *in vitro* и *ex vivo* воздействие лекарственных средств и натуральных продуктов на экспрессию клеточных медиаторов воспаления ИЛ-1, ФНО- α , ICAM-1 и HLA-DR, что позволяет ее использование в качестве инструмента изучения антицитокиновой активности различных веществ.

2. Комбинация цветков календулы обыкновенной, плодов бузины черной и травы фиалки трехцветной в модели *ex vivo* подавляет экспрессию провоспалительных цитокинов ИЛ-1 и ФНО- α и накопление внутриклеточного холестерина, т.е. обладает противовоспалительной и антиатерогенной активностью.

3. Антицитокиновое действие комбинации цветков календулы обыкновенной, плодов бузины черной и травы фиалки трехцветной (БАД «Инфламинат») проявляется в развитии противовоспалительного эффекта на уровне организма, что продемонстрировано в животной модели асептического воспаления и в клиническом исследовании при воспалительных заболеваниях суставов и позвоночника у человека.

4. Антицитокиновое действие БАД «Инфламинат» приводит к развитию антиатеросклеротического эффекта, что проявляется замедлением прогрессирования интимо-медиального утолщения у лиц с субклиническим атеросклерозом.

5. Ранние неврологические проявления недостаточности мозгового кровообращения сопряжены с бессимптомным атеросклерозом, определяемым как увеличение толщины комплекса интима-медия сонных артерий.

6. Динамика минимальной неврологической симптоматики недостаточности мозгового кровообращения связана с прогрессированием каротидного атеросклероза, поскольку имеется корреляция между изменениями неврологического статуса и максимальной толщины интимо-медиального комплекса общих сонных артерий.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Горчакова Т.В.**, Супрун И.В., Собенин И.А., Орехов А.Н. Применение натуральных продуктов в антицитокиновой терапии. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.- 2007.-Т.143.-№3.-С.284-288.
2. **Кириченко Т.В.**, Мясоедова В.А., Меркулова Д.М., Меркулов Ю.А., Собенин И.А. Роль диффузного интимо-медиального утолщения сонных

- артерий в ранней диагностике цереброваскулярной патологии. // Практическая неврология и нейрореабилитация.-2009.-Т.4.-С.3-6.
3. Собенин И.А., Мясоедова В.А., **Кириченко Т.В.**, Чупракова О.В., Кожевникова Ю.А., Ковалевская Л.О., Орехов А.Н., Балдассаре Д., Тремоли Е. Возможная роль экологических факторов в формировании предрасположенности к развитию атеросклероза в московской популяции. // Бюллетень Московского общества испытателей природы. Отдел биологический.-2009.-Т.114.-№3.-С.302-315.
 4. Грачев А.Н., Карагодин В.П., Мясоедова В.А., **Кириченко Т.В.**, Рудимов Е.Н., Орехова Е.А., Хренов М.О., Авхачева Н.В., Мубаракшина Э.К., Кжышкловская Ю.Г., Орехов А.Н. Выделение моноцитов из крови человека для изучения влияния факторов внешней среды на иммунитет. // Бюллетень Московского общества испытателей природы. Отдел биологический.-2009.-Т.114.-№3.-С.291-296.
 5. **Горчакова Т.В.**, Никитина Н.А., Андрианова И.В., Собенин И.А., Орехов А.Н. Подавление внутриклеточного накопления холестерина и экспрессии провоспалительных цитокинов в условиях клеточной модели. Объединенный пленум патофизиологов, посвященный 85-летию академика РАМН Г.Н. Крыжановского. // Патогенез.-2007.-Т.5.-№1.-С.127-130.
 6. **Горчакова Т.В.**, Супрун И.В., Собенин И.А., Орехов А.Н. Сочетание противовоспалительной и антиатерогенной активности натурального препарата Инфламинат – перспектива длительной профилактики и терапии атеросклероза. // XIV Российский национальный конгресс «Человек и Лекарство», Москва, Россия, 16-20 апреля 2007 г.-Тезисы докладов.-С.360.
 7. **Кириченко Т.В.**, Андрианова И.В., Собенин И.А., Орехов А.Н. Оценка противовоспалительной эффективности препарата «Инфламинат» на животной модели воспаления. // Фундаментальные науки и практика. Сборник научных работ с материалами трудов 2-ой международной телеконференции. Томск.-2010.-Т.1.-№4.-С.92-94.
 8. Собенин И.А., Мясоедова В.А., **Кириченко Т.В.**, Чупракова О.В., Сурнин С.А., Павлова К.Н., Рудимов Е.Г. Толщина интимо-медиального слоя сонных артерий как фенотипический маркер ишемической болезни сердца. // Фундаментальные науки и практика. Сборник научных работ с материалами трудов 2-ой международной телеконференции. Томск.-2010.-Т.1.-№2.-С.60-62.
 9. **Gorchakova T.V.**, Suprun I.A., Sobenin I.A., Orekhov A.N. The suppression of inflammatory cytokines expression by natural substances. // 75th Congress of the European Atherosclerosis Society, Prague, Czech Republic, April 23-26, 2005. Atherosclerosis.-2005.-V.6(1).-P.66.

10. **Gorchakova T.V.**, Myasoedova V.A., Sobenin I.A., Orekhov A.N. The reduction of serum atherogenicity by natural anti-inflammatory drug. // XIV International Symposium on Atherosclerosis, Rome, Italy, June 18-22, 2006. *Atherosclerosis*.-2006.-V.7(3).-P.230-231.
11. **Gorchakova T.V.**, Suprun I.A., Sobenin I.A., Orekhov A.N. Combined anti-inflammatory and anti-atherogenic activity of natural drug Inflaminat – a perspective for long-term atherosclerosis prevention and treatment. // 76th Congress of the European Atherosclerosis Society, Helsinki, Finland, June 10-13, 2007. *Atherosclerosis*.-2007.-V.8(1).-P.234.
12. **Gorchakova T.V.**, Sobenin I.A., Orekhov A.N. The reduction of proinflammatory cytokine expression by natural components: a new approach to the prevention and treatment of atherosclerosis at the cellular level. // XVI International Symposium on Drugs Affecting Lipid Metabolism, New York, USA, October 4-7, 2007. *J Clin Lipidol*.-2007.-V.5(1).-P.492.
13. Sobenin I.A., Andrianova I.V., Demidova O.N., **Gorchakova T.V.**, Orekhov A.N. Lipid-lowering Effects of Time-Released Garlic Power Tablets in Double-Blinded Placebo-Controlled Randomized Study. // *J Atheroscler Thromb*.-2008.-V.15(6).-P.334-338.
14. **Gorchakova T.V.**, Sobenin I.A. Natural anti-inflammatory drug Inflaminat possesses anti-atherogenic activity. // 77th Congress of the European Atherosclerosis Society, Istanbul, Turkey, April, 26-29, 2008. *Atherosclerosis*.-2008.-V.9(1).-P.171.
15. **Gorchakova T.**, Myasoedova V., Sobenin I., Orekhov A. Atherosclerosis prevention with the anti-inflammatory dietary supplement Inflaminat. XV international symposium on atherosclerosis, Boston, USA, June 14-18, 2009. *Atherosclerosis Suppl*.-2009.-V.10(2).-P.387.
16. Myasoedova V., **Gorchakova T.**, Sobenin I., Orekhov A. Ultrasound monitoring of carotid atherosclerosis in peri- and postmenopausal women treated with phytoestrogen-rich dietary supplement Karinat. *Ibid*.-P.904.

Kirichenko Tatiana Vladimirovna

The influence of anti-cytokine therapy on atherosclerosis progression in patients with early signs of cerebrovascular insufficiency

The aim of this study was to investigate the effect of inflammatory cytokines suppression on atherosclerosis progression in patients with early signs of cerebrovascular insufficiency. Local inflammatory process is assumed to be one of the main reasons of the development of atherosclerotic lesions in vessel wall. Natural

anti-inflammatory drugs seem to be promising agents for anti-atherosclerotic therapy since they possess no significant side effects and therapy limits for administration. The first step of this investigation was the evaluation of anti-inflammatory effects of natural substances. The ability of serum that was obtained before single dose oral administration of different natural substances and 2, 4 and 8 hours after it to induce over-expression of IL-1, TNF- α , HLA-DR and ICAM-1 was investigated in primary culture of human blood-derived macrophages. The expression of inflammatory markers and mediators was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The initial screening was performed to reveal the herbs possessing the most prominent anti-inflammatory activity that was estimated as the ability of herbal extract to inhibit the pro-inflammatory cytokines expression in cultured cells. Then different combinations of the most effective herbs have been studied. It was shown that the combination of black elder (*Sambucus nigra*) berries, violet (*Viola tricolor*) and calendula (*Calendula officinalis*) flowers possesses the highest anti-inflammatory effect comparable to that of Diclofenac. This herb combination was registered as dietary supplement "Inflaminat". At the next stage of this study the antiatherogenic properties of Inflaminat were investigated. Inflaminat administration resulted in significant reduction of blood serum ability to induce cholesterol accumulation in cell culture. Anti-inflammatory activity of Inflaminat was also studied in animal model and in the pilot open-label clinical trial in 11 patients with inflammatory diseases of joints. In animal model, the effects of Inflaminat were comparable to those of Diclofenac with the respect to number of mast cells, inflammatory cells and oedema. The results of clinical trial demonstrated significant reduction in the total number of injured joints, disease-specific complaints as well as reduction of pain syndrome. The anti-atherosclerotic activity of Inflaminat was studied in double-blinded placebo-controlled clinical trial in 85 asymptomatic men. After 2 years of observation cIMT of common carotid artery increased by $12\pm 10\mu\text{m}$ ($p=0.104$) in Inflaminat-treated group and by $41\pm 6\mu\text{m}$ ($p=0.001$) in placebo recipients. MaxIMT increased by $2\pm 12\mu\text{m}$ ($p=0.577$) in Inflaminat-treated group and by $28\pm 8\mu\text{m}$ ($p=0,011$) in placebo recipients. The differences between groups were statistically significant ($p<0.01$). So, it was established in this study that long-term atherosclerosis treatment with anti-cytokine drug Inflaminat leads to prevention of IMT progression. Clinical significance of ultrasound parameters of the natural history of subclinical atherosclerosis was studied in relation to early neurologic symptoms characteristic for the insufficiency of cerebral blood flow. A correlation between direct indices of atherosclerosis and indicators of neurological status was revealed. The dynamics of subclinical neurological changes were associated with maxIMT progression ($p=0.028$). It was demonstrated that ultrasonic characteristics of carotid atherosclerosis have a high clinical impact on early manifestations of neurologic symptoms.