

## МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КАРДИОМИОЦИТОВ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ АЛКОГОЛЬНОЙ КАРДИОМИОПАТИИ У КРЫС: КАРДИОПРОТЕКТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ МЕТАБОЛИТОТРОПНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Запорожский государственный медицинский университет (г. Запорожье)

viktorsteblyuk@ukr.net

Данная работа выполнена в рамках НИР «Эндогенная нейропротекция: HSP<sub>70</sub>/HIF-1 $\alpha$ -опосредованные механизмы и разработка подходов к ее фармакологической регуляции», № гос. регистрации 0113U000797; 2017-2020 гг.

**Вступление.** Потребление этилового алкоголя на Украине имеет неуклонную тенденцию к росту и превышает аналогичные показатели стран Евросоюза на 50% [1-9,22]. Хроническая алкогольная интоксикация вызывает поражение практически всех органов и функциональных систем организма, что обусловило появление в последнее время термина «алкогольная болезнь» [1,4,9,19,22]. Показано, что смертность алкоголиков-мужчин в 4,1, а женщин в 7,7 раз выше, чем смертность среди остального населения. Средний возраст умерших, злоупотребляющих алкоголем, составляет 46 лет [1,4]. Среди висцеральных проявлений алкоголизма поражения сердечно-сосудистой системы занимают одно из ведущих мест и в 30% случаев являются непосредственной причиной смерти [4,19]. В настоящее время многочисленными работами установлена четкая взаимосвязь между злоупотреблением алкоголем и патологическими изменениями сердечной мышцы, детально описаны специфические морфологические изменения миокарда, которые характеризуют алкогольную кардиомиопатию как самостоятельную нозологическую единицу [1,4,9,19,22]. В настоящее время комплекс мероприятий, направленных на лечение больных с алкогольной кардиомиопатией, сводится к прекращению потребления алкоголя, проведению симптоматической и общеукрепляющей терапии. Несовершенство существующих концепций медикаментозной терапии структурно-функциональных нарушений миокарда на фоне хронической алкогольной интоксикации определяет настоятельную необходимость поиска и создания новых высокоэффективных фармакологических средств лечения этой патологии. В настоящее время лечение алкогольного поражения сердца ограничивается применением адреноблокаторов, блокаторов кальциевых каналов, витаминных препаратов [1,4,9]. С 90-х гг. прошлого столетия благодаря фундаментальным работам М.Н. Кондрашовой, В.В. Дунаева, В.С. Тишкина, Р.Д. Сейфуллы и др. в терапию сердечно-сосудистой патологии прочно вошли такие препараты как метаболитотропные кардиопротекторы [3]. В комплексной терапии алкогольной кардиомиопатии в качестве метаболитотропного кардиопротектора широкое применение нашел препарат Милдронат [3,17]. Име-

ются работы об использовании в качестве кардиопротектора в лечении алкогольной кардиомиопатии антиоксиданта Мексидола [1,4]. Однако, в реальной клинической практике при назначении этих средств не всегда удается достичь адекватного клинического эффекта [1]. В связи с этим необходим поиск новых лекарственных препаратов строго направленного действия, с учетом интимных механизмов повреждающего действия этилового алкоголя на миокард. В этом отношении несомненный интерес представляет производное 1,2,4-триазолил-5-тиона – Ангиолин (разработка НПО «Фарматрон»), который проявляет кардиопротективное действие при экспериментальном инфаркте миокарда и нейропротективное и эндотелиопротективное действия при ишемии головного мозга и хронической алкогольной интоксикации [2,3,6,10].

**Цель работы.** Изучение влияния Ангиолина на морфо-функциональные и молекулярные нарушения миокарда в условиях моделирования алкогольной кардиомиопатии (АКМП).

**Объект и методы исследования.** В эксперименте участвовало 60 белых беспородных белых крыс самцов массой 170-180 г, полученных из питомника Института фармакологии и токсикологии НАМН Украины, которые содержались в виварии при свободном доступе к пище (стандартный гранулированный корм) и воды, при естественной смене дня и ночи. Все экспериментальные процедуры осуществляли в соответствии с «Положением об использовании животных в биомедицинских исследованиях», Общими принципами работы на животных, одобренными 1-м Национальным конгрессом по биоэтике (г. Киев, Украина, 2001) и согласованными с положением Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (г. Страсбург, Франция, 1985). Алкогольную кардиомиопатию вызывали внутрижелудочным введением с помощью металлического зонда 20% раствора этанола в дозе 8 г/кг в течение 90 суток. Данная модель позволяет воспроизвести структурные, функциональные и обменные нарушения миокарда характерные для АКМП [19]. Все животные были разделены на 6 групп по 10 особей в каждой. Исследуемые препараты вводили внутрижелудочно с помощью металлического зонда – Ангиолин (НПО «Фарматрон», Украина) в дозе 100 мг/кг [3]; Милдронат (Гриндекс, Латвия) – 250 мг/кг [3,11]; Мексидол (ООО «НПК «Фармасофт», Россия) – 200 мг/кг [3,17]. Контрольная и интактная группы получали физио-

логический раствор. По окончании эксперимента животные выводились из эксперимента через 2-4 мин. после инъекции этанола натрия (40 мг/кг) (до потери рефлекса выпрямления) с целью минимизации нейрометаболических нарушений. Верхушечную часть сердца помещали в фиксатор Карнуа на 24 часа. После стандартной процедуры обезжизивания ткани и её пропитки хлороформом и парафином, миокард заливали в парапласт (McCormick, США). На ротационном микроскопе Microm-325 (Microm Corp., Германия) готовили серийные гистологические срезы толщиной 5 мкм. Для изучения морфофункционального состояния миокарда гистологические срезы депарафинировали по стандартной методике и окрашивали галоцианин-хромовыми квасцами по Эйнарсону для специфического выявления РНК [8]. Морфометрический анализ кардиомиоцитов проводили на микроскопе Axioskop (Zeiss, Germany) при помощи видеокамеры COHU – 4922 (USA) и вводили в систему цифрового анализа изображения VIDAS – 386 (Kontron Elektronik, Germany). Определяли следующие показатели: площадь ядер кардиомиоцитов (мкм<sup>2</sup>); концентрацию РНК в ядрах кардиомиоцитов в единицах оптической плотности ( $E_{оп}$ ); концентрацию РНК в цитоплазме кардиомиоцитов в единицах оптической плотности ( $E_{оп}$ ); плотность ядер кардиомиоцитов как показатель количества ядер клеток на 1 мм<sup>2</sup> площади ткани миокарда; ядерно-цитоплазматический коэффициент как показатель суммарной площади ядер кардиомиоцитов на 1 мм<sup>2</sup> площади ткани миокарда. Для биохимических исследований сердце промывали охлажденным 0,15 М KCl (4°C) 1:10, а затем измельчали в жидком азоте до порошкообразного состояния и гомогенизировали в 10-кратном объеме среды при (2°C), содержащей (в ммольях): сахарозы – 250, трис-НСI-буфера – 20, ЭДТА -1 (pH 7,4). При температуре (+4°C) методом дифференциального центрифугирования на рефрижераторной центрифуге Sigma 3-30k (Германия) выделяли цитозольную фракцию [8]. В цитозоле определяли молекулярный маркер поражения миокарда белок ST2 твердофазным иммуносорбентным сэндвич – методом ELISA по набору фирмы Critical Diagnostics Presage® ST2 Assay kit (REF# BC-1065).

Достоверность отличий между экспериментальными группами проводили при помощи непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Достоверными считали отличия с уровнем значимости более 95% ( $p < 0,05$ ). Результаты исследования обработаны с применением статистического пакета лицензионной программы «STATISTICA for Windows 6.1» (StatSoft Inc., № AXR R712D833214SAN5), а также «SPSS 16.0», «Microsoft Excel 2003».

### Результаты исследования и их обсуждение.

В результате проведенных исследований было установлено, что на 30-е сутки после 90-суточной алкоголизации у животных формируется алкогольная кардиомиопатия (АКМП) – гистологически выявлены деструктивные изменения кардиомиоцитов, проявляющиеся в виде фуксинофилии, анизотропии, накоплении в саркоплазме свободных липидов. Наряду с данными изменениями в миокарде обнаруживались явления пролиферации соединительно-тканых эле-

ментов и очаговое ожирение миокарда и развитие выраженного периваскулярного кардиосклероза.

Обращает на себя внимание достоверное снижение животных контрольной группы ядерно-цитоплазматического коэффициента на 26,2% и плотности ядер на 19,1% по сравнению с интактными животными, что отражает наличие у них патологической гипертрофии миокарда, апоптоза и гибели кардиомиоцитов (**табл. 1**). Также у животных этой группы наблюдалось повышение площади ядер кардиомиоцитов на 10,5% с параллельным уменьшением в концентрации РНК – в ядрах на 24% и в цитоплазме кардиомиоцитов на 26,6%. Принимая во внимание важную роль РНК в процессе синтеза структурных и ферментных белков клеток, становится очевидной возможность подавления протеинсинтетической функции кардиомиоцитов в условиях алкогольной кардиомиопатии. Таким образом, морфологические изменения кардиомиоцитов у крыс с АКМП характеризуются снижением плотности ядер кардиомиоцитов, повышением их площади, снижением концентрации ядерной и цитоплазматической РНК и низким ядерно-цитоплазматическим коэффициентом по сравнению с интактными животными, т.е. признаками патологической гипертрофии миокарда. Особенностью формирования АКМП, в отличие от других кардиомиопатий, является алкоголь-зависимое повреждение митохондрий миокарда, что делает митохондрию источником активных форм кислорода и проапоптотических белков и на фоне ухудшения энергообразования (снижение АТФ), наблюдается активация оксидативного стресса, апоптоза [1,2,15,16,18,19,22,23]. Кроме того, выделяют еще несколько звеньев кардиодеструктивного действия этанола – прямое токсическое действие ацетальдегида и этанола на синтез белка, срыв сопряжения между возбуждением и сокращением, нарушение липидного обмена и формирование жировой дистрофии, дисбаланс катехоламинов и других гормонов, ионный дисбаланс, воздействие на цитоскелет, активация провирусов, изменение процессов возбуждения и проведения в сердечной мышце [1,9,14,16,22,23]. Освещенные выше механизмы, реализуя своё пагубное действие на сердце, приводят, в конечном итоге, к развитию сердечной недостаточности. Принципиально важным процессом является ремоделирование сердца. Это понятие включает в себя: нарушение структуры сократительного аппарата кардиомиоцитов, их функциональную асимметрию, изменение межклеточных взаимодействий, интерстициальный фиброз, деспирализацию хода мышечных пучков и изменение формы полостей сердца. Подтверждение чему было увеличение в цитозоле миокарда контрольных крыс концентрации белка ST2 в 3,34 раза по сравнению с группой интакта (**табл. 2**). ST2 (Suppression of tumorigenicity 2, Growth Stimulation expressed gene 2, стимулирующий фактор роста, экспрессирующийся геном 2, он же IL1RL1) – член суперсемейства рецепторов IL -1. ST2 является рецептором IL-33 [12, 13]. ST2 – маркер фиброза и ремоделирования сердечной ткани, высвобождается кардиомиоцитами и фибробластами [13,20]. Повышение концентрации ST2 свидетель-

Морфофункциональные показатели кардиомиоцитов крыс с алкогольной кардиомиопатией (АКМП)

Экспериментальные группы	Площадь ядра, мкм <sup>2</sup>	Конц РНК в ядре, E <sub>оп</sub>	Конц РНК в цитоплазме, E <sub>оп</sub>	Плотность ядер, мм <sup>-2</sup>	Ядерно-цитоплазматический коэфф.
Интактная (n=10)	13,3±0,20	0,25±0,002	0,015±0,0002	4611,4±85,9	0,061±0,001
контроль (АКМП) (n=10)	14,7±0,35	0,19±0,002	0,011±0,0003	3726,1±143,7	0,045±0,001
АКМП+Ангиолин, 100 мг/кг (n=10)	12,9±0,75* <sup>1,2</sup>	0,24±0,004* <sup>1</sup>	0,016±0,0005*	4401,6±217,3* <sup>1,2</sup>	0,054±0,001* <sup>1,2</sup>
АКМП+Мексидол, 200 мг/кг (n=10)	16,9±0,61*	0,21±0,001*	0,014±0,0003*	3780,4±163,4	0,049±0,001*
АКМП+Милдронат, 250 мг/кг (n=10)	16,1±0,77*	0,19±0,004	0,013±0,0005*	3467,4±208,4*	0,042±0,001*

Примечание. \* – изменения достоверны по отношению к животным контрольной группы (p<0,05);

<sup>1</sup> – изменения достоверны по отношению к группе животных, получавших милдронат (p<0,05);

<sup>2</sup> – изменения достоверны по отношению к группе животных, получавших мексидол (p<0,05).

ствует о: ремоделировании сердца и сердечной недостаточности у животных с АКМП.

Курсовое введение Милдроната в дозе 250 мг/кг приводило к большему, по сравнению с группой контроля, снижению плотности ядер кардиомиоцитов на 6,9% и уменьшению ядерно-цитоплазматического коэффициента на 6,6% на фоне увеличения площади ядер кардиомиоцитов на 9,5%. Выявленные данные свидетельствуют о том, что Милдронат не оказывал влияние на признаки патологической гипертрофии миокарда при алкогольной кардиомиопатии. Введение Милдроната приводило к достоверному повышению РНК в цитоплазме кардиомиоцитов на 18%, не влияя на этот показатель в ядрах. Введение Милдроната снижало концентрацию ST2 на 17,2% в миокарде крыс АКМП. Выявленный эффект препарата может быть обусловлен тем, что Милдронат, опосредованно через повышение концентрации гамма-бутиробетаина, способен влиять на регуляцию фактора ядерной транскрипции NFκB, повышать экспрессию мРНК iNOS не влияя на eNOS и гиперпродукцию цитотоксических форм NO, играющих важную роль в процессах пролиферации, апоптоза [2,3,17]. Курсовое введение Мексидола в дозе 200 мг/кг не оказывало достоверного влияния на показатель плотности ядер кардиомиоцитов, но достоверно повышало ядерно-цитоплазматический коэффициент на 8,8% на фоне увеличения площади ядер кардиомиоцитов на 14,9%. Введение Мексидола приводило к достоверному повышению РНК в цитоплазме кардиомиоцитов на 27,2% и на 10,5% в ядрах кардиомиоцитов крыс с АКМП. Введение Мексидола снижало концентрацию ST2 на 26,1% в миокарде крыс АКМП. Рядом экспериментальных и клинических работ установлено, что Мексидол нормализует некоторые механизмы энергетического метаболизма при ишемии миокарда, снижает плотность апоптотически и измененных кардиомиоцитов, уменьшает зону некроза, улучшает сократимость миокарда. Мексидол являясь сквенджером АФК, может прерывать АФК-зависимые механизмы экспрессии IL-1b и тем самым прерывать

механизмы фиброза [3,7,11]. Введение Ангиолина в дозе 100 мг/кг в течение 30 суток после 3-месячного введения этанола оказывало выраженное кардиопротективное действие – приводило к достоверному, по сравнению с группой контроля, увеличению плотности ядер кардиомиоцитов на 18,1% (свидетельствует о кардиопротективном действии препарата), повышению на 26,3% концентрации РНК в ядрах кардиомиоцитов и повышению на 45,4% концентрации РНК в цитоплазме кардиомиоцитов (свидетельствует о повышении трансляционных процессов в кардиомиоцитах и стимуляции протеинсинтеза). Введение Ангиолина приводило к нормализации площади кардиомиоцитов (снижение этого показателя по сравнению с контролем на 12,2%), что свидетельствовало о снижении гипертрофии миокарда. Ангиолин в дозе 100 мг/кг достоверно на 20% повышал ядерно-цитоплазматический индекс миокарда крыс с АКМП, что указывает на наличие антигипертрофического эффекта данного препарата. Введение Ангиолина приводило к снижению концентрации ST2 на 43% в цитозоле миокарда крыс АКМП. По силе кардиопротективного эффекта Ангиолин достоверно превосходит референс-препарат Милдронат и Мексидол по всем показателям морфо-функциональной характеристики миокарда в условиях АКМП. Ангиолин по фармакологическим характеристикам, а именно уменьшению митохондрий с признаками нарушений ультраструктуры, повышению в экспрессии агентов эндогенной нейропротекции и кардиопротекции – белков теплового шока (HSP<sub>70</sub>) в цитозоле и митохондриях, торможению реакций оксидативного стресса, активации компенсаторных цитозольно-митохондриальных шунтов [3,10] наиболее показан в комплексной кардиопротекции при АКМП. Это связано с тем, что метаболитотропная терапия при АКМП в отличие от таковой при ХСН должна быть направлена на сохранение структурно-функциональных особенностей митохондрий миокарда, т.е. нести в себе элементы митопротекции [16,19,23]. Комплексная метаболитотропная кардиопротекция при АКМП должна

**Таблица 2.**

**Концентрация белка ST2 в цитозоле миокарда крыс с алкогольной кардиомиопатией (АКМП)**

Экспериментальные группы	Концентрация ST2, нмоль/мг белка
Интактная (n=10)	1,42±0,21
контроль (АКМП) (n=10)	4,75±0,32
АКМП+Ангиолин, 100 мг/кг (n=10)	2,71±0,16 <sup>*1,2</sup>
АКМП+Мексидол, 200 мг/кг (n=10)	3,51±0,32 <sup>*</sup>
АКМП+Милдронат, 250 мг/кг (n=10)	3,93±0,42 <sup>*</sup>

**Примечание.** -<sup>\*</sup> – изменения достоверны по отношению к животным контрольной группы (p<0,05); <sup>1</sup> – изменения достоверны по отношению к группе животных, получавших милдронат (p<0,05); <sup>2</sup> – изменения достоверны по отношению к группе животных, получавших мексидол (p<0,05).

восстанавливать метаболические алкогользависимые сдвиги в биохимическом континууме кардиомиоцитов, так чтобы каждый предыдущий лекарственный ингредиент создавал субстраты для действия последующего медикамента [2,3,4,19]. Кроме того, считается перспективным использование в лечении АКМП в качестве кардиопротекторов первой линии препаратов переключающих метаболизм миокарда с использования жирных кислот на аэробный распад глюкозы (как более эффективный путь), ингибируя митохондриальную кетоацил-СоА-тиолазу, а также нормализующих цикл Кребса, регулирующих опосредовано через HSP/HIF – зависимые механизмы митохондриально-цитозольные компенсаторные шунты энергии (в частности малат-аспартатный) [3,4,14,16,19]. Нашими предыдущими работами установлено, что Ангиолин в ответ на формирование ишемии активирует экспрессию HSP<sub>70</sub>, который не только «продолжает» действие HIF-1α, инициирующего запуск компенсаторных механизмов выработки энергии, но и самостоятельно поддерживает экспрессию активности НАД-МДГ-мх, тем самым длительно поддерживая активность малат-аспартатного челночного механизма [3, 10].

**Выводы**

1. Моделирование алкогольной кардиомиопатии (АКМП) путем 90-суточного внутрижелудочного введения 25% этанола (8 г/кг) приводит через 30 суток после отмены этанола к морфологическим изменениям кардиомиоцитов у экспериментальных животных – снижением плотности ядер кардиомиоцитов, повышением их площади, снижением концентрации ядерной и цитоплазматической РНК и низким ядерно-цитоплазматическим коэффициентом. В цито-

золе миокарда животных с АКМП регистрировали увеличение концентрации маркера фиброза и ремоделирования сердечной ткани – белка ST2 в 3,34 раза по сравнению с группой интакта.

2. Курсовое 30-суточное внутривенное введение животным с АКМП метаболитотропных кардиопротекторов в лечебном режиме – Ангиолина (100 мг/кг), Мексидола (200 мг/кг) и Милдроната (250 мг/кг) приводило к изменению в разной направленности и степени выраженности морфо-функциональных показателей кардиомиоцитов.

3. Курсовое введение Милдроната приводило к большему, по сравнению с группой контроля, снижению плотности ядер кардиомиоцитов и уменьшению ядерно-цитоплазматического коэффициента на фоне увеличения площади ядер кардиомиоцитов, повышению РНК в цитоплазме кардиомиоцитов на 18%, не влияя на этот показатель в ядрах и снижению концентрации ST2. Выявленные данные свидетельствуют о том, что Милдронат не оказывал влияние на признаки патологической гипертрофии миокарда при алкогольной кардиомиопатии.

4. Курсовое введение Мексидола не оказывало достоверного влияния на показатель плотности ядер кардиомиоцитов, но достоверно повышало ядерно-цитоплазматический коэффициент на фоне увеличения площади ядер кардиомиоцитов, приводило к достоверному повышению РНК в цитоплазме и ядрах кардиомиоцитов, снижало концентрацию ST2, что свидетельствовало о кардиопротективном эффекте препарата.

5. Введение Ангиолина оказывало выраженное кардиопротективное действие – приводило к достоверному, по сравнению с группой контроля, увеличению плотности ядер кардиомиоцитов, повышению концентрации РНК в ядрах и цитоплазме кардиомиоцитов, к нормализации площади кардиомиоцитов, повышению ядерно-цитоплазматического индекса миокарда и к снижению концентрации ST2. По силе кардиопротективного эффекта Ангиолин достоверно превосходит референс-препараты Милдронат и Мексидол.

6. Полученные данные являются экспериментальным обоснованием для применения Мексидола и, особенно, Ангиолина в комплексной терапии алкогольной кардиомиопатии.

**Перспективы дальнейших исследований** заключаются в дальнейшем изучении особенностей кардиопротективного действия Ангиолина и его преимуществ по сравнению с известными кардиопротекторами при экспериментальной алкогольной кардиомиопатии.

## Литература

1. Aleksandrov A.A. Vyyavlenie rasstroystv, vyzvannykh upotrebleniem alkogolya, v obschemeditsinskoj praktike / A.A. Aleksandrov // Meditsina. – 2007. – № 1 (56). – S. 12-15.
2. Belenichev I.F. Harakter ekspressii mRNK iNOS i eNOS v miokardn kryis s alkogolnoy kardiomiopatiey i na fone provodimoy terapii metabolitotropnyimi kardioprotektorami / I.F. Belenichev, V.S. Steblyuk, A.M. Kamyishnyiy // Vestnik problem biologii i meditsiny. – 2017. – Vyip. 2 (136). – S. 82-86.

3. Belenichev I.F. Neyroproteksiya i neyroplastichnost: Monografiya / I.F. Belenichev, V.I. Cherniy, E.A. Nagorna, S.V. Pavlov, N.V. Buhtiyarova. – Kiev: Logos, 2015. – 512 s.
4. Drapkina O. Problema alkogolnoy kardiomiopatii / O. Drapkina, Ya. Ashihmin, V. Ivashkin // Vrach. – 2005. – № 8. – S. 48-50.
5. Egorov A.N. Rol nitroziruyushego stressa v mehanizmah neyrodestruktsii v usloviyah prenatalnoy alkogolnoy intoksikatsii i puti farmakokorreksii voznikayuschih narusheniy / A.N. Egorov, I.F. Belenichev, E.P. Sokolik, L.I. Kucherenko // Zaporozhskiy meditsinskiy zhurnal. – 2012. – № 5. – S. 25-28.
6. Patent Rossiyskoy Federatsii № 21370492 S07D, A61K 31/41 i Patent UkraYini № 86668 MPK 200901 A61K 31/4196 № 200705865 Liziniy 3-metil-1,2,4-triazolil-5-tioatsetat, proyavlyayuschiy neyroprotektivnoe, nootropnoe, kardioprotektivnoe, endotelioprotektivnoe, protivovospalitelnoe, antioksidantnoe, protivovospalitelnoe protivogipoksicheskoe deystvie i obladayuschiy nizkoy toksichnostyu / Mazur I.A., Belenichev I.F., Kolesnik Yu.M., Kucherenko L.I.; zayavleno 04.06.2007. – Opubl. 20.10.2009.
7. Tyurenkov I.N. Vliyaniye meksidola i sulodeksina na uroven spetsificheskikh markerov razvitiya endotelialnoy disfunktsii u zhivotnykh s saharnym diabetom / I.N. Tyurenkov, A.V. Voronkov, A.A. Slietsans // Eksper. i Klin. farmakol. – 2012. – T. 75, № 35. – S. 14-15.
8. Chekman I.S. Doklinicheskoe izuchenie spetsificheskoy aktivnosti endotelioprotektivnykh preparatov / I.S. Chekman, I.F. Belenichev, E.A. Nagornaya, N.V. Buhtiyarova, L.I. Kucherenko. – Metodicheskie rekomendatsii GETs MZ Ukraini. – Kiev, 2014. – 60 s.
9. Aberle N.S. Acetaldehyde-induced cardiac contractile dysfunction may be alleviated by vitamin B1 but not by vitamins B6 or B12 / N.S. Aberle, L. Burd, B.H. Zhao // Alcohol & Alcoholism. – 2014. – Vol. 39, № 5. – P. 450-454.
10. Belenichev I.F. Functional nitric oxide conjugate systems state/restored heart thiols of rats in modeling isadrine-pituitrin's myocardial infarction using metabolitropic cardioprotector «Angiolin» / I.F. Belenichev, L.I. Kucherenko, E.A. Nagornaya, I.A. Mazur, N.V. Bukhtiyarova // International Journal of Basic & Clinical Pharmacology. – 2015. – Vol. 4, № 1. – P. 15-21.
11. Chekman I.S. Influence of mexidol on early genomic response and morphofunctional parameters of the brain cortex sensorimotor zone neurons after arteria carotis communis occlusion / I.S. Chekman, I.F. Belenichev, I.Yu. Yakovleva, N.A. Gorchakova, N.V. Bukhtiyarova // Oxid Antioxid Med Sci. – 2015. – Vol. 4, № 1. – P. 1-6.
12. Daniels L.V. Association of ST2 levels with cardiac structure and function and mortality in out patients / L.V. Daniels, P. Clopton, A.S. Maisel // Amer. Heart. – 2010. – № 160. – P. 721-728.
13. Daniels L.V. Using ST2 in cardiovascular patients: a review / L.V. Daniels, A. Bayes-Genis // Future Cardiol. – 2014. – Vol. 10, № 4. – P. 525-539.
14. David M.L. Synaptic Effects Induced by Alcohol / M.L. David, R. Marisa // Curr Top Behav Neurosci. – 2013. – № 13. – P. 31-86.
15. El-Mas M.M. Ethanol Metabolism and Effects: Nitric Oxide and its Interaction / M.M. El-Mas, A.A. Abdel-Rahman // Alcohol. – 2013. – Vol. 47, № 4. – P. 339-346.
16. Inoue M. Cross-talk between NO and oxyradicals, a supersystem that regulates energy metabolism and survival of animals / M. Inoue, E.F. Sato, A.M. Park // Free Radic. Res. – 2000. – Vol. 33. – P. 757-770.
17. Kalvinsh I.Ya. Mildronate: mode of action and prospects of its application / I.Ya. Kalvinsh. – Riga, 2012. – 132 p.
18. Kharchenko O. Long-term alcohol consumption provokes oxidative and nitrosative stress in albino rats brain / O. Kharchenko // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2015. – № 3. – P. 49-54.
19. Lieber Charles S. Medical and Nutritional Complications of Alcoholism: Mechanisms and Management / Charles S. Lieber. – Springer, N.Y., 1992. – 677 p.
20. Maisel A.S. Do we need another heart failure biomarker: focus on soluble suppression on tumoregenicity 2 (sST2) / A.S. Maisel // Eur. Heart Journ. – 2016. – № 1. – P. 7-27.
21. Michel Th. Cellular signaling and NO production / Th. Michel, P.M. Vanhoutte // Pflugers Arch. – 2010. – № 459. – P. 807-816.
22. Syapin P.J. Alcohol and nitric oxide production by cells of the brain / P.J. Syapin // Alcohol. – 1998. – № 16 (2). – P. 159-165.
23. Xin-sheng D. Ethanol Metabolism and Effects: Nitric Oxide and its Interaction / D. Xin-sheng, A.D. Richard // Curr. Clin. Pharmacol. – 2007. – № 2 (2). – P. 145-153.

УДК 616.831-092:616.89-008.441.3-036.12-085.272.4.014.4]-092.9

### МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ КАРДІОМІОЦИТІВ ПРИ МОДЕЛЮВАННІ АЛКОГОЛЬНОЇ КАРДІОМІОПАТІЇ У ЩУРИВ: КАРДІОПРОТЕКТИВНІ ЕФЕКТИ МЕТАБОЛІТОТРОПНИХ ЗАСОБІВ

Беленічев І. Ф., Стеблюк В. С., Абрамов А. В.

**Резюме.** В останній час у зв'язку зі значним поширенням алкогольної кардіоміопатії серед працездатного населення індустріально розвинених країн актуальною необхідністю є пошук нових лікарських засобів строго спрямованої дії з урахуванням інтимних механізмів пошкоджувальної дії етилового алкоголю на міокард. У цьому відношенні безсумнівний інтерес має похідне 1,2,4-триазоліл-5-тіона – Ангіолін (розробка НВО «Фарматрон»), а також Мілдронат та Мексидол.

**Метою роботи** є вивчення впливу Ангіоліну, Мілдронату та Мексидолу на морфофункціональні та молекулярні порушення міокарду в умовах моделювання алкогольної кардіоміопатії.

Встановлено, що моделювання алкогольної кардіоміопатії (АКМП) шляхом 90-добового внутрішньошлункового введення 25% етанолу (8 г/кг) призводить через 30 діб після відміни етанолу до морфологічних змін кардіоміоцитів в експериментальних тварин – зниженням щільності ядер кардіоміоцитів, підвищенням площі, зниженням концентрації ядерної та цитоплазматичної РНК та низьким ядерно-цитоплазматичним коефіцієнтом. У цитозолі міокарду тварин з АКМП реєстрували збільшення концентрації маркера фіброзу та ремоделювання серцевої тканини – білка ST-2 – у 3,34 рази – в порівнянні з групою інтакту. Курсове 30-добове внутрішньошлункове введення тваринам з АКМП метаболітотропних кардіопротекторів у лікувальному режимі – Ангіоліну (100 мг/кг), Мексидолу (200 мг/кг) та Мілдронату (250 мг/кг) призводило до змін у різній спрямованості та ступеню вираженості морфофункціональних показників міокарду.

Курсове введення Мілдронату призводило до більшого, у порівнянні з групою контролю, зниженню щільності ядер кардіоміоцитів та зниження ядерно-цитоплазматичного коефіцієнту на фоні збільшення

площі ядер кардіоміоцитів, збільшення РНК у цитоплазмі кардіоміоцитів на 18%, не впливаючи на цей показник у ядрах та зниженню концентрації ST-2. Отримані дані свідчать про те, що Мілдронат на виявив впливу на ознаки патологічної гіпертрофії міокарду при алкогольній кардіоміопатії. Курсове введення Мексидолу не мало достовірного впливу на показник щільності ядер кардіоміоцитів, але достовірно підвищувало ядерно-цитоплазматичний коефіцієнт на фоні збільшення площі ядер кардіоміоцитів, призводило до достовірного збільшення РНК у цитоплазмі та ядрах кардіоміоцитів, знижувало концентрацію ST-2, що свідчило про кардіопротективний ефект засобу. Введення Ангіоліну чинило виражений кардіопротективний ефект – призводило до достовірного, у порівнянні з групою контролю, збільшенню щільності ядер кардіоміоцитів, підвищенню концентрації РНК у ядрах та цитоплазмі кардіоміоцитів, до нормалізації площі кардіоміоцитів, збільшенню ядерно-цитоплазматичного індексу міокарду та до зниження концентрації ST-2. За силою кардіопротективного ефекту Ангіолін достовірно перевершує референс-засоби Мілдронат та Мексидол. Отримані дані є експериментальним обґрунтуванням для застосування Мексидолу та, особливо, Ангіоліну у комплексній терапії алкогольної кардіоміопатії.

**Ключові слова:** експериментальна алкогольна кардіоміопатія, ангіолін, мексидол, мілдронат, площа та щільність ядер кардіоміоцитів, РНК, ST-2 протеїн.

УДК 616.831-092:616.89-008.441.3-036.12-085.272.4.014.4]-092.9

### **МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КАРДИОМИОЦИТОВ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ АЛКОГОЛЬНОЙ КАРДИОМИОПАТИИ У КРЫС: КАРДИОПРОТЕКТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ МЕТАБОЛИТРОПНЫХ ПРЕПАРАТОВ**

**Беленичев И. Ф., Стеблюк В. С., Абрамов А. В.**

**Резюме.** В последнее время в связи распространением алкогольной кардиомиопатии среди трудоспособного населения промышленно развитых стран актуальной необходимостью является поиск новых лекарственных препаратов строго направленного действия, с учетом интимных механизмов повреждающего действия этилового алкоголя на миокард. В этом отношении несомненный интерес представляет производное 1,2,4-триазол-5-тиона – Ангхиолин (разработка НПО «Фарматрон»), а также Милдронат и Мексидол.

**Цель работы.** Изучение влияния Ангхиолина, Мексидола и милдроната на морфо-функциональные и молекулярные нарушения миокарда в условиях моделирования алкогольной кардиомиопатии.

Установлено, что моделирование алкогольной кардиомиопатии (АКМП) путем 90-суточного внутрижелудочного введения 25% этанола (8 г/кг) приводит через 30 суток после отмены этанола к морфологическим изменениям кардиомиоцитов у экспериментальных животных – снижением плотности ядер кардиомиоцитов, повышением их площади, снижением концентрации ядерной и цитоплазматической РНК и низким ядерно-цитоплазматическим коэффициентом. В цитозоле миокарда животных с АКМП регистрировали увеличение концентрации маркера фиброза и ремоделирования сердечной ткани – белка ST2 в 3,34 раза по сравнению с группой интакта. Курсовое 30-суточное внутривенное введение животным с АКМП метаболитропных кардиопротекторов в лечебном режиме – Ангхиолина (100 мг/кг), Мексидола (200 мг/кг) и Милдроната (250 мг/кг) приводило к изменению в разной направленности и степени выраженности морфо-функциональных показателей кардиомиоцитов.

Курсовое введение Милдроната приводило к большему, по сравнению с группой контроля, снижению плотности ядер кардиомиоцитов и уменьшению ядерно-цитоплазматического коэффициента на фоне увеличения площади ядер кардиомиоцитов, повышению РНК в цитоплазме кардиомиоцитов на 18%, не влияя на этот показатель в ядрах и снижению концентрации ST2. Выявленные данные свидетельствуют о том, что Милдронат не оказывал влияние на признаки патологической гипертрофии миокарда при алкогольной кардиомиопатии. Курсовое введение Мексидола не оказывало достоверного влияния на показатель плотности ядер кардиомиоцитов, но достоверно повышало ядерно-цитоплазматический коэффициент на фоне увеличения площади ядер кардиомиоцитов, приводило к достоверному повышению РНК в цитоплазме и ядрах кардиомиоцитов, снижало концентрацию ST2, что свидетельствовало о кардиопротективном эффекте препарата. Введение Ангхиолина оказывало выраженное кардиопротективное действие – приводило к достоверному, по сравнению с группой контроля, увеличению плотности ядер кардиомиоцитов, повышению концентрации РНК в ядрах и цитоплазме кардиомиоцитов, к нормализации площади кардиомиоцитов, повышению ядерно-цитоплазматического индекса миокарда и к снижению концентрации ST2. По силе кардиопротективного эффекта Ангхиолин достоверно превосходит референс-препараты Милдронат и Мексидол. Полученные данные являются экспериментальным обоснованием для применения Мексидола и, особенно, Ангхиолина в комплексной терапии алкогольной кардиомиопатии.

**Ключевые слова:** экспериментальная алкогольная кардиомиопатия, ангиолин, мексидол, милдронат, плотность и площадь ядер кардиомиоцитов, РНК, ST2 – протеин.

UDC 616.831-092:616.89-008.441.3-036.12-085.272.4.014.4]-092.9

### **MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF CARDIOMYOCYTES IN THE MODELING OF ALCOHOLIC CARDIOMYOPATHY IN RATS: CARDIOPROTECTIVE EFFECTS OF METABOLITROPHIC DRUGS**

**Belenichev I. F., Steblyuk V. S., Abramov A. V.**

**Abstract.** Recently, in connection with the spread of alcoholic cardiomyopathy among the able-bodied population of industrialized countries, the urgent need is to find new drugs of strictly directed action, taking into

account the intimate mechanisms of the damaging effect of ethyl alcohol on the myocardium. In this respect, the 1,2,4-triazolyl-5-thione derivative, Angiolin (developed by Pharmatron), and Mildronate and Mexidol are of undoubted interest.

*The aim of the work* was to study the effect of Angiolin, Mexidol and Mildronate on morpho-functional and molecular myocardial disturbances under conditions of modeling of alcoholic cardiomyopathy. In the experiment, 60 white, non-white, white rats of male rats weighing 170-180 grams were obtained from the nursery of the Institute of Pharmacology and Toxicology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine. All experimental procedures were carried out in accordance with the "Regulations on the Use of Animals in Biomedical Research". Alcoholic cardiomyopathy (ACSM) was caused by intra-gastric injection with a metal probe of a 20% ethanol solution at a dose of 8 g/kg for 90 days.

This model can reproduce the structural, functional and metabolic disturbances of the myocardium characteristic of ACMP. All animals were divided into 6 groups of 10 individuals each. The investigated preparations were administered intragastrically with the help of a metal probe – Angiolin (NPO "Farmatron", Ukraine) in a dose of 100 mg/kg; Mildronate (Grindeks, Latvia) – 250 mg/kg; Mexidol (OOO NPK Pharmasoft, Russia) – 200 mg/kg.

Control and intact groups received physiological saline. At the end of the experiment, the animals were removed from the experiment in 2-4 minutes. After the injection of sodium ethaminal (40 mg/kg) (before the loss of the rectification reflex) in order to minimize the neurometabolic disorders. The apex of the heart was placed in a Carnoy fixator for 24 hours, then poured into a paraplast and serial histological sections (5  $\mu$ m) were prepared, which were stained by Einarsson.

Morphometric analysis of cardiomyocytes was performed using an Axioskop (Zeiss, Germany) microscope with a COHU-4922 (USA) video camera and entered into a digital image analysis system VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Germany). In the cytosol of the myocardium, a molecular marker of myocardial damage to ST2 protein was determined by the solid-phase immunosorbent sandwich ELISA method.

The reliability of the differences between the experimental groups was carried out using the nonparametric Mann-Whitney U-test. Reliability was considered significant with a significance level of more than 95% ( $p < 0.05$ ). The results of the research were processed using the statistical package of the licensed program "STATISTICA for Windows 6.1" (StatSoft Inc., No. AXR R712D833214SAN5), as well as "SPSS 16.0", "Microsoft Excel 2003".

It has been established that the modeling of alcoholic cardiomyopathy (ACMP) leads to morphological changes in cardiomyocytes in experimental animals—a decrease in the density of cardiomyocyte nuclei, an increase in their area, a decrease in the nuclear and cytoplasmic RNA concentration, and a low nuclear-cytoplasmic coefficient. In the cytosol of the myocardium, animals with ACMP were registered with an increase in the concentration of the marker of fibrosis and remodeling of the cardiac tissue – ST2 protein by 3,34 times compared with the group of the intact. The 30-day course of intragastric administration to animals with ACMP metabolotropic cardioprotectors in the treatment regimen – Angiolin (100 mg/kg), Mexidol (200 mg/kg) and Mildronate (250 mg/kg) led to a change in the different orientation and severity of morpho-functional parameters of cardiomyocytes.

The course of Mildronate's administration led to a greater decrease in the density of cardiomyocyte nuclei compared with the control group and a decrease in the nuclear-cytoplasmic coefficient against the background of an increase in the area of cardiomyocyte nuclei, an increase in RNA in the cytoplasm of cardiomyocytes by 18%, without affecting this index in nuclei and decreasing the concentration of ST2. The findings indicate that Mildronate did not affect the signs of abnormal myocardial hypertrophy in alcoholic cardiomyopathy.

Mexidol course administration had no significant effect on a density of cardiomyocyte nuclei, but significantly increased the nuclear-cytoplasmic ratio, with increased area cardiomyocyte nuclei, resulting in a significant increase of the RNA in the cytoplasm and the nucleus of cardiomyocytes, reduced ST2 concentration, indicating that the cardioprotective effects of the drug. Introduction Angiolin exerted pronounced cardioprotective – resulted in a significant, compared with the control group, an increase in cardiomyocyte nuclei density, higher concentration of RNA in the nuclei and the cytoplasm of cardiomyocytes, to normalize the area of cardiomyocytes, to increase the nuclear-cytoplasmic index of the myocardium and to reduce the concentration of ST2. Angiolin by its pharmacological characteristics is most indicated in the complex cardioprotection with ACMP. This is due to the fact that metabotropic therapy for AKMP, in contrast to that of CHF, should be aimed at preserving the structural and functional features of myocardium mitochondria, i.e. Carry the elements of mitoprotection. Complex metabotropic cardioprotection with ACMP should restore metabolic alcohol-dependent shifts in the biochemical continuum of cardiomyocytes, so that each previous medicinal ingredient creates substrates for the action of the subsequent medication. By the strength of the cardioprotective effect, Angiolin significantly exceeds the references Mildronate and Mexidol. The obtained data are experimental justification for the use of Mexidol and, especially, Angiolin in the complex therapy of alcoholic cardiomyopathy.

**Keywords:** experimental alcoholic cardiomyopathy, angiolin, mexidol, mildronate, density and area of nuclei of cardiomyocytes, RNA, ST2 – protein.

*Рецензент – проф. Білаш С. М.  
Стаття надійшла 15.08.2017 року*