

DOI: 10.26693/jmbs02.03.021

УДК 616.12-008.331.1:616-092.11-085:615.225.2:615:036.6

Нагорна О. О.¹, Бєленічев І. Ф.², Горчакова Н. О.¹, Мазур І. А.², Чекман І. С.³

ВПЛИВ АНГІОЛІНУ НА МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ПОКАЗНИКИ ЕНДОТЕЛІОЦИТІВ У ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЮ ХРОНІЧНОЮ СЕРЦЕВОЮ НЕДОСТАТНІСТЮ

¹Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця, м. Київ²Запорізький державний медичний університет³Київський медичний університет УАНМ

gorchakovan@ukr.net

При хронічній серцевій доксорубіциновій недостатності, крім порушень серцевої діяльності, можливі пошкодження ендотеліоцитів. Метою роботи було дослідження впливу ангіоліну на морфофункціональні показники ендотеліоцитів та імунологічні молекулярні маркери ендотеліальної дисфункції щурів з хронічною серцевою недостатністю. Моделювання серцевої недостатності здійснювали введенням доксорубіцину за Методичними вказівками ДЕЦ МОЗ України. Ангіолін вводили внутрішньоочеревинно в дозі 100 мг/кг протягом 14 діб паралельно з доксорубіцином, потім ще 21 добу. Мілдронат вводили в дозі 250 мг/кг за тією ж схемою. Ендотеліопротективну активність препаратів визначали за змінами морфофункціональних показників ендотеліоцитів морфологічними методами. Вміст імунологічних молекулярних маркерів ендотеліальної дисфункції – вміст С-реактивного білку, фактору некрозу пухлин альфа, гамма-інтерферону ідентифікували біохімічними методами з залученням наборів. Встановили, що при хронічній серцевій недостатності спостерігалася десквамація ендотеліальних клітин – зменшення площі, щільності ендотеліоцитів, концентрації РНК в ядрах ендотеліоцитів, зростання кількості епітеліальних клітин з ознаками апоптозу. Ангіолін при курсовому введенні підвищував щільність, площу ендотеліоцитів, концентрацію РНК в ядрах ендотеліоцитів та понижував щільність ендотеліоцитів з ознаками апоптозу. При введенні ангіоліну спостерігали зменшення експресії молекулярних маркерів дисфункції ендотелію – фактору некрозу пухлин альфа, С-реактивного білку, інтерферону-гамма на фоні підвищення експресії васкулоендотеліального фактору

Ключові слова: ангіолін, хронічна серцева недостатність, морфофункціональні властивості ендотеліоцитів, імунологічні маркери.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дана робота є фрагментом НДР «Експериментальне обґрунтування комбінованого застосування кардіотропних препаратів», № держ. реєстрації 0111U009417.

Вступ. При хронічній серцевій недостатності, що викликана доксорубіцином, крім функціональних порушень серцевої діяльності можливі пошкодження ендотеліоцитів, в тому числі фактору росту ендотеліоцитів [1, 5, 6].

Крім того, при різних хронічних захворюваннях серцево-судинної системи зростає вміст імунологічних маркерів таких як С-реактивний білок (СРБ), фактор некрозу пухлин альфа (ФНП α), гамма-інтерферон G (GIF- γ) [7, 10].

Ендотеліопротектори прямої дії подібні ангіоліну та непрямої дії подібні мілдронату, можуть по-різному впливати на морфофункціональні показники ендотеліоцитів та імунологічні маркери у щурів при патологічних станах, тому що вони мають різні механізми реалізації кардіо- та вазопротекторної дії [8].

Мета дослідження. Визначення впливу ангіоліну на морфо-функціональні показники ендотеліоцитів та імунологічні молекулярні маркери ендотеліальної дисфункції щурів з хронічною серцевою недостатністю.

Матеріали і методи дослідження. Експерименти проведені на 56 білих безпородних щурах-самцях масою 180–220 г, що утримувалися у віварії НМУ ім. О.О. Богомольця відповідно до положень Європейської конвенції про захист безхребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей (Страсбург, 2005), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених П'ятим національним конгресом з біоетики (Київ, 2013). Для відтворення хронічної серцевої недостатності (ХСН) застосовували доксорубіцинову модель, яку вважають найбільш

ефективною, що веде до розвитку вираженої та прогресуючої ХСН у більшості тварин завдяки застосуванню доксорубіцину внутрішньоочеревинно в кумулятивній дозі 15 мг/кг поділеної на 6 ін'єкцій протягом 14 днів [12].

Ангіолін в дозі 100 мг/кг та референтний препарат Мілдронат в дозі 250 мг/кг вводили внутрішньошлунково з Твіном-80 паралельно з доксорубіцином протягом 14 діб, а потім ще протягом 21 доби. Тварин виводили з експерименту на 35 добу під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг). В роботі застосовували ангіолін у вигляді таблетованої маси НВО «Фарматрон» (Запоріжжя) та мілдронат в капсулах по 250 мг/кг виробництва АТ Гриндекс (Латвія). Ендотеліопротективну активність препаратів оцінювали за змінами морфофункціональних показників ендотеліоцитів та вмісту молекулярних маркерів ендотеліальної дисфункції в атріальному міокарді та сироватці крові.

Для морфологічних досліджень вилучали верхівку серця, фіксували в 10% формаліні нейтральному, заливали в парафінові блоки, з яких робили серійні 5-мікронні зрізи з різних відділів міокарду [11]. Потім для вивчення морфофункціональних показників ендотеліоцитів гістологічні зрізи депарафінували за стандартним методом та забарвлювали галоціанін-хромовими квасцями за Ейнарсоном для визначення РНК[9].

Морфологічний аналіз проводили на мікроскопі Аxioskop (Ziess, Germany) за допомогою відеокамери СОНУ 386 (Kontron Elektronik, Germany). Визначали площу ендотеліоцитів, щільність ендотеліоцитів на 1 мм² площі міокарду, концентрацію РНК в ядрах ендотеліоцитів, щільність апоптичних та деструктивно змінених ендотеліоцитів на 1 мм² площі міокарду.

Також проводили біохімічні дослідження. Вміст С-реактивного білку визначали на автоматичному біохімічному Prestige 24i, застосовуючи набір фірми Сornau (N каталогу 4-480 серія 210-3131). Васкулоендотеліальний фактор (VEGF) ідентифікували в цитозольній фракції гомогенату серця твер-

дофазним імуносорбентним сендвідж-методом ELISA, ELISA Kit (Cat. NE-ELR0020) фірми Elobscience та виражали в пг/мг білка. Фактор некрозу пухлин альфа (TNF-α) визначали в цитозольній фракції гомогенату серця твердофазним імуносорбентним сендвідж-методом ELISA, ELISA Kit (Cat. NE-ELR0865) фірми Elobscience та виражали в пг/мг білка. Інтерферон-гама (INF-γ) ідентифікували в цитозольній фракції гомогенату серця твердофазним імуносорбентним сендвідж-методом ELISA, ELISA Kit (Cat. NE-ELR009) фірми Elobscience та виражали в пг/мг білка.

Вірогідність результатів оцінювали за допомогою t-критерію Стьюдента, застосовуючи стандартний пакет програм статистичного оцінювання результатів версії Microsoft Office Excel 2003.

Результати дослідження та їх обговорення.

Результати досліджень показали, що при доксорубіциновій хронічній серцевій недостатності відбувалися суттєві структурно-функціональні зміни ендотелію. Поряд зі збереженими ділянками інтими аорти та ендотелію міокарду були зони їх вираженого пошкодження, що у ряді випадків призводило до десквамації ендотеліальних клітин (табл. 1). Особливо чітко це спостерігалось в місцях локального набряку середньої оболонки аорти, де відмічали значну дезорганізацію еластичних мембран та появу великих фібробласноподібних клітин. При цьому також зросла кількість ендотеліальних клітин з ознаками апоптозу.

Введення щурам з ХСН ангіоліну в дозі 100 мг/кг призвело до зменшення прояв дисфункції ендотелію. Так, в групі тварин, які отримали ангіолін, спостерігали підвищення щільності ендотеліоцитів на 25,5%, площі ендотеліоцитів на 12,5% та зростання концентрації РНК в ядрах на 62,2%. Введення ангіоліну викликало антиапоптичний ефект, про що свідчить пониження щільності апоптично змінених ендотеліоцитів на 44,7%. Мілдронат достовірно змінював порівняно з контролем вищезазначені показники. Біохімічний аналіз сироватки крові експериментальних тварин визначив, що

Таблиця 1 – Вплив ангіоліну та мілдронату на морфофункціональні показники ендотеліоцитів кровеносних капілярів в атріальному міокарді при хронічній серцевій недостатності на 35 добу експерименту (n=10)

Досліджувані показники	Інтактні	ХСН (контроль)	ХСН+ангіолін (100 мг/кг)	ХСН+мілдронат (250 мг/кг)
Площа ендотеліоцитів, мкм ²	17,3±0,33	15,2±1,1*	17,1±0,77** ¹	15,8±1,0
Щільність ендотеліоцитів на 1 мм ² площі міокарду	1432±61	988±21*	1240±26** ¹	991±15
Концентрація РНК в ядрі ендотеліоцитів, ЕОП	0,221±0,001	0,143±0,001*	0,232±0,001** ¹	0,131±0,001** ¹
Щільність апоптичних і деструктивно змінених ендотеліоцитів на 1 мм ² площі міокарду	11,2±3,8	87,2±12,6*	48,2±12,8** ¹	81,2±18,5*

Примітки: *p<0,05 щодо інтактних тварин; **p<0,05 щодо контролю; ¹p<0,05 щодо мілдронату.

Таблиця 2 – Вплив ангіоліну та мілдронату на молекулярні маркери ендотеліальної дисфункції в атріальному міокарді та сироватці крові тварин з ХСН на 35 добу експерименту (n=10)

Досліджувані показники	Інтактні	ХСН(контроль)	ХСН+ангіолін (100 мг/кг)	ХСН+мілдронат (250 мг/кг)
VEGF, пг/мг білку	33,8±4,19	18,8±8,41*	55,1±7,22*** ¹	21,5±4,11
TNF-α, пг/мг білку	4,18±0,71	28,7±3,66*	10,2±1,78** ¹	27,1±4,87*
С-реактивний білок, г/л	4,21±0,31	14,13±0,87*	5,32±0,28** ¹	10,11±0,78*
IFN-γ пг/мг білку	11,8±2,8	32,28±2,26*	18,21±2,31*** ¹	36,67±4,11*

Примітки: *p<0,05 щодо інтактних тварин; **p<0,05 щодо контролю; ¹p<0,05 щодо мілдронату.

моделювання ХСН 14-добовим введенням доксорубіцину веде до достовірного підвищення С-реактивного білку в 2,35 рази на 35 добу спостереження відносно значень інтактних тварин (табл. 2). Підвищення С-реактивного білку свідчить про розвиток запальної реакції при ХСН та формуванні дисфункції ендотелію. Призначення тваринам з ХСН ангіоліну вело до достовірного зменшення С-реактивного білку в сироватці крові цих тварин на 62,2% порівняно з групою нелікованих тварин. Введення мілдронату забезпечило достовірно менш виражений ефект стосовно цього показника відносно до групи тварин з ХСН, які отримали ангіолін. Імуноферментний аналіз цитозоля міокарду тварин з ХСН виявив пониження васкулоендотеліального фактору (VEGF) на 44,4% відносно аналогічного показника інтактних тварин. Курсове введення тваринам з ХСН ангіоліну вело до підвищення на 193% VEGF в цитозолі міокарду, що ствердило раніше визначені ендотеліопротективні властивості ангіоліну. Подальшим імуноферментативним аналізом цитозоля міокарду тварин з ХСН виявлено підвищення молекулярних маркерів дисфункції ендотелію при ХСН – фактора некрозу пухлин альфа (TNF-α) в 5,8 рази і гама інтерферону (IFN-γ) на 173%.

В експериментальних дослідженнях було визначено, що VEGF, TNF-α, IL-1β та IFN-γ понижують експресію eNOS, продукцію NO, посилюють його окислювальну модифікацію, перетворюючи його в пероксинітрит. TNF-α та IFN-γ пригнічують експресію VEGF і запускають апоптоз ендотеліальних клітин [14].

Було продемонстровано, що рівні циркулюючих TNF-α та IFN-γ обернено пропорційні піковій швидкості кровообігу у пацієнтів з ХСН незалежно від віку, пікового вживання кисню і функціонально-го класу ХСН за класифікацією NYHA [13].

В дослідженнях VEST та SOLID було визначено, що підвищення рівня циркулюючих TNF-α, IL-1β та IFN-γ пов'язано зі зниженням виживання [2, 3, 4, 13].

Курсове призначення щурам з ХСН ангіоліну сприяло достовірному пониженню TNF-α на 64,5% та IFN-γ на 43,4%. Подібна дія ангіоліну свідчить про пригнічення TNF-α залежного процесу клітинної загибелі шляхом апоптозу в тканинах міокарду. Таким чином, ангіолін мав виражену ендотеліопротективну дію при доксорубіциновій ХСН, що виражалось в достовірному підвищенні щільності ендотеліоцитів судин міокарду, зростанню в них концентрації РНК і VEGF, а також в гальмуванні апоптозу ендотеліоцитів (достовірне пониження щільності клітин з ознаками апоптозу та пониження TNF-α, С-реактивного білку і IFN-γ). Введення мілдронату в дозі 250 мг/кг тваринам з ХСН не мало за цими показниками ендотеліопротективної дії на даній моделі ХСН.

Висновки

Курсове внутрішньоочеревинне введення ангіоліну в дозі 100 мг/кг щурам з ХСН протягом 35 днів веде до підвищення щільності ендотеліоцитів артеріальних судин міокарду на 2,5% площі ендотеліоцитів на 12,5%, зростанню в них концентрації РНК на 62,2%, пониженню щільності ендотеліоцитів з ознаками апоптозу на 33,7%.

Ангіолін при внутрішньоочеревинному введенні щурам в дозі 100 мг/кг протягом 35 днів зменшує експресію молекулярних маркерів дисфункції ендотелію – фактору некрозу пухлин альфа (TNF-α) на 64,5%, С-реактивного білку на 62,2%, інтерферону-гама (IFN-γ) на 44,7% на фоні підвищення експресії васкулоендотеліального фактору (VEGF) на 193%.

Перспективи подальших досліджень. Планується експериментальні порівняльні дослідження впливу ангіоліну з іншими, крім мілдронату, метаболітними ендотеліопротекторними засобами.

References

- Amosova KM, Stremenyuk OT, Andryeyev YeV, et al. Rol endotelialnoi disfunktsiyi ta sistemnoho imunnoho zapalennya u viniknenni ishemiyi miokarda pri fizichnomu navantazheni u khvorikh z hemodinamichno neznachushchim aterosklerozom vintsevikh arteriy sertsya. *Ukrainskiy kardiologichniy zhurnal*. 2011; 4: 14-9. [Ukrainian].

2. Buvaltsev VI. Disfunktsiya endoteliiya kak novaya kontseptsiya profilaktiki i lecheniya serdechno-sosudistyx zabolovaniy. *Mezhdunarodnyi meditsinskiy zhurnal*. 2001; 3: 202–8. [Russian].
3. Vaizova OE. Rol endotelialnykh faktorov v rehulyatsii sosudistoho tonusa i lokalnoho hemostaza. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal*. 2000; 2: 27-37. [Russian].
4. Vizir VA, Berezin AE. Perspektivy reversii endotelialnoy disfunktsii u bolnykh s zastoynoy serdechnoy nedostatochnostyu. *Klinicheskaya meditsina*. 2000; 7: 36-9. [Russian].
5. Hendlin HE, Emelina EI, Nikitin IH, Vasyuk YuA. Sovremenniy vzhlyad na kardiotsichnost khimioterapii onkologicheskikh zabolovaniy, vklyuchayushchey antratsiklinovye antibiotiki. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal*. 2017; 3: 145-54. [Russian].
6. Klimontov VV, Bulumbaeva DM, Tyan NV, i dr. Vzaimosvyaz urovnya faktora rosta endoteliiya sosudov v syvorotke krovi i polimorfizma gena VEGFA s ishemicheskoy boleznью serdtsa u bolnykh sakharnym diabetom 2-ho tipa. *Kardiologiya*. 2017; 57 (5): 17-22. [Russian].
7. Kovalenko VN, Talaeva TV, Bratus VV. Vospalenie i oksidativnyi stress v kardiiovaskulyarnoy patologii (obzor literatury). *Zhurnal Natsionalnoi akademiyi medichnikh nauk Ukraini*. 2012; 18 (4): 461-74. [Russian].
8. Kolesnik YuM, Chekman IS, Mazur IA, ta in. Mekhanizmi rozvitku endotelialnoi disfunktsiyi ta poshuk endotelioprotektoriv. *Zhurnal Natsionalnoi akademiyi medichnikh nauk Ukraini*. 2014; 20 (3): 289-99. [Ukrainian].
9. Mironov AN, Bunyatyan ND. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast pervaya*. M: Hrif i K; 2012. 944 s. [Russian].
10. Tereshchenko SN, Skvortsov AA, Shchedrina AYU, i dr. Diahnosticheskaya znachimost immunologicheskikh markerov u bolnykh vospalitelnoy kardiomiopatiey. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal*. 2017; 2: 22-9. [Russian].
11. Chekman IS, Hubskiy Yul, Belenichev IF, i dr. *Doklinicheskoe izuchenie spetsificheskoy aktivnosti potentsialnykh neyroprotektivnykh preparatov. Metodicheskie rekomendatsii*. K; 2010. 81 s. [Russian].
12. Chekman IS, Belenichev IF, Horchakova NA, i dr. *Doklinicheskoe izuchenie spetsificheskoy aktivnosti endotelioprotektivnykh preparatov. Metodicheskie rekomendatsii*. K; 2014. 60 s. [Russian].
13. Bauters C, Six I, Meurice T, Van Belle E. Growth factors and endothelial dysfunction. *Drugs*. 1999; 59: 11–5. PMID: 10548387
14. Belenichev IF, Mazur IA, Bukhtiyarova NV. The endothelium-protective effect of 3-methyl-1,2,4-triazolyl-5-thioacetate (s)-2,6-diaminohehexanic acid(Lysinium) effect on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and the characteristics of animals with cerebral ischemia. *Neurochemical journal*. 2013; 7 (4): 296-303. URL: <http://dspace.zsmu.edu.ua/handle/123456789/2338>.

УДК 616.12-008.331.1:616-092.11-085:615.225.2:615:036.6

ВЛИЯНИЕ АНГИОЛИНА НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

Нагорная Е. Ф., Беленичев И. Ф., Горчакова Н. А., Мазур И. А., Чекман И. С.

Резюме. При хронической сердечной недостаточности, кроме нарушений сердечной деятельности, возможны повреждения эндотелиоцитов. Целью работы было исследование влияния ангиолина на морфофункциональные показатели эндотелиоцитов и иммунологические молекулярные маркеры эндотелиальной дисфункции крыс с хронической сердечной недостаточностью. Моделирование сердечной недостаточности выполнялось введением доксорубина согласно Методическим рекомендациям ГЭЦ МОЗ Украины. Ангиолин вводили внутривентриально в дозе 100 мг / кг в течение 14 дней параллельно с доксорубином, затем еще 21 день. Милдронат вводили в дозе 250 мг / кг по той же схеме. Эндотелиопротективную активность препаратов определяли по изменениям морфофункциональных показателей эндотелиоцитов морфологическими методами. Содержание иммунологических молекулярных маркеров эндотелиальной дисфункции – содержание С-реактивного белка, фактора некроза опухоли альфа, гамма-интерферона идентифицировали биохимическими методами с привлечением наборов. Установили, что при хронической сердечной недостаточности наблюдалась десквамация эндотелиальных клеток – уменьшение площади, плотности эндотелиоцитов, концентрации РНК в ядрах эндотелиоцитов, рост количества эпителиальных клеток с признаками апоптоза. Ангиолин при курсовом введении повышал плотность, площадь эндотелиоцитов, концентрацию РНК в ядрах эндотелиоцитов и уменьшал плотность эндотелиоцитов с признаками апоптоза. При введении ангиолина наблюдали уменьшение экспрессии молекулярных маркеров дисфункции эндотелия – фактора некроза опухоли альфа, С-реактивного белка, интерферона-гамма на фоне повышения экспрессии васкулоэндотелиального фактора.

Ключевые слова: ангиолин, хроническая сердечная недостаточность, морфофункциональные свойства эндотелиоцитов, иммунологические маркеры.

UDC 616.12-008.331.1:616-092.11-085:615.225.2:615:036.6

Angiolon Influence on the Morphofunctional Characteristics of Rats' Endotheliocytes in Chronic Cardiac Insufficiency

Nagornaya E. A., Belenichev I. F., Gorchakova N. A., Mazur I. A., Chekman I. S.

Abstract. Endotheliocytes damage may be diagnosed in chronic cardiac insufficiency besides of cardiac activity and disturbance. *The aim of the study* is to examine the angiolon influence on the morphofunctional characteristics of rats' endotheliocytes and immunological molecular markers of the rats' endothelial dysfunction.

The material and method of the research. The experiments were conducted on the 56 rats without line. The doxorubicine cardiac insufficiency has been created by Methodical recommendation of State Expert Center of the Ministry of Health of Ukraine. Doxorubicin has been solved in the physiological solution and was injected intraperitoneally in the dose 2,5 mg/kg during 14 days. Angiolon was administered intragastrically in the dose 100 mg/kg together with doxorubicin and later during 21 days. Mildronat was administered in the dose 250 mg/kg by the same scheme. The animals were decapitated under thiopentalum-natrium injection. For morphological investigation the heart has been extracted, its top has been fixed in the neutral 10% solution of phormaline and it has been floated into the parafine block which from the serial 5-microne histological cuts has been prepared from the different myocardial parts. For the investigations of the morphofunctional endotheliocytes nucleus status the histological cuts have been deparafinized by the standard method and have been colored by the galocianinchromic alum by Einorson for specific identification RNA. Morphometric analysis of endotheliocytes has been conducted on the AXIOSKOP microscope by means of videocamera COHU-4922 and has been introduced in the system analysis in figures of picture VIDAS-386. It was stated such indexes of endotheliocytes as the endotheliocytes area, endotheliocytes density, RNA concentration in nucleus, apoptic and destructively changed endotheliocytes density. By the biochemical methods there were identified such markers of damage as C-reactive protein, tumor necrosis factor alpha, transforming growth factor, gamma-immunoglobuline. In chronic cardiac insufficiency the reduction of endotheliocytes area, the endotheliocytes density, RNA concentration in nucleus was stated. Apoptic and destructively changed endothelial sites density have been increased. The immunological data have been changed also. The level of C-reactive protein, tumor necrosis factor alpha, gamma-immunoglobuline has been increased and transforming growth factor has been lowered. Angiolon has restored the morphofunctional properties of endotheliocytes and biochemical immunological data.

Conclusion. In the chronic cardiac insufficiency angiolon injected during 35 days increased endotheliocytes area, endotheliocytes density, RNA concentration in nucleus and decreased the level of apoptic and destructively changed endotheliocytes' density. Angiolon also raised the transforming growth factor and the level of the C-reactive protein, gamma-immunoglobuline, and tumor necrosis factor alpha has been fallen.

Keywords: angiolon, chronic cardiac insufficiency, morphofunctional characteristics, endotheliocytes properties immunological markers.

Стаття надійшла 17.07.2017 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування