

## Анализ кардиопротекторного влияния небиволола на ультраструктуру миокарда при регенераторно-пластической сердечной недостаточности у крыс

Ю.Н. Кротова, Д.П. Хлопонин, П.А. Хлопонин, Т.В. Архипова

Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону

Контактная информация: д.м.н. Хлопонин Дмитрий Петрович [khloponin@list.ru](mailto:khloponin@list.ru)

Пролонгированное курсовое введение адриамицина — антибиотика из ряда производных антрациклинов — индуцирует у крыс выраженную кардиотоксическую реакцию с развитием характерной картины кардиомиопатии и регенераторно-пластической сердечной недостаточности. Кардиоселективный  $\beta_1$ -адреноблокатор небиволол проявляет на данной модели сердечной недостаточности отчетливую кардиопротекторную активность. В пользу этого свидетельствуют существенное уменьшение выраженности процессов клеточной гибели (главным образом, апоптоза) кардиомиоцитов, демонстрируемая в большинстве сердечномышечных клеток отсроченная активация процессов внутриклеточной регенерации, структурная стабилизация компонентов гистогематического барьера и снижение проявлений внутриклеточного и, особенно, интерстициального отека.

**Ключевые слова:** небиволол,  $\beta$ -адреноблокатор, кардиопротекция, адриамицин, сердечная недостаточность, апоптоз.

Антибиотики — производные антрациклинового ряда, такие как адриамицин (АДР, доксорубин), даунорубин, эпирубин, идарубин — одни из наиболее эффективных современных антибластомных средств, широко используемых для моно- и полихимиотерапии различных форм ряда опухолей, включая солидные опухоли, саркомы мягких тканей, лейкозы [3, 4, 5, 6, 11].

Однако их применение существенно ограничено возникающими нежелательными эффектами, основным из которых является дозозависимая кардиотоксичность, приводящая к развитию кардиомиопатии и тяжелой хронической сердечной недостаточности (СН), которые де-факто резистентны ко всем известным сегодня фармакотерапевтическим средствам [4, 8, 10, 11].

Патогенетические механизмы антрациклиновой кардиотоксичности крайне

сложны и многоплановы. Приоритетными среди них ныне считаются активация ПОЛ, нарушение адренергической иннервации и синтеза сократительных белков, развитие иммуновоспалительной реакции и стимуляция процессов клеточной гибели (включая апоптоз кардиомиоцитов (КМЦ)) в миокарде [4, 6].

Достигнутые за последние годы определенные (но, честно признать, довольно скромные) успехи в плане фармакопрофилактики и терапии АДР-индуцированной кардиотоксичности связаны, в том числе, с применением лекарственного препарата из ряда  $\beta$ -адреноблокаторов (БАБ) — карведилола [4, 6, 7]. На основании этих данных и продемонстрированного нами на модели альтернативной СН кардиопротекторного эффекта у кардиоселективного БАБ с NO-модулирующей активностью небиволола, мы посчитали

рациональным провести ультраструктурный анализ влияния этого БАБ на миокард крыс с экспериментальной регенераторно-пластической СН антрациклинового генеза.

### Материалы и методы

Исследования проводились на 24 белых беспородных крысах-самцах массой 150-180 г (на начало эксперимента), полученных из филиала «Андреевка» НЦБМТ РАМН. Животные содержались в стандартных условиях вивария (при естественном освещении,  $t$  воздуха  $+18-20^\circ\text{C}$  и влажности 50-60%) в пластиковых клетках размером  $55 \times 45 \times 15$  см, с подстилкой из древесных опилок, по 4-6 особей в клетке. Крысы потребляли гранулированный комбикорм (производитель ООО «Лабораторснаб») и воду *ad libitum* в поилках объемом 200 мл. В эксперимент животных забирали после 7 дней карантина.

Регенераторно-пластическую СН у животных моделировали в соответствии с общепринятым протоколом [12] путем введения АДР («Доксорубин-Лэнс», «Лэнс-Фарм», Россия) в курсовой дозе 15 мг/кг внутривенно (группа А,  $n=6$ ). Раствор АДР готовили согласно инструкции фирмы-производителя, растворяя содержимое 1 флакона (10 мг) в 5 мл растворителя (0,9% изотонического раствора NaCl).

Животные, служившие в качестве контроля I уровня ( $K_0$ -группа,  $n=6$ ), вместо АДР в аналогичном режиме (6-кратно в течение 2 недель) и в сравнимом объеме получали в/б инъекции 0,9% изотонического раствора NaCl.

Основная (опытная) группа животных (группа Н,  $n=6$ ) параллельно с АДР (вводившимся в курсовой дозе и режиме,

аналогичных группе А) в течение всего срока наблюдения получала кардиоселективный БАБ небиволол (Н) («Небилет», Berlin-Chemie AG, Германия) в суточной дозе 1 мг/кг *per os*. Введение Н начинали за двое суток до 1-й инъекции АДР, производили ежедневно и прекращали за 24 ч до умерщвления животных.

В группе контроля II уровня ( $K_{II}$ ;  $n=10$ ) АДР крысам не вводился, и они получали только Н в режиме, аналогичном группе Н (в дозе 1 мг/кг/сут *per os*).

Забор экспериментального материала (миокарда) производили на 8-9 неделях эксперимента. Для ультраструктурного анализа забирали по 3 сердца крыс из каждой группы. Обработка материала проводилась согласно общепринятым протоколам. Извлеченные сердца промывали в холодном 0,1 моль/л буферном растворе фосфата натрия ( $\text{pH}=7,4$ ). Далее образцы ткани предсердий и левого желудочка в форме кусочков размером  $1 \times 1$  мм фиксировали в холодном 2,5% растворе глутаральдегида на 0,1 М фосфатном буфере ( $\text{pH}=7,4$ ) с последующей постфиксацией 1% раствором тетраоксида осмия. Материал промывали в холодном растворе фосфатного буфера, обезживали в спиртах восходящей концентрации и заливали в аралдит. Полимеризацию блоков производили ступенчато при  $t=48^\circ\text{C}$ ,  $59^\circ\text{C}$  и  $80^\circ\text{C}$ . После прицельной заточки блоков ультратонкие срезы (50-90 нм) изготавливали на ультрамикротоме LKB-8800. Срезы контрастировали в 2,5% спиртовом растворе уранил-ацетата [13, 14] и растворе цитрата свинца [9], а затем просматривали в просвечивающем электронном микроскопе Tecnai G2 Spirit Bio TWIN с системой фотосъемки Tecnai Plate Camera System и цифровой видеокамерой высокого разрешения SIS MegaView III.

### Результаты и их обсуждение

Картина АДР-индуцированной кардиомиопатии и СН характеризуется демонстративными изменениями ультраструктуры миокарда, которые представляют собой комплекс морфологических проявлений, вызванных адриамицином повреждений, с одной стороны, и ответных репаративных реакций, с другой.

Электронно-микроскопический анализ ультратонких срезов миокарда крыс ГРУ АДР в целом согласуется с имеющимися в литературе описаниями [1, 2]. Для развивающейся у животных регенераторно-пластической СН в отдаленные (8-9 недели) сроки эксперимента свойственна явная гетероморфность желудочковых и предсердных КМЦ, которая, несомненно, обусловлена вариабельностью в них характера инволюционных и репаративных сдвигов.

Определяющее значение в структурной перестройке сердечномышечной ткани имеет практически полное подавление внутриклеточных процессов биосинтеза (т.е. пластического обмена) как основы

обновления ультраструктур КМЦ. При этом КМЦ условно можно подразделить на три типа. В первых (немногочисленных) проявления угнетения синтеза РНК и белка незначительны, во вторых его пролонгированная блокада и низкая активность сопряжены с гипоплазией внутриклеточных структур, а третьим КМЦ присуще и вовсе абсолютное подавление синтеза РНК и белка, проявлением чего является их прогрессирующая атрофия и элиминация. Последняя происходит в том числе посредством апоптотической гибели клеток сердечной мышцы, интенсивность которой к концу 9 недели эксперимента достигала 0,2-0,3%.

К основным морфологическим проявлениям антрациклиновой кардиотоксичности относятся не только изменения электронной плотности «гелизация» цитоплазмы, ультраструктуры ядра и его компонентов, но и организации и соотношений внутриклеточных объемов органелл сократительного аппарата (миофибрилл), энергетического метаболизма (митохондрий) (рис. 1), биосинтеза (сво-

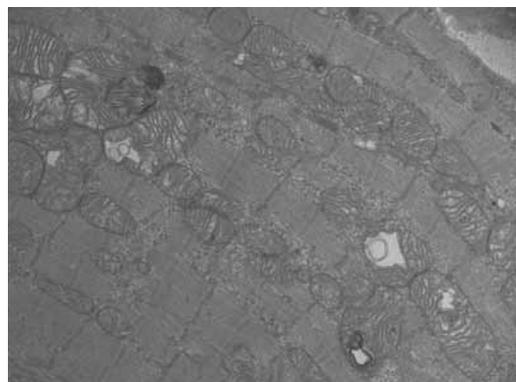


Рис. 1. Сократительный аппарат и деструктивно измененные митохондрии в кардиомиоцит правого предсердия крысы группы АДР. 9 неделя эксперимента. Электронная микрофотография. Ув. 11.500 х.

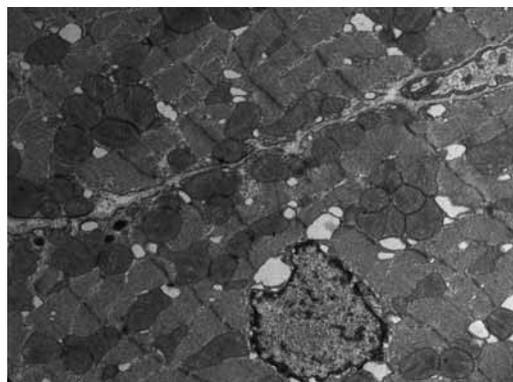


Рис. 2. Деструктивные изменения в кардиомиоцитах левого желудочка сердца крысы группы АДР. Дилатация цистерн саркоплазматической сети. 9 неделя эксперимента. Электронная микрофотография. Ув. 6.000 х.

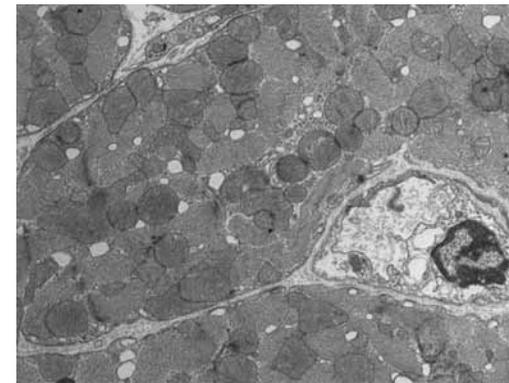


Рис. 3. Ультраструктурные проявления отека интерстициального компонента миокарда крыс группы АДР. 9 неделя эксперимента. Электронная микрофотография. Ув. 6.000 х.

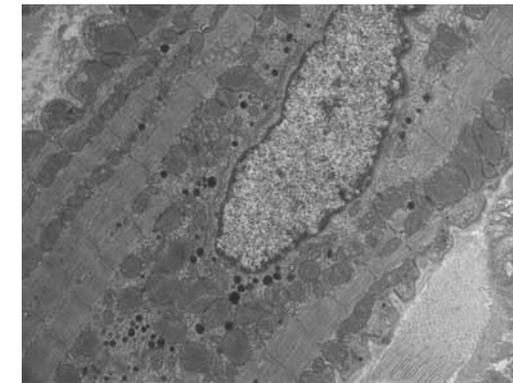


Рис. 4. Ультраструктура кардиомиоцита правого предсердия крысы группы Н. Продолжительность эксперимента – 9 недель. Ув. 6.000 х.

бодных рибосом, саркоплазматической сети (рис. 2) и аппарата Гольджи), включений (гранул гликогена и свободных липидов). Уже на обзорных электроннограммах отчетливо визуализируются проявления выраженного внутриклеточного и интерстициального отека (рис. 3). Последний, наряду с процессами структурной реорганизации интерстиция миокарда, обуславливает развитие интенсивного диффузного кардиосклероза, сопряженного с проявлениями апоптотической гибели эндотелиоцитов, лейомиоцитов и перицитов.

Анализ электроннооптических снимков миокарда крыс группы Н также свидетельствует о том, что АДР накладывает очевидный негативный «след» на структурно-функциональную характеристику сердечной мышечной ткани. Свидетельством этому служат явные изменения ультраструктуры вставочных дисков, ядерного компартмента КМЦ, миофибрилл, митохондрий и саркоплазматической сети. При этом весь комплекс развивающихся структурных изменений структуры в миокарде в целом характеризуется не только масштабом и

диапазоном проявлений деструктивных внутриклеточных процессов, но и определенной спецификой, присущей воздействию комбинации вводимых в эксперименте лекарственных препаратов (АДР и Н).

Использование Н оказывало несомненный стабилизирующий эффект на структуру сердечной мышечной ткани, основными проявлениями которого выступали не только значительное ослабление выраженности интерстициального и внутриклеточного отека, но и нормализация структуры гистогематического барьера в миокарде как вентрикулярного, так и атриального отделов сердца. Однако, необходимо, тем не менее, отметить, что в миокарде правого предсердия (рис. 4) выявленные особенности изменений его ультраструктуры на фоне Н были выражены не столь заметно как в левом желудочке (рис. 5).

Так или иначе, при введении Н достоверным было существенное (на 20-30%) уменьшение числа КМЦ с «адриамициновым» повреждением структуры ядер и особенно ядрышек; значительная гетерохроматизация кариоплазмы, отсут-

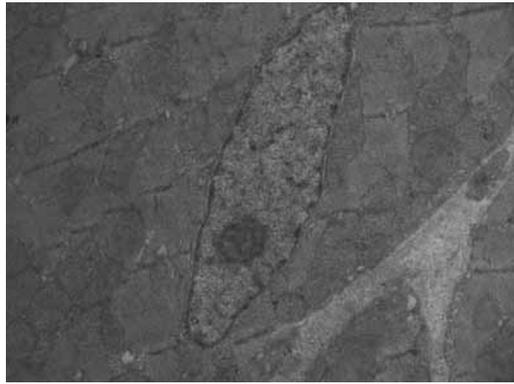


Рис. 5. Электроннооптический снимок миокарда левого желудочка крысы группы Н. Ультраструктура ядра и ядрышка вентрикулярного кардиомиоцита. Продолжительность эксперимента – 9 недель. Ув. 8.200 х.

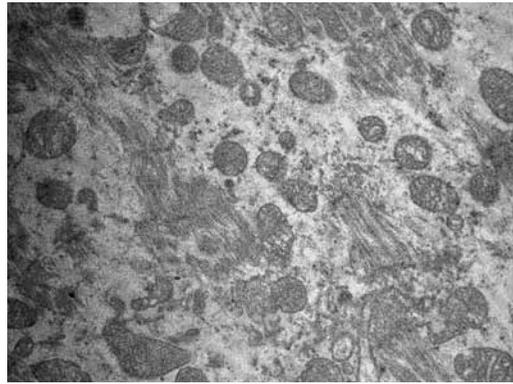


Рис. 6. Ультраструктурные проявления внутриклеточной репаративной регенерации в цитоплазме предсердного кардиального миоцита крысы группы Н. 9 неделя эксперимента. Электронная микрофотография. Ув. 9.900 х.

стве проявлений отсроченных апоптозов КМЦ при сохраняющихся признаках выраженной дезорганизации органелл цитоплазмы, её вакуолизации и внутриклеточного миоцитолитического. Следует отметить крайне низкий уровень субстратов энергообмена и возникновение локусов внутриклеточной регенерации (рис. 6).

В пользу предполагаемого антиапоптотического эффекта небиволола свидетельствовали отсутствие признаков апоптотически погибающих КМЦ как в левожелудочковом, так и в правопредсердном миокарде. Также следует обратить пристальное внимание на присутствие среди деструктивно измененных внутриклеточных структур аутофагосом и лизосом (аутофагия?), обнаружение небольших зон миоцитолитического.

В сердечномышечной ткани крыс группы Н также зачастую обнаруживались КМЦ с близкой к норме структурой миофибрилл, расположенных в окружении дилатированных цистерн саркоплазматического ретикулума и подвергшихся заметным повреждениям

митохондрий переменной формы и размеров, с прозрачным матриксом (нередко занимающим практически весь объем органеллы) и мизерным количеством крист. В матриксе некоторых, обычно локализованных вблизи ядра митохондрий можно было идентифицировать крупные округлые электронноплотные тельца.

К бесспорным морфологическим эффектам Н на фоне экспериментальной регенераторно-пластической СН можно отнести существенно менее выраженные проявления отека интерстиция и внутриклеточного отека КМЦ без каких-либо видимых нарушений целостности сарколеммы и межмиоцитарных вставочных дисков. Обнаруживающиеся в миокарде крыс группы Н проявления кардиосклероза коррелировали со спецификой структурно-функционального статуса тканевых элементов эндомизия, которые были обусловлены, в первую очередь, гетероморфностью выстилающего сосуда микроциркуляторного русла эндотелия, участием последнего в трансэндотелиальном транспорте, про-

явлениями как апоптоза эндотелиальных клеток, так и их новообразования, возможностью структурной реорганизации эндотелиоцитов, перицитов, лейкоцитов.

Констатируя относительную целостность ультраструктурной организации вставочных дисков и расположенных по их ходу межклеточных контактов, сарколеммы, порой мы обнаруживали локальные дилататы межклеточного пространства, заполненные рыхлым хлопьевидным материалом. Иногда подобными характеристиками обладали субсарколеммальные и межмиофибриллярные пространства. Судя по всему, в этом случае следует вести речь о проявлениях межклеточного и внутриклеточного отеков, которые, тем не менее, не носят однозначно альтерирующего характера, присущего, в частности, группе АДР в изученные сроки эксперимента.

#### Выводы

Пролонгированное курсовое введение адриамицина – антибиотика из ряда производных антрациклинов индуцирует у крыс выраженную кардиотоксическую реакцию с развитием к 9 неделе эксперимента характерной картины кардиомиопатии и регенераторно-пластической сердечной недостаточности. На данной модели сердечной недостаточности кардиоселективный  $\beta_1$ -адреноблокатор с NO-модулирующим эффектом небиволол проявляет отчетливую кардиопротекторную активность. В пользу этого свидетельствуют существенное уменьшение выраженности процессов клеточной гибели (главным образом, апоптоза) кардиомиоцитов, демонстрируемая в большинстве сердечномышечных клеток отсроченная активация процессов вну-

триклеточной регенерации, структурная стабилизация компонентов гистогематического барьера и снижение проявлений внутриклеточного и, особенно, интерстициального отека.

#### Список литературы

1. *Непомнящих Л.М., Лушникова Е.Л., Семенов Д.Е.* Регенераторно-пластическая недостаточность сердца. Морфологические основы и молекулярные механизмы. – М.: Изд-во РАМН. 2003. 256 с.
2. *Семенов Д.Е., Лушникова Е.Л., Непомнящих Л.М.* Особенности антрациклиновой модели кардиомиопатии: снижение синтеза белка, нарушение внутриклеточной регенерации и безнекротическая элиминация кардиомиоцитов // Бюлл. эксп. биол. 2001. Т. 131. № 5. С. 594-600.
3. *Arola O.J., Saraste A., Pulkki K., Kalajoki M., Parvinen M., Voipio-Pulkki L.M.* Acute doxorubicin cardiotoxicity involves cardiomyocyte apoptosis // Cancer Res. 2000. V. 60. P. 1789-1792.
4. *Diwakar J.* Cardiotoxicity of doxorubicin and other anthracycline derivatives // J. Nucl. Cardiol. 2000. Vol. 7. № 1. P. 53-62.
5. *Kalay N., Basar E., Ozdogru I.* Protective effects of carvedilol against anthracycline-induced cardiomyopathy // J. Am. Coll. Cardiol. 2006. Vol. 48. P. 2258-2262.
6. *Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo, G., Gianni L.* Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity // Pharmacol. Rev. 2004. Vol. 56. № 2. P. 185-229.
7. *Noori A., Lindenfeld J., Wolgel E., Ferguson D., Bristow M.R., Lowes B.*  $\beta$ -Blockade in adriamycin-induced car-

- diomyopathy // J. Card. Fail. 2000. Vol. 6. № 2. P. 115-119.
8. **Peng X., Chen B., Lim C.C., Sawyer D.B.** The cardiotoxicology of anthracycline chemotherapeutics: Translating molecular mechanism into preventative medicine // Mol. Interventions. 2005. V. 5. P. 163-171.
9. **Reynolds, E.S.** The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy // J. Cell. Biol. 1963. V. 17. № 1. P. 208-212.
10. **Shan K., Lincoff A.M. & Young J.B.** Anthracycline-induced cardiotoxicity // Ann. Int. Med. 1996. Vol. 125. № 1. P. 47-58.
11. **Singal P.K., Iliskovic N.** Doxorubicin-induced cardiomyopathy // N. Engl. J. Med. 1998. Vol. 339. P. 900-905.
12. **Siveski-Iliskovic N., Kaul N. & Singal P.K.** Probuocol promotes endogenous antioxidants and provides protection against adriamycin-induced cardiomyopathy in rats // Circulation. 1994. Vol. 89. P. 2829-2835.
13. **Watson M.L.** Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals // J. Biophys. & Biochem. Cytol. 1958. Vol. 4. P. 475-478.
14. **Watson M.L.** Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals: II. Application of solutions containing lead and barium // J. Biophys. & Biochem. Cytol. 1958. Vol. 4. P. 727-730.

## Analysis of nebivolol cardioprotective effect on myocardium ultrastructure during regenerative & plastic heart failure in rats

Yu.N. Krotova, D.P. Khloponin, P.A. Khloponin, T.V. Archipova

Long-term course of treatment with an anthracycline antibiotic adriamycin induces a pronounced cardiotoxic reaction with a development of specific manifestations of regenerative & plastic heart failure in rats. Cardioselective  $\beta_1$ -blocker nebivolol reveals evident cardioprotective activity in this heart failure model. It's confirmed by a considerable reduction of cardiomyocytes cell death processes intensity (mainly apoptosis), delayed activation of intracellular regeneration signs in the majority of heart muscle cells, structural stabilization of myohematic barrier components, and reduction of intracellular and especially interstitial edema manifestations.

**Key words:** nebivolol, beta-blocker, cardioprotection, adriamycin, heart failure, apoptosis.

## Анализ ЭЭГ крыс при введении флуоксетина и его комбинации с мелатонином

О.М. Куделина, Ю.С. Макляков, Д.П. Хлопонин, А.Е. Матухно, Е.В. Ганцгорн

Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону

Контактная информация: Куделина Оксана Михайловна [oksana\\_kudelina@mail.ru](mailto:oksana_kudelina@mail.ru)

Депрессия в настоящее время является одной из наиболее распространенных форм психопатологии. Важным методом оценки эффективности медикаментозного лечения этого заболевания является электроэнцефалография. В экспериментах на крысах был выяснен характер распределения ЭЭГ-ритмов при сформированном депрессивном расстройстве, в том числе на фоне применения антидепрессанта флуоксетина – селективного ингибитора обратного захвата серотонина, как самостоятельно, так и в комбинации с препаратом гормона мелатонина – мелаксеном.

**Ключевые слова:** депрессия, крысы, ЭЭГ, флуоксетин, мелаксен.

По данным ВОЗ, депрессии в настоящее время представляют собой одну из наиболее распространенных форм психопатологии [2]. К 2020 г. депрессивные состояния могут стать второй по частоте причиной нетрудоспособности в мире [4]. В России проблема заболеваемости и смертности, обусловленных депрессивными расстройствами, приобрела особую значимость из-за колоссальных социальных потрясений последних десятилетий [7]. По некоторым данным, жалобы на подавленное настроение предъявляются пациентами их участковым врачам чаще, чем все прочие, вместе взятые [3]. Помимо этого, лишь порядка 50% больных депрессиями отвечают объективным улучшением своего состояния и снижением жалоб на применение современных медикаментозных и не медикаментозных методов лечения [5].

На сегодняшний день наиболее широко применяемыми на этапе первичного звена оказания медицинской помощи антидепрессантами в мире [6] являются селективные ингибиторы обратного захвата серотонина (СИОЗС), и, в частности,

флуоксетин. Это объясняется их оптимальным соотношением эффективности (безопасности) стоимости по сравнению с антидепрессантами других групп.

В связи с тем, что один из доминирующих симптомов депрессии – нарушение сна, ныне совместно с антидепрессантами рекомендуется использовать препараты гормона эпифиза – мелатонин. Последний представляет собой эндогенный антидепрессивный агент, не только способный модулировать специфические эффекты традиционных психотропных средств, но и вполне пригодный для самостоятельного терапевтического применения [1]. Единственным зарегистрированным в нашей стране лекарственным препаратом мелатонина является «Мелаксен» («Юнифарм Инк», США).

Одним из наиболее информативных методов диагностики при патологии головного мозга является компьютерная электроэнцефалография (КЭЭГ). Внедрение ее в клиническую практику позволило выявить достоверные маркеры для дифференциальной диагностики и оценки тяжести психических рас-