

# ФАРМАКОЛОГИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ

## ВЛИЯНИЕ ЦИТОФЛАВИНА НА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНУЮ СТРУКТУРУ МИОКАРДА КРЫС В УСЛОВИЯХ ГИСТОТОКСИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

Т. П. Сатаева<sup>1</sup>

Целью данного исследования явилось изучение кардиопротекторных свойств препарата цитофлавин при гистотоксической гипоксии в условиях эксперимента. Исследование проводилось на 25 половозрелых самцах крыс линии Wistar массой 220 – 310 г. Контрольная группа была представлена 5 интактными животными. Эксперимент проводили в 2 параллельных сериях по 10 самцов в каждой опытной группе. Раствор хлорида кобальта вводили крысам обеих групп через атравматичный зонд в желудок в дозе 4 мг/кг, ежедневно 1 раз в сут в течение 30 дней. Крысам второй группы дополнительно после введения хлорида кобальта 1 раз в сутки внутривентриально вводили цитофлавин из расчета 0,5 мл/100 г массы тела животного на протяжении 30 дней. Проведенное исследование показало, что во всех опытных группах развивались изменения в сердечной мышце, которые по морфофункциональным проявлениям можно было отнести к разновидностям токсической кардиомиопатии. Структура миокарда, наблюдаемая у крыс второй группы с введением цитофлавина при кобальтовой интоксикации, в целом отражала тенденцию к минимализации объемов повреждения – сохранность структур большей части миокарда. Очевидно, что цитофлавин как антиоксидант препятствует накоплению свободных радикалов в миокарде и повышает устойчивость к гистотоксической гипоксии. Не исключено, что данный препарат, усиливая синтез белка, повышает общую выносливость миокарда, таким образом, демонстрируя кардиопротекторные свойства.

**Ключевые слова:** миокард; крысы; гипоксия; кобальт; цитофлавин.

### ВВЕДЕНИЕ

Известно, что кардиомиоцит является сложноорганизованной клеткой, в структуру которой входит целый ряд белков, выполняющих значительное количество функций: осуществление передачи сигнала, участие в процессе сокращения и расслабления клетки, удержание ее формы, взаимодействие с внеклеточным матриксом и внутриклеточными органеллами, а также соединение соседних клеток. В здоровом сердце сочетание структурных белков оптимально [9]. При ряде форм кардиомиопатий в результате гипоксических воздействий происходит нарушение синтеза и экспрессии некоторых белков, что приводит к функциональной несостоятельности миокарда [5].

Одна из частых форм гипоксии — тканевая (гистотоксическая) гипоксия, которая развивается при неспособности клеток утилизировать кислород в результате поражения ферментов тканевого дыхания или мембран клеток [4]. В патогенезе данного вида гипоксии имеет значение инактивация дыхательных ферментов при отравлении химическими веществами, нарушение синтеза дыхательных ферментов при дефи-

ците витаминов, понижение сопряжения процессов окисления и фосфорилирования при действии разобщающих факторов (нитриты, микробные токсины, тиреоидные гормоны и др.), повреждение митохондрий ионизирующей радиацией, продуктами перекисного окисления липидов, токсически действующими метаболитами при уремии, кахексии, тяжелых инфекциях [1].

Известно, что хлорид кобальта ( $\text{CoCl}_2$ ) в токсических дозах способен более прочно связываться с гемом, чем железо, и оказывать действие, аналогичное гистотоксической гипоксии, что позволяет применять его для моделирования гипоксических состояний в эксперименте [1]. Обладая высокой сенсibiliзирующей активностью, кобальт при его хроническом поступлении в организм приводит к полиморфному поражению сердечно-сосудистой, дыхательной и кроветворной систем, что позволяет отнести кобальт к веществам I класса опасности [6]. Кардиотоксическое действие кобальта обусловлено его способностью приводить к развитию дилатационной кардиомиопатии, нарушению сократительной функции миокарда [1, 6]. Хроническая кобальтовая интоксикация сопровождается гипертоническим синдромом. Накапливаясь в миокарде, кобальт блокирует ферментную систему дегидрогеназ, вызывая нарушение декарбоксилирования и дегидрирования кетокилот. Нарушение этих процессов, являющихся основными поставщиками энер-

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского» Медицинская академия им. С. И. Георгиевского, Россия, 295006, Симферополь, бул. Ленина, 5/7.

гии для миокарда, способствует развитию нарушений метаболических процессов в сердечной мышце [11]. К сожалению, несмотря на многообразие лекарственных препаратов, современный подход к терапии токсических кардиомиопатий проводится без учета особенностей энергетического метаболизма кардиомиоцитов, что значительно снижает эффективность лечения, вызывая рост смертности и/или инвалидизации населения, что увеличивает финансовые затраты государства.

Важная роль в лечении и профилактике негативных последствий активации свободно-радикальных процессов при гистотоксической гипоксии отводится антистрессорной терапии, перспективным направлением которой представляется использование различных природных и синтетических антиоксидантов [8]. Несмотря на широкое применение антиоксидантов для защиты организма от повреждающего действия стресса, их влияние на антиоксидантно-прооксидантный статус организма в условиях гистотоксического стресса изучено недостаточно. В связи с вышеизложенным целесообразным является изучение влияния различных веществ, которые могут обладать антиоксидантными свойствами, на развитие гипоксической стресс-реакции.

Существует целый ряд экспериментальных исследований, посвящённых метаболической и фармакологической активности сукцината [2]. Более того, в нашей стране сукцинат в составе разных препаратов уже достаточно долго и с успехом применяется в качестве субстратного антигипоксанта и органопротектора при различных патологических состояниях. С этих позиций наше внимание привлек отечественный препарат цитофлавин (ООО «НТФФ «ПОЛИСАН», Санкт-Петербург), обладающий антиоксидантным, кардиопротективным, метаболотропным и нейротропным свойствами [12, 14].

Целью данного исследования явилось изучение кардиопротекторных свойств препарата цитофлавин при гистотоксической гипоксии в условиях эксперимента.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование осуществили на 25 половозрелых самцах крыс линии Wistar массой 220 – 310 г, полученных из питомника «Биологическая клиника Медицинской академии им. С. И. Георгиевского», Симферополь. Контрольная группа была представлена 5 интактными животными. Эксперименты проводили в 2 параллельных сериях по 10 самцов в каждой опытной группе. Для получения токсического раствора хлорид кобальта растворяли в стерильной дистиллированной воде таким образом, что на единицу раствора, равную 0,2 мл, приходилось 0,8 мг кобальта (в пересчете на металл) [1]. На каждые 100 г массы крысы вводили 0,1 мл токсического раствора. Раствор хлорида кобальта вводили крысам обеих групп через атравматичный зонд в желудок в дозе 4 мг/кг, ежедневно 1 раз в сутки

в течение 30 дней. Крысам второй группы дополнительно после введения хлорида кобальта 1 раз в сутки внутрибрюшинно вводили цитофлавин из расчета 0,5 мл/100 г массы тела животного на протяжении 30 дней [12].

Животных содержали в виварии, уход за ними осуществлялся в соответствии с нормами и правилами обращения с лабораторными животными (Западный И. П., 1983). Крыс выводили из эксперимента декапитацией под наркозом (эфир с хлороформом) в соответствии с «Международными рекомендациями (этический кодекс) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985) и правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ от 19.06.2003 № 267).

Взвешивание животных проводили до и после проведения эксперимента. После торако- и перикардиотомии под эфирным наркозом сердце извлекали и сразу же после взвешивания помещали в кардиоплегический раствор (0,9 % KCl при температуре 0 °C), чем достигалась остановка сердца в диастолу.

Для гистологического исследования были отобраны образцы миокарда левого желудочка. Кусочки миокарда фиксировали в 10 % забуференном формалине в течение 5 сут, затем промывали в проточной воде, проводили через спирты возрастающей крепости и заливали в парафин. Гистологические срезы толщиной 5 – 6 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, а также по Массону для выявления процессов фиброгенеза [3].

Микропрепараты поперечного среза сердца, окрашенные гематоксилином-эозином, изучали на микроскопе Olympus CX-3 (Япония) с дополнительным проведением кардиометрического исследования 50 ядер кардиомиоцитов в каждой серии при использовании лицензионной программы Image Tool.

Для иммуногистохимического исследования материал фиксировали в 10 % растворе забуференного формалина с последующим приготовлением парафиновых блоков. Из каждого блока готовили серийные срезы толщиной 5 мкм. Выявление белка цитоскелета десмина (Anti-desmin Dako antibody Clone D33) и сократительного белка – саркомерного актина (клон Alpha-Sr-1), а также сосудистых структур, образованных эндотелиальными (CD31+) клетками сердца (клон SP38), проводили с помощью двойного пероксидаза-антипероксидазного метода (George L. Kumar, Lars Rudbeck.: DAKO, 2001) с использованием иммуногистостойнера «Dako Autostainer» («Dako Cytomation», Дания).

В настоящей работе были использованы методы электронно-микроскопического и электронно-гистохимического исследований. Образцы миокарда левого желудочка фиксировали в 2,5 % растворе глутарового альдегида на 0,2 М какодилатном буфере с pH 7,2 при температуре +4 °C и постфиксировали в 1 % растворе OsO<sub>4</sub> на холоде в течение 4 ч [7]. В дальнейшем дегидратировали биоптаты в этаноле восходящей concentra-

ции, заливали в эпон-812. Полутонкие и ультратонкие срезы готовили на ультратоме УМТП-7 (Украина).

Для определения цитохимических индикаторов гипоксического повреждения несомненный интерес представляло изучение активности дегидрогеназ лимфоцитов — ферментов цикла Кребса: сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ), значения которых рассматривались нами как неспецифический показатель повреждения митохондрий при воздействии хлорида кобальта. Исследование лимфоцитов периферической крови в известной мере отражает баланс гликолиза и окислительного фосфорилирования в других клетках организма.

Общеизвестно, что СДГ и ЛДГ относятся к числу важных клеточных ферментов, участвующих в процессе гликолиза. СДГ прочно связана с внутренней митохондриальной мембраной клеток и катализирует реакцию, при которой янтарная кислота (сукцинат) дегидрируется в фумаровую кислоту (фумарат). ЛДГ находится в цитозоле клетки и в анаэробных условиях катализирует обратимую реакцию восстановления пирувиноградной кислоты (пируват) в молочную (лактат), являющейся конечным продуктом гликолиза. Активность ферментов определяли цитобиохимическим методом (ЦБХ) в лимфоцитах мазка крови по методике [13]. Свежеприготовленные мазки крови фиксировали в течение 30 с 60 % ацетоном, забуференным 10 мМ НЕРЕС, при комнатной температуре, pH 5,2 – 5,4, затем ополаскивали дистиллированной водой и сушили на воздухе. Активность ферментов измеряли по восстановлению нитросинего тетразолия в свежеприготовленном мазке крови, инкубированной в среде, содержащей 125 мМ KCl (Sigma, США), 10 мМ НЕРЕС (Sigma, США), 1,22 мМ нитросинего тетразолия хлорида (Dudley Chemical Corporation) с добавками 5 мМ янтарной кислоты для выявления СДГ или смеси лактат (5 мМ) + малонат (5 мМ) + НАД (0,5 мМ) для выявления ЛДГ в течение 1 ч при 37 °С, pH 7,20.

Для оценки активности ферментов в клетках крови мы вычисляли средний цитохимический показатель (СЦП) по формуле (по Карлов, 1955):

$$\text{СЦП} = \frac{X_1 + X_2 \cdot 2 + X_3 \cdot 3 + X_4 \cdot 4}{100},$$

где  $X$  – количество клеток из 100 просмотренных нейтрофилов в 1 мазке с определенной степенью активности фермента; 1, 2, 3, 4 – степень активности; 100 – число просмотренных нейтрофилов в одном мазке.

Показатель активности в условных единицах вычисляется по формуле (Карлов). При вычислении показателя активности клетки с интенсивностью 0 исключаются; к проценту клеток с интенсивностью 1 ( $A$ ) прибавляется процент клеток с интенсивностью 2 ( $B$ ), умноженный на коэффициент 2, и количество клеток с

интенсивностью 3 ( $C$ ), умноженное на коэффициент 3, и т.д.

При этом выделяли 4 степени активности ( $4_{\text{СТ}}$  – нейтрофил полностью покрыт гранулами формазана;  $3_{\text{СТ}}$  – 3/4 активности;  $2_{\text{СТ}}$  – 1/2 активности и  $1_{\text{СТ}}$  – 1/4 активности).

Все измерения и исследования проводили с использованием средств измерительной техники, прошедших метрологическую поверку, и вспомогательного оборудования, прошедшего аттестацию на базе отдела морфологии с электронной микроскопией Центральной научно-исследовательской лаборатории Медицинской академии им. С. И. Георгиевского.

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью лицензионного программного обеспечения Microsoft Office Excel-2007 и Statistica 10.0. Данные представляли как  $M \pm m$ . Отличия между группами оценивали по  $t$ -критерию Стьюдента, различия между величинами считали достоверными при  $p < 0,05$ .

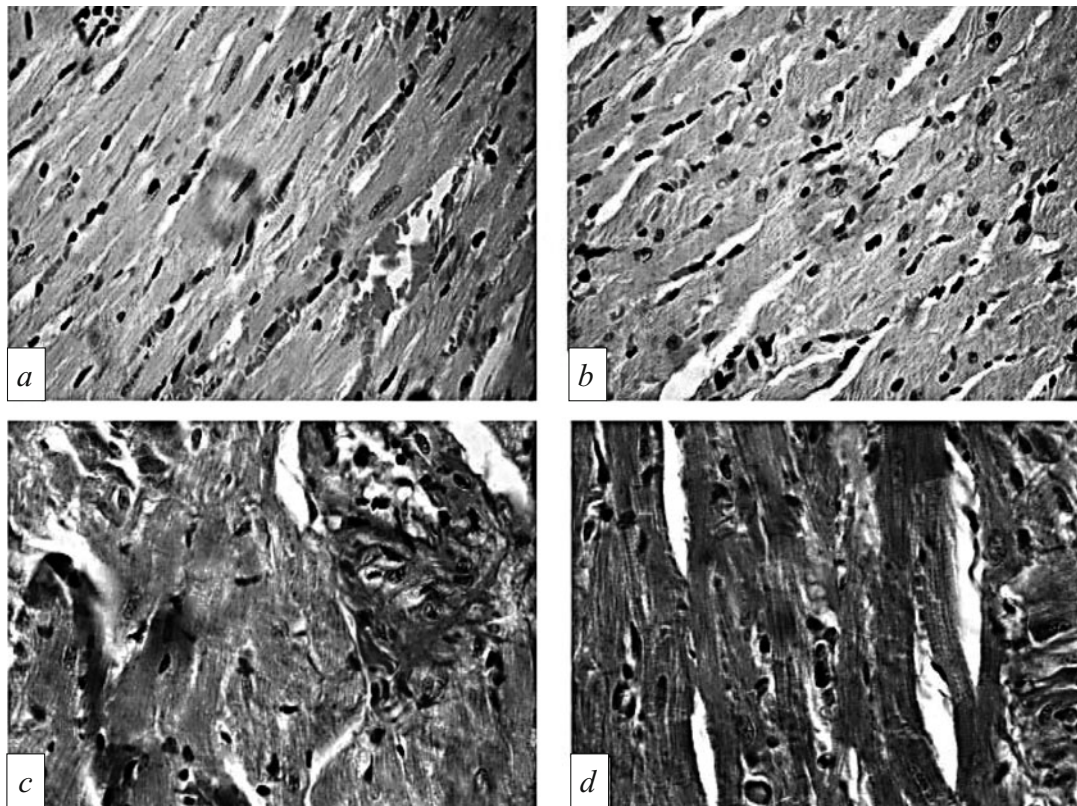
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проведенных исследований выявлено, что в обеих опытных группах происходит достоверное снижение массы тела животных, по сравнению с контролем на  $(24,61 \pm 1,3) \%$  ( $p < 0,05$ ), а абсолютной массы сердца — на  $(13,73 \pm 1,5) \%$  ( $p < 0,05$ ). При этом данные показатели значимо не отличались друг от друга у животных разных опытных групп. Само снижение массы сердца связано, по-видимому, с тем, что при гипоксии в миокарде уменьшается поглощение кислорода, следовательно, имеет место снижение окислительных процессов; уменьшение фосфорилирования, т.е. снижается активность синтеза макроэргических продуктов; нет систематического распада АТФ и креатинфосфата, это приводит к уменьшению стимуляции генетического аппарата и, как следствие, к угнетению синтеза белка.

Гистологический анализ *светооптических препаратов* выявил в строме миокарда животных обеих групп развитие отека, который распространяется почти на весь миокард. В цитоплазме кардиомиоцитов наблюдается гидропическая дистрофия, появляются очаги миоцитолита, в которых отмечается лимфоцитарная инфильтрация (рис. 1, а).

Окрашивание по Массону выявило избыточное количество коллагеновых волокон в интерстиции, а также в периваскулярном пространстве, что, по-видимому, дополнительно затрудняло транспорт субстратов и кислорода из кровеносного русла к рабочим клеткам в условиях гипоксии (рис. 1, в). Помимо этого, повсеместно выявлялись признаки нарушения гемодинамики, неравномерного капиллярного и венозного полнокровия, запустевания и спазма ряда сосудов гомоциркуляторного русла за счет развития периваскулярного отека.





**Рис. 1.** Морфология миокарда самцов крыс в условиях гистотоксической гипоксии:

- a* – признаки отека миокарда, исчезновение поперечной исчерченности миофибрилл, их волнообразная структура. Окрашивание гематоксилином-эозином,  $\times 1000$ ;  
*b* – гидропическая дистрофия кардиомиоцитов, умеренный интерстициальный отек на фоне коррекции цитофлавином. Окрашивание гематоксилином-эозином,  $\times 1000$ ;  
*c* – фибриллогенез в периваскулярном пространстве, местами разволокненные саркомеры миокарда. Окрашивание по Массону,  $\times 400$ ;  
*d* – умеренный фибриллогенез в местах лимфоцитарного инфильтрата при введении цитофлавина. Окрашивание по Массону,  $\times 400$ .

У интактных животных миокард имел вид сети из мышечных волокон с наличием узких щелей между ними. Поперечно-полосатая исчерченность – четкая, но просматривается не везде. Ядра кардиомиоцитов имели продолговатую форму, хроматин — средней степени хромности. Площадь ядра кардиомиоцита у контрольных животных варьирует в небольшом диапазоне ( $22,8 \pm 0,4$ )  $\text{мкм}^2$  (табл. 1).

О выраженной продолжающейся ишемии миокарда свидетельствовало резкое уменьшение количества и размера ядер кардиомиоцитов, появление среди них мелких, темных, т.е. пикнотичных ядер (например, с площадью ядра около  $8 \text{ мкм}^2$ ). Средняя площадь ядер кардиомиоцитов крыс первой группы на фоне введе-

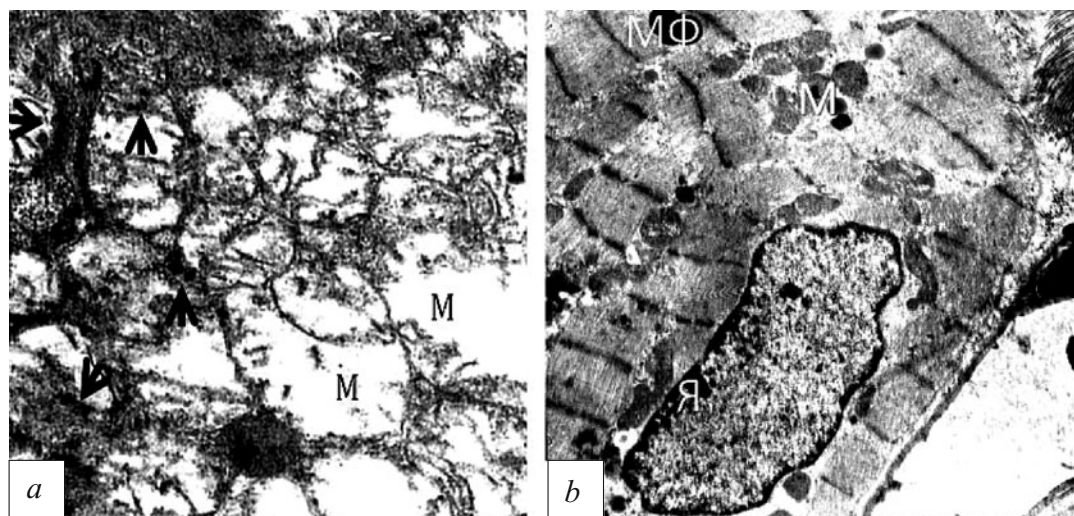
ния кобальта была на  $23,9\%$  достоверно меньше ( $p < 0,05$ ), чем в группе контроля (табл. 1).

При введении цитофлавина крысам в строме миокарда местами обнаружен отек, который носит очаговый характер и является менее интенсивным, чем в I опытной группе без цитофлавина. Площадь ядер кардиомиоцитов статистически значимо не отличалась от интактной группы контроля, имелась тенденция к уменьшению в среднем на  $9,1\%$  ( $p > 0,5$ ). Локально в цитоплазме кардиомиоцитов наблюдались явления гидропической дистрофии, которая носила очаговый характер, отмечалось частичное купирование сосудистых нарушений. Интенсивность отека и лимфоцитарная инфильтрация были менее выражены по сравнению с I экспериментальной группой (рис. 1, *b*). В участках интерстициального отека происходило набуха-

**Таблица 1.** Показатели диаметра и площади ядер кардиомиоцитов,  $n = 300$  ( $M \pm m$ )

Показатель	Контроль $n = 100$	$\text{CoCl}_2$ $n = 100$	$\text{CoCl}_2$ + цитофлавин $n = 100$
Диаметр ядра КМЦ, $\text{мкм}$	$12,3 \pm 0,7$	$9,2 \pm 0,3^*$	$10,7 \pm 0,9$
Площадь ядра КМЦ, $\text{мкм}^2$	$22,8 \pm 0,4$	$18,4 \pm 0,6^*$	$20,9 \pm 0,5$

\*  $p < 0,05$  — по отношению к контролю.



**Рис. 2.** Ультраструктура миокарда самцов крыс, подвергшихся гистотоксической гипоксии (электронная микроскопия):

*a* – группа I, отек саркоплазмы, субтотальная деструкция (стрелки) митохондриальных крист (М). ТЭМ,  $\times 19000$ .

*b* – группа II, просветление нуклеоплазмы ядра (Я), умеренно выраженные ядерные инвагинаты, сохранение структуры миофибрилл (МФ) и митохондрий (М) после коррекции цитофлавином. ТЭМ,  $\times 12000$ .

ние коллагеновых волокон и их гомогенизация, наблюдалась поверхностная дезорганизация соединительной ткани (рис. 1, *d*).

**Электронно-микроскопическое исследование** миокарда левого желудочка экспериментальных животных в обеих группах выявило ряд ультраструктурных повреждений ядра и органелл кардиомиоцитов.

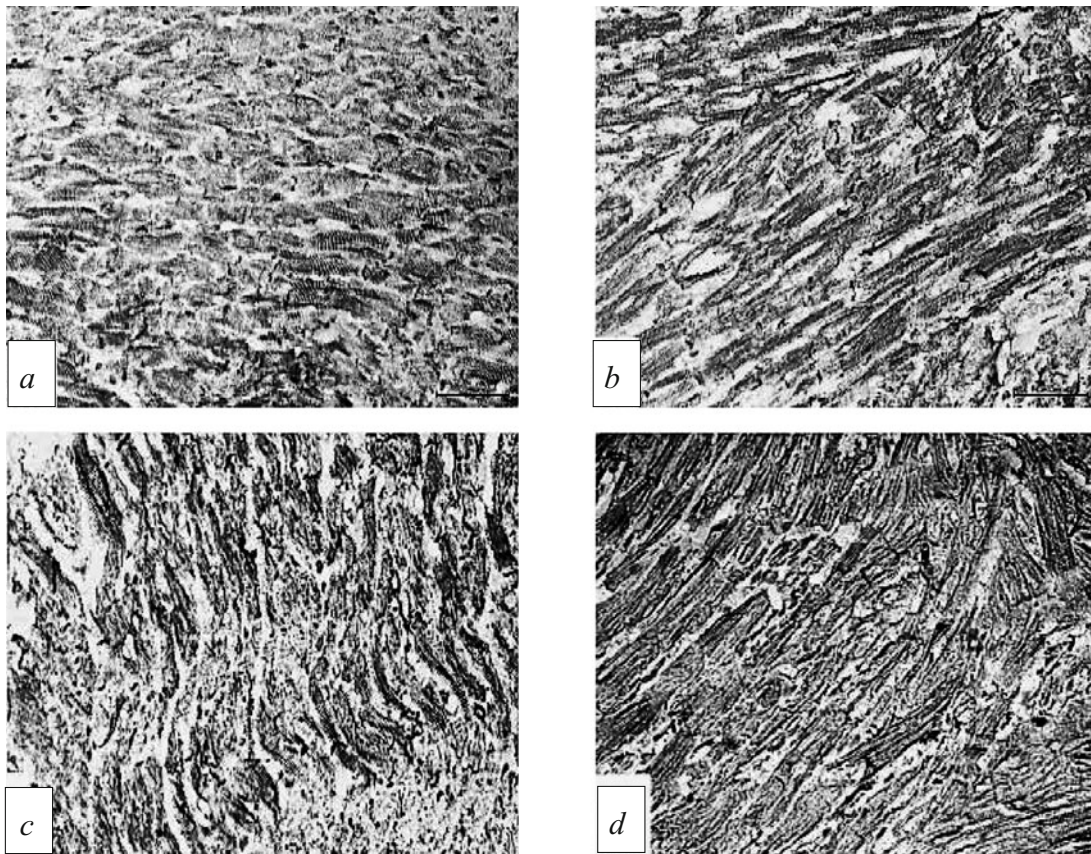
В сократительных кардиомиоцитах крыс первой группы (без цитофлавина) ядра располагались в центре саркоплазмы и отличались полиморфизмом, образуя огромное количество инвагинатов за счет саркоплазматического отека, иногда смещаясь в подсарколеммальную зону. Впячивания ядерной мембраны “охватывали” клеточные органеллы, чаще всего митохондрии. Кроме описанных изменений, обращает на себя внимание появление множественных вакуолей в саркоплазме. Вакуоли были округлой или овальной формы и различались по содержанию, чаще всего они находились под сарколеммой или в непосредственной близости от ядра. Они формировались из скоплений гранул гликогена крошечковидной зернистости, разрушенных митохондрий и зачастую были окружены двойной мембраной (рис. 2, *a*). Сократительный аппарат миокарда при введении хлорида кобальта приобретал признаки регенераторно-пластической недостаточности: “таяние”, мелкоочаговый и диффузный лизис миофибрилл, нарушение нормальной ориентации миофибрилл и отдельных миофиламентов в саркомерах, особенно вблизи вставочных дисков.

Согласно результатам электронной микроскопии, кардиомиоциты самцов крыс после 7-дневного введения цитофлавина имели повреждения как необратимого, так преимущественно и обратимого характера. Обратимые изменения заключались в неравномерном распределении ядерного хроматина, очаговом лизисе

митохондриальных крист, при этом большинство митохондрий сохраняли свою нормальную структуру (рис. 2, *b*). Однако цитопротекторное влияние вышеуказанного антиоксиданта все же не смогло полностью компенсировать деструктивное влияние мощного гипоксического стресса. Об этом свидетельствует обнаружение кардиомиоцитов, в цитоплазме которых развивался отек и отмечались участки лизиса компонентов миофибрилл. Следует отметить тот факт, что даже в таких клетках встречались довольно крупные митохондрии, которые не имели выраженных повреждений крист. Это, по-видимому, также объясняется проявлением антиоксидантной активности препарата. О неполном компенсировании действия гипоксического стресса свидетельствует диффузный фиброгенез в интерстиции кардиомиоцитов и лизис некоторых кардиомиоцитов.

**Иммуногистохимические исследования.** Для оценки изменений сократительного аппарата клетки миокарда, мы использовали антитела к десмину на основании того, что именно десмин является белком истинного цитоскелета, входит в структуру саркомера и вставочных дисков в качестве молекулы адгезии. В норме десмин экспрессируется в области вставочных дисков и Z-линий кардиомиоцитов, обеспечивая целостность клеток, процессы транспорта, механической и химической сигнализации в клетках миокарда [10]. Оценка иммуногистохимической реакции на десмин позволила отметить, что гистотоксическая кардиомиопатия сопровождается гетерогенной экспрессией этого белка, то есть клетки миокарда содержат различное количество десмина (рис. 3, *a*). В местах интерстициального отека реакция на десмин была снижена, что означает резкое сокращение числа промежуточных филаментов цитоскелета и разрушение сократительного ап-





**Рис. 3.** Иммуногистохимическое выявление десмина и саркомерного актина в миокарде самцов крыс, подвергшихся гистотоксической гипоксии, En Vision, Dako:

*a* – Свободные от десмина участки миокарда, граничащие с кардиомиоцитами, проявляющими гиперэкспрессию десмина,  $\times 400$ ; *b* – диффузное расположение небольших Desmin-Free зон при введении цитофлавина,  $\times 400$ ; *c* – снижение экспрессии саркомерного актина, дезорганизация актиновых филаментов при отсутствии коррекции,  $\times 400$ ; *d* – большая часть кардиомиоцитов экспрессирует саркомерный актин на фоне введения цитофлавина,  $\times 400$ .

парата, что коррелировало с выраженной сниженной экспрессией основного сократительного белка – саркомерного актина (рис 3, *c*). В большей степени были лизированы I-полосы, в которых располагаются тонкие (актиновые) филаменты. Кроме того, отмечалось неравномерное просветление саркоплазмы кардиомиоцитов, претерпевающих волнообразную деформацию.

После введения цитофлавина наблюдали небольшие свободные от десмина зоны миокарда с единичными кардиомиоцитами, проявляющими компенсаторную гиперэкспрессию десмина (рис. 3, *b*). Граница данных участков была резкая. Причем иммунопозитивные и иммунонегативные кардиомиоциты одного волокна чередовались между собой. В иммунонегативных кардиомиоцитах отмечалась слабая пылевидная экспрессия десмина. В иммунопозитивных кардиомиоцитах десмин резко визуализировался в Z-полосах и более слабо – во вставочных дисках.

При этом нами было выявлено диффузное снижение экспрессии саркомерного актина по сравнению с нормой в кардиомиоцитах сократительного аппарата сердца (рис. 3, *d*).

Известно, что основным стимулом к ангиогенезу при физиологических и патологических состояниях является недостаток кислорода (гипоксия или ишемия), который через активатор транскрипции факторов ангиогенеза – индуцируемый гипоксией фактор-1 (HIF-1) – вызывает экспрессию многих компенсаторных ангиогенных факторов [4]. Однако при избыточном введении кобальта наблюдался недостаточный ангиогенез, обусловленный ослаблением продукции факторов роста или экспрессией их рецепторов, либо увеличенной продукцией его ингибиторов, что может способствовать нарастанию тяжести ишемических повреждений.

Изменения в микроциркуляции миокарда были исследованы с помощью анти-CD31+ антител к одному из рецепторов эндотелиальных клеток. Оценка клеток CD31+ в группе без коррекции показала низкую экспрессию. Положительное окрашивание эндотелия регистрируется преимущественно в крупных сосудах и значительно реже – в капиллярах, при этом уменьшается количество и размер кровеносных сосудов.

В то же время микроциркуляторное русло миокарда крыс, получавших цитофлавин, менее пострадало от

Таблица 2. СЦП СДГ и ЛДГ в лимфоцитах периферической крови,  $n = 300 (M \pm m)$ 

Показатель	Контроль $n = 100$	CoCl <sub>2</sub> $n = 100$	CoCl <sub>2</sub> + Цитофлавин $n = 100$
СЦП СДГ, усл.ед.	1,88 ± 0,01	1,25 ± 0,37*	1,55 ± 0,07*
СЦП ЛДГ, усл.ед.	2,26 ± 0,14	2,71 ± 0,13*	2,58 ± 0,11*

\*  $p < 0,05$  – по отношению к контролю.

патологических процессов, индуцированных хлоридом кобальта. Микроциркуляция была достаточно хорошо выраженной, наблюдались явления неангиогенеза с формированием анастомозов микрокапилляров в основном вокруг дистрофичных кардиомиоцитов.

Одной из систем, которая чутко реагирует на нарастающую гипоксию и позволяет опосредованно судить о состоянии органов и тканей, является система крови. Определение активности ЛДГ и СДГ позволяет определять количественно соотношение митохондриального аэробного дыхания и низкопродуктивного цитоплазматического гликолиза при разных состояниях организма. Анализ цитохимических показателей в нейтрофилах периферической крови у крыс без цитофлавина показал, что на момент исследования наблюдался значительный дисбаланс цитохимических показателей (табл. 2). На момент обследования наблюдалось статистически значимое ( $p < 0,05$ ) снижение аэробного окисления и рост анаэробного гликолиза. Так, активность СДГ снижалась по сравнению с контролем на 33,5 %, а активность ЛДГ возрастала на 19,9 % ( $p < 0,05$ ), соответственно. Это свидетельствовало о компенсаторном преобладании анаэробного гликолиза на фоне резкого угнетения работы митохондрий.

Применение цитофлавина не смогло полностью нивелировать дисбаланс окисления энергетических субстратов, вызванный мощным фактором гистотоксической гипоксии, однако при введении корректора СЦП СДГ повышался по сравнению с таковым в группе без коррекции на 15,8 % ( $p < 0,05$ ), а СЦП ЛДГ превышал контроль на 14,2 % ( $p < 0,05$ ).

Данный эффект можно объяснить тем, что препарат содержит субстрат аэробного дыхания – янтарную кислоту, которая является одним из самых значительных источников энергии ввиду того, что СДГ, которая ее окисляет, по активности превосходит другие дегидрогеназы митохондрий.

Структура миокарда, наблюдаемая во второй серии с введением цитофлавина при кобальтовой интоксикации, в целом отражала тенденцию к минимализации объемов повреждения, проявляющуюся в виде сохранности цитоскелета и сократительного аппарата большей части клеток и волокон. При гистологическом исследовании отмечалось снижение патологической проницаемости сарколеммы, что проявлялось уменьшением интерстициального отека и явлений дистрофии в большинстве кардиомиоцитов. Однако при этом встречались участки ткани, которые находились в со-

стоянии дистрофии и некроза. Об антигипоксантами эффекте препарата можно опосредованно судить по уменьшению дисбаланса СДГ и ЛДГ. Очевидно, что цитофлавин как антиоксидант препятствует накоплению свободных радикалов в мышечной ткани и повышает устойчивость к гистотоксической гипоксии. Не исключено, что данный препарат, усиливая синтез белка и улучшая работу митохондрий, повышает общую выносливость миокарда и может обладать кардиопротекторными свойствами.

## ВЫВОДЫ

1. Введение раствора кобальта хлорида (4 мг/кг внутривенно ежедневно 1 раз в сутки в течение 30 дней) вызывает у крыс следующие изменения по сравнению с контролем:

а) снижение массы тела животных на (24,61 ± 1,3) % ( $p < 0,05$ ), абсолютной массы сердца – на (13,73 ± 1,5) % ( $p < 0,05$ );

б) уменьшение площади ядер кардиомиоцитов на 23,9 % ( $p < 0,05$ );

в) уменьшение васкуляризации миокарда и нарастание стромальной пролиферации и лимфоцитарной инфильтрации, затрагивающей мышечные волокна с ремоделированием миокарда;

г) снижение аэробного окисления на 33,5 %, рост анаэробного гликолиза на 19,9 % ( $p < 0,05$ ), соответственно.

2. Цитофлавин в дозе 0,5 мл/100 г массы тела животного внутривенно на протяжении 30 дней крысам на фоне введения хлорида кобальта способствует сохранности гемомикроциркуляторного русла, снижению патологической проницаемости сарколеммы, что проявлялось уменьшением интерстициального отека и явлений дистрофии в большинстве кардиомиоцитов, СЦП СДГ повышался по сравнению с таковым в группе без коррекции на 15,8 % ( $p < 0,05$ ), а уровень гликолиза превышал контроль на 14,2 % ( $p < 0,05$ ).

## ЛИТЕРАТУРА

1. В. Б. Брин, А. К. Митчиев, О. Т. Кабисов, К. Г. Митчиев, Патент России 2462762 (2011).
2. Т. В. Горбач, О. В. Ромащенко, В. В. Румбешт, Вісник проблем біол. і мед., 2(100), 196 – 0 (2013).
3. Г. А. Меркулов, Курс патолого-гистологической техники, Медицина, Ленинград (1969).
4. R. K. Bruick, Genes Dev., 17, 2614–2623 (2003).
5. L. M. Buja, Tex. Heart Inst. J., 40(3), 221–228 (2013).

6. N. Hatori, S. K. Pehrsson, N. Clyne, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **1181**, 257–260 (1993).
7. J. Kuo, *Electron microscopy: methods and protocols*, Humana Press. Inc., New Jersey (2007).
8. E. Mills, L. A. O'Neill, *Trends Cell Biol.*, **24**(5), 313–320 (2014).
9. M. Nichols, N. Townsend, P. Scarborough, M. Rayner, *Eur. Heart J.*, **1**, 1 – 10 (2014).
10. Di Somma, M. P. Di Benedetto, G. Slavatore, et al., *Eur. J. Heart. Fail.*, **6**, 389 – 398 (2004).
11. G. S. Wiberg, I. C. Munro, A. B. Morrison, *Can. J. Biochem.*, **45**, 1219 – 1223 (1997).
12. I. V. Zadnipyryani, O. S. Tretyakova, T. P. Sataeva, *Arkhiv Patol.*, **77**(6), 39–44 (2015).
13. M. V. Zakharchenko, N. V. Khunderyakova, T. V. Yachkula, et al., *Biophysics*, **61**(1), 100 – 104 (2016).
14. I. V. Zarubina, M. V. Lukk, P. D. Shabanov, *Bul. Exp. Biol. Med.*, **153**(3), 336–339 (2012).

Поступила 27.12.17

## EFFECT OF CYTOFLAVIN ON THE MACROMOLECULAR STRUCTURE OF RAT MYOCARDIUM UNDER CONDITIONS OF HISTOTOXIC HYPOXIA

T. P. Sataeva

V. I. Vernadsky Crimean Federal University, bulv. Lenina 5/7, Simferopol, 295006 Russia

This study was aimed at studying the cardioprotective properties of cytoflavin with respect to histotoxic hypoxia under experimental conditions. The study was conducted on 25 mature male Wistar rats weighing 220 – 310 g. The control group contained five intact animals. The experiments were carried out in two parallel series with 10 males in each experimental group. A toxic cobalt chloride solution was administered to rats in both groups via an atraumatic probe into the stomach in a single daily dose of 4 mg/kg over a period of 30 days. In rats of the second group after administration of cobalt chloride, cytoflavin was injected intraperitoneally once a day at a rate of 0.5 mL/100 g body weight for 30 days. The results showed that changes in the cardiac muscle developed in both experimental groups. According to morphofunctional manifestations, these changes could be attributed to various types of toxic cardiomyopathy. The structure of myocardium observed in the second group (treated with cytoflavin upon cobalt intoxication) generally reflected the tendency to minimization of the amount of damage, which was manifested by preservation of the structures of most cells and fibers of muscle tissue. It was evident that cytoflavin as an antioxidant prevents the accumulation of free radicals in muscle tissue and increases its resistance to histotoxic hypoxia. It is possible that this drug, enhancing the synthesis of protein, increases the overall endurance of the myocardium, thus demonstrating cardioprotective properties.

**Keywords:** myocardium; rats; histotoxic hypoxia; cobalt salt; cytoflavin.