

# МОРФОЛОГИЯ. ПАТОЛОГИЯ

УДК 547.466.3:616.89-008.441.13:616.127

## МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОЦЕНКА КАРДИОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ ПРОИЗВОДНЫХ ГАМК В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

**В. Н. Перфилова, И. Н. Тюренков, В. Б. Писарев, С. А. Лебедева,  
В. А. Толокольников, А. Н. Горячев**

*Кафедра фармакологии и биофармации ФУВ ВолГМУ, НИИ фармакологии при ВолГМУ,  
кафедра патологической анатомии с секционным курсом морфологии и патологии*

**Аннотация:** в эксперименте на 48 белых беспородных крысах-самцах показано кардиотоксическое действие 50% р-ра этанола в дозе 8 г/кг интрагастрально, 1 раз в день, в течение 30 дней, проявляющееся патологическими изменениями морфоструктуры миокарда, снижением сократимости и инотропных резервов сердца. Выявлено кардиопротекторное действие производных ГАМК- соединения РГПУ-147 и пирacetама, о чем свидетельствуют незначительные морфофункциональные изменения сердца в этих группах животных по сравнению с контрольной группой алкоголизованных животных в условиях хронической алкогольной интоксикации.

**Ключевые слова:** хроническая алкогольная интоксикация, производные ГАМК, ультраструктура миокарда, инотропные резервы сердца.

Хроническая алкогольная интоксикация обычно сопровождается значительными нарушениями функций соматических органов, в том числе и сердца. По статистике, до 15 % больных, особенно в молодом возрасте, умирают внезапно от сердечной недостаточности, возникающей в результате появления, под воздействием этилового спирта, органических изменений в сердце, что проявляется падением сократительной функции миокарда [8, 9, 15]. Поэтому актуальной задачей современной кардиофармакологии является поиск лекарственных препаратов, ограничивающих токсическое действие этанола на сердце и устраняющих последствия кардиотоксичности алкоголя.

В связи с многофакторным характером алкогольного поражения миокарда, для фармакокоррекции его необходимо использовать препараты, включающие в себя кардиопротекторные свойства различных групп: антиагрегантов, антигипоксантов, антиоксидантов и др. К числу таких препаратов можно отнести ГАМК-ергические средства [3–7, 13].

### ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Морфофункциональная оценка кардиопротекторного действия нового структурного аналога ГАМК – соединения РГПУ-147 в условиях хронической алкогольной интоксикации.

### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 48 белых беспородных крысах-самцах массой 260-280 г. Животные были поделены на 4 группы по 12 особей

в каждой. 1-я группа – позитивного контроля (интактные животные), 2-я группа – алкоголизованные животные (негативный контроль), получавшие за 40 мин до введения этанола физиологического раствора внутривентриально в эквивалентных исследуемым препаратам объемах, 3 и 4 группы – опытные, которые за 40 мин до введения этанола получали соединение РГПУ-147 и препарат сравнения пирacetам в дозах 50 и 200 мг/кг соответственно, 1 раз в день внутривентриально. Хроническую алкогольную интоксикацию моделировали путем интрагастрального введения 50 %-го р-ра этанола 8 г/кг 1 раз в день в течение 30 дней. Содержание животных производилось в соответствии с "Приказом МЗ РФ № 750", Рекомендациями Комитета при Минздраве России, рекомендациями ВОЗ по экспериментальной работе с использованием животных [2, 14, 16] на базе НИИ фармакологии и кафедры фармакологии и биофармации ФУВ ВолГМУ.

Через месяц после алкоголизации по 6 животных из каждой группы под нембуталовым наркозом декапитировали. Исследуемый материал (ткани сердца целиком) фиксировали в 10 %-м р-ре формалина в течение 48 часов с дальнейшим обезвоживанием и изготовлением парафиновых блоков. Для морфологического исследования миокарда использовались серийные фронтальные срезы, окрашенные гематоксилином и эозином, суданом III и IV. Было произведено 100 срезов на каждое сердце экспериментального животного. Микрофотосъемку с микропрепаратов производили фотокамерой CONTEX на увеличении 100, 400.

Морфометрическое исследование проведено в соответствии со сложившимися принципами системного количественного анализа [1]. Для прямого морфометрического исследования были использованы оцифрованные микрофотограммы миокарда крыс, обработанные с помощью программы для морфометрии "Image Tool, 3,00" (Texas, USA). В ткани миокарда определяли объемные доли (%) кардиомиоцитов (КМЦ), сосудов и соединительной ткани. Также определяли среднюю толщину (мкм), среднюю площадь поперечного сечения КМЦ (мкм<sup>2</sup>) и их ядер (мкм<sup>2</sup>). Статистическая обработка полученных данных была проведена общепринятыми для медико-биологических исследований методами с использованием пакета анализа "MS Excel" (USA).

Исследование сократимости миокарда и его инотропных резервов осуществлялось с помощью нагрузочных проб: нагрузки объемом, максимальной изометрической нагрузки. Нагрузка объемом осуществлялась путем введения 3 мл/кг физиологического раствора, максимальная изометрическая нагрузка – пережатием восходящей части дуги аорты на 30 с [12]. При этом регистрировались левожелудочковое давление (ЛЖД) и его первая производная (dp/dt+ и dp/dt-). Полученные данные сопоставлялись между собой. Более высокие показатели сократимости миокарда и инотропные резервы у животных опытных групп по сравнению с контрольной группой алкоголизованных животных свидетельствовали о кардиопротективном действии исследуемых веществ.

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась с помощью программы STATISTICA с использованием критерия Ньюмена-Кейлса и представлена в виде  $M \pm S$ , где  $M$  – средняя арифметическая,  $S$  – стандартная ошибка среднего.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При морфологическом исследовании препаратов у интактной группы животных не было выявлено патологических изменений в миокарде. Общая картина миокарда животных контрольной группы представлена на рис. 1.

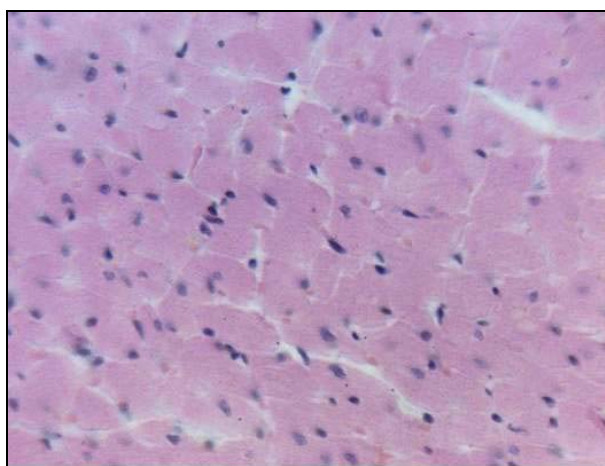


Рис. 1. Интактный миокард. Ув.  $\times 400$

У животных, подвергшихся хронической алкоголизации, обнаружены выраженные дегенеративные изменения цитоплазмы и ядер кардиомиоцитов (извитость и жировая инфильтрация кардиомиоцитов, дефрагментация миофибрилл, увеличение и снижение плотности прокрашивания ядер), фиброзные изменения в интерстиции миокарда, нарушение коронарного кровообращения в виде полнокровия сосудов, стазов и сладжирования эритроцитов, петехиальных кровоизлияний, набухания эндотелиоцитов сосудистого русла (рис. 2–5).

При введении соединения РГПУ-147 алкоголизированным животным изменения в тканях сердца проявлялись в значительно меньшей мере в сравнении с группой алкоголизованных крыс, о чем свидетельствует незначительная извитость кардиомиоцитов, пылевидная жировая инфильтрация, фиксируется небольшое снижение гликогена в цитоплазме кардиомиоцитов; дегенеративные изменения кардиомиоцитов минимальны, с единичными, слабо выраженными, дефрагментированными миофибрилловыми волокнами, отмечается минимальный отёк стромы миокарда с фокусами отложения соединительнотканых волокон. Сосуды менее полнокровны, в них определяются единичные проявления стаза и сладжирования эритроцитов, периваскулярно фиксируется небольшое количество петехиальных кровоизлияний, отдельные кардиомиоциты незначительно гипертрофированы (рис. 4–5).

Морфологические изменения в миокарде алкоголизованных животных, получавших пиратам, были более выражены по сравнению с группой животных, которым вводилось соединение РГПУ-147. В их миокарде отмечается значительная извитость и жировая инфильтрация кардиомиоцитов (особенно ярко проявляющаяся в поперечно расположенных мышечных волокнах), определяются умеренно выраженные жировые вакуоли, фиксируется существенное снижение гликогена в цитоплазме кардиомиоцитов. Обнаружены дегенеративные изменения кардиомиоцитов, сосуды полнокровны, спазмированы, эндотелиоциты кровеносных капилляров набухшие, с незначительно выраженной белково-вакуольной инфильтрацией, в сосудах определяются явления стаза и сладжирования эритроцитов, периваскулярно фиксируется умеренное количество очагов петехиальных кровоизлияний и незначительно гипертрофированных кардиомиоцитов (рис. 6–7).

В результате проведенных морфометрических исследований обнаружено, что у крыс, подвергшихся 30-дневной алкогольной интоксикации, происходит уменьшение объемной доли кардиомиоцитов, что свидетельствует о снижении числа активно функционирующих клеток (см. табл.).

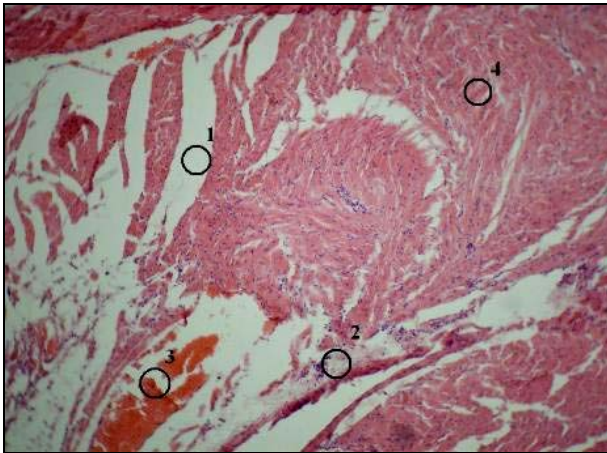


Рис. 2. Миокард алкоголизованных животных. Ув.  $\times 100$ :  
1 – отек стромы, 2 – фиброз интерстиция, 3 – полнокровие сосудов, стаз и сладж эритроцитов, 4 – выраженная извитость кардиомиоцитов

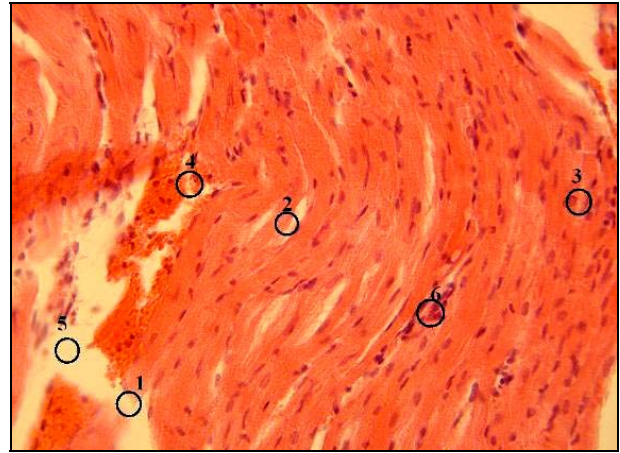


Рис. 3. Миокард алкоголизованных животных. Ув.  $\times 400$ :  
1 – фрагментация клеток, 2 – извитость кардиомиоцитов, 3 – гиперхромность ядер, 4 – экстравазация эритроцитов, 5 – стромальный отек, 6 – фиброз интерстиция

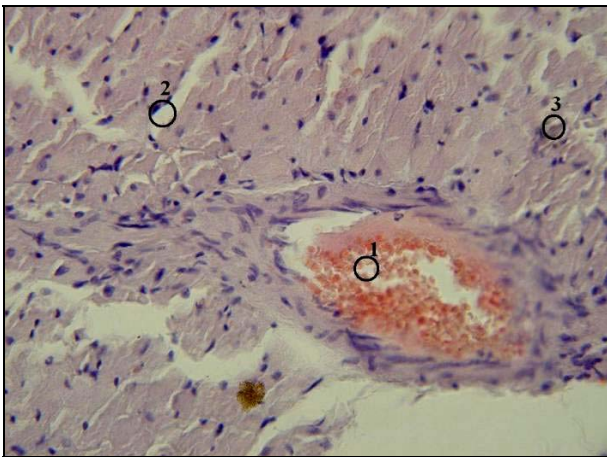


Рис. 4. Миокард алкоголизованных животных, получавших соединение РГПУ-147. Ув.  $\times 400$ :  
1 – умеренное полнокровие сосудов, незначительные явления стаза и сладжа, 2 – незначительный отек ткани, 3 – слабая извитость кардиомиоцитов

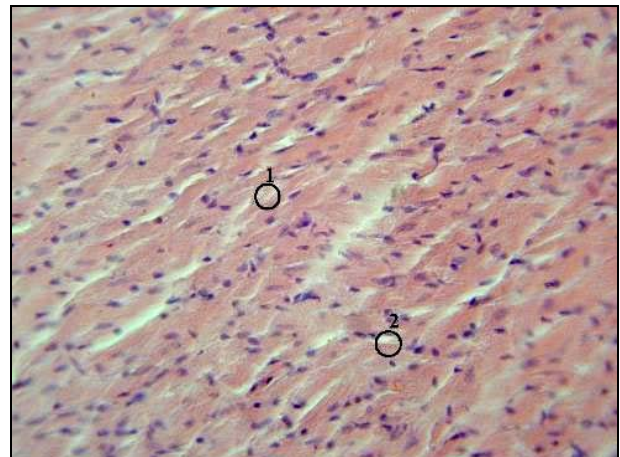


Рис. 5. Миокард алкоголизованных животных, получавших соединение РГПУ-147. Ув.  $\times 400$ :  
1 – небольшая волнистость миофибрилл, 2 – незначительный межклеточный отек

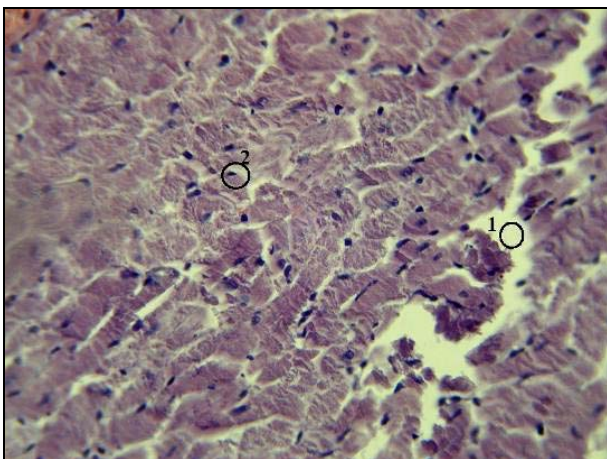


Рис. 6. Миокард алкоголизованных животных, получавших парацетам. Ув.  $\times 400$ :  
1 – отек межклеточного пространства, 2 – фрагментация и дезинтеграция кардиомиоцитов

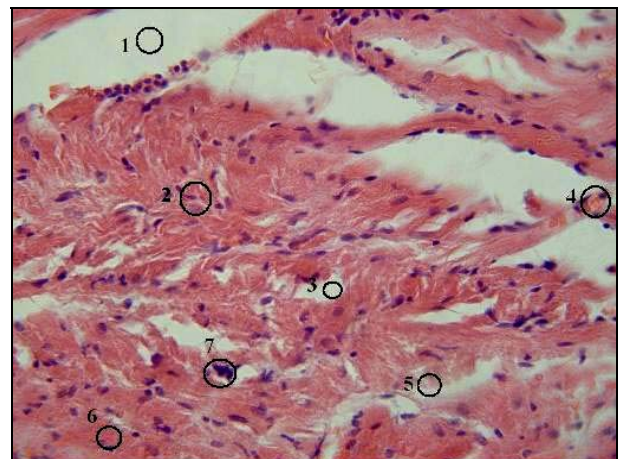


Рис. 7. Миокард алкоголизованных животных, получавших парацетам. Ув.  $\times 400$ :  
1 – выраженный отек стромы, 2 – отчетливая извитость мышечных волокон, 3 – выраженные жировые вакуоли, 4 – петехиальные периваскулярные кровоизлияния, 5 – фрагментация кардиомиоцитов, 6 – выраженная гипертрофия клеток, 7 – гиперхромия ядер кардиомиоцитов

**Показатели морфометрии миокарда у крыс с хронической алкогольной интоксикацией ( $M \pm m$ )**

Исследуемые показатели	Интактные животные (физиол. р-р)	Алкоголизованные животные (алкоголь)	Пирацетам + алкоголь	РГПУ-147 + алкоголь
Объемная доля КМЦ, %	74,8±3,6	66,0±2,4*	68,6±1,7	75,8±2,6**
Объемная доля сосудов, %	2,2±0,2	5,5±0,2*	4,8±0,3**	2,8±0,2**
Объемная доля фибробластов, %	5,2±0,4	7,0±0,4*	6,2±0,4	5,8±0,4**
Объемные доли соединительной ткани и инфилтратов, %	14,6±1,3	25,7±1,8*	22,4±2,1	16,2±1,4**
Толщина КМЦ, мкм	40,0±1,6	58,9±1,8*	50,4±2,3**	46,5±2,8**
Площадь поперечного сечения КМЦ, мкм <sup>2</sup>	152,5±10,1	290,5±6,9*	211,5±6,9**	161,8±7,9**
Площадь поперечного сечения ядер КМЦ, мкм <sup>2</sup>	26,8±1,8	27,4±1,6	27,9±0,9	24,0±1,3**

\* – достоверные различия негативного контроля с интактной группой ( $p \leq 0,05$ ); \*\* – достоверные различия опытных групп с негативным контролем ( $p \leq 0,05$ ).

При этом происходит увеличение объемных долей фибробластов и соединительной ткани, указывающих на явления мелкоочагового фиброза, характерного для гипоксического повреждения ткани миокарда при алкогольной интоксикации и нарастании склеротических процессов. Увеличение объемной доли сосудов можно трактовать как необходимость компенсаторного ангиогенеза в условиях относительной гипоксии. Анализ данных показывает, что, несмотря на уменьшение объемной доли кардиомиоцитов, в последних наблюдается статистически достоверное увеличение таких показателей, как толщина и площадь поперечного сечения (табл.).

Это можно охарактеризовать как явление компенсаторной гипертрофии миокарда. К этому же процессу можно отнести и увеличенный показатель площади поперечного сечения ядер клеток миокарда при алкогольной интоксикации, указывающий на активные синтетические и метаболические процессы в них как отражение внутриклеточной регенерации в ответ на повреждающее действие этилового алкоголя. Однако данный критерий статистически недостоверен (см. табл.).

При морфометрическом исследовании миокарда алкоголизованных животных, получавших соединение РГПУ-147, было обнаружено статистически достоверное, по основной массе критериев, его кардиопротективное действие. Защитное действие препарата сравнения пирацетама выражено незначительно и по ряду морфометрических критериев статистически недостоверно в сравнении с аналогичными показателями алкоголизованных животных контрольной группы.

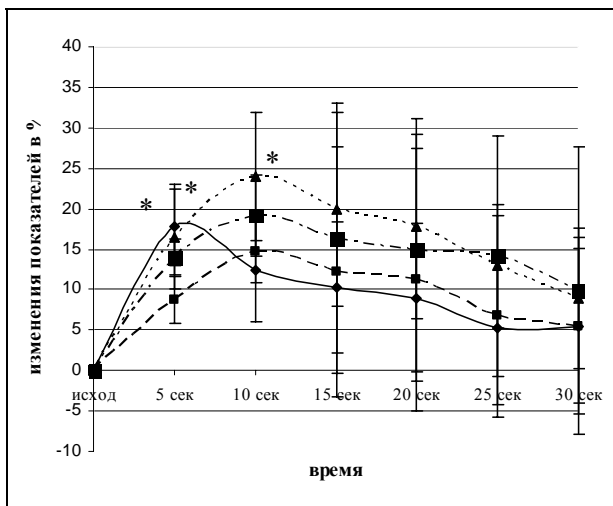
Хроническая алкогольная интоксикация способствует значительному снижению инотропных резервов сердца, что проявляется в незначительном увеличении у алкоголизованных животных ЛЖД, скорости сокращения ( $dp/dt+$ ), скорости

расслабления ( $dp/dt-$ ) миокарда в условиях нагрузки объемом и максимальной изометрической нагрузки по сравнению с интактной группой (рис. 1, 2, а-с).

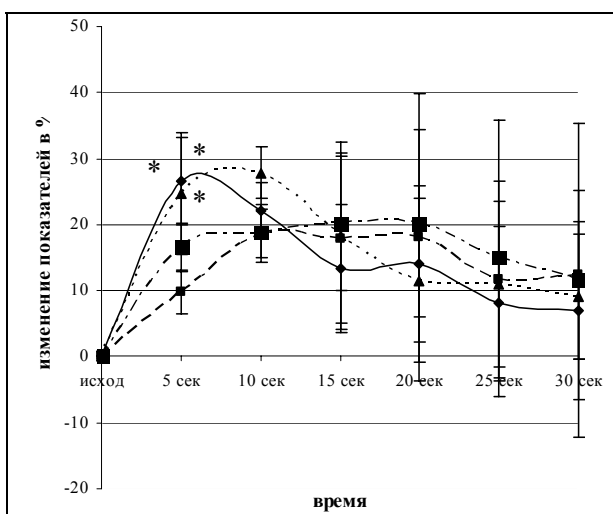
У животных, получавших перед алкоголизацией соединение РГПУ-147 и препарат сравнения пирацетам при нагрузке объемом ЛЖД увеличивалась на 16,5 и 14 %, скорость сокращения – на 24,7 и 16,7 %, скорость расслабления на 27 и 24,4 % соответственно, что было достоверно выше, чем у животных негативного контроля ( $p \leq 0,05$ ) (рис. 1, а-с). При максимальной изометрической нагрузке у групп животных, получавших соединение РГПУ-147, статистически значимо ( $p \leq 0,05$ ) увеличивались ЛЖД,  $dp/dt+$  и  $dp/dt-$  по сравнению с контрольной группой животных, получавших этанол на 60,7; 35,2 и 129 % соответственно. У животных, получавших пирацетам – на 58,4; 29 и 124,5 %, что также было выше, чем в контрольной группе алкоголизованных животных, однако статистически значимых отличий выявлено не было (рис. 2, а-с).

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

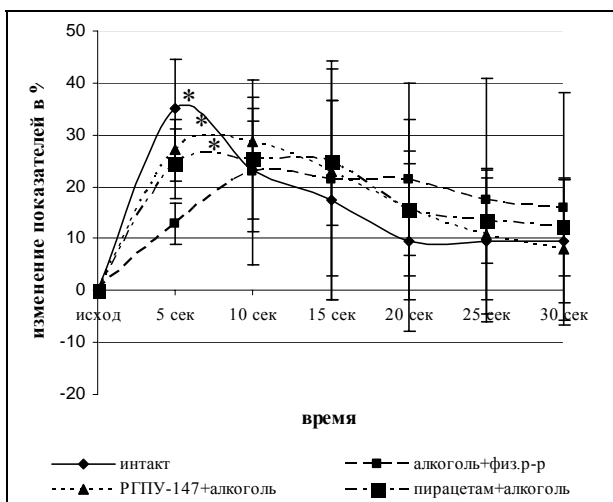
Таким образом, морфофункциональное исследование токсического действия алкоголя на сердце показало, что 30-дневное введение 50 %-го р-ра этанола 8 г/кг интрагастрально один раз в день приводит к патологическим изменениям в миокарде крыс. Обнаружено, что данные патологические изменения способствуют нарушению сократительных свойств сердца, которые проявляются при использовании нагрузочных тестов. Аналог гамма-аминомасляной кислоты соединение РГПУ-147, в большей степени, и препарат сравнения пирацетам способны предотвращать повреждающее действие этанола, что подтверждается как морфометрическими данными, так и при исследовании функциональных резервов сердца.



а

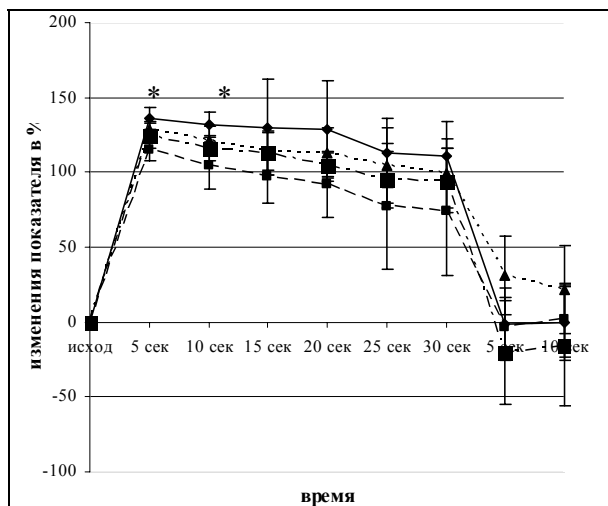


б

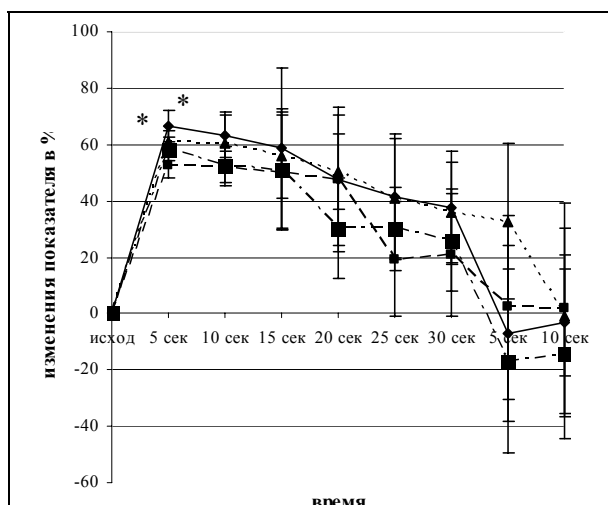


в

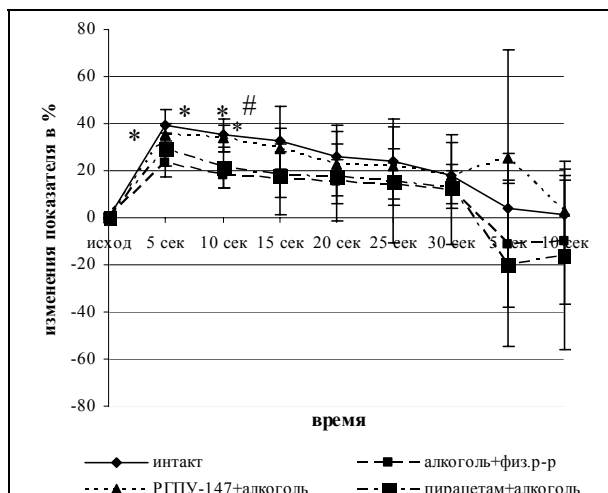
Рис. 1. Изменение ЛЖД (а), скорости сокращения (б) и скорости расслабления (в) миокарда у алкоголизованных животных в условиях нагрузки объемом: \* – изменения показателей достоверны по отношению к группе алкоголизованных животных по q-критерию Ньюмена-Кейлса при  $p < 0,05$



а



б



в

Рис. 2. Изменение ЛЖД (а), скорости сокращения (б) и скорости расслабления (в) миокарда у алкоголизованных животных в условиях максимальной изометрической нагрузки: \* – изменения показателей достоверны по отношению к группе алкоголизованных животных по q-критерию Ньюмена-Кейлса при  $p < 0,05$ ; # – изменения показателей достоверны по отношению к группе животных, получавших препарат сравнения пиррацетам по q-критерию Ньюмена-Кейлса при  $p < 0,05$

Учитывая политропное действие ГАМК и ее аналогов, можно предполагать, что кардиопротекторный эффект соединения РГПУ-147 и пирacetama в условиях ХАИ обусловлен способностью ограничивать повреждающее действие активных форм кислорода на мембраны кардиомиоцитов и их гибель, улучшать коронарный кровоток и микроциркуляцию, стимулировать процессы энергообразования [15, 16].

Таким образом, можно сделать заключение, что производные ГАМК – соединение РГПУ-147 и пирacetam – предотвращают повреждающее действие этанола, т. е. обладают кардиопротекторным действием в условиях хронической алкоголизации.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г. Г. Медицинская морфометрия. – М., 1990. – 384 с.
2. Березовская И. В. // Ланималогия – 1993. – № 1. – С. 42–43.
3. Воронков А. В. Нейропротекторные свойства фенибута и его аналогов при алкогольном повреждении мозга: автореф. дисс. ... канд. мед. наук. – Волгоград, 2003. – 24 с.
4. Гречко О. Ю. Кардиоваскулярные свойства новых производных фенибута и карфедона: автореф. дисс. ... канд. мед. наук. – Волгоград, 2000. – 20 с.
5. Кошкин И. В., Букач Т. А. Алкогольное поражение сердца. Практическое руководство. – Набережные Челны, 2001. – 112 с.

6. Кресюн В. И., Кравченко В. С., Калдырова Л. Л. // Фармакол и токсикол. – 1990. – Т. 53, № 2. – С. 29–31.

7. Ледяев М. Я. Влияние новых соединений – производных гамма-аминомасляной кислоты на агрегацию тромбоцитов и свертывание крови: автореф. дисс. ... канд. мед. наук. – М., 1986.

8. Моисеев В. С. // Кардиология. – 2003. – № 10. – С. 4–9.

9. Оковитый С. В. // ФАРМиндекс-Практик. – 2003. – Вып. 5. – С. 85–111.

10. Перфилова В. Н., Тюренков И. Н., Лебедева С. А. и др. // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2006. – № 2(18). – С. 78–81.

11. Перфилова В. Н., Островский О. В., Воровский В. Е. и др. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2007. – Т. 143, № 3. – С. 312–315.

12. Тюренков И. Н., Гурбанов К. Г. // Достижения современной экспериментальной фармакологии сердечно-сосудистой системы. – Воронеж, 1981. – С. 50–66.

13. Хан В. В. Влияние некоторых производных гамма-аминомасляной и янтарной кислот на коронарное кровообращение в условиях ишемизированного миокарда: автореф. дисс. ... канд. мед. наук. – Ростов-н/Д, 1990. – 26 с.

14. Червонская Г. П., Панкратова Г. П., Миронова Л. Л. и др. // Токсикол. вестн. – 1998. – № 3. – С. 2–8.

15. Keatsky Arthaus Z. Alkohol in Heaelt and Disease. – New-York: Barsel. – 2001. – P. 517–546.

16. Zutphen L. F., Baumans V., Beynen A. C. Principles of laboratory animal science. – Amsterdam: Elsevier, 1993. – 389 p.