

Ионова Екатерина Олеговна

**ВОЗМОЖНОСТИ ЭХОКАРДИОГРАФИИ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ЭФФЕКТОВ
ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДСТВ НА РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ И
ИНОТРОПНУЮ ФУНКЦИЮ НА МОДЕЛЯХ ПАТОЛОГИИ МИОКАРДА У КРЫС**

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении
«Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Крыжановский Сергей Александрович

Официальные оппоненты:

Оковитый Сергей Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России, кафедра фармакологии и клинической фармакологии, заведующий кафедрой

Чомахидзе Петр Шалвович, доктор медицинских наук, профессор, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), кафедра кардиологии, функциональной и ультразвуковой диагностики, профессор кафедры

Ведущая организация:

ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

Защита состоится «___» _____ 2023 года в _____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.183.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова» (ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова») по адресу: 125315 Москва, ул. Балтийская, д. 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ученой части ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» по адресу: 125315 Москва, ул. Балтийская, д. 8 и на сайте www.academpharm.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Вальдман Елена Артуровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В РФ в 2020 г., несмотря на изменение структуры смертности из-за появления новой причины – коронавирусной инфекции (7% в структуре смертности за 2020 г.), основную долю, как и прежде, составляет смертность от болезней системы кровообращения (БСК) – 47% от всех причин (Улумбекова Г.Э. с соавт., 2021). Более того, показатель смертности от БСК в РФ за январь – декабрь 2020 года составил 754,6 на 100 тыс. населения, что выше индикаторного показателя (595,0 на 100 тыс. населения) на 21,2% и на 23,4% выше показателя 2019 года (611,0 на 100 тыс. населения). Ранее сообщалось, что в РФ экономический ущерб от БСК равняется 2,7 трлн руб., что эквивалентно 3,2% ВВП (Концевая А.В. с соавт., 2018).

Патологическое ремоделирование сердца является одной из основных причин летальности от БСК, в том числе и от хронической сердечной недостаточности (ХСН). Так, согласно данным Фрамингемского эпидемиологического исследования, средняя 5-летняя летальность во всей популяции больных ХСН, являющейся исходом практически всех БСК, составляет 65% для мужчин и 47% – для женщин (Mahmood S.S. et al., 2014). В РФ, согласно результатам эпидемиологических исследований ЭПОХА-О-ХСН и ЭПОХА-ХСН, распространенность ХСН I-IV функционального класса составила 7% (7,9 млн. человек) от общего числа населения (Фомин И.В., 2016). Примерно половина больных ХСН умирает в течение первых 4-х лет с момента постановки диагноза, а в тяжелых случаях – столько же в течение первого года, и это происходит несмотря на повсеместное внедрение в широкую медицинскую практику самых эффективных на современном этапе лекарственных средств: ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента, β -блокаторов, антагонистов рецепторов альдостерона и т.д. (McDonagh T.A. et al., 2021; Kasprzak J.D. et al., 2023). В настоящее время единственным эффективным способом лечения декомпенсированной ХСН является пересадка сердца (Sánchez-Enrique C. et al., 2017). Поскольку лекарственные средства, эффективно препятствующие развитию патологического ремоделирования сердца, в клинике практически отсутствуют, их создание представляется несомненно актуальной задачей, позволяющей существенно снизить не только инвалидизацию, но и летальность от БСК.

Не менее актуальной задачей является внедрение в повседневную практику экспериментальных фармакологических исследований новых неинвазивных методических приемов, позволяющих в реальном масштабе времени, в динамике оценить как этапы формирования патологического процесса, так и особенности действия лекарственных средств, а также разработка на основе неинвазивных методов исследований трансляционных моделей, в максимально полном объеме воспроизводящих основные клиничко-диагностические критерии моделируемой патологии. При этом желательно, чтобы используемый методический прием обладал универсальностью, т.е. позволял проводить, в случае необходимости, и острые эксперименты в условиях вивисекции. Одним из таких методических приемов является эхокардиография, позволяющая, как

минимум, в полном объеме оценить размеры камер сердца и его инотропную функцию.

Степень разработанности проблемы. Первые сообщения о проведении эхокардиографических исследований на мелких лабораторных животных, преимущественно крысах, относятся к концу XX века (С.М. Cottrill et al., 1988; G. de Simone et al., 1990). Их авторы пришли к очень важному выводу о том, что «Метод является потенциально полезным инструментом для изучения динамики развития или регрессии сердечной гипертрофии» (С.М. Cottrill et al., 1988). В дальнейшем этот методический прием стал достаточно широко применяться для оценки этапов формирования и/или подтверждения наличия моделируемой патологии, преимущественно степени ремоделирования левого желудочка сердца (В.Ф. Heijnen et al., 2014; М.А. Garza et al., 2019), а также для изучения особенностей изменения состояния левого желудочка сердца в постинфарктном периоде (R. Esmaeili et al., 2017), в том числе и на фоне лекарственной терапии (G. Gao et al., 2020). Анализ этих публикаций свидетельствует о том, что систематические исследования, посвященные особенностям и возможностям эхокардиографии при проведении фармакологических исследований, в литературе не представлены. Анализ отечественной литературы свидетельствует о том, что в РФ на момент начала настоящего исследования при проведении фармакологических экспериментов эхокардиографические исследования на мелких животных практически не производили. На настоящий момент подобные публикации немногочисленны (А.А. Казаченко и др., 2013, В.Л. Лакомкин и др., 2018).

Цель исследования. Целью настоящей работы является систематическое методологическое изучение возможности использования метода эхокардиографии на мелких лабораторных животных при проведении острых и хронических экспериментов по оценке влияния фармакологических средств на инотропную функцию и ремоделирование сердца как в норме, так и при коронарогенной и некоронарогенной патологии миокарда.

Задачи исследования:

1. Валидация метода эхокардиографии на мелких грызунах.
2. Изучение возможностей метода эхокардиографии при проведении острых фармакологических тестов с изопротеренолом и метопрололом.
3. Изучение возможностей метода эхокардиографии для оценки эффектов фабомотизола и селективного блокатора металлопротеиназ 2 и 9 типов на модели острой ишемии миокарда.
4. Изучение возможностей метода эхокардиографии у крыс для разработки трансляционной модели постинфарктной хронической сердечной недостаточности (ХСН) и оценки эффективности фабомотизола для профилактики и лечения ХСН в условиях модели.
5. Изучение возможностей метода эхокардиографии у крыс для разработки трансляционной модели алкогольной кардиомиопатии и оценки эффективности триметазидина и фабомотизола в условиях модели.

6. Изучение возможности использования эхокардиографии на мелких животных как базового метода для разработки трансляционных моделей, воспроизводящих коронарогенную и некоронарогенную патологию миокарда.

Научная новизна. Впервые на основании систематических исследований продемонстрирована возможность и преимущества метода эхокардиографии на мелких животных для проведения острых и хронических экспериментов по изучению особенностей действия лекарственных средств на инотропную функцию и ремоделирование левого желудочка сердца. Впервые разработаны трансляционные модели хронической сердечной недостаточности и алкогольной кардиомиопатии у крыс, при создании которых эхокардиография являлась базовым методом исследований. Впервые на трансляционной модели хронической сердечной недостаточности показана высокая эффективность систематической терапии фабомотизолом. Впервые на трансляционной модели алкогольной кардиомиопатии получены данные, свидетельствующие о наличии высокой кардиопротективной активности у р-FOX ингибитора триметазида и анксиолитика фабомотизола.

Теоретическая и практическая значимость работы. Впервые с использованием метода эхокардиографии на мелких животных изучены особенности влияния фабомотизола на инотропную функцию и ремоделирование левого желудочка сердца в модельных экспериментах, воспроизводящих коронарогенную и некоронарогенную патологию миокарда, что обусловило целесообразность его дальнейшего фармакологического изучения в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова в качестве кардиопротектора и разработки новых показаний к его применению. Впервые с использованием метода эхокардиографии на мелких животных показаны особенности ремоделирования миокарда в острейшую фазу инфаркта миокарда и возможность коррекции выявленных нарушений с использованием блокатора цинк-зависимых металлопротеиназ 2 и 9 типов доксициклина, что составило фундаментальную основу для поиска новых оригинальных кардиопротекторов, селективно блокирующих локализованные в цитозоле кардиомиоцитов металлопротеиназы 2 и/или 9 типов. Разработанные трансляционные модели хронической сердечной недостаточности и алкогольной кардиомиопатии у крыс используются в повседневной практике НИИ фармакологии имени В.В. Закусова для поиска новых биомишеней с целью создания оригинальных кардиотропных лекарственных средств.

Методология и методы исследования. В настоящей работе использован комплекс методических приемов, модельных экспериментов и фармакологическая методология, позволившие систематически оценить возможности метода эхокардиографии на мелких животных при проведении скрининга и изучения кардиопротективной активности лекарственных средств.

Положения, выносимые на защиту.

1. Эхокардиографические исследования на мелких грызунах позволяют оценить

геометрию и инотропную функцию левого желудочка в условиях закрытой грудной клетки и на открытом сердце в норме, а также на моделях коронарогенной и некоронарогенной патологии миокарда.

2. Метод эхокардиографии может быть использован при проведении острых фармакологических тестов с изопротеренолом и метопрололом у крыс.

3. Метод эхокардиографии может быть использован для оценки эффектов фармакологических средств на модели острой ишемии миокарда.

4. С использованием метода эхокардиографии в качестве базового разработана трансляционная модель хронической сердечной недостаточности (ХСН) у крыс и доказана эффективность фабомотизола для профилактики и лечения ХСН в условиях модели.

5. С использованием метода эхокардиографии в качестве базового разработана трансляционная модель алкогольной кардиомиопатии и доказано кардиопротективное действие триметазидина и фабомотизола в условиях модели.

Степень достоверности. Исследование выполнено на большом экспериментальном материале с использованием адекватных методических приемов. Статистическая обработка полученных данных была проведена с привлечением соответствующих, современных методов математической статистики. Выводы базируются на собственных экспериментальных данных и анализе литературы.

Личный вклад автора состоит в проведении экспериментов, систематизации и интерпретации результатов исследований, анализа литературных данных по теме диссертации, статистической обработке полученных результатов, написании статей и тезисов, представлении результатов на российских и международных съездах и конференциях.

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 23 статьи, из них 20 – в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, в том числе 11 статей в журналах, входящих в международные базы данных Web of Science и Scopus; 3 статьи – в журнале, входящем в РИНЦ; получено 4 патента РФ. Результаты работы представлены в 24 тезисах в материалах научных съездов и конференций.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 182 страницах компьютерного текста. Состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы собственных результатов, заключения и выводов. Содержит 17 таблиц и 28 рисунков. Список литературы включает в себя 61 отечественных и 249 зарубежных англоязычных источника.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Препараты и вещества, использованные при проведении исследований

Субстанции: Фабомотизола дигидрохлорид (афобазол) «ERREGIERRE S.p.A.», Италия; изопротеренола гидрохлорид «Sigma»; США; метопролола гидрохлорид «Sigma», США; триметазидин АО «Фармстандарт» Россия; АЛМ-828, МЛ-269, МЛ-292, МЛ-293 ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» Россия. **Лекарственные средства:**

кетамин ФГУП «Московский эндокринный завод», Россия; уретан «Acros organics», Индия; эфир для наркоза ООО, «Кузбассоргхим», Россия; доксициклин ООО «ОЗОН», Россия; раствор натрия хлорида 0,9% изотонический ООО «Мосфарм», Россия.

Животные. Исследования выполнены на 447 белых беспородных крысах самцах и самках массой 160-350 г, 40 крысах самцах линии Wistar массой 200-220 г, 5 трехцветных морских свинок, полученных из питомника лабораторных животных филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА Россия. Организацию и проведение работ осуществляли в соответствии с российскими и международными нормативно-правовыми документами. Эксперименты проводили во временном интервале с 9.00 по 17.00. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Метод измерения эхокардиографических показателей. Эхокардиографические исследования производили в условиях закрытой/открытой грудной клетки и спонтанного дыхания/ИВЛ в одномерном М- (рисунок 1А) и двухмерном В- (рисунок 1Б) режимах при положении датчика эхокардиографа в парастеральной позиции по длинной оси сердца. В М-режиме определяли КСР и КДР, а затем по формуле L. Teichholz (L.E. Teichholz, 1976) рассчитывали: КСО, КДО, УО, ФУ и ФВ. Оценку эхокардиографических показателей проводили, как минимум, по пяти последовательным сердечным циклам. Все измерения выполняли в соответствии с Рекомендациями Американского общества и Европейской ассоциации по эхокардиографии (R.M. Lang et al., 2005). В работе использовали цифровой ультразвуковой аппарат DP6600 (Mindray Bio-Medical Electronics Co.Ltd, Китай) с электронным микроконвексным датчиком 65C15EA, воспроизводящим частоту 8 МГц.



Рисунок 1 – Эхокардиограмма интактной крысы, парастеральная позиция по длинной оси левого желудочка сердца. А – В-режим; Б – М-режим.

Методы воспроизведения коронарогенной патологии миокарда. Острую ишемию миокарда и инфаркт миокарда (ИМ) вызывали одномоментной перевязкой коронарной артерии на 1-2 мм ниже ее выхода из-под ушка сердца. Постинфарктную ХСН моделировали на крысах-самцах изначальной массой 180-200 г. ИМ воспроизводили по методу A. Selye (A. Selye, 1960). На вторые сутки после воспроизведения ИМ на наркотизированных кетамин (100 мг/кг в/б) крысах проводили эхокардиографические исследования и в дальнейший эксперимент отбирали только тех животных, у которых диагностировался передний трансмуральный ИМ. Критерием формирования постинфарктной ХСН было статистически значимое, по сравнению со 2-м днем после

воспроизведения ИМ, снижение фракции выброса + дилатация левого желудочка (ЛЖ) сердца. ХСН развивается через 90 дней после перевязки коронарной артерии.

Метод воспроизведения некоронарогенной патологии миокарда. Для изучения некоронарогенной патологии миокарда была выбрана алкогольная кардиомиопатия (АКМП), которую моделировали на беспородных белых крысах самцах изначальной массой 180-200 г путем принудительной алкоголизации, предоставляя в качестве единственного источника жидкости 10% раствор этанола. Среднесуточное потребление алкоголя в пересчете на чистый этанол колебалось в пределах 5.0-6.5 г/кг. АКМП развивается через 24 недели принудительной алкоголизации животных.

Статистика. Для сравнения независимых выборок использовали однофакторный дисперсионный анализ с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Ньюмену-Кейлсу. При анализе зависимых выборок использовали дисперсионный анализ повторных измерений с дальнейшей обработкой методами множественных сравнений по Ньюмену-Кейлсу или по Даннету. Результаты представляли в виде средних арифметических и их стандартных ошибок. В случае несоблюдения условий, необходимых для применения дисперсионного анализа, использовали непараметрический анализ по Крускалу-Уоллису с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Данну. Результаты представляли в виде медиан и нижнего и верхнего квартилей. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1 Валидация метода эхокардиографии на мелких животных

Валидацию метода эхокардиографии на мелких животных проводили в экспериментах на анестезированных (кетамин, 100 мг/кг, в/б) беспородных белых крысах самцах и морских свинках самцах, находящихся на спонтанном дыхании. Измерения проводили в В- и М-режимах в парастернальной позиции в положении датчика по длинной оси левого желудочка сердца.

В первой серии экспериментов определили показатели геометрии и инотропной функции сердца крыс. Полученные данные приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Референтные величины эхокардиографических показателей геометрии и деятельности сердца интактных наркотизированных (кетамин 100 мг/кг в/б) самцов крыс массой 160-250 г (n=160)

Показатель	Минимум	Максимум	Медиана	Среднее арифметическое
КСР, мм	1,16	2,23	1,75	1,72
КСО, мм ³	4,34	29,59	14,57	14,34
КДР, мм	2,93	4,93	3,62	3,65
КДО, мм ³	65,38	289,93	120,23	125,96
СО, мм ³	56,83	272,78	103,08	111,62
ФУ, %	44,3	68,0	51,9	52,6
ФВ, %	81,5	94,0	88,0	88,3

Величины эхокардиографических показателей, полученные в наших

экспериментах, практически совпадают или близки к таковым, известным из литературы (R. Hayward, C.Y. Lien, 2011; L. Liu et al.; 2016, R.C. Pasqualin et al., 2016 и др.). Валидность полученных результатов была подтверждена и в результате морфометрических измерений, проведенных на 10 крысах самцах. После проведения эхокардиографического исследования животных рандомизировали на 2 группы по 5 особей в каждой. У животных 1-й группы сердца были остановлены в систоле в/в инъекцией летальной дозы строфантина К, у животных 2-й группы после декапитации сердца были остановлены в диастолу погружением их в охлажденный безкальциевый раствор. Результаты морфометрических измерений, проведенных на поперечных срезах левого желудочка сердца, выполненных в пределах его средней трети, свидетельствуют о том, что у животных 1-й группы максимальный внутренний диаметр равняется $1,64 \pm 0,09$ мм, что хорошо соотносится с величиной КСР – $1,79 \pm 0,10$ мм ($p=0,302$); у животных 2-ой группы максимальный внутренний диаметр равняется $3,66 \pm 0,17$ мм, а КДР – $3,42 \pm 0,16$ мм ($p=0,318$).

Для подтверждения возможности использования и валидности метода эхокардиографии для оценки размеров, объемов и инотропной функции левого желудочка сердца у мелких животных эти показатели были определены у самцов морских свинок ($n=5$) массой 230-280 г. Полученные результаты свидетельствуют о том, что конечные внутренние размеры полости левого желудочка морских свинок самцов несколько больше, чем у крыс (например, КДР у крыс в среднем равен $3,65 \pm 0,03$ мм, а у морских свинок – $4,72 \pm 0,14$ мм), тогда как ФВ у морских свинок несколько ниже – $71,6 \pm 1,8\%$. По литературным данным у морских свинок ФВ колеблется в пределах 67,0-78,0% (N. Cetin, E. Cetin, M. Toker, 2005).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что проведенные нами эхокардиографические измерения позволяют адекватно оценить размеры, объемы и инотропную функцию левого желудочка сердца у мелких животных, т.е. наши результаты представляется валидными.

2 Доказательство возможности использования метода эхокардиографии на мелких животных для проведения острых фармакологических тестов

Оценка влияния потенциальных кардиотропных лекарственных средств на сократительную функцию сердца в острых фармакологических тестах является обязательным атрибутом доклинических исследований. Для доказательства возможности применения метода эхокардиографии на мелких животных для проведения острых фармакологических тестов мы в качестве эталонного средства с положительной инотропной активностью использовали неселективный агонист $\beta_{1,2}$ -адренорецепторов ультракороткого действия изопротеренол, который вводили в/в болюсом в дозе 20 мкг/кг, а в качестве эталонного средства с отрицательной инотропной активностью использовали селективный антагонист β_1 -адренорецепторов метопролол, который вводили в/в в дозе 2,0 мг/кг.

Эксперименты были выполнены на анестезированных (уретан, 1300 мг/кг в/б) крысах-самцах (n=5, в каждой группе) массой 160-180 г. У всех включенных в исследование животных исходные значения ФВ согласно данным эхокардиографии не выходили за пределы референтных величин. Показано, что через 1 минуту после окончания введения изопротеренола ФУ увеличилась с $46,5 \pm 1,5\%$ до $52,1 \pm 1,5\%$ ($p=0,0007$), а ФВ – с $82,3 \pm 1,4\%$ до $88,7 \pm 1,0\%$ ($p=0,041$). Через 5 минут после окончания введения изопротеренола ФУ и ФВ практически не отличаются от фона (рисунок 2А).

Через 2 минуты после окончания введения метопролола ФУ снизилась по сравнению с фоном с $51,3 \pm 1,5$ до $41,1 \pm 2,0 \%$ ($p=0,0008$), а ФВ – с $87,6 \pm 1,1$ до $78,2 \pm 2,2\%$ ($p=0,0015$). Через 5 минут после окончания введения препарата его кардиодепрессивные эффекты полностью сохраняются (рисунок 2Б).

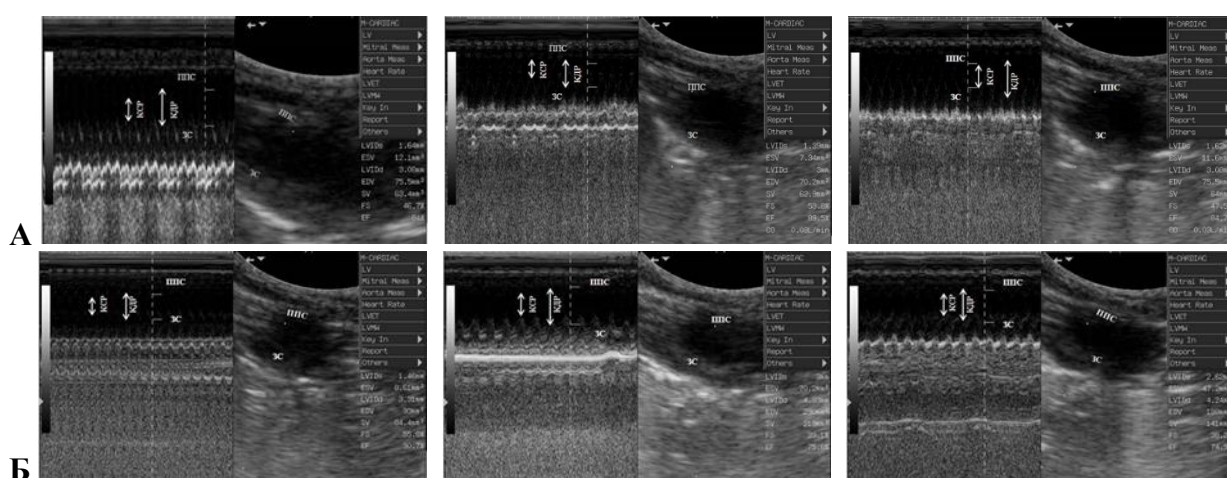


Рисунок 2 – ЭхоКГ, иллюстрирующие влияние А – изопротеренола (20 мкг/кг в/в) и Б – метопролола (1,0 мг/кг в/в) на эхокардиографические показатели наркотизированной (уретан 1300 мг/кг в/б) крысы. Слева направо: исходный уровень; через 1 мин и через 3 мин после введения препарата

Таким образом, полученные результаты убедительно свидетельствуют о том, что метод эхокардиографии на мелких лабораторных животных может быть использован при проведении острых фармакологических тестов по изучению влияния биологически активных соединений на инотропную функцию сердца. В отличие от традиционно применяемых для этих целей инвазивных методов исследования (определение $dp/dt_{\text{макс}}$ или величины фазового кровотока в восходящей части дуги аорты) метод эхокардиографии более физиологичен (животные находятся на спонтанном дыхании) и имеет ряд преимуществ. Во-первых, он атравматичен, что практически нивелирует риск получения некорректных результатов, связанных с травматичным операционным вмешательством, а во-вторых, позволяет получить информацию не только о состоянии инотропной функции сердца, но и об изменении геометрии левого желудочка сердца под влиянием изучаемых соединений, что представляется достаточно важным.

3 Изучение возможности использования метода эхокардиографии на мелких животных для изучения эффектов фармакологических средств при коронарогенной патологии миокарда

Целью настоящего этапа работы явилось изучение возможности использования эхокардиографии на мелких животных (крысы) для оценки этапов формирования постишемического ремоделирования миокарда как в острых, так и в хронических экспериментах, а также возможности коррекции выявленных нарушений при помощи кардиотропных лекарственных средств.

3.1 Доказательство возможности использования метода эхокардиографии на мелких животных для оценки эффективности фармакологических средств на модели острой ишемии миокарда

Опыты проводили на беспородных крысах-самцах массой 300-350 г, анестезированных уретаном (1300 мг/кг, в/б). Как следует из полученных данных, у интактных животных (n=5) вскрытие грудной клетки и перикардотомия не оказывали существенного влияния на инотропную функцию ЛЖ сердца (таблица 2), отмечалось лишь незначительное, статистически не значимое увеличение КСР и КДР.

У ложнооперированных животных (n=6) в течение всего периода наблюдения (60 мин) регистрируемые показатели также существенно не изменялись (таблица 2).

Одномоментная перевязка коронарной артерии повлекла за собой выраженные изменения систолической функции ЛЖ. На 3-й минуте после окклюзии коронарного сосуда КСР увеличился с $1,98 \pm 0,12$ мм до $3,11 \pm 0,19$ мм ($p < 0,001$), ФВ уменьшилась с $88,4 \pm 1,2$ до $67,0 \pm 1,6$ % ($p < 0,001$) (таблица 2).

Таким образом, практически сразу же после одномоментной перевязки коронарной артерии происходит резкое, статистически значимое падение систолической функции ЛЖ. Показано, что этот процесс динамически нарастает во времени и достигает своего максимума в период с 10-й по 20-ю минуту после перевязки (таблица 2). Так, на 20-й минуте ишемии КСР увеличился с $1,98 \pm 0,12$ мм до $3,84 \pm 0,16$ мм, $p < 0,001$ (по отношению к ложнооперированным $p < 0,001$) т.е. в 2 раза; КДР увеличился с $4,22 \pm 0,19$ мм до $5,27 \pm 0,23$ мм – $p < 0,001$ (по отношению к ложнооперированным $p < 0,040$) т.е. на 25%, а ФВ уменьшилась с $88,4 \pm 1,2$ % до $59,0 \pm 1,7$ %, $p < 0,001$ (по отношению к ложнооперированным $p < 0,001$), т.е. на 33%. (таблица 2). В период с 30-й по 60-ю минуту от момента перевязки коронарной артерии зарегистрировано постепенное незначительное улучшение показателей, характеризующих систолическую функцию ЛЖ сердца (таблица 2).

3.2 Изучение кардиопротективных эффектов селективного блокатора металлопротеиназ 2 и 9 типов антибиотика доксициклина на модели острой одномоментной окклюзии коронарной артерии

На следующем этапе, в продолжение приведенного выше исследования, нами была предпринята попытка оценить возможность использования эхокардиографии у крыс с открытой грудной клеткой для оценки кардиопротективного действия лекарственных

Таблица 2 – Изменение геометрии и инотропной функции левого желудочка сердца в условиях ОИМ у наркотизированных крыс (уретан 1300 мг/кг в/б) ($M \pm m$, p – по отношению к ложнооперированным; p_1 – к исходному уровню; p_2 – к 20-й минуте после коронарной окклюзии)

Условия	Показатель	До вскрытия грудной клетки	После вскрытия грудной клетки	Время после окклюзии коронарной артерии, минуты					
				3	10	20	30	45	60
Интактные крысы, n=5	КСР, мм	2,01±0,12	2,03±0,13 $p_1=0,947$	2,03±0,9 $p_1=0,969$	2,03±0,14 $p_1=0,969$	2,06±0,11 $p_1=0,812$	2,06±0,16 $p_1=0,795$	2,08±0,12 $p_1=0,713$	2,06±0,11 $p_1=0,801$
	КДР, мм	4,38±0,11	4,39±0,18 $p_1=0,980$	4,41±0,20 $p_1=0,911$	4,46±0,15 $p_1=0,859$	4,46±0,21 $p_1=0,775$	4,44±0,15 $p_1=0,803$	4,47±0,24 $p_1=0,796$	4,46±0,22 $p_1=0,783$
	ФУ, %	52,9±1,8	52,8±1,6 $p_1=0,987$	52,8±1,9 $p_1=0,972$	52,6±2,0 $p_1=0,880$	52,6±2,3 $p_1=0,901$	52,5±2,0 $p_1=0,854$	52,5±2,1 $p_1=0,862$	52,3±2,2 $p_1=0,727$
	ФВ, %	88,9±1,2	88,8±1,4 $p_1=0,992$	88,9±1,0 $p_1=0,999$	88,6±1,7 $p_1=0,983$	88,7±1,2 $p_1=0,920$	88,5±1,7 $p_1=0,894$	88,8±1,7 $p_1=0,972$	88,4±2,1 $p_1=0,911$
Ложная операция, n=6	КСР, мм	1,84±0,9	1,86±0,14 $p_1=0,951$	1,93±0,07 $p_1=0,698$	2,02±0,10 $p_1=0,451$	2,01±0,08 $p_1=0,379$	1,90±0,09 $p_1=0,649$	1,81±0,09 $p_1=0,891$	1,85±0,06 $p_1=0,958$
	КДР, мм	4,19±0,17	4,19±0,22 $p_1=0,990$	4,43±0,13 $p_1=0,427$	4,55±0,14 $p_1=0,269$	4,54±0,13 $p_1=0,263$	4,48±0,13 $p_1=0,349$	4,24±0,07 $p_1=0,938$	4,22±0,12 $p_1=0,858$
	ФУ, %	56,0±1,0	55,8±1,6 $p_1=0,933$	56,3±1,5 $p_1=0,960$	55,7±1,8 $p_1=0,950$	55,7±1,4 $p_1=0,997$	57,7±1,4 $p_1=0,847$	57,3±1,7 $p_1=0,856$	55,9±1,8 $p_1=0,938$
	ФВ, %	90,5±1,4	90,4±1,1 $p_1=0,971$	90,7±0,9 $p_1=0,961$	90,2±1,1 $p_1=0,989$	90,3±0,9 $p_1=0,928$	91,5±0,8 $p_1=0,863$	91,3±1,0 $p_1=0,877$	90,4±1,2 $p_1=0,967$
Острый инфаркт миокарда, n=12	КСР, мм	1,95±0,09	1,98±0,12 $p=0,506$ $p_1=0,914$	3,11±0,19 $p<0,001$ $p_1<0,001$ $p_2<0,001$	3,83±0,15 $p<0,001$ $p_1<0,001$ $p_2=0,973$	3,84±0,16 $p<0,001$ $p_1<0,001$	3,61±0,16 $p<0,001$ $p_1<0,001$ $p_2=0,145$	3,36±0,15 $p<0,001$ $p_1<0,001$ $p_2=0,003$	3,24±0,15 $p<0,001$ $p_1<0,001$ $p_2<0,001$
	КДР, мм	4,20±0,15	4,22±0,19 $p=0,912$ $p_1=0,926$	4,59±0,27 $p=0,596$ $p_1=0,071$ $p_2=0,003$	5,17±0,17 $p=0,044$ $p_1<0,001$ $p_2=0,619$	5,27±0,23 $p=0,040$ $p_1<0,001$	5,15±0,22 $p=0,049$ $p_1<0,001$ $p_2=0,561$	4,87±0,22 $p=0,060$ $p_1=0,004$ $p_2=0,069$	4,83±0,21 $p=0,058$ $p_1=0,005$ $p_2=0,053$
	ФУ, %	53,3±1,2	53,2±1,7 $p=0,225$ $p_1=0,978$	32,3±1,1 $p<0,001$ $p_1<0,001$	26,0±1,0 $p<0,001$ $p_1<0,001$	27,1±1,1 $p<0,001$ $p_1<0,001$	29,9±1,1 $p<0,001$ $p_1<0,001$	30,8±1,1 $p<0,001$ $p_1<0,001$	32,9±0,9 $p<0,001$ $p_1<0,001$
	ФВ, %	88,6±1,0	88,4±1,2 $p=0,221$ $p_1=0,990$	67,0±1,6 $p<0,001$ $p_1<0,001$ $p_2<0,001$	57,4±1,7 $p<0,001$ $p_1<0,001$ $p_2=0,414$	59,0±1,7 $p<0,001$ $p_1<0,001$	63,4±1,6 $p<0,001$ $p_1<0,001$ $p_2=0,035$	64,8±1,6 $p<0,001$ $p_1<0,001$ $p_2=0,008$	67,9±1,3 $p<0,001$ $p_1<0,001$ $p_2<0,001$

средств в условиях острейшей фазы ИМ.

Выбор эталонного препарата был проведен на основе анализа современных представлений о механизмах ремоделирования ЛЖ сердца в первые часы ИМ. Известно, что ведущую роль в патогенезе постинфарктного ремоделирования миокарда играет повреждение/потеря внутриклеточного матрикса (ВМ), обусловленное преимущественно деструкцией фибриллярных белков – коллагенов I и III типов. В деструкции фибриллярных белков, составляющих основную массу ВМ, одну из ключевых ролей играют желатиназы – матриксные металлопротеиназы 2 и 9 типов (ММП-2 и ММП-9) (D.Vanhoutte et al., 2006, M.L. Lindsey et al., 2012). Помимо внеклеточного матрикса ММП-2 и ММП-9 локализируются в цитозоле, митохондриях и ядре кардиомиоцитов (W. Bassiouni et al., 2021; X. Fan et al., 2016) и имеют многочисленные внутриклеточные мишени, которые в условиях ишемии под влиянием оксидативного стресса активируются в течение нескольких минут от ее начала (B.G. Hughes, R. Schulz, 2014), что влечет снижение инотропной функции ЛЖ. Исходя из этого, в качестве эталонного препарата был выбран антибиотик тетрациклинового ряда доксициклин, который, помимо бактериостатического действия, селективно ингибирует ММП-2 и ММП-9 и широко применяется в экспериментальных исследованиях в качестве их ингибитора (Y. Hori et al., 2009).

Крысы были рандомизированы на 3 группы: 1-я – ложнооперированные (n=6), 2-я – инфаркт миокарда (n=12) и 3-я – инфаркт миокарда + доксициклин (n=7). Животным 3-й группы доксициклин (40 мг/кг в 0,5 мл физиологического раствора) вводили через зонд в желудок 1 раз в сутки в течение 3 дней, предшествующих эксперименту. Крысы 1-й и 2-й групп получали аналогичный объем физиологического раствора.

В группе животных, получавших доксициклин, одномоментная перевязка коронарной артерии также как и в контроле влекла за собой снижение систолической функции ЛЖ сердца, однако в первые 20 минут от момента начала ишемии интенсивность этого процесса была статистически значимо ниже. Так, например, на 20-й минуте ишемии у контрольных животных КСР увеличивался с $1,98 \pm 0,12$ мм до $3,84 \pm 0,16$ мм, т.е. в 2 раза, тогда как у животных, получавших доксициклин, увеличение КСР составило 59% (соответственно, с $1,79 \pm 0,09$ до $2,85 \pm 0,12$ мм, $p=0,007$) (рисунок 3А). К этому моменту у контрольных животных ФВ снизилась с $88,4 \pm 1,2$ до $59,0 \pm 1,7$ %, т.е. на 33%, а у животных, получавших доксициклин – лишь на 24% (соответственно с $90,6 \pm 0,6$ до $68,7 \pm 0,9$ %, $p=0,002$) – различия статистически значимы ($p=0,002$). Начиная с 30-й минуты ишемии, показатели, характеризующие инотропную функцию ЛЖ сердца, в группе животных, получавших доксициклин, статистически значимо не отличались от таковых, зарегистрированных в это время в контрольной группе (рисунок 3Б).

По всей видимости, значимая стабилизация инотропной функции ЛЖ в острейшую фазу ИМ под влиянием доксициклина связана с его способностью ингибировать внутриклеточные ММП-2 и ММП-9.

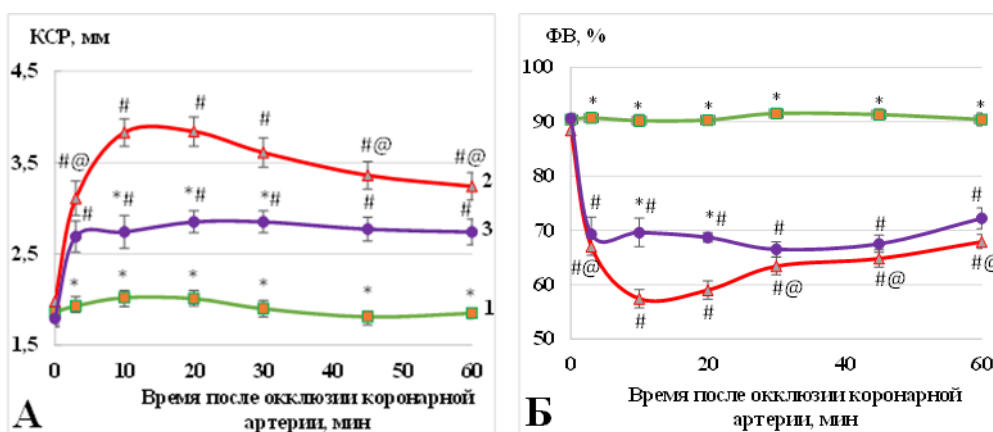


Рисунок 3 – Влияние доксициклина (40 мг/кг/сут., per os в течение 3 суток до окклюзии) на эхокардиографические показатели наркотизированных крыс (уретан 1300 мг/кг/ в/б) в условиях ОИМ. 1 – ЛО (n=6), 2 – ОИМ (n=12), 3 – ОИМ+доксициклин (n=7). * – $p < 0,05$ по отношению к контролю с ОИМ; # – $p < 0,05$ по отношению к исходному уровню; @ – $p < 0,05$ по отношению к уровню на 20-й минуте

Таким образом, результаты этой серии экспериментов позволяют говорить о том, что эхокардиография на мелких животных в условиях острого эксперимента позволяет не только в реальном масштабе времени, в динамике оценить этапы формирования патологического ремоделирования ЛЖ сердца, но и оценить кардиопротективные эффекты лекарственных средств.

В развитие этого направления исследований нами на модели острой ишемии миокарда при помощи эхокардиографии был проведен скрининг 7 соединений производных бензоиламино(фенилсульфонил)-замещенных циклических аминокислот, потенциально обладающих свойствами ингибиторов MMP-2 и/или MMP-9. В результате скрининга было выявлено соединение (1-({4-[(4-хлорбензоил)амино]фенил}сульфонил-L-пролин), которое по своей кардиопротективной активности, как минимум, не уступает эталонному препарату доксициклину. По результатам этого исследования получен патент РФ № 2646752.

3.3 Изучение возможности использования метода эхокардиографии на мелких животных для оценки эффективности фармакологических средств на трансляционной модели постинфарктной хронической сердечной недостаточности

На первом этапе исследования была предпринята попытка разработки трансляционной модели ХСН. Критерием формирования постинфарктной ХСН было статистически значимое по сравнению со 2-ми сутками после перевязки коронарной артерии снижение ФВ + дилатация ЛЖ сердца.

Опыты проводили на беспородных крысах-самцах, на момент включения в эксперимент массой 160-180 г, которые были рандомизированы на 2 группы: 1-я (n=9) – контрольная (ложнооперированные животные), 2-я (n=15) – основная (передний трансмуральный ИМ). В основной группе на 10-й и 12-й неделях эксперимента погибло 3 животных. Показано, что у ложнооперированных животных (n=9) на 2-е сут. после операции и в дальнейшем на протяжении всего периода наблюдения (3 мес.) величины,

характеризующие размеры и инотропную функцию ЛЖ, существенно не отличались от исходных. У животных основной группы (n=15/12) на 2-е сутки после воспроизведения ИМ (в эту группу включены только животные с документально подтвержденным передним трансмуральным инфарктом миокарда) зарегистрированы существенные изменения в состоянии систолической функции левого желудочка сердца (таблица 3, рисунок 4). К концу 1-го месяца от момента воспроизведения ИМ (таблица 3, рисунок 4) начинает формироваться и диастолическая дисфункция ЛЖ: отмечается статистически значимое по сравнению со 2-ми сутками после операции увеличение КДР – +18% (p=0,015), однако различие с КДР ложнооперированных животных не значимо (p=0,076). ФВ и ФУ левого желудочка сердца значимо не отличаются от таковых, зарегистрированных на 2-е сутки после операции. Через 3 месяца после воспроизведения инфаркта миокарда у животных основной группы отмечается дальнейшее динамическое увеличение максимальных конечных размеров левого желудочка сердца (КСР по сравнению с фоном до операции увеличился в 2,6 раза, а по сравнению со 2-м днем после операции – на 57%, а КДР соответственно на 57% и 46%), что сопровождается статистически значимым (p<0,001) по сравнению со 2-м днем после операции снижением ФВ (таблица 3, рисунок 4).

Таблица 3 – Изменения геометрии и функции сердца, возникающие в условиях ХСН, вызванной ЭИМ у крыс. Наркоз – кетамин 100 мг/кг в/б. (M±m, p – по отношению к ложнооперированным; p₁ – по отношению к уровню через 2 сут. после операции)

Группа животных	Показатель	Исходный уровень	Время после операции, сутки			
			2	30	60	90
Ложная операция, n=9	КСР, мм	1,59±0,09	1,67±0,10	1,76±0,14 p ₁ =0,622	1,85±0,18 p ₁ =0,561	1,88±0,19 p ₁ =0,619
	КДР, мм	3,42±0,11	3,55±0,13	3,63±0,15 p ₁ =0,920	3,64±0,20 p ₁ =0,971	3,83±0,22 p ₁ =0,646
	ФУ, %	53,5±1,2	52,9±1,5	51,6±1,4 p ₁ =0,401	49,2±1,5 p ₁ =0,075	50,9±1,2 p ₁ =0,395
	ФВ, %	88,4±2,0	88,6±1,8	87,6±1,7 p ₁ =0,606	85,7±1,9 p ₁ =0,455	87,1±1,6 p ₁ =0,726
ЭИМ, n=12	КСР, мм	1,48±0,07	2,49±0,08 p=0,002	3,05±0,12 p<0,001 p ₁ =0,002	3,36±0,15 p<0,001 p ₁ <0,001	3,91±0,17 p<0,001 p ₁ <0,001
	КДР, мм	3,31±0,12	3,56±0,11 p=0,984	4,21±0,13 p=0,076 p ₁ =0,015	4,63±0,17 p<0,001 p ₁ <0,001	5,20±0,19 p<0,001 p ₁ <0,001
	ФУ, %	55,02±1,0	30,0±1,3 p<0,001	27,9±1,2 p<0,001 p ₁ =0,164	27,7±1,3 p<0,001 p ₁ =0,284	25,1±1,0 p<0,001 p ₁ =0,011
	ФВ, %	86,8±1,4	63,9±1,6 p<0,001	60,6±1,5 p<0,001 p ₁ =0,094	60,1±1,6 p<0,001 p ₁ =0,136	54,9±1,4 p<0,001 p ₁ <0,001

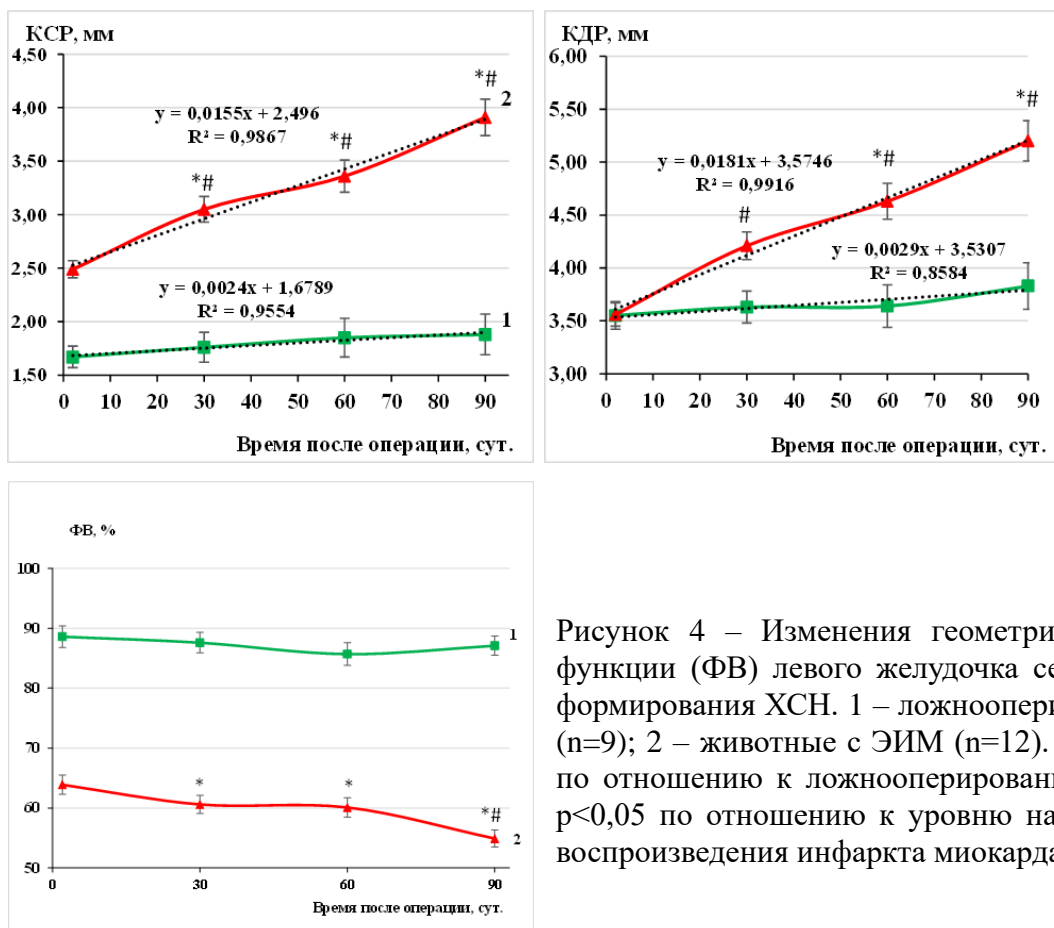


Рисунок 4 – Изменения геометрии и инотропной функции (ΦВ) левого желудочка сердца в процессе формирования ХСН. 1 – ложнооперированные крысы (n=9); 2 – животные с ЭИМ (n=12). М±m; * – p<0,05 по отношению к ложнооперированным крысам. # – p<0,05 по отношению к уровню на 2-е сутки после воспроизведения инфаркта миокарда.

Таким образом, согласно данным, полученным при помощи эхокардиографии, у животных через 90 суток после воспроизведения переднего трансмурального ИМ формируется ХСН, течение которой в 30% случаев отягощено развитием постинфарктной аневризмы передней стенки левого желудочка сердца. Наличие у крыс ХСН было подтверждено комплексом морфогистологических, биохимических и молекулярных исследований, выполненных сотрудниками лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» в.н.с. А.В. Сорокиной и н.с. И.А. Мирошкиной и руководителем лаборатории хронического воспаления и микроциркуляции ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» в.н.с., д.м.н. Л.М. Кожевниковой (Крыжановский С.А. и др., 2019).

Таким образом, нами разработана трансляционная модель ХСН у крыс (патент РФ № 2744681), воспроизводящая основные клинко-диагностические критерии этого заболевания. Установлена прямая корреляция между морфометрическими, гистологическими, биохимическими и молекулярными маркерами прогрессирующей ХСН и эхокардиографическими диагностическими признаками, что позволяет использовать неинвазивный метод эхокардиографии в качестве основного критерия оценки наличия/отсутствия данной патологии. Помимо этого, эхокардиография дает возможность в динамике, в реальном масштабе времени оценивать этапы формирования этого

патологического процесса.

На следующем этапе исследования изучили возможность использования анксиолитика фабомотизола для лечения ХСН, сформировавшейся у крыс, перенесших острый передний трансмуральный ИМ. Выбор препарата обусловлен тем, что он, помимо собственно анксиолитической, обладает и выраженной кардиопротективной активностью (С.А. Крыжановский и др., 2010, С.Б. Середенин и др., 2013).

Опыты проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 180-200 г, которые изначально были разделены на 2 группы: 1-я (n=11) – ложнооперированные животные; 2-я (n=15) – контроль ХСН. Через 3 месяца после проведения эхокардиографических исследований, показавших, что во 2-й группе у 13-ти из 15-ти животных сформировалась ХСН, крысы с ХСН были рандомизированы на 2 подгруппы: 2а – контроль ХСН (n=6) и 2б – ХСН + фабомотизол (n=7, 15 мг/кг, в/б. ежедневно, в период с 90 по 118 сутки эксперимента). Показано, что у ложнооперированных животных за весь период наблюдения не происходит каких-либо существенных изменений регистрируемых показателей, тогда как у крыс 2-й группы (n=12) к 90-му дню эксперимента происходит значимое увеличение полости ЛЖ и снижение его инотропной функции. Так, например, КСР по сравнению с интактными животными увеличился на 78% – с $2,21 \pm 0,05$ мм до $4,26 \pm 0,32$ мм ($p=0,0002$), а ФВ снизилась на 32% – с $85,2 \pm 1,0\%$ до $58,2 \pm 3,0\%$ ($p<0,0001$). С 3-го по 4-й мес. после воспроизведения ИМ у контрольных животных отмечено дальнейшее расширение полостей сердца и снижение ФВ (рисунок 5). У крыс, получавших экспериментальную терапию фабомотизолом, отмечена обратная картина: по сравнению с фоном перед началом лечения, происходит увеличение сократительной способности миокарда – ФВ возрастала на 12% – с $54,2 \pm 2,7$ до $64,8 \pm 3,4\%$ ($p=0,003$). Увеличение ФВ сопровождается тенденцией к уменьшению дилатации левого желудочка – КСР к моменту окончания лечения уменьшился на 14%, а КДР – на 2% (рисунок 5).

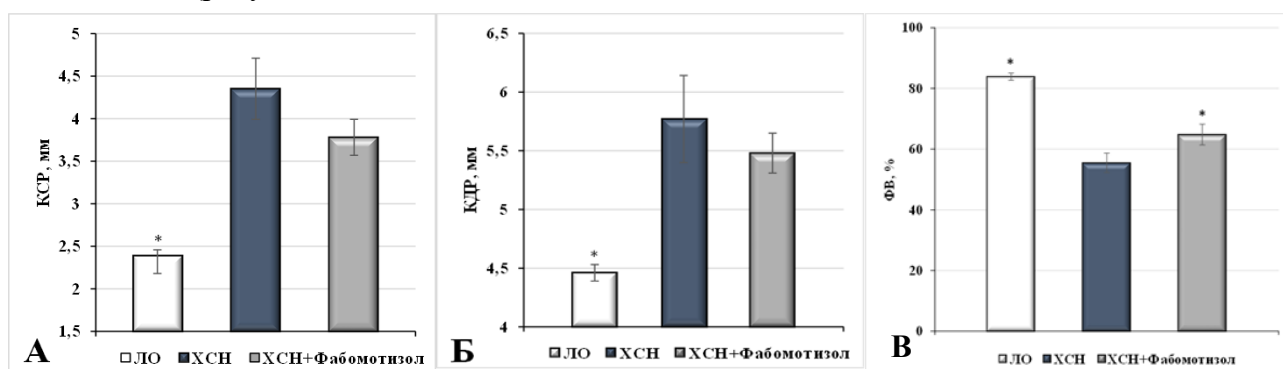


Рисунок 5 – Влияние фабомотизола (15 мг/кг/сут. в/б в течение 4 нед.) на КСР, КДР и ФВ левого желудочка сердца крыс со сформировавшейся ХСН (начало введения через 3 мес. после окклюзии коронарной артерии). ЛО – ложнооперированные крысы. А – по оси ординат КСР в мм; Б – по оси ординат КДР в мм, В – ФВ в %. $M \pm m$, * – $p<0,05$ по отношению контролю с ХСН.

Таким образом, результаты этой серии экспериментов свидетельствуют о том, что при помощи эхокардиографии можно не только в реальном масштабе времени, в динамике

оценивать этапы формирования патологического процесса, но и отслеживать эффекты лекарственной терапии, что хорошо согласуется с известными из литературы данными.

3.4 Изучение возможности использования метода эхокардиографии на мелких животных для оценки эффективности фармакологических средств при некоронарогенной патологии миокарда

Некоронарогенное повреждение миокарда моделировали путем длительной принудительной алкоголизации животных, приводящей к формированию АКМП, в основе которой лежит некоронарогенное, моноэтиологическое токсическое, алкоголь-обусловленное повреждение сердечной мышцы. На первом этапе исследований мы предприняли попытку разработать с использованием эхокардиографии трансляционную модель АКМП. Было показано, что согласно данным эхокардиографии АКМП начинает формироваться у крыс, принудительно в течении 20 недель в качестве единственного источника жидкости получавших 10% раствор этанола, о чем свидетельствует статистически значимое снижение инотропной функции ФВ ЛЖ по сравнению с фоном перед началом эксперимента (с 89,3% до 78,8%; $p \approx 0,019$). Однако при этом величины КСР и КДР левого желудочка статистически значимо не изменяются – соответственно $p \approx 0,1613$ и $p \approx 1,000$ (таблица 4).

В период с 20-й по 24-ю неделю происходит динамическое снижение регистрируемых показателей и к концу 24-й недели формируется полномасштабная АКМП (таблица 5). Так, КСР увеличивается на $\approx 65\%$ ($p \approx 0,0008$ по сравнению с контролем), а КДР \approx на 30% ($p \approx 0,0171$ по сравнению с контролем). Дилатация полости левого желудочка сердца сопровождается динамическим снижением его инотропной функции: ФВ за этот период снижается еще на 18% (соответственно с 78,8% до 64,5%; $p \approx 0,001$).

Таблица 4 – Динамика изменения эхокардиографических показателей геометрии и инотропной функции левого желудочка у крыс в процессе систематического потребления алкоголя. Наркоз – кетамин 100 мг/кг в/б. Представлены медианы показателей и нижний и верхний квартили; рк – по отношению к контролю

Показатель	Контроль, n=11	Алкоголизованные животные, n=5		Показатель Краскела-Уоллиса, Н
	24 недели	20 недель	24 недели	
КСР, мм	2,00 1,85÷2,36	2,62 2,54÷2,85 $p_k \approx 0,1613$	4,31 3,80÷4,41 $p_k \approx 0,0008$	14,127 $p \approx 0,0009$
КДР, мм	4,52 3,85÷4,90	4,54 4,08÷4,93 $p_k \approx 1,0000$	5,95 5,13÷6,37 $p_k \approx 0,0171$	7,986 $p \approx 0,0184$
ФУ, %	51,3 47,8±59,1	41,9 40,3÷42,2 $p_k \approx 0,0215$	30,8 27,6÷32,2 $p_k \approx 0,0010$	15,584 $p \approx 0,0004$
ФВ, %	87,5 84,6±92,4	78,8 77,4÷79,2 $p_k \approx 0,0215$	64,5 59,8÷66,5 $p_k \approx 0,0010$	15,584 $p \approx 0,0004$

Наличие у крыс АКМП было подтверждено комплексом морфогистологических, биохимических, молекулярных и электрофизиологических исследований, выполненных

гл.н.с И.М. Роцевской, гл.н.с Л.М. Кожевниковой, в.н.с. А.В. Сорокиной, с.н.с. В.Н. Столяруком и н.с. И.А. Мирошкиной (Крыжановский С.А. и др., 2017; Кожевникова Л.М. и др., 2018, Мирошкина И.А. и др., 2021).

Таким образом, нами разработана трансляционная модель АКМП у крыс (патент РФ № 2646454), воспроизводящая основные клинико-диагностические критерии этого заболевания. Установлена прямая корреляция между морфометрическими, гистологическими, биохимическими и электрофизиологическими маркерами АКМП и эхокардиографическими диагностическими признаками, что позволяет использовать неинвазивный метод эхокардиографии в качестве основного критерия оценки наличия/отсутствия данной патологии. Помимо этого, эхокардиография, так же как и в случае ХСН, дает возможность в динамике, в реальном масштабе времени, оценивать этапы формирования АКМП.

Далее была предпринята попытка фармакологической коррекции выявленных нарушений. В качестве эталонного препарата был выбран парциальный ингибитор окисления свободных жирных кислот (p-FOX ингибитор) триметазидин, который по мнению ряда кардиологов является препаратом выбора для лечения АКМП (В.Т. Ивашкин и др., 2006, H. Li et al., 2016). В качестве препарата сравнения использовали фабомотизол.

Опыты проводили на беспородных белых крысах-самцах с начальной массой тела 180–200 г. На 1-м этапе исследования животных рандомизировали на две группы: 1-я (n=9) – интактные крысы, не получавшие этанол; 2-я (n=17) – животные, которые в принудительном порядке подвергались алкоголизации в течение 24-х недель. По окончании 24-й недели, после подтверждения наличия у крыс 2-й группы эхокардиографических признаков сформировавшейся АКМП, алкоголизацию животных прекращали и крыс вновь рандомизировали на 2 подгруппы: 2а – основная и 2б – контрольная. Животным подгруппы 2а (n=10) ежедневно в течение 28 дней вводили триметазидин в дозе 30 мг/кг/сут., в/б; крысам подгруппы 2б (n=7) по аналогичной схеме вводили эквивалентный объем изотонического раствора натрия хлорида. Эксперимент с фабомотизолом строили аналогичным образом: 1-я группа (n=8); 2а подгруппа (n=9) – ежедневно в течение 28 дней вводили фабомотизол (15 мг/кг, в/б); 2б подгруппа (n=9) – по той же схеме изотонический раствор натрия хлорида. Оценку эхокардиографических показателей проводили за сутки до начала алкоголизации и через 24 и 28 недель от момента начала алкоголизации.

Систематическая терапия триметазидином у крыс со сформировавшейся АКМП (подгруппа 2а), начатая в условиях алкогольной абстиненции, оказывает выраженное кардиопротективное действие, характеризующееся не только значимым увеличением инотропной функции левого желудочка сердца, т.е. снижением тяжести течения сердечной недостаточности, но и уменьшением его КСР, т.е. обратным ремоделированием левого желудочка (рисунок 6).

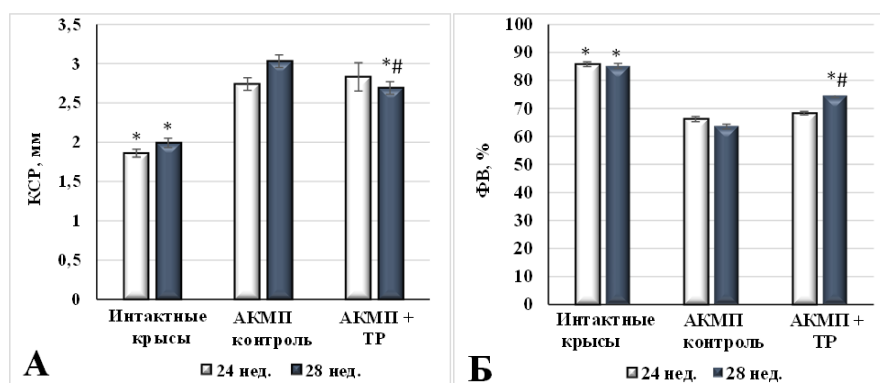


Рисунок 6 – Влияние триметазида (30 мг/кг/сут. в/б в течение 28 дней, начиная с 1-го дня абстиненции после 24 нед. алкоголизации) на КСР и ФВ крыс со сформировавшейся АКМП в условиях 28-дневной алкогольной депривации. $M \pm m$; * – $p < 0,05$ по отношению к АКМП контролю; # – $p < 0,05$ по отношению к уровню в конце 24-й недели алкоголизации. Тр – триметазидин.

Ближайшие результаты получены и у крыс, леченных фабомотизолом. Так, если у контрольных алкоголизованных крыс за период с 24-ой по 28-ю неделю КСР увеличился на 0,08 мм, то у животных, получавших фабомотизол, он уменьшился на 0,51 мм или на 17 % (соответственно с $3,00 \pm 0,17$ мм до $2,49 \pm 0,11$ мм, $p = 0,042$). Различие между подгруппами статистически значимо – $p = 0,038$. У контрольных крыс в этот период ФВ левого желудочка сердца снизилась на 2%, тогда как у леченных, напротив, увеличилась на 15% (соответственно с $64,9 \pm 2,4\%$ до $74,8 \pm 1,6\%$, $p = 0,005$). Различие между подгруппами 2а и 2б статистически значимо – $p = 0,004$ (рисунок 7).

Таким образом, в этой серии экспериментов впервые с помощью эхокардиографии продемонстрирована возможность использования фабомотизола для лечения АКМП. Полученные данные свидетельствуют о том, что систематическая экспериментальная терапия фабомотизолом животных, страдающих АКМП, по своей кардиопротективной эффективности, как минимум, не уступает терапии эталонному препарату триметазидин.

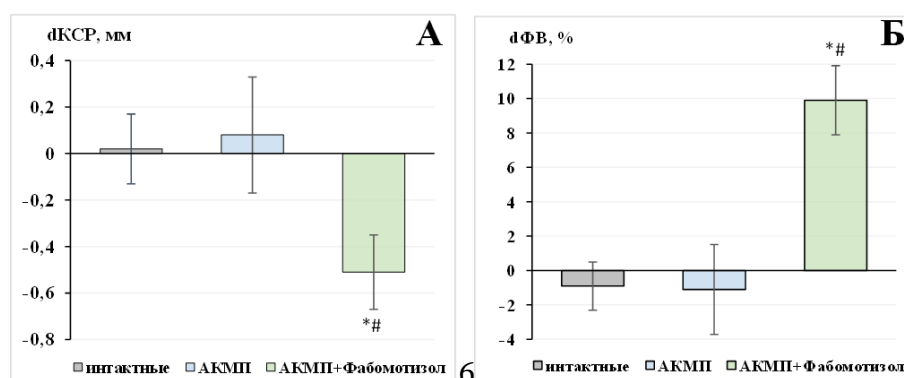


Рисунок 7 – Влияние фабомотизола (15 мг/кг/сут. в/б в течение 28 дней, начиная с первого дня абстиненции) на КСР и ФВ крыс со сформировавшейся АКМП в условиях 28-суточной алкогольной депривации. $M \pm m$; * – $p < 0,05$ по отношению к контрольной АКМП; # – $p < 0,05$ по отношению к уровню в конце 24-й недели алкоголизации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итоги выполнения исследования. Анализ полученных результатов позволяет сделать заключение о том, что метод эхокардиографии на мелких животных валиден и

полностью удовлетворяет требованиям, предъявляемым к проведению доклинических фармакологических исследований, посвященных поиску и изучению механизмов действия кардиотропных лекарственных средств и/или биологически активных соединений, потенциально обладающих данным видом активности. Использование этого методического приема позволяет в динамике, в реальном масштабе времени, проводить:

- острые фармакологические тесты по оценке влияния фармакологических веществ на размеры, объемы и инотропную функцию ЛЖ сердца;

- скрининговые исследования, посвященные поиску потенциальных кардиопротективных лекарственных средств, способных в условиях модельных экспериментов поддерживать/восстанавливать инотропную функцию ЛЖ сердца и/или уменьшать интенсивность/препятствовать развитию патологического ремоделирования сердца;

- исследования, посвященные как изучению особенностей ремоделирования левого желудочка сердца в острую фазу ИМ, так и исследования, посвященные коррекции выявленных нарушений при помощи кардиотропных фармакологически активных веществ;

- исследования, посвященные изучению особенностей формирования ХСН в модельных экспериментах, воспроизводящих как коронарогенную, так и некоронарогенную патологию миокарда, а также исследования возможности использования фармакологически активных соединений для профилактики/коррекции выявленных нарушений.

Традиционно эхокардиография позиционируется как неинвазивный метод исследований, однако, согласно полученным в настоящей работе результатам, этот методический прием может быть с успехом использован и в условиях вивисекции при проведении острых экспериментов на открытом сердце. При проведении подобных экспериментов впервые показана возможность использования селективного ингибитора цинк-зависимых металлопротеиназ 2-го и 9-го типов – антибиотика тетрациклинового ряда доксициклина в качестве кардиопротектора, значимо уменьшающего интенсивность патологического ремоделирование ЛЖ сердца в острейшую фазу ИМ.

Неинвазивное применение метода эхокардиографии позволяет в динамике, в реальном масштабе времени оценить этапы формирования патологических процессов, развивающихся как вследствие коронарогенного, так и некоронарогенного поражения миокарда.

Результаты этих экспериментов, свидетельствующие о формировании эхокардиографических признаков моделируемых патологических процессов, были полностью подтверждены комплексом морфогистологических, электрофизиологических и молекулярных исследований. Поскольку разработанные нами модели патологии воспроизводят основные клинико-диагностические признаки этих заболеваний, есть все основания считать их трансляционными.

Таким образом, неинвазивный метод эхокардиографии, характеризующий размеры, объемы и инотропную функцию ЛЖ сердца, может быть использован в качестве основного подхода к оценке наличия/отсутствия моделируемой патологии, что в существенной мере

оптимизирует и удешевляет хронические модельные эксперименты. Не менее важно и то, что разработанные трансляционные модели постинфарктной ХСН и АКМП позволяют не только изучать тонкие механизмы, лежащие в основе этих патологических процессов, но и создают фундаментальную базу для поиска и доклинического фармакологического изучения новых оригинальных кардиотропных лекарственных средств, обладающих положительным инотропным действием и препятствующих развитию и /или корригирующих патологическое ремоделирование ЛЖ сердца.

Все выше сказанное позволяет заключить, что в настоящем исследовании полностью реализованы стоящие перед ним задачи.

Практические рекомендации

Внедрение в повседневную практику разработанных нами трансляционных моделей постинфарктной ХСН и АКМП у крыс, где метод эхокардиографии играет роль ключевого диагностического инструмента, позволит ускорить и удешевить проведение доклинических фармакологических исследований, направленных на создание оригинальных инновационных кардиотропных лекарственных средств, обладающих положительным инотропным действием и препятствующих развитию и/или корригирующих патологическое ремоделирование левого желудочка сердца.

Результаты исследований, свидетельствующие о наличии у анксиолитика фабомотизола кардиопротективной активности, могут в дальнейшем быть использованы для решения вопроса о возможности расширения показаний к применению препарата в клинике.

Перспективы дальнейшей разработки темы

В плане дальнейшей разработки темы планируется изучить возможность использования эхокардиографии с доплеровским картированием на мелких животных при проведении фармакологических исследований. Использование этого методического приема позволяет оценить не только тотальную сократимость желудочков сердца, но и сократительную способность отдельных частей сердечной мышцы, изучить особенности кровотока с сердце и сосудах и т.д.

ВЫВОДЫ

1. Эхокардиографические исследования на мелких грызунах (крысы, морские свинки) позволяют оценить геометрию и инотропную функцию левого желудочка у животных как с закрытой грудной клеткой, так и на открытом сердце в условиях нормы и патологии миокарда.

2. Метод эхокардиографии позволяет оценить изменения геометрии и инотропной функции левого желудочка крыс в острых фармакологических тестах с изопротеренолом и метопрололом.

3. С использованием метода эхокардиографии показано, что экспериментальная терапия анксиолитиком фабомотизолом (15 мг/кг/сут., в/б, 14 дней) и ингибитором цинк-зависимых металлопротеиназ 2-го и 9-го типов доксициклином (40 мг/кг, per os), начатая в условиях острого инфаркта миокарда, не только препятствует снижению инотропной

функции левого желудочка сердца, но и значимо уменьшает степень его патологического ремоделирования.

4. На разработанной с помощью метода эхокардиографии трансляционной модели ХСН показано, что анксиолитик фабомотизол (15 мг/кг/сут., в/б, 28 дней) способствует развитию обратного ремоделирования левого желудочка и существенному восстановлению инотропной функции сердца.

5. На разработанной с помощью метода эхокардиографии трансляционной модели алкогольной кардиомиопатии доказана способность анксиолитика фабомотизола (15 мг/кг/сут., в/б, 28 дней) и р-FOX ингибитора триметазидина (30 мг/кг/сут., в/б, 28 дней) в условиях депривации алкоголя улучшать функциональную активность левого желудочка сердца.

6. Эхокардиография может использоваться в качестве базового метода при разработке трансляционных моделей патологии сердечно-сосудистой системы на мелких животных и оценки эффектов фармакологических средств.

СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССРТАЦИИ

Статьи в журналах из перечня ВАК при Минобрнауки России

1. Крыжановский С.А., **Ионова** Е.О., Столярук В.Н., Цорин И.Б., Вититнова М.Б. Особенности ремоделирования миокарда в острейшую фазу экспериментального инфаркта миокарда // Физиология человека. – 2012. – Т. 38, № 6. – С. 43-52.
2. Крыжановский С.А., **Ионова** Е.О., Столярук В.Н., Цорин И.Б., Вититнова М.Б. Влияние ингибитора металлопротеиназ на раннее постинфарктное ремоделирование в острейшую фазу инфаркта миокарда // Бюл. эксп. биол. и медицины. – 2013. – Т. 156, №7. – С.26-32.
3. Крыжановский С.А., Колик Л.Г., Цорин И.Б., **Ионова** Е.О., Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Надорова А.В., Середенин С.Б. К возможности использования эхокардиографии для оценки этапов формирования алкогольной кардиомиопатии» // Физиология человека. – 2014. – Т. 40, № 1. – С. 122-128.
4. Крыжановский С.А., Колик Л.Г., Столярук В.Н., Вититнова М.Б., **Ионова** Е.О., Сорокина А.В., Дурнев А.Д., Середенин С.Б. Трансляционная модель алкогольной кардиомиопатии // Молекулярная медицина. – 2015. – № 3. – С.40-47.
5. Крыжановский С.А., Цорин И.Б., Колик Л.Г., Столярук В.Н., Вититнова М.Б., **Ионова** Е.О., Сорокина А.В., Мирошкина И.А., Дурнев А.Д., Середенин С.Б. О возможности использования афобазола для лечения алкогольной кардиомиопатии и профилактики сопутствующих ей осложнений // Молекулярная медицина. – 2015. – № 4. – С.35-42.
6. С.А. Крыжановский, Л.Г. Колик, И.Б. Цорин, **Е.О. Ионова**, В.Н. Столярук, А.В. Сорокина, М.Б. Вититнова, И.А. Мирошкина Доказательство валидности эхокардиографии в модельных экспериментах на мелких животных // Бюл. эксп. биол. и медицины. – 2016. – Том 161, № 3. – С. 416-420.
7. Крыжановский С.А., **Ионова** Е.О., Столярук В.Н., Цорин И.Б., Вититнова М.Б. О механизме ремоделирования миокарда в острейшую фазу экспериментального инфаркта миокарда // Молекулярная медицина. – 2016. – Т.14, №1. – С.31-38.
8. Крыжановский С.А., Антипова Т.А., Цорин И.Б., Круглов С.В., **Ионова** Е.О., Столярук В.Н., Вититнова М.Б. Влияние афобазола на уровень индуцибельной NO-синтазы в ишемизированном миокарде // Молекулярная медицина. – 2016. – Т. 14, № 3. – С.26-31.
9. Крыжановский С.А., Колик Л.Г., Цорин И.Б., Столярук В.Н., Вититнова М.Б., **Ионова** Е.О., Сорокина А.В., Дурнев А.Д. Алкогольная кардиомиопатия: Трансляционная модель //

Бюл. эксп. биол. и медицины. – 2017. – Т. 163, № 5. – С. 582-586.

10. Крыжановский С.А., Цорин И.Б., Столярук В.Н., Ионова Е.О., Вититнова М.Б. Отдаленные результаты экспериментальной терапии афобазолом у крыс, перенесших острый инфаркт миокарда // Бюл. эксп. биол. и медицины. – 2017. – Т. 163, № 2. – С.140-155.

11. Крыжановский С.А., Кожевникова Л.М., Цорин И.Б., Суханова И.Ф., **Ионова Е.О.**, Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Мирошкина И.А., Середенин С.Б. К механизму кардиопротективного действия агониста σ_1 -рецепторов анксиолитика фабомотизола гидрохлорида (афобазола) // Бюл. эксп. биол. и медицины. – 2018. – Т. 165, № 5. – С. 605–609.

12. Мирошкина И.А., **Ионова Е.О.**, Надорова А.В., Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Сорокина А.В., Колик Л.Г., Дурнев А.Д., Цорин И.Б., Крыжановский С.А. Кардиопротективное действие триметазида у крыс со сформировавшейся алкогольной кардиомиопатией в период абстиненции // Молекулярная медицина. – 2018. – Т. 16, № 1. – С. 44-50.

13. Мирошкина И.А., **Ионова Е.О.**, Сорокина А.В., Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Цорин И.Б., Колик Л.Г., Крыжановский С.А., Дурнев А.Д. Сравнительное изучение кардиопротективного действия триметазида и фабомотизола гидрохлорида у крыс со сформировавшейся алкогольной кардиомиопатией в условиях абстиненции // Молекулярная медицина. – 2018. – Т. 16, № 3. – С. 58–64.

14. Крыжановский С.А., Цорин И.Б., **Ионова Е.О.**, Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Барчуков В.Г., Мирошкина И.А., Сорокина А.В., Кожевникова Л.М., Дурнев А.Д. Трансляционная модель хронической сердечной недостаточности у крыс // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2018. – Т.62, №2. – С. 129–135.

15. Кожевникова Л.М., Цорин И.Б., **Ионова Е.О.** и др. Гендерные особенности изменений состояния сердечно-сосудистой системы при алкогольной кардиомиопатии (экспериментальное исследование) // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2019. – Т.63, №4. – С.26-31.

16. Крыжановский С.А., **Ионова Е.О.**, Столярук В.Н., Цорин И.Б., Вититнова М.Б., Григоркевич О.С., Мокров Г.В., Гудашева Т.А. Изучение кардиопротективных эффектов ингибитора металлопротеиназ 1-({4-[(4-хлорбензоил)амино]фенил}сульфонил-L-пролина на модели острого инфаркта миокарда // Бюллетень эксп. биологии и медицины. – 2019. – Т. 168, № 11. – С. 582-587.

17. Крыжановский С.А., Цорин И.Б., Столярук В.Н., Вититнова М.Б., **Ионова Е.О.**, Барчуков В.В., Мирошкина И.А., Сорокина А.В., Кожевникова Л.М., Дурнев А.Д. Хроническая сердечная недостаточность: Трансляционная модель // Бюл. эксп. биол. и медицины. – 2019. – Т. 167, № 5. – С. 655-660.

18. Крыжановский С.А., Цорин И.Б., Столярук В.Н., Вититнова М.Б., **Ионова Е.О.**, Барчуков В.В., Кожевникова Л.М., Середенин С.Б. Изучение кардиопротективных эффектов фабомотизола гидрохлорида на трансляционной модели хронической сердечной недостаточности // Бюл. эксп. биол. и медицины. – 2019. – Т. 168, № 7. – С. 39-44.

19. Крыжановский С.А., Мирошкина И.А., **Ионова Е.О.** Роль сигма-1 рецепторов в регуляции деятельности сердца. Часть 2. роль сигма-1 рецепторов в кардиопротекции // Физиология человека. – 2021. – Т. 47, № 4. – С. 124-134.

20. Ионова Е.О., Мирошкина И.А., Сорокина А.В., Крыжановский С.А. Сравнительная оценка эхокардиографических и морфометрических характеристик левого желудочка сердца крыс // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2023. – 41-43. – № 1. – С. 41-43.

Статьи в журнале, индексируемом РИНЦ, не входящем в перечень ВАК

1. **Ионова Е.О.**, Цорин И.Б., Барчуков В.В., Столярук В.Н., Крыжановский С.А. К возможности применения эхокардиографии у мелких лабораторных животных для проведения острых фармакологических тестов // Фармакокинетика и фармакодинамика // 2018. – №2. – С. 59-64.

2. **Ионова Е.О.**, Барчукова Е.И., Вититнова М.Б., Цорин И.Б., Крыжановский С.А.

Сравнительная оценка эхокардиографических характеристик левого желудочка сердца у самок и самцов крыс // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2021. – № 1. – С. 14-17.

3. Цорин И.Б., Мирошкина И.А., **Ионова Е.О.**, Надорова А.В., Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Сорокина А.В., Колик Л.Г., Дурнев А.Д., Крыжановский С.А. Сравнительное изучение кардиопротекторного действия триметазида и фабомотизола гидрохлорида у крыс со сформировавшейся алкогольной кардиомиопатией в условиях продолжающегося потребления этанола // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2016. – № 3. – С. 38-41.

Патенты

1. Крыжановский С.А., Цорин И.Б., **Ионова Е.О.**, Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Барчуков В.В., Мирошкина И.А., Сорокина А.В., Кожевникова Л.М., Дурнев А.Д., Середенин С.Б. Трансляционная модель хронической сердечной недостаточности: способ и критерии оценки формирования. Патент РФ 2 744 681. 2021.

2. Середенин С.Б., Крыжановский С.А., Колик Л.Г., Цорин И.Б., Столярук В.Н., Вититнова М.Б., **Ионова Е.О.**, Сорокина А.В., Дурнев А.Д., Алексеев К.В. Агонист сигма-1 рецепторов 5-этоксид-2-[2-(морфолино)этилтио]-бензимидазола дигидрохлорид и/или основание – новое средство для профилактики внезапной сердечной смертности у пациентов, страдающих алкогольной кардиомиопатией. Патент РФ 2 691 636. 2019.

3. Середенин С.Б., Мокров Г.В., Крыжановский С.А., Лихошерстов А.М., Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Цорин И.Б., Гудашева Т.А., Григоркевич О.С., **Ионова Е.О.**, Дурнев А.Д., Жердев В.П. Ингибиторы цинк-зависимых металлопротеиназ (ММП-2 и ММП-9) в ряду бензоиламино(фенилсульфонил)-замещенных циклических аминокислот как потенциальные лекарственные средства, препятствующие постинфарктному ремоделированию левого желудочка сердца. Патент РФ 2 646 752. 2018.

4. Середенин С.Б., Крыжановский С.А., Колик Л.Г., Цорин И.Б., Столярук В.Н., Вититнова М.Б., **Ионова Е.О.**, Сорокина А.В., Дурнев А.Д., Алексеев К.В. Способ моделирования алкогольной кардиомиопатии. Патент РФ 2 646 454. 2018.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

p-Fox	–	парциальный ингибитор окисления свободных жирных кислот
АКМП	–	алкогольная кардиомиопатия
ИВЛ	–	искусственная вентиляция легких
ИМ	–	инфаркт миокарда
КДО	–	конечно-диастолический объем
КДР	–	конечно-диастолический размер
КСО	–	конечно-систолический объем
КСР	–	конечно-систолический размер
ЛЖ	–	левый желудочек сердца
ЛО	–	ложнооперированные
ММП-2	–	матриксная металлопротеиназа 2 типа
ММП-9	–	матриксная металлопротеиназа 9 типа
ОИМ	–	острый инфаркт миокарда
УО	–	ударный объем
ФВ	–	фракция выброса
ФУ	–	фракция укорочения
ХСН	–	хроническая сердечная недостаточность
ЭИМ	–	экспериментальный инфаркт миокарда