

УДК 57.084: 616.74-092.9: 615.272.4

**МОРФО-МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ КРЫС ПОСЛЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ СИМВАСТАТИНА****Белосова Е.С., Микашинович З.И., Саркисян О.Г., Мажугин В.Ю.***ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет Минздрава России»,  
Ростов-на-Дону, e-mail: belousovalena@mail.ru*

В митохондриях животных после длительного введения симвастина выявлено снижение активности сукцинатдегидрогеназы и цитохромоксидазы, что указывает на нарушение функции дыхательной цепи. В то же время, уменьшение общей АТФ-азной активности и АТФ-азы  $\text{Ca}^{2+}$  в гомогенате мышечной ткани отражает снижение эффективности активного транспорта катионов. Выявленные биохимические изменения были подтверждены результатами морфологического исследования. В образцах ткани животных экспериментальной группы было выявлено нарушение характера расположения мышечных клеток, наличие участков гипотрофированных миоцитов, снижение количества миофибрилл и миоглобина в клетке, что свидетельствует о наличии метаболической миопатии. Полученные данные указывают, что в основе деградации мышечной ткани при введении высоких доз статинов лежит нарушение взаимоотношений в системе энергосинтетических и энергозависимых процессов в миоцитах.

**Ключевые слова:** статины, симвастин, скелетные мышцы, статиновая миопатия**MORPHO-MOLECULAR CHANGES IN THE MUSCULAR TISSUE OF RATS AFTER THE LONG-TERM INTRODUCTION OF SIMVASTATIN****Belousova E.S., Mikashinovich Z.I., Sarkisyan O.G., Mazhugin V.Y.***Rostov State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don,  
e-mail: belousovalena@mail.ru*

In mitochondria of animals after prolonged administration of simvastatin, a decrease in the activity of succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase was detected, which indicates a disruption in the function of the respiratory chain. At the same time, the decrease in total ATPase activity and ATPase  $\text{Ca}^{2+}$  in the homogenate of muscle tissue reflects a decrease in the efficiency of active cation transport. The revealed biochemical changes were confirmed by the results of the morphological study. In the samples of animal tissue of the experimental group, there was a violation of the character of the location of muscle cells, the presence of areas of hypotrophic myocytes, a decrease in the number of myofibrils and myoglobin in the cell, which indicates the presence of metabolic myopathy. The data obtained indicate that the basis for the degradation of muscle tissue with the introduction of high doses of statins is the disruption of the relationships in the system of energy-related and energy-dependent processes in myocytes.

**Keywords:** statins, simvastatin, skeletal muscles, statin myopathy

Статины – ингибиторы ГМГ-Ко А-редуктазы признаны наиболее эффективной группой гиплипидемических средств. Однако их применение ассоциируется с развитием специфического побочного эффекта статиновой миопатии. Мышечные боли возникают внезапно, даже при длительном применении одного и того же препарата. Имеющиеся в литературе разрозненные сведения о механизмах статиновой миопатии не позволяют выстроить патогенетическую последовательность метаболических событий. Известно, что ГМГ-Ко А-редуктаза участвует в биосинтезе убихинона и нарушения на этом участке дыхательной цепи рассматриваются как один из основных механизмов деструктивных процессов [1, 2].

Целью работы явился анализ морфо-молекулярных изменений в мышцах экспериментальных животных при длительном введении симвастина (зокора).

**Материалы и методы исследования**

Исследование проводилось на беспородных крысах-самцах в возрасте 12–14 месяцев (300–350 г).

Содержание животных соответствовало санитарным правилам СП 2.2.1.3218–14 “Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)” от 29.08.2014. Животных в течение 3 месяцев содержали на рационе, обогащённом животными жирами (топлёное сливочное масло) и легко усваиваемыми углеводами (тростниковый сахар, манная крупа). В процессе эксперимента животные были разделены на две группы: группа сравнения – 35 животных, получавших рацион без добавления лекарственных веществ; экспериментальная группа – 35 животных, получавших в течение 2 месяцев симвастин (Zocor, 20 мг) по 0,001 г/100 г массы один раз в сутки в виде водной суспензии через пищеводный зонд. В качестве контрольной группы использовали интактных животных, которых содержали на общем рационе вивария (35 животных). Животных выводили из эксперимента декапитацией.

Для исследования отбирали фрагменты скелетных мышц из задней лапы животного. Активность аденозинтрифосфатного ферментного комплекса ( $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Ca}^{2+}$  – зависимой  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  – АТФ-азы) в гомогенатах определяли по методу, основанному на расщеплении под влиянием фермента органических фосфорсодержащих соединений с образованием неорганического фосфата, который регистрировали

по реакции с молибдатом аммония в присутствии аскорбиновой кислоты [3].

Митохондрии выделяли дифференциальным центрифугированием после гомогенизации в солевом растворе (0,15 М КСl и 10 мМ трис-НСl). Для удаления ядерной фракции гомогенаты центрифугировали 15 мин при 640 g. Фракцию митохондрий выделяли в течение 25 мин при 20 000 g с двукратным промыванием средой выделения. Активность субстратных дегидрогеназ цикла Кребса: пируватдегидрогеназы (ПДГ),  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназы ( $\alpha$ -КГ-Дг), сукцинатдегидрогеназы (СДГ) определяли спектрофотометрическим методом в модельной системе по реакции восстановления нитросинего тетразолия в присутствии специфического субстрата (пирувата Na,  $\alpha$ -кетоглутарата, сукцината) [4]. Активность цитохромоксидазы (ЦХО) определяли по реакции с парадинитродифениламином [5].

Для проведения морфологического исследования фрагменты мышечной ткани фиксировали в 10% нейтральном формалине в течение суток. Далее фрагменты мышечной ткани подвергали гистологической обработке по стандартному протоколу для операционного материала. Проведённые фрагменты заливали в стандартные заливочные кассеты для дальнейшей микротомии. Срезы расправляли в водяной бане и окрашивали по стандартной методике гематоксилином и эозином. После окраски срезы помещали под покровные стекла и осуществляли микроскопию с использованием микроскопа Nikon eclipse 50i с графической станцией Nikon digital sight DS-U3, окуляров CFI 10x/22, объективов Nikon Plan 10x/0,25, 20x/0,4, 40x/0,65.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием программных пакетов STATISTICA 6.0 и Microsoft Office Excel. Статистически достоверными считали отличия, соответствующие оценке ошибки вероятности  $p \leq 0,05$ .

### Результаты исследования и их обсуждение

В ранних исследованиях нами установлено, что содержание животных на рационе,

обогащённом легкоусваиваемыми углеводами и животными жирами (группа сравнения), приводило к нарушению интеграции основных метаболических путей энергетического обмена, которое характеризовалось накоплением недоокисленных продуктов – пирувата и лактата, повышением активности ПДГ на 119% ( $p < 0,001$ ),  $\alpha$ -КГ-ДГ на 94,12% ( $p < 0,001$ ), тогда как активность ЦХО и СДГ не отличалась от показателей контрольной группы (табл. 1) [6, 7].

После введения симвастатина в течение 2 месяцев в мышцах животных наблюдали снижение активности ПДГ на 27,9% ( $p_1 < 0,05$ ) и  $\alpha$ -КГ-ДГ на 54,6% ( $p_1 < 0,001$ ) относительно группы сравнения. Относительно контрольной группы активность ПДГ оставалась увеличенной на 57,71 ( $p_1 < 0,001$ ),  $\alpha$ -КГ-ДГ достоверно не отличалась. В то же время, в мышцах животных экспериментальной группы выявлено резкое снижение активности СДГ на 67,62% ( $p_1 < 0,001$ ), ЦХО на 69,44% ( $p_1 < 0,001$ ). При сравнении результатов с показателями контрольной группы активность СДГ и ЦХО была снижена на 63% ( $p < 0,001$ ) и 71,8% ( $p < 0,001$ ) соответственно (табл. 1).

В литературе имеются единичные и фрагментарные сведения об изменениях энергетического обмена и вкладе морфофункциональных изменений в митохондриях мышц при длительном приёме статинов. Анализируя полученные данные, можно полагать, что длительное введение симвастатина способствует усугублению нарушения энергетического обмена в мышцах, обусловленных гиперхолестеринемией, что может быть связано с дефицитом убихинона.

Таблица 1

Концентрация метаболитов гликолиза и активность ферментов энергетического обмена в мышечной ткани животных исследуемых групп ( $M \pm m$ )

Показатель	Контрольная группа n=35	Группа сравнения n=35	Экспериментальная группа n=35
СДГ [мкмоль/мл белка]	2,14 ± 0,235	2,44 ± 0,261 $p > 0,05$	0,79 ± 0,066 $p_1 < 0,001$ $p < 0,001$
ЦХО [мкмоль/мл белка]	0,0039 ± 0,00056	0,0036 ± 0,00028 $p > 0,05$	0,0011 ± 0,00011 $p_1 < 0,001$ $p < 0,001$
$\alpha$ -КГ-Дг [мкмоль/мл белка]	0,884 ± 0,094	1,716 ± 0,085 $p < 0,001$	0,779 ± 0,089 $p_1 < 0,001$ $p > 0,05$
ПДГ [мкмоль/мл белка]	0,811 ± 0,096	1,774 ± 0,223 $p < 0,01$	1,279 ± 0,137 $p_1 < 0,05$ $p < 0,001$

Примечание.  $p$  – достоверно относительно контрольной группы;  $p_1$  – достоверно относительно группы сравнения.

При этом в мышцах животных с экспериментальной гиперхолестеринемией выявлено повышение общей АТФ-азной активности на 28 % ( $p < 0,05$ ), АТФ-азы  $\text{Ca}^{2+}$  на 98 % ( $p < 0,001$ ) и АТФ-азы  $\text{Mg}^{2+}$  на 113,5 % ( $p < 0,001$ ) относительно контрольной группы. Динамику АТФ-азной активности в условиях гиперхолестеринемии можно рассматривать как адаптивно-компенсаторный механизм, направленный на сохранение внутриклеточного ионного гомеостаза (табл. 2).

нарушение возбудимости миоцитов, искажение регуляторной роли ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  и постепенная структурно-функциональная деградация мышечного волокна [10].

В связи с этим возникает вопрос: насколько выявленные биохимические сдвиги коррелируют с состоянием структурных компонентов. При исследовании образцов ткани животных экспериментальной группы было выявлено нарушение характера расположения мышечных клеток. Так, обнаруживались участки с однонаправлен-

Таблица 2

АТФ-азная активность в мышцах животных исследуемых групп ( $M \pm m$ )

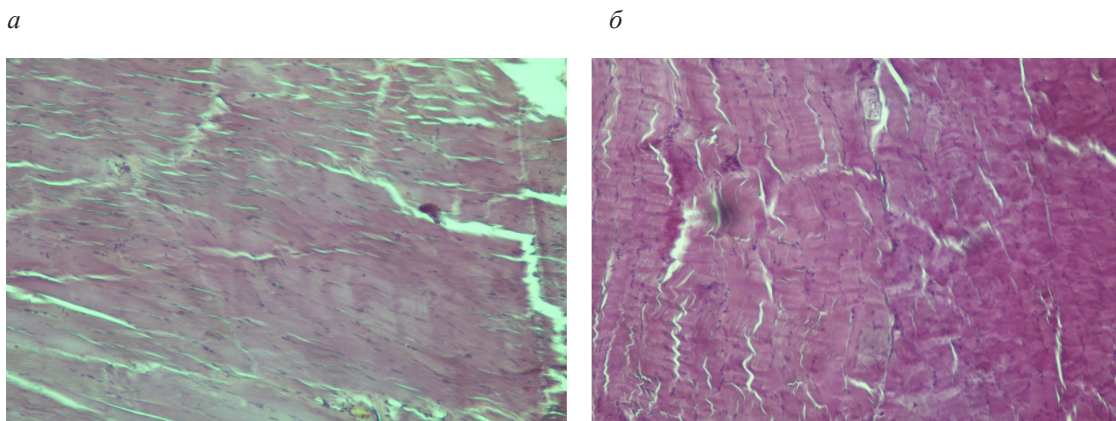
Показатель	Контрольная группа n=35	Группа сравнения n=35	Экспериментальная группа n=35
АТФ-аза общ. [мкмоль/мл белка]	0,0176 ± 0,0018	0,0225 ± 0,0020 $p < 0,05$	0,0072 ± 0,0006 $p_1 < 0,001$ $p < 0,001$
АТФ-аза $\text{Ca}^{2+}$ [мкмоль/мл белка]	0,0436 ± 0,0023	0,0865 ± 0,0041 $p < 0,001$	0,0307 ± 0,0018 $p_1 < 0,001$ $p < 0,001$
АТФ-аза $\text{Mg}^{2+}$ [мкмоль/мл белка]	0,0577 ± 0,002	0,1232 ± 0,005 $p < 0,001$	0,0676 ± 0,002 $p_1 < 0,001$ $p < 0,001$

Примечание.  $p$  – достоверно относительно контрольной группы;  $p_1$  – достоверно относительно группы сравнения.

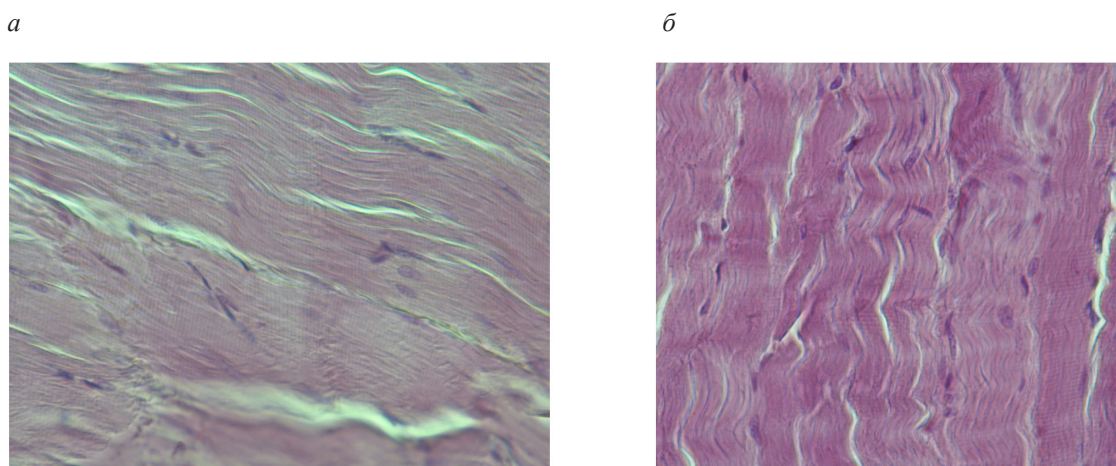
Введение симвастатина способствовало снижению в мышечной ткани общей АТФ-азной активности на 68,00 % ( $p_1 < 0,001$ ), АТФ-азы  $\text{Ca}^{2+}$  на 64,51 % ( $p_1 < 0,001$ ) и АТФ-азы  $\text{Mg}^{2+}$  на 45,13 % ( $p_1 < 0,001$ ) относительно группы сравнения (табл. 2). Следует отметить, что при сравнении с показателями контрольной группы общая АТФ-азная активность была снижена на 59,1 % ( $p < 0,001$ ), активность АТФ-азы  $\text{Ca}^{2+}$  на 29,59 % ( $p < 0,001$ ), активность АТФ-азы  $\text{Mg}^{2+}$  была увеличена на 17,16 % ( $p < 0,001$ ). Принимая во внимание данные об изменении ферментов энергетического обмена, можно полагать, что снижение АТФ-азной активности обусловлено дефицитом макроэргических фосфатов. Нарушение активного транспорта ионов способствует формированию ионного дисбаланса, следствием чего является

ным расположением миоцитов, которые чередовались с участками с разнонаправленным расположением клеток. При более сильном увеличении (в 880 раз) отмечалось наличие участков резко гипотрофированных миоцитов с узкими веретеновидными ядрами, часть ядер имели внутриядерные включения и выраженное снижение оптической плотности ядра, сменяющихся участками с относительно неизменными миоцитами (рис. 1а). В миоцитах отмечалось наличие участков с относительно сохранными саркомерами, которые чередовались с резко просветлёнными за счёт снижения миофибрилл и миоглобина в клетке, визуально отмечалось отсутствие поперечной исчерченности (рис. 2а). Полученные данные свидетельствуют о наличии метаболической миопатии.





*Рис. 1. а – фрагмент мышцы животного экспериментальной группы: при увеличении в 880 раз видны участки с гипотрофированными миоцитами; б – фрагмент мышцы здорового животного*



*Рис. 2. а – фрагмент мышцы животного экспериментальной группы: отмечается чередование неизменённых участков с участками с резко просветлёнными саркомерами, отсутствие поперечной исчерченности; б – фрагмент мышцы здорового животного*

В то же время, интересно отметить, что изменения биохимических параметров опережают структурные сдвиги, которые постепенно накапливаются в мышечной ткани.

#### **Заключение**

Полученные нами данные позволяют уточнить ход аварийных перестроек при длительном введении высокой дозы симвастатина. Как следует из полученного фактического материала, в основе деградации мышечной ткани лежит дезинтеграция как энергопродуцирующих, так и энергозависимых механизмов. Из чего следует, что дефицит энергии в мышечной ткани формирует «порочный круг» [10], в котором нарушение гомеостаза важнейших катионов приводит к изменению разности потенциалов по обе стороны мембраны, накоплению

ионов  $Ca^{2+}$ , активации фосфолипаз и нарушению целостности мембран, что способствует усугублению ионного дисбаланса. Учитывая полученные результаты, можно полагать, что одним из направлений оптимизации терапии может стать разработка способов метаболической коррекции молекулярных нарушений в мышцах при агрессивной терапии статинами. Введение в схемы терапии субстратных антигипоксантов с метаболическим типом действия, например цитофлавина, за счёт высоких энерготропных свойств сукцината позволит восполнять выявленное угнетение участка дыхательной цепи на уровне СДГ-ЦХО.

#### **Список литературы**

1. Долженко М.Н., Базилевич А.Я., Симагина Т.В. и др. Безопасность статинов: за и против. / М.Н. Долженко,

- А.Я. Базилевич, Т.В. Симагина, Л.И. Конопляник // Мистецтво лікування. – 2010. – №2(68). – С. 26–34.
2. Kumar A., Vashist A., Kumar P., Kalonia H., Mishra J. Protective effect of HMG CoA reductase inhibitors against running wheel activity induced fatigue, anxiety like behavior, oxidative stress and mitochondrial dysfunction in mice. *Pharmacol. Rep.*, 2012, vol. 64, no. 6, pp. 1326–1336.
3. Методы биохимических исследований (липидный и углеводный обмен). / ред. М.И. Прохорова. – Л.: Изд-во Ленинградского университета, 1982. – с. 271.
4. Nordmann I.N. Determination the activiti dehydrogenasiue des mitochondries a 1–acid-dichloride-2,3,5–triphenyl-tetrazolium. *Bull. Sos. Chim. Biol.*, 1957, vol. 33, pp. 189–197.
5. Кривченкова Р.С. Современные методы в биохимии/ Р.С. Кривченкова. – М.: Медицина, 1977. – 78 с.
6. Микашинович З.И., Белоусова Е.С. Биохимические изменения в эритроцитах как молекулярный индикатор клеточного повреждения при длительном введении сим-вастатина/ З.И. Микашинович, Е.С. Белоусова // Клеточ-ные технологии в биологии и медицине. – 2016. – №2. – С. 122–126.
7. Микашинович З.И., Белоусова Е.С., Саркисян О.Г. Нарушение энергозависимых процессов в мышечной ткани как один из патогенетических механизмов стагиновой мио-патии / З.И. Микашинович, Е.С. Белоусова, О.Г. Саркисян // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2016. – Т. 162. – № 10. – С. 426–429.
8. Muraki A., Miyashita K., Mitsuiishi M. et al. Coenzyme Q10 reverses mitochondrial dysfunction in atorvastatin-treated mice and increases exercise endurance. / A. Muraki, K. Miyashita, M. Mitsuiishi, M. Tamaki, K. Tanaka, H. Itoh // *J. Appl. Physiol.*, 2012, vol. 113, n o.3, pp. 479–486.
9. Sirvent P., Fabre O., Bordenave S., et el. Muscle mitochondrial metabolism and calcium signaling impairment in patients treated with statins / P. Sirvent, O. Fabre, S. Bordenave, D. Hillaire-Buys, D. Raynaud, E. Mauverger, A. Lacampagne, J. Mercier // *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2012, vol. 259, no. 2, pp. 263–268.
10. Дизрегуляционная патология / ред. Г.Н. Крыжанов-ский. – М.: Медицина, 2002. – С. 632.