

Биохимические изменения в мышечной ткани крыс при длительном применении симвастатина

Елена Викторовна Виноградова*

Ростовский государственный медицинский университет, г. Ростов-на-Дону, Россия

Реферат

DOI: 10.17816/KMJ2018-240

Цель. Анализ биохимических изменений в мышечной ткани крыс после длительного приёма симвастатина.

Методы. Исследование проведено на беспородных крысах-самцах. Было выделено три группы: контрольная группа (интактные животные); группа сравнения (животные с индуцированной гиперхолестеринемией без применения лекарственных средств); экспериментальная группа (животные с индуцированной гиперхолестеринемией, получавшие в течение 2 мес симвастатин по 0,0012 г/100 г массы тела 1 раз в сутки в виде водной суспензии через пищеводный зонд). В мышцах животных определяли концентрацию метаболитов гликолиза (пировиноградной кислоты и лактата), активность ферментов антиоксидантной защиты (восстановленного глутатиона, супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы), а также содержание изоформ тайтина, протеолитических фрагментов тайтина и небулина.

Результаты. После введения животным с индуцированной гиперхолестеринемией симвастатина было выявлено снижение концентрации метаболитов гликолиза (пировиноградной кислоты и лактата) относительно группы сравнения, а также разнонаправленные изменения активности ферментов антиоксидантной защиты (снижение активности супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы, концентрации восстановленного глутатиона, а активность каталазы осталась без изменений). При анализе структурных изменений в мышечной ткани животных после введения симвастатина было выявлено снижение содержания NT- и N2A-изоформ тайтина и практически полное отсутствие небулина по сравнению с животными группы сравнения. При этом регистрировали увеличение содержания протеолитических фрагментов тайтина (T2) в 1,3 раза.

Вывод. Данное исследование показало, что в основе миотоксичности статинов при их длительном применении лежит дезинтеграция ферментативных антиоксидантных процессов, а также тканевая гипоксия, приводящая к деструкции мышечного волокна и превалированию процессов протеолиза.

Ключевые слова: атеросклероз, статины, статиновая миопатия, симвастатин, скелетные мышцы.

Biochemical changes in rat muscle tissue with prolonged use of simvastatin

E.V. Vinogradova

Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia

Aim. Analysis of biochemical changes in rat muscle tissue after prolonged use of simvastatin.

Methods. The study was conducted on mongrel male rats. Three groups were identified: control group (intact animals), comparison group (animals with induced hypercholesterolemia not receiving the drugs), and experimental group (animals with induced hypercholesterolemia receiving simvastatin 0.0012 g/100 g of weight once a day for 2 months as an aqueous suspension through the esophageal probe). Metabolite concentration of glycolysis (pyruvic acid and lactate), activity of antioxidant protection enzymes (reduced glutathione, superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, glutathione peroxidase), titin isoforms and proteolytic fragments of titin and nebulin concentration were determined in the muscles of animals.

Results. After administration of simvastatin to animals with induced hypercholesterolemia, a decrease in the concentration of glycolysis metabolites (pyruvic acid and lactate) compared to comparison group was revealed, as well as multidirectional changes in the activity of antioxidant protection enzymes (decrease in activity of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase, decreased concentration of reduced glutathione, but catalase activity remained unchanged). The analysis of structural changes in animal muscle tissue after administration of simvastatin revealed a decrease in the concentration of NT- and N2A-titin isoforms and practically complete absence of nebulin compared to the animals from the comparison group. At the same time an increase in the concentration of proteolytic fragments of titin (T2) by 1.3 times was recorded.

Conclusion. The study showed that the basis of myotoxicity of statins in their long-term use is disintegration of enzyme antioxidant processes, as well as tissue hypoxia, leading to destruction of muscle fibers and prevalence of proteolytic processes.

Keywords: atherosclerosis, statins, statin myopathy, simvastatin, skeletal muscles.

Атеросклероз — опасное и коварное заболевание, так как патологические изменения происходят внутри сосудов, и на ранних стадиях клинические проявления

могут отсутствовать. Кроме того, атеросклероз — фактор риска развития сложных сердечно-сосудистых заболеваний и нередко представляет угрозу жизни больного.

На сегодняшний день препаратами выбора при лечении нарушений липидного обмена служат статины. Практически все исследователи отмечают высокую гиполипидемическую активность статинов и хорошую их переносимость при длительном лечении. Однако неоднократно были зарегистрированы случаи, когда у больных, получающих статины, резко возникают мышечные боли, иногда даже при повторном приёме одного и того же лекарственного препарата. В данном случае речь идёт о специфическом побочном эффекте данной группы препаратов — статиновой миопатии [1]. Несмотря на различные версии, чёткое понимание её патогенеза до сих пор отсутствует.

В связи с этим целью работы был анализ биохимических изменений в мышечной ткани после длительного приёма симвастатина.

Исследование проведено на беспородных крысах-самцах в возрасте 12–14 мес. Содержание животных соответствовало требованиям Приказа Минздрава РФ №708 от 23.08.2010 «Об утверждении правил лабораторной практики» и санитарным правилам СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» от 29.08.2014.

В процессе эксперимента животные были разделены на три группы.

Контрольную группу составили 35 животных, которые содержались на общем рационе вивария и в течение 3 мес получали через пищеводный зонд 0,5 мл дистиллированной воды 1 раз в сутки.

У животных экспериментальной группы индуцировали эссенциальную гиперхолестеринемия путём содержания в течение 3 мес на рационе, обогащённом животными жирами (топлённым сливочным маслом) и легко усваиваемыми углеводами (тростниковым сахаром, манной крупой). По истечении 3 мес у животных определяли уровень общего холестерина на анализаторе «Вауег» (Германия). После подтверждения гиперхолестеринемии животные были разделены на две группы:

– группа 1 (сравнения) — 35 животных, в течение 2 мес получавших рацион без добавления лекарственных веществ и 0,5 мл дистиллированной воды 1 раз в сутки через пищеводный зонд;

– группа 2 (экспериментальная) — 35 животных, получавших в течение 2 мес

симвастатин (Zoscor, 20 мг) по 0,0012 г/100 г массы тела 1 раз в сутки в виде водной суспензии через пищеводный зонд.

По окончании срока эксперимента животных забивали путём декапитации. Все манипуляции выполняли в соответствии с общепринятыми этическими нормами (протокол ЛНЭК ГБОУ ВПО «Ростовского государственного медицинского университета» МЗ РФ №21/15 от 10.12.2015).

Для исследования отбирали фрагменты скелетных мышц с задней лапы животного. Гомогенат мышечной ткани готовили в соотношении 1 г ткани на 9 мл охлаждённого изотонического раствора натрия хлорида, центрифугировали при 3000 об./мин.

В надосадочной жидкости определяли концентрацию восстановленного глутатиона [2], активность супероксиддисмутазы [2], каталазы [2], глутатионредуктазы [3] и глутатионпероксидазы [3].

Концентрацию пировиноградной кислоты определяли по реакции с 2,4-динитрофенилгидрозином [4]. Концентрацию лактата определяли по реакции уксусного альдегида, образующегося из молочной кислоты в присутствии серной, фосфорной кислот и ионов меди, с параоксидифенилом [4].

Выделение изоформ тайтина и небулина проводили по методике, разработанной в Институте теоретической и экспериментальной биофизики (г. Пушкино) [5, 6]. Содержание изоформ тайтина (NT- и N2A-) и небулина определяли в пересчёте на содержание тяжёлых цепей миозина.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием программы Statistica 6.0. Статистически значимыми считали различия, соответствующие оценке ошибки вероятности $p < 0,05$.

Введение симвастатина животным группы 2 (экспериментальной группы) способствовало снижению уровня холестерина в сыворотке крови до $1,637 \pm 0,136$ ммоль/л, что достоверно отличалось от показателей группы животных, не получавших симвастатин, доказывая гиполипидемическое действие статинов (табл. 1).

Косвенным показателем эффективности утилизации молекулярного кислорода при внутриклеточном метаболизме служит уровень пирувата и лактата. Нами было показано, что содержание животных на высокожировом рационе способствует формированию гипоксии, о чём свидетельствует накопление пирувата и лактата в мышечной ткани и эритроцитах [2].

Таблица 1. Уровень холестерина в сыворотке крови животных исследуемых групп (M±m)

Показатель	Контрольная группа, n=35	Группа 1 (сравнения), n=35	Группа 2 (экспериментальная), n=35
Холестерин, ммоль/л	1,588±0,154	2,785±0,342 p <0,001	1,637±0,136 p ₁ <0,001 p >0,05

Примечание: p — статистическая значимость различий относительно контрольной группы; p₁ — относительно группы сравнения.

Таблица 2. Концентрация метаболитов гликолиза (M±m)

Показатели	Контрольная группа, n=35	Группа 1 (сравнения), n=35	Группа 2 (экспериментальная), n=35
Пировиноградная кислота, мкмоль/мл белка	2,25±0,024	7,81±0,570 p <0,001	3,28±0,269 p ₁ <0,001 p <0,001
Лактат, мкмоль/мл белка	3,96±0,447	6,86±0,657 p <0,001	4,64±0,491 p ₁ <0,01 p >0,05

Примечание: p — статистическая значимость различий относительно контрольной группы; p₁ — относительно группы сравнения.

После введения симвастатина в мышцах животных группы 2 (экспериментальной) выявлено снижение концентрации пировиноградной кислоты на 58% (p₁ <0,001) и лактата на 32,36% (p₁ <0,001) относительно группы 1 (сравнения; табл. 2).

Полученные данные, с одной стороны, свидетельствуют о снижении тяжести гипоксического повреждения клетки. С другой стороны, можно полагать, что подавление биосинтеза эндогенного холестерина вследствие ингибирования активности 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент А редуктазы (ГМГ-КоА редуктазы), несмотря на сохраняющийся характер питания, способствовало нивелированию гиперметаболизма глюкозы.

В ранее проведённых нами экспериментах в мышцах животных с экспериментальной гиперхолестеринемией были выявлены разнонаправленные изменения активности ферментов антиоксидантной защиты. У данной группы животных было отмечено значительное увеличение активности глутатионредуктазы, каталазы и содержания восстановленного глутатиона (более чем в 2 раза) по сравнению с животными, находящимися на общем рационе. В то же время активность супероксиддисмутазы достоверно не отличалась от показателей контрольной группы, а глутатионпероксидазы — была снижена на 50% [1] (табл. 3).

Выявленные нами изменения согласуются с данными литературы, согласно которым длительное содержание животных на высокожировом рационе способствует снижению буферной ёмкости антиоксидантной защиты, нарушению её мобилизации в ответ на повышение активности прооксидантной системы [7].

Введение симвастатина экспериментальным животным (группа 2) способствовало снижению активности супероксиддисмутазы на 56,2% (p₁ <0,001), активность каталазы осталась без изменений относительно показателей животных группы сравнения (группы 1; см. табл. 3).

В исследуемой группе выявлены значительные изменения активности глутатионзависимых ферментов: дальнейшее снижение активности глутатионпероксидазы на 63,13% (p₁ <0,001), глутатионредуктазы — на 37,5% (p₁ <0,001), концентрации восстановленного глутатиона — на 49,83% (p₁ <0,001) относительно показателей группы 1.

Анализируя полученные, данные можно отметить, что метаболический ответ мышечной ткани на введение высокой дозы симвастатина проявляется резким снижением активности супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы.

Полученные нами данные согласуются с результатами В.З. Ланкина и соавт. [8], согласно которым статины обладают

Таблица 3. Активность ферментов антиоксидантной защиты в мышцах животных с экспериментальной гиперхолестеринемией до и после введения симвастатина

Показатели	Контрольная группа, n=35	Группа 1 (сравнения), n=35	Группа 2 (экспериментальная), n=35
Супероксиддисмутаза, усл.ед./мг белка	0,446±0,049	0,500±0,046 p >0,05	0,219±0,024 p ₁ <0,001 p <0,001
Каталаза, мКат/мг белка	1,494±0,211	2,729±0,162 p <0,001	2,786±0,438 p ₁ >0,05 p <0,001
Восстановленный глутатион, мкмоль/мг белка	28,79±4,187	96,55±7,894 p <0,001	48,44±3,213 p ₁ <0,001 p <0,001
Глутатионпероксидаза, мкмоль/мг белка	13,04±0,892	6,59±0,554 p <0,001	2,43±0,191 p ₁ <0,001 p <0,001
Глутатионредуктаза, мкмоль/мг белка	0,023± 0,0042	0,048±0,0030 p <0,001	0,030±0,0029 p ₁ <0,001 p >0,05

Примечание: p — статистическая значимость различий относительно контрольной группы; p₁ — относительно группы сравнения.

прооксидантным действием, о чём свидетельствуют повышение окисляемости биомембран и снижение сократительной активности миокарда в эксперименте при моделировании окислительного стресса путём введения водорода пероксида. В то же время снижение уровня восстановленного глутатиона относительно группы сравнения может быть обусловлено влиянием гипоксии, которая способствует истощению восстановленного глутатиона как в цитозоле, так и в митохондриях, увеличивая оксидативное повреждение [9]. Комплекс биохимических изменений в мышечной ткани способствует её деградации, что подтверждается выявленными структурными изменениями.

У животных экспериментальной группы (группа 2), было зарегистрировано снижение содержания NT-изоформы тайтина до 0,019 и более, N2A-изоформы — до 0,091 и более, практически полное отсутствие небулина по сравнению с животными группы сравнения (группы 1). При этом регистрировали увеличение содержания протеолитических фрагментов тайтина (T2) в 1,3 раза (рис. 1).

Исследования последних десятилетий показали, что сократительная активность саркомера зависит от полноценности гигантского белка поперечнополосатых мышц тайтина, выполняющего полифункциональную роль в саркомере. Тайтин имеет ключевое

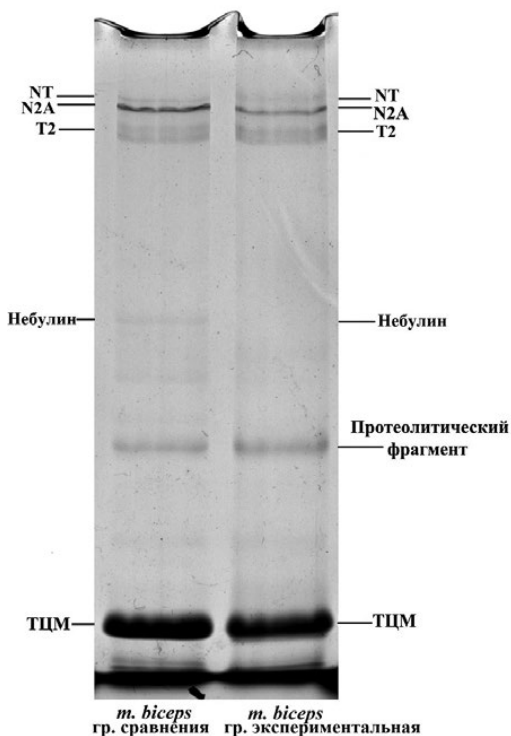


Рис. 1. Электрофорез в полиакриламидном геле; ТЦМ — тяжёлые цепи миозина

значение в обеспечении высокоупорядоченной структуры саркомера поперечнополосатых мышц, регуляции актин-миозинового взаимодействия, внутриклеточных взаимодействий [10]. Уменьшение содержания тайтина обусловлено преобладанием процессов протеолиза этого белка над его синтезом, что приводит к нарушению упорядоченной структуры мышечного волокна.

Поскольку нарушение структуры тайтина развивается при различной патологии мышечной ткани [10], можно полагать, что снижение уровня тайтина служит показателем, информативно отражающим наличие дистрофических процессов в мышце, и является критерием диагностики миопатии.

ВЫВОДЫ

1. Анализируя полученные данные, можно полагать, что один из молекулярных механизмов, лежащих в основе миотоксичности статинов при их длительном применении, — дезинтерация ферментов антиоксидантной защиты, что обуславливает усиление прооксидантных процессов, активации протеолиза важнейших макромолекул, лежащих в основе структурно-функциональной деградации мышечного волокна.

2. Полученные результаты дают основание использовать их как теоретическую основу для разработки схем метаболической коррекции при применении высокодозовой терапии статинами для поддержания функционального состояния скелетной мускулатуры. Определение уровня тайтина в биоптатах можно использовать как выявление раннего маркера мышечной дистрофии.

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.

ЛИТЕРАТУРА

1. Микашинович З.И., Белоусова Е.С., Виноградова Е.В., Семенец И.А. Ферментативная антиоксидантная защита в мышцах крыс при длительном введении симвастина. *Мед. вестн. Башкортостана*. 2017; 12 (1): 54–57. [Mikashinovich Z.I., Belousova E.S., Vinogradova E.V., Semenets I.A. Enzymatic antioxidant protection in muscles of rats under long-term administration of simvastatin. *Meditsinskiy vestnik Bashkortostana*. 2017; 12 (1): 54–57. (In Russ.)]

2. Микашинович З.И., Белоусова Е.С. Нарушение энергозависимых процессов в мышечной ткани как один из патогенетических механизмов статинной миопатии. *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* 2016; 162 (10): 426–430. [Mikashinovich Z.I., Belousova E.S.

Impairment of energy-dependant processes in the muscle tissue as a pathogenetic mechanisms of statin-induced myopathy. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2016; 162 (10): 426–430. (In Russ.)]

3. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Алеид Р. и др. Современные представления об антиоксидантной роли глутатиона и глутатионзависимых ферментов. *Вестник РАМН*. 2010; 3: 46–54. [Kalinina E.V., Chernov N.N., Aleid R. et al. Current views of antioxidative activity of glutathione and glutathione-depending enzymes. *Vestnik RAMN*. 2010; 3: 46–54. (In Russ.)]

4. Микашинович З.И., Летуновский А.В., Волжин О.О., Белоусова Е.С. *Биохимические исследования слюны в клинической практике*. Ростов-на-Дону: Изд-во РостГМУ. 2004; 80 с. [Mikashinovich Z.I., Letunovskiy A.V., Volzhin O.O., Belousova E.S. *Biokhimicheskie issledovaniya slyuny v klinicheskoy praktike*. (Biochemical studies of saliva in clinical practice.) Rostov-na-Donu: Izdatel'stvo RostGMU. 2004; 80 p. (In Russ.)]

5. Вихлянцев И.М., Подлубная З.А. Изоформный состав тайтина в мышцах при патологических процессах. *Биофизика*. 2008; 53 (6): 1058–1065. [Vikhlyantsev I.M., Podlubnaya Z.A. Titin isoform composition in the muscles in pathological processes. *Biofizika*. 2008; 53 (6): 1058–1065. (In Russ.)]

6. Вихлянцев И.М., Подлубная З.А. Новые изоформы тайтина (коннектина) и их функциональная роль в поперечнополосатых мышцах млекопитающих. Факты и предположения. *Успехи биол. хим.* 2012; 52: 239–280. [Vikhlyantsev I.M., Podlubnaya Z.A. New titin (connectin) isoforms and their functional role in striated muscles of mammals: facts and suppositions. *Uspekhi biologicheskoy khimii*. 2012; 52: 239–280. (In Russ.)]

7. Дубинина Е.Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состояниях окислительного стресса. *Вопр. мед. хим.* 2001; 47 (6): 561–581. [Dubinina E.E. The role of reactive oxygen species as signal molecules in tissue metabolism under conditions of oxidative stress. *Voprosy meditsinskoj khimii*. 2001; 47 (6): 561–581. (In Russ.)]

8. Лакомкин В.Л., Капелько В.И., Ланкин В.З. и др. Влияние ингибитора β-гидрокси-β-метилглутарил-коэнзим-А-редуктазы аторвастатина на сократимость изолированного сердца крыс в норме и при окислительном стрессе. *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* 2007; 143 (4): 383–385. [Lakomkin V.L., Kapel'ko V.I., Lankin V.Z. et al. Effect of β-hydroxy-β-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitor atorvastatin on contractility of the isolated rat heart under normal conditions and during oxidative stress. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2007; 143 (4): 383–385. (In Russ.)]

9. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Система глутатиона I. Синтез, транспорт глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы. *Биомед. хим.* 2009; 55 (3): 255–277. [Kulinskiy V.I., Kolesnichenko L.S. System of glutathione I. Synthesis, transport, glutathione transferases, glutathione peroxidases. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2009; 55 (3): 255–277. (In Russ.)]

10. Микашинович З.И., Белоусова Е.С. Биохимические изменения в эритроцитах как молекулярный индикатор клеточного повреждения при длительном введении симвастина. *Клеточные технол. в биол. и мед.* 2016; 2: 122–126. [Mikashinovich Z.I., Belousova E.S. Biochemical changes in erythrocytes as a molecular marker of cell damage during long-term simvastatin treatment. *Kletochnye tekhnologii v biologii i meditsine*. 2016; 2: 122–126. (In Russ.)]