



Оригинальная статья / Research article

Об эффективности эмпаглифлозина в терапии экспериментального инфаркта миокарда

Д. Ю. Ивкин¹✉, М. В. Краснова¹, С. В. Оковитый¹, А. А. Карпов³,
А. Н. Куликов², Е. И. Елецкая¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И. П. Павлова Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6–8

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России). 197341, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Акkuratова, д. 2

✉ Контактное лицо: Ивкин Дмитрий Юрьевич. E-mail: dmitry.ivkin@pharminnotech.com

ORCID: Д. Ю. Ивкин – <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>; М. В. Краснова – <https://orcid.org/0000-0001-8138-6408>;

С. В. Оковитый – <https://orcid.org/0000-0003-4294-5531>; А. А. Карпов – <https://orcid.org/0000-0003-0114-5896>;

А. Н. Куликов – <https://orcid.org/0000-0003-0305-4787>; Е. И. Елецкая – <https://orcid.org/0000-0002-9423-7249>.

Статья поступила: 26.09.2023

Статья принята в печать: 03.11.2023

Статья опубликована: 24.11.2023

Резюме

Введение. После появления эмпаглифлозина на фармацевтическом рынке отмечается рост публикаций, посвященных первичной и вторичной фармакодинамике препарата, увеличивается перечень потенциальных показаний к применению данного ингибитора натрий-глюкозного котранспортера. Гипотезы о фармакологических эффектах и механизмах их реализации проверяются как в масштабных клинических исследованиях, так и в экспериментах на животных.

Цель. Целью данной работы являлись исследования эффективности эмпаглифлозина с использованием эхокардиографических, гистологических и молекулярно-биологических анализов в трех наиболее значимых точках динамического перехода от острого инфаркта миокарда к постинфарктной хронической сердечной недостаточности на лабораторных крысах-самцах.

Материалы и методы. Эксперимент выполнялся на 60 аутбредных крысах-самцах. Инфаркт миокарда моделировали у наркотизированных животных путем перманентной перевязки левой коронарной артерии. Основываясь на данных эхокардиографического (ЭхоКГ) исследования, животных рандомизировали на две группы: контрольный инфаркт – группа патологии без лечения, получавшая плацебо, – и группа терапии с патологией, получавшая эмпаглифлозин в дозе 1 мг/кг per os внутривентрикулярно ежедневно с первого дня эксперимента. На 10, 20 и 30-й день после операции животным проводили ЭхоКГ-исследование, производилась эвтаназия части животных по 10 из каждой группы для выполнения гистологического исследования и молекулярного анализа.

Результаты и обсуждение. Использование эмпаглифлозина у животных после моделирования инфаркта миокарда способствовало значимому увеличению работоспособности миокарда на 10, 20 и 30-й день, достигая максимума на 20-й день ($47,58 \pm 1,87\%$). Препарат способствует длительному сохранению зоны повреждения сердечной мышцы с ранним образованием зрелой соединительной ткани, а также увеличивает сопротивляемость миокарда к воздействию гипоксии путем роста количества HIF-1.

Заключение. На основании проведенных исследований можно сделать вывод о возможности применения натрий-глюкозного котранспортера 2 типа эмпаглифлозина при формировании постинфарктной хронической сердечной недостаточности в условиях нормогликемии.

Ключевые слова: инфаркт миокарда, SGLT2-ингибиторы, эхокардиографическое исследование, молекулярно-биологический анализ, гистология

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. С. В. Оковитый, А. Н. Куликов, Д. Ю. Ивкин разработали дизайн эксперимента. А. А. Карпов, М. В. Краснова провели моделирование инфаркта миокарда и эхокардиографическое исследование. М. В. Краснова, Е. И. Елецкая провели доклинические исследования сравнительной эффективности полученных составов. Д. Ю. Ивкин, М. В. Краснова участвовали в обработке данных и в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Для цитирования: Ивкин Д. Ю., Краснова М. В., Оковитый С. В., Карпов А. А., Куликов А. Н., Елецкая Е. И. Об эффективности эмпаглифлозина в терапии экспериментального инфаркта миокарда. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(4):136–145. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1588>

Efficacy of Empagliflozin in the Treatment of Experimental Myocardial Infarction

Dmitry Yu. Ivkin¹✉, Marina V. Krasnova¹, Sergey V. Okovity¹, Andrey A. Karpov³,
Alexander A. Kulikov², Elizaveta I. Yeletskaia¹

¹ Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

² FSBEI HE I.P. Pavlov SPbSMU MOH Russia. 6–8, Lev Tolstoy str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

³ Almazov National Medical Research Centre. 2, Akkuratova str., Saint-Petersburg, 197341, Russia

✉ Corresponding author: Dmitry Yu. Ivkin. E-mail: dmitry.ivkin@pharminnotech.com

© Ивкин Д. Ю., Краснова М. В., Оковитый С. В., Карпов А. А., Куликов А. Н., Елецкая Е. И., 2023

© Ivkin D. Yu., Krasnova M. V., Okovity S. V., Karpov A. A., Kulikov A. A., Yeletskaia E. I., 2023

ORCID: Dmitry Yu. Ivkin – <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>; Marina V. Krasnova – <https://orcid.org/0000-0001-8138-6408>;
Sergey V. Okovity – <https://orcid.org/0000-0003-4294-5531>; Andrey A. Karpov – <https://orcid.org/0000-0003-0114-5896>;
Alexander A. Kulikov – <https://orcid.org/0000-0003-0305-4787>; Elizaveta I. Yeletskaia – <https://orcid.org/0000-0002-9423-7249>.

Received: 26.09.2023 Revised: 03.11.2023 Published: 24.11.2023

Abstract

Introduction. With the emergence of empagliflozin in the pharmaceutical market, there has been an increase in publications on the primary and secondary pharmacodynamics of the drug, and the list of potential indications for the use of this sodium-glucose co-transporter inhibitor is increasing. Hypotheses about pharmacological effects and mechanisms of their implementation are tested both in large-scale clinical studies and in animal experiments.

Aim. The purpose of this work was to study the effectiveness of empagliflozin by echocardiographic, histological and molecular biological analyses at the three most significant points of the dynamic transition from acute myocardial infarction to post-infarction chronic heart failure in laboratory male rats.

Materials and methods. The experiment was performed on 60 male outbred rats. Myocardial infarction was modeled in narcotic animals by permanent ligation of the left coronary artery. Based on echocardiographic (EchoCG) study data, animals were randomized to two groups: control infarction: untreated pathology group treated with placebo and pathology group treated with empagliflozin 1 mg/kg per os intragastric daily from the first day of the experiment. At 10, 20 and 30 days after the operation, the animals were also subjected to EchoCG testing, and a group of 10 animals from each group were euthanized for histological examination and molecular analysis.

Results and discussion. Empagliflozin use in animals after myocardial infarction modeling contributed to a significant increase in myocardial performance on days 10, 20 and 30, reaching a maximum on day 20 ($47.58 \pm 1.87\%$). The drug promotes long-term preservation of the area of damage to the heart muscle with early formation of mature connective tissue, and also increases myocardial resistance to hypoxia by increasing the amount of HIF-1.

Conclusion. Based on the studies carried out, it can be concluded that it is possible to use the sodium-glucose cotransporter type 2 empagliflozin in the formation of post-infarction chronic heart failure in the conditions of normoglycemia.

Keywords: myocardial infarction, SGLT2 inhibitors, echocardiogram, molecular biological analysis, histology

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Sergey V. Okovity, Alexander N. Kulikov, Dmitry Yu. Ivkin developed the design of the experiment. Andrey A. Karpov, Marina V. Krasnova conducted modeling of myocardial infarction and echocardiographic study. Marina V. Krasnova, Elizaveta I. Yeletskaia conducted preclinical studies of the comparative effectiveness of the obtained compositions. Dmitry Yu. Ivkin, Marina V. Krasnova participated in data processing and in writing the text of the article. All authors participated in the discussion of the results.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center of Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University" within the framework of agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia.

For citation: Ivkin D. Yu., Krasnova M. V., Okovity S. V., Karpov A. A., Kulikov A. A., Yeletskaia E. I. Efficacy of empagliflozin in the treatment of experimental myocardial infarction. *Drug development & registration*. 2023;12(4):136–145. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1588>

ВВЕДЕНИЕ

Результаты исследования С. А. Шальной и соавт. о встречаемости инфаркта миокарда (ИМ) у населения Российской Федерации подтверждают общую долю патологии в 2,9 % от популяции: 5,2 % у мужчин и 1,5 % у женщин, с тенденцией к увеличению с возрастом [1]. Проведенное к 31.08.2023 клиническое исследование Empact-Mi посвящено оценке влияния гипогликемического средства – SGLT2-ингибитора эмпаглифлозина (Джардинс®, Boehringer Ingelheim) на госпитализацию пациентов с сердечной недостаточностью и смертность после перенесенного острого ИМ. Однако результаты данного исследования еще только должны стать общедоступными¹. Представлялось актуальным выполнение

¹ EMPACT-MI: A Study to Test Whether Empagliflozin Can Lower the Risk of Heart Failure and Death in People Who Had a Heart Attack (Myocardial Infarction). Identifier: NCT04509674// Available at: <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04509674?term=EMPACT-MI&draw=2&rank=1>. Accessed: 28.09.2023.

экспериментального исследования на лабораторных животных, позволяющего достаточно быстро получить предварительные результаты и использовать методики, недоступные при проведении клинического исследования, в том числе гистологические post mortem. В проведенных нами ранее исследованиях была подтверждена эффективность испытуемого препарата на модели постинфарктной хронической сердечной недостаточности (ПИХСН) [2]. При литературном поиске не были обнаружены экспериментальные исследования похожего дизайна. Однако данные клинического исследования EMPA-RESPONSE-AHF² подтверждают возможность применения ингибиторов SGLT2 у госпитализированных пациентов с острым ИМ непосредственно после их стабилизации. В исследовании

² Effects of Empagliflozin on Clinical Outcomes in Patients With Acute Decompensated Heart Failure (EMPA-RESPONSE) ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03200860. Available at: <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT03200860>. Accessed: 28.09.2023.

EMPA-RESPONSE-ANF 80 пациентов с острым ИМ были рандомизированы и начали получать эмпаглифлозин или плацебо в течение суток после возникновения ИМ. В целом эмпаглифлозин показал себя безопасным и хорошо переносимым препаратом, снижая выраженность эффектов комбинированной конечной точки [3].

Гибель кардиомиоцитов и дисфункция оставшихся жизнеспособных кардиомиоцитов являются основными патологическими факторами сердечной недостаточности после ИМ. Митохондриальные комплексы становятся важными медиаторами регуляции функции кардиомиоцитов. Однако точная роль субъединиц митохондриального комплекса при сердечной недостаточности после ИМ остается неясной. В исследовании Janbandhu показано, что HIF-1 или фактор, индуцируемый гипоксией, подавляет пролиферацию сердечных фибробластов после инфаркта, индуцируемую активными формами кислорода (АФК) [4]. HIF-1 является фактором транскрипции, который функционирует как главный регулятор кислородного гомеостаза у всех видов млекопитающих животных, он контролирует доставку кислорода, участвуя в процессах ангиогенеза и ремоделирования сосудов, а также использование кислорода, регулируя метаболизм глюкозы и окислительно-восстановительный гомеостаз.

При дисфункции миокарда после перенесенного инфаркта экспрессия NDUFV опосредует выраженный терапевтический эффект, связанный с регуляцией фиброза и апоптоза [5].

Ряд исследований демонстрируют важную роль митохондриального дыхательного комплекса II (сукцинатдегидрогеназа, SDHA) в модулировании продукции АФК при различных сердечно-сосудистых патологиях: так, нарушение его сборки в миокарде способствует развитию дилатационной кардиомиопатии [6]. Именно поэтому, помимо методов функциональной диагностики (ЭхоКГ) и гистологического анализа, при проведении эксперимента использованы молекулярно-биологические методы.

Целью данного исследования явилась оценка эффективности эмпаглифлозина при экспериментальном ИМ в динамике в условиях нормогликемии и выявление возможного механизма реализации кардиотропного эффекта. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

- проведение эхокардиографического (ЭхоКГ) исследования на 10, 20 и 30-е сутки от перевязки левой коронарной артерии (ЛКА);
- динамическая гистологическая оценка патологических изменений в миокарде;
- динамическая оценка экспрессии фактора, индуцируемого гипоксией (HIF-1), НАДН-дегидрогеназы [убихинон] флавопротеина 1 (NDUFV) и сукцинатдегидрогеназы (SDHA) методом молекулярно-биологического анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент выполнялся на 60 аутобредных крысах-самцах, полученных из питомника лабораторных животных ФГУП ПЛЖ «Рапполово» РАНН. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях, от 22 сентября 2010 г. Исследование было выполнено с соблюдением принципов Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей (Страсбург, 1986) в соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики и в соответствии с протоколом биоэтической комиссии СПХФУ № Rat-SA(MI)-2020 от 03.02.2020.

Масса животных после периода адаптации на момент начала эксперимента составила (190 ± 10) г. Животные содержались в условиях 12/12-часового свет-темнового режима и получали стандартный корм и питьевую воду *ad libitum*. Инфаркт миокарда моделировали у наркотизированных животных [золетил (Virbac, Франция) + ксилазин (Interchemie, Нидерланды)] путем перманентной перевязки левой коронарной артерии [7–9]. Сразу же после операции, основываясь на значениях эхокардиографического (ЭхоКГ) исследования и данных второго стандартного отведения снятых электрокардиограмм (ЭКГ), животных рандомизировали на две группы: контрольный инфаркт – группа патологии без лечения, получавшая плацебо (группа № 1), – и группа терапии с патологией, получавшая эмпаглифлозин в дозе 1 мг/кг *per os* внутривнутрижелудочно ежедневно с первого дня эксперимента (группа № 2). На 10, 20 и 30-й день после операции животным также производили ЭхоКГ-исследование, осуществляли забор и анализ гистологического материала. ЭхоКГ выполняли наркотизированным животным на ультразвуковой системе MyLabTouchSL 3116 (Esaote, Италия) (рисунок 1).

При проведении ЭхоКГ животных размещали на подогреваемом столике в положении на спине. Шерсть над областью сердца предварительно выбривали для максимального контакта с гелем и ультразвуковым сосудистым линейным датчиком высокого разрешения с частотой 13 МГц. ЭхоКГ проводили в В-режиме (двумерное сканирование) и М-режиме (одномерное сканирование) [9]. Ключевыми параметрами оценки были фракция выброса (ФВ, %), фракция укорочения (ФУ, %), конечный систолический размер левого желудочка (КСР ЛЖ, мм), конечный диастолический размер левого желудочка (КДР ЛЖ, мм) и частота сердечных сокращений (ЧСС, уд/мин).

Через 10, 20 и 30 дней после моделирования ИМ производилась эвтаназия части животных по 10 из каждой группы для выполнения гистологического исследования и молекулярного анализа.



Рисунок 1. Схема эксперимента

Figure 1. Experimental design

Эвтаназию осуществляли внутрисердечной инъекцией 30 %-го раствора калия хлорида наркотизированных животных с целью остановки сердца в диастолу. После эвтаназии животных вскрывали, сердце извлекали, область с визуализированной зоной некроза помещали в раствор 10%-го забуференного нейтрального формалина для дальнейшего гистологического исследования, а оставшийся миокард замораживали в жидком азоте для последующего молекулярно-биологического анализа. Органы животных, погибших в интервале между точками, также подвергались гистологическому исследованию, но не замораживались.

Все данные выражены как среднее \pm стандартное отклонение. Что касается небольшого размера группы и отсутствия нормального распределения значений, то для обработки статистических данных использовались непараметрические статистические методы. В частности, критерий Краскела–Уоллиса использовался для оценки значимости различий между двумя несовпадающими популяциями. Анализ данных проводился с использованием пакета STATISTICA v10.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA), причем значения $p \leq 0,05$ рассматривались как указывающие на статистическую значимость.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В первые 10 дней после моделирования ИМ выживаемость животных в группе контрольного инфаркта составила 80 %, а в группе терапии – 100 %. В последующем выживаемость в обеих группах была 100 %.

Эхокардиографическое исследование

Согласно данным, полученными нами в ранее проведенных исследованиях [7], ФВ (Т) здоровых крыс данного пола и возраста колеблется в пределах $(71,3 \pm 5,21)$ %, а по литературным данным, варьирует от 53,7 до 86 % [8]. При этом ФВ в группе контрольного инфаркта (группа № 1) на 10-й день составила $(18,71 \pm 7,60)$ % с возрастанием к 20-му дню до $(37,12 \pm 6,34)$ % и снижением на 30-й день до $(24,90 \pm 5,49)$ %, что соответствует формирова-

нию постинфарктной хронической сердечной недостаточности (ПИ ХСН). В случае применения эмпаглифлозина (группа № 2) значимые приросты эффективности работы миокарда наблюдались на 10, 20 и 30-й дни, а на точке «20 дней» достигали своего абсолютного максимума $(47,58 \pm 1,87)$ % (рисунок 2, А). Значимые различия имеются на точке «30 дней» ($p = 0,0476$).

При анализе ЭхоКГ в предыдущем эксперименте ФУ составила $(50 \pm 7,7)$ % [7], а по литературным данным – от 37 до 52 % [8]. Картина изменений значения данного показателя на 10, 20 и 30-й дни полностью сопоставима с таковой по ФВ (рисунок 2, Б).

Значимых различий по показателям КДР ЛЖ, КСР ЛЖ между исследуемыми группами контрольного инфаркта и группы лечения получено не было (рисунок 2 В, Г).

Показатель ЧСС на 30-е сутки достоверно увеличился в группе терапии по сравнению с патологией без лечения, что можно связать с компенсаторной реакцией на фоне уменьшения значений функциональных показателей миокарда (рисунок 2, Д).

На рисунке 2 сведены результаты исследования в динамике.

Гистологическое исследование

10-е сутки после операции

В группе контроля (естественное течение после экспериментального острого ИМ) патологические изменения были закономерно представлены преимущественно выраженным повреждением в виде некроза (60 % животных) с умеренно выраженными (20 %) или выраженными (20 %) реактивными эксудативными воспалительными изменениями и формированием умеренно (50 %) или значительно выраженных (50 %) грануляций. Грануляционная ткань характеризуется незрелостью (отсутствием зрелой соединительной ткани). В крупных очагах некроза кардиомиоцитов наблюдалось формирование умеренно выраженной незрелой грануляционной ткани с полиморфноклеточной воспалительной инфильтрацией (рисунок 3, А).

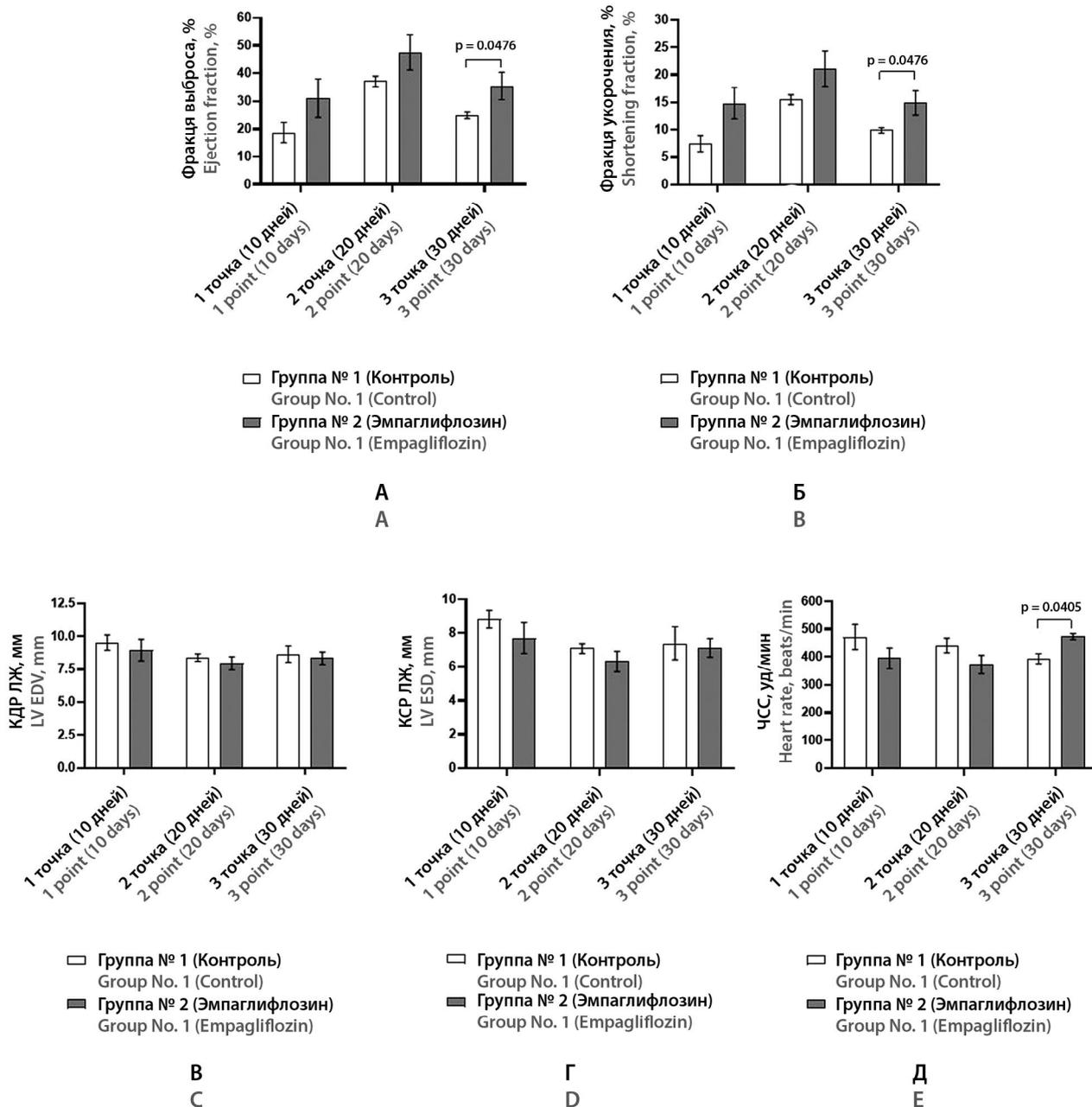


Рисунок 2. Динамика изменений основных ЭхоКГ-показателей в сравнении между группой № 1 (патология без лечения) и группой № 2 (патология с лечением эмпаглифлозином):

А – изменение значения фракции выброса, %; **Б** – изменение значения фракции укорочения, %; **В** – изменение значения КДР ЛЖ, мм; **Г** – изменение значения КСР ЛЖ, мм; **Д** – изменение ЧСС, уд/мин

Figure 2. Dynamics of changes in the main EchoCG indicators in comparison between group No. 1 (pathology without treatment) and group No. 2 (pathology with treatment with empagliflozin):

A – change in ejection fraction value, %; **B** – change in the value of the shortening fraction, %; **C** – change in the value of LV EDR, mm; **D** – change in LV ESR value, mm; **E** – change in heart rate, beats/min

В группе терапии признаки повреждения миокарда (в виде некроза) были значительно выражены у меньшей части животных (40%), у остальных были выражены умеренно (20%) и слабо (20%) или не выражены вовсе (20%). Тем не менее воспалительные экссудативные изменения наблюдались у всех животных, были выражены умеренно (60%) или значитель-

но (40%) и сопровождалась выраженными разрастаниями грануляционной ткани. Грубая соединительная ткань на этом сроке эксперимента не была сформирована, но наблюдалось возникновение эпителиоидно-клеточной реакции вокруг шовного материала (рисунок 3, Б).

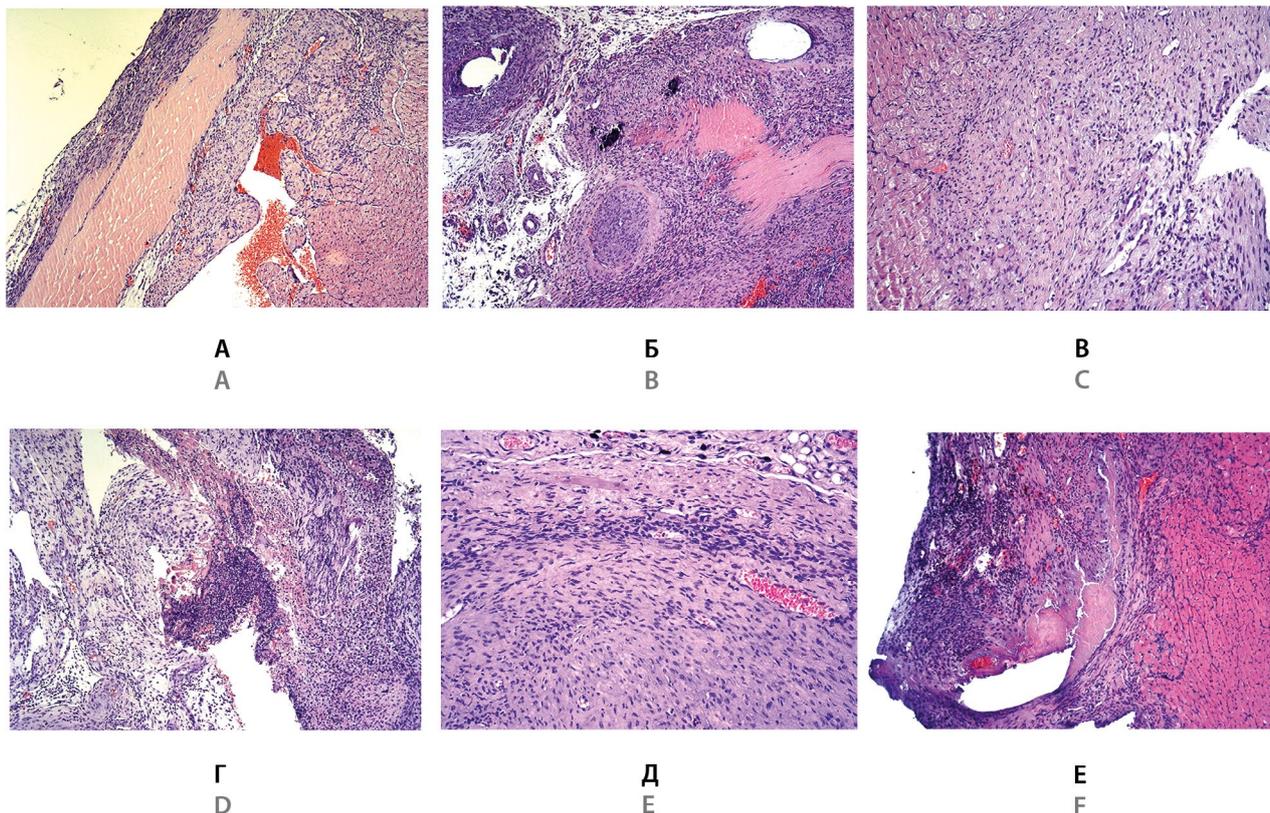


Рисунок 3. Гистологические изменения миокарда:

А – крупные очаги некроза кардиомиоцитов с формированием умеренно выраженной незрелой грануляционной ткани и умеренно выраженной полиморфноклеточной воспалительной инфильтрацией; **Б** – крупноочаговые некрозы кардиомиоцитов, окруженные обширными полями незрелой грануляционной ткани с умеренно выраженной лимфоплазмоцитарной инфильтрацией с примесью нейтрофилов, тучных клеток и гемосидерофагов, с дилатацией полостей сердца. Очаговая эпителиоидноклеточная реакция вокруг шовного материала, очаги обызвествления; **В** – крупноочаговый кардиосклероз со слабо выраженной перифокальной лимфогистиоцитарной инфильтрацией с примесью плазматических клеток и гемосидерофагов; **Г** – очаговые некрозы кардиомиоцитов, окруженные диффузными обширными полями незрелой грануляционной ткани с выраженной лимфоплазмоцитарной инфильтрацией с обильной примесью нейтрофилов с формированием очагов гнойного расплавления, тучных клеток и гемосидерофагов; **Д** – крупные очаги формирования зрелой грануляционной и соединительной ткани со слабо выраженной перифокальной лимфогистиоцитарной инфильтрацией с примесью плазматических клеток, гемосидерофагов, тучных клеток; **Е** – очаговые некрозы кардиомиоцитов, окруженные полями незрелой и зрелой грануляционной ткани с очаговой выраженной лимфоплазмоцитарной инфильтрацией с примесью нейтрофилов, тучных клеток и гемосидерофагов, с дилатацией полостей сердца

Figure 3. Histological changes in the myocardium:

A – large foci of cardiomyocyte necrosis with the formation of moderately expressed immature granulation tissue and moderately expressed polymorphic cellular inflammatory infiltration; **B** – large-focal necrosis of cardiomyocytes, surrounded by vast fields of immature granulation tissue with moderately pronounced lymphoplasmacytic infiltration with an admixture of neutrophils, mast cells and hemosiderophages, with dilatation of the cavities of the heart. Focal epithelioid cell reaction around the suture material, foci of calcification; **C** – large-focal cardiosclerosis with weakly expressed perifocal lymphohistiocytic infiltration with an admixture of plasma cells and hemosiderophages; **D** – focal necrosis of cardiomyocytes, surrounded by diffuse extensive fields of immature granulation tissue with pronounced lymphoplasmacytic infiltration with an abundant admixture of neutrophils with the formation of foci of purulent melting, mast cells and hemosiderophages; **E** – large foci of formation of mature granulation and connective tissue with weakly expressed perifocal lymphohistiocytic infiltration with an admixture of plasma cells, hemosiderophages, mast cells; **F** – focal necrosis of cardiomyocytes, surrounded by fields of immature and mature granulation tissue with focal pronounced lymphoplasmacytic infiltration with an admixture of neutrophils, mast cells and hemosiderophages, with dilatation of the cavities of the heart

20-е сутки после операции

В группе контроля некроз отсутствовал у всех животных, однако продолжала сохраняться умеренно (60 %) или слабо выраженная (40 %) экссудативная клеточная реакция (воспаление) и преимущест-

венно умеренные разрастания грануляционной ткани без явлений формирования грубой фиброзной ткани. Кроме того, у 20 % животных наблюдался крупноочаговый кардиосклероз со слабовыраженной перифокальной лимфоцитарной инфильтрацией (рисунок 3, В).

У 40 % животных из группы терапии сохранялись признаки повреждения миокарда (в виде очагов «замершего инфаркта») среди умеренно выраженной воспалительной инфильтрации и выраженных разрастаний грануляционной ткани. Вместе с тем у всех животных при этом наблюдалось слабо выраженное образование грубой соединительной ткани. Наблюдалось возникновение очагового миксоматоза в зоне формирующегося рубца у 80 % крыс (рисунок 3, Г).

30-е сутки после операции

В группе контроля у всех животных некротические изменения отсутствовали, воспаление было выражено слабо, умеренные разрастания грануляционной ткани сочетались с формированием умеренных (50 %) или выраженных (50 %) разрастаний грубой рубцовой ткани, в двух наблюдениях отмечено формирование тяжелой сердечной недостаточности (рисунок 3, Д).

В группе терапии признаки повреждения миокарда сохранились лишь у одного животного, экссудативная воспалительная реакция чаще была слабо выражена, слабо и умеренно выраженные разрастания грануляционной ткани сочетались с разной степени выраженности разрастаниями грубой рубцовой ткани. Сохранялась выраженность миксоматоза в зоне рубца (80 %) (рисунок 3, Е).

Таким образом, на основании характера и с учетом степени выраженности выявленных патологических изменений экспериментальный острый инфаркт миокарда в группе животных, получавших эмпаглифлозин, по отношению к группе контроля протекал со сниженной элиминацией некротического детрита и длительным сохранением зоны повреждения («замерший инфаркт»), более умеренной степенью выраженности экссудативного воспаления в зоне повреждения и неравномерностью формирования грануляционной ткани, а также более ранним образованием (уже к 20-му дню) зрелой соединительной ткани.

Молекулярно-биологический анализ

Тканевая гипоксия или ишемия в результате артериальной окклюзии индуцирует активность HIF-1. В свою очередь, он активирует транскрипцию нескольких генов, кодирующих ангиогенные факторы роста и цитокины [фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор роста плаценты (PGF), фактор роста тромбоцитов В (PDGFB), ангиопоэтин 1 (ANGPT1) и 2 (ANGPT2), фактор стволовых клеток (SCF)], которые, связываясь с родственными рецепторами клеточной поверхности, опосредуют свое биологическое воздействие на эндотелиальные клетки, гладкомышечные клетки сосудов, эндотелиальные клетки-предшественники, мезенхимальные стволовые клетки и другие ангиогенные клетки, происходящие из костно-

го мозга (BMDACs). HIF-1 также опосредует метаболическое перепрограммирование, которое может защитить сердце от повреждений после продолжительной ишемии-реперфузии за счет снижения производства активных форм кислорода [10].

В контрольном инфаркте наблюдалось снижение уровня HIF-1 на 10, 20 и 30-е сутки после моделирования ИМ (рисунок 4, А). Это может свидетельствовать о замедлении репаративных процессов в зоне ишемии на фоне слабовыраженной экссудативной воспалительной реакции и формирования умеренных и выраженных разрастаний грубой рубцовой ткани. В опытной группе на 20-е сутки наблюдалось достоверное увеличение количества HIF-1 после моделирования патологии. Это может говорить о том, что терапия эмпаглифлозином повышает устойчивость миокарда к воздействию гипоксии посредством увеличения количества HIF-1 с последующим восстановлением доставки кислорода к тканям, предотвращением гибели клеток миокарда, приводящей к развитию некротических очагов и фиброза.

Кислородный дефицит означает для дыхательной цепи переноса электронов (ЭТЦ) нехватку как доноров, так и конечного акцептора электронов. Преобладание анаэробного гликолиза и снижение продукции пирувата приводят к ингибированию всех стадий ЦТК, в том числе обеспечивающих субстратами комплексы I и II (окисление сукцината до фумарата и реакции, сопровождающиеся восстановлением НАД). Дефицит акцептора электронов приводит к их утечке по пути следования к терминальному комплексу ЭТЦ, что сопровождается неполным восстановлением кислорода и образованием его активных форм. Изменение активности комплексов I и II ЭТЦ является одним из основных молекулярных механизмов развития гипоксии, а также играет важную роль в формировании клеточного ответа на нее. Эти комплексы поставляют электроны в цикл убихинона относительно независимо друг от друга, однако для эффективного протекания окислительного фосфорилирования и поддержания энергетического баланса в клетке необходима нормальная деятельность их обоих. Функционируя параллельно, они представляют собой первое звено ЭТЦ, и их блокада при гипоксии приводит к нарушению работы всех остальных ее звеньев. Наиболее ранней ответной реакцией на снижение концентрации кислорода в окружающей среде являются изменения активности митохондриальных ферментов не на терминальном, а на субстратном участке дыхательной цепи, т.е. репрограммирование работы ЭТЦ. Происходит обратимое подавление электрон-транспортной функции комплекса I и компенсаторная активация комплекса II. При этом резко возрастают как содержание сукцината в крови и тканях, так и вклад сукцинатоксидазного окисления в общее дыхание, который может достигать 70–80 %.

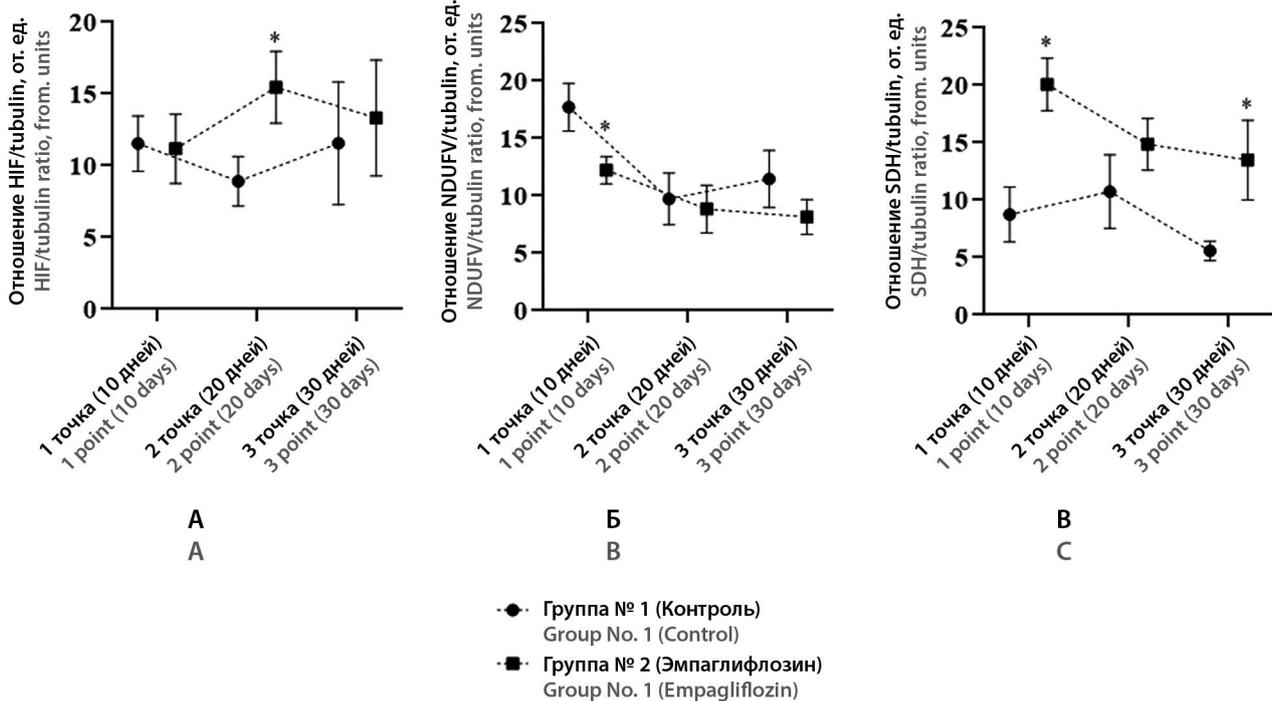


Рисунок 4. Изменение значений показателей молекулярно-биологического исследования (вестерн-блотт-анализа):

А – динамика изменения HIF-1 (фактор, индуцируемый гипоксией); **Б** – динамика изменения показателя NDUFV; **В** – динамика изменения показателя SDHA (сукцинатдегидрогеназы)

Figure 4. Changes in the values of indicators of molecular biological research (Western blot analysis):

A – dynamics of changes in HIF-1 (hypoxia-inducible factor); **B** – dynamics of changes in the NDUFV indicator; **C** – dynamics of changes in the SDHA (succinate dehydrogenase) indicator

НАДН-дегидрогеназа [убихинон] флавопротеин 1 – основная субъединица дыхательной цепи митохондриальной мембраны НАДН-дегидрогеназа (комплекс I), которая катализирует перенос электронов от НАДН через дыхательную цепь, используя убихинон в качестве акцептора электронов. Также играет важную роль в поддержании биоэнергетики клеток, так как является звеном ЭТЦ и участвует в процессе окислительного фосфорилирования.

По результатам проведенного исследования количество NDUFV достоверно снизилось на 10-е сутки в опытной группе в сравнении с группой контроля (рисунок 4, Б). В целом наблюдалось снижение данного показателя на 20 и 30-е сутки как в контрольной группе, так и в группе, которая получала терапию эмпаглифлозином.

Основными причинами снижения активности комплекса I при гипоксии считаются нехватка NADH и диссоциация флавиновой простетической группы НАДН-дегидрогеназной субъединицы. В условиях дефицита кислорода CoQ преимущественно находится в восстановленной форме, что делает невозможной передачу электронов от флавиновой простетической группы и приводит к разрушению ее связи с белком [11, 12]

Сукцинатдегидрогеназа (SDH – II комплекс) – это гетеротетрамерный интегрированный мембранно-протеиновый комплекс, участвующий как в процессе окислительного фосфорилирования, перенося электроны по дыхательной цепи, так и в критических реакциях цикла трикарбоновых кислот (цикла Кребса), катализируя окисление сукцината до фумарата. Комплекс SDH связан с внутренней мембраной митохондрий, имеет сложную структуру и состоит из 4 субъединиц, включая 2 гидрофильные субъединицы – SDHA и SDHB, которые вместе образуют каталитический центр энзима, и 2 гидрофобные субъединицы – SDHC и SDHD. Основная функция SDHA заключается в участии в окислительном фосфорилировании: превращение сукцината в фумарат преобразует FAD в FADH₂. Митохондрии оказывают прямое и косвенное влияние на физиологию кардиомиоцитов, регулируя биоэнергетику (кардиомиоциты имеют высокую потребность в синтезе АТФ и потреблении кислорода), окислительно-восстановительный сигнал (физиологический ответ), окислительный стресс (патологический ответ), метаболизм кальция, сократительные свойства, некроз и апоптоз. Следовательно, поддержание сердечной митохондриальной функции и целостности имеет решающее значение для здоровья человека.

Накопления сукцината (промежуточного звена Кребса) во время ишемии сердца достаточно, чтобы вызвать массивную генерацию АФК за счет индукции обратного транспорта электронов в ЭТЦ во время реперфузии [13, 14].

По результатам исследования в группе контроля показатель SDHA незначительно увеличивался на 20-е сутки по сравнению с 10-ми сутками, а к 30-му дню после моделирования патологии снижался, что может свидетельствовать о нарушении протекания окислительного фосфорилирования в митохондриях кардиомиоцитов за счет снижения активности работы ЭТЦ. Недостаток АТФ и накопление АФК будут способствовать повреждению клеток миокарда в условиях гипоксии. В опытной группе наблюдалось достоверное увеличение SDHA на 10 и 30-е сутки после моделирования ИМ. Это может указывать на ингибирование процессов окислительного стресса, восстановление работы ЭТЦ и биоэнергетики в кардиомиоцитах после ИМ на фоне терапии эмпаглифлозином (рисунок 4, В).

Экспериментально показано, что активность комплекса II при гипоксии снижается медленнее и в меньшей степени, нежели комплекса I. Это объясняется тем, что входящий в состав СДГ в качестве простетической группы ФАД в отличие от ФМН комплекса I в условиях умеренного дефицита кислорода не диссоциирует и продолжает выполнять свою электронтранспортную функцию. Временная, обратимая активация СДГ при гипоксии является экстренной компенсаторной реакцией, направленной на поддержание функционирования ЭТЦ в условиях блокады комплекса I. Она обеспечивает быструю энергопродукцию с целью немедленной компенсации происходящих изменений, а также стабилизацию транскрипционного фактора HIF и запуск процессов долговременной адаптации к гипоксии [13].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение эмпаглифлозина в раннем периоде после моделирования инфаркта миокарда у крыс способствовало улучшению эхокардиографических показателей относительно животных группы контрольного инфаркта. Наличие значимых отличий по показателям фракции выброса и фракции укорочения позволяют говорить об увеличении работы сердечной мышцы у животных, получавших лечение.

Основываясь на данных гистологической картины, у животных, которые получали лечение препаратом, можно выявить тенденцию к более раннему образованию зрелой соединительной ткани в зоне поражения миокарда, а также умеренность протекания процесса экссудативного воспаления по сравнению с данными животных контрольного инфаркта.

Результаты молекулярно-биологического анализа позволяют предположить, что одним из возможных механизмов, за счет которого эмпаглифлозин спо-

способствует увеличению устойчивости сердечной мышцы к воздействию гипоксии, является рост количества HIF-1. Увеличение показателя SDHA у данных животных также оказывает свою положительную роль в поддержании митохондриальной функции миокарда при наличии повреждения.

Таким образом, исходя из полученных данных, можно заявить, что ингибитор натрий-глюкозного котранспортера 2 типа эмпаглифлозин оказывает значительную положительную роль в процессах раннего восстановления после перенесенного инфаркта миокарда.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шальнова С. А., Драпкина О. М., Куценко В. А., Капустина А. В., Муромцева Г. А., Яровая Е. Б., Баланова Ю. А., Евстифеева С. Е., Имаева А. Э., Шляхто Е. В., Бойцов С. А., Астахова З. Т., Барбараш О. Л., Белова О. А., Гринштейн Ю. И., Ефанов А. Ю., Калачикова О. Н., Кулакова Н. В., Недогода С. В., Ротарь О. П., Трубачева И. А. Черных от имени участников исследования ЭССЕ-РФ Т.М. Инфаркт миокарда в популяции некоторых регионов России и его прогностическое значение. *Российский кардиологический журнал*. 2022;27(6):4952. DOI: 10.15829/1560-4071-2022-4952.
2. Krasnova M., Kulikov A., Okovityi S., Ivkin D., Karpov A., Kaschina E., Smirnov A. Comparative efficacy of empagliflozin and drugs of baseline therapy in post-infarct heart failure in normoglycemic rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2020;393(9):1649–1658. DOI: 10.1007/s00210-020-01873-7.
3. Damman K., Beusekamp J. C., Boorsma E. M., Swart H. P., Smilde T. D. J., Elvan A., van Eck J. W. M., Heerspink H. J. L., Voors A. A. Randomized, double-blind, placebo-controlled, multicentre pilot study on the effects of empagliflozin on clinical outcomes in patients with acute decompensated heart failure (EMPA-RESPONSE-AHF). *Eur. J. Heart Fail*. 2020;22:713–722.
4. Janbandhu V., Tallapragada V., Patrick R., Li Y., Abeygunawardena D., Humphreys D. T., Martin E. M. M. A., Ward A. O., Contreras O., Farbehi N., Yao E., Du J., Dunwoodie S. L., Bursac N., Harvey R. P. Hif-1a suppresses ROS-induced proliferation of cardiac fibroblasts following myocardial infarction. *Cell Stem Cell*. 2022;29(2):281–297. DOI: 10.1016/j.stem.2021.10.009.
5. Qi B., Song L., Hu L., Guo D., Ren G., Peng T., Liu M., Fang Y., Li C., Zhang M., Li Y. Cardiac-specific overexpression of Ndufs1 ameliorates cardiac dysfunction after myocardial infarction by alleviating mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Experimental & Molecular Medicine*. 2022;54:946–960. DOI: 10.1038/s12276-022-00800-5.
6. Wang X., Zhang X., Cao K., Zeng M., Fu X., Zheng A., Zhang F., Gao F., Zou X., Li H., Li M., Lv W., Xu J., Long J., Zang W., Chen J., Gao F., Ding J., Liu J., Feng Z. Cardiac disruption of SDHAF4-mediated mitochondrial complex II assembly promotes dilated cardiomyopathy. *Nature Communications*. 2022;13(1):3947.
7. Казаченко А. А., Оковитый С. В., Куликов А. Н., Ивкин Д. Ю., Шустов Е. Б. Экспериментальное моделирование хронической сердечной недостаточности. *Биомедицина*. 2013;1(3):41–48.
8. Куликов А. Н., Оковитый С. В., Ивкин Д. Ю., Карпов А. А., Лисицкий Д. С., Любишин М. М. Эффекты эмпаглифлозина при экспериментальной модели хронической сердечной недостаточности у крыс с нормогликемией. *Журнал Сердечная Недостаточность*. 2016;17(6):454–460.
9. Карпов А. А., Ивкин Д. Ю., Драчева А. В., Питухина Н. Н., Успенская Ю. К., Ваулина Д. Д., Усков И. С., Эйвазова Ш. Д., Минасян С. М., Власов Т. Д., Бурякина А. В., Галагудза М. М. Моделирование постинфарктной сердечной недостаточности путем окклюзии левой коронарной артерии у крыс: техника и методы морфофункциональной оценки. *Биомедицина*. 2014;3:32–48.

10. Semenza G. L. Hypoxia-inducible factors: roles in cardiovascular disease progression, prevention, and treatment. *Cardiovascular Research*. 2023;119(2):371–380. DOI: 10.1093/cvr/cvac089.
11. Приходько В. А., Селизарова Н. О., Оковитый С. В. Молекулярные механизмы развития гипоксии и адаптации к ней. Часть I. *Архив патологии*. 2021;83(2):52–61. DOI: 10.17116/ptol20218302152.
12. Приходько В. А., Селизарова Н. О., Оковитый С. В. Молекулярные механизмы развития гипоксии и адаптации к ней. Часть II. *Архив патологии*. 2021;83(3):6269.
13. Zhang Y., Liu D., Hu H., Zhang P., Xie R., Cui W. HIF-1 α /BNIP3 signaling pathway-induced-autophagy plays protective role during myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019;120:109464. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109464.
14. Kiyuna L. A., Albuquerque R. P. E., Chen C.-H., Mochly-Rosen D., Ferreira J. C. B. Targeting mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart failure: Challenges and opportunities. *Free radical biology & medicine*. 2018;129:155–168. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.019.
10. Semenza G. L. Hypoxia-inducible factors: roles in cardiovascular disease progression, prevention, and treatment. *Cardiovascular Research*. 2023;119(2):371–380. DOI: 10.1093/cvr/cvac089.
11. Prikhodko V. A., Selizarova N. O., Okovityi S. V. Molecular mechanisms for hypoxia development and adaptation to it. Part I. *Архив Патологии*. 2021;83(2):5261. (In Russ.) DOI: 10.17116/ptol20218302152.
12. Prikhodko V. A., Selizarova N. O., Okovityi S. V. Molecular mechanisms of hypoxia and adaptation to it. Part II. *Архив Патологии*. 2021;83(3):6269. (In Russ.)
13. Zhang Y., Liu D., Hu H., Zhang P., Xie R., Cui W. HIF-1 α /BNIP3 signaling pathway-induced-autophagy plays protective role during myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019;120:109464. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109464.
14. Kiyuna L. A., Albuquerque R. P. E., Chen C.-H., Mochly-Rosen D., Ferreira J. C. B. Targeting mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart failure: Challenges and opportunities. *Free radical biology & medicine*. 2018;129:155–168. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.019.

REFERENCES

1. Shalnova S. A., Drapkina O. M., Kutsenko V. A., Kapustina A. V., Muromtseva G. A., Yarovaya E. B., Balanova Yu. A., Evstifeeva S. E., Imaeva A. E., Shlyakhto E. V., Boytsov S. A., Astakhova Z. T., Barbarash O. L., Belova O. A., Grinshtein Yu. I., Efanov A. Yu., Kalachikova O. N., Kulakova N. V., Nedogoda S. V., Rotar O. P., Trubacheva I. A., Chernykh on behalf of the ESSE-RF study participants. T.M. Myocardial infarction in the population of some Russian regions and its prognostic value. *Russian Journal of Cardiology*. 2022;27(6):4952. (In Russ.) DOI: 10.15829/1560-4071-2022-4952.
2. Krasnova M., Kulikov A., Okovityi S., Ivkin D., Karpov A., Kaschina E., Smirnov A. Comparative efficacy of empagliflozin and drugs of baseline therapy in post-infarct heart failure in normoglycemic rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2020;393(9):1649–1658. DOI: 10.1007/s00210-020-01873-7.
3. Damman K., Beusekamp J. C., Boersma E. M., Swart H. P., Smilde T. D. J., Elvan A., van Eck J. W. M., Heerspink H. J. L., Voors A. A. Randomized, double-blind, placebo-controlled, multicentre pilot study on the effects of empagliflozin on clinical outcomes in patients with acute decompensated heart failure (EMPA-RESPONSE-AHF). *Eur. J. Heart Fail*. 2020;22:713–722.
4. Janbandhu V., Tallapragada V., Patrick R., Li Y., Abeygunawardena D., Humphreys D. T., Martin E. M. M. A., Ward A. O., Contreras O., Farbehi N., Yao E., Du J., Dunwoodie S. L., Bursac N., Harvey R. P. Hif-1 α suppresses ROS-induced proliferation of cardiac fibroblasts following myocardial infarction. *Cell Stem Cell*. 2022;29(2):281–297. DOI: 10.1016/j.stem.2021.10.009.
5. Qi B., Song L., Hu L., Guo D., Ren G., Peng T., Liu M., Fang Y., Li C., Zhang M., Li Y. Cardiac-specific overexpression of Ndufs1 ameliorates cardiac dysfunction after myocardial infarction by alleviating mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Experimental & Molecular Medicine*. 2022;54:946–960. DOI: 10.1038/s12276-022-00800-5.
6. Wang X., Zhang X., Cao K., Zeng M., Fu X., Zheng A., Zhang F., Gao F., Zou X., Li H., Li M., Lv W., Xu J., Long J., Zang W., Chen J., Gao F., Ding J., Liu J., Feng Z. Cardiac disruption of SDHAF4-mediated mitochondrial complex II assembly promotes dilated cardiomyopathy. *Nature Communications*. 2022;13(1):3947.
7. Kazachenko A. A., Okovityi S. V., Kulikov A. N., Ivkin D. Yu., Shustov E. B. Experimental modeling of chronic warm insufficiency. *Biomeditsina Biomedicine*. 2013;1(3):41–48. (In Russ.)
8. Kulikov A. N., Okovityi S. V., Ivkin D. Yu., Karpov A. A., Lisitsky D. S., Lyubishin M. M. Effects of empagliflozin in an experimental model of chronic heart failure in normoglycemic rats. *Heart Failure*. 2016;6(6):454–460. (In Russ.)
9. Karpov A. A., Ivkin D. Yu., Dracheva A. V., Pitukhina N. N., Uspenskaya Yu. K., Vaulina D. D., Uskov I. S., Eyvazova S. D., Mina-syan S. M., Vlasov T. D., Buryakina A. V., Galagudza M. M. Rat mo-