

УДК 591.473:615.27

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2018-3-131-139>

Для цитирования: Талалаева О.С., Зверев Я.Ф., Брюханов В.М., Мотин Ю.Г. Морфологические свидетельства анаболического действия препарата «Гистохром» у крыс. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (3): 131–139.

Морфологические свидетельства анаболического действия препарата «Гистохром» у крыс

Талалаева О.С.¹, Зверев Я.Ф.¹, Брюханов В.М.¹, Мотин Ю.Г.²

¹ Алтайский государственный медицинский университет (АГМУ)
Россия, 656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 40

² Краевая клиническая больница
Россия, 656024, г. Барнаул, ул. Ляпидевского, 1

РЕЗЮМЕ

Цель. Изучить анаболическое действие различных доз гистохрома у крыс в условиях длительных физических тренировок.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на аутбредных крысах сток Вистар обоего пола в возрасте 2–3 мес и весом 200–300 г. Крысам группы 1 ($n = 20$) в течение 10 сут подкожно вводили гистохром в дозе 1 мг/кг, группы 2 ($n = 20$) – 10 мг/кг, группы 3 ($n = 20$) – эквивалентные инъекции изотонического раствора натрия хлорида (контроль). Гипертрофические процессы в мускулатуре крыс индуцировали, используя модель принудительного плавания. Тренировки проводили через 1 сут. Забор материала для морфологического исследования осуществляли через 1 сут после первого и последнего плавания. Гипертрофию мышечных волокон оценивали по диаметру поперечного сечения мышечных волокон, среднему количеству гранул серебра на одно ядро миосимпласта и процентному содержанию ядер с 1–3 и более гранулами в сравнении с интактными (контрольными) животными.

Результаты. При морфологическом исследовании микропрепарата *m. gastrocnemius* зарегистрировано увеличение диаметра мышечного волокна на 19,4% в группе 1 и на 60% в группе 2. В контрольной группе крыс не обнаруживалось статистически значимого увеличения поперечного сечения мышечных волокон.

Изучение биосинтетической активности ядер миосимпластов выявило увеличение аргирофильных белков (AgNORs) в обеих испытуемых группах животных при менее яркой динамике в контроле. К 10-м сут наблюдения в контрольной группе крыс на 10% возросло количество миосимпластов с двумя ядрышковыми организаторами. Максимальный прирост аргирофильных гранул отмечался при длительном применении препарата «Гистохром» в дозе 1 мг/кг.

Заключение. Гистохром дозозависимо повышает биосинтетические процессы в скелетной мускулатуре крыс, обеспечивая развитие анаболического эффекта.

Ключевые слова: гистохром, анаболическое действие, гипертрофия, мышечные волокна.

ВВЕДЕНИЕ

Отечественные лекарственные средства серии «Гистохром» созданы на основе морского природного соединения, хиноидного пигмента мор-

ских беспозвоночных эхинохрома А (2, 3, 5, 6, 8-пентагидрокси-7-этил-1,4-нафтохинон) [1, 2]. Разработанный сотрудниками ТИБОХ ДВО РАН препарат одобрен Фармакологическим комитетом МЗ РФ и разрешен к применению Департаментом государственного контроля лекарственных средств [1, 3].

✉ Талалаева Ольга Сергеевна, e-mail: talalaeva_olga@mail.ru.

Более 10 лет антиоксидантные свойства препарата эффективно применяются в терапии различных форм ишемической болезни сердца (ИБС) [4, 5] и при офтальмологической патологии [6, 7]. В последние годы появилась тенденция к расширению терапевтических показаний для применения гистохрома [8–11]. Углубленное изучение фармакодинамики препарата знаменовалось выявлением дополнительных механизмов его клеточного действия. Так, выяснилось, что наряду с политаргетным влиянием препарата на процессы свободнорадикального окисления [12, 13], гистохром модулирует активность внутриклеточных сигнальных путей [14–16]. Также показано, что эхинохром А за счет геномных механизмов усиливает синтез белка и анаболические процессы, улучшает митохондриальное дыхание в кардиомиобластах клеточной линии Н9с2 и в изолированных кардиомиоцитах крыс [17]. При повышенной физической нагрузке гистохром увеличивает количество митохондрий в кардиомиоцитах [17, 18].

Не исключено, что зарегистрированная нами в предварительных экспериментах способность гистохрома повышать общую выносливость крыс при экстремальных физических нагрузках [11] обусловлена анаболическим действием препарата. Предположение о возможном анаболическом эффекте гистохрома выглядит логичным в контексте выявленных в последние годы новых геномно-опосредованных морфофункциональных изменений клеток, присущих эхинохрому А [14, 16–18].

Целью настоящего исследования стало изучение возможного анаболического действия различных доз гистохрома у крыс в условиях длительных физических тренировок.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эксперименте использовался препарат «Гистохром» (раствор для внутривенного введения 1% в ампулах по 5 мл); регистрационный номер Р N002363/01-2003 от 07.23.2008, ТИБОХ ДВО РАН, г. Владивосток [1].

Эксперименты выполнены на аутбредных крысах сток Вистар обоего пола в возрасте 2–3 мес и весом 200–300 г, выращенных в питомнике ГУ «НИИ цитологии и генетики СО РАН» (г. Новосибирск). Животных содержали в стандартных условиях вивария на полноценном сбалансированном рационе в соответствии с рекомендациями Института питания РАМН, в хорошо проветриваемом помещении с температурой (20 ± 2) °C

и влажностью не более 80%. Эксперименты выполняли в весенний период с 9.00 до 15.00.

До введения в эксперимент животные содержались в трех общих клетках по 20 крыс в каждой. После завершения адаптационного периода был применен блочный дизайн рандомизации, который является наиболее предпочтительным, так как обеспечивает репрезентативность выборки и устраняет вероятность систематической ошибки исследования. Для реализации блочной рандомизации предварительно были маркированы индивидуальные клетки в диапазоне значений 1–60 и заготовлены 60 листов, помеченных А (группа 1, $n = 20$), Б (группа 2, $n = 20$) и В (контроль, $n = 20$). Крыс извлекали по одной поочередно из каждой общей клетки и рассаживали в индивидуальные клетки в соответствии с порядковым номером. Параллельно извлекали по одному листку с указанием групповой принадлежности крысы. Индивидуальные клетки располагались на специальных полках параллельными рядами вдоль стены, равноудаленной от входа и окна.

Животных разделили на три группы. Первые две группы крыс ежедневно в течение 10 сут подкожно получали гистохром в дозе 1 мг/кг (группа 1, $n = 20$) и в дозе 10 мг/кг (группа 2, $n = 20$). Третья группа животных являлась контролем и получала эквивалентные подкожные инъекции изотонического раствора натрия хлорида ($n = 20$).

Для изучения возможного анаболического действия препарата «Гистохром» была использована разработанная ранее сотрудниками ГБОУ ВПО АГМУ методика оценки морфологических характеристик скелетной мускулатуры крыс после многократного воздействия экстремальных физических нагрузок [19]. Согласно данной методике, гипертрофические процессы в скелетной мускулатуре крыс индуцировали, используя модель принудительного плавания [20–22].

Тренировки проводили через 1 сут в течение 10 сут. С целью рандомизации животных по их устойчивости к физической нагрузке было проведено контрольное плавание. Животные, длительность плавания которых при рандомизации отклонялась на 35%, исключались из эксперимента. Адаптация к водной среде проходила в течение 7 сут в цилиндрической емкости с гладкой поверхностью. Диаметр емкости 60 см, глубина 120 см, температура воды (31 ± 1) °C. Цель адаптационного периода заключалась в том, чтобы уменьшить стрессовые реакции животных, которые могли возникнуть без физических тренировок [21, 23].

Забор материала для морфологического исследования производили два раза: 1) через 1 сут после первого плавания; 2) через 1 сут после последнего плавания. Сразу после эвтаназии осуществляли аутопсию с дальнейшей подготовкой препарата икроножной мышцы голени (*m. gastrocnemius (cap. lat.)*). Гистологический материал (кусочки *m. gastrocnemius* размером $0,5 \times 0,3$ см) фиксировали в 10%-м забуференном формалине в течение 1 сут с применением проводки с изопропанолом и заливкой в парафин [24]. Срезы тканей толщиной 6–8 мкм изготавливали на ротационном микротоме и заключали в синтетическую монтирующую среду для гистологических препаратов BioMaunt (Bio-Optica, Италия) под покровное стекло [19]. Гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином [25]. Определение биосинтетической активности ядер миосимпластов проводилось при помощи окраски на аргентофильные белки ядрышкообразующих районов – AgNORs (Bio-Optica, Италия) [19, 24, 25]. Морфометрические измерения проводили с помощью микроскопа ЛОМО Микмед-6, оснащенного фотонасадкой (ОАО «ЛОМО», г. Санкт-Петербург), с использованием программных пакетов ImageJ 1.43 и AxioVision 3.4 LE (Carl Zeiss, Германия). Гипертрофию мышечных волокон оценивали путем измерения поперечного сечения мышечных волокон, мкм, в светооптическом микроскопе ЛОМО Микмед-6 на увеличении $\times 400$ [19]. При определении поперечного сечения мышечных волокон, процентного содержания ядер с 1–3 и более гранулами, подсчете среднего количества гранул серебра на одно ядро миосимпласта анализировалось не менее 100 мышечных волокон [25]. Оценка морфометрических показателей производилась по ≥ 20 полям зрения. Гипертрофию мышечных волокон оценивали по совокупности параметров, включавших измерение поперечного сечения мышечных волокон, подсчета среднего количества AgNORs на одно ядро миосимпласта и определения процентного содержания ядер с 1–4 и более ядрышковыми организаторами в сравнении с интактными (контрольными) животными [19, 26].

Взвешивание животных осуществляли перед началом эксперимента и через 1 сут после его завершения на весах VM-512 с ценой деления 10 мг (погрешность измерения ± 10 мг).

Результаты обрабатывали с помощью пакета программ Statistica for Windows 6.0. Для анализируемых признаков предварительно оценивали соответствие закону нормального распределения

по критерию Шапиро – Уилка. В связи с тем, что данные не подчинялись нормальному закону, для описания статистических различий использовался непараметрический критерий Манна – Уитни (U-тест), а результаты представлены в виде медианы, интерквартильного размаха $Me (Q_1; Q_3)$ [27, 28]. Достоверность различий выборок оценивали с помощью непараметрического критерия Манна – Уитни. Динамику показателей в зависимых выборках парных измерений осуществляли с помощью критерия Вилкоксона, который в данном случае является предпочтительным ввиду высокой статистической мощности [27–29]. Для сравнения процентного содержания ядер миосимпластов с 1–4 и более аргирофильными гранулами в группах сравнения был применен критерий χ^2 Пирсона. Количество животных, включенных в анализ, обозначен как *n*. Различия считались достоверными при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты экспериментов показали, что регулярные тренировки не привели к статистически значимому увеличению массы животных контрольной группы ($p = 0,465$). Вместе с тем в обеих испытываемых группах регистрировался равнозначный статистически значимый прирост массы животных. Как следует из табл. 1, многократное воздействие экстремальных физических нагрузок сопровождалось ростом морфометрических показателей мышечного волокна в обеих испытываемых группах животных при одновременном отсутствии статистически значимых изменений анализируемых параметров в контрольной группе крыс. При морфологическом исследовании микропрепарата *m. gastrocnemius* выяснилось, что диаметр мышечного волокна увеличивается при повышении использованной дозы гистохрома. Методами гистологического анализа было показано, что 10-суточное применение препарата «Гистохром» в дозе 1 мг/кг сопровождалось увеличением поперечного сечения мышечных волокон на 19,4%. При десятикратном повышении дозы препарата описываемый показатель возрастал почти в два раза. В то же время при морфометрии в контрольной группе крыс не обнаруживалось статистически значимого увеличения поперечного сечения мышечных волокон после многократного воздействия экстремальных физических нагрузок.

Окрашивание тканей раствором коллоидного серебра зарегистрировало в обеих

испытуемых группах животных статистически значимое увеличение аргирофильных гранул (AgNORs). В контрольной группе крыс среднее

количество гранул серебра на одно ядро миосимпласта оставалось без изменений на протяжении эксперимента.

Т а б л и ц а 1
T a b l e 1

Влияние длительного введения различных доз гистохрома на показатели скелетной мускулатуры крыс, $Me (Q_1, Q_3)$ Effect of prolonged administration of various doses of histochochrome on the rat skeletal musculature, $Me (Q_1, Q_3)$							
Параметр Parameter	Исходные значения, $n = 60$ Starting value	Животные, получавшие гистохром Animals receiving histochochrome					
		Контрольные животные, $n = 20$ Controls, $n = 20$		Доза 1 мг/кг, $n = 20$ Dose 1 mg/kg, $n = 20$		Доза 10 мг/кг, $n = 20$ Dose 10 mg/kg, $n = 20$	
		2-е сут 2 nd day	11-е сут 11 th day	2-е сут 2 nd day	11-е сут 11 th day	2-е сут 2 nd day	11-е сут 11 th day
Масса крыс, г Rat weight, kg	242,7 (225,4; 261,1)	241,2 (220,7; 259,1)	239,5 (221,3; 260,1)	256,1 (242,3; 272,6)	284,1 (272,1; 290,6) $p_k = 0,024$	250,6 (246,1; 262,3)	285,3 (269,8; 294,1) $p_k = 0,038$
Морфометрия, мкм Morphometry, mkm	5,3 (4,6; 6,3)	4,7 (4,2; 5,3)	4,8 (4,5; 5,7)	5,8 (4,9; 6,5) $p_k = 0,002$	6,6 (5,6; 7,8) $p_{2-11} = 0,002$ $p_k < 0,001$	7,2 (6,2; 8,5) $p_k < 0,001$ $p_t < 0,001$	9,3 (8,5; 10,1) $p_{2-11} < 0,001$ $p_k < 0,001$ $p_t < 0,001$
AgNORs	1,5 (1,0; 2,0)	2,0 (1,0; 2,0)	2,0 (1,0; 2,0)	2,0 (2,0; 2,0) $p_k = 0,045$	2,0 (2,0; 3,0) $p_k = 0,002$	2,0 (1,5; 2,0) $p_k = 0,034$	2,0 (2,0; 3,0) $p_t = 0,002$

П р и м е ч а н и е. Уровень значимости различий между значениями, полученными во 2 и 11-е сут (p_{2-11}); рассчитанный относительно контрольных величин соответствующего дня исследования (p_k); между группами животных, получавших различные дозы гистохрома в соответствующие дни исследования (p_t).

Н о т е: p_{2-11} – the level of significance of the differences between the values obtained on Day 2/Day 11; p_k is the significance level of the differences calculated relative to the control values of the corresponding study day; p_t is the level of significance of differences between groups of animals receiving different doses of histochochrome on the respective days.

В результате экстремальных физических нагрузок к 11-м сут наблюдения в контрольной группе крыс почти в два раза увеличилось процентное содержание ядер с тремя AgNORs. Одновременно на 10% возросло количество ядер

миосимпластов с двумя ядрышковыми организаторами. Из приведенных в табл. 2 данных следует, что максимальное увеличение количества AgNORs отмечалось при длительном применении гистохрома в дозе 1 мг/кг ($p < 0,001$). Количество

Т а б л и ц а 2
T a b l e 2

Содержание ядер миосимпластов с 1–4 и более аргирофильными гранулами, % Percentage of nuclei of myosymplast with 1–4 or more argyrophilic granules, %							
Группа животных Group of animals	Срок определения, сут Time interval, days	Количество аргирофильных гранул (AgNORs) в подсчете на 1 ядро симпласта The number of argyrophilic granules (AgNORs) counted for 1 core of the symplast					p^*
		0	1	2	3	≥4	
Интактные, $n = 60$ Intact	0	7	43	42	8	–	–
Контроль, $n = 20$ Controls	2	–	48	38	14	–	0,830
	11	–	34	51	15	–	0,750
Группа 1, 1 мг/кг, $n = 20$ Group 1, 1 mg/kg, $n = 20$	2	–	19	57	22	2	< 0,05
	11	–	5	60	30	5	< 0,001

Группа животных Group of animals	Срок определения, сут Time interval, days	Количество аргирофильных гранул (AgNORs) в подсчете на 1 ядро симпласта The number of argyrophilic granules (AgNORs) counted for 1 core of the symplast					<i>p</i> *
		0	1	2	3	≥ 4	
Группа 2, 10 мг/кг, <i>n</i> = 20 Group 2, 10 mg/kg, <i>n</i> = 20	2	–	25	51	22	2	0,100
	11	–	23	51	22	4	0,100

* сравнение между группами проводили с применением критерия χ^2 Пирсона; сравнение показателей, полученных в подопытных группах животных, проводили с контрольными значениями; сравнение показателей в контрольной группе производили со значениями интактных крыс.

* comparison between groups was performed using the Pearson χ^2 criterion; comparison of the indices obtained in experimental groups of animals was performed with control values; comparison of the parameters in the control group was performed with the values of intact rats.

ядер миосимпластов, содержащих два ядрышко-вых организатора (60%), к моменту завершения исследования почти на 10% превысило аналогичные значения в контрольной группе крыс. Процентное содержание ядер с тремя аргирофильными гранулами на фоне 10-суточного применения 1 мг/кг гистохрома возросло в два раза. Этот показатель возрос до 30% против 15% в контрольной группе крыс.

Через 10 сут введения препарата «Гистохром» в дозе 10 мг/кг количественные характеристики интенсивности биосинтетических процессов *m. gastrocnemius* крыс были сопоставимы со значениями, характерными для контрольной группы животных ($p = 0,100$). Десятикратное увеличение дозы препарата привело к некоторому увеличению в миосимпластах процентного содержания ядер с 3–4 и более AgNORs, не достигших, однако, порога статистической значимости (см. табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

В контрольной группе животных регулярное воздействие экстремальных физических нагрузок, не повлияв на мышечную массу крыс, обеспечило лишь тенденцию к увеличению морфометрических показателей мышечного волокна. Приведенные результаты согласуются с полученными ранее данными о повышении физической выносливости крыс вследствие многократной срочной адаптации к факторам среды большой интенсивности [11, 22]. Отсутствие статистически значимых морфологических изменений в контрольной группе крыс, вероятно, связано с недостаточной интенсивностью и (или) продолжительностью физических нагрузок в данных экспериментальных условиях.

Сочетание многократного воздействия экстремальных физических нагрузок с 10-суточным подкожным введением препарата «Гистохром» в дозах 1 и 10 мг/кг сопровождалось статистически значимым приростом массы животных и дозозависимым изменением морфометрических характеристик мышечных волокон.

Исследования последних лет подтверждают, что диаметр мышечных волокон прямо пропорционально зависит от объема физической работы [19, 30] и уровня биосинтетических процессов [31–33]. Зарегистрированное увеличение поперечного сечения миосимпластов в опытных группах крыс является одним из морфологических признаков гипертрофии мышечных волокон. Не исключено, что описанные изменения обусловлены анаболическим эффектом препарата «Гистохром».

Современным методом визуализации белков-маркеров анаболических процессов в миосимпластах является качественная и количественная оценка эу- и гетерохроматина [26]. За последние годы определен вклад в понимание проблемы функции ядрышек был внесен изучением специальных ядрышковых белков, которые связываются с серебром как с моноклональным антителом (в международной классификации – это аргирофильные белки, связанные с ядрышкообразующими районами AgNORs, nuclear organization region) [33, 34].

Статистически значимое увеличение числа ядрышковых организаторов (AgNORs) в опытных группах крыс указывает на усиление биосинтетических процессов в миосимпластах. Это может свидетельствовать о том, что препарат «Гистохром» дозозависимо индуцирует геномную активность, повышая тем самым анаболические

процессы в скелетной мускулатуре крыс. Показано, что формирование аргирофильных белков в области ядрышкового организатора зависит от активности гена *p53* [30, 35–37]. Это позволяет предположить, что гистохром обладает р53-модулирующей активностью [14, 17, 18]. В то же время установлена прямая зависимость биосинтетических процессов миосимпласов с числом ядрышковых организаторов [30, 33].

Таким образом, результаты представленного эксперимента с учетом косвенных данных и литературы позволяют высказать предположение, что гистохрому свойствен анаболический эффект [17, 18].

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Исследование одобрено локальным этическим комитетом АГМУ (протокол 3 от 20.03.2013).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. ГРАС. Регистрационное удостоверение. URL: [http://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=39892aad-5327-4a6c-99d5-2dc5a51ee2e7&t=\(дата обращения: 07.02.2017\)](http://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=39892aad-5327-4a6c-99d5-2dc5a51ee2e7&t=(дата%20обращения%2007.02.2017)). [GRLS. Product license]. URL: [http://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=39892aad-5327-4a6c-99d5-2dc5a51ee2e7&t=\(access mode: 07.02.2017\)](http://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=39892aad-5327-4a6c-99d5-2dc5a51ee2e7&t=(access%20mode%2007.02.2017)) (in Russ.).
2. Мищенко Н.П., Федореев С.А., Багирова С.А. Новый оригинальный отечественный препарат гистохром®. *Хим.-фармацевт. журн.* 2003; 37 (1): 49–53. [Mishhenko N.P., Fedoreev S.A., Bagirova S.L. New original Russian drug histochrome®. *Him.-farmaceut. zburn.* 2003; 37 (1): 49–53 (in Russ.).]
3. Энциклопедия лекарственных средств; под ред. Ю.Л. Шевченко и др. В 2 т. М.: Ремедиум, 2001: 1175. [Encyclopedia of medicines / pod red. Ju.L. Shevchenko i dr. V 2 t. M.: *Remedium Publ.*, 2001: 1175 (in Russ.).]
4. Закирова А.Н., Иванова М.В., Голубятникова В.Б. Фармакокинетика и клиническая эффективность гистохрома у больных острым инфарктом миокарда. *Эксперим. и клин. фармакол.* 1997; 60 (4): 21–24. [Zakirova A.N., Ivanova M.V., Golubjatnikova V.B. Pharmacokinetics and clinical efficacy of histochrome in patients with acute myocardial infarction. *Jeksperim. i klin. farmakol.* 1997; 60 (4): 21–24 (in Russ.).]
5. Репнин А.Н., Максимов И.В., Марков В.А., Шишканов В.А., Варваренко В.В., Карпов Р.С. Оценка кардиопротекторного действия эмоксипина при тромболитической реперфузии миокарда. *Кардиология.* 1994; (3): 4–7. [Repnin A.N., Maksimov I.V., Markov V.A., Shishkanov V.A., Varvarenko V.V., Karpov R.S. Evaluation of the cardioprotective effect of emoxipin in thrombolytic reperfusion of the myocardium. *Kardiologija.* 1994; (3): 4–7 (in Russ.).]
6. Егоров Г.Б., Алехина В.А., Волобуева Т.М. Новый биоантиоксидант гистохром в клинике глазных болезней. *Вестн. офтальмологии.* 1999; 115 (2): 34–35. [Egorov G.B., Alehina V.A., Volobueva T.M. New bioantioxidant histochrome in the treatment of eye diseases. *Vestn. oftal'mologii.* 1999; 115 (2): 34–35 (in Russ.).]
7. Полуни Г.С., Воробьева О.К., Макашова Н.В. Опыт применения препарата гистохром в офтальмологической практике. *Рефракц. хирургия и офтальмология.* 2003; 3 (2): 23–28. [Polunin G.S., Vorob'eva O.K., Makashova N.V. Histochrome in ophthalmic practice. *Refrakc. hirurgija i oftal'mologija.* 2003; 3 (2): 23–28 (in Russ.).]
8. Козлов В.К., Козлов М.В., Лебедько О.А., Рыжавский Б.Я., Морозова Н.В. Клинико-экспериментальное обоснование применения эхинохрома А для коррекции и профилактики структурно-метаболических нарушений в системе органов дыхания на ранних этапах онтогенеза. *Дальневосточный медицинский журнал.* 2009; (2): 61–64. [Kozlov V.K., Kozlov M.V., Lebed'ko O.A., Ryzhavskij B.Ja., Morozova N.V. Clinical and experimental substantiation of the use of A echinochrome for the correction and prevention of structural and metabolic disturbances in the respiratory system at the early stages of ontogeny. *Dal'nevostochnyj medicinskij vestnik.* 2009; (2): 61–64 (in Russ.).]
9. Талалаева О.С., Жариков А.Ю., Федореев С.А., Зверев Я.Ф., Брюханов В.М., Мищенко Н.П., Лампатов В.В. Влияние гистохрома на экскреторную функцию почек в эксперименте. *Бюллетень сибирской медицины.* 2011; 10 (5): 101–104. [Talalaeva O.S., Zhariikov A.Ju., Fedoreev S.A., Zvereva Ja.F., Brjuhanov V.M., Mishhenko N.P., Lampatov V.V. Effect of histochrome on the excretory function of the kidney. *Vyulleten' sibirskoj mediciny – Bulletin of Siberian Medicine.* 2011; (5): 101–104 (in Russ.).]
10. Патент РФ № 2266737, 12.04.2004. Препарат для лечения геморрагического инсульта и способ лечения геморрагического инсульта. Патент РФ № 2266737, 12.04.2004. Мищенко Н.П., Федореев С.А., Стоник В.А., Козловская Э.П., Гусев Е.И., Гусева М.Р., Мартынов М.Ю. [Patent RF № 2266737, 12.04.2004. A drug for the treatment of hemorrhagic stroke and a method for treating hemorrhagic stroke. Patent of the Russian Federation No. 2266737, April 12, 2004. Mishhenko N.P., Fedoreev S.A., Stonik V.A., Kozlovskaja Je.P., Gusev E.I., Guseva M.R., Martynov M.Ju (in Russ.).]

11. Талалаева О.С., Зверев Я.Ф., Брюханов В.М. Влияние гистохрома на физическую выносливость крыс. *Бюллетень сибирской медицины*. 2016; 15 (4): 97–103. [Talalaeva O.S., Zverev Ja.F., Brjuhanov V.M. The influence of histochochrome on the physical endurance of rats. *Bjulleten' sibirskoj mediciny – Bulletin of Siberian Medicine*. 2016; 15 (4): 97–103 (in Russ.)].
12. Лебедев А.В., Левицкая Е.Л., Тихонова Е.В., Иванова М.В. Антиоксидантные свойства, автоокисление и мутагенная активность эхинохрома А в сравнении с его эстрифицированным аналогом. *Биохимия*. 2001; 66 (8): 1089–1098. [Lebedev A.V., Levickaja E.L., Tihonova E.V., Ivanova M.V. Antioxidant properties, auto-oxidation and mutagenic activity of A echinochrome in comparison with its esterified analogue. *Biobimija*. 2001; 66 (8): 1089–1098 (in Russ.)].
13. Lebedev A.V., Ivanova M.V., Levitsky D.O. Echinochrome, a naturally occurring iron chelator and free radical scavenger in artificial and natural membrane systems. *Life Sci*. 2005; 76 (8): 863–875. DOI: 10.1016/j.lfs.2004.10.007.
14. Кареева Е.Н., Тихонов Д.А., Мищенко Н.П., Федореев С.А., Шимановский Н.Л. Влияние гистохрома на экспрессию p53 в клетках красного костного мозга мышей в условиях модели хронического стресса. *Хим.-фармацевт. журн.* 2014; 48 (3): 9–12. [Kareeva E.N., Tihonov D.A., Mishhenko N.P., Fedoreev S.A., Shimanovskij N.L. The effect of histochochrome on p53 expression in red bone marrow cells of mice under the conditions of the chronic stress model. *Him.-farmaceut. zburn.* 2014; 48 (3): 9–12 (in Russ.)]. DOI: 10.1007/s11094-014-1067-x.
15. Lennikov A., Kitaichi N., Noda K., Mizuuchi K., Ando R., Dong Z., Fukuhara J., Kinoshita S., Namba K., Ohno S., Ishida S. Amelioration of endotoxin-induced uveitis treated with the sea urchin pigment echinochrome in rats. *Mol. Vis*. 2014; 20: 171–177.
16. Eremenko E.M., Antimonova O.I., Shekalova O.G., Polonik S.G., Margulis B.A., Guzhova I.V. Novel compounds increasing chaperone Hsp70 expression and their biological activity. *Tsitologija*. 2010; 52 (3): 235–241. DOI: 10.1134/s1990519x10030065.
17. Seo D.Y., McGregor R.A., Noh S.J., Choi S.J., Mishchenko N.P., Fedoreyev S.A., Stonik V.A., Han J. Echinochrome a improves exercise capacity during short-term endurance training in rats. *Mar. Drugs*. 2015; 13 (9): 5722–5731. DOI: 10.3390/md13095722.
18. Kim H.K., Youm J.B., Jeong S.H., Lee S.R., Song I.S., Ko T.H., Pronto J.R., Ko K.S., Rhee B.D., Kim N., Nilius B., Mischchenko N.P., Fedoreyev S.A., Stonik V.A., Han J. Echinochrome A regulates phosphorylation of phospholamban Ser16 and Thr17 suppressing cardiac SERCA2A CaI- reuptake. *Pflugers Arch*. 2015; 467 (10): 2151–2163. DOI: 10.1007/s00424-014-1648-2.
19. Патент РФ № 2568903, 07.04.2014. Способ оценки анаболического действия лекарственных препаратов. Патент РФ №2568903, 07.04.2014. Мотин Ю.Г., Жариков А.Ю., Лампатов В.В., Талалаева О.С. [Patent RF № 2568903, 07.04.2014. Method for assessing the anabolic effect of drugs. Patent of the Russian Federation No. 2568903, 04/07/2014. Motin Ju.G., Zharikov A.Ju., Lampatov V.V., Talalaeva O.S. (in Russ.)].
20. Мирошников С.В., Нотова С.В., Тимашева А.Б., Маньшина Л.Е. Показатели адаптивности к физической нагрузке лабораторных животных в условиях экспериментального изменения тиреоидного статуса. *Мед. науки. Фундаментальные исследования*. 2012; 10: 73–77. [Miroshnikov S.V., Notova S.V., Timasheva A.B., Man'shina L.E. Indicators of adaptability to physical activity of laboratory animals under conditions of experimental change in thyroid status. *Med. nauki. Fundamental'nye issledovaniya*. 2012; 10: 73–77 (in Russ.)].
21. Dawson C.A., Horvath S.M. Swimming in small laboratory animals. *Med. Sci. Sports*. 1970; (2): 51–78. DOI: 10.1249/00005768-197000220-00002.
22. Horvath S.M., Dawson C.A., Lin Y.C. Regional distribution of 137Cs in rats forced to swim in warm and cold water. *Comp. Biochem. Physiol.* 1970; 37 (2): 265–270. DOI: 10.1016/0010-406x(70)90552-9.
23. Якимович И.Ю., Бородин Д.А., Подрезов И.К., Иванов В.В., Васильев В.Н., Котловский М.Ю., Борисова Л.В. Влияние физически нагрузок на содержание триацилглицеролов в скелетных мышцах у крыс с индуцированным высококалорийной диетой ожирением. *Бюллетень сибирской медицины*. 2014; 13 (1): 92–97. [Jakimovich I.Ju., Borodin D.A., Podrezov I.K., Ivanov V.V., Vasil'ev V.N., Kotlovskij M.Ju., Borisova L.V. Influence of physical activities on the content of triacylglycerols in skeletal muscles in rats with high-density diet induced by obesity. *Bjulleten' sibirskoj mediciny – Bulletin of Siberian Medicine*. 2014; 13 (1): 92–97 (in Russ.)]. DOI: 10.17816/pavlovj2015241-49.
24. Пешков М.В., Дыгало И.И. Метод гистологической проводки тканей с использованием изопропанола и минерального масла. *Архив патологии*. 2009; 71 (3): 39–41. [Peshkov M.V., Dygalo I.I. The method of histological wiring of tissues using isopropanol and mineral oil. *Arbiv patologii*. 2009; 3: 39–41 (in Russ.)].
25. Бобров И.П., Авдалян А.М., Климачев В.В., Лазарев А.Ф., Гервальд В.Я., Долгатов А.Ю., Самуйленкова О.В., Ковригин М.В., Кобяков Д.С. Модификация гистохимического метода выявления ядрышковых организаторов на гистологических срезах. *Архив патологии*. 2010; (3): 35–37. [Bobrov I.P., Avdaljan A.M., Klimachev V.V. Lazarev A.F., Gerval'd V.Ja., Dolgатов A.Ju., Samujlenkova O.V., Kovrigin M.V., Kobjakov D.S. Modification of the histochemical method of detecting nucleolar organizers on histological sections. *Arbiv patologii*. 2010; 72 (3): 35–37 (in Russ.)].
26. Яцковский А.Н. Метод оценки функциональной активности клеточных ядер. *Арх. анат.* 1987; 92 (1): 76–79. [Jackovskij A.N. Method for assessing the functional

- activity of the cell nuclei. *Arb. anat.* 1987; 92 (1): 76–79 (in Russ.).
27. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: МедиаСфера, 2002: 312. [Rebrova O.Yu. Statistical analysis of medical data. Application of the STATISTICA software package. М.: MediaSfera Publ., 2002: 312 (in Russ.).]
28. Хафизьянова Р.Х. Математическая статистика в экспериментальной и клинической фармакологии. М.: Медицина, 2006: 373. [Hafizyanova R.H. Mathematical statistics in experimental and clinical pharmacology. М.: Meditsina Publ., 2006: 373 (in Russ.).]
29. Петри А., Сэбин К. Наглядная медицинская статистика. М.: ГЭОТАР Медиа, 2009: 168. [Petri A., Sebin K. Medical statistics. М.: GEOTAR Media Publ., 2009: 168 (in Russ.).]
30. Bodine S.C., Stitt T.N., Gonzalez M., Kline W.O., Stover G.L., Bauerlein R., Zlotchenko E., Scrimgeour A., Lawrence J.C., Glass D.J., Yancopoulos G.D. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nature Cell Biology.* 2001; 3 (11): 1014–1019. DOI: 10.1038/ncb1101-1014.
31. Белоус А.С., Бирюкова Ю.К., Затолокина М.А., Лавриенко К.И., Лойко Е.А., Маль Г.С., Шевелев А.Б., Трубникова Е.В. Трофические изменения скелетной мускулатуры крыс после фармакотерапии силденафилом и церебролизинем при моделировании ишемии нижних конечностей. *Вестник Российского государственного медицинского университета.* 2016; 4: 69–74. [Belous A.S., Birjukova Ju.K., Zatolokina M.A., Lavrienko K.I., Lojko E.A., Mal' G.S., Shevelev A.B., Trubnikova E.V. Trophic changes in skeletal musculature of rats after pharmacotherapy with sildenafil and cerebrolysin in modeling ischemia of lower limbs. *Vestnik Rossiyskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta.* 2016; 4: 69–74 (in Russ.).]
32. Гудкова А.Я., Шляхто Е.В. Клеточные механизмы гипертрофии миокарда при гипертрофической кардиомиопатии и эссенциальной артериальной гипертензии. *Артериальная гипертензия.* 2008; 14 (4): 373–380. [Gudkova A.Ja., Shljahto E.V. Cellular mechanisms of myocardial hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy and essential arterial hypertension. *Arterial'naja gipertenzija.* 2008; 14 (4): 373–380 (in Russ.).]
33. Cuthbertson D.J., Babraj J., Smith K., Wilkes E., Fedele M.J., Esser K., Rennie M. Anabolic signaling and protein synthesis in human skeletal muscle after dynamic shortening or lengthening exercise. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2006; 290 (4): e731–e738. DOI: 10.1152/ajpendo.00415.2005.
34. Bubulya P.A., Prasanth K.V., Deerinck T.J., Gerlich D., Beaudouin J., Ellisman M.H., Ellenberg J., Spector D.L. Hypophosphorylated SR splicing factors transiently localize around active nucleolar organizing regions in telophase. *J. Cell Biol.* 2004; 167 (1): 51–63. DOI: 10.1083/jcb.200404120.
35. Gudkova A.Ya., Shliakhto E.V., Mamaev N.N., Rybakova M.G., Amineva Kh.K., Semernin E.N., Korzhenevskaja K.V., Zaráiskii M.I. Elevated expression of argenophilic proteins from the nucleolar organizer regions in myocardium of patients with obstructive hypertrophic cardiomyopathy and mutations in p53 tumor suppressor gene. *Tsitologija.* 2003; 45 (11): 1124–1133.
36. Gadbaill A.R., Chaudhary M., Patil S., Gawande M. Actual Proliferating Index and p53 protein expression as prognostic marker in odontogenic cysts. *Oral Dis.* 2009; 15 (7): 490–498. DOI: 10.1111/j.1601-0825.2009.01590.x.
37. Olovnikova I.A., Kravchenkoa J.E., Chumakova P.M. Homeostatic functions of the p53 tumor suppressor: regulation of energy metabolism and antioxidant defense. *Semin. Cancer Biol.* 2009; 19 (1): 32–41. DOI: 10.1016/j.semcancer.2008.11.005.

Поступила в редакцию 23.10.2017

Подписана в печать 15.05.2018

Талалаева Ольга Сергеевна, канд. мед. наук, доцент, кафедра патологической физиологии, АГМУ, г. Барнаул.

Зверев Яков Федорович, д-р мед. наук, профессор, кафедра фармакологии, АГМУ, г. Барнаул.

Брюханов Валерий Михайлович, д-р мед. наук, профессор, кафедра фармакологии, АГМУ, г. Барнаул.

Мотин Юрий Григорьевич, канд. мед. наук, врач-патологоанатом, Краевая клиническая больница, г. Барнаул.

(✉) Талалаева Ольга Сергеевна, e-mail: talalaeva_olga@mail.ru.

УДК 591.473:615.27

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2018-3-131-139>

For citation: Talalaeva O.S., Zverev Ya.F., Bryukhanov V.M., Motin Yu.G. Morphological evidence of anabolic action of the drug histochrome in rats. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2018; 17 (3): 131–139.

Morphological evidence of anabolic action of the drug histochrome in rats

Talalaeva O.S.¹, Zverev Ya.F.¹, Bryukhanov V.M.¹, Motin Yu.G.²

¹ Altay State Medical University (ASMU)
40, Lenin Av., Barnaul, 656038, Russian Federation

² Regional Clinical Hospital
1, Lyapidevskiy Str., Barnaul, 656024, Russian Federation

ABSTRACT

The aim of the investigation was to assess histochrome's anabolic effect as a consequence of treatment of various doses in rats in conditions of prolonged physical training.

Materials and methods. The experiments were performed on the Wistar's rats. Experimental Group 1 was subcutaneously injected with histochrome in a dose of 1 mg/kg ($n = 20$) within 10 days, experimental group 2 was treated subcutaneously at a dose of 10 mg/kg ($n = 20$), and control group 3 received equivolume injections of isotonic sodium chloride ($n = 20$). Rat muscle hypertrophy was induced using the method of forced swimming. A piece of muscle was taken for morphological examination a day after the first and last period of swimming. Hypertrophy of muscle fibers was evaluated by the cross-sectional diameter of muscle fibers, the average quantity of argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) proteins and the percentage of nuclei with 1, 2, 3 or more AgNOR compared to intact (control) animals.

Results. Microscopic morphological examination of *M. gastrocnemius* registered increase in diameter of muscle fiber by 19,4% (1 mg/kg) and by 60% (10 mg/kg). In the control group of rats an increase in a transverse section of muscle fibers was not found to be statistically significant.

The study of biosynthetic nuclei activity of myosimplastus registered increase the AgNOR proteins in both examines groups of animals in comparison the less dynamics in control one. By 10th day of observation the quantity of myosimplastus with two AgNOR increased in a control group of rats by 10%. The maximum AgNOR proteins gained was marked in case of the prolonged use of histochrome in a dose 1 mg/kg.

Conclusion. Histochrome enables the increase in dose-dependent biosynthetic processes in skeletal muscles of rats, providing the development of anabolic effect.

Key words: histochrome, anabolic effect, hypertrophy, muscle fibers.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

SOURCE OF FINANCING

The authors state that there is no funding for the study.

CONFORMITY WITH THE PRINCIPLES OF ETHICS

The study was approved by the local ethics committee under the named after ASMU (Protocol No. 3 of 20.03.2013).

Received 23.10.2017

Accepted 15.05.2018

Talalaeva Olga S., PhD, Associate Professor, Department of Anatomy Patology, ASMU, Barnaul, Russian Federation.

Zverev Yakov F., DM, Professor, Department of Pharmacology, ASMU, Barnaul, Russian Federation.

Bryukhanov Valeriy M., DM, Professor, Department of Pharmacology, ASMU, Barnaul, Russian Federation.

Motin Yuriy G., PhD, Pathologist, RCH, Barnaul, Russian Federation.

(✉) Talalaeva Olga S., e-mail: talalaeva_olga@mail.ru.