

©Коллектив авторов

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭТОКСИДОЛА НА ЭКСПРЕССИЮ ФОЛЛИСТАТИН-ПОДОБНОГО БЕЛКА-1 (FSTL-1) В МИОКАРДЕ КРЫСЫ ПОСЛЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИНФАРКТА

*Е.В. Парфенова¹, Е.С. Зубкова¹, М.А. Болдырева¹, З.И. Цоколаева¹, Ю.В. Олефир²,
Б.К. Романов², А.Б. Прокофьев^{2,3}, В.Г. Кукес^{2,3*}, О.А. Горошко², Т.В. Александрова²,
А.А. Газданова³, О.К. Парфенова³, Н.Г. Сидоров³, А.Д. Андреев³*

¹Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии,
121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15А

²Научный центр экспертизы средств медицинского применения,
127051, Москва, Петровский бульвар, 8, стр. 2; *эл. почта: elmed@yandex.ru

³Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова,
119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

При инфаркте FSTL-1 активно секретируется кардиомицитами, ускоряет рост миофибрилл сердца и стимулирует экспрессию фактора роста эндотелия сосудов. Цель работы заключалась в поиске лекарственного средства, способного влиять на синтез FSTL-1 у крыс после инфаркта миокарда. Опыты проведены на крысах линии Wistar массой 250-350 г с моделированным инфарктом миокарда и без инфаркта (группа 5). В течение 7 и 14 дней животным контрольных групп (группы 1, 2) подкожно вводили физиологический раствор, а животным экспериментальных групп (группы 3, 4) вводили этоксидол 1 раз в сутки в дозе 24 мг/кг (суточная доза составляла 6,36 мг/на животное; средняя масса животного — 265 г). Вводимый объем составлял 200 мкл, концентрация раствора — 31,8 мг/мл. В день операции препарат вводили внутривенно, последующие 7 и 14 дней — подкожно. В начале и в конце исследования концентрацию FSTL-1 в плазме крови определяли методом ИФА. Экспрессию гена *FSTL-1* определяли методом ПЦР. По окончании опытов сердца использовали для гистохимического анализа. Для определения размеров сформировавшегося после инфаркта рубца использовали классический метод окрашивания по Маллори. Полученные результаты показывают, что развитие острого экспериментального инфаркта миокарда сопровождается значительным увеличением экспрессии *FSTL-1* в сердце, которое регистрируется на 7 день и сохраняется повышенным на 14 день после инфаркта. После терапии этоксидолом к 14 дню отмечается тенденция к снижению экспрессии *FSTL-1*, что совпадает с динамикой уровня белка FSTL-1 в плазме крови. Можно предположить, что тенденция к снижению экспрессии *FSTL-1* связана с более успешным процессом репарации после инфаркта, так как FSTL-1 повышается именно в ответ на повреждение миокарда и снижается, когда стимулы к его экспрессии из поврежденной ткани сердца уменьшаются. Косвенно это предположение подтверждается обнаруженной тенденцией к уменьшению размера постинфарктного фиброза при лечении этоксидолом. Полученные результаты свидетельствуют о способности этоксидола влиять на синтез FSTL-1 у крыс после инфаркта миокарда.

Ключевые слова: фоллистатин-подобный белок 1; инфаркт миокарда; этоксидол

DOI: 10.18097/PBMC20206603250

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время показано, что секретируемый гликопротеин фоллистатин-подобный белок 1 (Follistatin-like 1, FSTL-1) вовлечен как в процессы развития организма, так и в процессы формирования патологических состояний и травм; в связи с этим в последнее время активно изучается его участие в механизмах заболевания для разработки новых методов лечения. Последние исследования показывают, что FSTL-1 может быть использован в качестве биомаркера воспаления, ревматоидного артрита, сердечно-сосудистых заболеваний, а также риска возникновения метаболического синдрома и наличия атеросклеротических бляшек коронарных артерий [1-3]. Роль FSTL-1 в иммунитете до конца не изучена: описано как про-, так и противовоспалительное действие данного белка.

FSTL-1 играет важную регуляторную роль в процессах выживания клеток, пролиферации, дифференцировки и миграции, развития органов,

канцерогенезе и метастазировании. Мыши с нокаутом *FSTL-1* умирают при рождении с многочисленными аномалиями развития дыхательной и костной систем [4].

Изучение роли FSTL-1 в развитии острого коронарного синдрома и сердечной недостаточности выявило его потенциал для регенеративной терапии сердца. При инфаркте FSTL-1 активно секретируется кардиомицитами, ускоряет рост миофибрилл сердца и стимулирует экспрессию фактора роста эндотелия сосудов [4, 5], а также ингибирует костный морфогенетический белок-4 (BMP4), принимающий участие в компенсаторных реакциях постинфарктного периода [5]. FSTL-1 продуцируется также клетками эпикарда, однако сразу после инфаркта его концентрация в эпикарде уменьшается [5]. Авторы предположили, что это не позволяет сердцу эффективно восстанавливаться и решили увеличить локальную концентрацию FSTL-1 в пораженном участке сердца, использовав эпикардальную трансплантацию “заплатки” из коллагена, насыщенную

этим белком и обеспечивающую постепенное высвобождение FSTL-1, который, как полагали, должен стимулировать регенеративные процессы. У всех подопытных животных после перенесённого инфаркта миокарда было отмечено существенное улучшение функции сердца, улучшение выживаемости животных и признаки регенерации кардиомиоцитов даже в случае наложения заплатки спустя неделю после перенесенного инфаркта [5]. В другой работе было установлено, что инъекции FSTL-1 могут предотвращать повреждение миокарда, вызванное ишемией, ингибируя апоптоз и воспалительные реакции посредством активации AMP-активируемой протеинкиназы и ингибирования BMP4 [6]. Полученные результаты позволили авторам утверждать, что FSTL-1 может быть стимулятором образования мышечной ткани, в том числе ткани миокарда, и ингибитором образования рубцовой ткани, что указывает на перспективу его применения при сердечной недостаточности.

В клиническом исследовании на пациентах с дилатационной кардиомиопатией изучали профиль экспрессии и клеточное распределение FSTL-1 в миокарде при сердечной недостаточности [7]. Пациентам имплантировали желудочковый аппарат вспомогательного кровообращения на фоне фармакотерапии (лизиноприл, карведилол, спиронолактон и лозартан). Экспрессия FSTL-1, повышенная при сердечной недостаточности, после проведения терапии нормализовалась. Уровни экспрессии FSTL-1 коррелировали с маркером эндотелиальных клеток CD31, что указывает на потенциальную связь с васкуляризацией. Иммуногистохимическая оценка клеточного распределения FSTL-1 показала, что он локализуется в миоцитах, эндотелиальных и гладкомышечных клетках сосудов. Эти данные показывают, что повышенная экспрессия FSTL-1 может быть признаком сердечной недостаточности и связана как с тяжестью заболевания, так и с механизмами, лежащими в основе компенсации, раскрывая новое понимание патогенеза сердечной недостаточности и предлагая новые терапевтические мишени [7]. В связи с этими свойствами FSTL-1 во многих странах проводятся исследования применения экзогенного FSTL-1 у больных с хронической сердечной недостаточностью [7, 8].

Есть и другой путь — стимуляция продукции FSTL-1 препаратами, которые способны ускорять его синтез.

Цель работы заключалась в поиске лекарственного средства, способного влиять на синтез FSTL-1 у крыс после инфаркта миокарда. Для этого мы использовали этилметилгидроксипиридина малат (ЭМГПМ, лекарственный препарат Этоксидол®) — антиоксидантный препарат, обладающий антиишемическими свойствами и мембранопротекторным действием. Мы пошли по этому пути, получив предварительно положительные результаты в эксперименте на здоровых крысах, показывающие, что этоксидол способен увеличивать уровень FSTL-1 в периферической крови [9].

МЕТОДИКА

Моделирование инфаркта миокарда in vivo

Опыты проведены на крысах линии Wistar массой 250–350 г, наркотизированных зоветилом (“Virbac”, Франция). Доступ к сердцу производили путём торакотомии в четвертом межреберье слева. Вскрывали перикард, определяли левую коронарную артерию, под которую с помощью асептической иглы (6-0) подвели тонкую полипропиленовую лигатуру и затягивали.

После наркотизации и перед вскрытием грудной клетки у животных из яремной вены брали кровь в количестве 500 мкл в пробирки с антикоагулянтом (ЭДТА) и центрифугировали при 2000 g для последующего анализа уровня FSTL-1 в плазме.

Протокол эксперимента включал пять групп:

- 1) животные с инфарктом миокарда; выведены из эксперимента на 7 день (n=10);
- 2) животные с инфарктом миокарда; выведены из эксперимента на 14 день (n=2);
- 3) животные с инфарктом миокарда, получавшие этоксидол; выведены из эксперимента на 7 день (n=10);
- 4) животные с инфарктом миокарда; получавшие этоксидол; выведены из эксперимента на 14 день (n=2);
- 5) не оперированные животные (n=3).

Терапию этоксидолом проводили по следующему протоколу: препарат вводили 1 раз в сутки в дозе 24 мг/кг веса (суточная доза составляла 6,36 мг/на животное; средняя масса животного 265 г). Вводимый объём составлял 200 мкл, концентрация раствора — 31,8 мг/мл. В день операции препарат вводился внутривенно, последующие 6 и 14 дней — подкожно. Контрольной группе животных вводили 200 мкл физиологического раствора.

Забор крови и тканей для анализа

При выводе животных из эксперимента проводили повторный забор цельной крови из яремной вены. После извлечения сердца, его отмывали от крови в ледяном растворе NaCl (0,9%) и отделяли левый желудочек. Ткань взвешивали (средняя масса левого желудочка составила 414±79 мг). Далее кусочки миокарда по 100 мг заливали 1 мл TRIzol (“Life Technologies”, США), замораживали в жидком азоте и перетирали до гомогенного состояния.

Выделение и проверка качества РНК

Выделение суммарной РНК из гомогенизированных образцов проводили согласно рекомендациям производителя TRIzol. Кратко: к образцам добавляли по 0,2 мл хлороформа на 1 мл TRIzol и инкубировали 3 мин при 20°C. После центрифугирования (15 мин, 12000 g) собирали верхнюю водную фазу и добавляли к ней изопропиловый спирт (0,5 мл на 1 мл исходного TRIzol), инкубировали 10 мин; после центрифугирования осадок РНК промывали 75% этанолом, высушивали на воздухе и растворяли в 30 мкл стерильной воды.

ВЛИЯНИЕ ЭТОКСИДОЛА НА ЭКСПРЕССИЮ FSTL-1 ПРИ ИНФАРКТЕ

Концентрацию РНК измеряли при 260 нм на спектрофотометре NanoDrop™ 2000 (“Thermo Fisher Scientific”, США). Качество выделения и степень деградации РНК проверяли с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле в TBE буфере (трис-борат-ЭДТА) с 0,5 мкг/мл бромистого этидия при напряжённости поля ~6 В/см. Гели фотографировали в УФ свете с помощью гель-документирующей системы FusionX (“VilberLourmat”, Германия). На рисунке 1 показан электрофорез выделенной РНК в 1,5% агарозном геле.

Показателем целостности РНК является соотношение фрагментов 28S и 18S рибосомальной РНК. Для дальнейшего анализа использовали только препараты РНК высокого качества (28S/18S>1).

Определение относительной экспрессии мРНК FSTL-1 методом ПЦР в реальном времени

Полученную РНК использовали для синтеза кодирующей ДНК (кДНК) с олиго (дТ)-праймером при помощи набора RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (“Fermentas”, Латвия) в соответствии с протоколом производителя. ПЦР в реальном времени проводили в амплификаторе StepOnePlus™ Real-Time PCR System (“Applied Biosystems”, США). Реакционная смесь содержала смесь реактивов (“Синтол”, Россия), включая интеркалирующий флуоресцентный краситель SybrGreen I, праймеры (10 пмоль каждого олигонуклеотида) и кДНК (1-5 нг кДНК). После начальной стадии денатурации (95°C, 10 мин) были проведены 40 циклов амплификации с отжигом и элонгацией

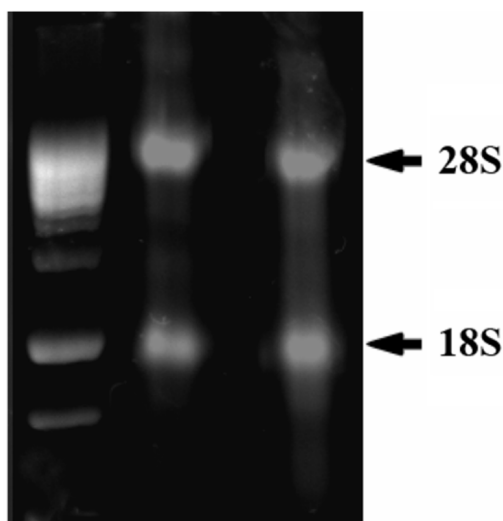


Рисунок 1. Электрофоретическое разделение препаратов РНК миокарда крыс в 1,5%-м агарозном геле. Окрашивание бромистым этидием. Стрелки указывают положения 28S и 18S рибосомальных РНК.

Таблица 1. Олигонуклеотидные последовательности праймеров

Целевой ген	Прямой праймер	Обратный праймер	Длина ампликона
<i>ratActB</i>	ACC CGC GAG TAC AAC CTT CTT	TAT CGT CAT CCA TGG CGA ACT	76 п.о.
<i>ratActc1</i>	CAC GGC ATT ATC ACC AAC TG	AAC AAT GCC TGT GGT TCT CC	240 п.о.
<i>FSTL-1</i>	TCT GCG CCA ATG TGT TTT GTG G	TGA GGT AGG TCT TGC CAT TAC TG	135 п.о.

при 60°C в течение 60 с. Специфичность амплификации оценивали после завершения ПЦР при анализе кривых плавления продуктов в диапазоне температур от 60°C до 99°C. Каждый образец амплифицировали в трёх технических повторях. Олигонуклеотидные последовательности праймеров, специфичные к FSTL-1 крысы, были подобраны с помощью программного обеспечения Primer3Plus на основе последовательностей мРНК FSTL-1, задепонированных в базе данных NCBI (National Center for Biotechnological Information, США) под номерами XM_017598075.1 и NM_024369.2. Синтез праймеров осуществлен в “Евроген” (Россия). Последовательности указаны в таблице 1.

Для нормирования экспрессии кДНК FSTL-1 в качестве референсных использовали гены, кодирующие α-кардиальный (сердечный) актин (ACTC1) и β-цитоплазматический актин (ACTB). Расчёт относительной экспрессии кДНК FSTL-1 проводили, оценивая ΔΔCt, как описано в [10].

Оценка FSTL-1 в плазме крови крыс с инфарктом миокарда до и после лечения этоксидолом

FSTL-1 в плазме крови крыс с инфарктом миокарда до и после лечения этоксидолом оценивался методом иммуноферментного анализа с использованием набора ИФА фирмы “Abcam” (США) (кат. №ab246546).

Морфометрическая оценка размера инфаркта

Для гистохимического анализа каждый образец сердца помещался в отдельную кювету с Tissue-Tek (“Sakura Finetechnical Co.”, Япония) и замораживался в парах жидкого азота. Кюветы хранились при температуре -70°C. С каждого замороженного фрагмента на криостате при температуре -21°C были получены замороженные срезы толщиной 7 мкм. Стекла со срезами хранились при температуре -20°C. Для определения размеров сформировавшегося после инфаркта рубца использовали классический метод окрашивания по Маллори с использованием красителей, специфичных к соединительной ткани. Срезы фиксировали в 4% растворе формалина в фосфатном буфере в течение 2 мин. Промывали 2 раза в фосфатном буфере в течение 5 мин, далее срезы обезжиривали в ацетоне в течение 20 мин, после чего высушивали при комнатной температуре. Срезы окрашивали в 0,1% растворе кислого фуксина в течение 3 мин, ополаскивали водой, опускали на 3-5 мин в 1% раствор фосфорномолибденовой кислоты, после чего ещё раз ополаскивали в фосфатном буфере и окрашивали смесью красителей: 5% раствор анилиновый синий / 2% Оранж G / 2% щавелевой кислоты / H₂O. Срезы ополаскивали дистиллированной водой, дегидратировали с помощью иммерсии в растворах этанола восходящей

концентрации (80%, 96%, 100%) и в толуоле, заливали в канадский бальзам (“Sigma”, США). Миокард окрашивался в ярко-красный цвет, соединительная ткань и коллаген — в голубой, эритроциты — в жёлтый. С полученных гистологических препаратов поперечных срезов на трёх уровнях сердца с помощью цифровой камеры получали фотоизображения, которые затем анализировали на компьютере с помощью программы ImageJ Software.

Для оценки размера рубца использовали следующие параметры: площадь рубца (в процентах от площади стенок левого желудочка (ЛЖ); длина рубца в % от эпикардальной окружности сердца и длина рубца в % от эндокардиальной окружности ЛЖ. Размер инфаркта выражался как отношение площади инфаркта к площади всего левого желудочка. Данные по каждому животному усреднялись по 3-4 срезам.

Статистическая обработка данных

Данные представлены в формате среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (для параметрического распределения) или стандартное отклонение (для непараметрических распределений). Статистическую обработку результатов выполняли в пакете Statsoft Statistica 6.0 с использованием t-критерия Стьюдента или U-критерия Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Данные анализа изменения относительной экспрессии мРНК *FSTL-1* представлены на рисунке 2 и в таблице 2. Как видно из рисунка 2, экспрессия мРНК *FSTL-1* была повышена в несколько раз на 7 день после инфаркта (группы 1 и 2) по сравнению с экспрессией мРНК *FSTL-1* в неповреждённом миокарде крысы (группа 5, “интактные животные”). Достоверных различий между группами с введением этоксида и без введения этоксида не было выявлено. На 14 день после инфаркта в группе с этоксидом (группа 4) и без этоксида (группа 2) было по 2 крысы. Видно, что повышенная экспрессия *FSTL-1* сохраняется и на 14 день, но небольшое

Таблица 2. Уровень экспрессии мРНК *FSTL-1* относительно группы 1 (инфаркт миокарда – 7 день, без лечения этоксидом)

	FSTL-1	
	Референсный ген <i>ActB</i>	Референсный ген <i>Actc1</i>
Группа 5	0,30 \pm 0,08	N/A
Группа 1	1 \pm 0,42	1 \pm 0,70
Группа 3	0,9 \pm 0,33	0,98 \pm 0,49

Примечание. N/A – данные не представлены, поскольку экспрессия сердечного актина ACTC1 почти в 15 раз выше у животных без инфаркта (группа 5) и в данном случае этот ген не может использоваться в качестве референсного.

количество животных в группах не позволяет делать какие-либо выводы о различиях между группами.

Как было отмечено выше, выбор референсных генов при изучении изменений транскрипции на моделях, связанных с повреждением ткани — сложная задача, поскольку основным критерием выбора референсного гена, по экспрессии которого оценивают возможные ошибки, связанные с различной концентрацией кДНК в образцах, является относительное постоянство уровня его экспрессии при всех экспериментальных условиях. При инфаркте происходит гибель значительного количества кардиомиоцитов, причём у различных животных гибнет различное количество клеток. Возможно, различия в экспрессии *FSTL-1* при действии этоксида были бы более заметны, если бы все животные имели одинаковый размер инфаркта. Однако добиться этого практически невозможно. Единственным решением может быть включение в эксперимент большого количества животных с последующим отбором животных с одинаковыми размерами инфаркта. Также в последующих работах необходимо будет проверить содержание *FSTL-1* в ткани миокарда с помощью специфических антител, и таких белков как миостатин и активин- α (ИФА, иммуногистохимия), так как действие этоксида, возможно, реализуется не через влияние на экспрессию гена этого фактора, а через посттранскрипционные механизмы.

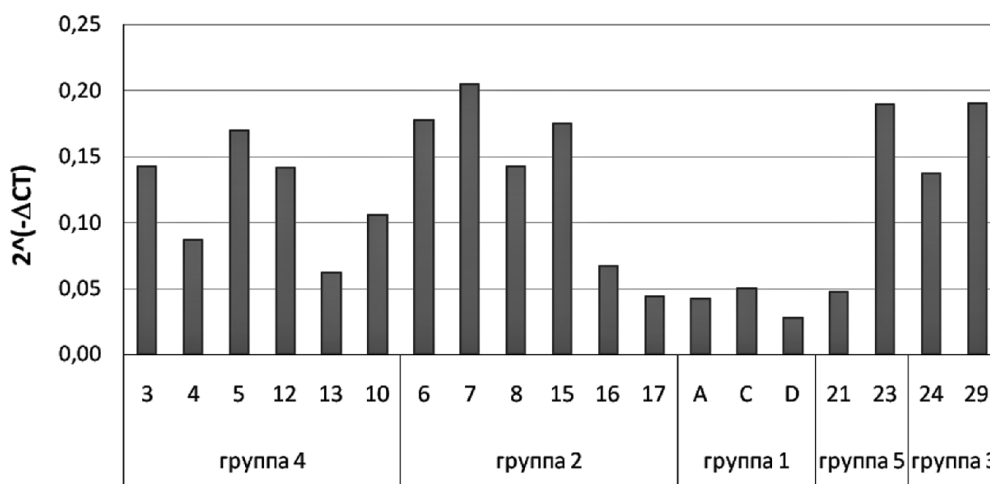


Рисунок 2. Относительная экспрессия мРНК *FSTL-1* против *ActB*. *ActB* – актин β -цитоплазматический.

При анализе концентрации FSTL-1 в плазме крови было выявлено, что уровень FSTL-1 увеличивается в общем кровотоке после острого инфаркта миокарда (рис. 3, табл. 3). Введение этоксидаola приводило к снижению концентрации FSTL-1 в плазме крови как на 7 день, так и на 14 день ($p<0,05$). Однако такой вывод для групп 2 и 4 нуждается в подтверждении на большем количестве экспериментальных животных.

На рисунке 4 представлена концентрация FSTL-1 в плазме крови крыс контрольных и экспериментальных групп.

Данные морфометрической оценки размера инфаркта сердца крыс представлены в таблице 4 и на рисунке 5.

Полученные результаты указывают на тенденцию к уменьшению размера рубца и площади инфаркта у крыс, получавших лечение этоксидаолом, которая не достигла уровня статистической значимости, возможно, из-за недостаточного количества животных в группах. Это диктует необходимость более расширенного исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Впервые продемонстрирована способность антиоксидантного лекарственного средства этоксидаол влиять на регуляцию FSTL-1 у крыс после инфаркта миокарда. Полученные результаты показывают, что развитие острого экспериментального инфаркта миокарда сопровождается значительным увеличением экспрессии FSTL-1 в сердце. После терапии этоксидаолом к 14 дню отмечается тенденция к снижению экспрессии FSTL-1, что совпадает с динамикой уровня белка FSTL-1 в плазме крови.

Можно предположить, что тенденция к снижению экспрессии FSTL-1 связана с более успешным процессом репарации после инфаркта, так как FSTL-1 повышается именно в ответ на повреждение миокарда и снижается, когда стимулы к его экспрессии из повреждённой ткани сердца уменьшаются. Косвенно это предположение подтверждается обнаруженной тенденцией к уменьшению размера постинфарктного фиброза при лечении этоксидаолом.

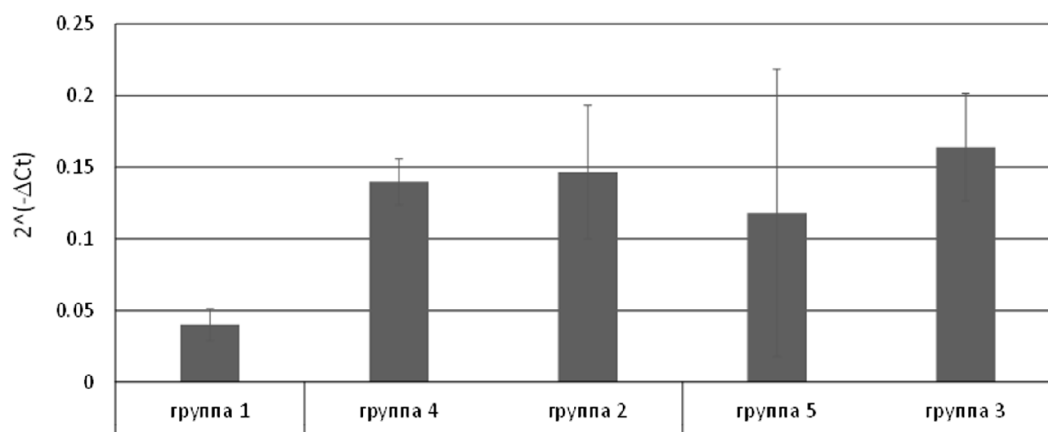


Рисунок 3. Экспрессия *FSTL-1* в ткани миокарда крыс после экспериментального инфаркта и терапии этоксидаолом. Группа 1 – инфаркт на 7 день, без этоксидаола; группа 2 – инфаркт на 14 день, без этоксидаола; группа 3 – инфаркт на 7 день, с этоксидаолом; группа 4 – инфаркт на 14 день, с этоксидаолом; группа 5 – животные без инфаркта. Достоверные различия в экспрессии выявлены между группой 5 и 3, 5 и 1 ($p<0,05$).

Таблица 3. Концентрация FSTL-1 в плазме крови крыс с инфарктом миокарда до и после лечения этоксидаолом

	Концентрация FSTL-1 в начале эксперимента, пг/мл (M± SD)	Концентрация FSTL-1 в конце эксперимента, пг/мл (M± SD)	Достоверность между данными в начале и конце эксперимента, p
Группа 1 – инфаркт, 7 дней без этоксидаола	25927,67±4988,0	26173,78±6347,4	0,520
Группа 2 – инфаркт, 14 дней, без этоксидаола	26399,3±2191,7	20533,3±3856,3	0,400
Группа 3 – инфаркт, 7 дней, с этоксидаолом	30358,43±2866,5	24746,17±9282,1	0,045
Группа 4 – инфаркт, 14 дней, с этоксидаолом	28013,35±4897,8	14695,7±3710,8	0,040

Таблица 4. Морфометрическая оценка размера инфаркта сердца крыс на 7 день терапии этоксидаолом

	Контроль (n=3)	Этоксидаол (n=4)
Площадь рубца в % от площади стенок ЛЖ	25,75±6,24	20,40±2,06
Длина рубца в % от эпикардальной окружности сердца	35,67±7,49	30,22±2,97
Длина рубца в % от эндокардиальной окружности ЛЖ	56,00±7,10	42,83±4,57

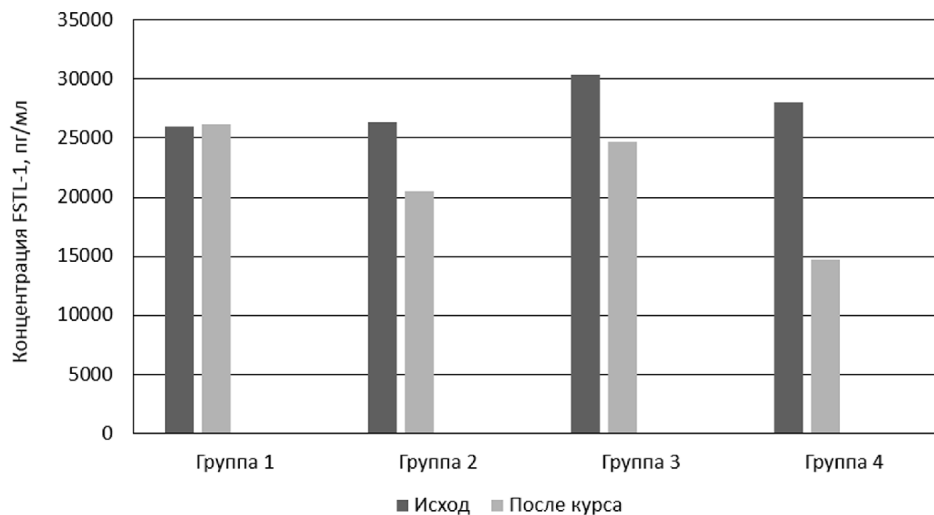


Рисунок 4. Относительная концентрация FSTL-1 в плазме крови крыс с инфарктом миокарда до и после курса этоксида. 1 – 7 дней контроль, 2 – 14 дней контроль, 3 – 7 дней курса этоксида, 4 – 14 дней курса этоксида.

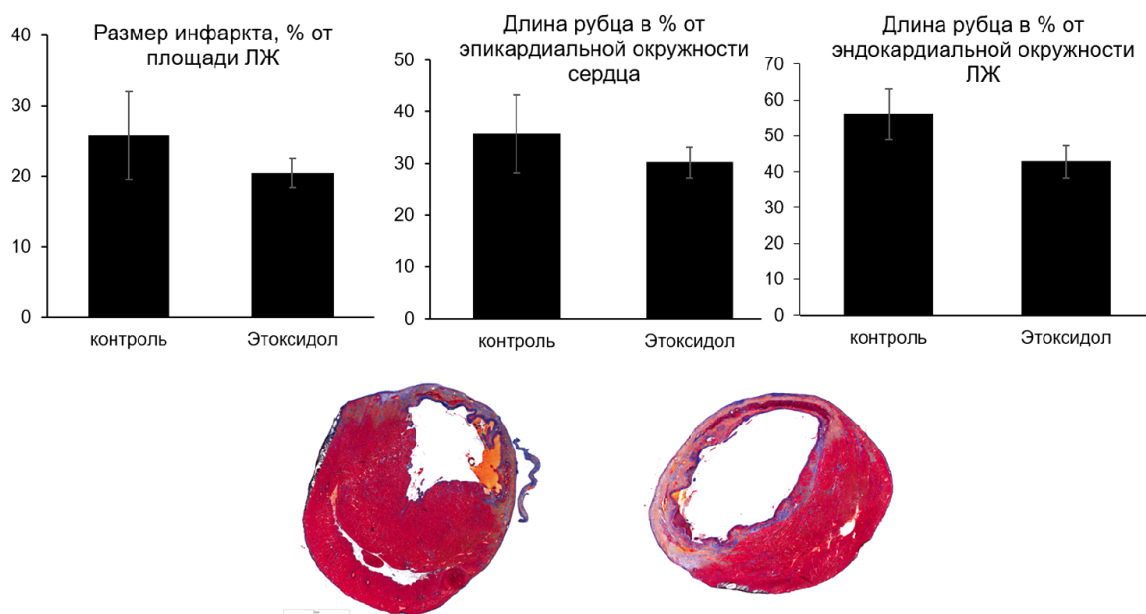


Рисунок 5. Морфометрическая оценка размера экспериментального инфаркта на срезах сердца крыс в результате терапии этоксилом (7 день).

БЛАГОДАРНОСТИ

Благодарим коллектив Национального медицинского исследовательского центра кардиологии, который принимал участие в проведении данного эксперимента.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №19-15-00384).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При выполнении исследований придерживались правил и норм гуманного обращения с экспериментальными животными. Исследование проводили в соответствии с правилами основных

документов, регламентирующих проведение экспериментов на лабораторных животных и условия их содержания: “Правила надлежащей лабораторной практики”, утвержденные приказом Минздрава России №199н от 1 апреля 2016 г., и Директива 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. Хирургические манипуляции и процедуры эвтаназии, разработанные в соответствии с национальными и европейскими директивами, были одобрены управлением по этике и уходу за животными (Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии, разрешение № 385.06.2009).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lee S.Y., Kim D.Y., Kyung Kwak M., Hee Ahn S., Kim H., Kim B.J., Koh J.M., Rhee Y., Hwa Kim C., Hyun Baek K., Min Y.K., Hun Lee S., Kang M.I. (2019) *Endocr. J.*, **66**(3), 241-251.
2. Chaly Y., Hostager B., Smith S., Hirsch R. (2014) *Immunol. Res.*, **59**(1-3), 266-272.
3. Peters M.M.C., Meijis T.A., Gathier W., Doevendans P.A.M., Sluijter J.P.G., Chamuleau S.A.J., Neef K. (2019) *Mini Rev. Med. Chem.*, **19**(16), 1379-1389.
4. Geng Y., Dong Y., Yu M., Zhang L., Yan X., Sun J. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**(17), 7058-7063.
5. Wei K., Serpooshan V., Hurtado C., Diez-Cuñado M., Zhao M., Maruyama S., Zhu W., Fajardo G., Nosedá M., Nakamura K. et al (2015) *Nature*, **525**, 479-485.
6. Ogura Y., Ouchi N., Ohashi K., Shibata R., Kataoka Y., Kambara T., Kito T., Maruyama S., Yuasa D., Matsuo K., Enomoto T., Uemura Y., Miyabe M., Ishii M., Yamamoto T., Shimizu Y., Walsh K., Murohara T. (2012) *Circulation*, **126**(14), 1728-1738.
7. Lara-Pezzi E., Felkin L.E., Birks E.J. (2008) *Endocrinology*, **149**(11), 5822-5827.
8. Shimano M., Ouchi N., Nakamura K., van Wijk B., Ohashi K., Asaumi Y., Higuchi A., Pimentel D.R., Sam F., Murohara T., van den Hoff M.J., Walsh K. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**(43), E899-E906.
9. Кукес В.Г., Олефир Ю.В., Романов Б.К., Прокофьев А.Б., Парфенова Е.В., Болдырева М.А., Горошко О.А., Парфенова О.К., Газданова А.А., Демченкова Е.Ю. (2019) Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения, **9**(4), 256-260. [Kukes V.G., Olefir Y.V., Romanov B.K., Prokofiev A.B., Parfenova E.V., Boldyreva M.A., Goroshko O.A., Parfenova O.K., Gazdanova A.A., Demchenkova E.Y. (2019) *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*, **9**(4), 256-260.]
10. Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001) *Methods*, **25**, 402-408.

Поступила в редакцию: 31. 03. 2020.
После доработки: 19. 05. 2020.
Принята к печати: 21. 05. 2020.

STUDY OF THE INFLUENCE OF ETOXIDOL ON EXPRESSION OF FOLLISTATIN-LIKE PROTEIN-1 (FSTL-1) IN MYOCARDIUM AFTER EXPERIMENTAL INFARCTION IN RATS

E.V. Parfenova¹, E.S. Zubkova¹, M.A. Boldyreva¹, Z.I. Tsokolaeva¹, Yu.V. Olefir², B.K. Romanov², A.B. Prokofiev^{2,3}, V.G. Kukes^{2,3}, O.A. Goroshko², T.V. Aleksandrova², A.A. Gazdanova³, O.K. Parfenova³, N.G. Sidorov³, A.D. Andreev³*

¹National Medical Research Center of Cardiology,
15A, 3rd Cherepkovskaya str., Moscow, 121552 Russia

²Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8-2 Petrovsky blv., Moscow, 127051 Russia; *e-mail: elmed@yandex.ru

³I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University),
8-2 Trubetskaya str., Moscow, 119991 Russia

In heart attack, FSTL-1 is actively secreted by cardiomyocytes, accelerates growth of heart myofibrils and stimulates of vascular endothelial growth factor expression. The aim of this work was to investigate the effect of Etoxidol on synthesis of FSTL-1 in rats after myocardial infarction. The experiments were performed on Wistar rats weighing 250-350 g with simulated myocardial infarction or intact (group 5). Animals of control groups (groups 1, 2) were treated with saline for 7 and 14 days; Etoxidol (24 mg/kg) was injected to animals of experimental groups (group 3, 4) (the daily dose was 6.36 mg/animal) for 6 or 14 days. The injection volume was 0.2 ml. At the beginning and at the end of the study plasma concentrations of FSTL-1 were determined by the ELISA method. Myocardial *FSTL-1* gene expression was determined by real-time PCR. At the end of the experiments, the hearts were also used for histochemical analysis. To determine the size of the scar formed after the modeled heart attack, we used the classic Mallory staining method. The results show that the development of experimental acute myocardial infarction is accompanied by a significant increase in *FSTL-1* expression in the heart, which was detected on the 7th day and stored increased by 14 days after a heart attack. After therapy with Etoxidol, a tendency to a decrease in the expression of *FSTL-1* by the 14th day was observed; it coincided with the dynamics of the plasma protein FSTL-1 level. It can be assumed that the downregulation trend in the *FSTL-1* expression is associated with a more effective repair process after a heart attack, since FSTL-1 increases precisely in response to myocardial damage and decreases when the incentives for its expression from damaged heart tissue are reduced. Indirectly, this assumption is confirmed by the detected tendency to reduce the size of post-infarction fibrosis in the treatment with Etoxidol. The results indicate the ability of Etoxidol to influence FSTL-1 synthesis of in rats after myocardial infarction.

Key words: follistatin-like protein 1; myocardial infarction; etoxidol

Funding. The Russian Science Foundation (project number 19-15-00384) supported this work.

Received: 31.03.2020, revised: 19.05.2020, accepted: 21.05.2020.