УДК 616-005.4: 615.217.34:547.756

Н. А. Цубанова

Вплив спіроциклічного похідного оксіндолу на показники енергетичного обміну та гістоструктуру міокарда за умов гострої ізадринової патології

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

Ключові слова: спіроциклічне похідне оксіндолу, кардіопротекторний ефект, гістоструктура міокарда, енергетичний обмін

Пошук обґрунтованих шляхів впливу на патогенетичні механізми розвитку серцево-судинних захворювань (ССЗ) залишається актуальною проблемою сучасної фармації та медицини [8, 10, 12, 15]. Відомо, що провідна ланка в патогенезі ССЗ – це гіпоксичні ураження, на тлі яких відбувається порушення процесів енергоутворення [2, 11, 13] та активація вільно-радикального окиснення структурних ліпідів біологічних мембран [9, 14]. Набутий енергодефіцит та пригнічення енергозалежних процесів обумовлює введення в сучасні схеми фармакотерапії ССЗ антигіпоксантів, здатних відновлювати енергетичний метаболізм клітини [2, 3, 8]. Одним із таких препаратів є мексидол – засіб з антигіпоксантною та метаболічною дією, для якого доведена доцільність застосування при серцево-судинних захворюваннях [5].

Перспективною в плані пошуку нових антигіпоксантів для терапії ССЗ є оригінальна сполука – 4,3'-спіро [(2-аміно-3-ціано-4,5-дигідропірано [3,2-c]хромен-5-он)-5-метил-2'-оксіндол] (у подальшому сполука 77, синтезована у НФаУ канд. фарм. наук Р. Г. Редькіним та професором Л. А. Шемчуком), для якої в попередніх дослідженнях доведена значна антигіпоксантна активність [6].

Суттєвий інтерес становить стан метаболізму серцевого м'яза за умов гострої патології, що в наступному може бути відправним пунктом для пошуку речовин з антигіпоксичною, антиоксидантною та енергозберігаючою дією. *Мета дослідження* – вивчення впливу нової сполуки на енергетичний обмін та гістоструктуру міокарда за умов гострого ізадринового міокардиту для виявлення можливої кардіопротекторної дії.

Матеріали та методи. Ізадриновий міокардит викликали в білих безпорідних щурів-самців масою 190–240 г внутрішньом'язовим уведенням розчину ізадрину в дозі 60 мг/кг протягом 4-х діб [1]. Ізадрин викликає підвищення роботи серця та потреби міокарда в кисні, що призводить до гіпоксії та ішемії серцевого м'яза. Розвивається активація лізосомальних ферментів та аутоліз кардіоміоцитів, спостерігається типова запальна реакція з перевагою проліферативних процесів. Сполуку 77 у дозі 5 мг/кг, що має найбільший антигіпоксантний ефект [6], вводили щодня в шлунок у лікувально-профілактичному режимі протягом 6 діб (4 доби на тлі введення ізадрину та 2 доби після моделювання міокардиту). Препарат порівняння мексидол виробництва ВАТ «Мир-фарм», Росія, уводили щурам-самцям у дозі 100 мг/кг за аналогічною схемою. Контрольні тварини одержували еквівалентну кількість води.

Для оцінки впливу сполуки 77 на енергетичний обмін досліджували вміст у міокарді макроергічних фосфатів – АТФ, АДФ, АМФ (мкмоль/г сухої ваги тканини серця). Обробку екстрактів проводили за допомогою наборів реактивів фірми «Мангайм» (Німеччина). Для дослідження вмісту макроергів використовували метод Лампрехта та Тротшольда [7].

Енергетичний заряд розраховували за наступною формулою [2]:

$$\text{Енергетичний заряд} = \text{АТФ} + 0{,}5\text{АДФ} / \text{АТФ} + \text{АДФ} + \text{АМФ}$$

© Н. А. Цубанова, 2012

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми Statistika 6.0. з використанням критерію Ст'юдента.

Для гістологічного дослідження проводили фіксування сердець щурів усіх груп після повної зупинки скорочення органа в 10 % розчині формаліну. Поперекову пластинку із серця тварин вирізали через увесь орган на рівні середини обох шлуночків. Зразки зневоднювали в спиртах зростаючої міцності, занурювали в целоїдин-парафін. Мікротомовані зрізи фарбували гематоксиліном та еозином [4]. Мікроскопічне вивчення препаратів проводили під мікроскопом Mikros 400. Мікрофотографування здійснювали цифровим фотоапаратом Nicon Col Pix4500. Фотознімки обробляли на комп'ютері Pentium 4GH за допомогою програми Nicon View 5. Морфологічні дослідження проведені на базі ЦНДЛ НФаУ за допомогою ст. наук. співроб. Ю. Б. Лар'яновської.

Результати та їх обговорення. Відомо, що ферменти дихального ланцюга та дегідрогенази циклу Кребса багато в чому визначають інтенсивність аеробного окиснення – основного шляху утворення енергії. У зв'язку із цим важливо було дослідити динаміку вмісту АТФ та її метаболітів. Проведені біохімічні дослідження з встановлення вмісту аденілових нуклеотидів у серцевому м'язі на тлі гострого ізадринового міокардиту показали, що модельна патологія викликає значні зсуви в енергетичному обміні міокарда (таблиця).

Не зважаючи на включення компенсаторних біохімічних механізмів, у тварин групи контрольної патології зареєстровано розвиток значного енергодефіциту. Одночасно зі зменшенням на 36 % умісту АТФ було виявлено накопичення продуктів її розпаду – АДФ і АМФ, та вірогідне зниження енергетичного заряду, інтегративного показника, що об'єднує три компоненти аденілової системи.

Уведення сполуки 77 стабілізувало енергетичний обмін міокарда до рівня показників інтактного контролю. Вірогідне підвищення вмісту АТФ (на 46 % відносно контрольної патології), зниження АДФ та АМФ (на 23 та 40 % відносно контрольної патології відповідно) та відновлення енергетичного заряду свідчать про здатність нової сполуки попереджувати розвиток енергетичного дефіциту активності на рівні мексидолу.

За даними проведених гістологічних досліджень установлено, що в інтактних щурів міокард мав вигляд єдиного масиву жмутків серцево-м'язових волокон, що змінювали свій напрям. Синтиціальна структура масиву волокон не змінена, на погляд волокна однакові за товщиною, рівномірно пофарбовані, помірно анастомозують між собою. Кардіоміоцити у волокнах розташовані послідовно один за одним. Ядра кардіоміоцитів витягнутої або овальної форми, звичайні за розміром та локалізацією, нормохромні, з чіткою хроматиновою субстанцією, ядерцем. Простежувалася поперечна посмугованість міофібрил. Міжволокневі та міжжмут-

Таблиця

Вплив сполуки 77 та мексидолу на показники енергетичного обміну в міокарді щурів із гострим ізадриновим міокардитом (n = 6)

Показник	Групи тварин			
	Інтактний контроль	Контрольна патологія	Сполука 77, 5 мг/кг	Мексидол, 100 мг/кг
АТФ, мкмоль/г	6,02±0,16	3,88±0,17***	5,69±0,13##	5,24±0,15*#
АДФ, мкмоль/г	0,81±0,03	1,07±0,04**	0,83±0,03#	0,85±0,02#
АМФ, мкмоль/г	0,38±0,01	0,68±0,02***	0,41±0,01##	0,44±0,02##
Енергетичний заряд	0,890±0,002	0,782±0,005***	0,880±0,005##	0,866±0,003**##

*Примітка. *Достовірні відмінності з показниками групи інтактного контролю, P < 0,05; ** достовірні відмінності з показниками групи інтактного контролю, P < 0,01; *** достовірні відмінності з показниками групи інтактного контролю, P < 0,001; # достовірні відмінності з показниками контрольної патології, P < 0,01; ## достовірні відмінності з показниками контрольної патології, P < 0,001.*

кові проміжки помірні. Уміст сполучнотканинних клітин у міжжмуткових та міжволокневих прошарках не значний. Дрібні вени в зовнішніх шарах міокарда повнокровні. Артерії дрібного та середнього калібру мали звичайні за товщиною судинні стінки, просвіт судин помірний (рис. 1).

У тварин групи контрольної патології в міокардіальній структурі виявлені виразні порушення у вигляді різного розміру ділянок деструкції серцево-м'язових волокон (мікронекрози). Найчастіше вогнища деструкції локалізувалися в лівому шлуночку, а саме у найвразливіших функціонально зонах – сосочкових м'язах, рідше в субепікардіальних та середніх пластах м'язових волокон. На місцях деструкцій загиблі фрагменти волокон заміщувалися клітинними інфільтратами, в складі яких були переважно лімфо-гістіоцитарні елементи з домішкою недиференційованих клітин. Інфільтрати мали, головним чином, ізольований вогнищевий характер, але місцями мали вигляд полосоподібних скупчень (рис. 2 а, б). Зрідка виявляли більш «свіжі» пошкодження волокон. Вони охоплювали невеликі групи кардіоміоцитів з просвітленою цитоплазмою, розбухлими міофібрилами, лізованими або гіпохромними ядрами. У стромі поруч з такими кардіоміоцитами спостерігали збільшену клітинну насиченість. Місцями видно нашарування «свіжих» та «старих» пошкоджень (рис. 2 в). На ділянках міокарда, що зберігали свою структуру, стан волокон без особливостей, хоча місцями деякі волокна були набряклі, поперекова посмугованість міофібрил часто затушована.

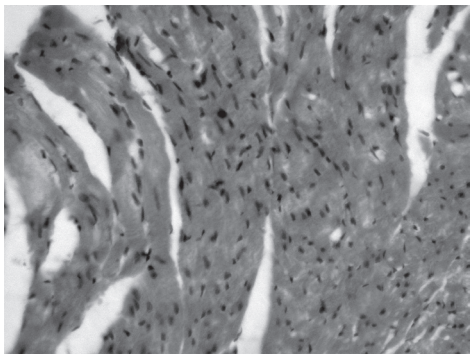

Рис. 1. Міокард інтактного щура. Нормальний стан серцево-м'язових волокон (ділянка сосочкових м'язів лівого шлуночка). Гематоксилін-еозин. × 200.

Уведення сполуки 77 сприяло значному покращанню стану серцевого м'яза. У переважної більшості щурів вогнища деструкції мали поодинокий, дрібний характер, виявлені лише на верхівках сосочкових м'язів лівого шлуночка.

Клітинні інфільтрати, що формувалися на місці пошкоджених фрагментів волокон, мали в своєму складі не лише лімфоцитарно-гістіоцитарні елементи, а й молоді фібробластичні клітини, що свідчило про початок процесу репарації. У деяких випадках мали місце не мікронекрози, а субміліарні клітинні скупчення (рис. 3). «Свіжі» пошкодження серцевого м'яза були відсутні, де-не-де посилена клітинна насиченість міжжмуткових проміжків. Загалом, меншим було набухання міофібрил, виразнішою поперекова посмугованість волокон.

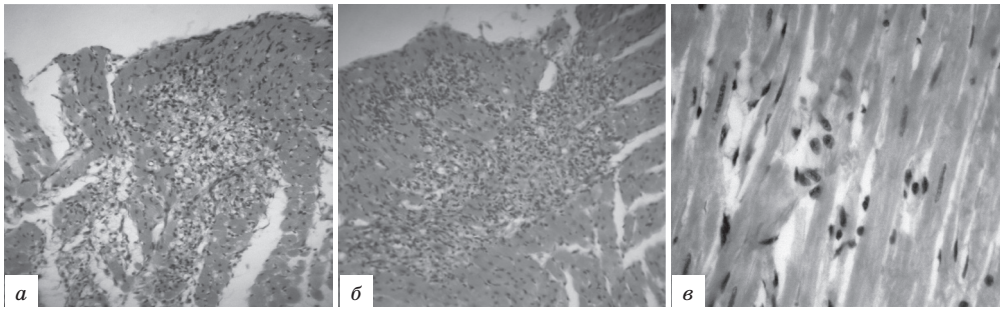

Рис. 2. Міокард щура після введення ізадрину. Обширні клітинні інфільтрати («старі» пошкодження) на місці загиблих волокон у сосочкових м'язах (а) та середніх пластах м'язових волокон (б) лівого шлуночка; «свіже» пошкодження групи кардіоміоцитів (в). Гематоксилін-еозин. а-б – × 100, в – × 200.

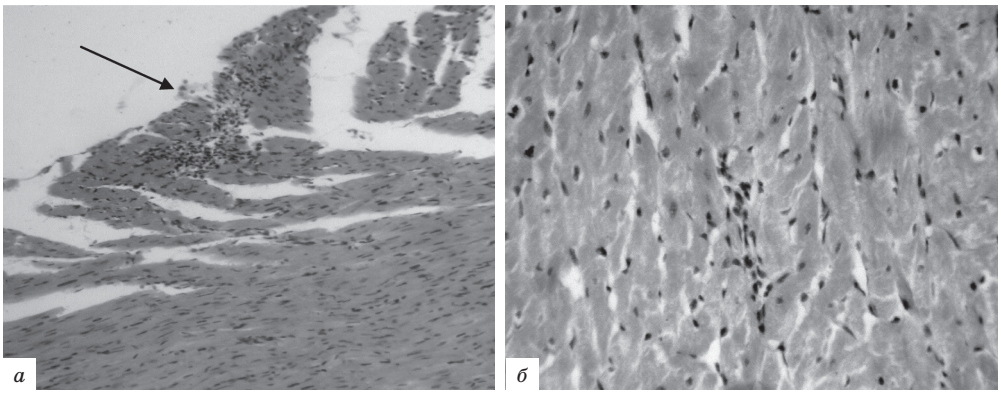

Рис. 3. Міокард щура, якому вводили сполуку 77 на тлі ізадринової патології: а – дрібна гранульома на верхівці сосочкового м'яза лівого шлуночка (× 100); б – субміліарне клітинне скупчення (× 200). Гематоксилін-еозин.

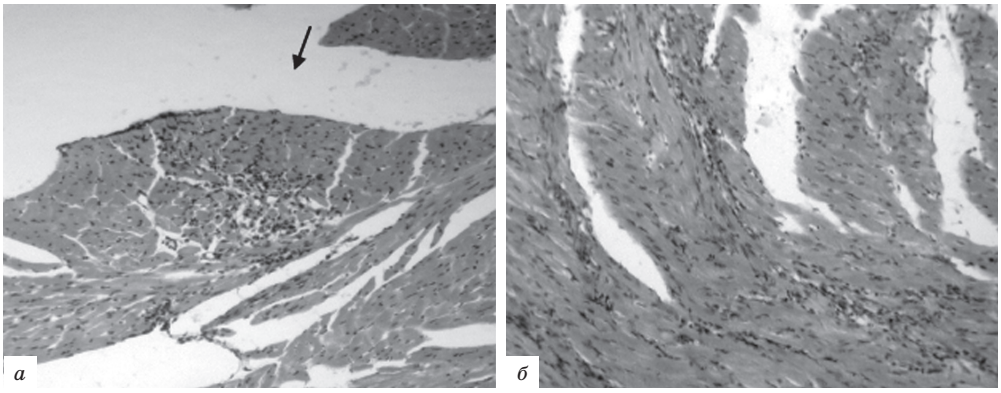

Рис. 4. Міокард щура, якому вводили мексидол на тлі ізадринової патології: а – помірна гранульома на місці вогнища деструкції; б – розповсюджені полосоподібні клітинні скупчення. Гематоксилін-еозин. × 100.

Уведення в тому самому режимі препарату порівняння – мексидолу в дозі 100 мг/кг, також знижувало рівень патологічних змін у міокарді тварин відносно контрольної патології. Втім, порівняно зі сполукою 77, виразність деструктивних змін у проблемних зонах серцевого м'яза лівого шлуночка була вищою. Клітинні інфільтрати на місцях деструкцій мали як вогнищевий, так і доволі розповсюджений полосоподібний вигляд (рис. 4). В інфільтратах помітні початкові ознаки репарації (присутність молодих клітин фібробластичного ряду). Місцями видно й поодинокі «свіжі» пошкодження волокон.

Проведені гістологічні дослідження свідчать про значну кардіопротекторну активність сполуки 77, яка перевищує дію мексидолу.

Висновок

Спіроциклічне похідне оксіндолу за умов його 6-разового внутрішньошлункового введення в дозі 5 мг/кг відновлює енергетичний дефіцит клітин міокарда в щурів із моделлю гострого ізадринового міокардиту. Кардіопротективна дія нової сполуки підтверджена гістологічними дослідженнями та перевищує таку в препарату порівняння мексидолу в дозі 100 мг/кг.

1. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації за редакцією О. В. Стефанова.– К.: Авіцена, 2001.– 528 с.
2. *Зарубина И. В.* Молекулярная фармакология антигипоксантов / И. В. Зарубина, П. Д. Шабанов.– СПб.: Издательство Н–Л, 2004.– 368 с.
3. Компендиум 2009 – лекарственные препараты / Под ред. В. Н. Коваленко, А. П. Викторова.– К.: МОРИОН, 2009.– С. 1575–1576.

4. *Меркулов Г. А.* Курс патологической техники / Г. А. Меркулов.– Л. : Медицина, 1969.– 424 с.
5. *Одинцова Н. Ф.* Мексидол в комплексной терапии артериальной гипертензии у больных пожилого и старческого возраста / Н. Ф. Одинцова // Фарматека.– 2006.– № 20.– С. 21–24.
6. Пат. 87952 Україна, МПК C07D 209/04, 209/96, 311/96, 405/02, 491/20, A61K 31/33, 31/404, 31/436, 31/437, 31/438 4,3'-спіро [(2-аміно-3-ціано-4,5-дигідропірано [3,2-с]хромен-5-он)-5-метил-2'-оксіндол], який проявляє антигіпоксантну активність / Редькін Р. Г., Цубанова Н. А., Черних В. П.; заявник та патентовласник НФаУ.– 200815044; заявл.26.12.2008; опубл. 25.08.2009. Бюл. № 16.
7. *Прохорова М. И*. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) : учеб. пособие / М. И. Прохорова.– Л.,1982.– 272 с.
8. *Чекман И. С*. Кардиопротекторы: клинико-фармакологические аспекты / И. С. Чекман, Н. А. Горчакова, С. Б. Французова, В. О. Минцер // Укр. мед. часопис.– 2003.– XI–XII.– С. 18–25.
9. *D'Agostino R. B*. General Cardiovascular Risk Profile for Use in Primary Care The Framingham Heart Study / D'Agostino R. B., Vasan R. S., Pencina M. J // Circulation.– 2008.– № 17.– P. 743–753.
10. Association of genetic variants and incident coronary heart disease in multi-ethnic cohorts. The PAGE Study / Franceschini N, Carty C, Buzkov] P, [et al.] // Circ Cardiovasc Genet.– 2011.– Oct 31.– P. 273–8.
11. *Mandelzweig L.* The second Euro Heart Survey on acute coronary syndromes: characteristics, treatment and outcome of patients with ACS in Europe and the Mediterranean basin / Mandelzweig L., Battler A., Boyko V. [et al.] // Eur. Heart. J.– 2006.– V. 27 (19).– P. 2285–2293.
12. The utility of gestures in patients with chest discomfort / Marcus G. M., Cohen J., Varosy P. D. [et al.] // Am. J. Med.– 2007, № 120 (1).– P. 83–89.
13. *Moe K. T.* Current trends in diagnostic biomarkers of acute coronary syndrome / Moe K. T., Wong P. // Ann. Acad. Med. Singap.– 2010.– № 39 (3).– P. 210–215.
14. *Thygesen K.* Universal definition of myocardial infarction / Thygesen K., Alpert J. S., White H. D. // Circulation.– 2006.– V. 116 (22).– P. 2634–2653.
15. *Thygesen K.* Universal definition of myocardial infarction / Thygesen K., Alpert J. S., White H. D. // Eur. Heart J.– 2007.– № 28 (20).– P. 2525–2538.

Н. А. Цубанова

Влияние спироциклического производного оксиндола на показатели энергетического обмена и гистоструктуру миокарда в условиях острой изадриновой патологии

В статье представлены материалы биохимического и гистологического исследования влияния спироциклического производного оксиндола в дозе 5 мг/кг на течение острого изадринового миокардита у крыс. Оценку интенсивности патологического процесса в миокарде проводили на высоте развития патологии. Установлено, что новое соединение предотвращает развитие энергетического дефицита на фоне патологии, увеличивает уровень АТФ и уменьшает содержание АДФ и АМФ. По данным гистологических исследований, установлено, что изучаемое соединение проявляет выраженное кардиопротекторное действие, которое превышает активность препарата сравнения мексидола в дозе 100 мг/кг. Результаты исследований свидетельствуют о выраженном кардиопротекторном эффекте нового соединения.

Ключевые слова: спироциклическое производное оксиндола, кардиопротекторный эффект, гистоструктура миокарда, энергетический обмен

N. A. Tsubanova

The influence of spirocyclic oxindolic derivative on indicators of the energy exchange and histostructure of myocardium in the conditions of izadrin pathology

In article are presented results of experiments as to the ifluence of spirocyclic oxindolic derivative (5 mg/kg) on some biochemical and histological parameters of rat's myocardium under the model of acute izadrin myocarditis. All estimations were carried out at the peak of the pathology signs.

It was established that new substance prevented the development of energy deficiency in myocardium, increased level of ATP and reduced ADP and AMP accumulation.

The results of histology research showed that the new substance possesses cardioprotective properties more significant than preparation of comparison Mexidol (100 mg/kg).

The results of researches testify to the expressed cardioprotective effect of the tested substance.

Key words: spirocyclic oxindolic derivative, cardioprotective effect, histostructure of myocardium, energy exchange

Надійшла: 28.03.2012 р.

Контактна особа: Цубанова Наталя Анатоліївна, канд. фарм. наук, доцент, кафедра технології та безпеки ліків, Інститут підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету, пл. Повстання, б. 17, м. Харків, 61001. Тел.: (50) 538-14-45. E-mail: tsubanova@rambler.ru