УДК 615.21:615.038:547.568:616.831-005

ЭНДОТЕЛИЙПРОТЕКТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ДИБОРНОЛА В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ МИОКАРДА

[1]Смольякова В.И., [2]Щетинин П.П., [2]Плотникова Т.М., [3]Кучин А.В.

[1]ФГБУ «НИИ фармакологии имени Е.Д. Гольдберга» РАМН, Томск, e-mail: mbp2001@mail.ru;
[2]ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Томск, e-mail: plot160@mail.ru;
[3]ФГБУН «Институт химии Коми» НЦ УрО РАН, Сыктывкар, e-mail: kutchin-av@chemi.komisc.ru

Изучены эндотелийпротективные эффекты диборнола® (4-метил-2,5-диизоборнилфенола) – нового отечественного препарата из группы пространственно затрудненных фенолов в условиях острой ишемии/реперфузии миокарда у крыс. У диборнола в эксперименте выявлены антиоксидантный, антигипоксический, гемореологический виды фармакологической активности, что явилось основанием для изучения его эффектов, направленных на защиту эндотелия сосудистой стенки от повреждения при усилении перекисного окисления липидов, обусловленном ишемическими и реперфузионными процессами в миокарде. У крыс при модели острой ишемии/реперфузии миокарда отмечено существенное нарушение функциональной активности эндотелия сосудов, которое проявилось снижением его антиагрегантной и сосудорасширяющей активности. В этих условиях диборнол при его лечебно-профилактическом введении (100 мг/кг внутрижелудочно, в течение 3 дней до и 5 дней после воспроизведения модели ишемии/реперфузии миокарда) повышал антиагрегантную активность эндотелия сосудистой стенки крыс на 37 %, по сравнению с эффектом эндотелия сегмента брюшной аорты животных, не получавших лечения. Кроме того, диборнол уменьшал коэффициент эндотелиальной дисфункции на 43 %, по сравнению с показателем контрольной группы. Следовательно, диборнол в условиях модели ишемии/реперфузии миокарда оказывает эндотелийпротективное действие, о чем свидетельствует его способность повышать антиагрегантные свойства эндотелия и уменьшать коэффициент эндотелиальной дисфункции.

Ключевые слова: 4-метил-2,5-диизоборнилфенол (диборнол®), острая ишемия/реперфузия миокарда, эндотелиальная дисфункция, эндотелийпротективная активность.

ENDOTHELIAL PROTECTIVE ACTIVITY OF DIBORNOL IN THE MODEL OF ACUTE MYOCARDIAL ISCHEMIA/REPERFUSION

[1]Smolyakova V.I., [2]Shchetinin P.P., [2]Plotnikova T.M., [3]Kuchin A.V.

[1]Institute of Pharmacology of RAMS n.a. E.D. Goldberg, Tomsk, e-mail: mbp2001@mail.ru;
[2]Siberian State Medical University, Tomsk, e-mail: plot160@mail.ru;
[3]Institute of Chemistry of Komi SC UB RAS, Syktyvkar, e-mail: kutchin-av@chemi.komisc.ru

The authors investigated the endothelium-protective properties of dibornol® (4-methyl-2,5-diisobornylphenol), a new Russian drug belonging to the group of sterically hindered phenols, in rats with an acute myocardial ischemia-reperfusion injury model. During the experiment, dibornol was found to have antioxidative, antihypoxic, and hemorheologic types of pharmacological activity and this became the base for research on its influence on the protection of vessel wall endothelium from damage during the increase of lipid peroxidation caused by ischemic and reperfusion processes in myocardium. A dramatic distortion of functional activity of vessel walls endothelium was found in rats with an acute myocardial ischemia-reperfusion model. This manifested in a decrease in the anti-platelet and vasodilatory activity of endothelium. Dibornol (p.o. administration 100 mg/kg for 3 days before and 5 days after the myocardial ischemia/reperfusion model) increased the anti-platelet activity of the rats vessel wall endothelium by up to 37 % in comparison with the effect of endothelium of abdominal aorta segment in animals without treatment. Moreover, dibornol decreased the coefficient of endothelium dysfunction by 43 % in comparison with that of the control group. Consequently, in the myocardial ischemia-reperfusion model, dibornol has an endothelium protective effect, which is proved by its ability to increase the anti-platelet properties of endothelium and to decrease the coefficient of endothelial dysfunction.

Keywords: 4-methyl-2,6-diisobornilphenol (dibornol®), acute myocardial ischemia/reperfusion, endothelial dysfunction, endothelial protective effect.

В России сердечно-сосудистые заболевания занимают лидирующую позицию в качестве причин смертности, составив в 2006 г. 56,5 % от всех смертельных исходов и демонстрируя устойчивую тенденцию к росту этого показателя [13]. Дисфункция сосудистого эндотелия является одним из основных патофизиологических механизмов сердечно-сосудистых заболеваний, участвуя в развитии атеросклероза, коронарного тромбоза, ремоделировании левого желудочка, прогрессировании сердечной недостаточности. Важными причинами эндотелиальной дисфункции являются нарушение локальной продукции NO и окислительный стресс, в результате которого избыточная генерация эндотелийзависимого супероксида инактивирует молекулы NO, способствует повреждению мембран эндотелиоцитов пероксинитритом и гидроксильными ради-

калами. Исходя из этих представлений, эффективными эндотелийпротекторами могут быть вещества, способные снижать интенсивность процессов ПОЛ и/или защищать NO от инактивации активными формами кислорода [5, 12].

Перспективным соединением, находящимся на стадии доклинических исследований, является диборнол® (4-метил-2,6-диизоборнилфенол) – отечественный препарат, синтезированный на опытном производстве Института химии Коми НЦ УрО РАН. Диборнол представляет собой пространственно затрудненный терпенофенол, обладающий доказанной мощной антиоксидантной активностью [6]. На данный момент продемонстрированы его гемореологический, антитромбоцитарный, антитромбогенный эффекты в условиях модели транзиторной ишемии головного мозга [6, 7] и осуществляется комплексное изучение кардиопротективной активности препарата [8, 9]. В рамках этого исследования находится изучение влияния диборнола на функциональную активность эндотелия сосудов при ишемии/реперфузии миокарда, как одного из возможных механизмов кардиопротективной активности препарата.

Целью данного исследования является изучение влияния диборнола (4-метил-2,6-диизоборнилфенола) на антиагрегантную и сосудорасширяющую активность эндотелия в условиях модели инфаркта миокарда с последующей реперфузией у крыс.

Материалы и методы исследования

Опыты выполнены на 40 аутбредных крысах-самцах сток Вистар массой 250-290 г. Исследование проводили в 2 сериях экспериментов. В первой серии опытов изучали влияние диборнола на антиагрегантную активность сосудистой стенки, во второй – влияние препарата на эндотелийзависимую и эндотелийнезависимую вазодилятацию. В каждой серии экспериментов крысы были разделены на 3 группы: ложнооперированные, контрольные и опытные животные. У животных контрольной и опытной групп воспроизводили модель острой ишемии миокарда с последующей рециркуляцией. С этой целью крыс наркотизировали (тиопентал натрия, 60 мг/кг внутрибрюшинно), затем интубировали и подключали к аппарату искусственной вентиляции легких Rodent Ventilator 7025 (Италия). После проведения торако- и перикардотомии осуществляли окклюзию левой коронарной артерии на уровне нижнего края *auricula sinistra* без нарушения топографии сердца в грудной клетке по методу А.Х. Когана [4]. Длительность окклюзии левой коронарной артерии составляла 45 мин, после чего лигатуру развязывали и проводили постишемическую реперфузию. Мониторирование ЭКГ во II стандартном отведении проводили для верификации окклюзии коронарной артерии, используя компьютерный электрокардиограф Поли-Спектр-8/Л (Россия). У ложнооперированных животных проводили аналогичное оперативное вмешательство, но без лигирования сосуда.

Влияние диборнола на антиагрегантную активность сосудистой стенки изучали по методу, предложенному В.П. Балудой и И.И. Деяновым [1]. Для этого на 5-е сутки эксперимента у крыс под наркозом (тиопентал натрия, 60 мг/кг внутрибрюшинно) производили изъятие фрагмента брюшной аорты (m=3,0±0,2 мг). Выделенный сегмент аорты отмывали от крови и в течение 3 минут инкубировали в стандартизированной богатой тромбоцитами плазме (БТП), полученной от крыс-доноров, после чего регистрировали агрегатограммы на приборе АТ-02 (Россия) с помощью самописца Recorder 2210 (Швеция) при добавлении к плазме АДФ в конечной концентрации $4 \cdot 10^{-5}$ М. Для получения донорской БТП были использованы 7 интактных самцов крыс-доноров. Агрегацию тромбоцитов в богатой тромбоцитами плазме определяли нефелометрическим методом G. Born [11]. Получение богатой и бедной тромбоцитами плазмы и подсчет числа тромбоцитов проводили стандартными методами [3]. Богатую и бедную тромбоцитами плазму крови получали центрифугированием при 400 g и 1800 g соответственно на центрифуге РС-6. В БТП подсчитывали количество тромбоцитов микроскопическим методом при фазовом контрасте в камере Горяева. После определения числа тромбоцитов в БТП проводили ее стандартизацию разведением бедной тромбоцитами плазмой до 400±30 тыс. тромбоцитов в 1 $мм^3$ пробы.

Для изучения влияния диборнола на вазодилататорную функцию эндотелия у наркотизированных животных (тиопентал натрия, 60 мг/кг внутрибрюшинно) катетеризовали сонную артерию для регистрации артериального давления после внутривенного введения ацетилхолина (5 мкг/кг) и натрия нитропруссида (30 мкг/кг), вызывающих эндотелийзависимую и эндотелийнезависимую вазодилятацию соответственно. Рассчитывали площади над кривой реакции артериального давления на введение анализаторов. Коэффициент эндотелиальной дисфункции (КЭД) определяли как отношение площади над кривой при введении натрия нитропруссида к величине этого показателя при инъекции ацетилхолина [1].

В обеих сериях опытов животные из опытных групп получали 100 мг/кг диборнола внутрижелудочно в виде суспензии в 1 мл 2 % крахмальной слизи 1 раз в сутки по лечебно-профилактической схеме: в течение 3-х дней до и 5-и дней после ишемии/реперфузии миокарда. Крысы контрольной группы и ложнооперированные животные получали эквиобъемные количества крахмальной слизи внутрижелудочно по аналогичной схеме.

Для статистической обработки данных использовали пакет программного обеспечения «Statistica 8.0». Рассчитывали среднее значение, стандартную ошибку. Для оценки достоверности различий между группами использовали непараметрический критерий Mann–Whitney U test. Статистически значимыми различия считались при $p<0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

На первом этапе было изучено влияние диборнола на антиагрегантную активность сосудистого эндотелия при острой ишемии/реперфузии миокарда у крыс. Установлено,

что исходная (без предварительной инкубации с сегментом сосуда) амплитуда необратимой АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов в плазме крыс-доноров составляла 36 %. Предварительная инкубация в донорской плазме сегментов брюшной аорты ложнооперированных животных снижала амплитуду агрегации тромбоцитов до 8 %. После инкубации в БТП крыс-доноров сегментов сосудов животных с ишемией/реперфузией миокарда амплитуда АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов составила 19 %, что в 2,4 раза выше показателя у ложнооперированных животных (таблица). Следовательно, воспроизведение ишемии/реперфузии миокарда у крыс существенно уменьшало антиагрегантные свойства эндотелия сосудистой стенки. Вероятно, одной из основных причин этого эффекта является формирующийся после ишемии и особенно после реперфузии миокарда оксидативный стресс, которому придают большое значение в снижении антиадгезивных и антиагрегантных свойств эндотелия [6, 10].

Влияние диборнола
при лечебно-профилактическом введении
(100 мг/кг, внутрижелудочно)
на антиагрегантную активность
сосудистой стенки у крыс после ишемии /
реперфузии миокарда

Группы животных		Амплитуда агрегации тромбоцитов, %
До инкубации		
Интактные крысы-доноры (n=7)		36±3
После инкубации с сегментом аорты		
Ложнооперированные (n=5)		8±1$^{\#}$
Инфаркт миокарда	Контроль (n=6)	19±1$^{\#}$*
	Диборнол (n=6)	12±1$^{\#+}$

Примечание: $^{\#}$ – $p<0,05$ по сравнению со значениями у интактных крыс; * – $p<0,05$ по сравнению со значениями у ложнооперированных животных; $^{+}$ – $p<0,05$ по сравнению со значениями у группы контроля.

Амплитуда АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов после инкубации сегмента брюшной аорты крыс с ишемией/реперфузией миокарда, получавших диборнол по лечебно-профилактической схеме, составила 12 %, что на 37 % ниже, чем показатель контрольной группы, и было близко к уровню значений в группе ложнооперированных животных (таблица).

Следовательно, лечебно-профилактическое введение диборнола предотвращает снижение антиагрегантной активности эндотелия аорты, вызванное ишемией/реперфузией миокарда у крыс.

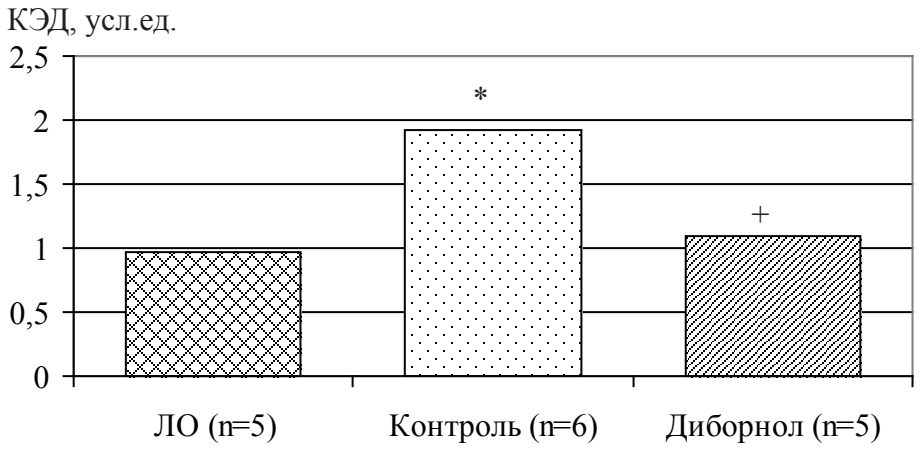
Нарушение эндотелийзависимой вазодилатации является ранним критерием эндотелиальной дисфункции и является первым шагом в развитии сердечно-сосудистых заболеваний. Для изучения влияния диборнола на вазодилятирующую функцию эндотелия регистрировали реакцию артериального давления на введение ацетилхолина и натрия нитропруссида и рассчитывали КЭД. Ацетилхолин стимулирует выброс эндотелием оксида азота, поэтому широко используется в клинике и эксперименте для оценки эндотелиальной дисфункции. Вместе с тем, при различных патологических состояниях, в том числе и при инфаркте миокарда, может меняться реакция гладких мышц сосудов на действие и других гуморальных и нейрогенных факторов. Поэтому для оценки эндотелийнезависимой вазодилатации использовали натрия нитропруссид.

В группе ложнооперированных крыс КЭД составил 0,97, то есть существенных изменений реакции артериального давления на вазоактивные агенты не наблюдалось. У контрольных животных КЭД после острой ишемии/реперфузии миокарда составил 1,92, что почти в 2 раза превышало значение в группе ложнооперированных крыс. В группе крыс, получавших диборнол в течение 3-х суток до воспроизведения модели ишемии миокарда с реперфузией и 5-и суток после, КЭД составил 1,09. Следовательно, диборнол практически восстанавливал сосудорасширяющую активность эндотелия до значений у ложнооперированных животных.

Известно, что антиоксиданты повышают образование NO и эндотелийзависимую вазодилятацию у людей с сердечно-сосудистыми заболеваниями [5], потенцируют антиагрегантную активность эндотелия [2]. Диборнол, являясь мощным антиоксидантом, вероятно, проявляет свою эндотелийпротективную активность, прежде всего, за счет ингибирования метаболического окисления NO, приводя к повышению его биодоступности, и, следовательно, усиливая его антиагрегантное и вазодилятирующее действие [5].

Заключение

Диборнол при острой ишемии/реперфузии миокарда у крыс способен предотвращать нарушения функциональной активности сосудистого эндотелия, что проявилось повышением его антиагрегантной активности и восстановлением эндотелийзависимой вазодилатации.



Влияние диборнола (100 мг/кг, внутрижелудочно) при лечебно-профилактическом введении на коэффициент эндотелиальной дисфункции (КЭД, усл. ед.) у крыс после ишемии/реперфузии миокарда

Примечание: * – $p<0,05$ по сравнению с показателями ложнооперированных крыс (ЛО); $^{+}$ – $p<0,05$ по сравнению с контролем.

Выявленные эндотелийпротективные свойства диборнола можно рассматривать в качестве одного из возможных механизмов кардиопротективной активности препарата.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу», ГК № 16.N08.12.1007.

Список литературы

1. Балуда В.П., Деянов И.И. Значение определения антитромбогенных свойств стенки сосудов в профилактике тромбозов // Кардиология. – 1988. – Т. 28, № 5. – С. 103–105.

2. Гуманова Н.Г. Влияние антиоксидантов Q510 и резвератрола на регуляторную функцию эндотелия у крыс с моделированной артериальной гипертонией / Н.Г. Гуманова, Е.Б. Артюшкова [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2007. – Т. 143, № 6. – С. 619–622.

3. Закревская А.Л. Тромбоциты крыс как модель исследования ингибиторов агрегации // Патологическое функционирование системы гемостаза. – Ленинград, 1990. – С. 46–54.

4. Коган А.Х. Хирургический метод моделирования коронароокклюзионного инфаркта миокарда и аневризмы // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 1979. – № 3. – С. 79–81.

5. Марков Х.М. Оксид азота и атеросклероз. Оксид азота, дисфункция эндотелия и патогенез атеросклероза // Кардиология. – 2009. – Т. 49, № 11. – С. 64-74.

6. Плотников М.Б. Антиоксидантная активность производного о-изоборнилфенола при ишемии головного мозга у крыс / М.Б. Плотников, И.С. Иванов, В.И. Смольякова [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2010. – № 5. – С. 23-25.

7. Плотников М.Б. Гемореологические эффекты производного орто-изоборнилфенола в условиях ишемии головного мозга у крыс / М.Б. Плотников, И.С. Иванов, В.И. Смольякова [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. –Т. 149, № 6. – С. 660-662.

8. Плотникова Т.М. Гемореологические эффекты диборнола в условиях модели ишемии/реперфузии миокарда / Т.М. Плотникова, Г.А. Чернышева, В.И. Смольякова [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2014. –Т. 157, № 2. – С. 173-176.

9. Щетинин П.П. Противоаритмическая активность диборнола в условиях модели острой ишемии – реперфузии миокарда // Бюллетень сибирской медицины. – 2013. – Т. 12, № 3. – С. 153-156.

10. Angec J.A. Role of the endothelium in the genesis of cardiovascular disease // Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. – 1996. – Vol. 23. – P. 16–22.

11. Born G.V.R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal // Nature. – 1962. – Vol. 194, № 4832. – P. 927–929.

12. Madigan M., Zuckerbraun B. Therapeutic potential of the nitrite-generated NO pathway in vascular dysfunction // Frontiers in immunology. – 2013. – Vol. 4. – P. 1-9.

13. World Health Statistics 2011. Switzerland: World Health Organization Press, 2011. – 170 p.

References

1. Baluda V.P., Dejanov I.I. Kardiologija, 1988, Vol. 28, no. 5, pp. 103–105.

2. Gumanova N.G., Artjushkova E.B., Metelskaja V.A., Kochkarov V.I., Pokrovskaja T.G., Danilenko L.M., Korneev M.M., Pokrovskij M.V., Pashin E.N. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2007, Vol. 143, no. 6, pp. 619-622.

3. Zakrevskaja A.L. Trombocity krys kak model' issledovanija ingibitorov agregacii, Patologicheskoe funkcionirovanie sistemy gemostaza [Pathologic functioning of homeostasis system], Leningrad, 1990, pp. 46–54.

4. Kogan A.H. Hirurgicheskij metod modelirovanija koronarookkljuzionnogo infarkta miokarda i anevrizmy, Patologicheskaja fiziologija i jeksperimental'naja terapija [Pathological physiology and experimental therapy], 1979, no. 3, pp. 79–81.

5. Markov H.M. Nitrous Oxide and Atherosclerosis. Nitrous Oxide, Dysfunction of Vascular Endothelium, and Pathogenesis of Atherosclerosis, Cardiology, 2009, Vol. 49, no. 11, pp. 64-74.

6. Plotnikov M.B., Ivanov I.S., Smol'jakova V.I., Chernysheva G.A., Kuchin A.V., Chukicheva I.Ju., Krasnov E.A. Prob-

lems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry, 2010, no. 5, pp. 23-25.

7. Plotnikov M.B., Smol'jakova V.I., Ivanov I.S., Chernysheva G.A., Kuchin A.V., Chukicheva I.Ju., Krasnov E.A. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2010, Vol. 149, no. 6, pp. 660-662.

8. Plotnikova T.M., Chernysheva G.A., Smol'jakova V.I., Shchetinin P.P., Kuchin A.V., Chukicheva I.Ju., Plotnikov M.B. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2014, Vol. 157, no. 2, pp. 173-176.

9. Shchetinin P.P. Antiarrhythmic activity of dibornol in the model of acute myocardial ischemia/reperfusion, Bulletin of Siberian Medicine, 2013, Vol. 12, no. 3, pp. 153–156.

10. Angec J.A. Role of the endothelium in the genesis of cardiovascular disease, Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 1996, Vol. 23, pp. 16–22.

11. Madigan M., Zuckerbraun B. Therapeutic potential of the nitrite-generated NO pathway in vascular dysfunction, Frontiers in immunology, 2013, Vol. 4, pp. 1-9.

12. Born G.V.R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal, Nature, 1962, Vol. 194, no. 4832, pp. 927–929.

13. World Health Statistics 2011. Switzerland: World Health Organization Press, 2011. – 170 p.

Рецензенты:

Венгеровский А.И., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой фармакологии, ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, г. Томск;

Алиев О.И., д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории фармакологии кровообращения, ФГБУ «НИИ фармакологии им. Е.Д. Гольдберга» СО РАМН, г. Томск.

Работа поступила в редакцию 10.06.2014.