

© Коллектив авторов, 2022
УДК 616.124.2
DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2022.17098>
ISSN – 2073-8137

КАРДИОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНЫХ 3-ФОРМИЛХРОМОНА. ФОКУС НА ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МИТОХОНДРИЙ

Д. И. Поздняков, И. Е. Рыбалко, К. Х. Саркисян

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал Волгоградского государственного медицинского университета, Российская Федерация

THE CARDIOPROTECTIVE EFFECT OF 3-FORMYLCHROMONE DERIVATIVES. FOCUS ON CHANGES IN THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF MITOCHONDRIA

Pozdnyakov D. I., Rybalko I. E., Sarkisyan K. H.

Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of the Volgograd State Medical University, Russian Federation

Проведено изучение кардиопротекторной активности шести новых производных 3-формилхромона в сравнении с триметазидином и мельдонием при курсовом терапевтическом пероральном введении в условиях экспериментального инфаркта миокарда. Установлено, что применение производных 3-формилхромона увеличивает активность цитратсинтазы и соответственно метаболическую активность интерфибриллярных митохондрий, подавляя при этом образование супероксид-радикала в субсарколеммальных митохондриях, уменьшая зону некроза миокарда.

Ключевые слова: инфаркт миокарда, производные 3-формилхромона, митохондриальная дисфункция, кардиопротекция

A study evaluated the cardioprotective activity of six new derivatives of 3-formylchromone in comparison with trimetazidine and meldonium during the course of therapeutic oral administration in experimental myocardial infarction. As a result, it was found that the use of 3-formylchromone derivatives increases the activity of citrate synthase and, accordingly, the metabolic activity of interfibrillary mitochondria, while suppressing the formation of a superoxide radical in subsarcolemal mitochondria, reducing the zone of myocardial necrosis.

Keywords: myocardial infarction, 3-formylchromone derivatives, mitochondrial dysfunction, cardioprotection

Для цитирования: Поздняков Д. И., Рыбалко И. Е., Саркисян К. Х. КАРДИОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНЫХ 3-ФОРМИЛХРОМОНА. ФОКУС НА ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МИТОХОНДРИЙ. Медицинский вестник Северного Кавказа. 2022; 17(4):411-414. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2022.17098>

For citation: Pozdnyakov D. I., Rybalko I. E., Sarkisyan K. H. THE CARDIOPROTECTIVE EFFECT OF 3-FORMYLCHROMONE DERIVATIVES. FOCUS ON CHANGES IN THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF MITOCHONDRIA. *Medical News of North Caucasus*. 2022; 17(4):411-414. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2022.17098> (In Russ.)

АТФ – аденозинтрифосфат
ИБС – ишемическая болезнь сердца
ЛО – ложнооперированные животные

НК – негативный контроль
ИФМ – интерфибриллярные митохондрии
ССМ – субсарколеммальные митохондрии

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) и инфаркт миокарда как самый неблагоприятный исход данного заболевания представляют собой главную причину высокого уровня смертности населения экономически развитых и развивающихся стран. В комплексной терапии ИБС находят свое применение кардиопротекторы – группа лекарственных средств, действие которых направлено на восстановление метаболических процессов в ишемизированном миокарде. Кардиопротекторы являются вспомогательными средствами в терапии ИБС, имеющими класс доказанности IIb [1]. К наиболее известным представителям данной фармакотерапевтической группы относятся три-

метазидин – ингибитор 3-кетоацил-КоА-тиолазы и соответственно митохондриального метаболизма жирных кислот [2], а также мельдоний, который ингибирует γ -бутиробетаингидроксилазу и подавляет реакции «карнитинового шаттла» с накоплением γ -бутиробетаина [3].

Данные средства в той или иной степени оказывают влияние на функцию митохондрий и метаболические клеточные процессы. Митохондрии играют ключевую роль в нормальном функционировании сердца, а также в патогенезе различных заболеваний миокарда, включая ИБС. В условиях физиологического функционирования митохондрии миокарда обеспечивают генерацию макроэргов в виде АТФ,

регулируют процессы апоптоза и генерации свободных радикалов [4]. В настоящее время в кардиомиоцитах идентифицированы два подтипа митохондрий: субсарколеммальные (SSM) и интерфибриллярные (IFM), отличающиеся как по своей активности, так и по степени участия в развитии патологического процесса при ишемии миокарда [5, 6]. В этой связи можно предположить, что актуальным направлением кардиопротективной терапии может являться дифференцированное воздействие на изменение митохондриальной функции с повышением активности IFM и ограничением SSM субпопуляций [7].

Цель исследования: оценить влияние производных 3-формилхромона на изменение активности митохондриальных субпопуляций в условиях экспериментальной ишемии миокарда.

Материал и методы. Объектами для исследования выступали производные 3-формилхромона с лабораторными шифрами: ХА-1 (3-[(1E)-3-оксо-3-фенилпроп-1-ен-1-ил]-4Н-1-бензопиран-4-он), ХА-2 (3-[(1E)-3-(3,4-диметилфенил)-3-оксопроп-1-ен-1-ил]-4Н-1-бензопиран-4-он); ХА-3 (3-[(1E)-3-(2-гидрокси-5-метилфенил)-3-оксопроп-1-ен-1-ил]-4Н-1-бензопиран-4-он); ХА-4 (3-[(1E)-3-(5-фтор-2-гидроксифенил)-3-оксопроп-1-ен-1-ил]-4Н-1-бензопиран-4-он); ХА-5 (3-[(1E)-3-(2-гидрокси-3-йод-5-метилфенил)-3-оксопроп-1-ен-1-ил]-4Н-1-бензопиран-4-он) и ХА-6 (3-[(1E)-3-(3,5-дигидрокси-4-гидрокси-фенил)-3-оксопроп-1-енил]-6-метокси-хромен-4-он). Синтез данных соединений был осуществлен на кафедре органической химии ПМФИ – филиала ВолгГМУ. Строение веществ подтверждалось спектроскопическими методами анализа (ЯМР, ИК и УФ-спектроскопия) [8].

В качестве биологической модели в исследование были взяты 200 аутбредных особей крыс-самцов (Wistar). Животные для экспериментальных целей были предоставлены аккредитованным центром разведения лабораторных животных «Рапполово». До непосредственного начала эксперимента крысы находились в условиях карантина на протяжении двух недель. Во время исследования крысы содержались в помещениях экспериментального вивария со стандартными для данного вида животных условиями размещения: температура окружающего воздуха 18–22 °С, влажность 60–70 %, при смене суточного цикла, соответствующего циркадному ритму животных. Содержание и манипуляции, проводимые с животными, соответствовали международным нормам экспериментальной этики [9].

Экспериментальный инфаркт миокарда моделировали у крыс в условиях хлоралгидратной анестезии (внутрибрюшинно, 350 мг/кг) путем необратимого лигирования коронарной артерии в области левого желудочка в верхней трети по ходу кровеносного сосуда [8]. При постановке эксперимента, разработке соответствующего дизайна исследования все животные были разделены на несколько групп. В первую группу включались ложнопериованные животные (ЛО). Вторая группа крыс – негативный контроль (НК), группа с модельной патологией, которой фармакокоррекция не проводилась. Также были выделены группы животных, получавших препараты сравнения и исследуемые вещества. Количество животных в группе равнялось 20 особям. В случае смертности экспериментальные группы формировались методом «добора». У десяти животных из группы оценивали изменение митохондриальной функции, у оставшихся десяти оценивали изменение зоны некроза миокарда. В качестве препара-

тов сравнения выступали лекарственные препараты кардиопротекторного действия, присутствующие на отечественном фармацевтическом рынке – мельдоний («Милдронат®», Grindex, Латвия) и триметазидин («Предуктал®», АНФАРМ, Польша). Референты вводили перорально в дозе 100 мг/кг – мельдоний [10] и 35 мг/кг – триметазидин [8]. Изучаемые соединения вводили в дозе 20 мг/кг [11]. Референтные препараты и исследуемые вещества (в виде тонкодисперсной водной суспензии) вводили на протяжении 10 дней после моделирования инфаркта миокарда через атравматичный зонд, однократно в сутки. Первое введение соединений и референтов осуществляли после пробуждения животных. На 11-й день эксперимента крыс под анестезией декапитировали и извлекали миокард, который перфузировали буферным раствором HEPES (pH=7,4). С целью выделения митохондриальных субпопуляций миокард гомогенизировали в среде (pH=7,4): сахара 250 мМ +10 мМ Трис-НСl +0,5 мМ ЭДТА. Гомогенат центрифугировали при 1000 г на протяжении 10 минут. Полученный супернатант делили на две части (А и В), первую из которых (А) повторно центрифугировали при 8000 г 5 мин. Осадок ресуспендировали в среде выделения, полученная среда представляла собой взвесь SSM. Для изоляции IFM в части центрифугата (В) использовали соответствующую методику [12]. Все операции выполнялись при 4 °С. В митохондриальных субпопуляциях оценивали активность цитратсинтазы и концентрацию супероксид-радикала.

Активность цитратсинтазы определяли спектрофотометрически в реакции образования 2-нитро-5-бензойной кислоты из 5'-дифенил-2-нитробензойной кислоты) в присутствии ацетилкофермента А и анализируемой взвеси митохондрий. Изменение оптической плотности смеси регистрировали при 412 нм. Активность пересчитывали на концентрацию белка (оценивали по методу Бредфорда) в образце и выражали в Ед/мг [13]. Концентрацию супероксид-радикала определяли по изменению флуоресцентного сигнала дигидроэтидий бромида в образцах, также пересчитывали на содержание белка в образце и выражали в нмоль/г [14]. Изменение величины зоны некроза миокарда у крыс с экспериментальным ишемическим поражением сердца оценивали путем определения абсорбции в УФ-спектре окрашенного тканевого хлороформного экстракта формазана (трифенилтетразолиевый метод) [8].

Статистический анализ результатов эксперимента производили с применением программного обеспечения статистического анализа STATISTICA 6.0 (StatSoft, США). Данные представляли в виде M (среднее) $\pm$ SEM (стандартная ошибка среднего). Статистические отличия между экспериментальными группами выявляли методом дисперсионного анализа в однофакторном варианте с постпроцессингом, где использовался критерий Ньюмена – Кейлса. Критический уровень значимости составлял $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Активность цитратсинтазы в группе животных НК была ниже аналогичной у ЛО крыс: в митохондриальных субпопуляциях IFM – на 87,7 % ($p < 0,05$), SSM – на 33,9 % ($p < 0,05$). На фоне введения животным препаратов сравнения значимого изменения активности цитратсинтазы в интерфибриллярных митохондриях отмечено не было. Вместе с тем применение мельдония способствовало восстановлению активности цитратсинтазы в субсарколеммальной субпопуляции до уровня ЛО животных. У крыс,

которые получали исследуемые соединения ХА 1–6, активность IFM-цитратсинтазы превосходила аналогичную у группы крыс НК в 3,1 ($p<0,05$); 4,0 ($p<0,05$); 3,3 ($p<0,05$); 3,4 ($p<0,05$); 3,9 ($p<0,05$) и 4,3 ($p<0,05$) раза соответственно, что также было достоверно выше результатов оценки ферментативной активности у животных, получавших препараты сравнения. Стоит отметить, что статистически значимых отличий активности цитратсинтазы субсарколеммальных митохондрий у крыс, получавших изучаемые вещества, и ЛО животных не установлено (рис. 1).

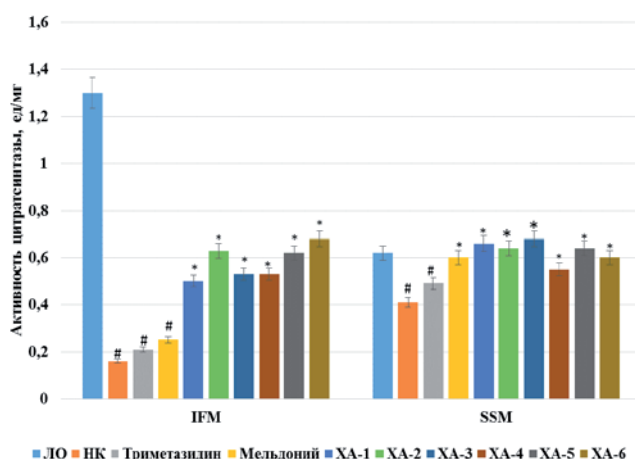


Рис. 1. Изменение активности цитратсинтазы в митохондриальных субпопуляциях миокарда у крыс на фоне введения исследуемых веществ и референтов.
Примечание. * – $p<0,05$ по отношению к НК животным; # – $p<0,05$ по отношению к ЛО животным

Анализируя данные, полученные в ходе оценки изменения концентрации супероксид-радикала в митохондриальных субпопуляциях (рис. 2), установили, что в интерфибриллярных митохондриях в группе крыс НК содержание супероксид-радикала было выше аналогичного у ЛО крыс в 5,8 раза ($p<0,05$), тогда как в SSM субпопуляции концентрация супероксид-радикала у животных, лишенных фармакологической поддержки, превосходила таковую у ЛО крыс в 7,7 раза ($p<0,05$). Применение триметазидина и мельдония способствовало повышению содержания супероксид-радикала в IFM субпопуляции по отношению к группе крыс НК в 2,7 раза ($p<0,05$) и 2,4 раза ($p<0,05$) соответственно. В субсарколеммальных митохондриях концентрация супероксид-радикала у экспериментальных животных, которым фармакологическую коррекцию инфаркта миокарда проводили путём перорального введения препаратов сравнения, не отличалась ($p>0,05$) от аналогичной у группы НК. На фоне введения крысам изучаемых веществ в субсарколеммальной субпопуляции наблюдалось снижение концентрации активных форм кислорода, представленных супероксид-радикалом в сравнении с группой животных НК: ХА-1 на 82,2 % ($p<0,05$); ХА-2 на 85,7 % ($p<0,05$); ХА-3 на 80,4 % ($p<0,05$); ХА-4 на 81,3 % ($p<0,05$); ХА-5 на 83,5 % ($p<0,05$) и ХА-6 на 84,6 % ($p<0,05$) соответственно. Содержание супероксид-радикала в SSM субпопуляции у крыс, которым вводили анализируемые соединения, было статистически значимо ($p<0,05$) ниже аналогичного у крыс, получавших препараты сравнения. В интерфибриллярных митохондриях содержание супероксид-радикала у животных, которым вводили исследуемые вещества, статистически значимо не отличалось от группы крыс НК (рис. 2).

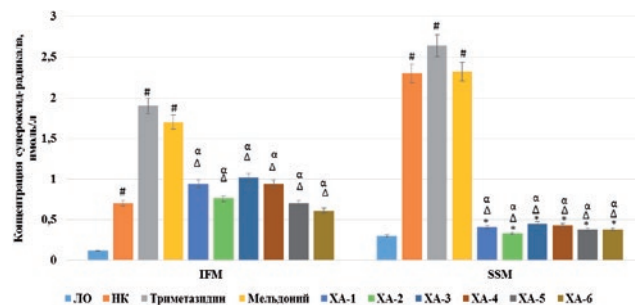


Рис. 2. Влияние изучаемых соединений на изменение концентрации супероксид-радикала в митохондриальных субпопуляциях миокарда у крыс.

Примечание. * – $p<0,05$ по отношению к НК животным; # – $p<0,05$ по отношению к ЛО животным; α – $p<0,05$ по отношению к крысам, которым вводили триметазидин; Δ – $p<0,05$ по отношению к крысам, которым вводили мельдоний

Следует отметить, что нарушение митохондриального метаболизма в группе крыс НК, вероятно, способствовало увеличению зоны некроза миокарда, которая составляла $33,2\pm 2,1$ %. Применение препаратов сравнения: триметазидина и мельдония – способствовало уменьшению зоны некроза миокарда относительно группы крыс НК на 23,0 % ($p<0,05$) и на 17,5 % ($p<0,05$) соответственно, тогда как применение анализируемых веществ – представителей ряда производных 3-формилхромона приводило к снижению данного показателя на 39,2 % ($p<0,05$); 36,4 % ($p<0,05$); 38,3 % ($p<0,05$); 36,4 % ($p<0,05$); 33,7 % ($p<0,05$) и 28,6 % ($p<0,05$) соответственно для соединений ХА 1–6. Также в ходе исследования было установлено, что величина некротического очага у крыс, получавших исследуемые вещества и референтные препараты, статистически значимо не различалась ($p>0,05$) (рис. 3).

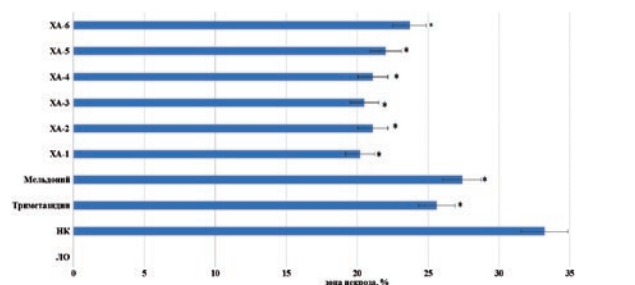


Рис. 3. Влияние изучаемых соединений на изменение зоны некроза миокарда у крыс.

Примечание: * – $p<0,05$ относительно НК животных (критерий Ньюмена – Кейлса)

Проведенное исследование показало, что курсовое терапевтическое применение новых производных 3-формилхромона в условиях экспериментального инфаркта миокарда способствовало увеличению активности цитратсинтазы – основного ферментативного маркера митохондриального биогенеза [15], причем энзиматическая активность более значимо возрастала в протективной IFM субпопуляции. Введение изучаемых соединений приводило к снижению генерации супероксид-радикала в субсарколеммальных митохондриях, практически не влияя на данный показатель в IFM субпопуляции. Данный факт может быть связан с наличием у производных 3-формилхромона антирадикальных свойств, а также с восстановлением активности антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы и каталазы [16]. На фоне введения животным препаратов сравнения наблюдалось повышение концентрации су-

пероксид-радикала как в IFM, так и в SSM субпопуляциях, что может быть связано с разобщающим действием данных препаратов на митохондриальный метаболизм. Регуляторный потенциал производных 3-формилхромона в отношении митохондриального биогенеза может быть опосредован влиянием на белки семейства сиртуинов [17], отвечающих практически за все аспекты функциональной активности митохондрий, включая процессы аутофагии, окислительного метаболизма и синтеза органелл *de novo* [18].

Заключение. На основании проведенного исследования можно предполагать наличие кардиопротекторной активности у исследуемых производных 3-формилхромона, которая связана с восстановлением функции митохондриальной IFM субпопуляции и подавлением генерации супероксид-радикала (соответственно окислительного стресса) в SSM субпопуляции, что в свою очередь отличает данные вещества от применяемых в клинической практике средств кардиопротекторного действия.

Литература/References

1. Poluektov Y. M., Petrushanko I. Y., Undrovinas N. A. Glutathione-related substances maintain cardiomyocyte contractile function in hypoxic conditions. *Sci. Rep.* 2019;9(1):4872. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41266-2>
2. Marzilli M., Vinereanu D., Lopaschuk G. Trimetazidine in cardiovascular medicine. *Int. J. Cardiol.* 2019;293:39-44. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2019.05.063>
3. Schobersberger W., Dünwald T., Gmeiner G., Blank C. Story behind meldonium-from pharmacology to performance enhancement: a narrative review. *Br. J. Sports Med.* 2017;51(1):22-25. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2016-096357>
4. Kumar A. A., Kelly D. P., Chirinos J. A. Mitochondrial Dysfunction in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Circulation.* 2019;139(11):1435-1450. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.036259>
5. Ribeiro Junior R. F., Dabkowski E. R., Shekar K. C., O'Connell K. A., Hecker P. A. MitoQ improves mitochondrial dysfunction in heart failure induced by pressure overload. *Free Radic. Biol. Med.* 2018;117:18-29. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.012>
6. Crochemore C., Mekki M., Corbière C. Subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria display distinct superoxide production profiles. *Free Radic. Res.* 2015;49(3):331-337. <https://doi.org/10.3109/10715762.2015.1006212>
7. Sun J., Nguyen T., Aponte A. M. Ischaemic preconditioning preferentially increases protein S-nitrosylation in subsarcolemmal mitochondria. *Cardiovasc. Res.* 2015;106(2):227-236. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv044>
8. Voronkov A. V., Pozdnyakov D. I., Rukovitsyna V. M., Oganessian E. T., Voronkova M. P. Cardioprotective properties of chromone-3-aldehyde derivatives under an experimental cardiac infarction complicated with hypercholesterolemia. *Health Risk Analysis.* 2019;3:128-134. <https://doi.org/10.21668/health.risk/2019.3.15>
9. Percie du Sert N., Hurst V., Ahluwalia A. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 2020;18(7):e3000410. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410>
10. Demir D., Kuru Bektaşoğlu P., Koyuncuoğlu T. Neuroprotective effects of meldonate in a rat model of traumatic brain injury. *Injury.* 2019;50(10):1586-1592. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2019.08.036>
11. Руковицина В. М., Поздняков Д. И., Чиряпкин А. С., Оганесян Э. Т. Производные 3-формилхромона как модуляторы активности митохондриального комплекса III. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация.* 2019;4:114-121. [Rukovitsina V. M., Pozdnyakov D. I., Chiryapkin A. S., Oganessian E. T. Derivatives of 3-formylchromone as modulators of mitochondrial complex III activity. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya. – Bulletin of the Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy.* 2019;4:114-121. (In Russ.)].
12. Long Q., Huang L., Huang K., Yang Q. Assessing Mitochondrial Bioenergetics in Isolated Mitochondria from Mouse Heart Tissues Using Oroboros 2k-Oxygraph. *Methods Mol. Biol.* 2019;1966:237-246. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9195-2_19
13. Kras K. A., Hoffman N., Roust L.R., Benjamin T. R., Filipakis E. A., Katsanos C. S. Adenosine Triphosphate Production of Muscle Mitochondria after Acute Exercise in Lean and Obese Humans. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2019;51(3):445-453. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000001812>
14. Zhu Z., Guo R., Li Y., Li S., Tu P. Comparison of three analytical methods for superoxide produced by activated immune cells. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 2020;101:106637. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2019.106637>
15. Wilcox X. E., Ariola A., Jackson J. R., Slade K. M. Overlap Concentration and the Effect of Macromolecular Crowding on Citrate Synthase Activity. *Biochemistry.* 2020;59(18):1737-1746. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.0c00073>
16. Воронков А. В., Поздняков Д. И., Руковицина В. М., Веселова О. Ф., Олохова Е. А., Оганесян Э. Т. Антирадикальные и хелатирующие свойства производных хромон-3-альдегида. *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2019;82(12):32-35. [Voronkov A. V., Pozdnyakov D. I., Rukovitsina V. M., Veselova O. F., Olokhova E. A., Oganessian E. T. Antiradical and chelating properties of chromon-3-aldehyde derivatives. *Ekspierimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya. – Experimental and clinical pharmacology.* 2019;82(12):32-35. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.30906/0869-2092-2019-82-12-32-35>
17. Pozdnyakov D. I., Voronkov A. V., Rybalko A. E. Chromone-3-aldehyde derivatives – sirtuin 2 inhibitors for correction of muscular dysfunction. *Curr. Iss. Pharm. Med. Sci.* 2019;32(1):45-50. <https://doi.org/10.2478/cipms-2019-0010>
18. Van de Ven R. A. H., Santos D., Haigis M. C. Mitochondrial sirtuins and Molecular Mechanisms of Aging. *Trends Mol. Med.* 2017;23(4):320-331. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.02.005>

Поступила 03.08.2021

Сведения об авторах:

Поздняков Дмитрий Игоревич, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии; тел.: 89187560889; e-mail: pozdniackow.dmitry@yandex.ru

Рыбалко Илья Евгеньевич, студент 3 курса фармацевтического факультета; тел.: 89884871784; e-mail: kinder11101995@yandex.ru

Саркисян Кристина Хореновна, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии; тел.: 89286347378; e-mail: kristyfarm@rambler.ru