

УДК 615.036.8+616.12-008.1

Ключевые слова: кардиопротектор, Гепакардин, тропонин I, инфаркт миокарда

Key words: cardioprotector, Hepacardin, troponin I, myocardial infraction

Чуваев И. В., Глотова С. В., Кудряшов А. А., Ганкина Ю. В.

ИЗУЧЕНИЕ КАРДИОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ ПРЕПАРАТА ГЕПАКАРДИН THE STUDY OF CARDIOPROTECTIVE PROPERTIES OF THE PREPARATION HEPACARDIN

ФГОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины», Санкт-Петербург
Saint-Petersburg State Academy of Veterinary Medicine, Saint-Petersburg

*Институт Ветеринарной Биологии, Санкт-Петербург

**Institute of Veterinary Biology, Saint-Petersburg*

Чуваев Игорь Валерьевич, к.б.н., главный врач*

Адрес: 197101, Санкт-Петербург, ул. Большая Монетная, 22-50. Тел.: (812) 232-55-92

*Chuvaev Igor V., Ph.D. in Biology Science, Chief Veterinary Physician**

Address: 197101, Saint-Petersburg, Bolshaya Monetnaya street, 22-50. Tel.: +7 812 232-55-92

Глотова Светлана Вячеславовна, аспирант каф. фармакологии и токсикологии

Адрес: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская, д. 5, СПбГАВМ, каф. фармакологии и токсикологии

Glotova Svetlana V., Pharmacology and Toxicology Dept. Postgraduate

Address: 196084, Russia, Saint-Petersburg, Chernigovskaya street, 5, Saint-Petersburg State Academy of Veterinary Medicine, Pharmacology and Toxicology Dept.

Кудряшов Анатолий Алексеевич, зав. каф. патологической анатомии, проф., д.в.н.

Адрес: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская, д. 5, СПбГАВМ, каф. патологической анатомии. Тел.: (812) 388-13-78

Kudryashov Anatoliy A., Chief of the Dept. of Pathologic Anatomy, Professor, Doctor of Veterinary Science

Address: 196084, Russia, Saint-Petersburg, Chernigovskaya street, 5, Saint-Petersburg State Academy of Veterinary Medicine, Pathologic Anatomy Dept. Tel.: +7 812 388-13-78

Ганкина Юлия Владимировна, аспирант каф. патологической анатомии

Адрес: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская, д. 5, СПбГАВМ, каф. патологической анатомии

Gankina Julia V., Pathologic Anatomy Dept. Postgraduate

Address: 196084, Russia, Saint-Petersburg, Chernigovskaya street, 5, Saint-Petersburg State Academy of Veterinary Medicine, Pathologic Anatomy Dept.

Аннотация. На крысах с помощью адреналиновой модели поражения миокарда изучены кардиопротекторные свойства препарата Гепакардин. Профилактическое применение Гепакардина (14 дней, 50 мг/кг) с последующей адреналиновой нагрузкой (4 мг/кг, подкожно) в значительной степени предотвращало гибель животных; снижало выход в кровяное русло Тропонина I; препятствовало появлению на кардиограмме изменений, характерных для инфаркта миокарда; в значительной степени улучшало гистологическую картину в кардиомиоцитах в сравнении с контролем.

Summary. *Cardioprotective properties of the preparation Hepacardin were studied in rats by applying the adrenal model of myocardial lesion. Preventive application of Hepacardin (during 14 days, 50 mg/kg) with the following adrenal load (4 mg/kg subcutaneously) substantially contributed to averting of fatal cases, reduction of troponin I outflow into bloodstream, prevention of appearance of typical for myocardial infraction changes in cardiograms and improving of the histologic pattern in cardiomyocytes in comparison with the control group.*

Введение

Разработка и создание ветеринарных фармакологических средств гериатрической направленности представляет все больший и больший интерес для ветеринарной фармакологии [9, 17]. К обязательным эффектам средств, улучшающих качество жизни стареющих животных, можно отнести хондро-, гепато- и кардиопротекцию [15, 19].

Ранее был разработан и создан препарат ЧИН 3607 (Гепакардин) [16], включающий

в себя экстракты растительного и животного происхождения. Доклинические и клинические исследования этого препарата выявили его высокую безопасность [1] и эффективность как хондро- и гепатопротектора [12, 13].

Учитывая, что у животных старшей возрастной группы, с которой приходится сталкиваться ветеринарному врачу, одна из часто встречающихся проблем – это хроническая сердечная недостаточность, вызванная изменениями в миокарде различной этиологии [4],

а также учитывая свойства компонентов, входящих в состав препарата, на наш взгляд, было целесообразным изучение его возможных кардиопротекторных свойств на модели патологии сердца.

Известно [3, 5], что большие дозы адреналина способны вызывать у животных повреждение артерий и миокарда. Данные повреждения бывают настолько выраженными, что в сердце возникают некротические очаги, неотличимые от инфарктных. Это и определило выбор методического подхода к исследованию кардиопротекторных свойств Гепакардина.

Выбирая адреналиновую модель, мы полагали, что, если препарат проявит защитные свойства в таких жестких условиях, то в других, более мягких условиях, он заведомо будет оказывать кардиопротекторный эффект.

Целью данного исследования было изучение кардиопротекторных свойств препарата Гепакардин на модели острого поражения миокарда крыс, вызванного введением 0,1%-го раствора адреналина гидрохлорида.

Материалы и методы

Изучение кардиопротекторных свойств препарата Гепакардин проводили на крысах линии Wistar, самцах, массой 380–400 г, с использованием адреналиновой модели инфаркта миокарда [6], в модификации [14]. Данная модификация, по совокупности факторов, является, на наш взгляд, наиболее оптимальной для изучения кардиопротекторных свойств новых препаратов и может быть использована для скрининговых исследований.

Подопытные животные были разделены на 3 группы по 10 крыс в каждой:

1 группа – в течение 14 дней до однократного введения адреналина животные получали с кормом препарат Гепакардин ежедневно в дозе 50 мг/кг;

2 группа – однократное введение адреналина;

3 группа – контроль (интактные).

Для оценки эффективности профилактического применения препарата Гепакардин контролировали следующие показатели:

- выживаемость животных после введения адреналина;

- изменения на электрокардиограмме, сня-

той через 24 часа после введения животным адреналина. Кардиограмму крысам снимали на электрокардиографе CardiMax FX-7102 в стандартных отведениях I, II, III (двухполюсные отведения от конечностей: I – левая и правая передние конечности, II – левая задняя и правая передняя конечности, III – левая задняя и левая передняя конечности) в спинном положении;

- наличие в сыворотке крови крыс тропонина I через 48 часов после введения адреналина. Определение содержания тропонина I осуществляли иммунохроматографическим методом (HiSense TnI Card). Принцип метода основан на формировании окрашенной видимой полосы (комплекс антиген – антитело) в тестовой зоне устройства при взаимодействии антител к сТnI, иммобилизованных на твердой фазе теста с сТnI из образца крови;

- гистологическая картина миокарда крыс через 48 часов после введения адреналина. Материал для гистологического исследования сразу после взятия фиксировали в 10%-м нейтральном формалине. Фиксированный материал промывали водой, обезвоживали проводкой через спирты в возрастающей концентрации и заливали в парафин по общепринятой методике (Меджунов Г. В., 1968 г.). Из парафиновых блоков готовились гистологические срезы на микротоме толщиной 4–6 микрон, которые затем депарафинизировали и окрашивали гематоксилином и эозином. Оценка гистологических срезов производилась с помощью бинокулярного светооптического микроскопа МИКМЕД-1 при увеличении x 400 и x 200.

Результаты и обсуждение

Как показали проведенные исследования, профилактическое применение препарата Гепакардин в течение двух недель до введения адреналина полностью предотвращало гибель подопытных животных (табл. 1).

Как представлено в таблице 1, все животные группы № 1 через 24 часа после введения адреналина остались живы, хотя в первые 12 часов проявляли сильную заторможенность; у некоторых крыс этой группы отмечалась одышка (дыхание ртом), судороги, цианоз слизистых оболочек.

Влияние профилактического применения препарата Гепакардин на выживаемость крыс и появление тропонина I в крови после введения адреналина

Показатель \ Группа	№ 1 (Гепакардин+адреналин) n=10	№ 2 (адреналин) n=10	№ 3 (интактные) n=10
Выживаемость животных после адреналиновой нагрузки (%)	100	50	100
Появление тропонина I в сыворотке крови животных после адреналиновой нагрузки (% случаев)	40	100	0

В группе № 2 смертность в течение первых 12 часов после введения адреналина достигла 50 %. При вскрытии погибших животных данной группы патологические изменения наблюдались в грудной полости: легкие были гиперемированы, при разрезе и надавливании на легкие появлялась пенная жидкость, кусочек легкого при погружении плавал в толще воды; сердце имело шаровидную форму, стенки его были утолщены и немного отечны; в носовой полости наблюдалось значительное количество серозной жидкости; в брюшной полости патологических изменений не выявили. Наблюдаемые при вскрытии павших животных патологоанатомические изменения могут указывать на отек легких кардиогенной природы, что и явилось основной причиной смерти. У выживших животных группы № 2 до конца эксперимента проявлялись признаки заторможенности и вялости.

Животные группы № 3 вели себя как обычно, отклонений в их поведении, потреблении корма и воды отмечено не было.

Через 24 часа после введения адреналина было проведено снятие кардиограммы у животных всех групп.

При снятии ЭКГ у крыс было установлено следующее.

Группа №1:

- подъем сегмента ST выше изолинии и положительный зубец T наблюдали лишь в двух случаях (рис. 1, 2, показано стрелками). Зона трансмурального повреждения мышечных волокон (после острого нарушения коронарного кровообращения) обуславливает регистрацию на ЭКГ подъема сегмента ST выше изолинии и слияние его с положительным зубцом T;

- у трех крыс этой группы наблюдали значительное снижение вольтажа зубцов ЭКГ (рис. 3), в т. ч. зубца R. Высота зубца

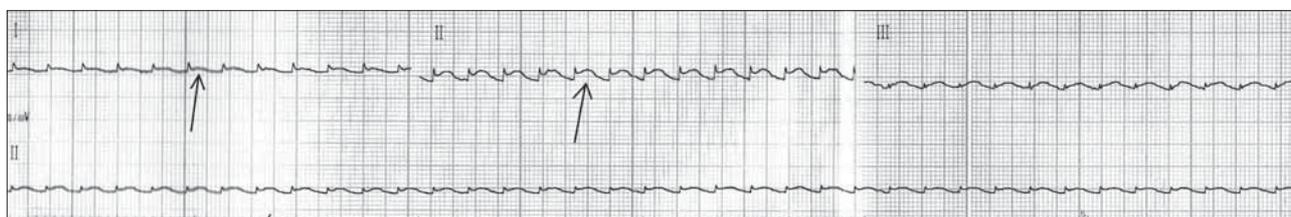


Рис. 1. Кардиограмма крысы из группы № 1 через 24 часа после введения адреналина.

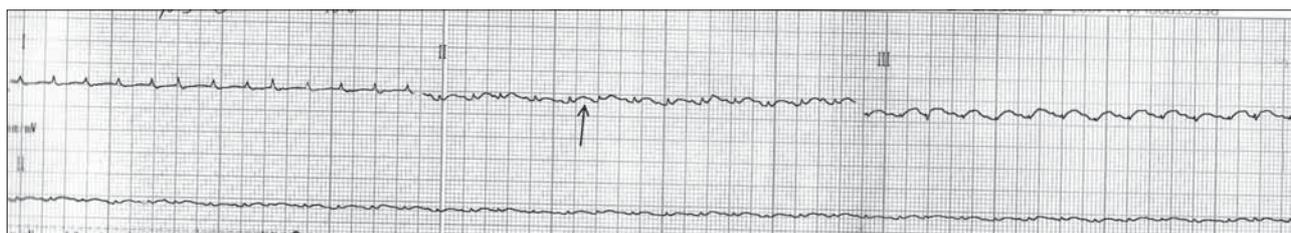


Рис. 2. Кардиограмма крысы из группы № 1 через 24 часа после введения адреналина.

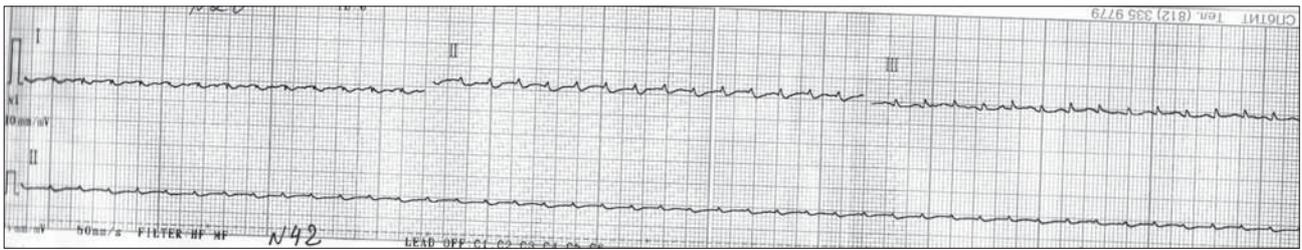


Рис. 3. Кардиограмма крысы из группы № 1 через 24 часа после введения адреналина.



Рис. 4. Кардиограмма крысы из группы № 1 через 24 часа после введения адреналина.

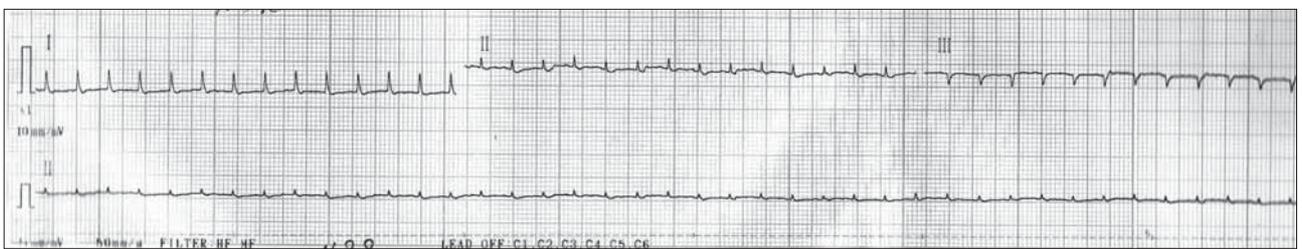


Рис. 5. Кардиограмма крысы из группы № 1 через 24 часа после введения адреналина.

R уменьшается за счет образования зоны повреждения в миокарде [7];

- у остальных крыс данной группы выраженных отклонений по ЭКГ выявлено не было (рис. 4, 5).

Группа № 2:

- подъем сегмента ST и положительный зубец T можно было четко наблюдать лишь на двух кардиограммах (рис. 6, 7, показано

стрелками); на остальных трех вольтаж зубцов был слишком занижен (рис. 8), что может свидетельствовать о выраженной токсической кардиомиопатии [7];

- наблюдалось замедление сердечного ритма (рис. 7, 9).

Группа № 3:

- на электрокардиограммах крыс из группы № 3 патологических изменений не выявлено.

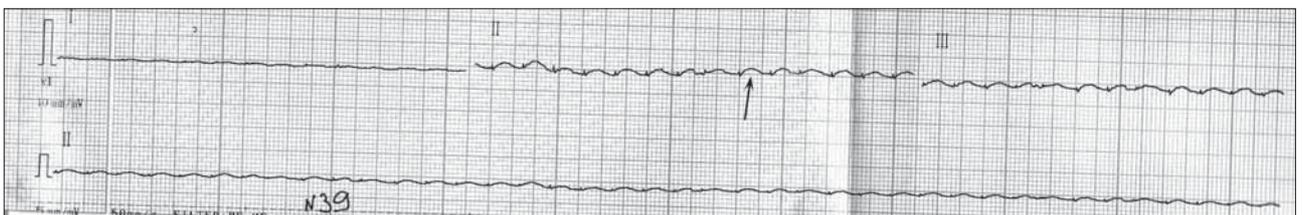


Рис. 6. Кардиограмма крысы из группы № 2 через 24 часа после введения адреналина.

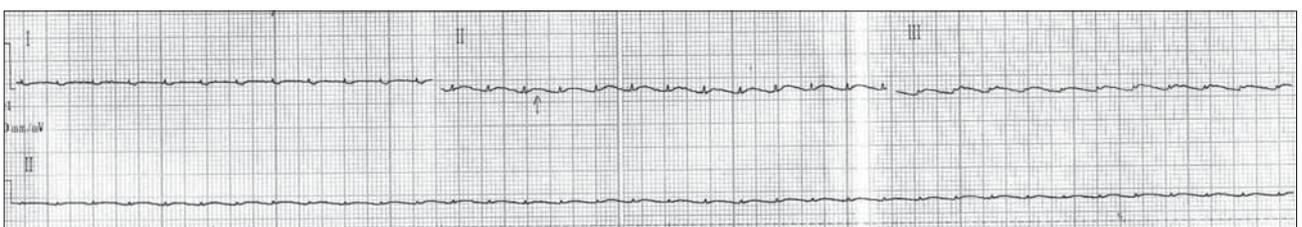


Рис. 7. Кардиограмма крысы из группы № 2 через 24 часа после введения адреналина.



Рис. 8. Кардиограмма крысы из группы № 2 через 24 часа после введения адреналина.

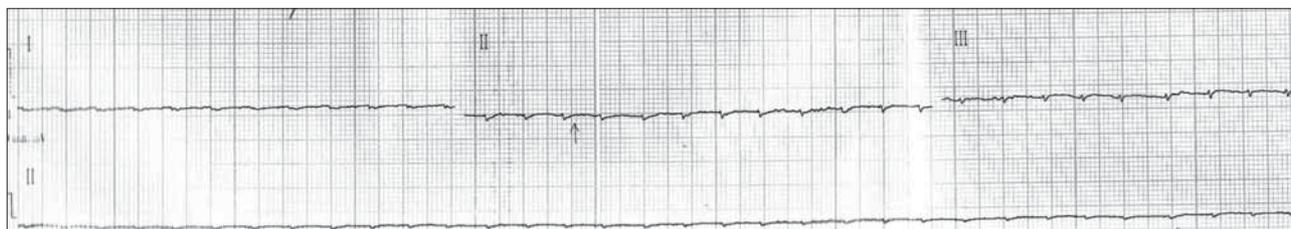
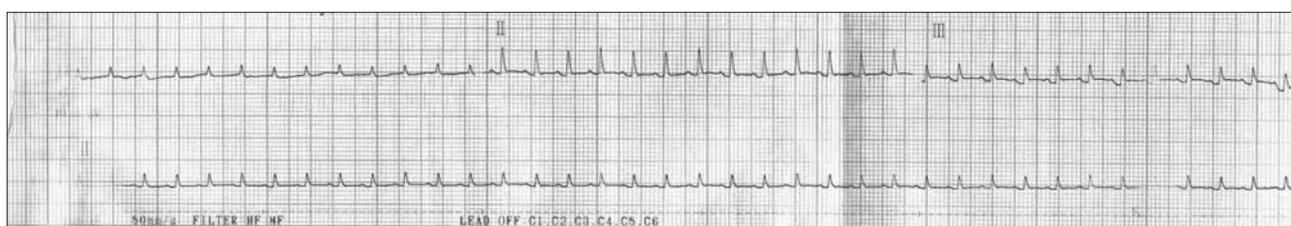


Рис. 9. Кардиограмма крысы из группы № 2 через 24 часа после введения адреналина.



Кардиограмма крысы, не подвергавшейся интоксикации.

Через 48 часов после введения адреналина все крысы были декапитированы, и в сыворотке крови каждой из них было проведено определение наличия тропонина I. Результаты исследования представлены в таблице 1.

Как представлено в таблице 1, из десяти животных первой группы положительная реакция на наличие тропонина I была выявлена только у четырех (40 %). У животных второй группы (n=5) тропонин I был выявлен во всех пяти исследуемых образцах крови (100 %). У интактных животных (группа № 3, n=10), тропонин I обнаружен не был ни в одном образце крови (0 %).

Согласно современным представлениям, диагностическим критерием инфаркта миокарда, наряду с клиническими и электрокардиографическими признаками, являются лабораторные маркеры повреждения миокарда: креатинфосфокиназа и ее МВ-фракция, миоглобин, лактатдегидрогеназа и тропонина [10]. Наибольший интерес среди указанных маркеров представляет тропонин. Это связано с его высокой специфичностью, с ранним (от 3 до 12 часов) и продолжительным повышением показателя (в среднем до 7–8 суток), что делает воз-

можным диагностику инфаркта миокарда ретроспективно.

Тропонины представляют собой белковые молекулы, формирующие состоящий из трех субъединиц (Тп С, Тп Т и Тп I) комплекс, расположенный на актиновых филаментах в поперечно-полосатой мускулатуре. Тропониновый комплекс участвует в процессах сокращения и расслабления миокарда. Тп С – Ca²⁺-связанный протеин – участвует в регуляции деятельности актиновых филаментов. Тп I ингибирует процесс сокращения мышечных волокон при нарушении связи Тп С с ионами кальция. Тп Т обеспечивает взаимодействие всего тропонинового комплекса с тропомиозином и филаментами актина [18]. В то время как основная часть сердечных тропонинов фиксирована на сократительных белках, небольшое их количество (6–8 % Тп Т и 3,5 % Тп I) находится в свободном состоянии в цитозоле. В норме сердечные тропонины не попадают в системный кровоток, однако тропонин С встречается как в сердце, так и гладкомышечных волокнах других внутренних органов, поэтому не используется для диагностики инфаркта миокарда. Как маркеры повреждения

миокарда используют тропонин Т или I. Определение как Тп Т, так и Тп I при условии использования качественных реагентов позволяет высокоинформативно диагностировать кардиомиопатию, и оба белка имеют эквивалентную диагностическую информативность.

Определение тропонинов – очень чувствительный тест, который позволяет подтвердить и мелкоочаговый инфаркт миокарда [2, 8]. Однако этот показатель может быть повышен не только при коронарной недостаточности, но и при сердечной недостаточности и/или гипертрофии миокарда на фоне артериальной гипертензии, т. е. при состояниях, сопряженных с повреждением кардиомиоцитов. И тем не менее на сегодняшний день тропонины Т и I рассматриваются как наиболее значимые и специфичные маркеры повреждения миокарда [11].

Таким образом, учитывая результаты, полученные по определению тропонина I в крови испытуемых животных после адреналиновой нагрузки, можно говорить о достаточно высоком профилактическом кардиопротекторном действии препарата Гепакардин.

Кроме сыворотки крови, у животных всех трех групп через 48 часов после введения адреналина для гисто-морфологического исследования был взят миокард.

При гистологическом исследовании миокарда было обнаружено следующее.

Группа № 1:

- в образцах сердечных мышц была выявлена зернистая дистрофия: набухание цитоплазмы, нечеткие границы клеток и ядра; ядра кардиомиоцитов были слабо окрашены, с нечеткими границами; саркоlemma сохранена; окраска мышечных волокон неоднородна (рис. 10, 11, 12).

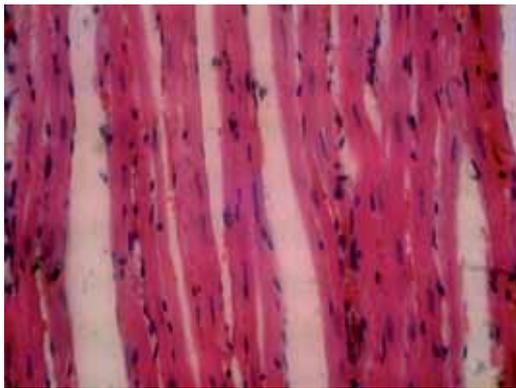


Рис. 10. Гистологическая картина миокарда крысы первой группы через 48 часов после адреналиновой нагрузки (в продольном сечении). Увеличение x 400.

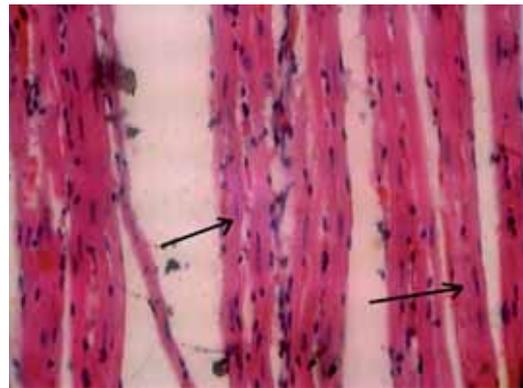


Рис. 12. Гистологическая картина миокарда крысы первой группы через 48 часов после адреналиновой нагрузки (стрелками показаны нечеткие границы ядер, набухание цитоплазмы). Увеличение x 400.

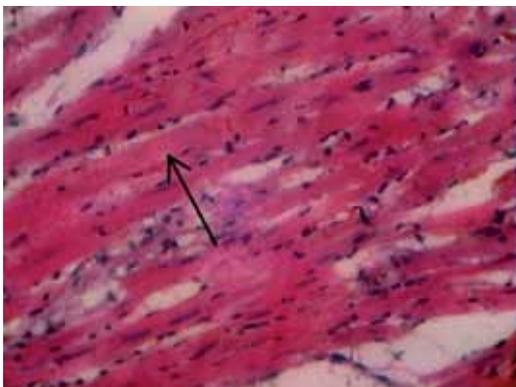


Рис. 11. Гистологическая картина миокарда крысы первой группы через 48 часов после адреналиновой нагрузки (стрелкой показано набухание цитоплазмы). Увеличение x 400.

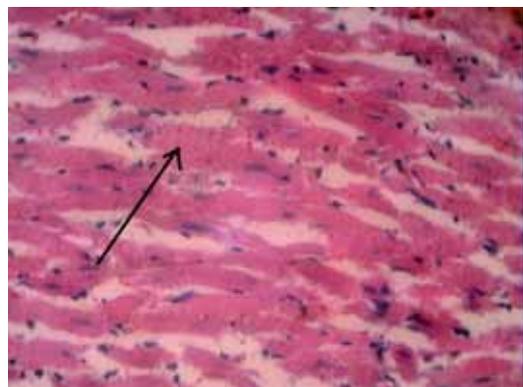


Рис. 13. Гистологическая картина миокарда крысы второй группы через 48 часов после адреналиновой нагрузки (стрелкой показаны набухание (глыбчатость) цитоплазмы, нечеткие границы ядер в кардиомиоцитах). Увеличение x 400.

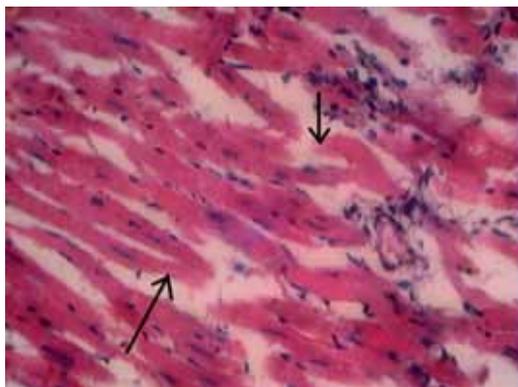


Рис. 14. Гистологическая картина миокарда крысы второй группы через 48 часов после адреналиновой нагрузки (стрелками показано отсутствие сарколеммы и отсутствие ядер в кардиомиоцитах). Увеличение x 400.

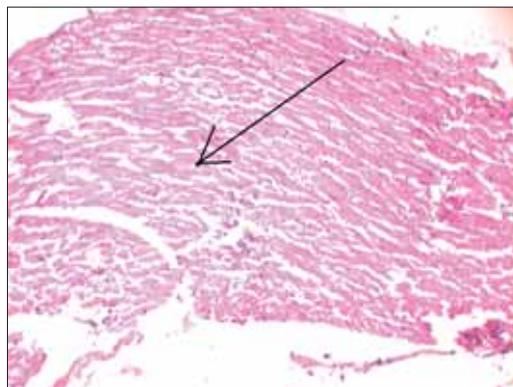


Рис. 16. Гистологическая картина миокарда крысы второй группы через 48 часов после адреналиновой нагрузки (стрелкой показан участок с менее четкой окраской). Увеличение x 200.

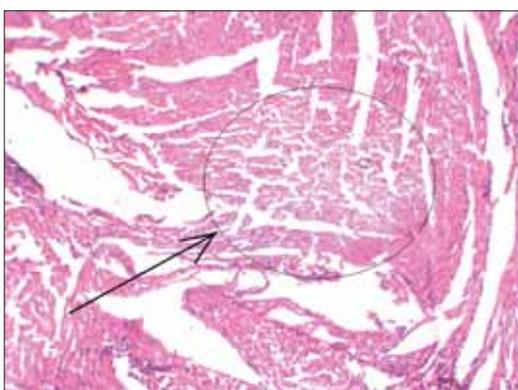


Рис. 15. Гистологическая картина миокарда крысы второй группы через 48 часов после адреналиновой нагрузки (стрелкой показан участок с менее четкой окраской). Увеличение x 200.

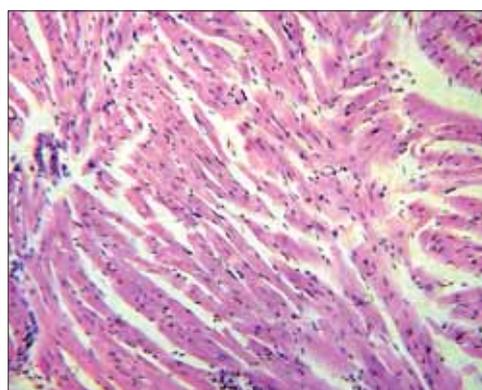


Рис. 17. Гистологическая картина миокарда крысы третьей группы (интактные). Увеличение x 200.

Группа № 2:

- в образцах сердечных мышц были обнаружены изменения, свойственные некробиозу кардиомиоцитов: отсутствие сарколеммы, сильное набухание и глыбчатость цитоплазмы; лизис ядер, а в некоторых клетках – полное их отсутствие (рис. 13, 14); в некоторых образцах миокарда обнаружили участки с более светлой окраской мышечной ткани, что дает возможность предположить ишемию (рис. 15, 16).

Группа № 3:

- в образцах сердечных мышц выраженных изменений не обнаружено (рис. 17): ядра кардиомиоцитов были хорошо видны, имели удлиненно-овальную форму, располагались ближе к центру цитоплазмы и своей длинной осью были ориентированы параллельно сарколемме; в саркоплазме видны поперечные полосы; цитоплазма некоторых кардиомио-

цитов неравномерно или очень насыщенно окрашена; сарколемма четко определялась.

Выводы

1. Однократное введение крысам раствора адреналина гидрохлорида подкожно в дозе 4 мг/кг вызывает гибель 50 % испытуемых животных в течение первых 12 часов после введения адреналина.

2. Профилактическое применение препарата Гепакардин крысам в течение 14 дней в дозе 50 мг/кг предотвращает гибель животных от адреналиновой нагрузки (4 мг/кг).

3. Однократное введение крысам раствора адреналина гидрохлорида подкожно в дозе 4 мг/кг приводит через 24 часа к четким изменениям кардиограммы животных, характерным для некроза клеток сердечной мышцы (инфаркта миокарда).

4. Профилактическое применение препарата Гепакардин крысам в течение 14 дней в дозе 50 мг/кг в значительной степени предотвращает появление на кардиограмме изменений, характерных для инфаркта миокарда, вызванного адреналиновой нагрузкой (4 мг/кг).

5. Однократное введение крысам раствора адреналина гидрохлорида подкожно в дозе 4 мг/кг вызывает через 48 часов появление в сыворотке крови тропонина I у 100 % испытуемых животных.

6. Профилактическое применение препарата Гепакардин крысам в течение 14 дней в дозе 50 мг/кг предотвращает появление тропонина I в сыворотке крови у 60 % крыс, подвергшихся адреналиновой нагрузке (4 мг/кг).

7. Однократное введение крысам раствора адреналина гидрохлорида подкожно в дозе 4 мг/кг вызывает через 48 часов гистологические изменения в миокарде, характерные для начальной стадии некроза кардиомиоцитов.

8. Профилактическое применение препарата Гепакардин крысам в течение 14 дней в дозе 50 мг/кг предотвращает гистологические изменения в миокарде, характерные для начальной стадии некроза кардиомиоцитов у крыс с адреналиновой нагрузкой (4 мг/кг).

Список литературы

1. Глотова, С. В. Изучение острой и хронической токсичности препарата ЧИН 3607 (Гепакардин) / С. В. Глотова // Актуальные вопросы ветеринарной биологии – 2009. – № 2 (2) – С. 15–18.
2. Гогин, Е. Е. Острый коронарный синдром: этапы диагностики, определяющие тактику оказания помощи / Е. Е. Гогин // Терапевтический архив. – 2001. – № 4. – С. 5–11.
3. Гофман, Б. Катехоламины и средства, влияющие на адренэргическую передачу / Б. Гофман // Клиническая фармакология по Гудману и Гилману. Книга 1. – М., 2006. – С. 185.
4. Дейвис, Майк. Гериятрия собак и кошек / М. Дейвис. – М. : Аквариум, 2002. – С. 25.
5. Меерсон, Ф. З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца / Ф. З. Меерсон. – М. : Медицина, 1984. – 269 с.
6. Непомнящих, Л. М. Альтернативная недостаточность мышечных клеток сердца при метаболических и ишемических повреждениях / Л. М. Непомнящих. – М., 1998. – С. 56.

7. Орлов, В. Н. Руководство по электрокардиографии / В. Н. Орлов. – М., 1983. – С. 67.

8. Сапрыгин, Д. Б. Современная диагностика и оценка острого коронарного синдрома: значение определения тропонинов / Д. Б. Сапрыгин // Лечащий врач. – 2005. – № 4. – С. 54–56.

9. Соколов, В. Д. Гериятрическое направление в ветеринарной фармакологии / В. Д. Соколов, И. В. Чуваев // Материалы первого международного конгресса ветеринарных фармакологов и токсикологов «Эффективные и безопасные лекарственные средства», СПб., 2008. – С. 58.

10. Трифонов, И. Р. Биохимические маркеры некроза миокарда. Общая характеристика биомаркеров, их применение для диагностики инфаркта миокарда: обзор современных рекомендаций / И. Р. Трифонов // Кардиология. – 2001. – № 11. – С. 93–95.

11. Целуйко, В. И. Уровень тропонина I и клиническое течение инфаркта миокарда / В. И. Целуйко, Е. Г. Почепцова, С. М. Карлов // Экспериментальная и клиническая медицина. – 2003. – № 3–4. – С. 67–71.

12. Чуваев, И. В. Изучение гепатопротекторных свойств препарата ЧИН 3607 на модели острого гепатита / С. В. Глотова, И. В. Чуваев, Н. Л. Андреева // Ветеринарная практика. – 2008. – № 3 (42). – С. 116–121.

13. Чуваев, И. В. Клинические испытания препарата Гепакардин на собаках старшей возрастной группы / И. В. Чуваев, С. В. Глотова, Н. Л. Андреева // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. – 2009. – № 4 (4). – С. 24–30.

14. Чуваев, И. В. Оптимизация адреналиновой модели инфаркта миокарда на крысах / И. В. Чуваев, С. В. Глотова // Материалы Всероссийского съезда ветеринарных фармакологов и токсикологов «Эффективные и безопасные лекарственные средства в ветеринарии», СПб., 2009. – С. 28–31.

15. Чуваев, И. В. Сравнительный анализ обращений владельцев собак в клинику «Институт Ветеринарной Биологии» за 1998 и 2008 гг. / И. В. Чуваев, В. Д. Соколов, С. В. Глотова // Материалы всероссийского съезда ветеринарных фармакологов и токсикологов «Эффективные и безопасные средства в ветеринарии», 2009. – С. 90.

16. Чуваев, И. В. Необходимость изыскания гериятрических средств для плотоядных / И. В. Чуваев, В. Д. Соколов, С. В. Глотова // XIX Международная научно-практическая конференция по фармакологии и токсикологии : [материалы]. – СПб., 2007.

17. Cupp, C. J. The role of nutritional interventions in the longitive and maintenance of long-term health in aging cats / C. J. Cupp, W. W. Kerr, C. Jean-Philippe // Intern Journal Appl. Res. Vet. Med. – 2008. – N 6. – P. 69–81.

18. Korff, S. Heart // S. Korff, H. A. Katus, E. Giannitsis. – 2006. – V. 92. – P. 987–993.

19. Witte, P. Ортопедические болезни стареющих кошек / P. Witte, H. Scott // Veterinaty focus. – N 19 (3), 2009. – С. 46–49.