

## Влияние новых производных хромон-3-альдегида на развитие мышечной дисфункции в условиях эксперимента

А.В. Воронков, Д.И. Поздняков, В.М. Руковицина, Э.Т. Оганесян

## Impact of new derivatives chromon-3-aldehyde in the development of muscle dysfunction in experimental conditions

A.V. Voronkov, D.I. Pozdnyakov, V.M. Rukovitsyna, E.T. Oganesyana

*Пятигорский медико-фармацевтический институт-филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет», г. Пятигорск*

**Ключевые слова:** мышечное утомление, производные хромона, мексидол, метапрот

### Резюме

Влияние новых производных хромон-3-альдегида на развитие мышечной дисфункции в условиях эксперимента

*А.В. Воронков, Д.И. Поздняков, В.М. Руковицина, Э.Т. Оганесян*

Статья посвящена изучению влияния новых производных хромон-3-альдегида на развитие мышечного утомления в условиях эксперимента. Исследование выполнено на мышцах-самцах, которым электромиостимуляцией моделировали мышечное утомление, оценку изменения мышечной функции проводили в тесте «сила-хватки», подтверждаемого серией биохимических анализов. Изучаемые соединения вводились профилактически на протяжении 7 суток до воспроизведения мышечной дисфункции в дозе, равной 1/100 от LD<sub>50</sub>. В результате установлено, что применение изучаемых производных хромон-3-альдегида способствовало устранению проявлений мышечной дисфункции, восстановлению функциональной активности скелетной мускулатуры, нормализации процессов энергопродукции, миогенеза и аэробного окисления. При этом, исследуемые соединения показали эквивалентную фармакологическую эффективность с референтными препаратами Мексидолом и Метапротом.

Ключевые слова: мышечное утомление, производные хромона, Мексидол, Метапрот.

**Воронков Андрей Владиславович** – доцент, д.м.н., заведующий кафедрой фармакологии с курсом клинической фармакологии Пятигорского медико-фармацевтического института. Контактная информация: e-mail: rgohor77@mail.ru, пр. Калинина, 11, Пятигорск, Ставропольский край, Россия, 357500

**Поздняков Дмитрий Игоревич** – преподаватель кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии Пятигорского медико-фармацевтического института. Контактная информация: e-mail: rozdniaskow.dmitry@yandex.ru, пр. Калинина, 11, Пятигорск, Ставропольский край, Россия, 357500

**Руковицина Виктория Михайловна** – аспирант кафедры органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института. Контактная информация: e-mail: rukovitsina.vika@mail.ru, пр. Калинина, 11, Пятигорск, Ставропольский край, Россия, 357500

**Оганесян Эдуард Тоникович** – профессор, д.фарм.н., заведующий кафедрой органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института. Контактная информация: e-mail: edwardow@mail.ru, пр. Калинина, 11, Пятигорск, Ставропольский край, Россия, 357500

## Abstract

## Impact of new derivatives chromon-3-aldehyde in the development of muscle dysfunction in experimental conditions

A.V. Voronkov, D.I. Pozdnyakov, V.M. Rukovitsyna, E.T. Oganesyana

The article is devoted to the study of the influence of new derivatives of chromone-3-aldehyde on the development of muscle fatigue in an experiment. The study was performed on male mice, which modeled muscle fatigue by electromyostimulation method; the evaluation of changes in muscle function was carried out in the test «strength-grip», confirmed by a series of biochemical tests. The studied compounds were administered prophylactically for 7 days prior to the play of muscle dysfunction in a dose equal to 1 / 100th of LD50. As a result, it was found that the use of the studied derivatives of chromone-3-aldehyde contributed to the elimination of manifestations of muscle dysfunction, functional activity of skeletal muscles, normalization of energy production, myogenesis and aerobic oxidation. Thus the test compound showed equivalent pharmacological efficacy with a reference drug Mexidol and Metoprolol.

Keywords: muscle fatigue, derivatives of chromone, Mexidol, Metoprolol.

## Введение

Хромоны – биологически активные вещества гетероциклической природы, в основе которых лежит ядро бензо-γ-пирона. Хромоны и их структурные аналоги обладают обширным спектром фармакологической активности, включающей в себя нейропротективное, противоопухолевое, антиоксидантное, антиаллергическое, противовоспалительное и антипролиферативное действие [1]. Кроме того, описано, что модифицированные структуры на основе хромона могут обладать тирозин- и протеинкиназа-ингибирующей активностью, регенеративным действием, реализуемым на уровне экспрессии соответствующих генов [2].

Известно, что основой патогенеза мышечного утомления является индукция миодистрофических процессов с активацией воспаления, оксидативного стресса, митохондриальной дисфункции, что сопровождается ухудшением энергопродукции, развитием лактат-ацидоза, усилением апоптоза [3]. Таким образом, исходя из ведущих патогенетических звеньев мышечной дисфункции и спектра фармакологической активности производных хромона, можно предположить, что применение данных веществ способно нивелировать проявления мышечного утомления и делает данные объекты перспективными для изучения с целью создания средств для коррекции мышечной дисфункции.

## Цель исследования

В эксперименте оценить безопасность и влияние новых производных хромон-3-альдегида на развитие мышечного утомления.

## Материал и методы

В качестве биологической модели в работе использовали 160 половозрелых мышей-самцов линии Balb/c массой 23-25 грамм. Исследование выполнено с соблюдением норм международной экспериментальной этики и соответствовало требовани-

ям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Strasbourg, 22 June, 1998). Изучаемые соединения были получены на кафедре органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института под руководством проф., д.ф.н. Э.Т. Оганесяна и представляли собой новые замещенные производные хромон-3-альдегида под условными шифрами Х3АНО<sub>2</sub>, Х3АОАС и Х3А.Н.

Работа состояла из двух последовательных этапов. На первом этапе с целью оценки безопасности применения новых производных хромон-3-альдегида определяли токсичность изучаемых соединений в условиях острого эксперимента с расчетом среднелетальной дозы для каждого соединения (LD<sub>50</sub>). LD<sub>50</sub> рассчитывали по методу Финни. Для реализации поставленной задачи на данном этапе исследования было сформировано 9 групп мышей по 10 особей в каждой (по 30 животных для определения LD<sub>50</sub> каждого соединения).

На втором этапе исследования производили оценку влияния изучаемых соединений на развитие мышечной дисфункции в условиях электромиостимуляционного теста. Оставшиеся животные подвергались рандомизации по величине мышечной силы, оцениваемой в тесте «сила-хватки» (точка 1), на основании чего было сформировано 7 равных экспериментальных групп (n=10). Первую группу составили животные группы положительного контроля (ПК), которым не моделировали мышечное утомление. Вторая группа мышей – группа негативного контроля (НК) с воспроизведенной мышечной дисфункцией, но не получавшая фармакологическую поддержку. Третьей и четвертой группам животных вводили препараты сравнения – «Мексидол» (Фармасофт, Россия) в дозе 100 мг/кг [4] и «Метапрот» (ANVI Lab., Россия) в дозе 14,3 мг/кг [5]. Группы мышей с пятой по седьмую получали исследуемые соединения Х3АНО<sub>2</sub>, Х3АОАС и Х3АН, соответственно, в дозах, равных 1/100 от величины LD<sub>50</sub> для каждого соединения. Изучаемые объекты и референтные препараты вводились per os профи-

лактически на протяжении 7 дней до моделирования мышечного утомления.

Мышечную дисфункцию воспроизводили электромиостимуляционным методом: в условиях хлоралгидратной анестезии (350 мг/кг) экспериментальным животным в *m. biceps brachii* вживляли электроды и далее через 24 часа производили электромиостимуляцию в режиме: 100 Гц, 3 сек. (3 сокращения) → 3 мин. утомительного сокращения (субмаксимальная стимуляция, 40 Гц) → 100 Гц, 3 сек. (3 сокращения) [6]. После миостимуляции производили оценку величины мышечной дисфункции в тесте «сила-хватки» (точка 2). Далее, через 30 мин., с целью оценки функционального резерва и степени восстановления активности поперечно-полосатой мускулатуры повторно определяли силу хватки мышцей (точка 3). Впоследствии у мышцей производили забор биологического материала (кровь, с последующим получением сыворотки и мышечная ткань *m. biceps brachii*) и проводили серию биохимических тестов с определением активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ), креатинфосфокиназы (КФК), концентрации креатинина, и миоглобина в сыворотке крови. В мышечной ткани определяли концентрацию белка, уровень молочной и пировиноградной кислот, для чего готовили гомогенат мышц на 1М фосфатном буфере (рН 7,8) в соотношении 1:10. Активность ЛДГ, КФК, концентрацию креатинина, белка, молочной и пировиноградной кислот определяли с использованием стандартных наборов реактивов («Ольвекс диагностикум»). Уровень миоглобина оценивали методом твердофазного иммуноферментного анализа (реактивы «Cloud Clone», США). Пробоподготовка и ход анализа соответствовал инструкции, прилагаемой к каждому набору.

Статистическую обработку полученных данных проводили с применением программного пакета «STATISTICA 6.0» (StatSoft, США). Результаты представляли в виде  $M \pm S.E.$  Для сравнения групп средних применяли «ANOVA»-анализ с пост-тестом

Ньюмена-Кейсла. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

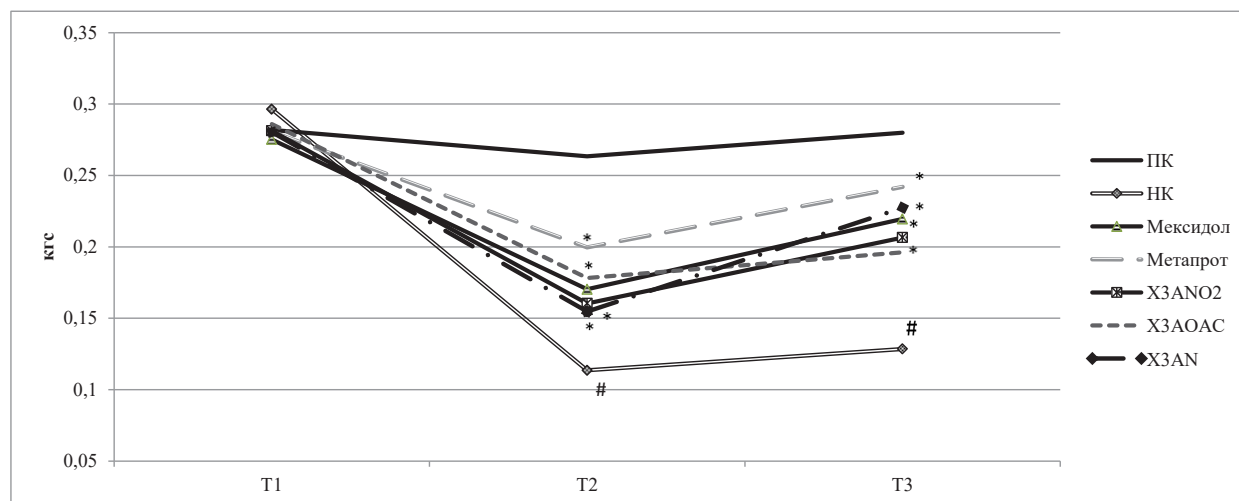
## Результаты исследования

На первом этапе исследования установлено, что значение  $LD_{50}$  для соединений ХЗАНО<sub>2</sub>, ХЗАОАС и ХЗАН составило 3558,44 мг/кг; 4012,51 мг/кг и 3874,42 мг/кг, соответственно. Таким образом, дозы изучаемых соединений для проведения второго этапа исследования составили: ХЗАНО<sub>2</sub> – 35,6 мг/кг; ХЗАОАС – 40,12 мг/кг; ХЗАН – 38,7 мг/кг.

В ходе проведения второго этапа исследования установлено, что у ПК группы мышцей сила хватки на всех точках регистрации (точка 1-3) значимо не изменялась (рис.1). У группы животных НК сила хватки непосредственно после миостимуляции снизилась на 211,1% ( $p < 0,05$ ) относительно фонового значения мышечной силы данной группы животных и на 200% ( $p < 0,05$ ) была ниже аналогичного значения ПК группы мышцей. Следует отметить, что по истечении 30 мин. (точка 3) мышечная сила животных НК группы статистически значимо не изменилась по отношению ко второму измерению, что свидетельствует о низкой скорости восстановления функциональной активности поперечнополосатой мускулатуры у мышцей НК группы (рис.1).

На фоне профилактического введения животным Мексидола (рис.2) сила хватки после миостимуляции была выше аналогичного показателя НК группы мышцей на 88,8% ( $p < 0,05$ ), но на 58,8% ( $p < 0,05$ ) была ниже фонового значения данной группы животных. По истечении 30 мин. (точка 3) сила хватки мышцей, получавших Мексидол, превосходила показатель НК группы животных на 110% ( $p < 0,05$ ) и на 23,5% ( $p < 0,05$ ) была выше мышечной силы данной группы животных, оцениваемой непосредственно после миостимуляции (точка 2).

При введении экспериментальным животным референтного препарата Метапрот сила хватки мышцей после электромиостимуляции превосходила



**Рис 1** Влияние исследуемых соединений и референтных препаратов на развитие мышечной дисфункции в условиях электромиостимуляционного теста

таковую у НК группы мышей на 122,2% ( $p < 0,05$ ), а по истечении 30 мин. – на 130% ( $p < 0,05$ ). Следует отметить, что восстановление мышечного тонуса у мышей на фоне введения Метапрота происходило более интенсивно, нежели у НК группы животных, о чем свидетельствует более выраженное изменение силы хватки мышей, которым вводили Метапрот, по сравнению с НК группой животных между точками 2 и 3 (на 15% ( $p < 0,05$ )).

При профилактическом введении исследуемых соединений сила хватки мышей в точке 2 изменялась практически в равной степени (рис.1): так, на фоне применения соединений  $XZANO_2$ ,  $XZAOAC$  и  $XZAN$  сила хватки животных, превосходила аналогичный показатель НК группы мышей на 76,9% ( $p < 0,05$ ), 84,5% ( $p < 0,05$ ) и 69,3% ( $p < 0,05$ ), соответственно. В точке 3 мышечная сила животных, получавших  $XZANO_2$ ,  $XZAOAC$  и  $XZAN$ , статистически значимо была выше таковой у НК группы мышей на 81,1% ( $p < 0,05$ ), 73,9% ( $p < 0,05$ ) и 97,6% ( $p < 0,05$ ), соответственно. При этом, сила хватки мышей, которым вводили  $XZAOAC$ , статистически значимо по отношению к показателям после миостимуляции не изменилась, в то время как при введении мышам соединений  $XZANO_2$  и  $XZAN$  мышечный тонус по истечении 30 мин. с момента миостимуляции был выше такового в точке 2 на 22,5% ( $p < 0,05$ ) и 38,6% ( $p < 0,05$ ), соответственно (рис.1).

При проведении биохимических тестов (табл.1) установлено, что мышечная дисфункция, воспроизведенная электромиостимуляцией, сопровождается повышением у НК группы мышей активности ЛДГ и КФК в сыворотке крови на 119,6% ( $p < 0,05$ ) и 101,6%, соответственно, увеличением сывороточной концентрации миоглобина на 257,8% ( $p < 0,05$ ) и снижением уровня креатинина в сыворотке крови на 125,8% ( $p < 0,05$ ). Также у НК группы животных относительно ПК группы мышей установлено повы-

шение концентрации молочной и пировиноградной кислот, снижение концентрации белка в гомогенате мышечной ткани на 245% ( $p < 0,05$ ), 373,7% ( $p < 0,05$ ) и 107,4% ( $p < 0,05$ ), соответственно.

На фоне введения мышам референтных препаратов Мексидол и Метапрот концентрация молочной и пировиноградной кислот в гомогенате мышечной ткани статистически значимо не отличалась от показателей ПК группы животных. Концентрация белка в гомогенате мышц мышей, получавших Мексидол и Метапрот, была выше, чем показатель НК группы животных на 53,7% ( $p < 0,05$ ) и 76,2% ( $p < 0,05$ ), соответственно (табл.1). Активность ЛДГ и КФК, концентрация миоглобина в сыворотке крови у мышей, которым вводили Мексидол, уменьшилась по сравнению с НК группой животных на 37,8% ( $p < 0,05$ ), 101,6% ( $p < 0,05$ ) и 67,8% ( $p < 0,05$ ), соответственно, а концентрация креатинина, напротив, увеличилась на 78,4% ( $p < 0,05$ ). На фоне введения экспериментальным животным препарата сравнения Метапрот (табл.1) по отношению к НК группе мышей отмечено снижение активности ЛДГ и КФК, содержание миоглобина на 122,3% ( $p < 0,05$ ), 182,2% ( $p < 0,05$ ) и 71,3% ( $p < 0,05$ ), соответственно, при увеличении концентрации креатинина на 107,8% ( $p < 0,05$ ).

При применении изучаемых веществ  $XZANO_2$ ,  $XZAOAC$  и  $XZAN$  концентрация лактата в гомогенате мышц экспериментальных животных уменьшилась по сравнению с НК группой мышей на 68,3% ( $p < 0,05$ ); 40,8% ( $p < 0,05$ ); 81,5% ( $p < 0,05$ ), содержание пирувата также снизилось на 260% ( $p < 0,05$ ); 200% ( $p < 0,05$ ) и 291,3% ( $p < 0,05$ ), соответственно. Концентрация белка мышечной ткани на фоне применения соединений  $XZANO_2$ ,  $XZAOAC$  и  $XZAN$  по отношению к НК группе мышей увеличилась на 57,1% ( $p < 0,05$ ); 31,8% ( $p < 0,05$ ) и 69,1% ( $p < 0,05$ ), соответственно. Кроме того, при введении животным

Табл. 1

**Изменение биохимических показателей на фоне коррекции мышечной дисфункции изучаемыми соединениями и препаратами сравнения**

Группа	ПК	НК	Мексидол	Метапрот	$XZANO_2$	$XZAOAC$	$XZAN$
Лактат, ммоль/г	0,20±0,003	0,69±0,06#	0,29±0,011*	0,26±0,012*	0,41±0,035*	0,49±0,039*	0,38±0,019*
Пируват, ммоль/г	0,019±0,001	0,09±0,038	0,018±0,001*	0,017±0,011*	0,025±0,002	0,03±0,002*	0,023±0,001*
Белок г/л	15,01±0,325	7,24±0,547#	11,126±0,964*	12,756±0,697*	11,37±0,497*	9,54±0,518*	12,238±0,45*
Миоглобин, нг/мл	11,21±0,773	40,11±1,237#	23,90±3,737*	18,04±3,28*	28,44±2,265*	20,28±1,031*	19,05±1,308*
ЛДГ, Ед/л	1020,79 ±82,462	2241,61 ±92,176#	1627 ±102,846*	794,24 ±73,463*	1300,47 ±120,196*	1110,33 ±148,233*	971 ±102,438*
КФК, Ед/л	606,45 ±36,523	1222,70 ±35,473#	791,83 ±80,764*	713,46 ±72,796*	756,28 ±77,181*	860,33 ±106,826*	516,36 ±32,187*
Креатинин, ммоль/л	90,65±4,579	40,14±3,414#	71,62±5,860*	83,41±6,853*	67,06±1,841*	69,85±6,159*	77,64±5,519*

Примечание: ПК – группа животных положительного контроля; НК – группа животных негативного контроля;

\*- статистически значимо относительно НК группы животных;

# – статистически значимо относительно ПК группы животных.



изучаемых соединений ХЗАНО<sub>2</sub>, ХЗАОАС и ХЗАН активность ЛДГ по сравнению с НК группой мышей снизилась на 75,3% (p<0,05), 102,5% (p<0,05) и 130,9% (p<0,05), соответственно, активность КФК также уменьшилась на 61,7% (p<0,05); 74% (p<0,05) и 136,8% (p<0,05), соответственно. Концентрация миоглобина в сыворотке крови мышей на фоне коррекции мышечной дисфункции соединениями ХЗАНО<sub>2</sub>, ХЗАОАС и ХЗАН снизилась на 41% (p<0,05), 97,8% (p<0,05) и 110,5% (p<0,05), соответственно, напротив, содержание креатинина увеличилось на 67,1% (p<0,05), 74% (p<0,05) и 93,4% (p<0,05) соответственно.

Полученные результаты свидетельствуют, что профилактическое введение новых производных хромон-3-альдегида способствовало устранению проявлению мышечной дисфункции у экспериментальных животных в условиях электромиостимуляции, что выражалось в восстановлении процессов аэробного дыхания, образования макроэргов, о чем свидетельствует нормализация концентрации молочной, пировиноградной кислот, активности ЛДГ и КФК, уровня креатинина. Также на основании повышения концентрации белка в мышечной ткани и снижении сывороточной концентрации миоглобина можно предположить, что применение изучаемых соединений препятствовало мышечной деструкции. Исходя из анализа литературных источников, подобное действие производных хромона может быть связано с улучшением митохондриальной функции, посредством антагонистического взаимодействия с FPR1 рецептором [7]. Кроме того для дериватов хромона описано регулирующее действие на каскад реакций аннексина 1. Проявляя одновременно как стимулирующие, так и ингибирующие свойства на функцию аннексина 1, производные хромона оказывают антиапоптотическое действие [8], подавляя, тем самым, деструкцию мышечной ткани, в тоже время активация каскада аннексина 1 способствует увеличению пула мультипотентных прогениторных C2C12 клеток [9], что в сочетании с увеличением активности IGF1 ведет к усилению миогенеза [10] и сохранению сократительной функции скелетной мускулатуры.

## Выводы

В результате электромиостимуляции у животных наблюдается развитие мышечной дисфункции, выражаемой в снижении мышечной силы (на 211,1% (p<0,05)), что подтверждалось данными биохимического исследования.

Применение изучаемых производных хромон-3-альдегида под шифрами ХЗАНО<sub>2</sub>, ХЗАОАС и ХЗАН способствовало устранению проявления мышечной дисфункции у мышей, что сопровождалось нормализацией процессов аэробного окисления, энергопродукции и миодеструкции/миогенеза.

Наряду с высокой фармакологической активностью исследуемые производные хромон-3-

альдегида характеризуются низкой токсичностью (LD<sub>50</sub> для соединений ХЗАНО<sub>2</sub>, ХЗАОАС и ХЗАН составило 3558,44 мг/кг; 4012,51 мг/кг и 3874,42 мг/кг), что делает данные соединения перспективными объектами для дальнейшего изучения с целью создания средств для коррекции мышечного утомления.

## Литература

1. Kumar S., Kob J. *Physicochemical, Optical and Biological Activity of Chitosan-Chromone Derivative for Biomedical Applications // International Journal of Molecular Sciences.* – 2012. – Vol.13 (5). – P.6102-6116. doi:10.3390/ijms13056102.
2. D.H. Nam, K.Y. Lee, C.S. Moon, Y.S. Lee *Synthesis and anticancer activity of chromone-based analogs of lavendustin A // Eur. J. Med. Chem.* – 2010. – Vol.45. – P. 4288–4292.
3. S.K. Powers, G.S. Lynch, K.T. Murphy, et al. *Disease-Induced Skeletal Muscle Atrophy and Fatigue // Medicine and science in sports and exercise.* – 2016. – Vol. 48 (11). – P. 2307-2319. doi:10.1249/MSS.0000000000000975.
4. Т.А. Воронина, И.Г. Капица, Е.А. Иванова *Сравнительное исследование влияния мексидола и милдроната на физическую работоспособность в эксперименте // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* – 2017. – Т. 117, № 4. – С. 71-74.
5. С.И. Баулин, С.М. Рогачева, С.В. Афанасьева *Изучение влияния фармацевтических препаратов на физическую работоспособность // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 2013. – Т. 155, № 5. – С. 586-589.
6. N.S. Gregory, Gibson-Corley K., Frey-Law L., et al. *Fatigue-enhanced hyperalgesia in response to muscle insult: induction and development occur in a sex-dependent manner // Pain.* – 2013. – Vol. 154 (12). – P. 2668-2676.
7. I.A. Schepetkin, L.N. Kirpotina, A.I. Khlebnikov, et al. *Antagonism of Human Formyl Peptide Receptor 1 (FPR1) by Chromones and Related Isoflavones // Biochemical pharmacology.* – 2014. – Vol. 92 (4). – P. 627-641. doi:10.1016/j.bcp.2014.09.027.
8. Biggarro V., Behedere R., Dal Piaz F., et al. *Annexin A1 Induces Skeletal Muscle Cell Migration Acting through Formyl Peptide Receptors. Hotchin N.A, ed. PLoS ONE.* – 2012. – Vol.7 (10): e48246. doi:10.1371/journal.pone.0048246.
9. Biggarro V., Fontanella B., Franceschelli S., et al. *Role of Annexin A1 in mouse myoblast cell differentiation // J Cell Physiol.* – 2010. – Vol. 224. – P. 757–765
10. Uemura K., Hayashi M., Itsubo T., et al. *Myostatin promotes tenogenic differentiation of C2C12 myoblast cells through Smad3 // FEBS Open Bio.* – 2017. – Vol. 7 (4). – P. 522-532. doi:10.1002/2211-5463.12200.