

615.71-092.9

HISTOLOGICKÉ A MORFOMETRICKÉ HODNOTENIA ZMIEN VYBRANÝCH ORGÁNOV POTKANA PO KRÁTKODOBEJ (7-DŇOVEJ) APLIKÁCII (4-FLUÓRFENYL)PIPERAZÍNOVÉHO DERIVÁTU (LÁTKA IIIv)

¹Dana ŤAŽKÁ, ¹Ruth MLYNAROVÁ, ²Jana MATUŠKOVÁ, ¹Eva RAČANSKÁ, ¹Pavel ŠVEC, ¹Ján KYSELOVIČ

¹Katedra farmakológie a toxikológie Farmaceutickej fakulty Univerzity Komenského, Bratislava

²Ústav patofyziológie Lekárskej fakulty Univerzity Komenského, Bratislava

Súhrn

V našich predchádzajúcich farmakologických hodnoteniach na izolovaných orgánoch (predsieň, trachea a aorta) sme potvrdili efekt novo syntetizovaného derivátu (4-fluórfenyl)piperazínu na kardiovaskulárny systém (1). Špecifické ovplyvnenie myokardu a relatívne vysoká vazodilatačná aktivita (2) nás podnietili k cielej morfológickej a histologickej analýze zmien štruktúry myokardu a steny aorty po krátkodobej aplikácii látky IIIv. Sedemdňové podávanie 5 a 50 mg/kg látky IIIv potkanom viedlo k signifikantnému poklesu hmotnosti srdca. V dávke 50 mg/kg sme pozorovali štatisticky významné zuženie hrúbky steny aorty ($96,42 \pm 0,31 \mu\text{m}$) v porovnaní s kontrolnou skupinou, ktoré nebolo sprevádzané štrukturálnymi abnormalitami cievnej steny aorty. Histologická analýza rezov tkanív myokardu, pečene a obličky neukázala zmeny v ich architektúre po aplikácii oboch dávok látky IIIv.

Kľúčové slová: Derivát (4-fluórfenyl)piperazín; Krátkodobé podávanie; Potkany; Kardiovaskulárny systém; Vazodilatačné účinky.

Histological and Morphometric Evaluations of Changes in Selected Rat Organs after a Short-Term (Seven Day) Application of a (4-Fluorophenyl) Piperazine Derivative (IIIv Agent)

In our previous pharmacological evaluations of isolated organs (the atrium, the trachea and the aorta), we confirmed the effect of a new synthesized (4-fluorophenyl) piperazine derivative on the cardiovascular system (1). Specific influencing of the myocardium and a relatively high vasodilative activity (2) led us to targeted morphometric and histological analysis of myocardium structure and aortal wall changes after a short-term IIIv agent application.

A seven day 5 and 50 mg/kg administration of IIIv agent to rats led to a significant decrease in heart weight. In the 50 mg/kg dose we monitored a statistically significant narrowing of the aortal wall ($96,42 \pm 0,31 \mu\text{m}$) in comparison with the control group which was not accompanied by structural abnormalities of the aortal vascular wall. A histological analysis of myocardium, liver and kidney tissue insections did not show any changes in their architecture after the application of both IIIv agent doses.

Key words: (4-fluorophenyl) piperazine derivative; Short-term application; Rats; Cardiovascular system; Vasodilative effects.

Úvod

Kardiovaskulárne ochorenia, ako sú ischemická choroba srdca, hypertenzia a rôzne poruchy srdcového rytmu predstavujú v súčasnosti vysoké percento celkovej mortality a morbidity v civilizovanom svete a sú dominantnou príčinou predčasných úmrtí žien a mužov (3). Osobitý významný pokrok vo farmakoterapii kardiovaskulárneho systému zaznamenali β -adrenoreceptorový antagonisti (4) a blokátory vstupu vápnika. V súčasnosti sa preto často v terapeutickej praxi používa ich kombinácia v snahe zvý-

šiť biologickú využiteľnosť týchto liečiv (5). Na koľko sa v poslednej dekáde koncentruje terapia okrem odstránenia primárnej príčiny ochorenia i na korekciu štrukturálnych abnormalít srdca a ciev, projekcia a zavádzanie nových látok s výhodnejšími vlastnosťami pokračuje a prináša úspech v terapeutickej praxi (6). Tieto skutočnosti sa stali podnetom k syntéze tzv. hybridných zlúčenín, pri ktorých sa predpokladá zvýšená antihypertenzívna aktivita v dôsledku inkorporácie časti molekuly s vazodilatačným pôsobením (7).

Systematickým štúdiom základných vzťahov štruktúry a účinku aryloxyamino-propranololov boli pripravené viaceré β -adrenolytické účinné deriváty. Zo získaných poznatkov o štruktúre a účinku sa ako perspektívne ukázali deriváty substituované v parapolohe 3–4 uhlíkovým alkylkarbamátovým zoskupením voči éterickému kyslíku spojovacieho reťazca a v rámci snahy získať zlúčeniny so širokým spektrom biologických účinkov bol na dusíkatý atóm v hydrofilnej časti molekuly zavedený objemnejší N-substituovaný piperazín. Vznikli tak látky, ktoré sa svojou β -drenolytickou aktivitou vyrovnali účinným, v terapeutickú praxi úspešne používaným látkam (8). Takéto štrukturálne zoskupenie je vlastne látkam zo skupiny neselektívnych kalciových antagonistov typu flunarizínu.

Mlynarová so spol. zistili významnú mieru kardioselektívneho pôsobenia a súčasne i vysokú vazodilatačnú aktivitu (2) u látky IIIv, t. j. derivátu (4-fluórfenyl)piperazínu. V experimentoch rozšírených o pozorovania fyziologických parametrov na izolovaných aortách po sedemdnovej premedikácii látkou IIIv zaznamenali pozitívne výsledky.

Týždňová aplikácia látky IIIv znižovala veľkosť fáziekej časti kontrakcie predkontrahovanej tromi látkami (KCl, prostaglandín $F_{2\alpha}$, noradrenalin) s rozdielnym pôsobením (1). Antihypertenzívne pôsobenie látky IIIv pozorovali aj u spontánne hypertenzných potkanov (SHR), kde po perorálnej aplikácii látky došlo k významnému poklesu tlaku krvi v priebehu piatich hodín po podaní (nepublikované).

Pozitívna úprava fyziologických parametrov vyvolaná 7-dňovou (krátkodobou) aplikáciou látky IIIv Wistar potkanom nás podnietila k morfometrickej (merali sme celkovú hrúbku steny aorty (médiu a intimu) a histologickej analýze. Pri sledovaní histologických zmien sme sa zamerali na vznik možných štrukturálnych abnormalít vyvíjajúcich sa v dôsledku aplikácie nosyntetizovanej látky IIIv na vybraných orgánoch (srdce, aorta, pečeň a oblička).

Experimentálna časť

Príprava a charakteristika študovanej látky s pracovným označením IIIv, t. j. butylester kyseliny 4-[2-hydroxy 3(4fluórfenyl) piperazín]propoxybenzylkarbamovej, už bola popísaná (2).

Použité zvieratá

V experimente boli použité potkany samce kmeňa Wistar (Dobrá voda) s hmotnosťou 350–400 g. Potkany boli chované za štandardných podmienok (pri teplote vzduchu 22–24 °C, s vlhkosťou vzduchu 60 %, pričom mali zabezpečený potrebný prísun vody „ad libitum“).

Schéma pokusu

Zvieratá boli randomizované do troch experimentálnych skupín. 1. a 2. skupine zvierat bola s. c. po dobu 7 dní v 24-hodinových intervaloch aplikovaná látka IIIv v dávke 5 mg/kg a 50 mg/kg. Kontrolnej skupine bol s totožným dávkovacím režimom aplikovaný izotonický roztok NaCl.

Meranie hmotnosti orgánov

Po usmrtení zvierat sme izolovali orgány srdce, pečeň, obličky, aorta a mozog, ktoré boli hneď odvážené a ich hmotnosti boli dodatočne prepočítané v miligramoch k celkovej hmotnosti tela.

Histologická analýza

Tkanivá boli následne fixované tekutým dusíkom a uskladnené pri teplote –20 °C po dobu 2 mesiacov až do konečného spracovania. Rezy jednotlivých orgánov (s hrúbkou 10 μ m) boli narezané zmrazovacím mikrotómom a zafarbené štandardným farbiacim postupom hematoxylin/eozín. Z každého orgánu bolo pripravených 40 rezov.

Morfometrická analýza

Série za sebou nasledujúcich rezov aorty boli spracované okulárovým mikrometrom, merali sme celkovú hrúbku steny aorty (intimu a médiu) v 4 na seba navzájom kolmých bodoch na 16 rezoch aorty.

Štatistické spracovanie výsledkov

Výsledky sú uvedené ako aritmetické priemery a ich stredné chyby priemeru. Rozdiely medzi jednotlivými skupinami boli hodnotené nepárovým Studentovým t-testom. Za štatisticky významné sú považované hodnoty $p < 0,05$.

Výsledky a diskusia

V doposiaľ vykonaných experimentoch sa nám podarilo dokázať, že látka IIIv, t. j. derivát (4-fluórfenyl)piperazínu spĺňa požadované kritériá pre optimálne kardiovaskulárne účinnú štruktúru s β -adre-

nolytickým a vazodilatačným pôsobením (2). Na základe úpravy funkčných parametrov srdca a zníženia kontrakčnej odpovede izolovaného prstenca aorty po krátkodobej (7-dňovej) aplikácii látky IIIv Wistar potkanom môžeme predpokladať, že inkorporácia vhodne substituovaného piperazínu do bázikovej časti základnej štruktúry aryloxyamonipranolu priaznivo ovplyvňuje komplexné kardiovaskulárne pôsobenie celej molekuly (1).

V experimente sme sa zamerali na morfo-metrickú analýzu hrúbky steny aorty a histologické hodnotenie vybraných orgánov (srdce aorta, pečeň, oblička). Potkanom sme po dobu siedmich dní s. c. aplikovali látku IIIv v dávke 5 a 50 mg/kg. Aplikované množstvo látky vychádzali z hodnôt LD₅₀ (1).

Po aplikácii novo syntetizovanej látky IIIv došlo v porovnaní s kontrolnou skupinou ($393 \pm 22,0$ g) k štatisticky významnému zníženiu hmotnosti tela v oboch experimentálnych skupinách ($345 \pm 10,0$ g a $337 \pm 8,3$ g). Krátkodobá aplikácia látky IIIv v dávke 5 mg/kg a 50 mg/kg viedla k štatisticky významnému zníženiu hmotnosti srdca (z $1,03 \pm 0,04$ g na $0,83 \pm 0,03$ g a $0,65 \pm 0,02$ g), aj po prepočítaní hmotnosti srdca v mg k celkovej hmotnosti tela (tab. 1). Veľmi vysoko štatisticky významný nárast hmotnosti obličky k celkovej hmotnosti tela (z $2,51 \pm 0,12$ mg/g na $3,02 \pm 0,18$ mg/g) sme pozorovali u zvierat s vyššou dávkou (tab. 1). Signifikantný nárast tkaniva mozgu (z $5,07 \pm 0,17$ mg/g na $5,56 \pm 0,38$ mg/g) sme zaznamenali po prepočítaní hmotnosti mozgu k hmotnosti tela v skupine zvierat, ktorej bola aplikovaná menšia dávka látky IIIv (tab. 1). Hmotnosť sleziny, pečene a aorty sa aplikáciou látky IIIv, ako ukázali výsledky, nemenila ani v jednej experimentálnej skupine (tab. 1).

Morfometrická analýza ukázala rozdiely v hrúbke steny aorty medzi jednotlivými skupinami. Sedemdňová aplikácia látky IIIv v dávke 5 mg/kg hrúbku steny aorty nemenila. Po podaní 10-násobne vyššej dávky došlo k významnému zúženiu hrúbky steny aorty (tab. 1). Kardioselektívne pôsobenie a súčasne i relatívne vysoká vazodilatačná aktivita látky IIIv (6) môže pravdepodobne súvisieť so zmenami hrúbky steny aorty.

Na transversálnych rezoch aorty farbených základným farbiacim postupom hematoxyln/eozín sme nepozorovali rozdiely v štruktúre aorty preliečených a nepreliečených zvierat (viď farebná príloha s. I–II, obr. 1: (A) Histologické rezy aorty kontrolnej sku-

piny zvierat, obr. 2: (B) Stav po preliečení 5 mg/kg látkou IIIv a obr. 3: (C) Stav po preliečení 50 mg/kg látkou IIIv, HE, zväčšenie 250krát).

Tabuľka 1

Priemerné hmotnosti potkanov a ich odobratých orgánov prepočítané k celkovej hmotnosti tela v mg/g $\pm$ SEM, priemerné hodnoty hrúbky steny aorty $\mu\text{m} \pm$ SEM po 7-dňovej aplikácii látky IIIv (n=7, p<0,05*, p<0,01 vzhľadom ku kontrole)**

Skupina	kontrola	5 mg/kg	50 mg/kg
celková hmotnosť (g)	$393 \pm 44,00$	$345 \pm 20,25^*$	$337 \pm 16,61^*$
srdce (mg/g)	$2,64 \pm 0,41$	$2,40 \pm 0,21$	$1,94 \pm 0,11^*$
slezina (mg/g)	$2,22 \pm 0,48$	$2,11 \pm 0,16$	$2,27 \pm 0,27$
pečeň (mg/g)	$34,06 \pm 3,87$	$32,44 \pm 3,41$	$35,94 \pm 1,67$
oblička (mg/g)	$2,51 \pm 0,24$	$2,89 \pm 0,46$	$3,02 \pm 0,21^{**}$
mozog (mg/g)	$5,07 \pm 0,34$	$5,56 \pm 0,39^*$	$5,49 \pm 0,37$
aorta (mg/g)	$0,26 \pm 0,12$	$0,27 \pm 0,11$	$0,34 \pm 0,10$
hrúbka steny aorty (μm)	$112,54 \pm 2,32$	$110,58 \pm 3,33$	$96,42 \pm 2,19^{**}$

Sedemdňová premedikácia látkou IIIv v oboch dávkach (5 a 50 mg/kg) nevedla k vzniku štruktúrnych abnormalít v tkanive myokardu. Skoršie zaznamenané významné zníženie masy myokardu (1) bez sprievodných patologických nálezov v histologickom obraze nám umožňujú predpokladať, že tieto výsledky môžeme považovať skôr za priaznivé z hľadiska remodelácie myokardu. V súčasnosti je už všeobecne akceptovaný a klinicky potvrdený účinok β -blokátorov (9) a blokátorov kalciového vstupu (10) v procese regresie hypertrofie. Predpokladá sa, že dôvodom regresie hypertrofie je skôr znížený tlak krvi ako priamy účinok liečiv (9). Ich mechanizmus vplyvu na remodeláciu je otázný (3). Nevysvetlená však zostáva i tá skutočnosť, či regresia hypertrofie vyvolaná antihypertenzívnymi skupinami liečiv predstavuje pozitívnu odpoveď (12).

Histopatologické zmeny sme nepozorovali ani na rezoch pečene a obličky ako v skupine zvierat

preliečených nízkymi, tak i vysokými dávkami. Morfológické poškodenia hepatocytov sme nezaznamenali ani pri väčšom zväčšení, bunky si zachovali normálnu veľkosť a mononuklearitu.

Proximálne tubuly vonkajšieho kortexu a drene obličky neboli porušené. Morfológia Bowmanovho puzdra a distálnych tubulov zostala nezmenená.

V našich predchádzajúcich experimentoch vykonaných na izolovaných orgánoch sa nám podarilo dokázať, že látka IIIv t. j. derivát (4-fluórfenyl)piperazínu, disponuje β -adrenolytickými a vazodilatačnými účinkami na kardiovaskulárny systém (1, 2). Vzhľadom na to, že hodnoty LD_{50} sa pohybovali v rozmedzí terapeuticky používaných liečiv zamerali sme sa na sledovanie vplyvov látky IIIv v *in vivo* experimentoch, v ktorých sme podávali látku v dávke 5 a 50 mg/kg. Potvrdili sme efekt látky IIIv na kardiovaskulárny systém. Mikroskopická analýza neukázala štrukturálne zmeny na tkanivách po 7-dňovej aplikácii látky IIIv v oboch dávkach.

Práca vznikla s podporou grantu Univerzity Komenského číslo 147/2001/UK.

Literatúra

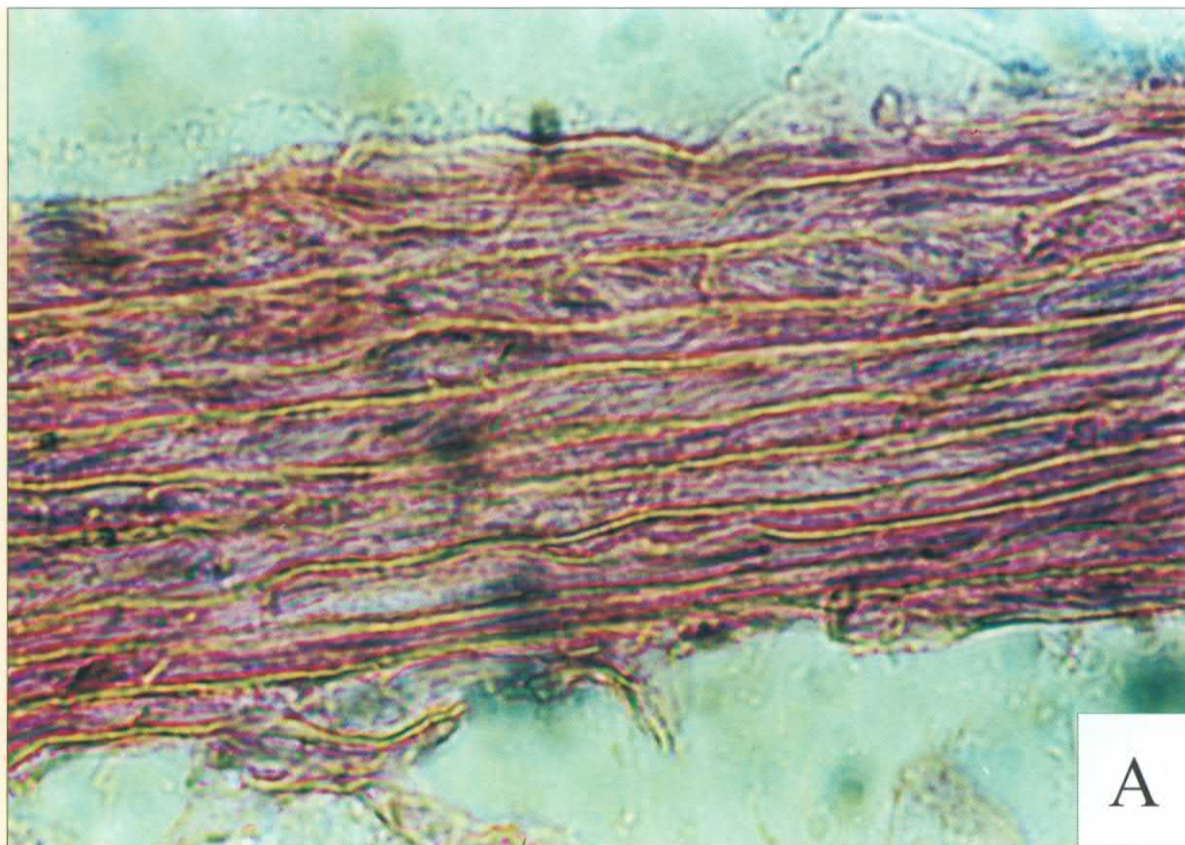
1. MLYNÁROVÁ, R., a kol. Účinky (4-fluórfenyl)piperazínového derivátu (látka IIIv) na kardiovaskulárne funkcie. Čes. a Slov. Farm., 2000, roč. 49, s. 177–180.
2. MLYNÁROVÁ, R., a kol. Príprava a farmakologická charakteristika aryloxyamino-propanolových derivátov s predpokladaným kardiovaskulárnym pôsobením. Čes. a Slov. Farm., 1996, roč. 45, s. 260–264.
3. STRUIJKER-BOUDIER, HAJ., et al. Pharmacology of cardiac and vascular remodeling. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 1995, vol. 35, p. 509–539.
4. CLELAND, JG., et al. Beta-blocking agents in heart failure. Eur. Heart J., 1996, vol. 11, p. 1629–1639.
5. KÖPPE, HG. Recent chemical developments in the field of beta adrenoreceptor blocking drugs. Progr.Clin. Bioch. Med., 1986, vol. 3, p. 29.
6. RUFFOLO, RR. – FEUERSTEIN, GZ. Recent development in the use of beta-blockers in the treatment of the heart failure. J. Cardiovasc. Pharmacol., 1998, vol. 32, Suppl 1, p. S22–30.
7. BOTROS, S. – SAAD, F. Synthesis, anti-hypertensive and beta-adrenoreceptor antagonist activities of 3-(4-(3-(4-aryl-1-piperazyl)-isopropanoloxo)-phenyl)-4(3H)quinazolones. Eur. J. Med. Chem., 1989, vol. 24, p. 585–590.
8. RAČANSKÁ, E. a kol. Pharmacological evaluation of new alkylesters (4-(2-hydroxy-3-alkyl- amino)propoxy)phenyl-carbamic acid with beta-adrenolytic properties. Pharmazie, 1990, vol. 45, p. 851–853.
9. MICHEL, JB., et al. Pathophysiological role of the vascular smooth muscle cell. J. Cardiovasc. Pharmacol., 1990, vol. 16 (Suppl. 1), p. S4–S11.
10. DAHLHOF, B., et al.: Reversal of left ventricular hypertrophy in hypertensive patients. A meta-analysis of 109 treatment studies. Am. J. Hypert., 1995, vol. 5, p. 95–110.
11. ŠIMKO, F.: Pathophysiological principles of the relation between myocardial hypertrophy of the left ventricle and its regression. Physiol. Res., 1994, vol. 43, p. 259–266.

Předneseno na 6. česko-slovenské mezioborové toxikologické konferenci s mezinárodní účastí v Hradci Králové 4. 9. 2001.

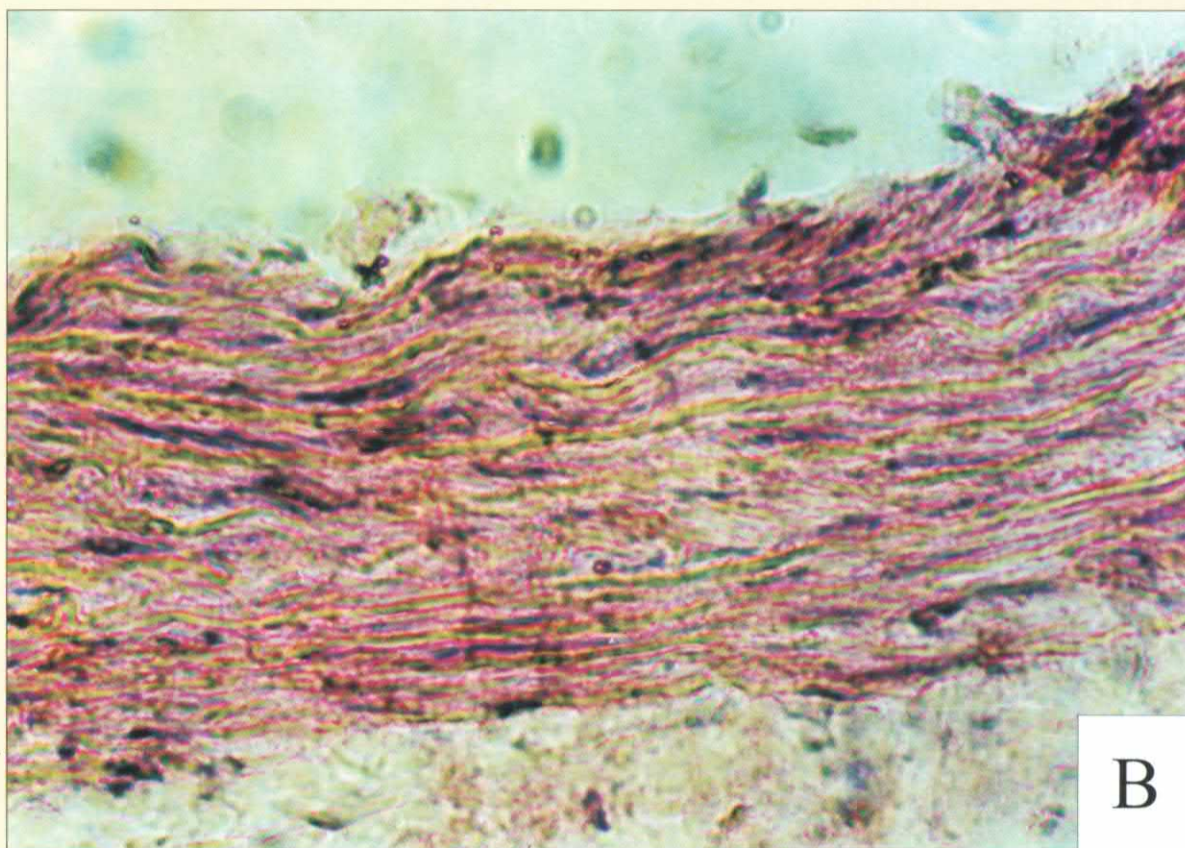
Korespondence: RNDr. Dana Ťažká
Katedra farmakológie a toxikológie
Farmaceutickej fakulty
Univerzita Komenského
Kalinčiakova 8
832 32 Bratislava
Slovenská republika

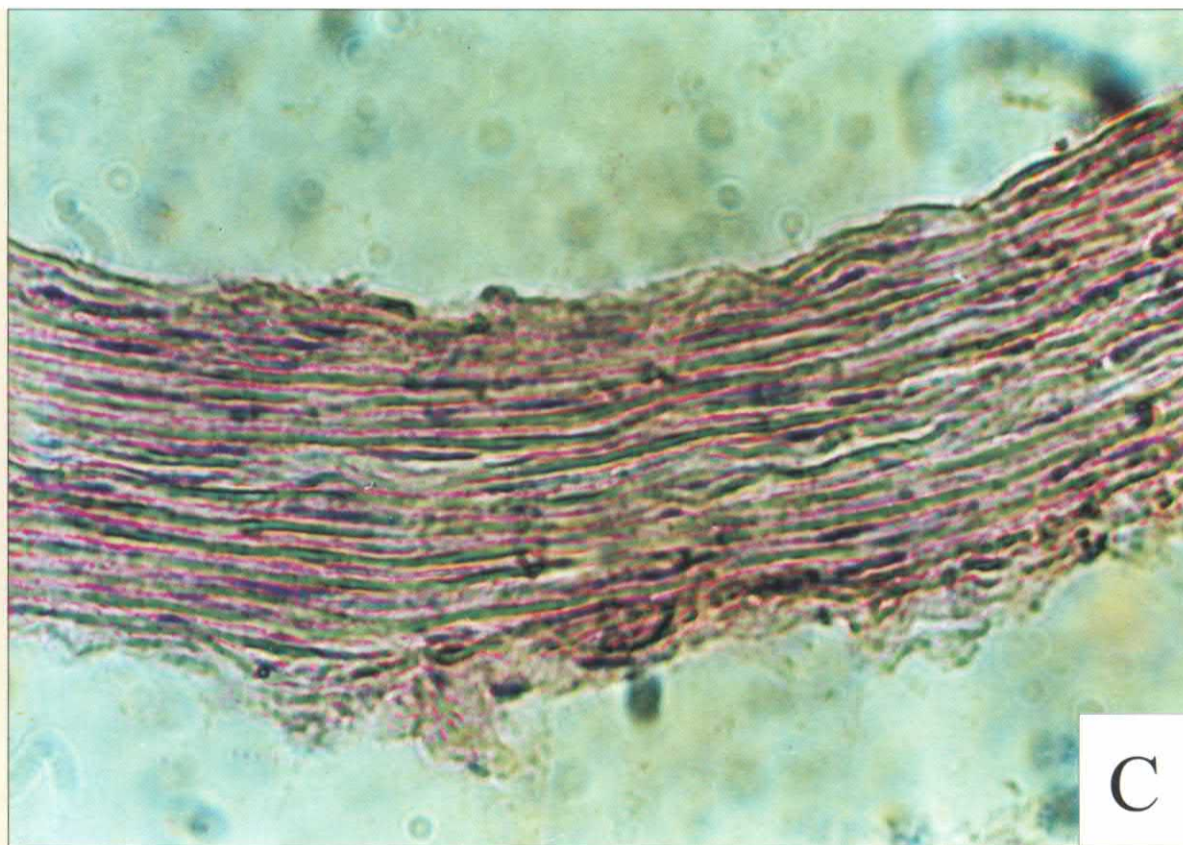
Do redakce došlo 11. 10. 2001

Obr. 1



Obr. 2





Obr. 3