

УДК 616-005.4: 615.217

Н. А. ЦУБАНОВА

Національний фармацевтичний університет

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ НЕФРОПРОТЕКТОРНОЇ ДІЇ СПІРОЦИКЛІЧНОГО ПОХІДНОГО ОКСИНДОЛУ ЗА УМОВ ПАТОЛОГІЙ РІЗНОГО ГЕНЕЗУ

Наведені результати порівняльного аналізу нефропротекторної дії нової сполуки спіроциклічного похідного оксиндолу на моделі гострої ниркової недостатності ішемічного та токсичного генезу. На моделі ішемічної гострої ниркової недостатності у щурів доведені нефропротекторні властивості спіроциклічного похідного оксиндолу (курсове введення у дозі 5 мг/кг). Досліджувана сполука відновлює нирковий кровообіг на рівні препарату порівняння мексидолу (доза 100 мг/кг); попереджає розвиток анурії, нормалізує парціальні функції нирок за умов водного діурезу, виявляє антипротеїнуричний і гіпоазотемічний ефекти на рівні препарату порівняння хофітолу (доза 110 мг/кг). На моделі етиленгліколової нефропатії у мишей нефропротекторна дія спіроциклічного похідного оксиндолу у дозі 5 мг/кг перевищує активність препаратів порівняння мексидолу у дозі 100 мг/кг та мелатоніну у дозі 5 мг/кг. Нefропротекторна активність нової сполуки не залежить від генезу ураження нирок.

Ключові слова: спіроциклічні похідні оксиндолу; нефропротекторний ефект; ниркова недостатність

ВСТУП

Відомо, що на захворювання нирок різного ступеня тяжкості страждають 350 осіб з кожних 10 тисяч населення [7, 8]. При захворюваннях нирок найбільш небезпечним є розвиток гострої ниркової недостатності (ГНН). Цей симптомокомплекс характеризується швидкою втратою гомеостатичних функцій нирок. Він спостерігається у 5 % усіх госпіталізованих пацієнтів і переважає серед хворих хірургічного та акушерського профілю [2, 10]. Лікування ГНН відноситься до числа найважливіших проблем медицини та фармації. Незважаючи на удосконалення методів профілактики та лікування, смертність при даній патології складає 50 %, а в окремих групах хворих (дитячий і літній вік, поліорганна недостатність) сягає 80 % [6].

Індукована токсинами ГНН реєструється у кожного десятого хворого, що потребують термінового гемодіалізу [8]. Серед відомих нефротоксинів одне з перших місць посідають промислові речовини, з яких найнебезпечнішими є органічні розчинники (зокрема етиленгліколь). Вищезазначене обумовлює актуальність пошуку лікарських засобів, що виявляють захисну дію на нирки в умовах інтоксикацій. Тому пошук нових нефропротекторних засобів, здатних корегувати клінічні прояви ГНН незалежно від генезу патології, є актуальним питанням сучасної фармації та медицини.

Існуючі фітопрепарати – хофітол, леспенефрил, байкалін тощо [3] характеризуються у більшості випадків високою безпечністю, яка є важливою, зважаючи на хронічний перебіг захворювань нирок, та переважно гіпоазотемічною та значно менш вираженою антигіпоксичною дією, що є їх суттєвим недоліком [9].

Оскільки, саме ішемія, незалежно від генезу її розвитку, є найбільш значущим ланцюгом у патогенетичному каскаді розвитку та хронізації ниркової недостатності, актуальним є створення нового нефропротекторного препарату з потужним антигіпоксичним ефектом. Для нової сполуки – 4,3'-спіро[(2-аміно-3-ціано-4,5-дигідропірано[3,2-с]хромен-5-он)-5-метил-2'-оксиндолу] (у подальшому сполуки 77), що була синтезована вченими НФаУ, у попередніх дослідженнях встановлено значну антигіпоксичну активність [5]. Метою даної роботи було провести порівняльний аналіз нефропротекторної дії спіроциклічного похідного оксиндолу за умов гострої ниркової недостатності ішемічного та токсичного генезу.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

На першому етапі дослідження нефропротекторної дії сполуки 77 проводили на білих нелінійних щурах-самцях масою 180-250 г на моделі ішемічної ГНН. Тотальну ішемію обох нирок відтворювали під тіопентал-натрієвим наркозом, накладаючи спеціальні судинні затискачі на обидві ниркові ніжки на 75 хв [4]. Стан видільної функції нирок (ВФН) визначали

© Цубанова Н. А., 2014

Таблиця 1

**ВПЛИВ СПІРОЦИКЛІЧНОГО ПОХІДНОГО
ОКСИНДОЛУ ТА ХОФІТОЛУ НА ДІУРЕЗ
У ЩУРІВ ІЗ ГНН ЗА УМОВ ВОДНОГО ДІУРЕЗУ
ЗА 2 ГОДИНИ, $M \pm m$, $n = 12$**

Група	Показник		
	діурез, мл/100 г за 2 год	виведення навантаження, %	% тварин з анурією
Інтактний контроль	$2,13 \pm 0,09$	$70,25 \pm 2,38$	0
Контрольна патологія	$0,22 \pm 0,08^*$ $0,54 \pm 0,06^*$	$7,50 \pm 2,81^*$ $18,0 \pm 2,17^*$	58,3*
Сполука 77, 5 мг/кг	$0,76 \pm 0,17^{* \#}$ $0,92 \pm 0,17^{* \#}$	$25,58 \pm 5,74^{* \#}$ $30,70 \pm 5,55^{* \#}$	16,7* [#]
Хофітол, 110 мг/кг	$0,92 \pm 0,27^{* \#}$ $1,27 \pm 0,29^{* \#}$	$30,91 \pm 9,09^{* \#}$ $42,50 \pm 9,58^{* \#}$	33,3*

Примітки:

1) у числівнику – показник усієї групи, у знаменнику – для тварин без анурії;

2) достовірні відмінності: * – з вихідними показниками інтактного контролю ($p < 0,05$);# – з показниками контрольної патології* ($p < 0,05$).

у попередньо адаптованих тварин за допомогою тесту водного навантаження (3 % від маси тіла). Тварини були розподілені на чотири групи: 1) інтактний контроль ($n = 12$); 2) контрольна патологія – ГНН ($n = 12$); 3) щури з ГНН, які одержували сполуку 77 у дозі 5 мг/кг ($n = 12$); 4) щури з ГНН, які одержували препарат порівняння хофітол (таблетки, фірма «Laboratories Rosa-Phitopharma», Франція) у дозі 110 мг/кг ($n = 12$). Досліджувану сполуку та хофітол вводили експериментальним тваринам у шлунок у лікувально-профілактичному режимі протягом трьох діб до моделювання ГНН та дві доби на тлі ГНН. Ефективність нової сполуки та препарату порівняння хофітолу визначали за показниками видільної функції нирок на першу добу ГНН за біохімічними показниками сечі і сироватки крові на другу добу ГНН.

На другому етапі роботи досліджували вплив сполуки 77 на моделі токсичної етиленгліколевої ГНН, яку відтворювали підшкірним введенням мишам масою 18-25 г етиленгліколю в дозі 10 мг/кг [4]. Тварини були розподілені на чотири групи: 1) контрольна патологія ($n = 8$); 2) миші з ГНН, які одержували сполуку 77 у дозі 5 мг/кг ($n = 8$); 3) миші з ГНН, яким вводили препарат порівняння мексидол у дозі 100 мг/кг ($n = 8$); 4) миші з ГНН, які одержували препарат порівняння мелатонін у дозі 5 мг/кг ($n = 8$). Мексидол був обраний препаратом порівняння як відомий метаболічний засіб, здатний відновлювати енергетичний обмін та виявляти значну захисну дію на клітини [1]. Конденсована гетероциклічна сполука 77 за ядром молекули – 4Н-пірано[3,2-с]хромен є структурним аналогом мелатоніну [5], що обумовило вибір мелатоніну як другого препарату порівняння. Досліджувану сполуку та препарати порівняння вводи-

ли у шлунок протягом трьох діб, востаннє за 40 хв до моделювання патології.

Тварини утримувались у стандартних умовах віварію ЦНДЛ НФаУ відповідно до правил GLP. При роботі виконували вимоги Директиви Ради ЄС із питань захисту тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей. Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми за допомогою програми Statistika Analystsoft з використанням критерію Стюдента та кутового перетворення Фішера [11].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати вивчення нефропротекторної активності сполуки 77 та препарату порівняння хофітолу на моделі ішемічної ГНН наведені у табл. 1 та 2. При ішемічній ГНН у тварин групи контрольної патології відбувається значне порушення функції нирок: достовірно знижується діурез, у 58,3 % тварин зареєстровано анурію (табл. 1). Впродовж 2 діб у тварин групи контрольної патології прогресувала висока протеїнурія, азотемія на тлі дуже низької швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ) – у 50 разів нижче за показники інтактного контролю. Показником тяжкого перебігу модельної патології є також вірогідне збільшення цитолітичних ферментів АлАТ та АсАТ у сироватці крові (табл. 2), що свідчить про ураження печінки та підтверджує поліорганність ураження, при таману ГНН. Хофітол вірогідно підвищує діурез на тлі ГНН, але незначно знижує кількість тварин з анурією – 33,3 % відносно групи контрольної патології (табл. 1).

Нефропротекторна дія хофітолу характеризується також зниженням протеїнурії, покращенням виведення нирками азотовмісних речовин та незначною антицитолітичною активністю, про яку говорить тенденція до зменшення АлАТ і АсАТ (табл. 2). За інтегральною захисною ефективністю досліджувана сполука вірогідно зменшує кількість тварин з анурією (16,7 %) та перевершує за цим показником препарат порівняння хофітол (табл. 1). Сполука 77 відновлює здатність нирок виводити азотовмісні речовини: у сечі значно збільшується вміст сечовини та креатініну, у 3 рази зростає ШКФ відносно групи контрольної патології, що сприяє значному зменшенню вмісту креатиніну та сечовини в крові. Нова сполука вірогідно зменшує протеїнурію. Про виражену антицитолітичну активність сполуки 77 свідчить достовірне зниження рівня АлАТ та АсАТ у сироватці крові порівняно з показником групи контрольної патології (табл. 2).

Отримані результати свідчать про потужну нефропротекторну активність сполуки 77, що виявляється у відновленні функціональної дії нирок та нормалізації біохімічних показників.

На другому етапі досліджували нефропротекторну дію нової сполуки за умов гострої токсичної ГНН. Введення етиленгліколю викликає фатальне

Таблиця 2

**ВПЛИВ СПІРОЦИКЛІЧНОГО ПОХІДНОГО ОКСИДОЛУ ТА ХОФІТОЛУ НА ПАРЦІАЛЬНІ ФУНКЦІЇ
НИРОК І БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ СИРОВАТКИ КРОВІ ТА СЕЧІ У ЩУРІВ З ГНН, M ± m, n = 6**

Показники	Інтактний контроль	Контрольна патологія	Сполука 77, 5 мг/кг	Хофітол, 110 мг/кг
Креатинін сечі, мкмоль/л	3,81 ± 0,17	1,64 ± 0,21*	2,37 ± 0,15**	2,16 ± 0,14*
Креатинін сироватки крові, мкмоль/л	59,02 ± 2,76	263,0 ± 12,69*	147,95 ± 7,28**	165,14 ± 6,62**
ШКФ, мл/год/100 г	0,15 ± 0,01	0,003 ± 0,001*	0,009 ± 0,001**	0,022 ± 0,007**
Сечовина сечі, ммоль/л	26,76 ± 1,57	8,43 ± 0,87*	15,53 ± 1,09**	16,69 ± 2,02**
Сечовина сироватки крові, ммоль/л	5,24 ± 0,18	28,47 ± 1,87*	17,45 ± 1,51**	16,57 ± 1,09**
Кліренс сечовини, мл/хв 100г	0,093 ± 0,006	0,002 ± 0,0*	0,004 ± 0,001*	0,015 ± 0,005**
Білок сечі, г/л	0,20 ± 0,02	0,83 ± 0,07*	0,48 ± 0,05**	0,53 ± 0,08**
АлАТ, моль/ч.л (у крові)	0,65 ± 0,03	1,30 ± 0,08*	1,03 ± 0,08**	1,11 ± 0,07*
АсАТ, моль/ч.л (у крові)	0,56 ± 0,02	1,23 ± 0,06*	0,97 ± 0,04**	1,07 ± 0,06*

Примітки. * – достовірні відмінності з показниками інтактного контролю ($p < 0,01$); * – достовірні відмінності з показниками контрольної патології ($p < 0,05$).

ураження нирок із 100 % летальністю за перші 12 год (табл. 3).

Токсичний механізм дії етиленгліколю розділяють на дві фази: у першу чергу, виявляється токсична дія на центральну нервову систему із пригніченням дихання; у другій фазі етиленгліколь викликає набряк судинних стінок та їх некроз, відбувається зниження функції гемоглобіну, пов'язаної із переносом кисню. Порушується обмін речовин із накопиченням недоокиснених продуктів. Далі етиленгліколь окиснюється до оксалатної кислоти та її солей, які накопичуються у нирках, мозку та інших органах, що призводить до порушення їхніх функцій, посиленого розпаду білків та глибоких змін обміну вуглеводів. Вживаність тварин на моделі етиленглікової інтоксикації є інтегральним критерієм нефропротекторного ефекту. Сполука 77 вже з перших 12 год гострої патології вірогідно знижує показник летальності, на момент закінчення експерименту (5 доба спостережень) зафіксовано найвищу вживаність – 50 %.

При використанні референт-препаратів мексидолу та мелатоніну захисна дія виявлялася не однакою. На тлі введення мексидолу показник летальності на момент закінчення експерименту складав 62,5 %, на тлі мелатоніну – 75 %, ці показники віро-

гідно перевищували дані групи контрольної патології, але суттєво поступалися ефективності сполуки 77. Протекторна дія мексидолу зумовлена його антиоксидантною та мембранопротекторною дією. Цей препарат викликає посилення компенсаторної активації гліколізу та зменшує пригнічення окисних процесів у циклі Кребса, що й зумовлює стабілізацію клітинних мембран [1]. Для мелатоніну також характерна антиоксидантна та мембранопротекторна дія [3], але за умов ГНН вона поступається активності мексидолу у 1,5 рази та сполуки 77 – у 2 рази.

Захисна дія нової сполуки за умов ГНН різного ґенезу може бути пов'язана, у першу чергу, з антиоксидантним ефектом, що важливо в умовах активації процесів окиснення, індукованого етиленгліколем. Також реалізація протекторної дії сполуки 77, ймовірно, пов'язана з її метаболічними властивостями: підвищенням вмісту АТФ, цитратсинтази, сукцинатдегідрогенази, піруватдегідрогенази, тобто активацією енергетичної функції мітохондрій та стабілізацією клітинних мембран, що було встановлено в попередніх дослідженнях.

ВИСНОВКИ

Сполука 4,3'-спіро[(2-аміно-3-ціано-4,5-дигідропірано[3,2-с]хромен-5-он)-5-метил-2'-оксидолу] ви-

Таблиця 3

ЛЕТАЛЬНІСТЬ МИШЕЙ ЗА УМОВ ГОСТРОЇ ЕТИЛЕНГЛІКОЛЕВОЇ ГНН (n = 8)

Група	1-а доба		2-а доба	3-а доба	4-а доба	5-а доба
	0-12 год	12-24 год				
Контрольна патологія	7/8 (87,5 %)	8/8 (100 %)	8/8 (100 %)	8/8 (100 %)	8/8 (100 %)	8/8 (100 %)
ГНН + сполука 77, 5 мг/кг	2/8 (25 %)*	3/8 (37,5 %)*	4/8 (50 %)*	4/8 (50 %)*	4/8 (50 %)*	4/8 (50 %)*
ГНН + мексидол, 100 мг/кг	3/8 (37,5 %)*	4/8 (50 %)*	5/8 (62,5 %)*	5/8 (62,5 %)*	5/8 (62,5 %)*	5/8 (62,5 %)*
ГНН + мелатонін, 5 мг/кг	3/8 (37,5 %)*	4/8 (50 %)*	5/8 (62,5 %)*	2/8 (75 %)*	2/8 (75 %)*	2/8 (75 %)*

Примітка. У числінику – кількість мишей, що загинули, у знаменнику – загальна кількість у групі, у дужках – % тих, що загинули; * – вірогідні відмінності з контролем ($p < 0,05$ за кутовим перетворенням Фішера).

являє виражену нефропротекторну активність за умов гострої ниркової недостатності ішемічного та токсичного генезу. Механізм нефропротекторної дії нової сполуки, ймовірно, обумовлено її впливом на різні ланки патогенезу експериментальної гострої ниркової недостатності. Провідними механізмами нефропротекторної дії нової сполуки є антигіпоксичний, антиоксидантний, антицитолітичний ефекти.

Узагальнюючи одержані результати щодо вивчення впливу сполуки 77 на нирки, можна зробити висновок, що ефективність її захисної дії не залежить від генезу патології (токсичне або ішемічне ураження). Таким чином, нова сполука може знайти застосування в медичній практиці у складі лікарських засобів для лікування ішемії нирок.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Воронина Т. М. Мексидол. Основные нейropsychотропные эффекты и механизм действия / Т. М. Воронина // Мед. вестник. – 2009. – № 6 (475). – С. 2-3.
2. Іванов Д. Д. Гостра ниркова недостатність / Д. Д. Іванов // Острые и неотложные состояния в практике врача. – 2007. – № 1 (3). – С. 4-9.
3. Компендиум 2013 – лекарственные препараты / Под ред. В. Н. Коваленко. – К.: МОРИОН, 2013. – 2320 с.
4. Методи експериментального моделювання ураження нирок для фармакологічних досліджень / [С. Ю. Штриголь, В. М. Лісовий, І. А. Зупанець та ін.]. – К., 2009. – 48 с.
5. Пат. 87952 Україна, МПК С 07 D 209/04, 209/96, 311/96, 405/02, 491/20, А 61 К 31/33, 31/404, 31/436, 31/437, 31/438 4,3'-спіро[(2-аміно-3-ціано-4,5-дигідропірано[3,2-с]хромен-5-он)-5-метил-2'-оксіндол], який проявляє антигіпоксичну активність / Р. Г. Редькін, Н. А. Цубанова, В. П. Черних; заявник та патентовласник НФаУ. – 200815044. Опубл.: 25.08.2009. – Бюл. № 16.
6. Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury / P. Devarajan // J. Am. Soc. Nephrol. – 2006. – Vol. 17, № 6. – P. 1503-1520.
7. Ho K. M. Meta-analysis of frusemide to prevent or treat acute renal failure / K. M. Ho, D. J. Sheridan // Brit. Medical J. – 2006. – Vol. 333 (7565) – P. 420-425.
8. Palevsky P. M. Intensity of renal support in critically ill patients with acute kidney injury / [P. M. Palevsky, J. H. Zhang, T. Z. O'Connor et al.] // The New England J. of Medicine. – 2008. – № 359 (1). – P. 7-20.
9. Singh D. The effect of naringin, a bioflavonoid on ischemia-reperfusion induced renal injury in rats / D. Singh, K. Chopra // Pharmacol. Res. – 2004. – Vol. 50, № 2. – P. 187-193.
10. Uchino S. An assessment of the RIFLE criteria for acute renal failure in hospitalized patients / S. Uchino, R. Bellomo, D. Goldsmith // Crit. Care Med. – 2006. – Vol. 34. – P. 1913-1917.
11. www.analystsoft.com/ru

УДК 616-005.4: 615.217

Н. А. Цубанова

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ НЕФРОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ СПИРОЦИКЛИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДНОГО ОКСИНДОЛА ПРИ ПОРАЖЕНИИ ПОЧЕК РАЗНОГО ГЕНЕЗА

Приведены результаты сравнительного анализа нефропротекторного действия нового соединения спироциклического производного оксиндола на модели острой почечной недостаточности ишемического и токсического генеза. На модели ишемической острой почечной недостаточности у крыс установлены нефропротекторные свойства спироциклического производного оксиндола (курсовое введение в дозе 5 мг/кг). Изучаемое соединение восстанавливает почечный кровоток на уровне препарата сравнения мексидола (доза 100 мг/кг); предотвращает развитие анурии, нормализует парциальные функции почек в условиях водного диуреза, проявляет антипротеинурический и гипоазотемический эффекты на уровне препарата сравнения хофитола (доза 110 мг/кг). На модели этиленгликолевой нефропатии у мышей доказаны нефропротекторные свойства спироциклического производного оксиндола в дозе 5 мг/кг. Установлено, что активность нового соединения превышает таковую у препаратов сравнения мексидола в дозе 100 мг/кг и мелатонина в дозе 5 мг/кг. Нефропротекторная активность нового соединения не зависит от генеза поражения почек.

Ключевые слова: спироциклическое производное оксиндола; нефропротекторный эффект; почечная недостаточность

UDC 616-005.4: 615.217

N. A. Tsubanova

COMPARATIVE ANALYSIS OF NEPHROPROTECTIVE PROPERTIES OF SPIROCYCLIC OXINDOLIC DERIVATIVES IF KIDNEY DAMAGE OF DIFFERENT GENESIS

It has been showed the results of a comparative analysis of nephroprotective properties of new compound of spirocyclic oxindolic derivatives on model acute renal failure of ischemic and toxic origin. Nephroprotective properties of spirocyclic oxindolic derivative (course of treatment in doses 5 mg/kg) have been proved on the model of ischemic acute renal failure in rats. Investigated compound restores kidney blood stream at the level of preparation of comparison Mexidol (dose 100 mg/kg) prevents anuria, normalises partial renal functions under water loading conditions, has antiproteinuric and hypoazotemic effects at the level of preparation of comparison Hofitol (dose 110 mg/kg). On the ethyleneglycolic nephropathy model of mice were proved the nephroprotective properties of the spirocyclic oxindole derivative in a dose 5 mg/kg. It is set that activity of new compound exceeds the effect of preparation of comparison Mexidol in a dose 100 mg/kg and Melatonin in a dose 5 mg/kg. Nephroprotective activity of new connection does not depend on the genesis of renal damage.

Key words: spirocyclic oxindolic derivative; nephroprotective effect; kidneys's defect

Адреса для листування:

61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.

Тел. (057) 706-35-81. Тел. 050-538-14-45.

E mail: tsubanova@rambler.ru.

Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції

17.06.2014 р.