

УДК 615.011: 547.857.4

ВПЛИВ БЕНФУРАМУ НА ВМІСТ ПРОСТАГЛАНДИНІВ В ПЛАЗМІ КРОВІ ТА АКТИВНІСТЬ КАЛІКРЕЇН-КІНІНОВОЇ СИСТЕМИ У ЩУРІВ

Корнієнко В.І., к.фарм.н.

Харківська державна зооветеринарна академія, м. Харків

Анотація. Наведені результати дослідження впливу бенфураму на вміст простагландинів в плазмі крові та активність калікреїн-кінінкової системи у щурів. Показано, що бенфурам дозі 30 мг/кг стимулює біосинтез простагландинів ПГЕ₂, що сприяє покращенню сечевивідної функції нирок, а також підвищує концентрацію кінінів в плазмі крові у щурів, що є одним з механізмів його діуретичної активності.

Ключові слова: бенфурам, простагландини ПГЕ₂, калікреїн-кінінова система.

Актуальність проблеми. Важливою проблемою нефрології є фармакологічна корекція порушень водно-електролітного балансу організму. Функція нирок та її регулюючі механізми постійно направлені на вирівнювання гомеостазу позаклітинної рідини. Ефект гормонів, які регулюють реабсорбцію електролітів, інтегрований з локальними регуляторами діяльності нирок – простагландинами і кінінами [1]. Біосинтез простагландинів здійснюється каскадом специфічних мікросомальних ферментів – циклооксигеназ [12]. Простагландини ПГЕ₂ виробляються в основному в ендотелії артерій і епітелії збиральних трубочок нирок шляхом розпаду з відповідної поліненасиченої жирної кислоти [2]. ПГЕ₂ збільшує викид калікреїну, який перетворює кініногени в кініни. Сольове навантаження призводить до пригнічення звільнення ПГЕ₂, реабсорбції іонів натрію і хлора в товстій частині висхідного відділу петлі Генле та кірковому відділі збиральних трубочок. Простагландини, передусім з групи Е₂, стимулюють діурез унаслідок розширення артеріол і посилення ниркового кровообігу [3, 7], зниження реабсорбції сечовини і пригнічення реабсорбції Na⁺ на рівні висхідної частини петлі Генле та збиральних трубочок кіркової речовини нирок [2, 19].

Кініни розслабляють гладенькі м'язи судин, розширюють ниркові артеріоли і знижують кров'яний тиск, підвищують діурез за рахунок збільшення клубочкової фільтрації [10]. Кініни, як і інші вазодилаторні препарати, стимулюють синтез і секрецію ендотеліального чинника розслаблення, яким є оксид азоту NO, що синтезується із амінокислоти аргініну при дії ферменту NO-синтетази [3, 18]. Натрійуретичний ефект кінінів пов'язаний із збільшенням синтезу простагландинів ПГЕ₂, ниркового кровотоку і клубочкової фільтрації, а також з пригніченням реабсорбції натрію в проксимальних канальцях нирок.

Адреналін у фізіологічних умовах звужує вивідні артеріоли нирок, унаслідок чого збільшуються гломерулярна фільтрація і діурез [3]. У великих дозах і умовах стресу він звужує не лише вивідні, але й приносячі артеріоли, що призводить до падіння клубочкової фільтрації і зниження діурезу [4].

Завдання дослідження. Вивчення впливу бенфураму на вміст простагландинів в плазмі крові та активність калікреїн-кінінкової системи у щурів.

Матеріал та методи дослідження. Дослідження впливу бенфураму на вміст простагландинів в плазмі крові з водним та сольовим навантаженнями проведено на нелінійних білих щурах обох статей масою 210-230 г, які були розділені на 9 груп (по 7 щурів у кожній) з використанням радіоімунологічного методу В.М. Jaffe [17]. Радіоімунологічний аналіз простагландинів групи Е₂ (ПГЕ₂) проводили за допомогою набору реагентів фірми "Clinical Assayer" (США). Кров відбирали в поліетиленові пробірки, що містять 2% розчин етилендіамінтетраацетату в кількості 1 мл і ацетилсаліцилової кислоти в об'ємі 0,01 мл (30,4% розчин) на 1 мл цілісної крові. Плазму відокремлювали центрифугуванням при 4°C і 2000 об/хв протягом 30 хвилин. Екстракцію ПГЕ₂ проводили згідно інструкції, що додається до набору. До 1 мл плазми додавали 3 мл петролейного ефіру для видалення нейтральних ліпідів. Після видалення ліпідної фракції додавали 5 мл розчину, що містить етилацетат, ізопропанол і 0,2 Н хлористоводневу кислоту в співвідношенні 3:3:1. Струшували 15 секунд і додавали 2 мл ацетилацетату і 3 мл дистильованої води. Після центрифугування відбирали органічну фазу в об'ємі 3 мл. Колончатую хроматографію проводили методом послідовної елюації ПГЕ₂ за В.М. Jaffe на колонках кремнієвої кислоти сумішшю розчинників з бензолу, метанолу та етилацетату в різних

кількісних співвідношеннях [17]. Отримані елюати випаровували в ротаційному випарнику. Метод кількісного аналізу ПГ в отриманих елюатах заснований на зміні конкурентного скріплення мічених H_3 ПГ і досліджуваних ПГ₂ із специфічними антитілами до ПГ (кроляча антисироватка до ПГ). Розділення пов'язаних з антитілами не зв'язаних ПГ йде за рахунок осадження комплексу антиген-антитіло другим антитілом, специфічним до першого. Після центрифугування зв'язана радіоактивність осідає. Осад розчиняли в сцинтиляторі Брея. Підрахунок імпульсів проводили з сцинтиляційним лічильником протягом 1 хвилини.

Для визначення вмісту ПГ в діапазоні від 8,3 до 2000 мг/мл креслили стандартну криву з 6 крапок, для чого в 6 пробірок замість проб додавали певну кількість стандартного ПГ₂. На осі ординат відкладали відсоток скріплення H_3 ПГ, на осі абсцис - логарифм концентрацій ПГЕ₂, відповідних певній кількості з'єднання. Величину відсотка з'єднання для кожної проби і стандарту розраховували за формулою:

$$B_n = \frac{CPM_n - NSB}{B_o - NSB} \cdot 100\%$$

, де

CPM (n) – кількість імпульсів в хвилину; NSB - неспецифічне з'єднання; $U(o)$ - максимальне з'єднання.

Кількість ПГЕ₂ в кожній пробі визначали по калібрувальній кривій і проводили перерахунок, враховуючи розмір проби, що піддався екстрагуванню [8].

Визначення вмісту калікреїногену (прекалікреїну) і калікреїну визначали методом Т.С. Пасхиної і А.В. Крінської [11,12]. Метод заснований на тому, що утворюється в результаті гідролізу етилового ефіру N-бензоіл-L-аргінину (БАЕЕ) калікреїном N-бензоіл-L-аргінін (БА) має вищий коефіцієнт молярної екстинції. Метод включає 2 етапи:

1) відділення прекалікреїну від решти компонентів кінінової системи і інших трипсиноподібних ферментів сироватки крові за допомогою ДЕАЕ - сефадекса А-50 при рН 7,0;

2) зміну активності калікреїну і калікреїногену в цій фракції спектрофотометричним за швидкістю гідролізу БАЕЕ. Вміст калікреїногену і калікреїну виражали в мілі одиницях калікреїну в 1 мл сироватки крові за формулою:

$$\frac{D_{253}^{15} \cdot 3 \cdot 5 \cdot 1000}{1,1 \cdot 15 \cdot 0,25}$$

де D_{253}^{15} - приріст оптичної щільності в пробі за 15 хвилин (при лінійному ході реакції);

1,1 - D_{253} відповідна утворенню 1 мкмоль БА з БАЕЕ в 1 мл проби;

3 - об'єм проби в кюветі, мл;

5 - об'єм неадсорбованої фракції, мл;

0,25 - об'єм сироваткової крові, узятої для аналізу, мл;

15 - тривалість інкубації.

При проведенні експериментальних досліджень тварини знаходилися в стандартних умовах віварію, утримувалися на стандартному раціоні в умовах вільного доступу до води і їжі відповідно до положень і вимог «Європейської конвенції захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних і наукових цілей» (Страсбург, 1986 р.) і «Загальними етичними принципами експериментів на тваринах» [15]. Експериментальні дані обробляли загальноприйнятими методами варіаційної статистики з використанням програмного забезпечення версії Microoft Office Excel 2003. Достовірність відмінностей між експериментальними групами оцінювали за допомогою t-критерія Стьюдента [4, 6, 13].

Результати дослідження. Результати проведених досліджень впливу бенфураму на вміст простагландинів в плазмі крові щурів з водним і сольовим навантаженнями подані в таблиці 1. Аналіз отриманих експериментальних даних показує, що вміст ПГЕ₂ в плазмі інтактних щурів з водним навантаженням склав $5,32 \pm 0,09$ нмоль/л. У контрольних групах щурів з сольовим навантаженням вміст простагландинів ПГЕ₂ зменшився на 10,7 %, а з водним навантаженням – збільшився на 9,2 %. Під дією бенфураму у інтактних тварин вміст простагландинів в плазмі крові збільшився на 18,1 %. У щурів, які отримували сольове навантаження вміст простагландинів зріс на 22,9 % в порівнянні з інтактним контролем і на 4,1% в порівнянні з інтактними щурами, які отримували бенфурам в дозі 30 мг/кг. При водному навантаженні інтактних щурів, яким вводили бенфурам, вміст простагландинів в плазмі збільшвся на 31% в порівнянні з інтактними щурами і на 11 % в порівнянні з інтактними щурами, які отримували бенфурам.

Таблиця 1.

Вплив бенфураму на вміст простагландинів ПГЕ₂ в плазмі крові (n=7)

Препарати	Доза мг/кг	Вміст ПГЕ ₂ в плазмі, нмоль/л		
		Інтактні	Сольове навантаження	Водне навантаження
Контроль	-	5,32±0,09	4,75±0,06	5,81±0,07
Бенфурам	30,0	6,28±0,07*	6,54±0,08*	6,97±0,09*
Гідрохлортіазид	25,0	5,94±0,09*	6,12±0,09*	6,53±0,08*

Примітки: * – достовірність результатів при $P < 0,05$ у порівнянні з контролем.

Під дією гідрохлортіазиду у інтактних тварин вміст простагландинів ПГЕ₂ в плазмі збільшився на 11,6 %. У щурів на тлі сольового навантаження вміст простагландинів зріс на 15 % в порівнянні з інтактним контролем і на 3% в порівнянні з інтактними щурами, які отримували гідрохлортіазид. При водному навантаженні інтактних щурів, яким вводили гідрохлортіазид, вміст простагландинів в плазмі збільшився на 22,7% в порівнянні з інтактним контролем і на 9,9% в порівнянні з інтактними щурами, які отримували гідрохлортіазид в дозі 25 мг/кг. Бенфурам за активністю перевищує дію гідрохлортіазиду.

Таким чином, бенфурам стимулює біосинтез простагландинів ПГЕ₂ в організмі щурів та підвищує їх вміст в плазмі крові, що сприяє покращенню сечевивідної функції нирок. Вплив бенфураму і гідрохлортіазиду на активність калікреїн-кінінової системи у щурів з водним та сольовим навантаженням оцінювали за вмістом калікреїну і калікреїногену в плазмі крові за допомогою ензиматичного методу. Результати отриманих даних наведені в табл.2.

Таблиця 2.

Вплив бенфураму і гідрохлортіазиду на вміст калікреїногену і калікреїну у плазмі крові щурів (M±m; n = 7)

Серія дослідів	Доза мл/кг	Вміст калікреїногену, мед/мл	Вміст калікреїну, мед/мл
Водне навантаження			
Інтактні тварини	-	265,82 ± 2,2	93,61±2,14
Контроль	-	279,74 ± 2,6	98,72±3,12
Бенфурам	30,0	298,53± 2,5*	113,45±3,26*
Гідрохлортіазид	25,0	286,91± 3,3*	104,56±4,11*
Сольове навантаження			
Інтактні тварини	-	264,37 ± 5,41	92,85±2,12
Контроль	-	252,42 ± 4,14	91,47±2,37
Бенфурам	2,2	281,35 ± 3,29**	107,51±3,25*
Гідрохлортіазид	2,0	271,32 ± 3,18*	103,74±3,61

Примітка: верхній індекс * і ** - достовірність по відношенню до інтактних щурів при $p < 0,05$ і $p < 0,01$, нижній індекс * і ** - достовірність по відношенню до контролю при $p < 0,05$ і $p < 0,01$, відповідно.

Аналіз представлених даних показує, що у інтактних щурів вміст калікреїногену в плазмі складає 265,82 мод/мл і калікреїну - 93,61 мод/мл. В контрольній групі вміст калікреїногену в плазмі складає 279,74 мод/мл і калікреїну - 98,72 мод/мл. Під впливом бенфураму вміст калікреїногену збільшився на 12,3 % і калікреїну на 21,2 % в порівнянні з інтактними щурами. Під дією гідрохлортіазиду збільшився вміст калікреїногену в плазмі крові щурів на 7,9 % і калікреїну -

на 11,6% в порівнянні з інтактним контролем.

Отримані експериментальні результати свідчать про те, що бенфурам підвищує вміст калікреїногену і калікреїну в плазмі крові білих щурів і по активності перевершує дію гідрохлортіазиду.

Таким чином, під дією бенфураму збільшується вміст кінінів в плазмі крові, що є також одним з механізмів діуретичної активності бенфураму, оскільки кінінам притаманні виражені натрійуретичні і діуретичні властивості.

Висновки

1. Бенфурам у інтактних тварин стимулює біосинтез простагландинів в плазмі крові на 18,1%, а у щурів які отримували сольове навантаження – на 22,9% в порівнянні з інтактним контролем.
2. Під впливом бенфураму калікреїноген збільшилася на 12,3% і калікреїн – на 21,2% в порівнянні з інтактними щурами.
3. Під дією гідрохлортіазиду вміст калікреїногену в плазмі крові щурів збільшився на 7,9% і калікреїну - на 11,6% в порівнянні з інтактним контролем.
4. Отримані результати свідчать, що бенфурам підвищує біосинтез простагландинів та збільшує вміст калікреїногену і калікреїну в плазмі крові щурів і по активності перевищує дію гідрохлортіазиду.

Література

1. Биохимия человека / Р. Марри, Д. Греннер, П. Мейес [и др.]. – М. : Мир, 2003. – 206 с .
2. Вандер А. Физиология почек /А. Вандер; пер. с англ. /под ред. Ю.В. На-точина– 5-е изд. – М.: Медицина, 2001. – 256 с.
3. Глезер Г.А. Диуретики : руководство для врачей / Г.А. Глезер. - М.: Интербук-бизнес, 1993. - 352 с.
4. Джеймс А. Шейман. Патологическая физиология почки / Джеймс А. Шейман : пер. с англ. - /2-е изд., испр. - М. : СПб: Бином; Невский Диалект, 1999. - 206 с.
5. Доклінічні дослідження лікарських засобів / за ред. О.В. Стефанова. - Київ : Авіцена, 2001. - 528 с.
6. Лапач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием EXCEL / Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. – К.: Морион, 2000. – 320 с.
7. Машковский М.Д. Лекарственные средства / М.Д.Машковский. – [15-е изд., перераб., испр. и доп.]. – М.: ООО "Изд-во Новая волна", 2009. – 1206 с.
8. Методические указания к количественному анализу простагландинов, тромбосана, простаглицина и циклических нуклеотидов в биологических жидкостях и тканях /Под ред. А.М. Эфендиева, В.Д. Помейнецкого.- Баку: МЗ Азерб. ССР, 1984. – 42 с.
9. Мухин Н. Рациональная фармакотерапия в нефрологии /Н. Мухин, Л. Коз-ловская, Е. Шилова – М.: Литтера, 2006. – 918 с.
10. Пасхина Т.С. Калликреин плазмы крови – новые функции //Биохимия.- 1976.- Т. 41, № 8.- С. 1347.
11. Пасхина Т.С. Упрощенный метод определения калликреиногена и калликреина в сыворотки (плазме) крови человека в норме и при некоторых патологических состояниях / Т.С. Пасхина, А.В. Кринская //Вопр. мед. химии. – 1974. – Т. 20, № 6.- С. 660-663.
12. Романенко М.И. Синтез, фізико-хімічні та біологічні властивості похідних імідазо[1,2-*f*]ксантиніл-8-алканових кислот / М.И.Романенко, Т.М.Рак, О.О.Мартинюк, Б.А.Самура и др.// Вісник фармації. - Харків: Вид-во НфаУ. -№1(65). – 2011. – С. 38-41.
13. Сернов Л.Н. Элементы экспериментальной фармакологии. / Сернов Л.Н., Гацура В.В. – М.: Медицина, 2000. – С. 308-328.
14. Anderson G.D., Hauser S.D., Bremer M.E., et al. Selective inhibition of cyclo-oxygenase-2 reverses inflammation and expression of COX-2 and IL-6 in rat adjuvant arthritis / G.D. Anderson, S.D. Hauser , M.E. Bremer [et al.] // . J.Clin.Invest. – 1996. – № 97. – P. 2672-2679.
15. Commission of the European Communities: Council Directive of 18 December 1986 on the Laws, regulating the Application of Principles of Good Laboratory Practice and the Verification of Their Applications for Tests on Chemical Substances (87/18/EEC). The Rules Governing Medicinal Products in the European Community. – 1991. –Vol. 1. – P.145-146.
16. Masferrer J.L. Selective regulation of cellular cyclooxygenase by dexamethasone and endotoxin in mice / J.L.Masferrer, B.S. Zweifel, K. Seibert.[et al.] // . J. Clin. Invest. 2007; – Vol. 86 – P.– 1375-1379.
17. Jaffe B.M. Radioimmunoassay measurement of prostaglandin E, A and F in human plasma / B.M.Jaffe, H.R.Bernham, C.W. Parker //J. Clin. Invest.- 1973.- Vol.52.-P. 398-405.
18. Possible involvement of organic anion and cation transporters in renal excretion of xanthine

derivatives, 3- methylxanthine and enprofylline / M.Nadai, M.Kato, Yoshizumi et al. // Life Sci. - 2007. - Vol. 22, №15. - P. 1175-1182.

21. Singh G. Celecoxib versus naproxen and diclofenac in osteoarthritis patients: SUCCESS-1 study / G. Singh, J. Fort, J. Goldstein [et al.] // Am. J. Med. – 2006. – Vol. 119. – P. 255-266.

ВЛИЯНИЕ БЕНФУРАМА НА СОДЕРЖАНИЕ ПРОСТАГЛАНДИНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ И АКТИВНОСТЬ КАЛЛИКРЕИН-КИНИНОВОЙ СИСТЕМЫ У КРЫС

Корниенко В.И., к.фарм.н., доцент

Харьковская государственная зооветеринарная академия, г. Харьков

Аннотация. Приведены результаты исследования влияния бенфурама на содержание простагландинов в плазме крови и активность калликреин-кининовой системы у крыс. Показано, что бенфурам в дозе 30 мг/кг стимулирует биосинтез простагландинов ПГЕ₂, что способствует улучшению мочевыделительной функции почек, а также повышает концентрацию кинина в плазме крови у крыс, который является одним из механизмов его диуретической активности.

Ключевые слова: бенфурам, простагландины ПГЕ₂, калликреин-кининовая система.

BENFURAM INFLUENCE ON PROSTAGLANDINE CONTENT IN THE BLOOD SERUM AND KALLIKREIN-KININ SYSTEM ACTIVITY IN RATS

Kornienko V.I.

Kharkov State Zooveterinary Academy, Kharkov

Summary. The results of benfuram influence on prostaglandine content in the blood serum and kallikrein-kinin system activity in rats have been investigated. Benfuram a dose 30 mg/kg stimulated prostaglandine PGE₂ biosynthesis which promotes improving of urino-genital function of kidneys and also increases kinin concentration in rat's blood serum which is one of mechanisms of its diuretic activity.

Key words: benfuram, prostaglandins PGE₂, kallikrein-kinin system.

УДК 615. 011.547.857.4

ВПЛИВ БЕНФУРАМУ НА ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН НИРОК ЗА УМОВ ЗМІНЕНОЇ АКТИВНОСТІ АЛЬДОСТЕРОНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ

Корнієнко В.І., к.фарм.н., доцент

Харківська державна зооветеринарна академія, м. Харків

Анотація. За умов зниженої активності альдостеронових рецепторів при сумісному застосуванні бенфураму і спіронолактону діурез у щурів збільшився у 3,12 рази порівняно з контролем і в 2,37 рази в порівнянні з спіронолактоном. При поєднаному застосуванні бенфураму і спіронолактону спостерігали зменшення екскреції іонів К⁺, ніж при самостійному введенні бенфураму. Введення бенфураму за умов підвищення активності альдостеронових рецепторів призвело до посилення діурезу у 3,08 рази в порівнянні з контролем та зростання екскреції іонів натрію у 3,17 рази. Екскреція іонів калію з сечею після застосування бенфураму збільшилась в 1,53 рази в порівнянні з контролем.

Ключові слова: бенфурам, спіронолактон, ДОКСА, альдостеронові рецептори.

Актуальність проблеми. В регуляції водно-сольового гомеостазу приймає участь альдостерон, який утворюється в клубочковій зоні кори наднирників та впливає на транспорт іонів Na⁺ та K⁺ [3]. Втрата значного об'єму крові, зменшенні швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ) і дефіциті іонів Na⁺ виникає подразнення рецепторів привідної артеріоли нирки і натрієвих рецепторів юстагломерулярного апарату, що призводить до прискорення синтезу і екскреції реніну [2, 9]. Альдостерон разом із реніном і ангіотензином утворює єдину ренін-ангіотензин-альдостеронову-систему, яка є регулятором артеріального тиску (АТ) та водно-електролітного обміну. Специфічні мембранні і клітинні рецептори до альдостерону виявлені в нирках, шлунку, слинних і потових залозах, гіпокампі, товстій кишці, паразитовидних залозах, серці, печінці, селезінці та гіпофізі [6]. Альдостерон знижує втрати натрію з сечею, активує всмоктування його в кишечнику і стимулює «сольовий апетит» [10]. Альдостерон впливає на цитозольні рецептори, відкриття каналів в мембрані клітин та транспорт іонів натрію у клітинне ядро, де він викликає експресію відповідних генів і активацію синтезу Na⁺, K⁺-АТФази та інших білків. Геномні та