

DOI: 10.26693/jmbs04.01.041

УДК 615.225.015.4:616.61:612.398

Горошко О. М.¹, Захарчук О. І.¹, Заморський І. І.²,
Ежнед М. А.¹, Драчук В. М.², Паламар А. О.³, Сахацька І. М.¹

ВПЛИВ ТРИВАЛОГО ВВЕДЕННЯ КОРВІТИНУ НА ПРОТЕОЛІТИЧНУ АКТИВНІСТЬ У ЩУРІВ З ГЕНТАМІЦИНОВОЮ НЕФРОПАТІЄЮ

Вищий державний навчальний заклад України
«Буковинський державний медичний університет», Чернівці, Україна

¹кафедра фармацевтичної ботаніки та фармакогнозії

²кафедра фармакології

³кафедра фармації

gorolesya@ukr.net

Метою роботи стало дослідити зміни протеолітичної активності в сечі, плазмі крові та тканині нирок при тривалому введенні корвітину у щурів з гентаміциновою нефропатією. Гентаміцинову модель гострого пошкодження нирок відтворювали шляхом введення щурам 4% розчину гентаміцину сульфату в дозі 80 мг/кг один раз на день протягом 6 днів. Корвітин вводили внутрішньоочередово у дозі 10 мг/кг. Забій тварин проводили на 7 день експерименту. Ступінь пошкодження ниркової тканини при гентаміциновій нефропатії оцінювали за інтенсивністю протеолізу. За результатами експерименту встановлено, що при дослідженні гентаміциновою нефропатії проходили глибокі зміни функціонального стану нирок з різким пригніченням протеолітичної активності.

При введенні корвітину відмічалось зростання протеолітичної активності сечі за інтенсивністю лізису альбуміну, лізису азоказеїну та показники розпаду азоколу.

У плазмі крові інтенсивність лізису низькомолекулярних білків перевищувала показники нелікованих тварин за лізису азоальбуміном. Протеолітична деструкція високомолекулярних білків збільшилась у порівнянні з нелікованими тваринами. Колагенолітична активність плазми крові під впливом препарату аналогічно зростала.

Протеолітична активність у тканині нирок показала зростання лізису азоальбуміну, лізису азока-

зеїну. Активність деструкції білків з найбільш високою молекулярною масою збільшувалась у порівнянні з нелікованими тваринами при використанні корвітину.

Отже, водорозчинний препарат кверцетину - корвітин при тривалому використанні сприяв відновленню протеолітичної активності в організмі тварин з гентаміциновою нефропатією.

Ключові слова: протеолітична активність, кверцетин, корвітин, гентаміцинова нефропатія.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дана робота є продовженням комплексних досліджень науково-дослідної теми кафедри фармації Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет» «Фармакологічне та фармако-економічне обґрунтування застосування засобів з антиоксидантною активністю за ушкодження нирок та органів травлення», № державної реєстрації 0116U002932.

Актуальність. Патології нирок, як одна із невідкладних станів, ускладнює перебіг багатьох захворювань які досить швидко призводить до летального наслідку. Одне з провідних місць, серед спектрів даної проблеми, займає токсична дія ряду речовин на скелетні м'язи [1]. Досить часто виникають медикаментозні форми гострого пошкодження нирок (ГПН) внаслідок нефротоксичної дії низки

лікарських засобів, з яких близько 60% спричинено вживанням антибіотиків.

Аміноглікозиди є потужними бактерицидними антибіотиками, що широко використовуються для лікування інфекцій, викликаних грамнегативними мікроорганізмами [2]. Можливість розвитку нефрота ототоксичності є серйозним обмеженням до використання аміноглікозидів, а зокрема – гентаміцином. В клінічній практиці у 30 % пацієнтів при тривалому використанні з'являються ознаки ураження, що вимагає припинення їхнього застосування [3]. У патогенезі розвитку гентаміцинової нефропатії має місце активація процесів вільнорадикального окиснення на фоні дисбалансу АОС [4]. Центральною ланкою механізму формування гентаміцинової нефротоксичності є тубулярний ефект, зумовлений частково його реабсорбцією в проксимальних канальцях з наступною дестабілізацією мембран лізосом та ендоплазматичного ретикулуму, що призводить до вивільнення протеаз та пригнічення синтезу білка [5]. «Цитозольний» гентаміцин пригнічує клітинне дихання та продукцію АТФ, провокує розвиток оксидативного стресу, що призводить до активації апоптозу. Гентаміцин може викликати загибель клітин шляхом утворення вільних радикалів, стимуляції позаклітинних чутливих до кальцію рецепторів і енергетичної катастрофи, зниження ниркового кровотоку і запалення [6].

Гістологічно токсичність гентаміцину асоціюється з індукцією тубулярного некрозу, епітеліального набряку проксимальних канальців, клітинної десквамації, гломерулярного застою, периваскулярного набряку та запалення [7]. Окисненим білкам притаманна підвищена чутливість до протеолізу [8]. Надмірна активація системи необмеженого протеолізу є важливою патогенетичною ланкою в розвитку деструктивних, запальних та алергічних реакцій [9]. Враховуючи роль оксидативного стресу в розвитку гентаміцинової нефропатії [10], раціональним є проведення корекції токсичної дії антибіотика, використовуючи препарати, які володіють антиоксидантними властивостями.

Метою роботи стало дослідити зміни протеолітичної активності в сечі, плазмі крові та тканині нирок при тривалому введенні корвітину у щурів з гентаміциновою нефропатією.

Матеріал та методи дослідження. Експериментальні дослідження проводились на нелінійних білих щурах масою 120–180г. Піддослідні тварини були поділені на такі групи: 1 – контроль, тваринам вводили внутрішньоочеревинно воду для ін'єкцій в об'ємі, що є еквівалентною кількості розчину корвітину; 2 – створювали модельну патологію нирок і вводили внутрішньоочеревинно воду для ін'єкцій в об'ємі, що є еквівалентною кількості розчину корві-

тину; 3 – тварини, які після моделювання патології одержували корвітин. Гентаміцинову модель ГПН відтворювали шляхом введення щурам 4% розчину гентаміцину сульфату в дозі 80 мг/кг один раз на день протягом 6 днів.

Корвітин вводили внутрішньоочеревинно у дозі 10 мг/кг. Тварин забивали шляхом декапітації, під легким ефірним наркозом, дотримуючись положень «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986). Забій тварин проводили на 7 день експерименту. Матеріалами дослідження були сеча, плазма крові, сироватка крові, гомогенат нирки. Ступінь пошкодження ниркової тканини при гентаміциновій нефропатії оцінювали за інтенсивністю протеолізу. Стан протеолітичної активності визначали на основі реакції з азосполуками [11-13].

Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 2005), Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006, ст. 26), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених П'ятим національним конгресом з біоетики (Київ, 2013).

Результати досліджень обробляли статистично за допомогою програми "Statgraphics" з використанням t-критерію Ст'юдента.

Результати дослідження та їх обговорення. Встановлено, що при дослідженій гентаміцинової нефропатії (табл. 1-3) проходили глибокі зміни функціонального стану нирок з різким пригніченням протеолітичної активності.

Протеолітична активність групи тварин модельної патології у сечі пригнічувалась за всіма показниками. Так, лізис альбуміну зменшився у 2,2 рази, лізис азоказеїну – у 1,6 рази, лізис азоколу – у 2,5 рази.

Таблиця 1 – Зміни протеолітичної активності у сечі щурів з гентаміциновою нефропатією після багаторазового введення корвітину ($M \pm m$, $n=7$)

Показники, що вивчалися	Контроль	ГПН	ГПН + корвітин
		На 7 день експерименту	
Лізис азоальбуміну, E_{440} (мл · год.)	8,85±0,36	3,96±0,14 $p_1 < 0,001$	7,22±0,38 $p_2 < 0,001$
Лізис азоказеїну, E_{440} (мл · год.)	6,36±0,23	4,02±0,13 $p_1 < 0,001$	7,59±0,23 $p_2 < 0,001$
Лізис азоколу, E_{440} (мл · год.)	0,41±0,04	0,16±0,02 $p_1 < 0,001$	0,43±0,05 $p_2 < 0,001$

Примітки: p_1 – вірогідність різниць показників порівняно з контролем; p_2 – вірогідність відмінностей показників порівняно з ГПН.

Таблиця 2 – Зміни протеолітичної активності у плазмі крові з гентаміциновою нефропатією після багаторазового введення корвітину ($M \pm m$, $n=7$)

Показники, що вивчалися	Контроль	ГПН	ГПН + корвітин
		На 7 день експерименту	
Лізис азоальбуміну, $E_{440}/(\text{мл} \cdot \text{год.})$	$6,02 \pm 0,12$	$3,57 \pm 0,28$ $p_1 < 0,01$	$6,43 \pm 0,45$ $p_2 < 0,001$
Лізис азоказеїну, $E_{440}/(\text{мл} \cdot \text{год.})$	$6,19 \pm 0,14$	$3,78 \pm 0,22$ $p_1 < 0,001$	$6,67 \pm 0,42$ $p_2 < 0,001$
Лізис азоколу, $E_{440}/(\text{мл} \cdot \text{год.})$	$0,36 \pm 0,04$	$0,14 \pm 0,04$ $p_1 < 0,05$	$0,29 \pm 0,06$ $p_2 < 0,01$

Примітки: p_1 – вірогідність різниць показників порівняно з контролем; p_2 – вірогідність відмінностей показників порівняно з ГПН.

Протеолітична активність плазми крові в групі тварин з модельною патологією знизилась, зокрема інтенсивність лізису альбуміну та лізису казеїну зменшилась у 1,7 та 1,6 рази відповідно в порівнянні з контрольною групою тварин. Колагенолітична активність плазми крові, визначена за лізисом азоколу, зменшилась на 7 день експерименту у 2,6 рази.

Аналогічно відмічалось пригнічення протеолітичної активності групи тварин модельної патології у тканині нирок практично у 1,7 рази у порівнянні з показниками контрольної групи.

За умов гліцеролової ГПН показники активності протеолізу зменшувались, ймовірно, внаслідок пошкодження проксимальних відділів каналців нефрона.

Згідно даних експерименту, при корекції ГПН корвітином протеолітична активність була більшою щодо нелікованих тварин майже протягом усього експерименту. При багаторазовому введенні корвітину відмічалось зростання протеолітичної активності сечі (**табл. 1**), так, інтенсивність лізису альбуміну зросла у 1,8 рази; лізису азоказеїну – у 1,9 рази; показники розпаду азоколу збільшувались в порівнянні з нелікованими тваринами при семиденному введенні у 2,7 рази.

У плазмі крові (**табл. 2**) інтенсивність лізису низькомолекулярних білків перевищувала показники нелікованих тварин за лізис азоальбуміном на 7 день – у 1,8 рази. Протеолітична деструкція високомолекулярних білків, визначена за лізисом азо-

Таблиця 3 – Зміни протеолітичної активності у тканині нирок щурів з гентаміциновою нефропатією після багаторазового введення корвітину ($M \pm m$, $n=7$)

Показники, що вивчалися	Контроль	ГПН	ГПН + корвітин
		На 7 день експерименту	
Лізис азоальбуміну, $E_{440}/(\text{мл} \cdot \text{год.})$	$76,0 \pm 6,20$	$41,5 \pm 2,38$ $p_1 < 0,001$	$75,27 \pm 2,64$ $p_2 < 0,01$
Лізис азоказеїну, $E_{440}/(\text{мл} \cdot \text{год.})$	$77,5 \pm 4,30$	$43,23 \pm 4,84$ $p_1 < 0,001$	$75,4 \pm 2,06$ $p_2 < 0,001$
Лізис азоколу, $E_{440}/(\text{мл} \cdot \text{год.})$	$5,1 \pm 0,60$	$3,03 \pm 0,44$ $p_1 < 0,01$	$5,93 \pm 0,71$ $p_2 < 0,01$

Примітки: p_1 – вірогідність різниць показників порівняно з контролем; p_2 – вірогідність відмінностей показників порівняно з ГПН.

казеїну, збільшилась у 1,8 рази. Колагенолітична активність плазми крові за лізисом азоколу під впливом препарату збільшувались у порівнянні з нелікованими тваринами у 2,1 рази.

Результати дослідження протеолітичної активності на тлі гентаміцинової нефропатії у тканині нирок (**табл. 3**) показали також достовірне зростання лізису азоальбуміну у 1,8 рази, лізису азоказеїну у 1,7 рази. Активність деструкції білків з найбільш високою молекулярною масою, що визначалась за лізисом азоказеїну, збільшувалась у порівнянні з нелікованими тваринами у 1,9 рази в порівнянні з нелікованими тваринами при використанні корвітину.

Отже, водорозчинний препарат кверцетину - корвітин при тривалому використанні сприяв відновленню протеолітичної активності в організмі тварин з гентаміциновою нефропатією, що проявляється у більшій мірі на відновленні протеолізу білків.

Висновок. Багаторазове застосування водорозчинного препарату кверцетину корвітину збільшує протеолітичну активність рідин організму та тканин нирок за умов гентаміцинової нефропатії, що дає підстави для подальших клінічних досліджень.

Перспективи подальших досліджень. Отримані результати обґрунтовують доцільність подальшого дослідження препаратів кверцетину з антиоксидантною активністю як потенційних засобів для фармакологічної корекції пошкоджень нирок різної етіології.

References

- Fliser D, Laville M, Covic A, Fouque D, Vanholder R, Juillard L, et al. A European Renal Best Practice (ERBP) position statement on the Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) clinical practice guidelines on acute kidney injury: part 1: definitions, conservative management and contrast-induced nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2012; 27(12): 4263–72. PMID: 23045432. PMCID: PMC3520085. DOI: 10.1093/ndt/gfs375
- Quiros Y, Vicente-Vicente L, Morales AI, López-Novoa JM, López-Hernández FJ. An integrative overview on the mechanisms underlying the renal tubular cytotoxicity of gentamicin. *Toxicol Sci.* 2011; 119(2): 245–56. PMID: 20829429. DOI: 10.1093/toxsci/kfq267

3. Muthuraman A, Singla S, Rana A, Singh A, Sood Sh. Reno-protective role of flunarizine against gentamicin induced nephrotoxicity in rats. *Yakugaku Zasshi*. 2011; 131(3): 437–43. <https://doi.org/10.1248/yakushi.131.437>
4. Zamorskyi II, Dudka YeA, Shchudrova TS. Vplyv melatoninu na funktsionalnyi stan nyrok shchuriv za umov rozvytku hentamitsynovoi nefropatii na tli pinealnoi hipofunktsiyi. *Klinichna ta eksperymentalna patolohiya*. 2018; 3 (65): 44-9. [Ukrainian]
5. Drachuk VM, Zamorskyi II. Porivnyalna kharakterystyka nefroprotektornoї aktyvnosti taurynu ta kanefronu pry hentamitsynoviy nefropatii. *Odeskyi medychnyi zhurnal*. 2018; 4: 12-7. [Ukrainian]
6. Ali B H, Al Za'abi M, Blunden G, Nemmar A. Experimental gentamicin nephrotoxicity and agents that modify it: a mini-review of recent research. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2011; 109(4): 225–32. PMID: 21599835. DOI: 10.1111/j.1742-7843.2011.00728.x
7. Balakumar P, Rohilla A, Thangathirupathi A. Gentamicin-induced nephrotoxicity: Do we have a promising therapeutic approach to blunt it? *Pharmacol Res*. 2010; 62(3): 179–86. PMID: 20434560. DOI: 10.1016/j.phrs.2010.04.004
8. Zamorskyi II, Unhuryan TM. Aktyvnist proteolizu ta fibrynolizu v nyrkoviy tkanyni za hostroho poshkodzhennya nyrok na tli vvedennya tseruloplazminu. *Ukrainskyi zhurnal medytsyny, biolohiyi ta sportu*. 2018; 3(12): 16-20. [Ukrainian] <https://doi.org/10.26693/jmbs03.03.016>
9. Neporada KS, Berehova TV, Sukhomlyn AA, ta in. Rozvytok proteolitychnoho dysbalansu v tkanyakh orhaniv porozhnyy rota (ohlyad literatury). *Medychnyi forum*. 2017; 12(12): 103–6. [Ukrainian]
10. Zamorskyi II, Shchudrova TS. Porivnyalna otsinka nefroprotektornoї aktyvnosti orhanospetsyfychnykh peptydiv pry hentamitsynoviy nefropatii v shchuriv. *Farmakolohiya ta likarska toksykolohiya*. 2014; 6(41): 81-6. [Ukrainian]
11. Mikhyeyev AO, Horban YeM. Osoblyvosti perebihu proteolizu, fibrynolizu ta perekysnoho okysnennya lipidiv u kirkoviy rechovyni nyrok shchuriv riznoho viku. *Medychna khimiya*. 2007; 9(2): 70-3. [Ukrainian]
12. Mahalyas VM, Mikhyeyev AO, Rohovyi BYe, ta in. *Suchasni metodyky eksperymentalnykh ta klinichnykh doslidzen Tsentralnoi naukovy-doslidnoi laboratoriyi Bukovynskoi derzhavnoi medychnoi akademiyi*. Metodychnyi posibnyk. Chernivtsi: BDMA; 2001. 42 p. [Ukrainian]
13. Tymofiychuk IR, Anokhina SI. Stan proteo- ta fibrynolitychnoi aktyvnosti struktur holovnoho mozku ta riven metabolitiv monoooksydu nitroheny u shchuriv riznykh vikovykh hrup. *Zdobutky klinichnoi i eksperymentalnoi medytsyny. (Ternopil)*. 2013; 2: 284-5. [Ukrainian]

УДК 615.225.015.4:616.61:612.398

ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ КОРВИТИНА НА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ У КРЫС С ГЕНТАМИЦИНОВОЙ НЕФРОПАТИЕЙ

Горошко А. М., Захарчук А. И., Заморский И. И., Ежнед М. А., Драчук В. М., Паламар А. А., Сахацкая И. М.

Резюме. Целью работы было исследовать изменения протеолитической активности в моче, плазме крови и ткани почек при длительном введении корвитина у крыс с гентамициновой нефропатией. Гентамициновую модель острого повреждения почек моделировали путем введения крысам 4% раствора гентамицина сульфата в дозе 80 мг/кг один раз в день в течение 6 дней.

Корвитин вводили внутривентриально в дозе 10 мг/кг. Забой животных проводили на 7 день эксперимента. Степень повреждения почечной ткани при гентамициновой нефропатии оценивали по интенсивности протеолиза. По результатам эксперимента установлено, что при исследованной гентамициновой нефропатии проходили глубокие изменения функционального состояния почек с резким угнетением протеолитической активности.

При введении корвитина отмечался рост протеолитической активности мочи по интенсивности лизиса альбумина и азоказеина, а также показателя распада азоколу.

В плазме крови интенсивность лизиса низкомолекулярных белков превышала показатели у крыс, которые подверглись лечению по сравнению с группой крыс с патологией. Протеолитическая деструкция высокомолекулярных белков увеличилась по сравнению с больными животными. Колагенолитическая активность плазмы крови под влиянием препарата аналогично возросла.

Протеолитическая активность в ткани почек показала рост лизиса азоальбумина и азоказеина. Активность деструкции белков с наиболее высокой молекулярной массой увеличивалась по сравнению с больными животными при использовании корвитина.

Итак, водорастворимый препарат кверцетина - корвитин при длительном использовании способствовал восстановлению протеолитической активности в организме животных с гентамициновой нефропатией.

Ключевые слова: протеолитическая активность, кверцетин, корвитин, гентамициновая нефропатия.

UDC 615.225.015.4:616.61:612.398

**The Influence of Corvitin on Proteolytic Activity in Rats
with Gentamicin-Induced Nephropathy in Case of its Long-Term Administration**

**Horoshko O. M., Zakharchuk O. I., Zamorskiy I. I., Ezhned M. A.,
Drachuk V. M., Palamar A. A., Sakhatska I. M.**

Abstract. Renal pathology, as one of the urgent conditions, quickly leads to lethality and also complicates many diseases. Quite often there are medicinal forms of acute kidney damage due to the nephrotoxic effect of a number of drugs, namely the antibiotic gentamicin. In the pathogenesis of gentamicin nephropathy, activation of free radical oxidation processes takes place on the background of the imbalance of acute kidney damage. Oxidized proteins have an increased sensitivity to proteolysis. Given the role of oxidative stress in the development of gentamicin nephropathy, it is rational to carry out correction of antibiotic's toxic effect by using drugs with anti-oxidant activity.

The purpose of the work was to investigate the changes in proteolytic activity in urine, plasma and kidney tissue with prolonged administration of corvitin in rats with gentamicin-induced nephropathy.

Material and methods. Experiments were performed on non-linear white rats with body weight of 120-180 g. The gentamicin model was induced by administering 4% solution of gentamicin sulfate to the rats at a dose of 80 mg/kg once a day during 6 days. Corvitin was administered intraperitoneally at a dose of 10 mg/kg converted to quercetin. Animals were decapitated under a light etheric anesthesia on the 7th day of the experiment. The degree of damage to the renal tissue with gentamicin nephropathy was evaluated according to the proteolysis intensity.

Results and discussion. During the study of gentamicin-induced nephropathy, deep changes took place in the functional state of the kidneys with a sharp suppression of proteolytic activity.

After long-term corvitin administration we observed the growth of the urine proteolytic activity. Thus, albumen lysis increased by 1.8 times; azocasein lysis increased by 1.9 times; azocola decay rates increased by 2.7 times compared to untreated animals after 7 days of administration.

In blood plasma, the intensity of lysis of low molecular weight proteins exceeded by 1.8 times the untreated animals for lysine by azoalbumin for 7 days. The proteolytic degradation of high molecular weight proteins which was determined by the azocasein lysis increased by 1.8 times. Under the drugs influence the collagenolytic activity of blood plasma by azocola lysis increased by 2.1 times in comparison with untreated animals.

Proteolytic activity in the renal tissue showed an increase in the lysis of azoalbumin by 1.8 times, azocasein lysis increased by 1.7 times. The activity of proteins destruction with the highest molecular weight increased by 1.9 times in comparison with untreated animals with corvitin administration.

Keywords: proteolytic activity, quercetin, corvitin, gentamicin-induced nephropathy.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Стаття надійшла 10.11.2018 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування