ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ ГІПОГЛІКЕМІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ε-КАРБОКСИАМІЛАМІДУ 4-(N-БУТИЛУРЕЇДОСУЛЬФОНІЛ)-ОКСАНІЛОВОЇ КИСЛОТИ НА МОДЕЛІ АЛОКСАНІНДУКОВАНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ У ЩУРІВ

Г.О.Бойко, І.П.Банний, О.Г.Ситник, Н.С.Нікітіна

Інститут підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету

Ключові слова: похідні букарбану; гіпоглікемічні властивості; підшлункова залоза; В-клітини; гістологічні дослідження; цукровий діабет (ЦД); інсулінозалежний цукровий діабет (ІЗЦД)

Наведені матеріали з вивчення специфічних гіпоглікемічних властивостей вперше синтезованої сполуки ε-карбоксиаміламіду 4-(N-бутилуреїдосульфоніл)-оксанілової кислоти (в подальшому АБ-4) на моделі алоксанового діабету у щурів. Встановлено, що сполука в дозі 125 мг/кг має виражену цукрознижуючу активність за рахунок її дії на β-клітини острівців підшлункової залози. Як препарат порівняння використовували стандартний цукрознижуючий препарат "Букарбан", на основі якого була отримана речовина АБ-4. Проводились макроскопічні дослідження печінки та гістологічні — підшлункової залози. В кожній групі попередньо визначався вихідний рівень глюкози у крові. В подальшому кількість цукру визначалась через кожну годину протягом 10 год. Оцінку ефективності препарату та сполуки проводили за динамікою цукру крові протягом доби, а також за даними патоморфологічних досліджень. Вперше синтезована речовина ε-карбоксиаміламід 4-(N-бутилуреїдосульфоніл)-оксанілової кислоти у 2,2 рази перевищує цукрознижуючу активність букарбану.

Цукровий діабет (ЦД) — це хронічний мультигормональний розлад усіх видів метаболізму, який характеризується наростаючою гіперглікемією, глюкозурією, розвитком ускладнень, в основі яких лежать ушкодження судин, а також нейропатії. Він є гострою актуальною проблемою охорони здоров'я з точки зору різноманітності його видів з різною етіологією [1-5, 18, 26].

Розрізняють, в основному, два види цукрового діабету.

Первинний — ідіопатичне розладнання механізмів інсулінової регуляції метаболізму. Це захворювання може бути викликане або деструкцією β-клітин панкреатичних острівців та абсолютною інсуліновою недостатністю, або комбінацією первинної резистентності тканин-мішеней до інсуліну, а β-клітин — до глюкози, що призводить до відносної недостатності інсуліну.

Таким чином, первинний ЦД, складаючи біля 95% усіх випадків цукрового діабету, розділяється на 2 типи:

1. Первинний цукровий діабет I типу (інсулінозалежний, гіпоінсулінемічний, юнацький, ювенільний, ІЗЦД) складає 20% від загальної кількості первинного ЦД.

2. Первинний цукровий діабет II типу (інсулінонезалежний, гіперінсулінемічний, хвороба дорослих, старих, повних, ІНЦД), який складає 80% від загальної кількості первинного діабету. Цей тип включає декілька особливих підтипів: ІНЦД у неповних хворих (Па); ІНЦД у повних (Пб) та ІНЦД в юнацькому віці (Пс).

Вторинний цукровий діабет або гіперглікемічні синдроми, які виникають внаслідок інших хвороб і уражають підшлункову залозу чи систему регуляції вуглецевого метаболізму (хронічний панкреатит, травма підшлункової залози, акромегалія, фехромоцитома, гіпертиреоїдизм) [4, 5, 19].

Етіологія ІЗЦД мультифакторіальна. Ціла низка зовнішніх факторів може призвести до розвитку діабету (віруси, хімічні діабетогени), провокуючи цитоліз β-клітин острівців, призводячи до аутоімунного процесу. Однак, цей процес можливий тільки в організмі генетично схильного індивіда (внутрішні фактори). Саме цей симбіоз є основним у виникненні ІЗЦД у молодому віці [4, 5, 23].

Г.О.Бойко — аспірант кафедри якості, стандартизації та сертифікації ліків Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету (м. Харків)

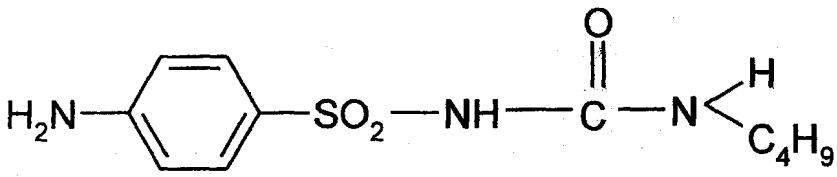

Рис. 1. Хімічна структура букарбану

Провідним фактором виникнення ІЗЦД є прогресуюча загибель β-клітин панкреатичних острівців, які з функціональної точки зору представляють собою тканину підшлункової залози. Це призводить до зміни гетероклітинних взаємин в острівцях, розвитку інсулінопенії та відносного і абсолютного виділення надмірної кількості контрінсулярних α-острівцевих гормонів. У результаті порушується утилізація глюкози. Виникають порушення всіх видів метаболізму [4, 5, 24]. Хронічні порушення метаболізму породжують ускладнення ІЗЦД, головні з яких пов'язані з ангіопатією [12, 20].

У хворих на ЦД у 2 рази частіше бувають хвороби серця та в 17 разів частіше хвороби нирок.

Половина інсулінозалежних хворих умирає від хронічної ниркової недостатності, 3/4 — від ускладнень атеросклерозу.

У популяції хворих на ЦД входять діти віком до 14 років. Щорічний приріст числа дітей, хворих на інсулінозалежний цукровий діабет, складає близько 6%. До 13% хворих з ЦД — це діти молодше 5 років [2, 9, 17].

ІЗЦД складає від 10 до 20% усіх випадків цукрового діабету та набуває особливого значення в дитячих та підліткових групах [14, 21].

Для терапії даного захворювання використовуються, в основному, гормональні препарати "Інсулін" та його аналоги (середня і важка форма діабету) [6, 7, 10, 13, 22], а також рослинні та синтетичні препарати (легка та середня форма). Кожен з цих лікарських препаратів має ряд недоліків (інсулін — аутоімунізація; синтетичні — токсичність, кумулятивність). У зв'язку з цим існує необхідність пошуку як рослинних, так і синтетичних хімічних препаратів, які мають цукрознижуючу дію, але максимально позбавлені побічних ефектів.

У практиці терапії ІЗЦД, особливо легкої та середньої форми, використовуються препарати з різних хімічних груп: похідні сульфаніламідів [8], бігуанідів та сульфонілсечовини [11, 16]. Представником останньої є букарбан: N-(пара-амінобензолсульфоніл)-N^1-н-бутилсечовина (рис. 1).

Більш токсичний ніж бутамід, але більш активний. Внаслідок наявності у молекулі букарбану групи NH_2 у бензольному ядрі, що є характерним для сульфаніламідів з антибактеріальною активністю, цей препарат може призводити до порушення мікрофлори шлунка та кишок (дисбактеріозу). Крім того, він викликає шкірно-алергічні реакції та порушення кровотворення [8, 15, 27].

Метою даної роботи було фармакологічне вивчення нової сполуки є -карбоксиаміламіду 4-(N-бутилуреїдосульфоніл)-оксанілової кислоти та її впливу на β-клітини на моделі алоксаніндукованого ЦД у щурів.

Нами було синтезовано 9 нових похідних на основі букарбану, з яких на етапі скринінгу був виділений ε-карбоксиаміламід 4-(N-бутилуреїдосульфоніл)-оксанілової кислоти (АБ-4), що і став об'єктом наших досліджень.

Модель алоксанового діабету є високовідтворюваною та відповідає основним клініко-патоморфологічним порушенням, що зустрічаються при даній патології у людини [15, 20, 25].

Матеріали та методи

Для моделювання ІЗЦД використовували внутрішньоочеревинне введення водного розчину алоксану як хімічного діабетогена в дозі 150 мг/кг маси тіла тварини. Алоксан застосовувався для руйнування плазматичних мембран β-клітин з наступною втратою острівцями їх основних специфічних функцій. Експеримент проводився на білих щурах-самцях популяції Вістар з масою 150-200 г.

Всього було поставлено 4 серії дослідів на 26 щурах: в першій та другій групах їх було по 6, в третій та четвертій — по 7:

- у першій групі були щури з алоксановим діабетом, яким речовина АБ-4 не вводилась;
- у контрольній (друга група) — щури без цукрового діабету, які одержували досліджувану речовину АБ-4;
- в експериментальній (третя група) були щури з алоксаніндукованим діабетом, яким вводилась речовина АБ-4;
- щури з діабетом четвертої групи отримували цукрознижуючий препарат "Букарбан".

У 2-й та 3-й групі речовина АБ-4 вводилась у дозі 125 мг/кг, щури 4-ї отримували букарбан у тій же дозі.

Специфічну гіпоглікемічну дію синтезованої речовини та препарату порівняння оцінювали за динамікою рівня глюкози протягом доби.

Проводили макроскопічні дослідження печінки та гістологічні — острівців Лангерганса підшлункової залози.

На зрізах підшлункової залози за допомогою окуляр-мікрометра визначали середній діаметр панкреатичних острівців (мкм), їх чисельність у препараті, а також кількість β-клітин у тварин різних експериментальних груп.

Аналіз усіх мікропрепаратів проводили за допомогою мікроскопу Бімам-Р.

У кожній групі попередньо визначався вихідний рівень глюкози в крові. У подальшому кількість цукру визначалась через кожну годину на протязі 10 год. Останній вимір проводили через 24 год.

Глюкозу в сироватці крові визначали глюкозооксидазним методом за допомогою діагностичних наборів фірми "Філісіт діагностика" серії 3.04.02.

Загальний стан щурів оцінювався за ступенем їх активності.

Таблиця

Гіпоглікемічна активність синтезованої речовини АБ-4 у щурів

Умови експерименту	n	Початковий рівень глюкози, ммоль/л	X±Sx час досліду, год										
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	24
Алоксановий діабет без АБ-4	6	9,48± ±0,86	9,50± ±1,28	9,55± ±1,28	9,43± ±1,03	9,40± ±1,70	9,40± ±1,70	9,46± ±1,37	9,50± ±1,40	9,40± ±1,42	9,45± ±1,12	9,50± ±1,45	9,42± ±1,38
% зниження		100%	+0,2	+0,7	-0,5	-0,8	-0,95	-0,2	+0,2	-0,8	-0,3	+0,2	-0,6
Інтактний контроль+АБ-4	6	3,40± ±0,22	3,80± ±0,58	3,67± ±0,11	3,47± ±0,17	3,47± ±1,14	2,92± ±0,22	2,79± ±0,17	2,38± ±0,14*	2,69± ±0,33	3,70± ±0,22	4,25± ±0,14	3,45± ±0,25
% зниження		100%	+12	+8	+2	+2	-14	-18	-30	-21	+9	+25	+1,4
Алоксановий діабет+АБ-4	7	9,70± ±0,58	9,41± ±0,45	8,54± ±0,50	7,76± ±0,11*	7,37± ±0,11*	6,21± ±0,41*	5,04± ±0,42*	4,46± ±0,59*	5,93± ±0,33*	8,45± ±0,75	10,11± ±0,78	9,80± ±0,81
% зниження		100%	-3	-12	-20	-24	-36	-48	-54	-25	+7	+28	+0,95
Алоксановий діабет+букарбан	7	8,40± ±0,30	—	8,06± ±0,54	—	6,38± ±0,09	—	6,64± ±0,20	—	7,06± ±0,25	—	7,30± ±0,17	7,98± ±0,05
% зниження		100%		-4		-24		-21		-16		-13	-5

Примітка. * — Ступінь вірогідності цих спостережень знаходиться в межах -0,001<p<0,05

Результати експерименту оброблялись методом математичної статистики із застосуванням критерію Ст'юдента.

Результати та їх обговорення

Отримані результати наведені в таблиці та на графіку (рис. 2).

Аналіз даних показав, що у тварин з алоксановим діабетом без уведення синтезованої речовини АБ-4 (1-ша група) протягом усього експерименту кількість цукру практично не змінювалась (табл.).

У щурів другої групи з уведенням синтезованої речовини спостерігалось зниження рівня глюкози в інтервалі 5-8-ї год (-14 — -21%). Максимальне її зниження виявлялось через 7 год (-30 %). Через 24 год рівень глікемії практично не відрізнявся від вихідного рівня.

Деяке підвищення цукру в крові на початку дослідження пов'язано, очевидно, з активацією α-клітин острівців Лангерганса підшлункової залози.

У третій групі тварин з алоксановим цукровим діабетом та введенням синтезованої речовини АБ-4 за 6 год до ін'єкції алоксану динаміка глюкози в крові різко відрізняється від попередньої групи. Тут спостерігається швидке та поступове зниження цукру: від 3% через 1 год і до 24% на 4-ій. Найбільше зниження виявлене у проміжку між 5-ою та 8-ою год (-36 — -25%), яке досягало максимуму -54% на 7-ій год.

Четверта група тварин з цукровим діабетом на тлі введення букарбану характеризувалась типовою для цього препарату невисокою гіпоглікемічною активністю -4% через 2 год; -13% на 10-ій год та максимальним зниженням до -21% на 6-й, але з більш тривалою дією. Слабка гіпоглікемія проявлялась навіть через 24 год.

На графіку (рис. 2) чітко прослідкується різниця в активності синтезованої речовини АБ-4 та препарату порівняння "Букарбану". В динаміці цукру крові здорових щурів також спостерігалась тенденція до його зниження, але в значно меншій мірі.

Коливання кількості цукру у щурів з діабетичним контролем практично не виходить за межі вихідних даних.

При макроскопічному дослідженні печінки було встановлено, що у щурів з алоксановим діабетом (контроль 1-ї групи) печінка має заокруглені краї, частки її не розрізнені, а з'єднані з іншими органами.

У щурів другої групи (контроль) печінка має звичайний колір, краї її заокруглені, поділ на частки чітко виражений. З іншими органами не з'єднана.

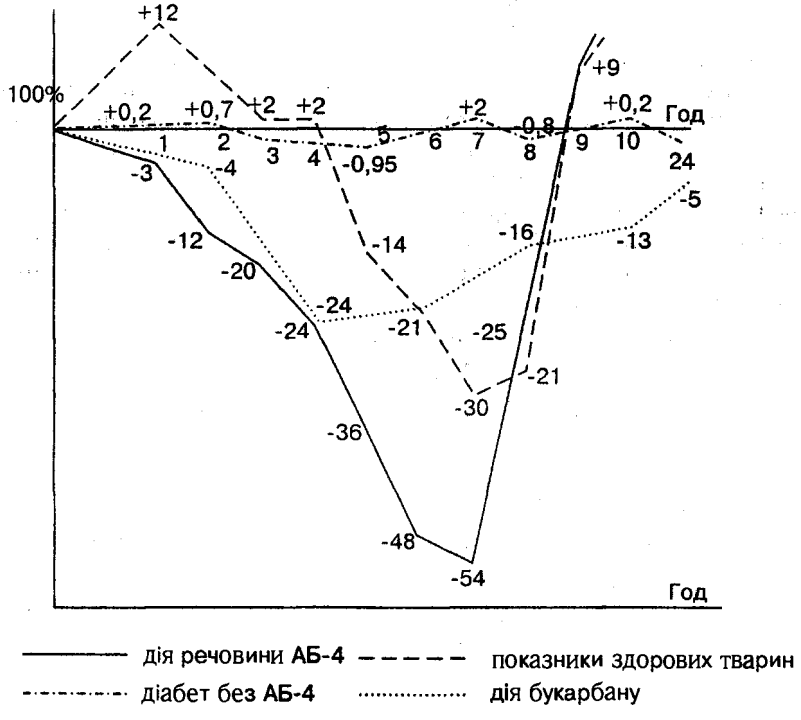

Рис. 2. Динаміка рівня глюкози в % в інтактних щурів та щурів з діабетом

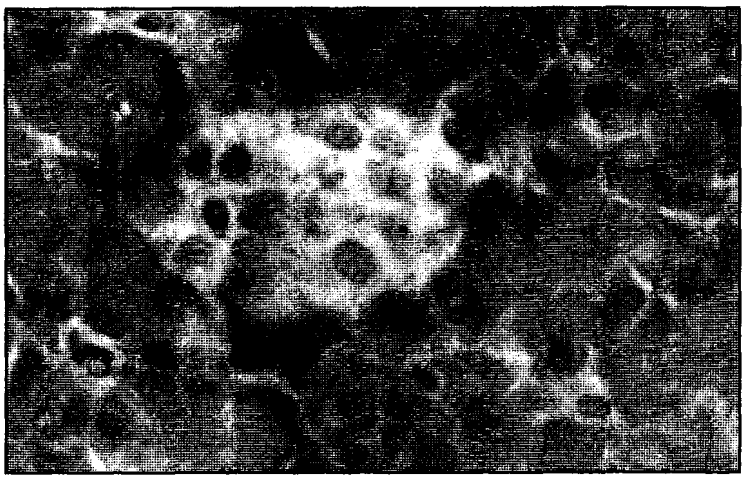

Рис. 3. Підшлункова залоза здорового щура. х250

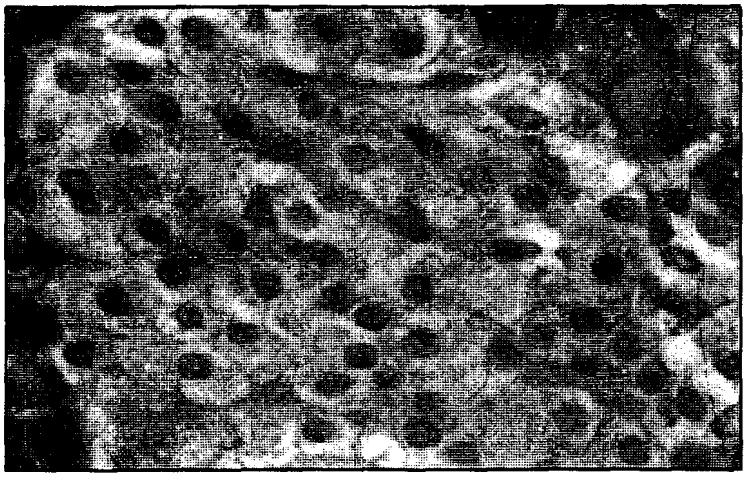

Рис. 4. Підшлункова залоза щура з алоксановим діабетом, не лікованим речовиною АБ-4. х250

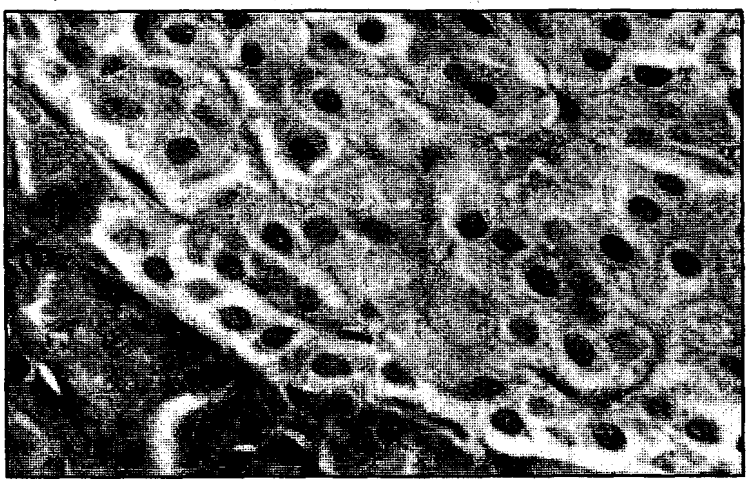

Рис. 5. Підшлункова залоза щура з алоксановим діабетом, лікованим речовиною АБ-4. х250

У тварин з алоксановим діабетом (третя група), яким синтезована речовина вводилась за 6 год до ін'єкції діабетогена, визначались слабко заокруглені краї печінки, деякі частини не розподілена, колір блідуватий.

У печінці тварин з цукровим діабетом із введенням їм букарбану (четверта група) визначалась наявність спайок, заокруглених її країв та їх потовщення.

При мікроскопічному дослідженні підшлункової залози було встановлено, що в 1-й групі тварин (діабетичний контроль) з'єднально-тканинна капсула та перетинки між дольками залози розширені, різко знижена кількість панкреатичних острівців (до 5 одиниць) та β-клітин. Середній діаметр острівців складає 52,9±8,74 мкм. Самі клітини збільшені у розмірах (рис. 4).

У другій групі (здорові щури — інтактний контроль) на мікропрепаратах видно, що центральну частину панкреатичних острівців займають β-клітини, які мають у цитоплазмі специфічну зернистість (наявність інсуліну). Ознак деградації β-клітин не відмічено, гістологічно вони повноцінні. Ядра клітин помірно варіабельні за розміром. Ядерця та хроматинова субстанція чітко контуруються (рис. 3).

У третій групі експериментальних тварин, яким до ін'єкції алоксану перорально вводилась синтезована речовина АБ-4, гістологічна картина представлена достатньою кількістю збережених β-клітин, але в меншій ніж у контролі кількості зі специфічною зернистістю та повноцінною функцією (рис. 5).

Протягом усього експерименту загальний стан тварин був задовільним, шерсть гладка, апетит добрий, тварини не збуджені. Поведінка звичайна.

У першій групі щурів спостерігалось деяке підвищення їх збудженості та послаблення апетиту, що пояснюється дією нелікованої гіперглікемії.

ВИСНОВКИ

1. ε-Карбоксиаміламід 4-(N-бутилуреїдосульфоніл)-оксанілової кислоти має цукрознижуючу активність, яка в 2,2 рази перевищує активність букарбану.

2. На відміну від букарбану синтезована речовина, введена за 6 год до ін'єкції алоксану, в значній мірі запобігає загибелі β-клітин острівців Лангерганса підшлункової залози та функції печінки.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Бриндак О.И., Черных В.П., Черных В.Ф., Бездетко П.А. Сахарный диабет. — Х.: Прапор, 1994. — 128 с.*
2. *Влияние сахара на сознание и поведение детей //Мед. марк. — 1997. — №25. — С. 14-18.*
3. *Древаль А.В. //Мед. марк. — 1998. — №28 (1). — С. 50.*
4. *Зайчиков А.Ш., Чурилов Л.П. Основы патохимии. — 2-е изд. Т. 2. — С.-Пб: Элби, 2001. — С. 252-253.*
5. *Зайчиков А.Ш., Чурилов Л.П. Основы патохимии. — 2-е изд. Т. 2. — С.-Пб: Элби, 2001. — С. 255-261.*
6. *Корсун В.Ф.//Мир медицины и лекарственных растений. — 2000. — №3-4 (11-12). — С. 32-36.*
7. *Липсон В.В., Полторак В.В., Горбенко Н.И. //Хим.-фарм. журн. — 1997. — №11. — С. 5-9.*
8. *Машковский М.Д. Лекарственные средства. — В 2-х т. Т. 2. 13-е изд. — М., С.-Пб, К.: Новая волна, 2000. — С. 22.*
9. *Малашхия Ю.А., Иванидзе Л.А., Сехниашвили З.Ш. и др. //Intern. J. on Immunorehabilit. — 1997. — №6. — С. 171-173.*
10. *Полторак В.В., Горбенко Н.І. //Клінічна фармація. — 1999. — Т. 3, №1. — С. 16-19.*
11. *Соединения сульфонилмочевины //Мед. марк. — 1995. — №20. — С. 2-3.*
12. *Скрининг на сахарный диабет и лечение сахарного диабета //Мед. марк. — 1997. — №27. — С. 60.*
13. *Современная концепция пероральной фармакотерапии сахарного диабета и его сосудистых осложнений //Клінічна фармация. — 1999. — Т. 3, №2. — С. 31-35.*
14. *Строев Ю.И. Болезни эндокринной системы. В кн.: Подростковая медицина: руководство для врачей / Ред. Л.И.Левина. — С.-Пб: Спецлит, 1999. — С. 436-469.*
15. *Ceriello A. //Diabetic Medicine. — 1998. — Vol. 15, №3. — P. 188-193.*
16. *Dunn C.D., Peters D.H. //Drugs. — 1995. — Vol. 49, №5. — P. 718-721.*
17. *Faller D.V. //Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. — 1999. — Vol. 26, Suppl. 1. — P. 68-75.*
18. *Fuhlendorff J., Rorsman P., Kofod H. et al. //Diabetes. — 1998. — Vol. 47, №3. — P. 345-351.*
19. *Gorbenko N., Poltorack V., Gladkikh A. et al. //Diabetol. — 1998. — Vol. 41, Suppl. 1. — P. 232.*
20. *Lavin N. Manual of Endocrinology and Metabolism. — 2nd ed. — Boston, New York: Liffle, Brown and Company, 1994. — 714 p.*
21. *Malaisse W. J. //Horm. Metab. Res. — 1995. — Vol. 27, №3. — P. 263-266.*
22. *Mendall M.A., Patel P., Ballam L. et al.//Br. Med. J. — 1996. — Vol. 312. — P. 986-993.*
23. *Perriello G. //Diabetes Metab. Rev. — 1995. — Vol. 11, Suppl. 1. — P. 51-56.*
24. *Peterson D.L., Hall J., Rasmussen S.J. et al. //Pathol. — 1998. — Vol. 30. — P. 163-167.*
25. *Taylor T.N. //J. of Res. in Pharmaceutical Economics. — 1998. — Vol. 9, №1. — P. 33-45.*
26. *The World Book Encyclopedia. — Vol. 1. A. — Chicago, London, Sydney, Toronto: World Book Inc., 1994. — 1004 p.*
27. *Wojcicki J., Sulikowski T., Wojcicki M. et al. //Chem. Abs. — 1995. — Vol. 123. — P. 26.*

Адреса для листування: 61002, м. Харків,
вул. Пушкінська, 53. Тел. (057)706-30-63.
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 21.01.2004 р.