ВПЛИВ АМІНОЦУКРІВ ТА ЇХ КОМБІНАЦІЙ З ДИКЛОФЕНАКОМ НАТРІЮ НА БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН НА ТЛІ МЕМБРАНОЗНОЇ НЕФРОПАТІЇ

С.К.Шебеко, І.А.Зупанець

Національний фармацевтичний університет

Ключові слова: мембранопротектори; аміноцукри; диклофенак натрію; біохімічні показники; адріаміцинова нефропатія

Відомо, що розвиток запально-деструктивних захворювань нирок супроводжується значними біохімічними змінами у внутрішньому середовищі організму, що вірогідно відображають перебіг патології. У роботі наведені результати фармакологічного вивчення засобів з вираженими мембранопротекторними та антиоксидантними властивостями на моделі адріаміцинової нефропатії у щурів. У рамках дослідження було визначено вплив на біохімічні показники крові лабораторних тварин таких субстанцій та експериментальних комбінацій, як глюкозаміну гідрохлорид, глюкозаміну сульфат, N-ацетилглюкозамін, глюкозаміну пентаацетат та комбінації глюкозаміну гідрохлориду і N-ацетилглюкозаміну з диклофенаком натрію. Результати експерименту свідчать про те, що у порівнянні з контрольними препаратами (диклофенаком натрію, преднізолоном, фраксипарином) досліджувані засоби вірогідно нормалізують показники азотистого та білкового обміну, швидкості клубочкової фільтрації, а також процесів вільнорадикального окиснення. Подібний комплекс фармакологічної активності взагалі може бути охарактеризований як нефропротекторний і найбільше виражений у глюкозаміну гідрохлориду, N-ацетилглюкозаміну та їх комбінацій з диклофенаком натрію.

За останні десятиріччя значно розширилися уявлення про механізми розвитку гломерулонефритів (ГН). Науковцями накопичено велику кількість даних, які підтверджують вагому роль мембранодеструктивних процесів у патогенезі вказаної патології. Порушення структурно-функціональної організації базальної мембрани (БМ), в першу чергу, пов'язують з активацією вільнорадикальних та аутоімунних процесів і ушкодженням її захисного шару, утвореного глікозаміногліканами (ГАГ) [2, 5, 15, 18]. Про це свідчить достовірне підвищення концентрації ГАГ та їх мономерів у сироватці крові та сечі хворих на хронічні ГН, яке є результатом запально-деструктивних процесів [6]. Також слід відмітити характерні біохімічні зміни в організмі хворих, основними з яких є порушення азотистого та білкового обмінів, що проявляється збільшенням вмісту у сироватці крові залишкового азоту (сечовини, креатиніну), зниженням концентрації загального білка, в першу чергу, за рахунок альбуміну та, відповідно, зменшенням співвідношення альбумінів і глобулінів [19]. По-друге, відмічається підвищення вмісту продуктів ПОЛ — малонового діальдегіду, дієнових кон'югатів, відновленого глутатіону та ін. [5].

Відомо, що саме присутність О-сульфатованих та N-ацетильованих похідних аміноцукрів у складі захисного шару БМ нирок обумовлює наявність негативного заряду на її поверхні, який запобігає розвитку протеїнурії та явищ гіперкоагуляції в капілярах нефронів, що неминуче виникають при розвитку захворювання, тобто сприяє нефропротекторній дії [11, 13, 16]. Таким чином, аміноцукри у складі глікозаміногліканів БМ можна вважати одним із факторів ниркової селективної проникності [18]. Також слід відмітити, що поверхневий шар ГАГ базальної мембрани приховує її антигенні зони та перешкоджає розвитку каскаду аутоімунних реакцій, які лежать у патогенезі ГН [11, 15].

У зв'язку з цим застосування засобів, що діють як захисні агенти стосовно БМ нирок та усувають дефіцит кислих гексозамінів і, таким чином, нівелюють негативні біохімічні зміни в організмі хворого, повинно займати одне з перших місць у терапії ГН. До числа речовин, потенційно придатних для цієї мети, можна віднести аміноцукор глюкозамін (ГА) та деякі його похідні, які мають значну мембранопротекторну, антиоксидантну дію та є природними метаболітами людського організму

С.К.Шебеко — аспірант, асистент кафедри клінічної фармакології з фармацевтичною опікою Національного фармацевтичного університету (м. Харків)

[1]. Це безпосередньо підтверджується позитивними клінічними результатами застосування препаратів з групи ГАГ (сулодексид) у лікуванні хворих на ГН та ниркову недостатність [10, 12].

Також, на наш погляд, доцільним є використання з цією метою комбінацій аміноцукрів з НПЗП, наприклад, диклофенаком натрію (ДН), який не тільки вважається "золотим стандартом" цієї фармакологічної групи за співвідношенням клінічної ефективності та безпеки, але й чинить значно менший вплив на нирки, ніж інші "класичні" протизапальні засоби [8, 9, 17]. При умові нівелювання побічних ефектів НПЗП шляхом поєднання їх з аміноцукрами в одній лікарській формі можна отримати перспективний препарат нефропротекторної дії, що буде поєднувати властивості високоефективного мембранопротектора та антифлогістика і, таким чином, буде повністю відповідати патогенетично обгрунтованим напрямкам терапії ГН. Це частково підтверджується попередніми дослідженнями, які свідчать про те, що комбіноване застосування аміноцукру глюкозаміну гідрохлориду з диклофенаком натрію на моделі карагенінового набряку у мишей приводить до потенціювання протизапального ефекту останнього. Це дозволяє знизити ефективну дозу ДН майже вдвічі при збереженні високого рівня фармакологічної активності [1].

Виходячи з вищенаведеного, для досліджень були відібрані такі субстанції та експериментальні комбінації, як глюкозаміну гідрохлорид, глюкозаміну сульфат, N-ацетилглюкозамін, глюкозаміну пентаацетат та комбінації глюкозаміну гідрохлориду і N-ацетилглюкозаміну з диклофенаком натрію з метою вивчення їх впливу на біохімічні показники в умовах моделювання мембранозної нефропатії у лабораторних щурів.

Матеріали та методи

Експериментальні дослідження виконані на 120 білих нелінійних щурах масою 175-185 г, які утримувались на стандартному харчовому раціоні віварію при вільному доступі до питної води, постійній вологості та температурному режимі. Мембранозну нефропатію відтворювали шляхом внутрішньоочеревинного введення адріаміцину (Sigma, США) в дозі 10 мг/кг і концентрації 1 мг/мл [2].

Всі тварини були розділені на 12 експериментальних груп по 10 щурів у кожній: інтактні; контрольні тварини з нефропатією; тварини, які на тлі нефропатії отримували ГА гідрохлорид, ГА сульфат, N-ацетилГА, ГА пентаацетат в умовно терапевтичних дозах 50 мг/кг, комбінації ГА гідрохлориду та N-ацетилГА з ДН (8:1) в дозах 4 мг/кг по ДН ($ЕД_{50}$ за протизапальною активністю) [1] та препарати порівняння ДН в дозах 4 мг/кг (для порівняння з комбінаціями) та 8 мг/кг, преднізолон у дозі 1,9 мг/кг ($ЕД_{50}$ за протизапальною активністю), а також фраксипарин у дозі 170 ОД/кг (середня терапевтична доза, перерахована за Ю.С.Риболовлевим). Досліджувані препарати вводили 1 раз на добу протягом трьох тижнів, починаючи з першого дня експерименту.

Функціональний стан нирок та ступінь біохімічних змін в організмі щурів оцінювали наступними методами. На другий та третій тиждень експерименту у тварин визначали спонтанний добовий діурез за допомогою індивідуальних метаболітних клітин, після чого їх негайно виводили з досліду по 5 особин з кожної групи (з дотриманням міжнародних біоетичних вимог роботи з тваринами), з метою отримання сироватки крові та паренхіми нирок для біохімічних досліджень. Далі за допомогою біохімічних наборів "Lachema" (Чехія) визначали такі показники, як сечовина крові (діацетилмонооксимним методом), креатинін крові та сечі (за реакцією з пікриновою кислотою), загальний білок (біуретовим методом), вміст альбуміну (за реакцією з бромкрезоловим зеленим) [3]. Активність вільнорадикальних процесів визначали за вмістом ТБК-чутливих речовин як у сироватці крові, так і у паренхімі нирок за допомогою стандартної спектрофотометричної методики за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [7].

Швидкість клубочкової фільтрації (ШКФ) оцінювали за кліренсом ендогенного креатиніну, який розраховували за формулою:

$$C_{cr} = U_{cr} \cdot V / P_{cr},$$

де: U_{cr} — концентрація креатиніну в сечі;
P_{cr} — концентрація креатиніну в плазмі крові;
V — добова кількість сечі [2].

Одержані результати оброблялись методами варіаційної статистики з використанням критеріїв Фішера-Стьюдента за допомогою комп'ютерних програм [4].

Результати та їх обговорення

Результати дослідження динаміки біохімічних показників у лабораторних тварин під впливом експериментальної терапії на тлі мембранозної нефропатії наведені у таблиці та на рисунку. На другий тиждень розвитку патології у щурів контрольної групи вже почали проявлятись вірогідні зміни у показниках азотистого та білкового обмінів у порівнянні з інтактом, які через тиждень досягали ще більших значень. Так, рівень сечовини та креатиніну крові зріс більш ніж у 2 та у 1,2 рази відповідно (таблиця); вміст загального білка у сироватці крові зменшився більш ніж у 1,3 рази переважно за рахунок альбумінів, відсоткове співвідношення яких упало втричі, що пояснюється альбумінуричним характером протеїнурії. Особливої уваги заслуговує ШКФ, визначена за кліренсом креатиніну, як показник, що безпосередньо характеризує функціональний стан нирок. У контрольній групі вона була вірогідно нижчою у порівнянні з інтактом вже на другий тиждень і наприкінці третього тижня ця різниця досягла 60%. Описані вище зміни показників залишкового азоту та ШКФ свідчать про виникнення у контрольних щурів ниркової недостатності.

Таблиця

Динаміка деяких біохімічних показників щурів з мембранозною нефропатією під впливом експериментальної терапії (n=120)

Умови досліду	Термін дослідду, тиждень	Сечовина крові, ммоль/л	Креатинін крові, мкмоль/л	Креатинін сечі, ммоль/л	Загальний білок, г/л	Альбумін, %	ШКФ, мл/доба
1 група (інтакт)	вихідні дані	4,28±0,18	61,80±1,70	4,21±0,21	72,04±2,69	34,33±1,16	398,7±18,1
2 група (контроль)	2	7,78±0,45**	65,04±3,37	2,16±0,19**	64,80±2,43	24,68±1,93**	249,6±30,7**
	3	10,80±1,01**	75,11±5,21**	2,22±0,17**	54,06±3,28**	10,63±0,69**	153,3±11,4**
3 група (ГА г/х)	2	4,28±0,47***	67,72±1,76	4,21±0,13*	77,70±2,22***	37,32±1,45***	384,9±12,2*
	3	4,52±0,22***	59,49±3,74*	3,92±0,17*	70,48±1,70*	30,50±1,58*	415,6±40,8*
4 група (ГА сульфат)	2	5,55±0,85	61,47±3,91	3,16±0,28*	68,58±2,70	36,26±1,66***	313,4±19,4
	3	7,40±0,35*	68,10±3,83	2,48±0,12	58,28±2,65	17,62±1,52*	233,5±16,9*
5 група (N-ацетилГА)	2	4,23±0,33***	61,36±1,82	4,07±0,31*	76,50±3,13*	34,36±1,51***	394,8±26,0*
	3	4,42±0,28***	62,16±1,95*	4,17±0,27*	72,48±1,58***	31,40±1,45***	417,3±27,5*
6 група (ГА пентаацетат)	2	5,62±0,24	60,36±1,67	3,82±0,28*	71,21±1,93	29,82±1,43	370,9±25,5*
	3	6,27±0,52*	65,52±2,05	3,74±0,22*	67,82±2,99*	28,86±1,47*	388,7±41,0*
7 група (ГА г/х+ДН)	2	4,56±0,32*	65,50±2,12	4,08±0,30*	75,42±1,89***	33,70±1,38***	361,8±28,2*
	3	4,33±0,15***	62,34±1,99	4,02±0,10*	71,76±2,39*	33,14±2,17***	384,6±24,6*
8 група (N-ацГА+ДН)	2	4,71±0,21*	63,74±2,80	3,82±0,19*	73,22±1,52*	31,38±1,50*	347,2±14,2*
	3	4,63±0,13***	67,00±1,60	4,20±0,40*	69,76±2,42*	29,64±1,51*	376,8±35,0*
9 група (ДН 4 мг/кг)	2	6,81±0,36	67,93±3,32	2,76±0,21	62,48±1,50	26,30±1,12	244,5±24,4
	3	9,53±0,66	68,47±5,71	2,24±0,18	60,84±2,76	18,92±1,92*	207,3±8,2*
10 група (ДН 8 мг/кг)	2	6,51±0,36	65,22±2,67	3,07±0,32*	65,74±2,57	26,94±1,11	274,2±29,9
	3	8,36±0,69	68,86±1,73	3,00±0,14*	63,90±2,96	21,42±1,03*	258,7±24,3*
11 група (преднізолон)	2	6,71±0,29	65,45±2,5	3,03±0,13*	66,20±1,88	27,64±1,65	245,4±18,1
	3	9,47±0,75	72,28±2,90	2,68±0,15	64,34±2,13*	25,32±0,92*	171,3±13,3
12 група (фраксипарин)	2	5,61±0,14*	62,14±1,28	3,52±0,23*	68,56±1,91	27,40±0,70	414,3±34,0*
	3	7,56±0,21*	67,26±1,60	3,60±0,28*	65,68±1,98*	26,48±1,27*	450,2±42,2*

Примітки:
1) * — p≤0,05 відносно контрольної групи;
2) ** — p≤0,05 відносно інтакту;
3) *** — p≤0,05 відносно препаратів порівняння (групи 9-12).

В інших дослідних групах біохімічні зміни були виражені значно слабше у порівнянні з інтактними тваринами. Так, показники залишкового азоту крові у щурів, які отримували ГА гідрохлорид, N-ацетилГА та їх комбінації з ДН (групи 3, 5, 7 та 8) протягом експерименту, не мали вірогідних відмінностей від інтакту і були значно нижчими, ніж у контрольній групі. Слід відмітити динаміку вмісту сечовини крові у тварин вищезгаданих дослідних груп, де цей показник на третій тиждень розвитку патології був вірогідно нижчим, ніж у щурів, яких лікували препаратами порівняння. Аналогічна картина спостерігалась у показниках білкового обміну. За вмістом загального білка тварини 3 та 7 груп вірогідно перевищували показники препаратів порівняння на другий, а тварини 5 групи — на третій тиждень нефропатії. При цьому за відсотковим співвідношенням альбумінів щури, яких лікували N-ацетилГА та комбінацією ГА гідрохлориду з ДН, протягом експерименту мали вірогідну перевагу над групами тварин, які отримували препарати порівняння. Це свідчить про значно меншу втрату альбумінів із сечею у тварин вищезазначених груп, а отже, менший ступінь ураження ниркового фільтра. Показник ШКФ у тварин 3, 5, 6, 7 та 8 груп був на рівні інтактних щурів і на третій тиждень дослідження вірогідно перевищував його у всіх групах препаратів порівняння окрім фраксипарину, що пояснюється антикоагуляційними властивостями та особливостями хімічної структури низькомолекулярних гепаринів [12].

У механізмі розвитку мембранозної ниркової патології важливу роль відіграють процеси ПОЛ,

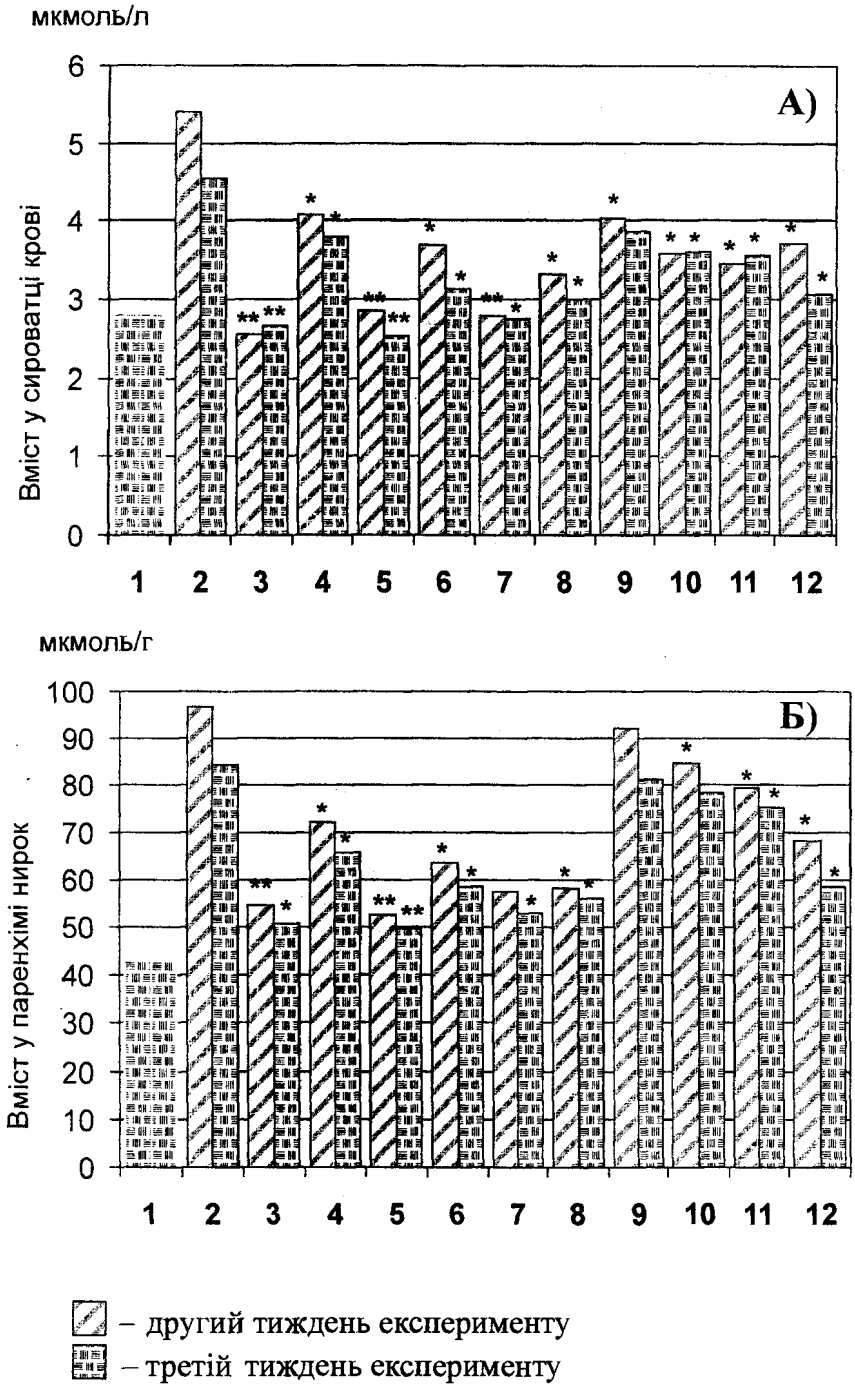

Рис. Вплив експериментальної терапії на вміст ТБК-чутливих речовин у сироватці крові (А) та паренхімі нирок (Б) лабораторних тварин на другий та третій тиждень нефропатії.

Примітки:

1) * — p≤0,05 відносно контрольної групи;

2) ** — p≤0,05 відносно препаратів порівняння (групи 9-12).

особливо у такій вільнорадикальній моделі, як адріаміцинова нефропатія [5, 14, 20]. Тому доцільним, на наш погляд, було вивчення впливу експериментальної терапії на такий високоінформативний показник ПОЛ, як вміст ТБК-чутливих речовин у сироватці крові та тканині нирок дослідних щурів. Аналіз даних, представлених на рисунку, свідчить про вірогідний ріст цих показників у тварин контрольної групи. Щури 3, 5, 7 та 8 груп, що отримували ГА гідрохлорид, N-ацетилГА та їх комбінації з ДН, мали на третій тиждень експерименту вміст ТБК-чутливих речовин вірогідно менший по відношенню до тварин, яких лікували препаратами порівняння.

Таким чином, результати проведеного експерименту свідчать про те, що у порівнянні з контрольними препаратами (диклофенаком натрію, преднізолоном, фраксипарином) досліджувані лікарські засоби вірогідно нормалізують функціональний стан нирок, показники азотистого, білкового обмінів та вільнорадикального окиснення, а також уповільнюють перебіг запально-деструктивних процесів на тлі мембранозної нефропатії у лабораторних щурів. Подібний комплекс фармакологічної активності взагалі може бути охарактеризований як нефропротекторний і найбільше виражений у таких з досліджуваних субстанцій та експериментальних композицій, як глюкозаміну гідрохлорид, N-ацетилглюкозамін та їх комбінацій з диклофенаком натрію.

ВИСНОВКИ

1. Аміноцукри глюкозаміну гідрохлориду, N-ацетилглюкозамін та їх комбінації з диклофенаком натрію в умовах розвитку мембранозної нефропатії нормалізують негативні біохімічні зміни в організмі лабораторних тварин.

2. Ці засоби є перспективними в плані подальшого поглибленого вивчення їх фармакологічної активності та механізмів дії з метою використання в клінічній практиці для лікування хворих на гломерулонефрити та ниркову недостатність.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Зупанець І.А., Попов С.Б., Отрішко І.А. //Клінічна фармація. — 2002. — Т. 6, №2. — С. 48-50.*
2. *Зупанець І.А., Шебеко С.К. //Клінічна фармація. — 2004. — Т. 8, №3. — С. 36-40.*
3. *Камышников В.С. Клинико-биохимическая лабораторная диагностика: Справ. — В 2-х т. Т. 1. — 2-е изд. — Мн: Интерпрессервис, 2003. — 495 с.*
4. *Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. — К.: Морион, 2000. — 320 с.*
5. *Остапова Т.С., Халанский А.А. //Укр. терапевт. журн. — 2000. — Т. 2, №1. — С. 58-62.*
6. *Павлов С.Б. //Клиническая медицина. — 1998. — Т. 76, №2. — С. 41-43.*
7. *Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. Современные методы в биохимии / Под ред. В.А.Ореховича. — М.: Медицина, 1977. — С. 44-46.*
8. *Berger R.G. //J. of the Amer. Acad. of Orthopedic Surgeons. — 1994. — Vol. 2, №5. — P. 255-260.*
9. *De Broe M.E., Elseviers M.M. //N. Engl. J. Med. — 1998. — Vol. 338. — P. 446-452.*
10. *Dedov I., Shestakova M., Vorontzov A., Palazzini E. //Nephrol. Dial. Transplant. — 1997. — Vol. 12. — P. 2295-2300.*
11. *Deen W.M., Lazzara M.J., Myers B.D. //Am. J. Physiol. Renal. Physiol. — 2001. — Vol. 281. — P. F579-F596.*
12. *Gambaro G., Van Der Woude F. //J. Am. Soc. Nephrol. — 2000. — Vol. 11. — P. 359-368.*
13. *Groffen A.J., Veerkamp J.H., Monnens L.A., Van Den Heuvel L.P. //Nephrol. Dial. Transplant. — 1999. — Vol. 14. — P. 2119-2129.*
14. *Hertzan-Levy Sh., Fish R., Skutelsky E. et al. //Nephron. — 2000. — Vol. 84, №4. — P. 354-361.*
15. *Mundel P., Shankland S. //J. Am. Soc. Nephrol. — 2002. — Vol. 13. — P. 3005-3015.*
16. *Pavenstadt H., Kriz W., Kretzler M. //Physiol. Rev. — 2003. — Vol. 83. — P. 253-307.*
17. *Pugliese F., Cinotti G. //Nephrol. Dial. Transplant. — 1997. — Vol. 12. — P. 386-388.*
18. *Raats I.C.J., Van Den Born J., Berden J.H.M. //Kidney Int. — 2000. — Vol. 57. — P. 385-400.*
19. *Remuzzi G., Bertani T. //N. Engl. J. Med. — 1998. — Vol. 339. — P. 1448-1456.*
20. *Xiaozhong L., Haitao Y., Xueguang Z. //Chin. Med. J. — 2003. — Vol. 116, №12. — P. 1831-1835.*

Адреса для листування: 61002, м. Харків,
вул. Пушкінська, 27. Тел. (057) 706-30-72.
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 10.05.2005 р.