

Гістологічні дослідження впливу спіроциклічного похідного оксіндолу на перебіг гострої ниркової недостатності у щурів

Н.А.Цубанова

Національний фармацевтичний університет
Харків, Україна

У статті наведені матеріали гістологічного дослідження впливу оригінального спіроциклічного похідного оксіндолу в дозі 5 мг/кг на перебіг ішемічної гострої ниркової недостатності у щурів. Оцінку інтенсивності патологічного процесу в нирках проводили на висоті розвитку патології. За даними гістологічних досліджень встановлено, що досліджувана сполука виявляє виражену нефропротекторну дію, яка перевищує активність препарату порівняння хофітолу в дозі 110 мг/кг. Встановлено, що досліджувана сполука значно зменшує дістрофічні та некротичні зміни в медулі, тоді як вплив хофітолу виявляється переважно на рівні кори нирки. Результати гістологічних досліджень свідчать про виражений нефропротекторний ефект нової сполуки.

Ключові слова: спіроциклічне похідне оксіндолу, нефропротекторний ефект, гістологічні дослідження

ВСТУП

За статистикою, на захворювання нирок різного ступеня тяжкості страждають 350 з кожних 10 тисяч людей [7]. При захворюваннях нирок 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, 9]. 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, 10, 11]. Тому пошук нових нефропротекторних засобів є актуальним. 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 [8].

Оскільки саме ішемія 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'-оксіндолу] (у подальшому сполуки 77, що була синтезована в НФаУ к.ф.н. Р.Г.Редькіним та проф. Л.А.Шемчуком) у попередніх дослідженнях встановлено значну антигіпоксичну активність [5].

Метою дослідження було вивчити можливу нефропротекторну дію нової сполуки на клітинному рівні в умовах гострої ниркової недостатності.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Морфологічний стан нирок щурів досліджували через добу після моделювання ішемічної ГНН. Тотальну ішемію обох нирок відтворювали під тіопентал-натрієвим наркозом, накладаючи спеціальні судинні затискачі на обидві ниркові ніжки на 75 хв. [4]. Тварини були розподілені на чотири групи: інтактний контроль (n=12); контрольна патологія – ГНН (n=12); щури з ГНН, які отримували сполуку

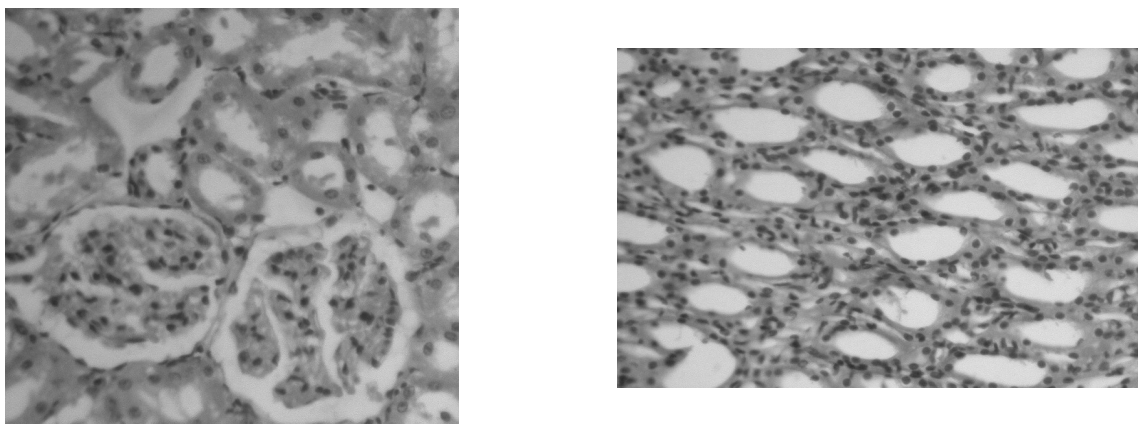


Рис. 1. Нирка інтактного щура: а — субкапсулярна зона кіркової речовини, видні ниркові тільця та звивисті каналці нефронів; б — нирковий сосочок. Нормальний стан нефротелію прямих каналців та епітелію збиральних трубочок. Гематоксилін-еозин. *250.

77 у дозі 5 мг/кг (n=12); щури з ГНН, які отримували препарат порівняння хофітол (таблетки, фірма «Laboratories Rosa-Phitopharma», Франція) у дозі 110 мг/кг (n=12). Забір матеріалу на морфологічне дослідження проведено через 24 год. після відновлення кровообігу в нирках. Морфологічні дослідження проведені на базі ЦНДЛ НФаУ за допомогою ст.н.с. Ю.Б.Лар'яновської.

Зразки правої нирки тварин всіх груп досліді фіксували в 10% розчині формаліну, зневоднювали в спиртах зростаючої міцності, заливали в целюдин-парафін. Мікроміровані зрізи фарбували гематоксиліном та еозином [1]. На зрізах крім оглядової мікроскопії проводили напівкількісну оцінку змін у різних відділах каналцевої системи нефронів: у зовніш-

ніх та внутрішніх зонах кори, інтермедіарній зоні, у мозковому шарі — оцінювали ступінь вираженості атрофії/сплощення, дезорганізації та некрозу нефротелію та епітелію. Підрахунок проводили в полі зору мікроскопа у 5 повторностях (окуляр 10, об'єктив 40). Результати оцінки представляли у балах: 0 балів — відсутність змін; 1 бал — слабкі зміни (зачіпають до 5-10% каналців); 2 бали — помірні зміни (зачіпають до 20% каналців); 3 бали — значні зміни (зачіпають до 40-50% каналців); 4 бали — дуже значні зміни (зачіпають до 90% каналців). Огляд мікропрепаратів проводили під мікроскопом Micros 400. Мікрофотографування мікроскопічних зображень здійснено цифровим фотоапаратом Nikon Cool Pix 4500. Фотознімки обробляли на комп'ютері Pentium

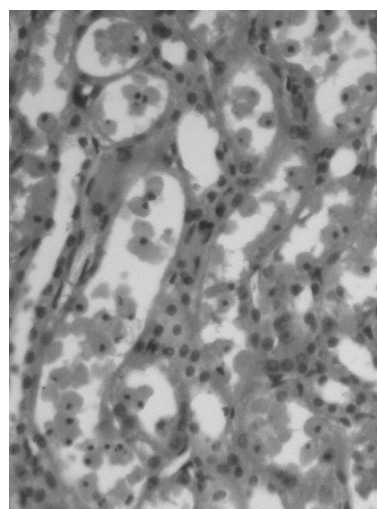
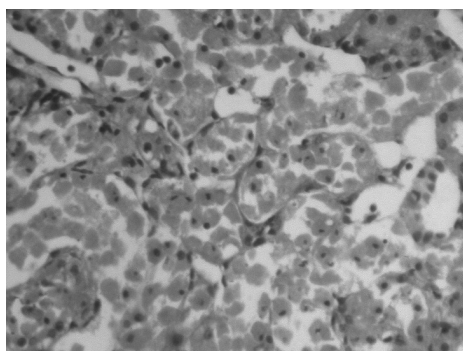


Рис. 2. Нирка щура з ГНН. Патологічні зміни проксимальних каналців внутрішньої (а, б) зони кіркової речовини: а — некроз нефротелію; б — втрата зв'язку нефротелію з основною базальною мембраною, вільне розташування в просвіті каналців. Гематоксилін-еозин. *250.

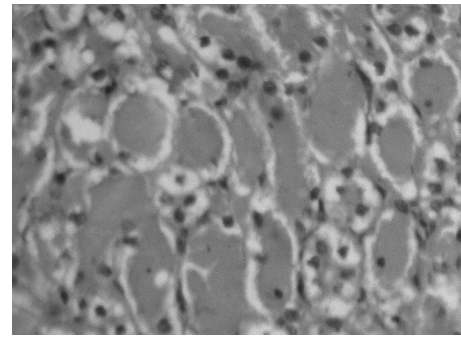
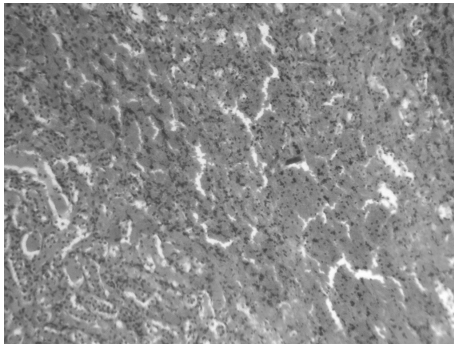


Рис. 3. Нирка щура з ГНН: а — крововиливи в мозковому шарі. Гематоксилін-еозин. *100; б — мозковий шар, дистрофія, некроз нефротелію, закупорка просвіту канальців. Гематоксилін-еозин. *250.

2,4GHz за допомогою програми Nikon View5. Статистичну обробку результатів проводили, застосовуючи непараметричний аналог однофакторного дисперсійного аналізу — критерій Крускала-Уоліса, після чого застосовували критерій Мана-Уїтні [3, 4]. Для визначення статистичних розбіжностей використовували стандартний пакет програм «Statistica 5».

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У тварин групи інтактного контролю при мікроскопічному дослідженні в кірковій речовині видні численні ниркові тільця, розташовані зі звичайною щільністю. Розмір основної маси ниркових тілець помірний. Рисунок капілярних петель, що утворюють клубочки ниркових тілець, достатньо виражений. Нефротелій не змінено, ядра чіткі. Просвіт канальців у межах норми. Стан внутрішньоорганичних кровоносних судин та стромы без особливостей. У нирковому сосочку епітелій збиральних трубочок звичайний (рис. 1).

У щурів групи контрольної патології спостерігали весь спектр патологічних змін канальцевих клітин нирок від дистрофії (набухання та вакуолізація цитоплазми) до некрозу. У просвіті канальців була еозинофільна маса, іноді з домішкою дегенеративно змінених ядер, яка виповнювала цей просвіт до повної обструкції. У деяких канальцях епітеліальні клітини втрачали зв'язок з основною базальною мембраною і вільно містилися в просвіті (рис. 2), у канальцях спостерігали наявність білкового ексудату.

Встановлено виражену конгенсію (прилив крові), крововиливи, плазмодіapedез у мозковому шарі тварин групи контрольної патології (рис. 3). Нефротелій прямих канальців та епітелій, що вистеляв стінки збиральних трубочок, у стані дистрофії, атрофії (виражене сплющення) та некрозу. Просвіт канальців, особливо в наближених до інтермедіарної зони, доволі часто обтуровано щільною еозинофільною масою (рис. 3).

Сполука 77 сприяла відновленню кровообігу в ниркових артеріях та зменшенню патологічних змін у нирковій паренхімі у 70% тварин цієї групи. Дезорганізація та некроз

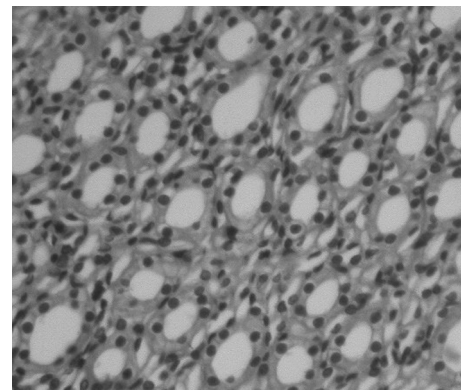
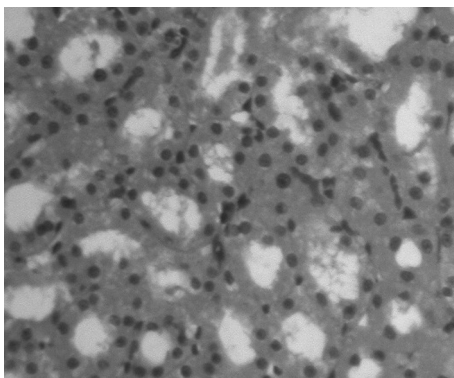


Рис. 4. Нирка щура з ГНН, якому вводили сполуку 77: а — стан проксимальних канальців внутрішньої зони кіркової речовини; незначне набухання нефротелію; б — ділянка ниркового сосочка; вакуолізація епітелію збиральних трубочок; просвіт вільний. Гематоксилін-еозин. *250.

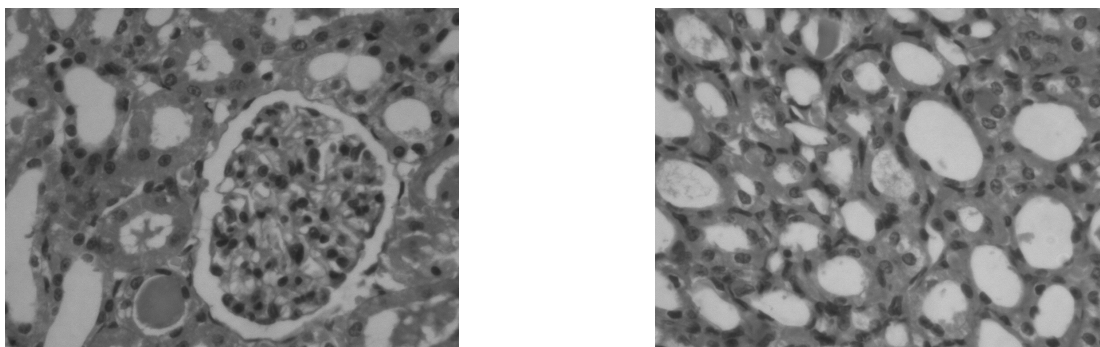


Рис. 5. Нирка щура з ГНН, якому вводили сполуку 77: а – ниркове тільце не змінене, звивисті каналці переважно в нормальному стані; б – стан прямих каналців та збиральних трубочок мозкового шару наближений до норми. Гематоксилін-еозин. *250.

нефротелію проксимальних частин каналців нефронів у зовнішній зоні кіркової речовини дуже незначний. Зберігалоя набухання нефротелію. У внутрішній та інтермедіарній зонах кіркової речовини нефротелій основної маси проксимальних частин каналців, висхідної частини петлі Генле лише з вираженим набуханням без ознак некрозу та дезорганізації. Просвіт каналців здебільше широкий, вільний (рис. 4).

Ниркові тільця нормального вигляду, капілярні петлі клубочків достатньо повнокровні. Кровоносні судини паренхіми місцями не видні, місцями поширені та повнокровні, але без крововиливів навколо. У мозковому шарі прямі артеріоли помірно повнокровні, явищ крововиливів, плазмодіapedезу не встановлено. Нефротелій прямих каналців та епітелій збиральних трубочок доволі часто в тій чи іншій мірі сплюснений, просвіт каналців та трубочок широкий, вільний. Іноді видна невиражена вакуолізація клітин (рис. 5). Збиральні

трубочки ниркового сосочка в аналогічному стані (рис. 4).

Введення хофітолу на фоні ГНН сприяло суттєво меншій вираженості зменшення дистрофічно-некротичних змін нефротелію каналців проблемних зон ниркової паренхіми. При цьому у 50% тварин групи зміни носили більш дрібноосередкований, ніж у контрольній патології, характер, вони неоднаково позитивно зменшувалися одразу в різних зонах кори та мозкового шару. Так, наприклад, у корі стан каналців покращувався, а в мозковому шарі була виражена конгенсія та дистрофічні й некротичні зміни нефротелію та епітелію. У 50% тварин потужність патологічних змін нефротелію проксимальних частин каналців нефронів, висхідної частини петлі Генле, прямих каналців та епітелію збиральних трубочок, розлади кровообігу були на рівні контрольної патології (рис. 6).

З метою порівняння вираженості патологічного процесу проведена напівкількісна оцінка

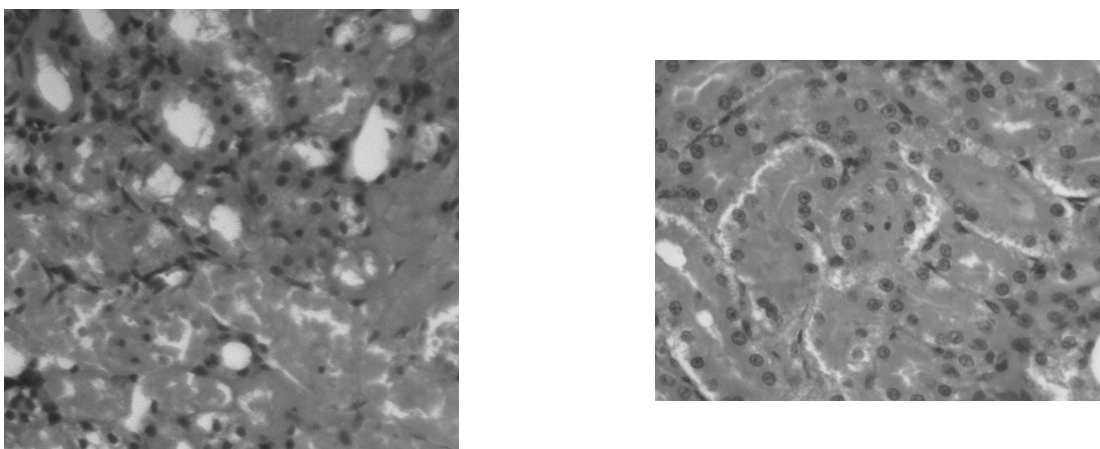


Рис. 6. Нирка щура, якому вводили хофітол: а – стан нефротелію проксимальних каналців внутрішньої зони кіркової речовини; некроз частини каналців (обведено); б – дезорганізація, закупорка просвіту каналців щільним детритом. Гематоксилін-еозин. *250.

ТАБЛИЦЯ 1

Напівкількісна оцінка вираженості патологічних змін нефротелію на тлі ГНН та вплив на показники сполуки 77 та хофітолу (бали)

Група		Патологічні зміни нефротелію, у балах		
		Дистрофія	Дезорганізація	Некроз
Інтактний контроль	Кора нирки	0,24±0,19	0,0±0,0	0,0±0,0
	Інтрамедіарна зона	0,64±0,22	0,0±0,0	0,0±0,0
	Мозковий шар	0,0±0,0	0,08±0,08	0,0±0,0
Контрольна патологія	Кора нирки	2,43±0,22*	1,28±0,16*	1,60±0,30*
	Інтрамедіарна зона	1,77±0,19*	1,67±0,22*	3,17±0,14*
	Мозковий шар	2,97±0,06*	1,80±0,14*	2,70±0,13*
Сполука 77, 5 мг/кг	Кора нирки	2,23±0,14*	0,90±0,16**	0,77±0,16**
	Інтрамедіарна зона	2,40±0,28**§	1,43±0,09**§	1,57±0,22**§
	Мозковий шар	0,80±0,15**§	0,80±0,10**§	0,53±0,16**§
Хофітол, 100 мг/кг	Кора нирки	1,77±0,21*	1,23±0,21*	1,00±0,15*
	Інтрамедіарна зона	1,30±0,27	2,27±0,24*	2,70±0,16**
	Мозковий шар	2,37±0,31**	1,43±0,20*	1,67±0,26**

Примітки: * – достовірні відмінності з показниками інтактного контролю ($p < 0,05$); # – достовірні відмінності з показниками контрольної патології ($p < 0,05$); § – достовірні відмінності з препаратом порівняння хофітолом ($p < 0,05$).

стану нефротелію проксимальних частин каналальців, нефронів різних зон кори та нефротелію прямих каналальців і епітелію збиральних трубочок мозкового шару (табл. 1).

Сполука 77 вірогідно знижує патологічні зміни в нирках (дистрофія, дезорганізація, некроз клітин) в усіх досліджуваних зонах (зовнішня, інтрамедіарна, мозкова). Найбільш виражений проєктивний ефект досліджуваної сполуки зафіксовано для інтрамедіарної зони та мозкового шару нирок, тобто прояви гострого гіпоксичного ураження переважно залишаються на рівні кори нирки. На відміну від хофітолу, де деструктивні наслідки ішемії, залишалися здебільшого на рівні інтрамедіарної зони та мозкового шару нирки, як і у тварин групи контрольної патології.

ВИСНОВКИ

На моделі гострої ниркової недостатності сполука 77 виявляє потужну нефропротекторну дію, суттєво знижуючи патологічні прояви в системі каналальців нефронів, особливо в проксимальній частини та у висхідній петлі Генле, зменшує вираженість ускладнень з боку порушеного кровообігу. За даними гістологічного дослідження, нефропротекторний ефект сполуки 77 у дозі 5 мг/кг перевищує активність хофітолу в дозі 110 мг/кг.

ЛІТЕРАТУРА

1. Меркулов Г.А. Курс патологической техники. – Л.: Медицина, 1969. – 424 с.

2. Иванов Д.Д. Гостра нирковая недостатность // Острые и неотложные состояния в практике врача. – №1 (3). – 2007. – С. 4-9.

3. Компендиум 2009 – лекарственные препараты / Под ред. В.Н.Коваленко, А.П.Викторова. – К.: МОРИОН, 2009. – С. 1575-1576.

4. Методи експериментального моделювання ураження нирок для фармакологічних досліджень / С.Ю.Штриголь, В.М.Лісовий, І.А.Зупанець [та ін.]. – Київ, 2009. – 48 с.

5. Пат. 87952 Україна, МПК C07D 209/04, 209/96, 311/96, 405/02, 491/20, A61K 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 / Редькін Р.Г., Цубанова Н.А., Черних В.П.; заявник та патентовласник НФаУ.-200815044; заявл.26.12.2008; опубл. 25.08.2009, Бюл. № 16.

6. Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury // J. Am. Soc. Nefrol. – 2006. – Vol. 17. – №6. – P. 1503-1520.

7. Ho K.M., Sheridan D.J. Meta-analysis of frusemide to prevent or treat acute renal failure // Brit. Medical J. – 2006. – Vol. 333 (7565) – P. 420-425.

8. Singh D., Chopra K. The effect of naringin, a bioflavonoid on ischemia-reperfusion induced renal injury in rats // Pharmacol. Res. – 2004. – Vol. 50. – №2. – P. 187-193.

9. Uchino S., Bellomo R., Goldsmith D. et al. An assessment of the RIFLE criteria for acute renal failure in hospitalized patients // Crit. Care Med. – 2006. – Vol. 34. – P. 1913-1917.

10. Webb S., Dobb G. ARF, ATN or AKI? It's now acute kidney injury // Anaesthesia and Intensive Care. – 2007. – №35 (6). – P. 843-844.

11. Weisberg L.S. Management of severe hyperkalemia // Crit. Care Med. – 2008. – №36 (12). – P. 3246-3251.

Н.А.Цубанова. Гистологические исследования влияния спироциклического производного оксиндола на течение острой почечной недостаточности у крыс. Харьков, Украина.

Ключевые слова: спироциклическое производное оксиндола, нефропротекторный эффект, гистологическое исследование.

В статье представлены материалы гистологического исследования влияния спироциклического производного оксиндола в дозе 5 мг/кг на течение ишемической острой почечной недостаточности у крыс. Оценку интенсивности патологического процесса в почках проводили на высоте развития патологии.

По данным гистологических исследований установлено, что изучаемое соединение проявляет выраженное нефропротекторное действие, которое превышает активность препарата сравнения хофитола в дозе 110 мг/кг. Установлено, что сполука 77 значительно уменьшает дистрофические и некротические изменения в медуле, тогда как влияние хофитола проявляется преимущественно на уровне коры почки.

N.A.Tsubanova. Histology research of properties of spirocyclic oxindolic derivatives on the model of ischemic acute renal failure.

Key words: of spirocyclic oxindolic derivative, nephroprotective effect, histology research.

In article presented The results of histology research of spirocyclic oxindolic derivative in doses 5 mg/kg on the model of ischemic acute renal failure in rats. The estimation of intensity of pathological process in kidney carried out at the peak of the pathology evolutions. The results of histology research, it has been established that the tested substances noted nephroprotective properties and has more significant nephroprotective activity that preparation of comparison Hofitol in doses 110 mg/kg. It has been established that substances 77 considerably diminishes dystrophy and necrotizing changes in cerebral layer, while influence of Hofitol shows up advantage activity at the level of crust layer of kidney.

Надійшла до редакції 15.12.2011 р.