

О.М. Філінська, С.В. Яблонська, Є.А. Сластья,
В.К. Рибальченко

ПОРУШЕННЯ БІОХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ СИРОВАТКИ КРОВІ ТА СЕЧІ ПРИ СУБХРОНІЧНОМУ ІНТРАГАСТРАЛЬНОМУ ВВЕДЕННІ ЩУРАМ 7-ГІДРОКСИКУМАРИНУ

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, м. Київ

Кумарини та їх похідні входять до складу рослин і проявляють широкий спектр біологічної дії, багато з них використовуються у медичній практиці. Вони мають протипухлинну, проти-запальну, протитуберкульозну, антиоксидантну, діуретичну, фотосенсибілізуючу дію та пригнічують активність ВІЛ-1 протеази [1, 2, 3]. Біологічну активність кумаринів пов'язують з присутністю в структурі їх молекули декількох фармакофорних центрів, таких як лактонне кільце, фенольні гідроксили та подвійний зв'язок в 3,4-положеннях. Одним із похідних кумаринів є харчовий барвник 7-гідроксикумарин. Для оцінки фізіологічного стану організму тварин та людини використовують біохімічні показники сироватки крові та сечі. Ферментативні системи клітин, що каталізують ключові реакції клітинного метаболізму, першими реагують при дії екзогенних речовин на організм. Так, зміни активності аланінаміно-трансферази (АлАТ) в сироватці крові більш специфічні при захворюваннях печінки, аспаратаміно-трансферази (АсАТ) — печінки, серця, скелетних м'язів, лактатдегідрогенази (ЛДГ) — печінки, серцевих м'язів, нирок, скелетних м'язів, лужної фосфатази (ЛФ) — кісток, гепатобіліарної системи, бронхів [4, 5]. Для оцінки основного та вуглеводного обмінів основними показниками є зміни вмісту загального білку, альбуміну, глюкози, сечовини та креатиніну. Для оцінки ліпідного обміну — загального холестеролу і тригліцеридів та їх фракцій.

Метою роботи є дослідження

біохімічних показників сироватки крові (активність аланін- та аспаратамінотрансфераз, лактатдегідрогенази та лужної фосфатази, загального білка, глюкози, креатиніну, сечовини, хлоридів, тригліцеридів, холестерину, кальцію) та сечі (загального білка, рН, щільності, креатиніну, глюкози, сечовини, іонів хлориду) при субхронічному інтрагастральному введенні щурам 7-гідроксикумарину.

Матеріали та методи дослідження

Досліди проведено на білих нелінійних самцях щурів з початковою масою 100-120 г, що утримувалися на стандартному харчовому раціоні віварію. Експериментальні групи тварин формували методом випадкової вибірки з урахуванням маси тіла як визначального показника. Досліджувану речовину 7-гідроксикумарин розводили в дистильованій воді, вводили інтрагастрально за допомогою зонда щоденно вранці до годування тварин у дозах 50 мг/кг маси тіла, 200 мг/кг та 500 мг/кг протягом трьох місяців. П'ятій групі тварин (відновний період протягом місяця), що отримувала досліджувану речовину у дозі 500 мг/кг протягом трьох місяців, 7-гідроксикумарин не вводили. Контрольним тваринам у вищезазначений спосіб вводили дистильовану воду. Щоденно спостерігали за загальним станом тварин, споживанням корму та води. Щурів зважували щотижня.

Біохімічні показники визначали в сироватці крові, яку отримували центрифугуванням крові при 1500 g 10 хв. Активність лактатдегідрогенази (ЛДГ), лужної фосфатази (ЛФ),

вміст глюкози, хлоридів, сечовини, тригліцеридів визначали за допомогою наборів реактивів фірми PLIVA-Lachema (Чеська Республіка), активність аланін- (АлАТ) та аспаратамінотрансфераз (АсАТ) — "Реагент" (Україна), креатиніну, холестерину, кальцію — "Філісіт-Діагностика" (Україна). Кількість білка визначали за методом Лоурі [6]. Добову сечу тварин збирали відсаджуючи їх у камери для збору сечі, перед тим вводили інтрагастрально 5 мл дистильованої води. Сечу фільтрували та визначали в ній рН, щільність, білок, креатинін, глюкозу, хлориди та сечовину за допомогою зазначених наборів реактивів.

Статистичну обробку результатів провели за t-критерієм Ст'юдента. Для відповідних розрахунків використовували стандартний пакет програм статистичного аналізу Microsoft Excel. Вірогідною вважалась різниця, якщо значення $p \leq 0,05$.

Результати та їх обговорення

Після першого місяця впливу всіх досліджуваних доз 7-гідроксикумарину не було виявлено вірогідних змін активності ферментів сироватки крові. Але досліджувана сполука, починаючи вже з мінімальної дози 50 мг/кг, викликає дворазове зниження вмісту глюкози порівняно з контрольними значеннями ($4,33 \pm 0,36$ ммоль/л), що може свідчити про порушення функції підшлункової залози (гіперинсулінізм) та печінки [4, 5]. Під впливом 7-гідроксикумарину спостерігається і підвищення вмісту кальцію в сироватці: при дозі 50 мг/кг в 1,5 раза (в контрольній групі — $0,87 \pm 0,11$ ммоль/л), а при вищих концентраціях сполуки цей показник збільшується вдвічі. Збільшення в крові концентрації кальцію свідчить про порушення мінерального обміну, що спостерігається при підвищеній активності парашитовидної залози [4]. Після першого місяця введення 7-гідроксикумарину істотних змін в біохімічних показниках сечі щурів не виявлено.

Після другого місяця введення щурам 7-гідроксикумарину виявлено лише підвищення активності АлАТ в 1,5 раза (в контрольній групі — $1,59 \pm 0,15$ мкмоль/год · мл) при максимальній досліджуваній дозі, що може свідчити про порушення функції печінки [7]. Після три-

місячного впливу 7-гідроксикумарину (табл. 1) виявлено зміни біохімічних показників сироватки крові: активність АлАТ та лужної фосфатази зростає приблизно у 1,5 раза лише при максимальній досліджуваній дозі (500 мг/кг). Під впливом цієї ж дози зростає і вміст сечовини на 50%.

було зареєстровано зростання вмісту кальцію та зниження вмісту глюкози, як в першому місяці.

Найбільші зміни біохімічних показників сечі, як і крові, після введення 7-гідроксикумарину встановлено на третьому місяці досліджень (табл. 2). Виявлено зниження рівня рН сечі на 15% при максимально

центрації сечовини в сироватці та білка в сечі) та гепатобіліарної системи (підвищення активності АлАТ та ЛФ) [4-9]. За морфофункціональними дослідженнями стану печінки [10] встановлено, що 7-гідроксикумарин через три місяці впливу викликає у печінці шурів розвиток жирової дистрофії та пору-

Таблиця 1

Зміни біохімічних показників сироватки крові самців шурів після трьох місяців введення 7-гідроксикумарину

Показники	Концентрація речовини, мг/кг			
	Контроль	50 мг/кг	200 мг/кг	500 мг/кг
Білок, г/л	73,00±3,53	75,25±4,78	67,65±2,71	68,90±2,25
АлАт, мкмоль/год · мл	1,24±0,10	1,46±0,10	1,34±0,11	1,98±0,15*
АсАт, мкмоль/год · мл	2,06±0,20	2,42±0,20	2,13±0,05	2,30±0,07
ЛФ, мккат/л	4,19±0,44	4,40±0,37	4,82±0,21	6,49±0,59*
ЛДГ, мккат/л	6,72±1,29	7,78±1,75	7,18±1,80	8,92±1,43
Глюкоза, ммоль/л	3,43±0,66	3,11±0,48	3,25±0,52	2,37±0,32
Креатинін, мкмоль/л	84,96±3,22	92,04±4,07	91,33±3,05	92,75±1,64
Сечовина, ммоль/л	6,74±0,19	7,64±0,82	7,20±0,16	10,11±0,12*
Хлорид, ммоль/л	108,97±2,21	106,65±3,24	108,32±2,15	107,58±2,86
Тригліцериди, ммоль/л	1,14±0,15	1,00±0,06	1,11±0,10	1,12±0,12
Холестерин, ммоль/л	1,61±0,13	1,73±0,07	1,87±0,08	1,71±0,05
Са, ммоль/л	0,97±0,08	0,92±0,05	0,99±0,07	0,91±0,04

Примітка: * — $p < 0,05$ відносно контролю

Отже, найбільш виражені зміни біохімічних показників спостерігаються через три місяці введення 7-гідроксикумарину. Після введення речовини у дозі 500 мг/кг підвищується вміст сечовини, зростає активність АлАТ і ЛФ, що не спостерігається у попередні місяці. Після двох- та трьохмісячного введення досліджуваної речовини не

діючій дозі. Вміст білка в сечі самців підвищується в 3 рази, що може свідчити про певну дисфункцію нирок (протеїнурія) [8, 9].

Отримані дані свідчать, що трьохмісячний вплив 7-гідроксикумарину спричиняє найбільші зміни біохімічних показників сироватки крові та сечі, що є характерними для дисфункції нирок (збільшення кон-

центрації сечовини в сироватці та білка в сечі) та гепатобіліарної системи (підвищення активності АлАТ та ЛФ) [4-9].

Після місяця відновлення виявлено ті ж самі зміни біохімічних показників сироватки крові, що були встановлені після третього місяця (табл. 3). Так, у сироватці крові зареєстровано підвищений вміст сечовини та активності АлАТ та ЛФ, проте вміст глюкози в сироватці крові та білка у сечі повертається до

Таблиця 2

Зміни біохімічних показників сечі самців шурів після трьох місяців введення 7-гідроксикумарину

Показники	Концентрація речовини, мг/кг			
	Контроль	50 мг/кг	200 мг/кг	500 мг/кг
Білок, мг/мл	0,07±0,008	0,10±0,008*	0,19±0,009*	0,21±0,012*
рН	6,3±0,07	6,3±0,23	6,1±0,09	5,6±0,024*
Щільність, г/мл	1,03±0,01	1,01±0,01	1,02±0,00	1,03±0,01
Креатинін, мкмоль/л	1352,3±175,0	1355,0±115,1	1929,4±238,7	1849,0±297,9
Глюкоза, ммоль/л	0,31±0,03	0,41±0,04	0,30±0,03	0,31±0,06
Сечовина, ммоль/л	392,24±51,89	429,12±51,38	472,70±47,96	495,89±99,81
Хлорид, ммоль/л	46,00±3,87	36,28±10,00	55,33±3,47	51,50±5,12

Примітка: * — $p < 0,05$ відносно контролю

Таблиця 3

Зміни біохімічних показників сироватки крові самців щурів після місяця відновлення

Показники	Концентрація речовини, мг/кг	
	Контроль	500 мг/кг
Білок, г/л	77,55±3,31	75,10±3,16
АлАт, мкмоль/год · мл	1,39±0,08	1,90±0,11*
АсАт, мкмоль/год · мл	2,07±0,50	2,19±0,07
ЛФ, мккат/л	4,01±0,10	5,97±0,36*
ЛДГ, мккат/л	6,73±0,11	7,0±0,2
Глюкоза, ммоль/л	3,32±0,13	3,01±0,14
Креатинін, мкмоль/л	82,5±6,7	84,3±4,5
Сечовина, ммоль/л	9,15±0,54	15,07±0,78*
Хлорид, ммоль/л	109,43±1,51	110,32±2,34
Тригліцериди, ммоль/л	1,42±0,10	1,76±0,18
Холестерин, ммоль/л	1,62±0,14	1,73±0,2
Са, ммоль/л	0,88±0,05	0,86±0,08

Примітка: * — $p < 0,05$ відносно контролю

норми. Отже, у самців не відбулося повного відновлення функціонування нирок та печінки.

Таким чином, після першого місяця впливу 7-гідроксикумарин викликає зниження вмісту глюкози та підвищення вмісту кальцію починаючи з мінімальної досліджуваної дози 50 мг/кг. При подальшому введенні речовини ці показники відновлюються. Після другого міся-

ця досліджень при дозі 500 мг/кг підвищується активність АлАТ в сироватці крові у дозах 200 та 500 мг/кг. На третьому місяці, крім АлАТ, зростає активність ЛФ та сечовини, а також знижується значення рН сечі, підвищується вміст білка в сечі. Підвищення активності ЛФ не спостерігали у попередні місяці. Через три місяці, на відміну від попередніх місяців, не було виявлено

зростання вмісту кальцію та зниження глюкози. Вище перераховані зміни біохімічних показників сироватки крові щурів можуть свідчити про порушення функції нирок та дисфункцію гепатобілярної системи. Через місяць після відміни 7-гідроксикумарину у сироватці крові зареєстровано підвищення концентрації сечовини, АлАТ та ЛФ у самців. У сечі відновлюється вміст білка та значення рН. Після місяця відновлення показники крові щурів залишаються в межах фізіологічної норми.

Висновки

1. При субхронічному інтрагастральному введенні 7-гідроксикумарин чинить дозозалежну загальнотоксичну дію на організм щурів-самців з переважним ураженням печінки і нирок.
2. 7-Гідроксикумарин викликає підвищення активності АлАТ, ЛФ і вмісту сечовини лише при максимальній досліджуваній концентрації речовини — 500 мг/кг. Після відновлювального місячного періоду ці зміни майже зберігаються.
3. 7-Гідроксикумарин викликає зниження рН та вмісту хлоридів, підвищення вмісту білка у сечі щурів, що нормалізуються у відновлювальний період.

ЛИТЕРАТУРА

1. Willems H. Oral anticoagulant treatment with coumarin derivatives does not influence plasma homocysteine concentration / H. Willems, M. den Heijer, W. Gerrits [et al.] // *Europ. J. Inter. Med.* — 2007- Vol. 17, N 2. — P. 120-124.
2. Lunney E.A. A novel nonpeptide HIV-1 protease inhibitor: elucidation of binding mode and its application of the desing of related analogs / E.A. Lunney, S.E. Hagen, J.M. Domagala [et al.] // *J. Med. Chem.* — 1994. — V.37, №17. — P. 2664-2677.
3. Сараф А.С. Поиск новых противоаллергических соединений в ряду производных кумарина и изучение механизмов действия / А.С. Сараф, А.В. Симонян, Э.Т. Оганесян // *Эксперим. и клинич. фармакология.* — 1993. — Т. 56, № 2. — С. 47-50.
4. Клиническая биохимия / Под ред. В.А. Ткачука. — 2е изд., испр. и доп. — М.: "Гэотар-Мед". — 2004. — 512 с.
5. Маршалл В.Д. Клиническая биохимия / Маршалл В.Д. Пер.с англ. — М. СПб.: "Издательство БИНОМ"- "Невский диалект", 2000. — 368 с.
6. Lowry O.H. Protein measurement with the folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.I. Rosenbrougn, A.L. Farr, R.I. Randall // *J. Biol. Chem.* -1951. -Vol. 193. -P. 265-275.
7. Eraslan G. Effects of cypermethrin on some biochemical changes in rats: the protective role of propolis / G. Eraslan, M. Kanbur, S. Silici [et al.] // *Exp. Anim.* — 2008. — Vol. 57, N 5. — P. 453-460.
8. Soliman K.M. Effect of carnosine on gentamicin-induced nephrotoxicity / K.M. Soliman, M. Abdul-Hamid, A.I. Othman // *Med. Sci. Monit.* — 2007. — Vol. 13, N 3. — P. 73-83.
9. Scotti da Silva-Colombeli A. Analytical interferences of drugs in the chemical examination of urinary protein / A. Scotti da Silva-Colombeli, M. Falkenberg // *Clin. Biochem.* — 2007 — Vol.40, N 13-14. — P. 1074-1076.
10. Сластья Є.А. Вплив 7-гідроксикумарину на морфологію печінки та тонкого кишечника щурів / Є.А. Сластья, Н.О. Карпезо, І.В. Харчук, О.В.Линчак [та ін.] // *Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. Збір. наук. праць.* — 2007. — Вип. 3-4, № 78-79. — С. 50-56.

*О.М. Филинская, к.б.н., С.В. Яблонская, к.б.н.,
Е.А. Слатья, к.х.н., В.К. Рыбальченко, д.б.н.*

НАРУШЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СЫВОРОТКИ КРОВИ И МОЧИ ПРИ СУБХРОНИЧЕСКОМ ИНТРАГАСТРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ КРЫСАМ 7-ГИДРОКСИКУМАРИНА

Установлены изменения биохимических показателей сыворотки крови и мочи при субхроническом интрагастральном введении 7-гидроксикумарина в дозах 50, 200, 500 мг/кг. Это вещество повышает активность аланинаминотрансферазы, щелочной фосфатазы, содержание мочевины в сыворотке крови, а также понижает значение рН, повышает концентрацию белка в моче, что свидетельствует о нарушении функций почек и печени. После восстановительного периода не все показатели возвращаются к норме.

Ключевые слова: 7-гидроксикумарин, субхроника, показатели, кровь, моча, почки, печень

О.М. Filinska, S.V. Yablonska, E.A. Slastyia, V.K. Rybalchenko

ABNORMALITIES OF BLOOD AND URINE BIOCHEMICAL PARAMETERS OF RATS AFTER SUBCHRONIC TREATMENT WITH 7- HYDROXY-COUMARIN

Changes of blood and urine biochemical parameters after subchronic treatment with 7- hydroxycoumarin in dozes 50, 200, 500 mg/kg has been determined. This compound increases alanine aminotransferase activity, alkaline phosphatase activity, urea content in blood and reduces pH value and increases protein value in urine that indicates about abnormalities of liver and kidneys functions. After recovery period not all parameters have been normalized.

Key words: 7- hydroxycoumarin, subchronic, parameters, blood, urine, kidney, liver