

5. Stepanyuk GI, Ruda NV, Marincova NG, ta in. Ocinka spromozhnosti deyakih aminokislotovmisnih pohidnih 1,4-naftohinonu pidvishhuvati fizichnu vitrivalist' organizmu pri riznih temperaturnih rezhimah [Assessment of possibility amino acid derivates of the 1.4 naphthochinone for support of body endurance in different temperature conditions]. *Biomedical and Biosocial Anthropology*. 2009;13:166-169.
6. Ruda NV. Aktoprotekorna aktivnist' v ryadu novih aminokislotovmisnih pohidnih 1,4-naftohinonu [Actoprotective activity of the 1.4-naphthochinone new derivates]. *Visnik Vinnic'kogo nacional'nogo medichnogo universitetu*. 2009;13(2):382-385.
7. Yakovleva LV, Mishchenko OYa, Lar'yanov'ska YuB, ta in. Eksperimental'ne vivchennya novih adaptogennih zasobiv: metod. rek [Experimental research of new adaptogenic remedies: methodological recommendations]. Kiiiv, 2009.
8. Golovenko MYa. Eksperimental'ne vivchennya nootropnoi aktivnosti farmakologichnih spolkuk: Metodichni rekomendatsii [Experimental research of the nootropic activity of pharmacological remedies: methodological recommendations]. DFC MOZU. Kiiiv, 2002;18.
9. Gatsura VV. Metody pervichnogo farmakologicheskogo issledovaniya biologicheskii aktivnyh veshchestv [Methods of primary pharmacological research of biologically active agents]. Moskva, 1974;142.
10. Lapach SN, Chubenko AV, Babich PN. Statistika v nauke i biznese: Prakticheskoe rukovodstvo [Statistics in science and business: Practical guidance]. Kiev, 2002;640.
11. Stepanyuk GI, Ruda NV, Drachuk OP, ta in. Porivnyal'niy vpliv kalievoi soli 2-glicino-3-hlor-1,4-naftohinonu ta bemitilu na metabolichni procesi v organizmi shhuriv v umovah shhodennogo trenuvannja bigom u tretbani [Influence of the potassium salt 2-glicino-3-chlor-1,4-naphthochinone and bemitil on metabolism of rats in conditions of every day ran training in treadmill]. *Farmakologiya ta likars'ka toksikologiya*. 2011;2:62-66.

## Коррекция милдронатом морфофункционального состояния почек при доксорубициновой нефропатии

\*Ж. М. Гаина, Р. Б. Косуба

Department of Pharmacy, Bucovinian State Medical University  
2, Theatre Square, Chernivtsi, Ukraine

\*Corresponding author: janna1008@mail.ru. Manuscript received December 31, 2012; revised February 15, 2013

\*J. M. Gaina, R. B. Kosuba

### Correcting morphofunctional condition of kidneys by Mildronate at Doksorubicine nephropathy

The study has been made on white non-linear male rats weighing 150-170 gr. Three series of experiments were made: in the first one, the animals were injected with Doxorubicine (Ukraine, "Kievmedpreparat", 5 mg/kg, intramuscular, once every seven days, four times); in the second one, the animals were injected with mildronate (Latvia, "Grindex", 50 mg/kg, intraperitoneally, 28 days) against the background of Doxorubicine injection; in the third series (the control), water was injected into the animals (in similar volume) instead of medications. The regime of Doxorubicine injection chosen by the researchers has been used by scientists to simulate Doxorubicine cardiopathy. The function of the kidneys was studied 30 minutes after the last injection of the preparations against water loading (5% of the animals' body mass). On the 28-th day of the experiment, the kidneys were taken for morphogenetic investigations. Under the influence of Doxorubicine, the speed of glomerular filtration decreased, creatinine concentration in blood plasma increased, and expressed proteinuria combined with the reduction of sodium and potassium ions excreted with urine. Usage of Mildronate together with Doxorubicine in the injection course prevents nephrotoxic effects of Doxorubicine. The findings of morphohistologic studies of the kidneys corroborated nephroprotective properties of mildronate.

**Key words:** Mildronate, Doxorubicine nephropathy, rats.

### Реферат

Исследование проведено на белых нелинейных крысах-самцах массой 150-170 г. Проведено 3 серии опытов: в первой – животным вводили доксорубицин (Украина, «Киевмедпрепарат», 5 мг/кг, в/м, 1 раз в 7 дней, четырежды); во второй – животным вводили милдронат (Латвия, «Grindex», 50 мг/кг, в/брюшинно, 28 дней) на фоне введения доксорубицина; в третьей (контрольной) – животным вместо лекарственных средств (в аналогичном объёме) вводили воду для инъекций. Избранный нами режим введения доксорубицина исследователи используют для моделирования доксорубициновой кардиомиопатии. Функцию почек исследовали через 30 мин после последнего введения препаратов на фоне водной загрузки (5% от массы тела животных). На 28 сутки эксперимента выделяли почки для проведения морфогистологических исследований. Под влиянием доксорубицина уменьшилась скорость клубочковой фильтрации, возросла концентрация креатинина в плазме крови, выраженная протеинурия сочеталась с уменьшением экскреции ионов натрия и калия с мочой. Курсовое применение милдроната совместно с введением доксорубицина предупредило нефротоксические эффекты доксорубицина. Проведенные морфогистологические исследования почек подтвердили нефропротекторные свойства милдроната.

**Ключевые слова:** милдронат, доксорубициновая нефропатия, крысы.

### Введение

Поиск средств защиты организма от токсического действия противоопухолевых химиотерапевтических препаратов является актуальной научной проблемой. В последние годы к наиболее эффективным и часто применяемым противоопухолевым антибиотикам относятся

препараты антрациклинового ряда, в частности, доксорубицин (адриаамицин). Механизм его цитотоксического действия связан с ингибированием синтеза нуклеиновых кислот, нарушением синтеза РНК, связью с липидами клеточных мембран и нарушением транспорта ионов и функции клетки [6, 13]. Такой механизм действия док-

сорубицина способствует высокой антимиотической активности, однако, низкой избирательности действия, что сопровождается выраженными побочными реакциями.

Серьезным побочным эффектом при лечении доксорубицином является кардиотоксичность [6], а в последние годы доказано и его нефротоксическое действие [11]. Благодаря особенностям химического строения препарата в организме образуется большое количество супероксидных радикалов [13], что способствует развитию доксорубициновой нефропатии с повреждением всех структур почечного фильтра, и в первую очередь базальной мембраны [11, 12]. Для уменьшения токсического действия доксорубицина предлагают использовать разные препараты с антиоксидантными, мембранопротекторными, антиоксидантными свойствами [3].

Известно, что милдронат (МНН – мельдоний), как препарат коррекции метаболизма с цитопротекторными свойствами, улучшает метаболические процессы в клетках и уменьшает чувствительность тканей к гипоксии за счет блокады окисления жирных кислот и включения альтернативной системы образования энергии – окисление глюкозы [5]. Препарат успешно используют в кардиологической практике при заболеваниях сердечно-сосудистой системы (ИБС, ХСН) [8], а также для повышения работоспособности здоровых людей при физических и умственных нагрузках.

Выше изложенное позволило предположить рабочую гипотезу о возможном использовании милдроната в качестве мембранопротекторного средства для уменьшения нефротоксического действия доксорубицина, что и явилось целью настоящего исследования.

### Материал и методы

Исследование проведено на белых нелинейных крысах-самцах массой 150-170г. Проведено 3 серии опытов: в первой – животным вводили доксорубицин (Украина, «Киевмедпрепарат», 5 мг/кг, в/м, 1 раз в 7 дней, четырежды); во второй – животным вводили милдронат (Латвия, «Grindex», 50мг/кг, в/брюшинно, 28 дней) на фоне введения доксорубицина; в третьей (контрольной) – животным вместо лекарственных средств (в аналогичном объеме) вводили воду для инъекций. Избранный нами режим введения доксорубицина исследователи используют для моделирования доксорубициновой кардиомиопатии [3].

Функцию почек исследовали через 30 мин после последнего введения препаратов на фоне водной загрузки (5% от массы тела животных) [9]. После этого животных помещали в индивидуальные клетки и в течение 2 часов собирали мочу, в которой определяли содержание ионов натрия, калия, белка, креатинина. Расчетными методами определяли показатели, свидетельствующие о функциональном состоянии почек [10]. На 28 сутки эксперимента животных умерщвляли декапитацией под легкой эфирной анестезией и выделяли почки для проведения морфогистологических исследований. Материал фиксировали в течение 48 часов в 10% растворе нейтрально-

го формалина, затем проводили обезвоживание и после парафиновой заливки на санном микротоме делали серийные гистологические срезы толщиной 5 мкм. После депарафинизации срезы окрашивали гематоксилином и эозином и светлооптическими методами изучали в микроскопе ЛЮМАН–P8. Фотокопии изображения фиксировали цифровым фотоаппаратом.

При работе с животными соблюдали требования Европейской конвенции по защите животных (Страсбург, 1986) и методические рекомендации ГФЦ МЗ Украины [2]. Полученный цифровой материал обрабатывали методами статистического анализа. Вероятность разницы средних арифметических ( $\bar{x}$ ) определяли параметрическим методом с определением  $t$ -критерия Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

Курсовое применение доксорубицина вызвало изменения в показателях экскреторной, ионорегулирующей и кислотовыделительной функций почек. Скорость клубочковой фильтрации уменьшилась в 1,4 раза ( $p < 0,05$ ), в крови в 1,6 раза ( $p < 0,001$ ) возросла концентрация креатинина, свидетельствующая о гиперазотемии. В моче животных уменьшилась концентрация осмотически активных ионов. Экскреция ионов натрия достоверно уменьшилась в 1,8 раза, экскреция ионов калия – в 1,7 раза (таб. 1). При этом соотношение концентрации данных ионов в моче (натрий/калиевый коэффициент) не изменилось. Обращает на себя внимание выраженная протеинурия. Экскреция белка с мочой возросла в 10 раз (таб. 1), что может привести к значительной потере белка организмом. По сравнению с показателями контрольных животных увеличилась экскреция аммиака, титрованных кислот и произошел сдвиг рН мочи в щелочную сторону (таб. 1). Доксирубициновую протеинурию и другие проявления мочевого синдрома связывают с уменьшением в базальных мембранах клеток почечного эпителия макромолекул гликозамингликанов и гликопротеинов особенно гепарансульфата, который является фактором почечной проницаемости [11, 13].

Выявленные нами доказательства токсического влияния доксорубицина на показатели деятельности почки, по-видимому, обусловлены его повреждающим влиянием на мембранные структуры клеток тканей, в том числе базальных мембран нефроцитов. Некоторые авторы предлагают использовать модель доксорубициновой нефропатии как модель нефропатии минимальных изменений для проведения фармакологических скрининговых исследований в поисках средств, обладающих мембраностабилизирующим, цитопротекторным действием [4, 7].

Учитывая известные цитопротекторные свойства милдроната, в следующей серии экспериментов мы использовали милдронат с целью возможного предупреждения, или уменьшения отрицательного влияния доксорубицина на функцию почек. Как свидетельствуют представленные в таблице данные, сочетанное курсовое применение милдроната и доксорубицина значительно уменьшило нефротоксичность доксорубицина. Возросла концентрация ионов натрия и калия в моче. Экскре-

Таблица 1

**Влияние милдроната (50мг/кг) на функциональное состояние почек крыс при доксорубициновой нефропатии ( $\bar{x} \pm Sx$ ,  $n = 7$ )**

Показатели	Контроль	Доксорубицин	Доксорубицин + милдронат
Диурез, мл/2 часа,100,0	3,6 ± 0,25	3,5 ± 0,32	3,7±0,19
Концентрация ионов натрия в моче, ммоль/л	0,42 ± 0,191	0,25 ± 0,012 p < 0,001	0,66 ± 0,054 p < 0,01 p <sub>1</sub> < 0,01
Экскреция ионов натрия с мочой, мкмоль/2 часа/100,0	1,51 ± 0,173	0,85 ± 0,033 p < 0,001	2,43 ± 0,093 p < 0,001 p <sub>1</sub> < 0,01
Концентрация ионов калия в моче, ммоль/л	5,14 ± 0,571	3,16 ± 0,277 p < 0,001	7,78 ± 0,377 p < 0,05 p <sub>1</sub> < 0,01
Экскреция ионов калия с мочой, мкмоль/2 часа/100,0	18,46 ± 1,45	10,66 ± 0,244 p < 0,001	29,67 ± 1,686 p < 0,001 p <sub>1</sub> < 0,001
Клубочковая фильтрация, мкл/мин	439,21 ± 40,52	304,27 ± 25,57 p < 0,05	327,37 ± 48,24 p < 0,01
Концентрация креатинина в моче, ммоль/л	0,93 ± 0,01	1,08 ± 0,034 p < 0,01	0,94 ± 0,006 p <sub>1</sub> < 0,01
Концентрация креатинина в плазме крови, мкмоль/л	64,57 ± 1,959	103,33 ± 1,44 p < 0,001	73,6 ± 1,64 p < 0,05 p <sub>1</sub> < 0,001
Концентрация белка в моче мг/л.	0,003 ± 0,0003	0,03 ± 0,004 P < 0,001	0,003 ± 0,0005 p <sub>1</sub> < 0,001
Экскреция белка с мочой, мг/2 часа/100,0	0,011 ± 0,0003	0,11 ± 0,009 p < 0,001	0,012 ± 0,0019 p <sub>1</sub> < 0,001
pH мочи, ед.	6,78 ± 0,079	7,77 ± 0,055 p < 0,001	6,93 ± 0,031 p <sub>1</sub> < 0,001

**Примечание:** p – достоверность изменений относительно контроля, p<sub>1</sub> – достоверность изменений относительно доксорубицина.

ция ионов натрия увеличилась в 2,9 раза (p < 0,01), ионов калия – в 2,8 раза (p < 0,001), что превысило соответствующие показатели у контрольных животных в 1,6 раза (p < 0,001). Преобладало свойственное милдронату салуретическое действие. Нормализовалась и экскреция белка с мочой. Концентрация креатинина в плазме крови уменьшилась в 1,4 раза (p < 0,05), однако оставалась еще в 1,14 раза выше (p < 0,05) контрольного показателя. С возрастанием экскреции ионов водовода pH мочи уменьшилась до уровня контрольных животных.

Таким образом, совместное применение доксорубицина с милдронатом значительно уменьшило и предупредило токсические проявления доксорубицина на почки.

Проведенные морфогистологические исследования структуры почек животных, получавших доксорубицин, выявили изменения в извитых канальцах почек без нарушений структуры клубочкового аппарата. При этом, в отличие от группы контрольных животных (рис. 1), под влиянием доксорубицина у 18% эпителиальных клеток извитых канальцев наблюдались признаки гидропиче-

ского набухания (рис. 2). О способности доксорубицина вызывать деструктивные изменения в почках свидетельствуют и данные литературы [12].

Под влиянием милдроната количество эпителиальных клеток с признаками гидропического набухания в канальцах уменьшилось на 6% (рис. 3), что свидетельствует о защитном действии препарата на почки и служит морфологическим подтверждением корректирующего влияния милдроната на функциональное состояние почек при действии доксорубицина.

Кроме того, в предыдущих наших исследованиях [1] показано, что под влиянием милдроната восстанавливается нарушенное доксорубицином оксидантно-антиоксидантное равновесие в организме. В гомогенатах почек уменьшается содержание продуктов липопероксидации и окисленные модифицированные белки, наряду с активацией ферментов антирадикальной защиты, что является дополнительным подтверждением нефропротекторных свойств милдроната при доксорубициновой нефропатии.

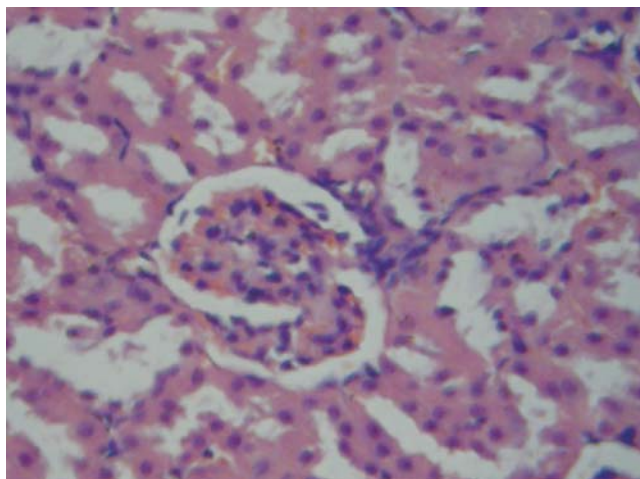


Рис. 1. Почка крысы (контроль). Гистоструктура ткани почки на уровне извитого канальца без видимых изменений. Отдельные эпителиальные клетки извитых канальцев с признаками гидропического набухания (менее 1%). Окраска гематоксилин-еозином. Об. 10<sup>x</sup>, Ок. 10<sup>x</sup>

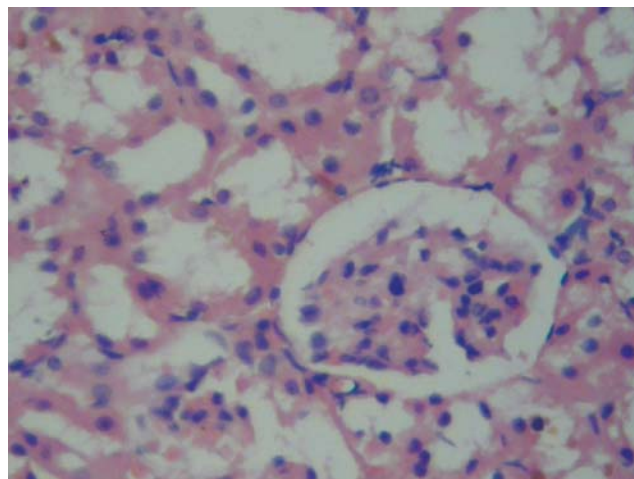


Рис. 2. Почка крысы (модель доксорубициновой нефропатии). Окраска гематоксилин-еозином. Об. 10<sup>x</sup>, Ок. 10<sup>x</sup>

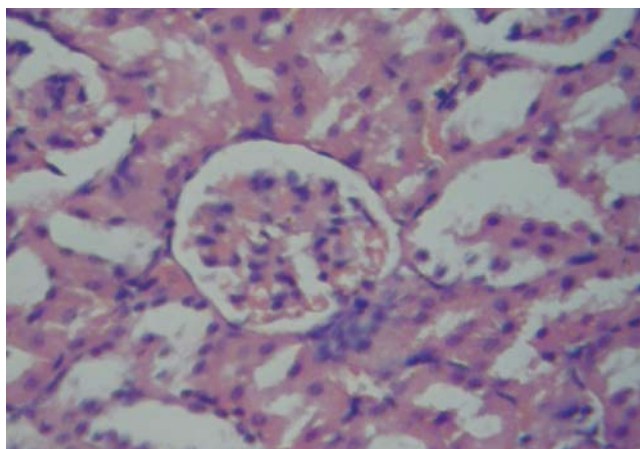


Рис. 3. Почка крысы (модель доксорубициновой нефропатии+милдронат). Окраска гематоксилин-еозином. Об. 10<sup>x</sup>, Ок. 10<sup>x</sup>

### Выводы

Результаты проведенных морфофункциональных исследований состояния почек животных свидетельствуют о том, что милдронат оказывает защитное действие на почки при доксорубициновой нефропатии и могут служить экспериментальным обоснованием целесообразности применения милдроната в качестве нефропротекторного средства в клинической практике.

### References

1. Gaïna ZhM, Kosuba RB, Yaremiy IN. Korriguval'nij vpliv mildronatu na pokazniki oksidantno-antioksidantnoi ravnovagi v organizmi shhuriv na tli toksichnoi dii doxorubicinu [Corrective influence of mildronate on indices of oxidant-antioxidant balance in rats in case of toxic action of doxorubicine]. *Medichna himiya*. 2012;14(1):56-60.
2. Doklinichni doslidzhennja likars'kih zasobiv (metodichni rekomendacii) [Preclinical research of medicinal remedies (methodologic recommen-

- dation)]. Za red. chl.-kor. AMN Ukraïni O. V. Stefanova. K.: Avicena, 2001;528.
3. Chekman IS, Trofimova TS, Mazur IA, ta in. Efektivnist' zastosuvannya tiotriazolinu za umov doxorubicinovoï kardiomiopatii [Efficacy of tiotriazoline use in doxorubicine cardiomiopathy]. *Zaporozhskij medicinskiy zhurnal*. 2010;12(5):207-210.
4. Zupanets IA, Shebeko SK. Modeljuvannya membranoznoi nefropatii u laboratornih tvarin dlja skringovih doslidzen' likars'kih preparativ membranoprotekornoï dii [Modeling of the membrane nephropathy in laboratory animals for scrining research of remedies with membrane protective action]. *Klinichna farmaciya*. 2004;8(3):36-40.
5. Kalvin'sh IYa. Mildronat – mehanizm dejstvija i perspektivy ego primenenija [Mildronat – the mechanism of action and prospect of its application]. Riga: izd-vo PAO «Grindeks», 2001;122.
6. Matyash MG, Kravchuk TL, Vysockaya VV, ta in. Inducirovannaja antraciklinami kardiotoxichnost': mehanizmy razvitija i klinicheskie pojavlenija. [Cardiotoxicity induced by antracyclines: mechanisms of development and clinical manifestations]. *Sibirskij onkologicheskij zhurnal*. 2008;30(6):67-74.
7. Shtriгол' SYu, Lisoviy VM, Zupanets IA, ta in. Metodi eksperimental'nogo modeljuvannya urazhennja nirok dlja farmakologichnih doslidzen' [Experimental methods of modeling of kidney diseases for pharmacological researches]. Metodichni rekomendacii. Kiïv, 2009;48.
8. Mihin VP, Pozdnyakova YuM, Hlebodarov FE, ta in. Mildronat v kardiologicheskoi praktike – itogi, novye napravlenija, perspektivy [Mildronat in cardiological practice – the results, the new directions, prospects]. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika*. 2012;11(1):95-101.
9. Natochin YuV, Kutina AV. Novyj podhod k integrativnoj funkcional'noj karakteristike pochek pri raznyh tipah diureza. [New approach to the integrative functional characteristic of kidneys at different types of diuresis]. *Nefrologiya*. 2009;13(3):19-23.
10. Ryabov SI, Natochin YuV. Funktsional'naya nefrologiya [Functional nephrology]. Spb.: Lan, 1997;304.
11. Saenko YuV, Shutin AM, Musina RH. K mehanizmu toksicheskogo dejstvija doxorubicina na pochki. [To the mechanism of toxic effect of doxorubicine on kidneys]. *Nefrologiya*. 2006;10(4):72-76.
12. Hertzan-Levy Sh, Fish R, Skutelsky E, et al. Glomerular basement membrane anionic sites in adriamycin nephropathy: effect of saline loading and nitric oxide modulation. *Nephron*. 2000;84(4):354-361.
13. Xiaozhong L, Haitao Y, Xueguang Z. Adriamycin increases podocyte permeability: evidence and molecular mechanism. *Chin. Med. J.* 2003;116(12):1831-1835.