На правах рукописи

Алтарева Анастасия Игоревна

ВЛИЯНИЕ КВЕРЦЕТИНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ НА ЭКСКРЕТОРНУЮ ФУНКЦИЮ ПОЧЕК В НОРМЕ И ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

3.3.6 – фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Самара – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:
Зайцева Елена Николаевна − доктор медицинских наук, доцент.

Официальные оппоненты:

Оковитый Сергей Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакологии и клинической фармакологии, заведующий кафедрой.

Шустов Евгений Борисович – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства», главный научный сотрудник.

Ведущая организация:
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «____» _____ 2025 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.158.02, созданного на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» (197022, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12) по адресу: 197022, Санкт-Петербург, Каменоостровский пр., д. 71.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12 и на сайте https://iemspb.ru/external/altareva/

Автореферат разослан «_____» _____ 202_ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук Мухин Валерий Николаевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности. Почка – многофункциональный жизненно важный парный орган, участвующий в поддержании водного и энергетического баланса, в синтезе ряда веществ, а также в удалении продуктов азотистого обмена и многих чужеродных веществ (Добросердов Д.А., и др., 2020; Дургалян Т.М., 2019). Сложность и опасность хронической болезни почек (ХБП) заключается в том, что клинические признаки заболевания появляются при поражении 65-80% почечной ткани, кроме того, комплексно поражаются другие органы и ткани (Короткова В.А., и др., 2021). Соответственно, ранняя диагностика и адекватное лечение почечной недостаточности может продлить жизнь и улучшить ее качество (Ахмедова Н.Ш., и др., 2022; Прокопенко Е.И., 2018; Шаробаро В.Е., 2021). Стремительный рост числа пациентов с нарушениями функций жизненно важных клиренсовых органов (почек и печени) – общемедицинская междисциплирная проблема, имеющая весомые социально-экономические последствия, такие как: резкое снижение качества жизни, высокая смертность пациентов, назначение дорогостоящего лечения, а в случае декомпенсации – гемодиализ и трансплантация органа (Айдаров З.А., 2020; Бабаев Ф.Г., и др., 2020; Басалай О.Н., и др., 2023; Кольчик Е.Ю., и др., 2020; Суханова Д.Д., и др., 2018).

Частота встречаемости ХБП и острого повреждения почек (ОПП) варьирует в разных регионах и обусловлена генетическими различиями, особенностями питания, образом жизни, экономическим уровнем развития страны (Айдаров З.А., 2020). По данным Всемирной организации здравоохранения, заболевания почек находятся на 12 месте, как причина стойкой утраты трудоспособности (Жмуров Д.В., и др., 2020; Котенко О.Н., и др., 2021). Научные исследования последних лет сообщают о 500 новых случаях ОПП на 1 млн населения в год, тогда как летальность от данного заболевания составляет 26-50%.

В настоящее время в практической медицине применяется множество медикаментозных схем для лечения острых и хронических нефропатий (Глизер, С.Л., и др., 2020; Дядык А.И., и др, 2020; Рашидова С.С., 2022; Koza Y., 2016). Однако лекарственные средства, применяемые для лечения почечной патологии, часто обладают низкой эффективностью и вызывают побочные эффекты, усугубляющие тяжесть поражения органа (Ермоленко Т.И., 2014; Котенко О.Н., и др., 2021). Поэтому проблема фармакотерапии ОПП и предотвращения его перехода в ХБП актуальна (Ахмедова Н.Ш., и др., 2022; Бабаев Ф.Г., и др., 2020; Шутов А.М., и др., 2021).

Одним из перспективных источников лекарственных средств является лекарственное растительное сырье, содержащее флавоноиды. Кверцетин и его производные (дигидрокверцетин, рутин и гиперозид) являются представителями класса флавоноидов, характеризующихся многообразием структур, широким спектром биологической активности и

низкой токсичностью (Куркина А.В., 2012). Отдельные флавоноиды обладают иммуномодулирующими, нейротропными, диуретическими, гепатопротекторными, желчегонными, противоопухолевыми и другими фармакологическими свойствами. Данные эффекты флавоноидов часто привлекают ученых в области создания новых лекарственных препаратов растительного происхождения (Куркин В.А., 2020). Учитывая стремительный рост заболеваемости почечной патологией, анализ влияния флавоноидов на экскреторную функцию почек представляется актуальным. В связи с этим предпринято настоящее исследование по изучению влияния флавоноидов на выделительную функцию почек интактных крыс и животных с моделью ишемической острой почечной недостаточности (ОПН).

Цель исследования – анализ влияния кверцетина и его производных на экскреторную функцию почек в норме и при острой почечной недостаточности.

Задачи исследования:

1. Исследовать влияние кверцетина и его производных на почечную экскрецию воды, электролитов, креатинина.

2. Изучить механизм действия кверцетина и его производных на экскреторную функцию почек, клубочковую фильтрацию, канальцевый транспорт воды, натрия и креатинина.

3. Изучить возможность использования диуретического, салуретического и креатининуретического эффектов кверцетина и его производных для лечения ОПН, восстановления экскреторной функции почек и метаболизма нефронов на модели экспериментальной ишемической ОПН.

4. Провести сравнительный анализ эффективности кверцетина и его производных при фармакотерапии экспериментальной ОПН по функциональным показателям работы клубочково-канальцевого аппарата почек.

5. Исследовать влияние кверцетина и его производных на сосудистые микроциркуляторные сдвиги и морфологические параметры почечных структур на модели экспериментальной ОПН.

Научная новизна. Впервые проведен сравнительный анализ влияния кверцетина и его производных на почечную экскрецию воды, натрия, калия, креатинина при физиологических условиях.

Впервые предпринята попытка определения локализации механизма диуретического действия кверцетина и его производных (клубочки, канальцы).

Впервые обосновано применение кверцетина и его производных для купирования постишемической ОПН, нормализации выделительной функции почек, метаболизма нефронов, функциональных показателей работы клубочково-канальцевого аппарата почек, стабилизации сосудистых микроциркуляторных сдвигов и морфологических параметров почечных структур

на модели экспериментальной ОПН.

Теоретическая и практическая значимость работы. Настоящее исследование носит фундаментальный характер и направлено на поиск лекарственных средств для фармакотерапии ОПН среди биологически активных соединений (БАС) растительного происхождения. Теоретические достижения, изложенные в разделе «научная новизна», определяют практическую значимость диссертационной работы. Результаты проведенных экспериментальных исследований обосновывают применение кверцетина и его производных дигидрокверцетина, рутина и гиперозида при ОПН ишемического генеза.

Полученные в ходе выполнения работы результаты являются перспективными для внесения в регистрационное досье для получения разрешения на клинические исследования эффективности применения кверцетина, дигидрокверцетина, рутина и гиперозида при почечной недостаточности ишемического генеза, а также применяются при проведении практических и лекционных занятий на кафедрах Института фармации Самарского государственного медицинского университета.

Методология и методы исследования. Настоящее исследование выполнено на интактных крысах и на животных с экспериментальной постишемической ОПН. В опытах на интактных крысах изучено влияние БАС растительного происхождения, кверцетина и его производных (дигидрокверцетина, рутина и гиперозида) на выделительную функцию почек. Диуретические дозы БАС подобраны экспериментальным путем, с опорой на литературные данные.

В работе были применены следующие методы исследования: фармакологические, биохимические, ультразвуковые, гистологические и статистические. Выполненные в рамках исследования опыты были рассмотрены и одобрены Комитетом по биоэтике при Самарском государственном медицинском университете (протокол №222 от 07 апреля 2021 г.).

Связь задач исследования с основным планом научно-исследовательских работ университета. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Все изученные соединения флавоноидной природы (кверцетин, дигидрокверцетин, рутин и гиперозид) оказывают дозозависимое стимулирующее влияние на экскреторную функцию почек.

2. Кверцетин и рутин в дозе 5 мг/кг умеренно стимулируют диурез исключительно за счет снижения канальцевой реабсорбции натрия. Дигидрокверцетин и гиперозид в дозе 1 мг/кг значительно стимулируют диурез как за счет увеличения клубочковой фильтрации, так и за счет снижения канальцевой реабсорбции натрия.

3. Кверцетин, дигидрокверцетин, рутин и гиперозид реализуют нефропротекторный эффект за счет ускоренного восстановления экскреторной функции почек и метаболизма нефронов на модели ишемической ОПН.

4. Ежедневное введение кверцетина, дигидрокверцетина, рутина и гиперозида в первые 7 дней постишемического периода восстанавливает функциональные параметры клубочково-канальцевого аппарата, нормализует микроциркуляцию и почечный кровоток на модели экспериментальной ишемической ОПН.

Степень достоверности. Достоверность результатов, полученных в ходе настоящего исследования, обусловлена достаточным объемом опытов, выполненных при помощи современных инструментальных и лабораторных методик, последующей систематизации, а также комплексной статистической обработки полученных данных в соответствии с общими рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств (использованием современных методов статистической обработки, достаточного объема статистических выборок, наличие препаратов сравнения).

Апробация результатов. Результаты настоящего исследования были доложены на Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых с международным участием «Аспирантские чтения – 2022: Молодые ученые – медицине. Технологическое предпринимательство как будущее медицины. SIMS – 2022: Samara International Medical Science» (Самара, 2022), Научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы химической безопасности в сфере фармацевтической и медицинской науки и практики» (Пермь, 2022), III Научно-практической онлайн-конференции с международным участием «Современные проблемы фармации» (Самара, 2022), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Аспирантские чтения – 2023: Молодые ученые – медицине. Приоритетные направления науки в достижении технологического суверенитета. SIMS – 2023: Samara International Medical Science» (Самара, 2023), I Международной конференции «Интеграционные связи фармацевтической экологии в современных реалиях – 2023» (Москва, 2023), VI Съезде фармакологов России (Москва, 2023).

Апробация работы состоялась 20 июня 2024 года на заседании Научной проблемной комиссии по химико-фармацевтическим наукам с участием сотрудников кафедр Института фармации Самарского государственного медицинского университета.

Сведения о публикациях по теме диссертации. По теме настоящего исследования опубликовано 14 научных работ, в том числе 6 статей в журналах, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ и индексируемых в международных базах данных «Scopus» и «Web of Science»; получено 4 патента РФ на изобретения.

Внедрение результатов исследования. Результаты диссертационного исследования

используются в научных исследованиях и учебном процессе на кафедрах: фармакологии имени з.д.н. РФ профессора А.А. Лебедева и фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии Института фармации Самарского государственного медицинского университета.

Личный вклад автора. Результаты диссертационного исследования были получены лично автором. Автор принимал участие в постановке всех серий экспериментов. Совместно с научным руководителем, доктором медицинских наук, доцентом Е.Н. Зайцевой автор проанализировал и обобщил полученные результаты, подготовил публикации и патенты.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 123 страницах компьютерного текста. В состав работы входят: введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждение полученных результатов, выводы, практические рекомендации, перечень сокращений, список литературы, включающий 178 источников (114 – русскоязычных и 64 – иностранных). Диссертация содержит 11 рисунков и 22 таблицы.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 14 работ, в том числе 6 статей в журналах, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ и входящих в международные цитатно-аналитические базы Web of Science и Scopus; 4 патента РФ на изобретения.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Научно-исследовательская работа выполнена в 2020 – 2023 гг. на базе кафедры фармакологии имени Заслуженного деятеля науки РФ профессора А.А. Лебедева ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России. Организация научно-исследовательских работ соответствовала этическим нормам, регламентирующим эксперименты на животных, указанным в международной и российской нормативно-правовой документации.

Опыты выполнены на 320 белых беспородных крысах обоего пола массой 180-220 г. Изучение действия кверцетина, дигидрокверцетина, рутина и гиперозида на выделительную функцию почек при физиологических условиях проводили в дозах 1, 5 и 10 мг/кг в 4-х ч и 24-х ч экспериментах на фоне 3% водной нагрузки (внутрижелудочно). Препаратом сравнения был взят «петлевой» диуретик фуросемид в пороговой дозе 1 мг/кг (фуросемид, таблетки 40 мг, ОАО «Дальхим-фарм», Россия). В полученных пробах мочи определяли диурез (V, мл/4 ч и мл/сут), методом пламенной фотометрии на пламенном анализаторе жидкости (ПАЖ-2, НПО «Аналитприбор», Украина) регистрировали содержание натрия (U_{Na}, мкмоль/л) и калия ($U_к$, мкмоль/л), методом фотоэлектроколориметрии на концентрационном фотоэлектрическом фотометре (КФК-3, НПО «Лаборкомплект», Россия) – креатинина мочи (U_{Cr}, мг%). Для 4-х часовых и суточных опытов по общепринятым формулам рассчитывали: $U_{Na} \bullet V$ – почечную

экскрецию натрия (мкмоль/4 ч и мкмоль/сут), $U_K \bullet V$ – почечную экскрецию калия (мкмоль/4 ч и мкмоль/сут) и $U_{Cr} \bullet V$ – почечную экскрецию креатинина (мг/4 ч и мг/сут). С целью получения более точных данных все показатели пересчитывали на 100 г массы тела крыс.

Исследование механизма действия кверцетина, дигидрокверцетина, рутина и гиперозида на клубочковую фильтрацию и канальцевый транспорт натрия проводили с использованием острых опытов с внутримышечным введением исследуемых соединений. Крыс наркотизировали внутримышечным введением золетила («Золетил 100» (тилетамин и золазепам), Virbac, Франция) и рометара («Рометар» (ксилазин), Bioveta, Чехия). Животных фиксировали на спине, вводили в бедренную вену 0,9% раствор натрия хлорида (из расчета 1 мл на 200 г веса животного), катетеризировали мочевой пузырь. Собирали одну 30-мин контрольную порцию мочи. Производили однократную внутримышечную инъекцию исследуемого вещества, которое перед введением растворяли в теплом изотоническом растворе натрия хлорида (объем растворителя брали из расчета 0,5 мл на 200 г веса крыс). Собирали опытные пробы мочи в течение трех 30-мин промежутков.

В ходе опытов регистрировали почечную экскрецию воды, натрия, калия и креатинина. Параллельно из вены забирали по 0,5 мл крови (в контрольных и опытных условиях), определяли концентрацию креатинина и натрия: P_{Na} – концентрация натрия в плазме крови (мкмоль/л), P_{Cr} – концентрация креатинина в плазме крови (мг%). Рассчитывали клубочковую фильтрацию, канальцевую реабсорбцию воды и натрия: $C_{Cr} = 100 \times V \times U_{Cr} / P_{Cr}$ – клиренс креатинина (мкл/мин/100 г); U_{Cr} / P_{Cr} – концентрационный индекс креатинина (усл. ед.); $U_{Na} \cdot V \cdot 100 / (P_{Na} \cdot C_{Cr} \cdot 0{,}94)$ – экскретируемую фракцию натрия (%). Концентрационный индекс креатинина позволяет судить о реабсорбции воды в канальцах почек, экскретируемая фракция натрия – о количестве экскретируемого натрия по отношении к профильтровавшемуся.

Ишемическую модель ОПН создавали односторонней нефрэктомией и наложением сосудистого зажима на почечную ножку единственной почки на 1,5 ч. При изучении влияния кверцетина и его производных на тяжесть экспериментальной ишемической ОПН всем группам животных ежедневно в течение 7 дней после операции вводили внутрижелудочно 3% водную нагрузку, опытным крысам – дополнительно исследуемое соединение. Регистрировали почечную экскрецию воды, натрия, калия и креатинина. На 3-и, 5-е и 7-е сутки опыта брали пробы крови, определяли P_{Cr} – содержание креатинина в крови (мг%); также определяли в моче содержание U_{LDG} – лактатдегидрогеназы (ЛДГ, ед/л), U_{GGT} – гаммаглутамилтрансферазы (ГГТ, ед/л), U_{Pr} – белка (г/л). По общепринятым формулам вычисляли почечную экскрецию натрия, калия, креатинина, ЛДГ, ГГТ и белка. Скорость клубочковой фильтрации, клиренс креатинина, вычисляли по формуле: $C_{Cr} = 100 \times V \times U_{Cr} / P_{Cr}$ (мл/мин).

Исследование влияния кверцетина и его производных на УЗИ параметры почек и УЗДГ

параметры сосудов почек проводили на 7-е сутки после операции под наркозом. Методом ультразвукового сканирования оценивали продольный и поперечный размер почек, толщину, и кровенаполнение паренхимы, фиксировали состояние чашечно-лоханочной системы. Методом ультразвуковой допплерографии со спектральным анализом (УЗДГ) на портативном ультразвуковом сканере SonoScape S6Pro (SonoScape, КНР) ультразвуковым линейным датчиком L741 изучали почечную гемодинамику. Регистрировали максимальную систолическую скорость артериального потока – МСС (см/с), конечную диастолическую скорость артериального потока – КДС (см/с), индекс резистентности по формуле: МСС – КДС / МСС на уровне ствола почечной артерии и сегментарных почечных артерий.

Изучение влияния кверцетина и его производных на морфологические параметры почек крыс с ишемической ОПН проводили на 3-и сутки опыта. Животных выводили из эксперимента передозировкой наркозных средств (золетила и рометара), согласно инструкции. Забор биоматериала осуществляли после остановки дыхания и сердцебиения. Гистологическая проводка объектов была осуществлена по адаптированному протоколу для паренхиматозных органов мелких грызунов. Заливка осуществлена в парафиновую среду Гистомикс экстра (Биовитрум, Россия). Из полученных блоков были сделаны срезы толщиной 4 мкм и смонтированы на гистологические стекла. Окрашивание полученных препаратов было осуществлено стандартными красителями - гематоксилин и эозин. Оценку полученных гистологических препаратов осуществляли при помощи световой микроскопии. Микроскоп Микромед вар. 3 led с видеокамерой и программным обеспечением Toup Tek Toup View.

Статистический анализ полученных экспериментальных данных проводили с использованием стандартных методов вариационной статистики: вычисление средней арифметической величины (M) и средней ошибки средней арифметической (m) с использованием программ Microsoft Excel 2010 (MS Office 2010, USA) «Пакет анализа», Statistica 13.0 по непараметрическим критериям Манна-Уитни с поправкой Бонферрони (для независимых рядов данных), Уилкоксона (для зависимых рядов данных).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние кверцетина и его производных на выделительную функцию почек при физиологических условиях. Было выявлено, что кверцетин при однократном внутрижелудочном введении в дозе 5 мг/кг за 4 ч опыта увеличивал почечную экскрецию воды (на 22%) и натрия (на 41%), в дозе 10 мг/кг – воды (на 21%), натрия (на 38%) и креатинина (на 43%) относительно показателей водного контроля (таблица 1). В суточном эксперименте кверцетин в дозе 1 мг/кг вызывал изолированный рост натрийуреза (на 27%), в дозе 5 мг/кг – диуреза (на 27%), в дозе 10 мг/кг – диуреза (на 15%) и натрийуреза (на 31%) относительно контрольных значений.

Таблица 1 – Влияние однократного внутрижелудочного введения кверцетина, дигидрокверцетина, рутина, гиперозида и фуросемида на параметры экскреторной функции почек интактных крыс в 4 ч эксперименте (M±m, n=10)

Группа	Показатели			
	Диурез, мл/100 г	Натрийурез, мкмоль/100 г	Калийурез, мкмоль/100 г	Креатининурез, мг/100 г
Кверцетин, 4 ч				
Контроль (вода)	2,32±0,12	211,32±13,04	129,18±10,18	0,24±0,03
1 мг/кг	2,36±0,10	232,25±22,68	151,31±13,31	0,24±0,01
5 мг/кг	2,83±0,16 *	299,17±12,83 *	173,41±26,64	0,22±0,02
10 мг/кг	2,81±0,11 *	291,51±21,52 *	155,22±13,53	0,34±0,02 *
Кверцетин, 24 ч				
Контроль (вода)	3,78±0,16	442,42±15,90	238,02±15,43	7,64±0,51
1 мг/кг	4,08±0,14	561,97±16,68 *	268,80±26,62	8,02±0,49
5 мг/кг	4,80±0,10 *	517,45±43,16	305,79±32,34	8,48±0,38
10 мг/кг	4,35±0,17 *	580,38±22,44 *	283,43±30,89	6,87±0,36
Дигидрокверцетин, 4 ч				
Контроль (вода)	1,93±0,18	240,25±21,60	135,51±7,05	0,20±0,05
1 мг/кг	2,37±0,08	357,90±17,46 *	170,95±22,41	0,22±0,05
5 мг/кг	2,74±0,27 *	387,89±36,96 *	193,61±11,80 *	0,16±0,03
10 мг/кг	2,82±0,30	382,01±32,95 *	178,44±9,66 *	0,13±0,03
Дигидрокверцетин, 24 ч				
Контроль (вода)	2,46±0,18	497,80±16,18	275,68±30,81	5,15±0,34
1 мг/кг	3,34±0,26 *	632,29±34,55 *	328,07±33,24	7,59±0,61 *
5 мг/кг	4,01±0,46 *	935,58±33,86 *	402,28±22,55 *	8,44±1,14 *
10 мг/кг	4,02±0,37 *	892,41±40,50 *	412,97±24,98 *	7,88±0,63 *
Рутин, 4 ч				
Контроль (вода)	0,96±0,09	48,27±5,52	27,20±3,45	0,15±0,02
1 мг/кг	0,99±0,05	56,60±3,63	32,85±1,03	0,14±0,02
5 мг/кг	1,20±0,04 *	62,97±2,16 *	32,30±2,93	0,16±0,03
10 мг/кг	0,95±0,10	46,79±5,48	34,27±2,24	0,12±0,02
Рутин, 24 ч				
Контроль (вода)	1,55±0,14	214,32±22,95	187,18±17,25	0,71±0,20
1 мг/кг	1,71±0,03	273,93±11,14	224,35±8,63	0,72±0,07
5 мг/кг	2,02±0,08 *	321,33±15,22 *	239,94±14,78 *	0,82±0,07
10 мг/кг	2,06±0,13 *	326,06±8,06 *	338,75±19,16 *	0,67±0,10
Гиперозид, 4 ч				
Контроль (вода)	0,97±0,21	238,46±44,75	72,99±18,78	1,44±0,37
1 мг/кг	1,52±0,04 *	354,15±13,58	100,21±7,06	2,17±0,09 *
5 мг/кг	1,65±0,19	461,10±78,51	107,64±10,76	2,16±0,35
10 мг/кг	0,23±0,01 *	100,52±7,14 *	21,94±1,25	0,45±0,03
Гиперозид, 24 ч				
Контроль (вода)	1,86±0,18	592,19±52,99	105,63±11,73	2,67±0,28
1 мг/кг	2,13±0,09	835,79±26,31 *	130,08±5,65	3,92±0,12 *
5 мг/кг	3,34±0,22 *	895,90±60,17 *	207,15±15,28 *	4,24±0,30 *
10 мг/кг	1,85±0,10	417,17±19,54 *	117,35±10,19	2,29±0,12
Фуросемид, 4 ч				
Контроль (вода)	1,97±0,13	67,80±9,72	43,87±3,98	0,07±0,01
1 мг/кг	3,81±0,22 *	218,71±15,61 *	76,69±4,72 *	0,09±0,02
Фуросемид, 24 ч				
Контроль (вода)	2,98±0,22	519,78±63,07	183,21±13,21	1,19±0,11
1 мг/кг	5,42±0,34 *	814,99±75,24 *	225,78±9,61 *	1,58±0,13

Примечание: * - изменения в опытной группе статистически значимы по отношению к контролю, критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони, $p<0,05$.

В тоже время рутин при однократном внутрижелудочном введении в дозе 5 мг/кг за 4 ч опыта способствовал росту диуреза (на 25%) и натрийуреза (на 30%), в 24-х ч эксперименте в дозе 5 и 10 мг/кг – соответственно диуреза (на 30% и 33%), натрийуреза (на 50% и 52%) и калийуреза (на 28% и 81%) относительно контрольных показателей.

В свою очередь, гиперозид в дозе 1 мг/кг за 4 ч опыта вызывал значительный рост диуреза (на 57%) и креатининуреза (на 51%), в дозе 10 мг/кг – способствовал обратной почечной реакции, антидиурезу (снижению диуреза на 76%) и антинатрийурезу (снижению натрийуреза на 58%) относительно значений контрольной группы животных. В суточном эксперименте гиперозид в дозе 1 мг/кг способствовал росту натрийуреза (на 41%) и креатининуреза (на 47%), в дозе 5 мг/кг – диуреза (на 80%), натрийуреза (на 51%), калийуреза (на 96%) и креатининуреза (на 59%), в дозе 10 мг/кг – изолированному росту натрийуреза (на 30%) относительно контроля.

Препарат сравнения фуросемид в пороговой дозе 1 мг/кг, введенный однократно внутрижелудочно, за 4 ч опыта стимулировал диурез (на 46%), натрийурез (на 68%) и калийурез (на 42%), в суточных опытах – значительно увеличивал диурез (на 53%), натрийурез (на 116%), калийурез (на 51%) относительно показателей водного контроля.

В ходе проведенных экспериментов были определены оптимальные диуретические дозы для исследуемых БАС флавоноидной природы при обычных условиях: для кверцетина и рутина – 5 мг/кг, для дигидрокверцетина и гиперозида – 1 мг/кг.

Механизм действия кверцетина и его производных на клубочковую фильтрацию и канальцевый транспорт натрия. Было выявлено, что кверцетин при однократном внутримышечном введении в дозе 5 мг/кг спустя 30 мин после инъекции увеличивал диурез (на 26%), натрийурез (на 50%), калийурез (на 38%), клиренс креатинина (на 35%), в конце 60 мин – натрийурез (на 63%), калийурез (на 29%) и экскретируемую фракцию натрия (на 53%), по истечении 90 мин – натрийурез (на 33%) относительно контрольных значений (таблица 2). Характеризующий скорость клубочковой фильтрации клиренс креатинина возрастал под действием кверцетина в меньшей степени в сравнении с натрийурезом и калийурезом. Также кверцетин изменял и экскретируемую фракцию натрия. Следовательно, увеличение выведения натрия почками связано как с возрастанием клубочковой фильтрации, так и со снижением канальцевой реабсорбции.

При однократном внутримышечном введении крысам дигидрокверцетина в дозе 1 мг/кг спустя 30 мин было отмечено значительное увеличение диуреза (на 132%), натрийуреза (на 217%), калийуреза (на 168%), клиренса креатинина (на 151%) и экскретируемой фракции натрия (на 33%), в конце 60 мин – диуреза (на 65%), натрийуреза (на 136%), калийуреза (на 102%), клиренса креатинина (на 56%), а также экскретируемой фракции натрия (на 53%), по истечении 90 мин – натрийуреза (на 71%), калийуреза (на 93%) и экскретируемой фракции натрия (на 60%)

относительно контроля. Дигидрокверцетин изменял клиренс креатинина и экскретируемую фракцию натрия. Следовательно, увеличение выведения натрия обусловлено и увеличением клубочковой фильтрации, и снижением канальцевой реабсорбции.

Таблица 2 – Влияние однократного внутримышечного введения кверцетина, дигидрокверцетина, рутина, гиперозида и фуросемида на параметры экскреторной функции почек интактных крыс (M±m, n=10)

Группа	Показатели					
	Экскреция воды, мкл/мин/ 100 г	Экскреция натрия, мкмоль/мин/ 100 г	Экскреция калия, мкмоль/мин/ 100 г	Клиренс креатинина, мкл/мин/ 100 г	Концентрационный индекс креатинина, усл. ед.	Экскретируемая фракция натрия, %
Кверцетин, 5 мг/кг						
Контроль	4,07±0,22	0,93±0,09	0,32±0,03	4384,37±430,89	11,01±1,17	0,17±0,02
30 мин	5,13±0,21 *	1,41±0,09 *	0,43±0,03 *	5905,86±522,95 *	11,54±0,94	0,19±0,02
60 мин	4,23±0,36	1,53±0,16 *	0,40±0,02 *	4487,83±660,86	10,50±1,15	0,26±0,02 *
90 мин	3,82±0,26	1,25±0,06 *	0,34±0,01	4108,34±432,33	10,69±0,77	0,22±0,02
Дигидрокверцетин, 1 мг/кг						
Контроль	3,87±0,27	0,80±0,06	0,38±0,03	4053,58±362,63	10,57±0,79	0,15±0,01
30 мин	8,98±0,15 *	2,54±0,10 *	1,02±0,04 *	10194,01±794,68 *	11,36±0,86	0,20±0,02
60 мин	6,39±0,37 *	1,89±0,06 *	0,77±0,04 *	6336,70±389,53 *	10,38±1,15	0,23±0,03 *
90 мин	3,75±0,24	1,37±0,08 *	0,73±0,04 *	3899,68±277,50	10,60±0,83	0,24±0,02 *
Рутин, 5 мг/кг						
Контроль	4,13±0,22	0,88±0,03	0,41±0,01	5193,73±464,44	12,47±0,68	0,13±0,01
30 мин	6,44±0,73 *	1,44±0,16 *	0,65±0,11 *	6000,13±709,54	9,48±0,55 *	0,18±0,02 *
60 мин	5,87±0,60 *	1,32±0,18 *	0,71±0,10 *	5969,06±755,13	10,18±0,60 *	0,16±0,02
90 мин	5,49±0,55 *	1,22±0,13 *	0,68±0,12 *	5464,21±699,53	9,91±0,69 *	0,15±0,01
Гиперозид, 1 мг/кг						
Контроль	3,89±0,29	0,74±0,05	0,28±0,03	4516,13±324,68	11,81±0,71	0,13±0,01
30 мин	7,47±0,36 *	2,09±0,05 *	0,55±0,04 *	9686,83±517,70 *	13,04±0,53	0,13±0,01 *
60 мин	7,66±0,35 *	1,85±0,08 *	0,50±0,04 *	8745,34±556,63 *	11,52±0,70	0,17±0,01 *
90 мин	6,42±0,37 *	1,57±0,13 *	0,40±0,02 *	7244,02±429,25 *	11,42±0,69	0,18±0,02
Фуросемид, 1 мг/кг						
Контроль	4,02±0,23	0,79±0,09	0,45±0,02	4617,84±448,23	11,44±0,97	0,14±0,01
30 мин	8,11±0,95 *	1,92±0,31 *	0,85±0,15 *	5355,32±803,71	6,67±0,64 *	0,28±0,02 *
60 мин	7,36±0,77 *	1,69±0,20 *	0,86±0,11 *	6530,49±932,77	9,09±0,84	0,23±0,04 *
90 мин	6,39±0,64 *	1,35±0,16 *	0,72±0,08 *	4744,62±693,94	7,52±0,90 *	0,23±0,02 *
Примечание: * - изменения в опытной группе статистически значимы по отношению к контролю; контроль – показатели, снятые до введения препарата, опыт – после введения препарата, критерий Уилкоксона, $p < 0,05$.						

Рутин в дозе 5 мг/кг спустя 30 мин после однократного внутримышечного введения стимулировал диурез (на 56%), натрийурез (на 73%), калийурез (на 59%), экскретируемую фракцию натрия (на 38%), снижал концентрационный индекс креатинина (на 24%), в конце 60 мин исследования – способствовал росту диуреза (на 42%), натрийуреза (на 50%), калийуреза (на 73%), снижению концентрационного индекса креатинина (на 18%), по истечении 90 мин – возрастанию диуреза (на 33%), натрийуреза (на 39%), калийуреза (на 66%), концетрационный индекс креатинина продолжал оставаться пониженным (на 21%) по сравнению с контрольными показателями. В течение всего опыта рутин изменял экскретируемую фракцию натрия и концентрационный индекс креатинина. Следовательно, увеличение выведения натрия и воды обусловлено снижением канальцевой реабсорбции ионов натрия и воды.

Гиперозид в дозе 1 мг/кг спустя 30 мин после введения способствовал значительному росту диуреза (на 92%), натрийуреза (на 182%), калийуреза (на 95%), клиренса креатинина (на 114%) и экскретируемой фракции натрия (на 31%), в конце 60 мин – продолжал стимулировать диурез (на 97%), натрийурез (до 150%), калийурез (до 180%), клиренс креатинина (94%) и экскретируемую фракцию натрия (31%), по истечении 90 мин – продолжал поддерживать диурез (на 65%), натрийурез (на 112%), калийурез (на 42%) и клиренс креатинина (на 60%) повышенными в сравнении с контрольными значениями. За время исследования гиперозид изменял клиренс креатинина и экскретируемую фракцию натрия. Следовательно, увеличение выведения воды и натрия обусловлено увеличением клубочковой фильтрации и снижением канальцевой реабсорбции.

Препарат сравнения фуросемид, введенный однократно внутримышечно в пороговой дозе 1 мг/кг, спустя 30 мин эксперимента значительно увеличивал почечную экскрецию воды (на 102%), натрия (на 143%), калия (на 89%), экскретируемую фракцию натрия (на 100%) и уменьшал концентрационный индекс креатинина (на 42%), в конце 60 и 90 мин эксперимента – способствовал соответственно менее выраженному росту диуреза (на 83% и 59%), натрийуреза (на 114% и 71%), калийуреза (на 91% и 60%), экскретируемой фракции натрия (на 64%), продолжал снижать концентрационный индекс креатинина (на 21% и 34%) в сравнении с контролем. В течение всего опыта препарат сравнения фуросемид значительно увеличивал экскретируемую фракцию натрия, снижал концентрационный индекс креатинина и не влиял на клиренс креатинина. Следовательно, увеличение выведения натрия и воды почками обусловлено исключительно снижением канальцевой реабсорбции.

Эффективность фармакотерапии кверцетином и его производными при экспериментальной ишемической ОПН. Эффективность фармакотерапии ОПН в настоящее время можно оценить по динамике параметров выделительной функции почек (диурез, салурез, креатининурез) и маркеров повреждения почек, которые отражают тяжесть поражения органа – скорость клубочковой фильтрации (СКФ, клиренс креатинина), протеинурия, лактатдегидрогеназа (ЛДГ) и гаммаглутамилтрансфераза (ГГТ) мочи. Ферменты ЛДГ и ГГТ, экскретируемые с мочой, позволяют идентифицировать почечную патологию на ранних стадиях. К методам функциональной диагностики почечного кровотока относится ультразвуковая допплерография (УЗДГ), которая позволяет зарегистрировать следующие параметры: уголнезависимый допплеровский индекс резистентности, отражающий пульсовое наполнение определенного сосуда; диаметр сосудов почек, максимальную систолическую скорость артериального потока в устье почечной артерии и ее ветвях, а также эхогенность паренхимы почек. Также важным и точным методом верификации диагноза и контроля эффективности проводимого лечения является патогистологический метод исследования.

Влияние кверцетина и его производных на тяжесть экспериментальной ишемической ОПН. В 1-е сутки послеоперационного периода все исследуемые соединения способствовали увеличению диуреза относительно контрольных значений: кверцетин (на 31%), дигидрокверцетин (на 25%), рутин (на 70%) и гиперозид (на 96%) (таблица 3). У гиперозида и рутина рост диуреза был значительно выше, чем у кверцетина и дигидрокверцетина. Все соединения способствовали росту салуреза относительно показателей контроля: рутин – натрийуреза (на 51%) и калийуреза (на 45%), гиперозид – натрийуреза (на 82%) и калийуреза (на 47%), дигидрокверцетин – калийуреза (на 29%). По силе салуреза преобладал гиперозид.

На 3-и сутки, в разгар ОПН, показатели выделительной функции почек под действием исследуемых БАС продолжали оставаться повышенными относительно контрольных значений: диурез – под действием кверцетина (на 39%), дигидрокверцетина (на 54%), рутина (на 53%) и гиперозида (на 45%); натрийурез – под действием кверцетина (на 109%), дигидрокверцетина (на 99%), рутина (на 103%) и гиперозида (на 78%); калийурез – под действием кверцетина (на 70%), дигидрокверцетина (на 59%), рутина (на 92%) и гиперозида (на 90%); креатининурез – под действием кверцетина (на 69%), дигидрокверцетина (на 100%), рутина (на 85%) и гиперозида (на 211%). По силе диуреза доминировали дигидрокверцетин и рутин, салуреза – рутин, креатининуреза – гиперозид.

На 3-и сутки опыта динамика маркеров ОПН выглядела следующим образом: кверцетин повышал СКФ (на 141%) и понижал ГГТ (на 35%); дигидрокверцетин увеличивал СКФ (на 242%), уменьшал креатинин крови (на 6%), белок (на 40%) и ЛДГ мочи (на 31%); рутин стимулировал СКФ (на 200%), блокировал мочевую экскрецию белка (на 35%) и ЛДГ (на 41%); гиперозид способствовал росту СКФ (на 222%), снижению белка (на 39%) и ЛДГ мочи (на 37%) относительно контрольных значений. Следовательно, исследуемые соединения в разгар ОПН проявляют выраженные нефропротективные свойства.

В заключительные 7-е сутки эксперимента на фоне прогрессирования полиурии у контрольной группы животных отмечалось снижение диуреза у животных опытных групп под действием кверцетина (на 19%), рутина (на 27%) и гиперозида (на 29%). Также отмечалось снижение почечной экскреции соответственно белка и ГГТ под действием кверцетина (на 25% и 24%), рутина (на 40% и 41%) и гиперозида (на 35% и 38%), гиперозид дополнительно способствовал снижению уровня ЛДГ в моче (на 49%) относительно нелеченого контроля.

Таким образом, все исследуемые соединения эффективны при лечении животных с моделью ишемической ОПН, эффективность фармакотерапии ОПН ишемического генеза возрастает в ряду: кверцетин – рутин – гиперозид – дигидрокверцетин.

Таблица 3 – Влияние кверцетина, дигидрокверцетина, рутина и гиперозида на суточные параметры экскреторной функции почек крыс с ишемической ОПН (M ± m)

Показатели	Контроль (ОПН)	ОПН + Кверцетин, 5 мг/кг	ОПН + Дигидро-кверцетин, 1 мг/кг	ОПН + Рутин, 5 мг/кг	ОПН + Гиперозид, 1 мг/кг
1сутки					
Диурез, мл/сут	1,02±0,04	1,34±0,08 *	1,28±0,10 *	1,73±0,13 *	2,00±0,20 *
Натрийурез, мкмоль/сут	118,76±12,49	144,16±13,85	139,39±16,79	179,74±24,39 *	216,52±27,33 *
Калийурез, мкмоль/сут	49,02±2,73	56,70±5,14	63,06±5,90 *	70,92±4,34 *	71,95±9,96 *
Креатининурез, мг/сут	2,05±0,15	2,11±0,11	1,99±0,20	2,44±0,20	2,54±0,34
3 сутки					
Диурез, мл/сут	2,29±0,19	3,18±0,20 *	3,53±0,30 *	3,50±0,26 *	3,32±0,24 *
Натрийурез, мкмоль/сут	146,73±18,11	306,25±36,60 *	290,84±31,78 *	297,96±30,87 *	260,53±22,74 *
Калийурез, мкмоль/сут	108,26±15,98	184,20±16,40 *	172,19±20,40 *	207,81±17,45 *	205,64±20,00 *
Креатининурез, мг/сут	4,18±0,43	7,07±0,50 *	8,38±0,80 *	7,75±0,60 *	8,80±0,85 *
Креатинин крови, мг/сут	1,04±0,02	1,02±0,02	0,98±0,02 *	1,01±0,02	0,99±0,02
СКФ, мл/мин	942,90±137,25	2268,01±237,40 *	3223,02±513,58 *	2832,96±417,66 *	3038,25±422,92 *
Протеинурия, г/сут	0,84±0,04	0,65±0,09	0,50±0,07 *	0,55±0,07 *	0,60±0,09 *
ЛДГ, мкмоль/сут	1,76±0,07	1,58±0,12	1,39±0,11 *	1,04±0,10 *	1,11±0,14 *
ГГТ, мкмоль/сут	3,20±0,39	2,08±0,13 *	2,30±0,24	2,46±0,20	2,85±0,31
7 сутки					
Диурез, мл/сут	4,59±0,21	3,72±0,25 *	4,50±0,25	3,35±0,26 *	3,26±0,23 *
Натрийурез, мкмоль/сут	298,95±20,41	283,05±26,60	323,96±27,52	267,44±22,65	272,41±25,84
Калийурез, мкмоль/сут	170,03±14,59	154,99±16,18	168,67±14,30	144,72±12,37	173,49±22,04
Креатининурез, мг/сут	5,18±0,49	5,54±0,71	4,77±0,43	5,23±0,60	4,56±0,56
Креатинин крови, мг/сут	1,00±0,02	0,98±0,02	0,96±0,02	0,99±0,02	0,98±0,02
СКФ, мл/мин	2448,49±339,01	2249,11±416,03	2318,01±296,45	1927,06±413,64	1647,59±320,51
Протеинурия, г/сут	0,51±0,05	0,38±0,02 *	0,41±0,02	0,31±0,02 *	0,33±0,03 *
ЛДГ, мкмоль/сут	7,14±0,80	6,51±0,38	6,20±0,33	5,70±0,60	3,60±0,40 *
ГГТ, мкмоль/сут	5,53±0,45	4,15±0,35 *	5,00±0,45	3,15±0,25 *	3,39±0,39 *
Примечание: * - изменения в опытной группе статистически значимы по отношению к контролю, критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони, $p<0,05$.					

Влияние кверцетина и его производных на УЗИ/УЗДГ параметры почек и сосудов почек крыс с ишемической ОПН. На 7-е сутки после операции после введения водной нагрузки и исследуемых соединений животных всех групп наркотизировали и подвергали ультразвуковому исследованию: интактная, контрольная (нелеченые крысы с ОПН) и четыре опытные группы (крысы с ОПН, леченые кверцетином, дигидрокверцетином, рутином и гиперозидом). При выполнении УЗИ и УЗДГ исследования интактных животных были

осуществлены замеры ряда параметров: размеров почек, максимальной систолической скорости артериального потока (МСС), индексов резистентности (ИР, RI) почечной и сегментарных артерий (верхней, средней и нижней), диаметра почечной артерии (таблица 4).

Таблица 4 – Влияние кверцетина и его производных на УЗИ параметры почек и УЗДГ параметры сосудов почек крыс с ишемической ОПН (M ± m, n = 7)

Параметры			Интактные	Контроль (ОПН)	ОПН + Кверцетин	ОПН + Дигидро-кверцетин	ОПН + Рутин	ОПН + Гиперозид
Размеры почки, мм		Толщина паренхимы	21,21± 0,24	23,29± 0,36 *	21,00± 0,37 **	22,00± 0,26 **	20,50± 0,30 **	20,00± 0,33 **
		Ширина	11,21± 0,43	11,00± 0,44	13,05± 0,47 **	11,50± 0,34	10,00± 0,45	12,10± 0,53
		Длина	3,14± 0,34	3,50± 0,33	3,30± 0,30	3,10± 0,23	3,00± 0,26	3,00± 0,26
Ствол почечной артерии		V, см/с	0,73± 0,03	0,60± 0,01 *	0,62± 0,01	0,66± 0,01 **	0,78± 0,02 **	0,71± 0,01 **
		RI	0,53± 0,06	0,89± 0,02 *	0,76± 0,01 **	0,68± 0,01 **	0,72± 0,01 **	0,75± 0,01 **
Сегментарные артерии	Нижняя 1/3	V, см/с	0,31± 0,01	0,31± 0,01	0,32± 0,01	0,37± 0,01 **	0,28± 0,01 **	0,31 0,01
		RI	0,50± 0,07	0,80± 0,03 *	0,66± 0,02 **	0,68± 0,03 **	0,65± 0,03 **	0,67± 0,04 **
	Средняя 1/3	V, см/с	0,35± 0,01	0,41± 0,02	0,35± 0,02	0,34± 0,02	0,39± 0,02	0,40± 0,02
		RI	0,53± 0,03	0,81± 0,03 *	0,68± 0,03 **	0,70± 0,04	0,65± 0,04 **	0,72± 0,04
	Верхняя 1/3	V, см/с	0,36± 0,03	0,36± 0,02	0,34± 0,03	0,37± 0,03	0,39± 0,03	0,38± 0,02
		RI	0,55± 0,03	0,75± 0,03 *	0,65± 0,03	0,60± 0,04 **	0,65± 0,03	0,71± 0,03
Диаметр ствола почечной артерии, мм			1,31± 0,03	0,95± 0,04 *	1,22± 0,02 **	1,25± 0,03 **	1,13± 0,03 **	1,30± 0,03 **

Примечание: V – максимальная систолическая скорость кровотока; RI – индекс резистентности; * - изменения в контрольной группе животных с нелеченой ОПН статистически значимы по отношению к интактной группе животных, ** - изменения в опытной группе с леченой ОПН статистически значимы по отношению к контрольной группе животных с нелеченой ОПН, критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони, $p<0,05$.

Для контрольных животных с нелеченой ОПН при УЗИ и УЗДГ исследовании было отмечено уменьшение диаметра (на 27%) и МСС ствола почечной артерии (на 18%), увеличение ИР на стволе почечной артерии (на 68%), верхней (на 36%), средней (на 63%) и нижней (на 50%) сегментарных артериях относительно группы интактных животных.

В ходе анализа данных, полученных с помощью УЗИ, было выявлено, что толщина паренхимы почек достоверно увеличивалась у контрольных животных с нелеченой ОПН (на

10%) относительно интактной группы животных. Исследуемые БАС способствовали ее уменьшению: кверцетин (на 10%), дигидрокверцетин (на 6%), рутин (на 12%) и гиперозид (на 14%). В тоже время при изучении продольного (длина) и поперечного (ширина) размеров почек было обнаружено, что только кверцетин способствовал увеличению поперечного размера почек относительно показателей нелеченого контроля (на 19%).

В ходе УЗДГ исследования был изучен диаметр ствола почечной артерии, скорость кровотока в нем (МСС) и индекс сопротивления (RI), увеличение которого характеризует воспалительные и склеротические процессы, способствующие ухудшению функций почек.

Снижение скорости кровотока в стволе почечной артерии относительно интактных животных произошло у контрольной группы животных с нелеченой ОПН (на 18%), тогда как исследуемые соединения способствовали ее увеличению у животных опытных групп: дигидрокверцетин (на 10%), рутин (на 30%), гиперозид (на 18%). Индекс резистентности значительно возрастал у контрольной группы крыс (на 68%) относительно значений интактной группы животных, у опытных групп животных он уменьшался относительно нелеченого контроля: кверцетин (на 15%), дигидрокверцетин (на 24%), рутин (на 19%) и гиперозид (на 16%). Диаметр ствола почечной артерии уменьшался у контрольной группы животных (на 27%) относительно интактных животных, в то время как у всех животных опытных групп он увеличивался относительно контрольных значений: кверцетин (на 28%), дигидрокверцетин (на 32%), рутин (на 19%) и гиперозид (на 37%).

В тоже время в нижней сегментарной артерии дигидрокверцетин способствовал увеличению скорости кровотока (на 19%), рутин – ее уменьшению (на 10%) относительно показателей контроля. Индекс резистентности возрастал у контрольной группы животных относительно показателей интактной группы (на 60%), исследуемые соединения снижали индекс резистентности: кверцетин (на 17%), дигидрокверцетин (на 15%), рутин (на 19%) и гиперозид (на 16%) относительно контрольных значений.

В средней сегментарной артерии у контрольной группы животных также возрастал индекс резистентности (на 53%), у опытных групп данный показатель снижался: при лечении кверцетином (на 15%) и рутином (на 20%) относительно нелеченого контроля.

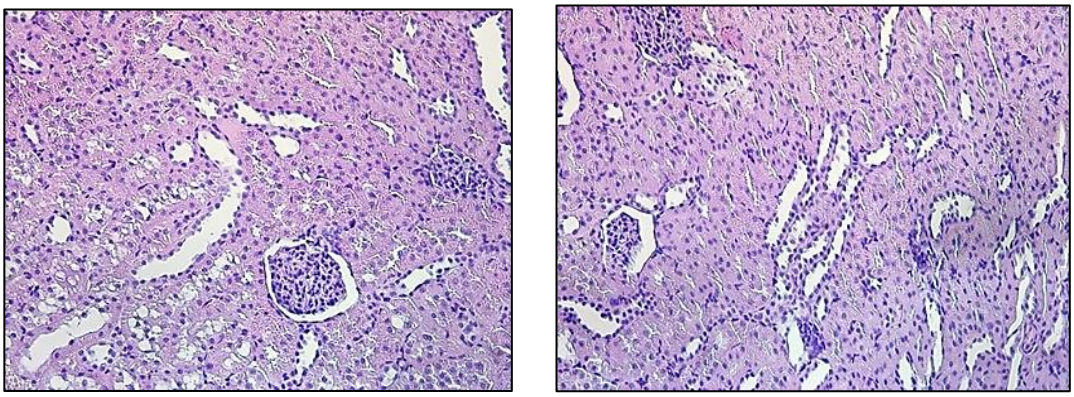
Параллельно в верхней сегментарной артерии индекс резистентности увеличивался у контрольной группы животных (на 36%), у опытных групп уменьшался только при лечении дигидрокверцетином (на 20%) относительно контрольной группы.

Следовательно, результаты УЗИ и УЗДГ исследований, полученные на 7-е сутки эксперимента, подтверждают высокую эффективность монотерапии гиперозидом и дигидрокверцетином. Об этом свидетельствуют следующие изменения: рост диаметра почечной артерии, возрастание скорости кровотока на почечной артерии, снижение индекса

резистентности на почечной артерии и ее ветвях. Монотерапия кверцетином и монотерапия рутином уступают по эффективности первым двум соединениям: кверцетин – не оказывает влияния на скорость кровотока, рутин – снижает скорость кровотока в нижней сегментарной артерии.

Влияние кверцетина и его производных на морфологические параметры почек крыс с ишемической ОПН. С целью подтверждения полноценной сформированности экспериментальной модели ишемической ОПН у крыс после операции и эффективности проводимого лечения на 3-и сутки опыта были выполнены морфологические исследования препаратов почек интактных животных, контрольных животных с нелеченой ОПН и животных с ОПН, леченых кверцетином, дигидрокверцетином, рутином и гиперозидом.

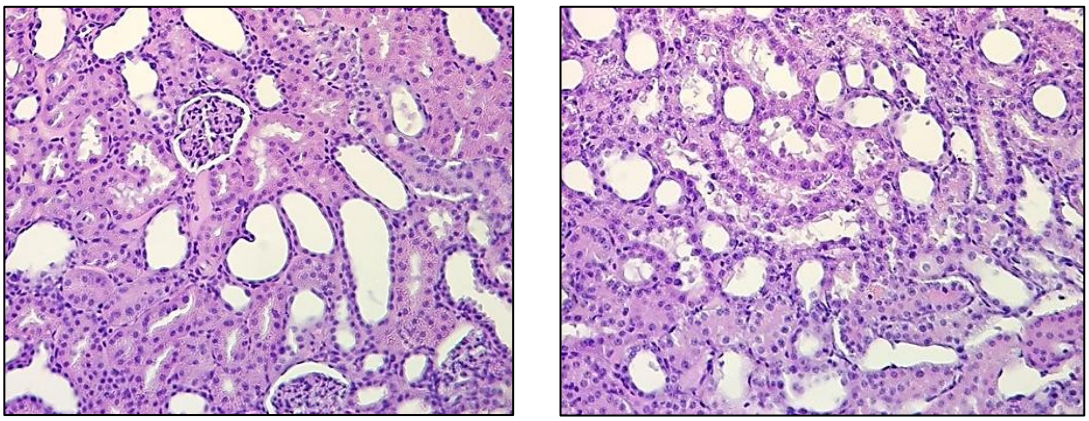
В ходе морфологических исследований препаратов почек интактной группы крыс четко визуализировали корковое и мозговое вещество почек. В корковом веществе были хорошо видны почечные тельца, извитые почечные канальцы без признаков патологических изменений (рисунок 1).



А Б

Рисунок 1. Микропрепарат почки интактного животного: почечные клубочки (А) и канальцы (Б), увеличение х40. Окраска гематоксилином и эозином

При патогистологическом исследовании препаратов почек контрольной группы крыс были выявлены изменения в сравнении с интактной группой крыс (рисунок 2). Визуализировали картину начальной стадии ОПН. Кровенаполнение коркового и мозгового веществ было снижено. Отмечали умеренный неравномерный отек и незначительную диффузно-очаговую лимфогистиоцитарную инфильтрацию интерстиция. Почечные клубочки были деформированы, диффузно инфильтрированы клетками воспаления. Обнаруживали узелковую зернистую дистрофию эпителия проксимальный почечных канальцев, вакуольную дистрофию и некрозы отдельных эпителиоцитов; расширение просвета и признаки атрофии эпителия, вакуольную дистрофию и некрозы единичных групп дистальных канальцев; в просветах канальцев - зернистые эозинофильные массы (клеточный дебрис и цилиндры).



А Б

Рисунок 2. Микропрепарат почки контрольного животного с нелеченой ОПН, 3 сут послеоперационного периода: почечные клубочки (А) и канальцы (Б), увеличение х40. Окраска гематоксилином и эозином

В тоже время, данные патогистологических исследований препаратов почек групп крыс с ОПН, леченой кверцетином и рутином, отличались от показателей контрольных крыс с нелеченой ОПН в лучшую сторону. Визуализировали картину олигоанурической стадии ОПН. Кровенаполнение коркового слоя было усилено. Почечные клубочки были полнокровны, гиперклеточны за счет умеренной пролиферации и незначительной лимфогистиоцитарной инфильтрации. Отмечалась диффузно-очаговая лимфогистиоцитарная инфильтрация с примесью нейтрофильных лейкоцитов интерстиция на фоне его умеренного неравномерного отека. Неравномерная умеренная белковая зернистая дистрофия эпителия проксимальных почечных канальцев, вакуольная дистрофия отдельных почечных канальцев. Очаги разрывов базальной мембраны проксимальных канальцев – тубулорексис, кровоизлияния. Неравномерное расширение просветов и признаки атрофии эпителия, вакуольная дистрофия и некрозы единичных групп дистальных канальцев. В просветах канальцев – зернистые эозинофильные массы, цилиндры, слущенные эпителиоциты, выщелоченные эритроциты.

Одновременно, данные патогистологических исследований препаратов почек групп крыс с ОПН, леченой дигидрокверцетином и гиперозидом, выгодно отличались от показателей нелеченого контроля и данных опытных групп крыс, получавших кверцетин и рутин. Визуализировали стадию разрешения ОПН. Кровенаполнение коркового слоя было усилено. Отмечали диффузно-очаговую лимфогистиоцитарную инфильтрацию с примесью нейтрофильных лейкоцитов интерстиция на фоне его умеренного неравномерно отека. Почечные клубочки были сохранены, капсула клубочка расширена за счет отека. Неравномерно выраженная, умеренная белковая зернистая дистрофия эпителия проксимальных почечных канальцев сохранялась. Были видны: единичные очаги разрывов базальной мембраны проксимальных канальцев – тубулорексис, кровоизлияния; неравномерное расширение просветов, атрофия и некрозы единичных групп дистальных

канальцев. В просветах единичных канальцев обнаруживали зернистые эозинофильные массы (фокусы тиреоидизации), слущенные эпителиоциты, единичные выщелоченные эритроциты.

По результатам оценки морфологических параметров препаратов почек крыс доминирующими лечебными схемами были определены: монотерапия гиперозидом и монотерапия дигидрокверцетином, так как была видна картина разрешающей стадии ОПН. Эффективность двух других схем лечения была значительно ниже, так как была видна картина олигоанурической стадии ОПН.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования расширили представление о почечном эффекте БАС класса флавоноидов кверцетина, дигидрокверцетина, рутина и гиперозида. Все соединения обладают диуретическим действием: кверцетин – коротким 4-х ч эффектом, дигидрокверцетин, рутин и гиперозид – длительным суточным эффектом. Определены оптимальные диуретические дозы исследуемых БАС при энтеральном введении: для дигидрокверцетина и гиперозида – 1 мг/кг, для кверцетина и рутина – 5 мг/кг. Следовательно, более перспективными БАС для использования в терапии ОПН являются дигидрокверцетин и гиперозид, обладающие длительным эффектом и минимальной активной дозой.

Проведен анализ механизма диуретического действия кверцетина и его производных при внутримышечном введении в оптимальных диуретических дозах на уровне нефрона: оценено влияние на работу клубочкового фильтра (по клиренсу креатинина), а также на канальцевый транспорт натрия (по экскретируемой фракции натрия) и на реабсорбцию воды (по концентрационному индексу креатинина). Было установлено, что кверцетин первично стимулирует клубочковую фильтрацию и параллельно во все периоды наблюдения значительно угнетает канальцевый транспорт натрия. Дигидрокверцетин и гиперозид одновременно увеличивают клубочковую фильтрацию и угнетают канальцевую реабсорбцию. Рутин угнетает транспорт натрия и воды в нефроне без изменения клубочковой фильтрации.

Вопрос о применении диуретиков при ОПН окончательно не решен. Речь идет о выборе препаратов, соответствующих доз, времени введения, химической структуре соединений, механизме их действия и других параметров. В литературе есть указания на то, что диуретики при ОПН могут увеличить тяжесть патологии или быть неэффективными (Дядык А.И., и др., 2020). С другой стороны, описано, и положительное влияние мочегонных средств на тяжесть нефропатии (Дубищев А.В., 1991). В этом плане заслуживает внимание вопрос об эффективности БАС флавоноидной структуры, отдельные работы свидетельствуют о положительном воздействии флавоноидов на течение ОПН (Беловол А., и др., 2012; Дубищев А.В., 1991; Зверев Я.Ф., и др., 2023; Alasmari A.F., et al., 2021).

На модели ишемической ОПН было показано, что ежедневное введение крысам (7 дней)

исследуемых соединений в тех же дозах вызывало значительное увеличение диуреза по сравнению с контролем в течение первых четырех суток наблюдения, на третьи сутки в разгар ОПН резко возрастал клиренс креатинина (клубочковая фильтрация). Экскреция белка и ЛДГ снижалась под влиянием дигидрокверцетина, рутина, гиперозида, выделение ГГТ – под действием кверцетина. Это свидетельствует об ослаблении тяжести ОПН.

Ультразвуковое исследование (УЗИ) методом ультразвуковой допплерографии со спектральным анализом (УЗДГ) на седьмые сутки постишемического периода показало, что гиперозид и дигидрокверцетин доминируют по эффективности положительного влияния на почечное кровообращение. Они увеличивают диаметр почечной артерии, скорость кровотока в ней, уменьшают индекс резистивности. Кверцетин и рутин действуют слабее.

Морфологические исследования почек с постишемической ОПН, проведенные на 3-ий день эксперимента, подтвердили результаты опытов с нефропротекторным действием исследуемых БАС. Проводя сравнительную оценку эффективности БАС по гистологическим критериям можно сделать заключение о более выраженном нефропротекторном действии гиперозида и дигидрокверцетина (визуализирована стадия разрешения ОПН) по сравнению с кверцетином и рутином (визуализирована стадия разгара ОПН). Это проявляется не только в нормализации кровообращения, но и в большей сохранности нефроцитов.

Наиболее эффективными оказались дигидрокверцетин и гиперозид. Они увеличивают клубочковую фильтрацию, нормализуют почечное кровообращение, кислородное снабжение нефроцитов, их сохранность при ишемической травме. С другой стороны, блокируя транспорт натрия и вторично жидкости в канальцах, препараты препятствуют коллапсированию (спадению) стенок, взаимному сдавлению и некрозу апикальных структур нефроцитов. За счет сохранности клубочковой фильтрации, хорошей проходимости и нормализации почечных канальцев быстрее восстанавливается функция нефронов. Это и лежит в основе нефропротекторного действия исследуемых флавоноидов.

ВЫВОДЫ

1. Кверцетин в оптимальной дозе 5 мг/кг при энтеральном введении стимулирует почечную экскрецию воды и натрия в первые часы наблюдения. Дигидрокверцетин в дозе 1 мг/кг и 5 мг/кг вызывает дозозависимое увеличение выделения воды, натрия, калия и креатинина в течение суток. Рутин в дозе 5 мг/кг стимулирует выведение воды и натрия с нарастанием экскреции электролитов в течение суток. Гиперозид стимулирует суточную экскрецию воды, натрия, калия и креатинина в дозах 1 мг/кг и 5 мг/кг.

2. Изучение механизма диуретического действия препаратов на уровне функционирования нефрона в острых экспериментах показало, что кверцетин при внутримышечном введении в дозе 5 мг/кг стимулирует клубочковую фильтрацию в первые 30

мин, на протяжении всего эксперимента преобладает угнетение канальцевого транспорта натрия. Дигидрокверцетин в дозе 1 мг/кг обладает как клубочковым эффектом в первые 60 мин, так и канальцевым эффектом в последние 60 мин наблюдения. В механизме диуретического действия рутина, введенного в дозе 5 мг/кг внутримышечно, преобладает блокада транспорта натрия и воды в почечных канальцах. Гиперозид в дозе 1 мг/кг увеличивает диурез одновременно, как за счет увеличения клубочковой фильтрации в течение 90 мин, так и за счет угнетения канальцевой реабсорбции натрия в первые 60 мин наблюдения.

3. На модели ишемической ОПН было показано, что ежедневное введение кверцетина, дигидрокверцетина, рутина и гиперозида в течение 7 дней в оптимальных дозах вызывает значительное увеличение диуреза, натрийуреза, калийуреза, креатининуреза в первые 5 дней постишемического периода. Максимальный эффект проявляется на 2-4 сутки. Возрастание почечной экскреторной функции ослабляет признаки олигоанурической стадии ОПН.

4. Анализ биохимических показателей крови и мочи (маркеров почечной недостаточности), проведенный на 3, 5 и 7 сут постишемического периода показывает стойкое уменьшение протеинурии под действием всех изучаемых соединений во все периоды наблюдения. Клиренс креатинина увеличивается под действием препаратов в основном на 3 сут наблюдения. Экскреция лактатдегидрогеназы и гаммаглутамилтрансферазы снижается под действием отдельных соединений в отдельные дни наблюдения.

5. Ультразвуковое исследование с допплерографией со спектральным анализом почечного кровообращения, проведенные на 7 сут постишемического периода, показывают выраженное нормализующее действие дигидрокверцетина и гиперозида на параметры сосудов и кровообращения. Положительный эффект кверцетина и рутина выражен слабее.

6. Патогистологическое исследование, проведенное на 3 сут постишемической ОПН, показывает признаки восстановления клубочково-канальцевого аппарата почек под действием кверцетина и его производных. Визуализирована картина начальной стадии ОПН у нелеченых животных контрольной группы, стадии разрешения – у животных, леченых дигидрокверцетином и гиперозидом, стадии разгара – у животных, леченых кверцетином и рутином.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Рекомендуется продолжить выделение и поиск соединений с диуретической и нефропротекторной активностью среди производных кверцетина.

2. Рекомендуется детально исследовать в расширенных доклинических исследованиях выявленные в экспериментах на крысах нефропротекторные свойства кверцетина, дигидрокверцетина, рутина и гиперозида при постишемической ОПН.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ и/или входящих в международные базы данных Scopus и Web of Science:

1. Зайцева, Е.Н. Нефропротекторные свойства кверцетина и его производных при экспериментальной ишемической острой почечной недостаточности / Е.Н. Зайцева, **А.И. Алтарева,** А.В. Дубищев, В.А. Куркин, О.А. Гусякова, Н.В. Чернова // Химико-фармацевтический журнал. – 2024. Т. 58, №6. – С. 42-47. https://doi.org/10.30906/0023-1134-2024-58-6-42-47

2. Зайцева, Е.Н. Влияние кверцетина и его производных на экскреторную функцию почек крыс / Е.Н. Зайцева, **А.И. Алтарева,** А.В. Дубищев, В.А. Куркин, О.В. Шарова // Химико-фармацевтический журнал. – 2024. Т. 58, №2. – С. 13-18. https://doi.org/10.30906/0023-1134-2024-58-2-13-18

3. Урбанчик, Е.А. Фитохимическое и фармакологическое исследование активных веществ и сухих экстрактов почек тополя краснонервного (POPULUS RUBRINERVUS Hort. Alb.) различной полярности / Е.А. Урбанчик, В.А. Куркин, Е.Н. Зайцева, В.М. Рыжов, А.В. Дубищев, А.С. Цибина, **А.И. Алтарева,** Ю.Д. Сироткина // Фармация и фармакология. – 2023. – Т. 11. – №4. – С. 301-311. https://doi.org/ 10.19163/2307-9266-2023-11-4-301-311

4. Kurkin, V.A. Diuretic Activity of Flavonoids and Dense Extract of Spreading Marigold Flowers / V.A. Kurkin, E.N. Zaitseva, A.V. Kurkina, A.E. Savelyeva, **A.I. Klimova,** A.S. Tsibina // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2023. – Vol. 11. – No. 56. P. 1462-1465. https://doi.org/10.1007/s11094-023-02814-3

5. Куркин, В.А. Диуретическая активность флавоноидов и густого экстракта цветков бархатцев отклоненных / В.А. Куркин, Е.Н. Зайцева, А.В. Куркина, А.Е. Савельева, **А.И. Климова,** А.С. Цибина // Химико-фармацевтический журнал. – 2022. – Т. 56. – № 11. – С. 33-36. https://doi.org/10.30906/0023-1134-2022-56-11-33-36

6. Куркин, В.А. Изучение влияния флавоноида гиперозида на выделительную функцию почек / В.А. Куркин, Е.Н. Зайцева, Н.А. Волкова, **А.И. Климова,** О.Е. Правдивцева, А.В. Дубищев // Традиционная медицина. – 2021. – Т. 3. – № 69. – С. 58-61. https://doi.org/10.54296/18186173_2022_3_58

Публикации в материалах конференций:

1. **Алтарева, А.И.** Исследование влияния кверцетина и дигидрокверцетина на выделительную функцию почек / **А.И. Алтарева** // Материалы всероссийской научно-практической конференции молодых ученых с международным участием «Аспирантские чтения – 2022: Молодые ученые – медицине. Технологическое предпринимательство как будущее медицины. SIMS – 2022: Samara International Medical Science», Самара, 2022 г., С. 259-

262.

2. Зайцева, Е.Н. Гиперозид и почки / Е.Н. Зайцева, **А.И. Алтарева,** В.А. Куркин, А.А. Абрамова // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии. 2022. – С. 93-96. (Сборник материалов научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы химической безопасности в сфере фармацевтической и медицинской науки и практики», Пермь, 14-15 декабря 2022 г.)

3. **Алтарева, А.И.** Локализация и механизм действия кверцетина и его производных на клубочковую фильтрацию и канальцевый транспорт натрия / **А.И. Алтарева** // Материалы всероссийской научно-практической конференции молодых ученых с международным участием «Аспирантские чтения – 2023: Молодые ученые – медицине. Технологическое предпринимательство как будущее медицины. SIMS – 2023: Samara International Medical Science», Самара, 25 октября 2023 г., С. 310-313.

4. **Алтарева, А.И.** Влияние кверцетина и его производных на экскреторную функцию почек в норме и при экспериментальной почечной недостаточности натрия / **А.И. Алтарева,** Е.Н. Зайцева // **Экспериментальная и клиническая фармакология:** приложение. – 2023. – С. 8. (Материалы VI Съезда фармакологов России «Смена поколений и сохранение традиций. Новые идеи – новые лекарства», «КЛЯЗЬМА», 20-24 ноября 2023 г.)

Объекты интеллектуальной собственности:

1. Зайцева Е.Н., **Алтарева А.И.,** Куркин В.А., Правдивцева О.Е., Абрамова А.А., Волкова Н.А. Применение гиперозида в качестве диуретического, салуретического и креатининуретического средства. Патент на изобретение RU 2802832 C1, 04.09.2023 г.

2. Зайцева Е.Н., **Алтарева А.И.,** Куркин В.А., Абрамова А.А., Савельева А.Е. Применение кверцетина в качестве диуретического, салуретического и креатининуретического средства. Патент на изобретение RU 2802833 C1 04.09.2023 г.

3. Зайцева Е.Н., **Алтарева А.И.,** Куркин В.А., Цибина А.С., Шарова О.В. Применение дигидрокверцетина в качестве диуретического, салуретического и креатининуретического средства. Патент на изобретение RU 2802874 C1, 05.09.2023 г.

4. Куркин В.А., Зайцева Е.Н., Волкова Н.А., Правдивцева О.Е., Цибина А.С., **Климова А.И.** Средство, обладающее креатининуретическим действием. Патент на изобретение RU 2800375 C1, 20.07.2023 г.