

© М.В. Оглуздина, А.В. Смирнов, 2002
УДК [616.63-008.6.001.5:616.149:612.12]-08

М.В. Оглуздина, А.В. Смирнов

ДЕЙСТВИЕ ФЕНИБУТА НА АВТОРИТМИЧЕСКУЮ СОКРАТИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК ВОРОТНОЙ ВЕНЫ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ КРОВИ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ УРЕМИЕЙ

M. V. Ogluzdina, A. V. Smirnov

EFFECTS OF PHENIBUT ON AUTORHYTHMICAL CONTRACTILE ACTIVITY OF THE PORTAL VEIN SMOOTH MUSCLE CELLS AND BIOCHEMICAL PARAMETERS OF BLOOD OF RATS WITH EXPERIMENTAL UREMIA

Научно-исследовательский институт нефрологии Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, Россия

РЕФЕРАТ

В опытах *in vivo* исследовано влияние фенибута в дозе 10 мг/кг на функциональную активность гладкомышечных клеток (ГМК) воротной вены и биохимические показатели крови крыс с экспериментальной ХПН. Длительное введение фенибута в указанной дозе (1 и 2 месяца) препятствовало подавлению функциональной активности ГМК воротной вены и оказывало нормализующее действие на уровень щелочной фосфатазы у крыс с ХПН.

Ключевые слова: фенибут, хроническая почечная недостаточность, экспериментальная уремия, субтотальная нефрэктомия, щелочная фосфатаза.

ABSTRACT

Effects of Phenibut in dosage 10 mg/kg on functional activity of the portal vein smooth muscle cells (SMC) and biochemical parameters of blood of rats with experimental chronic renal failure (CRF) were investigated in *in vivo* experiments. Continuous administration of Phenibut in this dose during 1-2 months was shown to prevent the suppression of functional activity of SMC of the portal vein and exerted a normalizing influence upon the level of alkaline phosphatase in CRF rats.

Key words: Phenibut, chronic renal failure, experimental uremia, subtotal nephrectomy, alkaline phosphatase.

ВВЕДЕНИЕ

В предыдущих работах было показано, что производное гамма-аминомасляной кислоты фенибут у крыс с нефрэктомией оказывает нормализующее действие на функциональную активность воротной вены и ритмоинотропные отношения в миокарде: ослабляет повышенную активность у крыс с уремией I степени и препятствует резкому снижению функциональной активности гладкомышечных клеток (ГМК) и кардиомиоцитов, характерному для развития уремии II степени [1,4].

Уменьшение массы функционирующей паренхимы почки сопровождается снижением фильтрации ряда гормонов, в том числе кальций регулирующих, и накоплению их в крови. В результате развиваются тяжелые нарушения обмена кальция [1]. Стойкое увеличение концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле вызывает необра-

тимые нарушения функциональной активности клеток различных тканей, и в конечном итоге – их гибель [7,8].

Так как эффект фенибута осуществляется путем снижения поступления ионов кальция в гладкомышечные клетки сосудов и кардиомиоциты [2-4], то установленные механизмы регулирующего действия фенибута на сосуды и миокард могут служить основой рекомендаций по эффективному применению его в медицинской практике для коррекции функционального состояния сосудистых гладких мышц и миокарда при таких тяжелых и распространенных заболеваниях, как гипертензия, болезни почек и гиперпаратиреоз.

При этом встает вопрос, не будет ли фенибут оказывать токсическое действие на пациентов с этими заболеваниями. Ранее клинические испытания фенибута осуществлялись с 1963 года

Таблица 1

**Биохимические параметры ($\bar{X} \pm m$) крови и мочи крыс
после нефрэктомии**

Параметр	Срок после операции		
	контроль	1 месяц	2 месяца
Сыворотка крови			
Мочевина, ммоль/л	5,22±0,24	13,3±0,7**	16,4±0,4**
Креатин, мкмоль/л	57,12±11,38	92,75±21,94**	110,12±6,14**
Мочевая кислота, мкмоль/л	61,25±9,98	82,97±2,97**	93,65±7,45**
Са общий, ммоль/л	2,39±0,11	2,34±0,02	2,39±0,05
Са 2+, ммоль/л	1,15±0,03	0,87±0,02**	0,86±0,03**
Белок, г/л	68,69±4,61	68,52±6,34	65,2±3,53
АЛТ, U/l	68,3±13,0	64,67±8,44	66,0±4,6
АСТ, U/l	135,86±20,2	141,33±22,87	144,89±19,91
Щелочная фосфатаза, U/l	187,0±59,2	432,33±27,48**	384,6±99,3**
ГГТ, U/l	1,8±0,8	1,0±0,7	1,4±0,8
Холестерин, ммоль/л	0,79±0,13	1,22±0,62	1,12±0,23
Триглицериды, ммоль/л	1,04±0,15	1,16±0,30	1,45±0,31
Глюкоза, ммоль/л	7,69±0,81	6,69±0,8	7,72±0,42
Моча			
Белок, г/л	0,29±0,13	0,89±0,03**	0,80±0,06**
Минутный диурез,	0,0019±0,0005	0,0037±0,0011*	0,002±0,0009
СКФ, мл/мин	0,57±0,01	0,42±0,02*	0,27±0,12*
P, ммоль/сут	7,2±1,4	12,5±3,4**	28,9±3,7**

Примечание: различия достоверны по сравнению с контролем: * - $p < 0,05$; ** $p < 0,01$;
АЛТ – аланин – аминотрансфераза, АСТ – аспартат – аминотрансфераза, ГГТ – гамма-
глутамил-трансфераза, P – фосфор, СКФ – скорость клубочковой фильтрации.

Таблица 2

**Биохимические параметры ($\bar{X} \pm m$) сыворотки крови крыс
с нефрэктомией, получавших фенибут (10 мг/кг)**

Параметр	Срок после операции	
	1 месяц	2 месяца
Мочевина, моль/л	12,47±1,68	13,68±2,98
Креатин, мкмоль/л	91,0±11,19	99,83±17,90
Мочевая кислота, мкмоль/л	119,4±30,48	80,17±10,71
Са общий, ммоль/л	2,63±0,13	2,39±0,20
Белок, г/л	59,6±5,27	64,33±5,09
АЛТ, U/l	49,4±13,44	64,67±8,44
АСТ, U/l	156,2±12,89	175,6±37,27
Щелочная фосфатаза, U/l	245,0±84,1**	251,43±37,03**
ГГТ, U/l	1,4±0,8	1,17±0,37
Холестерин, ммоль/л	1,34±0,19	1,07±0,08
Триглицериды, ммоль/л	1,42±0,09	1,13±0,46
Глюкоза, ммоль/л	5,94±1,64	6,83±0,90

Примечание: различия достоверны по сравнению с параметрами крыс с нефрэктомией
через 1 и 2 месяца после этапа операции: * - $p < 0,05$; ** $p < 0,01$;
АЛТ – аланин – аминотрансфераза, АСТ – аспартат – аминотрансфераза, ГГТ – гамма-
глутамил-трансфераза.

в Ленинградском НИИ им. Бехтерева (899 человек) и в 15 клиниках бывшего Советского Союза. Фенибут оказался эффективным и безопасным средством в применяемых дозах (0,15 – 3,5 г в день), отмечали его мягкое действие и отсутствие каких-либо токсических явлений даже при длительном (3 – 4 недели) лечении [5]. В литературе нами не были обнару-

жены данные о влиянии фенибута на больных с заболеваниями почек и экспериментальных животных с уреимией. Поэтому основной целью данной работы явилось исследование действия фенибута на биохимические параметры крови крыс экспериментальной уреимией. Кроме того, был проведен сравнительный анализ биохимических показателей и физиологической активности гладкомышечных клеток (ГМК) воротной вены исследуемых крыс.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для создания экспериментальной уремии применяли метод субтотальной нефрэктомии (НЭ), традиционно использующийся при изучении патогенеза уремии и получивший оценку как модель хронической почечной недостаточности (ХПН), при которой значительная редукция функциональной массы сочетается с прогрессирующим гломерулярным склерозом и протеинурией [6, 13, 14]. Животным удаляли полюса одной почки, а спустя 7 дней удаляли вторую почку. В целом объем удаленной ткани составил 75 – 85%. Оба этапа операции проводились под эфирным наркозом. Развитие уремии

отслеживали по биохимическим показателям крови и мочи с использованием унифицированных методик. Крысы получали фенибут в дозе 10 мг на 200 г массы тела в течение 1 и 2 месяцев после второго этапа операции.

Фенибут был предоставлен проблемной лабораторией нитросоединений РГПУ им. Герцена (зав. каф. В.М. Берестовицкая).

Сокращения фрагментов воротной вены (ВВ) крысы регистрировались с помощью механоэлектрического преобразователя 6МХ1С в изометрическом режиме в растворе Кребса при $t^0 = +34^0\text{C}$, pH 7,4. Сигнал фиксировался в оперативной памяти компьютера с последующей записью на магнитном диске и автоматизированной обработкой электромиограмм по специально разработанной программе. Данные обрабатывались статистически с применением критериев Стьюдента и Вилкоксона.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При развитии хронической почечной недостаточности повышается концентрация в крови вазоактивных веществ в связи с активацией синтеза одних (ангиотензин и др.) и подавлением процессов расщепления и выведения других (креатинин, паратиреоидный гормон и др.) [12], что приводит к нарушению проницаемости стенки магистральных сосудов и капилляров. Изменение проницаемости гломерулярных капилляров является субстратом развития протеинурии – одного из ранних признаков нарушения функции почек. Действительно, через 1 месяц после 2-го этапа нефрэктомии содержание белка в моче у экспериментальных животных было увеличено в среднем на 206,9% (табл.1), наблюдался рост фосфора на 73,6%. При этом скорость клубочковой фильтрации снижалась в среднем на 26,3%, а минутный диурез увеличивался на 94,7%. В это время в сыворотке крови наблюдался рост содержания мочевины в среднем на 154,8%, креатинина на 62,4%, мочевой кислоты на 35,5% и активности щелочной фосфатазы в среднем на 131,2%. Уровень ионизированного кальция крови при этом снижался на 24,4%. Таким образом, через 1 месяц после нефрэктомии у животных развивалась уремия I степени.

О развитии уремии I степени свидетельствовал и характер функциональной активности ГМК ВВ: наблюдался рост частоты авторитмической сократительной активности на $37,8 \pm 3,5\%$, общей амплитуды сокращений на $102,2 \pm 4,8\%$ и выполняемой веной работы на $96,4 \pm 14,3\%$ (рис. 1).

При развитии патологического процесса у нефрэктомированных крыс наблюдалось ухудшение функции почки. Через 2 месяца после 2-го этапа операции в моче рост содержания белка и фосфора составлял 175,9 и 301,4%, соответственно. Скорость клубочковой фильтрации снижалась на 52,6%, а минутный диурез увели-

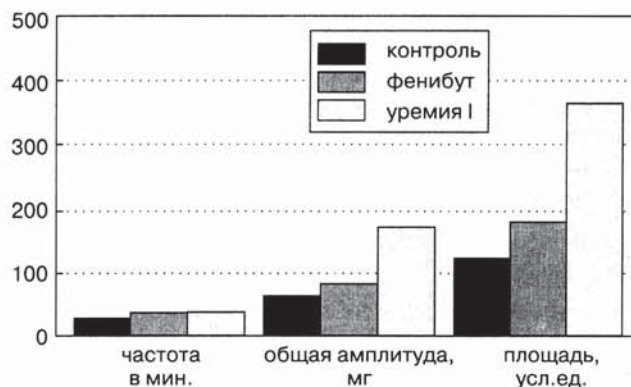


Рис. 1. Параметры авторитмической сократительной активности ГМК ВВ крыс линии Вистар (контроль), крыс с уремией I степени и получавших фенибут (10 м/кг) в течение 1 месяца после нефрэктомии.

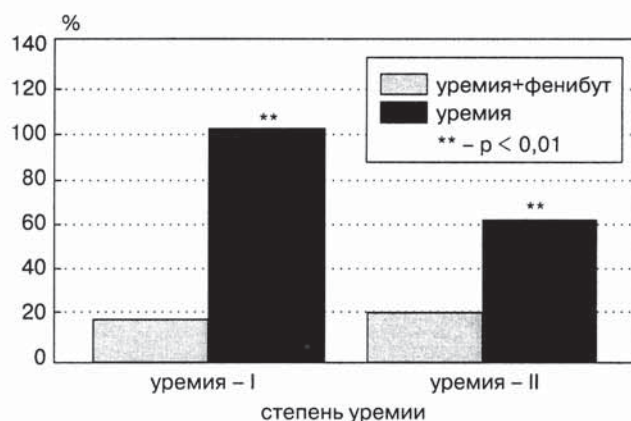


Рис. 2. Изменение активности щелочной фосфатазы крови крыс с уремией по сравнению с контролем.

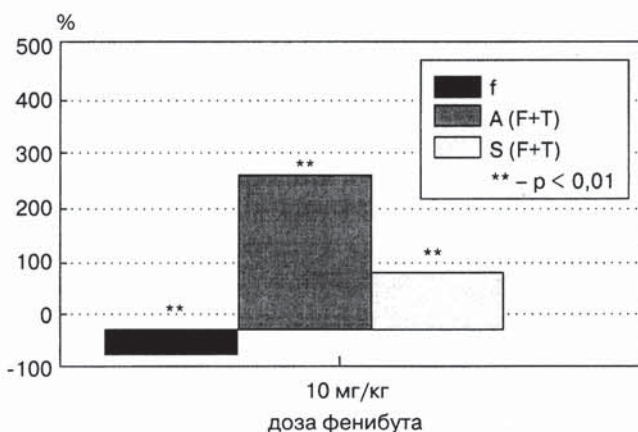


Рис. 3. Действие фенибута на функциональную активность ГМК ВВ нефрэктомированных крыс по сравнению с животными, не получавшими препарат.

чивался в среднем на 52,6% (см. табл.1). Рост концентрации мочевины в сыворотке крови составлял в среднем 214,2%, креатинина – 92,8%, мочевой кислоты – 52,9% и активность щелочной фосфатазы увеличивалась на 105,7%. Концентрация ионов кальция оставалась сниженной в это время на 25,2%. Изменения биохимических параметров крови и мочи крыс свидетельствовали о развитии уремии II степени, что подтверждалось и резким снижением

функциональной активности ГМК ВВ: частота авторитмической сократительной активности ВВ увеличивалась на $52,9 \pm 4,7\%$, снижалась общая амплитуда сокращений на $32,9 \pm 3,4\%$ и выполняемая веной работа на $24,2 \pm 4,0\%$.

На протяжении двух месяцев после нефрэктомии в сыворотке крови экспериментальных животных не наблюдалось достоверных изменений в активности аланин – и аспартат-аминотрансфераз, гамма-глутамил-трансферазы. Содержание общего белка, холестерина, триглицеридов, глюкозы и общего кальция в крови нефрэктомизированных животных не отличалось от контроля (см. табл. 1).

Введение фенибута в дозе 10 мг/кг в течение 1 и 2 месяцев после нефрэктомии не оказывало влияния на биохимические показатели сыворотки крови по сравнению с нефрэктомизированными животными, не получавшими препарат (табл. 2). Исключение составила щелочная фосфатаза, активность которой у крыс, получавших фенибут, не отличалась достоверно от этого показателя у интактных крыс линии Вистар (рис. 2). Следовательно, фенибут оказывал нормализующее действие на активность щелочной фосфатазы в крови животных с уреимией.

При этом фенибут оказывал нормализующее действие и на функциональную активность ГМК ВВ.

У животных, получавших фенибут в дозе 10 мг/кг в течение одного месяца после второго этапа операции наблюдалось снижение общей амплитуды фазно-тонических сокращений ГМК ВВ в среднем на $37,7 \pm 3,2\%$ и площади под кривой сокращений ВВ на $34,8 \pm 2,6\%$ по сравнению с животными с уреимией I степени, не получавшими препарат. По сравнению с контролем частота авторитмической сократительной активности ГМК ВВ достоверно не изменялась (рис. 3), а общая амплитуда и площадь под кривой сокращений ГМК ВВ были выше в среднем на 28,2 и 13,3%, соответственно. Таким образом, сохранялась относительно нормальная функциональная активность ГМК ВВ.

У крыс, получавших фенибут по 10 мг/кг 2 месяца по сравнению с животными с уреимией II степени наблюдалось снижение частоты авторитмической сократительной активности ГМК ВВ в среднем на $61,1 \pm 3,3\%$, рост общей амплитуды фазно-тонических сокращений на $443,5 \pm 32,0\%$ и площади под кривой сокращений ВВ за 1 минуту на $232,9 \pm 16,3\%$ (рис. 3).

Таким образом, длительное введение фенибута нефрэктомизированным крысам препятство-

вало подавлению функциональной активности ГМК воротной вены, характерному для развития экспериментальной уремии II степени.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что одним из ведущих патогенетических агентов, обуславливающих метаболические сдвиги при экспериментальной уремии, является паратиреоидный гормон (ПТГ) [10]. Токсическое действие гормона на ГМК сосудов и кардиомиоциты обусловлено избыточным накоплением кальция в ЦП и митохондриях [11].

Перегрузка клеток кальцием приводит к нарушению энергетического обмена, изменению функции ферментов мембран, рецепторов и каналов и, в конечном итоге, к гибели клеток [7,8].

При развитии уремии у больных с хронической почечной недостаточностью избыточная концентрация ПТГ в крови приводит к усилению процессов резорбции кости и поражению скелета (остеомаляция и фиброзный остит), которое сопровождается резким возрастанием активности щелочной фосфатазы в крови [9]. В настоящей работе также было показано, что при развитии экспериментальной уремии у крыс наблюдалось увеличение активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови. Длительное введение фенибута нефрэктомизированным крысам оказывало нормализующее влияние на активность щелочной фосфатазы, что может быть обусловлено тем, что фенибут снижал токсическое действие ПТГ на кость. Ранее нами было показано, что у крыс линии Вистар, спонтанно гипертензивных крыс и крыс с уреимией в экспериментах *in vitro* фенибут препятствовал развитию токсического действия ПТГ на сосуды, видимо, путем уменьшения избыточного поступления ионов Ca^{2+} в ГМК [4].

Таким образом, полученный экспериментальный материал свидетельствует, что нормализующее действие фенибута на измененную функциональную активность ГМК ВВ и активность щелочной фосфатазы крыс с уреимией I и II степени может быть следствием его восстанавливающего влияния на гомеостаз кальция. Фенибут восстанавливает избирательную проницаемость клеточных мембран, снижает вход кальция в клетку через потенциалзависимые и хемочувствительные кальциевые каналы мембраны. Кроме того, фенибут активизирует обмен Ca^{2+} между кальциевыми пулами и сократительными бел-

ками в ГМК, снижая таким образом зависимость функциональной активности ГМК сосудов крыс с уремией от поступления внеклеточного Ca^{2+} .

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в работе данные о снижении фенибутом выраженности эффекта нефрэктомии на сосуды и его нормализующее действие на активность щелочной фосфатазы сыворотки крови имеют практический интерес для применения этого производного ГАМК в комплексной терапии сопутствующих хронической почечной недостаточности заболеваний сердечно-сосудистой системы в нефрологической клинике.

1. У крыс с нефрэктомией длительное введение фенибута в дозе 10 мг/кг оказывает нормализующее действие на функциональную активность воротной вены: ослабляет повышенную активность у крыс с уремией I степени и препятствует резкому снижению функциональной активности, характерному для развития уремии II степени.

2. Введение фенибута в дозе 10 мг/кг в течение 1 и 2 месяцев препятствует повышению активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови крыс с экспериментальной уремией.

3. Влияние фенибута на функциональную активность воротной вены крыс с экспериментальной уремией осуществляется через снижение поступления ионов кальция в гладкомышечные клетки сосудов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Наточин Ю.В. Гомеостаз кальция и почки // Тер. архив.-1987. -Т.9, N. 8. - С. 7 - 14.
2. Оглуздина М.В., Барабанова Т.А., Пенчул Н.А., Шишкина Л.И., Берестовицкая В.М. Влияние фенибута на функциональную активность гладкомышечных клеток сосудов и миокарда при развитии экспериментальной уремии у крыс// Нефрология.-1997.-Т.1, N 2. - С. 98 - 102.
3. Оглуздина М.В., Барабанова В.В., Берестовицкая В.М., Усик Н.В. Влияние фенильного производного гамма-аминомасляной кислоты фенибута на авторитмическую сократительную активность воротной вены// Российский физиол. журнал им. И.М.Сеченова. - 1998.- Т.84, N 1, 2. -С. 103 - 110.
4. Оглуздина М.В., Барабанова В.В., Парастаева М.М. Уремический токсин - паратиреоидный гормон и фенибут// Нефрология.-1998.- Т.2, N 1. - С. 93 - 98.
5. Хвилинский Т.Я. Фенибут//Проспект. - М.:ЦБНТИ медром., 1980. - 16 с.
6. Anderson S., Rennke H.G., Brenner B.M. Therapeutic advantage of converting enzyme inhibitors in arresting progressive renal disease associated with hypertension in the rat// J. Clin. Invest.-1986.-Vol.77.-P.19-93.
7. Cheung J.J., Bonventre J.V., Malis C.D., Jeaf A. Calcium and ischemic injury// New Eng. J. Med.- 1986.- Vol. 314, N 26. - P. 1670- 1676.
8. Kroner H., Planker M. The role of calcium in liver damage// Path. Res. Pract.- 1980.- Vol.169, N 3.- P.298-303.
9. Liebross B.A., Coburn J.W. Calcium disorders// Ed. D. Heath, S.J.Marx.-London, 1982.- 336 p.
10. Massry L., D. Godstein. Role of parathyroid hormone in uremic toxicity// Kidney Int.- 1978 - Vol.13, N.8 - P.39-42.
11. Nilius B. Calcium and liver cell death// Wiss. Beitr. M.- 1987.- N 99. - S. 108-122.
12. Olson J.L., Wilson S.K., Heptinstall R.H.Relation of glomerular injury to preglomerular resistance in experimental hypertension // Kidney Int.- 1986.- Vol. 29.- P.849.
13. Olson J.L., Hostetter T.H., Rennke H.J. et al. Altered glomerular permselectivity and progressive sclerosis following extreme ablation of renal mass // Kidney Int. - 1982. - Vol.22. - P.112 - 126.
14. Stahl R.A., Thaiss F. Eicosanoids biosynthesis and function in the glomerulus // Renal Physiol. - 1987.- Vol.10. - P.1.

Поступила в редакцию 19.02.2002 г.