© Коллектив авторов, 1998
УДК 612.018.2:[616.63-008.6+616.61-089.87]-092.9

М.В.Оглуздина, В.В.Барабанова, М.М.Парастаева

УРЕМИЧЕСКИЙ ТОКСИН — ПАРАТИРЕОИДНЫЙ ГОРМОН И ФЕНИБУТ

M.V.Ogluzdina, V.V.Barabanova, M.M.Parastaeva

THE UREMIC TOXIN — PARATHYROID HORMONE AND PHENIBUT

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

РЕФЕРАТ

Фенильное производное гамма-аминомасляной кислоты — фенибут — препятствовал развитию токсического действия паратиреоидного гормона на гладкомышечные клетки (ГМК) воротной вены интактных крыс Вистар, крыс с уремией II степени и крыс с уремией, получавших фенибут (10 и 50 мг/кг в день) в течение 1 и 2 мес. При совместном действии паратиреоидный гормон и фенибут оказывали нормализующее влияние на авторитмическую сократительную активность ГМК воротной вены крыс с уремией I степени и спонтанно гипертензивных крыс (SHR), характеризующихся повышенной функциональной активностью ГМК.

Ключевые слова: фенибут, паратиреоидный гормон, авторитмическая сократительная активность, экспериментальная уремия, субтотальная нефрэктомия.

ABSTRACT

The GABA derivative phenibut was found to prevent the development of toxical effect of the parathyroid hormone (PTH) on the smooth muscle cells (SMC) of the portal vein in Wistar rats, in rats with the second stage uremia and rats which received phenibut (10 and 50 mg/kg daily) during 1 and 2 months. When used together the PTH and phenibut had a normalizing effect on spontaneous contractile activity of the portal vein smooth muscle cells in rats with the first stage uremia and spontaneously hypertensive rats characterized by increased functional activity of the SMC.

Key words: phenibut, parathyroid hormone, spontaneous contractile activity, experimental uremia, subtotal nephrectomia.

ВВЕДЕНИЕ

Паратиреоидный гормон (ПТГ) — один из основных регуляторов гомеостаза кальция в организме. Но при уменьшении количества функционирующих нефронов паратиреоидный гормон является одним из патогенетических агентов, обуславливающих метаболические сдвиги в организме [7]. Токсическое действие ПТГ реализуется через изменение распределения кальция в клеточных депо и цитоплазме в результате увеличения проницаемости мембран для ионизированного кальция. Стойкое увеличение концентрации ионов Са в клетке приводит к необратимым нарушениям их функции, к перегрузке митохондрий кальцием, нарушению энергетического запаса, изменению функции ферментов мембран, рецепторов, каналов и, в конечном итоге, к гибели клеток [4, 6].

Как нами было показано ранее, длительное введение фенильного производного гамма-аминомасляной кислоты фенибута (10 и 50 мг/кг) нефрэктомированным крысам препятствовало подавлению функциональной активности ГМК воротной вены (ВВ), характерному для развития ХПН II степени [2]. Возможно, действие фенибута реализовалось через подавление токсического влияния ПТГ на ГМК ВВ.

Целью данного исследования был сравнительный анализ действия ПТГ на ГМК ВВ контрольных крыс Вистар, крыс с уремией и SHR.

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 котором значительная редукция функциональной массы сочетается с прогрессирующим гломерулярным склерозом и протеин-

Таблица 1

Действие паратиреоидного гормона ($4{,}0 \cdot 10^{-9}$ моль/л) на воротную вену крыс ($\bar{X} \pm m$)

Серия крыс	Время воздействия, мин	Частота сокращений, %	Общая амплитуда, %	Общая площадь, %
Вистар (n=7)	2	81,7±7,5*	112,6±3,7**	111,5±3,8*
	5	82,3±6,7*	76,2±11,3*	82,2±3,3*
	10	87,7±4,3*	65,1±7,7**	74,1±3,0**
Уремия I ст. (n=6)	2	78,3±2,1**	127,7±7,9**	122,7±6,6**
	5	94,7±3,9*	71,7±5,7**	69,0±5,9**
	10	105,0±2,7*	65,0±5,1**	60,3±4,7**
Уремия II ст. (n=7)	2	96,3±2,8*	111,7±0,9**	113,7±7,4**
	5	93,0±10,9	71,7±8,3**	68,7±9,9**
	10	85,7±17,5	63,0±13,9**	59,3±19,6**
SHR (n=8)	2	82,8±4,7**	124,5±5,3**	120,4±4,7**
	5	92,3±2,0*	69,7±5,6**	68,2±5,7**
	10	123,4±5,4*	64,7±4,6**	64,3±5,2**

* $p<0{,}05$.

** $p<0{,}01$ — различия достоверны в сравнении с исходными параметрами, принятыми за 100 %.

Примечание. n — число препаратов.

урией [3, 8]. 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 дозах 10 и 50 мг/кг в течение 1 и 2 мес после второго этапа операции.

Эксперименты проводились на фрагментах воротной вены (ВВ) крыс, обладающей авторитмической сократительной активностью. Фрагмент ВВ устанавливали между фиксированным стержнем и датчиком силы (механоэлектрический преобразователь 6МХІС) в специальной ванночке для переживания препарата. Ванночка объемом 5 мл снабжена перфузионной системой термостатирования, обеспечивающей регулируемый поток оксигенированного 95% O_2 и 5% CO_2 раствора Кребса и рабочую температуру раствора 34 °С при pH 7,4. После закрепления фрагмента ВВ производили дозированное натяжение на 20—25% исходной длины, что составляло 1000 мг.

Регистрация сократительной активности фрагмента ВВ производилась в изометрическом режиме. Одновременно с записью на диаграмной ленте самописца Н-327-1 сигнал от механоэлектрического преобразователя обрабатывался с помощью ЭВМ по специальной программе.

В опытах использовали раствор Кребса (NaCl — 118,2; KCl — 14,7; $NaHCO_3$ — 2,5; KH_2PO_4 — 1,2; $MgSO_4$ — 0,09; $CaCl_2$ — 2,25; глюкоза — 11,1 ммоль/л), фенибут в рабочей концентрации $2{,}0 \cdot 10^{-5}$ моль/ л, паратиреоидный гормон в концентрации $4{,}0 \cdot 10^{-9}$ моль/л (фирма Hormon Chemic München).

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

Данные обрабатывали статистически с применением критериев Стьюдента и Уилкоксона.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Паратиреоидный гормон ($4 \cdot 10^{-9}$ моль/л) вызывал двухфазные изменения параметров авторитмической сократительной активности ГМК воротной вены крыс линии Вистар, SHR и крыс с уремией I и II степени.

Первая фаза действия гормона — увеличение функциональной активности ВВ — наблюдалась через 1—2 мин после его добавления в инкубационную среду (табл. 1; рис. 1—3). ПТГ вызвал снижение частоты авторитмической сократительной активности ВВ и увеличение общей амплитуды сокращений, т. е. сохранение нормальных хроноинотропных отношений. При этом отмечался рост площади под кривой сокращений за 1 мин. Первая фаза действия гормона отмечалась во всех опытах, независимо от исходных характеристик функционального состояния препарата ВВ крыс различных линий.

Вторая фаза действия гормона выражалась в снижении функциональной активности ВВ (см. табл. 1; рис. 1—3). Частота авторитмиче-

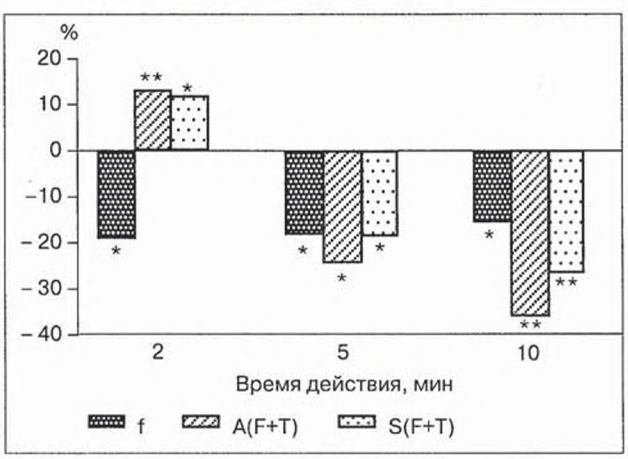

Рис. 1. Изменение авторитмической сократительной активности воротной вены крыс линии Вистар (%) под влиянием паратиреоидного гормона ($4{,}0 \cdot 10^{-9}$ моль/л).

Различия достоверны по сравнению с исходными параметрами: * $p<0{,}05$; ** $p<0{,}01$.

ской сократительной активности у крыс линии Вистар и крыс с уремией II степени оставалась сниженной. У крыс с уремией I степени и SHR на 10-й минуте действия гормона наблюдался рост частоты сокращений. Во всех опытах, независимо от регистрируемой частоты авторитмической сократительной активности, ПТГ вызывал снижение амплитуды фазно-тонических сокращений и площади под кривой сокращений за 1 мин, т. е. наблюдалось уменьшение выполняемой веной работы (см. табл. 1; рис. 1—3).

Действие паратиреоидного гормона исследовали также на фоне предварительного 10-минутного введения фенибута ($2{,}0 \cdot 10^{-5}$ моль/л) в среду переживания фрагмента ВВ крыс линии Вистар, SHR, крыс с уремией I и II степени, крыс с уремией, получавших фенибут по 10 и 50 мг/кг в день в течение 1 и 2 мес.

Добавление фенибута в инкубационный раствор сопровождалось изменением параметров авторитмической сократительной активности ГМК ВВ (табл. 2). Фенибут снижал частоту авторитмической сократительной активности ГМК ВВ крыс всех исследованных групп животных. Амплитуда фазно-тонических сокращений под влиянием фенибута увеличивалась на протяжении всего времени эксперимента у крыс линии Вистар, крыс с уремией I степени и животных с уремией, получавших предварительно фенибут по 50 мг/кг в течение 2 мес. При действии фенибута на ВВ спонтанно гипертензивных крыс (SHR) амплитуда сокращений достоверно увеличивалась лишь на 10-й минуте, в среднем, на 18,4±13,0%.

Общая площадь под кривой сокращений ГМК ВВ за 1 мин под влиянием фенибута in vitro увеличивалась у интактных крыс линии Вистар и крыс с уремией, получавших фенибут в опытах in vivo в дозе 50 мг/кг (см. табл. 2). У крыс с уремией I и II степени, не получавших препарата in vivo, фенибут в опытах in vitro не изменял площадь под кривой сокращений ГМК ВВ. Действие фенибута на ГМК ВВ крыс с уремией, которым предварительно вводили препарат в дозе 10 мг/кг, и крыс SHR вызывало снижение площади под кривой сокращений.

Наиболее интересным эффектом действия фенибута являлось его влияние на базальный тонус ГМК ВВ. Фенибут вызывал значительное снижение базального

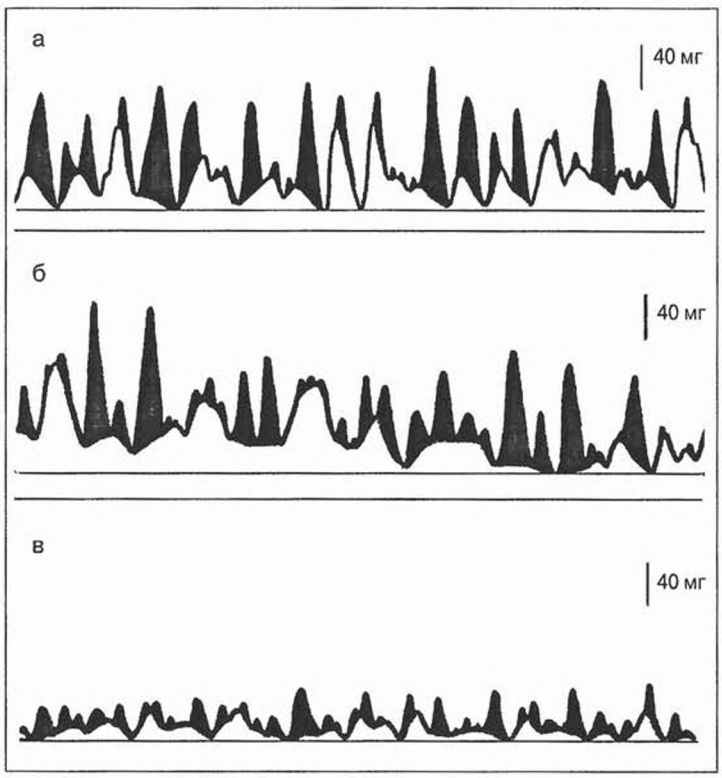

Рис. 2. Действие паратиреоидного гормона ($4{,}0 \cdot 10^{-9}$ моль/л) на авторитмическую сократительную активность воротной вены крысы с уремией II степени (машинная графика).

Здесь и на рис. 3: а — исходная миограмма (время записи — 1 мин); б — 2-я минута действия паратиреоидного гормона; в — 10-я минута действия паратиреоидного гормона.

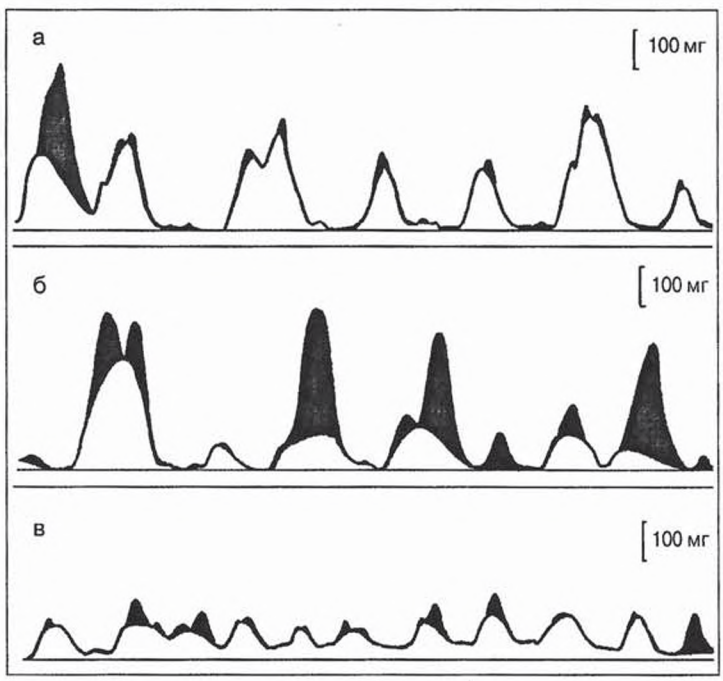

Рис. 3. Действие паратиреоидного гормона ($4{,}0 \cdot 10^{-9}$ моль/л) на авторитмическую сократительную активность воротной вены спонтанно гипертензивных крыс (машинная графика).

Таблица 2

Действие фенибута ($2,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л) на авторитмическую сократительную активность ГМК ВВ крыс ($\bar{X} \pm m$)

Серия крыс	Время воздействия, мин	Частота сокращений, %	Общая амплитуда, %	Общая площадь под кривой сокращений, %	Изменение базального тонуса, мг
Крысы Вистар (n=25)	2	45,0±10,4*	162,3±18,2**	132,7±2,0*	–85,0±33,0**
	5	50,2±12,0*	124,0±10,3**	113,0±7,2*	–84,0±22,0**
	10	73,0±11,2*	127,4±10,0**	121,4±7,8*	–79,0±22,0**
Уремия I ст. (n=5)	2	55,7±9,3**	140,0±12,2**	103,4±3,0	–90,0±30,0**
	5	63,0±11,2**	130,2±9,8**	98,3±2,0	–90,0±30,0**
	10	66,3±11,7**	130,0±15,3**	97,3±10,2	–95,0±30,0**
Уремия II ст. (n=6)	2	80,7±0,3**	101,7±4,3	105,0±10,0	–56,7±4,3**
	5	83,7±2,7**	78,6±7,3*	98,0±4,2	–76,7±16,2**
	10	89,3±12,4	76,7±8,7*	92,7±9,9	–70,0±10,0**
Уремия + фенибут 10 мг/кг — 1 мес (n=5)	2	87,5±8,5*	90,5±5,0*	98,5±5,0	–20,0±0**
	5	92,0±3,0*	71,0±3,0*	86,0±2,0*	–15,0±5,0**
	10	92,0±3,0*	77,0±3,0*	89,5±2,4*	–15,0±5,0**
Уремия + фенибут 10 мг/кг — 2 мес (n=8)	2	72,2±4,8**	92,7±12,3	91,7±8,3	–55,0±5,0**
	5	81,6±3,4*	76,3±8,7**	72,2±7,8**	–58,0±8,0**
	10	78,6±9,6*	76,3±9,8**	70,4±6,6**	–60,0±10,0**
Уремия + фенибут 50 мг/кг — 2 мес (n=6)	2	59,3±9,8**	167,3±12,4**	140,3±6,2**	–43,3±6,7**
	5	60,7±8,9**	133,0±7,6**	129,0±6,0**	–63,3±7,7**
	10	65,0±13,0**	126,5±4,7*	120,0±3,7*	–72,5±12,5**
SHR (n=9)	2	65,2±14,7**	113,5±17,0	94,4±1,2*	–11,3±10,3
	5	65,3±14,0**	103,2±17,2	95,0±7,4	–34,0±10,3*
	10	65,5±14,3**	118,4±13,0*	78,6±12,4*	–31,7±19,3*

* $p<0,05$.

** $p<0,01$ – различия достоверны по сравнению с исходными параметрами, принятыми за 100 %.

Примечание. n — число экспериментов.

тонуса ГМК ВВ на протяжении всего времени эксперимента. Достоверно меньшее снижение базального тонуса ГМК ВВ под влиянием фенибута отмечалось у крыс с уремией, предварительно получавших препарат в дозе 10 мг/кг в течение 1 мес, и крыс SHR (см. табл. 2).

На фоне фенибута ПТГ вызывал снижение частоты авторитмической сократительной активности, увеличение общей амплитуды и площади под кривой сокращений , т.е. рост выполняемой веной работы — I фаза действия гормона, у крыс всех исследуемых групп, кроме крыс с уремией I степени (табл. 3; рис. 4).

II фаза действия гормона , заключающаяся в снижении функциональной активности ВВ , в среде с фенибутом имела место только у крыс с уремией I степени и SHR. На 2—10-й минуте действия ПТГ на авторитмическую сократительную активность ВВ этих групп регистрировалось снижение общей амплитуды сокращений, а с 5—10-й минуты — уменьшение площади под кривой сокращений (см. табл. 3; рис. 4). Фенибут и ПТГ , действуя совместно (рис. 5), снижали площадь под кривой сокращений ГМК ВВ SHR и крыс с уремией I степени, в среднем, на 42,9 и 29,6% соответственно, что свидетельствует об уменьшении выполняемой веной работы. В результате площадь под кривой сокращений ГМК ВВ SHR на 10-й минуте действия ПТГ достоверно не отличалась от значения данного параметра у интактных крыс Вистар (216,4±8,6 и 220,3±4,6 усл. ед. соответственно). Площадь под кривой сокращений ГМК ВВ крыс с уремией I степени была выше, чем у контрольных крыс на 38,3%, но на фоне уменьшения базального тонуса ГМК, в среднем, на 95,0 мг.

ОБСУЖДЕНИЕ

Паратиреоидный гормон вызывал двухфазные изменения авторитмической сократительной активности ГМК ВВ крыс всех экспериментальных серий. Рост фазно-тонической сократительной активности ВВ под влиянием гормона (I фаза действия) обусловлен увеличением входа ионов кальция в результате повышения проницаемости мембраны ГМК ВВ для данного иона [1]. Резкое снижение выполняемой веной работы во II фазу действия ПТГ может быть вызвано перегрузкой клеток Са, приводящей к нарушению энергетического запаса, и нарушением транспорта кальция в ГМК ВВ.

Фенибут в опытах in vitro снижал частоту авторитмической сократительной активности ГМК ВВ крыс исследуемых групп, возможно, вследствие влияния на мембрану пейсмекерных

Таблица 3

Действие паратиреоидного гормона ($4{,}0 \cdot 10^{-9}$ моль/л) на воротную вену крыс на фоне фенибута ($\bar{X} \pm m$)

Серия крыс	t, мин	Частота сокращений, %	Общая амплитуда, %	Общая площадь, %
Вистар (n=8)	2	89,7±6,4**	137,6±10,4**	121,7±6,8*
	5	80,2±9,7*	104,5±5,6	93,8±7,2
	10	85,3±6,4*	83,7±18,2	86,8±12,9
Уремия I ст. (n=5)	2	110,0±10,0	89,5±6,5**	99,5±4,7
	5	114,0±14,2	75,4±4,2*	84,2±9,3*
	10	111,5±12,3	66,5±12,5**	70,4±6,3*
Уремия II ст. (n=6)	2	83,3±6,7**	122,7±2,3**	116,0±4,9*
	5	86,7±13,3	97,7±14,7	94,3±6,8
	10	100,0±4,0	94,5±5,4	95,5±8,3
SHR (n=9)	2	84,9±7,2*	119,6±13,2*	114,0±5,6*
	5	86,2±12,0	95,4±10,9	95,4±10,2
	10	105,3±10,2	75,6±13,0**	78,5±9,4**
Уремия + фенибут 2 мг — 1 мес (n=5)	2	89,3±4,7*	118,7±5,4*	109,3±4,2
	5	102,0±5,3	90,4±8,9	92,2±12,8
	10	105,7±10,0	90,7±12,4	94,6±6,4
Уремия + фенибут 2 мг — 2 мес (n=8)	2	82,4±7,6**	117,6±10,6**	110,3±4,2*
	5	87,4±5,6*	94,5±4,5	98,6±4,9
	10	85,2±8,2*	94,5±5,5	93,6±5,7
Уремия + фенибут 10 мг — 2 мес (n=6)	2	90,0±2,4*	119,0±11,0*	110,4±4,2*
	5	90,8±12,8	102,0±12,0	98,4±6,7
	10	95,0±12,0	89,8±7,7	89,4±8,3

* $p<0{,}05$.

** $p<0{,}01$ — различия достоверны в сравнении с исходными параметрами (10-я минута действия фенибута), принятыми за 100 %.

Примечание. n — число препаратов, t — время воздействия.

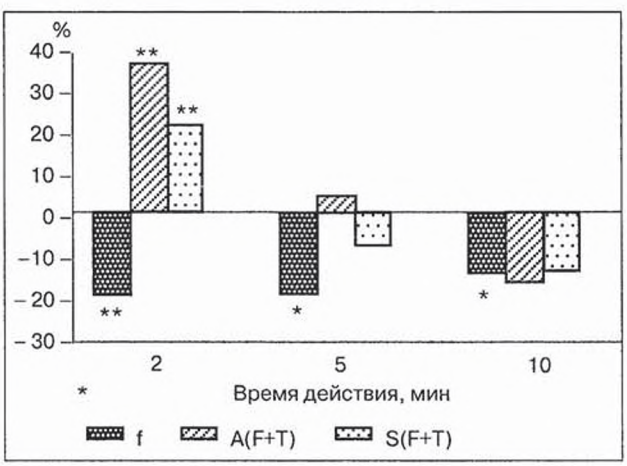

Рис. 4. Изменение авторитмической сократительной активности воротной вены крыс Вистар (%) под влиянием паратиреоидного гормона ($4{,}0 \cdot 10^{-9}$ моль/л) на фоне фенибута.

Различия достоверны по сравнению с исходными параметрами (10-я минута действия фенибута): * $p<0{,}05$; ** $p<0{,}01$.

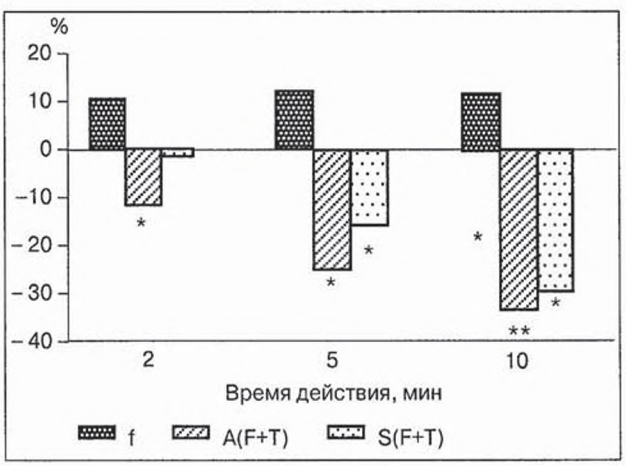

Рис. 5. Изменение авторитмической сократительной активности воротной вены крыс с уремией I степени (%) под влиянием паратиреоидного гормона ($4{,}0 \cdot 10^{-9}$ моль/л) на фоне фенибута.

Различия достоверны по сравнению с исходными параметрами (10-я минута действия фенибута): * $p<0{,}05$; ** $p<0{,}01$.

миоцитов в результате гиперполяризации мембраны. Наблюдаемое увеличение амплитуды фазно-тонических сокращений и площади под кривой сокращений ГМК ВВ интактных крыс линии Вистар и крыс с уремией, получавших в течение 2 мес фенибут в дозе 50 мг/кг in vivo, является следствием сохранения нормальных хроноинотропных отношений. У крыс с уремией I и II степени фенибут в опытах in vitro достоверно не изменял площадь под кривой сокращений ГМК ВВ, тогда как у животных, получавших препарат в дозе 10 мг/кг 1 и 2 мес, и

SHR наблюдалось снижение данного показателя, возможно, в результате изменения числа ГАМКβ-рецепторов в мембране ГМК, агонистом которых и является фенибут. Существуют данные, что в мозге крыс SHR снижено количество и функциональная реактивность ГАМКβ-рецепторов [5].

Уменьшение базального тонуса ГМК ВВ под влиянием фенибута, видимо, обусловлено снижением активности хемочувствительных потенциалнезависимых кальциевых каналов.

Фенибут предотвращал развитие II фазы действия ПТГ на ВВ крыс, заключающуюся в резком снижении авторитмической сократительной активности ГМК, возможно, в результате торможения избыточного поступления ионов кальция в клетки под влиянием ПТГ. Исключение составили препараты ВВ животных с уремией I степени и SHR. ГМК ВВ этих крыс характеризуются высокой функциональной активностью, свидетельствующей об активации транспорта ионов кальция в начальный период развития патологического процесса. Действие ПТГ и фенибута оказывало нормализующее влияние на авторитмическую сократительную активность ГМК ВВ крыс этих групп.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты исследований показали, что фенибут препятствовал развитию II фазы действия ПТГ на ГМК ВВ контрольных крыс Вистар, крыс с уремией II степени и крыс с уремией, получавших предварительно фенибут in vivo. Фенибут и ПТГ при совместном применении оказывали нормализующее действие на авторитмическую сократительную активность ГМК ВВ крыс с уремией I степени и SHR.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барабанова В.В., Давыдова И.Л., Халезова Н.Б. Механизмы действия ПТГ на функциональную активность кардиомиоцитов и ГМК сосудов // Механизмы действия медиаторов и гормонов на эффекторные клетки. Тез. докл. Всес. конф.—Суздаль, 1989. — С. 20.

2. Оглуздина М.В., Барабанова Т.А., Пенчул Н.А. и др. Влияние фенибута на функциональную активность гладкомышечных клеток сосудов и миокарда при развитии экспериментальной уремии у крыс // Нефрология.—1997.— Т.1, № 2.— С. 98—102.

3. 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.

4. Cheung J.J., Bonventre J.V., Malis C.D., Jeaf A. Calcium and ischemic injury // New Engl. J. Med.—1986.—Vol. 314, № 26.—P. 1670—1676.

5. Ichida T., Sasaki S., Takeda K., Kuriyama K., Nakagawa M. Functional alteration of the GABA (B) receptor in the brain of spontaneously hypertensive rats // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.—1995.—Vol. 22, Suppl.1.—P. S51—S53.

6. Kroner H., Planker M. The role of calcium in liver damage // Path. Res. Pract.—1980.—Vol. 169, № 3.—P. 298—303.

7. Mussry S.,Godstein D. Roll of parathyroid hormone in uremic toxicity // Kidney Int.—1978.—Vol., № 8.—P. 39—42.