

© Н.Д.Филипец, В.М.Сирман, А.И.Гоженко, 2014  
УДК [612.273:616.61]-08

*Н.Д. Филипец<sup>1</sup>, В.М. Сирман<sup>2</sup>, А.И. Гоженко<sup>3</sup>*

## МЕХАНИЗМЫ ИОНОРЕГУЛИРУЮЩЕЙ ФУНКЦИИ ПОЧЕК ПРИ ГИСТОГЕМИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ И ВОЗМОЖНЫЕ ПУТИ ЕЕ КОРРЕКЦИИ

*N.D. Filipets, V.M. Sirman, A.I. Gozhenko*

## THE MECHANISMS OF ION REGULATION KIDNEYS FUNCTION IN HISTOHEMIC HYPOXIA AND POSSIBLE WAYS OF ITS CORRECTION

<sup>1</sup>Кафедра фармакологии Буковинского государственного медицинского университета, г. Черновцы, Украина; <sup>2</sup>Координационный центр трансплантации органов, тканей и клеток МОЗ Украины, г. Киев; <sup>3</sup>Украинский научно-исследовательский институт медицины транспорта, г. Одесса

### РЕФЕРАТ

**ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ:** изучение механизмов ионорегулирующей функции почек при развитии гистогемической гипоксии (ГГГ), а также нефропротекторных свойств дилтиазема и флокалина. **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Эксперименты проведены на лабораторных нелинейных белых крысах массой 0,15–0,17 кг после 5% водной нагрузки. ГГГ моделировали введением нитрита натрия в дозе 50 мг/кг и 2,4-динитрофенола в дозе 3 мг/кг. Через 30 дней вводили семь дней внутривенно дилтиазем и флокалин в дозах по 5 мг/кг на 1% слизи крахмала. В моче и плазме крови определяли содержание ионов натрия и калия методом пламенной фотометрии, концентрацию креатинина – колориметрическим методом. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Развитие ГГГ нефропатии у крыс характеризовалось уменьшением скорости клубочковой фильтрации (СКФ), понижением фильтрационной натриевой нагрузки, угнетением канальцевой реабсорбции ионов натрия, увеличением натрийуреза и калийуреза. После введения дилтиазема изучаемые показатели функции почек у крыс с ГГГ не изменялись. Напротив, под влиянием флокалина увеличивались СКФ и фильтрационная фракция ионов натрия, восстанавливалась реабсорбция воды, повышался проксимальный транспорт ионов натрия, уменьшался калийурез. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Оценка почечных эффектов представителей классов модуляторов кальциевых и калиевых каналов показала, что в отличие от дилтиазема, флокалин может рассматриваться как нефропротектор при развитии гистогемического гипоксического поражения почек.

**Ключевые слова:** ионорегулирующая функция почек, гистогемическая гипоксия, дилтиазем, флокалин.

### ABSTRACT

**THE AIM OF RESEARCH** was to study the mechanisms of ion regulation in the kidneys under the conditions of histohemic hypoxia (HHH), as well as the nephroprotective properties of diltiazem and flocalin. **MATERIALS AND METHODS.** The experiments were made on non-linear laboratory white rats with 0.15–0.17 kg weight after 5% water load. HHH was modeled by administration of sodium nitrite at a dose of 50 mg/kg and 2,4-dinitrophenol at a dose of 3 mg/kg. After 30 days we administered diltiazem and flocalin intragastrically at a dose of 5 mg/kg each on 1% starch solution during 7 days. Concentration of sodium and potassium ions in urine and blood plasma was measured with flame photometry, and creatinine concentration was measured with colorimetry technique. **RESULTS.** Progression of histohemic nephropathy in rats was characterized by the decrease of glomerular filtration rate (GFR), decrease of filtrational sodium load, inhibition of tubular sodium reabsorption, increase of natriuresis and kaliuresis. After administration of diltiazem the studied indexes of renal function in rats with HHH did not change. Conversely under the influence of flocalin GFR and filtrational sodium load increased, water reabsorption restored, proximal transport of sodium ions increased, kaliuresis decreased. **CONCLUSION.** Assessment of the renal effects of the representatives of calcium and potassium channels has shown that unlike diltiazem, flocalin can be regarded as a nephroprotective agent under the conditions of histohemic hypoxic lesion of kidneys.

**Key words:** ion regulation in the kidney, histohemic hypoxia, diltiazem, flocalin.

### ВВЕДЕНИЕ

Среди крупных органов первое место по потреблению кислорода занимают почки. Наиболее энергозависимым является канальцевый транспорт и, прежде всего, процесс реабсорбции ионов натрия. Известно, что различные формы гипоксии

являются важнейшими причинами нарушения почечных функций [1]. Однако сложный характер адаптационно-компенсаторных реакций почек не всегда позволяет выявить взаимосвязь между кислородным обеспечением и степенью нарушения канальцевого транспорта. В то же время, понимание патогенеза энергодефицитного повреждения необходимо для решения вопроса медикаментозной защиты почек от кислородной недостаточности.

Филипец Н.Д. Украина, г. Черновцы, 58002, Театральная площадь, д. 2. Буковинский государственный медицинский университет. Тел.: +38(037)22 3 52 62, e-mail: natalya.dmi@gmail.com

Одной из наиболее информативных моделей для изучения гипоксических влияний на деятельность почек является гистогемическая гипоксия (ГГГ). Морфологический анализ нефрона после сочетанного воздействия гистотоксического и гемического прогипоксических факторов выявил структурные изменения клеток клубочкового и канальцевого отделов нефрона, что и обусловило выбор модели ГГГ для проведения исследования [2]. Принимая во внимание ведущую роль дизонии в формировании функционально-метаболических нарушений почек, в качестве потенциальных корректоров гипоксических влияний изучались фармакологические модуляторы ионных каналов. Установление защитной биологической роли активации калиевых каналов и блокады кальциевых каналов при энергетическом дефиците и критическом повышении внутриклеточного пула ионов кальция послужило предпосылкой для исследования ренопротекторных свойств представителей соответствующих классов лекарственных средств [3]. Выбор дилтиазема основывался на научных сведениях о преимущественной способности недигидропиридиновых антагонистов кальция замедлять темпы прогрессирования хронических заболеваний почек [4–6]. Предшествующие наши экспериментальные исследования показали, что фторсодержащий аналог пинацидила активатор аденозинтрифосфатчувствительных калиевых ( $K_{ATФ}$ ) каналов флокалин влияет на гомеостатические функции почек и при физиологических водно-солевых нагрузках, и в условиях формирования токсической сулемовой нефропатии [7–8]. Ренальную фармакодинамику дилтиазема и флокалина обеспечивает прямое или косвенное уменьшение мембранного кальциевого потока через медленные потенциалзависимые кальцевые каналы. Несмотря на специфический, блокирующий вход ионов кальция в клетку, а также учитывая структурно-функциональную гетерогенность ионных каналов, предположение о неоднозначном влиянии на функции почек дилтиазема и флокалина при ГГГ представляется возможным.

Цель настоящей работы заключалась в изучении механизмов ионорегулирующей функции почек при ГГГ, а также протекторных возможностей блокатора кальциевых каналов (БКК) дилтиазема и активатора  $K_{ATФ}$  каналов флокалина в условиях развития гипоксической нефропатии у крыс.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперименты проведены на 28 лабораторных беспородных белых крысах массой 0,15–0,17 кг,

которых содержали на гипонатриевом режиме питания (зерно пшеницы) со свободным доступом к водопроводной отстоянной воде. Исследования выполняли в соответствии с положением «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, которых используют в экспериментальных и других научных целях» (г.Страсбург, 1986).

Гипоксическую нефропатию моделировали однократным подкожным введением 1% раствора метгемоглобинообразователя нитрита натрия (НН) в дозе 50 мг/кг массы тела и последующим (через 30 мин) внутрибрюшинным введением 0,1% раствора динитрофенола (ДНФ) в дозе 3 мг/кг. После введения НН в дозе 50 мг/кг возникает гемическая гипоксия средней степени тяжести [9]. ДНФ является классическим агентом, вызывающим развитие гистотоксической гипоксии вследствие расщепления процессов окисления и фосфорилирования. Таким образом, в нашей модификации формируется комбинированная гистогемическая гипоксическая нефропатия (ГГГН) [10]. Спустя тридцать дней после моделирования ГГГН, группе крыс вводили внутривентрикулярно через металлический зонд дилтиазем (Sanofi, Франция, 5 мг/кг, семь дней) на 1% крахмальной слизи в объеме 5 мл/кг. Другой группе крыс аналогичным способом вводили и субстанцию флокалина (5 мг/кг, семь дней). Интактным (контрольным) и нелеченным (группа с ГГГН) крысам вводили растворитель. Функциональное состояние почек изучали в условиях индуцированного водного диуреза. Через 30 мин после последнего введения всем крысам внутривентрикулярно вводили подогретую до 37 °С водопроводную воду в количестве 5% от массы тела и помещали на два часа в обменные клетки для сбора мочи. Эвтаназию проводили под нембуталовым наркозом (1% раствор этаминала натрия, 20 мг/кг). В моче и плазме крови определяли количество ионов натрия и калия методом фотометрии пламени на ФПЛ-1. Концентрацию креатинина в моче – методом Фолина, в плазме крови – методом Поппера в модификации Мерзона по реакции с пикриновой кислотой с последующей колориметрией на спектрофотометре СФ-46 [11]. Стандартизированные по клубочковой фильтрации (КФ) и массе тела показатели рассчитывали по общепринятым формулам [12]. Статистический анализ межгрупповых отличий проводили при помощи компьютерной программы »Statgrafics» с использованием t-критерия Стьюдента. В ходе изложения результатов исследований указывались только статистически достоверные отличия ( $p < 0,05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты экспериментов показали, что в условиях развития гипоксической нефропатии после введения НН и ДНФ ионорегулирующая функция почек характеризовалась уменьшением в 1,6 раза натрийуреза и в 1,3 раза калийуреза на фоне сохраненного в пределах нормы диуреза. При неизменившихся значениях концентрации ионов натрия и калия в крови экскреция осмотически активных электролитов снижалась вследствие угнетающих влияний гипоксии на клубочковые и канальцевые процессы в нефроне. СКФ у крыс с моделью ГГН уменьшалась в 1,6 раза (рис. 1), в 1,5 раза снижались фильтрационный заряд и реабсорбированная фракция ионов натрия, проксимальная реабсорбция ионов натрия уменьшалась в 1,6 раза (рис. 2), снижение относительной реабсорбции воды составляло 3%.

После введения БКК дилтиазема показатели СКФ, фильтрационной и реабсорбированной фракций ионов натрия, проксимального транспорта ионов натрия, относительной реабсорбции воды у крыс с ГГН оставались на прежнем уровне и были ниже контрольных величин. Значения диуреза и возросшие величины калийуреза соответствовали показателям нормы. Дилтиазем не уменьшал активируемых гипоксией ренальных влияний ренин-ангиотензиновой системы (РАС). Стандартизированный по КФ показатель дистального транспорта ионов натрия был в 1,5 раза выше, чем в контрольной группе.

Активация  $K_{ATP}$  каналов более благоприятно сказывалась на реакциях почечных процессов у крыс с гипоксической нефропатией. По сравнению с нелеченной группой после введения флокалина СКФ увеличивалась в 1,9 раза и достигала контрольного значения (см. рис. 1). Аналогичная направленность была характерна для показателей фильтрационной и реабсорбированной фракций ионов натрия, а также и для относительной натриевой реабсорбции. Величины относительной реабсорбции воды и диуреза после применения флокалина соответствовали уровню у интактных крыс. Обращали на себя внимание более высокие значения проксимального транспорта ионов натрия в условиях открытия  $KATP$ -каналов. Под влиянием флокалина, за счет двукратного повышения у крыс с ГГН, проксимальная реабсорбция ионов натрия восстанавливалась (см. рис. 2). В то же время, стандартизированный по КФ показатель дистальной реабсорбции ионов натрия был ниже в 1,8 раза, чем в группе без лечения, и значимо не отличался от контроля. У крыс с ГГН в 1,4

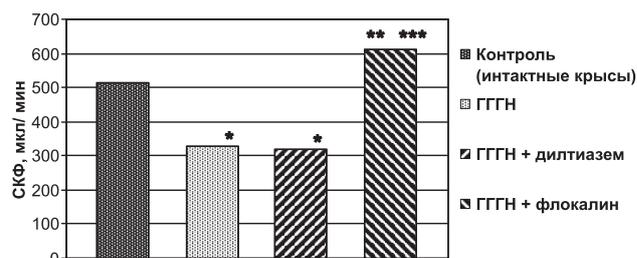


Рис. 1. Влияние дилтиазема (5 мг/кг) и флокалина (5 мг/кг) на скорость клубочковой фильтрации (СКФ) в условиях развития гистогемической гипоксической нефропатии (ГГН) после 5% водной нагрузки. \* – достоверность отличий в сравнении с показателями контрольной группы ( $p < 0,01$ ); \*\* – достоверность отличий в сравнении с показателями при ГГН ( $p < 0,001$ ); \*\*\* – достоверность отличий в сравнении с показателями при ГГН + дилтиазем ( $p < 0,001$ ).

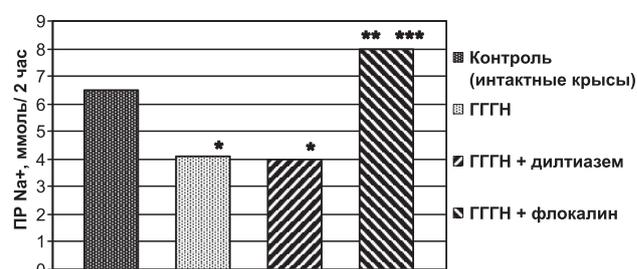


Рис. 2. Влияние дилтиазема (5 мг/кг) и флокалина (5 мг/кг) на проксимальную реабсорбцию (ПР)  $Na^+$  в условиях развития гистогемической гипоксической нефропатии (ГГН) после 5% водной нагрузки. \* – достоверность отличий в сравнении с показателями контрольной группы ( $p < 0,01$ ); \*\* – достоверность отличий в сравнении с показателями при ГГН ( $p < 0,001$ ); \*\*\* – достоверность отличий в сравнении с показателями при ГГН + дилтиазем ( $p < 0,001$ ).

раза уменьшался калийурез, концентрация ионов натрия и калия в плазме крови не отличалась от нормы, что предполагало активирующие влияния флокалина на процессы поддержки калиевого баланса в условиях гипоксии и подтверждало ранее высказанное нами предположение, исключающее дизонемические побочные эффекты при применении флокалина [13].

## ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что при ГГН способность почек поддерживать водный баланс сохранялась в полной мере, судя по нормальным величинам водного диуреза. Одновременно в крови не изменялись контрольные показатели концентрации ионов натрия и калия. Несмотря на гипоксию, интенсивность выделенных ионов натрия и калия даже уменьшалась. Снижение салуреза можно объяснить компенсаторной реакцией почек, направленной на задержку электролитов для увеличения объемов внеклеточной и, особенно, внутрисосудистой жидкости, что способствовало повышению минутного объема крови и, тем самым, гемодинамической компенса-

ции гипоксии. Вместе с тем, структура почечных функций претерпела значительные изменения. Так, достоверно снижалась СКФ. Как следствие, уменьшалась фильтрационная фракция ионов натрия, т. е. снижалось количество ионов натрия, поступавшее в канальцевый сектор нефрона. Соответственно, судя по значению показателя реабсорбированной фракции ионов натрия, уменьшалась и канальцевая натриевая реабсорбция. Количество реабсорбированных ионов натрия понижалось как в проксимальных, так и в дистальных отделах канальцев. Вместе с тем, если интенсивность реабсорбции воды уменьшалась, что и обуславливало нормальные величины диуреза, то стандартизированные по СКФ показатели проксимальной реабсорбции ионов натрия не изменялись (см. рис. 2), а дистальной реабсорбции – даже возрастали в 1,3 раза. Таким образом, в условиях ГГГ основным звеном патогенеза являлась энергетическая недостаточность эпителия почечных канальцев, что приводило к уменьшению процессов реабсорбции, в первую очередь, ионов натрия. Далее по известному механизму тубулогломерулярной связи через активацию внутрипочечной РАС уменьшалась СКФ [14], что обеспечивало снижение фильтрационного заряда ионов натрия и, следовательно, объёма его реабсорбции. Это и является одной из приспособительных реакций, осуществляемой ценой уменьшения выведения конечных продуктов обмена веществ и нарушения ионорегулирующей функции почек. Известно, что одним из последствий энергетической недостаточности является угнетение работы ионных насосов в клетках, что ведёт к дизиионии: уменьшению внутриклеточного пула ионов калия, а также к увеличению содержания в клетках ионов натрия и кальция. Такие возможные нарушения являются основанием для применения в качестве корректоров почечных функций препаратов, регулирующих ионные транспортные потоки.

С этой целью было изучено ренальное влияние бензотиазепинового производного класса БКК. Установлено, что после применения дилтиазема не изменялась характеристика функционального состояния почек при ГГГ. Показатели СКФ, реабсорбции воды оставались сниженными, и также уменьшалась канальцевая реабсорбция ионов натрия. Индуцированное любым повреждающим агентом, в том числе и гипоксией, нарушение проницаемости плазматических мембран или мембран органелл может привести к резкому повышению внутриклеточного содержания ионов кальция. Полученные результаты дают основание предполагать, что при данной модели ГГГ не происходило

чрезмерного увеличения входа ионов кальция в клетку. Возможно, что в случае ГГГ биологические активные агонисты цитоплазматического повышения ионов кальция – биогенные амины, пептидные гормоны и др. лишь увеличивали чувствительность гладкомышечных клеток к индукторам роста внутриклеточной концентрации катиона. Данное предположение и также факт более избирательной блокады дилтиаземом кальциевых каналов венечных сосудов объясняют неэффективность препарата в отношении ренальной вазодилатации и регуляции гломерулярного кровотока. Отсутствие у дилтиазема гемодинамических гломерулопротекторных эффектов в условиях ГГГ сказывалось на функциональном состоянии клубочкового аппарата почек, и СКФ у крыс с гипоксической нефропатией не изменялась. Более того, блокада кальциевого тока дилтиаземом уменьшала адаптативные процессы в клетках эпителия канальцев, что приводило к снижению реабсорбции ионов натрия и посредством механизма тубулогломерулярной обратной связи поддерживало низкий уровень СКФ.

Напротив, нефротропное влияние флокалина при ГГГН характеризовалось повышением СКФ, нормализацией процессов реабсорбции воды и ионов натрия. Интегральные механизмы почечной защиты при гипоксическом повреждении предполагают гемодинамические и негемодинамические эффекты флокалина. Известно, что активация КАТФ-каналов в сосудистых гладкомышечных и эндотелиальных клетках приводит к их расширению и предупреждает сосудосуживающие реакции. Закономерная вазодилатация вследствие открытия КАТФ-каналов флокалином приводила к повышению системного и локального кровообращения, уменьшению вазоконстрикторных влияний РАС, индуцированных гипоксией. Стабилизирующие влияния флокалина на механизмы ауторегуляции гломерулярного кровотока, в том числе и на состояние тонуса афферентных и эфферентных артериол, отображались увеличением СКФ у крыс с моделью ГГГ. Активация КАТФ-каналов внутренней мембраны митохондрий приводит к её деполяризации, понижению поступления ионов натрия вовнутрь, ощелачиванию и умеренному набуханию матрикса, что способствует сохранению АТФ [15]. Уменьшение использования энергоресурсов при повышении активности КАТФ-каналов имело большое значение для восстановления канальцевого транспорта ионов натрия. Повреждающее влияние гипоксии на тубулярные процессы угнеталось после введения флокалина, на что указывало увеличение энергозависимой проксимальной реабсорбции

ионов натрия и повышение концентрационной способности почек. Вероятно, что управление трансмембранными кальциевыми потоками через стимуляцию активности КАТФ-каналов потенцировало ряд других негемодинамических ренальных эффектов, связанных с уменьшением перегрузки нефроцитов ионами кальция, стабилизацией метаболических и угнетением свободнорадикальных реакций. Следствием этого явилась интенсификация процессов клубочкового и канальцевого отделов нефрона, обеспечивающих восстановление ионорегулирующей функции почек в условиях развития ГГГ.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные экспериментальные данные позволили установить некоторые различия в выраженности действия изучаемых представителей классов БКК и активаторов КАТФ-каналов при почечной патологии гипоксического генеза. Используемая модель характеризовалась структурно-функциональными изменениями как более чувствительных к влиянию гипоксии канальцев, так и вовлеченных при формировании ГГГН клубочковых компонентов нефрона. Бензотиазепиновый представитель БКК не влиял на поврежденные гипоксией компенсаторные механизмы поддержки гломерулярных процессов и не восстанавливал сниженную СКФ. Вместе с тем, сохранялась выявленная в условиях энергодифицита дисфункция канальцевого отдела, характеризовавшаяся снижением проксимального транспорта ионов натрия. Учитывая сигнальную роль внутриклеточного иона кальция во многих гомеостатических реакциях, при ГГГ не исключает эффективность дилтиазема в сочетании с препаратами, реализующими другие нефропротективные механизмы. В отличие от дилтиазема, фторсодержащий аналог пинацидила флокалин оказывал защитное влияние на почечные функции в условиях ГГГН. Более стабильные гемодинамические эффекты и сбалансированность энергозависимых транспортных канальцевых процессов при активации сарколеммальных и митохондриальных КАТФ-каналов под влиянием флокалина обуславливали увеличение СКФ и проксимальной реабсорбции ионов натрия. Сле-

довательно, активатор  $K_{ATP}$  флокалин является эффективным нефропротектором, способствующим нормализации ионорегулирующей функции почек при ГГГ.

### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Nangaku M, Rosenberger C, Heyman SN, Eckardt K-U. Regulation of hypoxia-inducible factor in kidney disease. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2013; 40 (2): 148-157
2. Філіпєць НД, Гоженко А.І., Давиденко І.С. Морфологічні зміни тканин нирок за умов поєданого застосування нітриту натрію та 2,4-динітрофенолу. *Вісн морфології* 2013; 19(2): 268-271
3. Norman P. *Ion channel modulator pipelines: targets and agents in development*. Cambridge Healthtech Institute, 2009; 11-58
4. Добронравов ВА, Царькова ОВ. Блокаторы кальциевых каналов в нефропротекции. *Нефрология* 2004; 8(1): 7-21
5. Синяченко ОВ, Игнатенко ГА, Мухин ИВ. Результаты длительного применения блокаторов кальциевых каналов в лечении гипертензивных больных хроническим гломеруло-нефритом. *Нефрология* 2005; 9(2): 67-72
6. Bakris GL, Weir MR, Secic M, Campbell B, Weis-McNulty A. Differential effects of calcium antagonist subclasses on markers of nephropathy progression. *Kidney International* 2004; 65: 1991-2002
7. Філіпєць НД, Гоженко АІ. Функціональні зміни нирок щурів за умов фармакологічної активації калієвих каналів. *Вісн Вінницького національного медичного університету* 2013; 17(2): 324-327
8. Филипец НД, Гоженко АИ. Сравнительное изучение нефропротекторных свойств модуляторов калиевых и кальциевых каналов при экспериментальном поражении почек. *Экспер и клин фармакол* 2014; 77(1): 10-12
9. Путилина ФЕ, Ещенко НД. Влияние гипоксии и 2,4-динитрофенола на лактатдегидрогеназную реакцию в мозгу, печени, в почках. *Вопр мед химии* 1971;7(2): 161-165
10. Gozhenko A, Filipets N, Zukow W. Flokaline and diltiazem renoprotector properties in chronization hypoxic nephropathy. *Journal of Health Science* 2013; 3 (12): 389-398
11. Берхин ЕБ, Иванов ЮИ. *Методы экспериментального исследования почек и водно-солевого обмена*. Алтайское кн. изд-во, Барнаул, 1972; 98-116
12. Рябов СИ, Наточин ЮВ. *Функциональная нефрология*. Лань, СПб., 1998; 45-76
13. Гоженко АИ, Филипец НД. Нефротропные эффекты при активации аденозинтрифосфатчувствительных калиевых каналов в зависимости от функционального состояния почек крыс. *Нефрология* 2013; 17 (2): 87-90
14. Гоженко АИ. Патогенез токсических нефропатий. *Актуальные проблемы транспортной медицины* 2006; 4(2): 9-15
15. Szewczyk A, Jarmuszkiewicz W, Kunz WS. Mitochondrial potassium channels. *Life*; 2009; 61(2): 134-143

*Автори заявляють об відсутності конфлікту інтересів.*

Поступила в редакцію: 12.02.2014 г.  
Принята в печать: 29.05.2014 г.