

© А.И.Гоженко, Н.Д.Филипец, 2013
УДК [616.61:661.31]-092.4

А.И. Гоженко¹, Н.Д. Филипец¹

НЕФРОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПРИ АКТИВАЦИИ АДЕНОЗИНТРИФОСФАТЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ПОЧЕК КРЫС

A.I. Gozhenko, N.D. Filipets

THE RENOTROPIC EFFECTS OF ADENOSINE TRIPHOSPHATE-SENSITIVE POTASSIUM CHANNEL ACTIVATION DEPENDING ON THE FUNCTIONAL STATE OF KIDNEYS IN RATS

¹Украинский научно-исследовательский институт медицины транспорта, г. Одесса; кафедра фармакологии Буковинского государственного медицинского университета, г. Черновцы, Украина.

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ: изучение нефротропных эффектов активатора аденозинтрифосфатчувствительных калиевых каналов флокалина. **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Эксперименты проведены на лабораторных нелинейных белых крысах массой 0,15–0,17 кг в условиях 5% водной нагрузки. В первой серии флокалин вводили семь дней зондом внутривентрикулярно в дозе 5 мг/кг на 1% слизи крахмала. Во второй серии экспериментов препарат применяли однократно через 2 ч после моделирования токсической нефропатии подкожным введением хлорида ртути в дозе 1 мг/кг. В моче и плазме крови определяли содержание ионов натрия и калия методом пламенной фотометрии, концентрацию креатинина – колориметрическим методом, белок в моче – сульфосалициловым методом. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** На фоне повторного введения препарата у крыс повышался диурез, увеличивалась экскреция креатинина и скорость клубочковой фильтрации (СКФ). Повышалась концентрация ионов калия в плазме крови и уменьшалась концентрация ионов калия в моче, концентрация ионов натрия в моче и натрийурез уменьшались. На модели сулемовой нефропатии после введения флокалина увеличивались диурез, экскреция креатинина и СКФ, уменьшалась протеинурия, концентрация ионов калия в моче и калийурез повышался. При этом нормализовался показатель натриемии, возрастала экскреция ионов натрия с мочой. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Более выраженная водовыделительная реакция у крыс после введения флокалина на фоне развития сулемовой нефропатии способствует повышению почечной экскреции ионов натрия и калия при отсутствии электролитных нарушений в плазме крови. Повышение СКФ и антипротеинуретический эффект обуславливают ренопротективное действие препарата при формировании токсической нефропатии.

Ключевые слова: активация аденозинтрифосфатчувствительных калиевых каналов, флокалин, почки.

ABSTRACT

THE AIM of the study was to: research of renotropic effects of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels activator Flocalin. **MATERIAL AND METHODS.** The experiments were made in laboratory non-linear white rats 0,15-0,17 kg of weight under conditions of 5% water load. The first series of experiments consisted of intraventricular administration of Flocalin with a tube in the dose of 5 mg/kg on 1% amyllum mucus over the period of 7 days. In the second series of experiments Flocalin was administered once in 2 hours after modeling of toxic nephropathy by subcutaneous injection of mercuric chloride 1 mg/kg. Urine and plasma levels of sodium and potassium ions were measured using flame photometry. Quantitative analysis of creatinine was performed with colorimetric assay. Urine protein was estimated using sulfosalicylic acid test. **RESULTS.** The repeated administration of Flocalin to the rats increased diuresis, as well as creatinine excretion and glomerular filtration rate (GFR). We observed elevation of plasma potassium levels and diminution of urine potassium concentration. At the same time plasma sodium levels and natriuresis decreased. After Flocalin administration in the model of sublimate nephropathy we observed the increase of diuresis, creatinine excretion and GFR, decrease of proteinuria and elevation of urine potassium levels and kaliuresis. This was followed by plasma sodium level rate normalization and increment of potassium ions excretion in the urine. **CONCLUSION.** A more pronounced reaction of water excretion after administration of Flocalin to the rats under conditions of sublimate nephropathy contributes to the increase of renal sodium and potassium excretion with the absence of electrolyte changes in blood plasma. Elevation of GFR and antiproteinuric effect determine renoprotective action of Flocalin in toxic nephropathy.

Key words: adenosine triphosphate-sensitive potassium channels activation, Flocalin, kidneys.

ВВЕДЕНИЕ

Многофакторность причин нефрологических заболеваний предопределяет поиск лекарственных

средств, направленных на улучшение деятельности почек и угнетение повреждающих влияний на органы-мишени. Взаимосвязь патогенетических механизмов развития и прогрессирования ренальной и кардиоваскулярной патологии [1–3] обуславливает интерес научного поиска нефротропных

Филипец Н.Д. Украина, г. Черновцы, 58002, Театральная площадь, д. 2. Буковинский государственный медицинский университет, кафедра фармакологии, тел. раб. +38(037)22 3 52 62; моб. +380506080496; E-mail: natalya.dmi@gmail.com

влияний представителей фармакологической защиты миокарда. Безусловно, оптимизация гемодинамического режима, контролируемого сердцем, и основных процессов почечной регуляции водно-солевого баланса формируют приоритетность выбора медикаментозной терапии.

В связи с этим заслуживают внимания активаторы калиевых каналов (АКК) – класс кардиопротекторных, антиангинальных и вазоактивных средств. К прямым кардиопротекторам относится новый активатор аденозинтрифосфатчувствительных калиевых (K_{ATP}) каналов, фторсодержащий аналог пинацидила флокалин [4]. Открытие или пролонгация длительности открытого состояния калиевых каналов препятствует поступлению ионов кальция через потенциалзависимые кальциевые каналы, что тормозит вазоконстрикторные и свободнорадикальные реакции, сохраняет энергоресурсы клеток миокарда [5–7]. Общность направлений органопротекции способствует изучению нефротропных свойств оригинального отечественного АКК. Влияние на сосудистый тонус, восстановление клеточного ионного баланса изначально являются факторами ренопротекции, адаптирующими почечные гомеостатические механизмы к измененным условиям. Целью настоящей работы было исследование нефротропных эффектов активатора K_{ATP} -каналов флокалина при изменении функционального состояния почек после увеличения объема внеклеточной жидкости у интактных крыс и в условиях развития токсической нефропатии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперименты проведены на 36 лабораторных нелинейных белых крысах массой 0,15–0,17 кг, которых содержали на гипонатриевом режиме питания со свободным доступом к отстоянной водопроводной воде. В первой серии флокалин вводили семь дней зондом внутрижелудочно в дозе 5 мг/кг на 1% слизи крахмала в объеме 5 мл/кг. Через 30 мин после последнего введения объем внеклеточной жидкости увеличивали 5% водной нагрузкой. Во второй серии экспериментов препарат вводили однократно через 2 ч после моделирования токсической нефропатии подкожным введением 0,1% раствора хлорида ртути в дозе 1 мг/кг [8], и через 30 мин проводили водную нагрузку. Контрольным группам (во второй серии контролем также являлась группа крыс с токсической нефропатией) внутрижелудочно вводили слизь крахмала и выполняли водную нагрузку. Диурез регистрировали через 2 ч. Эвтаназию проводили под нембуталовым наркозом (1% раствор этиминала натрия, 20 мг/кг) в соответствии с положением

«Европейской конвенции по защите позвоночных животных, которые используются в экспериментах и других научных целях» (Страсбург, 1986). В моче и плазме крови определяли содержание ионов натрия и калия методом фотометрии пламени на ФПЛ-1. Концентрацию креатинина в моче – методом Фолина, в плазме крови – методом Попера в модификации Мерзона по реакции с пикриновой кислотой с последующей колориметрией на спектрофотометре СФ-46 [9]. Белок в моче определяли по реакции с сульфосалициловой кислотой. Стандартизированные по скорости клубочковой фильтрации (СКФ) и массе тела показатели рассчитывали по общепринятым формулам [10]. Статистический анализ межгрупповых отличий проводили при помощи компьютерной программы «Statgrafics» с использованием t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведенные исследования продемонстрировали способность флокалина изменять состояние почечных функций в условиях водной нагрузки у здоровых крыс и после нефротоксического воздействия хлорида ртути. Показатели, характеризующие деятельность почек после гипергидратации организма на фоне многократного введения препарата (табл. 1), указывали на повышение диуреза, увеличение экскреции креатинина, активацию скорости клубочковой фильтрации и на неизменную экскрецию белка.

Отмечалось повышение содержания ионов калия в плазме крови. Вместе с тем, концентрация ионов калия в моче уменьшалась, а показатель калийуреза не отличался от контрольного значения. Содержание ионов натрия в плазме крови не изменялось, концентрация ионов натрия в моче и натрийурез уменьшались.

На модели сулемовой нефропатии (табл. 2) ренальное влияние флокалина проявлялось возрастающей динамикой диуреза, экскреции креатинина и СКФ. Обращает внимание выраженный антипротеинуретический эффект: показатели экскреции белка у крыс после введения препарата практически достигали контрольных значений. Концентрация ионов калия в плазме не изменялась. Содержание ионов калия в моче увеличивалось, регистрировалось калийуретическое действие флокалина. Уровень натриемии, возросший при формировании острой почечной недостаточности, нормализовался после активации K_{ATP} -каналов. Падение натрийуреза при поражении почек сулемой под влиянием флокалина сменялось возрастанием экскреции ионов натрия до значений показателя у интактных животных.

Таблица 1

Показатели функционального состояния почек крыс в условиях 5% водной нагрузки после введения флокалина (5 мг/кг, 7 дней, X±m)

Показатели	Контроль, n=6	Флокалин, n=6	p
Диурез, мл/2 ч	4,0±0,15	4,5±0,12	<0,01
Экскреция креатинина, мкмоль/2 ч	2,5±0,09	3,3±0,24	<0,01
Скорость клубочковой фильтрации, мкл/мин	349,8±26,57	517,0±52,12	<0,05
Концентрация белка в моче, г/л	0,002±0,0004	0,002±0,0003	>0,1
Экскреция белка, мг/2 ч	0,06±0,002	0,008±0,0014	>0,1
Экскреция белка, мг/100мкл КФ	0,002±0,0006	0,002±0,0004	>0,1
Концентрация K ⁺ в плазме крови, ммоль/л	6,1±0,33	8,2±0,61	<0,05
Концентрация K ⁺ в моче, ммоль/л	7,3±1,05	4,9±0,20	<0,05
Экскреция K ⁺ , мкмоль/2 ч	29,9±4,99	21,9±1,12	>0,1
Концентрация Na ⁺ в плазме крови, ммоль/л	122,7±1,80	122,1±1,94	>0,1
Концентрация Na ⁺ в моче, ммоль/л	0,83±0,192	0,32±0,028	<0,05
Экскреция Na ⁺ , мкмоль/2 ч	3,35 ± 0,845	1,39 ± 0,082	<0,05

Примечание. В табл. 1 и 2: n – число наблюдений, p – достоверность различий, КФ – клубочковый фильтрат.

ОБСУЖДЕНИЕ

Изменение внутрипочечной гемодинамики в результате вазодилатации при активации K_{ATФ}-каналов повышает скорость клубочковой фильтрации. В условиях функциональной водной нагрузки, как и многие антигипертензивные агенты, флокалин вызывает преимущественное расширение приводящей артериолы и стабилизацию внутриклубочкового давления крови. Снижение натриевой экскреции (см. табл. 1) означает, что диуретический эффект препарата является следствием увеличения клубочковой фильтрации.

Сопоставление сравнительно небольшой разницы показателей диуреза с увеличением в 1,5 раза СКФ демонстрирует функциональную способность здоровых почек выводить избыток воды за счет преимущественной активации клубочкового сектора нефрона. Отсутствие протеинурии при этом позволяет исключить гиперфильтрацию при стимуляции K_{ATФ}-каналов. Вместе с тем, уменьшение в 2,4 раза выделения ионов натрия свидетельствует о сохранении способности почек после введения флокалина поддерживать осмотический баланс при гипергидратации организма. По-видимому, клеточ-

Таблица 2

Показатели функционального состояния почек крыс при формировании сулемовой нефропатии после введения флокалина в дозе 5 мг/кг в условиях водной нагрузки (X+m)

Показатели	Контроль, n=6	Сулемовая нефропатия, n=6	p	Сулемовая нефропатия + флокалин, n=6	p
Диурез, мл/2 ч/100г	3,5±0,52	2,0±0,20		3,1±0,12	1/2<0,05 2/3<0,001
Экскреция креатинина, мкмоль/2 ч	1,9±0,30	2,2±0,03		3,1±0,17 p<0,01	1/2<0,05 2/3<0,001
Скорость клубочковой фильтрации, мкл/мин	390,5±70,30	303,7±30,30	НД	602,4±56,	1/2<0,05 2/3<0,001
Концентрация белка в моче, г/л	0,005±0,001	0,050±0,007		0,01±0,004	<0,001 2/3<0,01
Экскреция белка, мг/2 ч	0,020±0,007	0,09±0,013		0,03±0,012	1/2<0,01 2/3<0,05
Экскреция белка, мг/100 мкл КФ	0,005±0,001	0,030±0,006		0,006±0,0021	1/2<0,01 2/3<0,01
Концентрация K ⁺ в плазме крови, ммоль/л	6,20±0,30	5,90±0,69		6,6±0,58	НД
Концентрация K ⁺ в моче, ммоль/л	6,40±0,77	16,6±0,53		18,7±0,73	1/2<0,001 1/3<0,001 2/3<0,05
Экскреция K ⁺ , мкмоль/2 ч	22,8±3,46	32,7±3,55	НД	58,5±3,56	1/3<0,001 2/3<0,01
Концентрация Na ⁺ в плазме крови, ммоль/л	127,9±5,28	140,4±1,46		120,0±13,33	1/2<0,05
Концентрация Na ⁺ в моче, ммоль/л	0,27±0,037	0,19±0,014		0,38±0,097	1/2<0,05
Экскреция Na ⁺ , мкмоль/2 ч	1,02±0,25	0,39±0,062		1,22±0,32	1/2<0,05 2/3<0,05

ные эффекты АКК изменяют калиевый обмен в организме и обуславливают увеличение плазменного содержания катиона, что и наблюдалось при применении флокалина – концентрация ионов калия в плазме крови повышалась в 1,3 раза. Несмотря на допустимое пропорционально СКФ изменение фильтрационного заряда ионов калия, уровень его экскреции не менялся. Так как в условиях водного диуреза концентрация ионов калия в моче меньше, чем в плазме крови, вероятнее всего, флокалин повышает канальцевую калиевую реабсорбцию.

В условиях формирования токсического поражения почек отчетливо проявлялись нефротропные эффекты флокалина (см. табл. 2).

Волюморегулирующая функция почек восстанавливалась благодаря влиянию препарата на почечный кровоток и характеризовалась повышенным диурезом при двукратном увеличении СКФ по сравнению с показателями у нелеченных крыс. Активация экскреторной функции почек после введения АКК проявлялась повышением в 1,4 раза выделения с мочой эндогенного креатинина. Учитывая прямую связь протеинурии с динамикой прогрессирования почечной недостаточности, особого внимания заслуживает антипротеинуретический эффект препарата. Применение флокалина уменьшает в 5 раз концентрацию белка в моче и в 3 раза понижает двухчасовую протеинурию, а при перерасчете по СКФ показатель экскреции белка с мочой уменьшался в 5 раз. Увеличение объема клубочкового фильтрата, как и фильтрационной натриевой загрузки, способствовало снижению концентрации ионов натрия в плазме крови при введении флокалина. Модуляция клеточного ионного баланса отображалась на процессах канальцевого транспорта ионов натрия. Сниженный в 2,6 раза показатель почечной экскреции ионов натрия при поражении хлоридом ртути превышал в 3 раза это значение после фармакологической активации калиевых каналов. Механизм калийуретического действия связан как с повышением СКФ, так и увеличением канальцевой секреции ионов калия под влиянием флокалина в условиях токсической нефропатии. При этом выход ионов калия из тканевых депо обеспечивает стабильность концентрации катиона в плазме крови.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что флокалин активирует волюморегулирующую функцию почек в условиях 5% водной нагрузки. Водовыделительная реакция более существенна

после стимуляции K_{ATP} -каналов на начальной стадии развития экспериментальной сулемовой нефропатии и это, в свою очередь, сказывается на увеличении почечной экскреции осмотически активных ионов натрия и калия. При этом не снижается концентрация исследуемых катионов в плазме крови. Учитывая то, что основой побочных эффектов диуретиков являются электролитные, а именно, гипокалиемические нарушения, можно исключить неблагоприятные воздействия АКК, обусловленные ионным дисбалансом. Ренопротективное действие флокалина реализуется на клубочковом и канальцевых уровнях нефрона с нормализацией почечных процессов – фильтрации и канальцевого транспорта на уровне проксимального канальца, о чем свидетельствует снижение протеинурии. Вместе с тем, значительное повышение скорости клубочковой фильтрации и антипротеинуретический эффект определяют потенциальную возможность флокалина замедлять процесс формирования токсической нефропатии.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Смирнов АВ, Добронравов ВА, Каюков ИГ. Кардиоренальный континуум: патогенетические основы превентивной нефрологии. *Нефрология* 2005; 9(3): 7-14
2. Ronco C, House AA, Haapio M. Cardiorenal syndrome: refining the definition of a complex symbiosis gone wrong. *Intensive Care Med* 2008; 34: 957-962
3. McCullough PA, Haapio M, Mankad S et al. Prevention of cardio-renal syndromes: workgroup statements from the 7th ADQI Consensus Conference. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25: 1777-1784
4. Мойбенко ОО, Струтинський РБ, Ягупольський ЛМ, Мохорт МА. Розробка та підготовка до впровадження нового вітчизняного кардіопротекторного препарату – фторвмісного активатора АТФ-залежних калієвих каналів Флокалін. *Наука та інновації* 2006; 2(4): 114-119
5. Мойбенко ОО, Струтинський РБ, Ягупольський ЛМ, Шаламай АС. Організація заводського виготовлення препарату Флокалін – нового вітчизняного спазмолітика і кардіопротектора. *Наука та інновації* 2009; 5(1): 80-84
6. Strutynskiy RB, Neshcheret AP, Tumanovska LV et al. Cardioprotective effects of flocalin in vivo experiments: influence on the hemodynamic and on the damage of myocardium under ischemia-reperfusion. *Int J Phys Pathophys* 2010; 1(3): 211-218
7. Voitychuk OI, Strutynskiy RB, Yagupolskii LM et al. Sarcolemmal cardiac KATP channels as a target for the cardioprotective effects of the fluorine-containing pinacidil analogue flocalin. *Brit J Pharmacol* 2011; 162(3):701-711
8. Гоженко АИ, Карчаускас ВЮ, Долوماتов СИ. Влияние водной и гиперосмотической нагрузок на клиренс креатинина при экспериментальной нефропатии, вызванной хлоридом ртути. *Нефрология* 2002; 6(5): 72-74
9. Берхин ЕБ, Иванов ЮИ. *Методы экспериментального исследования почек и водно-солевого обмена*. Алтайское кн. изд-во, Барнаул, 1972; 98-116
10. Рябов СИ, Наточин ЮВ. *Функциональная нефрология*. Лань, СПб., 1998; 45-76

Поступила в редакцию 05.03.2013 г.
Принята в печать 27.03.2013 г.