

© А.И.Гоженко, С.И.Доломатов, Е.А.Доломатова, 2004
УДК [611.61:546.33].001.5

А.И. Гоженко, С.И. Доломатов, Е.А. Доломатова

РЕАКЦИЯ ПОЧЕК БЕЛЫХ КРЫС НА ВВЕДЕНИЕ МАЛЫХ ДОЗ НИТРИТА НАТРИЯ

A.I. Gozhenko, S.I. Dolomatov, E.A. Dolomatova

REACTIONS OF WHITE RATS' KIDNEYS TO SMALL DOSES OF SODIUM NITRATE

Кафедра общей и клинической патологической физиологии им. В.В.Подвысоцкого Одесского государственного медицинского университета, Украина

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Изучение деятельности почек крыс в условиях однократного и хронического введения малых количеств нитритов. **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Работа выполнена на беспородных белых крысах-самцах. Влияние однократного введения нитрита натрия в количестве 0,2 мг на 100 г м.т. в составе 5% водной нагрузки изучали на половозрелых крысах с массой тела 95-110 г (n=20). Хроническое поступление нитрита натрия осуществляли выпаиванием животных (масса тела 190-260 г) водным раствором нитрита натрия (50 мг/л) в течение 7 суток (n=10). Кроме того, была проведена серия экспериментов с одновременным выпаиванием водным раствором нитрита натрия (50 мг/л) и каптоприла (10 мг/л) в течение 7 суток (n=20). Полученные результаты сравнивали с соответствующим возрастным контролем - по 15 крыс в каждой группе. Функцию почек исследовали в условиях 5% водной нагрузки. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Установлено, что малые дозы нитрита натрия при однократном и хроническом введении вызывают достоверное снижение клиренса креатинина и повышение почечной экскреции белка. Также показано, что каптоприл при хроническом поступлении нитритов в организм не отменяет снижение клиренса креатинина и усиление протеинурии. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** 1. Однократное и хроническое введение малых доз нитрита натрия в организм белых крыс приводит к снижению клиренса креатинина и повышению экскреции белка. 2. Хроническое поступление в организм малых доз нитрита натрия сопровождается накоплением нитритов во внеклеточной жидкости организма. 3. Совместное хроническое введение блокатора АПФ и малых доз нитрита натрия способствует дальнейшему повышению выделения белка почками на фоне сниженных значений клиренса креатинина. 4. Блокада АПФ каптоприлом оказывает влияние на почечный транспорт экзогенных нитритов и нитратов и состояние цикла оксида азота.

Ключевые слова: почки, нитрит натрия.

ABSTRACT

THE AIM of the investigation was to study activity of rats' kidneys under conditions of a single and chronic administration of small doses of nitrites. **MATERIALS AND METHODS.** The work was performed in white male rats. Effects of a single dose of sodium nitrite (0.2 mg/100g of body mass) against the background of 5% water load were studied in mature rats with body mass 95-110 g (n=20). Chronic administration of sodium nitrite was fulfilled by watering the animals (body mass 190-260 g) with water solution of sodium nitrite (50 mg/l) during 7 days (n=10). In addition, a series of experiments were carried on with a simultaneous watering with water solution of sodium nitrite (50 mg/l) and captopril (10 mg/l) during 7 days (n=20). The results obtained were compared with the controls of the same age - 15 rats in each group. The function of kidneys was investigated under conditions of 5% water load. **RESULTS.** It was found that small doses of sodium nitrite when given once or chronically caused reliably decreased creatinine clearance and elevation of renal excretion of protein. It was also shown that captopril at chronic administration of nitrites failed to abolish the decrease of creatinine clearance and the increase of proteinuria. **CONCLUSION.** 1. A single or chronic administration of small doses of sodium nitrite to white rats results in decreased creatinine clearance and elevated excretion of protein. 2. Chronic administration of small doses of sodium nitrite is followed by accumulation of nitrites in the extracellular fluid. 3. The simultaneous chronic administration of ACE-inhibitor and small doses of sodium nitrite facilitates further increase of protein excretion by the kidneys against the background of lower value of creatinine clearance. 4. Blockade of ACE with captopril influences the renal transport of exogenous nitrites and nitrates and the state of the nitrogen oxide cycle.

Key words: kidneys, sodium nitrite

ВВЕДЕНИЕ

По данным литературы, нитриты и нитраты эндогенного происхождения постоянно присутствуют в плазме крови человека и животных, являясь основным метаболитом молекулы оксида азота субстратом в процессах ресинтеза молекулы NO по нитрит-редуктазному пути [1]. Установлено, что скорость образования нитратов и нитритов в орга-

низме объективно отражает темпы продукции оксида азота [2]. Также показано, что почки принимают участие в поддержании постоянного уровня нитритов и нитратов во внеклеточной жидкости [3,4]. Между тем влияние малых доз экзогенных нитритов, наиболее физиологически активных метаболитов NO, на состояние органов и функциональных систем человека и животных изучено

недостаточно. Целью данной работы является изучение деятельности почек крыс в условиях однократного и хронического введения малых количеств нитритов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на беспородных белых крысах-самцах. Влияние однократного введения нитрита натрия в количестве 0,2 мг на 100 г м.т. в составе 5% водной нагрузки изучали на половозрелых крысах с массой тела 95-110 г (n=20). Хроническое поступление нитрита натрия осуществляли выпаиванием животных (масса тела 190-260 г) водным раствором нитрита натрия (50 мг/л) в течение 7 суток (n=10). Кроме того, была проведена серия экспериментов с одновременным выпаиванием водным раствором нитрита натрия (50 мг/л) и каптоприла (10 мг/л) в течение 7 суток (n=20). Полученные результаты сравнивали с соответствующим возрастным контролем – по 15 крыс в каждой группе. Функцию почек исследовали в условиях 5% водной нагрузки. Мочу собирали в течение 2 часов. Из эксперимента крыс выводили путем декапитации под легкой эфирной анестезией. Кровь стабилизировали гепарином, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин. В полученных образцах мочи и плазмы определяли следующие показатели: осмоляльность криоскопическим методом на осмометре модели 3D3 (США), концентрацию креатинина фотометрическим методом в реакции с пикриновой кислотой на спектрофотометре СФ-46 (Россия), концентрацию нитритов и нитратов в реакции с реактивом Грисса фотометрическим методом, концентрацию белка в моче определяли фотометрическим методом в реакции с сульфоса-

лициловой кислотой. Величины почечной экскреции анализируемых веществ и результаты клиренс-методов исследований рассчитывали на 100 г массы тела [5]. Статистический анализ полученных результатов проводили общепринятым методом с использованием критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Установлено, что однократное введение нитритов в количестве 0,2 мг на 100 г м.т. приводит к умеренному изменению функционального состояния почек крыс – снижению клиренса креатинина и увеличению экскреции белка (табл. 1). При этом концентрация нитритов в плазме крови достоверно не изменяется, а уровень нитратов возрастает в 3 раза. Также зарегистрировано повышение почечной экскреции нитратов и нитритов, соответственно в 5 и 3 раза. В то же время выпаивание крыс раствором нитрита натрия (50 мг/л) в течение 7 суток сопровождается снижением клиренса креатинина в 1,8 раза, повышением концентрации мочевины и нитритов в плазме крови в 2 раза, увеличением экскреции белка, нитритов и нитратов, соответственно в 2, 10 и 2,6 раза (табл. 2). В свою очередь, назначение каптоприла на фоне хронического поступления нитритов сопровождается достоверным повышением объема диуреза в 1,7

Таблица 1

Показатели деятельности почек под влиянием однократного введения водного раствора нитритов в количестве 0,2 мг/100 г м.т. ($\bar{X} \pm m$)

Изучаемые показатели	Контрольная группа, n=15	Введение нитритов, n=20
Диурез, мл/ч	1,6±0,2	1,6±0,1
Экскреция креатинина, мкмоль/ч	1,95±0,18	1,80±0,07
Клиренс креатинина, мкл/мин	579±22	414±15 p<0,01
Экскреция белка, мг/ч	0,051±0,004	0,088±0,009 p<0,01
Концентрация нитритов в плазме крови, мкмоль/л	3,7±0,3	4,2±0,2
Концентрация нитратов в плазме крови, мкмоль/л	4,5±0,3	13,9±0,2 p<0,01
Экскреция нитритов, мкмоль/ч	0,003±0,001	0,010±0,001 p<0,01
Экскреция нитратов, мкмоль/ч	0,010±0,002	0,053±0,002 p<0,01

Примечание: n- число наблюдений; p- показатель достоверности межгрупповых отличий.

Таблица 2

Показатели деятельности почек при хроническом поступлении нитрита натрия ($\bar{X} \pm m$)

Изучаемые показатели	Контроль, n=15	Нитрит натрия, n=10	Нитрит натрия +каптоприл, n=20
Диурез, мл/ч	1,5±0,2	1,9±0,3	2,5±0,3; p1<0,01
Экскреция креатинина, мкмоль/ч	2,4±0,2	2,7±0,3	2,9±0,3
Клиренс креатинина, мкл/мин	658±24	365±19; p1<0,01	393±17; p1<0,01
Концентрация мочевины в плазме крови, ммоль/л	3,8±0,2	8,4±0,3; p1<0,01	6,2±0,2; p1<0,01; p2<0,05
Экскреция белка, мг/ч	0,039±0,005	0,078±0,009; p1<0,01	0,146±0,017; p1<0,01; p2<0,01
Концентрация нитритов в плазме крови, мкмоль/л	5,9±0,4	12,6±0,2; p1<0,01	8,7±0,3; p1<0,01; p2<0,05
Концентрация нитратов в плазме крови, мкмоль/л	5,1±0,3	5,3±0,5	7,3±0,4; p1<0,05; p2<0,05
Экскреция нитритов, мкмоль/ч	0,003±0,001	0,030±0,004; p1<0,01	0,008±0,001; p1<0,01; p2<0,01
Экскреция нитратов, мкмоль/ч	0,009±0,001	0,023±0,002; p1<0,01	0,037±0,004; p1<0,01; p2<0,01

Примечание: n- число наблюдений; p1- показатель достоверности отличий в сравнении с контрольной группой; p2- показатель достоверности отличий между группами животных, получавших нитрит натрия.

раза и протеинурии. Величина клиренса креатинина остается сниженной, а уровни мочевины и нитритов в плазме крови имеют тенденцию к нормализации, однако достоверно превышают контрольные значения. Отметим, что использование каптоприла сопровождается ростом концентрации нитратов в моче и плазме, а также усилением их выделения почками.

ОБСУЖДЕНИЕ

По данным литературы, почечная экскреция эндогенных нитратов и нитритов является основным каналом выделения данных соединений [6]. Показано, что почечная экскреция нитритов и нитратов тесно связана с состоянием почечного кровотока и канальцевого транспорта натрия [7]. При этом снижение темпов системной продукции оксида азота приводит к уменьшению почечного клиренса нитритов и нитратов, в том числе за счет усиления их канальцевой реабсорбции [8]. Корреляционный анализ между концентрацией нитратов и нитритов в плазме крови человека и параметров их почечного транспорта свидетельствует о том, что почкам принадлежит важная роль в поддержании постоянного уровня этих соединений во внеклеточной жидкости организма человека в норме и при патологии [9]. Сообщается о тесной положительной корреляции между содержанием нитритов и креатинина в плазме крови [10,11]. Уровень эндогенных нитритов и нитратов в плазме крови колеблется в достаточно узких пределах и изменение его величины может использоваться в качестве диагностического показателя при патологических состояниях сердечно-сосудистой системы [6], нарушениях обменных процессов [12] и в травматологии [13]. Таким образом, эндогенные нитраты и нитриты являются химически стабильными производными оксида азота. Достаточно постоянная величина их концентрации во внеклеточной жидкости организма обеспечивается, с одной стороны, состоянием продукции оксида азота NO-синтазами, а с другой стороны, темпами почечного клиренса. Установлено также, что ряд патологических процессов сопровождается чаще всего повышением содержания нитратов и нитритов в плазме крови. Между тем патофизиологические механизмы, инициируемые избыточным уровнем нитритов и нитратов в организме, изучены недостаточно. Напомним, что через 2 часа после однократного введения животным нитрита натрия в количестве 0,2 мг на 100 г м.т. не приводит к достоверному повышению аниона в плазме крови. Между тем, реакция почек на экзогенный нитрит свидетельствует о достаточно высокой чувствительности гомеос-

татических ренальных процессов к данному соединению. Вместе с тем, выбранная нами доза вещества более чем на порядок ниже количества, необходимого для индукции легкой формы гемической гипоксии [1,14,15]. Такие рассуждения позволили нам высказать мнение о том, что обнаруженные отклонения деятельности почек в меньшей степени обусловлены токсическим эффектом почечной паренхимы, а вызваны главным образом перестройкой гуморальных механизмов внутриорганной ауторегуляции. Действительно, согласно ранее полученным нами результатам инъекция нитрита натрия приводит к закономерному увеличению активности ренин-ангиотензиновой системы [14,15]. Нельзя исключить, что физиологические уровни нитратов и нитритов способны напрямую регулировать уровень активности ренин-ангиотензиновой системы [16]. Кроме того, сообщается о тесной взаимосвязи минералокортикоидов и цикла оксида азота в регуляции функции почек [17]. Приведенные выше аргументы позволили нам выдвинуть предположение о том, что устойчивое повышение концентрации нитритов в плазме крови, сопровождающее течение некоторых патологических процессов, способно оказывать влияние на почечный транспорт нитратов и нитритов. Проведенная серия по 7-дневному выпаиванию крыс раствором нитрита натрия (50 мг/л) продемонстрировала, что степень накопления этого вещества в плазме крови животных носит умеренный характер и не превышает значений, характеризующих уровень ретенции эндогенных нитритов при патологии [6,12,13]. Между тем установлено, что избыточное содержание в плазме крови нитритов сопровождается отчетливыми изменениями функции почек. В частности, наблюдается снижение клиренса креатинина и повышение экскреции белка, а также увеличение экскреции нитритов и нитратов. Вместе с тем, назначение каптоприла – блокатора ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) в сочетании с нитритной нагрузкой не оказывало существенного влияния на величину клиренса креатинина, а протеинурия даже усиливалась. Анализируя влияние каптоприла на кинетику нитритов, отметим, что использование блокатора АПФ приводило к некоторому уменьшению содержания нитритов в плазме крови, на фоне отчетливого роста уровня нитратов. В свою очередь, темпы выделения почками нитратов на фоне блокатора АПФ возрастали, а значения экскреции нитритов снижались. Таким образом, снижение клиренса креатинина и усиление протеинурии в ответ на поступление малых доз экзогенных нитритов, по нашему мнению, в меньшей степени обусловлены

активацией ренин-ангиотензиновой системы. Однако усиление протеинурии и достаточно низкие параметры клиренса креатинина под влиянием каптоприла не исключают прямого нефротоксического эффекта нитрита натрия. Полученные результаты, также позволяют выдвинуть предположение о том, что РАС тесно вовлечена в регуляцию почечного транспорта нитритов и нитратов, а также цикла оксида азота.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Однократное и хроническое введение малых доз нитрита натрия в организм белых крыс приводит к снижению клиренса креатинина и повышению экскреции белка.

2. Хроническое поступление в организм малых доз нитрита натрия сопровождается накоплением нитритов во внеклеточной жидкости организма.

3. Совместное хроническое введение блокатора АПФ и малых доз нитрита натрия способствует дальнейшему повышению выделения белка почками на фоне сниженных значений клиренса креатинина.

4. Блокада АПФ каптоприлом оказывает влияние на почечный транспорт экзогенных нитритов и нитратов и состояние цикла оксида азота.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Реутов ВП, Сорокина ЕГ, Охотин ВЕ, Косицын НС. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. Наука; М., 1998
2. Lauer Th, Preik M, Rassaf T et al. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98 (22): 12814-12819
3. Zeballos GA, Bernstein RD, Thompson CI, Forfia PR.

Pharmacodynamics of plasma nitrate/nitrite as an indication of nitric oxide formation in conscious dogs. *Circulation* 1995; 91 (12): 2982-2988

4. Гоженко АИ. Роль оксиду азоту в молекулярно-клеточных механизмах функций нитрок. Украинский биохимический журнал 2002; 74 (4a): 96.

5. Наточин ЮВ. Физиология почки. Формулы и расчеты. Наука, Л., 1974

6. Wennmalm A, Benthin G, Edlund A et al.,. Metabolism and excretion of nitric oxide in humans. An experimental and clinical study. *Circ Res* 1993; 73: 1121-1127

7. Majid DS, Godfrey M, Grisham MB, Navar LG. Relation between pressure natriuresis and urinary excretion of nitrate/nitrite in anesthetized dogs. *Hypertension* 1995; 25 (4): 860-865

8. Godfrey M, Majid DS. Renal handling of circulating nitrates in anesthetized dogs. *Am J Physiol Renal Physiol* 1998; 275 (1): F68-F73

9. Osorio JC, Xu X, Vogel T et al. Plasma nitrate accumulation during the development of pacing-induced dilated cardiac myopathy in conscious dogs is due to renal impairment. *Nitric Oxide* 2001; 5 (1): 7-17

10. Mackenzie IM, Ekangaki A, Young JD, Garrard CS. Effect of renal function on serum nitrogen oxide concentrations. *Clin Chem* 1996; 42 (3): 440-444

11. Bernstein RD, Zhang X, Zhao G et al. Mechanisms of nitrate accumulation in plasma during pacing-induced heart failure in conscious dogs. *Nitric Oxide* 1997; 1 (5): 386-396

12. Tanaka S, Yashiro A, Nakashima Y et al. Plasma nitrite/nitrate level is inversely correlated with plasma low-density lipoprotein cholesterol level. *Clin Cardiol* 1997; 20 (4): 361-365

13. Saitoh D, Takasu A, Fukuzuka K et al. Analysis of plasma nitrite/nitrate in human thermal injury. *Tohoku J Exp Med* 2001; 194 (2): 129-136

14. Гоженко АИ. Энергетическое обеспечение основных почечных функций и процессов в норме и при повреждении почек: Дис... д-ра мед. наук.-Черновцы, 1987; 368

15. Федорук А.С. Функция почек при гемической гипоксии: Дис... канд. мед. наук. Черновцы, 1991; 242

16. Vanhoutte PM, Boulanger CM, Vidal M., Mombouli J-P. Endothelium-derived mediators and the renin-angiotensin system. In: Robertson JL, Nicholls MG, eds. *The renin-angiotensin system: biochemistry, physiology, pathophysiology, therapeutics*. Gower Medical Publishing, 1993

17. Granger JP, Kassab S, Novak J et al. Role of nitric oxide in modulating renal function and arterial pressure during chronic aldosterone excess. *Am J Physiol* 1999; 276 (1): R197-R202

Поступила в редакцию 02.04.2004 г.