Дубова Марія Григорівна - старший лаборант відділу по вивченню гіпоксичних станів Інституту фізіології ім.О.О.Богомольця
Розова Єкатерина Всеволодівна - д. біол. н.,провідний науковий співробітник відділу по вивченню гіпоксичних станів Інституту фізіології ім.О.О.Богомольця; erozova@ukr.net;
Маньковська Ірина Микитівна - д. мед. н., професор, завідуюча відділом по вивченню гіпоксичних станів Інституту фізіології ім.О.О.Богомольця; mankovsk@bihp.kiev.ua

© Гоженко А.І., Філіпець Н.Д., Давиденко І.С.
УДК: 616.6-085.225.2

Гоженко А.І.[1], Філіпець Н.Д.[2], Давиденко І.С.[2]
[1]ДП Український науково-дослідний інститут медицини транспорту (вул. Канатна, 92, м. Одеса, 65039, Україна); [2]Буковинський державний медичний університет, кафедри фармакології та патоморфології (Театральна пл., 2, м. Чернівці, 58002, e-mail: natalya.dmi@gmail.com)

ОСОБЛИВОСТІ СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ЗМІН НИРОК ПІСЛЯ МОДУЛЯЦІЇ ІОННИХ КАНАЛІВ ЗА УМОВ ХРОНІЗАЦІЇ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ЕКЗОТОКСИЧНИХ НЕФРОПАТІЙ

Резюме. *В експериментах на лабораторних білих щурах показано, що під впливом активатора аденозинтрифосфатзалежних калієвих каналів флокаліну за умов хронізації гістогемічної гіпоксичної і сулемової нефропатій позитивна динаміка морфологічних змін відображалась покращенням клубочкових і канальцевих процесів. У результаті застосування блокатора кальцієвих каналів дилтіазему після аналогічних езотоксичних пошкоджень структурні зміни нирки були виражені в меншій мірі, і лише у щурів із сулемовою нефропатією збільшувалась функціональна здатність проксимальних канальців. Оцінка впливу модуляторів іонних каналів на структурно-функціональний стан нирок за умов хронізації екзотоксичних нефропатій свідчить про переважні нефропротекторні властивості флокаліну у порівнянні з дилтіаземом*
Ключові слова: *екзотоксична нефропатія, структурно-функціональні зміни, флокалін, дилтіазем.*

Вступ

Ступінь вираженості токсикодинамічних ефектів екзогенних сполук першочергово залежить від функціонального стану нирок. Як екскреторний орган, нирки вражаються при багатьох інтоксикаціях. Інтенсивний ренальний кровообіг, здатність концентрувати в сечі токсини та продукти їх біотрансформації, зворотна резорбція сполук зумовлюють високу чутливість нирок до токсикантів. Наслідками взаємодії з ксенобіотиками є виникнення токсичних нефропатій, від яких прямо залежать синдроми соматогенної фази та прогресування екзотоксичного пошкодження інших органів і систем. У механізмах ренальної дисфункції мають місце ряд універсальних неспецифічних ланцюгів патогенезу. Разом із тим, функціональний стан і морфологічна картина токсичної нирки в більшості залежить від властивостей пошкоджувальних агентів і від тривалості постінтоксикаційного періоду. Тому, вибір адекватної механізмам етіопатогенезу нефропротекторної терапії є необхідною умовою для стабілізації адаптативних реакцій та попередження розвитку хронічної поліорганної патології.

Метою нашої роботи було дослідження структурних змін і функціонального стану нирок на експериментальних моделях екзотоксичного пошкодження організму щурів та вивчення протекторних властивостей модуляторів іонних каналів клітинних мембран флокаліну та дилтіазему за умов хронізації токсичних нефропатій.

Матеріали та методи

Експерименти проведені на 48 лабораторних білих щурах масою 0,15-0,17 кг, які одержували гіпонатрієвий раціон харчування та відстояну водогінну воду. Токсичний вплив на організм здійснювали шляхом підшкірного введення 0,1% розчину сулеми в дозі 5 мг/кг маси тіла одноразово. Другій групі щурів уводили підшкірно 1% розчин нітриту натрію (НН) у дозі 50 мг/кг і через 30 хв - внутрішньоочеревинно 2,4-динітрофенол (ДНФ) у дозі 3 мг/кг. Таким чином у нашій модифікації виникала поєднана гемічна і гістотоксична гіпоксія (ГГГ). З 30-го дня після моделювання розпочинали внутрішньошлункове введення суспензії флокаліну (5 мг/кг) і дилтіазем (Sanofi, Франція, 5 мг/кг) на 1% слизу крохмалю в об'ємі 0,5 мл на 100 г маси тіла. Через 30 хв після останнього введення (7 днів) здійснювали 5% водне навантаження і поміщали щурів в обмінні клітки на 2 год для збору сечі. Евтаназію здійснювали відповідно до вимог Європейської конвенції із захисту експериментальних тварин (86/609ЄЄС). У сечі і плазмі крові визначали вміст іонів натрію і калію методом фотометрії полум'я на ФПЛ-1. Концентрацію креатиніну в сечі визначали методом Фоліна, у плазмі крові - методом Поппера в модифікації Мерзона за реакцією з пікриновою кислотою на спектрофотометрі СФ-46. Білок у сечі визначали за реакцією з сульфосаліциловою кислотою [Михеева, Богодарова, 1969].

Для морфологічного дослідження біоптати тканин нирок фіксували в 10% розчині нейтрального формаліну. Після фіксації матеріал зневоднювали у розчинах етилового спирту і ущільнювали парафіном при температурі 58°С. Парафінові гістологічні зрізи тканини нирок товщиною 5-7 мкм виготовляли санним мікротомом МС-2, після депарафінізації зрізи фарбували ге-

матоксиліном та еозином. Мікропрепарати вивчали у світловому мікроскопі. Цифрові копії оптичного зображення отримували за допомогою цифрового фотоапарата Olympus SP550UZ і аналізували за допомогою ліцензійної копії комп'ютерної програми "ВидеоТест-Размер 5.0" (ООО Видеотест, Росія). Стандартизовані за швидкістю клубочкової фільтрації (ШКФ) та масою тіла показники розраховували за загальновизнаними формулами [Гоженко та ін. 2009]. Статистичний аналіз міжгрупових відмінностей проводили за допомогою комп'ютерної програми "Statgrafics".

Результати. Обговорення

Результати експериментів показали, що у віддаленому періоді після введення НН і ДНФ зберігаються пригнічувальні впливи гіпоксії на клубочковий та канальцевий відділи нефрону. У порівнянні з інтактними (контрольними щурами) знижувались показники швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ), фільтраційної та реабсорбованої фракції іонів натрію, транспорту іонів натрію у проксимальних канальцях, посилювалась протеїнурія, що засвідчувало розвиток ГГГ-ї нефропатії (ГГГН). Ренальні впливи модуляторів іонних каналів різнились залежно від представників класів цих лікарських засобів. Застосування активатора калієвих каналів (АКК) флокаліну позитивним чином відображалось на основних ниркових процесах у щурів. Порівняно з нелікованою групою, після введення флокаліну показники ШКФ і проксимального транспорту іонів натрію досягали контрольного значення, збільшувався фільтраційний натрієвий заряд, зростала реабсорбована фракція іонів натрію, зменшувалась протеїнурія. На противагу АКК блокатор кальцієвих каналів (БКК) дилтіазем суттєво не впливав на основні процеси гомеостатичних функцій нирок. У щурів з ГГГН рівень ШКФ і проксимальної реабсорбції іонів натрію не змінювався, показники фільтраційної і реабсорбованої фракції іонів натрію лишались нижчими за контроль, зберігалась протеїнурія.

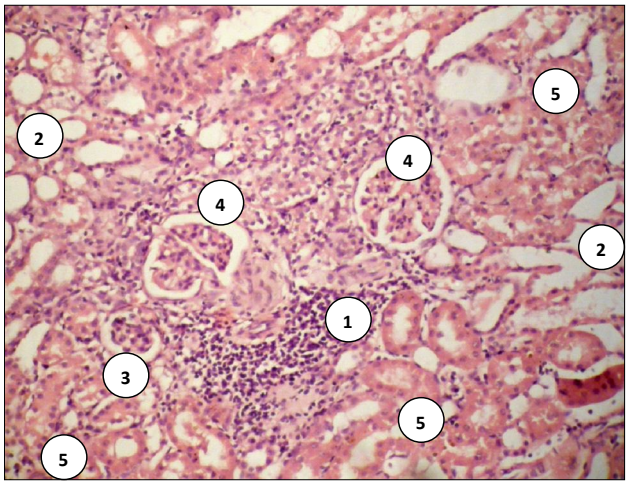

Рис. 1. Кіркова речовина нирки щура. Модель гістогемічної гіпоксичної нефропатії. 1 - осередок фіброзу строми; 2 - осередки атрофії епітелію звивистих канальців; 3 - атрофований клубочок; 4 - незмінені клубочки; 5 - звивисті канальні з проявами оборотного набухання епітеліоцитів. Гематоксилін-еозин. Об.20х. Ок.10х.

За умов розвитку ГГГН мали місце три морфологічних явища (рис. 1). Перші два явища власне є проявом хронічної патології (гіпоксії) і полягали в осередковому фіброзі строми кіркової речовини нирки та атрофії 18,0±0,9% епітеліоцитів звивистих канальців. Також слід вказати на атрофію окремих клубочків нирки. Третє явище відноситься до патології, яка може розвиватися як при гострій так і при хронічній гіпоксії - це оборотне набухання (гідропічне набухання та гідропічна вакуолізація) епітелію звивистих канальців, цей процес поширювався на 64,0±1,2% епітеліоцитів звивистих канальців. Дослідження мікропрепаратів нирок у відно-

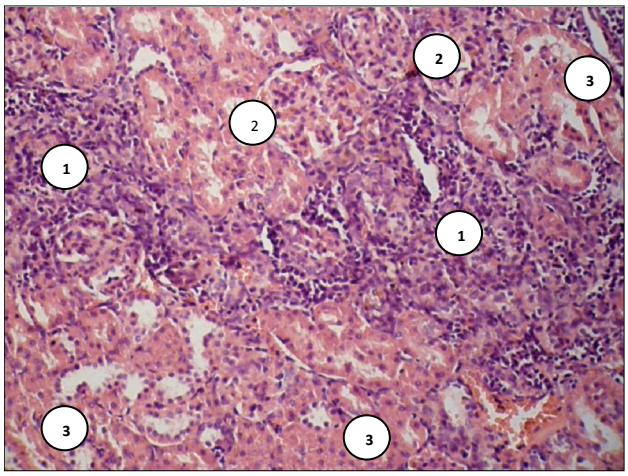

Рис. 2. Кіркова речовина нирки щура. Модель гістогемічної гіпоксичної нефропатії. 1 - осередок фіброзу строми; 2 - незмінені клубочки; 3 - звивисті канальні з проявами оборотного набухання епітеліоцитів. Мікрофотографія. Гематоксилін-еозин. Об.20х. Ок.10х.

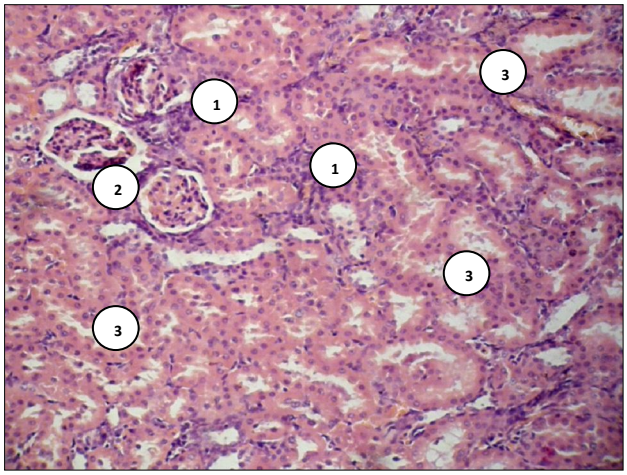

Рис. 3. Кіркова речовина нирки щура. Модель гістогемічної гіпоксичної нефропатії. 1 - осередок фіброзу строми; 2 - незмінені клубочки; 3 - звивисті канальні з проявами оборотного набухання епітеліоцитів. Гематоксилін-еозин. Об.20х. Ок.10х.

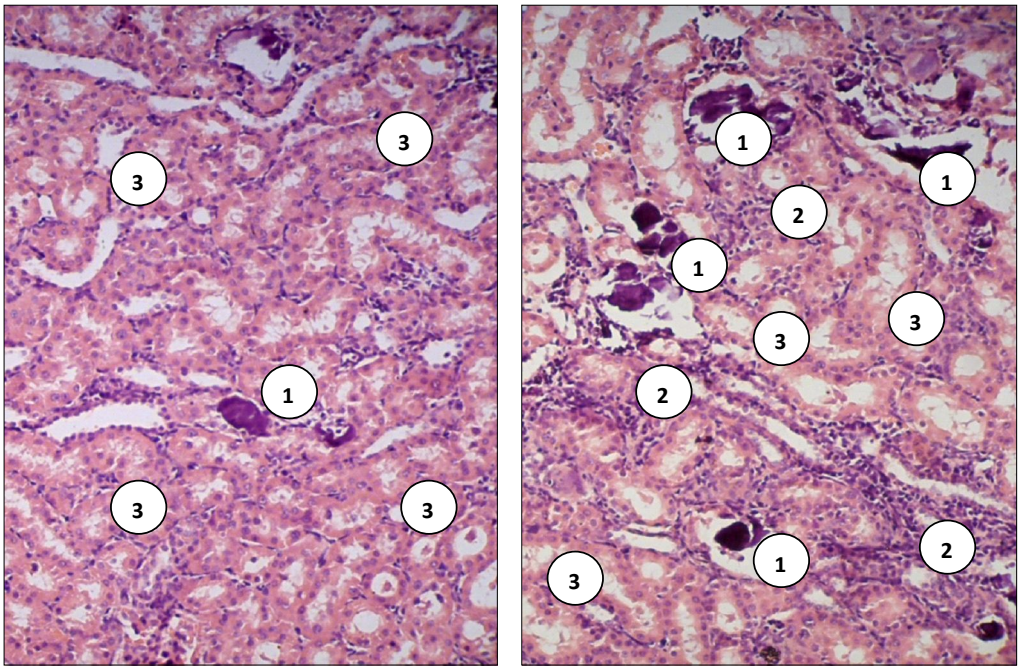

Рис. 4. Кіркова речовина нирки щура. Модель сулемової нефропатії. 1 - осередки вапнування; 2 - грануляційна тканина; 3 - звивисті канальні з проявами оборотного набухання епітеліоцитів. Гематоксилін-еозин. Об.20х. Ок.10х.

шенні фіброзу і оборотного набухання встановило практично аналогічну морфологічну картину після застосування представників різних класів модуляторів іонних каналів. Так, фіброз строми залишався на рівні контролю, хоча атрофічних явищ у канальцях та клубочках не виявлено. Оборотне набухання під впливом флокаліну і дилтіазему поширювалося відповідно на 58,0±1,1% і на 59,0±1,4% епітеліоцитів звивистих канальців (рис. 2, 3).

Вивчення змін діяльності нирок через 30 днів після введення сулеми засвідчило виражені реакції пошкодження нирок у цей період. Привертало увагу збільшення ШКФ, фільтраційної фракції іонів натрію, екскреції білка, а також зростання абсолютної реабсорбції іонів натрію за умов відсутності вірогідних змін проксимального транспорту іонів натрію. Під впливом флокаліну у щурів з сулемовою нефропатією стабілізація показників ШКФ, фільтраційного заряду та реабсорбованої фракції іонів натрію супроводжувались активацією проксимальної натрієвої реабсорбції, зниженням протеїнурії. Після ведення дилтіазему зменшувалась екскреція білка з сечею.

Морфологічні зміни, за умов розвитку сулемового пошкодження нирок, відмічалися в основному у кірковій речовині (рис. 4). Можна відмітити три типи уражень. Перший тип - вапнування осередків некротизованих раніше груп епітеліоцитів звивистих канальців без вираженої реакції ниркової строми. Таким типом уражень були охоплені не більше 1% епітеліоцитів переважно в субкапсулярній зоні кіркової речовини нирки. Другий тип уражень - вапнування ділянок некротизованих раніше епітеліоцитів звивистих канальців з вираженою реакцією строми у вигляді формування грануляційної тканини різного ступеня зрілості. Такий тип уражень мав максимальне вираження у юкстамедулярній зоні, відповідав

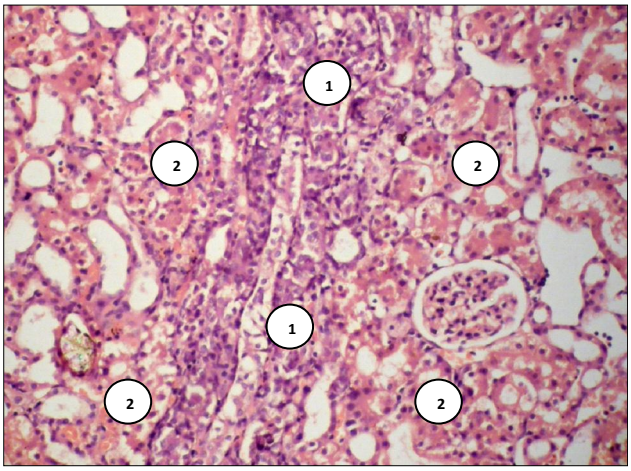

Рис. 5. Кіркова речовина нирки щура. Модель сулемової нефропатії Позначення: 1 - грануляційна тканина; 2 - звивисті канальні з проявами оборотного набухання епітеліоцитів. Мікрофотографія. Гематоксилін-еозин. Об.20х. Ок.10х.

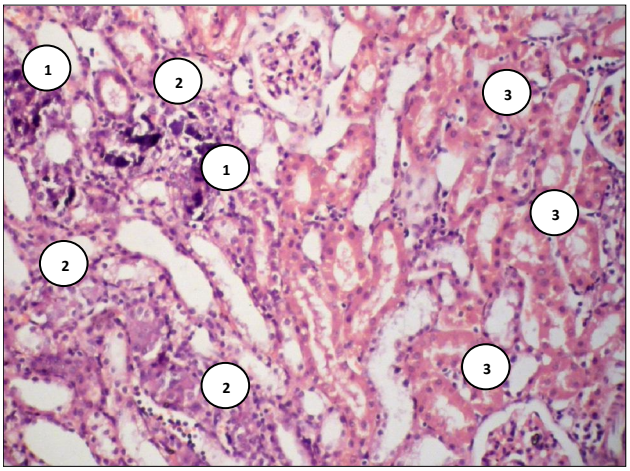

Рис. 6. Кіркова речовина нирки щура. Модель сулемової нефропатії Позначення: 1 - осередки вапнування; 2 - грануляційна тканина; 3 - звивисті канальні з проявами оборотного набухання епітеліоцитів. Мікрофотографія. Гематоксилін-еозин. Об.20х. Ок.10х.

первинним ураженням більшого об'єму і охоплював близько 4% епітеліоцитів. Третій тип уражень - це оборотне набухання (гідропічне набухання та гідропічна вакуолізація) епітелію звивистих канальців, що вижили. Поширеність цього явища становила до 95% звивистих канальців і була рівномірною у всіх зонах кіркової речовини. Внаслідок впливу флокаліну (рис. 5) перший тип уражень не зустрічався зовсім. Другий тип уражень мав місце, але без кальцинозу, тобто на місцях загиблих епітеліоцитів розросталася грануляційна тканина без відкладань нерозчинних солей кальцію, що є більш сприятливим варіантом регенерації, ніж із кальцинозом. Третій тип уражень мав місце, але його поширеність становила близько 75%. Після введення дилтіазему (рис. 6) перший тип уражень зустрічався дуже зрідка. Другий тип уражень був подібним за характеристиками та розмірами до змін у контрольній групі. Третій тип уражень поширювався приблизно на 85% звивистих канальців.

Патогенетичними ланцюгами інтоксикації НН і ДНФ є зниження утворення метгемоглобіну і розщеплення процесів окиснення і фосфорилювання [Путилина, Ещенко, 1971], що призводило до розвитку ГГГ. Клінічні прояви поліорганної дисфункції залежать від стану органів і тканин із високим рівнем аеробного енергообміну до яких відносяться і нирки. Тому, незважаючи на віддалений період після індукції гіпоксії, зберігались ренальні розлади. Варто відзначити значно меншу ступінь морфологічних порушень, ніж виявлені нами зміни у тканинах нирок через дві години після введення НН і ДНФ [Філіпець та ін., 2013]. Структурний стан нефроцитів стабілізувався паралельно згасанню пошкоджувальних впливів прогіпоксичних чинників завдяки збереженню ниркового обігу на тлі гемічної гіпоксії та поступової активації механізмів протекції і розвитку толерантності до енергодефіциту [Гоженко, 1987]. Відсутність специфічних морфологічних ознак виключала цитологічні відмінності після фармакологічної модуляції іонних каналів.

Разом із тим, сукупність порушень клубочкових і канальцевих процесів вказувала на хронізацію ГГГН. У реалізації ефектів антигіпоксичного захисту організму кінцевими ефекторами є аденозинтрифосфатчутливі калієві (КАТФ) канали. Ефекти флокаліну і дилтіазему опосередковуються через зменшення внутрішньоклітинного пулу іонів кальцію, що зумовлює схожість фармакодинамічного спектру. Однак, завдяки прямій активації флокаліном КАТФ каналів мітохондрій [Струтинська та ін., 2013] ініціювались тригерні антигіпоксичні реакції, стабілізувались процеси окислювального фосфорилювання, підвищувалась стійкість клітин до гіпоксії. Тому флокалін чинив захисний ренальний вплив за умов гострої екзотоксичної інтоксикації [Гоженко, Филипец, 2013; Филипец, Гоженко, 2014] і проявляв переважні нефропротекторні ефекти через 30 днів після введення НН і ДНФ [Gozhenko et al., 2013].

У спектрі токсичної дії солей важких металів має місце нефротропний ефект. Після 30-го дня введення двохлористої ртуті виникали характерні для цього періоду морфо-функціональні зміни нирок. Розвиток сулемової нефропатії пов'заний із блокадою іонами ртуті SH-груп ферментів, у тому ж числі, сукцинатдегідрогенази та Na^+-K^+-АТФ-ази у проксимальних канальцях, ішемією нефрону, активацією пероксидного окиснення ліпідів [Гоженко, 2006]. Тому збалансованість клубочково-канальцевих процесів і суттєву позитивну структурну перебудову можна вважати результатами гемодинамічних, метаболічних, енергозберігаючих впливів активатора $K_{АТФ}$ каналів. Менш виражені морфологічні зміни під впливом БКК можна пояснити з позицій недостатнього сбалансування гломерулярної гемодинаміки, а також притаманними дилтіазему деякими прооксидантними ефектами, виявленими в експериментах із поєднаними метаболічними порушеннями [Усанова и др., 2009]. В той же час, зниження кальцієвого перевантаження клітин відображалось зменшенням числа уражених клітин звивистих канальців і збільшенням проксимальной реабсорбції білка, що зумовлює антипротеїнуретичний ефект дилтіазему.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Під впливом активатора аденозинтрифосфатзалежних калієвих каналів флокаліну за умов хронізації експериментальної гістогемічної і сулемової нефропатії позитивна динаміка морфологічних змін відображалась суттєвим покращенням основних процесів забезпечення гомеостатичної функції нирок.

2. У результаті застосування блокатора кальцієвих каналів дилтіазему після езотоксичного пошкодження організму щурів структурні зміни були менш вираженими, збільшувалась функціональна здатність проксимальних канальців лише на моделі сулемової нефропатії.

3. Експериментальна оцінка впливу модуляторів іонних каналів на структурно-функціональний стан нирок за умов хронізації екзотоксичних нефропатій свідчить про переважні нефропротекторні властивості флокаліну у порівнянні з дилтіаземом.

Перспективним є подальше вивчення та співставлення впливу флокаліну та дилтіазему на показники енергетичного забезпечення ниркових функцій для розширення механізмів морфофункціональних передумов нефропротекції модуляторами іонних каналів.

Список літератури

Влияние эналаприла, дигоксина, атенолола и дилтиазема на перекисное окисление липидов при сочетанных метаболических нарушениях (экспериментальное исследование) / А.А.Усанова, А.А.Александровский, А.В.Зорькина [и др.] //Рациональная фармакотерапия в кардиологии.- 2009.- №6.- С.63-67.

Гоженко А.И. Нефротропные эффекты при активации аденозинтрифосфатчувствительных калиевых каналов в зависимости от функционального состояния почек крыс /А.И.Гоженко, Н.Д.Филипец //Нефрология.- 2013.- Т.17, №2.- С.87-90.
Гоженко А.И. Патогенез токсических нефропатий /А.И.Гоженко //Акт. пробл. транспортной мед.- 2006.- №2(4).- С.9-13.
Гоженко А.И. Энергетическое обеспечение основных почечных функций и процессов в норме и при повреждении почек: автореф. дис. на соиск. учен. степ. докт. мед. наук: спец. 14.00.16 "Патологическая физиология" /А.И.Гоженко.- Киев, 1987.- 37с.
Михеева А.И. Сульфосалициловый метод определения белка в моче / А.И.Михеева, И.А.Богодарова //Лаб. дело.- 1969.- №7.- С.441-442.
Методи експериментального моделювання ураження нирок для фармакологічних досліджень: [метод. реком.] /А.І.Гоженко, С.Ю.Штриголь, В.М.Лісовий [та ін.].- К., 2009.- 47с.
Нові фторвмісні активатори аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів флокалін і тіофлокалін пригнічують кальційіндуковане відкривання мітохондріальної пори у серці щурів /Н.А.Струтинська, Р.Б.Струтинський, С.В.Чорна [та ін.] //Фізіол. журнал.- 2013.- Т.59, №6.- С.3-9.
Путилина Ф.Е. Влияние гипоксии и 2,4-динитрофенола на лактатдегидрогеназную реакцию в мозгу, печени, в почках /Ф.Е.Путилина, Н.Д.Ещенко //Вопр. мед. химии.- 1971.- Т.17, №2.- С.161-165.
Філіпець Н.Д. Морфологічні зміни тканин нирок щурів за умов поєднаного застосування нітриту натрію та 2,4-динітрофенолу /Н.Д.Філіпець, А.И.Гоженко, І.С.Давиденко //Вісник морфології.- 2013.- Т.19, №2.- С.268-271.
Филипец Н.Д. Сравнительное изучение нефропротекторных свойств модуляторов калиевых и кальциевых каналов при экспериментальном поражении почек /Н.Д.Филипец, А.И.Гоженко //Эксперим. и клин. фармакол.- 2014.- Т.77, №1.- С.10-12.
Gozhenko A. Flokaline and diltiazem renoprotector properties in chronization hypoxic nephropathy /A.Gozhenko, N.Filipets, W.Zukow //J. of Health Science.- 2013.- Vol.3(12).- C.389-398.

Гоженко А.И., Филипец Н.Д., Давыденко И.С.

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ПОЧЕК ПОСЛЕ МОДУЛЯЦИИ ИОННЫХ КАНАЛОВ В УСЛОВИЯХ ХРОНИЗАЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЭКЗОТОКСИЧЕСКИХ НЕФРОПАТИЙ

Резюме. *В экспериментах на лабораторных белых крысах показано, что под влиянием активатора аденозинтрифосфатзависимых калиевых каналов флокалина в условиях хронизации гистогемической и сулемовой нефропатий позитивная динамика морфологических изменений отображалась улучшением клубочковых и канальцевых процессов. В результате применения блокатора кальциевых каналов дилтиазема после аналогичных экзотоксических повреждений структурные изменения почки были выражены в меньшей мере, и только у крыс с сулемовой нефропатией повышалась функциональная способность проксимальных канальцев. Оценка влияния модуляторов ионных каналов на структурно-функциональное состояние почек в условиях хронизации экзотоксических нефропатий показала преимущественные нефропротекторные свойства флокалина по сравнению с дилтиаземом.*

Ключевые слова: *экзотоксическая нефропатия, структурно-функциональные изменения, флокалин, дилтиазем.*

Gozhenko A.I., Filipets N.D., Davydenko I.S.

PECULIARITIES OF STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHANGES OF KIDNEYS AFTER MODULATION OF ION CHANNELS UNDER THE CONDITIONS OF CHRONIZATION OF EXPERIMENTAL EXOTOXIC NEPHROPATHIES

Summary. *In experiments on laboratory white rats it has been shown that administration of adenosine triphosphate-sensitive potassium channel activator flocalin resulted in positive dynamics of morphological changes (improvement of glomerular and tubular processes) under the conditions of chronization of histohemic hypoxic and sublimate nephropathies. Administration of calcium channel blocker diltiazem after the analogous exotoxic injury has lead to less pronounced structural changes of kidney, and the functional ability of proximal tubules increased only in rats with sublimate nephropathy. Assessment of the effect of ion channels modulators on structural and functional state of kidneys under the conditions of chronization of exotoxic nephropathies has shown the predominant nephroprotective properties of flocaline in comparison to diltiazem.*

Key words: *exotoxic nephropathy, structural and functional changes of kidneys, flocalin, diltiazem.*

Стаття надійшла до редакції 21.04.2014 р.

Гоженко Анатолій Іванович - д. мед. н., професор, заслуж. діяч науки і техніки України, директор ДП "Український науково-дослідний інститут медицини транспорту"; +38 048 722-53-64, +38 048 728-14-52; medtrans2@rambler.ru; unii_mt@mail.ru
Філіпець Наталія Дмитрівна - к. мед. н., доцент кафедри фармакології Буковинськькго державного медичного університету; +38 0372 23-52-62,+38 050 608-04-96; natalya.dmi@gmail.com
Давиденко Ігор Святославович - д. мед. н., професор, завідувач кафедри патоморфології Буковинськькго державного медичного університету; +38 0372 51-47-57; davydenko.igor@bsmu.edu.ua

© Зябліцев С.В., Ролінська Л.М.

УДК: 616.379-008.64+615.33]-028.77:59

Зябліцев С.В., Ролінська Л.М.
Донецький національний медичний університет імені М.Горького МОЗ України, кафедра патологічної фізіології (пр-т Ілліча,16, м.Донецьк, 83003, Україна)

МЕХАНІЗМИ РОЗВИТКУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОГО ДІАБЕТУ

Резюме. *Пошкодження інсулярного апарату підшлункової залози після дії STZ (введення 25 мг/кг триразово з інтервалом у 5 діб) були наявні три стадії. 1 стадія починалася після першого введення STZ та продовжувалася до 21-30 доби*