

МОДЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РОЛИ ОКСИДА АЗОТА В КАНАЛЬЦЕВЫХ ЭФФЕКТАХ ФИТОДИУРЕТИКОВ

© 2011 В.П. Панин, А.В. Дубищев, М.И. Панина, В.Б. Браславский

Самарский государственный медицинский университет

Поступила в редакцию 06.10.2011

В модельных опытах детализирован механизм канальцевого эффекта в почках биологически активного соединения (БАС) прунина и цинарозид, выделенных из растительного сырья ивы остролистной, и определена роль NO в прямом эффекте на биомембраны с использованием донатора L-аргинина и блокатора синтеза оксида азота N_w-нитро-L-аргинина.

Ключевые слова: *фитодиуретики, прунин, цинарозид, модели биологических мембран, транспорт нитрита, оксид азота*

Поиск новых лекарственных препаратов для профилактики и лечения заболеваний мочевыделительной системы является одной из ведущих задач бурно развивающихся в настоящее время фармакологии, фармакогнозии, фитотерапии и нефрологии. В последнее время прогрессивно растет численность больных с острой и хронической почечной недостаточностью, спровоцированной как контактом с различными токсическими веществами окружающей среды, так и продуктами питания, инфекционными заболеваниями и лекарственными препаратами. Острота вопроса состоит еще и в том, что почки – основной орган выведения различных метаболитов и вредных веществ из организма – очень трудно поддаются терапии при патологии, поэтому необходимо больше уделять внимания профилактике нефропатий [1, 8]. Известно, что растительные диуретики, часто используемые в народной медицине, отличаются мягкостью и относительной безопасностью действия, редкостью нарушений кислотно-щелочного, электролитного баланса и других побочных эффектов, возможностью назначения при противопоказаниях к синтетическим мочегонным средствам. Кроме того, растительные диуретики обладают сопутствующей антисептической активностью, их можно использовать длительно, резистентность к ним развивается крайне редко [2, 4].

Анализ фармакологических свойств лекарственных растений и выделенных из них индивидуальных действующих веществ открывает широкие перспективы для создания на их основе

эффективных лекарственных средств. В этом плане несомненный интерес представляют биологически активные соединения (БАС), источниками которых являются осина, тополь и ива, относящиеся к семейству ивовых [5]. Растения семейства ивовых являются перспективными источниками получения лекарственных препаратов с диуретической активностью. Во-первых, это доступный и широко представленный источник сырья; во-вторых, в них содержится множество БАС; и, в-третьих, эти БАС обладают множеством фармакологических эффектов, в том числе влияют и на почки [4, 5].

Одним из значительных достижений последних лет прошлого столетия стало открытие биорегуляторных свойств эндогенного оксида азота (NO). Он синтезируется практически во всех тканях организма и обладает широким спектром биологического действия. В почках NO образуется как в сосудах, так и в нефроцитах. Он участвует в регуляции почечного кровотока, клубочковой фильтрации, модуляции канальцевого транспорта электролитов и воды в нефронах как в норме, так и при почечной патологии [7]. Однако роль NO в регуляции функции почек окончательно не установлена. Литературные данные в оценке значения оксида азота крайне противоречивы. В ряде экспериментальных и клинических исследований выявлена важная роль NO в регуляции экскреторной функции почек. В то же время генерируемый мезангиальными и канальцевыми эпителиальными клетками NO может усиливать тканевое повреждение. Эта особенность была выявлена при гломерулонефрите у людей, на моделях клубочкового повреждения у животных и в экспериментах *in vivo* с использованием воспалительных цитокинов. Таким образом, изучение связи диуретической, салуретической и нефропротекторной активности фитопрепаратов с возможностью их изменять уровень NO в почках, как мощного фактора регуляции микроциркуляторных и метаболических процессов, позволит раскрыть механизм защитного

Панин Вячеслав Павлович, аспирант. E-mail: zip1@list.ru

Дубищев Алексей Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии

Панина Марина Ивановна, доктор медицинских наук, профессор кафедры общей и клинической патологии

Браславский Валерий Борисович, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии

действия и откроет пути поиска препаратов лечебного и профилактического направления. Это подтверждает актуальность данного исследования не только для фармакологии, фармакогнозии, но и для фармакоэкологии и клинической нефрологии.

Учитывая, что проведенные нами ранее исследования по изучению диуретической и NO-эксcretорной активности фитопрепаратов ивы в физиологических условиях выявили дозозависимые эффекты, а также учитывая низкую эффективность (по критерию NO-эксcretорной активности) фитопрепарата экстракта коры ивы остролистной сухого при токсической нефропатии и отрицательные эффекты воздействия на почечные функции, в том числе экскрецию метаболитов оксида азота, при токсической нефропатии выделенного из ивы индивидуального БАС феногликозида салицина, мы пришли к выводу о необходимости экспериментального изучения влияния на экскреторную функцию почек других БАС, содержащихся в растительном сырье ивы остролистной. Профессор В.А. Куркин с сотрудниками из растительного сырья ивы остролистной выделил в чистом виде БАС, относящиеся к группе флавоноидов: прунин и цинарозид.

Цель исследования: детализировать механизм канальцевого эффекта в почках БАС прунина и цинарозида, выделенных из растительного сырья ивы остролистной, как наиболее эффективной точки приложения действия препаратов на нефроциты. Также предстояло также выяснить участие NO в прямом эффекте на биомембраны, используя донатор и блокатор синтеза оксида азота.

Для решения вышеуказанной цели нами было поставлено несколько серий модельных опытов на биологических мембранах. Дело в том, что канальцевый транспорт натрия изучать на уровне почки, нефрона *in vivo* методически сложно. В определенной мере можно ответить на поставленный вопрос проведением экспериментов на биомоделях, выполняющих аналогичную функцию. Если препараты угнетают или стимулируют транспорт натрия в почечных канальцах, то и на биологических моделях при прямом действии их на транспортные структуры должен быть аналогичный эффект [3]. Известно, что в тонком кишечнике осуществляется направленный транспорт воды и ионов. Отрезки тонкой кишки и послужили модельным объектом, в котором осуществляются транспортные процессы, аналогичные таковым в нефронах. Наш выбор был остановлен на данной модели, так как она широко использовалась ранее с целью анализа действия диуретиков на транспорт ионов натрия, калия, хлора и межклеточную проницаемость [3].

В модельных опытах по исследованию транспорта натрия замкнутые отрезки тонкой кишки крыс наполнялись стандартным раствором Рингера и инкубировались в растворе Рингера,

содержащем вместо ионов натрия ионы лития. Дыхание изолированных тканей поддерживалось путем постоянной аэрации (пропускания воздуха через инкубационную среду под давлением). Количество натрия, перенесенного за 4 часа со стороны слизистой оболочки к серозной, стало показателем транспортных процессов. Исследуемые препараты вводились в инкубационные среды по обе стороны биомембран в концентрации 1 ммоль/л.

При исследовании действия прунина (рис. 1) в первые три часа эксперимента регистрировалось достоверное снижение транспорта натрия от мукозной поверхности кишки к серозной в 1,4 раза по сравнению с контролем. За 4-й час перенос натрия с внутренней поверхности кишки к наружной практически не изменился по сравнению с контролем. Таким образом, прунин тормозит ионный транспорт натрия через биологические мембраны.

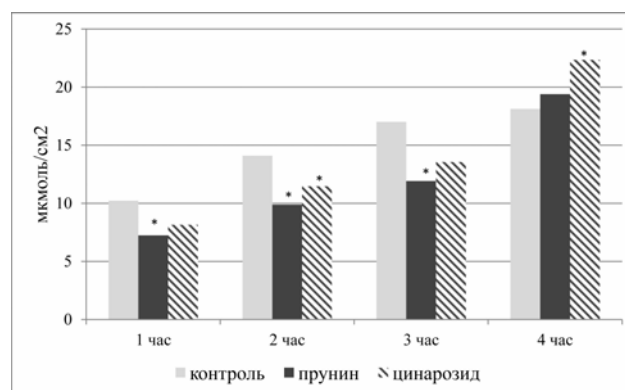


Рис. 1. Влияние прунина (1 ммоль/л) и цинарозида (1 ммоль/л) на транспорт натрия от мукозной поверхности к серозной оболочке стенки тонкой кишки ($M \pm s$, $n=10$)

Введение в инкубационные среды цинарозида (рис. 1) сопровождалось следующими изменениями переноса натрия от мукозной поверхности кишки к серозной. В 1-й час снижение транспорта натрия не носило достоверный характер; на 2-м часу транспорт натрия достоверно снизился в 1,2 раза по сравнению с контролем. На 3-м часу перенос натрия не отличался от контрольных величин. На 4-м часу ионный транспорт даже был выше контроля в 1,2 раза. Таким образом, эффект снижения проницаемости биологических мембран для натрия под действием цинарозида был менее существенным и нестойким, сменяясь затем повышением переноса ионов натрия через биологические мембраны.

Для изучения роли NO в регуляции транспорта натрия через стенку кишечника были поставлены опыты с L-аргинином – предшественником и активатором синтеза эндогенного оксида азота и N_w -нитро-L-аргинином – блокатором синтеза оксида азота, ингибирующего обе изоформы фермента NO-синтазы (cNOS, iNOS). При введении L-аргинина гидрохлорида (рис. 2) было

установлено достоверное снижение переноса ионов натрия от мукозной поверхности кишки к серозной в первые два часа исследований в 1,4 раза по сравнению с контролем. На 3-м часу эксперимента отмечалось менее значительное снижение транспорта натрия с внутренней поверхности кишки к наружной, на 4-м часу исследований транспорт натрия практически не отличался от контроля. Таким образом, можно сделать заключение о стабилизирующем влиянии L-аргинина на проницаемость биологических мембран для натрия, проявляющемся, однако, в ограниченном временном диапазоне.

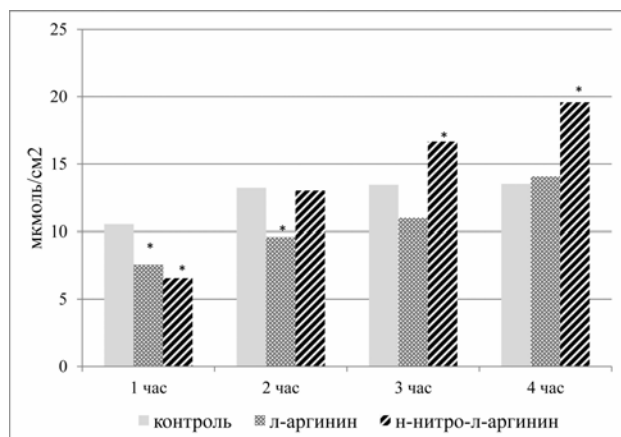


Рис. 2. Влияние L-аргинина гидрохлорида (1 ммоль/л) и N_w-нитро-L-аргинина (1 ммоль/л) на транспорт натрия от мукозной поверхности к серозной оболочке стенки тонкой кишки (M±s, n=10)

При исследовании влияния блокатора N_w-нитро-L-аргинина (рис. 2) было выявлено снижение транспорта натрия от мукозной поверхности кишки к серозной в 1-й час эксперимента в 1,6 раза по сравнению с контролем, что связано, по-видимому, с введением в инкубационные среды экзогенных нитрогрупп – источника NO – и стабилизацией биомембран для натрия. На 2-м часу перенос натрия практически не отличался от контрольных показателей. Далее было зафиксировано достоверное усиление переноса натрия с внутренней поверхности кишки к наружной: в 1,2 раза по сравнению с контролем за 3-й час и в 1,5 раза за 4-й час, связанное, по-видимому, с торможением ферментативного клеточного высвобождения эндогенного NO и повышением проницаемости биологических мембран для ионов натрия.

Модельные опыты с отрезками тонкой кишки крыс, имитирующими почечные каналцы, продемонстрировали влияние исследуемых веществ на перенос натрия через эпителиальный барьер. Значит, препараты могут влиять и на транспортные процессы в нефроцитах. Исследования, выполненные на кафедре фармакологии СамГМУ ранее [3], свидетельствуют о том, что транспорт натрия через биомембрану может идти

по двум направлениям: 1 – через клетку, 2 – через межклеточные промежутки. Поэтому необходимо было уточнить механизм действия веществ на целлюлярный и парацеллюлярный транспорт ионов с использованием соответствующих маркеров.

Для изучения возможного трансмембранного транспорта общепринятой моделью стали эритроциты. Мембранная организация эритроцитов аналогична другим клеткам. Они легкодоступны для экспериментов. Проницаемостные свойства эритроцитов оценивались с помощью флуоресцентного зонда 1-анилино-8-нафталинсульфоната (АНС), несущего на себе отрицательный заряд. Известно, что АНС мгновенно фиксируется на наружной поверхности мембраны эритроцитов посредством адсорбции (быстрая фаза, длительностью несколько минут), после чего АНС проникает внутрь клеток крови по градиенту концентрации (медленная фаза, длительностью до 1 часа) [3, 6]. В контроле перенос эритроцитарной пасты в раствор с АНС в концентрации 5 мкмоль/л через 1 минуту приводил к снижению концентрации флуоресцентного зонда с 5 мкмоль/л до 2,57±0,16* мкмоль/л (на 49%), что свидетельствовало об адсорбции молекул маркера на поверхности эритроцитов (рис. 3). Динамика дальнейшего падения концентрации зонда в инкубационном растворе выглядела так: через 5 минут она уменьшилась до 2,29±0,12* мкмоль/л (на 54%); спустя 10 и 20 минут до 2,21±0,11* мкмоль/л (на 56%) и до 2,14±0,15* мкмоль/л (на 57%), соответственно; на 40-й и 60-й минутах – до 1,86±0,14* мкмоль/л (на 63%) и до 2,0±0,09* мкмоль/л (на 60%), соответственно. (* - достоверность показателей, рассчитанная по критерию Уилкоксона p<0,5). Это свидетельствовало о поглощении зонда клетками до выравнивания концентрации маркера по обеим сторонам мембраны эритроцитов.

Добавление в инкубационную среду с АНС прунина в концентрации 1 ммоль/л вызывало выраженное снижение адсорбции флуоресцентного зонда на поверхности эритроцитов и торможение проникновения его внутрь клеток. За 1-ю минуту эксперимента концентрация зонда снизилась на 20%, достоверно меньше степени снижения в контроле. Из этого следует, что прунин значительно препятствует адсорбции АНС на поверхности эритроцитов. Кроме того, прунин замедлял и перенос флуоресцентного зонда через мембрану внутрь эритроцитов. Это было видно из динамики поглощения АНС эритроцитами (рис. 3). Цинарозид в концентрации 1 ммоль/л, добавленный в инкубационную среду с АНС, также препятствовал адсорбции флуоресцентного зонда на поверхности эритроцитов и проникновению маркера трансмембранного транспорта внутрь клеток. За 1-ю минуту эксперимента концентрация зонда снизилась на 33% – достоверно меньше величины снижения в контроле. Из этого

следует, что цинарозид оказывает тормозящее влияние на адсорбцию АНС на поверхности эритроцитов. Кроме того, цинарозид замедлял и перенос флуоресцентного зонда через мембрану внутрь эритроцитов. Это было видно из динамики поглощения АНС эритроцитами (рис. 3). Итак, эритроциты являются хорошей моделью для изучения проницаемости биологических мембран. Использование флуоресцентного зонда делает этот способ высокочувствительным.

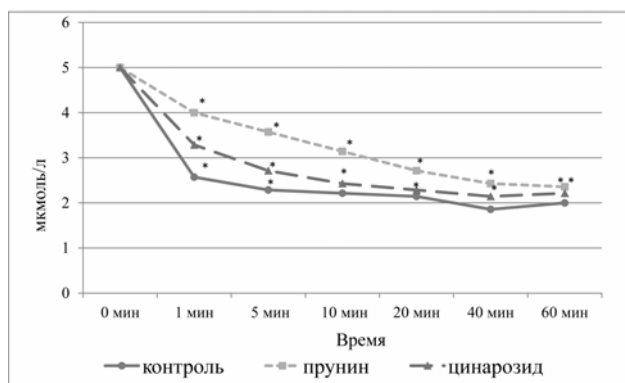


Рис. 3. Влияние прунина (1 ммоль/л) и цинарозида (1 ммоль/л) на динамику поглощения флуоресцентного зонда АНС эритроцитами крыс ($M \pm m$, $n=10$)

Таким образом, прунин и цинарозид оказывают стабилизирующее действие на мембраны, снижая их проницаемость для ионов. По-видимому, стабилизация мембран нефроцитов является одним из ведущих механизмов диуретического, салуретического действия выделенных БАС и фитопрепаратов, полученных из растений семейства ивовых. L-аргинин в концентрации 1 ммоль/л, добавленный в инкубационную среду с АНС, достоверно препятствовал адсорбции флуоресцентного зонда на поверхности эритроцитов, вызывая снижение его концентрации на 47% (в контроле – на 58%) и проникновение маркера трансмембранного транспорта внутрь клеток (рис. 4). Добавление в инкубационную среду с АНС N_w -нитро-L-аргинина также вызывало снижение адсорбции флуоресцентного зонда на поверхности эритроцитов и проникновение его внутрь клеток. За 1-ю минуту эксперимента концентрация зонда снизилась на 42% – еще меньше величины снижения, вызванного L-аргинином, и достоверно меньше степени снижения в контроле. Из этого следует, что N_w -нитро-L-аргинин оказывает выраженное тормозящее влияние на адсорбцию АНС на поверхности эритроцитов, по-видимому, выступая в данном эксперименте как донатор экзогенных нитрогрупп. Кроме того, N_w -нитро-L-аргинин более существенно, чем L-аргинин, замедлял и перенос флуоресцентного зонда через мембрану внутрь эритроцитов. Это было видно из динамики поглощения АНС эритроцитами.

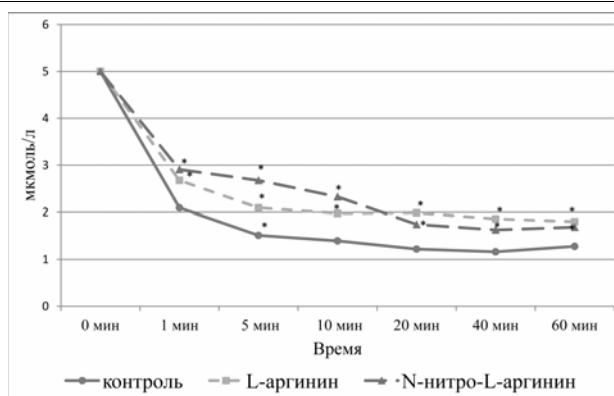


Рис. 4. Влияние L-аргинина гидрохлорида (1 ммоль/л) и N_w -нитро-L-аргинина (1 ммоль/л) на динамику поглощения флуоресцентного зонда АНС эритроцитами крыс ($M \pm m$, $n=10$)

Опыты с донатором и блокатором синтеза NO подтверждают участие оксида азота в транспортных процессах через клеточные мембраны. Зафиксированное нами ранее угнетение транспорта натрия в модельных опытах на отрезках тонкой кишки, могло быть результатом изменения и парацеллюлярного переноса иона. Возможность регуляции переноса натрия по межклеточным промежуткам за счет фиксированных отрицательных зарядов анализировалась на отрезках тонкой кишки крыс с использованием маркера межклеточного транспорта – флуоресцирующего вещества уранина. Уранин (флуоресцеина динатриевая соль) добавлялся в раствор со стороны слизистой оболочки, откуда по межклеточным промежуткам он проникал по градиенту концентрации в наружный раствор. Изменение концентрации уранина в наружном растворе было критерием межклеточного транспорта [3, 6].

При инкубации с пруниним и цинарозидом наблюдалась тенденция к снижению показателей транспорта уранина в экспериментах по сравнению с контрольными значениями, но изменения не носили характера значимых. При инкубации с L-аргинином на 1-м часу эксперимента значимых изменений транспортных процессов не наблюдалось. Далее наблюдалось достоверное снижение транспорта уранина: в 1,3 раза по сравнению с контролем – за 2-й час и в 1,4 раза по сравнению с контрольными значениями – за 3-й час. На 4-м часу эксперимента изменение транспортных процессов имело противоположную динамику, значимо не отличаясь, однако, от контроля вследствие высокой дисперсии показателей. Следовательно, L-аргинин может влиять и на парацеллюлярный транспорт ионов, стабилизируя проницаемость межклеточных соединений, однако, данный эффект проявляется в ограниченном временном диапазоне. При введении N_w -нитро-L-аргинина транспортные процессы в первые два часа практически не отличались от контроля. На третьем и четвертом часу инкубации

прослеживалась тенденция к усилению транспорта, но изменения показателей не носили характер значимых. Таким образом, из всех исследуемых веществ только L-аргинин может кратковременно влиять на парацеллюлярный транспорт ионов, стабилизируя межклеточную проницаемость.

Выводы:

1. В модельных опытах на отрезках тонкой кишки БАС прунин вызывает угнетение транспорта натрия от слизистой оболочки к серозной. Аналогичный эффект оказывает активатор синтеза NO – L-аргинин. Блокатор синтеза NO – N_w-нитро-L-аргинин увеличивает перенос натрия через стенку кишечника. БАС цинарозид действует неоднозначно. Исследуемые препараты практически не влияют на межклеточный транспорт уранина.

2. В модельных опытах на эритроцитах БАС прунин, а также L-аргинин и N_w-нитро-L-аргинин препятствуют адсорбции флуоресцентного зонда АНС на поверхности эритроцитов и замедляют его перенос через мембрану внутрь клеток. Действие БАС цинарозида выражено слабее.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Арутюнов, Г.П. Проблема гиперфилтрации в клинической практике / Г.П. Арутюнов, Л.Г. Оганезова // Клиническая нефрология. 2009. № 1. С. 29-40.

2. Брюханов, В.М. Побочные эффекты современных диуретиков: метаболические и токсико-аллергические аспекты / В.М. Брюханов, Я.Ф. Зверев. – Новосибирск: «ЦЭРИС», 2003. – 224 с.
3. Дубищев, А.В. Новое представление о механизме регуляции канальцевого транспорта натрия в нефронах / А.В. Дубищев, Е.Н. Зайцева // «Актуальные вопросы последилового образования и здравоохранения». Юбилейный сборник научных работ. – Самара, 2008. С. 89.
4. Егоров, В.А. Пути рационального использования новых лекарственных растений семейства Salicaceae / В.А. Егоров, В.А. Куркин, В.Б. Браславский и др. // Человек и лекарство: Тезисы докладов VI Российского национального конгресса. – М., 1999. С. 405.
5. Куркин, В.А. Флавоноиды почек *Populus balsamifera* L. / В.А. Куркин, В.Б. Браславский, Г.Г. Запесочная // Химия природных соединений. 1990. № 2. С. 272-273.
6. Лебедев, А.А. Фармакология почек. Очерки к 50-летию исследования проблемы / А.А. Лебедев. – Самара, 2002. 104 с.
7. Топчий, И.И. Роль оксида азота в регуляции функции почек при прогрессирующих гломерулопатиях // Украинский терапевтический журнал. 2002. Т.4, № 2. С. 72-76.
8. Yoneko, M. New approach for chronic renal failure model by direct kidney injection of doxorubicin in rats / M. Yoneko, J. Kamei, C.F. Ito, J. Kojima // J. Meth. And Find. Exp. And Clin. Pharmacol. 2007. V. 29, № 6. P. 389-394.

MODELING EXPERIENCES OF OXIDE NITROGEN ROLE IN RENAL TUBULAR EFFECTS OF PHYTODIURETICS

© 2011 V.P. Panin, A.V. Dubishchev, M.I. Panina, V.B. Braslavskiy

Samara State Medical University

In modeling experiences the mechanism of renal tubular effect in nephros by biologically active compound (BAC) prunin and cinarozid, allocated of vegetative raw materials of *Salix* is detailed, and role of NO in direct effect on biomembranes with use of aid donor of L-arginine and blocker of synthesis oxide of nitrogen of N_w-nitro-L-arginine is defined.

Key words: *phytodiuretics, prunin, cinarozid, models of biological membranes, sodium transport, nitrogen oxide*

Vyacheslav Panin, Post-graduate Student. E-mail: zip1@list.ru
Aleksy Dubishchev, Doctor of Medicine, Professor, Head of the
Pharmacology Department

Marina Panina, Doctor of Medicine, Professor at the Common
and Clinical Pathology Department

Valeriy Braslavskiy, Candidate of Pharmacy, Associate Professor
at the Pharmacognosy with Botany and Bases of Phytotherapy Department