

УДК 616.61+616.36+616.15]-06:616-099-092

©Т. М. Бойчук, Ю. Є. Роговий, В. В. Белявський, М. В. Дікал
Буковинський державний медичний університет**ВПЛИВ МЕЛАТОНІНУ НА ФУНКЦІЮ НИРОК ТА ЦИТОКІНИ КРОВІ ЗА УМОВ УВЕДЕННЯ
2,4 - ДІНІТРОФЕНОЛУ**

ВПЛИВ МЕЛАТОНІНУ НА ФУНКЦІЮ НИРОК ТА ЦИТОКІНИ КРОВІ ЗА УМОВ УВЕДЕННЯ 2,4 - ДІНІТРОФЕНОЛУ – У дослідках на 40 білих нелінійних щурах-самцях масою 0,16 – 0,20 кг при гіпонатрієвому раціоні харчування через 2 год моделювання тканинної гіпоксії за введення 2,4-динітрофенолу встановлено захисний вплив екзогенного мелатоніну на функціональний стан нирок та рівень цитокінів крові, який зменшував втрати іонів натрію та білка з сечею, знижував рівень інтерлейкіну-1 β та підвищував концентрацію інтерлейкіну - 6 в плазмі крові.

ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА НА ФУНКЦИЮ ПОЧЕК И ЦИТОКИНЫ КРОВИ ПРИ ВВЕДЕНИИ 2,4 - ДИНИТРОФЕНОЛА – В опытах на 40 белых нелинейных крысах-самцах массой 0,16 – 0,20 кг при гипонатриевом рационе питания через 2 часа моделирования тканевой гипоксии после введения 2,4-динитрофенола показано защитное влияние экзогенного мелатонина на функциональное состояние почек и уровень цитокинов крови, который уменьшал потери ионов натрия и белка с мочей, снижал уровень интерлейкина-1 β и повышал концентрацию интерлейкина-6 в плазме крови.

THE INFLUENCE OF MELATONIN ON KIDNEYS' FUNCTION AND LEVEL OF BLOOD CYTOKINES UNDER THE CONDITIONS OF 2,4-DINITROFENOL INTRODUCTION – The protective influence of exogenous melatonin on the functional state of kidneys and concentration of cytokines in blood plasma, which decreasing of the urinary loss of sodium ions and protein, level of interleukin-1 β in blood plasma and accompanied with a growth of the interleukin – 6 in blood plasma have been shown in experiments on 40 albino nonlinear male rats with the body weight 0,16–0,20 kg under the conditions of hyposodium dietary intake in 2 hours of simulating tissue hypoxia after introduction of 2,4-dinitrofenol.

Ключові слова: 2,4-динітрофенол, нирки, мелатонін, синдром втрати іонів натрію, цитокіни.

Ключевые слова: 2,4-динитрофенол, почки, мелатонин, синдром потери ионов натрия, цитокины.

Key words: 2,4-dinitrofenol, kidneys, melatonin, syndrome of sodium ions loss, cytokines.

ВСТУП Відомо, що введення 2,4-динітрофенолу викликає розвиток гострої тканинної гіпоксії [1, 10, 13] із-за розщеплення процесів окиснення і фосфорилування, що може призвести до розладів функції нирок та супроводжуватися порушенням головного енергозалежного процесу – реабсорбції іонів натрію [9]. Такі зміни на початкових етапах пошкодження можуть супроводжуватися розвитком синдрому втрати іонів натрію з сечею [3] та зростанням прозапальних цитокінів у крові. Попереджувати розвиток даних реакцій пошкодження може антиоксидант мелатонін, який є донором електронів, синергістом багатьох антиоксидантів, зв'язує вільні радикали, стимулює активність антиоксидувальних ферментів, захищає ядра клітин від пошкодження. Мелатонін є сильним антиоксидантом і забезпечує захист білкових молекул від окиснювального пошкодження, і є однією із головних молекул в системі захисту організму від окиснювального стресу, і може виявляти протекторні властивості на каналці нирок [12]. Водночас захисна роль

мелатоніну на показники функції нирок та цитокіни крові за умов гіпонатрієвого раціону харчування при гострій тканинній гіпоксії, зумовленій введенням 2,4-динітрофенолу, досліджена не достатньо.

Метою дослідження стало з'ясування захисної ролі введення екзогенного мелатоніну на показники функції нирок та цитокіни крові за умов гіпонатрієвого раціону харчування при гострій тканинній гіпоксії, зумовленій введенням 2,4-динітрофенолу.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ Експерименти проведено на 40 білих нелінійних щурах-самцях масою 0,16–0,20 кг, в яких моделювали гостру тканинну гіпоксію шляхом уведення 0,1 % розчину 2,4-динітрофенолу внутрішньоочеревинно в дозі 3 мг/кг одноразово [10]. Стійкість щурів до гострої гіпоксії оцінювали за часом втрати пози на "висотному плато" гострої гіпобаричної гіпоксії і часом загального перебування тварин від моменту досягнення "висоти" 12000 м до появи другого агонального вдиху (час життя або резервний час), а також за часом відновлення пози з моменту початку спуску. Виділяли три групи тварин: високо-, середньо- і низькостійкі [2]. Усі подальші дослідження проводили на середньостійких щурах.

Екзогенний мелатонін вводили в дозі 3,5 мг/кг одноразово [12].

Функціональний стан нирок досліджували за умов водного діурезу, для чого щурам внутрішньошлунково, за допомогою металевого зонда, вводили водопровідну воду, підігріту до температури 37 °С в кількості 5 % від маси тіла. Величину діурезу (V) оцінювали в мл/2 год^m100 г, відносно го діурезу у відсотках. Після водного навантаження з метою отримання плазми проводили евтаназію тварин шляхом декапітації під легким ефірним наркозом, в кров збирали в пробірці з гепарином. Швидкість клубочкової фільтрації (C_{cr}) оцінювали за кліренсом ендogenous креатиніну, яку розраховували за формулою:

$$C_{cr} = U_{cr} \cdot V / P_{cr}$$

де U_{cr} і P_{cr} – концентрація креатиніну в сечі і плазмі крові відповідно.

Фільтраційну фракцію іонів натрію (FFNa⁺) оцінювали за формулою:

$$FFNa^{+} = C_{cr} \cdot PNa^{+}$$

де PNa⁺ – концентрація іонів натрію в плазмі крові.

Екскрецію іонів натрію (EFNa⁺), калію (EFK⁺), білка (E_{pr}), креатиніну (E_{cr}) розраховували за формулами:

$$EFNa^{+} = V \cdot UNa^{+}$$

$$EFK^{+} = V \cdot UK^{+}$$

$$E_{pr} = V \cdot U_{pr}$$

$$E_{cr} = V \cdot U_{cr}$$

де UNa⁺, UK⁺, U_{pr} – концентрації іонів натрію, калію, білка в сечі. Абсолютну реабсорбцію іонів натрію (RFNa⁺) розраховували за формулою:

$$RFNa^+ = C_{cr} \cdot PNa^+ - V \cdot UNa^+$$

Відносну реабсорбцію іонів натрію ($RFNa^+$) оцінювали за формулою:

$$RFNa^+ \% = (1 - V \cdot UNa^+ / C_{cr} \cdot PNa^+) \cdot 100 \%$$

Досліджували проксимальну та дистальну реабсорбцію іонів натрію (T^pNa^+ , T^dNa^+). Розрахунки проводили за формулами:

$$T^pNa^+ = (C_{cr} - V) \cdot PNa^+$$

$$T^dNa^+ = (PNa^+ - UNa^+) \cdot V$$

Розраховували кліренси іонів натрію (CNa^+) та безнатрієвої ($C^{H_2O} Na^+$) води за формулами:

$$CNa^+ = V \cdot UNa^+ / PNa^+$$

$$C^{H_2O} Na^+ = V - V \cdot UNa^+ / PNa^+ [11].$$

Фактор некрозу пухлин - α , інтерлейкін - 1β та інтерлейкін - 6 в плазмі крові визначали імуноферментним методом [3, 5, 14].

Статистичну обробку отриманих даних проводили на комп'ютері за допомогою програми "Statgrafics" та "Excell 7.0". Усі експерименти проведені з дотриманням правил проведення робіт з використанням експериментальних тварин (1977 р.) та положень Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовуються в експериментах та інших наукових цілях (від 18 березня 1986 р.).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ На тлі введення екзогенного мелатоніну знижувався рівень інтерлейкіну- 1β , мала місце тенденція до гальмування концентрації фактору некрозу пухлин- α та зростав інтерлейкін- 6 в плазмі крові через 2 год після моделювання тканинної гіпоксії на фоні уведення 2,4-динітрофенолу в дозі 3 мг/кг за умов гіпонатрієвого раціону харчування (рис. 1).

За умов уведення екзогенного мелатоніну при тканинній гіпоксії викликаній 2, 4-динітрофенолом величина сечовиділення, відносний діурез, концентрація та екскреція іонів калію в сечі, клубочкова фільтрація, концентрація креатиніну в плазмі крові, екскреція та концентраційний індекс ендogenousного креатиніну змін не зазнавали. Концентрація і екскреція білка в сечі знижувалися (табл. 1).

Оцінка транспорту іонів натрію за умов уведення екзогенного мелатоніну на фоні тканинної гіпоксії викликаній 2, 4 - динітрофенолом виявила гальмування концентрації та екскреції іонів натрію в сечі. Фільтраційна фракція, абсолютна реабсорбція іонів натрію змін не зазнавали. Відносна реабсорбція іонів натрію зростала. Знижувалися концентраційний індекс та кліренс іонів натрію, не змінювався кліренс вільної від іонів натрію води. Проксимальна і дистальна реабсорбції іонів натрію характеризувалися тенденцією до росту. Концентрація іонів натрію в плазмі крові не змінювалася (табл. 2).

Уведення 2, 4-динітрофенолу зумовлювало зниження рівня АТФ у ниркових канальцях в середньому у 2 рази [10] за рахунок розщеплення окиснення і фосфорилування. Дефіцит АТФ і ймовірно активація перекисного окиснення ліпідів та білків за умов тканинної гіпоксії призводили до порушення головного енергозалежного процесу ниркових канальців – реабсорбції іонів натрію [4], що вик-

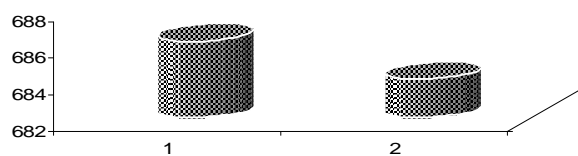
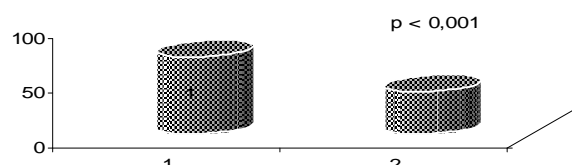
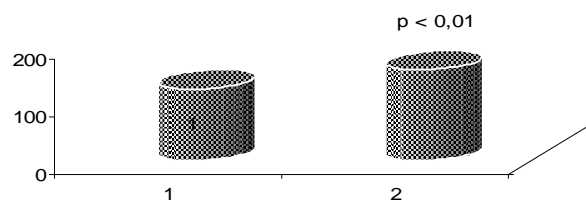
Фактор некрозу пухлин - α (пг/мл)Інтерлейкін - 1β (пг/мл)Інтерлейкін - 6 (пг/мл)

Рис. 1. Вплив уведення екзогенного мелатоніну в дозі 3,5 мг/кг на концентрації в плазмі крові фактору некрозу пухлин- α , інтерлейкіну- 1β , інтерлейкіну- 6 через 2 год після введення 2, 4-динітрофенолу в дозі 3 мг/кг за умов гіпонатрієвого раціону харчування при водному індукованому діурезі в об'ємі 5 % від маси тіла. 1 – уведення 2, 4 - динітрофенолу, 2 – уведення 2, 4-динітрофенолу на фоні мелатоніну; p – вірогідність різниць порівняно з уведенням 2, 4-динітрофенолу.

ликало розвиток синдрому втрати досліджуваного катіона. Пошкодження бар'єрів кишечника та печінки на фоні енергодефіциту призводило до транслокації ендотоксину з просвіту кишечника в кров [8], який зумовлював зростання концентрації фактору некрозу пухлин- α , інтерлейкіну- 1β , інтерлейкіну- 6 [7, 15], які у свою чергу викликали додаткові реакції пошкодження ниркових канальців із підсиленням прояву синдрому втрати іонів натрію.

Такі зміни можна розцінювати як прояв ранніх механізмів розвитку псевдогепаторенального синдрому за умов введення 2,4-динітрофенолу [6].

Мелатонін за рахунок своїх антиоксидантних властивостей виявляв захисні цитопротекторні впливи на канальці нирок, що призводило до покращання відносної реабсорбції іонів натрію із зменшенням прояву втрати даного електроліту з сечею. На що вказувало зниження концентрації, екскреції іонів натрію, концентраційного індексу та кліренсу досліджуваного катіона. Крім того, захис-

Таблиця 1. Вплив уведення екзогенного мелатоніну в дозі 3,5 мг/кг на показники функції нирок через 2 год після введення 2, 4-динітрофенолу в дозі 3 мг/кг за умов гіпонатрієвого раціону харчування при водному індукованому діурезі в об'ємі 5 % від маси тіла ($\bar{x} \pm S_x$)

Показники	2, 4-динітрофенол (n=10)	2, 4-динітрофенол + мелатонін (n=10)
Діурез, мл/2 год · 100 г	3,72±0,253	3,94±0,216
Відносний діурез, %	74,51±5,069	78,8±4,32
Концентрація іонів калію в сечі, ммоль/л	26,9±4,39	19,2±1,98
Екскреція іонів калію, мкмоль/2 год · 100 г	90,4±7,99	76,2±8,91
Концентрація креатиніну в сечі, ммоль/л	1,41±0,058	1,15±0,013
Екскреція креатиніну, мкмоль/2 год · 100 г	5,13±0,186	4,54±0,254
Концентрація креатиніну в плазмі крові, ммоль/л	47,10±2,030	43,6±3,52
Концентраційний індекс ендogenous креатиніну, од.	30,6±2,04	28,7±3,25
Клубочкова фільтрація, мкл/хв · 100 г	919,1±42,61	938,7±122,72
Концентрація білка в сечі, г/л	0,032±0,0063	0,013±0,0021
Екскреція білка, мг/ 2 год · 100 г	0,105±0,0122	0,050±0,0060
Екскреція білка, мг/100 мкл C_{cr}	0,012±0,0017	0,006±0,0008

Примітки: 1. p – вірогідність різниць порівняно з уведенням 2, 4-динітрофенолу; 2. n – число спостережень.

Таблиця 2. Вплив уведення екзогенного мелатоніну в дозі 3,5 мг/кг на транспорт іонів натрію через 2 год після введення 2, 4-динітрофенолу в дозі 3 мг/кг за умов гіпонатрієвого раціону харчування при водному індукованому діурезі в об'ємі 5 % від маси тіла ($\bar{x} \pm S_x$)

Показники	2, 4-динітрофенол (n=10)	2, 4-динітрофенол + мелатонін (n=10)
Концентрація іонів натрію в сечі, ммоль/л	0,76±0,061	0,31±0,038
Концентрація іонів натрію в плазмі крові, моль/л	136,0±1,675	138,5±2,61
Фільтраційна фракція іонів натрію, мкмоль/хв · 100 г	125,34±6,932	128,6±15,67
Екскреція іонів натрію, мкмоль/2 год · 100 г	2,80±0,293	1,27±0,213
Екскреція іонів натрію, мкмоль/100 мкл C_{cr}	0,305±0,0284	0,144±0,0252
Абсолютна реабсорбція іонів натрію, мкмоль/хв · 100 г	125,3±6,93	128,5±15,66
Відносна реабсорбція іонів натрію, %	99,981±0,0018	99,991±0,0015
Концентраційний індекс іонів натрію, у. о.	0,006±0,0005	0,002±0,0003
Кліренс іонів натрію, мл/2 год · 100 г	0,021±0,0023	0,009±0,0016
Кліренс вільної від іонів натрію води, мл/2 год · 100 г	3,71±0,252	3,93±0,214
Дистальна реабсорбція іонів натрію, мкмоль/2 год · 100 г	503,5±34,73	541,1±26,19
Проксимальна реабсорбція іонів натрію, ммоль/2 год · 100 г	14,53±0,811	14,89±1,874
Дистальна реабсорбція іонів натрію, мкмоль/100 мкл C_{cr}	0,457±0,0256	0,525±0,0445
Проксимальна реабсорбція іонів натрію, ммоль/100 мкл C_{cr}	13,14±0,176	13,32±0,250

Примітки: 1. p – вірогідність різниць порівняно з уведенням 2, 4-динітрофенолу; 2. n – число спостережень.

на дія мелатоніну на проксимальний відділ нефрону приводила до покращання реабсорбції білка та зменшення ступеня протеїнурії. Зниження рівня інтерлейкіну-1 β та тенденція до зниження концентрації фактору некрозу пухлин- α на фоні введення екзогенного мелатоніну вказують на протекторні властивості “гормону темряви” щодо прозапальних цитокінів. Водночас, зростання рівня інтерлейкіну-6 на фоні введення мелатоніну, ймовірно сприяє прояву захисних властивостей інтерлейкіну-6, оскільки зазначений цитокін може виявляти не тільки прозапальні, але й протизапальні властивості.

ВИСНОВОК У досліджах на статевозрілих білих нелінійних щурах-самцях при гіпонатрієвому раціоні харчування через 2 год моделювання тканинної гіпоксії за введення 2,4-динітрофенолу встановлено захисний вплив екзогенного мелатоніну на функціональний стан нирок та рівень цитокінів крові, який зменшував втрати іонів натрію та білка з сечею, знижував рівень інтерлейкіну-1 β та підвищував концентрацію інтерлейкіну-6 в плазмі крові.

Перспективи подальших досліджень З'ясування ролі інтерлейкіну-6 у патогенезі псевдогепаторенального синдрому за умов введення 2,4-динітрофенолу.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Агаджанян Н. А. Классификация гипоксических, гипо- и гиперкапнических состояний / Н. А. Агаджанян, А. Я. Чижов // *Фізіол. ж.* – 2003. – Т. 49, № 3. – С. 11–16.
2. Березовский В. А. Гипоксия и индивидуальные особенности реактивности / В. А. Березовский. – К. : Наук. думка, 1978. – 216 с.
3. Білоокій В. В. Роль фактора некрозу пухлин-альфа, інтерлейкінів-6,-4 у патогенезі ступенів тяжкості перебігу жовчного перитоніту / В. В. Білоокій, Ю. Є. Роговий // *Шпитальна хірургія.* – 2007. – № 4. – С. 36–39.
4. Гоженко А. І. “Приховане” ушкодження проксимального відділу нефрону / А. І. Гоженко, Ю. Є. Роговий, О. С. Федорук // *Одеський мед. ж.* – 2001. – № 5. – С. 16–19.
5. Дікал М. В. Роль фактору некрозу пухлин-альфа в патогенезі тубуло-інтерстиційного синдрому за хронічного нефриту Мазугі / М. В. Дікал, Ю. Є. Роговий // *Вісн. наукових досліджень.* – 2007. – № 2. – С. 108–111.
6. Маммаев С. Н. Гепаторенальный синдром 1-го и 2-го типа: современное состояние проблемы / С. Н. Маммаев, А. М. Каримова // *Рос. ж. гастроэнтерол. гепатол. колопроктол.* – 2008. – Т. 18, № 6. – С. 4–14.
7. Місцевий імунітет травного тракту / [Стасенко А. А., Саєнко В. Ф., Діброва Ю. А. та ін.]. – К. : Три крапки, 2005. – 216 с.
8. Пат. 5601 UA, МПК А61В10/00, G01N33/ 50. Спосіб діагностики синдрому транслокації / Білоокій В. В., Пішак В. П., Роговий Ю. Є. та ін. заявка 20040705910; заявл. 19.07.2004; опубл. 15.03.2005, Бюл. № 3.
9. Пішак В. П. Універсальність ушкодження проксимального канальця при захворюваннях нирок / В. П. Пішак, В. В. Білоокій, Ю. Є. Роговий // *Клінічна та експериментальна патологія.* – 2005. – Т. 4, № 1. – С. 72–76.
10. Путилина Ф. Е. Влияние гипоксии и 2,4-динитрофенала на лактатдегидрогеназную реакцию в мозгу, печени и почках / Ф. Е. Путилина, Н. Д. Ещенко // *Вопросы мед. химии.* – 1971. – Т. 17, № 2. – С. 161–165.
11. Сучасні методики експериментальних та клінічних досліджень центральної науково-дослідної лабораторії Буковинської державної медичної академії : навч.-метод. посіб. / [В. М. Магальяс, А. О. Міхеєв, Ю. Є. Роговий та ін.]. – Чернівці : Буковинська державна медична академія, 2001. – 42 с.
12. Шинкарьок В. Г. Характеристика показників іонорегулювальної функції нирок у щурів в динаміці розвитку гліцеролової гострої ниркової недостатності за різних умов освітлення на фоні екзогенного введення гормону шишкоподібного тіла мелатоніну / В. Г. Шинкарьок // *Клінічна та експериментальна патологія.* – 2010. – Т. IX, № 2 (32). – С. 122–126.
13. Eckardt K.U. Role of hypoxia in the pathogenesis of renal disease/ K. U. Eckardt, C. Rosenberger, J.S. Jurgensen [et. al.] // *Blood Purif.* – 2003. – № 21. – P. 253–257.
14. TNF-a-dependent bilateral renal injury is induced by unilateral renal ischemia-reperfusion/ Meldrum K. K., Y. Xiao, R. R. Desrosiers, R. Beliveau // *American Journal Physiology.* – 2002. – Vol. 282, № 2. – P. 540–546.
15. Basic Pathology / [Robbins, Kumar, Abbas, Fausto, Mitchell]. – [8th ed.]. – Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo: Bsevier Inc. – 2007. – 902 p.

Отримано 21.02.11