

На правах рукописи



Правикова Полина Дмитриевна

**РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА (II) В МОДУЛЯЦИИ
ОСМОРЕГУЛИРУЮЩЕГО ЭФФЕКТА ВАЗОПРЕССИНА**

1.5.5. Физиология человека и животных

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Томск – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук».

Научный руководитель: академик РАН, доктор медицинских наук,
профессор **Иванова Людмила Николаевна**

Официальные оппоненты:

Айзман Роман Иделевич, доктор биологических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный педагогический университет», кафедра анатомии, физиологии и безопасности жизнедеятельности, заведующий кафедрой

Парнова Римма Германовна, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, лаборатория сравнительной биохимии клеточных функций, главный научный сотрудник

Дзгоев Станислав Георгиевич, кандидат биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный научный центр «Владикавказский научный центр Российской академии наук», лаборатория субклеточных структур Института биомедицинских исследований – филиала ВНИЦ РАН, старший научный сотрудник

Защита состоится 22 марта 2023 г. в 14 час. 00 мин. на заседании диссертационного совета «НИ ТГУ.1.5.03», созданного на базе Института биологии, экологии, почвоведения, сельского и лесного хозяйства (Биологического института) федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет» по адресу: 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36 (Дом спорта ТГУ, аудитория 3).

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке и на официальном сайте федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет» www.tsu.ru.

Материалы по защите диссертации размещены на официальном сайте ТГУ: <https://dissertations.tsu.ru/PublicApplications/Details/3f9a81bd-d7ad-4676-8cc3-e8a1db4f5b1a>

Автореферат разослан «___» февраля 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета *Kaof* Кабачкова Анастасия Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы исследования. Адекватность и устойчивость работы любой регуляторной системы у высших животных зависит от функционирования механизмов, модулирующих эффект основного стимулирующего фактора по принципу отрицательной обратной связи. Основным фактором в системе регуляции осмотического гомеостаза у млекопитающих является нейрогипофизарный гормон вазопрессин (ВП), определяющий как интенсивность реабсорбции воды в почке [Agre, 2002], так и внеклеточную проницаемость интерстиция почечной медуллы, разделяющий элементы концентрирующего механизма почки [Stridh et al., 2012]. Оксид азота (NO) относится к числу аутокоидных, ренопротективных факторов почки [Shirazi et al., 2019], синтез которого в почке активируется самим ВП [Martin et al., 2002; O'Connor & Cowley, 2006]. NO, реализуя свой эффект в почечной ткани через cGMP-зависимый путь [Chang et al., 2018], участвует в регуляции как реабсорбции солей и воды [Kone & Baylis, 1997; Stoos & Garvin, 1997], так и почечной гемодинамики [Dautzenberg et al., 2014; Jude et al., 2016]. Поскольку ранее установлена ВП-независимая стимуляция водной проницаемости эпителия собирательных трубок (СТ), индуцируемая NO и cGMP [Bouley et al., 2005], применение препаратов, повышающих активность cGMP-сигнального пути, является одним из новых экспериментальных терапевтических подходов в лечении различных нарушений концентрирующей функции почек [Sanches et al., 2012; Assadi et al., 2015]. Вместе с тем к настоящему времени получены противоречивые данные о влиянии аутокоида почки NO на процесс осмотического концентрирования, а также отсутствует информация о включении структур интерстиция почечной медуллы в модуляцию оксидом азота осморегулирующего эффекта ВП.

Таким образом, исследование механизмов модуляции аутокоидным фактором почки оксидом азота осморегулирующего эффекта ВП дает возможность не только расширить представления о регуляции концентрирующей функции почек, но также подойти с новых позиций к изучению нарушений процесса осмотического концентрирования и послужить основой для поиска путей ее коррекции при таких заболеваниях, как несахарный диабет, артериальная гипертензия, сердечная недостаточность и др.

Степень разработанности темы исследования. К настоящему времени достигнут существенный прогресс в понимании молекулярных механизмов, индуцируемых ВП в эпителии почечных канальцев, завершающихся транслокацией водных каналов аквапоринов (AQP) и увеличением водопроницаемости эпителия [Rinschen et al., 2010; Fenton et al., 2020]. Вместе с тем получены данные о регуляции вазопрессином проницаемости внеклеточного матрикса почечной медуллы посредством изменения полимерности его компонентов, определяющих физико-химические свойства интерстиция почки [Ivanova et al., 2017]. В последние годы при изучении механизмов модуляции осморегулирующего эффекта ВП значительное внимание уделяется роли местных, аутокоидных факторов, выделение которых стимулирует сам гормон, формируя, тем самым, отрицательную обратную связь [Pearce et al., 2015; Leipziger & Praetorius, 2020]. Аутокоидными почечными факторами, участвующими в модуляции антидиуретического эффекта ВП, являются – эндотелин, простагландин E₂, дофамин, брадикинин, NO и др. [Pearce et al., 2015]. Несмотря на то, что NO многими исследователями определяется в качестве диуретического и натрийуретического агента [Garvin et al., 2011; Krishnan et al., 2018], механизмы вовлечения аутокоида в модуляцию осморегулирующей функции ВП во многом остаются неясными. NO реализует эффект через cGMP-сигнальный путь [Chang et al., 2018], тогда как сигнальный путь для ВП в эпителии СТ при активации V₂R представлен cAMP-системой [Tamma et al., 2011]. Ранее было установлено, что NO/cGMP-сигнальный путь индуцирует транслокацию AQP2 в апикальную мембрану СТ [Bouley et al., 2000; Noda & Sasaki, 2006], что подтверждалось в условиях применения факторов, повышающих внутриклеточный уровень cGMP [Bouley et al., 2005; Boone et al., 2010]. Вместе с тем другие авторы установили, что стимуляция NO/cGMP-сигнального пути уменьшает фосфорилирование AQP2, снижая водопроницаемость эпителия СТ [García et al., 1996;

Klokkers et al., 2009]. Предполагается, что внутриклеточные каскады ВП и NO взаимосвязаны, и NO может осуществлять своё влияние на почечные процессы, модулируя эффект антидиуретического гормона посредством воздействия на активность сАМР-системы [Bouley et al., 2008].

Целью данного исследования явился анализ механизмов модуляции аутоагонистным фактором почки оксидом азота (NO) осморегулирующего эффекта вазопрессина.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Исследовать гидроуретическую и натрийуретическую функцию почек у крыс WAG и у ВП-дефицитных крыс Brattleboro в условиях блокады синтеза NO, а также при активации его синтеза.

2. Оценить влияние активации аденилатциклазной и гуанилатциклазной сигнальных систем на параметры осморегулирующей функции почек у крыс WAG и ВП-дефицитных крыс Brattleboro при блокаде специфичных фосфодиэстераз (PDE-4 и PDE-5), устраняющих деградацию сАМР и сGMP.

3. Изучить влияние аутоагониста NO на состояние межклеточного матрикса почечной медуллы, формирующего барьер между структурами концентрирующей системы для диффузии воды и ионов у крыс WAG и у ВП-дефицитных крыс Brattleboro.

Научная новизна исследования. В экспериментах *in vivo* с использованием уникальной генетической модели ВП-дефицитных крыс Brattleboro, а также на крысах WAG с нормальным и сниженным в результате гидратации уровнем ВП впервые проведено комплексное морфофункциональное исследование роли NO в модуляции осморегулирующего эффекта ВП.

Установлено, что NO модулирует антидиуретический эффект вазопрессина. При блокаде синтеза NO установлен диуретический ответ вследствие устранения тонического активирующего эффекта NO на реабсорбцию воды, тогда как при активации NO/сGMP-сигнального пути при введении как экзогенного донора NO (НПН), так и силденафила, устраняющего деградирующее влияние PDE-5 на уровень сGMP, не выявлено изменений параметров гидроуреза.

Впервые установлено, что NO оказывает влияние на параметры натрийуретической функции почек, направленность изменений которых зависит от уровня эндогенного ВП в крови. При активации NO/сGMP-сигнального пути у крыс WAG с высоким уровнем ВП в крови выявлен антинатрийуретический эффект в связи со стимуляцией реабсорбции натрия, тогда как на ВП-дефицитной линии крыс Brattleboro, лишенных эндогенного ВП, установлен прямой ВП-независимый ингибирующий эффект NO на реабсорбцию натрия в эпителии почечных канальцев. В то же время наличие существенных изменений осморегулирующей функции при введении ингибитора PDE-4 ролипрама, повышающего активность сАМР-системы, определяется высоким уровнем эндогенного ВП в крови: у крыс WAG установлено снижение эффективности осмотического концентрирования вследствие торможения реабсорбции воды и натрия.

Впервые выявлено, что в модуляцию осморегулирующего эффекта ВП оксидом азота вовлекаются структуры интерстиция почечной медуллы, определяющие интенсивность внеклеточной диффузии воды и ионов. У крыс WAG при блокаде синтеза NO зафиксировано увеличение количества гистохимически выявляемого гиалуронана почечной медуллы вследствие изменения экспрессии генов, кодирующих ферменты его метаболизма (*HAS2*, *Hyal2*).

Научно-практическая значимость работы. Результаты исследования механизмов модуляции оксидом азота осморегулирующего эффекта вазопрессина расширяют современные представления о клеточных и молекулярных основах регуляции концентрирующей функции почки и могут способствовать разработке новых подходов к коррекции тубулоинтерстициальных повреждений, развивающихся при многих поражениях почечной ткани. Данные, полученные в ходе исследования, используются в курсе лекций по физиологии для студентов Новосибирского Государственного Университета.

Методология и методы исследования. Исследование выполнено на базе Лаборатории физиологической генетики Института цитологии и генетики СО РАН (ФИЦ ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск). В опытах использованы крысы линии инбредной WAG и ВП-дефицитные крысы линии Brattleboro из ЦКП вивария конвенциональных животных ИЦиГ СО РАН. Выполнение процедур проводилось как в соответствии с международными рекомендациями по работе с экспериментальными животными, а также с разрешением комитета по биоэтике ИЦиГ СО РАН.

Исследование, посвященное исследованию роли оксида азота в модуляции осморегулирующего эффекта вазопрессина, включало три экспериментальные серии: блокада синтеза NO, стимуляция синтеза NO, а также активации cAMP- и cGMP-сигнальных систем при селективном ингибировании фосфодиэстераз. Исследовалась количественная оценка почечной функций: скорость клубочковой фильтрации по клиренсу эндогенного креатинина (СКФ), диурез (V), клиренс осмотически активных веществ (C_{osm}), уровень реабсорбции осмотически свободной воды ($T_{H_2O}^c$), экскреция (E_{Na}) и экскретируемая фракция натрия (FE_{Na}). В экспериментах с пролонгированным ингибированием синтеза NO у животных постмортально выделяли образцы ткани для гистохимического и морфометрического анализа структур мозгового вещества почки, для определения кортико-медуллярного градиента натрия, а также для выделения тотальной РНК с последующим анализом уровня мРНК генов, кодирующих ферменты метаболизма гиалуронана почечной медуллы.

Положения, выносимые на защиту:

1. NO модулирует антидиуретический эффект вазопрессина. Блокада синтеза NO приводит к развитию диуретической реакции вследствие торможения реабсорбции осмотически свободной воды, тогда как при активации NO/cGMP-сигнального пути не установлено существенных изменений параметров гидроуретической функции почек.

2. NO модулирует осморегулирующий эффект вазопрессина, стимулируя реабсорбцию натрия, тогда как прямой ВП-независимый эффект NO направлен на торможение транспорта натрия в эпителии почечных канальцев.

3. В модуляцию осморегулирующего эффекта вазопрессина оксидом азота вовлекаются компоненты интерстиция почечной медуллы, реструктуризация которых при блокаде синтеза NO обусловлена изменением экспрессии генов, кодирующих ферменты метаболизма гиалуронана.

Степень достоверности полученных результатов. Достоверность полученных данных определяется высоким уровнем используемых современных методов, которые соответствовали поставленной цели и задачам. Исследование проводилось на современном сертифицированном оборудовании с последующей апробацией полученных данных в реферируемых научных журналах, включённых в список ВАК. Результаты исследования можно считать достоверными, поскольку применяемые методы статистического анализа характеризовались использованием адекватных критериев в соответствии с размерами и однородностью выборки с учетом пола и возраста животных.

Апробация материалов диссертации. Основные результаты работы были представлены на научных конференциях в виде устных докладов: на XXII международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных, ЛОМОНОСОВ-2015 (Москва, 2015), на XXIII съезде Физиологического общества им. И. П. Павлова (Воронеж, 2017), Всероссийской молодёжной конференции с международным участием «Современные аспекты интегративной физиологии» (Санкт-Петербург, 2018), на объединённом научном форуме VI съезда физиологов СНГ (Сочи, 2019), на 58-й международной научной студенческой конференции, МНСК (Новосибирск, 2020), на объединённом научном форуме VII съезда физиологов СНГ (Сочи, 2021).

Публикации по теме диссертации. По теме диссертации опубликовано 11 работ, в том числе 2 статьи в журналах, включённых в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук (из

них 1 статья в российском научном журнале, переводная версия которого входит в Scopus, 1 статья в российском журнале, переводная версия которой входит в журнал, входящем в Web of Science), 3 статьи в прочем научном журнале, 6 публикаций в сборниках материалов международных и всероссийской с международным участием конференций, научных форумов, съезда с международным участием.

Финансовая поддержка исследования. Основная часть работ была с была выполнена в рамках грантов Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 17-04-01073 А, № 20-04-00298 А).

Объем и структура диссертации. Материал диссертации изложен на 164 страницах, содержит 28 рисунков и 8 таблиц. Список литературы включает 439 российских и зарубежных источников. Текст диссертации построен по классическому типу и состоит из введения, четырех глав, заключения, списка условных обозначений и сокращений и списка литературы.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В первой главе представлен обзор литературы, в котором подробно описаны принципы регуляции водно-электролитного обмена у млекопитающих. Проведен анализ современных данных о молекулярных механизмах регуляции нейрогипофизарным гормоном вазопрессинном процесса осмотического концентрирования. Особое внимание уделяется роли почечных аутокоидов в модуляции осморегулирующего эффекта вазопрессина.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Экспериментальные животные

Эксперименты проведены на крысах в возрасте 8-недель, самках, линии WAG (Wistar Albino Glaxo) и гомозиготных ВП-дефицитных крысах Brattleboro из ЦКП вивария конвенциональных животных ФИЦ ИЦиГ СО РАН, содержавшиеся на стандартном рационе со свободным доступом к питьевой воде. Масса животных варьировалась от 160 до 190 грамм. Для выявления значимости уровня эндогенного ВП в регуляции процесса осмотического концентрирования при блокаде или активации синтеза NO были также проведены опыты на крысах WAG, у которых в течение 3-х суток подавлялась секреция ВП в условиях потребления гипотонического 5% раствора сахарозы [Fathollahi et al., 2015]. Размер каждой экспериментальной группы во всех сериях — от 9 до 12 особей.

2.2 Экспериментальные воздействия: дизайн эксперимента

Блокада синтеза NO. Поскольку в почечной ткани экспрессируются все типы синтаз NO [Bouley et al., 2008], для устранения влияния NO использовался неселективный ингибитор синтаз оксида азота, L-NAME (N(омега)-нитро-L-аргинин метиловый эфир, Сигма, США). L-NAME предварительно растворяли в 0,9 %-ном растворе хлорида натрия для инфузий и вводили внутривентриально дважды в день в течение 2 суток, 5 мг/100 г массы тела [Dobrowolski et al., 2015; Tain et al., 2015]. Контрольным животным вводили раствор хлорида натрия для инфузий объемом 0,1 мл/ 100 г массы тела. Все животные были разделены на 3 пары экспериментальных групп: контрольные крысы WAG и ВП дефицитные крысы Brattleboro; крысы обеих линий при введении ингибитора синтеза NO (L-NAME); крысы WAG в условиях гидратирующего рациона, гидратированные крысы WAG с введением L-NAME. Через 2 часа после последней инъекции животных помещали в индивидуальные клетки с проволочным дном для сбора спонтанно выделяющейся мочи.

Активация синтеза NO. Для активации синтеза NO в условиях краткосрочного эксперимента использовался экзогенный донор NO (дигидрат нитропруссид натрия, НПН, Сигма, США). НПН растворяли в 5%-ном растворе глюкозы для инфузий и вводили внутривентриально дважды в течение 2,5 часов в дозе 0,075 мг/ 100 г массы тела. Контрольным особям вводился внутривентриально 5%-ный раствор глюкозы для инфузий объемом 0,1 мл/100 г массы тела. Крысы двух линий были подразделены на 3 пары

экспериментальных групп: контрольные крысы WAG и ВП дефицитные крысы Brattleboro; крысы обеих линий в условиях введения НПН; гидратированные крысы WAG и гидратированные крысы WAG с введением НПН. Через 30 минут после последней инъекции собиралась спонтанно выделяющаяся моча для оценки функции почек [Hottinger et al., 2014].

Активация аденилатциклазной и гуанилатциклазной систем селективной блокадой фосфодиэстераз. Для оценки осморегулирующей функции почек у крыс WAG и Brattleboro при активации как сAMP-системы, так и сGMP-сигнального пути при устранении деградации сAMP и сGMP блокадой PDE. Использовались ингибиторы как сAMP-зависимый PDE-4 (ролипрам), так и сGMP-зависимой PDE-5 (силденафил цитрат). Контрольным крысам WAG и Brattleboro внутривентрально вводился раствор хлорида натрия для инфузий в объеме 0.1 мл/100 г массы тела. Ролипрам (Сигма, США), предварительно растворенный в капле 96%-ного этанола, разводили 0,9 %-ном растворе хлорида натрия и вводили внутривентрально в дозе 0.4 мг/0.1 мл/100 г массы тела дважды с интервалом 120 мин [Ding et al., 2018]. Через 2 часа после второй инъекции производился сбор спонтанно отделяемой мочи [Ahloulay et al., 2005]. Силденафил цитрат (Сигма, США) растворяли в физиологическом растворе и однократно внутривентрально вводили в дозе 0.5 мг/0.1 мл/100 г массы тела [Bouley et al., 2005] крысам обеих линий и через 90 мин собирали спонтанно экскретируемую мочу [Assadi et al., 2015].

После окончания экспериментального периода животных, предварительно анестезированных тиопенталом натрия, декапитировали и забирали пробы крови. В экспериментах с блокадой синтеза NO (L-NAME) у животных забирали также образцы почечной ткани для гистохимического анализа, определения кортико-медуллярных градиента натрия, а также для выделения тотальной РНК.

2.3 Количественная оценка почечных функций

Расчет параметров гидроуретической и натрийуретической функции проводился во всех экспериментальных группах. Скорость клубочковой фильтрации (СКФ) принимали равной клиренсу эндогенного креатинина, концентрацию которого в моче и в сыворотке крови измеряли при 490 нм на фотометре BioPhotometr plus («Eppendorf», Германия). В пробах мочи и в сыворотке крови определяли концентрацию осмотически активных веществ криоскопическим методом на миллиосмометре ОСКР-1М («КИВИ», Россия). Содержание катионов натрия в пробах мочи, сыворотке крови, а также в образцах почечной ткани определяли методом пламенной фотометрии (Flame photometer 410 Sherwood, Великобритания). Образцы ткани различных зон почки, высушивали до постоянной массы и помещали в 1н раствор серной кислоты. Концентрационный индекс, осмотическое очищения (C_{osm}), реабсорбцию осмотически свободной воды ($T_{H_2O}^c$), экскрецию (E_{Na}) и экскретируемую фракцию натрия (FE_{Na}) вычисляли по стандартным формулам на 100 грамм массы тела [Наточин, 1993; Голосова и др., 2015]. Кортико-медуллярный градиент натрия рассчитывали, как отношение его концентрации в мозговом веществе к концентрации в коре.

2.4 Светооптическое исследование структуры мозгового вещества почки

В условиях пролонгированной блокады синтеза NO проводилось светооптическое исследование структур мозгового вещества почки крыс. Для гистохимического качественного выявления гиалуронана ткань почки фиксировали в 10% формалине и далее по стандартной методике [Bancroft et al., 2002] обезживали и заливали в среду Histomix (Бiovitrum, Россия). Парафиновые срезы получали толщиной 6 мкм на микротоме HM 340 (Microm, Германия). Гистохимическое выявление гиалуронана проводили с помощью раствора алцианового синего, pH=2,5 (Biovitrum, Россия). Препараты изучали на световом микроскопе Axioscop 40 (Carl Zeiss, Германия) при увеличении объектива $\times 63$. Снимки выполнены с помощью цифровой фотонасадки AxioCam MRc (Carl Zeiss, Германия).

Морфометрия высоты эпителиоцитов СТ сосочка почки проводилась с помощью программы AxioVision 4.5 (Carl Zeiss, Германия).

2.5 Оценка экспрессии генов, кодирующих ферменты метаболизма НА, а также α -субъединицу ENaC в почке крыс

При устранении действия NO на фоне введения ингибитора его синтаз (L-NAME) методом ОТ-ПЦР в реальном времени определяли в почечной медулле уровень экспрессии генов, кодирующих ферменты метаболизма гиалуроновой кислоты: гиалуронан-синтаза-2 и гиалуронидаза-2 (HAS2, Hyal2). Количество мРНК *SCNN1a* (α -субъединицы ENaC) корковой зоны почки исследовалась в условиях применения селективного ингибитора PDE-5 силденафила. В качестве внутреннего стандарта использовался ген, кодирующий белок гипоксантинфосфорибозил-трансферазу-1 (HPRT1), поскольку данный ген стабильно экспрессируется ($CV \leq 10\%$) в почечной ткани у крыс [Kim et al., 2014]. Тотальную РНК из ткани почек выделяли при помощи набора реагентов Aurum Total RNA Mini kit (Bio-Rad, США) согласно прилагаемому протоколу. Для получения кДНК использовался набор реактивов MMLV RT kit (Евроген, Россия). Смесь, содержащую 1-2 мкг РНК, инкубировали в течение 60 мин при 42°C, для остановки реакции смесь прогревали 10 мин при 70°C. ПЦР в реальном времени проводили в реакционной смеси в присутствии интеркалирующего красителя EVA Green (Синтол, Россия). Ген-специфичные праймеры синтезировали в группе олигонуклеотидного синтеза ИФХБМ СО РАН (Биосинтез, Новосибирск, Россия). Амплификацию проводили на CFX96 real-time PCR (BioRad, США). Каждое измерение нормировали относительно экспрессии гена *HPRT1* и рассчитывали по методу $\Delta\Delta C_t$ [Bookout et al. 2006]. Продукты амплификации визуализировали при помощи электрофореза с использованием 1% этидиум бромид (Медиген, Новосибирск, Россия) в 1,8% агарозном геле.

2.6 Определение концентрации cGMP в моче иммуноферментным методом

Поскольку NO реализует эффект через cGMP-сигнальный путь, представляло интерес оценить концентрацию cGMP в моче в условиях введения L-NAME. Концентрацию cGMP в моче у крыс WAG и Brattleboro в условиях долговременной блокады синтеза NO (L-NAME) определяли на микропланшетном фотометре (Multiskan GO, Thermo) иммуноферментным анализом с использованием набора ab1333026 Cyclic GMP ELISA kit (abcam, Великобритания). Общее описание количественного метода: стандарты и экспериментальные образцы добавляли в покрытые антителами IgG лунки вместе с конъюгатом антигена к cGMP и специфическим антителом к cGMP. После инкубации и промывания добавляли субстрат, который впоследствии преобразовывался в результате биохимических реакций в регистрируемый при 405 нм сигнал, интенсивность которого обратно пропорциональна концентрации cGMP в пробирке.

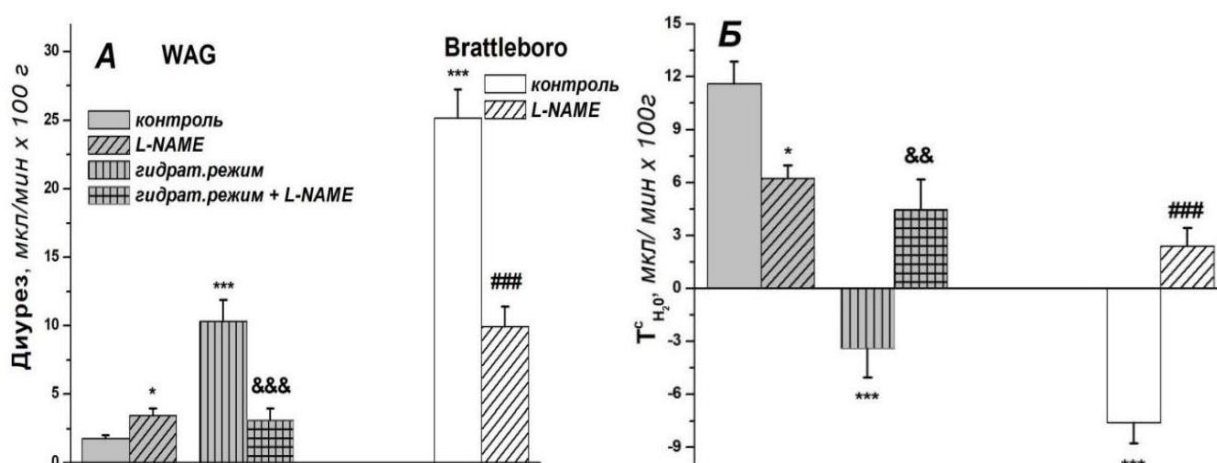
2.7 Статистическая обработка данных

Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ ошибка среднего ($M \pm SEM$). Достоверность различий оценивали в программе Statistica 8.0 с помощью апостериорного критерия Тьюки (Tukey HSD test) для множественных сравнений. Для парного сравнения средних между линиями крыс применялся критерий Стьюдента для независимых выборок. Достоверными считали различия при $p < 0.05$. Статистическому анализу предшествовал анализ нормальности распределения данных групп с применением критерия Шапиро-Уилка.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Влияние блокады синтеза NO на осморегулирующую функцию почек у крыс с различным уровнем вазопрессина в крови

Блокада синтеза NO при введении L-NAME вызывала разнонаправленные изменения гидроуретической функции почек у крыс двух линий (рисунок 1) при существенном снижении СКФ у всех групп животных в связи с вазоконстрикторным эффектом блокады NO [Böger et al., 1994] (таблица 1). У крыс WAG, содержащихся на стандартном водно-солевом режиме, при блокаде синтеза NO зафиксировано увеличение диуреза в результате торможения реабсорбции воды (рисунок 1). Подобный диуретический эффект при устранении действия NO был отмечен ранее в экспериментах на крысах с инфузией ингибитора синтеза NO в почечную артерию [Ortiz et al., 2002]. Следует заметить, что у крыс WAG в условиях действия L-NAME осмотическое концентрирование оставалось на достаточно высоком уровне, а показатели натрийуретической функции достоверно не изменялись (рисунок 2), что обусловлено преимущественной ролью ВП в регуляции экскреции натрия [Perussa et al., 2008]. В то же время у ВП-дефицитной линии Brattleboro, а также у гидратированных крыс WAG, экскретирующих в интактном состоянии гипотоническую мочу (рисунок 1), введение L-NAME, напротив, приводило к увеличению эффективности концентрирования: к значительному снижению скорости мочеотделения в связи со стимуляцией реабсорбции осмотически свободной воды (рисунок 1). Увеличение эффективности концентрирования у крыс Brattleboro, кроме того, обусловлено активацией функции противоточно-поворотной множительной системы в связи с достоверным приростом кортико-медуллярного градиента натрия (2.4 ± 0.2 в контроле; 3.8 ± 0.3 в опыте, $p < 0.05$) вследствие стимуляции его реабсорбции. У крыс Brattleboro при блокаде синтеза NO выявлена антинатрийуретическая реакция: уменьшение экскретируемой фракции натрия и скорости его экскреции (рисунок 2). Антинатрийуретический ответ у крыс Brattleboro, как предполагается, является следствием устранения прямого ингибирующего эффекта NO на транспорт натрия. Активация синтеза NO снижает активность эпителиального натриевого канала в почке (ENaC) и приводит к развитию натрийуреза [Hyndman et al., 2017], тогда как блокада нейрональной синтазы NO, напротив, снижает скорость экскреции натрия [Nakano et al., 2008].



А – скорость мочеотделения (V); Б – реабсорбция осмотически свободной воды (T_{cH_2O})

Достоверность различий: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ – сравнение с контрольной группой WAG;

$p < 0,001$ – сравнение с контрольной группой Brattleboro; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ – сравнение с гидратированной группой WAG

Рисунок 1 – Влияние блокады синтеза NO (L-NAME) на параметры гидроуретической функции у крыс WAG и у ВП-дефицитных крыс Brattleboro ($M \pm SEM$)

Таблица 1 – Влияние блокады синтеза NO (L-NAME) на скорость клубочковой фильтрации (СКФ) у крыс линий WAG и Brattleboro

Показатель	СКФ, мл/мин	
Экспериментальные группы	Контроль	L-NAME
WAG	0,48±0,05	0,30±0,05*
WAG гидратированные	0,49±0,07	0,3±0,02 ^{&}
Brattleboro	0,71±0,05**	0,43±0,05 ^{##}

Примечание: Все значения представлены как $M \pm SEM$. Различия достоверны при * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ – сравнение с контрольной группой WAG; [&] $p < 0,05$ – сравнение с гидратированной группой WAG; ^{##} $p < 0,01$ – сравнение с контрольной группой Brattleboro.

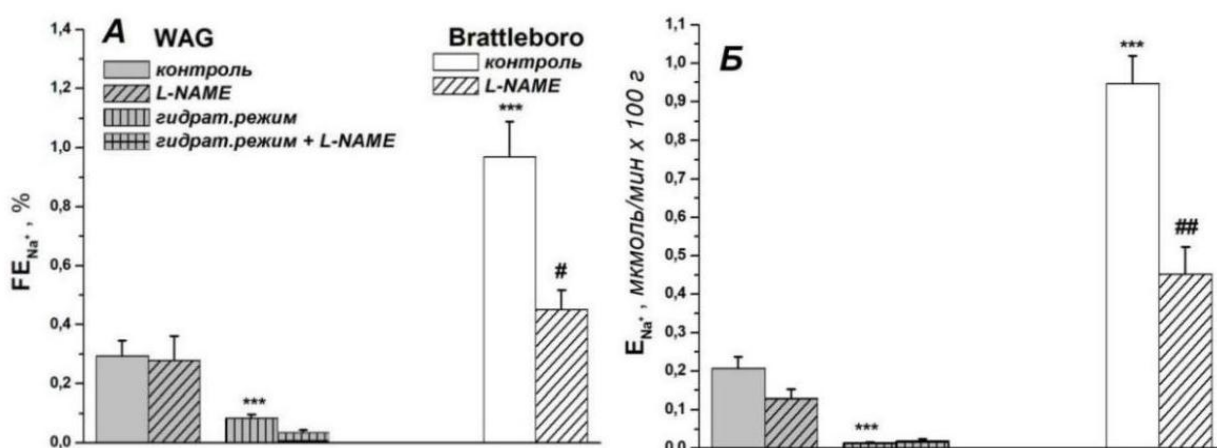
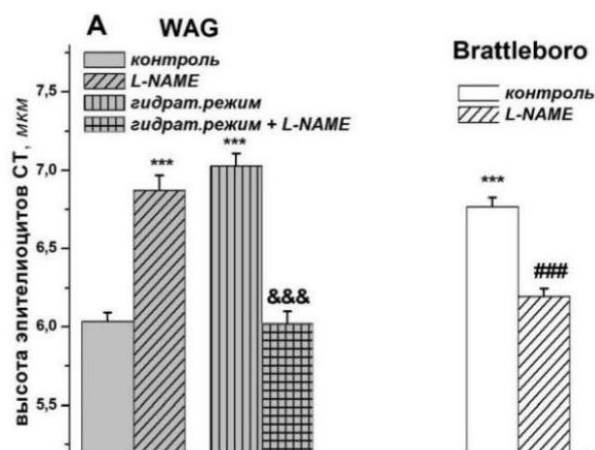


Рисунок 2 – Влияние блокады синтеза NO (L-NAME) на параметры натрийуретической функции почек у крыс WAG и у ВП-дефицитных крыс Brattleboro ($M \pm SEM$)

С изменением параметров осмотического концентрирования у крыс коррелируют морфологические перестройки эпителиоцитов собирательных трубок (СТ) гормон-чувствительной области сосочка, анализ состояния которых представляет существенный интерес, поскольку высота клеток определяется осмоляльностью интерстициальной и внутриканальцевой жидкости и является отражением изменений показателей концентрирующей функции почек. Морфометрический анализ показал, что в условиях блокады синтеза NO у крыс WAG диуретическая реакция сопровождалась увеличением высоты эпителиоцитов СТ почечной медуллы (рисунок 3). В противоположность этому, введение L-NAME как ВП-дефицитным крысам Brattleboro, так и гидратированным особям WAG приводило к уплощению эпителиоцитов СТ (рисунок 3), что обусловлено гипертонической средой внутриканальцевой жидкости, вызывающей изменения объема клеток вследствие их дегидратации [Bhave & Neilson, 2011]. Выявленная реакция эпителия СТ сосочка почки при устранении действия NO, очевидно, является следствием изменения осмотической концентрации канальцевой жидкости при изменении эффективности осмотического концентрирования.



Достоверность различий: *** $p < 0,001$ – сравнение с контрольной группой WAG; &&& $p < 0,001$ – сравнение с гидратированной группой WAG; ### $p < 0,001$ – сравнение с контрольной группой Brattleboro

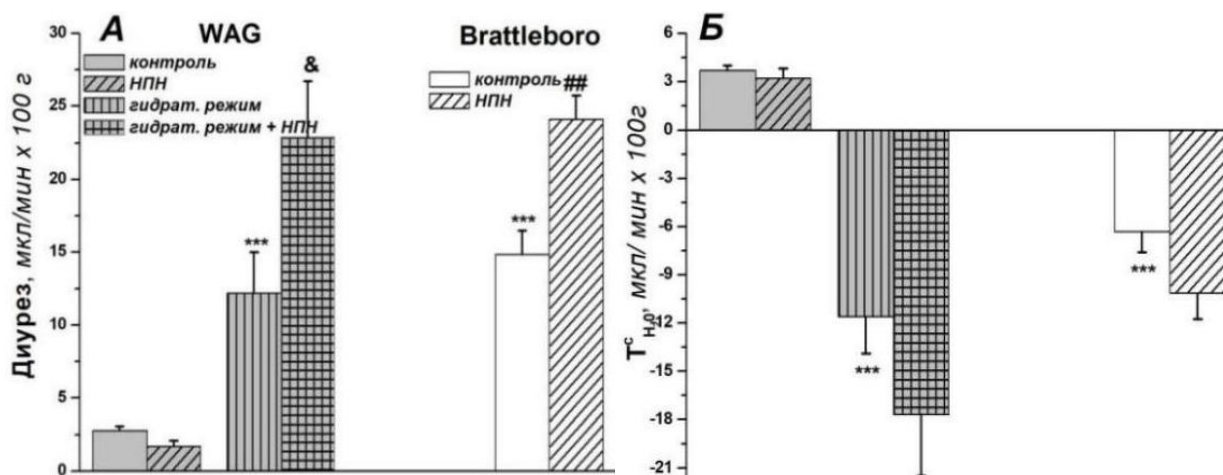
Рисунок 3 – Высота эпителиоцитов СТ средней трети сосочка почки у крыс WAG и у ВП-дефицитных крыс Brattleboro в условиях устранения действия NO ($M \pm SEM$)

Таким образом, блокада синтеза NO (L-NAME) приводит к существенным изменениям концентрирующей функции почек, направленность которых определяется уровнем эндогенного ВП в крови животных. У крыс WAG устранение действия NO приводит к диуретической реакции, в то время как у ВП-дефицитных крыс Brattleboro и у гидратированных крыс WAG развивается антидиурез вследствие усиления реабсорбции осмотически свободной воды. Введение L-NAME ВП-дефицитным крысам Brattleboro, в отличие от особей WAG, сопровождается снижением скорости экскреции натрия вследствие устранения тонического ингибирующего действия эндогенного NO на транспорт натрия в эпителии почечных канальцев.

3.2 Влияние активации синтеза NO на процесс осмотического концентрирования у крыс с различным уровнем вазопрессина в крови

При активации синтеза NO путём введения экзогенного донора НПН не выявлено достоверных изменений параметров гидроуретической функции у крыс WAG (рисунок 4). Учитывая отсутствие изменений параметров гидроуреза у крыс с нормальным уровнем ВП в крови при стимуляции синтеза NO, предполагается, что более значимое влияние принадлежит ВП в реализации осморегулирующего эффекта. В то же время у крыс WAG активация синтеза NO сопровождалась развитием антинатрийуреза, о чём свидетельствует снижение скорости экскреции и экскретируемой фракции натрия (рисунок 5). Предполагается, что выявленный антинатрийурез при введении НПН у крыс WAG обусловлен изменением реабсорбции натрия в дистальном сегменте нефрона и кортикальной зоны СТ. Известно, что активация NO/cGMP/PKG-системы способна оказывать стимулирующее влияние как на ВП-регулируемую транслокацию ENaC-канала [Yamada et al., 2007], так и на экспрессию гена, кодирующего его α -субъединицу [Chen et al., 2014]. Вместе с тем у ВП-дефицитных крыс Brattleboro и у гидратированных крыс WAG введение НПН приводило к развитию салиуреза: увеличение скорости экскреции натрия (рисунок 5) на фоне ускорения мочеотделения (рисунок 4). Выявленное нами увеличение диуреза без существенных изменений показателя реабсорбции осмотически свободной воды у ВП-дефицитных крыс Brattleboro, а также у гидратированных крыс WAG было обусловлено ускорением СКФ (Brattleboro: 0.34 ± 0.05 мл/мин – контроль, 0.79 ± 0.1 мл/мин – НПН, $p < 0.001$; гидратированные WAG: 0.2 ± 0.02 мл/мин – контроль, 0.33 ± 0.03 мл/мин – НПН, $p < 0.01$) в связи с сосудорасширяющим эффектом NO [Hottinger et al., 2014]. Увеличение диуреза у ВП-дефицитных крыс Brattleboro и гидратированных особей WAG в условиях введения НПН сопровождалось натрийуретической реакцией (рисунок 5), что

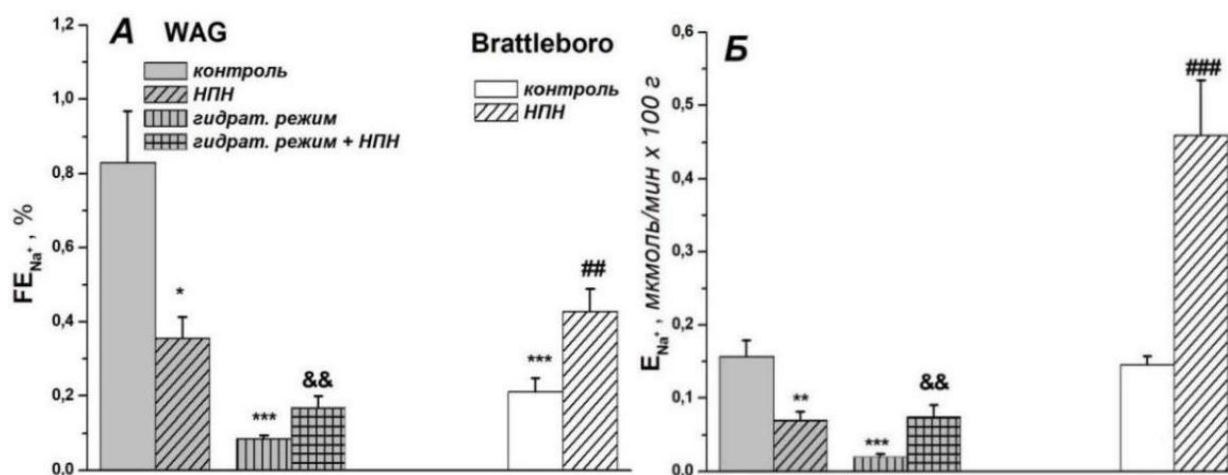
подтверждает ингибирующий ВП-независимый эффект NO на реабсорбцию натрия [Shirai et al., 2014; Mergia et al., 2016].



А – скорость мочеотделения (V); Б – реабсорбция осмотически свободной воды ($T_{H_2O}^c$)

Достоверность различий: *** $p < 0,001$ – сравнение с контрольной группой WAG; ## $p < 0,01$ – сравнение с контрольной группой Brattleboro; & $p < 0,05$ – сравнение с гидратированной группой WAG

Рисунок 4 – Влияние активации синтеза NO (НПН) на параметры гидроуретической функции у крыс WAG и у ВП-дефицитных крыс Brattleboro ($M \pm SEM$)



А – экскретируемая фракция натрия (FE_{Na^+}); Б – скорость экскреции натрия (E_{Na^+}).

Достоверность различий: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ – сравнение с контрольной группой WAG; && $p < 0,01$ – сравнение с гидратированной группой WAG; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ – сравнение с контрольной группой Brattleboro

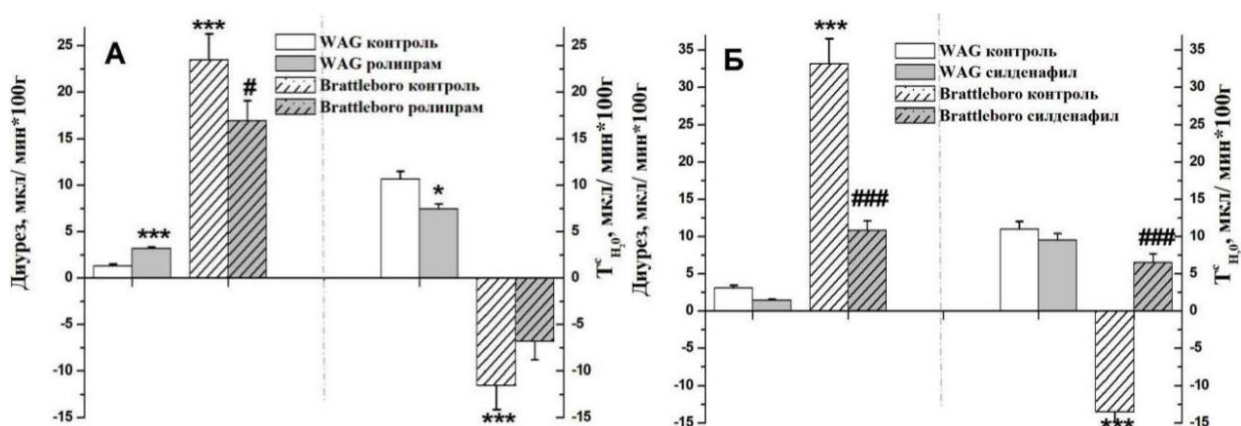
Рисунок 5 – Влияние активации синтеза NO (НПН) на параметры натрийуретической функции почек у крыс WAG и у ВП-дефицитных крыс Brattleboro ($M \pm SEM$)

Таким образом, при активации синтеза NO (НПН) не установлено существенных изменений уровня реабсорбции осмотически свободной воды, в то время как направленность изменений параметров натрийуретической функции зависит от уровня эндогенного ВП в крови. У крыс WAG с нормальным уровнем ВП введение НПН сопровождается антинатрийуретической реакцией, обусловленной стимуляцией реабсорбции натрия, в то время как у ВП-дефицитных крыс Brattleboro и у гидратированных особей WAG выявлено ускорение экскреции натрия вследствие прямого ингибирующего влияния NO на его транспорт в эпителии канальцев почки.

3.3 Влияние блокады специфичных фосфодиэстераз (PDE-4, PDE-5) на процесс осмотического концентрирования у крыс с различным уровнем вазопрессина в крови

У крыс WAG в условиях действия селективного ингибитора PDE-4 ролипрама, устраняющего деградацию cAMP [Ding et al., 2018], была установлена диуретическая реакция вследствие снижения реабсорбции осмотически свободной воды (рисунок 6 А), тогда как введение блокатора PDE-5, силденафила, повышающего содержание cGMP в структурах почки [Bouley et al., 2005], не приводило к существенным изменениям параметров гидруреза (рисунок 6 Б). В отличие от крыс WAG, у ВП-дефицитных крыс Brattleboro инъекция силденафила способствовала снижению скорости мочеотделения вследствие возрастания реабсорбции осмотически свободной воды (рисунок 6 Б). Выявленный антидиуретический эффект в условиях введения силденафила, очевидно, является следствием установленного ранее увеличения транслокации AQP2 в апикальную мембрану эпителиоцитов СТ [Bouley et al., 2005] и согласуется с данными об увеличении эффективности концентрирования мочи силденафилом у крыс с литий-индуцированными симптомами несахарного диабета [Sanches et al., 2012]. Между тем у крыс Brattleboro в условиях введения ролипрама, напротив, было установлено снижение скорости мочеотделения вследствие уменьшения СКФ (0.58 ± 0.03 мл/мин – контроль, 0.40 ± 0.04 мл/мин – ролипрам, $p < 0.01$) при отсутствии значимых изменений показателей реабсорбции осмотически свободной воды (рисунок 6 А).

Введение блокатора PDE-4 ролипрама привело к изменениям параметров натрийуретической функции лишь у крыс WAG с нормальным уровнем ВП в крови. У крыс WAG установлено увеличение уровня осмотического очищения и скорости экскреции натрия в результате резкого возрастания экскретируемой фракции катиона, тогда как у крыс Brattleboro изменения параметров натрийуреза оказались несущественными (рисунок 7). У крыс линии WAG ролипрам, по-видимому, повышал содержание трансммиттера гормона (cAMP) до значений, характерных для высокого уровня ВП в крови, достигая порога активации V_{1a} -рецепторов, трансдукция сигнала которых, как известно, приводит к подавлению реабсорбции натрия и проявлению значительного натрийуреза [Perucca et al., 2008; Golosova et al., 2016]. Между тем отсутствие изменений концентрирования у Brattleboro при введении ингибитора cAMP-зависимой PDE-4 ролипрама обусловлено, по-видимому, сниженной активности всех изоформ аденилатциклазы у крыс данной линии [Schen et al., 1997].



Диурез, скорость мочеотделения (V); $T_{H_2O}^c$ – реабсорбция осмотически свободной воды
 Достоверность различий: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ – сравнение с контрольной группой WAG; # $p < 0,05$; ### $p < 0,001$ – сравнение с контрольной группой Brattleboro

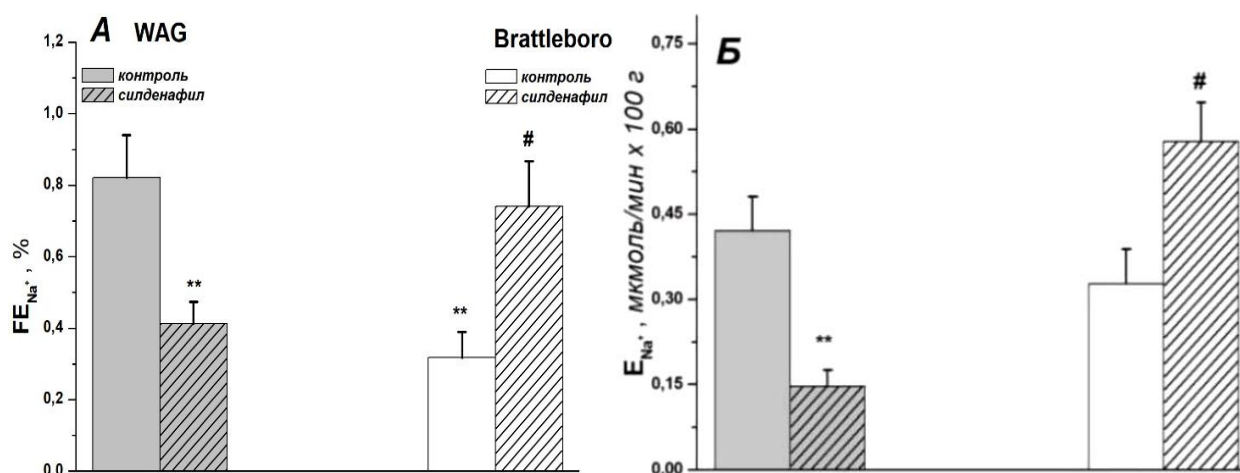
Рисунок 6 – Влияние ингибитора PDE-4 ролипрама (А) и блокатора PDE-5 силденафила (Б) на параметры гидроуретической функции у крыс WAG и у ВП-дефицитных крыс Brattleboro ($M \pm SEM$)



А – экскретируемая фракция натрия (FE_{Na}); **Б** – скорость экскреции натрия (E_{Na})
 Достоверность различий: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ – сравнение с контрольной группой WAG
 Рисунок 7 – Влияние ингибитора PDE-4 ролипрама на параметры натрийуретической функции почек у крыс WAG и у ВП-дефицитных крыс Brattleboro ($M \pm SEM$)

Принципиально иная реакция параметров натрийуретической функции почек нами была обнаружена в условиях применения ингибитора PDE-5, силденафила, устраняющего деградацию cGMP. При введении силденафила обнаружены аналогично действию НПН разнонаправленные изменения показателей натрийуретической функции почки у крыс с различным уровнем ВП в крови (рисунок 8). У крыс WAG был зафиксирован антинатрийурез, тогда как у ВП-дефицитных крыс Brattleboro, напротив, был выявлен натрийуретический ответ вследствие торможения реабсорбции натрия. Стимуляция реабсорбции натрия у крыс WAG, очевидно, является следствием выявленного нами увеличения уровня экспрессии *SCNN1a* гена, кодирующего α -субъединицу ENaC-канала (рисунок 9). Ранее установлено, что аналог cGMP 8-pCPT-cGMP стимулирует экспрессию гена, кодирующего α -субъединицу ENaC [Han et al., 2011; Chen et al., 2014]. У контрольных крыс WAG антинатрийурез в условиях активации NO/cGMP-сигнального пути блокадой PDE-5, по всей видимости, обусловлен изменением реабсорбции натрия в дистальных частях нефрона в результате взаимодействия сигнальных систем при действии соответственно ВП и NO. Между тем у крыс Brattleboro в условиях введения силденафила наблюдалось снижение содержания в кортикальной зоне почки мРНК *SCNN1a* на фоне развития натрийуретической реакции (рисунок 9). В подтверждении ВП-независимой роли NO/cGMP/PKG-сигнального пути в подавлении транспорта натрия в эпителии почечных канальцах ранее было выявлено, что NO усиливает натрийурез в том числе за счет уменьшения экспрессии обменника Na^+/H^+ типа-3 (NHE3) и активности Na^+/K^+ -АТФазы в эпителии проксимальных канальцев [Shirai et al., 2014; Mergia et al., 2016].

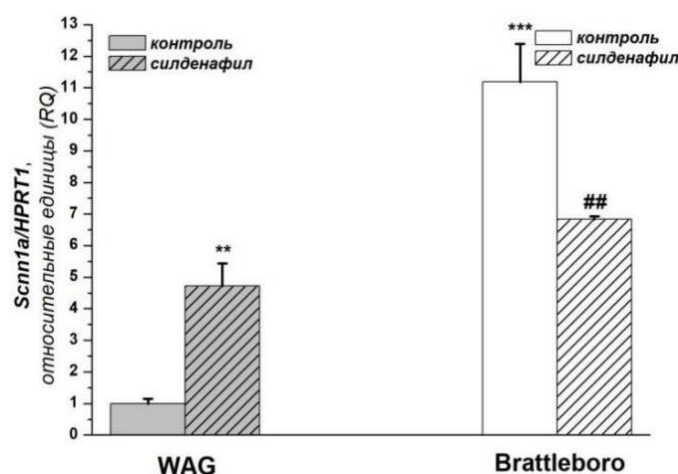
Таким образом, наличие существенным изменений осморегулирующей функции почек при введении ролипрама, ингибитора cAMP-специфичной PDE-4, определяется высоким уровнем эндогенного ВП в крови: у крыс WAG установлено снижение эффективности осмотического концентрирования вследствие торможения реабсорбции воды и натрия. Вместе с тем при блокаде силденафилом cGMP-зависимой PDE-5 выявлены значимые изменения гидроуреза лишь у ВП-дефицитных крыс Brattleboro: зафиксировано увеличение реабсорбции осмотически свободной воды, что указывает на ВП-независимую роль cGMP-сигнального пути в ее регуляции. В то же время селективный блокатор PDE-5 силденафил приводит к значительным изменениям параметров натрийуреза, направленность которых зависит от уровня ВП в крови: у крыс WAG был выявлен антинатрийурез, тогда как у ВП-дефицитных крыс Brattleboro зарегистрировано ускорения выведения натрия вследствие прямого ингибирующего влияния NO на транспорт натрия в эпителии почечных канальцев.



А – экскретируемая фракция натрия (FE_{Na}); Б – скорость экскреции натрия (E_{Na})

Достоверность различий: **p < 0,01 – сравнение с контрольной группой WAG; #p < 0,05 – сравнение с контрольной группой Brattleboro

Рисунок 8– Влияние ингибитора PDE-5 силденафила на параметры натрийуретической функции почек у крыс WAG и у ВП-дефицитных крыс Brattleboro (M ± SEM)



Уровень экспрессии мРНК *SCNN1a* приведён относительно гена домашнего хозяйства *HPRT1*

Достоверность различий: **p < 0,01; ***p < 0,001 – сравнение с контрольной группой WAG; ##p < 0,01 – сравнение с контрольной группой Brattleboro

Рисунок 9 – Содержание в корковом веществе почки мРНК *SCNN1a*, кодирующего α-субъединицу ENaC, у крыс WAG и Brattleboro в условиях блокады PDE-5 силденафилем (M ± SEM)

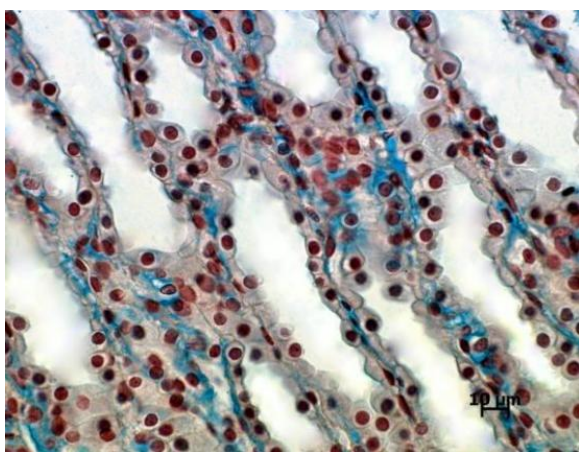
3.4 Анализ структурных элементов концентрирующего механизма в условиях блокады синтеза NO у крыс с различным уровнем вазопрессина в крови

Барьер на пути диффузии воды из просвета СТ в кровоток в зоне внутреннего мозгового вещества почки представлен не только эпителием, но также межклеточным матриксом, основным компонентом которого является гиалуронан (ГН) [Hansell et al. 2000]. С изменением параметров осмотического концентрирования у экспериментальных крыс коррелируют морфологические перестройки интерстициального матрикса гормон-чувствительной части почечной медуллы. Для контрольных крыс WAG фиксируются гистохимически выявляемый ГН в интерстиции сосочка почки, интенсивность окрашивания которого характерна для стандартного питьевого режима (рисунок 10 А). Введение крысам WAG ингибитора синтаз NO (L-NAME) приводило к развитию диуретического ответа, который сопровождается, согласно качественному гистохимическому анализу, увеличением окрашивания ГН в интерстиции почечной медуллы (рисунок 10 Б). Качественные изменения экстрацеллюлярного матрикса почки у крыс WAG, как предполагается, обусловлены увеличением содержания мРНК *HAS2* гена, кодирующего фермент синтеза ГН, в то время как уровень экспрессии гена *Hyal2*, кодирующего ключевой фермент гидролиза ГН, снижается (рисунок 11). Учитывая

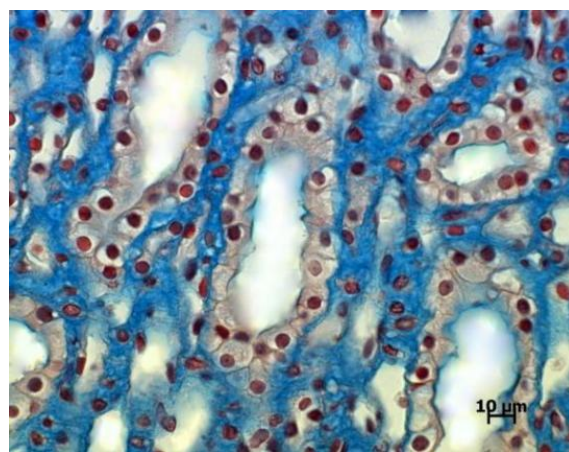
полученные результаты, можно судить об активации биосинтеза ГН и подавлении его катаболизма, приводящее к увеличению содержания ГН в интерстиции почечной медуллы, что приводит к снижению эффективности работы концентрирующего аппарата почек [Stridh et al. 2012]. Как известно, гиалуронидаза 2-го типа (HYAL2), мембранный фермент, является первичным звеном катаболизма НА и функционирует внеклеточно, гидролизует ГН с преимущественным образованием крупных остатков, которые интернализуются в клетку и расщепляются затем лизосомальными ферментами [Stern, 2003; Ericsson, Stern, 2012]. Предполагается, что у крыс WAG блокада синтеза NO приводит к подавлению ВП-зависимого гидролиза ГН [Ginetzinsky, 1958], увеличивая как вязкость внеклеточного матрикса, так и расстояние элементов канальцевой системы почки, и способствуя изменению проницаемости интерстиция для воды и ионов.

Поскольку, как известно, синтез NO в почечной медулле стимулируется ВП [O'Connor et al., 2007], представляло интерес сравнить в условиях блокады синтеза NO (L-NAME) морфофункциональные особенности почек крыс WAG с ВП-дефицитными особями Brattleboro, а также с гидратированными крысами WAG. У гидратированных крыс WAG при снижении эффективности концентрирования зафиксировано значительное увеличение количества гистохимически выявляемого ГН в интерстиции средней трети сосочка (рисунок 10 В), что согласуется с данными, полученными ранее [Ivanova et al., 2017], и обусловлены, по-видимому, снижением гиалуронидазной активности вследствие установленного уменьшения содержания мРНК *Hyal2* (рисунок 11). Одним из наиболее существенных морфологических отличий почек гомозиготных ВП-дефицитных крыс Brattleboro является существенное снижение плотности ГН в интерстиции сосочка почки (рисунок 10 Д) вследствие повышенной активности внутрипочечных гиалуронидаз [Ivanova et al., 2013]. При введении L-NAME как у ВП-дефицитных крыс Brattleboro, так и у гидратированных особей WAG не выявлено достоверных изменений уровня экспрессии генов метаболизма ГН (рисунок 11) внутренней мозговой зоны и соответствующих качественных изменений интерстиция сосочка почки (рисунок 10 Г, Е). Отсутствие изменений экстрацеллюлярного матрикса почки у крыс с врожденным дефицитом ВП или при подавлении его секреции при блокаде синтеза NO, по-видимому, является следствием сниженной базальной активности NO в сосочке почки [Martin et al., 2002] и предполагает важность ВП-зависимого механизма в регуляции оксидом азота внеклеточной проницаемости почечной медуллы.

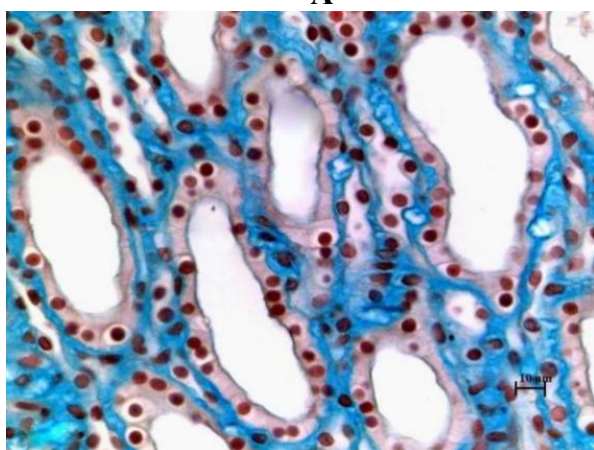
Таким образом, влияние блокады синтеза NO (L-NAME) на состояние интерстиция почечной медуллы существенно только в условиях с высокой секрецией эндогенного ВП, уровень которого в крови определяет базальную активность NO в сосочке почки. Установлено, что в модуляцию осморегулирующего эффекта вазопрессина оксидом азота вовлекаются компоненты интерстиция почечной медуллы, реструктуризация которых при блокаде синтеза NO обусловлена изменением экспрессии генов, кодирующих ферменты метаболизма гиалуронана. Результаты исследования позволяют заключить, что, у крыс WAG в условиях устранения действия NO зафиксировано нарастание содержания ГН в интерстиции почечной медуллы, которое, как предполагается, снижает внеклеточную проницаемость матрикса для воды и ионов.



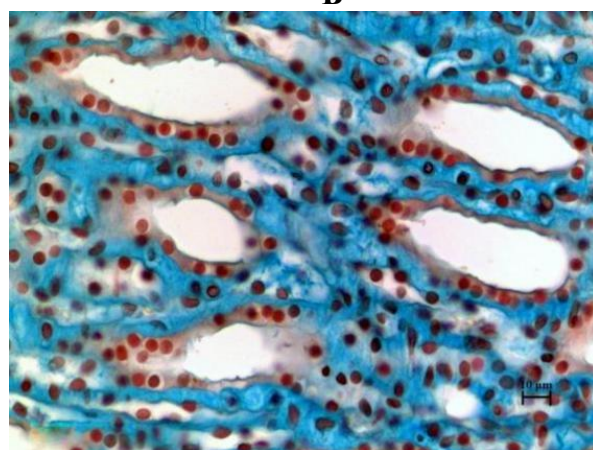
А



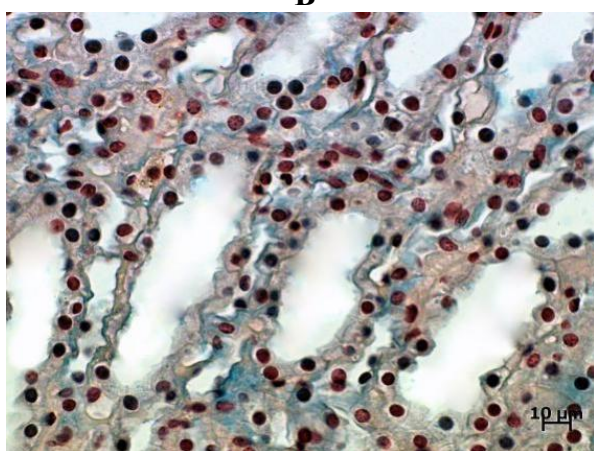
Б



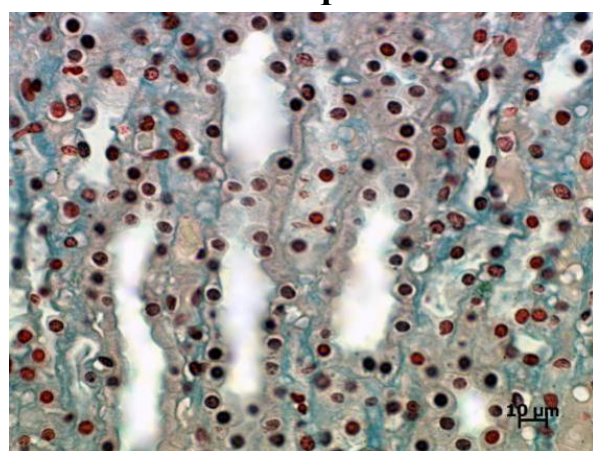
В



Г



Д

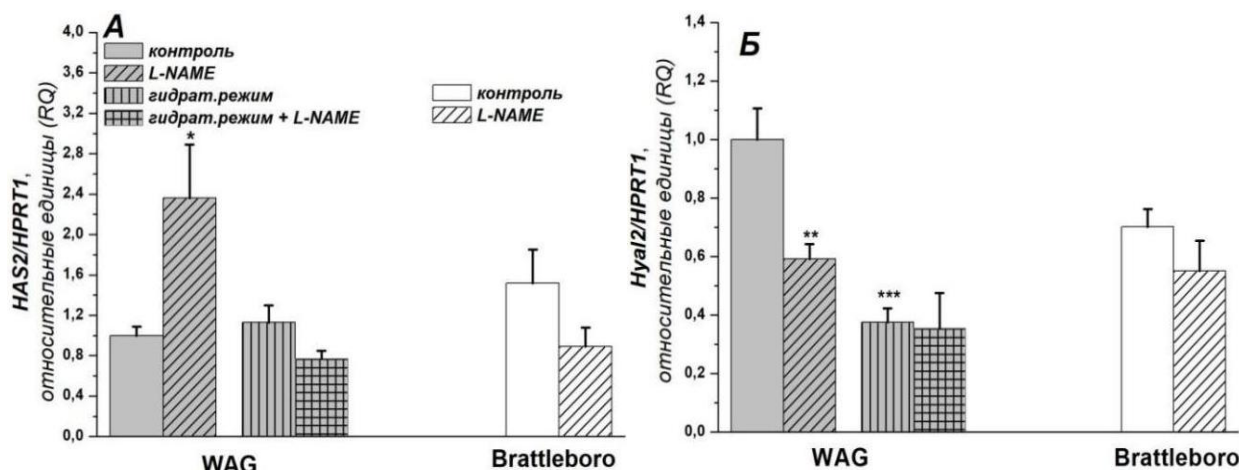


Е

А – WAG контроль (2198 мОсм/кг H₂O); Б – WAG, введение L-NAME (921 мОсм/кг H₂O);
В – гидратированные WAG (357 мОсм/кг H₂O); Г – гидратированные WAG + L-NAME (1057 мОсм/кг H₂O); Д – Brattleboro контроль (211 мОсм/кг H₂O); Е – Brattleboro, введение L-NAME (585 мОсм/кг H₂O)

Примечание: в скобках дано значение осмоляльности мочи; окрашивание срезов алциановым синим, ядра окрашены гематоксилином Эрлиха. Увеличение объектива x63. Снимки выполнены с помощью цифровой фотонасадки AxioCam

Рисунок 10 – Влияние блокады синтеза NO на локализацию гиалуронана средней трети сосочка у крыс WAG и у ВП-дефицитных крыс Brattleboro



А – гиалуронансинтазы-2 (*HAS2*); Б – гиалуронидазы-2 (*Hyal2*)

Уровень экспрессии приведён относительно гена домашнего хозяйства *HPRT1*. Достоверность различий: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ – сравнение с контрольной группой WAG

Рисунок 11 – Влияние блокады синтеза NO (L-NAME) на уровень экспрессии мРНК генов, кодирующих ферменты метаболизма гиалуронана почечной медуллы у крыс WAG и Brattleboro ($M \pm SEM$)

4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Поскольку адекватность работы любой регуляторной системы зависит от факторов, модулирующих эффект основного гормона, в последние годы значительное внимание уделяется роли местных, аутоагонистических агентов, синтез которых нередко является результатом отрицательной обратной связи действия гормона [Ahmad et al., 2018; Leipziger & Praetorius, 2020]. Водная проницаемость эпителия СТ является функцией тканеспецифического AQP2, который транслоцируется из цитоплазматических везикул в апикальную мембрану при активации cAMP/РКА-зависимого каскада реакций при связывании ВП с V_2 -рецепторами [Agre, 2002; Tamma et al., 2011]. Действие ВП на осмотическую проницаемость эпителия СТ модулируется различными локальными факторами, большинство из которых относится к аутоагонистам [Pearce et al., 2015]. Одним из таких факторов является оксид азота (II), NO, синтез которого регулирует сам ВП, формируя негативную обратную связь [Martin et al., 2002]. NO действует как аутоагонист, так и паракринным путем, реализуя свой ренопротекторный эффект [Jadot et al., 2017; Shirazi et al., 2019] при активации, cGMP-зависимой протеинкиназы (PKG), локализованной в различных сегментах нефрона, включая гормон-чувствительную часть СТ [Shen et al., 2016; Chang et al., 2018]. Вместе с тем сведения о действии NO на процесс осмотического концентрирования противоречивы и зависят от объекта исследования, методических подходов и дозы используемых препаратов. Таким образом, учитывая данные литературы о влиянии NO-системы на ВП-регулируемую реабсорбцию воды и транспорт натрия, предполагается, что cAMP- и cGMP-внутриклеточные каскады ВП и NO взаимосвязаны, и NO может осуществлять свое влияние на осморегулирующую функцию почек, модулируя эффект ВП посредством воздействия на активность cAMP-системы.

Целью данного исследования явилось изучение механизмов взаимодействия локального фактора NO и гормона ВП в регуляции процесса осмотического концентрирования. Для определения роли аутоагонистического фактора NO в модуляции осморегулирующего эффекта ВП были использованы крысы WAG с высоким уровнем эндогенного ВП в крови. Вместе с тем для выявления значимости ВП в реализации эффектов NO на концентрирующую функцию почек была предпринята серия экспериментов на ВП-дефицитных крысах Brattleboro, а также на крысах WAG в условиях подавления секреции ВП гидратирующим режимом. Роль NO в процессе осмотического концентрирования исследовалась в условиях как блокады синтеза NO при введении неселективного ингибитора его синтаз (L-NAME), так и при активации синтеза экзогенным донором NO (НПН). Кроме того, поскольку концентрация cAMP и cGMP определяется

соотношением активности циклаз и специфических фосфодиэстераз (PDE) [Rybalkin et al., 2003; Bender et al., 2006], представляло интерес оценить параметры осмотического концентрирования в условиях селективной блокады PDE, специфичной к cAMP (ролипрам) или к cGMP (силденафил).

Блокада синтеза NO оказывает существенное влияние на параметры гидроуретической функции, модулируя антидиуретический эффект вазопрессина. У крыс линии WAG с высоким уровнем вазопрессина устранение действия NO приводит к развитию диуретической реакции вследствие снижения уровня факультативной реабсорбции воды в связи с устранением стимулирующего влияния NO на факультативную реабсорбцию воды. В подтверждение этому ранее установлено, что активация синтеза NO как эндогенным, так и экзогенным его предшественником индуцирует транслокацию AQP2 в апикальную мембрану эпителиоцитов СТ [Boone et al., 2010]. Вместе с тем у крыс WAG при активации NO/cGMP-сигнальной системы введением как экзогенного донора НПП, так и при устранении деградирующего влияния PDE-5 на cGMP не выявлено существенных изменений параметров гидроуретической функции. Учитывая отсутствие изменений параметров гидроуретической функции у крыс WAG с нормальным уровнем ВП в крови при стимуляции cGMP-системы, предполагается, что более значимое влияние принадлежит ВП-зависимой cAMP-системе в реализации гидроосмотического эффекта. В подтверждение этому в экспериментах на нокаутных мышях CDNOS1 (CDNOS1KO) было установлено, что при водной депривации, приводящей к закономерному росту секреции ВП, активность NOS1 в СТ играет незначительную роль в регуляции процесса осмотического концентрирования [Mendoza & Hyndman, 2019]. В отличие от линии WAG у крыс Brattleboro, лишенных эндогенного вазопрессина, при введении ингибитора PDE-5 зафиксирована вазопрессин-независимая активация реабсорбции осмотически свободной воды, тогда как блокада cAMP-зависимой PDE-4 не приводит к существенным изменениям параметров гидроуреза. Выявленный ВП-независимый путь в регуляции реабсорбции воды в условиях активации cGMP-сигнального пути силденафилом, подтверждает факт, что NO и его внутриклеточные посредники лишь частично регулируют интенсивность факультативной реабсорбции воды по ВП-зависимому пути [Therwani et al., 2014; Cheung et al., 2020].

Установлено, что NO оказывает влияние на параметры натрийуретической функции почек, направленность которых зависит от уровня эндогенного вазопрессина в крови. У крыс WAG при активации NO-сигнального пути как путём введения НПП, так и при блокаде PDE-5 силденафилом выявлен антинатрийурез вследствие стимуляции реабсорбции натрия в канальцах нефрона в результате взаимодействия сигнальных систем при действии соответственно ВП и NO, тогда как у ВП-дефицитных крыс Brattleboro зафиксировано увеличение экскреции натрия в связи с прямым блокирующим влиянием NO на транспорт натрия. Зафиксированное торможение реабсорбции натрия у крыс линии Brattleboro при активации NO-сигнального пути подтверждает ингибирующий ВП-независимый эффект NO на реабсорбцию натрия [Shirai et al., 2014; Mergia et al., 2016]. В то же время наличие существенных изменений осморегулирующей функции при введении селективного ингибитора PDE-4 ролипрама, устраняющего деградацию cAMP, определяется высоким уровнем эндогенного вазопрессина в крови: у крыс WAG зафиксировано снижение эффективности осмотического концентрирования вследствие торможения реабсорбции натрия и воды. Обнаруженные особенности у крыс WAG, очевидно, были обусловлены интеграцией эффектов активации V₂- и V_{1a}-рецепторов ВП, обладающих различной чувствительностью к гормону [Perucca et al., 2008].

В процесс осмотического концентрирования вовлекается не только эпителий почечных канальцев и сосудистая система почки, но также интерстициальный матрикс, разделяющий элементы концентрирующего механизма и определяющий внеклеточную проницаемость для диффузии воды и ионов [Stridh et al., 2012]. Выявлено, что в модуляцию осморегулирующего эффекта вазопрессина оксидом азота вовлекаются структуры интерстиция почечной медуллы, определяющие интенсивность внеклеточной

проницаемости для воды и натрия. У крыс WAG при блокаде синтеза NO (L-NAME) зафиксировано увеличение количества гистохимически выявляемого гиалуронана (ГН) почечной медуллы при изменении экспрессии генов, кодирующих ферменты его метаболизма (HAS2, Hyal2). Снижение эффективности осмотического концентрирования у крыс WAG при устранении действия NO, как предполагается, является также следствием уменьшения проницаемости внеклеточного матрикса почечной медуллы для воды и ионов вследствие нарастания содержания ГН в сосочке почки. В то же время отсутствие изменений состояния почечного интерстиция у крыс с врожденным дефицитом вазопрессина или при подавлении его секреции, предполагает важность ВП-зависимого механизма в регуляции оксидом азота внеклеточной проницаемости почечной медуллы.

Таким образом, NO модулирует осморегулирующий эффект вазопрессина, участвуя в регуляции реабсорбции натрия и воды в эпителии почечных канальцев, а также внеклеточной проницаемости интерстиция почечной медуллы. Блокада синтеза NO приводит к развитию диуретического ответа вследствие как снижения уровня факультативной реабсорбции воды, так и изменения состояния внеклеточного матрикса почечной медуллы, определяющего внеклеточную диффузию воды и ионов. Активация NO/cGMP-сигнального пути стимулирует реабсорбцию натрия без существенных изменений параметров гидроуреза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые в экспериментах *in vivo* с использованием генетической модели вазопрессин-дефицитных крыс Brattleboro, а также крыс WAG с нормальным и сниженным в результате гидратации уровнем вазопрессина было проведено комплексное морфофункциональное исследование роли NO в модуляции осморегулирующего эффекта вазопрессина. Оценивались параметры гидроуретической и натрийуретической функции почек как в условиях блокады синтеза NO, так и при активации синтеза NO, а также при селективном устранении деградирующего действия фосфодиэстераз на уровень cAMP и cGMP. Полученные результаты о модулирующем влиянии NO на осморегулирующий эффект вазопрессина расширяют современные представления о молекулярных механизмах регуляции концентрирующей функции почек. Дальнейшие исследования могут быть посвящены разработке новых подходов к коррекции повреждений почки при изменении активности NO в почечной ткани.

На основании проведенных исследований сформулированы следующие **выводы**:

1. Устранение действия NO блокадой его синтаз модулирует антидиуретический эффект вазопрессина и приводит к развитию диуретической реакции вследствие торможения реабсорбции осмотически свободной воды, тогда как активация NO/cGMP-сигнального пути не влияет на параметры гидроуретической функции почек в связи с преобладающей ролью вазопрессина в регуляции факультативной реабсорбции воды.

2. Установлено участие cGMP-сигнального пути в вазопрессин-независимой стимуляции реабсорбции осмотически свободной воды. У вазопрессин-дефицитных крыс Brattleboro при устранении ингибирующего влияния PDE-5 на уровень cGMP зафиксирован антидиуретический ответ вследствие увеличения реабсорбции воды, тогда как блокада cAMP-зависимой PDE-4 не приводит к существенным изменениям параметров гидроуреза.

3. Активация NO/cGMP-сигнального пути приводит к изменениям параметров натрийуретической функции почек, направленность которых зависит от уровня эндогенного вазопрессина в крови. Установлена модуляция осморегулирующего эффекта вазопрессина, приводящая к стимуляции реабсорбции натрия, тогда как выявленный на крысах линии Brattleboro вазопрессин-независимый эффект NO направлен на торможение транспорта натрия в эпителии почечных канальцев.

4. В модуляцию оксидом азота осморегулирующего эффекта вазопрессина вовлекаются структуры почечного интерстиция, определяющие интенсивность внеклеточной диффузии воды и ионов. Развитие диуретической реакции у крыс WAG при

блокаде синтеза NO обусловлено увеличением содержания гиалуронана почечной медуллы при изменении экспрессии генов, кодирующих ферменты его метаболизма (*HAS2*, *Hyal2*).

5. NO модулирует осморегулирующий эффект вазопрессина, влияя на реабсорбцию натрия и воды, а также на состояние экстрацеллюлярного матрикса почечной медуллы. Устранение действия NO тормозит реабсорбцию осмотически свободной воды на фоне увеличения гистохимически выявляемого гиалуронана в интерстиции почечной медуллы. Активация NO/cGMP-сигнального пути стимулирует реабсорбцию натрия без существенных изменений параметров гидроуретической функции почек.

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

AQP2 – аквапорин 2 типа
сAMP – циклический аденозинмонофосфат
сGMP – циклический гуанозинмонофосфат
ENaC – эпителиальный Na⁺-канал
HAS – гиалуронансинтаза
HYAL – гиалуронидаза
NO – оксид азота (II)
PDE – фосфодиэстераза
PKA – протеинкиназа A
PKG – протеинкиназа G
ВП – вазопрессин
ГН – гиалуриновая кислота, гиалуронан
НПН – нитропруссид натрия
СКФ – скорость клубочковой фильтрации
СТ – собирательные трубки

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук:

1. **Правикова П. Д.** Влияние блокады синтеза оксида азота на гидроуретическую функцию и состояние экстрацеллюлярного матрикса почек у крыс с различным уровнем вазопрессина в крови / П. Д. Правикова, В. А. Лавриненко, Л. Н. Иванова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2019. – Т. 167, № 2. – С. 184–187. – 0,28 / 0,09 а.л.

в переводной версии журнала, входящем в Scopus:

Pravikova P. D. Effect of NO Synthesis Blockade on the Hydrouretic Function and Extracellular Matrix of the Kidneys in Rats with Different Blood Vasopressin Levels / P. D. Pravikova, V. A. Lavrinenko, L. N. Ivanova // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – Vol. 167, № 2 – P. 233–236. – DOI: 10.1007/s10517-019-04498-w.

2. **Правикова П. Д.** Влияние блокады синтеза NO на осморегулирующую функцию почек в условиях моделирования гипотиреоза у крыс с различным уровнем вазопрессина в крови / П. Д. Правикова, Л. Н. Иванова // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2021. – Т. 107, № 12. – С. 1505–1517. – DOI: 10.31857/S0869813921120086. – 0,85/ 0,43 а.л.

переводная версия статьи в журнале, входящем в Web of Science:

Pravikova P. D. Effect of NO Synthesis Blockade on Renal Osmoregulatory Function in Methimazole-Induced Hypothyroid Rats with Different Vasopressin Blood Level / P. D. Pravikova, V. A. Lavrinenko, L. N. Ivanova // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. – 2021. – Vol. 57, № 6. – P. 1461–1470. – DOI: 10.1134/S0022093021060223.

Публикации в прочих научных изданиях:

3. **Правикова П. Д.** Влияние блокады синтеза оксида азота на диуретическую и натрийуретическую функции почки у крыс с различным уровнем эндогенного вазопрессина в крови / П. Д. Правикова, Л. Н. Иванова // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2018. – Т. 104, № 1. – С. 97–103. – 0,52 / 0,26 а.л.

4. **Правикова П. Д.** Роль гуанилатциклазной системы в реализации осморегулирующей функции почек у крыс с различным уровнем вазопрессина в крови / П. Д. Правикова, Л. Н. Иванова // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2019. – Т. 105, № 12. – С. 1502–1513. – DOI: 10.1134/S0869813919120082. – 0,76 / 0,38 а.л.

5. **Правикова П. Д.** Влияние ролипрама на осморегулирующую функцию почек у крыс с различным уровнем вазопрессина в крови / П. Д. Правикова, Т. С. Курляндчик, Л. Н. Иванова // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2020. – Т. 106, № 12. – С. 1564–1570. – DOI: 10.31857/S0869813920120079. – 0,56 / 0,19 а.л.

6. **Правикова П. Д.** Влияние оксида азота на осморегулирующую функцию почки и на метаболизм гиалуроновой кислоты / П. Д. Правикова // ЛОМОНОСОВ–2015 : тезисы докладов XXII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых: секция «Биология». Москва, 13–17 апреля 2015 г. – Москва, 2015. – С. 392–393. – 0,08 а.л.

7. **Правикова П. Д.** Влияние оксида азота (II) на натрийуретическую и диуретическую функции почки крыс с различным уровнем эндогенного вазопрессина в крови / П. Д. Правикова, Л. Н. Иванова // Материалы XXIII съезда Физиологического общества им. И. П. Павлова с международным участием. Воронеж, 18–22 сентября 2017 г. – Воронеж, 2017. – С. 520–521. – 0,1 / 0,05 а.л.

8. **Правикова П. Д.** Гидроуретическая и натрийуретическая функция почек у крыс с различным уровнем вазопрессина в крови в условиях активации и инактивации синтеза оксида азота / П. Д. Правикова, Л. Н. Иванова // Современные аспекты интегративной физиологии : материалы всероссийской молодежной конференции с международным участием. Санкт-Петербург, 09–11 октября 2018 г. – Санкт-Петербург, 2018. – С. 83–84. – 0,09 / 0,05 а.л.

9. **Правикова П. Д.** Исследование интерстициального матрикса мозгового вещества почки у крыс с различным уровнем вазопрессина в крови в условиях ингибирования синтеза NO / П. Д. Правикова, Л. Н. Иванова // II объединенный научный форум. VI Съезд физиологов СНГ : научные труды. Сочи, Дагомыс, 01–06 октября 2019. – Москва, 2019. – Т. 1. – С. 85–86. – 0,06 / 0,03 а.л.

10. Курляндчик Т. С. Исследование роли цАМФ-системы в регуляции осморегулирующей функции и состояния интерстициального матрикса почки крыс с различным уровнем эндогенного вазопрессина в крови / Т. С. Курляндчик, **П. Д. Правикова** // МНСК–2020 : материалы 58-й международной научной студенческой конференции. Новосибирск, 10–13 апреля 2020 г. – Новосибирск, 2020. – С. 134–135. – 0,06 / 0,03 а.л.

11. **Правикова П. Д.** Влияние блокады синтеза NO в условиях гипотиреоза на состояние экстрацеллюлярного матрикса почек у крыс с различным уровнем вазопрессина / П. Д. Правикова, Т. С. Курляндчик, Л. Н. Иванова // Научные труды III объединенного научного форума физиологов, биохимиков и молекулярных биологов. Сочи, Дагомыс, 03–08 октября 2021. – Москва, 2021. – Т. 1. – С. 129–130. – 0,06 / 0,03 а.л.

Подписано в печать 09.02.2023
Формат 60 х 90 1/16. Печ. л. 1,4.
Тираж 100 экз. Заказ № 3

Отпечатано на полиграфической базе ИЦиГ СО РАН
630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 10