

УДК 616.12-008.331.1-02:616.61-085.255.2

СОСТОЯНИЕ НИТРОКСИДПРОДУЦИРУЮЩЕЙ ФУНКЦИИ ПОЧЕК ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ГИПОТЕНЗИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ НЕФРОГЕННОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

Е.Ф. Романченко, А.В. Тыртышников

Тихоокеанский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Ключевые слова: артериальная гипертензия, почки, нитроксидсинтаза, оксид азота.

У крыс с оригинальной моделью нефрогенной гипертензии проведено гистохимическое картирование NADPH-диафоразы (нитроксидсинтазы) в различных функциональных отделах почки в динамике и при использовании фуросемида, дибазола и клонидина. При введении этих препаратов изменение активности синтеза оксида азота в различных сегментах нефрона имело неодинаковую направленность. Стабильное усиление нитроксидпродуцирующей функции зафиксировано при введении клонидина. Повышение уровня нитроксидергической активности в этом случае может способствовать поддержанию активной вазодилатации и приводить к постепенному снижению продукции ренина. Увеличение активности нитроксидсинтазы в почечных клубочках и собирательных трубочках было присуще также дибазолу, однако данные эффекты отличались меньшей выраженностью и длительностью. Незначительное повышение активности фермента в проксимальных отделах нефрона наблюдалось на 1-й неделе введения дибазола. Наименьшее влияние на нитроксидпродуцирующую функцию почек продемонстрировал фуросемид.

Артериальная гипертензия (АГ) является одним из основных нефрологических синдромов, который может возникнуть на любом этапе почечного заболевания [1]. Большое значение в патогенезе гипертензивного синдрома отводится гемодинамическим нарушениям, сопровождающимся ишемией почечной ткани с последующей активацией ренин-ангиотензин-альдостероновой системы и задержкой натрия и воды [8]. Прогрессирующая атрофия интерстициальной ткани почек сопровождается угнетением выработки депрессорных веществ, таких как простагландины, кинины и оксид азота. Описанные к настоящему времени биологические эффекты оксида азота определяют важную роль нитроксидергического механизма почек в согласовании функциональной активности органа с уровнем его кровенаполнения [2, 4]. Вазомоторные, нейромодуляторные и гуморальные эффекты нитроксида, вырабатываемого различными отделами нефрона и интерстициальными элементами, дополняются его влиянием на экскреторную функцию почек, водно-солевой обмен и тубулогломерулярный баланс [6, 7].

Снижение синтеза оксида азота в почках, наблюдаемое при эссенциальной гипертензии, приводит к стабилизации АГ и ускоряет патологическое ремоделирование сердечно-сосудистой системы [11]. В этой связи нитроксидергическая функция почек рассматривается как эффективная терапевтическая мишень в комплексной терапии АГ. Однако до настоящего времени сведения об нитроксидмодулирующих

эффектах большинства гипотензивных препаратов остаются весьма фрагментарными. В настоящей работе мы анализировали влияние некоторых гипотензивных препаратов (фуросемида, клонидина, дибазола) на нитроксидергическую активность почек при экспериментальной нефрогенной гипертензии.

Материал и методы. Исследование выполнено на 90 белых нелинейных крысах-самцах массой 200–220 г. Артериальная гипертензия формировалась при разрушении паренхимы почек путем введения 0,1 мл 10 % раствора формалина в передний полюс правой и левой почки [10]. Преимуществами данной модели являются простота выполнения (не требуется полостной операции) и высокая степень воспроизводимости результатов. Динамические структурные перестройки в почечной ткани сопровождаются постепенным повышением артериального давления (АД). Измерение АД у экспериментальных животных проводили ежедневно в утренние часы неинвазивным методом с помощью аппарата PanLab-LE501 (Испания).

Животные были разделены на 5 групп: 1-я группа (группа АГ) – 20 животных с моделью АГ, не получавших лекарственной терапии; 2-я группа – 20 животных с моделью АГ, которым начиная с 28-го дня после операции внутривенно вводили петлевой диуретик (фуросемид, 1 мг/кг); 3-я группа – 20 животных с моделью АГ, которым начиная с 28 дня после операции внутримышечно вводили α_2 -адреномиметик (клонидин, 0,01 мг/кг); 4-я группа – 20 животных с моделью АГ, которым начиная с 28 дня после операции внутримышечно вводили спазмолитик (дибазол, 0,1 мг/кг); 5-я группа (контроль) – 10 ложноперированных животных, которым в почки вышеописанным способом вводили физраствор.

Крыс 1-й группы выводили из эксперимента на 7, 14, 28 и 42-е сутки после операции, крыс 2–4-й групп – на 7, 14, 28 и 42-е сутки после начала фармакологической коррекции АГ (по 5 крыс в каждой точке).

Изучение распределения и активности нитроксидсинтазы (NOS) проводилось на серийных продольных срезах почек с помощью гистохимического метода на NADPH-диафору, предложенного Норе и Vincent (1989). Исследуемый материал в течение 4 часов фиксировали в охлажденном, приготовленном на 0,1М фосфатном буфере (рН 7,4) 4 % растворе параформальдегида, затем в течение суток промывали при той же температуре в 0,1М фосфатном буфере (рН 7,4) и на

ночь оставляли в 30 % забуференном растворе сахарозы. Из замороженных в криостате образцов изготавливали срезы толщиной 25 мкм, которые помещали в среду, состав и конечная концентрация которой были следующими: 50 мМ трис-буфер (pH 8,0), 1 мМ NADPH (Sigma, США), 0,5 мМ нитросинего тетразолия (Sigma, США) и 0,2 % тритон X-100 (ISN, США). Инкубацию проводили в течение 30 мин при температуре 37°C, после чего срезы ополаскивали в дистиллированной воде, обезжизивали по стандартной методике и заключали в бальзам.

Количественную оценку плотности преципитата проводили с использованием видеокомпьютерной системы, смонтированной на микроскопе Jenaval (Karl-Zeiss, Германия) и оснащенном программой обработки данных AxioVision Rel.4.8 Software. Цифровую обработку изображения проводили также с помощью программ Adobe Photoshop 7.0 и ImageJ. Активность фермента выражали в единицах оптической плотности (ЕОП). Обработка полученных данных проводилась методом вариационной статистики с вычислением средней арифметической и ошибки средней. Оценку значимости различий двух независимых и зависимых совокупностей выполняли с помощью критерия Стьюдента и показателя вероятности различий.

Результаты исследования. Систолическое АД у крыс до операции составляло $120,0 \pm 3,7$, через 2 недели – $156,0 \pm 2,7$ и через 4 недели – $181,0 \pm 5,2$ мм рт.ст.; данное состояние сохранялось до 6-й недели эксперимента. При использовании гипотензивных препаратов через 4 недели терапии показатели АД в среднем снижались до $128,0 \pm 3,4$ мм рт.ст.

При гистохимическом исследовании нефроциты канальцевого аппарата, эпителий мозговых трубочек и структурные элементы клубочков почек маркировались на NADPH-диафорузу. У животных группы контроля эпителий проксимальных канальцев окрашивался в темный сине-фиолетовый цвет, диформазан располагался в эпителиоцитах в виде крупных гранул, плотность преципитата равнялась $29,3 \pm 2,3$ ЕОП. Эпителий дистальных канальцев коркового вещества и собирательных трубочек окрашивался в синий цвет ($46,7 \pm 2,2$ ЕОП). Сосудистый клубочек почечного тельца имел наиболее низкую активность NADPH-диафоразы: при гистохимической реакции приобретал сиреневый цвет с мелкодисперсным голубым осадком с показателями оптической плотности $32,2 \pm 2,9$ ЕОП.

В эпителиоцитах проксимальных канальцев на 2-й неделе эксперимента наблюдалось повышение активности NADPH-диафоразы в 1,3 раза по сравнению с показателями контрольной группы. К концу 6-й недели регистрировался последовательный спад активности фермента до $16,4 \pm 5,4$ ЕОП. В дистальных канальцах на 2-й неделе эксперимента отмечалось снижение диафоразной активности в 1,2 раза (до $56,5 \pm 4,1$ ЕОП). К исходу 4-й недели активность фермента незначительно возрастала, а к концу 6-й недели снижалась до $45,9 \pm 2,9$ ЕОП, что ниже контрольных показателей в 1,2 раза.

В собирательных трубочках в течение 4 недель эксперимента отмечалось постепенное увеличение активности NADPH-диафоразы, которое сменялось резким спадом, достигая минимума к исходу 6-й недели ($21,7 \pm 4,6$ ЕОП). В клубочках в течение 4-х недель после операции активность фермента нарастала (до $57,2 \pm 4,5$ ЕОП, в 1,8 раза выше нормы), а затем постепенно снижалась.

В условиях развивающейся АГ использование гипотензивных препаратов изменяло динамику активности NADPH-диафоразы во всех структурах почки. При введении фуросемида в эпителиоцитах проксимальных канальцев динамика активности фермента имела несколько фаз: к концу 2-й недели она снижалась до пределов контрольных значений ($28,7 \pm 2,5$ ЕОП), к концу 4-й увеличивалась до $44,3 \pm 2,2$ ЕОП и на 6-й неделе применения препарата вновь приближалась к контрольным показателям (рис., а). В эпителиоцитах дистальных канальцев на протяжении 4 недель коррекции происходило постепенное увеличение активности энзима, достигавшее нормы, и только лишь к исходу 6-й недели наблюдалось ее снижение. Аналогичная динамика отмечалась в почечных тельцах. В эпителии собирательных трубочек отмечена тенденция к увеличению показателей ферментативной активности на протяжении всего эксперимента; к концу 6-й недели активность NADPH-диафоразы приближалась к контрольным значениям.

У животных, получающих клонидин, в эпителиоцитах проксимальных канальцев почек в течение 4 недель наблюдалось последовательное увеличение активности NADPH-диафоразы в 1,4 раза по сравнению с контрольными показателями, и лишь к концу 6-й недели активность фермента незначительно снижалась, приближаясь к норме. Аналогичные изменения отмечались в эпителиоцитах дистальных канальцев (рис, б). В собирательных трубочках мозгового вещества в течение 4 недель коррекции происходило повышение активности фермента, достигавшее $56,0 \pm 3,8$ ЕОП, а к концу 6-й недели отмечался ее спад (рис., в). В почечных тельцах высокая активность фермента (в 1,7 раза, превышавшая показатели контроля) сохранялась на протяжении 4 недель, а к концу 6-й недели она снижалась до $43,5 \pm 4,1$ ЕОП.

При введении дибазола крысам с АГ в эпителиоцитах проксимальных канальцев почки в течение всего эксперимента показатели активности фермента оставались в пределах контрольных значений. В эпителиоцитах дистальных канальцев происходило последовательное увеличение диафоразной активности до контрольных значений на протяжении всех 6 недель. В почечном клубочке в течение срока наблюдения отмечался рост показателей активности энзима – в 1,6 раза по сравнению с показателями контроля (рис., г). В собирательных трубочках наблюдаемое в течение 4 недель повышение показателей активности NADPH-диафоразы до $48,0 \pm 4,3$ ЕОП к 6-й неделе эксперимента сменялось уменьшением активности фермента до уровня контрольных значений.

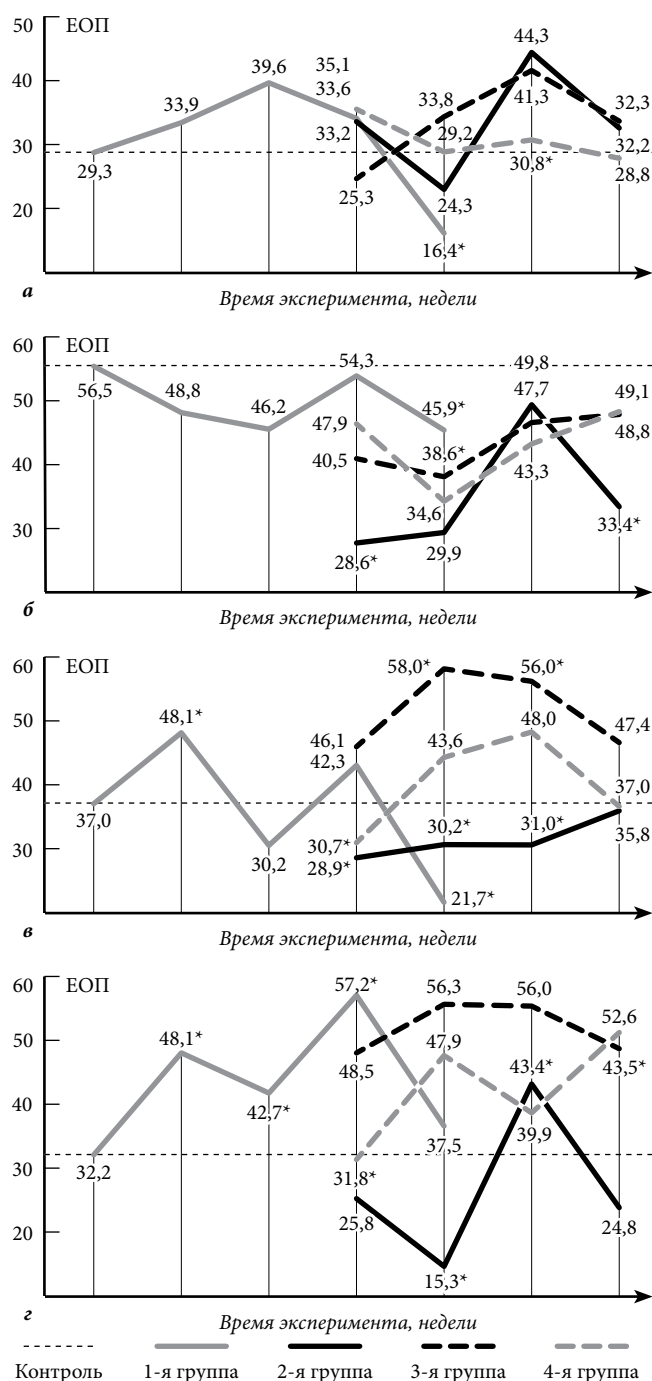


Рис. Динамика активности NADPH-диафоразы в проксимальных (а) и дистальных (б) каналах почек, в собирательных трубочках (в) и почечных клубочках (г):

* для 1-й группы – разница статистически значима по сравнению с контролем, для 2–4-й групп – разница статистически значима по сравнению с 1-й группой.

Обсуждение полученных данных. Известно, что оксид азота играет важную роль в функционировании почек – в регуляции водно-солевого обмена, почечной гемодинамики, синтеза ряда вазоактивных веществ [8]. Как показано в настоящем исследовании, система синтеза оксида азота в различных функциональных отделах почки динамично изменяется при развитии АГ и дифференцированно реагирует на использование различных антигипертензивных препаратов.

Проксимальные извитые каналы почек, как показывают данные настоящего исследования, обладают максимальным уровнем активности NADPH-диафоразы (NOS). В этом отделе синтезируется большая часть почечного L-аргинина – субстрата NOS [9]. Высокая активность этого фермента обусловлена функциональными особенностями данного участка канальцевой системы нефрона и напрямую связана с регуляцией таких процессов, как секреция креатинфосфата, активная и облигатная реабсорбция электролитов, воды, некоторых органических веществ и их транспортом в интерстиций [15]. В эпителии дистальных канальцев, обладающем средним уровнем активности NOS, с участием оксида азота происходит активная и факультативная (альдостеронзависимая) реабсорбция электролитов и пассивная реабсорбция воды, регулируемая антидиуретическим гормоном [3, 6]. Оксид азота, продуцируемый NOS собирательных трубочек, участвует в регуляции натрийуреза и выведения воды. Можно предположить, что увеличение активности NADPH-диафоразы, а следовательно, и повышенное образование оксида азота в эпителии проксимальных канальцев и собирательных трубочек, которое мы наблюдали у экспериментальных животных в первые 2–4 недели после операции, может отражать становление компенсаторных процессов, направленных на стимуляцию натрийуреза и диуреза, уменьшение объема циркулирующей крови и снижения АД. Наблюдаемая при развитии АГ активация фермента в клубочках направлена на улучшение реологических свойств крови, поддержание активной вазодилатации и нормальной интракортикальной и медуллярной гемодинамики, а следовательно, и адекватной ультрафильтрации в условиях развивающейся АГ.

В эндотелии капилляров клубочка, его капсуле и мезангиальных клетках NADPH-диафораза отражает каталитическую активность различных изоферментов семейства нитроксидсинтаз. Наличие NADPH-диафоразы в эндотелиальных клетках и капсуле клубочка свидетельствует об экспрессии эндотелиальной, а в мезангиальных клетках – индуцибельной изоформы фермента [8, 12, 14]. Поэтому нельзя исключать, что второй пик активности фермента, наблюдавшийся в почечных клубочках животных с АГ на 4-й неделе эксперимента, определяется экспрессией именно индуцибельной NOS.

В эпителии собирательных трубочек у экспериментальных животных на фоне нарастания АД зарегистрировано уменьшение активности NOS, что свидетельствует о том, что уже на ранних стадиях заболевания создаются предпосылки для нарушения образования оксида азота в количествах, необходимых для адекватного поддержания натрийуреза и выведения воды. Данный процесс напрямую связан с ранним развитием атрофии мозгового слоя, приводящей к уменьшению образования не только оксида азота, но и других депрессорных веществ – кининов и простагландинов [13].

К концу 6-й недели эксперимента, когда у животных устанавливались стабильно высокие показатели АД, во всех отделах нефрона наблюдалось постепенное истощение нитроксидпродуцирующей функции, что связано, по-видимому, с развитием дистрофических изменений в канальцах и склеротических изменений в капиллярах клубочков. В развитии склеротических изменений в клубочках важную роль играет и сам оксид азота, продуцируемый индуцибельной NOS, активность, которой резко повышается при стабилизации АД и остается на высоком уровне.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о наличии нитроксидмодулирующего компонента в спектре фармакологических эффектов фуросемида, клонидина и дибазола. При введении этих препаратов изменение активности синтеза оксида азота в почках имеет динамическое течение и неодинаковую направленность в различных сегментах нефрона. Стабильное усиление нитроксидпродуцирующей функции зафиксировано нами при введении клонидина, который реализовал свои эффекты через активацию NADPH-диафоразы в почечных тельцах и собирательных трубочках на всем протяжении эксперимента и в проксимальных канальцах через 4 недели регулярного применения. Вероятно, в основе данного эффекта препарата лежит его способность влиять не только на вазомоторные центры продолговатого мозга, но и регулировать активность локальных имидазолиновых рецепторов почечной паренхимы [13]. Повышение уровня нитроксидергической активности в этом случае может способствовать поддержанию активной вазодилатации и приводить к постепенному снижению продукции ренина. Увеличение активности NADPH-диафоразы в почечных клубочках и собирательных трубочках было присуще также дибазолу, однако данные эффекты отличались от действия клонидина меньшей выраженностью и длительностью. Незначительное повышение активности NOS в проксимальных отделах нефрона, наблюдавшееся на 1-й неделе введения дибазола, может вносить определенный вклад в усиление натрийуреза и увеличение диуреза – эффекты, характерные для данного препарата [5]. Наименьшим влиянием на нитроксидпродуцирующую функцию почек обладал фуросемид – лишь на 4-й неделе его регулярного применения было зарегистрировано значительное и кратковременное увеличение активности NOS в проксимальных извитых канальцах и почечных клубочках.

Таким образом, развитие экспериментальной АГ сопровождается реакцией со стороны нитроксидергической системы почки, а использование гипотензивных препаратов сопровождается динамическим и дифференцированным изменением активности синтеза оксида азота во всех почечных структурах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям РФ (госконтракты № 02.740.11.0450 и № 14.740.11.0186).

Литература

1. Алмазов В.А., Шварц Е.И., Шляхто Е.В.. Артериальная гипертензия // Клиническая фармакология и терапия. 2000. Т. 6, № 1. С. 7–15.
2. Белоусов Ю.Б., Намсараев Ж.Н. Эндотелиальная дисфункция как причина атеросклеротического поражения артерий при артериальной гипертензии: методы коррекции // Фарматека. 2004. Т. 6. С. 41–49.
3. Вандер А. Физиология почек. СПб.: Питер, 2000. 288 с.
4. Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Реутов В.П. NO-синтаза в норме и при патологии различного генеза // Вестник РАМН. 2000. Т.4. С. 30–34.
5. Кобалава Ж.Д., Котовская Ю.В. Артериальная гипертония. М., 2001. 208 с.
6. Кузнецов С.Л., Мушкамбаров Н.Н., Горячкина В.Л. Атлас по гистологии, цитологии и эмбриологии. М.: МИА, 2002. 374 с.
7. Кутырина И.М.. Современные аспекты патогенеза почечной артериальной гипертензии // Нефрология. 2000. Т. 4, № 1. С. 112–115.
8. Марков Х.М. Окись азота и окись углерода – новый класс сигнальных молекул // Успехи физиол. наук. 1996. № 4. С. 30–43.
9. Покровский В.И., Виноградов Н.А. Оксид азота, его физиологические и патофизиологические свойства // Тер. архив. 2005. № 1. С. 82–88.
10. Тищенко О.В., Елисеева Е.В., Мотавкин П.А. Значение оксида азота в развитии гипертрофии сердца в условиях экспериментальной почечной гипертензии // Цитология. 2002. Т. 44, № 3. С. 263–269.
11. Шляхто Е.В. Патогенез гипертонической болезни // Журн. сердечная недостаточность. 2002. Т. 3, № 1 (11). С. 12–13.
12. Bachmann S., Mundel P. Nitric oxide in the kidney: synthesis, localization, and function Amer. // J. Kidney Dis. 1994. Vol. 24, No. 1. P. 112–129.
13. Esler M. The sympathetic system and hypertension // American Journal of Hypertension. 2000. Vol. 13, No. 6. P. 99–106.
14. Pfeilschifter J., Kunz D., Muhi H. Nitric oxide: an inflammatory mediator of glomerular mesangial cells // Nephron. 1993. Vol. 64, No. 4. P. 518–528.
15. Maschio G., Oldrizzi L., Marcantoni C. Hypertension and progression of renal disease // Journal of Nephrology. 2000. Vol. 13. P. 225–227.

Поступила в редакцию 06.04.2011.

STATE OF NITRIC OXIDE-PRODUCING FUNCTION OF KIDNEYS WHEN USING ANTIHYPERTENSIVE DRUGS IN RATS WITH EXPERIMENTAL NEPHROGENIC HYPERTENSION

E.F. Romanchenko, A.V. Tyirtyishnikova

Pacific State Medical University (2 Ostryakova Av. Vladivostok 690950 Russian Federation)

Summary – The authors have conducted histochemical mapping of NADPH-diaphorase (nitroxide synthase) in different functional parts of kidney in dynamics and with the use of furosemide, dibazol and clonidine in rats with original model of nephrogenic hypertension. The infusion of these medications caused different changes in the nitric oxide production in different nephron segments. Clonidine caused stable enhancement of the nitric oxide-producing function. In this case, the increasing nitric oxide activity can maintain active vasodilatation, thus leading to gradual decrease of renin production. Dibazol also caused increasing activity of nitric oxide synthase in renal glomerulus and collector tubule but these effects were less intensive and shorter. The slight increase of the enzyme activity in the proximal segments of nephron was observed during the 1st week of Dibazol introduction. Furosemide exhibited the poorest effects on the nitric oxide-producing function of kidneys.

Key words: arterial hypertension, kidneys, nitric oxide synthase, nitric oxide.

Pacific Medical Journal, 2013, No. 2, p. 34–37.