

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ НЕФРОНА К АНТИДИУРЕТИЧЕСКОМУ ГОРМОНУ У КРЫС С ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

Бедоева З.Р.¹, Джигоев И.Г.¹, Батагова Ф.Э.^{1,2}, Кабоева Б.Н.¹, Лолаева А.Т.¹

¹ ФГБОУ ВО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Владикавказ, e-mail: alazalina@yandex.ru;

² ФГБУН Институт биомедицинских исследований Владикавказского научного центра РАН, Владикавказ, e-mail: anechca2003@mail.ru

Выяснялась чувствительность нефрона к антидиуретическому гормону у крыс с моделью почечной недостаточности. Исследования проводили на 78-и крысах линии Вистар (28 интактных и 50 с почечной недостаточностью, создаваемой в/м введением глицерина в дозе 0,8 мл/100г, и с повторным введением через две недели и один месяц). Антидиуретический гормон, в виде десмопрессина, вводили в/м в дозе 1,5 мкг/кг на фоне 5,0 % от веса крыс водной нагрузки водопроводной водой. Десмопрессин у 75,0 % контрольных крыс в течение первого часа вызвал отсутствие мочи, а у оставшихся 25,0 % – трехкратное её уменьшение. Сниженным диурез был и за второй час. Отмеченные изменения были обусловлены усилением канальцевой реабсорбции воды. Введение десмопрессина крысам с почечной недостаточностью в олигоанурическую фазу (через две недели) оказывает усиленное антидиуретическое действие, полностью блокируя водный диурез не только в первый час, но и за второй. На высоте полиурической фазы почечной недостаточности (через 1 месяц) эффект десмопрессина проявляется слабее, хотя канальцевая реабсорбция остается усиленной, но одновременно ускоряется и клубочковая фильтрация, а через три месяца (хроническая фаза) введение десмопрессина практически перестает оказывать характерное антидиуретическое действие.

Ключевые слова: почечная недостаточность, десмопрессин, водовыделительная функция, канальцевая реабсорбция.

SENSITIVITY OF NEFRON TO ANTIDIURETHIC HORMONE IN RATS WITH RENAL INSUFFICIENCY

Bedoeva Z.R.¹, Dzhioev I.G.¹, Batagova F.E.^{1,2}, Kaboeva B.N.¹, Lolaeva A.T.¹

¹North Ossetian State Medical Academy. Vladikavkaz, e-mail: alazalina@yandex.ru;

²Institute of Biomedical Researches of Vladikavkaz Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Vladikavkaz, e-mail: anechca2003@mail.ru

The sensitivity of the nephron to antidiuretic hormone in rats with a model of renal failure was elucidated. The studies were carried out on 78 Wistar rats (28 intact and 50 with renal insufficiency, created intramuscularly by the administration of glycerin at a dose of 0.8 ml/100 g, with repeated administration in two weeks and one month). Antidiuretic hormone, in the form of desmopressin, was administered intramuscularly at a dose of 1.5 µg/kg against a background of 5.0 % of the weight of the rats of the water load with tap water. Desmopressin in 75.0 % of the control rats during the first hour caused no urine, while the remaining 25.0 % caused a three-fold decrease. Decreased diuresis was in the second hour. The changes noted were due to increased tubular water reabsorption. The administration of desmopressin to rats with renal insufficiency in the oligoanuric phase (after two weeks) exerts an enhanced antidiuretic effect, completely blocking diuresis not only in the first hour after the water load, but also in the second. At the height of the polyuric phase of renal failure (after 1 month), the effect of desmopressin is less pronounced, although tubular reabsorption is enhanced, but glomerular filtration is also intensified, and after three months (chronic phase) it practically ceases to have a characteristic antidiuretic effect.

Keywords: renal insufficiency, desmopressin, water excretory function, tubular reabsorption.

Постоянное повышение частоты заболеваний, их омоложение, более сложные формы проявлений, среди которых болезни почек занимают значительное место как у нас в стране, так и повсеместно, требует поиска не только новых методов лечения, диагностики, но и выяснения механизмов, лежащих в основе этих заболеваний, что, несомненно, поможет ускорить лечение с благоприятным исходом. Отсюда очевидна целесообразность проведения

фундаментальных экспериментальных исследований на животных, с целью выяснения возможных изменений при различных патологических состояниях, в частности при почечной недостаточности.

Цель исследования

Определение чувствительности канальцевого аппарата почек к антидиуретическому гормону у крыс при острой и хронической почечной недостаточности.

Материалы и методы исследования

Модель почечной недостаточности создавали по методу G. Greven на 50-и крысах линии Вистар путем в/м введения 50,0 % глицерина в дозе 0,8 мл/100г [1]. Хотя существует много методов создания экспериментальных моделей почечной недостаточности, как фармакологических, недостатком которых является собственное действие вводимого препарата, нередко приводящее к тому, что хроническая почечная недостаточность развивается вторично, что затрудняет, а часто делает невозможным адекватное изучение ряда биохимических и иммунологических параметров, так и хирургических, с удалением большей ($\frac{5}{6}$) части почки [2; 3]. В наших опытах вводимый объём глицерина делился пополам, так как его введение в одно место в первые два-три дня приводило к гибели большей части крыс.

При постановке экспериментов мы исходили из времени развития почечной недостаточности: острая – в течение одной-двух недель после введения глицерина, хроническая – через три и более месяца. Но так как спустя один месяц после однократного введения крысам глицерина вызванные изменения начинают регрессировать, практически нормализуясь, то мы решили после опытов в конце второй недели и первого месяца ввести крысам еще по одному разу глицерин в указанной дозе. После первого введения глицерина из 50-и крыс, взятых в эксперимент, в первые два дня погибло четыре, а после второго и третьего введения – по три крысы. То есть непосредственно опыты ставили на 40 крысах.

Исследования по выяснению чувствительности тубулярного аппарата почек к антидиуретическому гормону проводили в условиях водного диуреза на 28-и крысах линии Вистар. В качестве антидиуретического гормона использовали минирин (Феринг, ФРГ), действующим началом которого является десмопрессин – синтетический аналог вазопрессина, полученный при дезаминировании цистеина и замещение L-аргинина на D-аргинин. Препарат, воздействуя на дистальные извитые канальцы и собирательные трубочки, обладает стойким, до 12 часов, антидиуретическим эффектом. В клинике его чаще всего применяют при несахарном диабете, причём суточная доза колеблется в значительном диапазоне – от 0,1 мг до 1,2 мг. А используемая нами для крыс доза десмопрессина в 1,5

мкг/кг, рассчитывалась эмпирически, с условием, чтоб его антидиуретический эффект длился около одного часа [4].

Так как исследования проводили в условиях водной нагрузки, то всем крысам вводили водопроводную воду в объёме 5,0 % их массы и помещали в специальные клеточки-воронки для сбора (отдельно за каждый час), выделяющейся в течение трех часов мочи, в которой спектрофотометрически (UNICO 800, США) определяли содержание креатинина по методу Поппера, основанного на реакции Яффе с изменением окраски пикриновой кислоты при взаимодействии с креатинином в щелочной среде. Уровень креатинина определяли и в плазме крови (мкмоль/мл), а затем рассчитывали скорость клубочковой фильтрации (мл/час/100г) и величину канальцевой реабсорбции воды (%).

Содержание крыс, уход, постановка опытов и вывод их из эксперимента (в состоянии обезболивания и сна после внутрибрюшинного введения крысам анестетика общего действия «Золетил» (Франция) в дозе 0,1-0,15 мл/100г.), с последующей утилизацией, осуществлялись в соответствии с приказом Минздравсоцразвития России № 708н от 23 августа 2010 г. «Об утверждении Правил лабораторной практики».

Полученные результаты статистически обрабатывались с помощью программы «GraphPadPrizm 5.06», степень достоверности оценивалась по t-критерию Стьюдента (параметрический метод сравнения средних величин).

Полученные результаты и их обсуждение

Антидиуретический гормон свое действие на дистальные отделы канальцев почек и собирательные трубочки оказывает через V_2 рецепторы, активация которых посредством Gs-белка и стимуляцию аденилатциклазного механизма каскадно запускает внутри эпителиоцитов процессы, приводящие к встраиванию в апикальную мембрану дистальных канальцев и собирательных трубочек аквапоринов второго типа, через которые вода из первичной мочи трансцеллюлярно, по системе образованных с аквапоринами трубочек, проходит к базолатеральной мембране, поступает в интерстиций, откуда далее идет в общий кровоток [5; 6; 7; 8].

Вначале мы выяснили влияние десмопрессина на интактных крысах. Полученные результаты выглядели следующим образом. За первый час из 28 крыс отсутствие диуреза было у 21-го, а у оставшихся 7-и количество выделившейся мочи было в 3 раза меньше контроля (в качестве контроля использовали этих же 28 крыс до введения им десмопрессина). То есть десмопрессин у $\frac{3}{4}$ крыс заблокировал образование окончательной мочи, а у остальных резко её снизил (табл.1). При этом скорость клубочковой фильтрации не менялась, а причиной угнетения водного диуреза было усиление канальцевой реабсорбции воды, то есть у крыс с полным отсутствием диуреза канальцевая реабсорбция воды, очевидно,

была 100,0 %, а у 7-и крыс, у которых выделилась моча, процесс обратного всасывания воды составил $96,74 \pm 0,35$ % ($p < 0,001$). За второй час диурез был у всех крыс, но он оставался статистически значимо меньше ($1,45 \pm 0,09$ мл/час/100г – контроль, $0,98 \pm 0,06$ мл/час/100г – десмопрессин, $p < 0,001$). И в этом случае уменьшение было вследствие повышенной канальцевой реабсорбции воды. А за третий час количество мочи у крыс с десмопрессином стало больше контроля, что уже было обусловлено снижением обратного всасывания воды, хотя клубочковая фильтрация оставалась неизменной (рис.1). Но в среднем за три часа после введения десмопрессина водный диурез у крыс был на 22,2 % меньше контроля. И когда мы оставили животных в клетках для сбора мочи еще на один час, то количество выделившейся мочи за четыре часа стало таким же, как у контрольных за три часа.

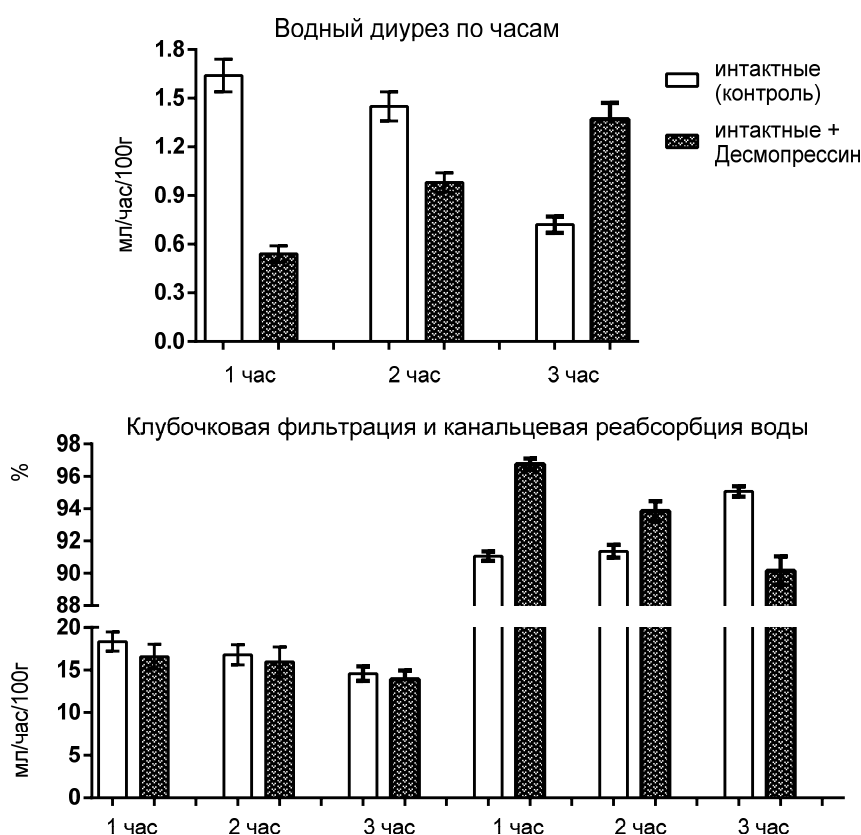


Рис. 1. Водный диурез, клубочковая фильтрация и канальцевая реабсорбция воды у крыс после инъекции десмопрессина

А то, что десмопрессин не изменил скорость клубочковой фильтрации созвучно с ранее полученным у нас в лаборатории данным об существенном его влиянии на скорость почечного кровотока. Отмечается лишь только слабое снижение [4]. Очевидно, что это могло быть связано с той незначительной вазоконстрикторской и гипертензивной способностью препарата, которая наблюдалось у больных [9], хотя в этом случае доза десмопрессина была другой (0,3 мкг/кг веса).

Таким образом, однократное введение интактным крысам десмопрессина в дозе 1,5 мкг/кг в условиях водной нагрузки водопроводной водой в объёме 5,0 % их массы, в течение первого часа, усиливая канальцевую реабсорбцию воды, блокирует диурез у 75,0 % животных, а у 25,0 % – в три раза его уменьшает. То есть у интактных крыс чувствительность канальцевого аппарата почек к действию антидиуретического гормона проявляется блокировкой диуреза за первый час, снижением за второй и повышением за третий, но в среднем за четыре часа введённая водная нагрузка выделяется почти в полном объёме, то есть десмопрессин в применяемой дозе не оказывает пролонгированное действие.

Исследование влияния десмопрессина при почечной недостаточности мы проводили в период наиболее выраженных изменений водовыделительной функции почек [10], то есть через две недели (в олигоанурическую фазу), один месяц (в полиурическую фазу) и через три месяца (в хроническую фазу). В эти периоды отмечаются: в течение первых двух недель снижение диуреза за счет угнетения клубочковой фильтрации; в конце месяца максимальное повышение диуреза вследствие ускорения фильтрации и частичного ослабления канальцевой реабсорбции воды; в конце третьего месяца водный диурез и основные процессы мочеобразования особо не отличаются от контроля (таблица).

Влияние десмопрессина на водный диурез, скорость клубочковой фильтрации и канальцевую реабсорбцию воды у крыс с почечной недостаточностью

Время	Стат. показатели	Диурез (мл/час/100г)	Клубочковая фильтрация (мл/час/100г)	Канальцевая реабсорбция (%)
Интактные крысы (контроль для почечной недостаточности)				
1 час	M±m	1,64±0,10	18,34±1,12	91,06±0,29
2 час	M±m	1,45±0,09	16,79±1,18	91,36±0,40
3 час	M±m	0,72±0,05	14,58±0,86	95,06±0,32
Интактные крысы + Десмопрессин (контроль для почечной недостаточности + Десмопрессин)				
1 час	M±m // p	0,54±0,05 // <0,001	16,58±1,44 // *	96,74±0,35 // <0,001
2 час	M±m // p	0,98±0,06 // <0,001	15,96±1,75 // *	93,85±0,62 // <0,001
3 час	M±m // p	1,37±0,10 // <0,001	13,92±1,01 // *	90,16±0,88 // <0,001
Через 2 недели после введения глицерина				
1 час	M±m // p	1,14±0,10 // <0,001	13,76±1,01 // <0,002	91,71±0,92 // *
2 час	M±m // p	0,94±0,05 // <0,01	11,73±0,92 // <0,002	91,90±0,50 // *
3 час	M±m // p	0,64±0,05 // *	12,24±0,78 // <0,001	94,77±0,42 // *
Через 2 недели после введения глицерина + Десмопрессин				
3 час	M±m // p	1,38±0,16 // *	38,09±2,82 // < 0,001	96,37±0,70 // <0,001

Через 1 месяц после введения глицерина				
1 час	M±m // p	2,08±0,14 // <0,02	22,53±1,12 // <0,001	90,76±0,72
2 час	M±m // p	2,12±0,16 // <0,001	20,25±1,33 // <0,01	89,53±0,69 // <0,05
3 час	M±m // p	0,72±0,06 // *	16,75±1,02 // *	95,70±0,54 // *
Через 1 месяц после введения глицерина + Десмопрессин				
2 час	M±m // p	0,77±0,10 // *	30,29±4,59 // <0,001	97,76±0,32 // <0,001
3 час	M±m // p	2,13±0,23 // <0,01	39,06±2,50 // <0,001	94,98±0,72 // <0,002
Через 3 месяца после введения глицерина				
1 час	M±m // p	1,52±0,09 // *	17,52±1,13 // *	91,32±0,60 // *
2 час	M±m // p	1,35±0,09 // *	17,75±1,29 // *	92,39±0,74 // *
3 час	M±m // p	0,59±0,03 // *	15,23±0,91 // *	96,12±0,39 // *
Через 3 месяца после введения глицерина+ Десмопрессин				
1 час	M±m // p	1,04±0,12 // <0,002	22,48±1,59 // <0,002	95,37±±0,30 // <0,01
2 час	M±m // p	1,65±0,14 // <0,001	18,76±2,15 // *	91,20±0,46 // <0,002
3 час	M±m // p	0,92±0,08 // <0,002	13,62±1,09 // *	93,24±0,57 // <0,002
* – отсутствие статистически значимых отличий				

У крыс с почечной недостаточностью в конце второй недели после инъекции глицерина введение десмопрессина вызвало полное отсутствие водного диуреза за первый и второй часы, но за третий час он был у всех крыс в объеме $1,38 \pm 0,16$ мл, что было больше, чем у интактных крыс ($0,72 \pm 0,05$ мл/час/100г). При этом появляется то, чего не было ни у интактных крыс под влиянием десмопрессин, ни у крыс с почечной недостаточностью – значительно ускорилась клубочковая фильтрация. Она достигла $38,09 \pm 2,85$ мл/час/100г, что в 2,7 раза больше контроля на десмопрессине. Канальцевая реабсорбция воды оставалась усиленной (таблица).

В чем могла быть причина столь значительного ускорения клубочковой фильтрации? Ведь у интактных крыс десмопрессин не оказал влияние на фильтрацию и его антидиуретический эффект был вызван только воздействием на каналцы. Скорее всего это обусловлено тем, что повышается давление в клубочках нефронов в результате сужения выносящей артериолы. На это есть ссылки в научной литературе, показывающие, что вазопрессин стимулирует выброс кальция из саркоплазматического ретикула гладкомышечных клеток, что усиливает их сокращение и соответственно приводит к сужению просвета выносящей артериолы [11; 12]. Также есть данные, что вазопрессин вместе с ангиотензином II и тромбоксаном через активацию протеинкиназ оказывают вазоконстрикторский эффект на выносящую артериолу, причем ангиотензин II является прежде всего физиологическим модулятором, а вазопрессин и тромбоксан проявляют свои эффекты при патологических состояниях, коим, конечно, является и почечная

недостаточность [13], хотя по сравнению с вазопрессинном десмопрессин обладает менее выраженным действием на гладкую мускулатуру сосудов и внутренних органов, вследствие того, что в структуре молекулы десмопрессина произошло дезаминирование 1-цистеина и замена 8-L-аргинина на D-аргинин.

В конце первого месяца введение десмопрессина вызвало отсутствие мочи за первый час у всех крыс с почечной недостаточностью, но за второй час диурез был уже у 60,0 % крыс ($0,77 \pm 0,10$ мл/час/100 г), а за третий – у всех ($2,13 \pm 0,23$ мл/час/100 г). И в этом случае также была ускорена клубочковая фильтрация и усилена канальцевая реабсорбция воды (таблица).

Исследования, проведённые в конце третьего месяца, показали, что десмопрессин особо не проявил свой характерный эффект. Диурез за первый час, хоть и был сниженным ($1,04 \pm 0,12$ мл/час/100г), но был у 90,0 % крыс, а за второй и третий – у всех (рис. 2).

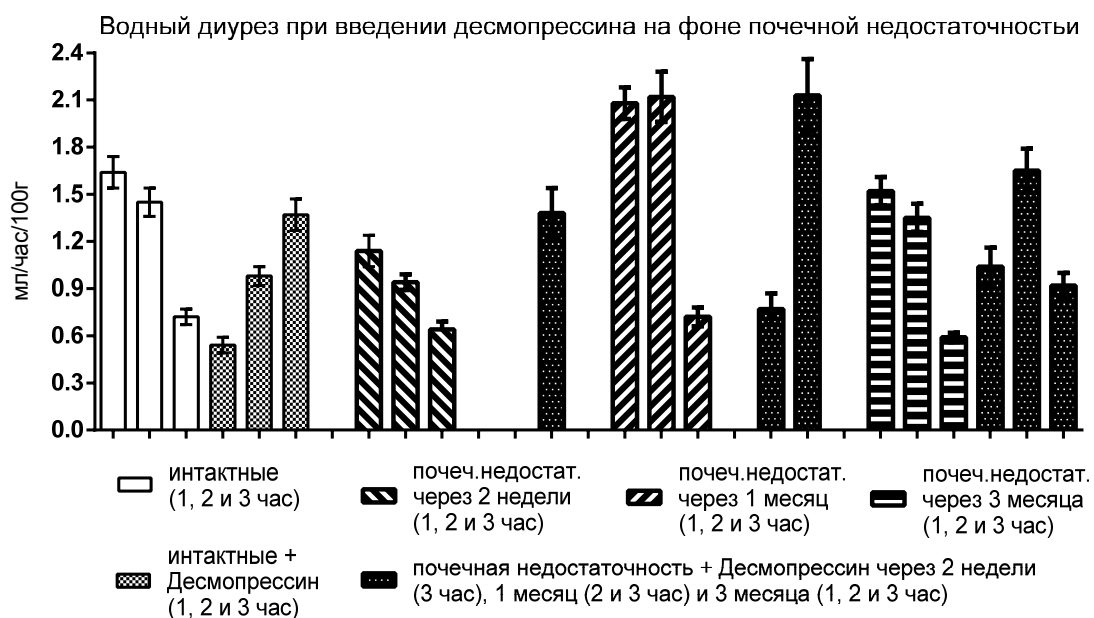


Рис.2. Влияние десмопрессина на водный диурез у крыс с почечной недостаточностью

Изменение диуреза при завершении экспериментов в основном было обусловлено канальцевой реабсорбцией воды, которая, по сравнению с данным после введения интактным крысам десмопрессина, была меньше за первые два часа и больше за третий час. Одновременно клубочковая фильтрация за первый час оставалась ускоренной, хотя уже не была столь значительной как в опытах через 1 месяца после создания модели (таблица).

Заклучение

Введение десмопрессина в дозе 1,5 мкг/кг крысам с почечной недостаточностью в олигоанурическую фазу в условиях водного диуреза оказывает усиленное антидиуретическое действие, полностью блокируя выделение мочи не только в первый час,

как у интактных крыс, но и во второй. На высоте полиурической фазы почечной недостаточности эффект проявляется слабее, хотя канальцевая реабсорбция воды остается усиленной, но одновременно ускоряется клубочковая фильтрация. При хронической почечной недостаточности десмопрессин практически перестает оказывать характерное действие, то есть чувствительность канальцев почек снижается, что, очевидно, вызвано тем, что к этому времени у крыс поражение затрагивает канальцы.

Список литературы

1. Джиоев И.Г. Некоторые особенности функции и морфологии почек крыс в условиях различных моделей экспериментальной почечной недостаточности / И.Г. Джиоев, А.М. Фидарова // Вестник новых медицинских технологий. – 2008. – Т. 15, № 1. – С. 38-39.
2. Гавришева Н.А. Способ моделирования хронической почечной недостаточности // Патент России. – 2003. – № 2215335.
3. Liu T.Q., Luo W.L., Tan X. et al. A novel contrast-induced acute kidney injury model based on the 5/6-nephrectomy rat and nephrotoxicological evaluation of iohexol and iodixanol in vivo // Oxid Med Cell Longev. – 2014. – Vol. 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/427560>.
4. Водовыделительная функция и чувствительность почек к антидиуретическому гормону у крыс с аутоиммунным нефритом / И.Г. Джиоев [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 10-6. – С. 1098-1102.
5. Крысова А.В. Роль аквапоринов в транспорте воды через биологические мембраны / А.В. Крысова, В.И. Циркин, А.А. Куншин // Вятский медицинский вестник. – 2012. – № 2. – С. 50-58.
6. Гайтон А.К. Медицинская физиология / А.К. Гайтон, Дж.Э. Холл. – М.: Логосфера, 2008. – 1256 с.
7. Титовец Э.П. Аквапорины человека и животных: фундаментальные и клинические аспекты / Э.П. Титовец. – Минск: Белорусская наука, 2007. – 239 с.
8. Kwon T.H., Frøkiær J., Nielsen S. Regulation of aquaporin-2 in the kidney: A molecular mechanism of body-water homeostasis // Kidney Res ClinPract. – 2013. – Vol. 32, № 3. – P. 96-102. doi: 10.1016/j.krcp.2013.07.005.
9. Mannucci P.M. Desmopressin (DDAVP) in the Treatment of bleeding disorders // Treatment of hemophilia. – 2012. – № 11. – P.1-9.
10. Механизмы водовыделительной функции почек при экспериментальной острой почечной недостаточности на фоне гиперкальциемии / И.Г. Джиоев [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 10-10. – С. 1924-1928.

11. Ranieri M., Tamma G., Di Mise A., Valenti G. Negative feedback from CaSR signaling to aquaporin-2 sensitizes vasopressin to extracellular Ca^{2+} // J. Cell Sci. – 2015. – Vol. 128, № 13. – P. 2350-2360. doi: 10.1242/jcs.168096.
12. Parrinello G., Torres D., Paterna S. Salt and water imbalance in chronic heart failure // Intern Emerg Med. – 2011. – Vol. 6, № 1. – P. 29-36. doi: 10.1007/s11739-011-0674-8.
13. Cavarape A., Bauer J., Bartoli E., Endlich K., Parekh N. Effects of angiotensin II, arginine vasopressin and thromboxane A2 in renal vascular bed: role of rho-kinase // Nephrol Dial Transplant. – 2003. – Vol. 18, № 9. – P. 1764-1769.