

## СОСТОЯНИЕ ЭЛЕКТРОЛИТНО-МОЧЕВИННОГО ПРОФИЛЯ ТКАНИ ПОЧЕК КРЫС С ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

Джиоев И.Г.<sup>1</sup>, Бедоева З.Р.<sup>1</sup>, Батагова Ф.Э.<sup>2</sup>, Ремизов О.В.<sup>1</sup>, Дзагахова А.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Северо-Осетинская государственная медицинская академия, Владикавказ, e-mail: inal44@mail.ru;

<sup>2</sup>Институт биомедицинских исследований ВНИЦ РАН, Владикавказ, e-mail: nechca2003@mail.ru

Изучался электролитно-мочевинный профиль ткани почек крыс с экспериментальной почечной недостаточностью с целью выяснения механизма водовыделительной функции. Исследования проводили на 62 крысах линии Вистар, 20 из которых составляли контрольную группу, остальные – экспериментальную. Почечную недостаточность создавали трехкратным (вначале, через две недели и спустя один месяц) введением глицерина в дозе 0,8 мл/100 г массы тела. опыты ставили как в условиях водного диуреза (после перорального введения водопроводной воды в объеме 5,0% массы крыс), так и спонтанного в течение трех месяцев (в конце первой и второй недель, первого, второго и третьего месяцев). Выявлено, что электролитно-мочевинный профиль слоёв ткани почек (в корковом и мозговом веществах, почечном сосочке), создаваемый осмотически активными натрием и мочевиной, у экспериментальных крыс в конце первого месяца снижается, в результате чего в интерстициальной ткани почек ослабевает осмотическое давление, что способствует торможению канальцевой реабсорбции воды и повышению диуреза. Одновременно, в условиях спонтанного диуреза, на протяжении всего эксперимента отмечается постоянное повышение в плазме крови содержания мочевины, в то время как экскреция увеличивается только в течение первого месяца, а затем снижается, и соотношение мочевины, выделенной с мочой, к её содержанию в крови уменьшается более чем в два раза, что также является характерным признаком почечной недостаточности. При водном диурезе наблюдаются аналогичные изменения, с той лишь разницей, что максимальное повышение экскреции мочевины наблюдается в конце второй недели после создания почечной недостаточности.

Ключевые слова: почечная недостаточность, диурез, мочевина, натрий, канальцевая реабсорбция, осмолярность почек, экскреция.

## ELECTROLYTIC-UTERINE PROFILE OF LINES OF KIDNEY TISSUE IN RATS WITH RENAL FAILURE

Dzhioev I.G.<sup>1</sup>, Badoeva Z.R.<sup>1</sup>, Batagova F.E.<sup>2</sup>, Remizov O.V.<sup>1</sup>, Dzagakhova A.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>North Ossetian State Medical Academy, Vladikavkaz, e-mail: inal44@mail.ru;

<sup>2</sup>Institute of Biomedical Investigations of Vladikavkaz Scientific Centre of RAS, Vladikavkaz, e-mail: nechca2003@mail.ru

The electrolyte-urea profile of the kidney tissue of rats with experimental renal insufficiency was studied to determine the mechanism of water excretion. Studies were performed on 62 Wistar rats, 20 controls. Renal failure was created three times (first, two weeks and one month later) with glycerol administration at a dose of 0.8 ml / 100 g. Experiments were performed both under conditions of water diuresis (oral administration of tap water in a volume of 5.0% by weight of rats) and spontaneous. Studies were conducted for three months (at the end of the first and second weeks, first, second and third months). It was revealed that the electrolyte-urea profile of the kidney takney layers (in cortical and medulla, papilla) created by sodium and urea in experimental rats decreases at the end of the first month, as a result of which osmotic pressure weakens in the interstitial kidney tissue, which contributes to the inhibition of tubular reabsorption of water and increase diuresis. At the same time, throughout the experiment, a constant increase in urea content in the blood plasma is noted, while excretion increases only during the first two weeks (with water diuresis) and the first month (with spontaneous diuresis), and then decreases, and the ratio of urea allocated with urine to its content in the blood decreases more than twice, which is also a characteristic sign of renal failure.at the end of the second week after the creation of renal failure.

Keywords: renal insufficiency, water excretory function, urea, sodium, tubular reabsorption, renal osmolarity, excretion.

Экспериментальные исследования функций почек в условиях различных патологических состояний позволяют вскрывать ранее неизвестные механизмы, лежащие в основе тех или иных заболеваний, что в перспективе может быть востребовано при

разработке способов лечения нефрологических больных. Несмотря на то что основной функцией почек является мочеобразовательная, они также поддерживают постоянство внутренней среды организма благодаря тонкой и точной регуляции основных процессов мочеобразования, во многом зависящих и от гормонального влияния, и от авторегуляции [1-3]. Образование окончательного объёма мочи в основном обусловлено канальцевой реабсорбцией воды, а она связана с осмолярностью интерстиций, создаваемой осмотически активными веществами, в первую очередь натрием и мочевиной [4-6]. Однако о величине обратного всасывания воды в канальцах почек можно судить более обоснованно и с большей точностью по уровню в плазме крови антидиуретического гормона – основного регулятора всасывания воды в дистальных канальцах и собирательных трубочках [7; 8].

Цель исследования: исследование состояния электролитно-мочевинного профиля ткани почек крыс с экспериментальной почечной недостаточностью для выяснения механизмов водовыделительной функции в этих условиях.

**Материалы и методы исследования.** Исследования проводили на 62 крысах линии Вистар. Контрольную группу, состоящую из 20 интактных животных, разделили на две равные подгруппы: с водной нагрузкой и без таковой (спонтанный диурез). Опытную группу, состоящую из 42 животных, также разделили на две равные подгруппы, в одной из которых крысы получали водную нагрузку (водопроводную воду в объёме 5,0% их массы тела), а в другой – питьевой режим сохранялся по потребности, определяющей объём спонтанного диуреза (подгруппа «спонтанного диуреза»).

Модель почечной недостаточности создавали путём внутримышечного введения крысам 50,0%-ного раствора глицерина в дозе 0,8 мл/100 г массы тела [9]. При постановке экспериментов исходили из того, что обмен веществ у крыс значительный, что способствует более ускоренному течению всех процессов и нормализации патологических состояний, а нефротоксическое действие однократного введения глицерина уже через две недели после введения ослабевает и практически заканчивается в течение месяца. В наших же планах было выяснение механизмов водовыделительной функции почек в течение трёх месяцев, то есть в условиях острого и хронического течения почечной недостаточности. В связи с этим через две недели после начала эксперимента животным повторно вводили глицерин в аналогичной дозе, а третий раз инъекцию глицерина делали спустя один месяц после первой инъекции.

Во время сбора мочи крыс сразу же после введения им водной нагрузки на три часа помещали в большие пластиковые воронки с закрытой крышкой и мочеприёмником (выделяющуюся мочу собирали отдельно каждый час). При проведении опытов со сбором спонтанного диуреза у животных моча собиралась в течение шести часов. В собранной моче

спектрофотометрически (спектрофотометр UNICO 2000, США) определяли содержание мочевины с помощью стандартного набора фирмы «Лаксма».

В слоях ткани почек определяли содержание мочевины и натрия: мочевины этим же набором после гомогенизации образцов, а натрия – после предварительного высушивания образцов, их растирания в порошок, экстрагирования иона  $0,75$  н раствором азотной кислоты и последующего определения его содержания методом пламенной фотометрии (ПФА-378, Россия) [10].

Так как исследования проводили три раза, то каждый раз для изучения осмолярности слоёв ткани почек и определения содержания мочевины в плазме крови забивали по 7 крыс в условиях полного обезболивания и состояния искусственного сна, вызванных внутрибрюшинным введением  $0,2$  мл золетила – анестетика общего действия (Франция). Подготовку и проведение опытов осуществляли согласно Приказу Министерства здравоохранения РФ «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» от 01.04.2016 г. № 199н (зарегистрирован в Минюсте РФ 15.08.2016 г. № 43232). При утилизации крыс, выведенных из экспериментов, исходили из Приказа Минсельхоза РФ «Ветеринарно-санитарные правила сбора, утилизации и уничтожения биологических отходов» от 16.08.2007 г. № 400.

Полученные результаты были подвергнуты статистической обработке с использованием программы GraphPad Prizm 6.01. При проведении статистической обработки полученных данных, исходя из того что количество животных в каждой из подгрупп было не столь значительным, мы отдали предпочтение методу Манна-Уитни. Данные считали достоверными при  $p < 0,05$ .

Разрешение для проведения данных экспериментальных исследований на животных было получено этическим комитетом ГБОУ ВПО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Минздрава России 09 декабря 2014 года, протокол № 4.5.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Ранее нами при выяснении чувствительности  $V_2$ -рецепторов канальцевого аппарата к антидиуретическому гормону у крыс с почечной недостаточностью, вызванной введением глицерина [11], было показано, что после водной нагрузки наиболее выраженные изменения диуреза, клубочковой фильтрации и канальцевой реабсорбции воды наблюдались через две недели и один месяц после создания модели, а в условиях спонтанного диуреза – через одну неделю и месяц после введения крысам глицерина [12]. Как при водном, так и спонтанном диурезе отмеченные изменения через три месяца стали приближаться к норме. Поэтому состояние электролитно-мочевинного профиля слоёв ткани почек исследовали в это же время.

Через 7 дней после инъекции глицерина содержание мочевины и натрия во всех слоях

почек крыс подгруппы «спонтанного диуреза» особо не отличалось от контрольных данных (таблица 1). А раз электролитно-мочевинный профиль не менялся, то неизменным остаётся осмотическое давление и, соответственно, канальцевая реабсорбция воды, а отмеченное нами ранее [11] снижение диуреза было обусловлено ослаблением скорости клубочковой фильтрации, а не изменением канальцевой реабсорбции.

Таблица 1

Уровни мочевины (мкмоль/г влажного веса) и натрия (мкмоль/г сухого веса) в слоях почек при спонтанном состоянии диуреза и после водной нагрузки

	Условия опытов	Статистические показатели	Корковое вещество	Мозговое вещество	Почечный сосочек
М О Ч Е В И Н А	Интактные крысы (контроль)				
	Спонтанный диурез	M±m	31,75±0,91	62,77±2,09	189,30±6,13
	Водная нагрузка	M±m	19,79±0,65	59,83±2,35	177,26±5,29
	Через 1 неделю после введения глицерина				
	Спонтанный диурез	M±m	32,58±0,76	64,27±3,24	193,54±7,12
	Через 2 недели после введения глицерина				
	Водная нагрузка	M±m	21,05±1,12	62,70±2,94	163,00±4,34 *
	Через 1 месяц после введения глицерина				
	Спонтанный диурез	M±m	27,26±0,72 *	54,75±1,83 *	168,25±4,68 *
	Водная нагрузка	M±m	17,33±0,50 *	52,13±1,96 *	158,55±6,17 *
	Через 3 месяца после введения глицерина				
	Спонтанный диурез	M±m	32,18±0,80	57,08±1,15 *	174,39±4,52 *
Водная нагрузка	M±m	20,46±0,95	60,08±2,16	181,06±7,22	
Н А Т Р И Й	Интактные крысы (контроль)				
	Спонтанный диурез	M±m	27,95±0,85	40,45±1,38	89,55±3,05
	Водная нагрузка	M±m	23,65±0,94	37,60±1,05	77,33±2,49
	Через 1 неделю после введения глицерина				
	Спонтанный диурез	M±m	26,07±0,82	39,95±1,03	90,53±3,75
	Через 2 недели после введения глицерина				
	Водная нагрузка	M±m	21,85±0,95	40,36±1,35	99,71±3,18 *
	Через 1 месяц после введения глицерина				
	Спонтанный диурез	M±m	24,76±0,60 *	34,02±0,96 *	79,76±2,99 *
	Водная нагрузка	M±m	19,81±0,75 *	34,06±0,78 *	69,18±2,19 *
	Через 3 месяца после введения глицерина				

	Спонтанный диурез	M±m	26,55±0,96	41,33±0,86	91,44±4,50
	Водная нагрузка	M±m	25,06±1,12	35,33±0,90	76,66±5,52
* - статистически значимые отличия к результатам интактных крыс по U-тесту Манна-Уитни					

Спустя месяц с момента создания модели почечной недостаточности, когда у крыс отмечалась наиболее выраженная полиурия, обусловленная как ускорением клубочковой фильтрации, так и снижением канальцевой реабсорбции воды, содержание мочевины и натрия в ткани слоёв почек было меньше, чем у интактных крыс. Уровень мочевины в корковом веществе опустился до 27,26±0,72 мкмоль/г влажного веса ( $p<0,01$ ), натрия до 24,76±0,60 мкмоль/г сухого веса, а в мозговом веществе – на 12,8% ( $p<0,02$ ) для мочевины и на 15,9% ( $p<0,01$ ) для натрия. Примерно в таком же объёме произошло их снижение в почечном сосочке (на 10,1% для мочевины и на 11,0% для натрия). Эти изменения содержания мочевины и натрия в слоях ткани почек способствуют снижению осмотического давления и канальцевой реабсорбции воды, что и вызывает полиурию.

При завершении экспериментов в конце третьего месяца в корковом веществе содержание мочевины и натрия не отличалось от нормы. В мозговом веществе и почечном сосочке уровень мочевины продолжал оставаться статистически значимо сниженным, в то время как уровень натрия был соразмерен контролю (таблица 1). Однако при этом градиент содержания мочевины в слоях почек (меньше в корковом веществе, больше в мозговом и ещё больше в почечном сосочке) сохранялся. Так, если у интактных крыс уровень мочевины в корковом веществе был 31,78±0,91 мкмоль/г влажного веса, в мозговом – 62,77±2,09 и в почечном сосочке 189,3±6,13 мкмоль/г влажного веса и если уровень в корковом веществе принять за 1, то соотношения между этими показателями составят 1 : 1,99 : 5,96. В условиях почечной недостаточности через одну неделю после начала эксперимента уровни мочевины в указанных слоях почек соотносятся как 1 : 1,97 : 5,94, через один месяц – 1 : 2,0 : 6,13 и через три месяца – 1 : 1,83 : 5,59.

Таким образом, у крыс с глицериновым токсическим поражением почек в условиях спонтанного диуреза изменения содержания мочевины и натрия в слоях ткани почек вызывают колебания осмотического давления, способствующие ослаблению канальцевой реабсорбции воды, что и будет приводить к увеличению диуреза, но при этом разница в содержании мочевины в слоях почек сохраняется.

В условиях водной нагрузки через один час после внутрижелудочного введения водопроводной воды электролитно-мочевинный профиль ткани слоёв почек выглядел следующим образом. При олигурической форме острой почечной недостаточности в конце второй недели в корковом и мозговом веществах почек содержание мочевины и натрия не отличалось от результатов контрольной группы (таблица 1), а в почечном сосочке уровень

мочевины был снижен ( $163,00 \pm 4,34$  мкмоль/влажного веса в опытной группе;  $177,26 \pm 5,29$  мкмоль/влажного веса в контроле;  $p < 0,05$ ), а натрия – наоборот, повышен ( $99,71 \pm 3,18$  мкмоль/сухого веса в опыте;  $77,33 \pm 2,49$  мкмоль/сухого веса в контроле;  $p < 0,05$ ). Очевидно, что эти разнонаправленные изменения уравнивали осмотическое давление в слоях ткани почек, поэтому канальцевая реабсорбция воды в это время не изменялась [11].

В конце первого месяца электролитно-мочевинный профиль почек во всех слоях был снижен, что и должно было стать причиной ослабления канальцевой реабсорбции воды, а при завершении опытов, по прошествии трех месяцев после введения глицерина, достоверных изменений в образцах слоёв почек не было выявлено (таблица 1).

Что могло менять содержание мочевины в слоях ткани почек? Очевидно, её уровень в плазме крови и скорость почечного кровотока в прямых сосудах юкстамедуллярных нефронов, в которых, в зависимости от скорости кровотока, усиливается или ослабляется вымывание мочевины из интерстициальной ткани [12]. В 2014 году в нашей лаборатории инвазивным доплерометрическим методом (Transonic NT 313, США) было показано, что у крыс с острой почечной недостаточностью происходит ослабление скорости почечного кровотока [13].

Определение содержания мочевины в плазме крови выявило её повышение уже через две недели ( $5,59 \pm 0,31$  ммоль/л – опытная группа;  $4,52 \pm 0,18$  ммоль/л – контроль;  $p < 0,01$ ), а дальше оно нарастало (через один месяц –  $6,90 \pm 0,29$  ммоль/л,  $p < 0,001$ ; в конце второго и третьего месяцев соответственно  $7,10 \pm 0,42$  и  $8,42 \pm 0,56$  ммоль/л;  $p < 0,001$ ). Такое повышение уровня мочевины в крови может способствовать нарастанию её содержания в интерстициальной ткани, что также усиливается действием вазопрессина, способствующего выходу мочевины из собирательных трубочек в интерстиций [12].

Относительно экскреции мочевины с мочой (таблица 2) было выявлено, что в условиях спонтанного состояния уже с первой недели происходит постепенное её повышение (максимально в конце первого месяца). В конце второго месяца выведение мочевины с мочой стало близко к результату контроля, а к моменту завершения опытов, в конце третьего месяца, меньше ( $p < 0,05$ ). При водном диурезе экскреция мочевины максимальна в конце первой недели, оставаясь повышенной ещё одну неделю, а далее – снижается (таблица 2).

Таблица 2

Экскреция мочевины (мкмоль/час/100 г) в условиях водного и спонтанного диуреза

Стат. показат.	При водном диурезе			При спонтанном диурезе
	1 час	2 час	3 час	
Интактные крысы (контроль)				

M±m	74,36±3,58	61,08±2,16	116,25±5,56	198,2±7,28
Через 1 неделю после введения глицерина				
M±m	105,7±6,86 *	68,53±4,69	106,66±7,15	249,3±14,61 *
Через 2 недели после введения глицерина				
M±m	95,66±6,09 *	78,49±7,11 *	132,6±10,10	275,7±19,37 *
Через 1 месяц после введения глицерина				
M±m	70,12±4,94	61,05±4,68	90,82±7,68 *	330,0±21,7 *
Через 2 месяца после введения глицерина				
M±m	65,08±2,46 *	53,71±1,94 *	84,33±3,15 *	183,0±14,15
Через 3 месяца после введения глицерина				
M±m	62,85±3,15 *	49,95±2,80 *	90,18±4,26 *	166,1±12,4 *
* - статистически значимые отличия к результатам интактных крыс по U-тесту Манна-Уитни				

Одним из характерных признаков почечной недостаточности является уменьшение соотношения экскреции мочевины к её содержанию в плазме крови [14; 15]. Так, у контрольных крыс в условиях водного диуреза за три часа оно составляло 55:1 (251,69±11,3 мкмоль/3 часа/100 г – экскреция мочевины, 4,52±0,18 ммоль/л – содержание в крови). У крыс с почечной недостаточностью это соотношение в течение двух недель держалось, как у контрольных (56:1 – в конце первой недели и 55:1 – в конце второй), но затем начало уменьшаться (32:1 – в конце первого, 28:1 – второго и 24:1 – третьего месяца).

В условиях спонтанного диуреза, когда после введения глицерина прошла одна неделя, соотношение экскреции мочевины к её содержанию в крови составляло 49:1, а при завершении опытов – 20:1. То есть как в условиях водного, так и спонтанного диуреза отмечается уменьшение соотношения этих показателей более чем в два раза.

**Заключение.** Создание на лабораторных крысах линии Вистар экспериментальной модели почечной недостаточности путём трехкратного в/м введения 50,0% глицерина в дозе 0,8 мл/100 г и проведение опытов в условиях спонтанного и водного диуреза в течение трех месяцев (через одну и две недели, в конце первого, второго и третьего месяцев) выявило нарастающее повышение содержания мочевины в плазме крови (в 1,86 раза больше исходного уровня в конце третьего месяца). Одновременно менялась экскреция мочевины, которая в условиях спонтанного диуреза сначала повышалась в течение одного месяца, а затем снизилась (при водном диурезе увеличение было только в течение двух недель, а затем экскреция мочевины снизилась). При завершении экспериментов в конце третьего месяца более чем в два раза уменьшилось соотношение экскреции мочевины к её содержанию в плазме крови, что является одним из характерных признаков хронической почечной

недостаточности. Электролитно-мочевинный профиль слоёв ткани почек крыс по содержанию мочевины и натрия при почечной недостаточности в условиях как спонтанного, так и водного диуреза в конце первого месяца снизился, что способствовало ослаблению в них осмотического давления и, соответственно, канальцевой реабсорбции воды, вызывая полиурию. При завершении экспериментов в конце третьего месяца содержание мочевины и натрия не отличалось от нормы.

### Список литературы

1. Гайтон А.К., Холл Дж.Э. Медицинская физиология. М.: Логосфера, 2008. 1256 с.
2. Трухан Д.И., Викторова И.А. Нефрология. Эндокринология. Гематология. Учебное пособие. СПб.; СпецЛит, 2017. 256 с.
3. Мухин Н.А., Андросова С.О., Андрусев А.М. Национальное руководство. Краткая версия / Под ред. Н.И. Мухина. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2018. 620 с.
4. Deng A., Tang T., Singh P., Wang C., Satriano J., Thomson S.C., Blantz R.C. Regulation of oxygen utilization by angiotensin II in chronic kidney disease. *Kidney International*. 2009. vol. 75. no. 2. P.197-204. DOI: 10.1038/ki.2008.481.
5. Пронина Н.Н., Джигоев И.Г., Логунова Л.В., Дзгоева Ф.У. Влияние минеральной воды в физиологических условиях и при некоторой патологии на функции почек // Лечебное использование курортных факторов Северной Осетии. Владикавказ, 1989. С. 66-74.
6. Наточина Н.Ю., Кузнецова А.А., Наточин Ю.В. Осморегулирующая функция почки у детей: учебное пособие. СПб, 2015. 24 с.
7. Наточин Ю.В. Физиология человека: водно-солевой гомеостаз // Физиология человека. 2018. Т. 44. № 3. С. 5-13. DOI: 10.7868/S0131164618030013.
8. Moss R., Thomas S.R. Hormonal regulation of salt and water excretion: a mathematical model of whole kidney function and pressure natriuresis. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2014. vol. 306. no. 2. P. 224-48. DOI:10.1152/ajprenal.00089.
9. Джигоев И.Г., Козаев А.В., Кабоева Б.Н., Батагова Ф.Э. Механизмы водовыделительной функции почек при экспериментальной острой почечной недостаточности на фоне гиперкальциемии // Фундаментальные исследования. 2014. № 10 (10). С. 1924-1928.
10. Камышников В.С. Клиническая лабораторная диагностика (методы и трактовка лабораторных исследований). М.: МЕДпресс, 2016. 720 с.
11. Бедоева З.Р., Джигоев И.Г., Батагова Ф.Э., Кабоева Б.Н., Лолаева А.Т. Чувствительность нефрона к антидиуретическому гормону у крыс с почечной недостаточностью // Современные проблемы науки и образования. 2017. № 5. [Электронный ресурс]. URL:

<http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=26883> (дата обращения: 20.02.2019).

12. Нормальная физиология. Учебник / Под ред. академика Б. Ткаченко. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. 688 с.
13. Джioев И.Г., Клочков Д.А., Кабоева Б.Н., Батагова Ф.Э. Водовыделительная функция и чувствительность почек к антидиуретическому гормону у крыс с аутоиммунным нефритом // *Фундаментальные исследования*. 2014. № 10 (6). С. 1098-1102.
14. Хиггинс К. Расшифровка клинических лабораторных анализов /пер. с англ., под ред. проф. В. Л. Эмануэля. М.: Лаборатория знаний, 2016. 592 с.
15. Minami S., Hamano T., Iwatani H., Mizui M., Kimura Y., Isaka Y. Tolvaptan promotes urinary excretion of sodium and urea: a retrospective cohort study. *Clinical and Experimental*. 2018. vol. 22. no. 3. P. 550-561. DOI: 10.1007/s10157-017-1475-9.