

УДК 591.461.599.323.4

## СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПОЧКИ У КРЫС С РАЗЛИЧНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СИСТЕМЫ ENOS-NO-ПРОТЕИНКИНАЗА G ПОСЛЕ ОБСТРУКЦИИ МОЧЕТОЧНИКА

**Баринов Э.Ф., Волошин В.В., Черешнева Е.В.**

*Донецкий государственный медицинский университет им. М. Горького,  
Украина*

Одним из патогенетических механизмов развития, хронизации и прогрессирования нефропатии при нарушении уродинамики является изменение баланса альтернативных регуляторов, к которым при ренальной патологии относят, прежде всего, ренин-ангиотензиновую систему и оксид азота [2, 4]. При этом, независимо от уровня ренина плазмы крови, активности ангиотензин-конвертирующего фермента и экспрессии рецепторов к ангиотензину II (АнгII), разными исследователями отмечено изменение реакции клеток-мишеней на эффекторный регулятор РАС - ангиотензин II. Индуцируемые им эффекты (проагрегантный, провоспалительный, профиброгенный, стимуляция апоптоза), реализуются посредством активации AT1 рецепторов, инициирующих активацию фосфолипазы C и повышение уровня внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> [5]. Однако, до сих пор нет полной ясности в отношении состояния антагонистической внутриклеточной сигнальной системы, адаптирующей клетку к повышению уровня Ca<sup>2+</sup>, которая включается при активации eNOS. Компенсаторное повышение продукции NO ведет к активации гуанилатциклазы (ГЦ), вызывая повышение уровня цГМФ и стимуляцию протеинкиназы G (ПкG) [3]. Анализ динамики продукции оксида азота в почке показал, что острая реакция на одностороннюю обструкцию мочеточника (ООМ, в течение 2 ч) проявляется ингибированием продукции NO [4]. В дальнейшем (через 1-7 дней после ООМ) зарегистрировано повышение активности различных изоформ NOS в корковом и мозговом веществе почки [3]. При этом необходимо подчеркнуть,

что повышение продукции NO отнюдь не гарантирует развитие адекватной реакции клеток-мишеней, поскольку клеточный ответ зависит от состояния и взаимоотношений мессенджерных и трансдукторных систем. Однако, информация в отношении состояния различных звеньев цепочки eNOS-NO-ПкG при ренальной дисфункции после острого нарушения уродинамики фрагментарна и противоречива. Исходя из этого, целью данной работы стало изучение различных звеньев внутриклеточного сигнального пути NO-ПкG с учетом хемосенситивности клеток-мишеней к АнгII при моделировании острого нарушения уродинамики.

### Материал и методы

Работа выполнена на 80 белых крыс линии Вистар массой 220±15 г. В контрольную группу вошли 10 интактных крыс. 70 крысам моделировали острую обструкцию мочеточника под гексеналовым наркозом. После срединной лапаротомии рассекали стенку мочевого пузыря и через устье левого мочеточника в его просвет проводили ангиокатетер. Катетер проводили под кожей, свободный конец выводили на шею и присоединяли к пластиковой пробирке для сбора мочи. Брюшную стенку послойно ушивали. Через 2-е суток после операции катетер закрывали на 48 ч, что воспроизводило острое нарушение пассажа мочи, затем восстанавливали отток мочи из левой почки. Контрольную группу составили 10 интактных крыс. В качестве объекта изучения статуса систем внутриклеточной сигнализации использовали тромбоциты, учитывая их доступность, экспрессию широкого спектра рецепторов на поверхности и

высокую активность eNOS. О состоянии клеточного ответа на АнгII судили по эффективной концентрации агониста, вызывающей агрегацию 50% тромбоцитов ( $EC_{50}$ ). У интактных крыс  $EC_{50}$  Анг-II составила  $0,85 \pm 0,05$  мкМ. Предварительная инкубация тромбоцитов с Лозартаном (селективным блокатором  $AT_1$ -рецепторов, 5 мкМ) полностью отменяла АнгII-индуцированную агрегацию тромбоцитов, что свидетельствует об участии  $AT_1$ -рецептора в индукции сигнальной системы фосфолипазаС-ПК С. О состоянии внутриклеточной системы eNOS-NO-ПкG судили по результатам ингибиторного анализа. Для его выполнения к суспензии тромбоцитов добавляли комбинацию стимуляторов или ингибиторов в следующих концентрациях: Анг-II –  $EC_{50}$ , трифтазин – 2 мкМ, L-аргинин – 200 мкМ; L-NAME – 1 мкМ, нитропруссид натрия (НП) – 10 мкМ. После инкубации при 20° С в течение 8-9 мин, определяли степень изменения агрегации тромбоцитов в каждой пробе. Агрегацию и дезагрегацию тромбоцитов регистрировали путем измерения оптической плотности светового потока, проходящего через суспензию клеток, на спектрофотометре СФ-46 [1].

Оценку структурно-функционального состояния почек проводили на 7 и 30 сутки после восстановления уродинамики. Определяли массу и объем органа. В гистологических препаратах был проведен зональный морфометрический анализ, включающий оценку удельных объемов паренхиматозных и стромальных элементов органа, а также подсчет процента канальцев с дистрофическими и деструктивными изменениями.

#### **Результаты исследования и их обсуждение**

У интактных крыс  $EC_{50}$  Анг-II составила  $0,85 \pm 0,05$  мкМ. Добавление в инкубационную смесь трифтазина (ингибитора  $Ca^{2+}$ -кальмодулина) приводило к повышению Анг-II-индуцированной агрегации тромбоцитов на  $18,3 \pm 0,7\%$  ( $p < 0,05$ ). Стимуляция и ингибирование NOS при добавлении L-аргинина и L-NAME приводила к

сходным по величине, но разнонаправленным эффектам: агрегация тромбоцитов соответственно уменьшалась на  $17,4 \pm 0,5\%$  или возрастала на  $20,3 \pm 0,8\%$  ( $p < 0,05$ ). Введение в инкубационную смесь НП уменьшало Анг-II-индуцированную агрегацию тромбоцитов на  $24,3 \pm 1,17\%$  ( $p < 0,05$ ).

После 48-часовой ООМ, судя по величине  $EC_{50}$  Анг-II (которая повышалась до  $0,95-2,0$  мкМ), у экспериментальных крыс происходило снижение чувствительности  $AT_1$ -рецепторов, что согласуется с литературными данными. Анализ характера распределения чувствительности  $AT_1$ -рецепторов позволил выделить три группы, характеризующиеся различной степенью снижения чувствительности  $AT_1$ -рецепторов. В 1-й группе ( $n=33$ )  $EC_{50}$  была на 11,8% выше ( $p > 0,05$ ), чем у интактных животных, во 2-й ( $n=16$ ) величина показателя превышала таковую у интактных крыс на 52,9% ( $p < 0,01$ ), а в 3-й группе ( $n=21$ ) – на 111,8% ( $p < 0,001$ ).

В 1 группе через 48ч ООМ для исследований *in vitro* использовали 1 мкМ Анг-II ( $EC_{50}$ ). При введении в суспензию тромбоцитов трифтазина выявлено статистически значимое повышение агрегации тромбоцитов на  $25,3 \pm 1,20\%$  ( $p < 0,05$ ). Учитывая стимулирующее влияние  $Ca^{2+}$ -кальмодулина на eNOS, в данном случае логично ожидать повышения активности фермента. Использование стимулятора и ингибитора eNOS подтвердило данное предположение: L-аргинин вызывал меньший, а L-NAME – больший эффекты, чем у интактных крыс (индуцированная агрегация тромбоцитов соответственно уменьшалась на  $9,3 \pm 0,3\%$  или возрастала на  $29,9 \pm 1,32\%$ ;  $p < 0,05$ ), что возможно только в случае более высокой активности eNOS. Закономерным представляется факт возрастания активности ГЦ в ответ на НП (Анг-II-индуцированная агрегация тромбоцитов уменьшалась на  $32,3 \pm 1,38\%$ ;  $p < 0,01$ ). Таким образом, снижение чувствительности  $AT_1$  рецепторов после ООМ у животных 1-й группы сопровождалось повышением активности внутри-

клеточной системы NO-ПКГ. Учитывая реципрокный характер взаимоотношений между сигнальными системами, запускаемыми посредством  $AT_1$  рецепторов и NO, зарегистрированное повышение активности NO-зависимого сигнального пути можно рассматривать как адаптационную реакцию на повышенную активность PAC при ООМ. Объем и масса почек крыс данной группы на 7 сутки после восстановления тока мочи были увеличены за счет отека коркового и мозгового вещества. Морфологически отмечалось неравномерное кровенаполнение сосудов гломерулярной и перитубулярной сетей, отек интерстиция и наличие в нем лейкоцитарных инфильтратов, расширение мочевого пространства собирательных трубок, особенно выраженное в мозговом веществе. Дистрофические и некротические в канальцах нефронов, достигали соответственно 39% и 16% в корковом веществе, 52% и 28% - в мозговом. К 30-м суткам удельный объем поврежденных канальцев снижался до 14% и 5,4% соответственно в корковом, и 18 и 7,4% - мозговом веществе органа. При этом удельный объем канальцев с признаками регенерации повышался до 32,5%.

Во 2-й группе через 48ч ООМ для исследований *in vitro* использовали 1,3 мкМ Анг-II ( $EC_{50}$ ). При введении в суспензию тромбоцитов трифазина выявлено – снижение активности  $Ca^{2+}$ -кальмодулина до  $37,0 \pm 1,51\%$  ( $p < 0,001$ ), что свидетельствует об исходно высоком уровне активности данного звена сигнальной системы. В этих условиях не удивительным представляется и высокая активность eNOS, стимулируемая  $Ca^{2+}$ -кальмодулином. Так, при добавлении в инкубационную смесь L-аргинина обнаружено небольшое (на 5,1%;  $p > 0,05$ ) снижение агрегации тромбоцитов. Иная ситуация возникла при добавлении к тромбоцитам L-NAME – прирост агрегации тромбоцитов достигал  $42,3 \pm 1,8\%$  ( $p < 0,001$ ), подтверждая исходно высокий уровень продукции NO. Избыточная активность сигнальной системы, запускаемой NO, подтверждается также

высокой резервной мощностью ГЦ – при введении нитропруссид натрия агрегация тромбоцитов снижалась на 44,3%. Таким образом, у животных 2-й группы зарегистрирована гипосенситивность  $AT_1$  рецепторов на фоне гиперстимуляции eNOS, сопровождаемой повышением активности сигнального пути NO-ПК Г. Таким образом, у животных 2-й группы можно констатировать наличие повышенной активности сигнальной системы NO-ПК Г. Морфологически в почках животных данной группы к 7 суткам отмечался выраженный отек интерстиция и вазодилатация с явлениями стаза и экстравазации форменных элементов крови. Большая часть канальцев имели признаки гидропической дистрофии и некроза. К 30-м суткам сохранялся высокий процент канальцев с признаками альтерации (59% в корковом веществе и 72% в мозговом) на фоне усиленного кровенаполнения сосудов, отека интерстиция в мозговом веществе, и лейкоцитарной инфильтрации перитубулярной зоны, удельный объем которой составил 3,8% в корковом веществе и 12,6% - в мозговом.

В 3-й группе через 48ч ООМ для исследований *in vitro* использовали наиболее высокую дозу Анг-II (1,8 мкМ), исходя из  $EC_{50}$ . Трифазин вызывал увеличение Анг-II-индуцированной агрегации тромбоцитов на  $9,4 \pm 0,8\%$  ( $p < 0,01$ ). Стимуляция и ингибирование eNOS при добавлении L-аргинина и L-NAME сопровождались разными по амплитуде эффектами (рис. 1в): агрегация тромбоцитов уменьшалась на  $14,5 \pm 0,5\%$  ( $p < 0,01$ ) и возрастала на  $7,2 \pm 0,8\%$  ( $p > 0,05$ ) соответственно. Ситуация, при которой стимулятор увеличивает, а ингибитор не оказывает существенного влияния на резервную мощность eNOS, свидетельствует о низкой фоновой активности фермента. Это может быть обусловлено угнетением активности  $Ca^{2+}$ -кальмодулин, недостатком стимулирующих влияний со стороны простагландинов и  $AT_2$  рецепторов, а также генетически детерминированным снижением экспрессии eNOS. Морфометрический анализ паренхиматозных и стромаль-

ных элементов органа на 7 сутки показал более выраженное нарушение кровоснабжения коркового вещества, по сравнению с 1-й группой, достоверное повышение доли канальцев с признаками дистрофии, некроза и апоптоза (соответственно на 16,9%, 10,2% и 12,4%;  $p < 0,05$ ). К 30 суткам отмечено сохранение высокого процента канальцев с дистрофическими изменениями (49,8%), появление канальцев с атрофией тубулярного эпителия (21,4%), на фоне снижения удельного объема сосудов и фиброгенной трансформации расширенного интерстиция.

### Выводы

Таким образом, нарушение уродинамики обуславливает изменение чувствительности клеток-мишеней к  $AT_1$  рецепторов. При этом снижение чувствительности  $AT_1$  рецепторов ассоциировано с индивидуальными особенностями функционирования антагонистической системы NO-ПК G. У животных 1-й группы (с незначительным снижением чувствительности  $AT_1$  рецепторов) зарегистрировано умеренное повышение активности NO-ПК G, отражающее адаптационную реакцию мишеней на увеличение содержания Анг II. Во 2-й и 3-й группах снижение чувствительности  $AT_1$  рецепторов сопровождалось разнонаправленными изменениями NO-зависимой сигнальной системы: избыточное повышение активности NO-ПК G во 2-й группе, и снижение активности eNOS при сохранении резервных возможностей ГЦ у крыс 3-й группы. При этом повышенная или сниженная активность сигнальной системы NO-ПК G определяет более глубокие нарушения гемодинамики и структурно-функционального состояния почки, создавая предпосылки для развития и хронизации постобструктивной нефропатии.

### Литература

1. Баринов Э.Ф., Романенко В.Н., Бондаренко Н.Н. и др. Использование теста агрегации тромбоцитов *in vitro* для оценки адренореактивности орга-

низма // Лабораторная диагностика. – 1999. – № 4. – С. 39-42.

2. Chevalier R.L. Pathogenesis of renal injury in obstructive uropathy // *Curr. Opin. Pediatr.* – 2006. – V. 18, № 2. – P. 153-160.
3. Chuang Y.H., Chuang W.L., Huang S.P., Huang C.H. Roles of nitric oxide and nitric oxide synthases in tissue damage of obstructed ureters in rats // *Scand. J. Urol. Nephrol.* – 2005. – V. 39, № 3. – P. 187-193.
4. Felsen D., Schulsinger D., Gross S.S., Kim F.Y., Marion D., Vaughan E.D. Renal hemodynamic and ureteral pressure changes in response to ureteral obstruction: the role of nitric oxide // *J. Urol.* – 2003. – V. 169, № 1. – P. 373-376.
5. Hunyady L., Catt J.K. Pleiotropic  $AT_1$  Receptor Signaling Pathways Mediating Physiological and Pathogenic Actions of Angiotensin II // *Mol. Endocr.* – 2005. – V. 20, № 5. – P. 953-970.

### Резюме

#### СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН НИРОК В ЩУРІВ З РІЗНОЮ АКТИВНІСТЮ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОЇ СИСТЕМИ ENOS-NO-ПРОТЕЇНКІНАЗА G ПІСЛЯ ОБСТРУКЦІЇ СЕЧОВОДУ

Баринов Е.Ф., Волошин В.В., Черешнева Є.В.

Метою даної роботи стало вивчення різних ланок внутрішньоклітинного сигнального шляху NO-ПК G з урахуванням хемосенситивності клітин-мишеней до Анг II за умов моделювання гострого порушення уродинаміки. Показано, що розвиток обструктивної нефропатії відбувається на фоні зміни чутливості клітин-мишеней до Анг II. Зниження чувствительності  $AT_1$  рецепторів асоційовано з індивідуальними особливостями функціонування антагоністичної системи NO-ПК G. Занадто висока чи знижена активність сигнальної системи NO-ПК G визначає більш глибокі порушення гемодинаміки і структурно-функціонального стану нирки, створюючи передумови для розвитку і хронізації нефропатії.

### Summary

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STATE OF KIDNEYS IN RATS WITH DIFFERENT ACTIVITY OF INTRACELLULAR SYSTEM ENOS-NO-PROTEIN KINASE G AFTER URETERAL OBSTRUCTION

*Barinov E.F., Voloshin V.V., Chereshneva E.V.*

The aim of this work was to estimate the state of different parts of intracellular signal way NO-PkG according to the chemosensitivity of target cells to AngII under acute block of urodynamics. It was shown that development of obstructive nephropathy is associated with

changes of target cells relation to AngII. The decrease of AT<sub>1</sub>-receptors sensitivity is related with individual peculiarities of antagonistic system NO-PkG state. The abundant or low activity of this system determines the deep alteration of hemodynamic, structural and functional state of kidney, which can be ground for development and chronization of nephropathy.

*Впервые поступила в редакцию 29.09.2007 г.  
Рекомендована к печати на заседании ученого совета НИИ медицины транспорта (протокол № 6 от 19.11.2007 г.).*

612.46.546.174:615.9.612.017

## ВЛИЯНИЕ NO-ГЕНЕРИРУЮЩЕГО СОЕДИНЕНИЯ И ИНГИБИТОРА NO-СИНТАЗЫ НА РЕАЛИЗАЦИЮ МЕХАНИЗМОВ КРАТКОВРЕМЕННОЙ АДАПТАЦИИ К ГИПОКСИИ У КРЫС ЛИНИИ КРУШИНСКОГО-МОЛОДКИНОЙ

*Крушинский А.Л., Реутов В.П., Кузенков В.С., Сорокина Е.Г., Кошелёв В.Б., Фадюкова О.Е., Байдер Л.М., Куроптева З.В., Жумабаева Т.Т., Комисарова Л.Х., Рясина Т.В., Косицын Н.С., Пинелис В.Г.*

*Биологический факультет МГУ, 119992 Москва, Воробьевы Горы  
Институт высшей нервной деятельности РАН, Москва,  
Научный центр здоровья детей РАМН, Москва,  
Факультет фундаментальной медицины МГУ, Москва  
Институт биохимической физики РАН, Москва  
Институт неврологии РАМН, Москва,  
valentinreutov@mtu-net.ru*

### Введение

Физиологически активная молекула – оксид азота (NO), обладает широким спектром действия [10, 22, 33]. NO, являясь одним из мессенджеров, участвует наряду с ионами NO<sub>2</sub><sup>-</sup> в регуляции систем внутри- и межклеточной сигнализации [23, 32]. NO идентичен эндотелиальному фактору релаксации (EDRF) [32], расслабляющему гладкие мышцы сосудов и предотвращающему агрегацию тромбоцитов к эндотелию [33]. Наряду с регуляторными функциями NO обладает цитотоксическими свойствами [9, 24, 25-

28]. С одной стороны, NO способен ингибировать электронно-транспортную цепь митохондрий в нейронах мозжечка [25, 26], а с другой – защищать клетки центральной нервной системы (ЦНС) от повреждений [27, 28]. Кроме того, NO и продукты его превращения способны повреждать белки и ненасыщенные жирные кислоты, входящие в состав мембран клеток и субклеточных структур, в том числе и глутаматные рецепторы [16, 17, 25-28], и повышать выживаемость нейронов мозжечка [28]. Все это приводит к тому, что NO называют “двуликим Яну-