

- reactivity of the organism // J. Physiol. Anthropol. Appl. Human Sci.– 2005.– V. 24, № 4.– P. 497-502.
9. Schrier R.W. Body Water Homeostasis: Clinical Disorders of Urinary Dilution and Concentration // J. Am. Soc. Nephrol.– 2006.– Vol. 17.– P. 1820-1832.
10. Tatsuya N. Role of RAS in the Obstructed Kidney of Rats With Unilateral Ureteral Obstruction // Jpn. J. Pharmacol.– 2002.– V. 90.– P. 361–364.

Резюме

АДАПТАЦІЙНІ РЕАКЦІЇ НИРОК У ЩУРІВ
З РІЗНОЮ АКТИВНІСТЮ ENOS У
РАННІЙ ТЕРМІН ПІСЛЯ ОБСТРУКЦІЇ
СЕЧОВОДУ

Волошин В.В.

Метою даної роботи було дослідження адаптаційних реакцій нирок у тварин з різної чутливістю АТ1-рецепторів і активністю eNOS у ранній термін після усунення обструкції сечоводу (ОС). Після 48-годинної ОС на підставі in vitro тесту експериментальних щурів розподілили на 2 групи: з помірною і вираженою реакцією АТ1-рецепторів і активністю eNOS. Показано, що ранніми наслідками гострого порушення уродинаміки є зниження енергозалежної канальцевої реабсорбції і порушення механізмів осморегуляції. Останнє обумовлено обмеженням адаптаційних можливостей товстої висх-

ідної частини петлі Генле і порушенням кортико-медулярного концентраційного градієнта. Виражене зниження чутливості АТ1-рецепторів і висока продукція NO підвищують імовірність і вираженість порушень парціальних функцій пособструктивної нирки.

Summary

RENAL ADAPTIVE REACTIONS IN RATS
WITH DIFFERENT ACTIVITY OF ENOS IN
EARLY TERMS AFTER URETERAL
OBSTRUCTION

Voloshin V. V.

The aim of this work was to estimate the adaptive renal reactions in rats with different sensitivity of AT1-receptors and activity of eNOS in early terms after reversible ureteral obstruction. After 48-h unilateral ureteral obstruction rats were subdivided into 2 groups according to sensitivity of AT1 receptors and activity of eNOS. It is shown that early results of acute alteration of urine passage are decrease of energy-dependent tubular reabsorption and alteration of osmoregulation mechanisms. These changes were due to limitation of adaptive abilities of Henle's loop and alteration of cortico-medullary concentrating gradient. High decline of AT1-receptors and hyperproduction of NO increase the probability and degree of renal dysfunction development in postobstructive kidney.

УДК УДК 591.462-007.271+591.461.2:599.323.4-003.96+591.149

**РОЛЬ NO В РАЗВИТИИ ТУБУЛО-ИНТЕРСТИЦИАЛЬНЫХ
НАРУШЕНИЙ ПРИ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ НЕФРОПАТИИ У КРЫС**

Баринов Э.Ф., Григорян Х.В., Терещук Б.П.

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

Впервые поступила в редакцию 28.09.2007 г. Рекомендована к печати на заседании ученого совета НИИ медицины транспорта (протокол № 5 от 05.10.2007 г.).

Несмотря на то, что диабетическая нефропатия протекает по типичному сценарию гломерулопатий, ключевым морфологическим критерием прогнозирования течения и исхода заболевания явля-

ется глубина тубуло-интерстициальных нарушений. Одним из механизмов поражения канальцев и стромы почки при нефропатиях различного генеза сахарном диабете является широко обсужда-

емый в литературе феномен протеинурического ремоделирования интерстиция. Но в патогенезе диабетической нефропатии нельзя забывать о синдроме эндотелиальной дисфункции, определяющем степень нарушения функционального состояния сосудистой стенки, провоспалительную активацию эндотелия, нарушение локального кровотока и ишемию канальцев нефронов. Ключевой молекулой, вокруг которой разворачиваются дебаты в сфере трактовки механизмов дисфункции эндотелия при СД, является оксид азота (NO). Данный регулятор не только контролирует состояние и адаптацию сосудистой стенки, ее проницаемость и пролиферацию эндотелиоцитов, но и способен оказывать реноспецифические эффекты, а также определяет потенциал саногенетических процессов в почке при повышении продукции ключевого провоспалительного, вазоконстрикторного и профиброгенного регулятора – ангиотензина II. Исходя из этого, целью данной работы стал анализ механизмов тубуло-интерстициальных нарушений в динамике развития диабетической нефропатии в условиях сниженной продукции NO.

Материал и методы

Работа выполнена на белых крысах самцах массой 220 ± 25 г, содержащихся в режиме свободного доступа к воде и пище. Для оценки мощности eNOS использовали тест *in vitro*: индуцированная ангиотензином II агрегация тромбоцитов в комбинации с ингибитором и стимулятором фермента – L-NAME и L-аргинин соответственно. Для получения тромбоцитов брали кровь из хвостовой вены в пластиковую пробирку, содержащую кислый цитратдекстрозный антикоагулянт в соотношении его крови 1:6. Кровь центрифугировали в течение 15 мин при 200 *g* для получения обогащенной тромбоцитами плазмы. После ее удаления проводили дальнейшее центрифугирование в течение 10 мин при 2000 *g* с целью получения обедненной тромбоцитами плазмы, которую использовали для поддер-

жания стандартного количества клеток на уровне 200 тыс/мкл. Суспензию отмытых тромбоцитов готовили в буферном растворе следующего состава (мкМ): NaCl (138), KCl (3), $MgCl_2$ (1), глюкоза (10), HEPES (10), Na_2PO_4 (0,37), р 7,4. В I-й серии к суспензии тромбоцитов прибавляли 0,1 мл физиологического раствора (контроль). Во II-й серии в пробирки вводили 0,25, 0,5, 1,0, 1,5 и 2 мкМ ангиотензина II (AngII), регистрируя агрегацию тромбоцитов (AT) спектрофотометрическим методом. При этом воспроизводили кривую «доза-ответ» и рассчитывали EC_{50} – эффективную концентрацию, вызывающую агрегацию 50% тромбоцитов. В III серии оценивали активность и резервную мощность eNOS путем введения в пробирки комбинации агониста с ингибитором (L-NAME) или стимулятором (L-аргинин) фермента соответственно. Об активности фермента судили по степени агрегационного и дезагрегационного эффектов, выраженных в процентах. Крыс распределили на три группы: с низкой, нормальной и высокой исходной резервной мощностью эндотелиальной NO-синтазы (eNOS). Для дальнейших экспериментов в рамках данной работы отбирали крыс со сниженной (1 группа, $n=20$) и нормальной (2 группа, $n=20$) резервной мощностью фермента. После 18-часового голодания моделировали сахарный диабет путем введения аллоксана (16 мг/кг) в хвостовую вену животного. Показателем развития инсулярной недостаточности считали повышение уровня глюкозы в крови в пределах 12-24 ммоль/л на 14 сутки эксперимента. Уровень гликемии определяли глюкозооксидантным методом. Критерием вовлечения в патологический процесс почки считали появление протеинурии, выраженность которой оценивали через 14 суток, 1, 2 и 3 месяца, определяя ее степень (слабая, умеренная и выраженная) по показателям суточной экскреции белка с мочой (г/сутки). Для морфологического исследования использовали срезы почки толщиной 5 ± 1 мкм, которые окрашивало гема-

токсилином и эозином, толуидиновым синим, по методу Браше, по ван Гизону. Морфометрический анализ проводили согласно зональной гетерогенности органа. Степень тубуло-интерстициальных нарушений оценивали на основании подсчета удельного объема (УО) интерстиция и перитубулярного капиллярного русла, инфильтратов (с учетом их клеточного состава), профилей канальцев с нормальным строением, альтеративными изменениями, признаками регенерации, атрофией. Полученные данные обрабатывали статистически.

Результаты и обсуждение

Оценка гликемии через 14 суток после введения аллоксана показала, что уровень глюкозы у крыс с низкой мощностью eNOS был на 16,34% ($p < 0,05$) выше, чем во 2 группе, что свидетельствует о роли дефицита NO в патогенезе СД. У 67,9% крыс 1-й группы в этот период регистрировалась слабая протеинурия. Морфологически эти изменения проявлялись ишемическим повреждением структур нефронов преимущественно в 1 зоне почки. На фоне спазма приносящей и выносящей артериол было зарегистрировано: неравномерное кровенаполнение сосудов в корковом веществе, периваскулярный отек и инфильтрация интерстиция, что вело к увеличению его удельного объема. Доля канальцев с дистрофическими и некротическими изменениями эпителия была на 35,6% выше, чем во 2 группе. Причем УО канальцев с альтеративными изменениями обратно коррелировал с диаметром гломерулярных артериол, и прямо - с УО инфильтратов. Известно, что ключевой мишенью ангиотензина II является эфферентная артериола. Очевидно, что ее констрикция, с одной стороны, вызывает повышение фильтрационного давления, гиперфильтрацию, повреждение фильтрационного барьера, определяя степень протеинурии, а с другой - снижение кровотока в перитубулярной сети капилляров индуцирует ишемическое повреждение канальцевого аппарата нефронов. При

этом одной из причин высокой реактивности сосудов может быть не только высокий уровень AngII в крови, но и низкая резервная мощность eNOS у животных 1 группы. Дефицит NO, равно как гипергликемия и ишемия, инициируют повышение активности ЦОГ-2 в клетках плотного пятна и мезангия, что стимулирует локальную продукцию простагландинов, повышая секрецию ренина в юкстагломерулярных клетках.

Через 1 месяц в почках крыс 1 группы сохранялось неравномерное кровенаполнение перитубулярной капиллярной сети в корковом веществе, отмечено расширение сосудов в наружном мозговом веществе, особенно в его внутренней полоске. Увеличение УО интерстиция было обусловлено умеренным отеком и лимфо-гистиоцитарной инфильтрацией периваскулярных зон. При этом процент канальцев с альтеративными изменениями был на 31,8% выше, а с признаками регенерации - на 52,4% ниже, чем у крыс 2 группы. Эти изменения развивались на фоне слабой и умеренной протеинурии.

Через 2 месяца было зарегистрировано снижение УО кортикального сосудистого русла при увеличении УО интерстиция за счет сохранения инфильтратов и пролиферации фибробластов. Эти морфометрические изменения по сути отражают снижение эффективности транспортных процессов в силу снижения площади сосудистой стенки, через которую осуществляется реабсорбция воды, электролитов, глюкозы и аминокислот. и расширения диффузионного расстояния за счет экспансии соединительной ткани, сопровождающейся пролиферацией фибробластов. При этом в эпителии канальцев у животных 1 группы сохранялись дистрофические изменения, десквамация щеточной каемки в проксимальных канальцах нефронов, уменьшение высоты эпителиальных клеток. Эти изменения к концу 3 месяца прогрессировали, завершаясь развитием атрофических изменений в 27,3% канальцев и фиброгенной трансформацией интерстиция.

Эти морфологические изменения сопровождалась умеренной (в 45% случаев) и выраженной (в 55%) протеинурией, причем степень суточной потери белка коррелировала с процентом увеличением УО интерстиция ($r=0,758$), снижением УО кортикальных перитубулярных сосудов ($r=-0,822$) и величиной суммарного УО канальцев с дистрофическими и атрофическими изменениями ($r=0,697$).

Полученные данные не только подтверждают общепринятую концепцию относительно роли оксида азота в патогенезе диабетической нефропатии, но позволяют впервые обратиться к вопросу индивидуализации диагностической, прогностической и терапевтической тактики с целью коррекции эндотелиальной и ренальной дисфункции при сахарном диабете. При обсуждении роли дефицита NO в патогенезе и прогрессирования диабетической нефропатии, важно учитывать его влияние на характер межклеточных коопераций в почке, в частности: тубулярный эпителий - интерстиций (фибробласты, макрофаги в условиях инфильтрации) - эндотелий перитубулярных капилляров. Дефицит NO, имеющий место у крыс 1 группы со сниженной резервной мощностью eNOS, определяет нарушение баланса между патогенетическими и саногенетическими реакциями клеток. Это с одной стороны, ограничивает адаптацию сосудистой стенки к действию патогенетических факторов сахарного диабета, а с другой – имеет реноспецифические эффекты в силу существования реципрокных взаимоотношений между оксидом азота и почечной ренин-ангиотензиновой системой.

Судя по результатам данной работы, ограничение резервной мощности eNOS и продукции NO является одним из факторов, определяющих вероятность и степень ишемического повреждения структур нефронов при СД. Сдвиг баланса в сторону AngII способствует развитию протеинурии и альтерации клеток тубулярного эпителия (вследствие ишемии и токсического действия реабсорбируемых

белков). Результатом этого является продукция хемоаттрактантов (MCP-1 и RANTES), привлекающих из сосудистого русла моноциты-макрофаги. Важным механизмом в прогрессировании тубуло-интерстициальных нарушений является дефицит продукции фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) при недостатке NO, что ограничивает пролиферацию клеток эндотелия, снижает вероятность и степень восстановления сосудистого русла почки. Как выяснено, источником этого фактора роста в почке, помимо подоцитов, являются клетки проксимального канальца и толстой восходящей части петли Генле. Следовательно, степень их повреждения на фоне воспаления и ишемии является одним из факторов, определяющих вероятность нарушения ремоделирования сосудистого русла в динамике репаративного процесса при СД. Выраженность и длительность сохранения лейкоцитарной инфильтрации можно также расценивать как прогностический фактор течения и исхода диабетической нефропатии. Данный феномен не только отражает степень активации и/или повреждения эндотелия в результате гипергликемии, ишемии, но и определяет эффективность репаративного процесса в органе, учитывая широкий спектр биологически активных веществ, продуцируемых макрофагами и лимфоцитами. Так, экспрессируемый макрофагами, тромбоцитами и клетками тубулярного эпителия тромбоспондин-1 известен как ингибитор пролиферации эндотелия и может вызывать апоптоз эндотелиоцитов, одновременно стимулируя фибропластические процессы в интерстиции. Ряд провоспалительных факторов, включая ИЛ-1b, ФНОa, на фоне существующей ишемии и гипергликемии способствуют включению каскада профиброгенных событий, включая пролиферацию фибробластов, которая под действием AngII сменяется усилением синтетической активности клеток, ведущей к склерозированию интерстиция. Можно ожидать, что на этом этапе восстановление продукции

NO обеспечит ограничение фиброза, тогда как прогрессивное снижение доступности NO усугубит ситуацию вследствие стимуляции экспрессии TGF β под влиянием AngII.

Выводы

Полученные данные свидетельствуют о том, что низкая резервная мощность eNOS является патогенетическим фактором, определяющим глубину ишемического повреждения тубуло-интерстиция и воспаления на ранних этапах развития диабетической нефропатии, а также вероятность развития склеротических процессов в интерстиции органа в отдаленные сроки. Оценка индивидуальных особенностей экспрессии и резервной мощности eNOS позволит адекватно оценить степень эндотелиальной дисфункции, разработать программу ее коррекции, что может лечь в основу развития стратегии индивидуализированной ренопротекции при сахарном диабете.

Литература

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. – М.: Медицина.– 1991 г.
2. Шишкин А.Н. Дисфункция эндотелия у пациентов с прогрессирующими заболеваниями почек // Нефрология– 2005.– Т. 9, № 2.– С. 16-23.
3. Ossman S.S. Diabetic Nephropathy: Where We Have Been and Where We Are Going // Diabetes Spectrum.– 2006.– Vol. 19. – P. 153-156
4. Jones L.C., Hingorani M.B. Genetic regulation of endothelial function Heart.– 2005.– Vol. 91, № 10.- P. 1275 - 1277.

Резюме

РОЛЬ NO В РОЗВИТКУ ТУБУЛО-ІНТЕРСТИЦІЙНИХ УШКОДЖЕНЬ ЗА УМОВ ДІАБЕТИЧНОЇ НЕФРОПАТІЇ У ЩУРІВ

Баринов Е.Ф., Григорян Х.В., Терещук Б.П.

З метою аналізу механізмів розвитку тубуло-інтерстиційних порушень за умов діабетичної нефропатії проведено вивчення структурно-функціонального стану нирок у щурів зі зниженою резервною потужністю eNOS при моделюванні алоксанового діабету. Показано, що низка резервнаощность eNOS является патогенетическим фактором, определяющим глубину ишемического повреждения тубуло-интерстиция и воспаления на ранних этапах развития диабетической нефропатии, а также вероятность развития склеротических процессов в интерстиции органа в отдаленные сроки.

Summary

ROLE OF NO IN TUBULO-INTERSTITIAL ALTERATION DIABETIC NEPHROPATHY IN RATS

Barinov E.F., Grigoryan Kh.V., Tereschuk B.P.

To analyze the mechanisms of tubulo-interstitial alteration at diabetic nephropathy we studied the structural-functional state of kidneys in rats with decreased reserve potency of eNOS. It was shown that low activity of eNOS is one of the pathogenic factor which determines the degree of ischemic damage of renal tubules and inflammation in interstitium at early stages of diabetic nephropathy and sclerosis of renal interstitium later.