

**РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА (NO) В МЕХАНИЗМАХ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ
ИНТЕРСТИЦИЯ ПОЧЕЧНОЙ МЕДУЛЛЫ В УСЛОВИЯХ ГИПОТИРЕОЗА
У КРЫС С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ ВАЗОПРЕССИНА В КРОВИ**

© 2022 г. П. Д. Правикова¹, *, Л. Н. Иванова¹

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

*E-mail: PollyPravi@yandex.ru

Поступила в редакцию 29.08.2022 г.

После доработки 07.10.2022 г.

Принята к публикации 11.10.2022 г.

У крыс линии WAG с высоким уровнем вазопрессина и у вазопрессин-дефицит-ной линии крыс Brattleboro в условиях гипотиреоза исследована роль почечного аутокоида оксида азота (NO) в механизмах структурных изменений интерстиция почечной медуллы, влияющих на внеклеточную проницаемость матрикса для воды и ионов. Установлено, что гипотиреоз у крыс WAG не приводит к существенным изменениям параметров гидроуретической функции, тогда как для крыс Brattleboro характерна антидиуретическая реакция вследствие активации реабсорбции осмотически свободной воды. Предполагается, что отсутствие изменений параметров гидроуреза у крыс WAG при гипотиреозе обусловлено увеличением в медулярной зоне почки содержания гиалуронана, основного компонента интерстиция, образующего барьер на пути диффузии воды и ионов. В то же время у крыс Brattleboro стимуляция концентрирующей функции при моделировании гипотиреоза не сопровождается существенными изменениями состояния внеклеточного матрикса, который для данной линии крыс в интактном состоянии характеризуется практически полным отсутствием гиалуронана. Установлено, что NO играет существенную роль в изменении структуры почечного интерстиция у крыс WAG в условиях гипотиреоза. Блокада синтеза NO с помощью L-NAME приводит к устранению выявленных при гипотиреозе изменений внеклеточного матрикса сосочка почки в связи с изменением до базальных значений контрольной группы уровня экспрессии гена гиалуронансинтазы-2 (HAS2), кодирующего фермент синтеза гиалуронана. Результаты исследования позволяют заключить, что гипотиреоз приводит к нарастанию содержания гиалуронана в интерстиции почечной медуллы, причем ключевую роль в проявлении данного эффекта играет NO, базальная активность которого в сосочке почки зависит от уровня вазопрессина в крови.

Ключевые слова: гиалуронан, гипотиреоз, оксид азота, вазопрессин, реабсорбция воды, крысы линии WAG и Brattleboro

DOI: 10.31857/S0869813922110097

Процесс осмотического концентрирования реализуется в зоне почечной медуллы, где барьер, разделяющий элементы концентрирующего механизма, представлен не только эпителием канальцев, но и экстрацеллюлярным матриксом, определяющим внеклеточную проницаемость для диффузии воды и ионов [1]. Одним из главных компонентов почечного интерстиция является кислый гликозаминогликан (ГАГ), гиалуронан (ГН) [2, 3], формирующий в сосочке почки гель с высоким

сопротивлением для диффузии жидкости [4]. Процесс биосинтеза ГН в соматических тканях млекопитающих, в том числе в интерстициальных клетках почки, осуществляется с участием ключевого фермента гиалуронансинтазы (HAS) [5], тогда как основную роль в деградации полимера играет семейство ферментов гиалуронидаз (HYAL1, 2) [6]. Нейрогипофизарный гормон вазопрессин, основной регулятор осмотического гомеостаза, реализует антидиуретический эффект не только путем стимуляции факультативной реабсорбции воды [7], но также посредством контроля проницаемости внеклеточного матрикса, регулируя гиалуронидазную активность [8, 9] и экспрессию генов метаболизма ГН [10]. Установлена тесная зависимость эффективности осмотического концентрирования от взаимодействия системных гормонов и тканевых аутокоидов в регуляции содержания ГН в интерстиции сосочка почки [11, 12]. Однако механизм вовлечения ГН интерстиция почки в процесс осмотического концентрирования остается дискуссионным и требует дальнейших исследований [13].

Тиреоидные гормоны (ТГ), секретируемые щитовидной железой, являются одним из главных факторов в системе регуляции водно-электролитного гомеостаза, влияющих как на почечную гемодинамику [14], так и на реабсорбцию солей и воды [15, 16]. Гипотиреоз сопровождается снижением скорости клубочковой фильтрации [17] и нарушением водовыделительной функции на фоне гиперсекреции ВП [18, 19], однако изменения внеклеточного матрикса почечной медуллы, определяющего скорость диффузии воды и ионов между элементами концентрирующего механизма, при гипотиреозе остается неизученными. Данные о развитии тканевых отеков при гипотиреозе вследствие увеличения содержания муцинов и ГН [20, 21] позволяют предположить, что дисфункция щитовидной железы приводит к изменению содержания ГН в интерстиции почки, образующего барьер на пути диффузии воды и ионов из просвета канальцев в кровотоки.

Адекватность работы любой регуляторной системы зависит от факторов, модулирующих эффект основного гормона, и в последние годы значительное внимание уделяется роли местных, аутокоидных агентов, синтез которых нередко активируется самим гормоном, формирующим отрицательную обратную связь [22]. При хроническом гипотиреозе наблюдается увеличение уровня почечного аутокоида NO в сосочке почки [23], что позволяет предположить участие данного фактора в регуляции состояния внеклеточного матрикса почечной медуллы при подавлении синтеза ТГ. Целью данной работы явилось исследование роли NO в механизмах структурных изменений интерстициального матрикса почечной медуллы в условиях гипотиреоза у крыс с различным уровнем эндогенного вазопрессина в крови.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на крысах инбредной линии WAG (Wistar Albino Glaxo) с высоким уровнем вазопрессина в крови, а также на гомозиготных крысах Brattleboro, лишенных вазопрессина вследствие мутации гена, кодирующего предшественник гормона [24]. В опытах использованы крысы в возрасте 60 дней и массой 150–200 г из вивария конвенциональных животных Института цитологии и генетики СО РАН, содержащиеся в условиях стандартного рациона со свободным доступом к питьевой воде и сухому корму. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ (Приложение к Приказу Министерства здравоохранения РФ № 267 от 19.06.2003), а также с учетом международных рекомендаций по работе с экспериментальными животными.

Животные каждой линии были разделены на 3 экспериментальные группы (по 9 особей в каждой): 1) контрольная группа; 2) крысы в условиях блокады синтеза ти-

реоидных гормонов раствором метимазола; 3) гипотиреоидные крысы с блокадой синтеза NO путем введения L-NAME. Крысы WAG в течение 6 недель потребляли 0.05%-ный раствор метимазола (Тирозол, Merck, Германия), блокирующего пероксидазу, участвующую в йодировании ТГ [25]. Учитывая межлинейные различия в суточном объеме потребляемой жидкости, для уравнивания суточной дозы препарата особи Brattleboro, характеризовавшиеся полидипсией, получали для питья 0.01%-ный раствор метимазола. Контрольные особи двух линий потребляли дистиллированную воду. Принимая во внимание увеличение в условиях гипотиреоза уровня NO во многих тканях [26, 27], в том числе в почке [23], для выявления значимости NO при гипотиреозе была предпринята серия экспериментов, в которых блокада синтеза NO при внутрибрюшинном введении L-NAME – неселективного ингибитора синтаз NO – дважды в день в течение последних 2 сут в дозе 3 мг на 100 г массы тела [28] осуществлялась на фоне подавления синтеза ТГ метимазолом.

По окончании экспериментального периода животных взвешивали и на 2 ч помещали в индивидуальные клетки с проволочным дном для сбора спонтанно экскретуемой мочи, затем животных анестезировали тиопенталом натрия (10 мг/100 г массы тела, внутрибрюшинно) и забирали пробы крови и образцы почечной ткани для гистохимического и молекулярно-генетического анализа.

Осмоляльность мочи и сыворотки крови определяли криоскопическим методом (миллиосмометр ОСКР-1М КИВИ, Россия). Концентрацию креатинина в моче и сыворотке крови определяли методом Яффе на спектрофотометре (BioPhotometer plus, “Erpendorf”, Германия, 490 нм), скорость клубочковой фильтрации рассчитывали по клиренсу эндогенного креатинина. Расчет почечных функций проводили по стандартным формулам на 100 г массы тела. Концентрацию общего уровня тетраiodтиронина (Т4) в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом (Rat thyroxine (T4) ELISA Kit, Cusabio, CSB-E05082г).

Пробоподготовку почечной ткани для гистохимического анализа проводили по стандартному протоколу [29]. Окрашивание срезов толщиной 5 мкм для специфического выявления кислых ГАГ производили альциановым синим (БиоВитрум, Россия). Гистологические препараты изучали с использованием светового микроскопа Axioscop 40 (Carl Zeiss), морфометрическое исследование высоты эпителиоцитов собираемых трубок середины сосочка проводили с помощью программы AxioVision 4.5.

Уровень экспрессии генов, кодирующих ферменты метаболизма гиалуроновой кислоты (HAS2, Hyal2) в почечной медулле, определяли методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). В качестве внутреннего стандарта использовались праймеры для гена, кодирующего белок “домашнего хозяйства” гипоксантинфосфорибозилтрансферазу-1 (*HPRT1*). Выделенные образцы ткани почки помещали в стерильные пробирки, замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C . Тотальную РНК из ткани почек выделяли при помощи набора реагентов Augum Total RNA Mini kit (Bio-Rad, США) на спин-колонках согласно прилагаемому протоколу. Концентрацию РНК в полученном образце измеряли на спектрофотометре Bio-Photometer plus (“Erpendorf”, Германия). Для получения кДНК использовали коммерческий набор “MMLV RT Kit” (“Евроген”, Россия): смешивали 0.5–1 мкг тотальной РНК в 20 мкл реакционной смеси. Реакционная смесь инкубировалась в течение 60 мин при 42°C , для остановки реакции смесь прогревали в течение 10 мин при 70°C . ПЦР-РВ проводили в присутствии красителя Eva Green (Синтол, Россия) объемом 20 мкл, содержащей 2 мкл кДНК, 8 мкл $2.5\times$ реакционной смеси, 8 мкл деионизированной воды, 1 мкл MgCl_2 25 мМ, по 0.5 мкл прямого и обратного праймеров с концентрацией 8 пкмоль/мкл (Биосинтез, Новосибирск, Россия). Амплификацию проводили в системе CFX96 (BioRad, США) по следующей схеме: 1) денатурация 95°C – 5 мин; 2) денатурация 95°C – 10 с, отжиг при оптимальной

Таблица 1. Последовательность ген-специфичных олигонуклеотидных праймеров

Ген	Последовательность праймера	Длина ампликона, п.н.	T_m (°C)	Источник
<i>Has2</i>	F: 5'-СТТССGAGAGTGGCTATACAATGC-3'	198	61	[31]
	R: 5'-GCGAAAGACGACTTGTGATGAGACC-3'		62	
<i>Hyal2</i>	F: 5'-CGTTACGTC AAGGCAGTCAG-3'	188	59	[32]
	R: 5'-AGGTACACGGAGGGAAAGAG-3'		58	
<i>HPRT1</i>	F: 5'-AGTTTGTGTTGGATATGCCCTTG-3'	126	60	[33]
	R: 5'-TG TAGATTCAACTTGCCGCTGTC-3'		61	

температуре для выбранных праймеров (60°C) – 30 с, элонгация 72°C – 20 с, 39 циклов; 3) определение кривых плавления продуктов амплификации в диапазоне температур от 65 до 95°C при шаге в 0.5°C для подтверждения специфичности амплификации и отсутствия димерных праймеров. Ген-специфичные праймеры, синтезированные в группе олигонуклеотидного синтеза Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, представлены в табл. 1. После проведения ПЦР-РВ данные анализировали в пакете программ CFX Manager Software ver. 3.1 (Bio-Rad, США). Каждое измерение нормировали относительно экспрессии гена *HPRT1* и рассчитывали по методу $\Delta\Delta Ct$ [30].

Данные представлены в виде среднего значения \pm ошибка среднего ($M \pm SEM$). Достоверность различий оценивали в программе Statistica 8.0 с помощью апостериорного LSD критерия Фишера для множественных сравнений. Для парного сравнения средних между линиями крыс применялся критерий Стьюдента для независимых выборок. Различия считались статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Параметры осмотического концентрирования у контрольных крыс линий WAG и вазопрессин-дефицитных Brattleboro, содержащихся на стандартном водно-пищевом рационе, существенно различались (табл. 2). У крыс WAG установлена низкая скорость мочеотделения, тогда как интактные вазопрессин-дефицитные особи Brattleboro характеризовались полиурией вследствие снижения реабсорбции осмотически свободной воды (табл. 2) при увеличении скорости клубочковой фильтрации (рис. 1). У крыс обеих линий, содержащихся в течение 6 недель в условиях

Таблица 2. Влияние блокады NO (L-NAME) на параметры гидроуретической функции у крыс линий WAG и Brattleboro в условиях моделирования гипотиреоза

Параметр	Экспериментальные группы					
	WAG			Brattleboro		
	контроль	метимазол	метимазол + L-NAME	контроль	метимазол	метимазол + L-NAME
Диурез (V), мкл/мин	1.66 \pm 0.25	1.25 \pm 0.1	2.04 \pm 0.16	31.23 \pm 1.49***	20.32 \pm 1.41###	12.27 \pm 2.89 [^]
Реабсорбция осмотически свободной воды	9.04 \pm 1.1	7.38 \pm 0.3	5.06 \pm 0.61&&	-13.6 \pm 1.5***	-7.4 \pm 1.1##	-1.9 \pm 1.5 [^]
$T_{H_2O}^C$, мкл/мин						

Все значения представлены как $M \pm SEM$. Различия достоверны при *** $p < 0.001$ – сравнение с контрольной группой крыс линии WAG; && $p < 0.01$ – сравнение с гипотиреотической группой WAG; ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ – сравнение с контрольными показателями линии Brattleboro; [^] $p < 0.05$ – сравнение с гипотиреотической группой крыс линии Brattleboro.

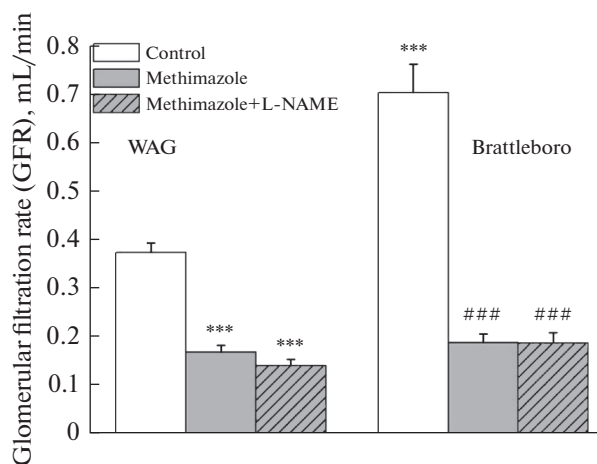


Рис. 1. Скорость клубочковой фильтрации (СКФ) в условиях блокады синтеза NO введением L-NAME на фоне моделирования гипотиреоза у крыс линий WAG и Brattleboro ($M \pm SEM$). Достоверность различий: *** $p < 0.001$ – сравнение с контрольной группой WAG; ### $p < 0.001$ – сравнение с контрольной группой Brattleboro.

подавления метимазолом синтеза ТГ, было выявлено значительное снижение общего уровня тетраодтиронина (Т4) как у крыс WAG (152.6 ± 3.9 нг/мл в контроле; 66.8 ± 13.4 нг/мл при гипотиреозе, $p < 0.001$), так и у крыс Brattleboro (158.5 ± 3.7 нг/мл в контроле; 28.8 ± 8.7 нг/мл при гипотиреозе, $p < 0.001$). Моделирование гипотиреоза вызвало снижение скорости клубочковой фильтрации у крыс обеих линий (рис. 1), тогда как параметры гидроуретической функции почек достоверно изменились лишь у вазопрессин-дефицитной линии Brattleboro (табл. 2). У гипотиреоидных крыс Brattleboro, в отличие от линии WAG, была зафиксирована антидиуретическая реакция: снижение диуреза вследствие увеличения реабсорбции осмотически свободной на фоне замедления скорости клубочковой фильтрации. Вместе с тем устранение действия NO при введении L-NAME на фоне гипотиреоза способствовало у крыс WAG снижению реабсорбции осмотически свободной воды, тогда как у линии Brattleboro, напротив, установлена стимуляция концентрирующей функции почек (табл. 2).

С изменением параметров осмотического концентрирования у экспериментальных крыс коррелируют морфологические перестройки эпителиоцитов собирательных трубок гормон-чувствительной области средней трети сосочка, анализ состояния которых представляет существенный интерес, поскольку высота клеток зависит от осмоляльности интерстициальной и внутриканальцевой жидкости и является отражением изменений уровня осмотического концентрирования. Высота эпителиоцитов собирательных трубок различалась у контрольных групп: у крыс линии WAG эпителий был заметно уплощен (5.51 ± 0.03 мкм) по сравнению с особями линии Brattleboro (5.88 ± 0.04 мкм). У гипотиреоидных крыс WAG при отсутствии изменений параметров гидроуреза высота эпителиоцитов не изменялась (5.51 ± 0.03 мкм в контроле; 5.62 ± 0.04 мкм при гипотиреозе), тогда как блокада синтеза NO на фоне диуретического ответа приводила к увеличению высоты эпителиоцитов собирательных трубок почечной медуллы (6.03 ± 0.06 мкм, $p < 0.001$). Между тем у крыс Brattleboro при гипотиреозе антидиуретическая реакция сопровождалась уплощением эпителиоцитов собирательных трубок (5.88 ± 0.04 мкм в контроле; 4.67 ± 0.04 мкм при

гипотиреозе, $p < 0.001$), которое частично нивелировалось при введении L-NAME (5.44 ± 0.03 мкм, $p < 0.001$).

Барьер на пути движения воды и солей из почечных канальцев в кровоток представлен не только эпителием, но также внеклеточным матриксом, основным компонентом которого является ГН, разделяющий элементы концентрирующей системы и определяющий скорость диффузии воды и солей по осмотическому градиенту [1, 10]. У контрольных крыс WAG, экскретирующих мочу с осмоляльностью выше 2000 мОсм/кг H_2O , выявлена типичная для высокого уровня секреции вазопрессина структура медуллярной зоны почек: уплощенный эпителий собирательных трубок, открытая дренажная сеть множества капилляров и окрашивание кислых ГАГ интерстиция почечной медуллы (рис. 2a). Между тем гомозиготные вазопрессин-дефицитные крысы Brattleboro, экскретирующие гипотоничную мочу, характеризовались практически полным отсутствием ГАГ в интерстиции гормон-чувствительной части средней трети сосочка почки (рис. 2b).

Подавление синтеза тиреоидной системы при потреблении раствора метимазола сопровождалось структурными перестройками интерстиция почечной медуллы только у крыс WAG с высоким уровнем эндогенного вазопрессина в крови. Согласно качественному гистохимическому анализу у гипотиреоидных крыс WAG, несмотря на отсутствие изменений параметров гидроуреза, установлено увеличение интенсивности окрашивания ГН в интерстиции сосочка по сравнению с контролем (рис. 2c). Качественные изменения экстрацеллюлярного матрикса почки у крыс WAG сопровождалось увеличением содержания мРНК *HAS2* гена, кодирующего фермент синтеза ГН (рис. 3a), в то время как уровень экспрессии гена *Hyal2*, ключевого фермента его катаболизма, увеличился незначительно (рис. 3b). Вместе с тем блокада синтеза NO с помощью L-NAME приводила к восстановлению внеклеточного матрикса до базального эутиреоидного состояния у гипотиреоидных крыс WAG (рис. 2e) в связи со снижением уровня экспрессии *HAS2* в сосочке почки до базальных значений контрольной группы с нормальным уровнем секреции ТГ (рис. 3a). Моделирование гипотиреоза у крыс Brattleboro не вызывало существенных изменений состояния интерстиция почечной медуллы (рис. 2d), несмотря на снижение уровня экспрессии *HAS2* в сосочке почки, устранявшееся при блокаде синтеза NO (рис. 3a). Вместе с тем при введении L-NAME крысам Brattleboro на фоне потребления метимазола не установлено качественных изменений интерстициального матрикса сосочка почки по сравнению с гипотиреоидной группой (рис. 2f).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В осморегулирующий процесс вовлекается не только эпителий почечных канальцев и сосудистая система почки, но также интерстициальный матрикс, разделяющий элементы концентрирующего механизма и определяющий внеклеточную проницаемость для воды и ионов [1]. Учитывая ранее полученные данные об увеличении содержания ГН в почечной медулле на фоне диуретического ответа и его снижении при дегидратации [34, 35], в последние годы активно обсуждается вопрос о роли внеклеточного матрикса в регуляции диффузии воды между структурами концентрирующего механизма [12, 36]. ТГ участвуют в регуляции осмотического концентрирования, и нарушение уровня их секреции приводит к существенным перестройкам этого процесса вследствие изменений почечной гемодинамики [14] и экскреции солей и воды [16]. Несмотря на прогресс в понимании молекулярных событий, индуцируемых ТГ в эпителии почечных канальцев [37], выявление новых звеньев в регуляции концентрирующей функции почек представляется актуальным, поскольку дает возможность разработки новых подходов к коррекции тубуло-интерстициальных нарушений в почках при дисфункции щитовидной железы.

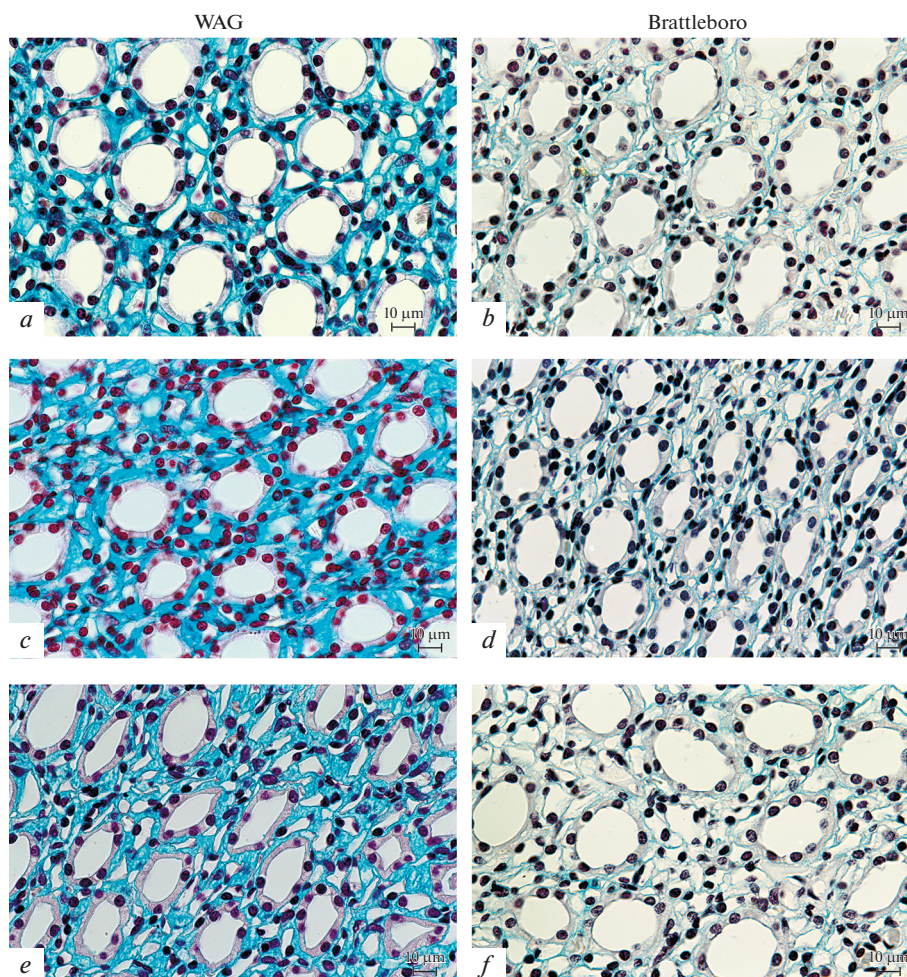


Рис. 2. Локализация гиалуронана (ГН) средней трети сосочка в условиях блокады синтеза NO введением L-NAME на фоне гипотиреоза у крыс линий WAG и Brattleboro.

(a) – WAG контроль (2050 мОсм/кг H₂O); (b) – Brattleboro контроль (197 мОсм/кг H₂O); (c) – гипотиреотидная группа WAG (2130 мОсм/кг H₂O); (d) – гипотиреотидная группа Brattleboro (300 мОсм/кг H₂O); (e) – гипотиреотидные WAG + L-NAME (1083 мОсм/кг H₂O); (f) – гипотиреотидные Brattleboro + L-NAME (458 мОсм/кг H₂O).

Примечание: в скобках дано значение осмоляльности мочи; окрашивание срезов алциановым синим, увеличение объектива ×63. Снимки выполнены с помощью цифровой фотонасадки AxioCam.

При снижении уровня ТГ повышается чувствительность эпителиоцитов собирающих трубок к вазопрессину, что приводит к усилению реабсорбции воды [38] вследствие увеличения экспрессии AQP1-3 в ткани почки [25, 39]. Как известно, при связывании вазопрессина с V₂-рецепторами стимулируется по цАМФ-зависимому каскаду транслокация тканеспецифичного белка AQP2 в апикальную мембрану эпителиоцитов собирающих трубок [40]. Вместе с тем при гипотиреозе усиливается секреция тиреотропного гормона (ТТГ), рецепторы к которому экс-

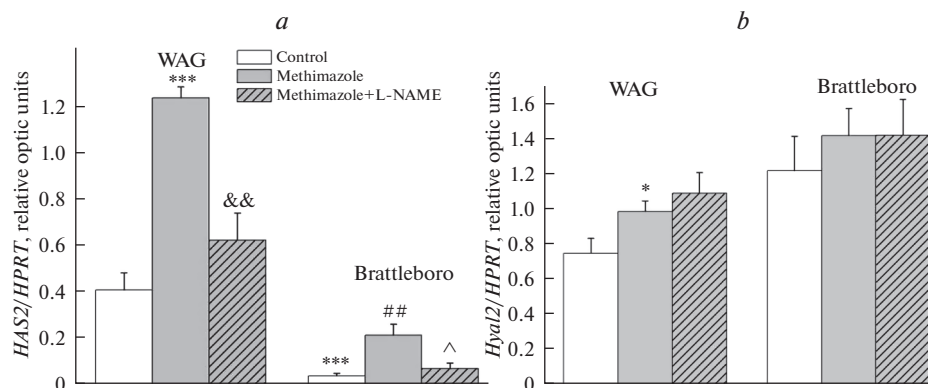


Рис. 3. Влияние блокады синтеза NO (L-NAME) на уровень экспрессии мРНК генов гиалуронансинтазы-2 (*HAS2*) (a), гиалуронидазы-2 (*Hyal2*) (b) в сосочке почки у гипотиреоидных крыс WAG и Brattleboro. Уровень экспрессии мРНК *HAS2*, *Hyal2* приведен относительно гена домашнего хозяйства *HPRT1*. Данные представлены как $M \pm SEM$. Достоверность различий: * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ – сравнение с контрольной группой WAG; && $p < 0.01$ – сравнение с гипотиреоидной группой WAG; ## $p < 0.01$ – сравнение с контрольной группой Brattleboro; ^ $p < 0.05$ – сравнение с гипотиреоидной группой крыс линии Brattleboro.

прессорируются в почечной ткани [41] и сопряжены с G_s -белком, стимулирующим цАМФ-путь [42]. Предполагается, что механизм, стимулирующий транскрипцию AQP2 в почечной ткани при гипотиреозе, обусловлен не только увеличением секреции вазопрессина, но также действием ТТГ. В то же время нами было выявлено, что изменения параметров гидроуреза при моделировании гипотиреоза были существенны лишь у крыс линии Brattleboro, лишенных эндогенного вазопрессина. У гипотиреоидных крыс WAG с высоким уровнем вазопрессина в крови параметры гидроуреза оставались на уровне контрольной группы, тогда как у вазопрессина-дефицитных крыс Brattleboro был установлен антидиуретический ответ вследствие усиления реабсорбции осмотически свободной воды. С изменением гидроуретической функции у гипотиреоидных крыс Brattleboro коррелирует реакция эпителия собирательных трубок гормон-чувствительной зоны сосочка: зафиксировано уплощение эпителиоцитов, обусловленное увеличением гипертоничности внутриканальцевой жидкости [43]. В то же время у крыс WAG в условиях гипотиреоза высота эпителия собирательных трубок не изменялась вследствие отсутствия достоверной реакции диуретической функции и осмоляльности внутриканальцевой жидкости. Следует заметить, что у гипотиреоидных крыс Brattleboro осмотическое концентрирование оставалось на достаточно низком уровне, что, по всей видимости, связано со сниженным базальным уровнем экспрессии AQP2. Известно, что введение крысам Brattleboro агониста V_2R , DDAVP, приводит к увеличению транслокации AQP2 в апикальную мембрану, при этом общее содержание AQP2 в клетке не изменяется [44].

Недостаток гормонов щитовидной железы нередко сопровождается развитием микседемы, которая характеризуется накоплением ГН в межклеточном пространстве [21] и является одной из причин задержки жидкости в организме при гипотиреозе [45, 46]. В почке млекопитающих высокая концентрация ГН характерна для мозговой зоны [47], где в интерстиции почечной медуллы формируется гель, физико-химические свойства которого определяют возможность связывания больших

объемов воды и положительно заряженных ионов [1]. Подавление синтеза ТГ у крыс WAG раствором метимазола приводило к увеличению интенсивности окрашивания ГН интерстиция гормон-чувствительной средней трети сосочка почки. Такая реакция интерстиция у гипотиреоидных крыс WAG может свидетельствовать о количественном росте компонентов внеклеточного матрикса, что подтверждается увеличением в сосочке мРНК *HAS2* вследствие устранения ингибирующего влияния ТГ на экспрессию гена *HAS2*, кодирующего фермент синтеза ГН. В исследованиях *in vitro* на неонатальных фибробластах ранее было найдено, что добавление в среду трийодтиронина (Т3) приводит к подавлению синтеза ГН путем снижения уровня экспрессии *HAS2* [48, 49]. Предполагается, что у крыс WAG в условиях гипотиреоза при нарастании в сосочке почки гистохимически выявляемого ГН формируется барьер на пути диффузии воды из просвета собирательных трубок в почечный кровоток, снижая стимулирующий эффект гипотиреоза на реабсорбцию воды. Одной из наиболее существенных морфологических особенностей почек гомозиготных вазопрессин-дефицитных крыс Brattleboro является снижение плотности ГН в интерстиции почечной медуллы [50], которое, как предполагают, является следствием повышенной гиалуронидазной активности в почечной ткани [10, 51]. Нами было установлено, что подавление синтеза ТГ раствором метимазола не вызывает у крыс Brattleboro качественных изменений состояния интерстиция сосочка почки, несмотря на увеличение мРНК *HAS2*, уровень экспрессии которого, тем не менее, оставался на достаточно низком уровне. Учитывая, что содержание ГН может регулироваться не только на уровне экспрессии генов, а также на посттранскрипционном и посттрансляционном уровне [52], отсутствие качественных изменений внеклеточного матрикса у гипотиреоидных крыс Brattleboro связано, по всей видимости, со сниженной активностью *HAS2*.

При снижении уровня ТГ помимо возникновения синдрома неадекватной секреции вазопрессина, приводящего к гипонатриемии в связи с задержкой воды в организме [19], установлено увеличение уровня NO в сосочке почки [23], который, как известно, является почечным аутокином, модулирующим процесс осмотического концентрирования [53]. Ранее нами было выявлено, что в модуляцию осморегулирующего эффекта вазопрессина оксидом азота вовлекаются структуры интерстиция почки, реструктуризация которых приводит к модуляции концентрирующей функции почек вследствие изменений внеклеточной диффузии [54]. Установлено, что NO играет существенную роль в преобразованиях почечного интерстиция у крыс WAG в условиях гипотиреоза: введение ингибитора синтеза NO (L-NAME) приводит у крыс WAG к восстановлению внеклеточного матрикса почки до контрольного эутиреоидного состояния. Снижение интенсивности окрашивания альциановым синим ГН у гипотиреоидных крыс WAG в условиях введения L-NAME, вероятно, явилось следствием установленного снижения мРНК *HAS2* до значений контрольной группы. Предполагается, что увеличение уровня NO в условиях подавления синтеза ТГ является ключевым фактором, стимулирующим ферментную активность и уровень экспрессии *HAS2*, способствуя увеличению биосинтеза ГН экстрацеллюлярного матрикса почки у крыс WAG.

Поскольку, как известно, синтез NO в почечной медулле стимулируется вазопрессинном [55], представляло интерес сравнить морфофункциональные особенности почек крыс WAG и вазопрессин-дефицитных особей Brattleboro в условиях блокады синтеза NO с помощью введения L-NAME на фоне гипотиреоза. У крыс Brattleboro при гипотиреозе введение L-NAME не приводило к качественным изменениям внеклеточного матрикса сосочка почки, что, по-видимому, явилось следствием сниженного базального уровня активности синтеза NO в сосочке почки у данной линии крыс [56]. Отсутствие существенных качественных изменений интерстиция почки у крыс Brattleboro при введении L-NAME на фоне гипотиреоза

предполагает важность вазопрессин-зависимого механизма в регуляции оксидом азота внеклеточной проницаемости почечной медуллы при подавлении синтеза ТГ.

Таким образом, результаты исследований позволяют заключить, что ключевую роль в нарастании содержания ГН в интерстициальном матриксе почечной медуллы в условиях гипотиреоза играет NO, базальная активность которого в сосочке почки зависит от уровня эндогенного вазопрессина в крови.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 20-04-00298 А), а также за счет средств бюджетного финансирования по государственному заданию № FWNR-2022-0007. Авторы благодарны Центру коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН (<http://www.bionet.nsc.ru/microscopy/>) за предоставленное оборудование.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы (Л.Н.И.), планирование эксперимента (Л.Н.И., П.Д.П.), сбор данных (П.Д.П.), обработка данных (П.Д.П.), написание манускрипта (Л.Н.И., П.Д.П.), редактирование манускрипта (Л.Н.И.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Stridh S, Palm F, Hansell P* (2012) Renal interstitial Hyaluronan: functional aspects during normal and pathological conditions. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 302: R1235–R1249. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00332.2011>
2. *Lee JY, Spicer AP* (2000) Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Curr Opin Cell Biol* 12(5): 581–586. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(00\)00135-6](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00135-6)
3. *Cowman MK* (2017) Hyaluronan and Hyaluronan Fragments. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 74: 1–59. <https://doi.org/10.1016/bs.accb.2017.10.001>
4. *Laurent TC, Laurent UB, Fraser JR* (1996) The structure and function of Hyaluronan: An overview. *Immunol Cell Biol* 74: A1–A7. <https://doi.org/10.1038/icb.1996.32>
5. *Itano N* (2008) Simple Primary Structure, Complex Turnover Regulation and Multiple Roles of Hyaluronan. *J Biochem* 144: 131–137. <https://doi.org/10.1093/jb/mvn046>
6. *Erickson M, Stern R* (2012) Chain gangs: new aspects of hyaluronan metabolism. *Biochem Res Int* 2012: 893947. <https://doi.org/10.1155/2012/893947>
7. *Agre P, King LS, Yasui M, Guggino WB, Ottersen OP, Fujiyoshi Y, Engel A, Nielsen S* (2002) Aquaporin water channels—from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol* 542(1): 3–16. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.020818>
8. *Ivanova LN, Melidi NN* (2001) Effects of vasopressin on hyaluronate hydrolase activities and water permeability in the frog urinary bladder. *Pflugers Arch* 443: 72–77. <https://doi.org/10.1007/s004240100575>
9. *Dzgoev SG* (2015) Selective V₂-Agonist of Vasopressin Desmopressin Stimulates Activity of Serum Hyaluronidase. *Bull Exp Biol Med* 159(4): 424–426. <https://doi.org/10.1007/s10517-015-2981-y>
10. *Ivanova LN, Babina AV, Baturina GS, Katkova LE* (2013) Effect of vasopressin on the expression of genes for the key enzymes of hyaluronan turnover in WAG and Brattleboro rat kidney. *J Exp Physiol* 98(11): 1608–1619. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2013.073163>

11. *Rügheimer L, Johnsson C, Maric C, Hansell P* (2008) Hormonal regulation of renomedullary hyaluronan. *Acta Physiol (Oxf)* 193: 191–198.
<https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2007.01795.x>
12. *Stridh S, Palm F, Takahashi T, Ikegami-Kawai M, Friederich-Persson M, Hansell P* (2017) Hyaluronan Production by Renomedullary Interstitial Cells: Influence of Endothelin, Angiotensin II and Vasopressin. *Int J Mol Sci* 18(12): 2701.
<https://doi.org/10.3390/ijms18122701>
13. *Pinter GG, Shohet JL* (2009) An inner medullary concentrating process activated by renal pelvic/colic muscle contractions: assessment and hypothesis. *J Nephrol Physiol* 113: 1–6.
<https://doi.org/10.1159/000228082>
14. *den Hollander JG, Wulkan RW, Mantel MJ, Berghout A* (2005) Correlation between severity of thyroid dysfunction and renal function. *Clin Endocrinol* 62: 423–427.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2005.02236.x>
15. *Mariani LH, Berns JS* (2012) The renal manifestations of thyroid disease. *J Am Soc Nephrol* 23(1): 22–26.
<https://doi.org/10.1681/ASN.2010070766>
16. *Iglesias P, Bajo MA, Selgas R, Diez JJ* (2009) Thyroid dysfunction and kidney disease. *Eur J Endocrinol* 160: 503–515.
<https://doi.org/10.1007/s11154-016-9395-7>
17. *Vargas F, Moreno JM, Rodriguez-Gomez I, Wangenstein R, Osuna A, Alvarez Guerra M, Garcia-Estan J* (2006) Vascular and renal function in experimental thyroid disorders. *Eur J Endocrinol* 2: 197–212.
<https://doi.org/10.1530/eje.1.02093>
18. *Skowsky WR, Kikuchi TA* (1978) The role of vasopressin in the impaired water excretion of myxedema. *Am J Med* 64(4): 613–621.
[https://doi.org/10.1016/0002-9343\(78\)90581-8](https://doi.org/10.1016/0002-9343(78)90581-8)
19. *Chen YC, Cadnapaphornchai MA, Yang J, Summer SN, Falk S, Li C, Wang W, Schrier RW* (2005) Nonosmotic release of vasopressin and renal aquaporins in impaired urinary dilution in hypothyroidism. *Am J Physiol: Renal Physiol* 289: 672–678.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00384.2004>
20. *Menzinger S, Kaya A, Saurat JH, Kaya G* (2016) Injected Hyaluronidase Reduces the Volume of Exogenous Hyaluronate Fillers in Mice and Results in Clinical Improvement in a Patient with Pretibial Myxedema. *Dermatopathology (Basel)* 3(3): 61–67.
<https://doi.org/10.1159/000446699>
21. *Hoelsly PM, Tolaymat LM, Sluzevich JC, Keeling JH* (2018) Pretibial myxedema successfully treated with intralesional hyaluronidase. *JAAD Case Rep* 4(9): 874–876.
<https://doi.org/10.1016/j.jdcr.2018.08.018>
22. *Leipzig J, Praetorius H* (2020) Renal Autocrine and Paracrine Signaling: A Story of Self-protection. *Physiol Rev* 100(3): 1229–1289.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2019>
23. *Sarati LI, Toblli JE, Martinez CR, Uceda A, Feldman M, Balaszczuk AM, Fellet AL* (2013) Nitric oxide and aqp2 in hypothyroid rats: A link between aging and water homeostasis. *Metabolism* 62: 1287–1295.
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2013.04.013>
24. *Valtin H, Schroeder HA* (1997) Familial hypothalamic diabetes insipidus in rats (Brattleboro rat). 1964 [classical article]. *J Am Soc Nephrol* 8: 1333–1341.
<https://doi.org/10.1681/ASN.V881333>
25. *Schmitt R, Klusmann E, Kahl T, Ellison DH, Bachmann S* (2003) Renal expression of sodium transporters and aquaporin-2 in hypothyroid rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: 1097–1104.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00368.2002>
26. *Rong S, Gao Y, Yang Y, Shao H, Okekunle AP, Lv C, Du Y, Sun H, Jiang Y, Darko GM, Sun D* (2018) Nitric oxide is involved in the hypothyroidism with significant morphology changes in female Wistar rats induced by chronic exposure to high water iodine from potassium iodate. *Chemosphere* 206: 320–329.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.015>
27. *Zhou J, Cheng G, Pang H, Liu Q, Liu Y* (2018) The effect of 131I-induced hypothyroidism on the levels of nitric oxide (NO), interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), total nitric oxide synthase (NOS) activity, and expression of NOS isoforms in rats. *Bosn J Basic Med Sci* 18(4): 305–312.
<https://doi.org/10.17305/bjbms.2018.2350>
28. *Tain YL, Huang LT, Lee CT, Chan JY, Hsu CN* (2015) Maternal citrulline supplementation prevents prenatal NG-nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME)-induced programmed hyperten-

- sion in rats. *Biol Reprod* 92: 1–7.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.121384>
29. *Bancroft JD, Gamble M, Jones ML, Totty BA* (2004) Theory and practice of histological techniques. Connective tissues and stains, 15th edn. Churchill Livingstone Publications 139–200.
 30. *Bookout AL, Cummins CL, Mangelsdorf DJ, Pesola JM, Kramer MF* (2006) High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR. *Curr Protoc Mol Biol* 15: Unit 15.8.
<https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1508s73>
 31. *Ivanova LN, Babina AV, Baturina GS, Katkova LE* (2017) The effect of vasopressin on the expression of genes of key enzymes of the interstitial hyaluronan turnover and concentration ability in WAG rat kidneys. *Russ J Genet Appl Res* 7: 249–257.
<https://doi.org/10.1134/S2079059717030066>
 32. *Rügheimer L, Olerud J, Johnsson C, Takahashi T, Shimizu K, Hansell P* (2009) Hyaluronan synthases and hyaluronidases in the kidney during changes in hydration status. *Matrix Biol* 28: 390–395.
<https://doi.org/10.1016/j.matbio.2009.07.002>
 33. *Kabilova NO, Bondar AA, Ivanova LN* (2009) Expression of type II hyaluronan-synthase gene in kidneys Wistar and Brattleboro rats with diabetes insipidus: effect of vasopressin and its analogues. *Dokl Biochem Biophys* 425: 61–64.
<https://doi.org/10.1134/S160767290902001X>
 34. *Hansell P, Göransson V, Odling C, Gerdin B, Hällgren R* (2000) Hyaluronan content in the kidney in different states of body hydration. *Kidney Int* 58(5): 2061–2068.
<https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2000.00378.x>
 35. *Göransson V, Johnsson C, Nylander O, Hansell P* (2002) Renomedullary and intestinal hyaluronan content during body water excess: a study in rats and gerbils. *J Physiol* 542(Pt 1): 315–322.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2001.014894>
 36. *Colombaro V, Jadot I, Declèves AE, Voisin V, Giordano L, Habsch I, Malaise J, Flamion B, Caron N* (2015) Lack of hyaluronidases exacerbates renal post-ischemic injury, inflammation, and fibrosis. *Kidney Int* 88: 61–71.
<https://doi.org/10.1038/ki.2015.53>
 37. *Iglesias P, Bajo MA, Selgas R, Díez JJ* (2017) Thyroid dysfunction and kidney disease: An update. *Rev Endocr Metab Disord* 18(1): 131–144.
<https://doi.org/10.1007/s11154-016-9395-7>
 38. *Hanna FW, Scanlon MF* (1997) Hyponatraemia, hypothyroidism, and role of arginine-vasopressin. *Lancet* 350(9080): 755–756.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)62563-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)62563-9)
 39. *Yeum CH, Kim SW, Kim NH, Choi KC, Lee J* (2002) Increased expression of aquaporin water channels in hypothyroid rat kidney. *Pharmacol Res* 46: 85–88.
[https://doi.org/10.1016/S1043-6618\(02\)00036-1](https://doi.org/10.1016/S1043-6618(02)00036-1)
 40. *Fenton RA, Murali SK, Moeller HB* (2020) Advances in Aquaporin-2 trafficking mechanisms and their implications for treatment of water balance disorders. *Am J Physiol Cell Physiol* 319(1): C1–C10.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00150.2020>
 41. *Sellitti DF, Akamizu T, Doi SQ, Kim GH, Kariyil JT, Kopchik JJ, Koshiyama H* (2000) Renal expression of two ‘thyroid-specific’ genes: thyrotropin receptor and thyroglobulin. *Exp Nephrol* 8: 235–243.
<https://doi.org/10.1159/000020674>
 42. *Boutin A, Krieger CC, Marcus-Samuels B, Klubo-Gwiedzinska J, Neumann S, Gershengorn MC* (2020) TSH Receptor Homodimerization in Regulation of cAMP Production in Human Thyrocytes *in vitro*. *Front Endocrinol (Lausanne)* 11: 276.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00276>
 43. *Bhave G, Neilson EG* (2011) Body fluid dynamics: back to the future. *J Am Soc Nephrol* 22(12): 2166–2181.
<https://doi.org/10.1681/ASN.2011080865>
 44. *Christensen BM, Zelenina M, Aperia A, Nielsen S* (2000) Localization and regulation of PKA-phosphorylated AQP2 in response to V(2)-receptor agonist/antagonist treatment. *Am J Physiol Renal Physiol* 278(1): F29–F42.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.2000.278.1.F29>
 45. *Smith TJ, Bahn RS, Gorman CA* (1989) Connective tissue, glycosaminoglycans, and diseases of the thyroid. *Endocr Rev* 10(3): 3663–3691.
<https://doi.org/10.1210/edrv-10-3-366>
 46. *Wiederhielm CA, Black LL* (1976) Osmotic interaction of plasma proteins with interstitial macromolecules. *Am J Physiol* 231(2): 638–641.
<https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1976.231.2.638>

47. *Mcauliffe WG* (1980) Histochemistry and ultrastructure of the interstitium of the renal papilla in rats with hereditary diabetes insipidus (Brattleboro strain). *Am J Anat* 157(1): 17–26.
<https://doi.org/10.1002/aja.1001570103>
48. *Pouyani T, Sadaka BH, Papp S, Schaffer L* (2013) Triiodothyronine (T3) inhibits hyaluronate synthesis in a human dermal equivalent by downregulation of HAS2. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 49(3): 178–188.
<https://doi.org/10.1007/s11626-013-9583-7>
49. *Deshpande M, Papp S, Schaffer L, Pouyani T* (2015) Hydrocortisone and triiodothyronine regulate hyaluronate synthesis in a tissue-engineered human dermal equivalent through independent pathways. *J Biosci Bioeng* 119(2): 226–236.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.08.001>
50. *Ivanova LN, Lavrinenko VA, Shestopalova LV, Korotkova SM* (2007) Structural and functional changes in epitheliocytes of collecting tubes in renal papilla of Brattleboro rats treated with vasopressin. *Bull Exp Biol Med* 143(1): 94–98.
<https://doi.org/10.1007/s10517-007-0026-x>
51. *Ivanova LN, Goryunova TE, Nikiforovskaya LF, Tishchenko NI* (1982) Hyaluronate hydrolase activity and glycosaminoglycans in the Brattleboro rat kidney. *Ann NY Acad Sci* 394: 503–508.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1982.tb37462.x>
52. *Tammi RH, Passi AG, Rilla K, Karousou E, Vigetti D, Makkonen K, Tammi MI* (2011) Transcriptional and post-translational regulation of hyaluronan synthesis. *FEBS J* 278: 1419–1428.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08070.x>
53. *Bouley R, Hasler U, Lu HA, Nunes P, Brown D* (2008) Bypassing vasopressin receptor signaling pathways in nephrogenic diabetes insipidus. *Semin Nephrol* 28: 266–278.
<https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2008.03.010>
54. *Pravikova PD, Lavrinenko VA, Ivanova LN* (2019) Effect of NO Synthesis Blockade on the Diuretic Function and Extracellular Matrix of the Kidneys in Rats with Different Blood Vasopressin Levels. *Bull Exp Biol Med* 167(2): 233–236.
<https://doi.org/10.1007/s10517-019-04498-w>
55. *O'Connor PM, Cowley AW Jr* (2007) Vasopressin-induced nitric oxide production in rat inner medullary collecting duct is dependent on V2 receptor activation of the phosphoinositide pathway. *Am J Physiol Renal Physiol* 293(2): F526–F532.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00052.2007>
56. *Martin PY, Bianchi M, Roger F, Niksic L, Féraille E* (2002) Arginine vasopressin modulates expression of neuronal NOS in rat renal medulla. *Am J Physiol Renal Physiol* 283(3): F559–F568.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00309.2001>

Role of Nitric Oxide (NO) in the Mechanisms of Structural Changes in the Renal Medullary Interstitium under Conditions of Hypothyroidism in Rats with Different Blood Vasopressin Levels

P. D. Pravikova^a, * and L. N. Ivanova^a

^a*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

*e-mail: PollyPravi@yandex.ru

The role of nitric oxide (NO), renal autocooid, in the mechanisms of structural changes in the renal medullary interstitium, affecting the extracellular permeability for water and ions, was studied in WAG rats with high blood vasopressin (AVP) level and AVP-deficient Brattleboro rats under conditions of hypothyroidism. No significant changes in the parameters of the renal diuretic function were observed in hypothyroid WAG rats, while in Brattleboro rats an antidiuretic response was established due to activation of solute-free water reabsorption. It is assumed that the absence of changes in the parameters of diuresis in WAG rats with hypothyroidism is due to the increase of the main component of the extracellular matrix content in the renal medulla, hyaluronan (HA), which forms a barrier to the diffusion of water and ions. At the same time, in Brattleboro rats, the stimulation of the concentrating renal function during hypothyroidism modeling is not accompanied by significant structural changes in the extracellular matrix, which in the

intact state is characterized by the almost total absence of HA in this strain. It was found that NO plays a significant role in changing the structure of the renal interstitium in WAG rats under conditions of hypothyroidism. Blockade of NO synthesis with L-NAME leads to the elimination of changes in the extracellular matrix of the renal papilla revealed during hypothyroidism due to a change in the level expression of gene hyaluronan synthase-2 (*HAS2*) encoding the main enzyme catalyzing the synthesis of HA, to the basal values of the control group. The results allow us to conclude that hypothyroidism leads to an increase in the content of HA in the renal medullary interstitium, and the key role in the manifestation of this effect is played by NO, the basal activity of which in the renal papilla depends on the blood AVP level.

Keywords: hyaluronan, hypothyroidism, nitric oxide, vasopressin, water reabsorption, WAG, Brattleboro