

**ВЛИЯНИЕ БЛОКАДЫ СИНТЕЗА ОКСИДА АЗОТА  
НА ДИУРЕТИЧЕСКУЮ И НАТРИЙУРЕТИЧЕСКУЮ ФУНКЦИИ  
ПОЧКИ У КРЫС С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ ЭНДОГЕННОГО  
ВАЗОПРЕССИНА В КРОВИ**

© П. Д. Правикова, Л. Н. Иванова

Федеральный исследовательский центр  
Институт цитологии и генетики СО РАН,  
Новосибирск, Россия  
E-mail: PollyPravi@yandex.ru

Исследовано влияние блокады синтеза оксида азота (NO) на осморегулирующую функцию почек в экспериментах на интактных и гидратированных крысах линии WAG и вазопрессин-дефицитных крысах линии Brattleboro. Установлено, что в условиях блокады синтеза NO направленность изменений почечных функций зависит от уровня вазопрессина в крови и носит противоположный характер. У интактных крыс WAG устранение действия эндогенного NO сопровождалось увеличением диуреза, обусловленного снижением реабсорбции осмотически свободной воды без существенного изменения реабсорбции натрия, в то время как у вазопрессин-дефицитных крыс Brattleboro и гидратированных крыс WAG наблюдалась антидиуретическая и антинатрийуретическая реакции вследствие нарастания реабсорбции осмотически свободной воды и натрия. Обсуждаются возможные механизмы, лежащие в основе различий реакции почек в ответ на блокаду синтеза NO, зависящие от уровня эндогенного вазопрессина и взаимодействия сигнальных систем, реализующих эффекты гормона и NO на транспорт воды и натрия.

*Ключевые слова:* вазопрессин, оксид азота (II), крысы линии Brattleboro и WAG, диурез, натрийурез.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 104. № 1. С. 96—102. 2018

*P. D. Pravikova, L. N. Ivanova.* EFFECT OF NITRIC OXIDE (II) SYNTHESIS INHIBITION ON THE DIURETHIC AND NATRIURETIC KIDNEY FUNCTIONS IN RATS WITH VARIOUS BLOOD VASOPRESSIN LEVELS. Institute of Cytology and Genetics The Siberian Branch of the RAS, Novosibirsk, Russia; e-mail: PollyPravi@yandex.ru.

The effect of nitric oxide (NO) synthesis inhibition on the diuretic and natriuretic functions in intact and hydrated WAG rats and also in vasopressin-deficient Brattleboro rats was studied. It was found in the course of renal function changes in conditions of NO inhibitor treatment is opposite and dependent on the blood vasopressin level. The elimination of the endogenous NO action in intact WAG rats was accompanied by increased diuresis caused by reabsorption of osmotically free water without significant changes of the sodium reabsorption, while in vasopressin-deficient Brattleboro rats and hydrated WAG rats antidiuretic and antinatriuretic reactions due to increase of osmotically free water and sodium reabsorption were observed. The possible mechanisms of the differences in the renal response to the inhibition of NO synthesis dependent on the endogeno-

us vasopressin level and on the interaction of signaling systems, that mediate the effect of hormone and NO on the water and sodium transport, were discussed.

*Key words:* vasopressin, nitric oxide (NO), Brattleboro rats, WAG, diuresis, natriuresis.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 104. N 1. P. 96—102. 2018

В системе осморегуляции у млекопитающих нейрогипофизарный гормон вазопрессин (ВП) является основным фактором, определяющим интенсивность реабсорбции воды в почечных канальцах путем активации транслокации белка водных каналов (аквапорина-2, AQP2) из цитозольных везикул в апикальную мембрану главных клеток эпителия собирательных трубок [1]. Действие вазопрессина модулируется различными тканевыми гормонами, оказывающими эффект паракринным путем. Одним из локальных факторов, выделение которого в почечной ткани стимулируется самим ВП, является оксид азота, NO [11]. В почке экспрессируются все 3 изоформы NO-синтаз (нейрональная, эндотелиальная, индуцибельная) как в эндотелии сосудов клубочка, так и в эпителии канальцев вдоль всего нефрона, включая собирательные трубки [5]. Современные экспериментальные данные о влиянии NO на осморегулирующий процесс противоречивы и зависят от объекта исследования, методических подходов и дозы использованных препаратов [3, 10]. Механизмы вовлечения NO в регуляцию внутриклеточных процессов в почечных канальцах также остаются во многом неясными [12]. Специального внимания заслуживает вопрос об особенностях действия NO на процессы транспорта воды и натрия в почечных канальцах в зависимости от уровня вазопрессина и о механизмах взаимодействия NO с гормоном в регуляции процесса осмотического концентрирования.

В настоящей работе исследованы особенности диуретической и натрийуретической функции почек в условиях устранения действия эндогенного NO селективным ингибитором NO-синтаз — N(омега)-нитро-L-аргинина — L-NNA в экспериментах на ненаркотизированных крысах линии WAG с высоким уровнем вазопрессина в крови, при подавлении секреции эндогенного вазопрессина путем гидратации 5%-ным раствором сахарозы, а также на вазопрессин-дефицитных крысах Brattleboro.

#### МЕТОДИКА

Эксперименты проведены на половозрелых крысах линии WAG (Wistar Albino Glaxo) и гомозиготных вазопрессин-дефицитных крысах линии Brattleboro с наследственным дефектом синтеза нейрогипофизарного гормона вследствие мутации гена вазопрессина. В опытах использованы крысы из ЦКП вивария конвенциональных животных Института цитологии и генетики СО РАН, содержащиеся на стандартном рационе со свободным доступом к питьевой воде.

Все эксперименты были осуществлены в соответствии с Правилами проведения работ с экспериментальными животными (приложение к приказу Министерства здравоохранения № 755 от 12.08.1977) и международными рекомендациями по работе с экспериментальными животными (The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals, Eighth Edition, 2010).

Все животные были подразделены на 6 экспериментальных групп от 5 до 10 особей в каждой группе: интактные (контрольные) крысы линии WAG и Brattleboro, крысы WAG и Brattleboro с введением ингибитора синтеза NO — L-NNA, крысы WAG, содержащиеся на гидратирующем рационе (отсутствие плотного корма, свободный доступ к 5%-ному раствору сахарозы в течение 4 суток) и гидратированные крысы WAG с введением L-NNA. Ингибитор синтеза NO — L-NNA вводился внутривентрально дважды в сутки в течение 2 дней в дозе 5 мг/100 г массы тела. Для определения параметров почечных функций всех животных помещали на 1 ч в индивидуальные клетки с проволочным дном для сбора спонтанно выде-

ляющихся проб мочи. Измеряли диурез, осмоляльность мочи, максимальную реабсорбцию осмотически свободной воды, скорость клубочковой фильтрации по эндогенному креатинину, экскрецию и экскретируемую фракцию натрия. Все параметры рассчитывались по стандартным формулам на 100 г массы тела. В конце эксперимента (через 2 ч после последней инъекции) животных анестезировали тиопенталом натрия (10 мг/100 г массы тела, внутривенно), после декапитации забирали пробы крови и образцы почечной ткани.

Концентрацию креатинина в моче и плазме крови определяли методом Яффе на спектрофотометре (PD 303 VV, Apel, Saitama, Япония, 490 нм). Осмоляльность мочи и плазмы крови измеряли криоскопическим методом (миллиосмометр МТ-2 «Буревестник», Россия). Содержание катионов натрия определяли методом пламенной фотометрии в пробах мочи, плазмы крови, а также в экстрактах из почечной ткани (Flame photometer 410 Sherwood, Великобритания). Предварительно высушенные образцы ткани экстрагировали в течение 7 суток в 1N растворе серной кислоты. Кортико-медулярный градиент натрия рассчитывали как отношение его концентрации в ткани сосочка к концентрации в коре почки.

Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  ошибка среднего ( $M \pm SEM$ ). Проверка значимости фактора генотипа (наличие/отсутствие вазопрессина) и действия препарата (блокада синтеза NO) осуществлялась с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Достоверность различий между значениями экспериментальных групп крыс оценивали с помощью апостериорного критерия Дункана (post-hoc Duncan's test) для множественных сравнений с использованием пакета программ Statistica 8.0. Достоверными считались различия при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Диуретическая и натрийуретическая функции почек у интактных крыс линии WAG и Brattleboro, лишенных эндогенного вазопрессина, существенно различаются (см. таблицу). У крыс линии WAG зарегистрирована олигурия и экскреция гипертоничной мочи, отражающей высокий уровень эндогенного вазопрессина в крови. В то же время вазопрессин-дефицитные крысы Brattleboro характеризовались типичными признаками несахарного диабета (Diabetes insipidus): высокой скоростью диуреза, отрицательными показателями реабсорбции осмотически свободной воды и соответственно низкой осмоляльностью экскретируемой мочи, а также несколько сниженной экскретируемой фракцией натрия.

Блокада синтеза NO при введении L-NNA сопровождалась разнонаправленными изменениями функции почек у крыс двух линий (см. таблицу). У крыс WAG с высоким уровнем вазопрессина в крови блокада синтеза NO отразилась только на показателях диуретической функции, наблюдалось существенное нарастание диуреза со снижением осмоляльности экскретируемой мочи вследствие снижения реабсорбции осмотически свободной воды (см. таблицу). Показатели натрийуретической функции в условиях блокады синтеза NO достоверно не изменялись. Подобный диуретический эффект был отмечен ранее в экспериментах на крысах с инфузией ингибитора синтеза NO в почечную артерию [10]. У вазопрессин-дефицитных крыс Brattleboro при блокаде синтеза NO обнаружено значительное увеличение реабсорбции осмотически свободной воды, снижение диуреза и нарастание осмоляльности отделяемой мочи (см. таблицу). В отличие от крыс WAG, у крыс Brattleboro выявлено значительное снижение скорости экскреции и экскретируемой фракции натрия (см. таблицу), а также достоверный прирост кортико-медулярного градиента натрия (см. рисунок), что свидетельствует об увеличении реабсорбции натрия в почечных канальцах.

Чтобы выяснить значимость вазопрессина в различном проявлении реакций концентрирующей функции почек на блокаду синтеза NO, была проведена серия

Влияние блокады синтеза NO на диуретическую и натрийуретическую функцию почек крыс линий WAG и Brattleboro (M ± SEM)

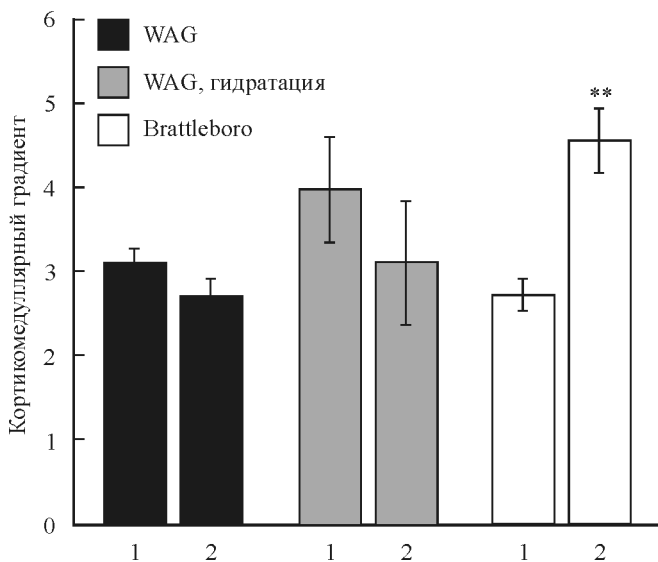
Экспериментальные группы, показатели	Линия крыс		
	WAG		
	Интактные	Введение L-NNA	Режим гидратации
Диурез, мкл/мин	1.01 ± 0.11	7.1 ± 1.38*	5.9 ± 1.3*
Скорость клубочковой фильтрации, мл/мин	0.23 ± 0.02	0.13 ± 0.01*	0.50 ± 0.07***
Реабсорбция осмотически свободной воды, мкл/мин	8.25 ± 0.47	3.28 ± 1.24*	3.3 ± 1.8*
Осмоляльность мочи мОсм/кг H <sub>2</sub> O	2217 ± 135	1056 ± 101**	476 ± 67***
Экскреция Na <sup>+</sup> , мкмоль/мин	0.19 ± 0.01	0.27 ± 0.08	0.31 ± 0.06
Экскретируемая фракция Na <sup>+</sup> , %	1.7 ± 0.2	1.4 ± 0.1	0.7 ± 0.1**

Продолжение таблицы

Экспериментальные группы, показатели	Линия крыс		
	WAG	Brattleboro	
	Режим гидратации + L-NNA	Интактные	Введение L-NNA
Диурез, мкл/мин	3.2 ± 0.3 <sup>^</sup>	13.49 ± 1.78 <sup>###</sup>	6.81 ± 1.17 <sup>&amp;&amp;</sup>
Скорость клубочковой фильтрации, мл/мин	0.24 ± 0.05 <sup>^^</sup>	0.18 ± 0.02	0.21 ± 0.04
Реабсорбция осмотически свободной воды, мкл/мин	9.3 ± 1.6 <sup>^^</sup>	-5.4 ± 2.3 <sup>###</sup>	3.75 ± 1.72 <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>
Осмоляльность мочи мОсм/кг H <sub>2</sub> O	1004 ± 76 <sup>^^</sup>	186 ± 19 <sup>###</sup>	569 ± 111 <sup>&amp;</sup>
Экскреция Na <sup>+</sup> , мкмоль/мин	0.14 ± 0.02 <sup>^</sup>	0.32 ± 0.04	0.13 ± 0.03 <sup>&amp;</sup>
Экскретируемая фракция Na <sup>+</sup> , %	1.3 ± 0.3	0.97 ± 0.08 <sup>#</sup>	0.27 ± 0.08 <sup>&amp;&amp;</sup>

Примечание. Различия достоверны при <sup>###</sup> $p < 0.001$ , <sup>#</sup> $p < 0.05$  (сравнение интактных групп крыс WAG и Brattleboro); \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (сравнение с интактной группой WAG); <sup>^</sup> $p < 0.05$ , <sup>^^</sup> $p < 0.01$ , <sup>^^^</sup> $p < 0.001$  (сравнение группы гидратированных крыс WAG с группой WAG гидратирующего режима на фоне введения L-NNA); <sup>&</sup> $p < 0.05$ , <sup>&&</sup> $p < 0.01$ , <sup>&&&</sup> $p < 0.001$  (сравнение интактной группы Brattleboro с опытной группой Brattleboro на фоне блокады синтеза NO (L-NNA)). Применялся апостериорный критерий Дункана (post-hoc Duncan's test).

экспериментов на крысах WAG, у которых путем гидратации подавлялась секреция эндогенного вазопрессина. Показатели гидроуретической и натрийуретической функции почек у гидратированных крыс WAG приближались к значениям, характерным интактным особям линии Brattleboro (см. таблицу). Введение на этом фоне ингибитора синтеза NO сопровождалось реакцией, направленность которой была аналогична ответу, выявленному у крыс Brattleboro: увеличение реабсорбции осмотически свободной воды, снижение скорости мочеотделения с нарастанием осмоляльности мочи, снижение скорости экскреции натрия, но без существенных изменений экскретируемой фракции (см. таблицу).



Влияние блокады синтеза NO на кортикомедулярный градиент натрия в почке крыс линий WAG и Brattleboro.

1 — контрольная группа; 2 — введение L-NNA. Достоверность различий: \*\*  $p < 0.01$  — сравнение интактной группы Brattleboro с опытной группой Brattleboro на фоне блокады синтеза NO (L-NNA). Применялся апостериорный критерий Дункана (post-hoc Duncan's test).

Скорость клубочковой фильтрации в ответ на блокаду синтеза NO несколько снижалась у крыс WAG, содержащихся как на стандартном рационе, так и в условиях гидратирующего режима (см. таблицу). Изменение этого показателя у крыс WAG, по всей видимости, связано с вазоконстрикторным эффектом при устранении сосудорасширяющего действия NO [3]. Однако эти изменения не явились определяющими в направленности изменений функции осмотического концентрирования и экскреции натрия.

Таким образом, блокада синтеза NO у вазопрессин-дефицитных крыс Brattleboro и гидратированных крыс WAG сопровождалась развитием антидиуретической и антинатрийуретической реакций, что является, очевидно, следствием устранения тонического ингибирующего действия эндогенного NO на транспорт воды и натрия. Такое заключение согласуется с данными о прямом ингибирующем влиянии NO на  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  котранспортер в эпителии изолированных петель Генле [2, 9] и на эпителиальный натриевый канал (ENaC) в главных клетках собирательных трубок [7, 12]. Опубликованные данные о влиянии NO на транспорт воды в почечных канальцах неоднозначны [3]. Однако в последние годы многие авторы приводят доказательства подавления транспорта воды под влиянием доноров NO вследствие снижения вазопрессин-зависимого содержания цАМФ в главных клетках эпителии собирательных трубок [8, 12]. Ингибирующее действие NO на вазотоцин-индуцированный осмотический ток воды было выявлено также на изолированном мочевом пузыре амфибий [6]. При этом найдено, что данный эффект является следствием активации цГМФ-зависимой протеинкиназы, которая взаимодействует с гидроосмотическим эффектом вазотоцина на уровне пост-цАМФ. Результаты нашего исследования показали, что присутствие вазопрессина у крыс нормальной линии приводит к развитию принципиально иной реакции, чем у вазопрессин-дефицитных животных при устранении действия NO путем блокады его синтеза. Подобная реверсия транспорта воды и ионов наблюдалась в экспериментах на изолированных сегментах петель Генле при действии на ка-

нальцы другого паракринного фактора, простагландин  $E_2$ , при добавлении в инкубационную среду вазопрессина [4].

Обсуждение механизмов выявленных различий реакции почек на блокаду синтеза NO требуют дальнейшей экспериментальной аргументации. Тем не менее можно допустить, что противоположный эффект зависит от присутствия вазопрессина и обусловлен особенностями исходной активности сигнальных путей, реализующих эффект вазопрессина и NO, и их взаимодействием. Классический сигнальный путь для вазопрессина в эпителии собирательных трубок, как известно, представлен аденилатциклазной системой [5]. NO реализует эффект через гуанилатциклазную систему, все компоненты которой также экспрессируются в собирательной трубке [3]. Согласно гипотетической схеме взаимодействия цАМФ- и цГМФ-зависимых путей [3], цГМФ-зависимая протеинкиназа оказывает активирующее влияние на протеинкиназу А и соответственно на транслокацию AQP2 в апикальную мембрану главных клеток собирательных трубок. Согласно этой схеме можно предположить, что у крыс с высоким уровнем вазопрессина и стимулированной аденилатциклазной системой блокада синтеза NO приводит к снижению транспорта воды и развитию диуретической реакции вследствие устранения тонического действия NO на протеинкиназу А. Следует заметить, что при этом осмотическое концентрирование остается на достаточно высоком уровне, что обусловлено сохранением высокой активности аденилатциклазной системы, стимулированной вазопрессином. У вазопрессин-дефицитных крыс Brattleboro и гидратированных крыс WAG активность аденилатциклазного сигнального пути и интенсивность транспорта воды резко снижена. Возможно, что устранение ингибирующего влияния эндогенного NO, опосредованное через фосфодиэстеразу-2, на транслокацию AQP2 приводит к активации реабсорбции воды [3].

Динамика выведения натрия почками также вносит несомненный вклад в процесс концентрирования мочи и в осморегулирующий процесс в целом. NO, помимо влияния на факультативную реабсорбцию воды, участвует в регуляции активности многих внутриклеточных транспортеров в эпителии различных сегментов нефрона и собирательной трубки [10]. Согласно современным данным NO, активирующий цГМФ-зависимый сигнальный путь, способен ингибировать  $Na^+-K^+-2Cl^-$  котранспортер в толстом восходящем колене петли Генле [2, 9], а также подавлять активность ENaC в дистальном отделе нефрона и собирательной трубке [7, 12]. В результате NO снижает реабсорбцию натрия вдоль нефрона и собирательной трубки. С этими данными согласуются экспериментальные результаты, полученные на вазопрессин-дефицитной линии. В условиях введения ингибитора синтеза NO лишь для крыс Brattleboro были выявлены достоверные изменения показателей, характеризующих выведение катионов натрия (снижение минутной экскреции натрия, снижение экскретируемой фракции натрия). Все эти данные указывают на увеличение реабсорбции натрия у вазопрессин-дефицитных крыс опытной группы, что подтверждается возросшим кортико-медулярным градиентом натрия. Этот эффект, очевидно, также способствовал нарастанию реабсорбции осмотически свободной воды и активации процесса концентрирования мочи в условиях блокады синтеза NO. У крыс WAG как с высоким уровнем вазопрессина в крови, так и при подавлении содержания гормона в условиях гидратирующего питьевого режима, на фоне блокады синтеза NO не было выявлено изменений экскреции натрия почками. Отсутствие реакции, вероятно, связано с сохранением преимущественного активирующего влияния эндогенного вазопрессина на реабсорбцию натрия через цАМФ-зависимую систему [10].

Таким образом, направленность изменений параметров концентрирующей функции почек крыс при устранении действия эндогенного NO реализуется путем взаимодействия аденилатциклазной и гуанилатциклазной систем, причем базальная активность аденилатциклазной системы, зависящая от уровня вазопрессина в крови, является определяющей.



Работа поддержана бюджетным финансированием по государственному заданию (проект № 0324-2016-0002) и РФФИ (проект № 17-04-01073).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] *Agre P.* Aquaporin water channels in kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11: 764—777. 2000.
- [2] *Ares G. R., Caceres P. S., Ortiz P. A.* Molecular regulation of NKCC2 in the thick ascending limb. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 301:1143—1159. 2011.
- [3] *Bouley R., Hasler U., Lu H. A., Nunes P., Brown D.* Bypassing vasopressin receptor signaling pathways in nephrogenic diabetes insipidus. *Semin. Nephrol.* 28: 266—278. 2008.
- [4] *Culpepper R. M., Andreoli T. E.* Interactions among Prostaglandin E<sub>2</sub>, Antidiuretic Hormone, and Cyclic Adenosine Monophosphate in Modulating Cl<sup>-</sup> Absorption in Single Mouse Medullary Thick Ascending Limbs of Henle. *J. Clin. Invest.* 71: 1588—1601. 1983.
- [5] *Fenton R. A., Knepper M. A.* Mouse models and the urinary concentrating mechanism in the new millennium. *Physiol. Rev.* 87: 1083—1112. 2007.
- [6] *Fock E. M., Lavrova E. A., Bachteeva V. T., Chernigovskaya E. V., Parnova R. G.* Nitric oxide inhibits arginine-vasotocin-induced increase of water osmotic permeability in frog urinary bladder. *Eur. J. Physiol.* 448: 197—203. 2004.
- [7] *Helms M. N., Yu L., Malik B., Kleinhenz D. J., Hart C. M., Eaton D. C.* Role of SGK1 in nitric oxide inhibition of ENaC in Na<sup>+</sup>-transporting epithelia. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 289: 717—726. 2005.
- [8] *Hyndman K. A., Boesen E. I., Elmarakby A. A., Brands M. W., Huang P., Kohan D. E., Pollock D. M., Pollock J. S.* Renal collecting duct NOS1 maintains fluid-electrolyte homeostasis and blood pressure. *Hypertension* 62: 91—98. 2013.
- [9] *Mount D. B.* Thick Ascending Limb of the Loop of Henle. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 9: 1974—1986. 2014.
- [10] *Ortiz P. A., Garvin J. L.* Role of nitric oxide in the regulation of nephron transport. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 282: 777—784. 2002.
- [11] *Park F., Zou A. P., Cowley A. W.* Arginine vasopressin-mediated stimulation of nitric oxide within the rat renal medulla. *Hypertension.* 32: 896—901. 1998.
- [12] *Pearce D., Soundararajan R., Trimpert C., Kashlan O. B., Deen P. M. T., Kohan D. E.* Collecting duct principal cell transport processes and their regulation. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 10: 135—146. 2015.

Поступила 18 V 2017  
После доработки 10 XI 2017