

© В.М.Брюханов, Я.Ф.Зверев, В.В.Лампатов, А.Ю.Жариков, 2009
УДК 616.61-072.7]-092.4

В.М. Брюханов¹, Я.Ф. Зверев¹, В.В. Лампатов¹, А.Ю. Жариков¹

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ ФУНКЦИИ ПОЧЕК В ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА ЖИВОТНЫХ

V. M. Briukhanov, Ya.F. Zverev, V.V. Lampatov, A.Yu. Zharikov

METHODICAL APPROACHES TO THE STUDY OF RENAL FUNCTION IN ANIMAL EXPERIMENTS

¹ Кафедра фармакологии Алтайского государственного медицинского университета, г.Барнаул, Россия

РЕФЕРАТ

Несмотря на активное развитие экспериментальной фармакологии, изучение влияний лекарственных препаратов на функции почек по-прежнему представляет собой весьма непростую задачу. Это связано с уникальной физиологией почки, а также со сложностью и разрозненностью методических приемов. Поэтому мы попытались создать единое методическое пособие, которое, на наш взгляд, могло бы помочь в исследовательской работе. В данной статье рассматриваются методики скрининговых исследований почечных эффектов лекарств, а также методические подходы к более глубокому изучению функций почек – определение активности клубочковой фильтрации, канальцевой секреции и канальцевой реабсорбции; водный диурез; изучение почечной элиминации лекарственных веществ; моделирование почечных заболеваний в эксперименте (оксалатный нефролитиаз, нефрит Масуги).

Ключевые слова: методические приемы, клубочковая фильтрация, канальцевая секреция, канальцевая реабсорбция, водный диурез, нефролитиаз, нефрит Масуги.

ABSTRACT

Despite an active development of experimental pharmacology, studying the influences of medicinal preparations on the renal functions is still rather uneasy problem. It is connected with unique physiology of a kidney, as well as with complexity and uncoordination of methodical technologies. Therefore we have tried to originate the unified methodical aids that, in our opinion, could be of use in the research work. The given article presents methods of screening investigations of drug renal effects, as well as methodical approaches to deeper studying kidneys functions - activity of glomerular filtrations, tubular secretion and tubular reabsorption; water diuresis; study of the renal elimination of medicinal agents; experimental modelling of renal diseases (oxalic nephrolithiasis, Masugi's nephritis).

Keywords: methodical aids, glomerular filtration, tubular secretion, tubular reabsorption, water diuresis, nephrolithiasis, Masugi's nephritis.

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на то, что в последние годы научные знания в нефрологии продвинулись далеко вперед, исследования, объектом которых являются почки, продолжают, затрагивая самые разные области медицины. С этих позиций огромное значение имеет изучение функционального состояния нефрона в экспериментальной фармакологии, уже хотя бы потому, что любой лекарственный препарат в процессе элиминации так или иначе оказывает свое воздействие на почки. Поэтому весьма часто перед исследователями встает необходимость установить характер этого воздействия. Разрешить эту проблему можно, лишь владея адекватной методической базой. И как часто бывает, именно здесь возникают серьезные трудности.

Уникальная физиология почки, сложность методик, разрозненность методических подходов значительно усложняют задачу. Учитывая это, мы попытались создать единое методическое пособие, которое, на наш взгляд, могло бы помочь в исследовательской работе.

В основу данного пособия положен многолетний опыт фундаментальных исследований, проводимых на базе кафедры фармакологии Алтайского государственного медицинского университета, начало которым было положено под руководством проф. Е.Б. Берхина [1]. Многие предлагаемые методики используются нами регулярно. С другими мы сталкиваемся реже, поэтому они будут приведены в авторской интерпретации, ссылаясь на соответствующие литературные данные. В целом же мы предлагаем структурированную схему исследований влияния лекарственных препаратов на поч-

Зверев Я.Ф. 656038, г.Барнаул, пр.Ленина, 40, (3852) 26-08-35;
E-mail: zver@asmu.ru

ки, которая, на наш взгляд, позволит получить наиболее точные практические результаты и в полном объеме обеспечит доклинические исследования новых лекарственных средств.

1. СКРИНИНГОВЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ФУНКЦИЮ ПОЧЕК

1. Постановка эксперимента

Скрининговые исследования функции почек в экспериментальной фармакологии проводятся в тех ситуациях, когда необходимо выявить наличие ранее неизвестных или воспроизвести уже установленные почечные эффекты у того или иного лекарственного препарата.

В качестве объекта исследований могут служить мыши, крысы, кролики и собаки. Для скрининговых экспериментов удобнее всего использовать крыс. Главным материалом для изучения функций почек в скрининговом анализе является моча, поэтому важнейшее значение придается ее правильному сбору у экспериментальных животных. Этот процесс осуществляется следующим образом. Крысы обоих полов в количестве не менее 15–20 (поровну самцы и самки) и массой 180–220 г помещаются в специально оборудованные индивидуальные клетки, предназначенные для сбора мочи (рис. 1). Клетки изготавливаются из алюминия или другого нержавеющей материала. Верхняя часть клетки может иметь форму куба или цилиндра, оптимальные размеры которого составляют 25–30 см в ширину и 20–25 см в высоту для достаточно комфортного размещения животного. Дно этой части представляет собой металлическую сетку с отверстиями шириной не менее 2–3 мм. Внутри клетки монтируется кормушка и поилка. Их устройство может быть различным, однако принципиально важно, чтобы оно миними-

зировало вероятность попадания в собираемый образец частиц пищи и, что особенно важно, воды, так как это может существенно исказить объем собранной мочи, а значит и результат самого эксперимента. Мы используем выдвижную металлическую кормушку, закрепляемую к корпусу клетки специальным держателем. В качестве поилки в наших экспериментах выступает пластиковый стаканчик, прикрепленный вверх дном с внешней стороны клетки. Крышка стаканчика имеет жесткую металлическую трубку, которая отходит под углом 45°, проникая внутрь клетки. Таким образом, животное имеет беспрепятственный доступ к воде, по мере надобности всасывая ее через трубку из стаканчика. При этом вероятность пролива исключается. Нижняя часть клетки должна иметь конусообразную форму, необходимую для стока мочи. К этому конусу прикрепляется отделитель, используемый для того, чтобы в мочу не попадали твердые частицы (кал, шерсть, пища) и не загрязняли опытный образец. Отделитель представляет собой полый стеклянный или пластиковый шарик грушевидной формы. В верхней части отделителя продельвается отверстие, в которое вставляется металлическая проволока, с помощью которой он подвешивается к центру сетки (см. рис. 1). Под отделитель ставится стаканчик для сбора мочи, стекающей по стенкам отделителя. При этом твердые частицы отбрасываются в стороны. Диаметр стаканчика не должен значительно превышать диаметр отделителя во избежание попадания твердых частиц в образец. В ходе эксперимента требуется регулярно мыть клетку. Лучше это делать каждый день, однако допускается мытье через 1–2 дня. Смысл данной процедуры понятен – дно сетки, стенки нижней части клетки и отделитель постоянно загрязняются, а это влечет за собой потерю мочи и искажение результатов эксперимента.

На протяжении эксперимента большое значение придается контролю таких параметров, как объем выпитой животными жидкости и рацион их питания. Количество потребляемой жидкости напрямую определяет величину суточного диуреза, а некоторые пищевые продукты могут изменять метаболические функции, влияя тем самым на экскреторные показатели. Поэтому в качестве корма для крыс рекомендуется использовать пшено с соответствующими минеральными и витаминными добавками.

После того как крысы помещаются в клетку, несколько дней им предоставляется на адаптацию. Как известно, крысы ведут коллективный образ жизни, и помещение в индивидуальную клетку вызывает у них сильную стрессовую реакцию, суще-



Рис. 1. Устройство индивидуальной клетки для сбора мочи и отделителя.

ственно изменяющую функцию организма в целом и почек в частности. Поэтому необходимо определенное время для того, чтобы животное привыкло к новым условиям обитания. Чаще всего период адаптации занимает 5–7 дней. Затем осуществляется серия контрольных определений, позволяющих выявить исходные значения функциональных параметров нефрона у крыс. Когда показатели функции почек стабилизируются, переходят непосредственно к изучению эффектов лекарственного препарата. При этом отбраковываются животные, средний суточный диурез которых составляет менее 2 мл или более 10 мл.

В зависимости от цели эксперимента влияние препарата на функцию почек может изучаться в условиях однократного и длительного введения. Пути введения могут быть самыми различными, однако чаще всего используются подкожные, внутрибрюшинные инъекции и энтеральное введение с помощью желудочного зонда. При энтеральном введении нерастворимых соединений чаще всего используют 2% крахмальную слизь с расчетом, что разовая доза препарата должна содержаться в 1–2 мл слизи.

2. Определение показателей функции почек

При скрининговых исследованиях моча собирается один раз в сутки через 24 ч после введения препарата. Из стаканчика, предназначенного для сбора, моча переливается в мерные пробирки, позволяющие определить объем суточного диуреза, который является первым в ряду важнейших показателей функции почек. Величина мочеотделения сравнивается с контрольными показателями, проводится статистический анализ, и если наблюдается достоверное увеличение диуреза, можно считать, что у препарата выявлен мочегонный эффект. Параллельно в скрининговом анализе проводят определение экскреторной функции почек. Показателями таковой являются экскреция с мочой ионов натрия и калия, а также уровень клубочковой фильтрации, маркером которой служит креатинин.

Экскреция ионов натрия и калия определяется методом пламенной фотометрии. Суть данного метода заключается в измерении оптической плотности пламени, которая изменяется при сгорании этих ионов. Несомненным достоинством метода является способность определять как свободные, так и связанные электролиты. При этом анализ требует использования газовой пропанобутановой смеси, что обуславливает необходимость соблюдения дополнительных мер безопасности (рис. 2).

Для объективности отметим, что некоторыми авторами предлагается использовать иономеры с



Рис. 2. Пламенный анализатор жидкостей ПФА-378.

соответствующими селективными электродами либо хроматографическое ион-селективное определение. Однако эти методы позволяют детектировать лишь несвязанные электролиты, что вносит в анализ достаточно серьезную погрешность.

Не вдаваясь в подробности работы прибора, которые всегда описаны в прилагающихся инструкциях, отметим, что на точность определения в методе пламенной фотометрии существенное влияние оказывает предварительная калибровка и разведение испытуемого образца. Калибровка осуществляется последовательным введением в прибор стандартных растворов соответствующего электролита с заранее известной концентрацией иона, причем именно иона, а не соли, применяемой для растворения. Например, необходимо приготовить стандартный раствор иона натрия в концентрации 100 мг/л, используя хлорид натрия. Несложно рассчитать, что для этого нужно отвесить 254 мг NaCl и растворить их в 1 л воды. Эти расчеты осуществляются по формуле:

$$M_{\text{соли}} = \frac{Mr_{\text{соли}} \times C_{\text{раствора иона}} \times V}{Mr_{\text{иона}}};$$

где $M_{\text{соли}}$ – масса соли, необходимая для приготовления раствора;

$Mr_{\text{соли}}$ – молярная масса используемой соли;

$Mr_{\text{иона}}$ – молярная масса растворяемого иона;

$C_{\text{раствора иона}}$ – концентрация раствора иона в мг/л;

V – объем приготавливаемого раствора.

Молярная масса хлорида натрия составляет 58,5 г/моль. Аналогичный показатель для ионов натрия равняется 23. Требуемая концентрация – 100 мг/л. Объем раствора в данном примере – 1 л. Подставив эти данные в формулу и произведя расчеты, мы получим, что для приготовления раствора иона натрия в концентрации 100 мг/л необходимо взять 254 мг хлорида натрия. Естественно, что данная формула справедлива для любых солей определяемого иона.

Концентрации стандартных растворов могут выбираться произвольно, однако нужно стараться, чтобы регистрируемая концентрация электролита находилась примерно в середине калибровочного интервала. Отметим еще один важный момент – ионы Na^+ и K^+ должны находиться совместно в одном калибровочном растворе, так как они оказывают взаимное влияние на оптические характеристики друг друга. Ну, а если учесть, что в любой биологической жидкости, и в том числе в моче, в достаточном количестве присутствуют оба эти электролита, то несоблюдение данного требования также приведет к искажению результатов эксперимента. Мы в своих опытах используем следующие концентрации стандартных растворов Na^+/K^+ – 200/200 мг/л, 100/100 мг/л, 40/40 мг/л, 20/20 мг/л. Для оптимизации работы сначала мы изготавливаем маточные растворы в большом объеме (обычно в концентрации Na^+/K^+ 1000/1000 мг/л), а затем перед экспериментами разводим их до требуемой концентрации. Необходимо также добавить, что та часть раствора, которая использовалась для калибровки, отбрасывается и ни в коем случае не сливается обратно в общую склянку во избежание изменения концентрации стандартных растворов.

Разведение пробы перед определением может варьироваться в зависимости от экспериментальных условий. При этом наибольшим изменениям подвержено разведение мочи при анализе натрия. В контрольных испытаниях чаще всего мочу крыс приходится разводить в 10 раз. Зачастую при изучении почечных эффектов лекарственного препарата приходится изменять степень разведения на натрий, особенно если этот препарат обладает выраженным салуретическим эффектом (например петлевые или тиазидовые диуретики). В этом случае разбавление может увеличиваться многократно до 100 раз. Но встречаются и противоположные ситуации – разведение уменьшается до 2–3. Это может наблюдаться в том случае, когда препарат увеличивает мочеотделение за счет усиления клубочковой фильтрации, не влияя на реабсорбцию (например растительные мочегонные средства). Разведение мочи при анализе экскреции

калия практически всегда остается постоянным – в 50 раз. Конечно, разведения можно подбирать индивидуально на усмотрение исследователя. Приведенные значения были выведены нами эмпирическим путем в ходе многолетних исследований и, на наш взгляд, являются оптимальными.

Уровень экскреции электролитов с мочой рассчитывается по формуле:

$$E = \frac{D \times P \times A}{Mr};$$

где E – экскреция определяемого иона в ммоль;

D – величина диуреза;

P – разведение;

A – показание прибора;

Mr – молярная масса определяемого иона.

Помимо исследования почечной экскреции электролитов, в скрининговом анализе всегда проводят изучение влияния лекарственного препарата на клубочковую фильтрацию. Как известно, маркером данного процесса является экскреция креатинина. Напомним, что креатинин – это вещество, образующееся в крови в ходе метаболизма азотистых соединений. При этом он в основном фильтруется и мало реабсорбируется в почках, поэтому уровень его экскреции с мочой прямо пропорционален уровню клубочковой фильтрации. Кроме того, давно установлено, что концентрация креатинина в плазме крови крыс не подвергается существенным колебаниям и, как правило, является стабильным показателем, величиной которого можно пренебречь.

Методика определения креатинина основана на реакции образования основания Шиффа, количество которого затем детектируется фотометрическим способом. В колбу на 50 мл отмеривают 0,5 мл мочи, добавляют 3 мл 1,5% раствора пикриновой кислоты и прибавляют 0,3 мл 2,5 N раствора NaOH. Здесь необходимо обратить особое внимание на приготовление раствора пикриновой кислоты. Основная проблема заключается в том, что эта кислота достаточно гидрофобна. Поэтому растворение возможно осуществить только при нагревании. Кроме того, для оптимизации процесса мы используем обработку раствора ультразвуком в специальной ультразвуковой ванне. В результате образуется раствор ярко-желтого цвета. Допускается выпадение кристаллов пикриновой кислоты в осадок, что свидетельствует о перенасыщении раствора.

В ходе описанной реакции креатинин в моче взаимодействует с пикриновой кислотой, образуя основания Шиффа, давая специфическую красно-желтую окраску. После смешивания раствор инкубируют 15 мин при комнатной температуре, за-

тем разбавляют водой до метки в колбе и измеряют оптическую плотность раствора на фотоэлектроколориметре при длине волны $\lambda=490$ нм. Для расчетов используют метод сравнения со стандартным раствором, который готовят аналогичным способом, отмеривая в колбу 0,5 мл раствора с заранее известной концентрацией. Мы используем готовый раствор креатинина фирмы Fluka с концентрацией 17,7 ммоль/л (2 мг/мл). Расчет экскреции креатинина осуществляется по формуле:

$$E_x = \frac{D \times A_x \times 50}{Mr \times A_{ст} \times 0,5};$$

где E_x – экскреция креатинина в ммоль;

D – величина диуреза;

A_x – оптическая плотность исследуемого образца;

$A_{ст}$ – оптическая плотность стандартного образца;

Mr – молярная масса креатинина;

50 – объем колбы;

0,5 – аликвота мочи.

Таким образом, в результате проведенных скрининговых исследований удастся установить, обладает ли лекарственный препарат диуретическим эффектом и каков ориентировочный механизм этого эффекта. Выводы относительно механизма мочегонного действия делаются на основании данных об экскреции креатинина и электролитов. В том случае, если усиление мочеотделения сопровождается увеличением почечной экскреции натрия, можно предположить, что препарат угнетает реабсорбцию этого иона, что инициирует развитие мочегонного действия. Если же повышение уровня диуреза происходит на фоне увеличения выделения креатинина, высока вероятность, что препарат реализует свой эффект за счет усиления клубочковой фильтрации.

В определенных ситуациях возникает необходимость провести более глубокое изучение функции почек. В этих случаях прибегают к помощи ряда специальных методик.

II. УГЛУБЛЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ФУНКЦИИ ПОЧЕК

Углубленные исследования влияния лекарственных препаратов на различные функции почки могут потребоваться в том случае, когда необходимо установить более точные механизмы выявленных у них почечных эффектов. В этом случае в первую очередь изучают воздействие лекарственного средства на основные транспортные процессы в нефроне, а именно – на клубочковую филь-

трацию, канальцевую секрецию и канальцевую реабсорбцию. С этой целью используют ряд специальных методик.

1. Изучение влияния лекарственного препарата на клубочковую фильтрацию, канальцевую секрецию и канальцевую реабсорбцию

1.1. Опыты на собаках

Считается, что наилучшие условия для изучения мочеотделения и определяющих его почечных процессов создаются в опытах на собаках-самках [1]. Существуют различные приемы для сбора мочи у этих животных, однако наиболее удачной является методика, предложенная И.П. Павловым еще в 1883 г., которая впоследствии была детально отработана его учеником И.С. Цитовичем в 1924–1927 гг. [2,3]. Суть данной методики заключается в том, что хирургическим путем производится совместное выведение мочеточников на переднюю брюшную стенку путем подшивания участка мочевого пузыря с находящимися в нем устьями обоих мочеточников к передней брюшной стенке. В результате появляется возможность проследить у таких животных динамику изменений функционального состояния почек в любые промежутки времени в естественных условиях. Обычно такая операция проводится за 2–3 недели до начала опытов.

В эксперимент включают собак массой 15–20 кг, которые находятся на постоянном водно-пищевом рационе. Кормление проводится один раз в сутки за 16–18 ч до начала эксперимента, количество воды для питья не ограничивается. Опыты проводятся не чаще 3 раз в неделю, причем желательнее осуществлять их постановку всегда в одном и том же помещении в утренние часы.

Влияние лекарственных препаратов на секреторную способность почек изучают по скорости секреции специальных маркерных веществ. К таковым могут относиться кардиотраст, верографин, йодамид, парааминогиппуровая кислота и некоторые другие органические соединения, чей транспорт в почках осуществляется преимущественно путем активного переноса из кровеносных сосудов в нефрон клетками проксимальных канальцев. Мы в своих исследованиях установили, что наибольшей секреторной способностью обладает кардиотраст, однако в связи с тем, что в последние годы он практически не выпускается промышленностью, часто приходится использовать другие маркерные вещества – верографин или йодамид. Правда, как оказалось, максимальный канальцевый транспорт этих веществ вдвое ниже, чем у кардиотраста, что является их главным недостатком при изучении секреторной способности почек [4–6].

Принципиально важным условием для изучения канальцевой секреции является создание в крови такой концентрации маркерного вещества, которая была бы достаточной для полного насыщения секреторных транспортных систем. Этому условию удовлетворяет методика внутривенной капельной инфузии секретируемых соединений, которую мы используем в наших опытах. Ее суть заключается в следующем. Собакам, находящимся в павловских станках, внутривенно в течение 5 мин вводят раствор кардиотраста в дозе 75 мг/кг массы тела, а затем начинают поддерживающую внутривенную инфузию 2,5% раствора кардиотраста со скоростью 3,5 мл/мин. Необходимо отметить, что инфузионный раствор обязательно должен содержать хлорид натрия (0,7%) и хлорид калия (0,04%) с целью предотвращения сдвигов ионного равновесия в плазме крови животных. В результате указанных манипуляций в плазме создается относительно стабильная концентрация кардиотраста на уровне 25–40 мг%, которая обеспечивает необходимый уровень насыщения транспортных систем в проксимальных канальцах. Сбор мочи для анализа проводят через 20–30 мин после начала инфузии на протяжении 3–4 клиренс-периодов по 10 мин, в середине которых берут кровь для анализа. После этого вводят (по возможности внутривенно) исследуемые лекарственные препараты, и продолжают опыт, вплоть до восстановления исходного уровня диуреза. Еще раз оговоримся, что приведенная методика подразумевает использование в качестве маркерного вещества кардиотраста, однако вместо него можно вводить верографин или йодамид.

При необходимости изучить активность секреторных систем в условиях длительного ежедневного введения испытуемого препарата опыт ставится каждые 3 дня на протяжении 10 дней.

Скорость клубочковой фильтрации в опытах на собаках определяется при помощи инулина. Давно доказано, что это вещество практически не секретируется и не реабсорбируется, а значит, может служить эффективным маркером процесса фильтрации. Постановка методики аналогична описанной выше (для изучения канальцевой секреции) с той лишь разницей, что начальная доза инулина составляет 25 мг/кг, а концентрация его поддерживающего раствора равна 0,5%. Показатели клубочковой фильтрации и канальцевой секреции, равно как и реабсорбции целесообразно определять в одном эксперименте.

Один из важнейших параметров при изучении почечных эффектов лекарственных средств – это их влияние на реабсорбцию различных веществ,

фильтрующихся в клубочке. В первую очередь к таковым относятся ионы Na^+ , K^+ , а также органические компоненты первичной мочи (глюкоза, ураты и др.). Конечно, данный список может быть расширен согласно задачам, стоящим перед исследователем, мы же раскроем принципы определения лишь основных, так сказать, классических маркеров реабсорбции. Определение неорганических катионов не требует каких-либо специальных манипуляций, достаточно лишь произвести сбор мочи в необходимый период времени и осуществить детекцию этих веществ соответствующими способами.

Изучение реабсорбции глюкозы носит более сложный характер. Как известно, обратное всасывание этого углевода в проксимальных канальцах осуществляется путем активного транспорта соответствующими переносчиками. Мы не будем приводить подробного описания этого процесса, так как он детально рассмотрен в самых разных литературных источниках, и ознакомление с этими данными не представляет труда. Важнее, что для определения максимального транспорта глюкозы ее содержание в плазме должно превышать пороговую величину. Эмпирическим путем установлено, что выраженная и стабильная гликозурия у собак возникает при концентрации глюкозы в плазме крови, начиная примерно с 300 мг%. Постановка эксперимента по определению максимальной реабсорбции глюкозы на собаках не отличается от описанной ранее (для изучения канальцевой секреции). Отметим лишь, что насыщающая доза глюкозы составляет 1 г/кг (вводится в виде 40% раствора), а концентрация поддерживающего раствора – 35%.

1.2. Опыты на крысах

Изучение транспортных процессов в нефроне можно проводить и на крысах. В данном случае активность секреторных систем определяют по уровню почечной экскреции кардиотраста после его однократного инъекционного введения в условиях водного диуреза. Корректность данного метода давно доказана и не вызывает сомнений. В нашей лаборатории постановка эксперимента осуществляется следующим образом. Перед началом опыта животным с помощью зонда в желудок вводят подогретую до 37°C воду в количестве 5% от массы тела. Иными словами, проводят водную нагрузку, цель которой – вызывать достаточно выраженную диуретическую реакцию в короткий промежуток времени. Затем спустя 20 мин внутрибрюшинно инъецируют кардиотраст в дозе 0,5 г/кг в виде 2,5% раствора и помещают крыс в индивидуальные приспособленные для сбора мочи клетки на 1 ч. По истечению этого срока собирают мочу, отбрако-

вывая тех крыс, у которых диурез был менее 2,5 мл. В данном случае опыт признается неудавшимся, так как экскреция кардиотраста оказывается заниженной из-за его частичной задержки в мочевыводящих путях. В собранной моче определяют кардиотраст. За указанный промежуток времени выделяется от 45 до 65% от введенной дозы маркера независимо от величины диуреза.

При изучении длительного влияния лекарственного препарата на канальцевую секрецию опыт ставится каждые 4 дня по описанной методике. Препарат при этом вводится ежедневно.

Скорость клубочковой фильтрации в экспериментах на крысах определяется по уровню выделения с мочой креатинина, методика определения которого описана в первой части.

Об активности реабсорбции в опытах на крысах судят по уровню экскреции с мочой электролитов и мочевой кислоты. Максимальный уровень реабсорбции глюкозы на крысах изучают реже, поскольку это достаточно сложно осуществить технически.

1.3. Определение концентрации маркерных веществ в моче

Концентрацию кардиотраста, верографина и йодамида в моче можно определять химическими и физико-химическими способами. В основе химического определения лежит метод обратного йодометрического титрования. Для осуществления реакции смешивают 2 мл разведенной мочи с 0,3 мл 7% раствора перманганата калия и 0,2 мл 4 М раствора серной кислоты. Избыток перманганата калия удаляется нитритом натрия, который в свою очередь инактивируется 30% раствором мочевины. В качестве титранта используют раствор тиосульфата натрия, индикатор – крахмал. Расчет производится по формуле:

$$C_{\text{мг/мл}} = \frac{0,1058 \times \Pi \times P \times Y \times 100}{V \times M};$$

где Π – показатель титрования;

P – разведение мочи (от 100 до 500 раз);

Y – молекулярная масса маркерного вещества;

V – количество раствора, взятое для титрования (обычно 2 мл);

M – масса атомов йода в молекуле вещества.

Концентрацию кардиотраста, верографина и йодамида в моче можно также определять методом спектрофотометрии. Кардиотраст имеет два максимума поглощения ($\lambda=240$ и 280 нм), а верографин и йодамид – один ($\lambda=240$ нм). Расчет производится с помощью калибровочного графика [4, 5].

Уровень максимальной секреции в опытах на собаках определяется по формуле:

$$T_M = U \times V - P \times F;$$

где T_M – количество секретируемого вещества в мг/мин;

U и P – концентрация вещества в мг/мл в моче и плазме соответственно;

V и F – диурез и фильтрация в мл/мин.

В основе определения концентрации инулина в моче и плазме крови лежит резорциновый метод, который основан на гидролизе инулина до фруктозы, реагирующей с резорцином в кислой среде с образованием красного окрашивания (реакция Селиванова). Приведем суть данной методики. К 2 мл разведенной мочи (или плазмы крови) добавляют 2 мл свежеприготовленного 0,1% раствора резорцина в 96-градусном спирте и 4 мл 30% хлористоводородной кислоты. Пробирки помещают на 30 мин в термостат при температуре 80°C , после чего охлаждают и определяют оптическую плотность раствора на фотоэлектроколориметре при длине волны $\lambda=508$ нм. Для построения калибровочной кривой используют стандартные растворы инулина в диапазоне концентраций от 10 до 100 мг% [1].

Скорость клубочковой фильтрации рассчитывается по формуле:

$$F = \frac{U \times V}{P};$$

где F – фильтрация;

U и P – концентрация инулина в моче и плазме крови соответственно;

V – диурез в мл/мин.

Концентрация глюкозы в крови и моче, как правило, определяется ортотолуидиновым методом (по Зендеру). Он основан на способности глюкозы образовывать с ортотолуидином при нагревании в кислой среде сине-зеленого комплекса, который определяется фотометрически. В пробирки объемом 20 мл вносят 0,5 мл мочи (или плазмы крови), прибавляют 2,5 мл стабилизированного в уксусной кислоте раствора ортотолуидина и помещают на 15 мин в кипящую водяную баню. После охлаждения определяют оптическую плотность раствора при длине волны $\lambda=570$ нм [1]. Величина максимальной реабсорбции глюкозы высчитывается по формуле:

$$T_{M_r} = U_r \times F - U_p \times V;$$

где T_{M_r} – количество реабсорбированной глюкозы в мг/мин;

U_r и P_r – концентрация глюкозы в мг/мл в моче и плазме соответственно;

V и F – диурез и фильтрация в мл/мин.

Ураты в моче определяются по методу Брауна в модификации К.М.Сулло (1974). Метод осно-

ван на получении синей окраски при взаимодействии мочевой кислоты с фосфорно-вольфрамовым реактивом. К 2,5 мл разведенной в 10–50 раз мочи добавляют 1 мл фосфорно-вольфрамового реактива и по 0,75 мл растворов углекислого натрия (для повышения интенсивности окраски) и мочевины (для предотвращения выпадения в осадок вольфрамата натрия) и через 20 мин измеряют оптическую плотность раствора при длине волны $\lambda=570$ нм. Расчет проводят по методу сравнения со стандартными растворами [1].

2. Водный диурез

При изучении влияний лекарственных препаратов на функции почек часто пользуются водной нагрузкой для повышения мочеотделения. Это особенно важно при определении количественных показателей функции почек, когда необходимо осуществить точный сбор мочи за небольшой период времени. Опыты могут ставиться как на собаках, так и на крысах, причем методики в этих случаях разнятся.

2.1. Опыты на собаках

В опытах на собаках водная нагрузка может осуществляться путем естественного питья, с помощью желудочного зонда, а также путем внутривенного введения изотонического раствора. Следует отметить, что на выраженность водного диуреза большое влияние оказывают состав жидкости и способ ее введения, поэтому необходимо остановиться на этих вопросах отдельно.

Доказано, что наибольшее мочеотделение провоцирует чистая водопроводная вода. Выраженность диуретической реакции снижается по мере приближения концентрации хлорида натрия в растворе к изотонической. При этом предпочтение следует отдавать естественному пути введения, т.е. питью, поскольку экспериментально доказано, что остальные пути введения (энтеральный, инъекционный, ректальный) вызывают значительно более слабую диуретическую реакцию.

В целом ход эксперимента выглядит следующим образом. Собаку через 16–18 ч после кормления ставят в станок. Собирают мочу за первый час, а затем каждые 15 мин второго часа для получения фона. За 2 мин до окончания второго часа перед собакой ставят миску с водой и освобождают голову, если ее подвижность была ограничена. Мы даем воду в количестве 30–40 мл на 1 кг массы тела, включая 10% молока. Применение молока очень важно, поскольку оно способствует добровольному питью всего количества. При этом чистую воду собака обычно пьет неохотно и не полностью, что может существенно исказить условия эксперимента. Однако использование более

высоких концентраций молока в питьевой смеси тоже нежелательно, так как это провоцирует развитие пищевых реакций, которые могут мешать проведению опыта. Жидкость для питья должна иметь температуру 25–30°, в жаркое время года можно давать воду комнатной температуры [1].

В описанных условиях водный диурез достигает постоянных величин через 3–4 опыта. Обычно за 3 ч выделяется 75–100% от принятого количества жидкости. Если же таковое не превышает 50%, опыт считается неудавшимся за исключением тех случаев, когда этот результат может быть следствием экспериментальных условий.

2.2. Опыты на крысах

При изучении водного диуреза крысы могут находиться в общей клетке и помещаться в индивидуальную только на время опыта.

Ход эксперимента можно представить в следующем виде. В течение 2–3 ч животное выдерживается без воды и пищи, после чего осуществляется водная нагрузка. С этой целью через зонд в желудок вводится вода комнатной температуры в количестве 5% от массы тела крысы. Диурез регистрируется ежечасно на протяжении 3–4 ч. В первых опытах мочеотделение может быть незначительным, поскольку процедура введения воды оказывает на него угнетающее влияние. Эти результаты не учитываются. После нескольких введений животное привыкает, и диурез стабилизируется. За 3 ч из организма крыс выделяется 75–100% от введенного количества жидкости. Те крысы, у которых данный показатель не превышает 50%, из опыта исключаются [1].

3. Изучение почечной элиминации лекарственных препаратов

В ходе исследований фармакологических эффектов лекарственных препаратов зачастую появляется необходимость изучить особенности их фармакокинетики, одним из главных показателей которой является выраженность почечной элиминации вещества. Существует довольно большое количество различных подходов к детекции лекарственного средства в моче. Мы в своих экспериментах применяем метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [7]. По общепринятому мнению, данный метод является наиболее современным и точным в определении концентрации лекарственных веществ в биологических жидкостях.

Отметим основные технические приемы в постановке опытов. Сбор мочи осуществляется как это описано в главе 1. Обычно для хроматографического определения хватает 1–2 мл мочи. Данная аликвота обязательно фильтруется с целью пре-

дотвращения загрязнения фильтров в приборе. Мы в своей лаборатории используем жидкостный хроматограф «Милихром-А02» отечественного производства с УФ детектором. Для фильтрования мочи мы применяем шприцевые фильтры с диаметром пор 0,22 мкм.

После того как моча профильтрована, ее вводят в хроматографическую систему и регистрируют качественные и количественные характеристики. Качественные характеристики позволяют идентифицировать искомое вещество на хроматограмме. К ним относятся время удерживания ($t_{уд}$) и объем удерживания ($V_{уд}$). Количественные характеристики способствуют вычислению концентрации вещества в исследуемом образце. Таковыми являются высота и площадь пика, соответствующего определяемому веществу. Для получения информации об этих характеристиках и для расчетов используют стандартный образец вещества с заранее известной концентрацией.

Необходимо отметить, что условия хроматографирования каждого отдельно взятого лекарственного препарата будут различаться, поскольку на них оказывает влияние большое количество различных факторов: гидрофильность или липофильность вещества, размер его молекулы, наличие в структуре хромофорных группировок и т.д. В связи с этим разработка методик базируется на индивидуальном подходе, что требует дополнительных материальных и временных затрат. И тем не менее, метод ВЭЖХ остается самым точным в определении концентрации лекарственных веществ в биологических жидкостях и поэтому рекомендован фармакопейным комитетом Минздрава РФ [8].

III. МОДЕЛИРОВАНИЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПОЧЕК

Довольно часто углубленные исследования почечных эффектов лекарственных препаратов требуют установления их фармакотерапевтической активности в отношении различных заболеваний мочевыделительной системы. Для достижения этой цели необходимо осуществить моделирование изучаемой патологии. Мы предлагаем экспериментальные модели наиболее важных с точки зрения доклинических исследований заболеваний почки, которые часто используются в нашей лаборатории.

1. Моделирование мочекаменной болезни

Среди многочисленных заболеваний мочевыделительной системы мочекаменная болезнь встречается часто. Основная форма данного заболевания – это оксалатный нефролитиаз. В том случае, когда необходимо изучить антилитогенное

действие лекарственного препарата, проводят моделирование экспериментального нефролитиаза.

Методических приемов, позволяющих вызвать камнеобразование в эксперименте, довольно много. Мы не будем приводить описание их всех, поскольку они уже изложены в опубликованном нами литературном обзоре, посвященном проблеме моделирования оксалатного нефролитиаза [9]. Подробно остановимся лишь на той модели, которую используем в своих экспериментах [10].

Крысы помещаются в индивидуальные клетки, приспособленные для сбора мочи. На протяжении трех недель в качестве питья им предоставляется 1% раствор этиленгликоля. Каждые 5–7 дней проводят сбор мочи и измерение уровня экскреции с мочой ионов кальция, фосфата и оксалата. Определение концентрации в моче ионов кальция осуществляют методом пламенной фотометрии. Детекция фосфат-ионов основана на реакции образования фосфорно-молибден-ванадиевого комплекса. Для осуществления этой реакции в колбу на 25 мл отмеривают 0,5 мл мочи, а затем прибавляют 2,5 мл 5% раствора молибдата аммония, 2,5 мл 6 Н азотной кислоты и 2,5 мл 0,25% раствора ванадата аммония. Приготовление последнего имеет некоторые особенности. В колбу на 1 л отвешивают 2,5 г ванадата аммония, который растворяют в 500 мл горячей воды, после чего добавляют 20 мл концентрированной азотной кислоты и разбавляют водой до конечного объема. В результате реакции происходит образования комплекса, который имеет специфическую желтую окраску. Тотчас же раствор доводят водой до метки в колбе и инкубируют 30 мин при комнатной температуре. Интенсивность возникающего окрашивания, которая прямо пропорциональна концентрации фосфат-ионов в моче, регистрируют на фотоэлектроколориметре при длине волны $\lambda=460$ нм. Расчет экскреции электролита проводят по методу сравнения со стандартным раствором. Уровень экскреции с мочой ионов оксалата измеряют при помощи метода ВЭЖХ, общие принципы которого описаны выше.

Одновременно в моче производят измерение ферментативной активности. В качестве показателей таковой обычно выбирают три фермента: лактатдегидрогеназа (ЛДГ), γ -глутамилтрансфераза (ГГТ), N-ацетил- β -D-глюкозаминидаза (НАГ), которые являются типичными маркерами повреждения эпителия почечных канальцев. Активность ЛДГ определяется методом спектрофотометрии при длине волны $\lambda=340$ нм. В основе метода лежит реакция восстановления пирувата до молочной кислоты. Эта реакция катализируется ЛДГ, а

ее скорость пропорциональна активности фермента. Каталитическая активность ГГТ, для измерения которой используется колориметрический метод, рассчитывается пропорционально количеству п-нитроанилина, образующегося в результате реакции взаимодействия L-γ-глутамил-3-карбокси-4-нитроанилида и глицилглицина. Детектирование п-нитроанилина осуществляется на фотоэлектроколориметре при длине волны $\lambda=400$ нм. Определение НАГ проводится по модифицированной методике Maruch [11]. Согласно этой методике активность НАГ пропорциональна количеству п-нитрофенола, образующегося в результате реакции гидролиза п-нитро-N-ацетил-β-глокозамида, которую катализирует указанный фермент. Измерение количества п-нитрофенола производится спектрофотометрически при длине волны $\lambda=400$ нм. Активность всех определяемых ферментов рассчитывается относительно концентрации креатинина в моче, выражающейся в мг/л и обозначаемой в единицах, как U/мг креатинина.

По истечении трех недель эксперимента часть крыс декапитируют путем дислокации шейного позвонка под эфирным наркозом и изымают у них почки для морфологического исследования, которое проводится при помощи метода светооптической микроскопии. После изъятия почки фиксируются в 10% растворе формалина. Затем для оценки изменений структурного состояния коркового и мозгового вещества почек делается срез ткани толщиной 4–6 мкм, который окрашивается гематоксилином и эозином. Идентификация кальциевых депозитов (в том числе и кристаллов оксалата кальция) проводится на срезах толщиной 10–15 мкм гистохимическим методом Ван Косса. В результате при увеличении $\times 100$ и $\times 400$ удастся выявить наличие соединений ионов Ca^{2+} , которые окрашены в черный цвет. При этом в данных условиях ядра клеток имеют красный цвет, а остальные тканевые структуры – розовый.

Лечебный эффект лекарственного препарата в отношении оксалатного нефролитиаза изучается на протяжении последующих трех недель его ежедневного введения. При этом крысы продолжают получать в качестве питья этиленгликоль. Если же перед исследователем стоит задача изучить профилактическое действие, то препарат вводится уже с первого дня эксперимента, общая длительность которого ограничивается тремя неделями. И в том, и в другом случае все контрольные показатели определяются аналогичным образом, как описано выше. Достоверное их отличие в сравнении с контрольными показателями может свидетельствовать о наличии у препарата антилитогенного эффекта.

2. Экспериментальный гломерулонефрит (нефрит Масуги)

Как известно, гломерулонефрит – это заболевание, характеризующееся аутоиммунным повреждением гломерулы. В результате возникают структурные и функциональные нарушения фильтрационного барьера в клубочке, что приводит к выделению с мочой и потере важнейших компонентов крови – белка, форменных элементов, электролитов и т.д. Проблема лечения этого заболевания и по сей день далека от разрешения, поэтому поиск по-настоящему эффективных лекарственных средств, способных ослабить течение патологического процесса, не прекращается. Естественно, что данный поиск может увенчаться успехом лишь при наличии адекватной экспериментальной модели гломерулонефрита, отражающей все его особенности, свойственные человеческому организму. На сегодняшний день этим требованиям в наибольшей степени удовлетворяет так называемый цитотоксический экспериментальный нефрит (нефрит Масуги).

Эта модель была разработана еще в 1934 г. японским ученым М. Masugi, именем которого она и была названа [12, 13]. Он показал, что гломерулонефрит может быть вызван в эксперименте введением животному цитотоксической (нефротоксической) сыворотки, содержащей гетерологичные антитела к антигенам базальной мембраны капилляров клубочков. При этом указанная модель в максимальной степени соответствует патогенезу гломерулонефрита у человека, что очень важно в процессе изучения эффектов лекарственных препаратов.

Методику моделирования нефрита Масуги можно разделить на 3 этапа [13]. На первом этапе получают антиген. Для этого крыс, используемых в эксперименте, под легким эфирным наркозом декапитируют путем дислокации шейного позвонка и забирают у них почки. Почки освобождают от капсулы, отделяют мозговое вещество, которое отбрасывается. Очищенное корковое вещество протирают через сито, регулярно смывая его физиологическим раствором в предварительно поставленную под сито фарфоровую чашку. Полученную в результате указанных манипуляций взвесь растертого коркового вещества вначале объединяют в одну емкость, а затем разливают по центрифужным пробиркам и центрифугируют в течение 3 мин при 2000 об/мин. Супернатант отбрасывают, оставшееся содержимое пробирок объединяют в одну емкость, прибавляют 15 мл физиологического раствора, встряхивают и вновь центрифугируют 3 мин при 2000 об/мин. Описан-

ную процедуру повторяют еще раз, центрифугируя 10 мин при 2000 об/мин. Надосадочную жидкость отбрасывают, и к осадку, объединенному в одну емкость, приливают 15 мл физиологического раствора, после чего емкость встряхивают. В результате получают антиген, активность которого определяется как масса 1 мл суспензии после высушивания.

На втором этапе проводят иммунизацию животных. Кроликам массой около 3 кг вводят 25 мг антигена, взятого в мл, который предварительно смешивается с 1 мл адьюванта Фрейнда. Адьювант готовится путем смешивания 4,5 мл вазелинового масла с 0,5 г ланолина и 5 мг вакцины БЦЖ. Антиген вводят дробно внутримышечно в несколько мест тела кролика. Через 4 нед на протяжении 3 дней животным внутрибрюшинно вводятся 100 мг антигена в 5 мл физиологического раствора. Затем по истечении 25 дней у кролика под наркозом из сонной артерии забирается кровь, которая центрифугируется 10 мин при 3000 об/мин. Плазма крови забирается, а осадок отбрасывается. Затем плазма инактивируется в термостате в течение 30 мин при температуре 56° С. Инактивированная плазма является нефротоксической сывороткой, которая содержит гетерологические антигены к почечной ткани крыс, выработавшиеся в организме кролика на введение антигена. Нефротоксическая сыворотка разливается в пенициллиновые флаконы, плотно упаковывается и хранится в замороженном виде.

Третий этап эксперимента – введение полученной сыворотки крысам. Сыворотка вводится в дозе 0,8 мл на 100 г массы животного в течение двух дней, в первый день внутрибрюшинно, а во второй – подкожно. После этого крыс помещают в индивидуальные клетки и регулярно проводят исследование функции почек, определяя показатели протеинурии, экскреции с мочой электролитов (Na^+ и K^+), а также активность маркерных ферментов повреждения нефроцитов – лактатдегидрогеназы, γ -глутамилтрансферазы, N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы.

Методики детекции электролитов и ферментов описаны выше, здесь же приведем наиболее доступный на наш взгляд способ определения содержания белка в моче.

К 1 мл разведенной мочи прибавляют 2,25 мл 3% раствора сульфосалициловой кислоты. В ре-

зультате данной реакции белок осаждается, и изменяется оптическая плотность раствора, которая регистрируется методом фотоэлектроколориметрии при длине волны $\lambda=590$ нм. Расчеты осуществляют с помощью калибровочной кривой.

После того, как показатели протеинурии, экскреции электролитов и активности ферментов достигают своего максимума, начинают вводить лекарственный препарат, об эффективности которого судят по достоверному снижению указанных выше параметров. В случае изучения возможного профилактического эффекта введение препарата начинают перед применением нефротоксической сыворотки. Общая продолжительность эксперимента составляет примерно 30 дней.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Берхин ЕБ, Иванов ЮИ. Методы экспериментального исследования почек и водно-солевого обмена. «Омская правда», Омск. 1972; 199
2. Павлов ИП. К методике собирания мочи. *Еженедельная клиническая газета* 1883; 30: 479-480
3. Цитович ИС. Хронические фистулы мочеточников как метод изучения физиологии, патологии и фармакологии почек. В: III съезд физиологов. Л. 1927; 95-96
4. Ульянов ГП, Лампатов ВВ. Почечный транспорт кардиотраста, верографина и йодамида. *Фармакология и токсикология* 1990; 53 (1): 62-64
5. Сергеев ПВ, Свиридов НК, Шимановский НЛ. Рентгеноконтрастные средства. Медицина, М. 1980; 240
6. Брюханов ВМ. Способ определения канальцевой секреции почек по верографину у крыс в хронических опытах. *Фармакология и токсикология* 1987; 50 (5): 73-74
7. Брюханов ВМ, Зверев ЯФ, Лампатов ВВ, Жариков АЮ. Особенности фармакодинамики и фармакокинетики фуроамида у крыс в условиях длительного введения. *Экспериментальная и клиническая фармакология* 2007; 70 (2): 33-36
8. Государственная фармакопея российской федерации. «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», 2008; 704
9. Жариков АЮ, Брюханов ВМ, Зверев ЯФ, Лампатов ВВ. Современные методы моделирования оксалатного нефролитиаза. *Нефрология* 2008; 12 (4): 33-36
10. Брюханов ВМ, Зверев ЯФ, Лампатов ВВ и др. Функция почек в условиях экспериментального оксалатного нефролитиаза. *Нефрология* 2008; 12 (1): 69-74
11. Maruch D. Rapid colorimetric assay of β -galactosidase and N-acetyl- β -glucosaminidase in human urine. *Clin Chim Acta* 1976; 73: 453-446
12. Marketos SG, Koutras DA. Experimental nephritis: one of the earliest publications on the subject by a pioneer of Neohippocratism. *Am J Nephrol* 1999; 19 (2): 333-335
13. Masugi M. The model of immune nephritis. *Beitr Path Anat* 1934; 12: 429

Поступила в редакцию 09.06.2009 г.

Принята в печать 13.07.2009 г.