

© В.А.Козлов, О.С.Глазырина, А.Ю.Толмачева, 2003
УДК [616-018-056.52+616.61]:546.212:599.323.4

B.A. Козлов, О.С. Глазырина, А.Ю. Толмачева

ВОДНАЯ ДЕПРИВАЦИЯ ВЛИЯЕТ НА ЭКСТРАНЕЙРОНАЛЬНЫЙ МЕДИАТОРНЫЙ ПУЛ ПОЧЕК БЕЛЫХ КРЫС И ПОЧЕЧНУЮ ПОПУЛЯЦИЮ ТУЧНЫХ КЛЕТОК

V.A. Kozlov, O.S. Glazyrina, A.Yu. Tolmacheva

WATER DEPRIVATION INFLUENCES THE EXTRANEURONAL MEDIATOR POOL OF WHITE RAT KIDNEYS AND RENAL POPULATION OF MAST CELLS

Кафедра фармакологии Чувашского государственного университета им. И.Н. Ульянова, г. Чебоксары, Чувашия, Россия

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ РАБОТЫ. Выяснение роли почечных экстранейрональных медиаторов в реализации ответа почки на водное лишение. В 1-й серии эксперимента на десяти белых беспородных крысах: четыре – контроль, три – суточная водная депривация (ВД), три – двухсуточная ВД при свободном доступе к сухому корму, исследован биоаминный статус почки. **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** В первые сутки ВД уменьшала интенсивность флуоресценции катехоламинов (КА), серотонина (С) (Falk) и гистамина (Г) (Cross) во всех отделах нефрона в 2-3 раза ($p < 0,01$). На вторые сутки ВД наблюдалась тенденция к восстановлению исходного уровня КА и С, однако флюоресценция оставалась достоверно ниже контроля, флюоресценция Г восстанавливалась полностью. Флюоресценция ацетилхолина (АЦХ) в первые сутки ВД (В.А. Козлов и соавт., патент № 2159433, приоритет 27 октября 1999) возрастала в 7-8 раз в клубочках и петлях Генле и в 2-3 раза в канальцах ($p < 0,001$). Во всех отделах нефрона наблюдалась сильная отрицательная корреляция (Пирсон) между АЦХ и др. исследуемыми медиаторами ($p < 0,01$) и сильная и средняя положительная корреляция между другими медиаторами. Во 2-й серии, построенной по той же схеме, исследовано влияние ВД на почечную популяцию тучных клеток (ТК). С первых суток ВД увеличивала число ТК в 2 раза в суб capsularной зоне почек, которое оставалось высоким. В медуллярной зоне число ТК увеличивалось в 8 раз во вторые сутки. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Экстранейрональный пул почечных КА, С, Г, АЦХ и ТК принимает участие в регуляции почечного статуса при водной депривации.

Ключевые слова: почечные амины, ацетилхолин, водная депривация, мастоциты.

ABSTRACT

THE AIM of the work was to investigate the bioamine status of the kidney. **MATERIAL AND METHODS.** Two series of experiments were carried out. The first series included 10 white rats: 4 - controls, 3 - one day of water deprivation (WD), 3 - two days of WD with free access to dry food. **RESULTS.** During the first day WD decreased the intensity of fluorescence of catecolamines (CA), serotonin (S) and histamine (H) 2-3 times ($p < 0.01$) in all parts of the nephron. On the second day of WD there was a tendency to restore the initial level of CA and S, but the fluorescence remained reliably lower than in control, the fluorescence of H was completely restored. Fluorescence of acetylcholine (ACH) during the first days of WD was 7-8 times greater in the glomeruli and Henle's loops, and 2-3 times in the tubules ($p < 0.001$). In all parts of the nephron there was a strong negative correlation between ACH and other mediators under study ($p < 0.01$) and strong and median positive correlation between other mediators. In the second series having the same scheme the influence of WD on the renal population of mast cells (MC) was investigated. Beginning from the first day WD resulted in 2 times greater number of MC in the subcapsular zone of the kidneys which remained high. In the medullary zone the number of MC was 8 times greater on the second day. **CONCLUSION.** The extraneuronal pools of renal CA, S, H, ACH and MC are involved in the regulation of the renal status in WD.

Keywords: renal amines, acetylcholine, water deprivation, mastocytes.

ВВЕДЕНИЕ

К настоящему времени опубликовано множество фармако-физиологических исследований с применением различных фармакологических средств, свидетельствующих об участии катехоламин-, серотонин, ацетилхолин- и гистаминергических регуляторных систем в формировании финальной мочи. Однако прямые исследования

количественных и качественных параметров медиаторной регуляции почечной функции, по-видимому, так и не были осуществлены. Нам известно лишь несколько работ, посвященных этому вопросу. Например, описательные работы [1-3]. Между тем, в почках синтезируются как экстранейрональный ацетилхолин [4, 5], так и дофамин [6, 7]. По-

чечный гистамин может иметь происхождение как из тучных клеток [8], так и синтезироваться в почках. Наличие серотонина в почках также описано ранее [1, 2]. Несмотря на то, что эффекты прямого введения в почечную артерию ацетилхолина, дофамина, серотонина и гистамина широко известны, эти многочисленные эксперименты не дают представления о кооперативном взаимодействии этих медиаторов при реализации почкой своих функций. Кроме того, часто используются фармакологические дозы, поскольку дозы физиологического уровня, как правило, не вызывают регистрируемых изменений таких интегральных показателей, как объем и состав финальной мочи.

В связи со сказанным целью нашего исследования является выяснение роли почечных экстрапериональных медиаторов в реализации ответа почки на водное лишение.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперименты проведены на 20 беспородных белых крысах обоего пола массой 140–160 г в две серии. В первой серии экспериментов по три крысы были подвергнуты соответственно одно- и двухсуточной водной депривации со свободным доступом к сухому корму. По окончании депривации обе группы были подвергнуты эфирной эвтаназии вместе с контрольными крысами по две на группу. Почки крыс были немедленно изъяты, смонтированы на металлические блоки, предварительно охлажденные до -18°C и помещены в криостат. Из почек крыс были приготовлены криостатные срезы 20 μ толщиной, в которых исследовали содержание катехоламинов и серотонина по B. Falck и соавт. [10], гистамина по S.A.M. Cross и соавт. [11], ацетилхолина по B.A. Козлову и соавт. [12, 13]. Поскольку метод флюоресцентного выявления ацетилхолина нов и не известен широкому кругу исследователей, приводим его полную пропись. Криостатные срезы толщиной 20 μ монтируют на предварительно охлажденные в криостате предметные стекла. Все стекла в криостате одновременно помещаются в охлажденный до +8°C 0,25% спиртовый (48°) раствор йода на 2 мин. После этого избыток йода отмывается этиловым эфиром. На две минуты срезы помещаются в 5% гидразингидрат, после чего осторожно отмываются дистilledированной водой и высушиваются. На сухие срезы наносится салициловый альдегид и срезы помещаются на 20 мин в термостат при 37°C. После инкубации салициловый альдегид смывается этиловым эфиром. В результате этой обработки в местах локализации ацетилхолина образуются кристаллы, которые при облучении в видимой сине-фиолетовой области флюоресцируют желто-

оранжевым свечением $\lambda_{\text{max}}=534-552$ нм, светофильтры №9 и №10 спектрофлюориметрической насадки ФМЭЛ-1А. Флюоресценцию образующуюся из ацетилхолина люминофора измеряли на светофильтре №9 $\lambda=534\pm\lambda\text{нм}$, запирающий светофильтр ЖС18, $\lambda_{\text{возбужд.}}=410$ нм, светофильтры ФС, БС, СЗС. Все препараты микроскопировали на люминесцентном микроскопе «Люмам-4», флюориметрию осуществляли с помощью микрофлюориметра ФМЭЛ-1А.

Электрические параметры при всех люминесцентных измерениях на всех замерах определялись следующими параметрами: входное напряжение 900В, сопротивление усилителя 10⁶ Ом. В насадке был установлен зонд 1,5. Для измерения использовали ФЭУ-39, показания снимали с цифрового вольтметра. На каждом препарате плаг-методом в субкаспуллярной и медуллярной зонах измеряли интенсивность люминесценции от 10 клубочков или канальцев, а в медуллярной – 10 участков петель Генле. Плаг-метод был выбран после того, как в предварительных исследованиях было установлено, что средние параметры люминесценции при использовании многоточечного метода и плаг-метода совпадают в пределах ошибки измерения.

Во второй серии эксперимент был повторен, а в почечных срезах исследовали количество тучных клеток по Unna не менее чем в пяти полях зрения, объектив 40 \times , окуляр 15 \times . Тучные клетки дифференцировались по зрелости кислых мукополисахаридов и выраженной грануляции. Кроме того, отдельно учитывались клетки кортикальной области и медуллярной зоны.

Полученный материал обработан статистически с использованием критерия t Стьюдента в среде табличного процессора Excel из пакета прикладных программ MS Office XP для первой серии экспериментов и критерия U Вилкоксона-Манна-Уитни в среде пакета Statistica 6.0 для второй серии экспериментов. Корреляционные отношения рассчитаны в среде табличного процессора Excel из пакета прикладных программ MS Office XP.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Водная депривация вызывала статистически достоверное уменьшение флюоресценции катехоламинов во всех отделах нефрона, максимальное в первые сутки депривации, а во вторые – наблюдалась тенденция к восстановлению исходного уровня (рис. 1). Кроме снижения флюоресценции, нами зафиксировано статистичное различие между интенсивностью флюоресценции катехоламинов в субкаспуллярных и медуллярных клубочках и проксимальными и дистальными канальцами в интак-

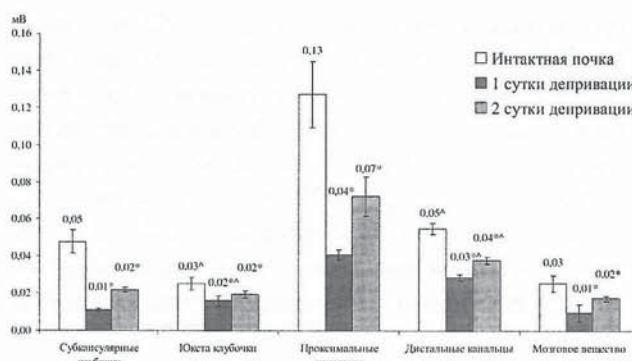


Рис. 1. Изменение флюоресценции катехоламинов в структурах нефрона крыс при водной депривации, N=9, n=60. Примечание: здесь и далее *p<0,01 по отношению к контролю; ^ p<0,01 по отношению к аналогичному отделу нефрона; размах вариационного ряда - ошибка средней.

тной почке. Интенсивность флюоресценции в медуллярной области была примерно в два раза ниже, чем в субкапсулярной. В первые сутки эти различия полностью нивелировались, а ко вторым – происходило восстановление различий в канальцевом аппарате, но не в клубочках. Интенсивность флюоресценции в петлях Генле количественно сопоставима с флюоресценцией Юкста клубочек. Как в интактном органе, так и при депривации, вне зависимости от ее длительности, максимальная флюоресценция катехоламинов обнаруживается в канальцевом аппарате почки, больше в проксимальных канальцах, чем в дистальных.

Флюоресценция серотонина (рис. 2), количе-

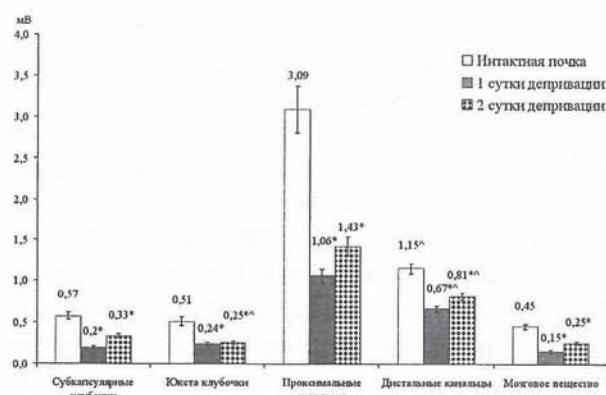


Рис. 2. Изменение флюоресценции серотонина в структурах нефрона крыс при водной депривации, N=9, n=60.

ственно более высокая, чем флюоресценция катехоламинов, также более выражена в канальцевом аппарате почки, чем в клубочковом и петлях Генле. Водная депривация вызывала такие же изменения флюоресценции серотонина, как и катехоламинов. Однако если флюоресценция катехоламинов уменьшалась двукратно, то относительное уменьшение флюоресценции серотонина в проксимальных канальцах было трехкратным.

При исследовании флюоресценции гистамина

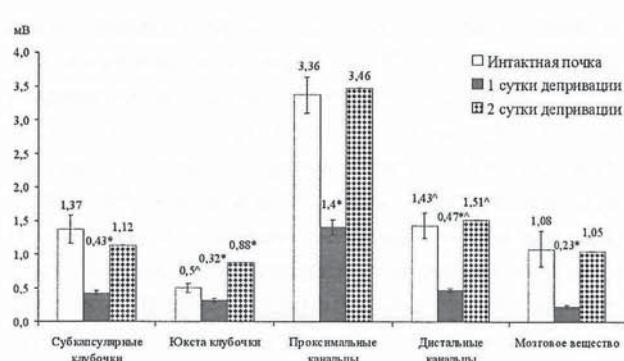


Рис. 3. Изменение флюоресценции гистамина в структурах нефрона крыс при водной депривации, N=9, n=60.

в интактном органе наблюдались различия между субкапсулярной и медуллярной областями, аналогичные различиям флюоресценции катехоламинов и серотонина. Лишение воды в первые сутки вызывало резкое угнетение флюоресценции гистамина (рис. 3). Однако к концу вторых суток интенсивность флюоресценции возвращалась к уровню интактного органа.

Интенсивность флюоресценции ацетилхолина

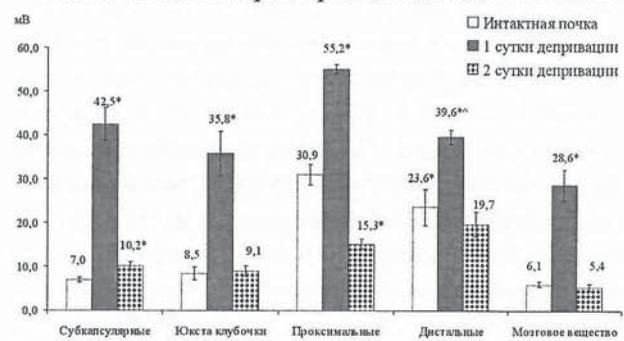


Рис. 4. Изменение флюоресценции ацетилхолина в структурах нефрона крыс при водной депривации, N=9, n=60.

менялась противоположным образом (рис. 4). В первые сутки депривации наблюдалось четырехкратное увеличение интенсивности флюоресценции ацетилхолина в клубочковом аппарате и петлях Генле и полуторакратное увеличение в канальцах. Во вторые сутки интенсивность флюоресценции уменьшалась, но оставалась достоверно выше в субкапсулярных клубочках, тогда как в канальцах была меньше интактного уровня.

Исследование корреляционных отношений (рис. 5) выявило сильную и среднюю достоверную отрицательную корреляцию между интенсивностью флюоресценции ацетилхолина и других медиаторов. Катехоламины, серотонин и гистамин между собой коррелируют положительно.

Тучные клетки в почке, в основном, обнаруживаются в субкапсулярной области, больше непосредственно под капсулой и в толще капсулы почки, чем в кортикальном слое. В медуллярной области

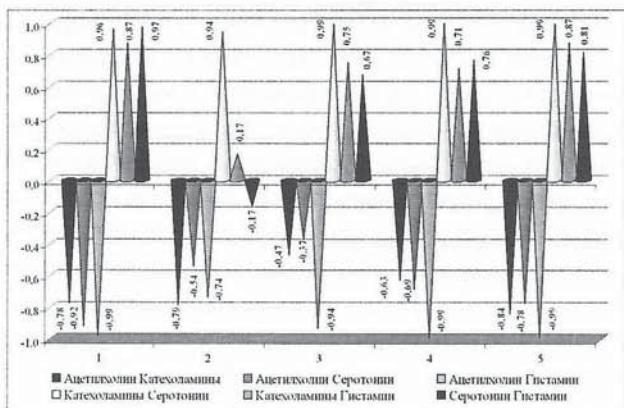


Рис. 5. Корреляционные отношения между изучаемыми медиаторами. Отрицательная корреляция - в порядке убывания интенсивности тона: ацетилхолин к катехоламинам, серотонину и гистамину соответственно (достоверность корреляции $p < 0,05$). Положительная корреляция - в порядке нарастания интенсивности тона: катехоламины к серотонину и гистамину, и серотонин к гистамину. 1 - субкапсулярные клубочки; 2 - юкстамедуллярные клубочки; 3 - проксимимальные канальцы; 4 - дистальные канальцы; 5 - петли Генле.

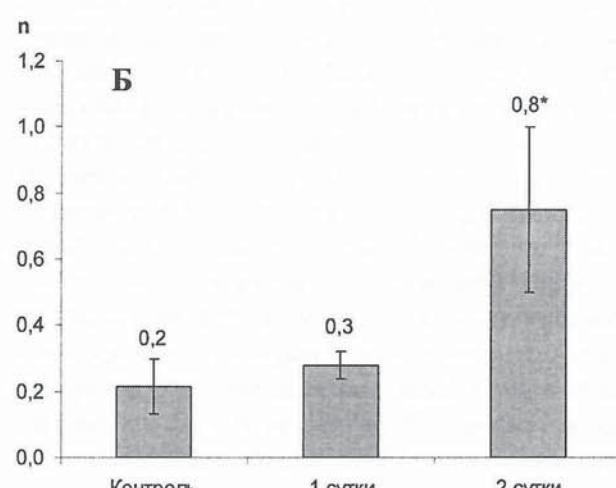
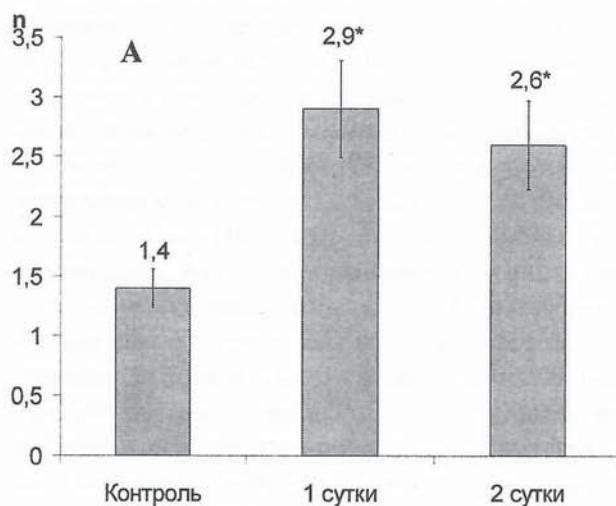


Рис. 6. Влияние водной депривации на число тучных клеток в кортикальной (А) и медуллярной (Б) областях почки крысы, n - число тучных клеток в поле зрения, $p < 0,05$, $N=9$, $n=15$.

тучные клетки единичны, общее их количество в семь и более раз меньше, чем в кортикалльной области. В интактном органе, в основном, обнаруживаются β -метахроматические клетки и, в меньшем количестве, - ортохроматические, при депривации их

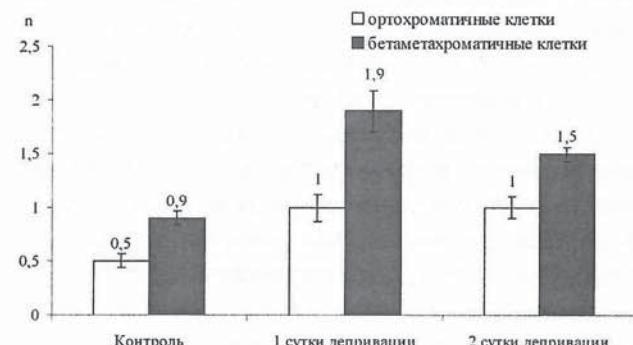


Рис. 7. Изменение числа тучных клеток в кортикалльной области почки при водной депривации, $p < 0,05$, $N=9$, $n=15$.

соотношение сохраняется, но появляются единичные β -метахроматические клетки (не статистично). Кроме того, если в интактной почке мастоциты имеют веретенообразную форму, то при водной депривации они становятся гексагональными. Наблюда-

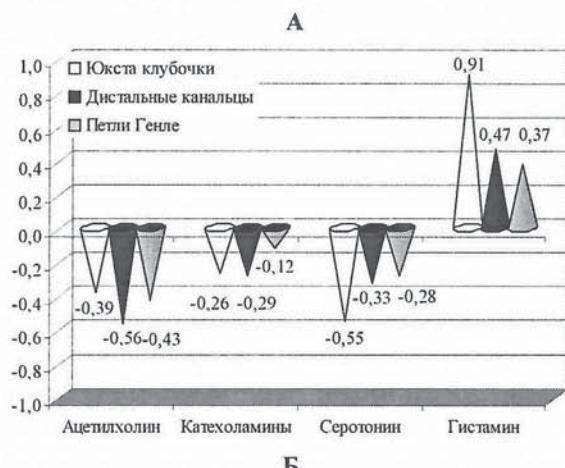


Рис. 8. Корреляционные отношения между числом тучных клеток (А - в кортикалльной области и Б - в медуллярной области почки) и интенсивностью флюоресценции медиаторов в различных областях нефрона при водной депривации (достоверность корреляции $p < 0,05$, $N=9$, $n=15$).

ется выстраивание клеток в цепочки. Подсчет тучных клеток позволил обнаружить двукратное увеличение их количества при водной депривации, как в первые, так и во вторые сутки в кортикальной области (рис. 6). В медуллярной области число тучных клеток увеличивалось в четыре раза во вторые сутки. Увеличение числа тучных клеток происходило равномерно за счет как ортохроматических, так и β-метахроматических клеток (рис. 7).

Между числом тучных клеток в субкапсулярных клубочках и уровнем ацетилхолина наблюдается достоверная положительная корреляция (рис. 8), а с остальными медиаторами, как в субкапсулярных клубочках, так и в проксимальных канальцах – сильная и средняя отрицательная. В Юкста клубочках, дистальных канальцах и петлях Генле корреляция с ацетилхолином, катехоламинами и серотонином слабая и отрицательная. Между уровнем гистамина и числом тучных клеток – корреляция положительная, сильная с флюоресценцией в Юкста клубочках.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как и ожидалось, водная депривация вызывает изменения уровня экстранеурональных биогенных регуляторов в почке, однако паттерн наблюдаемых нами изменений оказался несколько неожиданным. Мы предполагали, что такой сильный стресс, как лишение воды, должен бы вызвать увеличение интенсивности флюоресценции катехоламинов, как маркеров стресса. Ожидалось, что количество гистамина, как вещества, увеличивающего проницаемость биомембран в направлении от просвета сосуда или, может быть, канальца к интерстицию, будет возрастать. В то время как количество ацетилхолина могло бы снизиться, поскольку в ЦНС между адрено- и холинергической регуляцией отношения, как правило, реципронные. Между тем результаты мы получили прямо противоположные.

Однако если учесть, что основным катехоламином почек является дофамин, экстранеурональный синтез которого из диоксифениланина ряд исследователей наблюдали ранее [6, 7], это наблюдение не является неожиданным. Высокий уровень дофамина, как натрийуретика и диуретика, при водной нагрузке не желателен, видимо поэтому реализация программы по увеличению обратной реабсорбции воды при водной депривации реализуется через уменьшение содержания катехоламинов во всех отделах нефрона, особенно в проксимальном канальце, являющемся основной точкой приложения эндогенного почечного дофамина [6 и др.].

Параллельное снижение уровня тканевого серотонина является свидетельством участия этого вещества в регуляции транспорта воды в почке. Поскольку ренальные эффекты серотониновой регуляции не являются достаточно изученными, то для объяснения полученного нами факта можно пользоваться лишь спекуляциями. Так, например, между гистамином, ацетилхолином и серотонином, как биогенными регуляторами существует, по крайней мере, одна регуляторная связь, не обусловленная процессами нервной медиации. Серотонин является либератором гистамина, а гистамин – блокатором ацетилхолинэстеразы [14]. Если наши данные трактовать с этой точки зрения, то снижение серотонина является достаточным объяснением наблюданного нами уменьшения интенсивности флюоресценции гистамина. Возможно, что в этом есть некая биологическая целесообразность, поскольку многократное повышение уровня ацетилхолина при водной депривации требует и увеличения активности разрушающего его фермента.

Разработанный нами на основе реакции J.H. Fellmana [15] метод флюоресцентного выявления ацетилхолина в тканях является новым и не апробированным другими исследователями, поэтому к полученным нами данным мы относимся с известной осторожностью. Однако то, что в этом исследовании мы получили классически разнонаправленные ответы симпатической и парасимпатической регуляции с сильной отрицательной корреляцией, убеждает нас в полноценности нашей методики.

Целесообразности увеличения уровня ацетилхолина при адаптации почки к водной депривации также можно дать объяснение. Известно, что перфузируемый в почечную артерию ацетилхолин в малых дозах вызывает диуретическую реакцию, тогда как даже незначительное превышение пороговой дозы сопровождается резким угнетением мочевыделения [16]. Поэтому реализация задержки воды при водном лишении вполне может осуществляться путем повышения синтеза ацетилхолина в почках. То, что такой синтез действительно имеет место, является и нашим наблюдением [13].

Кроме ферментативного разрушения медиаторов, существуют и альтернативные механизмы их удаления. Одним из таких является захват биаминов тучными клетками. И, если изменение активности холинэстеразы при экзогенном введении холина нами было наблюдаемо в том же нашем исследовании [13], то участие тучных клеток в реализации почечной функции, по-видимому, практически не исследовалось.

Увеличение числа тучных клеток, индуцированное водной депривацией, видимо, вызвано увели-

чением количества гистамина и ацетилхолина – как рабочих субстратов. Переход мастоцитов из веретенообразной формы в гексагональную и появление одиночных g-метахроматических клеток с одной стороны свидетельствует об увеличении сульфатированности кислых мукополисахаридов, а с другой – об увеличении числа гранул в цитоплазме лаброцитов. И то и другое есть свидетельство увеличения их зрелости и вступления на путь реализации своей программы. Выстраивание тучных клеток в цепочки, по мнению [17], происходит при иммунизации органа. Возможно, это является маркером тяжести повреждения почки при водной депривации, вслед за которой может наблюдаться образование иммунных комплексов. Поскольку положительная корреляция числа тучных клеток наблюдалась только по отношению к ацетилхолину и гистамину, то можно думать, что лаброциты участвуют в удалении обоих веществ.

Наблюдавшаяся нами тенденция к восстановлению изучавшихся показателей до интактного уровня, возможно, свидетельствует, что острая фаза стресса, вызванного водным лишением, реализуется в течение первых-вторых суток с переходом почки на новый уровень регуляции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из полученных нами данных следует, что программа задержки воды при водной депривации на уровне почек реализуется путем увеличения экстраперитонального ренального синтеза ацетилхолина, сопровождаемого снижением уровней экстраперитональных катехоламинов, серотонина и гистамина. Удаление избыточного количества ацетилхолина может осуществляться с помощью почечной популяции тучных клеток.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Смирнова ВИ. Видовые особенности аутолюминесценции и адренергической иннервации почки кошки и крысы. В: *Морфофизиология нервной и сердечно-сосудистой системы в норме и патологии*. Чебоксары; 1974: 23-26
- Смирнова ВИ. Люминесцентно-гистохимический анализ действия адренотропных препаратов и серотонина на почку. Автореф. дисс ... к.м.н., Чебоксары; 1976
- Стопек Д, Гомбош А, Сиротякова М. Адренергическая и холинергическая иннервация почек некоторых млекопитающих. *Архив анатомии, гистологии и эмбриологии* 1978; 9: 37-43
- Pirola CJ, Alvarez AL, Balda MS et al. Evidence for cholinergic innervation in dog renal tissue. *Am J Physiol* 1989; 257(5) (Pt 2): F746-754
- Pirola CJ, Alvarez AL, Finkelman S et al. Release of acetylcholine from isolated canine renal tissue. *Am J Physiol* 1991; 260(2) (Pt 2): F198-203
- Hagege J, Richet G. Proximal tubule histamine fluorescence in renal slices incubated with L-Dopa. *Kidney Int* 1985; 27: 3-8
- Suzuki H, Nakane H, Kawamura M et al. Excretion and metabolism of dopa and dopamine by isolated perfused rat kidney. *Am J Physiol* 1984; 247(3) (Pt 1): E285-E290
- Ugaily-Thulesius L, Thulesius O. The effects of urine on mast cells and smooth muscle of the human ureter. *Urological Research* 1988; 16(6): 441-447
- Alessandri MG, Giovanni L, Mian M et al. PAF-induced histamine release in the isolated perfused rat kidney. *Int J Tissue Res* 1988; 10(1): 33-38
- Falck B, Hillarp N-G, Thieme G, Torp A. Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. *J Histochem Cytochem* 1962; 10: 348-354
- Cross SAM., Even W, Rost FWD. A study of methods available for cytochemical localization of histamine by fluorescence induced with o-phtaldehyde or acetaldehyde. *Histochemistry* J 1971; 3(6): 471-476
- Козлов ВА, Уфукова АЮ, Толмачев АС. Патент № 2159433, приоритет 27 октября 1999, Способ определения ацетилхолина.
- Kozlov VA, Glazirina OU, Ufukova AU et al. The choline changes acetylcholinesterases activity and acetylcholinum fluorescence intensity in the kidneys. In: 21th Workshop The biological essentiality of macro and trace elements, Germany, Jena, 18-19 October, 2002: 839-846
- Вайсфельд ИЛ, Кассиль ГН. Гистамин в биохимии и физиологии. М.: Наука; 1981
- Fellman JH. Determination of acetylcholine: Its application in a study of presynaptic release and a choline acetyltransferase assay. *J Neurochem* 1969; 16(2): 135-143
- Аникин ГД. О механизме прямого влияния на почку некоторых биологически активных веществ: Автореф. дис ... д.м.н. Барнаул; Чебоксары; 1971
- Азнаурян АВ, Акопджанян ЭС, Чилингарян СЦ. Тканевые базофилы в тимусе. *Архив анатомии, гистологии и эмбриологии* 1984; 86 (4): 45-47

Поступила в редакцию 06.05.2003 г.