

УДК 612.460+612.463

КАСКАДНАЯ СИСТЕМА РЕГУЛЯЦИИ ОСМОТИЧЕСКОГО ГОМЕОСТАЗА

© 2020 г. Академик РАН Ю. В. Наточин^{1,*}, А. С. Марина¹, Е. И. Шахматова¹

Поступило 31.05.2019 г.

После доработки 31.05.2019 г.

Принято к публикации 31.05.2019 г.

Система осморегуляции у человека и животных направлена на стабилизацию осмоляльности жидкостей внутренней среды для поддержания объёма клеток. В опытах на крысах показано, что после введения в желудок 5 мл воды на 100 г массы тела в сыворотке крови снижается осмоляльность и концентрация ионов Na и Ca, но не K и Mg. Показано существование каскадной системы осмотического гомеостаза: возрастает секреция глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1), окситоцина, снижается секреция вазопрессина, что уменьшает осмотическую проницаемость собирательных трубок. После водной нагрузки и инъекции 0.015 нМ эксенатида (миметик ГПП-1) время выведения 50% введённой воды уменьшается вдвое с 112 ± 4 до 57 ± 5 мин ($p < 0.01$); при инъекции 0.015 нМ окситоцина оно снижается до 83 ± 6 мин ($p < 0.01$). Выявлен физиологический механизм эффекта в почке перечисленных выше гормонов, ускоряющих восстановление осмотического гомеостаза.

Ключевые слова: осморегуляция, почка, каскадная система, окситоцин, глюкагоноподобный пептид-1, вазопрессин

DOI: 10.31857/S2686738920010175

Постоянство физико-химических параметров крови, жидкостей внутренней среды является важнейшим условием полноценной жизни человека и млекопитающих животных [1]. Прием пищи, воды, жизнь в разных климатических условиях неизбежно отражаются на осмоляльности сыворотки крови, концентрации в ней различных веществ. Согласно современным представлениям, после того как вода всосалась в кишечнике, наступает гипоосмоляльность крови. Эти изменения физико-химических параметров жидкостей внутренней среды воспринимают интерорецепторы, в том числе осморорецепторы. Сигналы от них влияют на поведение (чувство жажды), изменяется секреция вазопрессина, что вызывает перестройку деятельности почек [2, 3]. С учётом исключительного значения стабильности осмоляльности крови для поддержания объёма клеток различных органов возникло предположение, что могут существовать физиологические механизмы, смягчающие сдвиги гомеостаза и ускоряющие восстановление осмоляльности крови при поступлении избытка воды во внутреннюю среду. Задача настоящей работы состояла в изучении последовательности включения физиологиче-

ских механизмов осмотического гомеостаза, обеспечивающих поддержание постоянства осмоляльности сыворотки крови.

Эксперименты проведены на крысах линии Вистар. Животные имели свободный доступ к воде и получали стандартный гранулированный корм (ООО “Аллер Петфуд”, Россия). Утром в день эксперимента крыс не кормили, но они могли пить воду без ограничения. Содержание животных и проведение экспериментов выполнялось в соответствии с Российскими и международными правилами по работе с лабораторными животными. Для воздействия на систему осморегуляции неанестезированным крысам вводили воду зондом в желудок в объёме 5 мл на 100 г массы тела. Окситоцин (“Sigma-Aldrich”, США) и эксенатид, миметик глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1), растворяли в 0.9%-м растворе NaCl. Синтез эксенатида был выполнен на кафедре химии природных соединений химического факультета СПбГУ под руководством М.И. Титова. Внутримышечно инъецировали окситоцин или эксенатид в дозах 0.015 нмоль в объёме 0.1 мл на 100 г массы тела. Контролем служили животные с введением водной нагрузки и инъекцией 0.1 мл 0.9%-го раствора NaCl на 100 г массы тела.

Во время опыта крыс помещали в индивидуальные клетки-пеналы с проволочным дном, через которое моча по воронке стекала в пробирку. Диурез регистрировали при спонтанных мочеиспусканиях в течение 2 ч. Кровь у крыс брали из

¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской Академии наук, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: natochin1@mail.ru

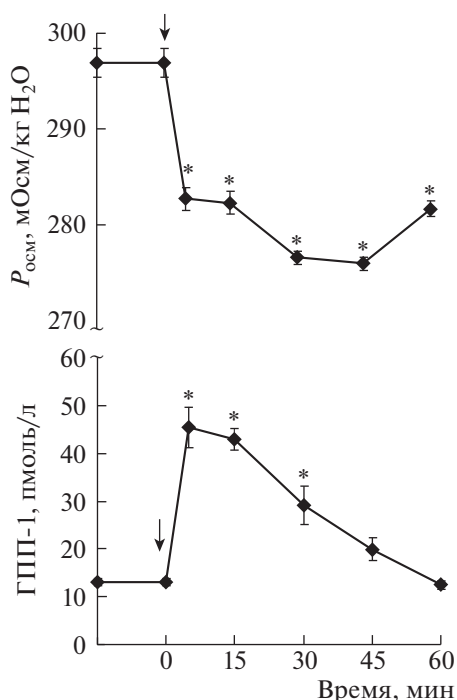


Рис. 1. Динамика осмоляльности $P_{осм}$ и концентрации глюкогоноподобного пептида-1 (ГПП-1) в сыворотке крови у крыс после водной нагрузки. Стрелка – введение воды в желудок. Количество обследованных животных в каждой точке на всех рисунках – 10. * $p < 0.05$ по сравнению с исходным периодом в контроле (0 мин).

сонной артерии под золепидиловым наркозом в дозе 5 мг на 100 г массы тела. Пробы крови для определения концентрации ГПП-1 собирали в охлажденные пробирки с K_3 ЭДТА, центрифугировали при температуре $t = +4^\circ C$ на Mikro 22R (“Hettich”, Германия), образцы плазмы крови до проведения анализа хранили при $t = -20^\circ C$.

Концентрацию ГПП-1 определяли с применением наборов GLP-1 Total ELISA (“Millipore”, США), для измерения концентрации окситоцина в моче использовали иммуноферментные наборы ELISA (“Enzo Life Sciences”, США). Считывание

оптической плотности осуществляли в 96-луночных планшетах по методике тест-системы на автоматическом ридере ELx808 (“Bio-Tek Instruments”, США). Для получения сыворотки крови использовали центрифугу Mikro 20 (“Hettich”, Германия), 8000 об/мин, 15 мин. Осмоляльность проб сыворотки крови и мочи определялась криоскопическим методом на микроосмометре 3320 (“Advanced Instruments”, США). Концентрация ионов Na и K в сыворотке крови измерялась с помощью ионоселективного блока на автоматическом биохимическом анализаторе Erba XL-200 (“Erba-Lachema”, Чехия). Измерение концентрации ионов Mg и Ca в пробах проводилось в воздушно-ацетиленовом пламени на атомном абсорбциометре AA-6200 (“Shimadzu”, Япония).

Показатели функций почек рассчитывали по стандартным формулам и нормализовали на массу тела. Все данные представлены в виде $M \pm m$. Сравнение между группами проводили с использованием одно- или двухфакторного дисперсионного анализа и теста Холм–Шидака для попарного сравнения средних. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

После введения воды по зонду в желудок крысе её всасывание в кишечнике вызывает снижение осмоляльности сыворотки крови и концентрации в ней ионов натрия и кальция (рис. 1, табл. 1), концентрация ионов Mg и K не уменьшалась. Гипоосмоляльность сыворотки приводит к поступлению воды в клетки по осмотическому градиенту, что увеличивает их объём. Эти изменения постепенно устраняются организмом благодаря выведению почкой осмотически свободной воды (рис. 2).

Естественно, физиологические изменения в организме после питья избытка воды могут неблагоприятно отражаться на водно-солевом гомеостазе, развивается гипоосмоляльность, этот эффект смягчается системой осморегуляции. Один из таких способов был установлен много лет назад: это условный рефлекс на питье воды, что увеличивало диурез [4]. Нами было показано, что в ответ на питье воды растёт секреция в кровь

Таблица 1. Динамика показателей сыворотки крови крыс после 5% водной нагрузки

Параметры сыворотки крови, ммоль/л	Контроль	Время после водной нагрузки		
		5	10	50
	$n = 10$	$n = 7$	$n = 7$	$n = 8$
P_{Na}	143.0 ± 1.0	143.1 ± 0.5	$139.6 \pm 0.7^*$	$138.7 \pm 0.6^*$
P_K	4.0 ± 0.1	4.4 ± 0.2	4.0 ± 0.1	$4.4 \pm 0.1^*$
P_{Mg}	0.72 ± 0.03	0.76 ± 0.03	$0.84 \pm 0.03^*$	0.78 ± 0.03
P_{Ca}	2.53 ± 0.03	2.58 ± 0.03	2.48 ± 0.02	$2.27 \pm 0.04^*$

* Достоверность отличий * $P < 0.05$ при сравнении с контролем.

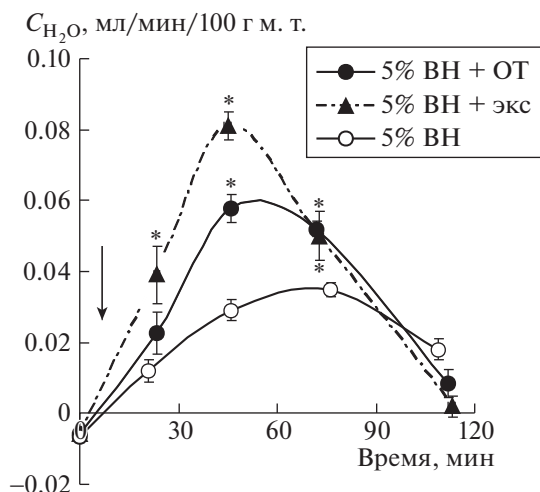


Рис. 2. Динамика выведения осмотически свободной воды C_{H_2O} почкой после водной нагрузки (ВН) и инъекции 0.015 нМ окситоцина (ОТ) с ВН или 0.015 нМ эксенатида (экс) с ВН. Стрелка – введение ВН и инъекция регуляторных пептидов. * $p < 0.01$ по сравнению с ВН.

ГПП-1 [5] и окситоцина [6]. Физиологически важно проанализировать, есть ли зависимость между изменением осмоляльности сыворотки крови и секрецией ГПП-1, как функционирует каскадная система и обеспечивает ли она смягчение резких сдвигов осмоляльности жидкостей внутренней среды. Критерием эффекта был избран расчёт времени, необходимого для выделения почкой 50% воды, которая была введена по зонду в желудок. Основой расчёта служило измерение времени экскреции почкой не общего объёма мочи, а выделения осмотически свободной воды [7], так как введенная в желудок вода и осмотически свободная вода идентичны по физико-химическим характеристикам практически полному отсутствию в них растворенных веществ.

Введение воды в желудок вызывает увеличение концентрации ГПП-1 наряду с уменьшением осмоляльности сыворотки крови (рис. 1). Этот гормон быстро разрушается в сыворотке, поэтому для инъекции крысе был использован его миметик – эксенатид, который воспроизводит физиологический эффект ГПП-1, но медленнее инактивируется [8]. Инъекция эксенатида ускоряет выведение осмотически свободной воды почкой (рис. 2). У крыс контрольной группы после водной нагрузки выведение почкой 50% воды за счёт экскреции осмотически свободной воды требует 112 ± 4 мин, после инъекции эксенатида и водной нагрузки этот эффект достигается вдвое быстрее, он снижается и при инъекции окситоцина (рис. 3). Введение воды увеличивает количество оксито-

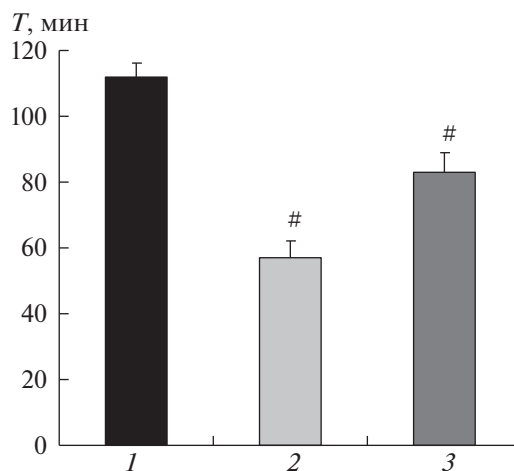


Рис. 3. Время T экскреции почкой крыс 50% введенной воды. 1 – водная нагрузка (ВН), 2 – инъекция 0.015 нМ эксенатида с ВН, 3 – инъекция 0.015 нМ окситоцина с ВН. # $p < 0.01$ по сравнению с ВН.

цина, выделяемого с мочой. За 120 мин в контроле экскреция окситоцина составляла 289 ± 29 пг, после 5% водной нагрузки 711 ± 77 пг ($p < 0.002$). Полученные результаты показывают, что организм млекопитающих обладает механизмами противодействия сдвигу физико-химических параметров жидкостей внутренней среды (рис. 2, 3). Этот эффект после питья воды основан на стимуляции секреции ГПП-1, с током крови он достигает почек, в котором уменьшается реабсорбция жидкости в проксимальном отделе нефрона. Большие объёмы жидкости поступают в дистальные отделы нефрона, в них реабсорбируются ионы и образуется осмотически свободная вода. Эффект ГПП-1, как и окситоцина, состоит в том, что быстрее выделяется осмотически свободная вода почкой (рис. 2, 3) и восстанавливается осмотический гомеостаз.

Таким образом, полученные результаты качественно меняют существующие представления о механизме восстановления водно-солевого гомеостаза при гипергидратации. По современным концепциям в основе реакции организма на потребление воды лежит стимуляция осморцепторов после всасывания воды в кишечнике [3, 9]. Полученные данные показывают, что в организме сформировалась каскадная система смягчения физико-химических сдвигов сыворотки крови после введения воды в желудок. Она может включать условный рефлекс, повышение секреции ГПП-1, усиление секреции окситоцина, уменьшение секреции вазопрессина нейрогипофизом. На повышение концентрации этих гормонов почка реагирует уменьшением реабсорбции жидкости в этом сегменте нефрона [10], что снижает всасывание ультрафильтрата в этом канальце и

большой объем жидкости достигает дистальных отделов нефрона [9], где ускоряется образование и выведение осмотически свободной воды почкой, восстановление осмоляльности крови.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом РФФ № 18–15–00358.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Наточин Ю.В.* // Усп. физиол. наук. 2017. Т. 48. № 4. С. 3–15.
2. *Acher R.* // Ann. Endocrinol. (Paris). 2002. V. 63. № 3. P. 197–218.
3. *Bankir L., Bichet D.G., Morgenthaler N.G.* // J. Intern. Med., 2017. V. 282. № 4. P. 284–297.
4. *Быков К.М., Алексеев-Беркман И. А.* // Тр. II Всесоюз. съезда физиологов. Л.: Главнаука, 1926. С. 134.
5. *Марина А.С., Кутина А.В., Шахматова Е.И. и др.* // ДАН. 2014. Т. 459. № 1. С. 121–124.
6. *Наточин Ю.В., Голосова Д.В., Шахматова Е.И.* // ДАН. 2018. Т. 479. № 6. С. 712–715.
7. *Наточин Ю.В.* Почка. Справочник врача. СПб: Изд-во. СПб ун-та. 1997. 208 с.
8. *Cheang J.Y., Moyle P.M.* // ChemMedChem. 2018. V. 13. № 7. P. 662–671.
9. *Шейман Д.А.* Патифизиология почки. М., СПб: Бином. 2016. 206 с.
10. *Kutina A.V., Marina A.S., Shakhmatova E.I., et al.* // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 2013. V. 40. № 8. P. 510–517.

CASCADE SYSTEM OF OSMOTIC HOMEOSTASIS REGULATION

Academician of the RAS **Yu. V. Natochin^{a, #}**, **A. S. Marina^a**, and **E. I. Shakhmatova^a**

^a *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russian Federation*

[#]*e-mail: natochin1@mail.ru*

The human and animal osmoregulation system is aimed at stabilizing the serum osmolality to maintain cell volume. It was shown that the introduction of 5 ml water per 100 g of body weight into the stomach rat decreased serum osmolality and concentration of Na and Ca ions, but not K and Mg. The cascade system of osmotic homeostasis include increase secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1), oxytocin, decrease of the secretion of vasopressin, which reduces the osmotic permeability of collecting duct. After water loading the injection of 0.015 nM of exenatide (mimetic GLP-1) the time of excretion of 50% of the water is halved from 112 ± 4 to 57 ± 5 min ($p < 0.01$); when injected 0.015 nM of oxytocin, it is reduced to 83 ± 6 min ($p < 0.01$). The physiological mechanism renal effect of the aforementioned hormones is discussed for the recovery of osmotic homeostasis.

Keywords: osmoregulation, kidney, cascade system, oxytocin, glucagon-like peptide-1, vasopressin