

УДК 612.46

ОТЛИЧИЯ ЭФФЕКТА АРГИНИН-ВАЗОТОЦИНА И АРГИНИН-ВАЗОПРЕССИНА НА ПОЧКУ КРЫС В ЭВОЛЮЦИИ ОСМОРЕГУЛЯЦИИ У ПОЗВОНОЧНЫХ

© 2019 г. Д. В. Голосова¹, Е. И. Шахматова¹, Ю. В. Наточин^{1,*}

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

*E-mail: natochin1@mail.ru

Поступила в редакцию 19.03.2018 г.

После доработки 24.07.2018 г.

Принята к публикации 15.08.2018 г.

Аргинин-вазоточин (АВТ) является гормоном большинства позвоночных, но у млекопитающих его сменяет вазопрессин. Исследование эффекта обоих нонапептидов семейства вазопрессина [аргинин-вазопрессин, (АВП) и АВТ] показало, что в почке крыс они участвуют в регуляции реабсорбции Na^+ и реабсорбции осмотически свободной воды. Эти эффекты обусловлены влиянием на разные подтипы V-рецепторов, активируемые разными концентрациями гормона в сыворотке крови. Предложен иммуноферментный метод определения концентрации АВТ в условиях полного подавления секреции АВП. Показано, что при инъекции одинаковых доз нонапептидов АВТ медленнее разрушается и дольше действует у крыс, чем АВП. Большая скорость метаболизма нонапептида в крови служит эволюционным преимуществом как способ улучшения качества регуляции водно-солевого обмена. Обсуждается вопрос о значении сопоставления эффекта утраченных в ходе эволюции гормонов позвоночных как метод изучения эволюции функций.

Ключевые слова: вазоточин, вазопрессин, почка, осморегуляция, осмотически свободная вода

DOI: 10.1134/S0044452919010054

ВВЕДЕНИЕ

Нонапептиды семейства вазопрессина секретируются в кровь у представителей всех классов позвоночных. Среди них аргинин-вазоточин (АВТ), гидрин 2, окситочин, ихтиоточин, аргинин-вазопрессин (АВП) [1]. Эти гормоны участвуют в регуляции водно-солевого обмена [1, 2], репродуктивной функции [1, 2] и поведения [3, 4]. В эволюции позвоночных происходит смена химической структуры нонапептидов и их роли в регуляции функций. Анализ огромной литературы по сравнительной эндокринологии [1, 5, 6] не дает ответа на вопрос о причинах, которые обусловили смену аминокислот в нонапептидах у представителей разных классов, какие функции приобретает новый аналог гормона. Сказанное предопределяет возможность еще одной линии сравнительно-физиологических исследований, имеющих значение для эволюционной физиологии – изучение эффекта физиологически активных веществ низших позвоночных у эволюционно более высоко развитых групп позвоночных, которые утратили этот гормон в ходе эволюции. Это может позволить выяснить, не только как видоизменилась регуляция функции, но и в чем суть несоответствия ранее существовавших гормонов новым условиям, какие последова-

ли изменения молекулярной организации и физиологической реакции, вызванные сменой регуляторного фактора.

У млекопитающих в крупноклеточных нейросекреторных ядрах гипоталамуса образуется АВП или лизин-вазопрессин [7], но не синтезируется АВТ, секретируемый у большинства позвоночных. Задачей настоящей работы послужило изучение трех взаимосвязанных вопросов, которые могут позволить выяснить причину смены нонапептидов в осморегуляции у млекопитающих: 1) сопоставление эффекта АВТ и АВП на почку крыс; 2) изучение соотношения между выведением этих гормонов почкой и реабсорбцией в канальцах воды и ионов; 3) определение длительности эффекта гормонов как проявление скорости смены паттерна регуляторных молекул в крови.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Эксперименты проведены на крысах линии Вистар. Животные получали стандартный гранулированный корм (рецепт ПК-120, ООО “Аллер Петфуд”, Россия) и находились в условиях свободного доступа к воде. Утром в день эксперимента крыс не кормили, сохраняя возможность пить воду. Крыс

использовали в повторных опытах не чаще 1 раза в неделю. Их содержание и проведение экспериментов выполнялось в соответствии с Российскими и международными правилами по работе с лабораторными животными.

АВП и АВТ (“Vachem”, Швейцария) инъецировали в дозах от 0.001 до 0.1 нмоль на 100 г массы тела. Для подавления секреции эндогенного АВП неанестезированным крысам вводили водную нагрузку (ВН) в объеме 5 мл на 100 г массы тела зондом в желудок и на этом фоне инъецировали изучаемый нонапептид. Препараты растворяли в 0.9%-ом растворе NaCl и вводили в объеме 0.1 мл на 100 г массы тела внутримышечно. Контролем служила группа животных с инъекцией растворителя в том же объеме без введения ВН.

Во время опыта крыс помещали в индивидуальные клетки-пеналы с проволочным дном, через отверстие которого моча по воронке стекала в мерную пробирку. Диурез регистрировали при спонтанных мочеиспусканиях в течение 4 ч. После мочеиспускания тотчас измеряли объем пробы и брали аликвоту для иммуноферментного анализа в пробирки типа эппендорф, в которые был добавлен ингибитор протеаз аprotинин (500 КИЕ/мл). Аликвоты мочи помещали в холодильную камеру и хранили при температуре -80°C . Концентрацию АВП в пробах мочи измеряли наборами для иммуноферментного анализа (ИФА) – ELISA, Enzo Life Sciences, Inc., США. Для определения концентрации АВТ в пробах мочи использовали наборы EIA, Peninsula Laboratories International, Inc., США. Измерение оптической плотности осуществляли в 96-луночных планшетах по методике тест-системы на автоматическом ридере ELx808 (Bio-Tek Instruments, США) по методике соответствующих тест-систем. Кровь у животных брали из сонной артерии под золотилковым (“Virbac”, Франция) наркозом (5 мг на 100 г массы тела внутримышечно). После свертывания кровь центрифугировали при 8000 оборотах в минуту на микроцентрифуге Hettich Micro 20 (Andreas Hettich GmbH, Германия) в течение 15 мин, для последующих анализов использовали сыворотку.

Осмоляльность в пробах сыворотки крови и мочи определяли криоскопическим методом на микроосмометре 3320 (Advanced Instruments, Inc., США). Концентрацию Na^+ в пробах мочи измеряли на пламенном фотометре Sherwood-420 (Sherwood Scientific, Великобритания), в сыворотке крови – с помощью ионоселективного блока на автоматическом биохимическом анализаторе Erba XL-200 (Erba Lachema, Чехия), концентрацию креатинина в сыворотке и моче – кинетическим методом по реакции Яффе без депротеинизации на том же анализаторе. Показатели функций почек рассчитывали по стандартным формулам [8] и нормализовали на 100 г массы тела. Для оценки динами-

ки параметров функций почек использовали их средние взвешенные значения по 30-минутным интервалам.

Сравнение групп проводили с использованием одно- или двухфакторного дисперсионного анализа с поправкой Бонферрони для множественных сравнений с контрольной группой или с последующим применением теста Холма и Шидака для попарного сравнения средних. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После введения в желудок ВН в течение часа водный диурез достигает максимума, что обусловлено удалением из мембран клеток собирательных трубок аквапорина 2 и образованием осмотически свободной воды (рис. 1). Инъекция на этом фоне АВП или АВТ уменьшает выведение осмотически свободной воды в результате повышения осмотической проницаемости стенки канальца (рис. 1), но не изменяет выведение Na^+ (рис. 2). Скорость гломерулярной фильтрации, измеренная по клиренсу креатинина, остается во всех сериях опытов на одном уровне: после введения ВН $C_{Cr} = 0.34 \pm 0.02$ мл/мин, после инъекции АВП и АВТ на фоне ВН $C_{Cr} = 0.40 \pm 0.03$ и $C_{Cr} = 0.31 \pm 0.04$ мл/мин соответственно ($p > 0.05$ к контролю). Следовательно, влияние нонапептидов на транспорт воды обусловлено участием клеток канальцев, а не изменением скорости гломерулярной фильтрации. Так как при инъекции нонапептидов в дозе 0.001 нмоль на 100 г массы тела выведение Na^+ практически не меняется (рис. 2, в верхней части выделен фрагмент, где размерность ординаты увеличена в 10 раз, чтобы были различимы особенности эффекта гормонов при изменении дозы на два порядка). Увеличение дозы нонапептида до 0.1 нмоль на 100 г массы тела сопровождается выраженной способностью гормона влиять на реабсорбцию осмотически свободной воды и на натрийурез (рис. 2). Проведенные опыты показали, что имеется зависимость между выделением нонапептида почкой и натрийуретическим эффектом. Следует обратить внимание, что действие АВП на функцию почки менее длительно, чем эффекты такой же дозы АВТ (рис. 1, 2).

Сопоставление экскреции нонапептидов (рис. 3) и Na^+ с мочой позволяет понять, в чем причина отличий реакции почки крыс на эти нонапептиды. У крыс оба гормона в небольших концентрациях влияют на реабсорбцию воды в канальцах почки, т.е. вызывают антидиуретическое действие. Полученные данные свидетельствуют о том, что под влиянием ВН осмоляльность сыворотки снижается с 295 ± 6 в контроле до 281 ± 1 мОсм/кг H_2O ($p < 0.05$) и тем самым рефлекторно подавляется секреция эндогенного АВП. После ВН концентрация

АВП в крови у крыс становится очень мала и его экскреция падает до нулевых значений (рис. 3). После инъекции АВП в этих условиях в течение первых 30 мин растет его выведение почкой, а затем оно быстро снижается (рис. 3). При отсутствии АВП в сыворотке крови в условиях ВН появляется экспериментальная возможность измерить концентрацию АВТ с помощью ИФА после инъекции этого гормона крысам. Причина в том, что из-за высокой кросс-реактивности при использовании метода ИФА нельзя измерить концентрацию АВТ в присутствии АВП в одной и той же пробе. Применение нашего метода с блокадой секреции АВП нейрогипофизом при введении ВН позволило определить выделение АВТ почкой. Показано, что выделение АВТ длится дольше и его экскреция с мочой почти на 2 порядка выше, чем АВП (рис. 3). Следовательно, более выраженное влияние АВТ на реабсорбцию ионов Na^+ в почке может определяться более медленным разрушением в крови этого нонапептида и поэтому более длительным эффектом.

Сопоставление выделения АВТ и Na^+ почкой показывает, что имеется прямая корреляция между экскрецией этого гормона и натрийурезом (рис. 4). Представление об особенностях влияния изучаемых нонапептидов (АВП, АВТ) на выделение растворенных в ультрафильтрате веществ может дать сопоставление клиренса осмотически активных веществ и осмотически свободной воды в опытах с инъекцией одинаковых доз нонапептидов у крыс. АВТ и АВП увеличивают осмоляльное очищение (C_{osm}), что указывает на уменьшение реабсорбции различных ионов. Действие АВТ значительно превышает действие АВП (рис. 5). Оба нонапептида усиливают осмотическое концентрирование мочи, что находит выражение в усилении реабсорбции осмотически свободной воды в почке (рис. 5). Тем самым полученные результаты показали, что АВТ, гормон большинства “домлекопитающих” позвоночных, обладает у крыс более выраженным эффектом, чем АВП, на выделение осмотически активных веществ, в том числе Na^+ , но также повышает реабсорбцию воды в почке крыс. Естественно, необходим анализ причин большего эффекта той же дозы АВТ у крыс по сравнению с АВП. Структура опытов с инъекцией АВП и АВТ была идентичной, одинаковыми были водный и пищевой режимы у крыс. Оказалось, что скорость деградации инъецированного АВП выше, чем АВТ (рис. 3). Тем самым при инъекции одинаковых доз нонапептидов кумулятивный эффект на транспорт воды и ионов в почке будет тем выше, чем дольше находится в крови гормон при условии, что он влияет на те же подтипы V-рецепторов. Введение одинаковых доз нонапептидов на фоне ВН, когда снижена секреция эндогенного АВП, позволяет рассчитать, какая часть гормона подвергается деградации и выводит-

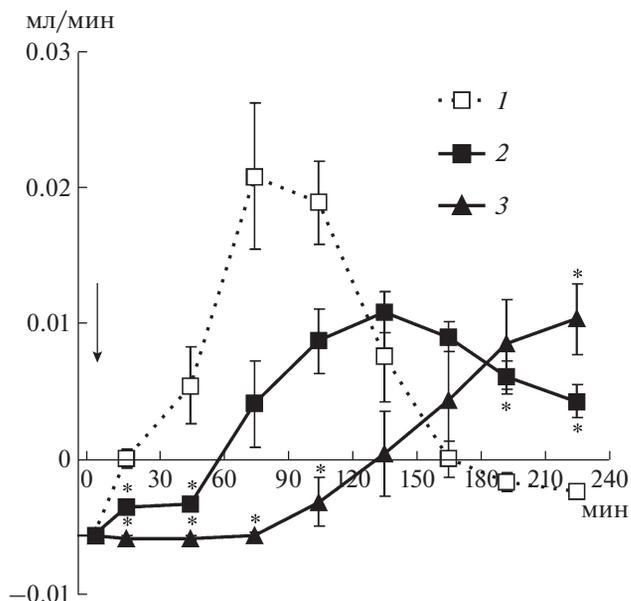


Рис. 1. Влияние аргинин-вазопрессина (АВП) и аргинин-вазотоцина (АВТ) на очищение осмотически свободной воды почкой на фоне водной нагрузки (ВН). По оси абсцисс – время опыта, мин; по оси ординат – выведение осмотически свободной воды, мл/мин. 1 – ВН; 2 – ВН + АВП; 3 – ВН+АВТ. Стрелка – введение 0.001 нмоль на 100 г массы тела гормонов и 5% ВН, * $p < 0.05$ – достоверность отличий эффекта гормонов при сравнении с ВН.

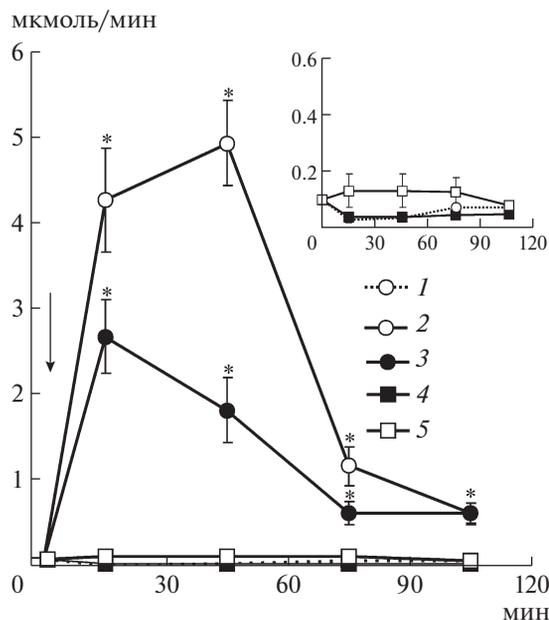


Рис. 2. Экскреция ионов натрия почкой после инъекции различных доз аргинин-вазопрессина (АВП) и аргинин-вазотоцина (АВТ) на фоне ВН. По оси абсцисс – время опыта, мин; по оси ординат – выведение ионов натрия, мкмоль/мин. 1 – ВН; 2 – ВН + 0.1 нмоль на 100 г массы тела АВТ; 3 – ВН + 0.1 нмоль на 100 г массы тела АВП; 4 – ВН + 0.001 нмоль на 100 г массы тела АВП; 5 – ВН + 0.001 нмоль на 100 г массы тела АВТ. Стрелка – введение гормонов и 5% ВН, * $p < 0.05$ – достоверность отличий эффекта гормонов при сравнении с ВН.

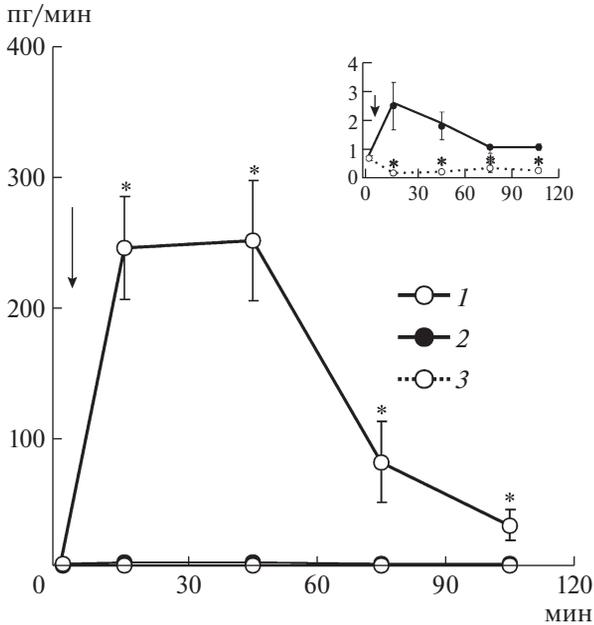


Рис. 3. Экскреция аргинин-вазопрессина (АВП) и аргинин-вазотоцина (АВТ) после их инъекции на фоне ВН. По оси абсцисс – время опыта, мин; по оси ординат – выведение нонапептидов, пг/мин. 1 – ВН + 0.1 нмоль на 100 г массы тела АВТ; 2 – ВН + 0.1 нмоль на 100 г массы тела АВП; 3 – ВН. Стрелка – введение гормонов и 5% ВН, * $p < 0.05$ достоверность при сравнении к экскреции АВП.

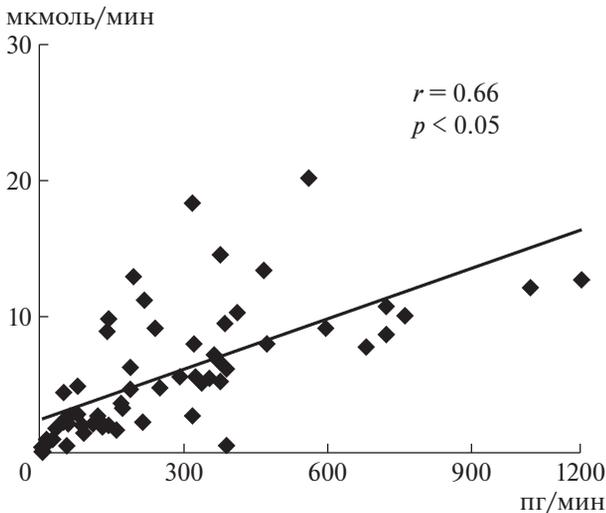


Рис. 4. Зависимость между экскрецией аргинин-вазотоцина (АВТ) и ионов натрия при его инъекции на фоне ВН. По оси абсцисс – выведение АВТ, пг/мин; по оси ординат – выведение ионов натрия, мкмоль/мин; r – коэффициент корреляции.

ся с мочой. Расчеты показали, что если принять количество инъекцированного гормона за 100%, то за 2 ч эксперимента с мочой выводится 16.48% АВТ и лишь 0.18% АВП. Это свидетельствует о большей

устойчивости АВТ к деградации ферментами в организме крыс и соответственно наблюдается более выраженное натрийуретическое действие.

Динамическое изучение концентрации нонапептидов нейрогипофиза в крови крыс технически сложно. Если брать несколько проб крови у одного животного для измерения концентрации гормона в течение короткого времени, то это изменит объем циркулирующей в сосудах крови и вызовет стрессорную реакцию. Поэтому был использован новый подход с угнетением секреции АВП с помощью ВН и изучена динамика содержания в жидкостях внутренней среды АВП и АВТ после их инъекции по изменению экскреции почкой. АВП и АВТ полностью свободно фильтруются в клубочках почки, а потому поступают в просвет канальца в той же концентрации, что имеются в крови.

Почка у крыс при стандартном водном режиме функционирует в состоянии антидиуреза благодаря секреции нейрогипофизом антидиуретического гормона, которым у крыс является АВП. Он увеличивает осмольность в мозговом веществе почки и повышает осмотическую проницаемость клеток эпителия, что усиливает реабсорбцию осмотически свободной воды. Ранее нами было показано, что инъекция АВТ в дозе 0.05 нмоль на 100 г массы тела приводит не только к увеличению реабсорбции осмотически свободной воды, но и оказывает натрийуретическое действие [9, 10]. Усиление экскреции Na^+ при увеличении дозы вводимого АВП коррелирует с экскрецией нонапептида с мочой [11]. У крыс на стандартном водном режиме без введения ВН инъекция 0.1 нмоль на 100 г массы тела АВТ вызывала усиление диуреза, натрийуреза и реабсорбции осмотически свободной воды. Натрийуретический эффект АВТ значительно превышал действие АВП (рис. 5).

Естественно, эффект вещества зависит от длительности его нахождения в крови. Были сопоставлены эффективные дозы АВП и АВТ на выведение ионов почками крыс и была произведена оценка степени их деструкции. На фоне ВН, которая снижала секрецию АВП (рис. 3), инъекцировали АВП или АВТ в одинаковых дозах – 0.1 нмоль на 100 г массы тела. Найдена корреляция между экскрецией Na^+ и выведением АВТ почкой (рис. 4). Инъекция АВТ уменьшает реабсорбцию клетками канальцев нефрона ионов Na , увеличивает диурез и салурез. Возникает, казалось бы невозможная ситуация: рост мочеотделения, из-за снижения реабсорбции ионов натрия и осмотически связанной с ними воды, одновременно сопровождается повышением реабсорбции осмотически свободной воды (рис. 2). В основе этого явления лежит стимуляция нонапептидом различных подтипов V-рецепторов, что приводит к снижению реабсорбции Na^+ при стимуляции V_{1a} -рецепторов, повышению осмольности мозгового вещества почки крыс и

увеличению проницаемости стенок собирательных трубок для воды в результате стимуляции V_2 -рецепторов. Инъекция АВТ и АВП в одинаковых дозах в опытах без ВН сопровождается увеличением диуреза, салуреза одновременно с возрастанием реабсорбции осмотически свободной воды (рис. 5). Это обусловлено действием нонапептида на разные подтипы V-рецепторов, стимуляция которых зависит от концентрации гормона в крови [12, 13].

Сиюминутная концентрация нонапептида в крови после инъекции зависит от объема внеклеточной жидкости, в которой он распределяется, и одновременного действия на процесс ряда факторов: 1) скорости расщепления нонапептида, что определяет полупериод его жизни; 2) локуса действия гормона в клетке канальца почки – базолатеральная либо люминальная мембрана, поскольку V-рецепторы выявлены на обеих мембранах; 3) соотношения разных подтипов V-рецепторов в мембранах клеток разных частей канальцев в каждой из популяций нефронов в почках. В конце концов, это находит выражение в виде увеличения реабсорбции осмотически свободной воды, усилении экскреции ионов натрия, осмотически активных веществ, что функционально проявляется в более эффективном восстановлении осморегуляции у животных при действии инъекцированного нонапептида.

Нонапептиды нейрогипофиза влияют на транспорт Na^+ и воды не только в почке, но и в других осморегулирующих органах позвоночных животных. У амфибий АВТ увеличивает проницаемость для воды и регулирует транспорт Na^+ клетками кожи и мочевого пузыря бесхвостых амфибий [14]. В почке млекопитающих АВП усиливает реабсорбцию Na^+ при участии V_2 -рецепторов [15], в то же время АВП и АВТ в более высоких дозах вызывают выраженный натрийурез, действуя на V_{1a} -рецепторы [16, 17].

Смена АВТ на АВП была связана и с появлением высокого уровня осмотического концентрирования мочи у эндотермных позвоночных. Отчасти у птиц, но преимущественно у млекопитающих, нонапептиды нейрогипофиза, сохраняя высокую функциональную активность, действуют на почку в иных условиях, исходя из их предназначения для физико-химической стабильности крови. Появление эндотермных позвоночных (птицы, млекопитающие) сопровождалось формированием системы осмотического концентрирования мочи, которой не было у представителей других классов позвоночных. Работу этой системы регулирует антидиуретический гормон. Так как у всех позвоночных, кроме теплокровных, осмоляльность мочи не превышает осмоляльности сыворотки крови, следовательно, концентрация основного осмотически активного компонента сыворотки крови – Na^+ не может быть больше его концентрации в выделяе-

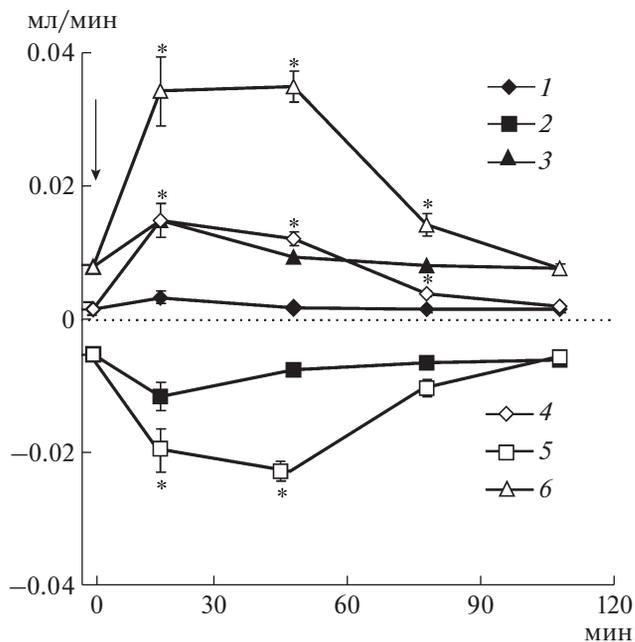


Рис. 5. Клиренс осмотически активных веществ, диурез, клиренс осмотически свободной воды при инъекции аргинин-вазопрессина (АВП) и аргинин-вазотоцина (АВТ) без ВН. По оси абсцисс – время опыта, мин; по оси ординат – диурез (V), мл/мин; выведение осмотически активных веществ (C_{Osm}), мл/мин; выведение осмотически свободной воды (C_{H_2O}), мл/мин. При инъекции АВП: 1 – V; 2 – C_{H_2O} ; 3 – C_{Osm} . При инъекции АВТ: 4 – V; 5 – C_{H_2O} ; 6 – C_{Osm} . Стрелка – инъекция 0.1 нмоль на 100 г массы тела АВП и АВТ, * $p < 0.05$ достоверность при сравнении с эффектом АВП.

мой моче. Поэтому должны быть синхронизированы объем выделяемой мочи и количество экскретируемого Na^+ , что очень важно для контроля объема внеклеточной жидкости, общего содержания в ней Na^+ , и, в конечном счете, гемодинамики. Иное дело у млекопитающих, где осмоляльность мочи может быть значительно выше осмоляльности крови. В этом случае натрийуретический эффект нонапептида мог бы привести к существенным изменениям баланса Na^+ и вызвать нарушение объема внеклеточной жидкости, оказать негативное влияние на циркуляцию крови.

Поясним сказанное, так как почка млекопитающих может выделять осмотически концентрированную мочу, то в ней может быть в несколько раз выше концентрация Na^+ , чем в крови. Становится необходимым не только строгий контроль объема внеклеточной жидкости, но и концентрации в ней натрия, и, следовательно, общего количества Na^+ в организме. Решить проблему позволило бы, по-видимому, создание системы более динамичной регуляции водно-солевого обмена. При однократном

прохождении крови по сосудам почки профильтрованный АВП поступает в просвет канальца. Гормон может взаимодействовать с V-рецепторами люминальных мембран клеток нефрона и оказывать эффект. Часть АВП захватывается клетками эпителия проксимального канальца, подвергается гидролизу, все аминокислоты реабсорбируются и вновь используются для построения новых молекул, в том числе и АВП, часть гормона экскретируется с мочой. У млекопитающих возникает потребность в более быстрой регуляции, чем у других позвоночных, поскольку у теплокровных выше скорость биохимических реакций в соответствии с Q_{10} . Появление АВП вместо АВТ дает преимущество при адаптации к разным экологическим условиям: удается без изменения компонентов системы, но обеспечивая высокую скорость подгонки нужной концентрации данного гормона в крови, приспособиться к складывающейся ситуации при адаптации к разным условиям водно-солевого режима. Такой подход позволил сохранить принципиально ту же систему регуляции, но ускорил смену концентрации гормона в крови при более быстром разрушении секретированного гормона и секреции в кровь необходимого, иногда такого же, количества нонапептида, в соответствии с сиюминутными потребностями организма. Все это обеспечила мутация, которая привела к замене изолейцина на фенилаланин в 3-м положении кольцевой части молекулы АВТ и его преобразовании в АВП. В итоге в гипофизе млекопитающих основным гормоном стал вазопрессин, который сменил вазотонин.

Смена химического строения нонапептида касается одного из элементов этой системы в ходе эволюции. Осуществление разных функций, обеспечиваемых одним нонапептидом, было решено природой, благодаря возникновению разных подтипов V-рецепторов. Их стимуляция зависит от разных концентраций гормона в крови, что решает проблему селективности эффекта. Суть в том, что даже при такой модификации (смена АВТ на АВП) разные подтипы V-рецепторов, локализованные в плазматической мембране одной клетки, будут по-разному включаться в регуляцию функции в зависимости от концентрации гормона в крови. Это касается V_{1a} -, V_{1b} - и V_2 -рецепторов. Известно, что они имеются в мембранах клеток дистального сегмента нефрона, толстого восходящего отдела петли Генле и собирательных трубок [15, 18], V_{1a} -рецепторы также локализованы в клетках стенок сосудов [13].

В экспериментах с микропункцией нефрона и на изолированных канальцах было показано, что АВП увеличивает реабсорбцию Na^+ , стимулируя V_2 -рецепторы [19]. В значительных концентрациях АВП приводит к усилению экскреции Na^+ [20–24]. Это обусловлено тем, что АВП в зависимости от дозы вызывает два противоположно направленных

эффекта на транспорт Na^+ : 1) увеличение реабсорбции Na^+ , при активации V_2 -рецепторов, и его аккумуляцию в мозговом веществе почки для повышения осмотического концентрирования; 2) увеличение натрийуреза при стимуляции V_{1a} -рецепторов. Ранее нами было показано, что величина экскретируемого почкой Na^+ при селективной стимуляции V_{1a} -рецепторов сопоставима с эффектом фуросемида [25]. Такой силы натрийуретический эффект может вызвать блокада функции Na, K, 2Cl-котранспортеров, которые локализованы в толстом восходящем отделе петли Генле. При блокаде V_{1a} -рецепторов натрийуретический эффект нонапептидного регулятора прекращается [10, 23].

Данные настоящей работы дают основание высказать предположение о биохимических механизмах отличий участия АВП и АВТ в регуляции функций и предпочтительности АВП для млекопитающих. В опытах с введением равных количеств этих нонапептидов крысам видно, что выделение АВТ почкой длится дольше, чем АВП. Это означает, что он медленнее расщепляется, дольше сохраняется в крови и дольше оказывает физиологическое действие, в том числе на реабсорбцию воды и экскрецию ионов почкой, регуляция при участии АВТ становится более инертной. В то же время смену концентрации гормона в крови можно рассматривать как важный фактор эффективности обеспечения гомеостаза. Поэтому столь существенный фактор в системе регуляции, как удаление гормона из крови и секреция в нее в данный момент времени нужных его количеств, позволяет строго контролировать гомеостатические параметры организма. Изменение осмоляльности сыворотки крови затрагивает функции всех клеток млекопитающих, поскольку от концентрации АВП зависит осмоляльность внеклеточной жидкости, а оттого объем каждой клетки. Этот фактор влияет на ряд функций различных органов и систем, прежде всего нейронов мозга.

Проведенный анализ показывает, сколь существенное значение в структуре эволюционной физиологии [26] может иметь предлагаемый в данной работе новый метод исследований эволюции функций с изучением эффекта утраченных гормонов для понимания развития и становления систем регуляции. Иными словами, изучение эффекта ранее действовавших физиологически активных веществ у животных для организмов последующих уровней эволюционного развития. Нельзя не обратить внимание на многоплановость решения проблем эволюции функций на примере водно-солевого гомеостаза у млекопитающих. Одна из линий развития касалась смены нонапептида [1], другая линия касается эволюции рецепторов вазопрессина и окситоцина [27]. Данные настоящего исследования позволяют проникнуть в смысл перемен со-

стояния функции, к которым привели отобранные эволюцией варианты развития.

Таким образом, АВТ и АВП в почке крыс вызывают в зависимости от концентрации как снижение, так и увеличение реабсорбции Na^+ ; как возрастание экскреции жидкости, так и усиление реабсорбции осмотически свободной воды. Эти эффекты зависят от влияния на разные подтипы V-рецепторов, активируемые в зависимости от концентрации гормона в сыворотке крови. Предложенный в настоящем исследовании метод определения концентрации АВТ в условиях практически полного подавления секреции АВП может быть применен и для измерения эффекта других аналогов вазопрессина и вазотоцина, которые имеют сходное строение с АВП. Используемый прием позволяет выявить физиологические эффекты нонапептида, и также может иметь широкое применение, когда физиологическим путем временно удается полностью подавить секрецию гормона и на этом фоне определить эффект иных регуляторных молекул подобного действия.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН № 43 (№ гос. регистрации АААА-А18-118013190199-1) и при поддержке гранта РФФИ № 17-04-01027.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bentley P.J. Endocrines and osmoregulation. A comparative account in vertebrates. Berlin, 2002.
2. Наточин Ю.В. Эволюция осморегуляции у позвоночных // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 1999. Т. 85. № 4. С. 582–593.
3. Donaldson Z.R., Young L.J. Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality // Science. 2008. Vol. 322. №. 5903. P. 900–904.
4. Caldwell H.K. Oxytocin and vasopressin: powerful regulators of social behavior // Neuroscientist. 2017. doi: 10.1177/1073858417708284
5. Acher R., Chauvet J., Rouille Y. Dynamic processing of neuropeptides // J. Mol. Neurosci. 2002. Vol. 18. № 3. P. 223–228.
6. Banerjee P., Joy K.P., Chaube R. Structural and functional diversity of nonapeptide hormones from an evolutionary perspective: A review // Gen. Comp. Endocrinol. 2017. V. 241. P. 4–23. doi: 10.1016/j.ygcen. 2016.04.025.
7. Wallis M. Molecular evolution of the neurohypophysial hormone precursors in mammals: comparative genomics reveals novel mammalian oxytocin and vasopressin analogues // Gen. Comp. Endocrinol. 2012. V. 179. № 2. P. 313–318.
8. Наточин Ю.В. Почка: Справочник врача. СПб., 1997.
9. Гао Цзе, Наточин Ю.В. Эволюционные преимущества участия вазопрессина вместо вазотоцина в регуляции водно-солевого обмена у млекопитающих // Ж. эвол. биохим. и физиол. 2004. Т. 40. № 2. С. 168–172.
10. Канашикина Т.А., Кузнецова А.А., Шахматова Е.И., Наточин Ю.В. Роль V_{1a} - и V_{2} -рецепторов в механизме физиологического парадокса – увеличение реабсорбции осмотически свободной воды на фоне повышения диуреза // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2006. Т. 92. № 10. С. 1228–1238.
11. Kutina A.V., Golosova D.V., Marina A.S., Shakhmatova E.I., Natochin Y.V. Role of vasopressin in the regulation of renal sodium excretion: interaction with glucagon-like peptide-1 // J. Neuroendocrinol. 2016. V. 28. № 4. doi: .10.1111/jne.12367
12. Bankir L., Bichet D.G., Bouby N. Vasopressin V2 receptors, ENaC, and sodium reabsorption: a risk factor for hypertension? // Am. J. Physiol. Renal Physiol. 2010. V. 299. № 5. P. F917–F928.
13. Koshimizu T.A., Nakamura K., Egashira N., Hiroshima M., Nonoguchi H., Tanoue A. Vasopressin V_{1a} and V_{1b} receptors: from molecules to physiological systems // Phys. Rev. 2012. V. 92. № 4. P. 1813–864.
14. Наточин Ю.В., Чанек К. Методы исследования транспорта ионов и воды. Почечные каналы, кожа, мочевой пузырь. Л., 1976.
15. Mutig K., Paliege A., Kahl T., Jöns T., Müller-Esterl W., Bachmann S. Vasopressin V_2 receptor expression along rat, mouse, and human renal epithelia with focus on TAL // Am. J. Physiol. Renal Physiol. 2007. V. 293. № 4. P. F1166–F1177.
16. Наточин Ю.В., Канашикина Т.А., Шахматова Е.И., Беспалова Ж.Д., Мордцинец Д.Ю., Поляк Я.Л. Влияние аналогов вазотоцина на выведение ионов Na^+ , K^+ , Mg^{2+} почкой крыс // Эксперим. и клин. фармакол. 2008. Т. 71. № 2. С. 32–35.
17. Bankir L. Antidiuretic action of vasopressin: quantitative aspects and interaction between V_{1a} and V_2 receptor-mediated effects // Cardiovasc. Res. 2001. V. 51. P. 372–390.
18. Ecelbarger C.A., Kim G.H., Wade J.B., Knepper M.A. Regulation of the abundance of renal sodium transporters and channels by vasopressin // Exp. Neurol. 2001. V. 171. № 2. P. 227–234.
19. Fenton R., Knepper M. Mouse models and the urinary concentrating mechanism in the new millennium // Physiol. Rev. 2007. V. 87. № 70. P. 1083–1112.
20. Balment R.J., Brimble M.J., Forsling M.L., Musabayane C.T. Natriuretic response of the rat to plasma concentrations of arginine vasopressin within the physiological range // J. Physiol. 1984. V. 352. P. 517–526.
21. Forsling M.L., Judah J.M., Windle R.J. The effect of vasopressin and oxytocin on glomerular filtration rate in the conscious rat: contribution to the natriuretic response // J. Endocrinol. 1994. V. 141. № 1. P. 59–67.
22. Kompanowska-Jezierska E., Emmeluth C., Grove L., Christensen P., Sadowski J., Bie P. Mechanism of vaso-

- pressin natriuresis in the dog: role of vasopressin receptors and prostaglandins // *Am. J. Physiol.* 1998. V. 274. P. 6. Pt 2. P. R1619–1625.
23. *Perucca J., Bichet D.G., Bardoux P., Bouby N., Bankir L.* Sodium excretion in response to vasopressin and selective vasopressin receptor antagonists // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2008. V. 19. № 9. P. 1721–1731.
24. *Kortenoeven M.L., Pedersen N.B., Rosenbaek L.L., Fenton R.A.* Vasopressin regulation of sodium transport in the distal nephron and collecting duct // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2015. V. 309. № 4. P. F280–F299.
25. *Голосова Д.В., Каравашкина Т.А., Кутина А.В., Марина А.С., Наточин Ю.В.* Влияние селективных агонистов V_{1a} , V_2 и V_{1b} рецепторов на транспорт натрия в почке крыс // *Бюл. эксп. биол. и мед.* 2015. Т. 160. № 12. С. 712–715.
26. *Наточин Ю.В.* Эволюционная физиология // *Ж. эвол. биохим. и физиол.* 2017. Т. 53. № 2. С. 139–150.
27. *Paré P., Paixão-Côrtes V.R., Tovo-Rodrigues L., Vargas-Pinilla P., Viscardi L.H., Salzano F.M., Henkes L.E., Borzolini M.C.* Oxytocin and arginine vasopressin receptor evolution: implications for adaptive novelties in placental mammals // *Genet. Mol. Biol.* 2016. V. 39. № 4. P. 646–657.

Differences of the Effect of Arginine-Vasotocin and Arginine-Vasopressin on Rat Kidney in the Evolution of Osmoregulation in Vertebrates

D. V. Golosova^a, E. I. Shakhmatova^a, and Yu. V. Natochin^{a, #}

^a *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St.-Petersburg, Russia*

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

Arginine-vasotocin (AVT) is a hormone common to most vertebrates except mammals where it is replaced by vasopressin. A study of the effect of both nonapeptides of the vasopressin family [AVT and arginine-vasopressin (AVP)] showed that in the rat kidney they are involved in the regulation of renal sodium and solute-free water reabsorption. These effects are mediated by different subtypes of Vreceptors activated by different blood serum concentrations of the hormone. An immunoenzyme assay (ELISA) was proposed to determine AVT concentrations under almost complete inhibition of AVP secretion. When both hormones were administered at equal doses, AVT broke down slower and acted longer than AVP. A high metabolic rate of the nonapeptide in the blood is supposed to be an evolutionary advantage as a tool to upgrade the water–salt balance regulation. The importance of comparing the effects of hormones lost during the evolution of vertebrates as a method to study the evolution of functions is discussed.

Key words: vasotocin, vasopressin, kidney, osmoregulation, solute free water