

УДК 577.175.34: 577.171.6: 575.113.1: 577.322: 577.323

Подтипы рецепторов нонапептидов нейрогипофиза и их функции в почках крысы

А. В. Кутина*, А. А. Макашов, Е. В. Балботкина, Т. А. Каравашкина, Ю. В. Наточин

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, 194223 Россия

*E-mail: kutina_anna@mail.ru

Поступила в редакцию 27.02.2019

После доработки 11.02.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.10943

РЕФЕРАТ Нонапептиды нейрогипофиза вазотоцин и мезотоцин, выявляемые у большинства позвоночных, у млекопитающих заменены вазопрессинном и окситоцином. С использованием биоинформатических методов нами определен спектр подтипов рецепторов этих гормонов у млекопитающих и их физиологические эффекты в почке крыс. Поиск последовательностей, сходных с последовательностями рецептора вазотоцина позвоночных, в протеомах и транскриптомах 9 видов млекопитающих и в геноме крысы выявил три подтипа рецепторов вазопрессина (V_{1a} , V_{1b} , V_2) и один тип рецептора окситоцина. В почке ненаркотизированных крыс, получивших водную нагрузку в объеме 2 мл на 100 г массы тела, выявлены три эффекта вазопрессина: 1) увеличение реабсорбции воды и натрия, 2) возрастание экскреции ионов калия, 3) рост экскреции ионов натрия. Обосновано предположение, что каждый из этих эффектов связан с селективной стимуляцией подтипов рецепторов вазопрессина – V_2 , V_{1b} и V_{1a} – в зависимости от концентрации нонапептида. В экспериментах на ненаркотизированных крысах с водной нагрузкой показано, что инъекция окситоцина снижает реабсорбцию осмотически свободной воды в почке и увеличивает экскрецию ионов натрия. Проанализированы физиологические механизмы реализации обоих эффектов при участии рецептора окситоцина одного типа. Таким образом, спектр активируемых подтипов рецепторов изменяется в зависимости от действующей концентрации гормонов нейрогипофиза, вследствие этого изменяется и преобладающий эффект на функции почек, что обеспечивает точную регуляцию водно-солевого гомеостаза.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА почка, вазопрессин, рецепторы, биоинформатика, экскреция ионов, реабсорбция воды.

ВВЕДЕНИЕ

Нонапептиды нейрогипофиза влияют на функции различных органов и систем у млекопитающих, участвуют в регуляции социального поведения [1]. Среди периферических эффектов этих гормонов важную роль играет регуляция работы почек при поддержании водно-солевого гомеостаза [2]. В нейрогипофизе большинства позвоночных животных секретируются вазопрессин-подобный (вазотоцин, вазопрессин, лизипрессин, фенипрессин) и окситоцин-подобный (окситоцин, мезотоцин, изотоцин, глумитоцин) гормоны [3]. Вазопрессин-подобные пептиды содержат остаток основной аминокислоты в положении 8 (Arg, Lys), а окситоцин-подобные – остаток нейтральной аминокислоты (Leu, Ile, Pro) [4]. Вазопрессин млекопитающих и человека участвует в регуляции функций почек: усиливает реабсорбцию воды, мочевины и натрия [5]. К основным периферическим эффектам окситоцина относятся утеротонический эффект [6]

и стимуляция выведения молока [7]. Введение высоких доз вазопрессина и окситоцина выявляет их натрийуретическое действие [8–10], а инъекции низких доз окситоцина оказывают гидроуретическое действие [11]. Ранее мы показали, что введение млекопитающим вазотоцина (гормон нейрогипофиза у других классов позвоночных) вызывает интенсивный натрийурез, существенно превышающий эффект вазопрессина и окситоцина [12]. Синтезированы и охарактеризованы аналоги вазотоцина с селективным антидиуретическим и натрийуретическим действием (повышение экскретируемой фракции натрия с 0.5% до 15–20%) [13]. Выявлены также пептиды, усиливающие выведение почками ионов калия [12]. В ходе эволюции позвоночных изменялась структура как гормонов нейрогипофиза, так и соответствующих им рецепторов. Принципиально важно понять, при участии рецепторов каких подтипов опосредуются эффекты нонапептидов и их аналогов

в почке. Связаны ли они с действием пептида на известные подтипы рецепторов вазопрессина (V_2 , V_{1a} , V_{1b}) и окситоцина [14] или существуют другие подтипы рецепторов? Описан новый рецептор мыши, имеющий более высокое сродство к вазотоцину, чем к вазопрессину и окситоцину [15]. Задача настоящей работы заключалась в том, чтобы, используя методы биоинформатики, определить спектр подтипов рецепторов к пептидам семейства вазопрессина и окситоцина у млекопитающих, а также выявить возможность воспроизведения эффектов, оказываемых аналогами вазотоцина, при введении крысам различных доз их природных гормонов – вазопрессина и окситоцина.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Гомологи гена вазотоцинового рецептора искали в геноме крысы (*Rattus norvegicus*), в протеомах и транскриптомах 9 видов млекопитающих: крысы, человека (*Homo sapiens*), шимпанзе (*Pan troglodytes*), орангутана (*Pongo abelii*), белощекого гиббона (*Nomascus leucogenys*), собаки (*Canis lupus familiaris*), мыши (*Mus musculus*), домового опоссума (*Monodelphis domestica*), уткуноса (*Ornithorhynchus anatinus*), доступных на ресурсе Genome (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>). Список геномных сборок приведен в табл. 1. Для поиска гомологов использовали программы nHMMER и rHMMER, построенные на скрытых марковских моделях, а также оригинальный программный код на языке shell [16]. Степень гомологии оценивали по значениям e-value и score, которые автоматически присваивались программой на основании внутренних алгоритмов. В качестве запроса использовали марковскую модель, построенную по аминокислотным и нуклеотидным последовательностям рецепторов вазотоцина (V_{1a} -подтип) различных позвоночных. Пороговое значение e-value выбрано на уровне $1e^{-3}$ для аминокислотных выравниваний и $1e^{-10}$ – для нуклеотидных согласно опубликованной методике [17]. Последовательности, не удовлетворяющие данным параметрам, в дальнейшем не рассматривали. Все найденные последовательности ранжировали в порядке уменьшения показателя сходства с запрашиваемой последовательностью (индекс Score) и представляли в графическом виде для выбора порогового уровня. В ходе дальнейших исследований использовали все последовательности с индексом Score больше порогового, а также по две последовательности ниже порогового уровня у каждого вида млекопитающих. Полученные последовательности были сохранены в одном файле в формате *fasta*. Множественные выравнивания найденных гомологов выполнены с помощью программы MAFFT [18]. Алгоритм L-INS-i выбран нами как наи-

Таблица 1. Список версий использованных протеомов, транскриптомов и геномов

Вид	Версия
<i>Homo sapiens</i>	GRCh38.p12
<i>Pan troglodytes</i>	Clint_PTRv2
<i>Pongo abelii</i>	Susie_PABv2
<i>Nomascus leucogenys</i>	Nleu_3.0
<i>Canis lupus familiaris</i>	CanFam3.1
<i>Rattus norvegicus</i>	Rnor_6.0
<i>Mus musculus</i>	GRCh38.p6
<i>Monodelphis domestica</i>	MonDom5
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	Ornithorhynchus_anatinus-5.0.1

более подходящий для работы с базами, содержащими менее 200 последовательностей [19]. *Fasta*-файл с результатами множественного выравнивания для дальнейшего анализа преобразовывали в *nexus*-файл с помощью web-инструмента Alignment Format Converter (<http://www.ibi.vu.nl/programs/convertalignwww/>). С использованием программы MrBayes и файла в формате *nexus*, полученного на прошлом этапе, выполнена байесовская реконструкция филогении гомологов [20]: произведено 300 000 генераций в случае аминокислотных последовательностей и 20 000 в случае нуклеотидных последовательностей. Число генераций выбрано на основе предварительно проведенного вычислительного эксперимента, где после всех генераций стандартное отклонение вероятностей расщепления было ниже 0.01 (значение выбрано на основании опубликованных данных [20]). Кладограмма с апостериорными вероятностями для каждого расщепления и филограмма со средней длиной ветвей были сгенерированы и записаны в *nexus*-файл. Визуализацию и редактирование деревьев выполняли инструментом FigTree (github.com/rambaut/figtree/). Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей рецепторов вазопрессина, окситоцина и нейропептида S крысы выполнено с помощью Clustal Omega 1.2.4 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Физиологические эксперименты выполнены на самках крыс линии Вистар весом 180–230 г. В каждой серии использовали 10 животных. Крысы получали стандартный гранулированный корм («Мелькомбинат», Россия) и имели свободный доступ к воде. С вечера накануне эксперимента крыс не кормили, но сохраняли доступ к воде. Содержание животных и проведение экспериментов соответствовали российским и международным правилам работы с лабораторными животными. В дни экспериментов у животных определяли фазы эстрального цикла с помощью микроскопического анализа мазков

влагалищных смывов. Соотношение фаз проэструс, эструс, метэструс и диэструс составило в среднем 15 ± 6 , 11 ± 5 , 26 ± 6 и $48 \pm 7\%$ соответственно. Вазопрессин и окситоцин (Sigma-Aldrich, США), селективные агонисты окситоциновых (Carbetocin, Tocris, Великобритания) и V_{1a} -рецепторов (Phe², Ile³, Orn⁸-вазопрессин, Bachem, США) в дозах 0.005, 0.015, 0.15 нмоль на 100 г массы тела (м.т.) вводили внутримышечно на фоне водной нагрузки (вода в объеме 2 мл на 100 г м.т. через зонд в желудок), которую использовали для подавления секреции вазопрессина. Контролем служили животные с водной нагрузкой и внутримышечной инъекцией 0.1 мл физиологического раствора на 100 г м.т. Селективные антагонисты окситоциновых (Pmp¹-Tyr(Me)²-Thr⁴-Orn⁸-des-Gly-NH₂⁹-вазотоцин, Bachem, США) и V_{1a} -рецепторов (Pmp¹-Tyr(Me)²-вазопрессин, Bachem, США) вводили в дозе 2 нмоль на 100 г м.т. внутрибрюшинно одновременно с вазопрессином в дозе 0.15 нмоль на 100 г м.т. на фоне водной нагрузки. Крыс помещали в специальные индивидуальные клетки для сбора проб мочи при спонтанных мочеиспусканиях. Осмоляльность мочи определяли на микроосмометре Advanced Instruments 3300 (США), концентрацию ионов натрия и калия – на пламенном фотометре Sherwood-420 (Великобритания). Показатели экскреции ионов и реабсорбции воды рассчитывали за период 60 мин от начала эксперимента. При расчете реабсорбции осмотически свободной воды использовали усредненное значение осмоляльности сыворотки крови у крыс после водной нагрузки, равное 288 ± 1 мОсм/кг H₂O. Во всех сериях экспериментов эффекты гормонов и агонистов их рецепторов наблюдали на протяжении всего эстрального цикла, поэтому значения показателей функции почек у крыс усредняли без учета фазы цикла. Показатели функции почек нормировали на 100 г м.т. Все данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего. Сравнение групп проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующим использованием *t*-теста с поправкой Бонферрони. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Поиск подтипов рецепторов вазопрессина и окситоцина методами биоинформатики

Найденные последовательности, сходные с рецептором вазотоцина, ранжировали в порядке убывания индекса Score (рис. 1). Показано, что у последовательностей с наилучшим совпадением с запрашиваемой индекс Score составил более 600, далее степень сходства резко снижалась, и у большинства последовательностей индекс равен примерно 100. В качестве

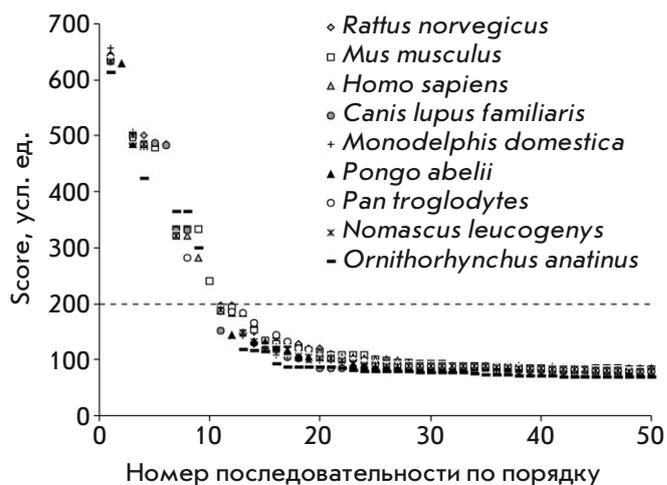


Рис. 1. Распределение найденных последовательностей по уровню сходства (Score) с усредненным рецептором вазотоцина. Пунктиром показано пороговое значение для дальнейшего анализа

порогового значения был принят уровень 200 (рис. 1). Последовательности, у которых Score был выше порогового, анализировали вручную по базе данных NCBI. Все обнаруженные белки, сходные на уровне первичной структуры с рецептором вазотоцина, аннотировали как рецепторы окситоцина и вазопрессина различных подтипов. Из дальнейшего анализа исключали дублирующие последовательности (в том числе мутантные аллельные варианты). Найденны актуальные версии ряда последовательностей, обновленных в базах данных.

У всех изученных видов млекопитающих выявлены четыре белка-рецептора семейства вазопрессина и окситоцина: V_{1a} (AVPR1A), V_{1b} (AVPR1B), V_2 (AVPR2) и рецептор окситоцина (OXTR). Исключение составили три случая. Во-первых, среди последовательностей *P. abelii*, отобранных по уровню Score, не найден V_2 -рецептор. Просмотр результатов поиска выявил последовательность XP_009233694.1 (Score = 144.7) – фрагмент V_2 -рецептора. В базе данных NCBI найдена ее обновленная версия XP_024096521.1. Во-вторых, V_2 -рецептор не найден в протеоме *M. domestica*. Ручной поиск в базе NCBI также не выявил рецептор вазопрессина данного подтипа у этого вида опоссумов, но найден белок, аннотированный как фрагмент V_2 -рецептора у *D. virginiana*. В-третьих, у *R. norvegicus* обнаружены две аминокислотные последовательности, аннотированные как V_{1b} -рецептор вазопрессина (NP_001276729.1 и NP_058901.3).

Наиболее сходными с белками-рецепторами семейства вазопрессина у всех изученных видов

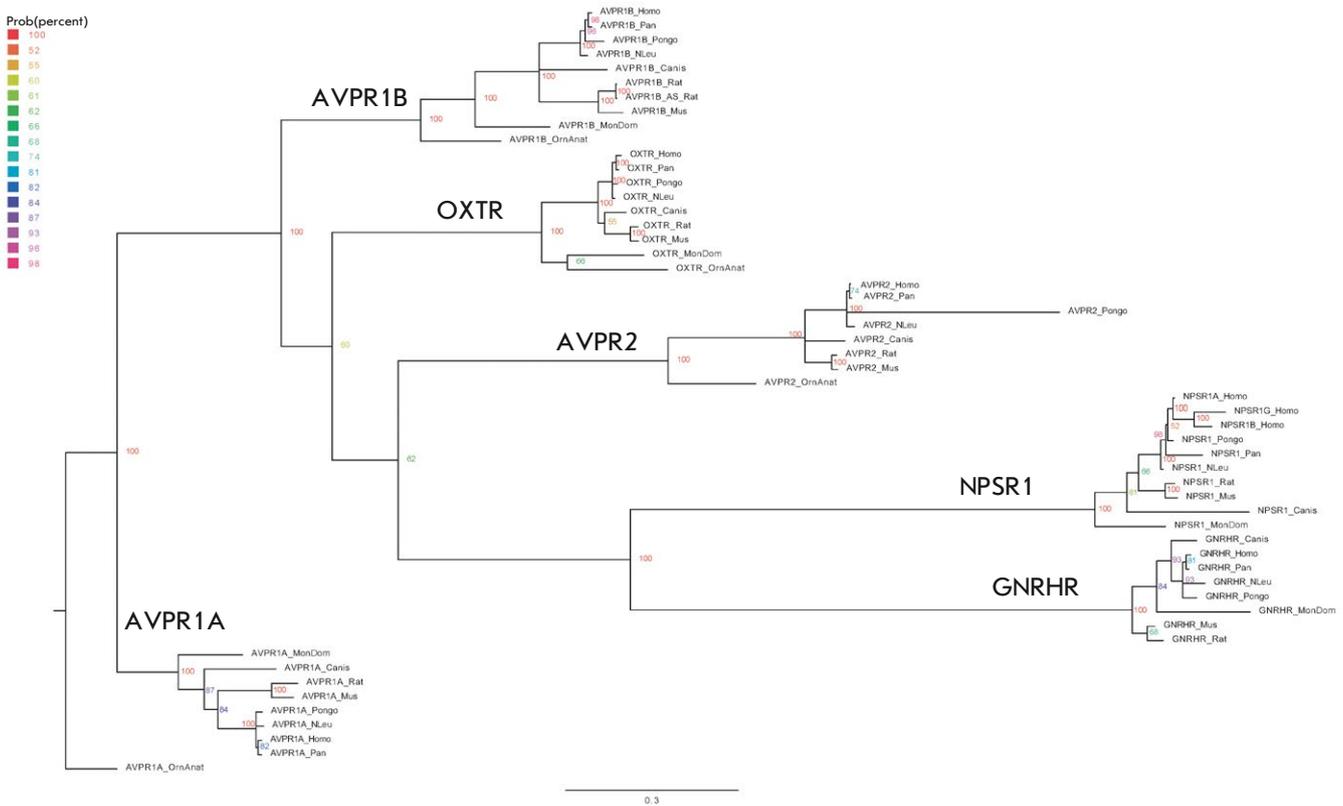


Рис. 2. Филограмма аминокислотных последовательностей рецепторов вазопрессина, окситоцина, нейропептида S и гонадотропин-рилизинг гормона у млекопитающих

оказались рецепторы нейропептида S (NPSR1) и гонадотропин-рилизинг гормона (GNRHR). Аминокислотные последовательности этих белков включены в построение филограмм наряду со всеми найденными последовательностями рецепторов вазопрессина и окситоцина. Обозначения и номера аминокислотных последовательностей белков, использованных для построения филограмм, приведены в табл. 2. Построение филограммы (рис. 2) показало, что все последовательности с индексом Score выше 200 четко разделились на четыре клады, соответствующие рецепторам вазопрессина V_{1a} , V_{1b} и V_2 -подтипов и рецептору окситоцина. Отдельные клады, сестринские по отношению к V_2 -рецепторам, сформировали рецепторы нейропептида S и гонадотропин-рилизинг гормона. Анализ опубликованной ранее последовательности кДНК «вазотоцинового» рецептора мыши (GenBank: AK033957) [15], а также предсказанной по ней структуры белка показал их соответствие нуклеотидной и аминокислотной последовательностям рецептора нейропептида S. На рис. 3 представлены результаты множественного выравнивания последовательностей рецепторов вазопрессина, окситоцина и рецептора нейропептида S крысы. Показано, что по аминокислотной последователь-

ности рецепторы вазопрессина и окситоцина идентичны друг другу примерно на 50%: V_{1a} -рецептор имеет 54% гомологии с V_{1b} -рецептором, 51% – с окситоциновым и 46% – с V_2 -рецептором. Рецептор нейропептида S имеет меньшее сходство с рецепторами вазопрессина (с V_{1a} – 33, с V_{1b} – 33, с V_2 – 30%) и окситоцина (32%), он содержит радикальные замены в лигандсвязывающих участках (рис. 3).

В транскриптомах 9 видов млекопитающих проведен поиск нуклеотидных последовательностей, сходных с транскриптом гена рецептора вазотоцина. Выявленные таким образом мРНК полностью соответствовали белкам, обнаруженным на предшествующем этапе исследования в протеоме. У *R. norvegicus* найдены две разные последовательности мРНК, кодирующие рецептор вазопрессина V_{1b} -подтипа: NM_017205.3 и NM_001289800.1. У *M. domestica*, как и при поиске по протеому, не найдена последовательность, соответствующая V_2 -рецептору. Наиболее близкими к нуклеотидной последовательности мРНК рецептора вазотоцина оказались мРНК рецепторов гонадотропин-рилизинг гормона и нейропептида S. Обозначения и номера нуклеотидных последовательностей, использованных для построения филограмм, приведены в табл. 2. На рис. 4 представлена фило-

Таблица 2. Идентификаторы нуклеотидных последовательностей мРНК и аминокислотных последовательностей белков-рецепторов млекопитающих, схожих с рецептором вазотоцина позвоночных

Вид	Белок	мРНК	Обозначение на филограммах
<i>Homo sapiens</i>	NP_000697.1	NM_000706.4	Avpr1a_Homo
	NP_000698.1	NM_000707.4	Avpr1b_Homo
	NP_000907.2	NM_000916.3	Oxtr_Homo
	NP_000045.1	NM_000054.4	Avpr2_Homo
	NP_997055.1	NM_207172.1	Npsr1A_Homo
	NP_001287864.1	NM_001300933.1	Npsr1G_Homo
	NP_997056.1	NM_207173.1	Npsr1B_Homo
<i>Pan troglodytes</i>	NP_000397.1	NM_000406.2	Gnrhr_Homo
	XP_016778615.1	XM_016923126.2	Avpr1a_Pan
	XP_525039.2	XM_525039.6	Avpr1b_Pan
	XP_001144020.1	XM_001144020.5	Oxtr_Pan
	XP_001145732.2	XM_009439827.2	Avpr2_Pan
	XP_024213409.1	XM_024357641.1	Npsr1_Pan
<i>Pongo abelii</i>	XP_526608.1	XM_526608.5	Gnrhr_Pan
	XP_002823515.2	XM_002823469.3	Avpr1a_Pongo
	XP_002813528.1	XM_002813482.3	Oxtr_Pongo
	XP_024089895.1	XM_024234127.1	Avpr1b_Pongo
	XP_024096521.1	XM_024240753.1	Avpr2_Pongo
	XP_002818110.2	XM_002818064.3	Npsr1_Pongo
<i>Nomascus leucogenys</i>	XP_024101999.1	XM_024246231.1	Gnrhr_Pongo
	XP_003252777.1*	XM_003252729.3	Avpr1a_Nleu
	XP_003272998.1	XM_003272950.3	Avpr1b_Nleu
	XP_012357682.1	XM_012502228.1	Oxtr_Nleu
	XP_003279348.1	XM_003279300.2	Avpr2_Nleu
	XP_003279243.1	XM_003279195.2	Npsr1_Nleu
<i>Canis lupus familiaris</i>	XP_003268473.1	XM_003268425.1	Gnrhr_Nleu
	NP_001185587.1	NM_001198658.1	Avpr1a_Canis
	NP_001185588.1	NM_001198659.1	Oxtr_Canis
	XP_545695.2	XM_545695.3	Avpr1b_Canis
	NP_001003177.1	NM_001003177.1	Avpr2_Canis
	XP_022283280.1	XM_022427572.1	Npsr1_Canis
<i>Rattus norvegicus</i>	NP_001003121.1	NM_001003121.1	Gnrhr_Canis
	NP_444178.2	NM_053019.2	Avpr1a_Rat
	NP_058901.3	NM_017205.3	Avpr1b_Rat
	NP_001276729.1	NM_001289800.1	Avpr1b_Rat
	NP_037003.2	NM_012871.3	Oxtr_Rat
	NP_062009.1	NM_019136.1	Avpr2_Rat
	NP_001100278.1	NM_001106808.1	Npsr1_Rat
<i>Mus musculus</i>	NP_112300.2	NM_031038.3	Gnrhr_Rat
	NP_058543.2	NM_016847.2	Avpr1a_Mus
	NP_036054.1	NM_011924.2	Avpr1b_Mus
	NP_001074616.1	NM_001081147.1	Oxtr_Mus
	NP_062277.1	NM_019404.2	Avpr2_Mus
	NP_783609.1	NM_175678.3	Npsr1_Mus
<i>Monodelphis domestica</i>	NP_034453.1	NM_010323.2	Gnrhr_Mus
	XP_001372716.1	XM_001372679.3	Avpr1a_MonDom
	XP_001372263.1	XM_001372226.2	Avpr1b_MonDom
	XP_016279957.1	XM_016424471.1	Oxtr_MonDom
	XP_001365641.2	XM_001365604.4	Npsr1_MonDom
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	XP_001362289.1	XM_001362252.2	Gnrhr_MonDom
	XP_001520677.1	XM_001520627.2	Avpr1a_OrnAnat
	XP_007660695.1	XM_007662505.1	Oxtr_OrnAnat
	XP_007663815.1	XM_001520222.2	Avpr2_OrnAnat
	XP_007658276.1*	XM_007660086.1	Avpr1b_OrnAnat
	XP_016082441.1* #	XM_016226955.1	Npsr1_OrnAnat
	NP_001116830.1	NM_001123358.1	Gnrhr_OrnAnat

Примечание: * – неполная последовательность, # – не обнаружена при автоматическом поиске, добавлена вручную из базы NCBI.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

AVPR1a	MSFPRGSQDRSVGNSSPWWPLTTEGSNGS-QEAA-----LGEGDSPLG DVRNEELAKLE	54
AVPR1b	-----MNSEPSWTATPSPGGTL-PVP-----N-ATTPWLGRDEELAKVE	37
OXTR	-----MEGTPAANWSVELDLGSGV-PPGEE-----GN-RTAGPPQRNEALARVE	42
AVPR2	-----MLLVS----TVSAVPGLFS-PPSSP-----SNSSQEELDDDRDPLLVAE	40
NPSR	--MPANLTE---GSFHANQT---VPMLDSSPVACTEIVTFTEALEAEWGSFYSSFKTEQ	52
	: :	
AVPR1a	I AVLAVIFVVAVLGNSSVLLALHRTPR--KTSRMHLFIRHLSLADLAVAFFQVLPCLCWD	112
AVPR1b	IGILATVIVLATGGNLAVLLTLGRHGH--KRSRMHLFVHLHALTDLGVALFQVLPCLLWD	95
OXTR	VAVLCLILFLALSGNACVLLALRTRH--KHSRLEFFMKHLSIADLVVAVFQVLPCLLWD	100
AVPR2	LALLSTIFVAVALSNGLVLGALIRRGRRGRWAPMHVFI SHLCLADLAVAFQVLPCLAWD	100
NPSR	LITLWVLFVFTIVGNSVVLFWSTWRR---KRKSRMTFFVTQLAITDSFTGLINILTDI IWR	109
	: * : . . * ** :	
AVPR1a	I TYFRFGPDWLCRVVKHLQVFMFASAYMLVMTADRYIAVCHPLKTLQQPARR-SRLMI	171
AVPR1b	I TYRFQGSDDL CRAVKYLQVLSMFASTYMLLAMTLDRYLAVCHPLRSLRQPSQS-TYPLI	154
OXTR	I TFRFYGPDLLCRLVKYLQVGMFASTYLLLSMLDRCLAICQPLRSLRRRTDR-L--AV	157
AVPR2	A TDRFHGPDALCRAVKYLQVGMYASSYMLAMTLDRHRAICRPMLAYRHGGGARWNRPV	160
NPSR	F TGD FMAPDLVCRIVRYLQVLLYASTYVLVLSLSDRYHAIVYPMKFLQGEKQA--KVL I	167
	* * . * : ** * : ** : : ** * : * : :	
AVPR1a	A TSWVLSFILSTPCYFIFSVIEIEVNNGTQDCWATFIQPWGTRAYVTWMTSGVFPVAPV	231
AVPR1b	A APWLLAAIILSLPCVFI FSLREVI--QSGVLDCWADFYFSWGPRAYITWTMTAIFVLPV	212
OXTR	L GTWLGCLVASAPCVHIFSLREVA----DGVFDCWAVFIQPWGPKAYVTWITLAVYIVPV	213
AVPR2	L VAWAFSLLLSLPCLFIFAQRDVG--NGSGVFCWARFAEPWGLRAYVTWIALMVFVAPA	218
NPSR	G IAWSLSLFSLIPTLIIFGKRTLS----NGEVQCWALWPDDSYWTPTYMTIVAFVLYFIPL	223
	* . : * * ** :	
AVPR1a	VVLGTCYGFICYHIWRNIRGKTAS-SRHSKGDKGSGEAVGPFHKGLLVTPCVSSVKSISR	290
AVPR1b	AVLTACYGLICHEIYKNLKVKTQA-GREERRGRTWTKSSSSAATRGLPSRVSSISTISR	271
OXTR	I VLAACYGLISFKIWQNLRLKTA-AAAAAEGND-----AAGGAGRAALARVSSVKLISK	267
AVPR2	L GIAACQVLI FRIHASLVPGPSE RARRRRGRRTGSP-----SEGAHVSA	264
NPSR	T IISVIYGLVIRTIWIKSKAHETVIS-----NCSDGELCCSYNRLG LISK	267
	: . : : * . :	
AVPR1a	A KIRTVKMTFVIVSAYILCWAPFFIVQMWSVVDENFIWTDSENPSITITALLASLNCCN	350
AVPR1b	A KIRTVKMTFVIVLAYIAQWAPFFSVQMWSVVDENAPNEDSTNVAFTISMLLGNLSSCCN	331
OXTR	A KIRTVKMTFIIIVLAFIVCWTPFFVQMWSVVDVNAPEAS---AFIIAMLLASLNCCN	324
AVPR2	A MAKTVRMTLVIVIVYVLCWAPFFLVQLWA AWDPEAPLER--PPFVLLMLLASLN SCTN	321
NPSR	A KIKAIKYSIVIIILAFICQWSPYFLDMLDNFNLLPD-TKERFYASV IONLPALNSAIN	326
	* : : : : * : : * : * : * : * : * : *	
AVPR1a	PWIYMFSGHLLQDCVQSFPCCHSMAQKFAKDDSDSMSRRQTSYSNNRSPTNSTGMWKDS	410
AVPR1b	PWIYMGFNSRLLPRSLSHHACCTGSKPQVHRQLST-----SSLTSRRTLLTHACGS	383
OXTR	PWIYMLFTGHLFHELVQRFFCCSARYLKGSRPGETSVSKKNSSTFVLSRRSSSQRSCSQ	384
AVPR2	PWIYASFSSVSSEL-RSLLCCAQRHTTHSLGPQDE-SCATASS-----LMKDT	369
NPSR	P LIYCIFSGSLCSPCKVQ-----RSQD-----SRMTYRERSER-----HEM-QILSK	367
	* ** * . . :	
AVPR1a	PKSSKSI-----RFIPVST-----	424
AVPR1b	PTLRLSLNLSLRAKPRPAGSLKDLEQVDGEATMETSIF	421
OXTR	PSSA-----	388
AVPR2	PS-----	371
NPSR	PEFI-----	371
	*	

Рис. 3. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей рецепторов вазопрессина, окситоцина и нейропептида S крысы. Серой заливкой выделены трансмембранные домены 1–7, рамкой обведены участки связывания рецептора с лигандами

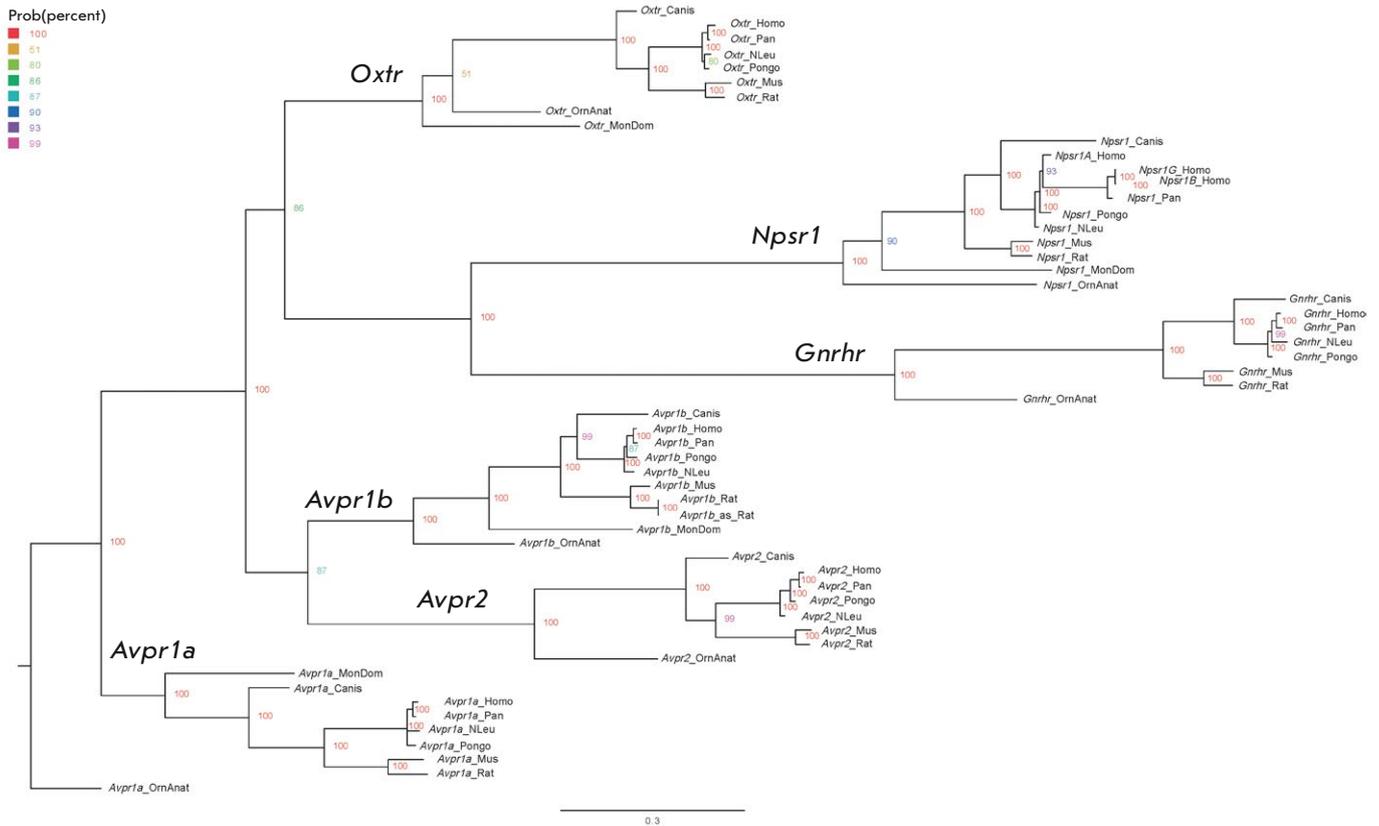


Рис. 4. Филограмма нуклеотидных последовательностей мРНК рецепторов вазопрессина, окситоцина, нейропептида S и гонадотропин-рилизинг гормона у млекопитающих

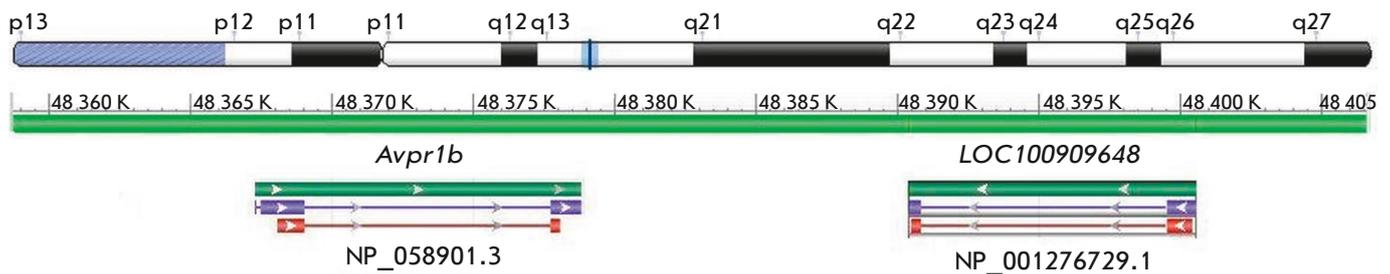


Рис. 5. Дупликация гена V_{1b} -рецептора в хромосоме 13 у крысы *Rattus norvegicus* (Chr 13 (NC_005112.4): 48 358 720 – 48 406 569)

грамма мРНК рецепторов семейства вазопрессина, которая в целом оказалась сходной с филограммой белков. В геноме крысы выявлено пять локусов, сходных с геном рецептора вазотоцина (табл. 3). Обнаружена дупликация гена V_{1b} -рецептора на длинном плече хромосомы 13 (рис. 5). Белки, кодируемые этими генами, полностью идентичны.

Физиологические эффекты вазопрессина и окситоцина на почки крыс

В опытах на крысах показано, что эффект вазопрессина на экскрецию ионов натрия, калия или ре-

абсорбцию осмотически свободной воды зависит от дозы гормона. Этот неонапептид вводили животным на фоне водной нагрузки, которая на время угнетала секрецию вазопрессина нейрогипофизом. Инъекция вазопрессина в дозе 0.005 нмоль на 100 г м.т. оказала антидиуретическое действие. Несмотря на водную нагрузку, моча животных была осмотически концентрированной (осмоляльность составила 546 ± 31 мОсм/кг H_2O ; 89 ± 14 мОсм/кг H_2O в группе без вазопрессина), происходила реабсорбция осмотически свободной воды в канальцах почек (рис. 6). Экскреция ионов калия была такой же, как в контро-

Таблица 3. Результаты поиска генов, сходных с нуклеотидной последовательностью рецептора вазотоцина, в геноме крысы *Rattus norvegicus*

Score	Хромосома (нить)	Начало – конец гена, п.н.	ID транскрипта	ID белка	Длина белка, а.о.
<i>Avpr1a</i> (ID гена – ENSRNOG0000004400)					
852.5	7(-)	67341080-67345308	ENSRNOT0000005829	ENSRNOP0000005829	424
<i>LOC100909648</i> (ID гена – ENSRNOG00000049261)					
500.8	13(-)	48390417-48400632	ENSRNOT00000074204	ENSRNOP00000067252	421
<i>Avpr1b</i> (ID гена – ENSRNOG00000048522)					
500.5	13(+)	48367307-48378831	ENSRNOT00000074512	ENSRNOP00000064689	421
<i>Oxtr</i> (ID гена – ENSRNOG00000005806)					
464.3	4(-)	144403358-144416116	ENSRNOT00000007724	ENSRNOP00000007724	388
<i>Avpr2</i> (ID гена – ENSRNOG00000059862)					
238.2	X(-)	156889410-156891213	ENSRNOT00000091495	ENSRNOP00000071931	371

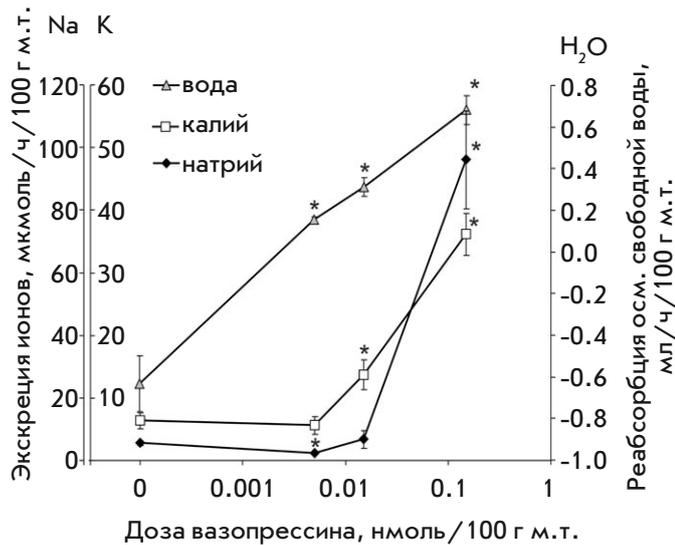


Рис. 6. Влияние внутримышечного введения различных доз вазопрессина на фоне водной нагрузки у крыс на экскрецию почками ионов натрия, калия и реабсорбцию осмотически свободной воды. * – значимость отличий ($p < 0.05$) от контроля (0 нмоль/100 г м.т.)

ле, а выведение ионов натрия уменьшилось вдвое, т.е. вазопрессин в этой дозе оказал антинатрийуретическое действие (рис. 6). Повышение дозы вазопрессина в 3 раза (до 0.015 нмоль на 100 г м.т.) привело к росту реабсорбции осмотически свободной воды, а выведение натрия было таким же, как в контрольной группе. Действие гормона в этой дозе вызывало усиление экскреции ионов калия на 130% (рис. 6), т.е. приводило к селективному калийурезу. При повышении дозы до 0.15 нмоль на 100 г м.т. вазопрессин не только усиливал реабсорбцию осмотически свободной воды,

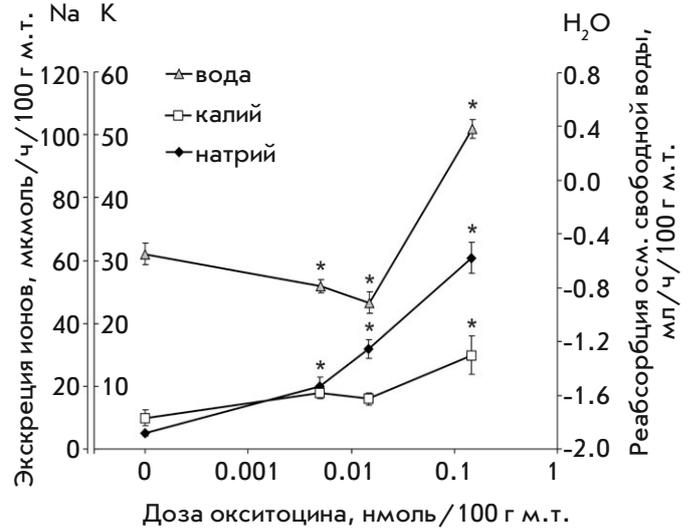


Рис. 7. Влияние внутримышечного введения различных доз окситоцина на фоне водной нагрузки у крыс на экскрецию почками ионов натрия, калия и реабсорбцию осмотически свободной воды. * – значимость отличий ($p < 0.05$) от контроля (0 нмоль/100 г м.т.)

но и повышал выведение одновалентных катионов. При этом наблюдался рост экскреции ионов калия и натрия с преобладанием выведения ионов натрия (рис. 6).

Введение в таких же физиологических условиях окситоцина (0.005 и 0.015 нмоль на 100 г м.т.) привело к усилению диуреза, селективному натрийурезу и уменьшению реабсорбции осмотически свободной воды (рис. 7). Экскреция ионов калия не отличалась от экскреции в контроле. Повышение дозы окситоцина до 0.15 нмоль на 100 г м.т. привело к антидиу-

ретическому эффекту, росту реабсорбции осмотически свободной воды, наряду с ростом экскреции ионов натрия отмечался подъем выведения ионов калия. Экскреция ионов натрия при действии окситоцина была ниже, чем после введения вазопрессина в той же дозе (рис. 6, 7).

Селективный V_{1a} -агонист воспроизвел натрийуретический эффект вазопрессина, при этом экскреция натрия усилилась в значительно большей степени, чем при действии гормона (рис. 8). Блокада V_{1a} -рецепторов полностью препятствовала развитию индуцированного вазопрессином натрийуреза; окситоциновый антагонист не вызывал такого эффекта (рис. 8). При действии окситоцина и агониста его рецепторов в отличие от V_{1a} -агониста усиление экскреции натрия сопровождалось усилением образования осмотически свободной воды (рис. 9).

ОБСУЖДЕНИЕ

В крупноклеточных нейронах гипоталамуса синтезируются различные нонапептиды, которые секретируются в кровь в нейрогипофизе. У большинства млекопитающих это вазопрессин и окситоцин, в то время как у позвоночных других классов – вазотоцин и мезотоцин [4, 21]. Эффекты нонапептидов опосредуются рецепторами, входящими в семейство мембранных G-связанных рецепторов. Согласно современным представлениям, у позвоночных произошли три последовательных дубликации генов рецепторов вазопрессин- и окситоцин-подобных пептидов. Данные, полученные при изучении круглоротых и хрящевых рыб, позволяют предположить, что у челюстноротых позвоночных было как минимум шесть разных генов, кодирующих рецепторы гормонов семейства вазопрессина: пять подтипов вазопрессиновых (вазотоциновых) рецепторов (V_{1a} ,

V_{1b} , V_{2a} , V_{2b} , V_{2c}) и один подтип рецептора окситоцина (у разных животных он называется окситоциновым, изотоциновым или мезотоциновым в зависимости от гормона окситоцинового ряда) [22]. V_{2b} -рецептор пока описан только у рыб, V_{2c} -рецептор обнаружен у всех позвоночных, кроме млекопитающих (у сумчатых в виде псевдогена). Передача сигнала рецепторами данного семейства происходит при участии фосфолипазы C, инозитолтрифосфата и кальция. Исключением является V_{2a} -рецептор, который активирует аденилатциклазу и стимулирует образование сАМР в качестве вторичного посредника.

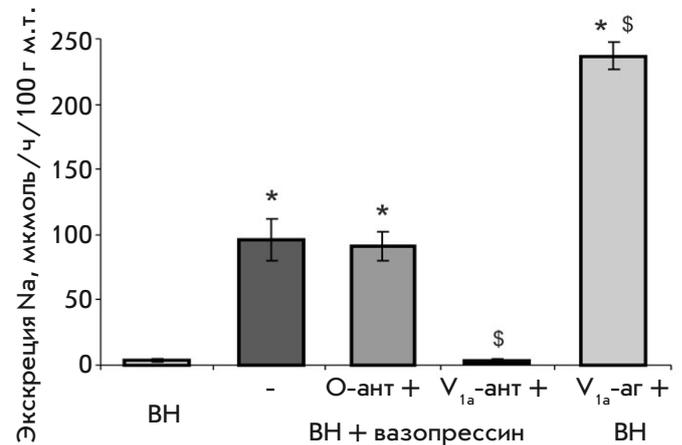


Рис. 8. Сопоставление действия вазопрессина и V_{1a} -агониста (V_{1a} -аг) в дозе 0.15 нмоль/100 г м.т. на экскрецию натрия и эффект антагонистов V_{1a} -рецепторов (V_{1a} -ант) и рецепторов окситоцина (O-ант) на натрийуретическое действие вазопрессина у крыс, получивших водную нагрузку (ВН). Значимость отличий ($p < 0.05$): * – от ВН, \$ – от ВН + вазопрессин

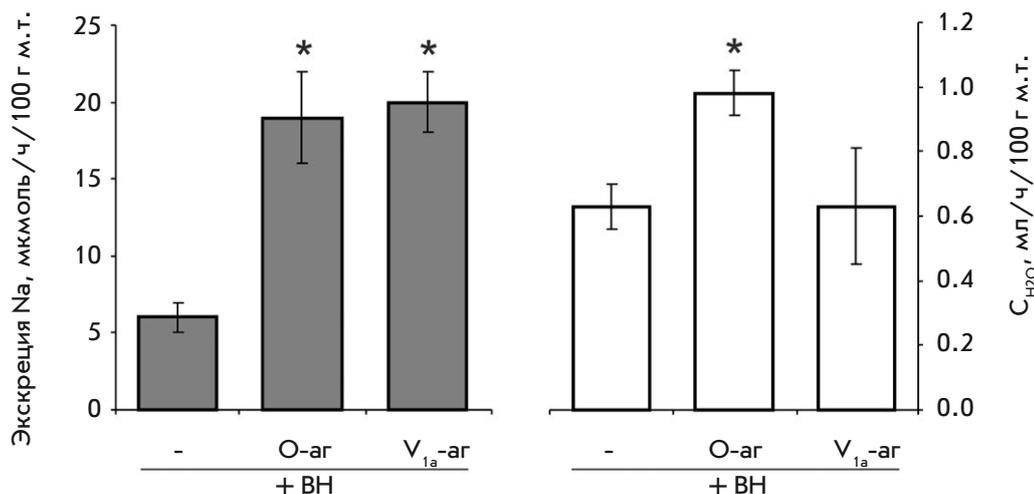


Рис. 9. Сопоставление действия агонистов V_{1a} -рецепторов (V_{1a} -аг) и рецепторов окситоцина (O-аг) в дозе 0.015 нмоль/100 г м.т. на фоне водной нагрузки (ВН) на экскрецию натрия почками и клиренс осмотически свободной воды (C_{H_2O}) у крыс. * – значимость отличий ($p < 0.05$) от ВН

В поисках ответа на вопрос о молекулярных механизмах полифункциональности вазопрессина и окситоцина проведен поиск их рецепторов у млекопитающих, сходных по аминокислотной и нуклеотидной последовательности с рецептором вазотоцина других позвоночных. Данные настоящей работы подтвердили, что в геноме крыс имеются гены трех подтипов V-рецепторов – V_{1a} , V_{1b} , и V_2 , и один ген рецептора окситоцина. Следующим, наиболее близким к ним по структуре белком является рецептор нейропептида S. Учитывая низкую степень гомологии с другими рецепторами вазопрессина и окситоцина, особенно лигандсвязывающих участков, маловероятным представляется его участие в реализации эффектов вазопрессина и окситоцина в почке, хотя это требует отдельной экспериментальной проверки. Выявленные в данной работе различия в действии возрастающих доз вазопрессина (рис. 6), а также во влиянии вазотоцина и его аналогов [12] на экскрецию одновалентных катионов и реабсорбцию воды в почке крыс могут быть связаны с различиями в спектрах активации трех существующих подтипов V-рецепторов. Это предположение подтверждается результатами нашей работы, а также более ранними исследованиями с применением агонистов и антагонистов V-рецепторов [12]. Наиболее хорошо изучен механизм антидиуретического и антинатрийуретического эффектов вазопрессина, направленных на обеспечение осмотического концентрирования мочи. V_2 -рецепторы активируются уже при низких концентрациях вазопрессина в крови, повышают проницаемость собирательных трубок для воды и активность транспортеров натрия в дистальных отделах нефрона [5, 23]. По-видимому, при повышении концентрации вазопрессина наряду с V_2 -рецепторами активируются V_{1b} - и V_{1a} -рецепторы и изменяется экскреция ионов натрия и калия. Ранее было показано, что агонист V_{1b} -рецепторов усиливает экскрецию калия [24], а стимуляция V_{1a} -рецепторов угнетает реабсорбцию натрия в толстом восходящем отделе петли Генле [10, 12, 13, 25] и приводит к натрийурезу. Нами показано, что натрийуретическое действие вазопрессина полностью устраняется антагонистом V_{1a} -рецепторов. V_{1a} -агонист, лишенный V_2 -активности, в значительно большей степени усиливает экскрецию натрия, чем вазопрессин, активирующий все подтипы V-рецепторов. Соотношение вовлечения подтипов V-рецепторов в физиологический ответ почки на введение вазопрессина в разных дозах может зависеть от различий в плотности рецепторов в мембранах канальцевых клеток нефронов и от разного сродства рецепторов к гормону. Различными методами показано присутствие в почке всех подтипов рецепторов вазопрессина и окситоцина (AVPR2

> AVPR1A > OXTR > AVPR1B) [26], экспрессия V_2 -рецептора значительно превышает экспрессию всех остальных подтипов рецепторов этого семейства [27]. Для активации V_{1a} -рецепторов у крысы требуется в 100 раз более высокая концентрация вазопрессина, чем для передачи сигнала через V_2 -рецепторы [28].

Более сложным представляется обсуждение механизма действия окситоцина в почке. В разных дозах этот нонапептид вызывает противоположные эффекты (рис. 7): в низкой дозе увеличивает выведение осмотически свободной воды и ионов натрия, а в высокой – усиливает реабсорбцию осмотически свободной воды и экскрецию ионов калия при повышении натрийуретического эффекта. Анализ протеома, транскриптома и генома крысы не выявил подтипов рецептора окситоцина, поэтому механизм физиологического эффекта следует объяснять, исходя из существования рецептора одного типа. Согласно анализу мРНК, кодирующей рецептор окситоцина [27, 29], этот рецептор наиболее представлен в проксимальном отделе нефрона. Известно, что снижение реабсорбции натрия в проксимальном канальце создает условия для увеличения клиренса осмотически свободной воды [11]. Этот эффект наблюдали при изучении механизма действия ингибиторов карбоангидразы [30] и глюкагоноподобного пептида-1 в почке [10]. Выполненные ранее эксперименты показали, что окситоцин [11] вызывает уменьшение реабсорбции жидкости в проксимальном канальце, вследствие чего больший объем жидкости поступает в последующие отделы нефрона. Так как на фоне водной нагрузки прекращается секреция вазопрессина нейрогипофизом, увеличение под действием окситоцина объема жидкости, поступающей в дистальный сегмент нефрона, способствует росту клиренса осмотически свободной воды. Нами показано, что усиление экскреции натрия и воды под действием окситоцина воспроизводится при введении селективного агониста рецепторов окситоцина. Кроме того, полученные данные указывают на различия в механизмах натрийуреза, вызванного окситоцином и вазопрессином – рост экскреции натрия обусловлен снижением реабсорбции натрия в проксимальном и дистальном отделах нефрона при активации рецепторов окситоцина и V_{1a} -рецепторов соответственно. Эффекты, наблюдающиеся при введении высокой дозы окситоцина (0.15 нмоль/100 г м.т.), аналогичны описанным для вазопрессина и, вероятно, связаны с действием нонапептида на рецепторы вазопрессина. В отличие от окситоцина селективный агонист рецепторов окситоцина в этой дозе не оказывает антидиуретического действия.

ВЫВОДЫ

1. Анализ аминокислотных и нуклеотидных последовательностей в протеомах и транскриптомах 9 видов млекопитающих выявил три подтипа рецепторов вазопрессина и один рецептор окситоцина.

2. При исследовании генома крысы методами биоинформатики выявлены гены, кодирующие четыре подтипа рецепторов к нонапептидам семейства вазопрессина и окситоцина (*Avpr1a*, *Avpr1b*, *Avpr2*, *Oxtr*).

3. В экспериментах на ненаркотизированных крысах, получавших водную нагрузку в объеме 2 мл на 100 г м.т., установлены три эффекта вазопрессина в почке: 1) увеличение реабсорбции осмотически свободной воды, 2) возрастание экскреции ионов калия, 3) снижение реабсорбции ионов натрия. Обосновано предположение об обусловленности этих эффектов

селективной стимуляцией V_{1a} -, V_{1b} - и V_2 -рецепторов в почке соответственно.

4. В экспериментах на ненаркотизированных крысах с водной нагрузкой показаны два эффекта окситоцина в почке: 1) снижение реабсорбции воды, 2) усиление экскреции натрия. Обсуждены возможные физиологические механизмы их реализации при участии одного подтипа рецептора окситоцина.

5. В зависимости от действующей концентрации гормонов нейрогипофиза изменяется спектр активируемых подтипов рецепторов и преобладающий эффект на функции почек, что обеспечивает точную регуляцию водно-солевого гомеостаза. ●

*Работа выполнена при поддержке гранта
Российского научного фонда (грант
№ 18-15-00358).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Stein D.J. // *CNS Spectr.* 2009. V. 14. P. 602–606.
- Bankir L., Bichet D.G., Morgenthaler N.G. // *J. Intern. Med.* 2017. V. 282. P. 284–297.
- Wallis M. // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2012. V. 179. P. 313–318.
- Acher R., Chauvet J. // *Front. Neuroendocrinol.* 1995. V. 16. P. 237–289.
- Kortenoeven M.L., Pedersen N.B., Rosenbaek L.L., Fenton R.A. // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2015. V. 309. P. F280–F299.
- Arrowsmith S., Wray S. // *J. Neuroendocrinol.* 2014. V. 26. № 6. P. 356–369.
- Crowley W.R. // *Compr. Physiol.* 2015. V. 5. P. 255–291.
- Verbalis J.G., Mangione M.P., Stricker E.M. // *Endocrinology.* 1991. V. 128. P. 1317–1322.
- Musabayane C.T., Forsling M.L., Balment R.J. // *Ren. Fail.* 1997. V. 19. P. 23–32.
- Kutina A.V., Golosova D.V., Marina A.S., Shakhmatova E.I., Natochin Y.V. // *J. Neuroendocrinol.* 2016. V. 28. № 4. P. 1–8.
- Наточин Ю.В., Голосова Д.В., Шахматова Е.И. // *Докл. АН.* 2018. Т. 479. С. 712–715.
- Kutina A.V., Marina A.S., Shakhmatova E.I., Natochin Yu.V. // *Regul. Pept.* 2013. V. 185. P. 57–64.
- Karavashkina T.A., Kutina A.V., Shakhmatova E.I., Natochin Yu.V. // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2011. V. 170. P. 460–467.
- Pare P., Paixao-Cortes V.R., Tovo-Rodrigues L., Vargas-Pinilla P., Viscardi L.H., Salzano F.M., Henkes L.E., Bortolini M.C. // *Genet. Mol. Biol.* 2016. V. 39. P. 646–657.
- Usui M., Aoshima H., Yamamoto Y., Luziga C., Mamba K. // *J. Vet. Med. Sci.* 2006. V. 68. P. 655–661.
- Wheeler T.J., Eddy S.R. // *Bioinformatics.* 2013. V. 29. P. 2487–2489.
- Pearson W.R. // *Curr. Protoc. Bioinformatics.* 2013. V. 43. P. 3.5.1–3.5.9.
- Nakamura T., Yamada K.D., Tomii K., Katoh K. // *Bioinformatics.* 2018. V. 34. P. 2490–2492.
- Katoh K., Standley D.M. // *Mol. Biol. Evol.* 2013. V. 30. P. 772–780.
- Ronquist F., Huelsenbeck J.P. // *Bioinformatics.* 2003. V. 19. P. 1572–1574.
- Warne J.M., Harding K.E., Balment R.J. // *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 2002. V. 132. P. 231–237.
- Yamaguchi Y., Kaiya H., Konno N., Iwata E., Miyazato M., Uchiyama M., Bell J.D., Toop T., Donald J.A., Brenner S., et al. // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2012. V. 178. P. 519–528.
- Bachmann S., Mutig K. // *Pflugers Arch.* 2017. V. 469. № 7–8. P. 889–897.
- Кутина А.В., Марина А.С., Наточин Ю.В. // *ДАН.* 2014. Т. 459. № 6. С. 762–764.
- Perucca J., Bichet D.G., Bardoux P., Bouby N., Bankir L. // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2008. V. 19. P. 1721–1731.
- Yu Y., Fuscoe J.C., Zhao C., Guo C., Jia M., Qing T., Bannon D.I., Lancashire L., Bao W., Du T., et al. // *Nat. Commun.* 2014. V. 5. P. 3230.
- Lee J.W., Chou C.L., Knepper M.A. // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2015. V. 26. P. 2669–2677.
- Bankir L. // *Cardiovasc. Res.* 2001. V. 51. P. 372–390.
- Ostrowski N.L., Lolait S.J. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 1995. V. 395. P. 329–340.
- Rosin J., Katz M.A., Rector F.C. Jr., Seldin D.W. // *Am. J. Physiol.* 1970. V. 219. P. 1731–1738.