

1
ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова
Российской Академии Наук

Научный доклад об основных результатах подготовленной
научно-квалификационной работы (диссертации)

**«Исследование участия подтипов рецепторов вазопрессина в
ионорегулирующей функции почек крыс»**

Голосова Дарья Викторовна

30.06.01 – Фундаментальная медицина

03.03.01 - Физиология

Научный руководитель:

академик РАН Наточин Юрий Викторович

ИЭФБ РАН
Санкт-Петербург
2017

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы. Основные представления о принципах функциональной организации системы регуляции водно-солевого обмена были разработаны на рубеже 50-60-х гг XX века (Verney, 1947; Smith, 1956; Гинецинский, 1963) и сохранились в своей основе до настоящего времени (Navar, 2004). Аргинин-вазопрессин, антидиуретический гормон, был синтезирован в 1954 г дю Винье (du Vineaud et al., 1953). К концу XX столетия стало ясно, что физиологические эффекты этого нонапептида зависят от стимуляции нескольких подтипов его рецепторов (Koshimizu et al., 2012), которые сохранились в эволюции с высокой степенью гомологии (Barberis et al., 1998; Barberis et al., 1999; Birnbaumer, 2000; Zingg, Laporte, 2003). К настоящему времени у млекопитающих описано несколько подтипов рецепторов аргинин-вазопрессина (V_{1a} , V_{1b} , V_2), установлена их молекулярная организация (Carmosino et al., 2006) и выяснена локализация в мембранах клеток почечных канальцев (Nonoguchi et al., 1995; Hernando et al., 2001; Mutig et al., 2007; Koshimizu et al., 2012). Каждый подтип V-рецепторов опосредует специфические функции одного гормона. Разработаны селективные агонисты и антагонисты рецепторов вазопрессина, которые успешно используются в клинике. Селективный антагонист V_{1a} -рецепторов – релковаптан, показал хорошие результаты при лечении пациентов с болезнью Рейно, дисменореей, при повышенном тонеусе матки. Селективный V_{1b} -антагонист, неливаптан, оказывал положительный эффект при лечении больных с психическими нарушениями (Koshimizu et al., 2012). Синтезирован ряд доступных для клинической практики аналогов с селективным действием на V_{1a} -рецепторы (Manning et al., 1993). V_{1a} -агонисты нашли применение в клинике для лечения различных шоковых состояний, в том числе в терапии синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания (Manning et al., 1993). Агонист V_2 -рецепторов, десмопрессин, используется в терапии несахарного диабета (Vávra et al., 1967).

Механизмы, за счет которых аргинин-вазопрессин осуществляет антидиуретическое и вазопрессорное действия, хорошо изучены. С одной стороны, этот гормон при взаимодействии с V_2 -рецепторами приводит к усилению реабсорбции осмотически свободной воды за счет увеличения проницаемости собирательных трубок благодаря встраиванию в апикальную мембрану клеток аквапорина-2. С другой стороны, аргинин-вазопрессин проявляет вазоконстрикторный эффект при связывании с V_{1a} -рецепторами, расположенными на эндотелии сосудов, и способен повышать артериальное давление вследствие. Эти данные были подтверждены экспериментами как *in vivo*, так и *in vitro*. Напротив, эксперименты *in vitro* и *in vivo*, предназначенные для изучения эффекта аргинин-вазопрессина на транспорт натрия, дают результаты, которые не согласуются между собой. В экспериментах с микропункцией нефрона и на изолированных канальцах было показано, что аргинин-вазопрессин увеличивает реабсорбцию ионов натрия (Gottschalk, Mylle, 1959; Fenton, Knepper, 2007), эффект, который должен приводить к уменьшению экскреции натрия с мочой *in vivo*. Однако, как показали эксперименты на животных и человеке, инфузия аргинин-вазопрессина приводит не к снижению, а к усилению экскреции натрия (Balment et al., 1984; Forsling et al., 1994; Kompanowska-Jezierska et al., 1998). Поскольку аргинин-вазопрессин увеличивает артериальное давление за счет V_{1a} -опосредованного сосудосуживающего эффекта, усиление экскреции натрия, если оно происходит в нормальных условиях, скорее должно способствовать его снижению.

Было показано, что введение аргинин-вазопрессина в дозах, превышающих антидиуретические, приводит к усиленной экскреции ионов натрия, при этом данное действие гормона резко снижается при инъекции антагониста V_{1a} -рецепторов (Perucca et al., 2008). Используемый для терапии ночного энуреза препарат, десмопрессин, селективный агонист V_2 -рецепторов, усиливает выведение ионов калия (Aunsholt et al., 1986; Vilhardt, 1990). Однако введение селективного агониста V_{1b} -рецепторов усиливает экскрецию калия в экспериментах *in vivo* и не влияет на транспорт воды в почке (Кутина и др., 2014). Непептидные антагонисты V_2 -рецепторов – мозаваптан, ликсиваптан, сатаваптан, толваптан – вызывают водный диурез, но

также усиливают экскрецию ионов натрия почками (Greenberg, Verbalis, 2006). Вероятно, комбинированные эффекты аргинин-вазопрессина на V-рецепторы осуществляются в зависимости от концентрации гормона в плазме крови.

Исследование эффекта селективной стимуляции различных подтипов V-рецепторов при использовании техники микроперфузии канальцев, а также при применении микропункционных методов, не дает ответа на вопрос о роли V-рецепторов в поддержании ионного гомеостаза, поскольку эффект стимуляции рецепторов может быть неодинаковым в клетках разных популяций нефронов. Представляется необходимым исследовать роль различных подтипов V-рецепторов в регуляции экскреции ионов почкой в экспериментах *in vivo*. Эти данные в современной литературе отсутствуют. Для исследования этой проблемы представляет интерес оценить изменения водно-солевого гомеостаза не только при действии аргинин-вазопрессина, но и его аналогов, а также исследовать характер возможных сдвигов ионного баланса при селективной стимуляции разных подтипов V-рецепторов. Решению этой задачи посвящена настоящая работа.

Цель исследования. Изучение эффекта селективной стимуляции подтипов V-рецепторов в экспериментах *in vivo* на выделение различных катионов (натрий, калий, магний, кальций) почкой крыс.

Задачи исследования

1. Исследование эффекта стимуляции V_{1a}-рецепторов, V_{1b}-рецепторов, V₂-рецепторов естественными гормонами нейрогипофиза (аргинин-вазопрессин, аргинин-вазотоцин) и селективными агонистами на экскрецию катионов (натрий, калий, магний и кальций) почкой крыс.
2. Изучение эффекта фармакологической блокады каналов и транспортеров ионов в мембранах клеток канальцев нефрона (Na, K, 2Cl-котранспортер, Na, Cl-котранспортер и ENaC) на транспорт катионов в почке на фоне селективной стимуляции V_{1a}-рецепторов.
3. Изучение эффекта антагониста V_{1b}-рецепторов на экскрецию ионов калия при усиленном калийурезе на фоне введения калийуретического нонапептида.
4. Исследование эффекта антагонистов V_{1a}-рецепторов и V₂-рецепторов при гиперосмии, вызванной гипернатриемией, на выведение катионов почкой.
5. Разработка нового клиренсового метода оценки эффекта нонапептидов при селективной стимуляции V_{1a}-рецепторов и салуретических средств на состояние водно-электролитного гомеостаза.

Научная новизна. Впервые установлен высокий диуретический и натрийуретический эффект стимуляции V_{1a}-рецепторов при инъекции селективного агониста [Phe²-Ile³-Orn⁸]-вазопрессина, сопоставимый с действием фуросемида, одного из самых сильных диуретиков.

Впервые охарактеризована роль стимуляции V_{1a}- и V₂-рецепторов в изменении выведения катионов натрия почкой при гиперосмии, вызванной гипернатриемией. Антагонист V_{1a}-рецепторов усиливает реабсорбцию ионов натрия в начальных отделах дистального сегмента нефрона, а антагонист V₂-рецепторов уменьшает в них реабсорбцию ионов натрия, что приводит к повышению осмотического концентрирования мочи. Усиленная реабсорбция осмотически свободной воды происходит за счет увеличенного притока жидкости к дистальным частям канальцев и создания высокого осмотического градиента в мозговом веществе почки. Сочетание уменьшения реабсорбции ионов натрия при стимуляции V_{1a}-рецепторов и усиления реабсорбции осмотически свободной воды, вследствие активации V₂-рецепторов, ускоряет удаление избытка солей натрия, калия, магния, кальция, что способствует восстановлению водно-электролитного баланса.

Предложен новый вариант расчета клиренса катионов, что позволяет оценить физиологический эффект агонистов V-рецепторов, гормонов и салуретических средств, с учетом содержания каждого изучаемого катиона во внеклеточной жидкости.

Теоретическая и практическая значимость работы. Впервые показана специфика функциональных эффектов стимуляции различных подтипов V-рецепторов в почке *in vivo*. Полученные данные могут быть использованы для создания препаратов, селективно активирующих разные подтипы V-рецепторов и избирательно влияющих на транспорт отдельных ионов и воды в почке. Эти препараты могут быть показаны для терапии пациентов с электролитными расстройствами, при нарушении баланса натрия, калия, магния, кальция. В клинической практике необходим подход для лечения отеков, дисбаланса отдельных ионов в крови. Полученные нами результаты свидетельствуют о возможности разработки новых пептидов, снижающих выведение воды и усиливающих выведение ряда ионов почкой. В настоящей работе представлен вариант применения селективного агониста V_{1a}-рецепторов при гипернатриемии, ускоряющий экскрецию ионов натрия. Показан эффект введения антагониста V_{1b}-рецепторов, который селективно снижает экскрецию ионов калия в почке, при усиленном калийурезе. Нонапептиды с различной способностью стимулировать V_{1a}-, V_{1b}- и V₂-рецепторы могут рассматриваться в качестве перспективных терапевтических средств при лечении пациентов с нарушениями водно-электролитного баланса.

Необходимость прогностической оценки эффекта лекарственной терапии при профилактике нарушений электролитного баланса требует адекватных способов оценки состояния пациентов и эффективности фармакотерапии. Подход к решению этой проблемы нашел выражение в разработке метода расчета эффекта действующего вещества с использованием клиренсовых формул с учетом не только концентрации данного катиона в сыворотке крови, но и общего содержания во внеклеточной жидкости. Новый подход отличается от стандартного при изучении экскреции катионов и характеризует селективные изменения ионного баланса при действии физиологически активного вещества на почку, возможные побочные эффекты из-за неравномерной потери отдельных ионов. Полученные данные могут быть использованы в лекциях и на семинарах в курсах физиологии, фармакологии и фармакотерапии для студентов высших учебных заведений.

Положения, выносимые на защиту

1. Аргинин-вазопрессин усиливает реабсорбцию осмотически свободной воды, а при повышении его дозы приводит к увеличению выведения ионов натрия и снижению экскреции ионов магния с мочой.
2. В одинаковых с аргинин-вазопрессином дозах аргинин-вазотоцин вызывает более выраженный натрийурез. Натрийуретический эффект аргинин-вазотоцина опосредован взаимодействием с V_{1a}-рецепторами. Введение V_{1a}-антагониста [Phe²-Ile³-Orn⁸]-вазопрессина на фоне инъекции аргинин-вазотоцина приводит к снижению экскреции ионов натрия.
3. Инъекция V_{1a}-агониста [Pmp¹-Tyr(Me)²]-вазопрессина усиливает экскрецию ионов натрия, калия, магния и кальция. Высокий натрийуретический эффект нонапептидного регулятора сопоставим с действием максимально эффективной дозы фуросемида.
4. Введение V₂-агониста (десмопрессин) контрольным крысам не изменяет экскрецию ионов натрия, но усиливает выведение ионов калия и снижает экскрецию ионов магния. Инъекция V₂-антагониста [Pmp¹-Dlle²-Ile⁴]-вазопрессина животным с гиперосмией приводит к усилению экскреции ионов натрия, магния и осмотически свободной воды.
5. Введение дезамино-аргинин-вазотоцина селективно усиливает экскрецию калия почками крыс. Инъекция антагониста V_{1b}-рецепторов (неливаптан) снижает калийуретический эффект дезамино-аргинин-вазотоцина до исходного (контрольного) уровня.
6. Оценка эффекта диуретических средств проведена с использованием новых клиренсовых методов, которые учитывают общее содержание изучаемых катионов во внеклеточной жидкостной фазе.

Апробация работы. Результаты исследования доложены и обсуждены на XVIII Международной медико-биологической конференции молодых исследователей, посвященной двадцатилетию медицинского факультета СПбГУ (Санкт-Петербург, 2015), 11-ом Всемирном конгрессе по нейрогипофизарным гормонам WCNH-2015 (Квинстаун, Новая-Зеландия, 2015), IX Всероссийской конференции «Нейроэндокринология-2015», посвященной 90-летию А. Л. Поленова (Санкт-Петербург, 2015), Всероссийской конференции «Современные проблемы физиологии высшей нервной деятельности, сенсорных и висцеральных систем», посвященной 90-летию со дня основания Института физиологии им. И. П. Павлова РАН (СПб–Колтуши, 2016), совместном заседании Американского Физиологического общества и Физиологического общества (Великобритания) «Physiology–2016» (Дублин, Ирландия, 2016), V Съезде физиологов СНГ (Сочи–Дагомыс, 2016), XV Всероссийском совещании с международным участием и VIII Школе по эволюционной физиологии, посвященных памяти академика Л. А. Орбели и 60-летию ИЭФБ РАН (Санкт-Петербург, 2016), международной конференции «Experimental biology–2017» (Чикаго, США, 2017), XXIII Съезде Физиологического общества им. И. П. Павлова (Воронеж, 2017).

По теме диссертации опубликовано 19 работ, в том числе 5 статей в рецензируемых научных журналах из перечня изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией для публикации материалов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

Личный вклад автора. Все экспериментальные данные, приведенные в диссертационной работе, получены лично автором или при его непосредственном участии. Автор проводил статистическую обработку полученных данных, осуществлял их анализ и обобщение, принимал участие в подготовке публикаций по материалам работы.

Материалы и методы исследования

Эксперименты проводили на крысах линии Вистар массой тела 200–260 г в соответствии с международными стандартами по работе с экспериментальными животными. Протоколы опытов одобрены этическим комитетом ИЭФБ РАН. Все животные в виварии получали сухой гранулированный корм, рецепт ПК-120 для содержания лабораторных животных (ООО «Лабораторкорм», Россия) и имели свободный доступ к воде. Сбор мочи осуществляли у ненаркотизированных крыс при произвольных мочеиспусканиях в течение 4–6 часов. Кровь забирали в отдельных экспериментах из сосудов шеи. Эксперименты выполнены на животных, которые находились на стандартном водном режиме, на фоне 5% водной нагрузки (ВН) и на фоне введения гипертонического раствора NaCl (2.5% NaCl 1.8 мл на 100 г массы тела внутривентриально).

Осмоляльность определяли в пробах сыворотки и мочи криоскопическим методом на микроосмометре Micro-Osmometer Model 3320 (Advanced Instruments, Inc, США). Исследование концентрации ионов натрия и калия проводилось в пробах мочи на пламенном фотометре Sherwood-420 (Великобритания). Исследование концентрации ионов кальция и магния проводили на атомном абсорбциометре AA6200 (Shimadzu, Япония). Концентрацию ионов натрия и калия в сыворотке крови определяли с помощью ионоселективного блока автоматического биохимического анализатора Erba XL-200 (Чехия) в нативных пробах. Концентрацию креатинина в сыворотке крови и моче определяли кинетическим методом по реакции Яффе без депротеинизации на биохимическом анализаторе Erba XL-200. Определение концентрации общего белка в сыворотке крови делали на биохимическом анализаторе Erba XL-200 биуретовым методом. Для измерения концентрации АВП в пробах мочи использовали наборы для иммуноферментного анализа без экстракции ELISA, Enzo Life Sciences, США.

В работе использованы следующие препараты: аргинин-вазопрессин (АВП, Sigma Aldrich, США), аргинин-вазотоцин (АВТ, Sigma Aldrich, США), дезамино-аргинин-вазотоцин (дААВТ,

СПБГУ, Россия), дезамино-вазотоцин (дАВТ, ЗАО “Синтез пептидов”, Россия), непептидный V_2 -антагонист OPC-31260 (Sigma Aldrich, США), пептидный V_2 -антагонист ([Pmp¹-Dlle²-Ile⁴]-вазопрессин, Bachem, Швейцария), агонист V_2 -рецепторов, десмопрессин (дДАВП, Sigma-Aldrich, США), агонист V_{1a} -рецепторов ([Phe²-Ile³-Orn⁸]-вазопрессин, Bachem, Швейцария), пептидный антагонист V_{1a} -рецепторов ([Pmp¹-Tyr(Me)²]-вазопрессин, Bachem, Швейцария), непептидный антагонист V_{1b} -рецепторов, неливаптан (Axon MedChem, США), фуросемид (Лазикс, Aventis Pharma, Индия), гипотиазид (Sanofi-Aventis, Венгрия), амилорид (Sigma-Aldrich, США), изофлуран (Baxter, США), золетил (Virbac, Франция).

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

Результаты исследования и их обсуждение

Почка крыс контрольной группы функционирует в состоянии антидиуреза под действием эндогенного антидиуретического гормона, в ней происходит реабсорбция осмотически свободной воды. Ранее было показано, что инъекция АВП в дозе 0.05 нмоль на 100 г массы тела приводит к увеличению реабсорбции осмотически свободной воды и является оптимальной для изучения антидиуретического действия (Гао, Наточин, 2004). В связи с этим для исследования эффекта нонапептидов на экскрецию катионов почкой были выбраны дозы, превышающие антидиуретический эффект препаратов. Животным вводили АВП в дозах 0.05–2 нмоль на 100 г массы тела. Полученные результаты показали, что АВП обладал натрийуретической активностью в дозах, на порядок выше тех, которые необходимы для реализации антидиуретического действия. При инъекции 0.1 нмоль на 100 г массы тела нонапептида усиливалась экскреция осмотически активных веществ, в том числе ионов калия, в дозе 0.1–1 нмоль на 100 г массы тела АВП вызывал реабсорбцию осмотически свободной воды. В дозах 0.25–2 нмоль на 100 г массы тела АВП увеличивал диурез, экскрецию ионов натрия, калия (Таблица 1). Уменьшение экскреции магния с мочой наблюдалось при введении АВП в дозах 0.5–2 нмоль на 100 г массы тела. Было показано, что при росте натрийуреза усиливалась реабсорбция осмотически свободной воды. Выявлена прямая зависимость между дозой инъектируемого нонапептида и его натрийуретическим эффектом. Отмечена прямая корреляция выведения ионов натрия и АВП с мочой при инъекции натрийуретических доз препарата. Максимальный натрийурез отмечен при инъекции АВП в дозе 0.5 нмоль на 100 г массы тела. (Рисунок 1).

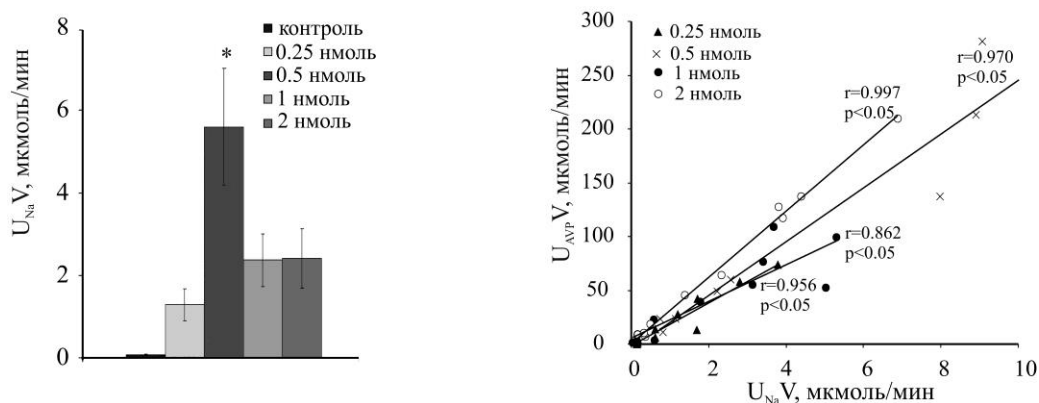


Рисунок 1. Экскреция ионов натрия (U_{NaV}) и ее зависимость от выведения АВП с мочой (U_{AVPV}) при инъекции различных доз АВП на максимуме натрийуреза.

В контрольной группе и у животных с введением АВП в дозах 0.05-0.1 нмоль на 100 г массы тела экскреция ионов натрия не зависит от выведения АВП с мочой. В контроле экскреция АВП составила 0.57 ± 0.06 пг/мин на 100 г массы тела на максимуме натрийуреза. Было показано, что натрийуретический эффект АВП снижался при введении антагониста V_{1a} -рецепторов (Perucca et al., 2008). Было принято решение об использовании селективного агониста $[\text{Phe}^2\text{-Ile}^3\text{-Orn}^8]$ -вазопрессина для исследования натрийуретического эффекта стимуляции V_{1a} -рецепторов. Инъекция 0.01–0.2 нмоль на 100 г массы тела V_{1a} -агониста усиливает экскрецию ионов натрия и калия (Таблица 2). Введение 0.025–0.2 нмоль на 100 г массы тела этого препарата привело к увеличению диуреза, экскреции осмотически активных веществ, ионов кальция и клиренса осмотически связанной воды. Максимально агонист V_{1a} -рецепторов в дозе 0.1 нмоль на 100 г массы тела усиливает выведение ионов натрия почти в 30 раз (Таблица 2). Последующее увеличение дозы не изменяет уровень экскреции ионов натрия на максимуме натрийуретического действия (Рисунок 2).

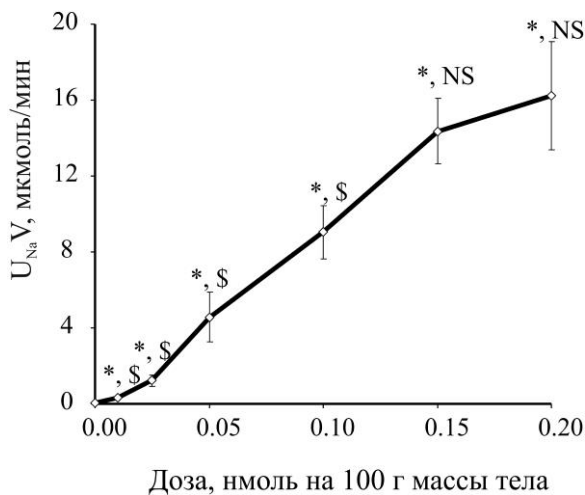


Рисунок 2. Экскреция катионов натрия (U_{NaV}) на максимуме натрийуреза после введения различных доз агониста V_{1a} -рецепторов. Обозначения: * $p < 0.05$ – достоверность отличий при сравнении с контролем; \$ $p < 0.05$, NS $p > 0.05$ – достоверность отличий при сравнении с эффектом от предыдущей дозы.

При введении агониста V_{1a} -рецепторов в дозах 0.15 и 0.2 нмоль на 100 г массы тела снижается клиренс осмотически свободной воды в 3 раза (Таблица 2). Чтобы убедиться в том, что стимуляция V_{1a} -рецепторов не влияет на транспорт воды в почке, был изучен эффект агониста V_{1a} -рецепторов на реабсорбцию осмотически свободной воды у животных на фоне ВН. Введение V_{1a} -агониста в этих условиях усиливает экскрецию ионов натрия, калия, магния, кальция по сравнению с контролем, но не влияет на клиренс осмотически свободной воды у крыс с ВН (Таблица 10). Таким образом, стимуляция V_{1a} -рецепторов не изменяет транспорт осмотически свободной воды в почке. Эффект V_{1a} -агониста на экскрецию ионов натрия сопоставим у животных на стандартном водном режиме и у крыс с ВН (Таблица 2, 3).

Для изучения локуса действия V_{1a} -агониста на транспорт катионов натрия в почке использовали различные диуретики, блокаторы каналов и переносчиков натрия: гипотиазид, фуросемид и амилорид (Рисунок 3). Поскольку введение агониста V_{1a} -рецепторов приводит к усилению экскреции натрия, калия, магния, кальция, вероятно, его действие связано с эффектом в дистальных отделах нефрона. Агонист V_{1a} -рецепторов (0.1 нмоль на 100 г массы тела) при сравнении с действием гипотиозида (2.5 мг на 100 г массы тела) обладает более выраженными натрийуретическими свойствами (Таблица 4), что согласуется с данными литературы (Li et al., 2017). На фоне блокады НСС гипотиазидом введение V_{1a} -агониста привело к увеличению диуреза, экскреции ионов натрия, калия. При этом введение гипотиозида на фоне инъекции V_{1a} -агониста дало статистически значимый прирост только для экскреции осмотически активных веществ, ионов калия и клиренса осмотически связанной воды и привело к тенденции к увеличению натрийуреза (Таблица 4). Величина прироста экскреции натрия невелика ввиду невысокой экскретируемой фракции ионов при действии диуретика.

Таблица 1. Эффект различных доз АВП на выведение ионов и воды почкой крыс.

Параметры функции почки	Доза, нмоль на 100 г массы тела						
	0 (контроль) (n=20)	0.05 (n=10)	0.1 (n=10)	0.25 (n=10)	0.5 (n=9)	1 (n=10)	2 (n=10)
V, мл	0.15±0.01	0.13±0.01 ^{ns}	0.23±0.04 ^{ns}	0.31±0.06*	0.72±0.11*	0.50±0.08*	0.48±0.08*
U _{osm} V, мкОсм	219±11	257±20 ^{ns}	355±36*	377±36*	543±51*	486±57*	393±47*
U _{Na} V, мкмоль	6±1	9±2 ^{ns}	35±10 ^{ns}	73±18*	135±21*	84±19*	77±14*
U _K V, мкмоль	20±2	23±4 ^{ns}	45±6*	53±4*	71±8*	84±6*	89±23*
U _{Mg} V, мкмоль	5.42±0.43	6.90±1.98 ^{ns}	5.74±1.09 ^{ns}	6.47±1.04 ^{ns}	3.47±0.44*	3.16±0.48*	2.29±0.38*
U _{Ca} V, мкмоль	0.19±0.06	0.11±0.03 ^{ns}	0.12±0.03 ^{ns}	0.37±0.11 ^{ns}	0.48±0.10 ^{ns}	0.15±0.04 ^{ns}	0.12±0.03 ^{ns}
C _{osm} , мЛ	0.74±0.04	0.86±0.07 ^{ns}	1.19±0.12*	1.27±0.12*	1.82±0.17*	1.63±0.19*	1.32±0.16*
C _{H2O} , мЛ	-0.59±0.03	-0.74±0.06 ^{ns}	-0.96±0.09*	-0.95±0.08*	-1.10±0.09*	-1.13±0.11*	-0.84±0.08 ^{ns}

Примечание. ^{ns} p>0.05, * p<0.05 – достоверность при сравнении с контролем. Все данные рассчитаны за 2 ч на 100 г массы тела.

Таблица 2. Эффект инъекции различных доз агониста V_{1a}-рецепторов на показатели функции почки.

Параметры функции почки	Доза, нмоль на 100 г массы тела						
	0 (контроль) (n=10)	0.01 (n=10)	0.025 (n=10)	0.05 (n=10)	0.1 (n=10)	0.15 (n=10)	0.2 (n=10)
V, мл	0.33±0.05	0.34±0.06 ^{ns}	0.80±0.13*	1.33±0.11*	2.02±0.17*	1.70±0.08*	1.77±0.12*
U _{osm} V, мкОсм	258±27	350±27 ^{ns}	486±39*	604±35*	835±47*	956±49*	995±45*
U _{Na} V, мкмоль	9±1	31±5*	57±8*	127±12*	248±16*	251±16*	267±18*
U _K V, мкмоль	15±3	27±3*	47±8*	58±5.2*	67±7*	87±5*	94±6*
U _{Mg} V, мкмоль	6.47±1.05	3.20±0.52 ^{ns}	9.00±0.60 ^{ns}	8.1±0.6 ^{ns}	9.2±0.6 ^{ns}	5.51±0.47 ^{ns}	5.64±0.45 ^{ns}
U _{Ca} V, мкмоль	0.22±0.06	0.42±0.15 ^{ns}	1.02±0.16*	0.98±0.12*	1.93±0.22*	1.42±0.10*	1.49±0.19*
C _{osm} , мЛ	0.87±0.09	1.18±0.09 ^{ns}	1.63±0.13*	2.03±0.12*	2.80±0.16*	3.21±0.16*	3.34±0.15*
C _{H2O} , мЛ	-0.53±0.10	-0.84±0.05 ^{ns}	-0.83±0.08 ^{ns}	-0.70±0.09 ^{ns}	-0.78±0.07 ^{ns}	-1.51±0.14*	-1.57±0.08*

Примечание. ^{ns} p>0.05, * p<0.05 – достоверность при сравнении с контролем. Все данные рассчитаны за 2 ч на 100 г массы тела.

Параметры функции почки	ВН (n=10)	V _{1a} -агонист +ВН (n=10)
V, мл	2.79±0.29	5.00±0.25 *
U _{osm} V, мкОсм	309±15	1045±48 *
U _{Na} V, мкмоль	5±2	272±20 *
U _K V, мкмоль	7±1	120±9 *
U _{Mg} V, мкмоль	2.84±0.52	5.51±0.60 *
U _{Ca} V, мкмоль	0.41±0.08	1.25±0.26 *
C _{osm} , мл	1.04±0.05	3.51±0.16 *
C _{H₂O} , мл	1.75±0.25	1.49±0.17 ^{ns}

Таблица 3. Влияние V_{1a}-агониста на экскрецию ионов и воды почкой после ВН.

Примечание. ^{ns} p>0.05, * p<0.05 – достоверность отличий при сравнении с ВН. Доза агониста V_{1a}-рецепторов 0.1 нмоль на 100 г массы тела. Все данные рассчитаны на 100 г массы тела за 2 ч.

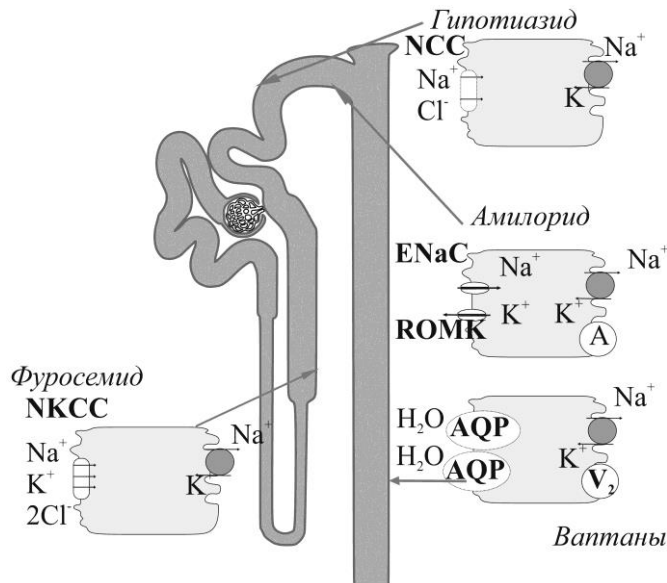


Рисунок 3. Локализация и клеточные механизмы действия диуретиков.

Обозначения: **A** – рецептор альдостерона, **V₂** – V₂-рецептор, **AQP** – аквапорины, **NKCC** – Na, K, 2Cl-котранспортер, **ENaC** – эпителиальные натриевые каналы, **ROMK** – калиевый канал наружного мозгового вещества почки, **NCC** – Na, Cl-котранспортер.

Введение амилорида (0.5 мг на 100 г массы тела) полностью подавляет экскрецию ионов калия с мочой у крыс, увеличивал выведение ионов натрия, снижает выведение магния, не оказывает эффекта на экскрецию ионов кальция и реабсорбцию осмотически свободной воды (Таблица 5). На фоне блокады ENaC натрийуретический эффект V_{1a}-агониста (0.1 нмоль на 100 г массы тела) увеличивался, калийуретическое действие снижалось. Инъекция амилорида и V_{1a}-агониста приводит к суммации натрийуретического действия препаратов (Таблица 5). Препятствие росту экскреции калия при действии V_{1a}-агониста на фоне действия амилорида указывает на зависимость калийуреза при действии нонапептида от секреции калия в конечных отделах нефрона и собирательных трубках.

Для исследования блокады Na, K, 2Cl-котранспортера использовали фуросемид. Фуросемид усиливал диурез за счет экскреции осмотически активных веществ, ионов натрия, калия, магния, кальция и увеличивает клиренс осмотически свободной воды (Таблица 6). При сравнении с эффектом агониста V_{1a}-рецепторов фуросемид увеличивал диурез, экскрецию кальция и реабсорбцию осмотически свободной воды. Оба препарата усиливали выведение ионов натрия, но при одновременном введении проявляли аддитивный натрийуретический эффект и снижали реабсорбцию осмотически свободной воды при сравнении с инъекцией агониста V_{1a}-рецепторов. Введение V_{1a}-агониста и фуросемида приводит к усилению диуретического эффекта нонапептидного регулятора (Рисунок 4).

Таблица 4. Кумулятивный эффект введения 0.1 нмоль на 100 г массы тела агониста V_{1a}-рецепторов и гипотиазида на экскрецию катионов и воды почкой крыс за 2 ч.

Параметры функции почки	Серии экспериментов			
	Контроль (n=10)	V _{1a} -агонист (n=10)	Гипотиазид (n=10)	V _{1a} -агонист+ гипотиазид (n=9)
V, мл	0.19±0.03	1.35±0.16 *	0.52±0.06 *, \$	1.55±0.19 *, NS
U _{osm} V, мкОсм	257±15	918±56 *	479±27 *, \$	1208±66 *, &
U _{Na} V, мкмоль	10±2	258±27 *	84±11 *, \$	314±21 *, NS
U _K V, мкмоль	15±3	90±8 *	55±5 *, \$	127±6 *, &
U _{Mg} V, мкмоль	4.88±0.56	7.27±0.97 ns	6.12±0.59 ns, NS	8.36±0.30 *, NS
U _{Ca} V, мкмоль	0.12±0.06	1.52±0.25 *	0.28±0.05 ns, \$	1.50±0.23 *, NS
C _{osm} , мл	0.86±0.05	3.08±0.19 *	1.61±0.09 *, \$	4.05±0.22 *, &
СН ₂ O, мл	-0.67±0.05	-1.73±0.11 *	-1.09±0.08 *, \$	-2.51±0.12 *, &

Примечание. ns p>0.05, * p<0.05 – достоверность отличий при сравнении с контрольной группой, которой вводили растворитель; NS p>0.05, & p<0.05 – достоверность отличий при сравнении с эффектом агониста V_{1a}-рецепторов. Все расчеты проведены на 100 г массы тела за 2 ч с момента введения агониста V_{1a}-рецепторов.

Таблица 5. Эффект V_{1a}-агониста и амилорида на диурез, экскрецию катионов и воды.

Параметры функции почки	Серии экспериментов			
	контроль (n=10)	V _{1a} -агонист (n=10)	Амилорид (n=10)	V _{1a} -агонист+ амилорид (n=10)
V, мл	0.11±0.01	0.92±0.06 *	0.38±0.03 *, \$	1.09±0.08 *, NS
U _{osm} V, мкОсм	207±17	708±37 *	255±15 ns, \$	270±18 *, NS
U _{Na} V, мкмоль	7±2	192±13 *	53±4 *, \$	270±18 *, &
U _K V, мкмоль	13±3	71±7 *	1±0.1 *, \$	5±1 *, &
U _{Mg} V, мкмоль	3.87±0.54	5.75±0.75 *	1.99±0.45 *, \$	4.45±0.54 ns, NS
U _{Ca} V, мкмоль	0.13±0.03	1.30±0.32 *	0.19±0.10 ns, \$	1.53±0.23 *, NS
C _{osm} , мл	0.70±0.06	2.37±0.12 *	0.86±0.05 ns, \$	2.41±0.13 *, NS
СН ₂ O, мл	-0.58±0.05	-1.46±0.08 *	-0.47±0.04 ns, \$	-1.32±0.09 *, NS

Примечание. ns p>0.05, * p<0.05 – при сравнении с контролем; NS p>0.05, & p<0.05 – при сравнении с эффектом агониста V_{1a}-рецепторов. Все расчеты проведены на 100 г массы тела за 2 ч с момента введения агониста V_{1a}-рецепторов.

Стимуляция V_{1a}-рецепторов на фоне действия фуросемида приводит к аддитивному эффекту препаратов на натрийурез (Рисунок 4), возможно, за счет действия агониста на изоформы Na, K, 2Cl-котранспортеров, нечувствительных к фуросемиду (Bazua–Valenti et al., 2016). Увеличение диуреза при действии фуросемида сопряжено со снижением реабсорбции осмотически свободной воды (Рисунок 5) по сравнению с эффектом агониста V_{1a}-рецепторов в первые 30 мин эксперимента. Несмотря на сходство эффекта агониста V_{1a}-рецепторов и фуросемида на транспорт ионов натрия, наблюдалось качественное отличие их влияния на реабсорбцию осмотически свободной воды фуросемид усиливал клиренс осмотически свободной воды, а инъекция V_{1a}-агониста приводила к увеличению ее реабсорбции (Рисунок 5). Эффект фуросемида, вероятно, опосредован снижением градиента, необходимого для реабсорбции воды в собирательных трубках почки.

Таблица 6. Эффект V_{1a} -агониста и фуросемида на диурез, экскрецию катионов и воды.

Параметры функции почки	Серия экспериментов			
	контроль (n=10)	V_{1a} -агонист (n=10)	Фуросемид (n=10)	V_{1a} -агонист+ фуросемид (n=10)
V , мл	0.17±0.02	1.68±0.14 *	2.95±0.23 *, &	3.92±0.11 *, &
$U_{osm}V$, мкОсм	247±26	867±42 *	980±64 *, NS	1383±57 *, &
$U_{Na}V$, мкмоль	11±2	235±17 *	293±26 *, NS	442±14 *, &
U_KV , мкмоль	21±5	70±6 *	87±9 *, NS	143±6 *, &
$U_{Mg}V$, мкмоль	2.53±0.42	5.50±0.43	6.62±0.34 *, NS	7.15±0.46 *, &
$U_{Ca}V$, мкмоль	0.11±0.05	1.50±0.10 *	4.37±0.46 *, &	4.93±0.29 *, &
C_{osm} , мл	0.83±0.09	2.91±0.14 *	3.29±0.22 *, NS	4.64±0.19 *, &
C_{H_2O} , мл	-0.66±0.07	-1.23±0.08 *	-0.34±0.06 *, &	-0.72±0.24 ns, &

Примечание. * $p < 0.05$, ns $p > 0.05$ – достоверность отличий при сравнении с контрольной группой, которой вводили 0.9% NaCl; NS $p > 0.05$, & $p < 0.05$ – достоверность отличий при сравнении с эффектом агониста V_{1a} -рецепторов. Все расчеты проведены на 100 г массы тела за 2 ч.

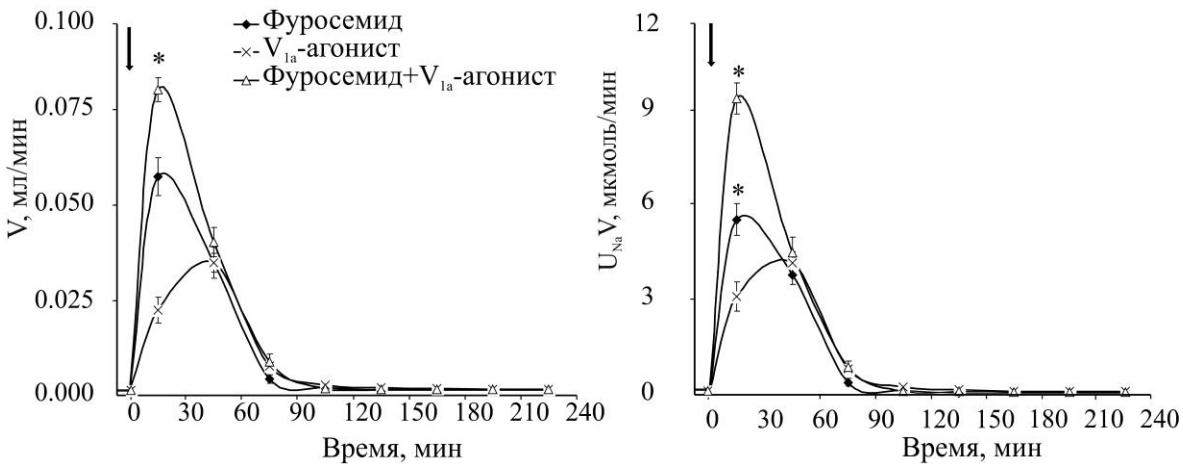


Рисунок 4. Динамика диуреза (V) и экскреции ионов натрия ($U_{Na}V$) при инъекции агониста V_{1a} -рецепторов, фуросемида и совместного введения фуросемида и агониста V_{1a} -рецепторов. Обозначения: * $p < 0.05$ – достоверность отличий при сравнении с инъекцией V_{1a} -агониста. Стрелка – момент введения препаратов. Все расчеты проведены на 100 г массы тела. Дозы препаратов: V_{1a} -агонист – 0.1 нмоль на 100 г массы тела, фуросемид – 1 мг на 100 г массы тела, ДАВТ – 0.05 нмоль на 100 г массы тела.

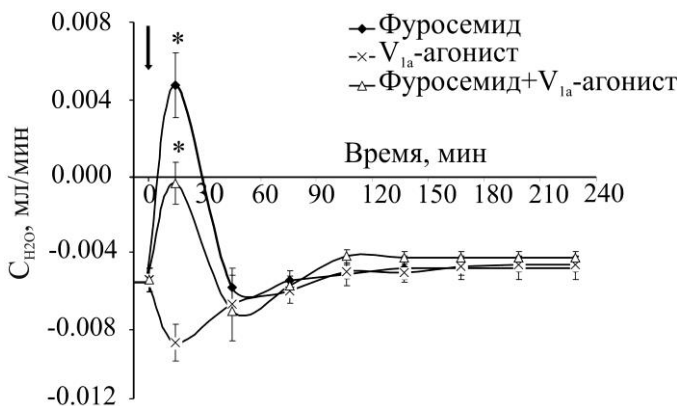


Рисунок 5. Динамика клиренса осмотически свободной воды (C_{H_2O}) при инъекции агониста V_{1a} -рецепторов, фуросемида и совместного введения фуросемида и агониста V_{1a} -рецепторов. Обозначения: * $p < 0.05$ – достоверность отличий при сравнении с V_{1a} -агонистом. Стрелка – момент введения препаратов. Все расчеты проведены на 100 г массы тела. Дозы: V_{1a} -агонист – 0.1 нмоль на 100 г массы тела, фуросемид – 1 мг на 100 г массы тела, ДАВТ – 0.05 нмоль на 100 г массы тела.

При сравнении эффекта диуретика и нонапептидных гормонов оказалось, что дАВТ и V_{1a} -агонист способствовали, а фуросемид препятствовал увеличению реабсорбции осмотически свободной воды в процессе осмотического концентрирования мочи. Нельзя исключить в данном процессе роль измененной гемодинамики, уменьшения почечного сосудистого сопротивления, вследствие чего происходит увеличение почечного кровотока, особенно кровотока в мозговом веществе почки, что вызывает уменьшение осмотического градиента в этой зоне почки, и больше жидкости остается в просвете нефрона. На максимуме диуретического действия агонист V_{1a} -рецепторов увеличивает экскретируемую фракцию ионов натрия до 14%, что сопоставимо с эффектом фуросемида (одного из самых сильных петлевых диуретиков) и дАВТ (Таблица 8).

Параметры функции почки	Серия экспериментов	
	контроль (n=10)	дАВТ (n=10)
V , мл	0.15±0.03	0.93±0.07 *
$U_{osm}V$, мкОсм	201±24	1087±56 *
$U_{Na}V$, мкмоль	0.88±0.28	296±19 *
U_KV , мкмоль	21±5	150±11 *
$U_{Mg}V$, мкмоль	1.99±0.25	4.90±0.26 *
$U_{Ca}V$, мкмоль	0.04±0.02	0.40±0.03 *
C_{osm} , мл	0.67±0.08	3.42±0.19 *
C_{H_2O} , мл	-0.53±0.07	-2.49±0.14 *

Таблица 7. Эффект инъекции 0.05 нмоль на 100 г массы тела дАВТ на выведение ионов и воды почкой крыс.

Примечание. ^{ns} $p>0.05$, * $p<0.05$ – достоверность отличий при сравнении с контролем. Все данные рассчитаны за 2 ч на 100 г массы тела.

Серии опытов	Параметры функции почки	
	FE_{Na} , %	C_{H_2O} , мл/мин
Контроль	0.14±0.05	-0.006±0.001
V_{1a} -агонист	14±1 *	-0.030±0.006 *
Фуросемид	19±2 *, ^{NS}	0.009±0.003 *, [§]
дАВТ	15±3 *, ^{NS}	-0.039±0.004 *, ^{NS}

Таблица 8. Экскретируемая фракция натрия (FE_{Na}) и клиренс осмотически свободной воды (C_{H_2O}) на максимуме диуреза при инъекции V_{1a} -агониста, фуросемида и дАВТ.

Примечание. * $p<0.05$ – достоверность отличий по сравнению с контрольной группой; [§] $p<0.05$, ^{NS} $p>0.05$ – достоверность отличий при сравнении с инъекцией агониста V_{1a} -рецепторов. Дозы препаратов: V_{1a} -агонист – 0.1 нмоль, фуросемид – 1 мг и дАВТ – 0.05 нмоль на 100 г массы тела. Все данные рассчитаны на 100 г массы тела.

Представляло интерес сопоставить эффект агониста V_{1a} -рецепторов, фуросемида и дАВТ – аналога аргинин-вазотоцина, который проявляет как V_{1a} -, так и V_2 -активность, на экскрецию ионов натрия и оценить их влияние на показатели электролитного состава сыворотки крови. Натрийуретический эффект дАВТ опосредован взаимодействием с V_{1a} -рецепторами и подавляется при совместном введении дАВТ с антагонистом V_{1a} -рецепторов (Karavashkina et al., 2011). Оказалось, что введение V_{1a} -агониста в дозе 0.1 нмоль на 100 г массы тела вызывает к 90 мин снижение осмоляльности крови, уменьшение концентрации ионов натрия, калия и магния (Таблица 9). Оценка экскреции ионов магния почкой на максимуме натрийуреза показала, что их выведение увеличивается с 0.03±0.01 до 0.13±0.01 мкмоль/мин на 100 г массы тела ($p<0.05$) и это приводит к снижению концентрации данного катиона в сыворотке крови. Концентрация общего белка остается на контрольном уровне. Несмотря на увеличение натрийуреза при инъекции фуросемида, концентрация натрия в сыворотке крови превышает исходный уровень (Таблица 9). Осмоляльность остается на исходном уровне, кальция – увеличивается. Концентрация общего белка повышена, что говорит об уменьшении объема внеклеточной жидкости. Инъекция дАВТ приводит к снижению осмоляльности и концентрации ионов натрия, калия, магния (Таблица 9). Таким образом, было отмечено,

что усиленная экскреция ионов натрия с мочой при инъекции фуросемида не приводит к снижению их концентрации в сыворотке крови (Таблица 9). Это связано прежде всего со снижением реабсорбции осмотически свободной воды. дАВТ усиливает натрийурез и приводит к снижению осмоляльности и концентрации ионов натрия в сыворотке крови, что может играть более выгодную роль при его использовании в условиях дегидратации (Голосова и др., 2015). Исследование использованных натрийуретических препаратов выявило, что фуросемид и нонапептидные регуляторы проявляют схожий эффект на экскрецию ионов натрия с мочой, но имеют различный механизм действия и при оценке параметров сыворотки крови демонстрируют различные показатели.

Таблица 9. Показатели сыворотки крови через 90 мин после инъекции агониста V_{1a} -рецепторов, фуросемида и дАВТ.

Параметры сыворотки крови	Серии экспериментов			
	контроль (n=10)	V_{1a} -агонист (n=10)	фуросемид (n=7)	дАВТ (n=7)
P_{Osm} , мОсм/кг H_2O	292±1	289±1 *	296±1 ^{ns}	279±1 *
P_{Na} , ммоль/л	143±0.4	141±1 *	147±0.5 *	138.8±0.2 *
P_K , ммоль/л	4.2±0.1	3.8±0.1 *	4.3±0.1 ^{ns}	3.95±0.2 ^{ns}
P_{Mg} , ммоль/л	0.93±0.02	0.82±0.03 *	0.89±0.03 ^{ns}	0.75±0.03 *
P_{Ca} , ммоль/л	2.12±0.03	2.17±0.04 ^{ns}	2.69±0.02 *	2.52±0.03 *
P_{TP} , г/л	64±1	65±0.6 ^{ns}	70±2 *	64.8±1.2 ^{ns}

Примечание. ^{ns} $p>0.05$, * $p<0.05$ – достоверность отличий при сравнении с контролем. Доза V_{1a} -агониста – 0.1 нмоль на 100 г массы тела, фуросемида – 1 мг на 100 г массы тела, дАВТ – 0.05 нмоль на 100 г массы тела.

Представляло интерес изучить эффект натрийуретических средств в условиях высокого эндогенного уровня вазопрессина в условиях гипернатриемии. Несмотря на значительную величину натрийуреза при введении фуросемида, осмоляльность крови к 60 мин эксперимента достигает пиковых значений и превышает показатели осмоляльности при введении гипертонического раствора NaCl (Рисунок 10), что соответствует эффекту фуросемида у крыс на стандартном водном режиме. Только инъекция дАВТ приводит к нормализации уровня натрия к первому часу эксперимента (Рисунок 10).

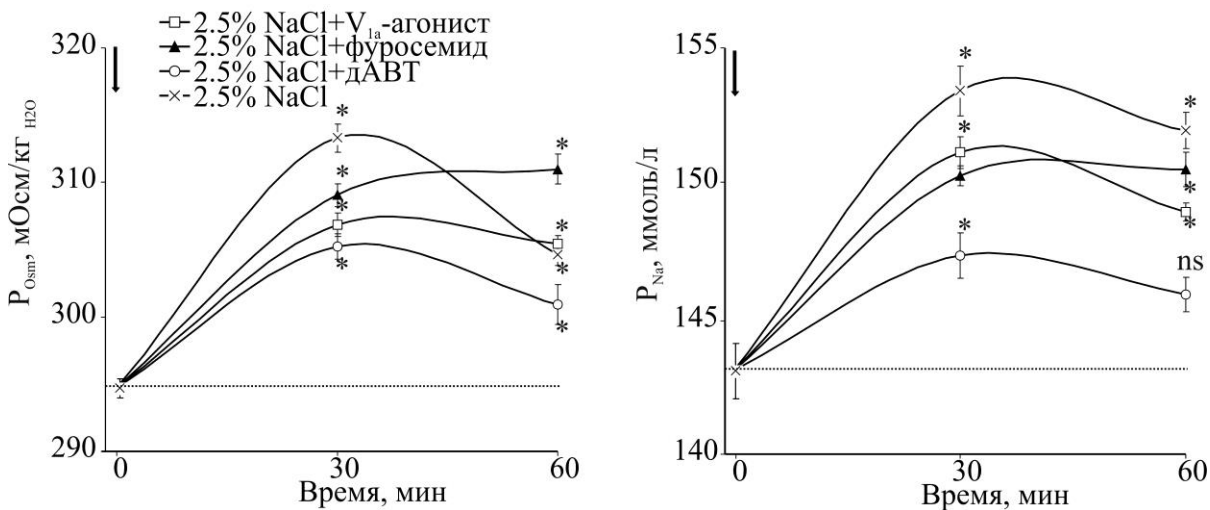


Рисунок 6. Динамика изменения осмоляльности крови (P_{Osm}) и концентрации натрия (P_{Na}) при введении салуретических средств на фоне гиперосмии. Обозначения: * $p<0.05$ – достоверность отличий при сравнении с исходным уровнем. Прерывистая линия – исходный уровень. $n=10$ в каждой группе.

Исследование экскреции ионов почкой крыс при селективной стимуляции V₂-рецепторов

Для оценки роли V₂-рецепторов в ионорегулирующей функции почек крыс использовали селективный агонист V₂-рецепторов дДАВП в дозах 0.001-0.1 нмоль на 100 г массы тела на стандартном водном режиме. Необходимо было изучить показатели функции почки на стандартном водном режиме на максимуме антидиуретической активности, поскольку применение агониста V₂-рецепторов вызывает антидиурез, и не представлялось возможным оценить динамику экскреции катионов и воды почкой. Инъекция дДАВП (0.001–0.1 нмоль на 100 г массы тела) крысам на стандартном водном режиме не влияет на экскрецию ионов натрия почкой. Увеличение экскреции ионов калия отмечается при инъекции дДАВП в дозах 0.025–0.1 нмоль на 100 г массы тела. Действие дДАВП на выведение ионов калия, вероятно, связано с его эффектом на эпителиальные натриевые каналы в нефроне (Blanchard et al., 2011). Снижение экскреции ионов магния проявляется при введении 0.1 нмоль на 100 г массы дДАВП. Уменьшение выведения ионов кальция отмечено при инъекции дДАВП в дозе 0.01–0.025 нмоль на 100 г массы тела. У крыс на стандартном водном режиме в данном исследовании было показано, что введение дДАВП не изменяет экскрецию ионов натрия с мочой, а введение антагонистов V₂-рецепторов приводит к усиленной экскреции ионов и воды почкой (Таблица 10). Для изучения эффекта антагониста V₂-рецепторов было принято решение об использовании непептидного антагониста ОРС-31260, который необходим для проведения иммуноферментного анализа и предотвращения перекрестной реакции препарата с антителами для АВП.

Параметры функции почки	Серия экспериментов	
	контроль (n=10)	V ₂ -антагонист (n=9)
V, мл	0.17±0.02	2.65±0.24 *
U _{osm} V, мкОсм	260±27	552±63 *
U _{Na} V, мкмоль	6±2	54±18 *
U _K V, мкмоль	27±4	61±8 *
U _{Mg} V, мкмоль	3.99±0.65	6.58±0.41 *
U _{Ca} V, мкмоль	0.11±0.04	2.01±0.46 *
C _{osm} , мл	0.87±0.09	1.85±0.21 *
C _{H₂O} , мл	-0.71±0.08	0.80±0.10 *

Таблица 10. Эффект пептидного антагониста V₂-рецепторов на выведение ионов и воды почкой крыс.

Примечание. * p<0.05 – достоверность отличий при сравнении с контролем. Все данные рассчитаны на 100 г массы тела за 2 ч. Доза V₂- антагониста – 1.5 нмоль на 100 г массы тела.

Для определения концентрации АВП в моче в этих экспериментах пробы собирали за промежуток времени, который соответствует снижению клиренса осмотически свободной воды и усилению натрийуреза (Рисунок 7). Инъекция антагониста V₂-рецепторов ОРС-31260 вызывает усиление экскреции АВП с 0.41±0.01 до 6.66±0.53 пг/мин на 100 г массы тела, что сопровождается 19-кратным ростом натрийуреза (с 0.037±0.007 до 0.709±0.120 мкмоль/мин на 100 г массы тела) в промежуток времени 90-10 мин эксперимента. Натрийурез, наблюдаемый при введении V₂-антагониста, вероятно, связан с увеличением концентрации АВП в плазме крови, вследствие потери большого объема осмотически свободной воды. В то время, когда происходит снижение клиренса и увеличение реабсорбции осмотически свободной воды, усиливается натрийурез. На максимуме натрийуреза ОРС-31260 усиливает экскрецию АВП с 0.0420±0.001 до 7.170±0.212 пг/мин. Введение ОРС-31260 вызывает усиление экскреции АВП с мочой, сопоставимое по величине с инъекцией АВП в дозе 0.25 нмоль на 100 г массы тела.

Экскреция АВП почкой в этих условиях растет с 0.57 ± 0.07 до 24.03 ± 8.15 пг/мин ($p > 0.05$ при сравнении с действием ОРС-31260).

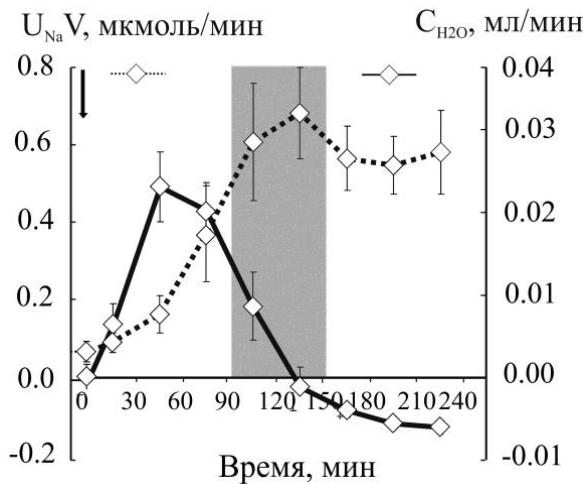


Рисунок 7. Экскреция ионов натрия ($U_{Na}V$) и клиренс осмотически свободной воды (C_{H_2O}) после введения ОРС-31260. Обозначения: серым цветом выделен промежуток времени, за который собирали пробы мочи для измерения АВП. Стрелка – момент введения препарата ($n=10$). Все расчеты проведены на 100 г массы тела.

Исследование эффекта инъекции калийуретического нонапептида при блокаде V_{1b} -рецепторов селективным антагонистом

В данной работе было показано, что инъекция АВП приводит к усиленной экскреции ионов калия. Ранее был синтезирован нонапептидный аналог дААВТ, который селективно усиливает экскрецию калия (Кутина и др., 2012). Предполагается, что V_{1b} -рецепторы участвуют в регуляции транспорта ионов калия в почке (Кутина и др., 2014). Для оценки роли V_{1b} -рецептора в ионорегулирующей функции почек крыс был использован дААВТ на фоне блокады V_{1b} -рецепторов антагонистом. дААВТ увеличивает экскрецию катионов калия, кальция, реабсорбцию осмотически свободной воды. Введение антагониста V_{1b} -рецепторов не изменяет экскрецию катионов и воды почкой у крыс. Блокада V_{1b} -рецепторов при введении дААВТ приводит к снижению калийуреза вдвое (Таблица 11), что свидетельствует об участии соответствующего подтипа рецептора вазопрессина в регуляции транспорта ионов калия.

Таблица 11. Эффект инъекции дААВТ, V_{1b} -антагониста и их совместного введения на осмо- и ионовыведительную функции почки.

Параметры функции почки	Серия экспериментов			
	контроль (n=11)	дААВТ (n=10)	V_{1b} -антагонист (n=9)	дААВТ+ V_{1b} -антагонист (n=10)
V , мл	0.14 ± 0.01	0.18 ± 0.01 ^{ns}	0.17 ± 0.02 ^{ns, NS}	0.15 ± 0.01 ^{ns, NS}
$U_{osm}V$, мкОсм	287 ± 17	354 ± 20 *	292 ± 15 ^{ns, NS}	289 ± 9 ^{ns, NS}
$U_{Na}V$, мкмоль	6.8 ± 1.3	9.7 ± 2.4 ^{ns}	6.0 ± 1.5 ^{ns, NS}	2.2 ± 0.5 ^{ns, NS}
U_KV , мкмоль	17 ± 2	66 ± 8 *	15 ± 2 ^{ns, \$}	37 ± 4 ^{ns, \$}
$U_{Mg}V$, мкмоль	2.50 ± 0.21	2.51 ± 0.36 ^{ns}	3.39 ± 0.46 ^{ns, NS}	3.37 ± 0.25 ^{ns, NS}
$U_{Ca}V$, мкмоль	0.019 ± 0.001	0.091 ± 0.017 *	0.049 ± 0.024 ^{ns, NS}	0.037 ± 0.004 ^{ns, NS}
C_{osm} , мл	0.96 ± 0.06	1.19 ± 0.07 *	0.98 ± 0.05 ^{ns, NS}	0.97 ± 0.03 ^{ns, NS}
C_{H_2O} , мл	-0.82 ± 0.04	-1.01 ± 0.05 *	-0.82 ± 0.04 ^{ns, NS}	-0.82 ± 0.02 ^{ns, \$}

Примечание. ^{ns} $p < 0.05$, * $p < 0.05$ – достоверность отличий при сравнении с контрольной группой; ^{NS} $p > 0.05$, \$ $p < 0.05$ – при сравнении с введением дААВТ. Все расчеты проведены на 100 г массы тела за 2 ч.

Исследование роли различных подтипов V-рецепторов на осмо- и ионовыведительную функцию почки при нагрузке гипертоническим раствором NaCl

Представляло интерес изучить эффект стимуляции различных подтипов V- рецепторов в условиях усиления секреции АВП. Введение гипертонического раствора NaCl привело к усилению диуреза, экскреции осмотически активных веществ. Экскреция ионов натрия за 2 ч эксперимента усилилась в 22 раза, калия – в 6 раз, магния – в 3 раза, кальция – в 17 раз. Уменьшился клиренс осмотически свободной воды в 4 раза (Таблица 12). Введение гипертонического раствора NaCl крысам вызывало гипернатриемию и гиперосмию (Таблица 12). Концентрация ионов калия, магния растет, а концентрация ионов кальция падает к 60 мин. (Таблица 13).

Параметры функции почки	Серия экспериментов	
	контроль (n=10)	2.5% NaCl (n=10)
V, мл	0.17±0.02	0.91±0.07 *
U _{osm} V, мкОсм	247±26	994±39 *
U _{Na} V, мкмоль	11±2	243±14 *
U _K V, мкмоль	21±5	124±8 *
U _{Mg} V, мкмоль	2.53±0.42	7.33±0.60 *
U _{Ca} V, мкмоль	0.11±0.05	1.88±0.18 *
C _{osm} , мл	0.83±0.09	3.34±0.13 *
C _{H₂O} , мл	-0.66±0.07	-2.42±0.07 *

Таблица 12. Показатели функции почки за 2 ч при введении 2.5% раствора NaCl.

Примечание. * p<0.05 – достоверность отличий при сравнении с контрольной группой. Все расчеты проведены на 100 г массы тела за 2 ч.

Параметры сыворотки крови	Серия экспериментов	
	контроль (n=10)	2.5% NaCl (n=10)
P _{osm} , мОсм/кг H ₂ O	295±6	305±1 *
P _{Na} , ммоль/л	143.0±1.0	152±1 *
P _K , ммоль/л	4.0±0.1	4.3±0.1 *
P _{Mg} , ммоль/л	0.72±0.03	0.84±0.02 *
P _{Ca} , ммоль/л	2.53±0.03	2.38±0.05 *
P _{TP} , г/л	61.7±0.8	63.9±1.5 ^{ns}

Таблица 13. Показатели сыворотки крови после нагрузки NaCl к 60 мин эксперимента.

Примечание. ^{ns} p>0.05, * p<0.05 – достоверность отличий при сравнении с контролем.

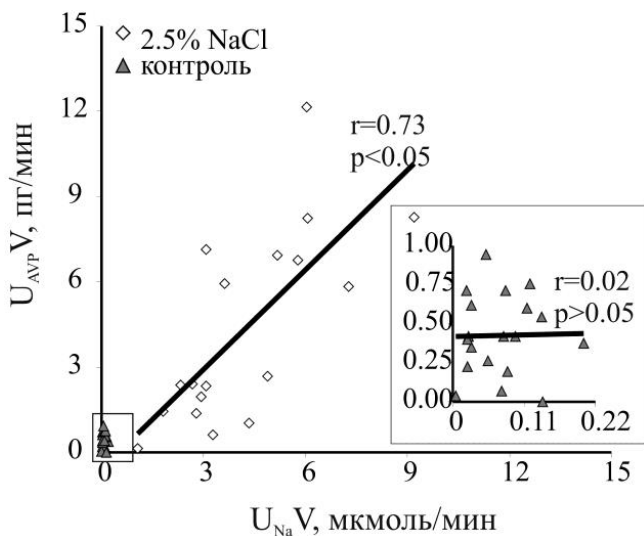


Рисунок 8. Корреляция между экскрецией АВП (U_{AVP}) и выведением ионов натрия с мочой (U_{Na}V) на максимуме натрийуреза у крыс на стандартном водном режиме и на фоне гиперосмии вследствие гипернатриемии. Обозначения: r – коэффициент корреляции. В квадрат вынесена контрольная группа. n=19 в контрольной группе, n=18 в группе с введением гипертонического раствора NaCl. Все расчеты проведены на 100 г массы тела.

Гиперосмия приводит к увеличению экскреции АВП с мочой до 4.31 ± 0.80 пг/мин на 100 г массы тела. Выведение АВП усиливалось до 9.44 ± 3.88 и 24.03 ± 8.15 пг/мин на 100 г массы тела при инъекции АВП в дозах 0.1 нмоль и 0.25 нмоль на 100 г массы тела на стандартном водном режиме, соответственно ($p > 0.05$ при сравнении с эффектом введения 2.5% раствора NaCl). Величина экскреции АВП на фоне гиперосмии, вызванной гипернатриемией, соответствует инъекции натрийуретической дозы АВП.

Эффект селективной блокады V_{1a} - и V_2 -рецепторов на выведение ионов при гиперосмии, вызванной гипернатриемией

Для оценки вклада селективной стимуляции V-рецепторов в регуляции водно-солевого гомеостаза при гиперосмии, вызванной гипернатриемией, использовали антагонисты V_{1a} - и V_2 -рецепторов. Использовали V_{1a} -антагонист в дозах 1 нмоль и 2 нмоль на 100 г массы тела. Инъекция антагониста V_{1a} -рецепторов в дозе 1 нмоль на 100 г массы тела на фоне нагрузки NaCl приводит к уменьшению экскреции осмотически активных веществ в 1.3 раза, что вызвано снижением выведения ионов натрия в 1.5 раза, кальция в 2.2 раза (Таблица 14). При увеличении дозы инъектируемого антагониста снижение экскреции натрия происходило в 2.6 раза, калия – вдвое, кальция – в 2.3 раза. Инъекция антагониста V_{1a} -рецепторов приводила к снижению клиренса осмотически свободной воды.

Таблица 14. Эффект антагониста V_{1a} -рецепторов на экскрецию ионов и воды почкой после инъекции 2.5% раствора NaCl.

Параметры функции почки	Серии экспериментов		
	2.5% NaCl (n=10)	2.5% NaCl+ V_{1a} -антагонист 1 нмоль (n=10)	2.5% NaCl+ V_{1a} -антагонист 2 нмоль (n=10)
V , мл	0.91 ± 0.07	$0.60 \pm 0.04^*$	$0.40 \pm 0.04^*$
$U_{osm}V$, мкОсм	994 ± 39	$792 \pm 45^*$	$609 \pm 44^*$
$U_{Na}V$, мкмоль	243 ± 14	$166 \pm 13^*$	$93 \pm 16^*$
U_KV , мкмоль	124 ± 8	129 ± 14^{ns}	$94 \pm 8^*$
$U_{Mg}V$, мкмоль	7.33 ± 0.60	7.11 ± 0.41^{ns}	6.33 ± 0.47^{ns}
$U_{Ca}V$, мкмоль	1.88 ± 0.18	$0.87 \pm 0.09^*$	$0.83 \pm 0.16^*$
C_{osm} , мл	3.34 ± 0.13	$2.66 \pm 0.15^*$	$2.04 \pm 0.15^*$
C_{H_2O} , мл	-2.42 ± 0.07	$-2.05 \pm 0.11^*$	$-1.64 \pm 0.11^*$

Примечание. * $p < 0.05$, ns $p > 0.05$ – достоверность отличий при сравнении с введением 2.5% раствора NaCl. Все показатели и дозы препарата рассчитаны на 100 г массы тела за 2 ч.

Для оценки роли V_2 -рецепторов в регуляции транспорта ионов почкой при гиперосмии использовали V_2 -антагонист в дозе 1.5 нмоль и 5 нмоль на 100 г массы тела. Инъекция 1.5 нмоль на 100 г массы тела V_2 -антагониста приводила к увеличению экскреции осмотически активных веществ, что вызвано увеличением выведения ионов натрия, кальция, при этом клиренс осмотически свободной воды не изменяется (Таблица 15). Инъекция бóльшей дозы V_2 -антагониста способствовала еще более значительному росту экскреции ионов: натрия, кальция и увеличению клиренса осмотически свободной воды. Доза 5 нмоль на 100 г массы тела была выбрана для оценки динамики экскреции катионов натрия и магния на фоне нагрузки NaCl. Антагонист V_2 -рецепторов усиливал выведение ионов натрия, а антагонист V_{1a} -рецепторов препятствовал экскреции ионов натрия с мочой (Рисунок 9).

Таблица 15. Эффект антагониста V_2 -рецепторов на экскрецию ионов и воды почкой после инъекции 2.5% раствора NaCl.

Параметры функции почки	Серия экспериментов		
	2.5% NaCl (n=10)	2.5% NaCl+ V_2 -антагонист 1.5 нмоль (n=10)	2.5% NaCl+ V_2 -антагонист 5 нмоль (n=10)
V , мл	0.91±0.07	1.84±0.20 *	4.18±0.19 *
$U_{osm}V$, мкОсм	994±39	1248±64 *	1437±50 *
$U_{Na}V$, мкмоль	243±14	348±28 *	428±25 *
U_KV , мкмоль	124±8	163±15 ^{ns}	146±9 ^{ns}
$U_{Mg}V$, мкмоль	7.33±0.60	8.05±0.74 ^{ns}	8.88±0.27 ^{ns}
$U_{Ca}V$, мкмоль	1.88±0.18	2.75±0.44 ^{ns}	4.44±0.58 *
C_{osm} , мл	3.34±0.13	4.19±0.21 *	4.82±0.17 *
C_{H_2O} , мл ^{2ч}	-2.42±0.07	-2.35±0.07 ^{ns}	-0.65±0.16 *

Примечание. * $p < 0.05$, ^{ns} $p > 0.05$ – достоверность отличий при сравнении с введением 2.5% раствора NaCl. Все данные и дозы препарата приведены на 100 г массы тела за 2 ч.

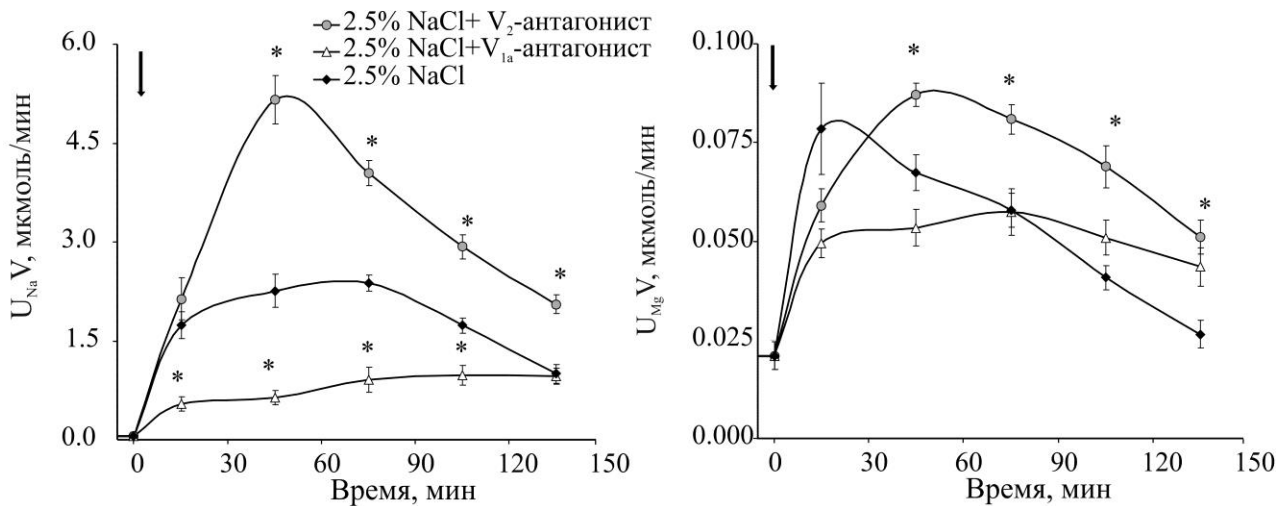


Рисунок 9. Динамика экскреции ионов натрия ($U_{Na}V$) и ионов магния ($U_{Mg}V$) при инъекции антагонистов V_{1a} - и V_2 -рецепторов на фоне нагрузки 2.5% NaCl. Обозначения: * $p < 0.05$ – достоверность отличий при сравнении с введением 2.5% раствора NaCl. Доза V_{1a} -антагониста – 2 нмоль на 100 г массы тела, доза V_2 -антагониста 5 нмоль на 100 г массы тела, $n=10$ в каждой группе. Стрелка – момент введения нагрузки и препаратов. Все расчеты проведены на 100 г массы тела.

Стимуляция V_{1a} - и V_2 -рецепторов необходима для поддержания осмотического гомеостаза. V_2 -опосредованное встраивание аквапоринов, вероятно, происходит при концентрации АВП на порядок ниже, необходимой для усиления V_2 -опосредованной реабсорбции ионов натрия. Блокада V_{1a} -рецепторов не влияет на выведение ионов магния почкой. Анализ кумулятивного эффекта антагониста V_2 -рецепторов не показал, что экскреция ионов магния за 2 часа изменяется. Но при оценке динамики выведения ионов магния при блокаде V_2 -рецепторов показано достоверное увеличение экскреции с 45 мин

эксперимента (Рисунок 9). Предполагается, что для проявления эффекта стимуляции V_2 -рецепторов в усилении реабсорбции ионов магния необходим определенный высокий эндогенный уровень вазопрессина в сыворотке крови.

Подходы к оценке эффективности применения салуретических средств

Интенсивный диурез и салурез вызывают петлевые диуретики, а также производные вазотоцина (Канашкина и др., 2007, Kutina et al., 2013), агонист V_{1a} -рецепторов (Голосова и др., 2015). Поскольку соотношение катионов в моче иное, чем в сыворотке крови (Наточин и др., 1993; Смирнов и др., 2010), длительное применение салуретиков может приводить к нарушению ионного гомеостаза. Из этого следует, что функциональная оценка салуретического эффекта только по экскреции катионов недостаточна. Решением проблемы мог бы быть анализ эффекта физиологически активных веществ не по стандартной формуле расчета клиренса ионов, когда учитывается концентрация в сыворотке крови и выделение в минуту, а по новой, предлагаемой формуле клиренса, рассчитанной с учетом общего содержания данного катиона во всей внеклеточной жидкостной фазе и времени полного действия данной дозы салуретика (Голосова, Наточин, 2017).

Таблица 15. Выведение и клиренс ионов на максимуме диуреза после инъекции агониста V_{1a} -рецептора.

Параметр	Na^+	K^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}
Условия опыта				
Е, мкмоль/мин				
контроль	0.08±0.01*	0.15±0.04*	0.020±0.004*	0.0009±0.0004*
V_{1a} -агонист	9.05±1.42	1.41±0.21	0.131±0.015	0.0540±0.0083
С, мл/мин				
контроль	0.0005±0.0001*	0.04±0.01*	0.018±0.004*	0.0003±0.0001*
V_{1a} -агонист	0.0642±0.0101	0.33±0.05	0.121±0.014	0.0152±0.0023

Примечание. * $p < 0.05$ – достоверность отличий при сравнении с действием V_{1a} -агониста. Е – экскреция ионов, С – клиренс ионов. Все расчеты проведены на 100 г массы тела, $n=10$ в каждой группе. Доза V_{1a} -агониста 0.1 нмоль на 100 г массы тела.

Учитывая данные содержания ионов в сыворотке крови, во внеклеточной жидкости и в теле крысы, приведена оценка клиренса и экскреции катионов. Новый вариант расчета клиренса ионов натрия (\dot{C}_{Na}) за время полного эффекта введенного препарата ($t=90$ мин): $\dot{C}_{Na} = E_{\Sigma Na} / Na_{ECF}$, где Na_{ECF} – содержание натрия во внеклеточной жидкостной фазе. Усиление выведения ионов натрия почти в 30 раз по сравнению с начальным уровнем мало отражается на его содержании во внеклеточной жидкости (Рисунок 33). Таким образом, оценка эффекта салуретиков по величине экскреции катионов и их клиренса показала, что при введении агониста V_{1a} -рецепторов экскреция ионов калия намного меньше его клиренса. Однако потеря ионов калия составляет почти половину его содержания во внеклеточной жидкости. Поддержание концентрации ионов калия в плазме крови в физиологическом диапазоне на фоне потери такого количества из внеклеточной жидкости происходит благодаря его мобилизации из депо. К концу опыта концентрация ионов калия в сыворотке крови составила 3.8 ± 0.1 ммоль/л, что на 10% ниже исходного значения. Иными словами, несмотря на выведение почкой огромных количеств ионов, извлечение из депо во внеклеточную жидкость способствует сохранению их соотношения в сыворотке крови.

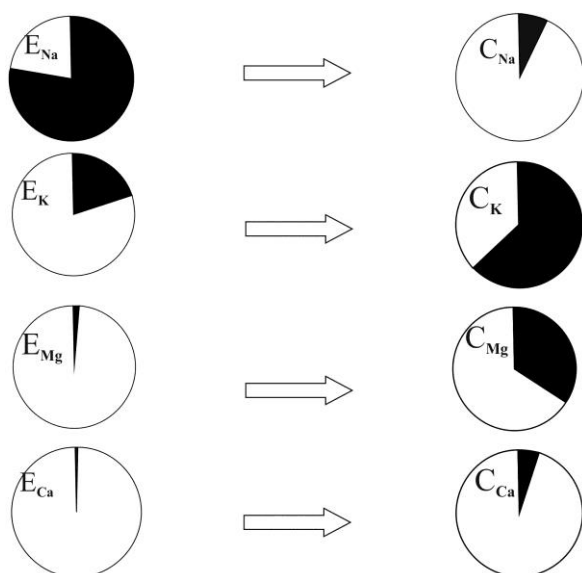


Рисунок 10 Экскреция (E) и клиренс (C) катионов за 90 мин после инъекции V_{1a} -агониста. Обозначения: круг слева – общее количество ионов натрия, калия, магния, кальция экскретируемых с мочой, мкмоль за 90 мин; черный сегмент – доля данного катиона, выведенного за 90 мин. Круг справа – общее количество катиона во внеклеточной жидкости; черный сегмент – клиренс катиона от общего содержания во внеклеточной жидкости. Все расчеты проведены на 100 г массы тела.

Выводы:

1. Инъекция крысам аргинин-вазопрессина (0.25-2 нмоль на 100 г массы тела) приводит к усиленной экскреции ионов натрия и калия. В дозе 0.5-2 нмоль на 100 г массы тела аргинин-вазопрессин уменьшает экскрецию ионов магния с мочой.
2. Инъекция аргинин-вазотоцина (0.01-0.1 нмоль на 100 г массы тела) усиливает экскрецию ионов натрия, калия, магния, кальция. В дозе 0.1 нмоль на 100 г массы тела аргинин-вазотоцин усиливает выведение ионов натрия, калия, кальция и не влияет на транспорт магния. Натрийуретический эффект аргинин-вазотоцина превышает натрийуретическое действие аргинин-вазопрессина.
3. Инъекция агониста V_{1a} -рецепторов $[\text{Phe}^2\text{-Ile}^3\text{-Orn}^8]$ -вазопрессина (0.025-0.2 нмоль на 100 г массы тела) усиливает экскрецию ионов натрия, калия, магния и кальция с почкой; натрийуретический эффект этого агониста сопоставим с действием максимальной дозы фуросемида.
4. Инъекция V_{1b} -антагониста, неливаптана, снижает экскрецию катионов калия до исходного уровня на фоне введения дезамино-аргинин-вазотоцина, что свидетельствует об участии V_{1b} -рецепторов в изменении транспорта калия в почке.
5. Стимуляция V_2 -рецепторов десмопрессином снижает экскрецию магния, увеличивает экскрецию калия и реабсорбцию осмотически свободной воды.
6. На фоне гиперосмии блокада V_2 -рецепторов введением $[\text{Pmp}^1\text{-Dlle}^2\text{-Ile}^4]$ -вазопрессина препятствует снижению реабсорбции осмотически свободной воды и способствует усилению экскреции ионов натрия и магния с мочой.
7. При гиперосмии, вызванной гипернатриемией, стимуляция V_{1a} -рецепторов уменьшает реабсорбцию ионов натрия в толстом восходящем отделе петли Генле, а стимуляция V_2 -рецепторов усиливает реабсорбцию ионов натрия и магния в канальцах нефрона.
8. Разработан новый метод оценки эффекта агониста V_{1a} -рецепторов и салуретических средств на ионорегулирующую функцию почек, основанный на клиренсе катионов с учетом их содержания в экстрацеллюлярной жидкости организма.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. **Голосова Д.В.**, Кутина А.В., Каравашкина Т.А., Марина А.С., Наточин Ю.В. Физиологический способ восстановления осмотического гомеостаза у крыс при гипернатриемии. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 101 (7): 804–811. 2015.
2. Кутина А.В., **Голосова Д.В.**, Марина А.С., Каравашкина Т.А., Наточин Ю.В. Влияние аналогов пептидных гормонов при пероральном и парентеральном введении на транспорт воды и ионов в почке. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 102(10): 1185–1194. 2016.

3. Kutina A.V., **Goloso**va 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. doi: 10.1111/jne.12367
4. **Голосова Д.В.**, Кутина А.В., Каравашкина Т.А., Марина А.С., Наточин Ю.В. Влияние селективных агонистов V1a, V2 и V1b рецепторов на транспорт натрия в почке крыс. *Бюлл. exper. биол. и мед.* 60(12): 712–715. 2015.
5. **Голосова Д.В.**, Наточин Ю.В. Новый вариант расчета клиренса катионов почкой крыс в оценке эффекта стимуляции V1a-рецепторов. *Бюлл. exper. биол. и мед.* 163(6): 664–667. 2017.
6. **Голосова Д.В.** Исследование роли V-рецепторов в регуляции экскреции магния почкой крыс. *Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье. XVIII Международная медико-биологическая конференция молодых исследователей посвященная двадцатилетию медицинского факультета СПбГУ.* С. 138. 2015.
7. Савина Ю.А., **Голосова Д.В.** Влияние стимуляции V1a-рецепторов вазопрессина на экскрецию натрия при гипернатриемии. *Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье. XVIII Международная медико-биологическая конференция молодых исследователей посвященная двадцатилетию медицинского факультета СПбГУ.* С. 464. 2015.
8. **Goloso**va D.V., Natochin Yu.V. Vasopressin receptors and renal effects of arginine-vasopressin and arginine-vasotocin in rat kidney. *Programme and abstracts of 11th World Congress of neurohypophysial hormones. Queenstown. New Zealand.* P. 46. 2015.
9. **Голосова Д.В.**, Кутина А.В. Роль вазопрессина и глюкагоно-подобного пептида-1 в регуляции экскреции ионов натрия почкой при нагрузке хлоридом натрия. *IX Всероссийская конференция «Нейроэндокринология-2015», посвященная 90-летию А.Л.Поленова.* СПб. С.52–53. 2015.
10. **Голосова Д.В.**, Зайцева К.В. Влияние селективной стимуляции V1a-рецепторов на выведение ионов натрия почкой. *Всероссийская конференция с международным участием «Современные проблемы физиологии высшей нервной деятельности, сенсорных и висцеральных систем», посвященная 90-летию со дня основания Институт физиологии им И.П. Павлова РАН.* СПб-Колтуши. С. 52–54. 2015.
11. Савина Ю.В., **Голосова Д.В.** Сравнение влияния селективного агониста V1a-рецепторов и амилорида на экскрецию ионов натрия и калия почкой. *Фундаментальная наука и клиническая медицина: Тезисы XIX Международной медико-биологической конференции молодых исследователей.* СПб. СПбГУ. С. 494–495. 2016.
12. **Goloso**va D.V. The role of renal V2-receptors in regulation of sodium excretion. *Physiology 2016. Abstracts. Joint meeting of the American Physiological Society and Physiological Society.* P. 200. 2016.
13. **Голосова Д.В.** Экскреция ионов натрия и воды почкой под влиянием вазопрессина и окситоцина» *Сборник материалов XV Всероссийского совещания с международным участием и VIII Школы по эволюционной физиологии, посвященных памяти академика Л.А. Орбели и 60-летию ИЭФБ РАН 17–22 октября.* С. 54. 2016.
14. Кутина А.В., **Голосова Д.В.** Роль вазопрессина и окситоцина в регуляции транспорта ионов в почке. *Научные труды. V Съезд Физиологов СНГ, V Съезд Биохимиков России, Конференция ADFLIM. Сочи-Дагомыс, Россия. 4–8 октября. Acta Natura. Спецвыпуск. Том 1. С. 37–38. 2016.*
15. **Голосова Д.В.** Роль подтипов рецепторов вазопрессина и окситоцина в регуляции выведения ионов. *Научные труды. V Съезд Физиологов СНГ, V Съезд Биохимиков России, Конференция ADFLIM. Сочи-Дагомыс, Россия. 4–8 октября. Acta Natura. Спецвыпуск. Том 1. С. 40. 2016.*
16. **Goloso**va D.V. Vasopressin and Oxytocin in Regulation of Renal Cation and Water Excretion: Nephron-Kidney Interaction. *FASEB J.* 31 (1). Suppl. 857.3. 2017.

17. **Голосова Д.В.** Исследование эффекта селективной стимуляции V- рецепторов на выведение ионов почкой. Материалы XXIII съезда Физиологического общества им. И. П. Павлова 18-22 сентября, г. Воронеж. С. 512–513. 2017.

18. **Голосова Д.В., Шахматова Е.И., Федоткина Т.В.** Исследование секреции гормонов нейрогипофиза и их эффекта на осмо- и ионорегулирующую функции почки. Материалы XXIII съезда Физиологического общества им. И. П. Павлова 18–22 сентября, Воронеж. С. 535–536.

19. **GolosoVA D.V., Bogolepova A.E, Shakhmatova E.I.** The effect of V1a receptor stimulation and consequent renal sodium excretion on blood pressure in vivo. Scientific Programme. 12th Worlds Congress on Neurohypophysial Hormones. 26–29 July, Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil. P. 60. 2017.