

Влияние вазопрессина на экспрессию генов, кодирующих ключевые ферменты метаболизма гиалуронана интерстициальной ткани, и на концентрирующую функцию почки крыс WAG

Л.Н. Иванова^{1, 2}, А.В. Бабина^{1, 2}✉, Г.С. Батурина¹, Л.Е. Каткова¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

Аргинин-вазопрессин (АВП) у млекопитающих является главным гормоном, регулирующим реабсорбцию воды в почке путем повышения осмотической проницаемости эпителия собирательных трубок. Основным звеном внутриклеточных реакций, индуцированных АВП, является транслокация везикул, содержащих водные каналы (аквапорины-2), в плазматическую мембрану главных клеток эпителия собирательных трубок. В интерстиции внутреннего мозгового вещества почки сосредоточено значительное количество отрицательно заряженного гликозаминогликана, гиалуронана, который может влиять на диффузию воды между структурами концентрирующего механизма в зависимости от состояния его полимерности. Вопрос о роли гиалуронана в регуляции транспорта воды в почке млекопитающих остается дискуссионным. С использованием ОТ-ПЦР реального времени проверялась гипотеза о вовлечении генов, кодирующих ключевые ферменты метаболизма гиалуронана, в долговременный эффект вазопрессина на концентрирующую функцию почек. Экспрессия генов гиалуронан-синтазы 2 (*Has2*), гиалуронидазы-1 и гиалуронидазы-2 (*Hyal1* и *Hyal2*), исследована в почке гидратированных крыс линии WAG (Wistar Albino Glaxo) и у крыс, которым в течение двух дней внутрибрюшинно вводился селективный агонист V₂-рецепторов вазопрессина dDAVP (200 мкг/кг веса тела, дважды в день внутрибрюшинно). Содержание мРНК *Has2* было наиболее высоким в мозговом веществе, сосочке почки гидратированных крыс. dDAVP индуцировал значительное снижение содержания мРНК *Has2* в этой зоне, в корковом веществе изменения были менее выражены. В противоположность *Has2*, введение dDAVP сопровождалось значительным повышением содержания мРНК *Hyal1* и *Hyal2* в сосочке почки, при этом наблюдались выраженное повышение активности гиалуронидазы в почечной ткани и нарастание осмолярности отделяющейся мочи. Предполагается, что вазопрессин ингибирует синтез гиалуронана и одновременно стимулирует его деградацию в интерстициальной ткани сосочка почки, повышая проницаемость матрикса и облегчая ток воды между элементами противоточной концентрирующей системы путем регуляции экспрессии генов ключевых ферментов метаболизма гиалуронана.

Ключевые слова: вазопрессин; почка; гиалуронан; гиалуронан-синтаза-2; гиалуронидаза-1, 2; экспрессия генов; осмотическое концентрирование.

Effect of vasopressin on the expression of genes for key enzymes of interstitial hyaluronan turnover and concentration ability in WAG rat kidneys

L.N. Ivanova^{1, 2}, A.V. Babina^{1, 2}✉, G.S. Baturina¹, L.E. Katkova¹

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

In mammals, arginine-vasopressin (AVP) is a major hormone involved in the regulation of renal water reabsorption, acting via an increase in the osmotic permeability of the collecting duct epithelium. The AVP-induced intracellular events include, as an essential step, the trafficking of the vesicles containing the water channels, aquaporin-2, to the apical plasma membrane of the collecting duct principal cells. The interstitium of the renal inner medulla contains abundant linear negatively charged glycosaminoglycan hyaluronan (HA), which affects the water flow depending on their polymeric state. Using real-time RT-PCR, we tested the assumption that the renal hyaluronan may be involved in the long-term vasopressin effect on water reabsorption. The expression of the genes encoding hyaluronan synthase-2 (*Has2*) and hyaluronidase-1, 2 (*Hyal1*, *Hyal2*) in the kidneys of Wistar Albino Glaxo (WAG) was studied. *Has2* mRNA content was the highest in the kidney papilla of the hydrated rats. The V₂ receptor-selective vasopressin analog dDAVP (100 µg/kg bw, ip, twice a day for 2 days) induced a considerable decrease in *Has2* mRNA content in the papilla with less pronounced changes in the cortex. In contrast to *Has2*, dDAVP treatment caused a significant increase in *Hyal1* and *Hyal2* mRNA content in the renal papilla. There was a good fit between *Hyal1* and *Hyal2* transcriptional level and changes in hyaluronidase activity in the renal tissue. It was suggested that vasopressin is able to inhibit the synthesis of hyaluronan and concomitantly

promotes its degradation in the renal papilla interstitium, thereby facilitating water flow between elements of the renal countercurrent system. The implications for this effect are discussed in the context of the literature data.

Key words: vasopressin; kidney; hyaluronan; hyaluronansynthase-2; hyaluronidase-1, 2; gene expression; water reabsorption.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Иванова Л.Н., Бабина А.В., Батурина Г.С., Каткова Л.Е. Влияние вазопрессина на экспрессию генов, кодирующих ключевые ферменты метаболизма гиалуронана интерстициальной ткани, и на концентрирующую функцию почки крыс WAG. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(2):234-242. DOI 10.18699/VJ16.138

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Ivanova L.N., Babina A.V., Baturina G.S., Katkova L.E. Effect of vasopressin on the expression of genes for key enzymes of interstitial hyaluronan turnover and concentration ability in WAG rat kidneys. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(2):234-242. DOI 10.18699/VJ16.138

В системе регуляции водно-электролитного гомеостаза у млекопитающих главным фактором, стимулирующим реабсорбцию воды в почке путем повышения осмотической проницаемости эпителия дистальных канальцев, является нейрогипофизарный гормон вазопрессин. Открытие аквапоринов, водных каналов клеточных мембран, отмеченное в 2003 г. Нобелевской премией (Agre, 1997, 2004), послужило основой прогресса в изучении молекулярных механизмов действия гормона. Согласно современным представлениям, вазопрессин, связываясь со специфическими рецепторами базальной мембраны главных клеток эпителия собирательных трубок, индуцирует цепь реакций, включающих в качестве главного звена транслокацию аквапоринов в апикальную мембрану клетки, и увеличение ее проницаемости (Nielsen et al., 2001; Noda, Sasaki, 2005; Rinschen et al., 2010). Помимо быстрого эффекта, развивающегося в течение нескольких минут, вазопрессин оказывает долговременное действие на проницаемость собирательных трубок на геномном уровне, стимулируя биосинтез аквапоринов (Ecelbarger et al., 1996; Uawithya et al., 2008). Несмотря на успех, достигнутый в последние годы в изучении клеточных механизмов действия вазопрессина, многие вопросы регуляции концентрирующей функции почек остаются нерешенными. Процесс осмотического концентрирования достигает максимального уровня в зоне внутреннего мозгового вещества – сосочке почки. В этой зоне барьер для диффузии воды из собирательных трубок в кровотоки представлен не только эпителием, но также плотным внеклеточным матриксом, разделяющим элементы концентрирующего противоточного механизма. Основным компонентом внеклеточного матрикса является гиалуронан (гиалуроновая кислота, ГК) – линейный отрицательно заряженный гликозаминогликан, построенный из повторяющихся дисахаридных единиц Д-глюкуроновой кислоты и N-ацетилглюкозамина (Comper, Laurent, 1978; Lee, Spicer, 2000). В почке млекопитающих распределение ГК гетерогенно: высокая концентрация характерна для внутренней зоны мозгового вещества, в то время как в корковом веществе содержание ГК в десятки раз ниже (Ivanova et al., 1982; Rügheimer et al., 2008). В высокополимерном состоянии ГК обладает уникальной способностью формировать трехмерный гель, связывать большие объемы воды и положительно заряженные

ионы, и это свойство может влиять как на диффузию воды и растворов в медулле почки, так и на поддержание концентрационного градиента (Day, 1952; Hedbys, 1963; Preston et al., 1965; Pinter, Shohet, 2009). Благодаря высокой вязкости ГК также может обладать функцией механо-осмотического преобразователя, конвертирующего энергию перистальтического сокращения гладких мышц почечной лоханки в аксиальный осмотический градиент в сосочке (Knepper et al., 2003; Pinter, Shohet, 2009).

А.Г. Гинецинским в 1958 г. была предложена гипотеза о вовлечении гиалуронидазы в механизм действия вазопрессина на реабсорбцию воды в почке (Ginetzinsky, 1958). В пионерских работах его лаборатории было найдено, что гиалуронидазная активность мочи нарастает при дегидратации и введении препаратов нейрогипофизарного гормона и падает практически до нуля при водной нагрузке. При этом гистохимически выявляются существенные изменения состояния интерстициального матрикса и межклеточных контактов в эпителии собирательных трубок (Иванова, 1958; Закс, Титова, 1959; Наточин, 1959; Иванова, Виноградов, 1962). Интерес к «гиалуронидазной гипотезе» возобновился в последние годы в связи с появлением новых данных о большой зависимости гиалуронидазной активности и содержания ГК в почке от интенсивности осмотического концентрирования и уровня вазопрессина в крови (Ivanova, Melidi, 2001; Harada, Takahashi, 2007; Rügheimer et al., 2008). Однако вопрос о молекулярных механизмах вовлечения ГК интерстициального матрикса в эффект вазопрессина на транспорт воды в почке остается дискуссионным и требует дальнейших исследований (Pinter, Shohet, 2009; Stridh et al., 2012).

Гетерогенность распределения ГК по функциональным зонам почки и изменение его концентрации при смене водного режима, по-видимому, могут быть объяснены различной интенсивностью биосинтеза этого полисахарида или его деградации. У млекопитающих идентифицированы три изоформы гиалуронан-синтазы, осуществляющие биосинтез ГК – HAS1, 2 и 3 (Spicer, McDonald, 1998). В почке крыс обнаружена экспрессия всех трех ферментов (Rügheimer et al., 2009). По-видимому, наиболее существенный вклад в содержание ГК вносит HAS2, для которой характерны продукция полимера максимальной длины и большая скорость полимеризации (Itano, Kimata, 1996; Jacobson et al., 2000; Bartolo,

Donald, 2007). В деградации ГК в соматических тканях млекопитающих основную роль играют лизосомальные гидролазы: гиалуронидаза 1-го типа, β -глюкуронидаза и β -N-ацетилглюкозаминидаза и гиалуронидаза 2-го типа, фиксированная на плазматической мембране клеток (Csoka et al., 2001; Jedrzejak, Stern, 2005; Harada, Takahashi, 2007). HYAL2 функционирует внеклеточно, гидролизует ГК с преимущественным образованием крупных остатков порядка 20–50 кДа, которые интернализуются в клетку и гидролизуются далее лизосомальными ферментами (Stern, 2003; Ericsson, Stern, 2012). В настоящем исследовании проведен анализ действия вазопрессина на экспрессию генов, кодирующих ключевые ферменты обмена ГК, в различных зонах почки крыс WAG в сопоставлении с показателями почечной функции.

Материалы и методы

Экспериментальные животные. Работа проведена на половозрелых крысах линии WAG весом 200–250 г, выращенных в ЦКП «Виварий конвенциональных животных» ИЦиГ СО РАН (г. Новосибирск). Крыс содержали группами по четыре–шесть особей в стандартных условиях со свободным доступом к питьевой воде и сухому корму. Исследование выполнено в соответствии с «Правилами работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу № 755 Министерства здравоохранения от 12 августа 1977 г.), а также с международными принципами Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным.

За день до эксперимента крыс помещали в индивидуальные клетки с сетчатым дном, в которых их содержали в течение всего экспериментального периода, и собирали спонтанно выделявшиеся пробы мочи для определения следующих функциональных параметров: диурез, скорость клубочковой фильтрации по клиренсу креатинина и уровень реабсорбции осмотически свободной воды ($T_{H_2O}^C$). В конце эксперимента животных анестезировали тиопенталом натрия (10 мг/кг веса тела, внутривенно) и после декапитации забирали пробы крови и образцы почечной ткани. Концентрацию креатинина в плазме крови и моче измеряли спектрофотометрически (PD 303 UV, Arel, Япония). Осмоляльность мочи и плазмы крови определяли криоскопическим способом (миллиосмометр МТ-2, Россия). Расчет почечных функций проводили по стандартным формулам.

Дизайн эксперимента. Все животные были разделены на три группы:

1) контрольные крысы ($n = 4$) содержались на стандартном корме со свободным доступом к питьевой воде; животным этой группы вводили физиологический раствор (0,5 мл внутривенно, дважды в день) в течение двух дней;

2) гидратированные крысы ($n = 4$); животных в течение двух дней лишали стандартного корма, но они имели свободный доступ к гипотоническому 4 %-му раствору сахарозы, в данных условиях потребление которого крысами достигало 60–70 % от массы тела в день; животные гидратировались и секреция эндогенного вазопрессина подавлялась;

3) крысы ($n = 4$) с введением селективного агониста V_2 -рецепторов вазопрессина (дезамино-Cys1,D-Arg8-вазопрессин, dDAVP, Sigma, США); препарат вводили внутривенно дважды в день в течение двух дней в дозе 100 мкг/кг массы тела; животных содержали на стандартном корме со свободным доступом к питьевой воде.

Оценка экспрессии мРНК генов в почке крыс. Уровень экспрессии мРНК генов, кодирующих ферменты метаболизма ГК (*Has2*, *Hyal1*, *Hyal2*), определяли в коре и внутреннем мозговом веществе почки методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Образцы тканей почки, взятые на холоде сразу после декапитации животных, помещали в стерильные пробирки, замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C до выделения РНК. Тотальную РНК из тканей почек получали с использованием набора реагентов Aurum Total RNA Mini kit (Bio-Rad, США) на колонках согласно прилагаемому протоколу. Концентрацию РНК в полученном образце измеряли на спектрофотометре Eppendorf BioPhotometer Plus (Eppendorf, Германия). Чистоту определяли по соотношению оптических плотностей образца, измеренных при 260 и 280 нм; в работе использованы пробы с коэффициентом более 1,8.

Для проведения обратной транскрипции смешивали 2 мкг тотальной РНК в 20 мкл реакционной смеси, в которую входили: 200 единиц обратной транскриптазы М-MLV RT (Биосан, Новосибирск, Россия), 0,1 мМ олиго-dT 18 праймеры (Биосинтез, Новосибирск, Россия), 1 \times MLV RT буфер (Promega, США), 3,5 мМ dNTP (Сибэнзим, Новосибирск, Россия), 5 мМ дитиотреитол (DTT, Sigma, США), 20 единиц ингибитора рибонуклеаз (Fermentas, Литва). В негативном контроле вместо РНК добавляли аликвоту бидистиллированной воды. Смесь инкубировали 60 мин при 42°C , реакция прерывалась инактивацией ферментов в течение 10 мин при 95°C . Работа выполнена в амплификаторе БИС (Россия). Полученную кДНК хранили при -20°C .

ПЦР в реальном времени проводили в реакционной смеси объемом 25 мкл, содержащей 2,5 мкл кДНК и 22,5 мкл смеси, состоящей из 2,5 мМ дезоксинуклеозидтрифосфатов, 10-кратного ПЦР буфера, 25 мМ MgCl_2 , 5 Е/мкл Taq ДНК-полимеразы с ингибирующими активностью фермента антителами, деионизированной воды (Набор реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя EVA Green, Синтол, Россия), смеси 12,5 пкмоль прямого и обратного праймеров (Биосинтез, Новосибирск, Россия). В негативном контроле вместо кДНК добавляли бидистиллированную воду. Амплификацию проводили в системе CFX96 real-time PCR (BioRad, США) по следующей схеме: 1) денатурация $95^\circ\text{C} - 5$ мин; 2) денатурация $95^\circ\text{C} - 10$ с, отжиг при оптимальной температуре для выбранных праймеров (60°C) – 30 с, элонгация $72^\circ\text{C} - 20$ с, 39 циклов; 3) определение кривых плавления продуктов амплификации в диапазоне температур от 65 до 95°C при шаге в $0,5^\circ\text{C}$ для подтверждения специфичности амплификации и отсутствия димерных праймеров. Ген-специфичные праймеры представлены в табл. 1, подбор проводили таким образом, чтобы соответствующие фрагменты геномной ДНК содержались внутри одного экзона.

Table 1. Primers for real-time RT-PCR and amplicon sizes

Gene	Primer sequence	Amplicon length, bp
<i>Has2</i>	F: 5'-CTTCCGAGAGTGGCTATACAATGC-3'	210
	R: 5'-GCGAAAGACGACTTGATGAGACC-3'	
<i>Hyal1</i>	F: 5'-TCGGACCCTTTATCCTGAAC-3'	262
	R: 5'-TTCTTACACCACTCTCCACTC-3'	
<i>Hyal2</i>	F: 5'-TCAGTGACGCTTCAAGTATGGA-3'	181
	R: 5'-GACTGAGGTGCAAGAAGGTACTG-3'	
<i>HPRT1</i>	F: 5'-AGTTTGTGTGGATATGCCCTTG-3'	126
	R: 5'-TGTAGATTCAACTTGCCGCTGTC-3'	

Количественную оценку уровня экспрессии мРНК изучаемых генов проводили по отношению к экспрессии гена «домашнего хозяйства» гипоксантинфосфорилтрансферазы-1 (*HPRT1*), который служил внутренним стандартом обратной транскрипции. После проведения ОТ-ПЦР данные анализировали в пакете программ CFX Manager Software ver. 1.5 (Bio-Rad, США). Каждое измерение выполняли в трех повторностях и нормировали относительно экспрессии гена *HPRT1* с использованием стандартного метода (Bookout et al., 2006).

После проведения ПЦР продукты амплификации идентифицировали при помощи электрофореза с использованием 1 %-го этидиум бромид (Медиген, Новосибирск, Россия) в 1,8 %-м агарозном геле (агароза – Sigma, США) с 1 × TBE буфером (разбавление TBE × 10, включающего 108 г трис, 54 г борной кислоты, 20 мл 1М ЭДТА, дистиллированная вода – до 1 л). Идентификацию проводили относительно ДНК-маркеров (Fermentas, Литва). Электрофорез осуществляли при напряжении 120 В в течение 30 мин в аппарате для горизонтального электрофореза (Helicon, Россия), гель фотографировали фотокамерой Olympus в ультрафиолетовом свете (300 нм) на трансиллюминаторе (рис. 1). Каждая пара праймеров давала одну полосу продукта ожидаемого размера.

Определение активности гиалуронидазы в ткани почки. Для определения гиалуронидазной активности в пробах крови и растворах гомогенатов коры и сосочка почки использовали флюориметрический метод Моргана–Эльсона в модификации Такахаши (Takahashi et al., 2003) в условиях трехчасового гидролиза при 37 °С по конечному продукту – N-ацетилглюкозамину (GlcNAc). Активность сопутствующих экзогидролаз в реакционной смеси ингибировали 0,02 М раствором слизиевой кислоты. Флюоресценцию измеряли на флюориметре-2М (ЛЮМЭКС, Россия) при волне возбуждения 545 нм и эмиссии – 602 нм. За единицу активности гиалуронидазы принимали количество фермента, необходимого в данных условиях реакции для образования одного мкмоль конечного глюкозамина за одну минуту. Соответствующая калибровочная кривая ставилась с известными концентрациями N-ацетилглюкозамина.

Измерение содержания гиалуронана в ткани почки. Образцы почечной коры и сосочка замораживали в жидком азоте, измельчали и выдерживали в смеси этанола и эфира, высушивали и взвешивали. Гиалуронан экстрагировали в 0,5 М NaOH в течение 15 ч при 4 °С. После центрифугирования (2000 g, 20 мин, 4 °С) супернатант анализировали, используя набор ELISA (Echelon Bioscience Inc., США).

Гистохимическое выявление гиалуронана. Светооптическое исследование выполнено на уровне коры почки и средней трети сосочка почки, содержащей структуры, ответственные за осмотическое концентрирование. Для подготовки блоков к проведению гистохимического анализа содержания гиалуроновой кислоты от почки после извлечения отсекали полосу; полученный фрагмент, включающий все зоны почки, помещали в 12 %-й фор-

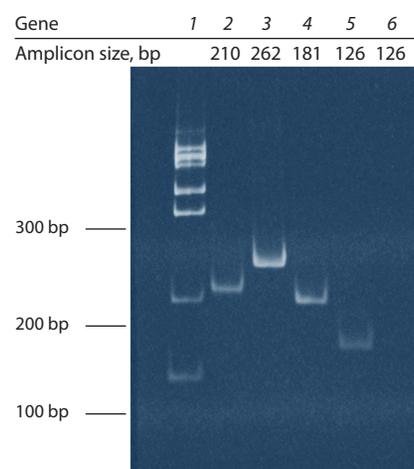


Fig. 1. Analysis of amplicons of genes under study *Has2*, *Hyal1*, *Hyal2*; the *HPRT1* housekeeping gene; and the negative PCR control.

Lanes: 1, DNA molecular weight ladder; 2, *Has2*; 3, *Hyal1*; 4, *Hyal2*; 5, *Hprt1*; 6, *Hprt1* (no RT).

малин на 48 ч. Далее осуществляли обезвоживание и заливку ткани в среду Histomix (БиоВитрум, Россия) по стандартным методикам. Срезы готовили на санном микротоме Microm HM430 (Microm International GmbH, Германия) толщиной 5 мкм. Окрашивание для специфического выявления кислых гликозаминогликанов производили алциановым синим (БиоВитрум, Россия), использовали 1 %-й раствор красителя при pH 2,5 в течение 3 мин. Для того чтобы избежать появления артефактов окраски, срезы контрольных и опытных групп окрашивали одновременно. Препараты изучали под световым

Table 2. Effects of hydration and dDAVP administration on renal functions

Renal function	Experimental series		
	Control	Hydration	dDAVP administration
Urine formation rate, ml/h/100 g body wt	0.15 ± 0.02	1.2 ± 0.3***	0.23 ± 0.04
Glomerular filtration rate (creatinine clearance), ml/h/100 g body wt	10.8 ± 2.0	12.9 ± 1.4	9.7 ± 1.4
Urine osmolality, mOsm/kg H ₂ O	1709 ± 85	61 ± 14***	2300 ± 105**
Plasma osmolality, mOsm/kg H ₂ O	311 ± 17	298 ± 16	301 ± 28
Osmotically free water reabsorption, ml/h/100 g body wt	+1.29 ± 0.22	-0.7 ± 0.014***	+1.52 ± 0.21

** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared to control rats.

микроскопом Axioscop 40 (Carl Zeiss, Германия) при увеличении объектива $\times 63$. Снимки препаратов выполнены с использованием цифровой фотонасадки AxioCam MRC (Carl Zeiss, Германия).

Статистическая обработка данных. Достоверность различий в изучаемых группах оценивали по t -критерию Стьюдента для парных сравнений. Для сравнения независимых выборок анализ достоверности различий проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA. Статистическую обработку проводили в пакете программ Statistica (StatSoft, США). Достоверными признавали различия при $p \leq 0,05$. Приведенные в работе данные представлены в виде: среднее \pm ошибка среднего ($M \pm SEM$).

Результаты

Оценка параметров почечной функции. Для животных разных экспериментальных групп были характерны существенные различия концентрирующей функции почек (табл. 2). Контрольные крысы экскретировали гипертоническую мочу. Обильное питье гипотонического 4 %-го раствора сахарозы в течение двух дней приводило к возрастанию скорости мочеобразования и резкому снижению осмоляльности экскретируемой мочи, обусловленному торможением реабсорбции осмотически свободной воды. Осмоляльность плазмы крови в данной экспериментальной группе не отличалась от контроля. Очевидно, это связано с перераспределением жидкости между компартментами в условиях гидратации. Введение dDAVP в течение двух дней индуцировало существенное возрастание реабсорбции осмотически свободной воды, и осмоляльность мочи достигала максимальных значений. Существенных различий скорости клубочковой фильтрации, измеренной по клиренсу креатинина, между экспериментальными группами не наблюдалось.

Уровень экспрессии генов ферментов метаболизма гиалуронана. При проведении ОТ-ПЦР в реальном времени было обнаружено, что мРНК гена *Has2* экспрессируется в коре и внутреннем мозговом веществе почки (рис. 2, а). Снижение реабсорбции осмотически свободной воды после двухдневной гидратации сопровождалось повышением экспрессии мРНК гена *Has2* во внутреннем мозговом веществе почки по сравнению с контролем.

В коре почки гидратированных крыс наблюдалось увеличенное содержание мРНК *Has2*, но в этой зоне прирост был значительно меньше, чем во внутреннем мозговом веществе. Введение селективного агониста V₂-рецепторов вазопрессина (dDAVP) приводило к снижению экспрессии *Has2* в коре почки по сравнению с контролем и группой гидратации, однако наиболее резкие различия содержания мРНК *Has2*, по сравнению с группой гидратации, отмечались во внутреннем мозговом веществе.

Содержание мРНК гена *Hyal-1* в коре почки достоверно не изменялось в условиях гидратации или введения dDAVP (рис. 2, б). Однако во внутреннем мозговом веществе при введении dDAVP выявлено существенное увеличение уровня экспрессии мРНК *Hyal-1*.

Тенденция к нарастанию уровня экспрессии мРНК гена *Hyal-2* наблюдалась в коре почки в условиях введения dDAVP (рис. 2, в). При этом гидратация гипотоническим раствором сахарозы вызвала достоверное снижение содержания мРНК *Hyal-2* в коре почки. По сравнению с контролем существенные изменения обнаружены во внутреннем мозговом веществе: достоверное уменьшение уровня экспрессии мРНК *Hyal-2* в условиях гидратации и значительное возрастание – при введении dDAVP. Низкое содержание мРНК *Hyal-2* в коре и внутреннем мозговом веществе почки гидратированных крыс коррелировало с наименьшей по сравнению с другими группами осмоляльностью экскретируемой мочи.

Активность гиалуронидазы в тканях почки. При определении гиалуронидазной активности в экстрактах коры почки не выявлено достоверных различий между экспериментальными группами (табл. 3). Активность гиалуронидазы во внутреннем мозговом веществе во всех группах была существенно выше по сравнению с корой. В условиях гидратации наблюдалось снижение гиалуронидазной активности во внутреннем мозговом веществе почки. Напротив, введение dDAVP вызвало достоверное возрастание активности фермента в ткани внутреннего мозгового вещества почки. Выявлена положительная корреляция между осмоляльностью мочи и активностью гиалуронидазы во внутреннем мозговом веществе почки ($r = 0,85, p < 0,05$).

Распределение гиалуронана в почке. В почке крыс WAG выявлено гетерогенное распределение ГК (табл. 3),

характеризующееся наименьшим содержанием ГК в коре всех экспериментальных групп. Во внутреннем мозговом веществе почки в условиях гидратации происходило достоверное возрастание содержания ГК. Действие dDAVP приводило к уменьшению содержания ГК во внутреннем мозговом веществе почки на 76 % по сравнению с гидратированными крысами. Результаты количественного распределения ГК согласуются с гистохимическим выявлением в почке исследованных животных (рис. 3). При светооптическом изучении срезов, окрашенных алциановым синим, не выявлено различий гистохимического окрашивания ГК в корковом веществе всех экспериментальных групп. В средней трети внутреннего мозгового вещества почки наиболее интенсивным было окрашивание ГК интерстициального пространства у гидратированных крыс (рис. 3, б), в то время как в группах контроля и введения dDAVP, характеризующихся высокими показателями эффективности осмотического концентрирования мочи, обнаружено менее интенсивное окрашивание интерстициального пространства (рис. 3, а, в).

Обсуждение

Был изучен эффект аналога вазопрессина, селективного агониста V₂-рецепторов, dDAVP, на экспрессию генов *Has2*, *Hyal1* и *Hyal2*, кодирующих ключевые ферменты, вовлеченные в обмен ГК в почке крыс WAG. Обнаружено, что содержание мРНК *Has2* было наибольшим во внутреннем мозговом веществе (сосочке почки) в условиях подавления секреции эндогенного вазопрессина у крыс WAG гидратацией. Введение в течение двух дней dDAVP ассоциировалось с существенным снижением содержания мРНК *Has2* в сосочке почки. Наблюдались четкие обратные отношения между экспрессией *Has2* в сосочке и реабсорбцией осмотически свободной воды. Повышенная транскрипция *Has2* при низком уровне вазопрессина в крови может свидетельствовать об усиленной продукции ГК, что подтверждалось нарастанием содержания ГК в почечной ткани и усилением интенсивности окрашивания структур интерстициального матрикса.

Введение крысам аналога вазопрессина приводило к снижению содержания ГК в интерстиции сосочка, что может быть не только следствием подавления биосинтеза полимера, но также усилением его катаболизма. Соответственно полученным результатам, гены *Hyal1* и *Hyal2* экспрессируются во всех функциональных зонах почки. В условиях действия dDAVP не наблюдалось существенного повышения экспрессии мРНК генов *Hyal1* и *Hyal2* и гиалуронидазной активности в корковом веществе почки по сравнению с контрольными животными, в то время как в области сосочка почки экспрессия этих генов и ферментативная активность значительно нарастали. На основании полученных данных невозможно выявить, какая именно форма гиалуронидазы вызывает повышение измеряемой гиалуронидазной активности ткани сосочка почки. Тем не менее отмечалась хорошая корреляция между изменением гиалуронидазной активности в тканевых экстрактах и транскрипционными событиями. В результате имело место повышение деградации ГК интерстиция, окружающего собирательные трубки, сегменты петель Генле и прямые сосуды, образующие пучки в мозговом

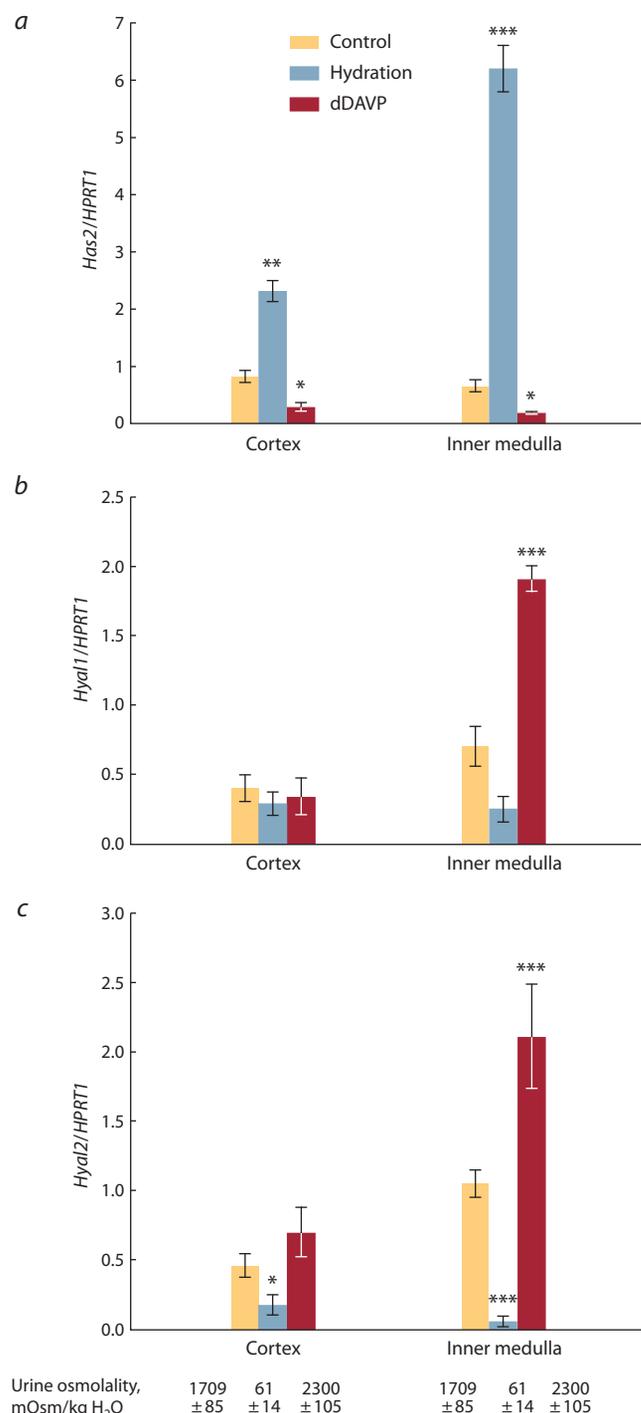


Fig. 2. Expression of mRNAs under study in the renal cortex and inner medulla of WAG rats: (a) hyaluronan synthase 2, (b) hyaluronidase 1, (c) hyaluronidase 2.

Expression of the *Has2* (a), *Hyal-1* (b), *Hyal-2* (c) genes is given relative to the *HPRT1* housekeeping gene. Data are shown as $M \pm SEM$. Significant differences from controls according to Student's *t* test: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Table 3. Effect of hydration and dDAVP administration on the content and Hyal activity in renal tissues

Experimental series	Hyaluronan content (mg/g dry wt)		Hyaluronidase activity (mcg GlcNAc/h/mg of protein)	
	Cortex	Papilla	Cortex	Papilla
Control	0.71 ± 0.05	7.9 ± 0.8 ^{vv}	15.1 ± 1.2	51.2 ± 4.9 ^{vv}
Hydration	0.88 ± 0.21	13.6 ± 0.1 ^{vvv ***}	14.5 ± 3.6	30.2 ± 5.5 ^{vvv **}
dDAVP administration	0.69 ± 0.12	3.29 ± 0.24 ^{vvv *}	18.9 ± 3.5	75.5 ± 6.4 ^{vvv *}

p* < 0.05; *p* < 0.01; ****p* < 0.001 compared to control; ^v*p* < 0.01; ^{vv}*p* < 0.001 compared to renal cortex.

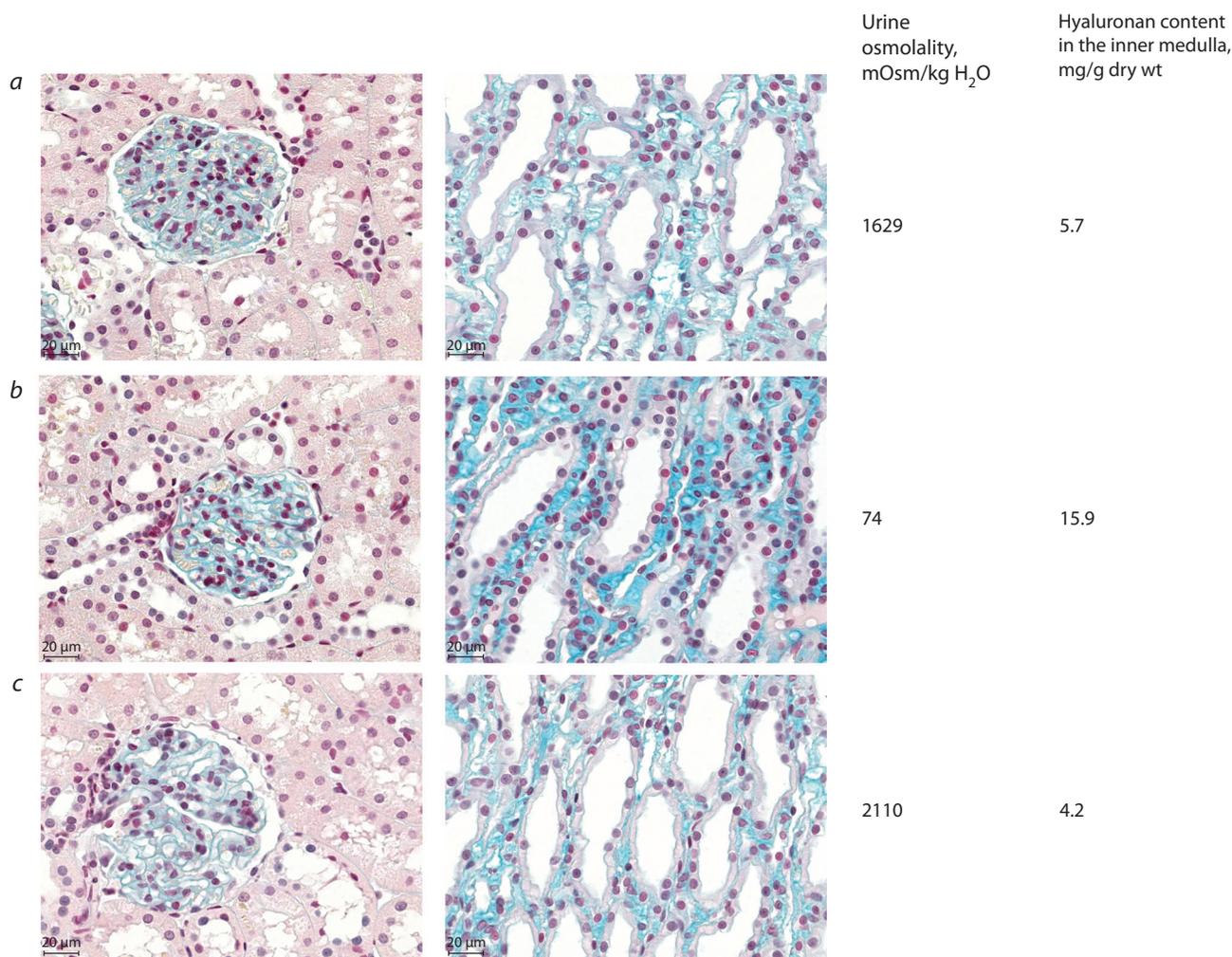


Fig. 3. Histochemical visualization of hyaluronan in the renal cortex and inner medulla of WAG rats. *a*, control; *b*, hydration; *c*, dDAVP treatment. Lens magnification × 63.

веществе почки. Предполагается, что гидролиз ГК в сосудистых пучках сосочка не только приводит к снижению вязкости интерстиция, но и сближает почечные канальцы и сосуды, вследствие чего укорачивается диффузионная дистанция между элементами концентрирующей системы почки и это способствует созданию осмотического градиента противоточной умножительной системой (Bartolo, Donald, 2007; Stridh et al., 2012).

Соответственно предыдущим исследованиям, двухчасовая гидратация, вызванная инфузией гипотонического раствора сахарозы, приводила к нарастанию содержания ГК в почечной сосочке крыс Спрэг-Доули, но при этом не регистрировалось нарастания транскриптов *Has2* и снижения транскриптов *Hyal1-4* (Hansell et al., 2000; Rügheimer et al., 2009). С точки зрения авторов, быстрое повышение ГК интерстиция за время двухчасовой гидра-

тации происходит без вовлечения изменений экспрессии генов и их вклада в продукцию и расщепление ГК, они предполагают, что нарастание ГК – следствие изменения активности гиалуронидазы. В то же время в их работе наблюдалась корреляция между снижением содержания ГК и уменьшением *Has2* транскрипции в сосочке почки после 24-часовой дегидратации. В нашем исследовании при пролонгированной гидратации (два дня) продемонстрированы как повышение экспрессии гена *Has2* с одновременным снижением экспрессии гена *Hyal2*, так и снижение гиалуронидазной активности в ткани сосочка. В экспериментах с введением аналога вазопрессина в течение двух дней у крыс WAG экспрессия гена *Has2* резко редуцировалась и одновременно повышалась экспрессия генов *Hyal1-2*. Таким образом, направленность изменений содержания ГК и гиалуронидазной активности в медуллярной зоне, которые наблюдались нами в экспериментах на крысах WAG, совпадает с тем, что получено ранее на крысах Спрэг-Дули (Hansell et al., 2000; Rügheimer et al., 2009). Расхождение литературных данных с нашими результатами в отношении экспрессии генов, кодирующих ферменты метаболизма ГК, может быть объяснено различиями экспериментального дизайна и длительностью эксперимента.

В сосочке почки вазопрессин может оказывать также не прямой эффект на активность гиалуронидазы благодаря изменению концентраций мочевины и натрия в интерстициальной среде. В сосочке почки крыс концентрация мочевины варьирует от 0,3 (во время водной нагрузки) до 1,0 М (при дегидратации), а натрия – от 0,15 до 0,4 М (Bulger, 1987). Кривая начальной скорости реакции гидролиза ГК ферментами, изолированными из почечного сосочка, показала, что концентрации мочевины и натрия, характерные для гидратации и долговременного эффекта вазопрессина, являются оптимальными для активности гиалуронидазы. В то же время концентрации выше или ниже оптимума оказывают ингибирующий эффект на ферментную активность (Ivanova et al., 1985). Х.Л. Брукс с коллегами (Brooks et al., 2003) наблюдали различные ответы генов на dDAVP в корковой и медуллярной зонах почки крыс Браттлборо, лишенных эндогенного вазопрессина. Авторы предположили, что долговременный эффект dDAVP может состоять из прямого и непрямого действия гормона на экспрессию генов. Непрямое действие может проявляться благодаря вазопрессин-индуцированным изменениям локальной осмоляльности и концентрации ионов. Наша гипотеза о регуляции активности гиалуронидазы в папиллярной зоне мочевиной и натрием согласуется также с наблюдениями, сделанными на бесклеточной среде, в которой был выявлен ингибирующий эффект низкой ионной силы на катализируемый гиалуронидазой гидролиз ГК (Asteriou et al., 2006). Сравнение данных предшествующих работ с результатами настоящего исследования подтверждает, что вазопрессин ускоряет катаболизм ГК в медуллярной зоне почки, при этом вовлекаются различные механизмы: вазопрессин повышает биосинтез ферментов HYAL1 и HYAL2 путем стимуляции экспрессии соответствующих генов и ускоряет деградацию ГК вследствие активации ферментов мочевиной и ионами натрия, концентрация

которых повышается в условиях антидиуреза. Дальнейшее изучение необходимо для проверки этой гипотезы.

Таким образом, результаты настоящего исследования показали, что изменение экспрессии генов, кодирующих ключевые ферменты обмена ГК интерстициальной ткани почки, вовлекается в эффект вазопрессина на реабсорбцию воды. Одновременно с повышением числа аквапоринов в клеточной мембране вазопрессин способен ингибировать синтез ГК интерстиция в мозговом веществе почки и вместе с этим стимулировать его деградацию. Это приводит к снижению содержания ГК в медуллярном интерстиции и облегчает диффузию воды между канальцами и сосудами концентрирующей системы почки. Вопрос о молекулярных механизмах эффекта вазопрессина на активность генов катаболизма ГК остается открытым.

Acknowledgments

This work was supported by State Budgeted Project 0324-2015-0004 and the Russian Foundation for Basic Research, project 10-04-01280.

The authors are grateful to the staff of the Vivarium of conventional animals, Institute of Cytology and Genetics, for providing experimental animals.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Agre P. Molecular physiology of water transport: aquaporins. *Biol. Cell.* 1997;89:255-257.
- Agre P. Nobel lecture. Aquaporin water channels. *Biosci. Rep.* 2004;24:127-163.
- Asteriou T., Vincent J.C., Tranchepain F., Deschrevel B. Inhibition of hyaluronan hydrolysis catalysed by hyaluronidase at high substrate concentration and low ionic strength. *Matrix Biol.* 2006;25:166-174.
- Bartolo R.C., Donald J.A. The distribution of renal hyaluronan and the expression of hyaluronan synthases during water deprivation in the Spinifex hopping mouse. *Notomys alexis*. *Comp. Biochem. Physiol. Part A. Mol. Integr. Physiol.* 2007;148:853-860.
- Bookout A.L., Cummins C.L., Mangelsdorf D.J., Pesola J.M., Kramer M.F. High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2006;Chapter 15:Unit 15.8.
- Brooks H.L., Ageloff S., Kwon T.-H., Brandt W., Terris J.M., Seth A., Michea L., Nielsen S., Fenton R., Knepper M. cDNA array identification of genes regulated in rat renal medulla in response to vasopressin infusion. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2003;284:F218-F228.
- Bulger R.E. Composition of renal medullary tissue. *Kidney Int.* 1987;31:556-561.
- Comper W.D., Laurent T.C. Physiological function of connective tissue polysaccharides. *Physiol. Rev.* 1978;58:265-315.
- Csoka A.B., Frost G.I., Stern R. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biol.* 2001;20:499-508.
- Day T.D. The permeability of the interstitial connective tissue and the nature of the interfibrillary substance. *J. Physiol.* 1952;177:1-8.
- Ecelbarger C.A., Chon C.L., Lolait S.J., Knepper M.A., DiGiovanni S.R. Evidence for dual signaling pathways for V₂ vasopressin receptor in rat inner medullary collecting duct. *Am. J. Physiol.* 1996;270:623-633.
- Ericsson M., Stern R. Chain gangs: new aspects of hyaluronan metabolism. *Biochem. Res. Int.* 2012. DOI 10.1155/2012/893947
- Ginetzinsky A.G. Role of hyaluronidase in the reabsorption of water in renal tubules (The mechanism of action of antidiuretic hormone). *Nature.* 1958;182:1218-1219.

- Hansell P., Göranson V., Odland C., Gerdin B., Hallgren R. Hyaluronan content in the kidney in different states of body hydration. *Kidney Int.* 2000;58:2061-2068.
- Harada H., Takahashi M. CD44-dependent intracellular and extracellular catabolism of hyaluronic acid by hyaluronidase-1 and -2. *J. Biol. Chem.* 2007;282:5597-5607.
- Hedbys B.O. Corneal resistance to the flow of water after enzymatic digestion. *Exptl. Eye. Res.* 1963;2:112-121.
- Itano N., Kimata K. Expression cloning and molecular characterization of HAS protein, a eukaryotic hyaluronan synthase. *J. Biol. Chem.* 1996;271:9875-9878.
- Ivanova L.N. To the question on hyaluronidase role in urine production. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny*=Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 1958;45:22-27.
- Ivanova L.N., Goryunova T.E., Nikiforovskaya L.F., Tishchenko N.I. Hyaluronate hydrolase activity and glycosaminoglycans in the Brattleboro rat kidney. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1982;394:503-508.
- Ivanova L.N., Goryunova T.E., Nikiforovskaya L.F., Tishchenko N.I. Distribution and activity of hyaluronate hydrolases in the kidney and their reaction to ADH. Eds R. Dzurik, B. Lichardus, W. Guder. *Kidney metabolism and function.* Dordrecht:Martinus Nyhoff, 1985.
- Ivanova L.N., Vinogradov V.V. Histochemical features of renal medullar interstitial mucopolisaccharides. *Arkhiv anatomii, gistologii i embriologii*=Archives of anatomy, histology and embryology. 1962; 43:18-23.
- Ivanova L.N., Melidi N.N. Effects of vasopressin on hyaluronate hydrolase activities and water permeability in the frog urinary bladder. *Pflugers Arch – Eur. J. Physiol.* 2001;443:72-77.
- Jacobson A., Brink J., Briskin M.J., Spicer A.P., Heldin P. Expression of human hyaluronan synthases in response to external stimuli. *Biochem. J.* 2000;348:29-35.
- Jedrzejewski M.J., Stern R. Structures of vertebrate hyaluronidases and their unique enzymatic mechanism of hydrolysis. *Proteins.* 2005;61: 227-238.
- Knepper M.A., Saidel G.M., Hascall V.C., Dwyer T. Concentration of solutes in the renal inner medulla: interstitial hyaluronan as a mechanoosmotic transducer. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2003;284: 433-446.
- Lee J.Y., Spicer A.P. Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Curr. Opin Cell. Biol.* 2000;12:581-588.
- Natochin Y.V. Hyaluronidase secretion in the kidney of different vertebrates. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny*=Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 1959;48:10-16.
- Nielsen S., Frokjer J., Marples D., Kwon T.-H., Agre P., Knepper M. Aquaporins in the kidney: from molecules to Medicine. *Physiol. Rev.* 2001;82:205-244.
- Noda Y., Sasaki S. Trafficking mechanism of water channel aquaporin-2. *Biol. Cell.* 2005;97:885-892.
- Pinter G.G., Shohet J.L. An inner medullary concentrating process activated by renal pelviccalyceal muscle contractions: assessment and hypothesis. *J. Nephron. Physiol.* 2009;113:1-6.
- Preston B.N., Davies M., Ogston A.G. The composition and physicochemical properties of hyaluronate acids prepared from ox synovial fluid and from mesothelioma. *Biochem. J.* 1965;96:449-471.
- Rinschen M.M., Yu M.-J.G., Boja J.D., Hoffert T., Pisitkun T., Knepper M.A. Quantitative phosphoproteomic analysis reveals vasopressin V2-receptor – dependent signaling pathway in renal collecting duct cells. *PNAS.* 2010;107:3882-3887.
- Rügheimer L., Johnsson C., Maric C., Hansell P. Hormonal regulation of renomedullary hyaluronan. *Acta Physiol.* 2008;193:191-198.
- Rügheimer L., Olerud L., Johnsson C., Takahashi T., Shimizu K., Hansell P. Hyaluronan synthases and hyaluronidases in the kidney during changes in hydration status. *J. Matrix Biol.* 2009;28:390-395.
- Spicer A.P., McDonald J.A. Characterization and molecular evolution of a vertebrate hyaluronan synthase gene family. *J. Biol. Chem.* 1998;273:1923-1932.
- Stern R. Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? *Glycobiology.* 2003;13:105R-115R.
- Stridh S., Palm F., Hansell P. Renal interstitial Hyaluronan: functional aspects during normal and pathological conditions. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2012;302:R1235-R1249.
- Takahashi T., Ikegami-Kawai M., Okuda R., Susuki K. A fluorimetric Morgan-Elson assay method for hyaluronidase activity. *Anal. Biochem.* 2003;322:257-261.
- Uawithya P., Pisitkun T., Ruttenberg B.E., Knepper M.A. Transcriptional profiling of native inner medullary collecting duct cells from rat kidney. *Physiol. Genomics.* 2008;32:229-253.
- Zaks M.G., Titova M.M. Histological and histochemical changes in rat kidney under hydration and antidiuresis. *Arkhiv anatomii, gistologii i embriologii*=Archives of anatomy, histology and embryology. 1959;37:19-24.