

DOI: 10.7868/S2658655X26020064  
УДК 612

Экспериментальная статья

## Роль цАМФ в регуляции вазопрессином водной проницаемости главных клеток собирательных трубок почки крыс линии Браттлборо

Г.С. Батурина<sup>1,2,\*</sup>, Л.Е. Каткова<sup>1,2</sup>, Е.И. Соленов<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>*Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук,  
Новосибирск, Российская Федерация*

<sup>2</sup>*Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,  
Новосибирск, Российская Федерация*

<sup>3</sup>*Новосибирский государственный технический университет,  
Новосибирск, Российская Федерация*

\*E-mail: baturina@yandex.ru

*Аннотация.* Гормон вазопрессин (АДГ) играет важную роль в регуляции водно-солевого баланса в организме млекопитающих. У крыс Браттлборо в результате мутации в гене АДГ-нейрофизина отсутствует эндогенный гормон, что приводит к рецессивной форме центрального несахарного диабета. В работе исследовали роль цАМФ в АДГ-зависимой регуляции водной проницаемости апикальной и базолатеральной мембран клеток собирательных трубок наружного мозгового вещества почки (ОМCD) у крыс Браттлборо. В качестве контроля использовали данные, полученные на гидратированных крысах Вистар. Коэффициент водной проницаемости (Pf) изолированных ОМCD оценивали методом, основанным на гашении флуоресценции кальцеина белками цитоплазмы. Содержание аквапоринов AQP2 и AQP3 в мембранной фракции клеток наружного мозгового вещества оценивали методом вестерн-блоттинга. Как агонист V2-рецепторов вазопрессина (dDAVP,  $10^{-8}$  М), так и проникающий аналог цАМФ (дб-цАМФ,  $10^{-5}$  М) при 25-минутном воздействии достоверно увеличивали водную проницаемость как апикальной, так и базолатеральной мембран главных клеток ОМCD у крыс обеих линий. При этом аналог цАМФ имел более выраженный эффект, чем dDAVP. Ранее нами было показано, что кратковременное воздействие dDAVP увеличивало содержание в мембранной фракции AQP2 у крыс Вистар и AQP2-3 у Браттлборо. В данной работе вестерн-блоттинг показал, что дб-цАМФ повышал содержание AQP2, но не AQP3 в мембранной фракции наружного мозгового вещества почки, как у крыс Вистар, так и у крыс Браттлборо. Можно предположить, что у крыс Браттлборо транспорт воды через базолатеральную мембрану главных клеток ОМCD, опосредованный AQP3, регулируется под действием АДГ не только цАМФ-зависимым путем, но и с участием других систем вторичных мессенджеров.

*Ключевые слова:* вазопрессин, аквапорины, крысы Браттлборо, цАМФ, регуляция водной проницаемости, несахарный диабет

*Финансирование.* Работа сделана в рамках госзадания Института цитологии и генетики СО РАН «Механизмы генетического контроля развития, физиологических процессов и поведения животных» FWNR-2022-0019.

*Соблюдение этических стандартов.* Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации. Они были одобрены Комиссией по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН (протокол № 115 от 20.12.2021 г.).

*Конфликт интересов.* Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

*Вклад авторов в публикацию.* КЛЕ, БГС – равный вклад, получение экспериментальных данных, обсуждение результатов исследования, написание текста статьи. СЕИ – концепция, получение экспериментальных данных, написание текста.

*Ссылка для цитирования:* Батурина Г.С., Каткова Л.Е., Соленов Е.И. Роль цАМФ в регуляции вазопрессинном водной проницаемости главных клеток собирательных трубок почки крыс линии Браттлборо. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова / Russian Journal of Physiology*. 2026. Т. 112. № 2. С. 503–517. <https://doi.org/10.7868/S2658655X26020064>

DOI: 10.7868/S2658655X26020064

Experimental article

## Vasopressin-Dependent Water Permeability Regulation in Collecting Duct Principal Cells of Brattleboro Rats: the Role of cAMP

G.S. Baturina<sup>1,2,\*</sup>, L.E. Katkova<sup>1,2</sup>, E.I. Solenov<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation*

<sup>2</sup>*Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation*

<sup>3</sup>*Novosibirsk State Technical University, Novosibirsk, Russian Federation*

\*E-mail: [baturina@yandex.ru](mailto:baturina@yandex.ru)

*Abstract.* The hormone vasopressin (ADH) plays an important role in water-salt balance regulation in mammals. In the Brattleboro rats, a mutation in the ADH-neurophysin gene results in the absence of endogenous ADH, leading to a recessive form of central diabetes insipidus. This study aimed to investigate the role of cAMP in ADH-dependent regulation of water permeability of the apical or basolateral membranes of the kidney outer medullary collecting duct (OMCD) principal cells of the Brattleboro rats. The data obtained on water-loaded Wistar rats were used as a control. The water permeability coefficient ( $P_f$ ) of principal cells in isolated OMCD was estimated by a method based on the quenching of calcein fluorescence by cytoplasmic proteins. The protein levels of AQP2 and AQP3 in the membrane

fraction of the outer medulla cells was estimated by Western blot analysis. Both the vasopressin V2 receptor agonist (dDAVP,  $10^{-8}$  M) and a membrane-permeable cAMP analogue (db-cAMP,  $10^{-5}$  M) significantly increased the Pf of the apical and basolateral membranes of the OMCD principal cells in rats of both lines after 25 minutes of exposure. However, the cAMP analogue caused a more pronounced effect than dDAVP. According to the results obtained by us earlier, short-term exposure to dDAVP increased the membrane fraction AQP2 protein level in Wistar rats and AQP2-3 in Brattleboro rats. Western blot analysis showed that db-cAMP increased the protein level of AQP2, but not AQP3, in the membrane fraction of the outer medulla of the kidney in both Wistar and Brattleboro rats. It can be assumed that in Brattleboro rats, AQP3-mediated water transport through the basolateral membrane of the OMCD principal cells is regulated by ADH not only through the cAMP-dependent pathway, but also through other secondary signaling systems, such as those related to calcium.

*Keywords:* vasopressin, aquaporins, Brattleboro rats, cAMP, kidney collecting ducts, water permeability regulation, diabetes insipidus

*Funding.* The work was carried out as part of the state assignment of the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, “Mechanisms of Genetic Control of Development, Physiological Processes, and Animal Behavior” FWR-2022-0019.

*Ethics declarations.* All procedures performed in animal studies complied with the ethical standards approved by the legal acts of the Russian Federation and the principles of the Basel Declaration. They were approved by the Bioethics Commission of the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Minutes No. 115 dated December 20, 2021).

*Conflict of interests.* The authors declare that there are no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

*Authors contribution.* KLE, BGS – equal contribution, obtaining experimental data, discussing research results, writing the article text. SEI – concept, obtaining experimental data, writing the text.

*For Citation:* Baturina G.S., Katkova L.E., Solenov E.I. Vasopressin-Dependent Water Permeability Regulation in Collecting Duct Principal Cells of Brattleboro Rats: the Role of cAMP. *Rossiiskij fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova / Russian Journal of Physiology*. 2026;112(2):503–517. (In Russ.)  
<https://doi.org/10.7868/S2658655X26020064>

## ВВЕДЕНИЕ

Аргинин-вазопрессин (антидиуретический гормон, АДГ) является основным гормоном, поддерживающим водный гомеостаз в организме млекопитающих, главным образом за счет регуляции реабсорбции воды в дистальной части нефрона и в собирательных трубках [1]. Согласно классической схеме передачи гормонального сигнала АДГ в главных клетках собирательных трубок почки, связывание

гормона со специфическими V<sub>2</sub>-рецепторами приводит к активации аденилатциклазы, наработке цАМФ и к запуску каскада внутриклеточных процессов, одним из конечных результатов которых является встраивание субапикальных везикул, содержащих водные каналы 2-го типа (аквапорин 2, AQP2), в апикальную мембрану [2, 3]. В базолатеральной мембране главных клеток собирательных трубок представлены AQP3 и ртуть-нечувствительный водный канал AQP4 [4–6]. Известно, при длительной активации передачи сигнала через V<sub>2</sub>-рецептор индуцируется синтез AQP2, AQP3, AQP 4 *de novo* [7, 8]. Ранее нами было показано, что в кратковременной регуляции водной проницаемости базолатеральной мембраны главных клеток собирательных трубок наружного мозгового вещества (OMCD) под действием АДГ основную роль играют ртуть-чувствительные водные каналы, по-видимому, AQP3 [9]. Сигнальные пути, участвующие в кратковременной регуляции водной проницаемости базолатеральной мембраны клеток собирательных трубок под действием АДГ, в настоящее время неизвестны.

Крысы линии Браттлборо являются носителями естественной мутации в гене предшественника АДГ, приводящей к отсутствию гормона в нейрогипофизе и плазме крови, что вызывает аутосомно-рецессивную форму гипоталамического несахарного диабета [10]. У крыс с несахарным диабетом снижается осмолярность мочи, увеличивается диурез и потребление жидкости [11]. Хорошо известно, что введение АДГ или его аналогов восстанавливает способность к концентрированию мочи у крыс Браттлборо, что говорит о существовании в почке крыс данной линии рецепторов V<sub>2</sub>-типа, способных связываться с лигандом, и основных звеньев механизма передачи гормонального сигнала [12–14]. Несмотря на то, что крысы Браттлборо являются общепринятой моделью наследственной формы центрального несахарного диабета, современных работ, посвященных детальному анализу молекулярных механизмов, отражающих особенности передачи сигнала АДГ в почке при этой патологии, не много.

Ранее нами показано, что агонист V<sub>2</sub>-рецепторов (десмопрессин, dDAVP) при длительном введении увеличивал апикальную и базолатеральную водную проницаемость клеток OMCD у крыс линии Вистар, в то время как у крыс линии Браттлборо этот эффект проявлялся главным образом базолатеральной [8]. В ряде исследований было установлено, что активация V<sub>2</sub>-рецепторов приводит к повышению уровня цАМФ, так и внутриклеточного кальция [15]. Вопрос о том, какие системы вторичных мессенджеров задействованы в АДГ-зависимой регуляции водной проницаемости базолатеральной мембраны клеток OMCD, остается актуальным.

Целью настоящей работы было исследование роли цАМФ в кратковременной АДГ-зависимой регуляции водной проницаемости апикальной и базолатеральной мембран клеток OMCD у вазопрессин-дефицитных крыс Браттлборо.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

*Животные.* В работе использованы ткани взрослых крыс (150–200 г) из стока Вистар и гомозиготных крыс Браттлборо обоих полов, выращенных на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных Института цитологии и генетики СО РАН. Для снижения уровня эндогенного АДГ крыс Вистар подвергали гидратации. С этой целью за 48 ч до эксперимента животных лишали корма и обеспечивали неограниченный доступ к 5%-ному водному раствору сахарозы. Ранее нами было показано, что при таких условиях содержания крыс Вистар, осмолярность

их спонтанно выделяемой мочи не отличается от таковой у гомозиготных крыс линии Браттлборо — это делает гидратированных крыс Вистар адекватной моделью для сравнения с крысами Браттлборо в контексте исследования дефицита АДГ [8].

*Получение фрагментов собирательных трубок.* Для получения суспензии фрагментов собирательных трубок мозгового вещества почки использовали методику, описанную нами ранее [16]. Извлеченные почки помещали в буферный фосфатный солевой раствор (PBS), декортицировали и удаляли внутреннее мозговое вещество и сосочек. Наружное мозговое вещество диспергировали, пропуская через инъекционную иглу с внутренним диаметром 0,45 мм, в низкокальциевом PBS, содержащем  $5 \times 10^{-5}$  М кальция. Полученную суспензию переносили в нормотоничный PBS (мМ: 137 NaCl; 4,7  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 2,7 KCl; 1,5  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,5  $\text{MgCl}_2$ ; 1  $\text{CaCl}_2$ ; 5 глюкоза; 280 мОсм/кг  $\text{H}_2\text{O}$ ; pH 7,4), фильтруя через капрон, и использовали как препарат фрагментов собирательных трубок наружного мозгового вещества. Все процедуры выполняли на холоде.

*Измерение водной проницаемости.* Метод измерения и расчета коэффициента водной проницаемости  $P_f$  плазматической мембраны клеток был описан нами ранее [17]. Непосредственно перед измерением каналы были сбалансированы в растворе PBS.

Для оценки коэффициента водной проницаемости мембраны был использован модифицированный метод, основанный на эффекте гашения флуоресценции красителя кальцеина (Calcein-AM) белками цитоплазмы [18]. Измерение флуоресценции кальцеина, отражающей кинетику осмотического набухания клеток, производилось при смене гипертонического (560 мОсм/кг  $\text{H}_2\text{O}$ ) раствора PBS на нормотонический (280 мОсм/кг  $\text{H}_2\text{O}$ ). Гипертонический раствор осмоляльностью 560 мОсм/кг  $\text{H}_2\text{O}$  получали добавлением в PBS маннитола (280 мМ).

Кратко: экспериментальная установка представляет собой проточную микрофлюидную камеру объемом 20 мкл, совместимую с флуоресцентным микроскопом OBSERVER 1 (Zeiss, Германия). Скорость протекания раствора в камере составляла 25 мл/мин, смена омывающего раствора — 100 мс, поддерживаемая температура  $36,8 \pm 0,2$  °C.

Перед измерением клетки загружали кальцеином ( $10^{-5}$ М, 20 мин, 37 °C) в камере микроскопа с остановленным потоком.

Начальные участки профилей величин относительной флуоресценции кальцеина, отражающие процесс входа воды в клетку, аппроксимировали линейной функцией. Расчет коэффициента линейной регрессии проводили, используя линейную аппроксимацию начального участка кривой методом наименьших квадратов.

При измерениях транспорта через базолатеральную мембрану клеток для блокады апикальной мембраны в просвет каналца вводили минеральное масло. Для оценки транспортных характеристик апикальной мембраны проводилась фиксация фрагмента собирательной трубки на стекле полилизинном (Poly-L-lysine solution 0,1% (w/v)  $\text{H}_2\text{O}$ ) с дальнейшим разрезанием ее стеклянным ножом. Базолатеральная поверхность затем была отогнута и стабилизирована на стекле, при этом клетки имели доступ к экспериментальной среде с апикальной стороны. Все манипуляции описаны и опубликованы ранее [19].

*Инкубация с dDAVP и  $\delta\text{b}$ - $\alpha$ АМФ.* Для оценки эффекта селективного агониста  $V_2$ -рецепторов десмопрессина и проникающего аналога циклического АМФ ( $\delta\text{b}$ - $\alpha$ АМФ) на водную проницаемость плазматической мембраны клеток собирательных трубок после контрольного определения коэффициента осмотической

водной проницаемости ( $P_f$ ) изолированный фрагмент канальца инкубировали с десмопрессинном (dDAVP  $10^{-8}$  М, Sigma Chemical, США) или дб-цАМФ (db-cAMP  $10^{-5}$  М, Sigma Chemical, США) 25 мин при  $37^\circ\text{C}$  в PBS непосредственно в камере измерения, далее повторяли определение  $P_f$ .

*Выделение мембранной фракции белков наружного мозгового вещества почки.* Методика получения обогащенной плазматическими мембранами фракции белков клеток наружного мозгового вещества почки описана нами ранее [19]. Наружное мозговое вещество почки нарезают на срезы толщиной 100–150 мкм. Контрольные срезы инкубировали в PBS. Срезы тестируемого образца помещали в PBS с добавлением dDAVP или дб-цАМФ. Инкубацию проводили в течение 25 мин при температуре  $37^\circ\text{C}$  при покачивании и аэрации. Сразу после этого ткань гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в холодном буфере для гомогенизации (НВ) (10 мМ Tris-HCl pH 7,4, 0,25 М сахарозы, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол), содержащем смесь ингибиторов протеаз (Complete protease inhibitor, Santa Cruz, США). Остатки клеток удаляли после центрифугирования (2000 об/мин в течение 15 мин при  $4^\circ\text{C}$ ). К супернатанту добавляли Percoll (Pharmacia, Швеция) до 30% (конечная концентрация) и центрифугировали смесь в течение 45 мин при 84000 g при  $4^\circ\text{C}$ . Обогащенную мембранами фракцию собирали и разбавляли ледяным буфером НВ в 5 раз и центрифугировали в течение 2 ч при 10000 g при  $4^\circ\text{C}$ . Осадок ресуспендировали в 100 мкл НВ и хранили при температуре  $-20^\circ\text{C}$ . Концентрацию белка определяли с помощью набора реактивов BCA Assay Reagent (Santa Cruz, США).

*Метод вестерн-блоттинга.* Препарат плазматических мембран растворяли в SDS-содержащем буфере (10 мМ Tris-HCl, pH 7,4, 0,25 М сахарозы, 1 мМ ЭДТА, ингибиторы протеаз, 1% SDS). Разделение белков проводили с помощью Лэмбли-электрофореза в 12%-ном акриламидном геле. Перенос белков на мембрану PVDF (Thermo scientific, США) проводили согласно протоколу производителя. Специфические антитела против AQP2 и AQP3 (Millipore, США) использовали в разведении 1 : 4000, антитела против  $\beta$ -тубулина (Abcam, США) в разведении 1 : 10000. Для проявления результатов вестерн-блоттинга использовали конъюгированные с пероксидазой хрена вторичные антитела (goat anti-rabbit secondary antibody, 1 : 10000, Santa Cruz Biotechnology, США) и коммерческие наборы с хемилюминисцентной детекцией (Clarity Western ECL substrate, Bio-Rad, США). Хемилюминисцентный сигнал детектировали с помощью прибора ChemiDoc MP imaging system (США) в Центре коллективного пользования Института цитологии и генетики СО РАН.

*Статистический анализ.* Для оценки статистической значимости различий в водной проницаемости изучаемых групп применяли  $t$ -критерий Стьюдента для парных сравнений. Различия признавались значимыми при  $p < 0,05$ . Для сравнения статистической значимости результатов вестерн-блоттинга сравнение различий проводили с помощью  $t$ -критерия для независимых групп. Различия признавались значимыми при  $p < 0,05$ . Количество образцов, взятых в реакцию, обозначали как  $n$ . Для проверки нормальности распределения использовали тест Шапиро–Уилка.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

*Влияние агониста V2 рецепторов АДГ на водную проницаемость.* Кратковременная инкубация собирательных трубок почки с dDAVP приводила к росту водной проницаемости как апикальной, так и базолатеральной мембран главных клеток у крыс обеих линий. Проводилось два измерения на одном экспериментальном

поле: (1) – контроль, (2) – после инкубации с десмопрессинном. При оценке статистических различий парным *t*-тестом все экспериментальные группы показали статистически значимый рост водной проницаемости (табл. 1).

**Таблица 1.** Коэффициент водной проницаемости апикальной и базолатеральной поверхностей клеток изолированных ОМСД в контроле и при воздействии десмопрессина

**Table 1.** Water permeability coefficient of the apical and basolateral surfaces of isolated OMCD cells under control and after desmopressin treatment

Животные	Апикальная поверхность ( $P_f$ , мкм/с)			Базолатеральная поверхность ( $P_f$ , мкм/с)		
	Контроль	dDAVP ( $10^{-8}$ М)	Парный <i>t</i> -тест	Контроль	dDAVP ( $10^{-8}$ М)	Парный <i>t</i> -тест
Вистар	134 ± 20	170 ± 15	$n = 8, p < 0,05$	118 ± 10	172 ± 15	$n = 8, p < 0,05$
Браттлборо	115 ± 13	130 ± 12	$n = 10, p < 0,05$	130 ± 20	170 ± 25	$n = 8, p < 0,05$

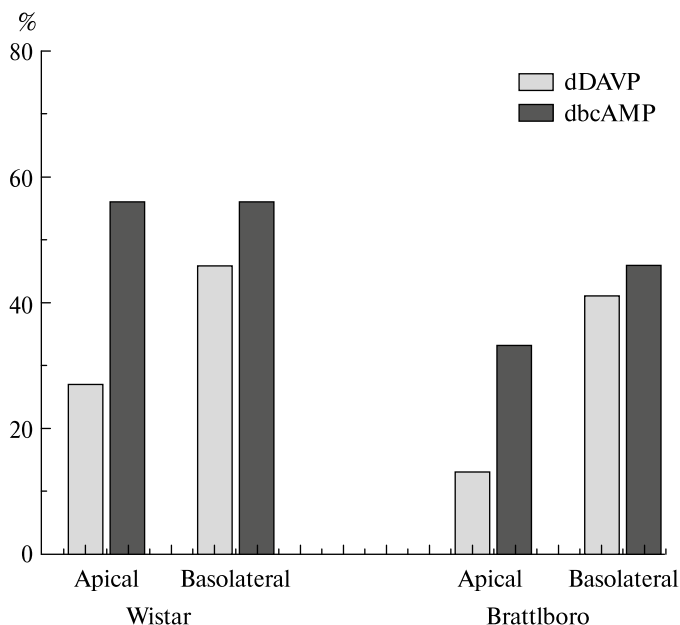
*Влияние проникающего аналога цАМФ на водную проницаемость.* Добавление в инкубационную среду мембранопроникающего аналога цАМФ приводило к росту водной проницаемости как апикальной, так и базолатеральной мембран клеток собирательных трубок у крыс обеих линий. Проводилось два измерения на одном экспериментальном поле: 1) контроль; 2) после инкубации с дб-цАМФ. При оценке статистических различий парным *t*-тестом все экспериментальные группы показали статистически значимый рост водной проницаемости (табл. 2).

**Таблица 2.** Коэффициент водной проницаемости апикальной и базолатеральной поверхностей клеток изолированных ОМСД в контроле и при воздействии дб-цАМФ

**Table 2.** Water permeability coefficient of the apical and basolateral surfaces of isolated OMCD cells under control and after exposure to db-cAMP

Животные	Апикальная поверхность ( $P_f$ , мкм/с)			Базолатеральная поверхность ( $P_f$ , мкм/с)		
	Контроль	дб-цАМФ ( $10^{-5}$ М)	Парный <i>t</i> -тест	Контроль	дб-цАМФ ( $10^{-5}$ М)	Парный <i>t</i> -тест
Вистар	151 ± 15	240 ± 17	$n = 9, p < 0,05$	120 ± 13	187 ± 17	$n = 10, p < 0,05$
Браттлборо	146 ± 10	194 ± 14	$n = 9, p < 0,05$	103 ± 11	150 ± 13	$n = 13, p < 0,05$

На рис. 1 продемонстрировано относительное увеличение водной проницаемости от контроля. Из диаграммы видно, что реакция на проникающий аналог цАМФ у крыс обеих линий более выражена, чем эффект dDAVP.



**Рис. 1.** Процент роста коэффициента водной проницаемости апикальной (apical) и базолатеральной (basolateral) мембран клеток собирательных трубок почки крыс Вистар и Браттлборо при воздействии dDAVP и дб-цАМФ

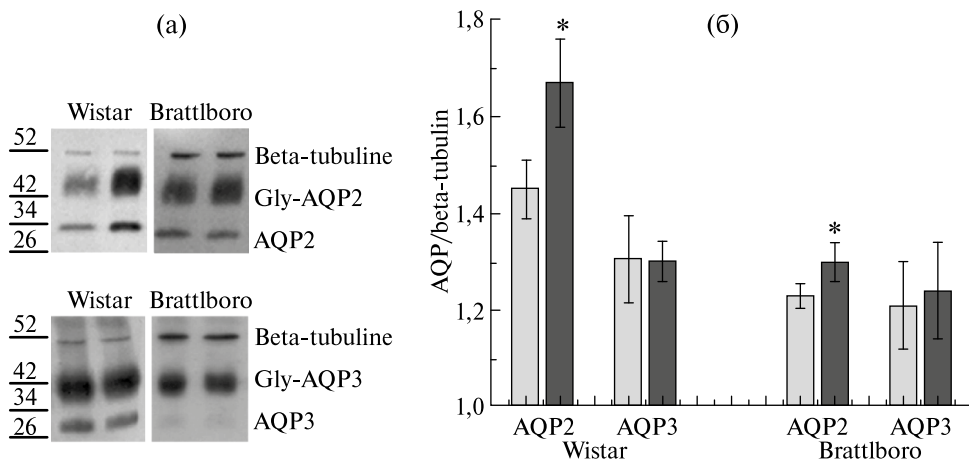
**Fig. 1.** Percentage increase in the water permeability coefficient of the apical and basolateral membranes of collecting duct cells in Wistar and Brattleboro rats following exposure to dDAVP and db-cAMP

*Эффект дб-цАМФ на содержание AQP2 и AQP3 в мембране клеток наружного мозгового вещества почки.* Методом вестерн-блоттинга показано, что инкубация срезов наружного мозгового вещества почки с аналогом цАМФ приводила к статистически значимому росту в мембранной фракции клеток содержания AQP2 как у крыс Вистар, так и у крыс линии Браттлборо. Реакция на дб-цАМФ была более выраженной у крыс Вистар. При этом роста содержания белка AQP3 не наблюдалось у крыс обеих линий (рис. 2). В контроле содержание белка AQP2 в мембранной фракции клеток наружного мозгового вещества почки статистически выше у крыс Вистар по сравнению с Браттлборо, что совпадает с данными, полученными нами ранее [8].

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе мы изучали роль цАМФ в кратковременной АДГ-зависимой регуляции водной проницаемости главных клеток OMCD крыс Браттлборо. Насколько нам известно, настоящее исследование является первым, в котором изучается кратковременная регуляция водной проницаемости апикальной и базолатеральной клеточных мембран главных клеток OMCD под действием dDAVP и дб-цАМФ у крыс Браттлборо.

Ранее нами было проведено исследование по сравнению длительного влияния dDAVP (100 мкг/кг; 4 введения дозы, каждые 12 ч, внутрибрюшинно)



**Рис. 2.** Вестерн-блоттинг белков AQP2 и AQP3. (а) – демонстрационный гель с обозначенными маркерами веса, общее количество проводимых анализов – 6, экспериментальных животных – 6. (б) – содержание белка AQP2 и AQP3, нормированное на содержание бета-тубулина, в плазматической мембране клеток наружного мозгового вещества почки крыс Вистар и Браттлборо. Контроль – штрихованные столбцы, эффект инкубации с дб-цАМФ – серые столбцы. \* –  $p < 0,05$ ,  $n = 6$ . Статистический анализ различий проводился между контролем и воздействием

**Fig. 2.** Western blot analysis of AQP2 and AQP3 proteins. (a) – Representative gel with indicated weight markers, total number of western blot analyses performed-6, experimental animals-6. (б) – AQP2 and AQP3 protein level normalized to beta-tubulin level in the plasma membrane of the outer medulla cells of the Wistar and Brattleboro rat kidney. Control – barred columns, effect of incubation with db-cAMP – gray columns. \* –  $p < 0.05$ ,  $n = 6$ . Statistical analysis of reliability was conducted between control and exposure

на осмотическую водную проницаемость ( $P_f$ ) апикальных и базолатеральных мембран клеток ОМСД крыс Браттлборо и предварительно подвергавшихся водной нагрузке крыс Вистар. У крыс Вистар апикальная и базолатеральная мембраны главных клеток ОМСД демонстрировали сопоставимый рост значений  $P_f$  в ответ на внутрибрюшинное введение dDAVP. У крыс Браттлборо увеличение водной проницаемости клеток ОМСД в ответ на dDAVP было гораздо более выраженным на базолатеральной мембране по сравнению с апикальной. Мы также продемонстрировали, что базовая экспрессия мРНК AQP2 была выше у крыс Браттлборо. По данным вестерн-блоттинга, в контроле содержание белка AQP2 в мембранной фракции клеток наружного мозгового вещества почки было статистически выше у крыс Вистар по сравнению с Браттлборо. Долговременное воздействие dDAVP повышало содержание белка AQP2 и AQP3 в мембранной фракции клеток наружного мозгового вещества почки крыс обеих исследуемых линий. Базовые уровни AQP3 и AQP4 у этих двух линий крыс не различались ни на уровне мРНК, ни на уровне содержания белков в мембране. На основании полученных результатов мы предположили, что отсутствие эндогенного АДГ у крыс Браттлборо вызывает нарушение формирования механизмов синтеза и встраивания AQP2, что может быть, по крайней мере частично, причиной отсутствия АДГ-зависимой регуляции апикальной мембраны при долговременном воздействии [8]. Механизм экспрессии AQP2 в апикальной мембране включает синтез его мРНК

и белка, процесс адресного внутриклеточного транспорта и встраивание канала в плазматическую мембрану. Формирование транспортного комплекса, необходимого для внутриклеточного транспорта, требует присутствия малых G-белков и посттрансляционной модификаций AQP2, включая фосфорилирование по Ser256 и Ser269 с помощью цАМФ-зависимой протеинкиназы А (PKA) [20–22]. В регуляции экспрессии AQP2 участвует цАМФ-зависимый транскрипционный фактор CREB [23, 24]. Для слияния везикулы, содержащей транспортный комплекс AQP2, с апикальной мембраной также требуется система белков SNARE (Soluble N-ethylmaleimide sensitive fusion factor attachment protein receptors) [25]. Нарушения в этом многостадийном механизме, которые присутствуют у крыс Браттлборо, в настоящее время не исследованы. Молекулярный механизм регуляции AQP2 в главных клетках OMCD крыс Браттлборо нуждается в специальном исследовании.

Согласно результатам, полученным в настоящей работе, и аналог цАМФ, и dDAVP вызывают повышение водной проницаемости как апикальной, так и базолатеральной клеточных мембран у крыс обеих исследуемых линий при кратковременном воздействии. У крыс Вистар десмопрессин повышает значения  $P_f$  апикальной мембраны на 27%, базолатеральной – на 46%. У крыс линии Браттлборо наблюдается такой же тренд изменений водной проницаемости мембран главных клеток OMCD под действием dDAVP: 13% – апикальная мембрана, 31% – базолатеральная. Эти данные согласуются с результатами многочисленных исследований, проведенных как на клеточных культурах, так и на животных моделях, которые показывают, что именно апикальная мембрана является скоростью лимитирующим барьером для трансцеллюлярного переноса воды в главных клетках собирательных трубок почки [26, 27]. По некоторым оценкам, водная проницаемость базолатеральной мембраны главных клеток (в расчете на площадь с поправкой на складки) в четыре раза выше, чем у апикальной мембраны [28, 29].

Аналог цАМФ вызывает сопоставимые изменения значений  $P_f$  апикальной и базолатеральной мембран у крыс Вистар (56 и 55% соответственно). У вазопрессин-дефицитных крыс Браттлборо рост значений  $P_f$  составил 33% с апикальной стороны и 46% с базолатеральной. Согласно результатам, полученным нами ранее, кратковременное воздействие dDAVP увеличивало содержание в мембранной фракции AQP2 у крыс Вистар и AQP2-3 у Браттлборо [8]. В настоящей работе методом вестерн-блоттинга мы показали, что аналог цАМФ повышает содержание в мембранной фракции наружного мозгового вещества почки AQP2, но не AQP3, как у крыс Вистар, так и у крыс Браттлборо. Можно предположить, что повышение водной проницаемости как апикальной, так и базолатеральной мембран главных клеток OMCD под действием десмопрессина в значительной мере регулируется сигнальными путями, активируемыми повышением внутриклеточного уровня цАМФ. В то же время, исходя из полученных результатов, можно предположить, что у крыс Браттлборо транспорт воды через базолатеральную мембрану главных клеток OMCD, опосредованный AQP3, регулируется под действием АДГ не только цАМФ-зависимым путем, но и с участием других систем вторичных мессенджеров, например, связанных с кальцием.

Значимость AQP3 для концентрирования мочи была подтверждена на мышах с нокаутом гена *aqp3*, которые демонстрировали сниженную трансэпителиальную осмотическую проницаемость для воды в собирательных трубках, нарушение функции концентрирования мочи и выраженную полиурию, представляя собой

фенотип, подобный нефрогенному несахарному диабету [30]. Сигнальные пути, участвующие в быстрой регуляции водной проницаемости базолатеральной мембраны клеток собирательных трубок под действием АДГ, в настоящее время изучены недостаточно. Накопленные данные указывают на то, что во многих типах клеток, экспрессирующих AQP3, его экспрессия может регулироваться цАМФ-путем, главным образом через PKA и ее нижестоящие эффекторы [31]. Так, показано что промоторная 5'-фланкирующая область гена *aqp3* содержит два сайта связывания CREB [32]. С другой стороны, с использованием системы экспрессии белков водных каналов в ооцитах *Xenopus* был проведен анализ осмотической водной проницаемости аквапоринов. В этих экспериментах холерный токсин и форсколин, активирующие аденилатциклазу, подавляли транспорт воды через AQP3 – это позволяет предположить, что изменения водной проницаемости AQP3 были вызваны повышением внутриклеточной концентрации цАМФ [33]. Вместе с тем есть сведения об участии цАМФ-независимых путей в регуляции AQP3 на уровне экспрессии гена. Например, показано, что в клетках пигментного эпителия сетчатки критическим фактором, индуцирующим экспрессию гена *aqp3*, является активация фосфолипазы А [34]. В то же время практически нет сведений о механизмах кратковременной регуляции функциональной активности AQP3 под действием АДГ. К настоящему моменту не описана непосредственная регуляция AQP3 в результате фосфорилирования. Иммуноэлектронная микроскопия позволила локализовать AQP3 в собирательных трубках почки преимущественно в базолатеральной области плазматической мембраны. Во внутриклеточных везикулах AQP3 обнаруживали в незначительных количествах, и это не позволяет предположить его транспорт в везикулах [7, 35].

Помимо встраивания везикул, еще одним возможным вариантом регуляции водной проницаемости аквапоринов может быть изменение проводимости каналов, уже встроенных в мембрану (gating). Экспериментальное изучение AQP в их нативной мембране или сверхэкспрессии в гетерологичных системах продемонстрировало, что водная проницаемость каналов может быть обратимо изменена в ответ на воздействие специфических модуляторов [36]. Таким образом, механизмы регуляции AQP3 под действием АДГ остаются неисследованными, и, согласно данным литературы и нашим результатам, не связаны с цАМФ-зависимым встраиванием в мембрану, как в случае AQP2.

Необходимо отметить, что молекулярные структуры, участвующие в транспорте воды через мембрану клеток, не ограничиваются водными каналами, вода может транспортироваться также в связанном с ионами состоянии, что вносит дополнительные сложности в интерпретацию результатов биофизических измерений. Однако мембраны клеток, экспрессирующих аквапорины, содержат несколько тысяч AQP на  $\mu\text{m}^2$ , в то время как плотность ионных каналов примерно на два порядка ниже [37]. Сравнение проницаемости единичных водных и ионных каналов позволяет предположить, что ионные каналы могут играть второстепенную роль в транспорте воды через плазматическую мембрану [38].

Исходя из полученных результатов, можно предположить, что AQP3 вносит значительный вклад в регуляцию водной проницаемости плазматической мембраны главных клеток ОМСД у крыс Браттлборо, при этом велика роль систем вторичных мессенджеров, активируемых АДГ и не связанных с цАМФ.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Knepper M.A., Kwon T.H., Nielsen S. Molecular physiology of water balance. *N. Engl. J. Med.* 2015;**372**:1349–1358. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1404726>
2. Brown D. The ins and outs of aquaporin-2 trafficking. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2003;**284**:F893–F901. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00387.2002>
3. Morelle J., Goffin E., Devuyst O. Molecular physiology of water balance. *N. Engl. J. Med.* 2015;**373**:194. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1505505>
4. Holmes R.P. The role of renal water channels in health and disease. *Mol. Aspects Med.* 2012;**33**:547–552. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.02.005>
5. Michalek K. Aquaglyceroporins in the kidney: present state of knowledge and prospects. *J. Physiol. Pharmacol.* 2016;**67**:185–193.
6. Su W., Cao R., Zhang X.Y. et al. Aquaporins in the kidney: physiology and pathophysiology. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2020;**318**:F193–F203. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00304.2019>
7. Ecelbarger C.A., Terris J., Frindt G. et al. Aquaporin-3 water channel localization and regulation in rat kidney. *Am. J. Physiol.* 1995;**269**:F663–F672. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1995.269.5.F663>
8. Baturina G.S., Katkova L.E., Zarogiannis S.G. et al. Brattleboro rats have impaired apical membrane water permeability regulation in the outer medullary collecting duct principal cells. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2016;**43**:1225–1233. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12666>
9. Solenov E.I., Nesterov V.V., Baturina G.S. et al. Effect of dDAVP on basolateral cell surface water permeability in the outer medullary collecting duct. *Eur. Biophys. J.* 2003;**32**:614–619. <https://doi.org/10.1007/s00249-003-0325-8>
10. Valtin H. The discovery of the Brattleboro rat, recommended nomenclature, and the question of proper controls. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1982;**394**:1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1982.tb37405.x>
11. Schmale H., Richter D. Single base deletion in the vasopressin gene is the cause of diabetes insipidus in Brattleboro rats. *Nature.* 1984;**308**:705–709. <https://doi.org/10.1038/308705a0>
12. Sokol H.W., Sise J. The effect of exogenous vasopressin and growth hormone on the growth of rats with hereditary hypothalamic diabetes insipidus. *Growth.* 1973;**37**:127–142.
13. DiGiovanni S.R., Nielsen S., Christensen E.I. et al. Regulation of collecting duct water channel expression by vasopressin in Brattleboro rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1994;**91**:8984–8988. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.19.8984>
14. Terris J., Ecelbarger C.A., Nielsen S. et al. Long-term regulation of four renal aquaporins in rats. *Am. J. Physiol.* 1996;**271**:F414–F422. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1996.271.2.F414>
15. Chou C.L., Yip K.P., Michea L. et al. Regulation of aquaporin-2 trafficking by vasopressin in the renal collecting duct. Roles of ryanodine-sensitive Ca<sup>2+</sup> stores and calmodulin. *J. Biol. Chem.* 2000;**275**:36839–36846. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005552200>

16. Ilyaskin A.V., Karpov D.I., Medvedev D.A. et al. Quantitative estimation of transmembrane ion transport in rat renal collecting duct principal cells. *Gen. Physiol. Biophys.* 2014;**33**:13–28. [https://doi.org/10.4149/gpb\\_2013063](https://doi.org/10.4149/gpb_2013063)
17. Zarogiannis S.G., Ilyaskin A.V., Baturina G.S. et al. Regulatory volume decrease of rat kidney principal cells after successive hypo-osmotic shocks. *Math. Biosci.* 2013;**244**:176–187. <https://doi.org/10.1016/j.mbs.2013.05.007>
18. Solenov E., Watanabe H., Manley G.T. et al. Sevenfold-reduced osmotic water permeability in primary astrocyte cultures from AQP-4-deficient mice, measured by a fluorescence quenching method. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2004;**286**:C426–C432. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00298.2003>
19. Katkova L.E., Baturina G.S., Ilyaskin A.V., Zarogiannis S.G., Solenov E.I. The water permeability reduction after successive hypo-osmotic shocks in kidney principal cells is apically regulated. *Cell Physiol. Biochem.* 2014;**34**:1802–1811. <https://doi.org/10.1159/000366379>
20. Nedvetsky P.I., Tamma G., Beulshausen S. et al. Regulation of aquaporin-2 trafficking. In: Beitz E., editor. *Aquaporins. Handbook of Experimental Pharmacology*. Berlin: Springer; 2009. **190**:133–157. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-79885-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-540-79885-9_6)
21. Moeller H.B., Fenton R.A. Cell biology of vasopressin-regulated aquaporin-2 trafficking. *Pflugers Arch.* 2012;**464**:133–144. <https://doi.org/10.1007/s00424-012-1129-4>
22. Park E.J., Kwon T.H. A minireview on vasopressin-regulated aquaporin-2 in kidney collecting duct cells. *Electrolyte Blood Press.* 2015;**13**:1–6. <https://doi.org/10.5049/EBP.2015.13.1.1>
23. Matsumura Y., Uchida S., Rai T. et al. Transcriptional regulation of aquaporin-2 water channel gene by cAMP. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1997;**8**:861–867. <https://doi.org/10.1681/ASN.V86861>
24. Yasui M., Zelenin S.M., Celsi G. et al. Adenylate cyclase-coupled vasopressin receptor activates AQP2 promoter via a dual effect on CRE and AP1 elements. *Am. J. Physiol.* 1997;**272**:F443–F450. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1997.272.4.F443>
25. Centrone M., Ranieri M., Di Mise A. et al. AQP2 trafficking in health and diseases: an updated overview. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2022;**149**:106261. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2022.106261>
26. Sabolić I., Katsura T., Verbavatz J.M. et al. The AQP2 water channel: effect of vasopressin treatment, microtubule disruption, and distribution in neonatal rats. *J. Membr. Biol.* 1995;**143**:165–175. <https://doi.org/10.1007/BF00233445>
27. Hasler U., Leroy V., Martin P.Y. et al. Aquaporin-2 abundance in the renal collecting duct: new insights from cultured cell models. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2009;**297**:F10–F18. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.90569.2008>
28. Strange K., Spring K.R. Cell membrane water permeability of rabbit cortical collecting duct. *J. Membr. Biol.* 1987;**96**:27–43. <https://doi.org/10.1007/BF01869332>
29. Flamion B., Spring K.R. Water permeability of apical and basolateral cell membranes of rat inner medullary collecting duct. *Am. J. Physiol.* 1990;**259**:F986–F999. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1990.259.6.F986>
30. Ma T., Song Y., Yang B. et al. Nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking aquaporin-3 water channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000;**97**:4386–4391. <https://doi.org/10.1073/pnas.080499597>

31. Zhou Y., Wang Y., Zhang H. et al. Effect of vasoactive intestinal peptide on defecation and VIP-cAMP-PKA-AQP3 signaling pathway in rats with constipation. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2016;**41**:1175–1180.
32. Okahira M., Kubota M., Iguchi K. et al. Regulation of aquaporin 3 expression by magnesium ion. *Eur. J. Pharmacol.* 2008;**588**:26–32.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.03.063>
33. Hamabata T., Liu C., Takeda Y. Positive and negative regulation of water channel aquaporins in human small intestine by cholera toxin. *Microb. Pathog.* 2002;**32**:273–277. <https://doi.org/10.1006/mpat.2002.0502>
34. Hollborn M., Ulbricht E., Reichenbach A. et al. Transcriptional regulation of aquaporin-3 in human retinal pigment epithelial cells. *Mol. Biol. Rep.* 2012;**39**:7949–7956.  
<https://doi.org/10.1007/s11033-012-1637-5>
35. Yamamoto T., Sasaki S., Fushimi K. et al. Vasopressin increases AQP-CD water channel in apical membrane of collecting duct cells in Brattleboro rats. *Am. J. Physiol.* 1995;**268**:C1546–C1551. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1995.268.6.C1546>
36. Eto K., Noda Y., Horikawa S., Uchida S., Sasaki S. Phosphorylation of aquaporin-2 regulates its water permeability. *J. Biol. Chem.* 2010;**285**:40777–40784.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.151928>
37. Verkman A.S., Mitra A.K. Structure and function of aquaporin water channels. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2000;**278**:F13–F28.  
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.2000.278.1.F13>
38. Pohl P. Combined transport of water and ions through membrane channels. *Biol. Chem.* 2004;**385**:921–926. <https://doi.org/10.1515/BC.2004.120>

#### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Батурина Галина Сергеевна — канд. биол. наук; ст. науч. сотр.,  
Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук,  
Новосибирск, Российская Федерация  
E-mail: baturina@yandex.ru  
<https://orcid.org/0000-0003-1289-5406>

Каткова Любовь Евгеньевна — канд. биол. наук; науч. сотр.,  
Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук,  
Новосибирск, Российская Федерация  
E-mail: liubovlatkova@yandex.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-2858-3215>

Соленов Евгений Иванович — д-р биол. наук; гл. науч. сотр.,  
Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук,  
Новосибирск, Российская Федерация  
E-mail: eugsol@bionet.nsc.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-0595-3084>

Поступила в редакцию 02.10.2025  
После доработки 28.10.2025  
Принята к публикации 30.10.2025

ABOUT THE AUTHORS

Baturina, Galina S. — Cand. Sc. (Biology); Senior Research Officer,  
Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,  
Novosibirsk, Russian Federation  
E-mail: baturina@yandex.ru  
<https://orcid.org/0000-0003-1289-5406>

Katkova, Lyubov E. — Cand. Sci. (Biology); Researcher, Institute of Cytology and Genetics,  
Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation  
E-mail: liubovlatkova@yandex.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-2858-3215>

Solenov, Evgeny I. — Dr. Sci. (Biology); Chief Researcher, Institute of Cytology and Genetics,  
Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation  
E-mail: eugsol@bionet.nsc.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-0595-3084>

Received October 02, 2025  
Revised October 28, 2025  
Accepted October 30, 2025