

ВЛИЯНИЕ АНАЛОГОВ ЭКСЕНАТИДА НА ФУНКЦИЮ ПОЧКИ КРЫСЫ НА ФОНЕ ВОДНОЙ НАГРУЗКИ

А. Е. Боголепова, Е. И. Шахматова¹

Инъекция эксенатида или его синтезированных аналогов в дозе 0,05 нмоль/100 г массы тела приводит к увеличению диуреза и выведения ионов натрия, магния и калия; лишь эксенатид вызывает экскрецию осмотически свободной воды. В условиях 1 % водной нагрузки только аналог I стимулировал выведение осмотически свободной воды. Выявленные особенности действия эксенатида и его аналогов открывают возможность поиска соединений с разной силой воздействия на ионорегулирующую и водовыделительную функции почки для избирательного увеличения экскреции воды, что имеет безусловное клиническое значение.

Ключевые слова: эксенатид, почка, водная нагрузка, синтезированные аналоги эксенатида

ВВЕДЕНИЕ

В поддержании постоянства осмоляльности крови, необходимого для нормального функционирования всех органов и систем, ключевую роль играет почка. Известно, что в восстановлении концентрации глюкозы в крови принимают участие инкретины, стимулирующие секрецию инсулина при повышении концентрации глюкозы в крови [3, 6]. Среди внепанкреатических эффектов глюкагоноподобного пептида I выявлена его способность снижать потребление пищи и воды [4], а также усиливать выведение натрия почкой [5, 7, 8]. Эксперименты, выполненные ранее на крысах с введением миметика глюкагоноподобного пептида I эксенатида и его синтезированных аналогов, показали, что эти пептиды обладают выраженным диуретическим действием, связанным с повышением экскреции натрия и магния [1]. В работе с введением эксенатида на фоне 5 % водной нагрузки выявлено, что он ускоряет выделение осмотически свободной воды почкой, вследствие чего экскреция введенной жидкости и восстановление физико-химических параметров крови происходят быстрее, чем в контрольной группе [2]. Применение 5 % водной нагрузки является стандартным методом индукции водного диуреза, практически полностью подавляющим эндогенную секрецию антидиуретического гормона и приводящим к созданию минимальной проницаемости собирательных трубок для обратного всасывания осмотически свободной воды. Принимая во внимание физиологическую и клиническую значимость эксенатида и его новых аналогов представляло интерес исследовать их влияние на гидруретическую функцию почки крысы на фоне 1 или 2 % водной нагрузки, воспроизводящей приближенную к естественному уровню гипергидратацию.

¹ Лаборатория физиологии почки и водно-солевого обмена (зав. — акад. РАН Ю. В. Наточин) Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, 194223, Санкт-Петербург, пр. М. Тореза, 44.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на ненаркотизированных самках крыс линии Вистар в возрасте 4–6 мес с массой тела (м.т.) 150–200 г, содержащихся в виварии при стандартных условиях. Накануне эксперимента животные получали корм только утром, но весь день имели свободный доступ к воде. Протокол исследования выполнен по международным стандартам работы с экспериментальными животными и одобрен этическим комитетом ИЭФБ. Эксенатид и его аналоги (синтезированы на кафедре химии природных соединений химического факультета СПбГУ под руководством М. И. Титова) вводили внутримышечно в объеме 0,1 мл/100 г м.т. в дозах 0,005; 0,015; 0,05 нмоль. Животным группы контроля инъецировали 0,9 % раствор хлорида натрия в том же объеме. В экспериментах с водной нагрузкой крысы получали через желудочный зонд 1 или 2 мл воды на 100 г м.т. и помещались в клетки-пеналы с проволочным дном, через отверстия которого моча стекала по воронке в пробирку. Выделение мочи регистрировали при спонтанном мочеотделении, измеряли объем мочи; осмоляльность определяли криоскопическим методом на микроосмометре 3300 (“Advanced Instruments, Inc.”, США), концентрацию ионов натрия и калия — на пламенном фотометре Coming-410 (Великобритания) в воздушно-пропановом пламени, ионов магния — в воздушно-ацетиленовом пламени на атомном абсорбционном спектрофотометре Hitachi-508 (Япония). Статистическая обработка: все данные представлены в виде $M \pm m$, для сравнения и оценки достоверности использован тест ANOVA и *t*-критерий Стьюдента.

Формулы эксенатида и его аналогов

HisGlyGluGlyThrPheThrSerAspLeuSerLysGlnMetGluGluGluAlaValArg-LeuPhelleGluTrpLeuLisAsnGlyGlyProSerSerGlyAlaProProProSer-NH₂ (эксенатид)

HisGlyGluGlyThrPheThrSerAspLeuSerLysGlnNleGluGluGluAlaValArg-LeuPhelleGluTrpLeuLisAsnGlyGlyProSerSerGlyAlaProProProSer-ol (аналог I, 14-норлейцин, 39-серинол-эксенатид)

HisGlyGluGlyThrPheThrSerAspLeuSerLysGlnNleGluGluGluAlaValArg-LeuPhelleGluTrpLeuLisAsnGlyGlyPro

SerSerGlyD-AlaProProSer-ol (аналог II, 14-норлейцин, 35-D-аланин-39-серинол-эксенатид)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования эффективности препаратов в зависимости от дозы была проведена серия экспериментов с введением 0,005; 0,015; 0,05 нмоль/100 г м.т. эксенатида и его аналогов. Введение 0,005 нмоль/100 г м.т. этих пептидов не привело к изменению диуреза и экскреции осмотически активных веществ по сравнению с группой контроля. Инъекция 0,015 нмоль/100 г м.т. исследуемых препаратов уже вызывала достоверное увеличение выведения воды и ионов почкой крыс. Но наиболее выраженный эффект препаратов, а также статистически значимые различия в действии эксенатида и его аналогов наблюдались при введении 0,05 нмоль/100 г м.т. Спустя 10–15 мин после введения 0,05 нмоль/100 г м.т. эксенатида или его аналогов отмечалось увеличение диуреза, достигавшее максимума между 20 и 45 мин эксперимента. Наибольший прирост выведения мочи за 30 мин наблюдался в ответ на введение эксенатида ($1,33 \pm 0,17$ по сравнению с $0,88 \pm 0,1$ и $0,69 \pm 0,09$ мл для аналогов I и II соответственно). Нарастание мочеотделения на фоне действия этих пептидов сопровождалось увеличением

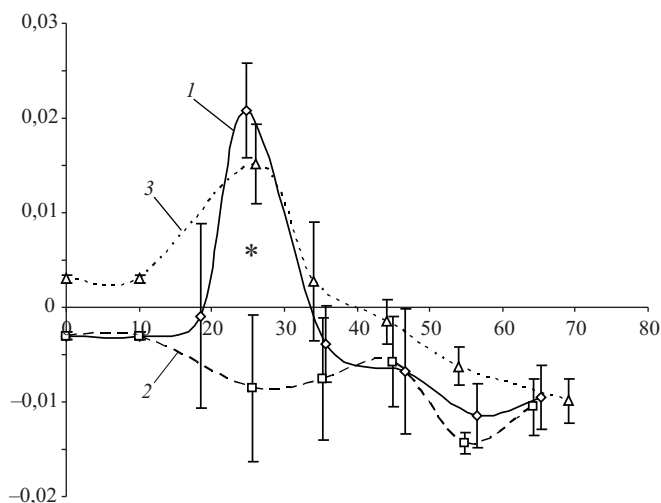
экскреции осмотически активных веществ, в первую очередь, ионов натрия: эксенатид и аналог I способствовали более выраженному натрийурезу, чем аналог II (таблица, $p < 0,05$). Эксенатид и его аналоги вызывали увеличение экскреции ионов калия и магния ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Показано, что на пике индуцированного эксенатидом диуреза отмечается экскреция осмотически свободной воды ($0,012 \pm 0,007$ по сравнению с $-0,002 \pm 0,001$ мл/мин/100 г м.т. в контрольной группе), которая после 35 мин сменяется интенсивной реабсорбцией ($-0,007 \pm 0,005$ мл/мин/100 г м.т.). Введение аналогов I и II не приводило к выведению осмотически свободной воды (таблица).

Для выяснения особенностей влияния миметиков инкретина на водовыделительную функцию почки были проведены исследования при разном состоянии водного баланса, в которых 0,05 нмоль/100 г м.т. эксенатида или аналогов I и II инъецировали на фоне 1 и 2 % водной нагрузки. Первая проба мочи у контрольных животных появлялась спустя 70 мин после введения в желудок 1 % водной нагрузки и через 20–25 мин после введения 2 % водной нагрузки: диурез увеличивался с $0,004 \pm 0,001$ до $0,007 \pm 0,001$ или $0,047 \pm 0,006$ мл/мин/100 г м.т. ($p < 0,01$) соответственно. На фоне 1 % водной нагрузки

Влияние эксенатида и его аналогов (0,05 нмоль/100 г массы тела) на диурез и экскрецию катионов и воды почкой крыс на фоне 1 и 2 % водной нагрузки

Доза на 100 г массы	V, мл	U _{osm} V, мкосм	U _{Na} V, мкмоль	U _K V, мкмоль	U _{Mg} V, мкмоль	C _{osm} , мл	C _{H₂O} , мл	t
Контроль (n = 10)	0,004 ± 0,001	1,80 ± 0,17	0,25 ± 0,05	0,23 ± 0,04	0,02 ± 0,003	0,006 ± 0,001	-0,002 ± 0,001	130
0,05 нмоль								
Эксенатид (n = 9)	0,08 ± 0,01	20,1 ± 3,0	7,1 ± 1,1	0,50 ± 0,13	0,18 ± 0,03	0,067 ± 0,01	0,012 ± 0,007	20
Аналог I (n = 10)	0,07 ± 0,008	20,4 ± 3,8	7,3 ± 1,6	0,67 ± 0,07	0,16 ± 0,02	0,07 ± 0,01	-0,003 ± 0,009*	27
Аналог II (n = 10)	0,04 ± 0,01* [#]	12,9 ± 0,9* [#]	4,1 ± 0,6* [#]	0,62 ± 0,06	0,07 ± 0,01** ^{##}	0,04 ± 0,003 [#]	-0,005 ± 0,004*	45
1 % ВН, контроль (n = 9)	0,006 ± 0,001	2,4 ± 0,5	0,19 ± 0,06	0,11 ± 0,04	0,018 ± 0,005	0,008 ± 0,002	-0,002 ± 0,001	70
0,05 нмоль + 1 % ВН								
Эксенатид (n = 9)	0,05 ± 0,007	14,6 ± 2,3	5,1 ± 1,2	0,42 ± 0,08	0,13 ± 0,02	0,049 ± 0,008	0,001 ± 0,005	31
Аналог I (n = 9)	0,09 ± 0,01*	21,4 ± 3,5*	7,9 ± 1,3*	0,65 ± 0,17	0,16 ± 0,02	0,072 ± 0,012*	0,017 ± 0,006**	23
Аналог II (n = 10)	0,03 ± 0,005 [#]	9,9 ± 1,0 [#]	3,2 ± 0,42 [#]	0,30 ± 0,06 [#]	0,08 ± 0,01 [#]	0,033 ± 0,003 [#]	-0,003 ± 0,004 [#]	45
2 % ВН, контроль (n = 10)	0,047 ± 0,006	2,7 ± 0,3	0,25 ± 0,04	0,20 ± 0,03	0,018 ± 0,002	0,009 ± 0,001	0,038 ± 0,005	42
0,05 нмоль + 2 % ВН								
Эксенатид (n = 10)	0,09 ± 0,01	15,1 ± 2,9	4,5 ± 0,56	0,66 ± 0,26	0,12 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,035 ± 0,006	25
Аналог I (n = 9)	0,10 ± 0,02	19,8 ± 2,9	6,8 ± 1,1	0,59 ± 0,15	0,14 ± 0,03	0,067 ± 0,01	0,039 ± 0,008	22
Аналог II (n = 10)	0,09 ± 0,01	14,8 ± 2,4	4,9 ± 0,96	0,61 ± 0,12	0,11 ± 0,02	0,05 ± 0,008	0,044 ± 0,008	30

Примечание. Данные рассчитаны на максимуме диуреза, представлены в виде $M \pm m$. Достоверность отличий по отношению к эксенатиду: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; по отношению аналога II к аналогу I — [#] $p < 0,05$; ^{##} $p < 0,01$. ВН — водная нагрузка, V — диурез, U_{osm}V — экскреция осмотически активных веществ, U_{Na}V — экскреция ионов натрия, U_KV — экскреция ионов калия, U_{Mg}V — экскреция ионов магния, C_{osm} — очищение от осмотически активных веществ, C_{H₂O} — очищение от осмотически свободной воды, t — время.



Экскреция осмотически свободной воды после введения 0,05 нмоль/100 г массы тела эксенатида или аналога I.

По оси абсцисс — время опыта, мин; по оси ординат — экскреция осмотически свободной воды, мл/мин/100 г массы тела. 1 — эксенатид 0,05 нмоль/100 г; 2 — аналог I 0,05 нмоль/100 г; 3 — аналог I 0,05 нмоль/100 г на фоне 1 % водной нагрузки. Достоверность отличий аналог I 0,05 нмоль/аналог I 0,05 нмоль + 1 % водной нагрузки: * — $p < 0,05$.

введение 0,05 нмоль/100 г м.т. эксенатида или его синтетических аналогов вызывало статистически значимый прирост диуреза и экскреции осмотически активных веществ, включая ионы натрия, калия и магния (таблица). Нарастание мочеотделения, наиболее выраженное на фоне действия аналога I, было обусловлено выведением осмотически свободной воды, наблюдавшимся только на пике диуреза (таблица). Таким образом, 1 % водная нагрузка изменяла кинетику действия этого аналога и приближала его по эффективности к эксенатиду (рисунок).

Введение 2 % водной нагрузки приводило к существенному снижению проницаемости стенок собирательных трубок для воды: как у крыс, получавших только водную нагрузку, так и при сочетании водной нагрузки с введением исследованных пептидов, повышенный диурез был в значительной степени обусловлен экскрецией осмотически свободной воды. Действие эксенатида и его аналогов при этих условиях ускоряло выведение водной нагрузки почкой (максимум диуреза смещался с 42-ой на 22 – 30-ю минуты), но не приводило к достоверному увеличению экскреции осмотически свободной воды по сравнению с группой контроля (таблица, $p > 0,05$). Выведение 2 % водной нагрузки на фоне действия синтетических миметиков глюкагоноподобного пептида I сопро-

ждалось увеличением очищения от осмотически активных веществ. Наиболее значимый прирост наблюдался на фоне действия аналога I, вызывавшего максимальный натрий-урез и повышение экскреции ионов калия и магния по сравнению с контролем (таблица).

Лечение нарушений водно-солевого обмена в клинике нуждается в фармакологических средствах, способных оказывать разное влияние на состояние водного и солевого баланса. Инкретины оказались уникальными регуляторными пептидами, способными увеличивать выведение осмотически свободной воды [2]. Разделение эффектов исследованных пептидов на экскрецию ионов и осмотически свободной воды (аналог I) открывает возможность поиска соединений с разной силой воздействия на ионорегулирующую и водовыделительную функции почки, что имеет безусловное клиническое значение.

ВЫВОДЫ

1. Аналоги эксенатида при стандартном водном режиме оказывают диуретический эффект за счет увеличения выведения осмотически активных веществ, ионов натрия. Экскреция осмотически свободной воды отмечается только на пике диуреза под влиянием эксенатида.

2. На фоне водной нагрузки в объеме 10 мл на кг массы тела аналог I обладает выраженным диуретическим и натрийуретическим эффектами, повышает очищение от осмотически свободной воды

Работа поддержана РФФИ (грант № 11-04-01636), программой “Научные школы” (НШ 65100.2010.4) и программой ОБН РАН.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. Е. Боголепова, А. В. Кутина, А. С. Марина и др., *Пробл. эндокринолог.*, **3**, 42 – 47 (2011).
2. А. С. Марина, А. В. Кутина, Ю. В. Наточин, *Докл. АН*, **437**(4), 568 – 570 (2011).
3. Z. T. Bloomgarden, *Diabetes care*, **33**(2), e20 – e23 (2010).
4. J. P. Gutzwiller, J. Drewe, B. Göke, et al., *Am. J. Physiol.*, **276**(5 Pt. 2), R1541 – R1544 (1999).
5. J. P. Gutzwiller, P. Hruz, A. R. Huber, et al., *Digestion*, **73**(2 – 3), 142 – 150 (2006).
6. D. M. Hargrove, N. A. Nardone, L. M. Persson, et al., *Metabolism*, **44**(9), 1231 – 1237 (1995).
7. C. Moreno, M. Mistry, R. J. Roman, *Eur. J. Pharmacol.*, **434**, 163 – 167 (2002).
8. M. Yu, C. Moreno, K. M. Hoagland, et al., *J. Hypertens.*, **21**, 1125 – 1135 (2003).

Поступила 29.03.12

THE EFFECT OF EXENATIDE ANALOGS ON HYDRURETIC FUNCTION OF RAT KIDNEY UNDER WATER LOAD

A. E. Bogolepova and E. I. Shakhmatova

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, M. Thorez prosp. 44, St. Petersburg, 194223, Russia

Injection (0.05 nmol/100 g b.w.) of exenatide or its amino-acid-substituted synthetic analogs I (substitution at positions 14 and 39) and II (substitution at positions 14, 35, and 39) led to an increase in diuresis and excretion of sodium, magnesium and potassium, but only exenatide caused the excretion of solute free water. In experiments with 1 % water load, only exenatide analog I stimulated the solute free water excretion. These features of exenatide and its analogs show the possibility of searching for substances with various power of action upon ion and water excretion by the kidney, which may have a clinical significance.

Key words: Exenatide; kidney; water load; synthesized analogs of exenatide