

**Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»**

Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций
Кафедра «Медицинская физика»

Работа допущена к защите
и.о.зав.кафедрой «МФ»
_____ О.Л. Власова
«_____» _____ 2016 г.

**ВЫПУСКНАЯ РАБОТА БАКАЛАВРА
ВЛИЯНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ МИМЕТИКОВ
ГЛЮКАГОНОПОДОБНОГО ПЕПТИДА-1 НА ОСМО- И
ИОНОРЕГУЛИРУЮЩИЕ ФУНКЦИИ ПОЧЕК КРЫС**

Направление: 38025023"Техническая физика

Профиль подготовки: Медицинская или биоинженерная физика

Работа выполнена на базе института эволюционной физиологии и биохимии
им. И.М. Сеченова, лаборатория физиологии почки и водно-солевого обмена.

Выполнил студент гр. 43431/1: _____ Спириденко Е.А.

Научный руководитель: _____ к.б.н., доцент
Постникова Т.Ю.

Научный консультант: _____ к.м.н., заведующая лабораторией
почки и водно-солевого обмена
Кутина А.В.

Куратор: _____ д.б.н., доцент
Линькова Н.С.

Санкт-Петербург
2016

РЕФЕРАТ

С.34 Рис.18 Табл. 2

ВЛИЯНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ МИМЕТИКОВ ГЛЮКАГОНОПОДОБНОГО ПЕПТИДА-1 НА ОСМО- И ИОНОРЕГУЛИРУЮЩИЕ ФУНКЦИИ ПОЧЕК КРЫС

Глюкагоноподобный пептид-1 регулирует углеводный обмен и влияет на водно-солевой баланс. Представляет существенный интерес синтез миметиков гормона с различным спектром физиологической активности. Целью данной работы стало исследование влияния нового миметика DAla³⁵-эксенатида на осмо- и ионорегулирующие функции почек крыс. В опытах на крысах линии Вистар при обычном водно-солевом режиме и при гипергидратации, вызванной водной нагрузкой, показано, что DAla³⁵-эксенатид оказывает диуретическое действие, увеличивает экскрецию почками осмотически активных веществ, ионов натрия, калия, кальция и магния, что позволяет рассматривать его как потенциальное мочегонное средство. Выведение ионов магния и кальция при действии пептида зависит от экскреции натрия. При гипергидратации аналог эксенатида увеличивает диурез и ускоряет выведение осмотически свободной воды. Препарат оказывает равное с эксенатидом действие на экскрецию натрия, но более слабое – на выведение избытка воды.

Ключевые слова: почка, ГПП-1, эксенатид, аналоги эксенатида, натрийурез, диурез

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|---|-----------|
| 1. ВВЕДЕНИЕ | 4 |
| 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | 5 |
| 2.1. Глюкагоноподобный пептид-1 | 5 |
| 2.2. Эксенатид..... | 9 |
| 2.3. Аналог эксенатида с заменой аминокислотного остатка в 35-ом положении | 11 |
| 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ | 12 |
| 4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ | 15 |
| 4.1. Влияние аналога эксенатида на ионорегулирующую функцию почек крыс..... | 15 |
| 4.2. Влияние аналога эксенатида на осморегулирующую функцию почек крыс..... | 22 |
| 5. ВЫВОДЫ..... | 30 |
| 6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... | 31 |

1. ВВЕДЕНИЕ

В XX веке была обнаружена эндокринная активность желудочно-кишечного тракта. Гормоны, вырабатываемые клетками слизистой кишечника, начали именоваться инкретинами. В настоящее время к ним относят глюкогоноподобный пептид-1 (ГПП-1) и глюкозозависимый инсулиотропный полипептид. Растет интерес к функциям этих пептидов. Обнаружено, что они обладают широким спектром биологических эффектов. Инкретины участвуют в регуляции углеводного обмена, стимулируя глюкозозависимую секрецию инсулина.

Исследования ГПП-1 показали, что помимо поддержания углеводного гомеостаза, он оказывает влияние на водно-солевой обмен организма. Уровень пептида в крови повышается как после приема пищи, так и при введении в организм избытка воды. Показано, что ГПП-1 и его миметик (то есть вещество, имитирующее действие гормона на рецептор), эксенатид, обладают выраженным диуретическим действием, а также стимулируют выведение катионов почками, в большей степени натрия. Эти свойства инкретинов и их миметиков могут оказаться полезными для коррекции нарушений водно-солевого баланса.

В настоящее время препараты на основе инкретинов (Баета (эксенатид), Виктоза (лираглутид)) используют для лечения пациентов с сахарным диабетом 2 типа. Возможно, препараты на основе ГПП-1 и эксенатида найдут новую сферу применения в клинической практике - профилактика и лечение нарушений водно-солевого баланса. Недавно были синтезированы новые аналоги эксенатида, которые могут стать более эффективной и экономически выгодной заменой ныне существующим препаратам.

Целью данной работы стало исследование влияния аналога эксенатида с заменой аминокислотного остатка в 35-ом положении на осморегулирующую и ионорегулирующую функции почек крыс.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Глюкагоноподобный пептид-1

Инкретины – гормоны, синтезируемые L-клетками слизистой оболочкой кишечника. Впервые термин «инкретин» ввел La Barre в 1930 году для обозначения гормональной активности кишечника, которая ведет к повышению эндокринной секреции поджелудочной железы /1/. На данный момент открыты два гормона этой группы. Первым в 1971 году был описан глюкозозависимый инсулиотропный полипептид (иногда его называют гастроингибирующим пептидом из-за его ингибирующего влияния на секреторную активность желудка). Позднее, в 80-х годах, был открыт второй пептид, названный ГПП-1. Его первичная структура была описана в 1983 году G. Bell и соавт. и насчитывает 30 аминокислотных остатков /2/.

ГПП-1 является продуктом гена глюкагона (наряду с глюкагоноподобным пептидом-2, оксинтомодулином и глюкагоном) /3/. Ген экспрессируется как в α -клетках поджелудочной железы, где из проглюкагона образуется глюкагон, так и в энтероэндокринных клетках (L-клетки слизистой оболочки кишки), где проглюкагон расщепляется до ГПП-1, ГПП-2 и оксинтомодулина. Наибольшее число L-клеток расположено в подвздошной и в ободочной кишках.



Рис.1. Действие ГПП-1 в периферических тканях и органах (рисунок из /4/).
GLP-1 – ГПП-1.

Экспериментально показано, что ГПП-1 обладает широким спектром биологических эффектов в различных органах и тканях (рис.1). Среди них наиболее важные – усиление секреции инсулина, торможение секреторной активности желудка, увеличение частоты сердечных сокращений, ускорение усвоения глюкозы мышцами и др. Основное, инсулинотропное действие ГПП-1 зависит от уровня гликемии /6/ и осуществляется при взаимодействии со специфическим рецептором на мембране β -клеток островков Лангерганса, после чего запускается секреция инсулина /7/. Рецептор ГПП-1 принадлежит к семейству рецепторов, связанных с G-белком, содержащим 7 трансмембранных доменов /9/. Полный путь взаимодействия ГПП-1 с рецепторами β -клеток и его эффекты представлены на рис.2.

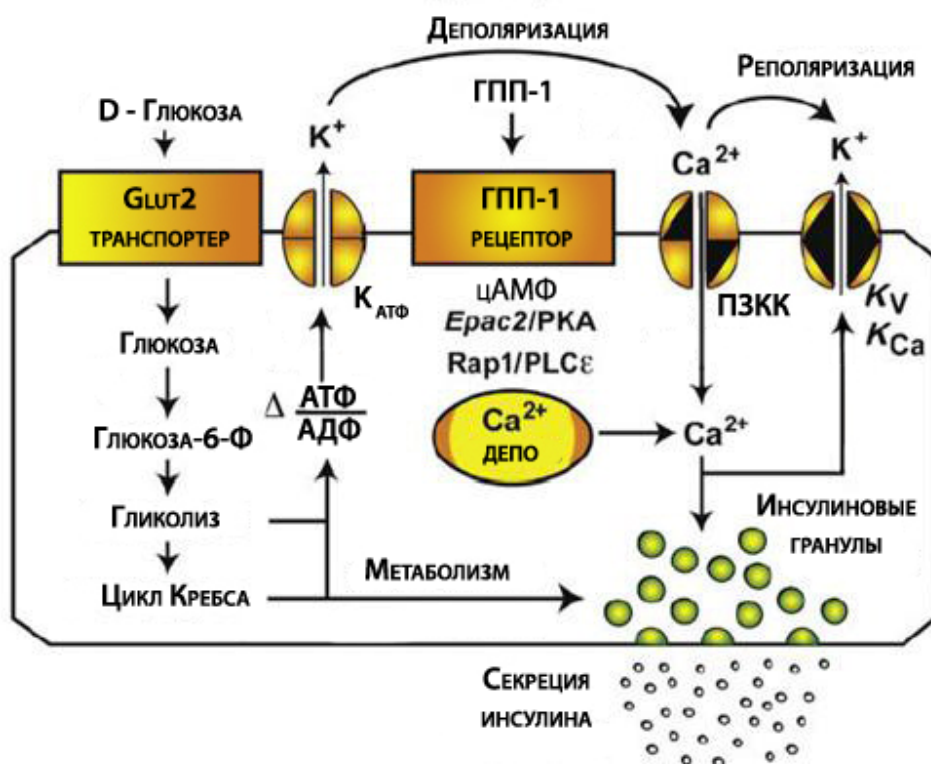


Рис.2 Процессы, происходящие в β-клетке при взаимодействии ГПП-1 с его рецептором (рисунок с модификациями из /5/).

При связывании ГПП-1 с рецептором идет активация аденилатциклазы, продукция цАМФ, повышение уровня внутриклеточного кальция и деполяризация мембраны клетки /8/. С помощью современных методов выявления информационной РНК, кодирующей рецептор, последний, помимо β-клеток поджелудочной железы, был обнаружен в тканях головного мозга, легких, сердца, желудка и почек. В почке рецептор ГПП-1 обнаружен в почечных сосудах и клетках проксимальных канальцев нефрона /9/.

Концентрация ГПП-1 в крови натощак составляет всего 5-10 пмоль/л, а при поступлении пищи в желудочно-кишечный тракт она повышается до 25 пмоль/л. Период полужизни пептида составляет около 2 минут /9/. Разрушение инкретина идет с помощью протеолитического фермента – дипептидилпептидазы-4 /5,8,9/, который отщепляет от интактного гормона (7-36 амид) два концевых N-терминальных аминокислотных остатка. В результате расщепления образуется метаболит (9-36 амид), лишенный основных биологических эффектов, период полувыведения которого составляет порядка 5 минут. Столь короткое время жизни объясняется

присутствием мембранно-связанной формы дипептидилпептидазы-4 на поверхностях клеток многих органов и тканей, а также свободной формы, растворенной в плазме крови. Если ввести в организм ингибиторы данного фермента, время жизни ГПП-1 увеличивается до 5 минут /10/.

В большинстве работ по исследованию ГПП-1 была показана его роль в регуляции углеводного обмена. Экспериментально было установлено, что секреция пептида происходит в ответ на прием пищи, на присутствие жиров, белков, углеводов, пищевых волокон в просвете кишечника и регулируется рядом эндокринных и нейрональных стимулов, либо прямой стимуляцией L-клеток /7/. Однако в более поздних работах была выдвинута и обоснована гипотеза, что ГПП-1 в значительной степени влияет и на водно-солевой баланс организма. В экспериментах было показано, что он стимулирует выведение натрия почкой /14/. Кроме того, оказалось, что концентрация ГПП-1 в крови повышается при введении в организм избытка воды /11/. Показано, что на фоне водной нагрузки ГПП-1 увеличивает экскрецию осмотически свободной воды на 186% по сравнению с группой, не получавшей препарат /13/. Инкретин способствует скорейшему восстановлению исходного состава сыворотки крови после солевой либо водной нагрузок /12/. Предполагается, что это происходит за счет снижения реабсорбции жидкости в проксимальном канальце. У крысы рецептор к инкретину был обнаружен методом гибридизации *in situ* в почечных клубочках и проксимальном канальце. В клубочках под действием ГПП-1, увеличивается скорость почечного кровотока и, как следствие, скорость клубочковой фильтрации. В свою очередь, в проксимальном канальце наблюдается снижение реабсорбции натрия и воды в эквивалентных количествах почти на 19%. Совместно эти факторы приводят к увеличению диуреза. Механизм действия гормона на проксимальный каналец, как было показано, связан с фосфорилированием белка Na^+/H^+ -обменника 3-его типа (NHE-3) по S552 и S605, что приводит к подавлению его активности и уменьшению реабсорбции натрия, а также к снижению рН в клетках

эпителия /10/. В некоторых других исследованиях показано уменьшение реабсорбции бикарбонатов /10/.

2.2. Эксенатид

Эксенатид – миметик ГПП-1, представляет собой синтетическую форму пептида экзендина-4, впервые выделенного из секрета слюнных желез ящерицы *Gila monster* (*Heloderma Suspectum*). Обнаружено, что у млекопитающих экзендин-4 является агонистом рецептора ГПП-1. Препарат на его основе (Баета) успешно применяется для лечения сахарного диабета 2 типа в США и Европе с 2005 года, а в России – с 2007. По последовательности аминокислотных остатков эксенатид обладает 53%-ным соответствием человеческому ГПП-1 /6/. В отличие от ГПП-1, эксенатид более устойчив к действию ДПП-4, благодаря замене предпоследнего глицина в N-терминальном фрагменте на аланин. При подкожном введении максимальная концентрация препарата в плазме крови наблюдается через 2 часа, а период полувыведения составляет 3-4 часа. Эксенатид состоит из 39 аминокислотных остатков и обладает всеми основными биологически важными эффектами инкретина, а именно он стимулирует синтез инсулина, подавляет продукцию глюкагона, замедляет эвакуацию пищи из желудка, снижает аппетит /9/. Благодаря этому пациенты с сахарным диабетом 2-ого типа, получающие терапию эксенатидом, сбрасывают лишний вес, что является достаточно важным, так как ожирение способствует прогрессированию заболевания. С другой стороны, так как действие Баеты зависит от уровня глюкозы в крови, то у пациентов существенно реже развивается гипогликемическая кома, чем при действии инсулина и других сахаропонижающих препаратов. При сахарном диабете эксенатид проявляет нефропротективные свойства, замедляет развитие гломерулосклероза, диабетической нефропатии, уменьшает уровень протеинурии /10/.

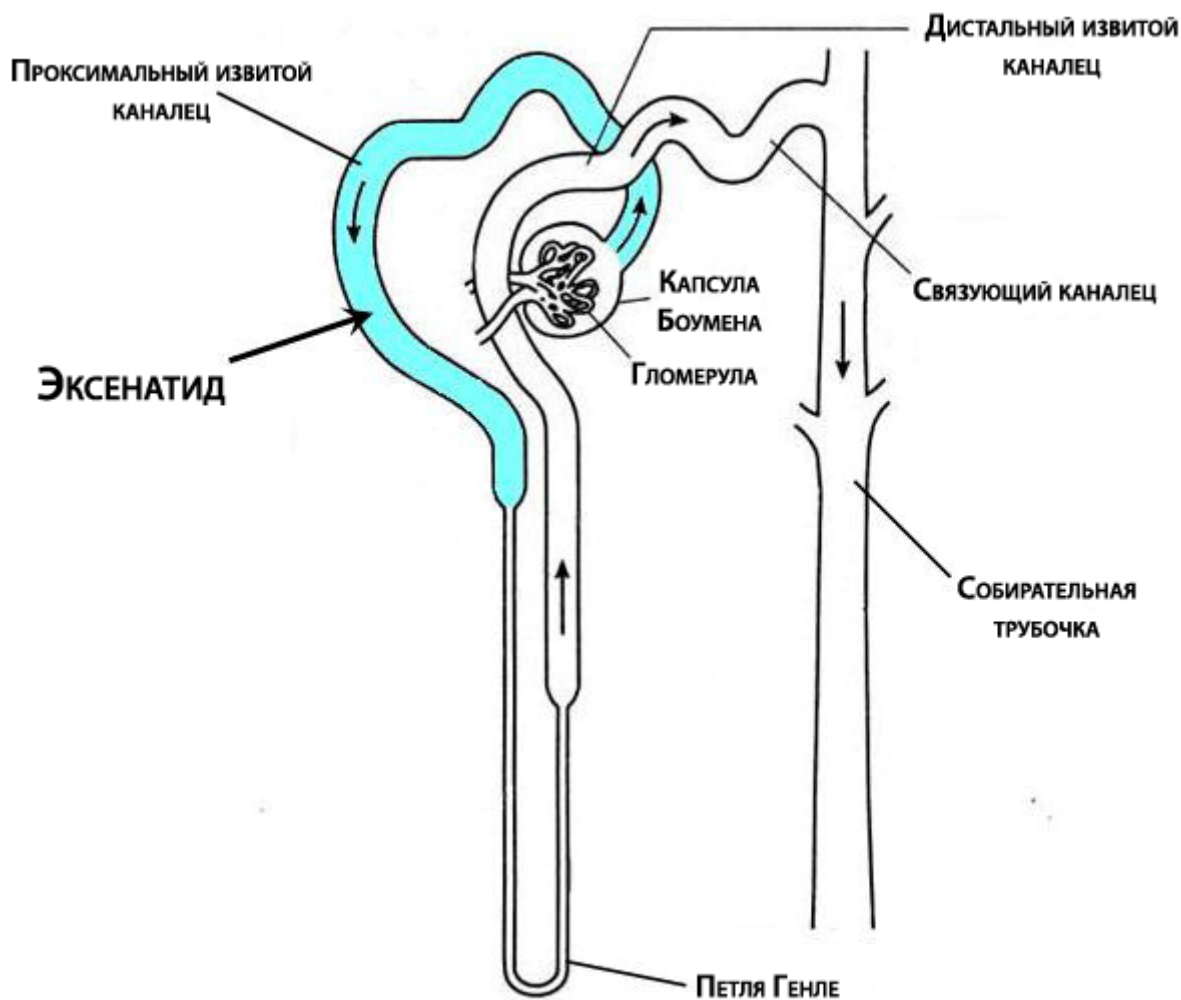


Рис.3. Локализация действия эксенатида в нефроне (показана цветом).
(Схема строения нефрона из /15/)

При исследовании физиологического действия эксенатида, как и в случае с ГПП-1 было обнаружено его влияние на почку и водно-солевой обмен. Аналогично ГПП-1 эксенатид увеличивает мочеотделение и выведение ионов натрия почкой, при этом показатели растут соответственно увеличению дозы препарата до уровня 0,15 нмоль на 100 г массы тела крысы. Максимальный эффект наблюдается через 15-30 минут после введения препарата. Эксенатид вызывает увеличение диуреза в 60 раз и рост экскреции натрия - почти в 57 раз /16/. Подобное действие обусловлено влиянием пептида на Na^+/H^+ -обменник, расположенный в мембранах клеток эпителия проксимального канальца (рис.3), что вызывает уменьшение реабсорбции

натрия с 99,5% до 81%. При этом отмечено слабое влияние на выведение других ионов, в частности калия и кальция /16/.

2.3. Аналог эксенатида с заменой аминокислотного остатка в 35-ом положении

Негативным эффектом применения эксенатида оказалась его плохая переносимость пациентами /7/. В связи с этим представляет интерес синтез новых аналогов эксенатида, которые оказывали бы меньше побочных эффектов при сохранении основной активности, и, возможно, обладали бы более селективным действием в отношении ионорегулирующей и осморегулирующей функций почек. Такие препараты могут найти применение как мочегонные средства не только у пациентов, страдающих сахарным диабетом, но и при других патологиях. Ранее было проведено исследование ряда аналогов эксенатида с заменами аминокислотных остатков в 14 и 35 положениях и показана их высокая натрийуретическая активность /17/.

Целью данной работы стало исследование влияния аналога эксенатида, который отличается от последнего заменой L-аланина на D-аланин в 35-ом положении, на осморегулирующую и ионорегулирующую функции почек крыс.

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все исследования проводили на ненаркотизированных самках крыс линии Wistar в возрасте от 3 до 6 месяцев и массой тела от 140 до 250 г. ГПП-1 полностью, а рецептор к ГПП-1 на 90% гомологичен человеческому [8], поэтому крысы являются адекватной моделью для изучения эффектов миметиков ГПП-1 на животных.

Крыс содержали в виварии в стандартных условиях, животные получали ad libitum воду и сухой полнорационный экструдированный комбикорм, произведенный ООО «Лабораторкорм». Вечером накануне эксперимента корм забирали, но доступ к воде оставался свободным вплоть до самого эксперимента. Протокол исследования одобрен этическим комитетом ИЭФБ РАН.

Эксенатид и его аналог синтезированы на химическом факультете СПбГУ проф. М.И. Титовым. Пептиды очищены с помощью ВЭЖХ (чистота 95%+), структура подтверждена масс-спектрометрией.

Химические формулы веществ:

ГПП-1: HisAlaGluGlyThrPheThrSerAspValSerLysAlaAlaGlnGluLeuTyrSerGluPheIleAlaTrpLeuValLysGlyArgGly-NH₂

Эксенатид: HisGlyGluGlyThrPheThrSerAspLeuSerLysGlnMetGluGluGluAlaValArgLeuPheIleGluTrpLeuLisAsnGlyGlyProSerSerGlyL-AlaProProProSer-NH₂

Аналог эксенатида с заменой в 35-ом положении: H-HisGlyGluGlyThrPheThrSerAspLeuSerLysGlnMetGluGluGluAlaValArgLeuPheIleGluTrpLeuLysAsnGlyGlyProSerSerGlyD-AlaProProProSer-ol

Эксенатид и его аналог растворяли в 0,9% растворе хлорида натрия и вводили внутримышечно в объеме 0,1 мл на 100 г массы тела (м.т.) в дозах 0,015; 0,05; 0,15; 0,5; 1 нмоль/100 г м.т. Животным группы контроля инъектировали 0,9% раствор хлорида натрия в том же объеме. Для изучения влияния пептидов на осморегулирующую функцию почек крысам давали

водную нагрузку per os – воду вводили через зонд в желудок в объеме 2 мл на 100 г м.т. Вес крыс определяли непосредственно перед опытом с помощью электронных весов. Во время эксперимента крыс помещали в клетки-пеналы с сетчатым дном и воронкой для сбора мочи. Пробы мочи собирали в течение 4 ч при произвольных мочеиспусканиях (рис.4), в протоколе записывали время получения пробы и ее объем.



Рис.4. Крысы в клетках-пеналах во время эксперимента.

Во всех пробах мочи определяли осмоляльность и концентрацию ионов натрия, калия, кальция и магния. Осмоляльность проб мочи измеряли криоскопическим методом на микроосмометре Advanced Instruments, Inc.3300 (США). Принцип работы прибора основан на изменении температуры в точке замерзания жидкости в зависимости от количества растворенных в ней солей. Концентрацию ионов натрия и калия измеряли в воздушно-пропановом пламени на двухканальном пламенном фотометре Sherwood-420 (Великобритания) при длинах волн 589,6 нм и 768 нм соответственно. Концентрацию ионов магния и кальция измеряли в воздушно-ацетиленовом пламени на атомно-абсорбционном спектрофотометре Shimadzu AA-6200 (Япония) при длинах волн 285,21 нм и 422,67 нм.

Для оценки функционального состояния почек рассчитывали диурез, экскрецию осмотически активных веществ и отдельных ионов, клиренс осмотически свободной воды. Все показатели нормировали на 100 г м.т. животного. Экскрецию ионов за определенный промежуток времени (например, за 3 часа) определяли по формуле: $U_x \cdot V \cdot t$, где U_x – концентрация иона в моче (мкмоль/мл), V – мочеотделение (мл/мин), t – время /15/. О процессах реабсорбции или экскреции воды судили по клиренсу осмотически свободной воды. Клиренс – это объем плазмы крови, полностью очищаемый от данного вещества в минуту. Клиренс осмотически свободной воды вычисляется по формуле:

$$C_{H_2O} = V - \frac{U_{Osm} \cdot V}{P_{Osm}},$$

где V – мочеотделение (мл/мин), U_{Osm} – осмоляльность мочи (мкОсм/кг H_2O), P_{Osm} – осмоляльность сыворотки крови ($P_{Osm} = 298$ мкОсм/кг H_2O). Если величина C_{H_2O} положительная, то речь идет об экскреции осмотически свободной воды, а если отрицательная – то о реабсорбции /18/.

Все данные представлены в виде $M \pm m$. Сравнение между группами проводили с помощью одно- или двухфакторного дисперсионного анализа с дальнейшим использованием поправки Бонферрони на число сравнений или теста Холма-Шидака для попарного сравнения средних, соответственно. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Рассчитывали коэффициент корреляции Пирсона.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Влияние аналога эксенатида на ионорегулирующую функцию почек крыс

Для изучения действия аналога эксенатида с заменой в 35-ом положении была проведена серия экспериментов на крысах при стандартном водно-солевом режиме и введении препарата в широком диапазоне доз (0,015-1,0 нмоль/100 г м.т.). Эффект пептида сопоставляли с действием самого эксенатида.

Введение эксенатида в дозе 0,015 нмоль/100 г м.т. привело к повышению диуреза и экскреции ионов натрия ($p < 0,05$), его аналог в этой дозе не оказывал значимого влияния на функции почек. Инъекция более высоких доз вела к достоверному увеличению диуреза и экскреции натрия. Зависимость объема выделяемой мочи от введенной дозы показана на рис.5, а зависимость экскреции ионов натрия от введенной дозы показана на рис. 6.

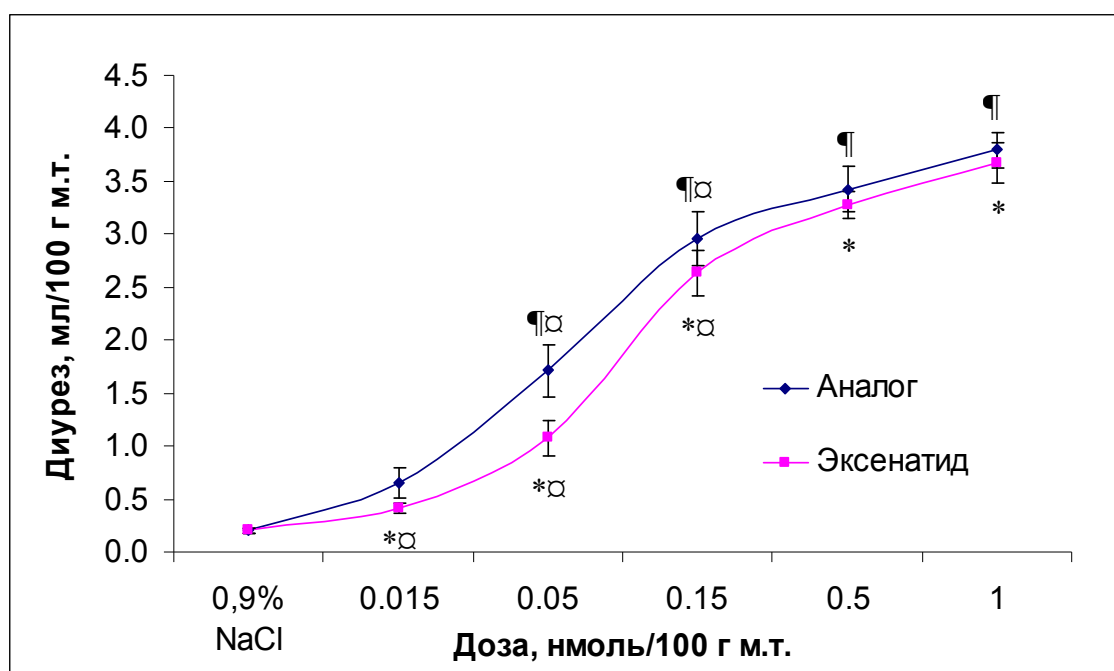


Рис.5. Зависимость суммарного объема выделяемой мочи за 3 часа эксперимента от дозы эксенатида и его аналога.

Значимость различий ($p < 0,05$) при сравнении: * - эксенатида с 0,9% NaCl; ¶ - аналога эксенатида с 0,9% NaCl; □ - с меньшей дозой того же препарата.

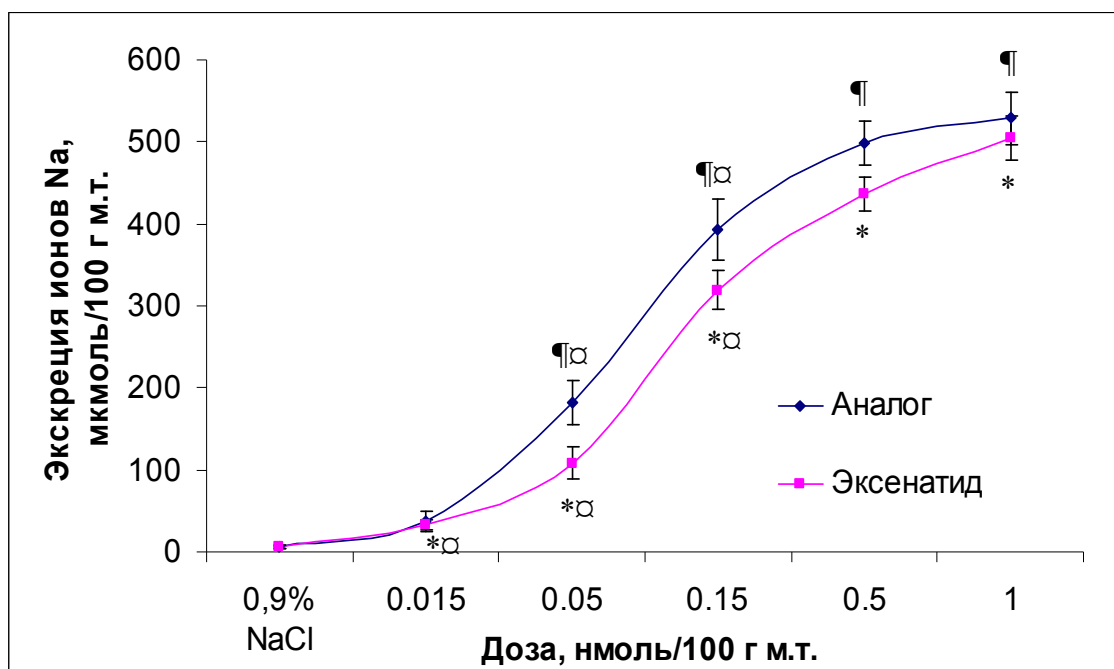


Рис.6. Зависимость экскреции почками ионов натрия за 3 часа эксперимента от дозы эксенатида и его аналога.

Значимость различий ($p < 0,05$) при сравнении: * - эксенатида с 0,9% NaCl; ¶ - аналога эксенатида с 0,9% NaCl; ☒ - с меньшей дозой того же препарата.

Как видно из графиков (рис.5 и 6), наиболее эффективной дозой эксенатида и его аналога является доза 0,15 нмоль/100 г м.т., дальнейшее увеличение дозы не ведет к статистически достоверному повышению показателей диуреза и натрийуреза.

Рассмотрим динамику мочеотделения у крыс при введении препаратов в дозе 0,15 нмоль/100 г м.т. (рис.7).

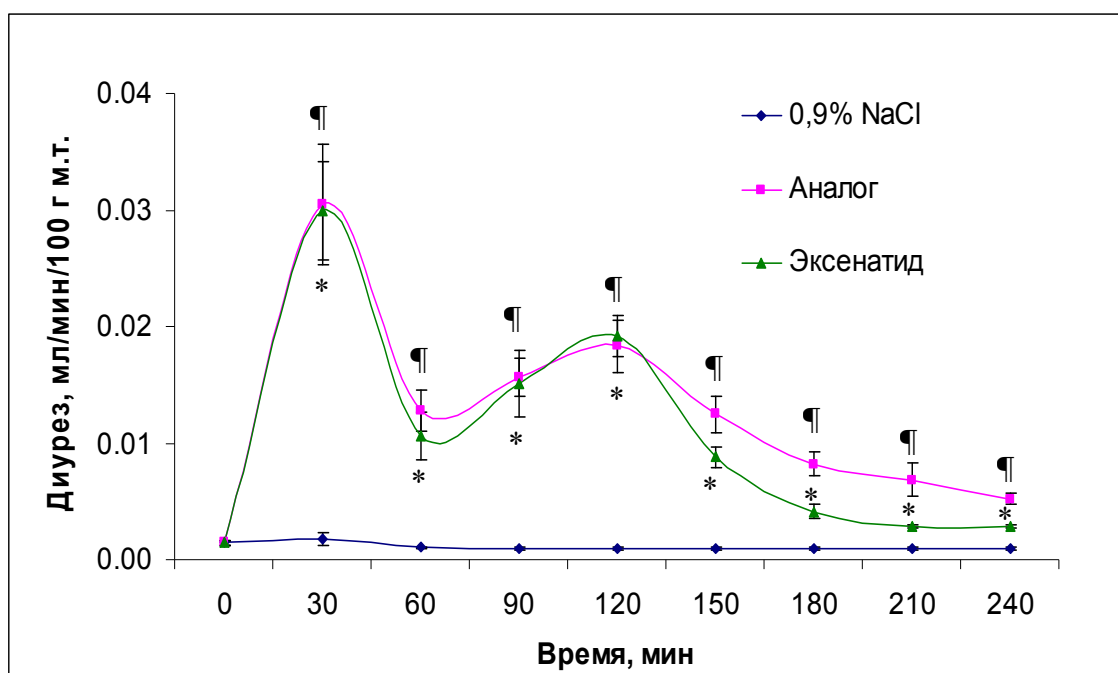


Рис.7. Динамика мочеотделения после введения эксенатида и его аналога в дозе 0.15 нмоль/100 г м.т. Значимость различий ($p < 0,05$) при сравнении:
 * - эксенатида с 0,9% NaCl; ¶ - аналога эксенатида с 0,9% NaCl.

Ярко выражено увеличение диуреза к 30-ой минуте от начала эксперимента, далее мочеотделение снижается. Второй пик диуреза наблюдается к концу 2-ого часа, но он примерно в 2 раза меньше по величине, чем первый. Диуретическое действие препаратов длится в течение 3-х часов. Анализ динамики экскреции ионов натрия (рис.8) показал, что выведение ионов также резко возрастает к 30-ой минуте, а затем постепенно снижается до базального уровня. Вероятно, диуретическое действие эксенатида и его аналога связано именно с увеличением выведения ионов натрия почкой. Стоит отметить, что достоверных различий между действием эксенатида и его аналога получено не было ($p > 0,05$).

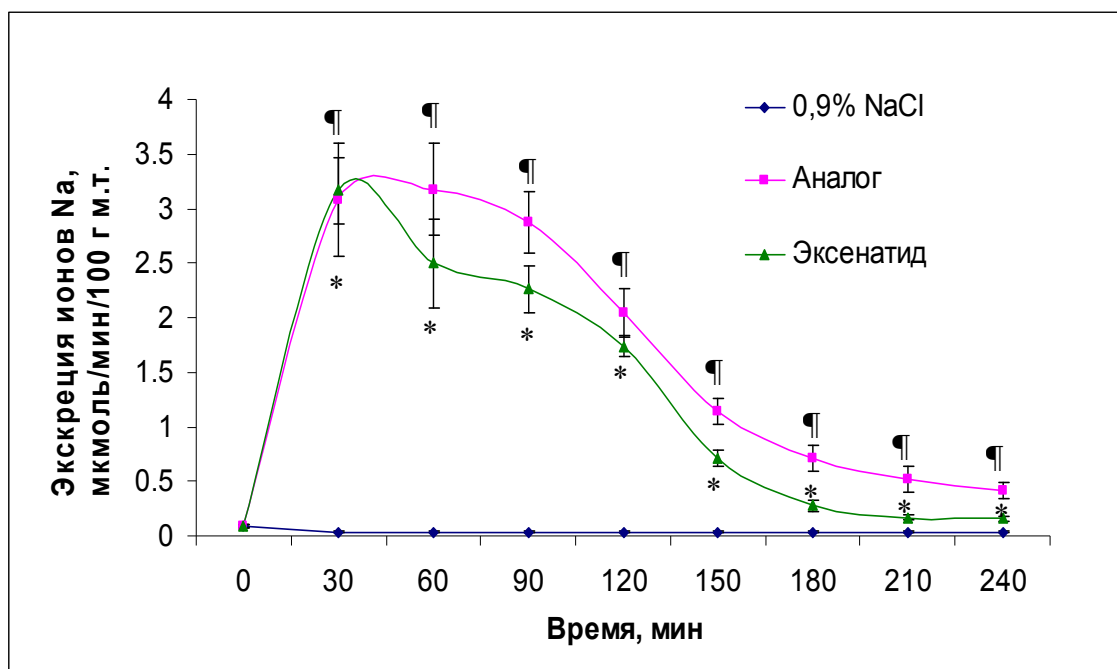


Рис.8. Динамика экскреции ионов натрия после введения эксенатида и его аналога в дозе 0.15 нмоль/100 г м.т. Значимость различий ($p < 0,05$) при сравнении: * - эксенатида с 0,9% NaCl; ¶ - аналога эксенатида с 0,9% NaCl.

**Суммарное выведение ионов почками за 3 часа эксперимента
у крыс после введения различных доз эксенатида и его аналога**

| Препарат | Доза, нмоль | Экскреция Na, мкмоль | Экскреция K, мкмоль | Экскреция Mg, мкмоль | Экскреция Ca, мкмоль |
|-----------|----------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 0,9% NaCl | - | 6±2 | 14±3 | 8,0±1,1 | 0,4±0,1 |
| Аналог | 0,015 | 38±12 | 26±8 | 7,8±0,6 | 0,4±0,1 |
| Эксенатид | 0,015 | 33±6 *□ | 31±5 □ | 7,6±0,9 | 0,4±0,1 |
| Аналог | 0,05 | 181±26 *□ | 52±6 *□ | 14,1±1,2 *□ | 2,6±0,5 *□ |
| Эксенатид | 0,05 | 108±19 *□ | 43±6 * | 11,9±1,2 | 2,3±0,7 |
| Аналог | 0,15 | 392±36 *□ | 75±6 *□¶ | 22,8±1,8*□¶ | 5,2±0,9 *□ |
| Эксенатид | 0,15 | 319±23 *□ | 56±4 * | 16,9±0,9 *□ | 6,7±0,6 *□ |
| Аналог | 0,5 | 498±26 * | 72±9 * | 20,9±0,9 * | 4,7±0,7 *¶ |
| Эксенатид | 0,5 | 436±21 *□ | 66±3 * | 22,9±1,5 *□ | 9,1±0,7 * |
| Аналог | 1,0 | 529±32 * | 74±5 * | 18,8±1,5 * | 13,9±1,3 *□ |
| Эксенатид | 1,0 | 505±26 * | 74±5 * | 20,6±0,9 * | 10,4±0,9 * |

Все показатели приведены в расчете 100 г м.т. животного. Значимость различий ($p < 0,05$) при сравнении: * - с 0,9% NaCl; ¶ - с эксенатидом в той же дозе; □ - с меньшей дозой того же препарата.

Суммарные показатели экскреции ионов почками при действии препаратов за 3 часа эксперимента представлены в таблице 1. Наряду с ростом выведения натрия эксенатид и его аналог стимулировали выведение других катионов – калия, магния и кальция. При введении препаратов в минимальной дозе (0,015 нмоль/100 г м. т.) достоверных отличий от группы контроля не получено. Эксенатид вызывал максимальный рост экскреции магния (в 2,9 раза) в дозе 0,5 нмоль/100 г массы тела, а его аналог – уже в дозе 0,15 нмоль/100 г м.т. Наибольший рост выведения кальция наблюдался при действии эксенатида в дозе 0,5 нмоль/100 г м.т. (в 23 раза), а аналога – в

дозе 1,0 нмоль/100 г м.т. (в 35 раз). Экскреция калия возрастала при действии препаратов уже в дозе 0,05 нмоль/100 г м.т. и достигала максимума при увеличении дозы до 0,15 нмоль/100 г м.т.

Проанализирована зависимость экскреции различных катионов почкой при действии препаратов от их натрийуретической активности (рис. 9, 10, 11). Показано, что выведение ионов магния и кальция четко коррелирует с величиной натрийуреза. Коэффициент корреляции между параметрами указывает на высокую силу связи экскреции натрия и магния, среднюю силу связи – экскреции натрия и кальция. Выведение калия в значительно меньшей степени определяется натрийурезом, наблюдается слабая корреляция между этими показателями. Полученные данные указывают на то, что эксенатид и его аналог могут оказывать непосредственное влияние на транспорт калия в почке, не зависящее от угнетения реабсорбции натрия.



Рис.9. Зависимость экскреции ионов магния от экскреции ионов натрия при действии аналога эксенатида в дозе 0,15 нмоль/100 г м.т.

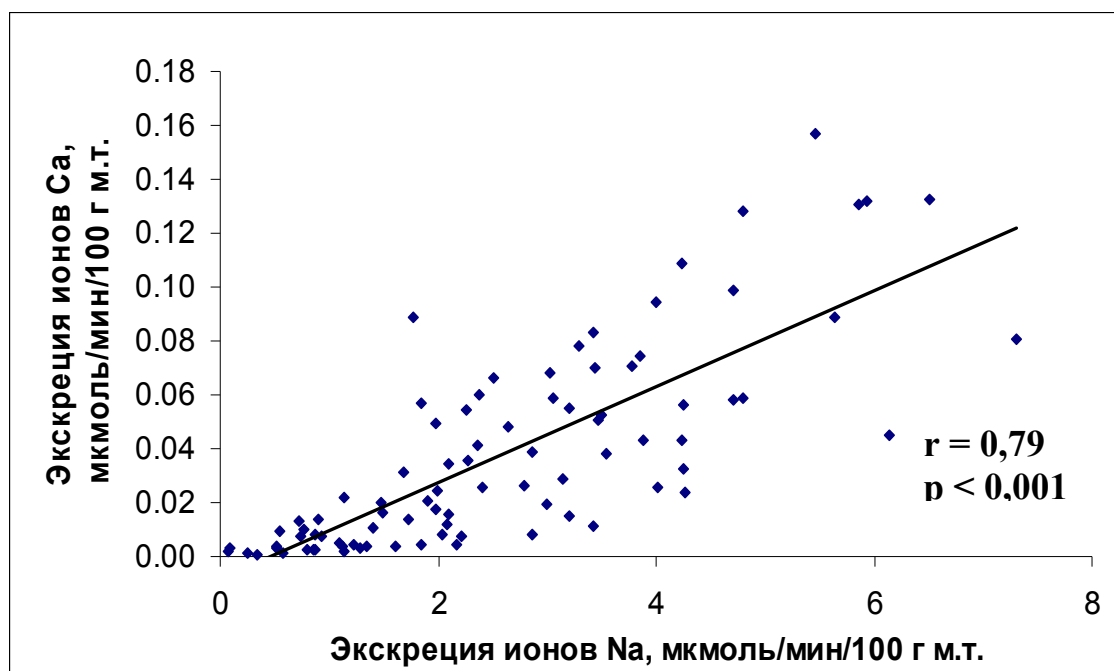


Рис.10. Зависимость экскреции ионов кальция от экскреции ионов натрия при действии аналога эксенатида в дозе 0,15 нмоль/100 г м.т.

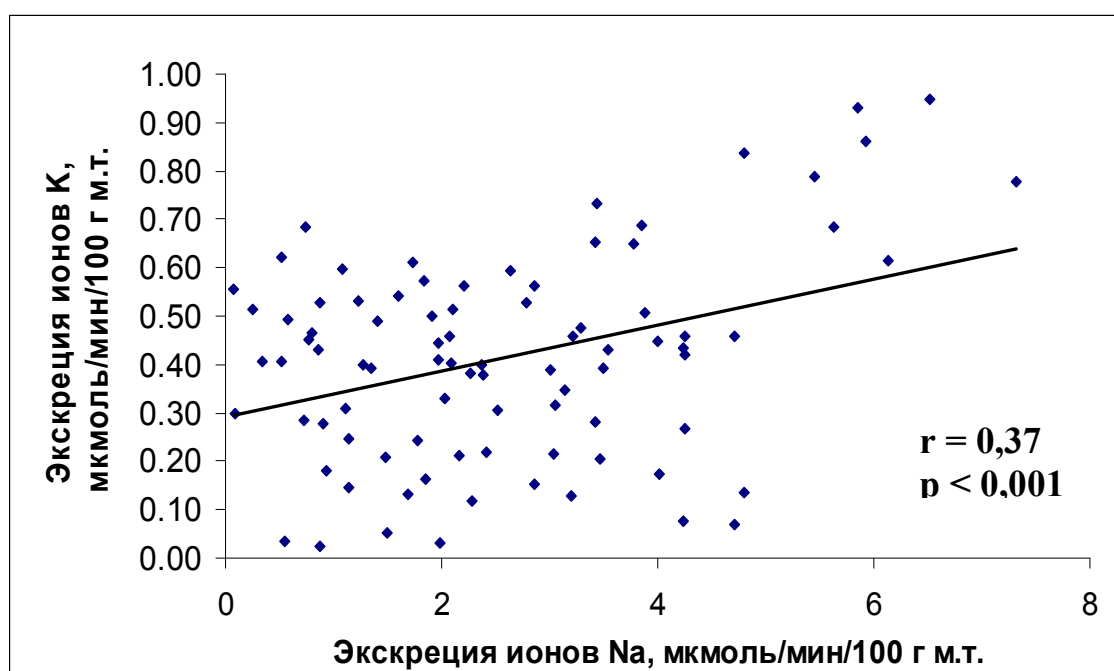


Рис.11. Зависимость экскреции ионов калия от экскреции ионов натрия при действии аналога эксенатида в дозе 0,15 нмоль/100 г м.т.

4.2. Влияние аналога эксенатида на осморегулирующую функцию почек крыс

На следующем этапе работы была проанализирована осморегулирующая функция почек крыс при действии эксенатида и его аналога. Был проанализирован клиренс осмотически свободной воды. Динамика этого показателя при действии препаратов в дозе 0,15 нмоль/100 г м.т. представлена на рис. 12. На графике видно, что в первый час от начала эксперимента идет увеличение реабсорбции воды, а после – уменьшение. Если совместить эти данные с данными, представленными на рис.7 и рис.8, то можно утверждать, что снижение реабсорбции осмотически свободной воды в течение второго часа эксперимента при действии эксенатида и его аналога приводит к росту диуреза (рис.7), несмотря на постепенное снижение натрийуреза (рис.8). Таким образом, второй пик диуреза при действии препаратов связан с уменьшением концентрирования мочи.

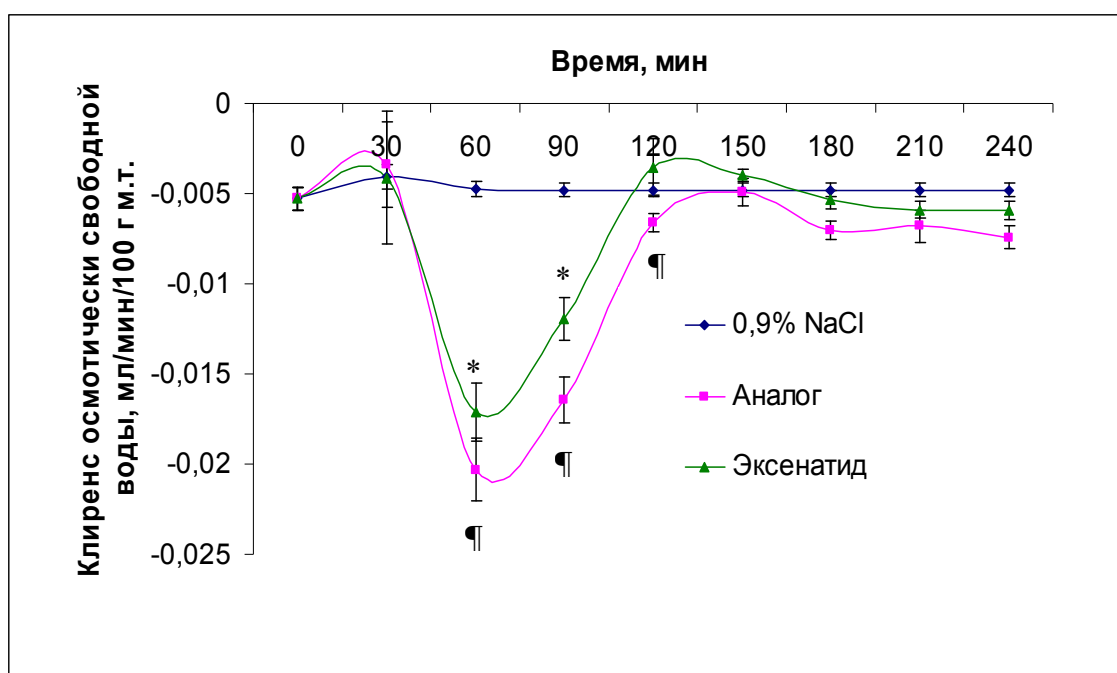


Рис.12. Динамика экскреции осмотически свободной воды после введения эксенатида и его аналога в дозе 0,15 нмоль/100 г м.т. Значимость различий ($p < 0,05$) при сравнении с группой контроля (0,9% NaCl): * - эксенатида; ¶ - аналога эксенатида.

Очевидно, что аналог эксенатида влияет на осморегулирующую функцию почек крыс. Для более подробного изучения действия препарата была проведена дополнительная серия опытов. Помимо эксенатида и его аналога (в дозах 0,015 и 0,05 нмоль на 100 г м.т.) все животные получили водную нагрузку в объеме 2 мл на 100 г м.т.

При введении в организм избытка воды наблюдалось увеличение диуреза (рис.13) и экскреции осмотически свободной воды (рис.14) к 60-ой минуте от начала эксперимента. Выведение осмотически активных веществ не изменялось (рис.15). Таким образом, рост диуреза был обусловлен исключительно повышением выведения осмотически свободной воды из организма.

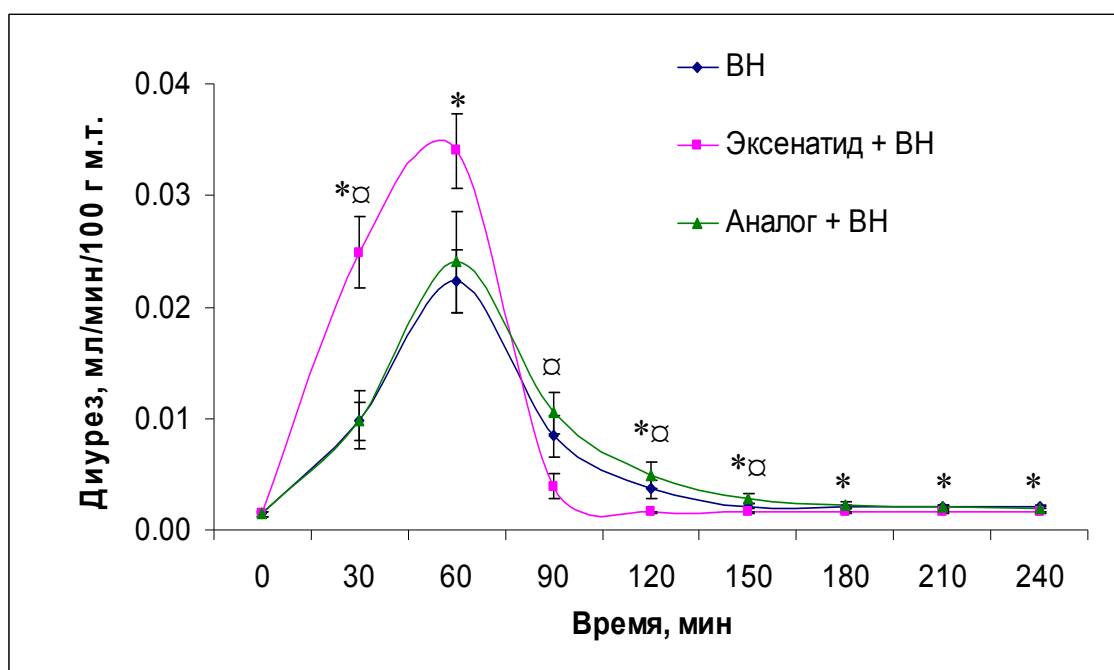


Рис.13. Диурез после введения эксенатида и его аналога в дозе 0,015 нмоль/100 г м.т. на фоне водной нагрузки. Значимость различий ($p < 0,05$) при сравнении с группой контроля (ВН): * - эксенатида; ¶ - аналога эксенатида.

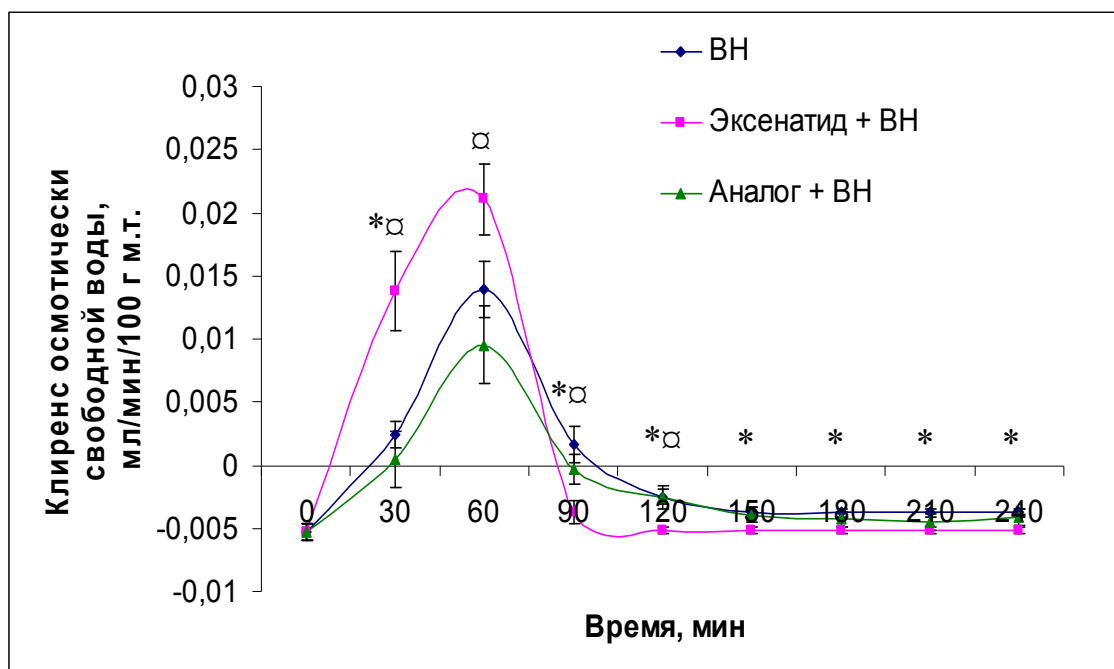


Рис.14. Динамика экскреции осмотически свободной воды после введения эксенатида и его аналога в дозе 0,015 нмоль/100 г м.т. на фоне водной нагрузки (ВН). Значимость различий ($p < 0,05$) при сравнении с группой контроля (ВН): * - эксенатида; ¶ - аналога эксенатида.

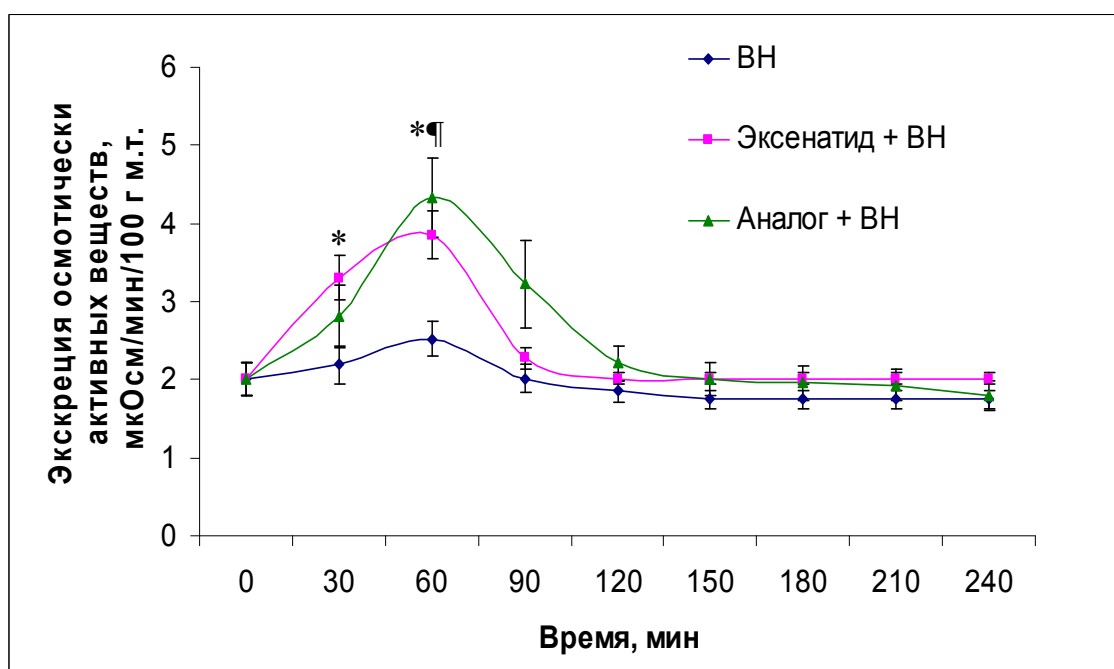


Рис.15. Динамика экскреции осмотически активных веществ после введения эксенатида и его аналога в дозе 0,015 нмоль/100 г м.т. на фоне водной нагрузки (ВН). Значимость различий ($p < 0,05$) при сравнении с группой контроля (ВН): * - эксенатида; ¶ - аналога эксенатида.

Введение эксенатида в дозе 0,015 нмоль/100 г м.т. на фоне водной нагрузки вело к достоверному повышению диуреза (рис.13), увеличению экскреции осмотически свободной воды (рис.14) и осмотически активных веществ (рис.15) к 60-ой минуте, по сравнению с группой, получившей только водную нагрузку. Инъекция аналога не привела к достоверному увеличению показателей диуреза и экскреции воды, однако стимулировала выведение осмотически активных веществ. Динамика соответствующих процессов представлена на рис. 13, 14, 15.

При введении препаратов в дозе 0,05 нмоль/100 г м.т. наблюдалась несколько иная картина: пик диуреза и клиренса осмотически свободной воды приходился уже на 30-ую минуту (рис.16 и 17); выведение осмотически активных веществ почками было значительно выше, чем в группе контроля (рис.18). Действие аналога статистически не отличалось от действия эксенатида ($p > 0,05$). На графиках видно, что как в группах с введением препаратов, так и при действии только водной нагрузки параметры функции почек возвращаются к исходному уровню через 180 минут от начала эксперимента (рис. 16, 17, 18).

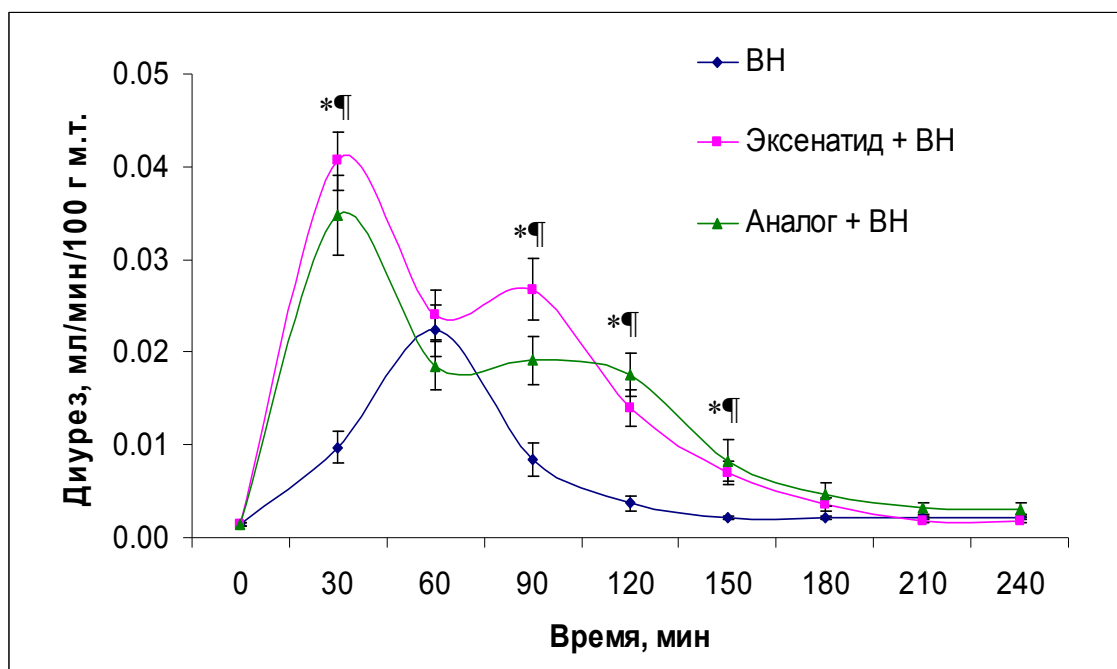


Рис.16. Диурез после введения эксенатида и его аналога в дозе 0,05 нмоль/100 г м.т. на фоне водной нагрузки (ВН). Значимость различий ($p < 0,05$) при сравнении с группой контроля (ВН): * - эксенатида; ‡ - аналога эксенатида.

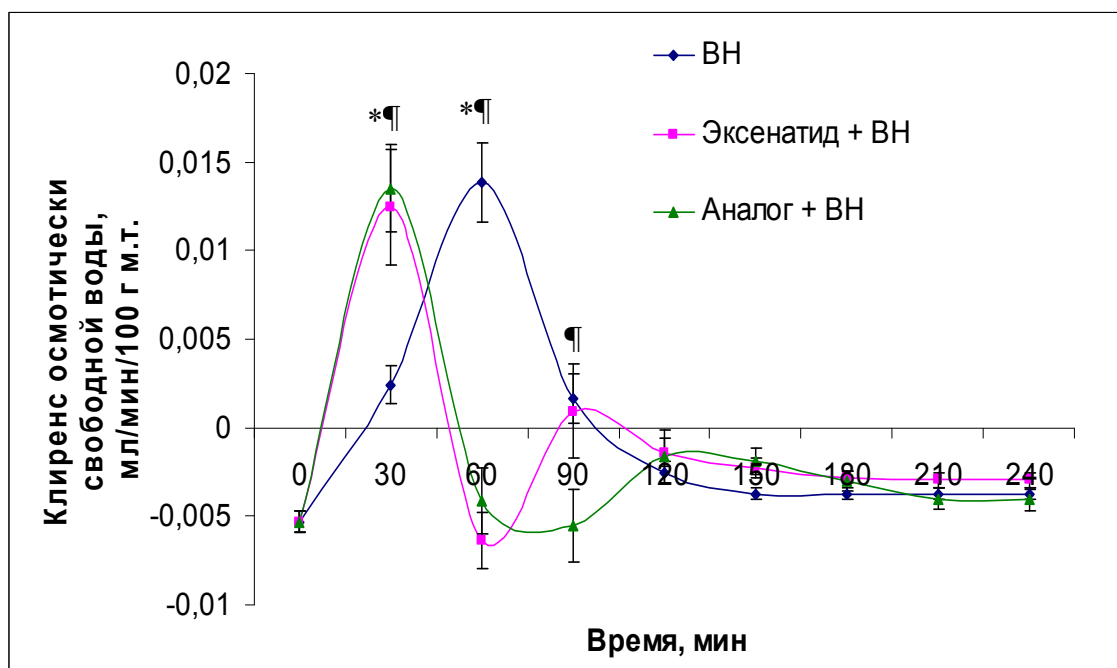


Рис.17. Динамика экскреции осмотически свободной воды после введения эксенатида и его аналога в дозе 0,05 нмоль/100 г м.т. на фоне водной нагрузки. Значимость различий ($p < 0,05$) при сравнении с группой контроля (ВН): * - эксенатида; ‡ - аналога эксенатида.

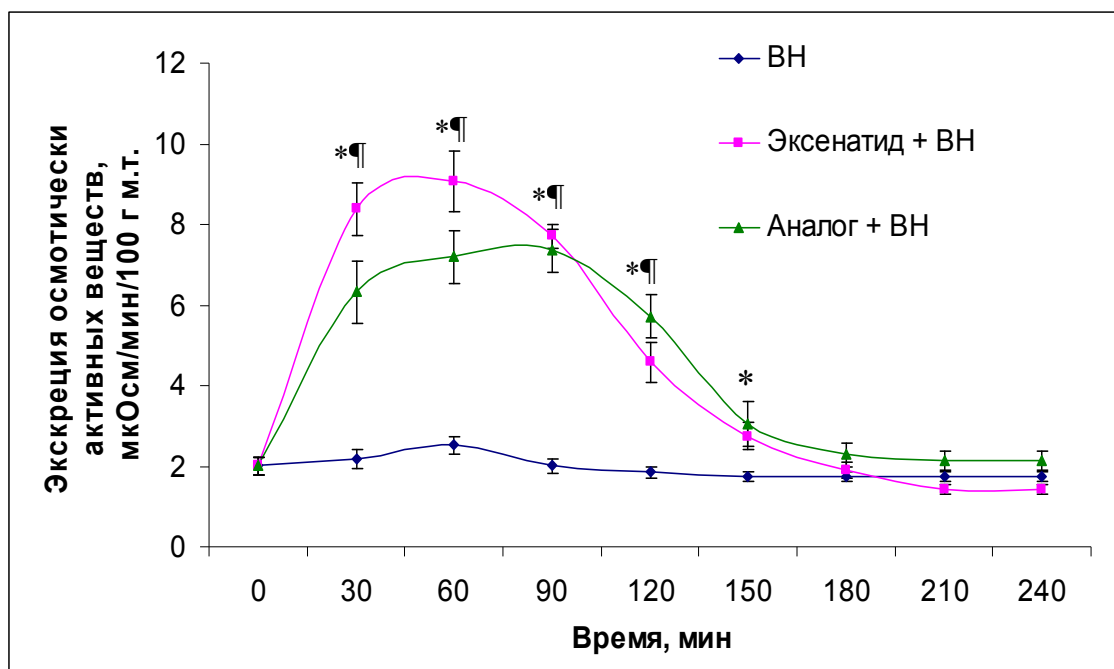


Рис.18. Динамика экскреции осмотически активных веществ после введения эксенатида и его аналога в дозе 0,05 нмоль/100 г м.т. на фоне водной нагрузки (ВН). Значимость различий ($p < 0,05$) при сравнении с группой контроля (ВН): * - эксенатида; ¶ - аналога эксенатида.

Для более полного анализа рассмотрим суммарные показатели мочеотделения, экскреции осмотически активных веществ и осмотически свободной воды за первые 3 ч (табл. 2).

Таблица №2.

Суммарное выведение мочи, экскреция осмотически активных веществ и осмотически свободной воды почками крыс за 3 часа эксперимента после введения различных доз эксенатида и его аналога на фоне водной нагрузки

| Экспериментальные условия | Диурез, мл | Экскреция осмотически активных веществ, мкОсм | Экскреция осмотически свободной воды, мл |
|-----------------------------------|--------------|---|--|
| ВН | 1,43 ± 0,05 | 376 ± 33 | 0,61 ± 0,08 |
| Аналог 0,015 нмоль + ВН | 1,63 ± 0,17 | 496 ± 42 | 0,51 ± 0,09¶ |
| Эксенатид 0,015 нмоль + ВН | 2,03 ± 0,06* | 465 ± 21 | 1,05 ± 0,11 |
| Аналог 0,05 нмоль + ВН | 3,09 ± 0,13* | 944 ± 52* | 0,65 ± 0,05 |
| Эксенатид 0,05 нмоль + ВН | 3,48 ± 0,14* | 1031 ± 36* | 0,66 ± 0,08 |

ВН – водная нагрузка. Все показатели приведены в расчете 100 г м.т. животного. Значимость различий ($p < 0,05$) при сравнении: * - с ВН; ¶ - с эксенатидом в той же дозе.

При введении аналога в дозе 0,015 нмоль/100 г м.т. показатели не отличались от группы контроля (табл. 2). Инъекция эксенатида приводила к увеличению диуреза, экскреции осмотически активных веществ, но не экскреции осмотически свободной воды (табл. 2). В дозе 0,05 нмоль/100 г м.т. оба препарата вызывают повышение диуреза и усиливают выведение осмотически активных веществ по сравнению с эффектом водной нагрузки. Однако при действии эксенатида и его аналога выводится такое же количество осмотически свободной воды, как и при действии водной нагрузки (табл. 2). Таким образом, препараты способствуют удалению избытка воды из организма, но в течение более короткого периода времени

(рис.17). Тем самым, эксенатид и его аналог могут способствовать нормализации водно-солевого баланса.

На основании проведенных экспериментов можно заключить, что аналог эксенатида оказывает диуретическое и натрийуретическое действие на почки крысы. Увеличение экскреции ионов натрия при действии препарата сопровождается увеличением реабсорбции осмотически свободной воды, ростом экскреции магния, кальция, калия. Наши данные указывают на то, что аналог эксенатида с заменой аминокислотного остатка в 35 положении тормозит реабсорбцию катионов в почках крысы.

Показатели экскреции натрия в группах, получивших эксенатид и его аналог не отличались ($p < 0,05$). Можно предположить, что изученный аналог также, как и эксенатид, угнетает активность Na^+/H^+ -обменника. Экскреция ионов магния и кальция изменялась в разной степени при действии препаратов. Максимальный рост экскреции магния достигался при введении меньшей дозы аналога, а максимальный рост экскреции кальция – меньшей дозы эксенатида. Влияние препаратов на экскрецию калия не различалось.

При гипергидратации оба препарата ускоряют выведение избытка воды из организма. Но эксенатид действует в более низкой дозе, чем его аналог. Ранее было показано, что механизм гидроуретического эффекта эксенатида включает в себя несколько процессов: 1) ускорение притока жидкости из проксимального канальца к дистальному сегменту нефрона и собирательным трубкам, 2) ускорение восстановления водонепроницаемости собирательных трубок при участии простагландинов /19/. Учитывая, что аналог эксенатида по натрийуретической активности и влиянию на экскрецию осмотически активных веществ не уступает эксенатиду, различия в гидроуретической активности препаратов, вероятно, связаны с их разным влиянием на процессы реабсорбции воды в собирательных трубках.

5. ВЫВОДЫ

- 1) Эксенатид и его аналог с заменой в 35 положении оказывают диуретическое действие.
- 2) Аналог эксенатида увеличивает экскрецию почками осмотически активных веществ, ионов натрия, калия, кальция и магния. Выведение ионов магния и кальция при действии аналога эксенатида зависит от экскреции натрия.
- 3) Эксенатид и его аналог оказывали равное по силе натрийуретическое и калийуретическое действие. Аналог эксенатида вызывал максимальный рост экскреции магния в меньшей дозе, чем эксенатид, а кальцийурез - в большей.
- 4) При гипергидратации, вызванной водной нагрузкой, эксенатид и его аналог увеличивают диурез и ускоряют выведение осмотически свободной воды. Аналог эксенатида с заменой в 35 положении Ala на D-Ala оказывает гидроуретическое действие в более высокой дозе, чем эксенатид.

Полученные данные указывают на влияние эксенатида и его нового аналога на функции почек. Высокая натрийуретическая и диуретическая активность изученных препаратов позволяет рассматривать эти пептиды как потенциальные мочегонные средства. До настоящего времени выявлен только один тип рецептора ГПП-1. Выявленные различия в физиологическом эффекте эксенатида и его аналога могут указывать на существование различных подтипов рецептора ГПП-1 с разной чувствительностью к синтетическим миметикам.

6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1) Мкртумян А.М., Бирюкова Е.В.; Использование инкретинов в лечении сахарного диабета 2 типа – вчерашняя мечта, близкая к реальности сегодня; Лечение; 2; 34-39; 2006.
- 2) Дедов И.И., Яшков Ю.И., Ершова Е.В.; Инкретины и их влияние на течение сахарного диабета 2 типа у пациентов с морбидным ожирением после бариатрических операций; Ожирение и метаболизм; 2; 3-10; 2012.
- 3) Holst J.J.; Glucagon and Glucagon-Like Peptides 1 and 2; Results Probl Cell Differ.; 50; 121-35; 2010.
- 4) Дедов И.И., Яшков Ю.И., Ершова Е.В.; Инкретины и их влияние на течение сахарного диабета 2 типа у пациентов с морбидным ожирением после бариатрических операций; Ожирение и метаболизм; 2; 3-10; 2012
- 5) Nadkarni P., Cherpurny O.G., Holz G.G.; Regulation of Glucose Homeostasis by GLP-1; Prog Mol Biol Transl Sci.; 121; 23-65; 2014.
- 6) Аметов А.С., Карпова Е.В.; Инкретиномиметики – новый этап в лечении сахарного диабета 2–го типа; РМЖ; 18; 23; 1410-1415; 2010.
- 7) Шестакова М.В., Викулова О.К.; Современные возможности фармакотерапии сахарного диабета 2 типа при помощи аналогов глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1); Сахарный диабет; 1; 9-15; 2007.
- 8) Drucker D. J.; Glucagon-Like Peptides; Diabetes; 47; 159 -169; 1998.
- 9) Романцова Т.И.; Ингибитор дипептидилпептидазы-IV – ситаглиптин: новые возможности терапии сахарного диабета 2 типа; Ожирение и метаболизм; 4; 22-28; 2006.
- 10) Корбут А.И., Климонтов В.В.; Терапия, основанная на инкретинах: почечные эффекты; Сахарный диабет; 19; 1; 53-63; 2016.
- 11) Стимуляция секреции глюкагоноподобного пептида-1 водной нагрузкой у человека; А.С. Марина, А.В. Кутина, Е.И. Шахматова, Е.В. Балботкина, Ю.В. Наточин; Доклады Академии Наук; 459; 1; 1-4; 2014.

- 12) Наточин Ю.В., Марина А.С., Кутина А.В.; Перераспределение проксимальной и дистальной реабсорбции воды и ионов в почке крыс при действии миметика глюкагоноподобного пептида-1; Бюллетень экспериментальной биологии и медицины; 160; 7; 13-16; 2015.
- 13) Марина А.С., Кутина А.В., Наточин Ю.В.; Участие инкретина в осмотическом гомеостазе у крыс; Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова; 98; 11; 1362-1370; 2012.
- 14) Glucagon-Like Peptide-1 Is Involved in Sodium and Water Homeostasis in Humans; J.P. Gutzwiller, P. Hruz, A.R. Huber, C. Hamel, C. Zehnder, J.Drewe, H. Gutmann, Z. Stanga, D. Vogel, C. Beglinger; Digestion; 73; 142-150; 2006.
- 15) Вандер А.; Физиология почек; СПб; Питер; 2000.
- 16) Кутина А.В., Марина А.С., Наточин Ю.В.; Натрийуретическое свойство эксенатида: высокая эффективность и локализация действия; Экспериментальная и клиническая физиология; 75; 2; 22-25; 2012.
- 17) Аналоги эксенатида; Ю.В. Наточин, М.И. Титов, И.И. Елисеев, И.А. Глуздилов, С.К. Никольская, А.В. Кутина, А.С. Марина; Патент RU 2422461 09.02.2010. Опубликовано 27.06.2011. Бюл. №18.
- 18) Наточин Ю.В.; Клиренс осмотически свободной и свободной от натрия воды: клиническое значение; Нефрология; 16; 2; 9-15; 2012.
- 19) Kutina A.V., Marina A. S., Shakhmatova E.I., Natochin Y.V.; Physiological mechanisms for the increase in renal solute-free water clearance by a glucagon-like peptide-1 mimetic; Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology; 40; 8; 510-517; 2013.