

На правах рукописи

КАНАШКИНА

Татьяна Анатольевна

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ СИНТЕЗИРОВАННЫХ АНАЛОГОВ  
АРГИНИН-ВАЗОТОЦИНА НА ФУНКЦИИ ПОЧКИ КРЫС

03.00.13 – Физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург

2007

Работа выполнена в лаборатории физиологии почки и водно-солевого обмена Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук

**Научный руководитель**

академик РАН Юрий Викторович Наточин

**Официальные оппоненты**

доктор медицинских наук, профессор Николай Павлович Ерофеев

доктор медицинских наук, профессор Ратмир Сергеевич Орлов

**Ведущее учреждение**

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова МО РФ

Защита состоится 29 мая 2007 г. в 11 часов

на заседании диссертационного совета Д 002. 127. 01

при Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова

Российской академии наук по адресу: Санкт-Петербург, пр. Гореза, 44

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук

Автореферат разослан \_\_\_ апреля 2007 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор биологических наук, профессор

Марина Николаевна Маслова

### **Общая характеристика работы.**

**Актуальность проблемы.** В физиологии почки и в клинической практике, связанной с решением проблем лечения отеков, гипо- и гипернатриемии, вопрос о регуляции реабсорбции натрия остается одним из наиболее актуальных и дискуссионных. Установлена роль альдостерона, атриопептида, вазопрессина в изменении выделения натрия и воды почкой. Недавно было показано, что у аргинин-вазотоцина (АВТ) при его введении крысам имеются уникальные свойства воздействия на водно-солевой обмен – он увеличивает экскрецию солей натрия и одновременно повышает реабсорбцию осмотически свободной воды в почке (Гао, Наточин, 2004). В то же время известные натрийуретические гормоны (Beltowski, Wojcicka, 2002; Елисеев, 2003; Antunes-Rodrigues et al., 2004) и петлевые диуретики (Greger, Wangemann, 1987; Uechi et al., 2003) усиливают натрийурез, но при этом не влияют на проницаемость канальцев для воды. Своеобразие действия на функцию почки АВТ открывало возможность исследования новых механизмов регуляции транспорта ионов натрия в почке и поиска более активных соединений, влияющих на реабсорбцию этих ионов. Целесообразность синтеза новых аналогов АВТ и исследования их влияния на почку обусловлена тем, что среди них могли оказаться физиологически активные вещества, тормозящие реабсорбцию натрия и способствующие быстрой экскреции его избытка из организма.

**Цель исследования.** Изучение влияния синтезированных аналогов АВТ на осмо- и ионорегулирующую функции почки у крыс, выяснение физиологических механизмов натрийуретического действия АВТ и его аналогов.

#### **Задачи исследования.**

1. Сравнительное исследование влияния аргинин-вазопрессина (АВП), АВТ и синтезированных аналогов АВТ – 1-дезамино-Arg<sup>8</sup>-вазотоцина (1dАВТ), 1-дезамино-1-монокарба-Arg<sup>8</sup>-вазотоцина (1d1мкАВТ), 1-дезамино-*D*-Arg<sup>8</sup>-вазотоцина (1dDАВТ) и *D*-Arg<sup>8</sup>-вазотоцина (DАВТ) на экскрецию воды и ионов натрия, калия, магния почкой крыс при стандартном водном режиме и на фоне водной нагрузки.
2. Исследование роли V<sub>1</sub>- и V<sub>2</sub>-рецепторов в реализации эффектов нонапептидов на выделение ионов натрия и воды почкой.

3. Исследование роли простагландина  $E_2$  ( $ПГЕ_2$ ), атриопептида, цАМФ, цГМФ в реализации натрийуретического эффекта АВТ и его аналогов.
4. Сопоставление особенностей действия фуросемида и аналогов АВТ на функции почки крыс.

**Научная новизна.** Впервые показано антидиуретическое действие синтезированных аналогов АВТ – 1dABТ, 1d1мкABТ, 1dDABТ, DABТ у крыс. Впервые установлено, что 1dABТ и 1d1мкABТ у крыс вызывают исключительно высокую экскрецию натрия почкой, которая более чем в 50000 раз в молярном отношении превышает действие фуросемида; эти вещества одновременно увеличивают реабсорбцию осмотически свободной воды в канальцах. Впервые показано, что натрийуретический эффект аналогов АВТ обусловлен стимуляцией  $V_1$ -рецепторов. Впервые показана высокая корреляция между энергией взаимодействия изученных пептидов с  $V_2$ -рецептором и увеличением реабсорбции воды в почке крыс *in vivo*.

**Научно-практическое значение работы.** Результаты исследования имеют фундаментальное значение для понимания механизма натрийуретической функции почки, они могут стать основой создания средств коррекции нарушений обмена натрия в организме. Усиление натрийуретического влияния у новых аналогов АВТ может найти применение при необходимости увеличить выделение натрия и сохранить воду в организме, что важно для обеспечения стабильной осмоляльности крови у человека. Полученные в работе результаты используются в курсах лекций по физиологии для студентов медицинского факультета Санкт-Петербургского государственного университета.

**Основные положения, выносимые на защиту.**

1. Синтезированные аналоги АВТ – 1dDABТ и DABТ обладают антидиуретическим эффектом на почку крыс. Выраженное пролонгированное антидиуретическое и натрийуретическое действие оказывают 1dABТ и 1d1мкABТ.
2. Антидиуретическая реакция почки крыс на введение АВТ и его аналогов связана с активацией  $V_2$ -рецепторов собирательных трубок. Натрийуретическое действие, обусловленное активацией  $V_1$ -рецепторов, включает участие цГМФ,  $ПГЕ_2$  и, по-видимому, реализуется в толстом восходящем отделе петли Генле.

3. 1dABT и 1d1мкABT в молярном отношении вызывают более чем в 50000 раз большее усиление выделения натрия почкой крыс по сравнению с высокой дозой фуросемида.

**Апробация работы.** Результаты исследования доложены и обсуждены на Всероссийской конференции молодых исследователей “Физиология и медицина“ (Санкт-Петербург, 2005), на II Российском симпозиуме по химии и биологии пептидов (Санкт-Петербург, 2005) и девятой Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей “Человек и его здоровье” (Санкт-Петербург, 2006).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 2 статьи в отечественных реферируемых журналах и тезисы 3-х докладов.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 150 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, характеристики материала и методов исследования, результатов исследования, обсуждения результатов, выводов, списка литературы, включающего 262 источника. Диссертация иллюстрирована 12 таблицами и 44 рисунками.

### **Материалы и методы исследования**

Эксперименты проводили на ненаркотизированных самках крыс линии Вистар в возрасте 3-6 месяцев с массой тела 150-200 г. Опыты выполнены в соответствии с международными стандартами по работе с экспериментальными животными. Функция почки крыс исследовалась при стандартном водном режиме и на фоне введения с помощью резинового зонда через рот в желудок воды в объеме 5 мл на 100 г массы тела для торможения секреции эндогенного АВП. Ненаркотизированные животные помещались в клетки-пеналы с полом из металлической сетки, через отверстия которого моча стекала по воронке в пробирку. Выделение мочи регистрировали при спонтанном мочеотделении, измеряли объем и забирали для дальнейшего исследования. Кровь получали из сонной артерии под эфирным наркозом.

В сыворотке крови и моче осмоляльность определяли криоскопическим методом на миллиосмометре МТ-4 (Буревестник, Россия) и микроосмометре 3300 (Advanced Instruments, Inc., США), концентрацию креатинина – по реакции с пикриновой кислотой на спектрофотометре UNICO-2100 с проточной кюветой (Япония), концентрацию ионов

магния – в воздушно-ацетиленовом пламени на атомном абсорбционном спектрофотометре Hitachi-508 (Япония). Исследование концентрации ионов натрия и калия в сыворотке крови проводили на анализаторе электролитов AVL 9140 (США), в моче концентрацию ионов натрия и калия измеряли в воздушно-пропановом пламени на пламенном фотометре Corning – 410 (Великобритания). Для определения концентрации ПГЕ<sub>2</sub>, цАМФ, цГМФ в моче использовали наборы для иммуноферментного анализа (R&D Systems, Великобритания), для измерения proANP(1-98) в сыворотке крови – наборы для иммуноферментного анализа (Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, Австрия). Измерение оптической плотности и расчет концентрации ПГЕ<sub>2</sub>, цАМФ, цГМФ и proANP(1-98) осуществляли на автоматическом ридере ELx800 (BIO-ТЕК Instruments, США) по методикам соответствующих тест-систем.

Использованные реактивы: гормоны – АВП и АВТ (Sigma Chemical Co, США), аналоги АВТ – 1dABТ, 1d1мкАВТ, 1dDABТ и DABТ (ЗАО «Синтез пептидов», Россия), агонист V<sub>2</sub>-рецепторов – dDABП (Sigma Chemical Co, США), антагонисты V<sub>1</sub>-рецепторов – OPC-21268 и V<sub>2</sub>-рецепторов – OPC-31260 (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Япония), блокатор циклооксигеназы – диклофенак натрия (Natur Produkt Europe B.V., Нидерланды), фуросемид (Hoechst, Индия).

Данные статистически обработаны и представлены в виде  $M \pm m$ . Для сравнения и оценки межгрупповых различий использовали тест ANOVA и непарный *t*-критерий Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ . Применяли корреляционный анализ.

## Результаты исследования

### Исследование влияния аналогов АВТ на выделение воды и ионов почкой крыс.

В контрольной группе крыс почка функционирует в состоянии антидиуреза в результате секреции эндогенного антидиуретического гормона, и происходит реабсорбция осмотически свободной воды. После инъекции в мышцу бедра крысам 1dABТ увеличивался диурез, выделение ионов натрия, и наблюдалось повышение реабсорбции осмотически свободной воды. Выявлена прямая зависимость между дозой инъецируемого 1dABТ и его антидиуретическим и натрийуретическим эффектами (рис. 1). В дозе 0.05 нмоль на 100 г массы тела он оказывает сильное натрийуретическое действие, дальнейшее

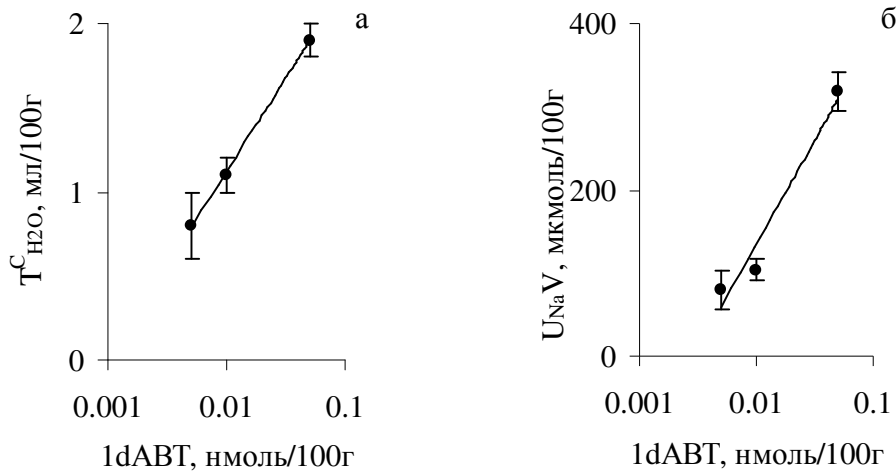


Рис. 1. Зависимость реабсорбции осмотически свободной воды и выделения ионов натрия почкой крыс от дозы инъектированного 1dABT.

По оси абсцисс – доза 1dABT в нмоль/100 г массы тела; по оси ординат – (а) реабсорбция осмотически свободной воды ( $T^C_{H_2O}$  в мл/100 г массы тела за 120 мин), (б) экскреция ионов натрия ( $U_{NaV}$  в мкмоль/100 г массы тела за 120 мин).

увеличение дозы не представлялось возможным в связи с чрезмерно выраженным антидиуретическим эффектом у этого аналога. После инъекции 0.05 нмоль 1dABT на 100 г массы тела крыс в течение первых 30 мин возрастал диурез, одновременно увеличивалась реабсорбция осмотически свободной воды. Усиливалось выведение осмотически активных веществ, экскреция ионов натрия возрастала в 47.5 раз, калия – в 7.7 раз, магния – в 4.8 раза (рис. 2). Повышение мочеотделения длилось в течение почти 2 ч, максимум реакции отмечался на 35-й мин. Подобное влияние на функции почки оказывали инъекции 0.05 нмоль на 100 г массы тела как ABT, так и 1d1мкABT. Динамика увеличения диуреза и экскреции ионов натрия, калия, магния весьма сходна. 1dABT в этой дозе обладает более выраженным антидиуретическим и натрийуретическим действием по сравнению с ABT (рис. 3). После инъекции 0.05 нмоль на 100 г массы тела DABT или 1dDABT натрийуретической реакции почки крыс не отмечалось. При действии всех изученных пептидов выявлен высокий коэффициент корреляции между экскрецией ионов натрия и калия ( $r=0.674$ ,  $p<0.01$ ,  $n=47$ ).

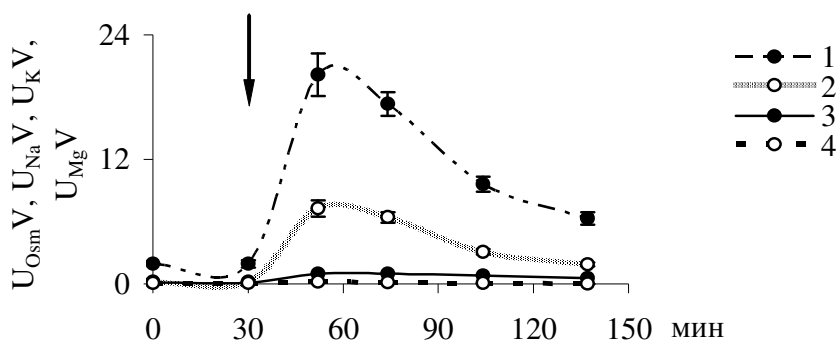


Рис. 2. Динамика выведения почкой крыс осмотически активных веществ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{++}$  после инъекции 0.05 нмоль 1dABT на 100 г массы тела.

По оси абсцисс – время в мин; по оси ординат – экскреция осмотически активных веществ ( $U_{\text{Osm}}V$  в  $\mu\text{моль}/\text{мин}\cdot 100$  г массы тела), ионов натрия ( $U_{\text{Na}}V$  в  $\mu\text{моль}/\text{мин}\cdot 100$  г массы тела), калия ( $U_{\text{K}}V$  в  $\mu\text{моль}/\text{мин}\cdot 100$  г массы тела) и магния ( $U_{\text{Mg}}V$  в  $\mu\text{моль}/\text{мин}\cdot 100$  г массы тела). Стрелка – инъекция в мышцу 0.05 нмоль 1dABT на 100 г массы тела; 1 –  $U_{\text{Osm}}V$ , 2 –  $U_{\text{Na}}V$ , 3 –  $U_{\text{K}}V$ , 4 –  $U_{\text{Mg}}V$ .

После введения в желудок воды в объеме 5 % к массе тела в течение 2 ч выводится  $85.9 \pm 2.2$  % введенной воды, количество осмотически свободной воды, выделяемой почкой за это время, равно 58 % от введенного объема воды. При введении водной нагрузки в результате подавления секреции эндогенного вазопрессина максимально реализуется водовыделительная функция почки. Инъекция 0.05 нмоль АВП на фоне водной нагрузки приводит к резкому уменьшению диуреза за счет увеличения реабсорбции осмотически свободной воды, но при этом не наблюдается повышение экскреции осмотически активных веществ. За 7 ч после инъекции АВП крысам почки выделили  $12.2 \pm 4.8$  % от введенной в желудок воды. При инъекции такой же дозы АВТ наблюдается выраженная экскреция осмотически активных веществ, ионов натрия, и, соответственно, меньшее снижение диуреза. Осмоляльное очищение после инъекции АВТ по сравнению с исходным уровнем возрастает на максимуме реакции более чем на порядок. При введении в желудок 5 мл воды на 100 г массы тела выявлена прямая зависимость между увеличением диуреза и экскрецией осмотически свободной воды ( $r=0.980$ ,  $p<0.01$ ), а после инъекции 0.05 нмоль АВТ на 100 г массы тела – между



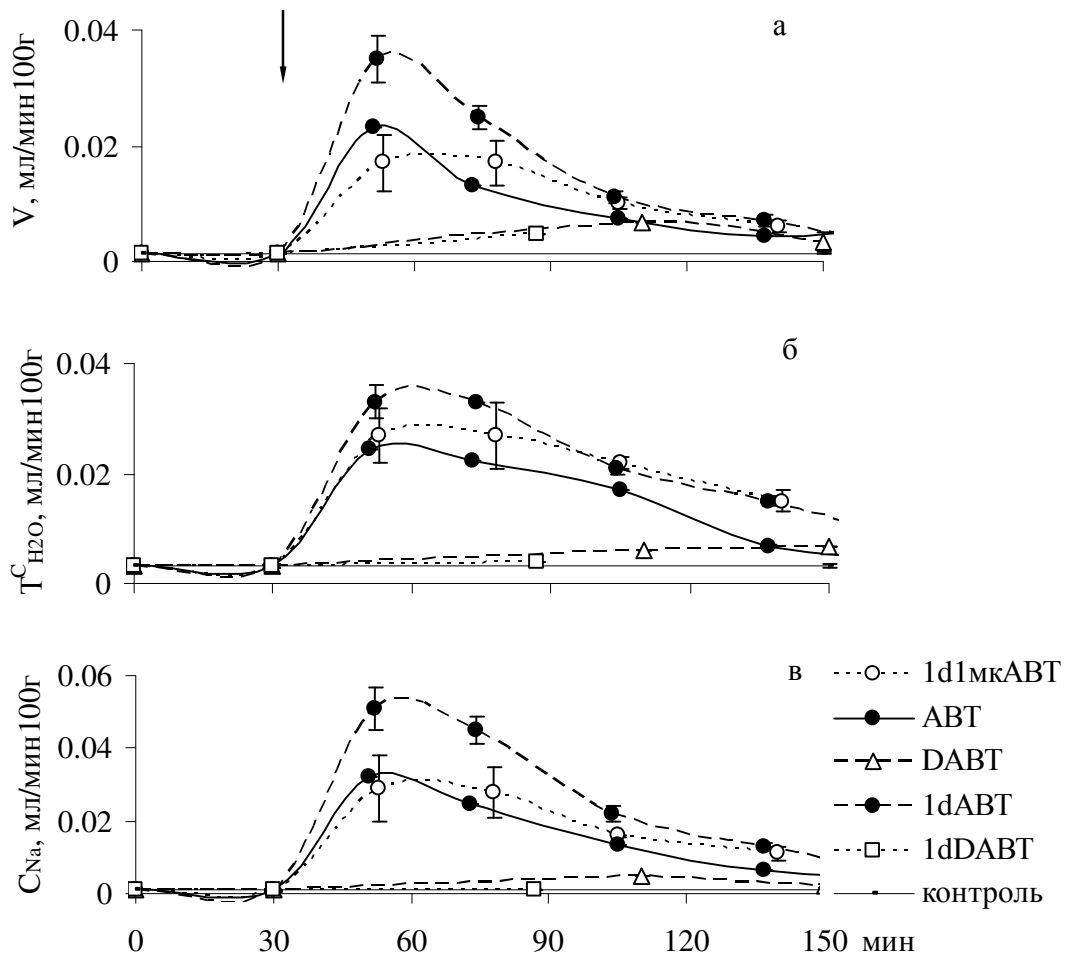


Рис. 3. Динамика мочеотделения у крыс после инъекции 0.05 нмоль АВТ и его аналогов на 100 г массы тела.

По оси абсцисс – время в мин; по оси ординат – (а) диурез ( $V$  в мл/мин·100 г массы тела), (б) реабсорбция осмотически свободной воды ( $T^C_{H_2O}$  в мл/мин·100 г массы тела), (в) очищение от ионов натрия ( $C_{Na}$  в мл/мин·100 г массы тела). Стрелка – инъекция в мышцу 0.05 нмоль АВТ или аналогов на 100 г массы тела.

повышением диуреза и одновременным возрастанием реабсорбции осмотически свободной воды ( $r=0.800$ ,  $p<0.01$ ), и высокая корреляция ( $r=0.938$ ,  $p<0.01$ ) между осмольальным очищением и реабсорбцией осмотически свободной воды (рис. 4). Это говорит о том, что повышение экскреции осмотически активных веществ после инъекции

пептида влечет за собой возрастание реабсорбции осмотически свободной воды. Экскретируемая фракция осмотически активных веществ возрастает с  $2.6 \pm 0.2 \%$  до  $11.9 \pm 1.2 \%$  ( $p < 0.001$ ), что указывает на канальцевый эффект гормона. Поскольку концентрация электролитов в сыворотке крови не отличалась от контроля, источником увеличенного очищения от осмотически активных веществ могло быть снижение их реабсорбции только в дистальном сегменте нефрона.

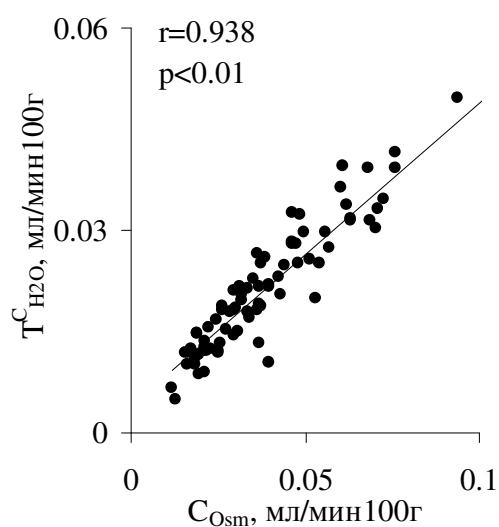


Рис. 4. Зависимость между клиренсом осмотически активных веществ и реабсорбцией осмотически свободной воды после инъекции 0.05 нмоль АВТ на 100 г массы тела на фоне водной нагрузки.

По оси абсцисс – клиренс осмотически активных веществ ( $U_{Osm}V$  в мл/мин·100 г массы тела); по оси ординат – реабсорбция осмотически свободной воды ( $T^C_{H2O}$  в мл/мин·100 г массы тела).

Для АВП, АВТ и его аналогов при введении на фоне водной нагрузки была исследована зависимость антидиуретического и натрийуретического эффектов от дозы. Сила антидиуретического действия растет пропорционально увеличению дозы АВТ и его аналогов (рис. 5), как и при введении АВП. Инъекция АВТ, 1dАВТ, 1d1мкАВТ и 1dДАВТ в дозе 0.0001 нмоль на 100 г массы тела оказывает в разной степени выраженное антидиуретическое действие без влияния на экскрецию ионов. Оно выражается в уменьшении мочеотделения и снижении экскреции осмотически свободной воды. Агонист  $V_2$ -рецепторов – dДАВП оказывает более выраженное антидиуретическое действие по сравнению с 1dДАВТ: за 2 ч наблюдения диурез после инъекции 0.0001 нмоль на 100 г массы тела 1dДАВТ составил  $2.4 \pm 0.3$  мл/100 г массы тела, а после введения dДАВП –  $0.9 \pm 0.1$  мл/100 г массы тела ( $p < 0.01$ ). В дозе 0.05 нмоль на 100 г массы тела АВТ и все исследованные аналоги (1dАВТ, 1d1мкАВТ, 1dДАВТ, ДАВТ) проявляют

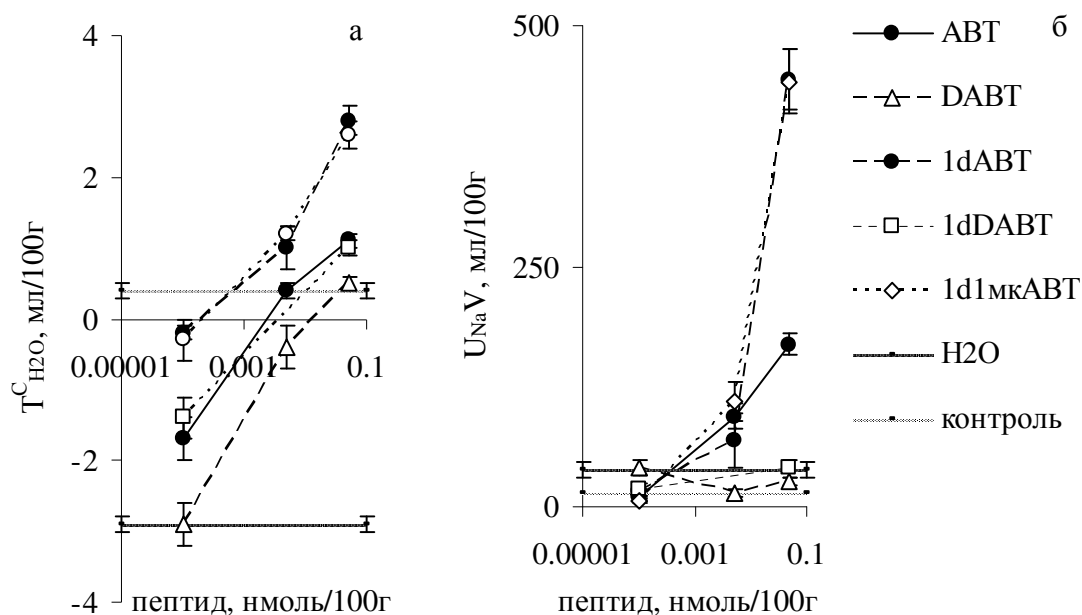


Рис. 5. Зависимость реабсорбции осмотически свободной воды и выделения ионов натрия от дозы пептидов, инъецированных крысам на фоне водной нагрузки.

По оси абсцисс – доза пептида в нмоль/100 г массы тела; по оси ординат – (а) реабсорбция осмотически свободной воды ( $T_{H_2O}^C$  в мл/100 г массы тела за 120 мин), (б) экскреция ионов натрия ( $U_{NaV}$  в мкмоль/100 г массы тела за 120 мин).

антидиуретическое свойство. При этом 1dABT и 1d1мкABT оказывают более выраженное влияние на почку крыс, чем ABT (табл. 1). Они резко увеличивают реабсорбцию воды и выделение почкой осмотически активных веществ, главным образом, ионов натрия, а также калия и магния. Натрийуретическая реакция почки длится в течение 2 ч, ей соответствует пик диуреза (рис. 6) и реабсорбции осмотически свободной воды. Антидиуретический эффект в целом более пролонгированный: за 7 ч наблюдения после введения 1dABT и 1d1мкABT от введенной в желудок воды выводится только  $36.9 \pm 3.5 \%$  и  $31.9 \pm 2.7 \%$ , соответственно. Клиренс эндогенного креатинина не изменялся, что указывает только на канальцевый эффект пептидов. Таким образом, антидиуретическое действие ABT, 1dABT и 1d1мкABT проявляется в меньших дозах, а для выявления натрийуретического эффекта требуется применение больших доз.

Таблица 1.

Показатели деятельности почки крыс после инъекции 0.05 нмоль АВТ и аналогов на 100 г массы тела на фоне водной нагрузки.

Параметры <sup>+</sup>	H <sub>2</sub> O (n=28)	АВТ (n=69)	1dАВТ (n=24)	1d1мкАВТ (n=11)	1dDАВТ (n=20)	DАВТ (n=27)
V, мл	4.27±0.11	0.89±0.06*	1.90±0.13* <sup>\$</sup>	1.40±0.12* <sup>\$</sup>	0.37±0.05* <sup>\$</sup>	0.51±0.05* <sup>\$</sup>
V, %	85.9±2.2	17.7±1.1*	37.3±2.5* <sup>\$</sup>	28.2±2.4* <sup>\$</sup>	7.3±0.9* <sup>\$</sup>	10.5±1.3* <sup>\$</sup>
C <sub>H<sub>2</sub>O</sub> , мл	2.9±0.1	-1.1±0.1*	-2.8±0.2* <sup>\$</sup>	-2.6±0.2* <sup>\$</sup>	-1.0±0.1* <sup>Ns</sup>	-0.5±0.1* <sup>\$</sup>
C <sub>osm</sub> , мл	1.3±0.1	2.0±0.1*	4.7 ±0.3* <sup>\$</sup>	4.0±0.3* <sup>\$</sup>	1.4±0.1 <sup>ns</sup> <sup>\$</sup>	1.0±0.1* <sup>\$</sup>
C <sub>Na</sub> , мл	0.28±0.05	1.22±0.09*	3.22±0.23* <sup>\$</sup>	3.20±0.24* <sup>\$</sup>	0.29±0.07 <sup>ns</sup> <sup>\$</sup>	0.19±0.03 <sup>ns</sup> <sup>\$</sup>
C <sup>Na</sup> <sub>H<sub>2</sub>O</sub> , мл	3.96±0.10	-0.30±0.06*	-1.35±0.23* <sup>\$</sup>	-1.80±0.15* <sup>\$</sup>	0.07±0.07* <sup>\$</sup>	0.32±0.06* <sup>\$</sup>
U <sub>Na</sub> V, мкмоль	39±8	169±12*	444±32* <sup>\$</sup>	442±33* <sup>\$</sup>	40±9 <sup>ns</sup> <sup>\$</sup>	26±4 <sup>ns</sup> <sup>\$</sup>
U <sub>K</sub> V, мкмоль	25±3	40±3*	95±11* <sup>\$</sup>	88±9* <sup>\$</sup>	31±4 <sup>ns</sup> <sup>\$</sup>	17±1* <sup>\$</sup>
U <sub>Mg</sub> V, мкмоль	1.1±0.2	1.4±0.3 <sup>ns</sup>	3.1±1* <sup>\$</sup>	4.7±0.5* <sup>\$</sup>	2.4±0.4* <sup>Ns</sup>	1.4±0.2 <sup>ns</sup> <sup>Ns</sup>
U <sub>osm</sub> V, мКОСМ	386±28	612±33*	1386±81* <sup>\$</sup>	1201±78* <sup>\$</sup>	416±40 <sup>ns</sup> <sup>\$</sup>	295±21* <sup>\$</sup>

Примечание. Достоверность отличий по сравнению с водной нагрузкой: \* p<0.05, <sup>ns</sup> – недостоверно; по сравнению с АВТ: <sup>\$</sup> p<0.05, <sup>Ns</sup> – недостоверно.

<sup>+</sup>Все данные рассчитаны за период 120 мин на 100 г массы тела животного.

V, % – выведение мочи в % от объема введенной воды в желудок.

#### Исследование механизма влияния АВТ и его аналогов на транспорт воды и ионов в почке млекопитающих.

*Исследование роли V<sub>1</sub>- и V<sub>2</sub>-рецепторов в реализации эффектов АВТ и 1dАВТ на выделение ионов натрия и воды почкой.* С целью исследования роли стимуляции разных типов рецепторов вазопрессина в натрийуретическом эффекте АВТ животным внутрибрюшинно инъецировали антагонист V<sub>1</sub>- или V<sub>2</sub>-рецепторов и вслед за этим на фоне водной нагрузки внутримышечно вводили 0.05 нмоль АВТ на 100 г массы тела. Мочеотделение возрастает как после введения воды в желудок, так и после инъекции АВТ. В основе роста диуреза после введения воды лежит повышение экскреции осмотически свободной воды, а увеличение мочеотделения после инъекции АВТ коррелирует с увеличением экскреции ионов натрия. Антагонист V<sub>1</sub>- рецепторов устраняет способность

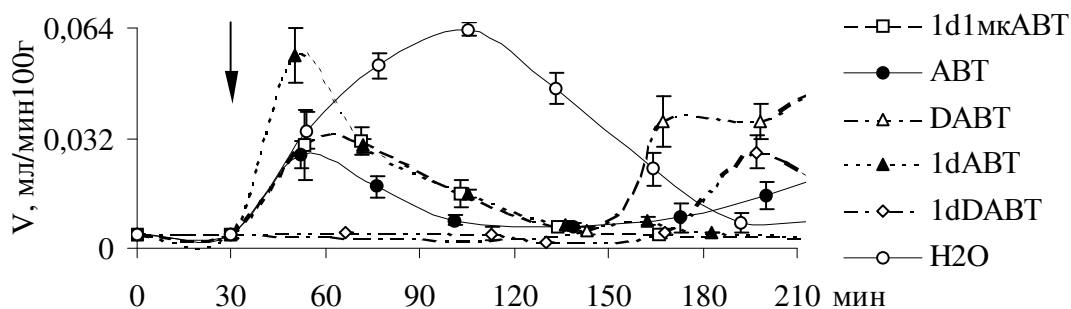


Рис. 6. Динамика мочеотделения у крыс после введения воды в желудок и инъекции 0.05 нмоль АВТ или аналогов на 100 г массы тела.

По оси абсцисс – время в мин; по оси ординат – диурез ( $V$  в мл/мин·100 г массы тела). Стрелка – введение 5 мл воды на 100 г массы тела зондом в желудок и инъекция в мышцу 0.05 нмоль АВТ или аналогов на 100 г массы тела.

АВТ усиливать диурез из-за снижения натрийуретической реакции. Антагонист  $V_2$ -рецепторов уменьшает эффект АВТ на реабсорбцию воды, в результате на смену повышенной реабсорбции воды происходит экскреция осмотически свободной воды и усиливается водный диурез (рис. 7).

В другой серии опытов антагонист  $V_1$ - или  $V_2$ -рецепторов вводили зондом в желудок и вслед за этим крысам внутримышечно инъецировали 0.05 нмоль 1dАВТ на 100 г массы тела. После введения антагониста  $V_1$ -рецепторов не происходит видимых изменений экскреции мочи почкой крыс. Введение антагониста  $V_2$ -рецепторов вызывало увеличение мочеотделения, что было связано с устранением влияния эндогенного АВП на реабсорбцию воды. Пик диуреза, наблюдающийся в течение первого часа после инъекции 1dАВТ и обусловленный натрийурезом, полностью снимался при введении антагониста  $V_1$ -рецепторов.

Д.Ю. Мордвинцевым (Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук) осуществлено компьютерное моделирование  $V_{1a}$ -,  $V_{1b}$ - и  $V_2$ -рецепторов и даны расчеты энергии взаимодействия исследованных нами лигандов с этими рецепторами. Нами эти данные сопоставлены с действием пептидов на выделение воды и ионов почкой *in vivo*. Сравнение влияния АВТ и его аналогов в дозе 0.0001 нмоль на 100 г массы тела на реабсорбцию почкой осмотически

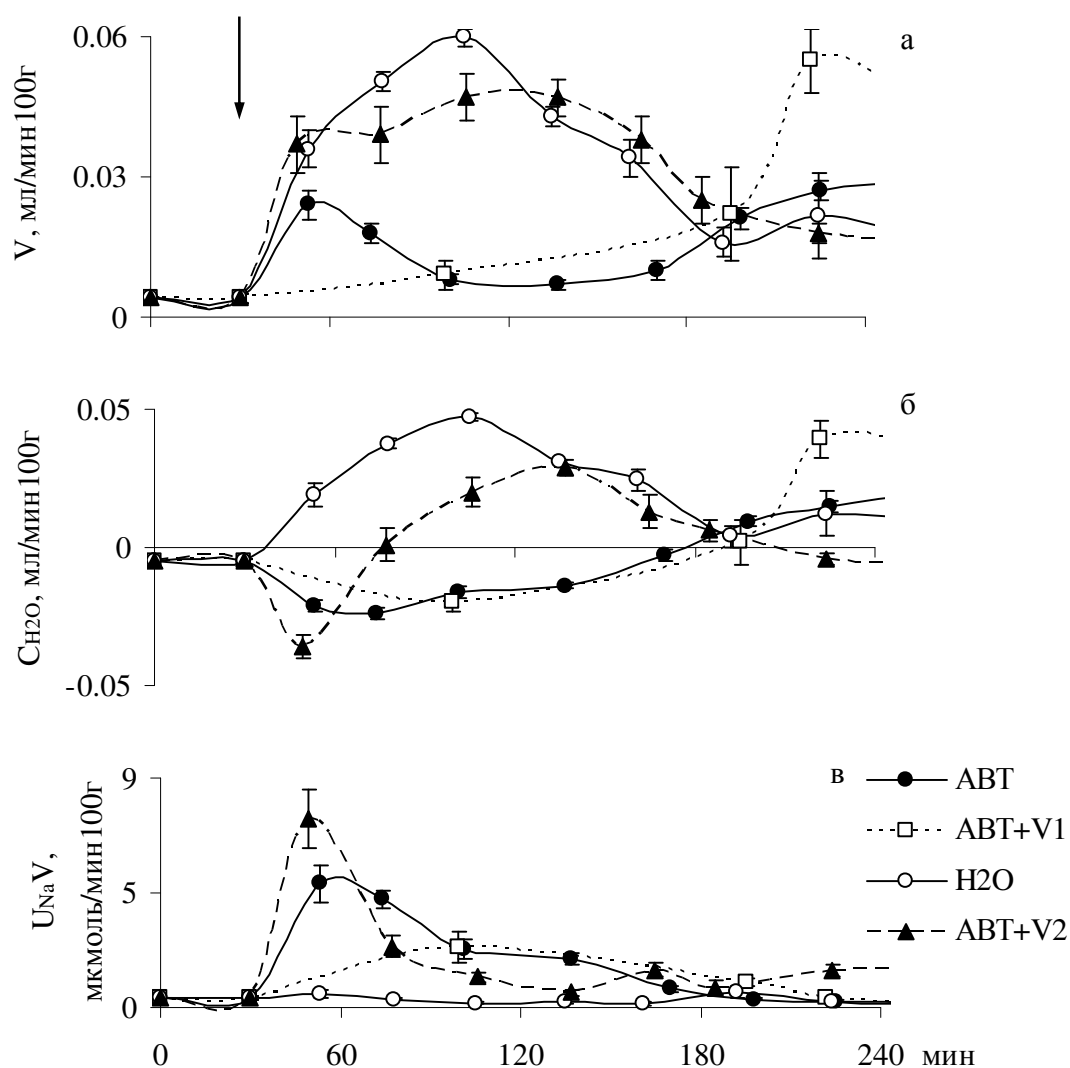


Рис. 7. Динамика мочеотделения у крыс после инъекции 0.05 нмоль АВТ и 130 мкг антагониста  $V_1$ - или  $V_2$ -рецепторов на 100 г массы тела на фоне водной нагрузки.

По оси абсцисс – время в мин; по оси ординат – (а) диурез ( $V$  в мл/мин·100 г массы тела), (б) клиренс осмотически свободной воды ( $C_{H_2O}$  в мл/мин·100 г массы тела), (в) экскреция ионов натрия с мочой ( $U_{Na}V$  в мкмоль/мин·100 г массы тела). Стрелка – введение в желудок воды в объеме 5 мл на 100 г массы тела, одновременная инъекция в мышцу 0.05 нмоль АВТ и внутрибрюшинное введение 130 мкг антагониста  $V_1$ - или  $V_2$ -рецепторов на 100 г массы тела.

свободной воды после введения водной нагрузки и энергии их взаимодействия с V-рецепторами выявило корреляцию ( $r=0.772$ ,  $p<0.05$ ) при взаимодействии различных пептидов с V<sub>2</sub>-рецептором (рис. 8). Для V<sub>1a</sub>- и V<sub>1b</sub>-рецепторов такой зависимости не обнаружено ( $r=0.374$ ,  $p>0.05$  и  $r=0.628$ ,  $p>0.05$ , соответственно). Также была исследована зависимость между энергией взаимодействия пептидов с V<sub>2</sub>-рецептором и дозой, необходимой для снижения экскреции осмотически свободной воды на 50 % после введения животным водной нагрузки. Очевидно, что необходимы различные количества аналогов гормонов в зависимости от аффинности лигандов к рецептору. Исключительно высокая корреляция ( $r=0.974$ ,  $p<0.05$ ) выявлена при сопоставлении реабсорбции осмотически свободной воды и энергии взаимодействия с V<sub>2</sub>-рецептором АВТ, DАВТ, dDАВТ и dDАВП.

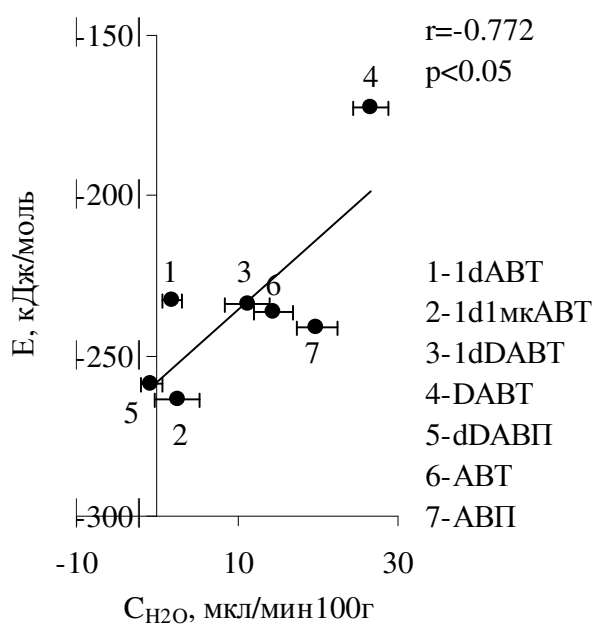


Рис. 8. Зависимость между клиренсом осмотически свободной воды после инъекции 0.0001 нмоль пептидов на 100 г массы тела на фоне водной нагрузки и энергией взаимодействия с V<sub>2</sub>-рецептором.

По оси абсцисс – клиренс осмотически свободной воды ( $C_{H_2O}$  в мкл/мин·100 г массы тела); по оси ординат – энергия взаимодействия с V<sub>2</sub>-рецептором ( $E$  в кДж/моль).

*Исследование роли ПГЕ<sub>2</sub>, атриопептида, цАМФ, цГМФ в реализации эффекта АВТ и его аналогов.* Экспериментально была проанализирована возможность секреции ПГЕ<sub>2</sub> в ответ на инъекцию АВТ и его аналогов. Уровень выведения ПГЕ<sub>2</sub> практически одинаков у животных из группы контроля и после введения воды. После инъекции пептидов с

натрийуретической активностью (0.05 нмоль на 100 г массы тела АВТ и 1d1мкАВТ, 0.005-0.05 нмоль на 100 г массы тела 1dАВТ) выявлена положительная корреляция ( $r=0.356$ ,  $p<0.05$ ) между выведением ПГЕ<sub>2</sub> и экскрецией ионов натрия (рис. 9).

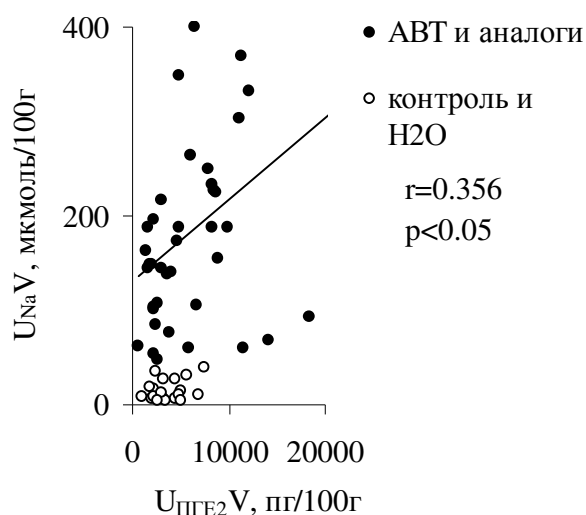


Рис. 9. Зависимость между выведением ПГЕ<sub>2</sub> и экскрецией ионов натрия почкой крыс после инъекции АВТ и его аналогов. По оси абсцисс – экскреция ПГЕ<sub>2</sub> ( $U_{\text{ПГЕ}_2V}$  в пг/100 г массы тела за 120 мин); по оси ординат – экскреция ионов натрия ( $U_{\text{Na}V}$  в мкмоль/100 г массы тела за 120 мин).

Введение неселективного ингибитора циклооксигеназы диклофенака натрия за 45 мин до инъекции 1dАВТ приводит к снижению выведения с мочой ПГЕ<sub>2</sub> до уровня контроля, уменьшению реабсорбции осмотически свободной воды и экскреции ионов натрия (табл. 2).

Увеличение экскреции натрия могло быть следствием усиления секреции одного из натрийуретических гормонов под влиянием аналогов АВТ. Для проверки возможности стимуляции секреции атриопептида в ответ на введение АВТ или 1dАВТ с его последующим влиянием на выделение ионов натрия была изучена концентрация proANP(1-98) в сыворотке крови после инъекции 0.05 нмоль на 100 г массы тела АВТ и 1dАВТ (табл. 3). Концентрация proANP(1-98) в сыворотке крови достоверно не изменялась, как и после введения 5 % водной нагрузки или в первые 10-30 мин после инъекции 0.05 нмоль АВТ на 100 г массы тела. Следовательно, натрийуретическое действие АВТ и 1dАВТ не связано с усилением секреции атриопептида.



Таблица 2.

Показатели деятельности почки крыс после инъекции 0.05 нмоль 1dABT и 0.5 мг диклофенака натрия на 100 г массы тела.

Параметры <sup>+</sup>	Контроль (n=19)	1dABT 0.05 нмоль (n=10)	Диклофенак натрия 0.5 мг + через 45 мин 1dABT 0.05 нмоль (n=10)
V, мл	0.16±0.03	1.33±0.20*	0.51±0.10* <sup>\$</sup>
C <sub>Cr</sub> , мл/мин	0.18±0.02	0.40±0.05*	0.34±0.03* <sup>Ns</sup>
C <sub>H2O</sub> , мл	-0.4±0.1	-1.8±0.1*	-1.3±0.1* <sup>\$</sup>
C <sub>Osm</sub> , мл	0.5±0.1	3.1±0.3*	1.9±0.2* <sup>\$</sup>
C <sub>Na</sub> , мл	0.11±0.03	2.25±0.30*	0.91±0.13* <sup>\$</sup>
C <sup>Na</sup> <sub>H2O</sub> , мл	0.05±0.02	-0.92±0.11*	-0.29±0.07* <sup>\$</sup>
U <sub>Na</sub> V, мкмоль	15±4	311±41*	125±18* <sup>\$</sup>
U <sub>K</sub> V, мкмоль	14±1	66±7*	87±9* <sup>Ns</sup>
U <sub>Mg</sub> V, мкмоль	2.7±0.4	6.7±1.1*	2.6±0.6 <sup>ns\$</sup>
U <sub>Osm</sub> V, мкосм	159±25	938±94*	576±67* <sup>\$</sup>
U <sub>ПГЕ2</sub> V, нг	3.3±0.4	9.4±1.6*	2.7±0.5 <sup>ns\$</sup>

Примечание. Достоверность отличий по сравнению с контролем: \* p<0.05, <sup>ns</sup> – недостоверно; по сравнению с 1dABT: <sup>\$</sup> p<0.05, <sup>Ns</sup> – недостоверно.

<sup>+</sup>Все данные рассчитаны за период 120 мин на 100 г массы тела животного (за исключением C<sub>Cr</sub>).

С целью выяснения роли различных вторичных мессенджеров в реализации эффектов 1dABT, исследовали экскрецию почкой цАМФ и цГМФ. Сопоставление реабсорбции осмотически свободной воды и выделения с мочой цАМФ (рис. 10а) после инъекции 0.005-0.05 нмоль 1dABT на 100 г массы тела выявило их положительную корреляцию (r=0.652, p<0.01). В ответ на инъекцию 1dABT выявлена корреляционная связь (r=0.509, p<0.05) между выделением натрия почкой и цГМФ (рис. 10б). Можно думать, что увеличение реабсорбции осмотически свободной воды включает участие цАМФ, а повышение экскреции натрия – цГМФ.

Таблица 3.

Динамика концентрации proANP(1-98) в сыворотке крови после инъекции 0.05 нмоль АВТ или 1dABT на 100 г массы тела.

Время после инъекции, мин	Концентрация proANP(1-98) в крови, пмоль/мл	
	АВТ	1dABT
0 мин	3.8±0.3 (22)	3.8±0.3 (22)
10 мин	3.0±0.2 (10) <sup>NS</sup>	3.6±0.3 (10) <sup>NS</sup>
20 мин	3.0±0.3 (10) <sup>NS</sup>	4.5±0.4 (20) <sup>NS</sup>
30 мин	3.7±0.5 (10) <sup>NS</sup>	4.1±0.3 (10) <sup>NS</sup>
60 мин	-	3.1±0.4 (10) <sup>NS</sup>

Примечание. Достоверность по отношению к исходному уровню концентрации: <sup>NS</sup> – недостоверно. В скобках – количество животных.

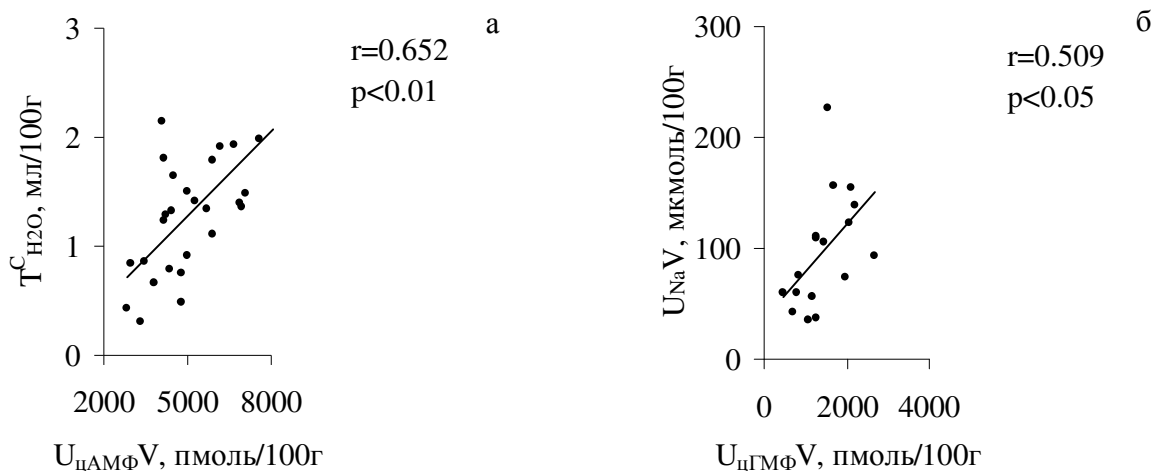


Рис. 10. Корреляция между выведением цАМФ и реабсорбцией осмотически свободной воды, выведением цГМФ и экскрецией ионов натрия после инъекции 0.005-0.05 нмоль 1dABT на 100 г массы тела.

По оси абсцисс – (а) экскреция цАМФ ( $U_{цАМФ}V$  в пмоль/100 г массы тела за 120 мин), (б) экскреция цГМФ ( $U_{цГМФ}V$  в пмоль/100 г массы тела за 120 мин); по оси ординат – (а) реабсорбция осмотически свободной воды ( $T^C_{H_2O}$  в мл/100 г массы тела за 120 мин), (б) экскреция ионов натрия ( $U_{Na}V$  в мкмоль/ 100 г массы тела за 120 мин).

### Сопоставление особенностей действия фуросемида и аналогов АВТ.

Для исследования локуса натрийуретического действия 1dABT в нефроне было сопоставлено его влияние с действием фуросемида. С этой целью проведены эксперименты с одновременным введением обоих веществ. Экскреция натрия за 2 ч после инъекции 1 мг на 100 г массы тела фуросемида и 0.05 нмоль на 100 г массы тела 1dABT была сходна:  $364 \pm 34$  мкмоль/100 г массы тела и  $318 \pm 24$  мкмоль/100 г массы тела, соответственно ( $p > 0.05$ ). Основной механизм действия фуросемида – инактивация  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспортера с люминальной стороны мембран клеток толстого восходящего отдела петли Генле. Так как совместное введение этих веществ не добавило количества натрия, экскретируемого с мочой ( $401 \pm 65$  мкмоль/100 г массы тела за 2 ч,  $p > 0.05$ ), местом действия 1dABT, по-видимому, является толстый восходящий отдел петли Генле.

Для оценки силы натрийуретического действия 1d1мкABT и 1dABT их влияние на почку крыс было сопоставлено с действием фуросемида. Для расчета количества молей экскретируемого натрия на моль введенного пептида или фуросемида ( $M_{\text{Na}}^x$ ) была разработана следующая формула:  $M_{\text{Na}}^x = U_{\text{Na}} V / T_x$ , где  $U_{\text{Na}} V$  – количество выделенного почкой натрия за время действия вещества «X» ( $T_x$  – инъецированное количество этого вещества). Это вещество частично разрушается, выделяется разными органами, но эффект того количества, которое действует в почке, приводит к увеличению экскреции натрия. В случае инъекции 0.5 мг фуросемида на 1 молекулу почка реагирует экскрецией 141 иона  $\text{Na}^+$ , на 1 молекулу введенного 1d1мкABT (0.05 мкг на фоне водной нагрузки) – 8220000 этих ионов. Пептид оказывается эффективнее фуросемида, одного из наиболее сильных современных салуретиков, почти в 60000 раз. Пептида инъецировано 0.05 нмоль, фуросемида – 1.51 мкмоль, т.е. для получения сопоставимого действия необходимо инъецировать более чем в 30000 раз больше молекул фуросемида. При аналогичных расчетах 1dABT (0.05 нмоль) оказывается эффективнее фуросемида (1.0 мг) более чем в 50000 раз. Эффект пептидов длится дольше, потому суммарный результат еще выше. Принципиальным физиологическим отличием реакции почки является возрастание реабсорбции осмотически свободной воды на максимуме диуреза после введения 1d1мкABT ( $22.6 \pm 1.8$  мкл/мин·100 г массы тела) или 1dABT ( $21.5 \pm 1.1$  мкл/мин·100 г

массы тела) и отсутствие такого эффекта после введения фуросемида ( $-8.0 \pm 2.8$  мкл/мин·100 г массы тела).

Таким образом, выявлена способность аналогов АВТ снижать реабсорбцию натрия в почке млекопитающих. Натрийуретическое и выраженное пролонгированное антидиуретическое действие оказывают 1dАВТ и 1d1мкАВТ. Натрийуретическое действие АВТ и аналогов сопровождается реабсорбцией воды наряду с увеличением диуреза. В основе этого явления лежит перераспределение реабсорбции внутри нефрона – уменьшение всасывания ионов в толстом восходящем отделе петли Генле и усиление реабсорбции осмотически свободной воды в собирательных трубках. Большой объем осмотически связанной воды, притекающей к месту увеличенной осмотической проницаемости, создает условия для возрастания реабсорбции осмотически свободной воды. Полученные результаты показывают, что соотношение между двумя эффектами АВТ и его аналогов определяется, по-видимому, степенью их сродства к  $V_1$ - и  $V_2$ -рецепторам. При селективной блокаде  $V_1$ -рецепторов снижается натрийуретический ответ почки на инъекцию АВТ и 1dАВТ, изменение реабсорбции воды обусловлено влиянием пептидов на  $V_2$ -рецепторы. Натрийуретическое действие АВТ и его аналогов отчасти опосредовано ПГЕ<sub>2</sub> и не связано с секрецией атриопептида. Снижение экскреции осмотически свободной воды при действии АВТ и аналогов на почку включает участие цАМФ, а реабсорбции натрия – цГМФ.

### Выводы

1. В экспериментах на ненаркотизированных самках крыс линии Вистар показано, что инъекция  $5 \cdot 10^{-11}$  М на 100 г массы тела 1-дезамино-аргинин-вазотоцина и 1-дезамино-1-монокарба-аргинин-вазотоцина резко увеличивает экскрецию ионов натрия почкой и повышает реабсорбцию осмотически свободной воды в собирательных трубках.
2. Антагонист  $V_2$ -рецепторов (ОРС-31260, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Япония) устраняет влияние аргинин-вазотоцина и 1-дезамино-аргинин-вазотоцина, связанное с увеличением реабсорбции осмотически свободной воды, а антагонист  $V_1$ -рецепторов (ОРС-21268, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Япония) инактивирует их натрийуретический эффект.

3. Выявлена корреляция между реабсорбцией осмотически свободной воды почкой крыс *in vivo* под влиянием исследованных пептидов (аргинин-вазопрессин, аргинин-вазотоцин, дезамино-D-аргинин-вазопрессин, 1-дезамин-аргинин-вазотоцин, 1-дезамин-1-монокарба-аргинин-вазотоцин, 1-дезамин-D-аргинин-вазотоцин и D-аргинин-вазотоцин) и расчетным значением энергии их взаимодействия с V<sub>2</sub>-рецептором.
4. Экскретируемая фракция осмотически активных веществ после инъекции 5·10<sup>-11</sup> М на 100 г массы тела аргинин-вазотоцина возрастает с 2.6 ± 0.2 % до 11.9 ± 1.2 % (p<0.001). Повышение клиренса осмотически активных веществ коррелирует с увеличением реабсорбции осмотически свободной воды. В механизме этого явления лежит возрастание поступления жидкости в собирательные трубки из-за снижения реабсорбции ионов натрия в толстом восходящем отделе петли Генле.
5. Натрийурез, стимулированный 1-дезамин-аргинин-вазотоцином, коррелирует с повышением экскреции почкой цГМФ и простагландина E<sub>2</sub>.
6. Введение крысам ингибитора циклооксигеназы диклофенака на фоне инъекции 1-дезамин-аргинин-вазотоцина приводит к уменьшению экскреции ионов натрия. Инъекция 5·10<sup>-11</sup> М на 100 г массы тела 1-дезамин-аргинин-вазотоцина не вызывает изменения концентрации атриопептида в сыворотке крови.
7. Натрийуретическое действие 1-дезамин-1-монокарба-аргинин-вазотоцина и 1-дезамин-аргинин-вазотоцина в молярном исчислении более чем в 50000 раз эффективнее высокой дозы фуросемида.

### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

#### **I. Статьи в реферируемых журналах:**

1. Наточин Ю.В., Буравкова Л.Б., Шахматова Е.И., Ларина И.М., Канашкина Т.А., Кротов В.П., Азьмуко А.А., Овчинников М.В., Григорьев А.И. Исследование влияния синтезированных аналогов вазотоцина на выделение воды и ионов почкой крыс и обезьян // ДАН. – 2006. – Т. 406. – № 3. – С. 407-410.
2. Канашкина Т.А., Кузнецова А.А., Шахматова Е.И., Наточин Ю.В. Роль V<sub>1</sub>- и V<sub>2</sub>-рецепторов в механизме физиологического парадокса – увеличение реабсорбции

осмотически свободной воды на фоне повышения диуреза // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2006. – Т. 92. – № 10. – С. 1228-1238.

## **II. Тезисы докладов:**

1. Канашкина Т.А., Шахматова Е.И. Изучение влияния аналогов вазопрессина и вазотоцина на осморегулирующую функцию почки крыс // Всероссийская конференция молодых исследователей “Физиология и медицина”. – Санкт-Петербург. – 2005. – С. 49.
2. Беспалова Ж.Д., Буравкова Л.Б., Доброхотов И.В., Канашкина Т.А., Ларина И.М., Овчинников М.В., Шахматова Е.И., Наточин Ю.В., Григорьев А.И. Синтез и исследование влияния новых аналогов вазотоцина на осморегулирующую функцию почки млекопитающих // II Российский симпозиум по химии и биологии пептидов. – Санкт-Петербург. – 2005. – С. 20.
3. Канашкина Т.А. Изучение влияния аналога аргинин-вазотоцина на экскрецию ионов натрия и воды в почке крыс // Девятая Всероссийская медико-биологическая конференция молодых исследователей “Человек и его здоровье”. – Санкт-Петербург. – 2006. – С. 136-137.