

ФАРМАКОЛОГИЯ ВЫДЕЛИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

НАТРИЙУРЕТИЧЕСКОЕ СВОЙСТВО ЭКСЕНАТИДА: ВЫСОКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ И ЛОКАЛИЗАЦИЯ ДЕЙСТВИЯ

А. В. Кутина, А. С. Марина, Ю. В. Наточин¹

Инъекция эксенатида самкам крыс линии Вистар вызывала увеличение диуреза, натрийуреза при слабом влиянии на выведение калия почкой. В эквимолярном отношении натрийуретическое действие эксенатида на максимуме реакции в 18500 раз превышало эффект фуросемида. Натрийуретическое и диуретическое действие максимальных доз эксенатида и фуросемида при сочетанном введении суммировалось, что указывает на различие механизмов их действия в нефроне. Эксенатид, вероятно, уменьшает реабсорбцию ионов натрия в проксимальном сегменте нефрона. Полученные данные могут быть существенны в оценке клинического использования эксенатида для выведения избытка внеклеточной жидкости при отеках и сохранения калия в организме.

Ключевые слова: эксенатид, почка, фуросемид, натрийурез, диурез

ВВЕДЕНИЕ

В последнее десятилетие показано, что выделение натрия почкой регулируется не только минералокортикоидами, но и пептидами, среди которых предсердный натрийуретический пептид [4, 8, 11], адреномедуллин [6, 10], 1-дезамино-вазотоцин [2, 7]. Увеличение мочеотделения и экскреции натрия наблюдалось при инъекции человеку глюкагоноподобного пептида 1 [5]. Представляло интерес выяснить особенности действия эксенатида, миметика глюкагоноподобного пептида 1, на почку крыс и сопоставить его влияние с эффектом петлевого диуретика фуросемида.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на ненаркотизированных самках крыс линии Вистар с массой тела 180–240 г. Протокол исследования одобрен этическим комитетом ИЭФБ РАН. Эксенатид растворяли физиологическим раствором до концентрации 0,05, 0,15, 0,5, 1,5 или 5 нмоль/мл и вводили внутримышечно в объеме 0,1 мл ($n = 10$ в каждой группе). Фуросемид инъецировали внутримышечно в дозе 3 мкмоль (0,1 мл 1 % раствора) крысам без ($n = 10$) или в сочетании с эксенатидом ($n = 10$). Контролем служили крысы из вивария с внутримышечным введением физиологического раствора в объеме 0,1 мл ($n = 20$). Дозы вводимых препаратов приведены из расчета на 100 г массы тела животных. Крыс помещали в клетки-пеналы с проволочным полом и конусовидным сужением, по которому стекала моча. Сбор мочи проводили в течение 4 ч, каждую

пробу регистрировали отдельно. В конце эксперимента у контрольных крыс осуществляли забор крови из сонной артерии под наркозом этаминал-натрием (0,6 мл смеси 0,75 % этаминал-натрия и 0,37 % хлоралозы). Диурез, экскрецию электролитов, скорость клубочковой фильтрации рассчитывали на 100 г массы тела животного.

Осмоляльность сыворотки крови и мочи определяли криоскопическим методом на микроосмометре 3300 (“Advanced Instruments, Inc.”, США), концентрацию креатинина — кинетическим методом по реакции Яффе на автоматическом биохимическом анализаторе EOS Bravo W (Италия) с применением реактивов фирмы “Randox”. Исследование концентрации ионов натрия и калия проводили на пламенном фотометре Corning-410 (Великобритания) в воздушно-пропановом пламени, концентрацию ионов магния — в воздушно-ацетиленовом пламени на атомном абсорбционном спектрофотометре Hitachi-508 (Япония). При фотометрии и спектрофотометрии использовали стандарты фирмы “Aldrich Chemical Company Inc.”, США.

Синтез эксенатида был выполнен на кафедре химии природных соединений химического факультета СПбГУ. В работе использован фуросемид (Лазикс, “Авентис Фарма”, Индия). Статистическую обработку осуществляли с использованием программы Statistica 6.0, данные представлены в виде $M \pm m$. Различия показателей по отношению к контролю оценивались по тесту ANOVA и критерию Ньюмена-Кейлса для множественных сравнений, различие $p < 0,05$ рассматривалось как статистически значимое.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение влияния различных доз эксенатида на диурез и выделение ионов натрия почкой показало,

¹ Лаборатория физиологии почки (зав. — акад. РАН Ю. В. Наточин) Учреждение Российской академии наук Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, 194223, Санкт-Петербург, пр. Тореза, 44.

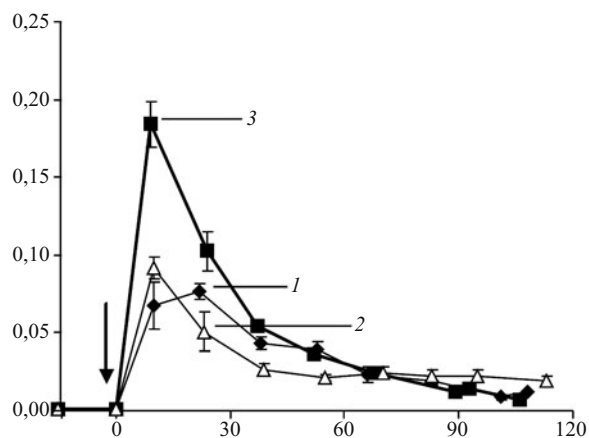


Рис. 1. Влияние инъекции эксенатида и фуросемида на мочеотделение у крыс.

По оси абсцисс — время опыта, мин; по оси ординат — диурез (V), мл/мин на 100 г массы тела. Здесь и на рис. 2, 3 стрелка — момент введения препаратов.

1 — фуросемид, 2 — эксенатид, 3 — фуросемид + эксенатид.

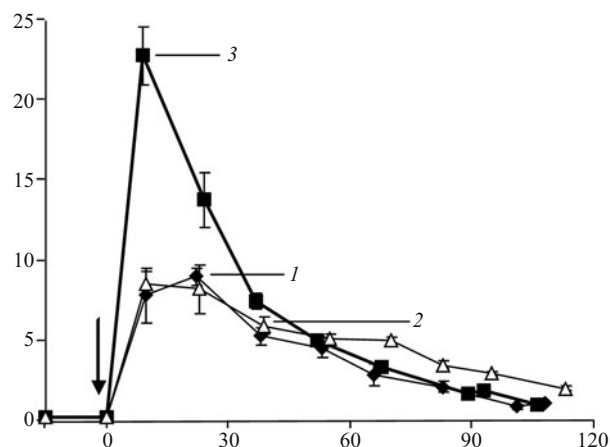


Рис. 2. Экскреция натрия почкой крыс после сочетанного введения фуросемида и эксенатида.

По оси абсцисс — время опыта, мин; по оси ординат — экскреция ионов натрия ($U_{Na}V$), мкмоль/мин на 100 г массы тела. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

что увеличение дозы эксенатида с 0,005 до 0,15 нмоль на 100 г массы тела вызывает повышение диуреза и натрийуреза. При дальнейшем повышении дозы значение этих параметров не растет, а имеется тенденция к снижению (таблица). Инъекция 0,15 нмоль пептида на 100 г массы тела вызывала увеличение диуреза (рис. 1) и натрийуреза (рис. 2), реакция достигала максимума через 15 – 30 мин. Затем постепенно параметры работы почки возвращались к исходному уровню. Мочеотделение на максимуме эффекта возрастало в 61,1 раза с $1,8 \pm 0,4$ ($n = 10$) до 110 ± 20 мкл/мин ($n = 10$, $p < 0,05$). Выделение натрия почкой в этих условиях повышалось в 56,5 раза с $0,23 \pm 0,04$ до 13 ± 2 мкмоль/мин ($p < 0,05$). Для выяснения роли основных механизмов мочеобразования в изменении реакции почек на инъекцию эксенатида была измерена скорость клубочковой фильтрации и рассчитана экскретируемая фракция натрия. На максимуме действия эксенатида скорость клубочковой фильтрации возрастала с $0,35 \pm 0,02$ мл/мин в исходном периоде до $0,43 \pm 0,03$ мл/мин ($p < 0,05$). Увеличение мочеотделения и экскреции натрия связано с уменьшением канальцевой реабсорбции Na^+ с 99,5 % до 81 %

($p < 0,05$), экскретируемая фракция которого растет в 38 раз.

Последующие эксперименты были направлены на выяснение локуса и силы натрийуретического действия эксенатида при сопоставлении с фуросемидом. Для этого была выяснена доза максимального диуретического и натрийуретического эффекта этих веществ у крыс. Для эксенатида она составляет 0,15 нмоль на 100 г массы тела (таблица). Ранее нами было установлено, что максимальный эффект фуросемида у крыс наблюдается в дозе 3 мкмоль на 100 г массы тела [7]. Сопоставление влияния инъекции только эксенатида или фуросемида и сочетанного введения обоих веществ показало, что наблюдается суммация эффектов, диурез и натрийурез достигают невиданно высоких значений (рис. 1, 2). На максимуме эффекта фуросемида почка выделяет вместо обычных $0,5 \pm 0,1$ % профильтровавшегося натрия — 25 ± 2 % ($p < 0,05$), после инъекции эксенатида 19 ± 1 % ($p < 0,05$), а при сочетанном введении — 49 ± 7 % ($p < 0,05$). Иными словами, экскретируется половина профильтровавшегося натрия и осмотически связанной с ним воды.

Влияние разных доз эксенатида на выделение ионов и воды почкой крыс

Доза, нмоль	n	$V^{2ч}$, мл	$U_{Osm}V^{2ч}$, мкосм	$U_{Na}V^{2ч}$, мкмоль	$U_KV^{2ч}$, мкмоль	$U_{Mg}V^{2ч}$, мкмоль	$C_{H_2O}^{2ч}$, мл
0,005	10	$0,19 \pm 0,03$	234 ± 20	28 ± 6	26 ± 5	$1,9 \pm 0,2$	$-0,6 \pm 0,1$
0,015	10	$1,84 \pm 0,10^*$	$639 \pm 21^*$	$198 \pm 10^*$	$34 \pm 3^*$	$7,0 \pm 0,7^*$	$-0,3 \pm 0,1^*$
0,05	10	$1,99 \pm 0,18^*$	$869 \pm 54^*$	$277 \pm 22^*$	$31 \pm 4^*$	$9,0 \pm 0,5^*$	$-0,9 \pm 0,1^*$
0,15	10	$3,25 \pm 0,17^*$	$1267 \pm 66^*$	$502 \pm 25^*$	$27 \pm 2^*$	$12,8 \pm 0,6^*$	$-1,0 \pm 0,1^*$
0,5	10	$3,14 \pm 0,26^*$	$1165 \pm 175^*$	$426 \pm 38^*$	$37 \pm 6^*$	$11,8 \pm 1,0^*$	$-0,8 \pm 0,1$
Контроль	20	$0,21 \pm 0,02$	217 ± 13	26 ± 2	16 ± 2	$2,0 \pm 0,3$	$-0,5 \pm 0,1$

Примечание. Суммарное выведение мочи ($V^{2ч}$), осмотически активных веществ ($U_{Osm}V^{2ч}$), натрия ($U_{Na}V^{2ч}$), калия ($U_KV^{2ч}$), магния ($U_{Mg}V^{2ч}$) и осмотически свободной воды ($C_{H_2O}^{2ч}$) за 2 ч эксперимента в расчете на 100 г массы тела. Дозы пептида приведены на 100 г массы тела. * — значимость различий с контролем ($p < 0,05$), n — число животных в каждой группе.

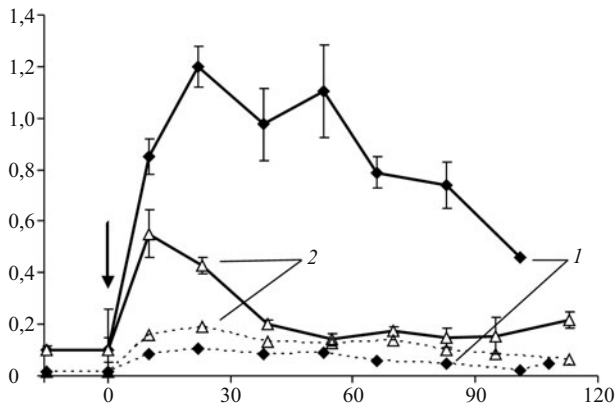


Рис. 3. Влияние введения фуросемида и эксенатида на экскрецию калия и магния почкой крысы.

По оси абсцисс — время опыта, мин; по оси ординат — экскреция ионов калия (U_{KV}), мкмоль/мин на 100 г массы тела (сплошная линия), экскреция ионов магния (U_{MgV}), мкмоль/мин на 100 г массы тела (пунктир). Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

Сопоставление силы натрийуретического эффекта эксенатида и фуросемида по предложенной нами ранее формуле [1] показало, что сила натрийуретического действия эксенатида на максимуме эффекта превосходит влияние фуросемида ~ в 18500 раз. Более того, эксенатид оказывается специфичнее фуросемида в отношении выделения натрия по сравнению с калием. Фуросемид стимулирует натрийурез, калийурез и хлорурез. Таким образом, применение фуросемида связано с значительной потерей калия из организма. Это обусловлено особенностью механизма и локализации эффекта фуросемида, который является блокатором Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ котранспортера в люминальной мембране клеток толстого восходящего отдела петли Генле [9, 12]. В максимальной дозе, примененной в наших экспериментах, фуросемид должен практически полностью прекратить реабсорбцию натрия и калия в толстом восходящем отделе петли Генле, что и происходит, судя по приведенной выше величине экскретируемой фракции натрия. Действие эксенатида в отношении реабсорбции Na^+ весьма специфично. На максимуме его эффекта прирост экскреции Na^+ составляет 475 мкмоль, K^+ — 13 мкмоль, Mg^{2+} — 10,7 мкмоль, реабсорбция осмотически свободной воды возрастает на 0,5 мл, а диурез увеличивается на 3,1 мл. Иная картина в аналогичной ситуации характерна для фуросемида: прирост экскреции Na^+ — 360 мкмоль, K^+ — 68 мкмоль, Mg^{2+} — 4,1 мкмоль, реабсорбция осмотически свободной воды снижается на 0,3 мл, а диурез возрастает на 3,2 мл. Экскреция K^+ выше после инъекции фуросемида по сравнению с эксенатидом, в отношении Mg^{2+} ситуация иная — его выделение сильнее при действии эксенатида (рис. 3).

Натрийуретические эффекты фуросемида и эксенатида суммируются, что позволяет предполагать не только различие механизма, но и локализации действия этих веществ в нефроне. Влияние эксенатида не

связано с реабсорбцией ионов в толстом восходящем отделе петли Генле, т.к. клетки этого участка нефрона полностью инактивированы введенным фуросемидом. Источником такой высокой экскретируемой фракции Na^+ при выключенном толстом восходящем отделе петли Генле может быть только проксимальный сегмент нефрона. Сопоставление данных литературы [3, 9] и представленных выше результатов позволяет предполагать, что эксенатид уменьшает реабсорбцию натрия в проксимальном сегменте нефрона. Однако снижение реабсорбции натрия в условиях введения эксенатида не может рассматриваться как влияние осмотического диуретика, он действует как регуляторный фактор. Учитывая начинающееся достаточно широкое клиническое применение аналогов эксенатида при терапии сахарного диабета (Баета и т.д.), полученные нами данные могут быть существенны в оценке клинического использования эксенатида для выведения избытка внеклеточной жидкости при отеках, когда необходимо сохранение калия в организме. Эта особенность действия эксенатида может быть существенна и в связи с развитием диабетической нефропатии, когда чувствительность почек к лекарственному средству и реакция на него могут быть изменены.

ВЫВОДЫ

1. Эксенатид у крыс увеличивает диурез и натрийурез при слабом влиянии на экскрецию калия почкой.
2. В эквимолярном отношении натрийуретическое действие эксенатида на максимуме реакции в 18500 раз превышает эффект фуросемида.
3. При использовании максимальных доз эксенатида и фуросемида суммируется диуретическое и натрийуретическое действие этих веществ.
4. Снижение реабсорбции натрия при инъекции эксенатида локализовано в проксимальном сегменте нефрона.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 08-04-00610), программ “Ведущие научные школы” (проект НШ-65100.2010.4.) и ОБН РАН. Авторы выражают благодарность М. И. Титову за синтез эксенатида.

ЛИТЕРАТУРА

1. Т. А. Канашкина, Е. И. Шахматова, Ю. В. Наточин, *Бюл. экспер. биол.*, **143**(5), 494 – 496 (2007).
2. Ю. В. Наточин, Л. Б. Буравкова, Е. И. Шахматова и др., *ДАН*, **406**(3), 407 – 410 (2006).
3. L. R. Carraro-Lacroix, G. Malnic, A. C. Girardi, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **297**(6), F1647 – 1655 (2009).
4. M. A. Fifer, C. R. Molina, A. C. Quiroz, et al., *Am. J. Cardiol.*, **65**(3), 211 – 216 (1990).
5. J. P. Gutzwiller, P. Hruz, A. R. Huber, et al., *Digestion*, **73**(2 – 3), 142 – 150 (2006).
6. V. Haditsch, A. Roessler, H. G. Hinghofer-Szalkay, *Physiol. Res.*, **56**(6), 779 – 787 (2007).
7. Т. А. Каравашкина, А. В. Кутина, Е. И. Шахматова, Ю. В. Наточин, *Gen. Com. Endocrinol.*, **170**(3), 460 – 467 (2011).

8. E. R. Levin, D. G. Gardner, W. K. Samson, *N. Engl. J. Med.*, **339**(5), 321 – 328 (1998).
9. M. D. Okusa, D. H. Ellison, *Physiology and pathophysiology of diuretic action*. In: R. J. Alpern and S. C. Hebert (Eds). *Seldin and Giebisch's The Kidney. Physiology and pathophysiology*, 4th Edition. Amsterdam: Elsevier, 2008. P. 1051 – 1094.
10. M. M. Taylor, W. K. Samson, *Microsc. Res. Tech.*, **57**(2), 105 – 109 (2002).
11. W. Wang, C. Li, L. N. Nejsum, H. Li, et al., *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **290**(2), F530 – 541 (2006).
12. K. A. Wargo, W. M. Banta, *Ann. Pharmacother.*, **43**(11), 1836 – 1847 (2009).

Поступила 18.02.11

NATRIURETIC EFFECT OF EXENATIDE: HIGH EFFICACY AND SITE OF ACTION

A. V. Kutina, A. S. Marina, and Yu. V. Natochin

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

Exenatide injection to female Wistar rats induced an increase in diuresis, urinary sodium and mild potassium excretion. The maximum natriuretic effect of exenatide was 18500 times more pronounced compared to that of furosemide in equimolar dose. The natriuretic and diuretic effects after combined administration of maximum doses of exenatide and furosemide were additive, which was indicative of different mechanisms of their action on the nephron. Exenatide probably inhibits sodium reabsorption in renal proximal segment. The data obtained might be essential for assessment of the clinical use of exenatide to excrete extra-cellular fluid excess in cases of edemation and to maintain potassium balance.

Key words: Exenatide, kidney, furosemide, natriuresis, diuresis