

ФАРМАКОЛОГИЯ ВЫДЕЛИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

ВЛИЯНИЕ НОВЫХ АНАЛОГОВ ГОРМОНОВ НЕЙРОГИПОФИЗА НА РЕАБСОРБЦИЮ НАТРИЯ И ВОДЫ В ПОЧКЕ КРЫС

А. В. Кутина¹, А. С. Марина¹, К. В. Зайцева¹, И. И. Елисеев²,
М. И. Титов², Ю. В. Наточин¹

Синтезированы новые аналоги нейрогипофизарных гормонов — оксипрессина, гидрина, глумитоцина, вазотоцина. Инъекция этих пептидов ненаркотизированным крысам показала, что замена концевой глицинамида на β -этаноламин (глицинол) или этиламин в молекуле 1-дезамино-аргинин-вазотоцина приводила к потере натрийуретической, но не антидиуретической активности. У аналогов оксипрессина и гидрина отсутствовали натрийуретическая активность и способность влиять на реабсорбцию воды. Аналог глумитоцина усиливал выведение Na^+ почкой, не влияя на выведение K^+ .

Ключевые слова: нейрогипофизарные гормоны, реабсорбция воды, натрийурез

ВВЕДЕНИЕ

Нонапептидные гормоны, образующиеся в гипоталамической области мозга, играют важную роль в регуляции водно-солевого обмена у животных и человека. Они участвуют в стабилизации объема, концентрации ряда ионов и осмоляльности плазмы крови. У представителей различных классов животных синтезируются аргинин-вазотонин (AVT), ихтиотонин, мезотонин и др. [6, 7, 10, 14], у млекопитающих — вазопрессин и окситонин [13]. Эти пептиды после синтеза в нейронах гипоталамуса поступают в гипофиз и секретируются в кровь [11, 13].

Наиболее распространен у позвоночных среди онапептидов нейрогипофиза AVT [11], у млекопитающих он найден в небольших количествах только в гипофизе [8]. Нейрогипофиз млекопитающих секретирует в кровь аргинин-вазопрессин или лизин-вазопрессин [13], основными органами-мишенями являются почки и кровеносные сосуды. Вазопрессин увеличивает реабсорбцию воды в собирательных трубках почки и повышает артериальное давление [9, 13], в то время как AVT у крыс, как нами ранее впервые было показано, оказывает два эффекта на почку: обладает выраженным антидиуретическим действием и вызывает интенсивный натрийурез [1]. Его аналог 1-дезамино-аргинин-вазотонин (1d-AVT) обладает исключительно сильным натрийуретическим действием [2, 4, 5], что

могло найти применение для усиления экскреции отдельных ионов почкой.

Деградацию гормонов нейрогипофиза осуществляют металлопротеиназы, катализирующие расщепление S-S связи между цистеинами в 1-м и 6-м положениях молекулы и отщепление дипептида с C-конца (арг-гли-NH₂), а дезаминирование цистеина в 1-м положении замедляет деградацию этих пептидов [12, 15]. Дезаминирование аминокислотного остатка в 1-м положении усиливало натрийуретическое действие AVT [2, 4]. Задачей настоящей работы явился синтез новых аналогов 1d-AVT, оксипрессина, гидрина, глумитоцина с целью создания веществ с избирательным влиянием на выведение Na^+ , K^+ и воды почкой крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на самках крыс линии Вистар с массой тела 150 – 220 г в соответствии с международными стандартами по работе с экспериментальными животными, одобрены этическим комитетом ИЭФБ РАН. Аналоги гипофизарных гормонов растворяли в 0,9% растворе NaCl в концентрации от 0,001 до 0,5 нмоль/мл и вводили внутримышечно в объеме 0,1 мл на 100 г массы тела. Выбор дозы основан на результатах наших исследований влияния 1d-AVT на деятельность почки [3, 4]. Животных помещали в клетки-пеналы с проволочным дном, через отверстие которого моча стекала по воронке в пробирку. Выделение мочи регистрировали при спонтанном мочеотделении, измеряли объем мочи, концентрацию в ней Na^+ , K^+ и осмоляльность. Кровь брали по окончании экспериментов из сонной артерии под эфирным наркозом.

Осмоляльность сыворотки крови и мочи определяли криоскопическим методом на микроосмометре

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

² Кафедра химии природных соединений (зав. — проф. А. Г. Шавва), Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Петродворец, 198504, Университетский пр., 26.

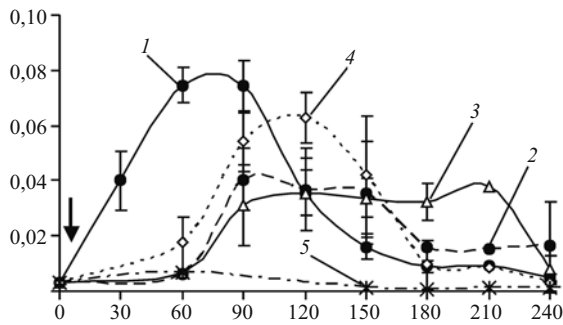


Рис. 1. Влияние аналогов вазотоцина на мочеотделение после водной нагрузки.

Здесь и на рис. 2: по оси абсцисс — время опыта, мин; по оси ординат — диурез (V), мл/мин на 100 г массы тела. Стрелка — введение в желудок 5 мл воды на 100 г массы тела (ВН) и внутримышечная инъекция пептидов в дозе 0,001 нмоль на 100 г массы тела.

1 — ВН, 2 — ВН + 1d-9-Ethylamide-AVT, 3 — ВН + 1d-9-Glycinol-AVT, 4 — ВН + 1d-9-deamido-AVT, 5 — ВН + 1d-AVT.

3300 (“Advanced Instruments, Inc.”, США). Исследование концентрации Na^+ , K^+ в сыворотке крови и в моче проводили на пламенном фотометре Corning-410 (Великобритания) в воздушно-пропановом пламени.

Изучены следующие аналоги пептидов гипофиза (в скобках приведены сокращенные названия): Мра-Тур-Пле-Глн-Асн-Сус-Про-Арг-Гли- NH_2 — 1-дезамин-аргинин-вазотоцин (1d-AVT); Мра-Тур-Пле-Глн-Асн-Сус-Про-Арг-Ethylamide — 1-дезамин-9-этиламин-аргинин-вазотоцин (1d-9-Ethylamide-AVT); Мра-Тур-Пле-Глн-Асн-Сус-Про-Арг-Гли-ол — 1-дезамин-9-глици-

нол-аргинин-вазотоцин (1d-9-Glycinol-AVT); Мра-Тур-Пле-Глн-Асн-Сус-Про-Арг-Гли-ОН — 1-дезамин-9-дезамидо-аргинин-вазотоцин (1d-9-deamido-AVT); Мра-Тур-Пле-Глн-Асн-Сус-Про-Арг-Гли-Гли-Лис-ОН — 1-дезамин-гидрин I (1d-Hydrin I); Мра-Тур-Пле-Глн-Асн-Сус-Про-Лей-Гли- NH_2 — 1-дезамин-3-фенилаланин-окситоцин (1d-3-Phe-OT); Мра-Тур-Пле-Глн-Асн-Сус-Про-Гли-Гли- NH_2 — 1-дезамин-8-глутамил-окситоцин (1d-8-Glu-OT). Мра — меркаптопропионовая кислота.

Аналоги гормонов синтезированы твердофазным методом с использованием следующих аминокислотных производных: Fmoc-Arg-ОН, Fmoc-Arg(Pbf)-ОН, Fmoc-Asn(Trt)-ОН, Fmoc-Cys(Acm)-ОН, Fmoc-Gln(Trt)-ОН, Fmoc-Glu(OtBu)-ОН, Fmoc-Gly-ОН, Fmoc-Ile-ОН, Fmoc-Lys(Boc)-ОН, Fmoc-Pro-ОН, Fmoc-Tyr(tBu)-ОН, β -Мра (Acm)-ОН, Fmoc-Leu-ОН. В качестве конденсирующего средства использовали диизопропилкарбодиимид или бензотриазол-1-ил-окси-трис-пирролидино-фосфоний гексафторфосфат в присутствии оксипентриазола. Снятие со смолы с одновременным удалением защитных групп трет.-бутильного типа проводили с помощью трифторуксусной кислоты в присутствии сквенджеров (вода, триизопропилсилан, этандитиол). Асп-защищенные пептиды обрабатывали раствором йода в водной (80%) уксусной кислоте. 1d-3-Phe-OT и 1d-8-Glu-OT получали на амино-2-хлортритильной смоле, для получения остальных пептидов использовали хлор-2-хлортритильную смолу. 1d-9-Ethylamide-AVT был получен конденсацией пептида Мра-Тур-Пле-Глн-Асн-Сус-Про-Арг-ОН

Влияние синтезированных аналогов пептидов гипофиза на функции почек крыс

Пептид	n	$V^{2ч}$, мл	$U_{\text{Osm}}V^{2ч}$, мкосм	$U_{\text{Na}}V^{2ч}$, мкмоль	$U_{\text{K}}V^{2ч}$, мкмоль	$C_{\text{H}_2\text{O}}^{2ч}$, мл
<i>Инъекция 0,05 нмоль пептида на 100 г массы тела в мышцу</i>						
1d-9-Ethylamide-AVT	15	0,13 ± 0,05	195 ± 34	12 ± 10	37 ± 12	-0,5 ± 0,1
1d-9-Glycinol-AVT	15	0,11 ± 0,04	178 ± 56	11 ± 6	39 ± 19	-0,5 ± 0,2
1d-9-deamido-AVT	15	0,13 ± 0,07	209 ± 114	13 ± 12	32 ± 2	-0,6 ± 0,3
1d-Hydrin I'	15	0,16 ± 0,05	210 ± 62	7 ± 7	28 ± 15	-0,6 ± 0,2
1d-3-Phe-OT	15	0,21 ± 0,18	242 ± 112	24 ± 23	33 ± 19	-0,6 ± 0,3
1d-8-Glu-OT	15	0,41 ± 0,26	420 ± 221	54 ± 36*	51 ± 41	-1,0 ± 0,5
1d-AVT	10	1,56 ± 0,37*	1197 ± 216*	441 ± 81*	135 ± 25*	-2,5 ± 0,4*
Контроль	22	0,23 ± 0,11	188 ± 90	5 ± 5	25 ± 14	-0,4 ± 0,3
<i>Водная нагрузка (внутри) + инъекция 0,001 нмоль пептида на 100 г массы тела в мышцу</i>						
1d-9-Ethylamide-AVT	5	2,41 ± 1,16*	309 ± 34	13 ± 8	19 ± 17	1,4 ± 1,1*
1d-9-Glycinol-AVT	5	2,22 ± 0,82*	315 ± 78	13 ± 13	28 ± 18	1,2 ± 0,9*
1d-9-deamido-AVT	5	4,03 ± 0,38	304 ± 45	5 ± 3	30 ± 15	3,0 ± 0,3
1d-Hydrin I'	5	4,11 ± 0,21	302 ± 101	9 ± 6	43 ± 35	3,1 ± 0,3
1d-3-Phe-OT	5	4,10 ± 0,43	334 ± 78	8 ± 3	38 ± 11	3,0 ± 0,5
1d-8-Glu-OT	5	4,06 ± 0,90	279 ± 104	8 ± 7	35 ± 20	3,1 ± 0,7
1d-AVT	15	0,14 ± 0,09*	199 ± 88	20 ± 19	19 ± 12	-0,5 ± 0,2*
Водная нагрузка	22	4,84 ± 0,72	366 ± 129	15 ± 9	42 ± 16	3,6 ± 0,8

Примечание. Суммарное выведение мочи ($V^{2ч}$), осмотически активных веществ ($U_{\text{Osm}}V^{2ч}$), натрия ($U_{\text{Na}}V^{2ч}$), калия ($U_{\text{K}}V^{2ч}$) и осмотически свободной воды ($C_{\text{H}_2\text{O}}^{2ч}$) за 2 ч эксперимента рассчитано на 100 г массы тела. * — значимость различий с соответствующим контролем ($p < 0,05$), n — число животных в группе.

с этиламинем, а 1d-9-Glycinol-AVT — восстановлением 1d-9-deamido-AVT боргидридом натрия (NaBH_4) в водном тетрагидрофуране. Очистку пептидов проводили с помощью препаративной обращеннофазной жидкостной хроматографии. Чистоту полученных после лиофилизации продуктов (95%+) проверяли аналитической высокоэффективной жидкостной хроматографией, структуру подтверждали масс-спектрами, содержание основного вещества определяли с помощью элементного (C, N, H) анализа. 1d-AVT синтезирован ЗАО “Синтез пептидов”.

Статистическую обработку осуществляли с использованием программы Statistica 6,0. Все данные представлены в виде $M \pm \sigma$. Значимость межгрупповых различий оценивали по тесту ANOVA Крускала-Уоллиса и критерию Данна для множественных сравнений (при $p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эксперименты с инъекцией аналогов нейрогипофизарных пептидов выполнены на ненаркотизованных животных. Одной группе крыс пептиды инъецировали в исходном состоянии водного баланса, в котором они находились в виварии, в другой группе — в начале опыта крысам через зонд в желудок вводили 5 мл воды на 100 г массы тела, а затем на фоне водного диуреза оценивали антидиуретическое действие аналогов. В первом случае создавались условия для оценки влияния гормона на реабсорбцию Na^+ в канальцах почек, во втором — на реабсорбцию осмотически свободной воды.

После введения воды в желудок возрастал диурез, достигая максимума через 50–60 мин, затем он постепенно снижался в течение последующих 2 ч (рис. 1). В основе увеличения диуреза лежало повышение экскреции осмотически свободной воды (таблица). Для изучения действия аналогов на выведение воды крысам инъецировали 1 пмоль пептида на 100 г массы тела. Ряд аналогов 1d-AVT, 1d-9-Ethylamide-AVT, 1d-9-Glycinol-AVT увеличивал осмотическую проницаемость собирательных трубок, снижал водный диурез (рис. 1) и экскрецию осмотически свободной воды (таблица). В отличие от 1d-AVT, который препятствовал развитию водного диуреза на протяжении 4 ч после водной нагрузки, при инъекции его аналогов выведение воды начиналось уже через 1–1,5 ч, но происходило с низкой скоростью по сравнению с контролем и растягивалось на 3 ч (рис. 1). Ряд пептидов (1d-Hydrin I⁺, 1d-3-Phe-OT, 1d-8-Glu-OT) практически не влиял на реабсорбцию осмотически свободной воды в почке (рис. 2, таблица).

Для изучения влияния пептидов на выведение почкой ионов по разработанной нами схеме эксперимента [3] аналоги инъецировали в дозе 0,05 нмоль на 100 г массы тела без водной нагрузки. Инъекция 1d-AVT увеличивала экскрецию Na^+ в 88,2 раза, K^+ в 5,4 раза (таблица). Аналоги с заменой аминокислотного остат-

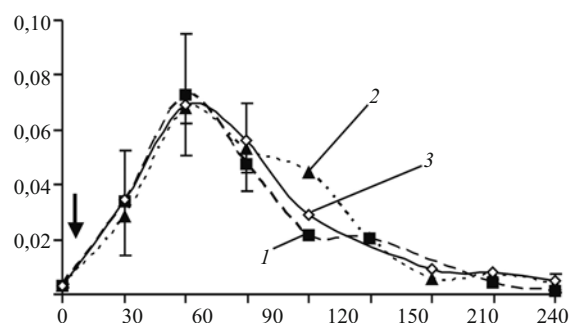


Рис. 2. Влияние аналогов гидрина, оксипрессина и глумитоцина на мочеотделение после водной нагрузки.

Обозначения те же, что на рис. 1.

ка в 9-м положении (1d-9-Ethylamide-AVT, 1d-9-Glycinol-AVT и 1d-9-deamido-AVT) потеряли натрийуретическую активность и не изменяли экскрецию калия почкой (таблица).

Дезаминированные аналоги гидрина, оксипрессина не влияли на выведение Na^+ и K^+ почкой крыс. Аналог глумитоцина (1d-8-Glu-OT) усилил экскрецию Na^+ почкой, но его эффект был слабее действия 1d-AVT (таблица). Следует отметить селективность натрийуретической активности 1d-8-Glu-OT, поскольку он не изменил выведения K^+ почкой крыс.

Проведенные исследования дали ответ на ряд вопросов о соотношении химической структуры аналогов пептидов гипофиза и влияния на транспорт воды, Na^+ , K^+ в канальцах почки. Установлено, что 1d-9-Ethylamide-AVT, 1d-9-Glycinol-AVT обладают способностью уменьшать экскрецию осмотически свободной воды. Это можно интерпретировать как проявление стимуляции аналогом V_2 -рецепторов базальной плазматической мембраны клеток собирательных трубок. Другая активность нонапептидов, предположительно связанная с влиянием на V_1 -рецепторы, находит физиологическое выражение в блокаде реабсорбции Na^+ [3]. Она ярко выражена у AVT [1], 1d-AVT [3] и 1d-8-Glu-OT (таблица), но практически отсутствует у других аналогов. Полученные результаты существенны для характеристики химической структуры аналогов нейрогормонов, определяющей возможность взаимодействия с различными типами V-рецепторов. Замена концевого глицинамида в молекуле AVT влияет на его связывание с V-рецепторами. Полученные результаты представляют интерес для синтеза соединений с избирательным действием на экскрецию почкой Na^+ , K^+ и воды.

ВЫВОДЫ

1. Новый аналог вазотоцина 1d-8-Glu-OT селективно усиливает экскрецию Na^+ , но не изменяет выделение K^+ почкой.

2. 1d-9-Glycinol-AVT, 1d-9-Ethylamide-AVT увеличивают реабсорбцию воды почкой крыс, не изменяя экскреции Na^+ и K^+ .

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 08 – 04 – 00610), программы “Ведущие научные школы” (проект НШ-4414.2008.4.) и программы ОБН РАН.

ЛИТЕРАТУРА

1. Цзе Гао, Ю. В. Наточин, *Ж. эвол. биох. и физиол.*, **40**(2), 168 – 172 (2004).
2. Ю. В. Наточин, Л. Б. Буравкова, Е. И. Шахматова и др., *ДАН*, **406**(3), 407 – 410 (2006).
3. Ю. В. Наточин, Т. А. Канашкина, Д. Ю. Мордвинцев, Е. И. Шахматова, *Росс. физиол. ж. И. М. Сеченова*, **93**(6), 625 – 634 (2007).
4. Ю. В. Наточин, Т. А. Канашкина, Е. И. Шахматова и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **71**(2), 32 – 35 (2008).
5. Ю. В. Наточин, Т. А. Канашкина, Е. И. Шахматова и др., Патент № 2342949 (2009).
6. R. Acher, J. Chauvet, M. T. Chauvet, Y. Rouille, *J. Exp. Zool.*, **284**(5), 475 – 484 (1999).
7. R. Acher, J. Chauvet, Y. Rouille, *Biol. Cell.*, **89**(5 – 6), 283 – 291 (1997).
8. C. Badiu, M. Coculescu, M. Moller, *Cel. Tissue Res.*, **295**(2), 225 – 229 (1999).
9. L. Bankir, *Cardiovasc. Res.*, **51**(3), 372 – 390 (2001).
10. Z. Barka-Dahane, M. Bendjelloul, J. Estabel, J. M. Exbrayat, *Histol. Histopathol.*, **25**(2), 159 – 175 (2010).
11. P. J. Bentley, *Endocrines and osmoregulation. A comparative account in vertebrates*, 2nd ed., V. 1, Springer, Berlin (2002).
12. J. A. Garcia-Horsman, P. T. Mdnistu, J. I. Vendldinen, *Neuropeptides*, **41**(1), 1 – 24 (2007).
13. L. Kovbch, B. Lichardus, *Vasopressin: disturbed secretion and its effects*, Kluwer, Dordrecht (1989).
14. Y. Ogushi, D. Kitagawa, T. Hasegawa, *J. Exp. Biol.*, **213**(2), 288 – 294 (2010).
15. M. G. Wallis, M. F. Lankford, S. R. Keller, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **293**(4), 1092 – 1102 (2007).

Поступила 16.03.10

INFLUENCE OF NEW NEUROHYPOPHYSEAL HORMONE ANALOGS ON SODIUM AND WATER REABSORPTION IN RAT KIDNEY

A. V. Kutina¹, A. S. Marina¹, K. V. Zaitseva¹, I. I. Eliseev², M. I. Titov², and Yu. V. Natochin¹

¹ Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Thorez Prospect 44, St. Petersburg, 194223, Russia

² St. Petersburg State University, Universitetskii pr. 26, St. Petersburg, Petrodvorets, 198504, Russia

New analogs of some neurohypophyseal hormones (oxypressin, hydrin, glutitocin, vasotocin) have been synthesized. Experiments with injection of these peptides to rats showed that substitution of C-terminal glycinamide on β -ethanolamine (glycinol) or ethylamine in 1-deamino-arginine vasotocin resulted in loss of natriuretic but not antidiuretic activity. Analogs of oxypressin and hydrin exhibited neither natriuretic activity nor ability to affect water reabsorption. Glutitocin analog induced renal sodium ion excretion and did not influence potassium ion excretion.

Key words: Neurohypophyseal hormones, water reabsorption, natriuresis