

# ФАРМАКОЛОГИЯ ВЫДЕЛИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

## ВЛИЯНИЕ АНАЛОГОВ ВАЗОТОЦИНА НА ВЫВЕДЕНИЕ ИОНОВ $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ , $\text{Mg}^{2+}$ ПОЧКОЙ КРЫС

Ю. В. Наточин<sup>1</sup>, Т. А. Канашкина<sup>1</sup>, Е. И. Шахматова<sup>1</sup>, Ж. Д. Беспалова<sup>2</sup>,  
Д. Ю. Мордвинцев<sup>3</sup>, Я. Л. Поляк<sup>3</sup>

В опытах на крысах установлено, что внутримышечная инъекция аргинин-вазотоцина, 1-дезамино-аргинин-вазотоцина (1dAVT) или 1-дезамино-1-монокарба-аргинин-вазотоцина (1d1mcAVT) в дозе  $5 \cdot 10^{-11}$  моль на 100 г массы тела увеличивает экскрецию почкой ионов  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  и  $\text{Mg}^{2+}$ . Антагонист  $V_1$ -рецепторов (OPC-21268) снижает влияние 1dAVT на выделение исследованных ионов почкой. Построена модель  $V_{1b}$ -рецептора и показана зависимость между энергией взаимодействия  $V_{1b}$ -рецептора и силой натрийуретического эффекта исследованных аналогов вазотоцина.

**Ключевые слова:** аргинин-вазотоцин, почка, натрийурез, калий, магний,  $V_{1b}$ -рецептор, антагонист  $V_1$ -рецепторов

### ВВЕДЕНИЕ

Аргинин-вазотоцин (AVT) увеличивает всасывание воды в почке у представителей большинства классов наземных позвоночных. У млекопитающих эту функцию выполняет аргинин-вазопрессин (AVP) [9]. Эти гормоны в почке увеличивают проницаемость эпителия собирательных трубок для воды при стимуляции  $V_2$ -рецепторов и активируют встраивание аквапорина 2 в мембрану клеток собирательных трубок [5, 6, 8]. AVP усиливает реабсорбцию  $\text{Na}^+$  в почке [7], AVT, напротив, уменьшает ее и вызывает натрийурез [1]. В фармакологии почки и клинической практике при лечении отеков и гипернатриемии поиск средств воздействия на реабсорбцию натрия остается одним из наиболее актуальных [3, 4]. Представляло интерес исследовать действие новых аналогов AVT на выделение почкой ряда катионов (натрий, калий, магний), изучить роль  $V_1$ -рецепторов в изменении выделения катионов почкой. Изучение этих вопросов послужило задачей настоящей работы.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на 70 ненаркотизированных самках крыс линии Вистар с массой тела 150 – 200 г в соответствии с международными стан-

дартами по работе с экспериментальными животными. Аргинин-вазотоцин (AVT), 1-дезамино-аргинин-вазотоцин (1dAVT), D-аргинин-вазотоцин (DAVT), 1-дезамино-D-аргинин-вазотоцин (1dDAVT), 1-дезамино-1-монокарба-аргинин-вазотоцин (1d1mcAVT) растворяли в 0,9 % растворе хлорида натрия и инъецировали внутримышечно в дозе 0,05 нмоль на 100 г массы. Выбор этой дозы определялся на основании ранее проведенных экспериментов с исследованием зависимости эффекта AVT от дозы [1]. Антагонист  $V_1$ -рецепторов (OPC-21268) растворяли в 5 % крахмальном киселе до получения концентрации 1,5 мг в 1 мл и вводили резиновым зондом в желудок в объеме 1 мл на 100 г массы тела, затем инъецировали аналог вазотоцина. Животных помещали в индивидуальные клетки-пеналы с полом из металлической сетки, под которым находились воронки с мерными конусными пробирками. Выделение мочи регистрировали при спонтанном мочеотделении и измеряли объем пробы.

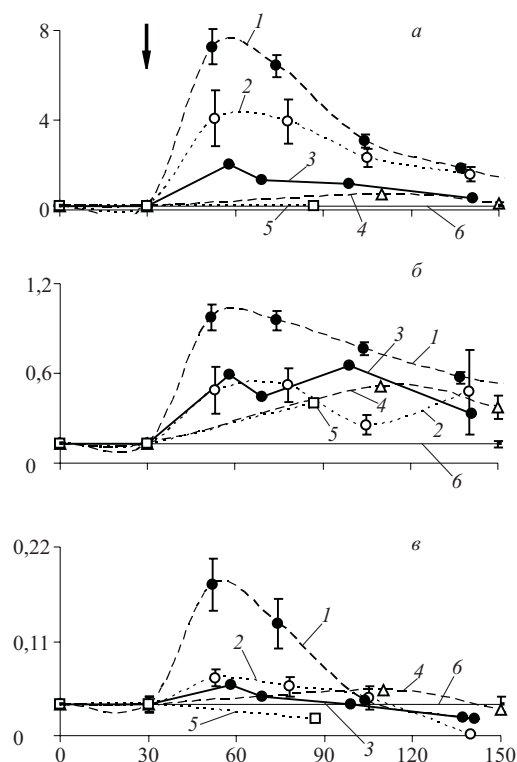
Концентрацию креатинина в моче определяли по реакции с пикриновой кислотой на спектрофотометре UNICO-2100 с проточной кюветой (Япония), концентрацию ионов магния — в воздушно-ацетиленовом пламени на атомном абсорбционном спектрофотометре Hitachi-508 (Япония), концентрацию ионов натрия и калия — в воздушно-пропановом пламени на пламенном фотометре Corning 410 (Великобритания). Статистическая обработка: данные представлены в виде  $M \pm m$ , для сравнения и оценки достоверности использован тест ANOVA.

Синтез пептидов 1dAVT, 1d1mkAVT, 1dDAVT, DAVT был выполнен ЗАО “Синтез пептидов” автоматическим твердофазным методом с использованием  $F_{\text{moc}}$ -технологии. Синтез проведен на синтезаторе Ар-

<sup>1</sup> Лаборатория физиологии почки (зав. — акад. РАН Ю. В. Наточин) Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, 194223, пр. Тореза, 44; e-mail: natochin@iephb.ru

<sup>2</sup> ФГУ “Российский кардиологический научно-производственный комплекс Росздрава”, Москва, 121552, 3-я Черепковская, 15 а; e-mail: peptidel@cardio.ru

<sup>3</sup> Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, 117997, ул. Миклухо-Маклая, 16/10; e-mail: chlorum@gmail.com



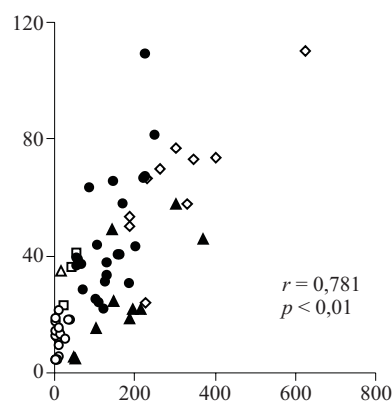
**Рис. 1.** Влияние AVT и его аналогов на выведение ионов почкой крыс.

По оси абсцисс — время опыта, мин, по оси ординат: *а* — экскреция ионов натрия ( $U_{NaV}$ ), мкмоль/мин · 100 г массы тела; *б* — экскреция ионов калия ( $U_{KV}$ ), мкмоль/мин · 100 г массы тела; *в* — экскреция ионов магния ( $U_{MgV}$ ), мкмоль/мин · 100 г массы тела. Условные обозначения: 1 — 1dAVT ( $n = 10$ ), 2 — 1d1mcAVT ( $n = 10$ ), 3 — AVT ( $n = 10$ ), 4 — DAVT ( $n = 10$ ), 5 — 1dDAVT ( $n = 10$ ), 6 — контроль ( $n = 10$ ). Стрелка — внутримышечная инъекция 0,05 нмоль на 100 г массы тела AVT, 1dAVT, 1d1mcAVT, DAVT и 1dDAVT.

plied Biosystems, модель 431A по стандартной программе для однократной конденсации  $F_{moc}$ -аминокислот. После заключительного деблокирования и отщепления от носителя полученные пептиды подвергали очистке с использованием обращено-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Синтезированные пептиды охарактеризованы с помощью аналитической ВЭЖХ (чистота не менее 98%),  $^1H$ -ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.

AVT получен от “Sigma Chemical Co” (США), антагонист  $V_1$ -рецепторов OPC-21268 — от “Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.” (Япония).

Модель  $V_{1b}$ -рецептора вазопрессина крыс была построена методом гомологического моделирования с использованием различных структур как шаблонов. При построении модели выравнивание аминокислотных последовательностей было принято таким же, как в базе данных GPCRDB. Моделирование проводилось при помощи программы MODELLER 8v2. Полученные структуры верифицировали при помощи WHAT-CHECK и минимизировали *in vacuo* в



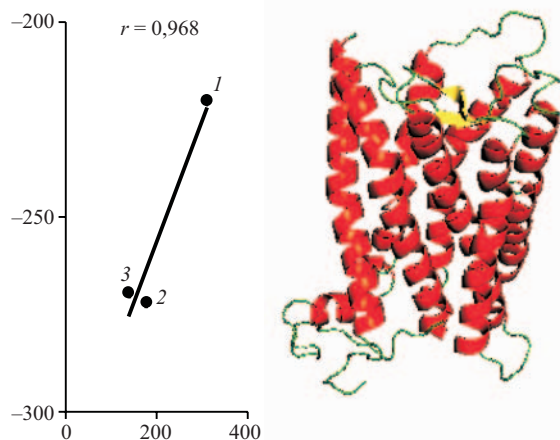
**Рис. 2.** Зависимость между выведением ионов натрия и калия почкой крыс после инъекции AVT и его аналогов.

По оси абсцисс — экскреция ионов натрия ( $U_{NaV}$ ), мкмоль/120 мин · 100 г массы тела, по оси ординат — экскреция ионов калия ( $U_{KV}$ ), мкмоль/120 мин · 100 г массы тела. Условные обозначения:  $\blacktriangle$  — 1d1mcAVT,  $\bullet$  — AVT,  $\square$  — DAVT,  $\diamond$  — 1dAVT,  $\triangle$  — 1dDAVT,  $\circ$  — контроль.

CHARMM — 300 итераций методом steepest descent. Модели вазотоцина и аналогов были построены *de novo* в PyMOL и Chem3D 2005 Pro (ChambridgeSoft) и релаксированы *in vacuo* в полях MM2 и CHARMM при помощи программного пакета TINKER. Докинг всех структур аналогов вазотоцина проводили в программе вычисления энергии HEX4.5e. При докинге использовали полученные в результате молекулярно-динамических исследований структуры вазотоцина, его аналогов и построенную модель рецептора для симуляции взаимодействия подвижных молекул лиганда и рецептора.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

После инъекции AVT, 1dAVT, 1d1mcAVT в дозе  $5 \cdot 10^{-11}$  моль на 100 г массы тела мочеотделение возрастало. В течение первого получаса оно достигало максимума, затем постепенно снижалось к исходному уровню; динамика диуреза совпадала с динамикой натрийуреза (рис. 1). По силе натрийуретического действия аналоги распределились в следующей последовательности: 1dAVT, 1d1mcAVT, AVT; DAVT и 1dDAVT в этой дозе не влияли на экскрецию натрия. Изучение выделения почкой ионов  $K^+$  и  $Mg^{2+}$  показало сходство динамики их экскреции и выделения ионов  $Na^+$  (рис. 1). Сопоставление выделения ионов  $Na^+$  и  $K^+$  при инъекции изученных пептидов свидетельствует о высоком коэффициенте корреляции между ними (рис. 2). На максимуме реакции почки после инъекции 1dAVT экскреция ионов  $Na^+$  с мочой увеличилась с  $0,13 \pm 0,03$  до  $3,61 \pm 0,42$  мкмоль/мин · 100 г массы тела (в 28 раз),  $K^+$  — с  $0,12 \pm 0,01$  до  $0,75 \pm 0,06$  мкмоль/мин · 100 г массы тела (в 6 раз),  $Mg^{2+}$  — с  $0,024 \pm 0,004$  до  $0,086 \pm 0,022$  мкмоль/мин · 100 г мас-



**Рис. 3.** Зависимость между выведением натрия почкой крыс после инъекции 0,05 нмоль на 100 г массы тела пептидов и энергией их взаимодействия с  $V_{1b}$ -рецептором.

Слева: по оси абсцисс — экскреция ионов натрия ( $U_{NaV}$ ), мкмоль/120 мин · 100 г массы тела, по оси ординат — энергия взаимодействия ( $E$ ) в кДж/моль  $V_{1b}$ -рецептора и AVT и его аналогов. Условные обозначения: 1 — 1dAVT, 2 — 1d1mcAVT, 3 — AVT. Справа: структура  $V_{1b}$ -рецептора.

сы тела (в 4 раза). Экскретируемая фракция натрия, рассчитанная по соотношению концентрационных показателей  $Na^+$  и креатинина, повысилась с  $0,5 \pm 0,1\%$  до  $10,3 \pm 0,7\%$ , что указывает на уменьшение реабсорбции  $Na^+$  в почечных канальцах под влиянием пептида.

Известно, что увеличение реабсорбции осмотически свободной воды обеспечивается стимуляцией  $V_2$ -рецепторов. Их блокада антагонистом (OPC-31260) вызывала снижение реабсорбции осмотически свободной воды после введения AVT [2]. Следует обратить внимание, что увеличение мочеотделения почкой крыс после инъекции AVT и его аналогов обусловлено не уменьшением реабсорбции осмотически свободной воды, а возрастанием экскреции осмотически активных веществ и осмотически связанной с ними воды [2]. Можно было предположить, что усиление выведения исследованных катионов обусловлено стимуляцией аналогами AVT  $V_1$ -рецепторов. Это предположение нашло подтверждение в опытах с введением 1dAVT на фоне предварительного введения антагониста  $V_1$ -рецепторов OPC-21268. После инъекции 1dAVT экскреция  $Na^+$  за 2 ч достигала  $318 \pm 24$  мкмоль/100 г массы тела ( $n = 10$ ). При одновременном введении антагониста  $V_1$ -рецепторов и 1dAVT выделение  $Na^+$  снизилось до  $85 \pm 17$  мкмоль/100 г массы тела ( $n = 10$ ) за 2 ч ( $p < 0,001$ ), что указывает на роль стимуляции этих рецепторов в уменьшении транспорта  $Na^+$ . Нами построена модель  $V_{1b}$ -рецептора (рис. 3) и оценены параметры его взаимодействия с изученными пептидами, увеличивающими выделение

ионов  $Na^+$  почкой. Сопоставление энергии взаимодействия  $V_{1b}$ -рецептора с силой натрийуретического эффекта AVT и его аналогов выявило весьма высокую зависимость.

Таким образом, синтезированы новые аналоги AVT и выявлена их способность резко увеличивать выделение катионов почкой в результате рецептор-опосредованного влияния на транспорт ионов клетками канальцев. Хотя по величине экскреция катионов сопоставима с действием фуросемида, но эффект принципиально отличен по механизму. В случае фуросемида — это угнетение  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $2Cl^-$  котранспортера в люминальной мембране клетки толстого восходящего отдела петли Генле, в опытах с инъекцией аналогов AVT — следствие изменения транспорта катионов при участии внутриклеточной системы, активируемой  $V_1$ -рецептором.

## ВЫВОДЫ

1. Инъекция AVT, 1dAVT и 1d1mcAVT в дозе  $5 \cdot 10^{-11}$  моль на 100 г массы тела резко увеличивает выделение ионов  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{++}$  почкой крыс.

2. Построена модель  $V_{1b}$ -рецептора и выявлена корреляция между энергией взаимодействия  $V_{1b}$ -рецептора и натрийуретическим эффектом AVT и его аналогов.

Авторы выражают искреннюю признательность фирме “Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.” (Япония) за предоставление для научных исследований антагонистов рецепторов вазопрессина (OPC-21268, OPC-31260).

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 05-04-49836), программы “Ведущие научные школы” (проект НШ-6576.2006.4.) и программы ОБН РАН “Физиологические механизмы регуляции внутренней среды”, 2007 г.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Цзе Гао, Ю. В. Наточин, *Ж. эвол. биох. и физиол.*, **40**(2), 168 – 172 (2004).
2. Т. А. Канашкина, А. А. Кузнецова, Е. И. Шахматова, Ю. В. Наточин, *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова*, **92**(10), 1228 – 1238 (2006).
3. В. Г. Кукес, *Клиническая фармакология*, 3-е изд., ГЭОТАР-Медиа, Москва (2006).
4. Н. А. Мухин, В. С. Моисеева, А. И. Мартынова (ред.), *Внутренние болезни*, 2-е изд., Т. 1, ГЭОТАР-Медиа, Москва (2006).
5. P. Agre, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **11**(4), 764 – 777 (2000).
6. J. Antunes-Rodrigues, M. de Castro, L. L. Elias, et al., *Physiol. Rev.*, **84**(1), 169 – 208 (2004).
7. C. A. Ecelbarger, G. H. Kim, J. B. Wade, and M. A. Knepper, *Exp. Neurol.*, **171**(2), 227 – 234 (2001).
8. S. Nielsen, J. Frokiaer, D. Marples, et al., *Physiol. Rev.*, **82**(1), 205 – 244 (2002).
9. J. M. Warne, K. E. Harding, and R. J. Balment, *Comp. Biochem. Physiol.*, **132**(1), 231 – 237 (2002).

**EFFECTS OF VASOTOCIN ANALOGS ON EXCRETION OF Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, and Mg<sup>2+</sup> IONS VIA RAT KIDNEY****Yu. V. Natochin<sup>1\*</sup>, T. A. Kanashkina<sup>1</sup>, E. I. Shakhmatova<sup>1</sup>, Zh. D. Bespalova<sup>2</sup>, D. Yu. Mordvintsev<sup>3</sup>, and Ya. L. Polyak<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Laboratory of Renal Physiology, Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Thorez Prosp. 44, St. Petersburg, 194223, Russia;

<sup>2</sup> State Cardiology Research and Production Association, Ministry of Public Health, ul. Cherepkovskaya 15A, Moscow, 121552 Russia

<sup>3</sup> Shemyakin – Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

\*e-mail: natochin@iephb.ru

Experiments on rats showed that the intramuscular injections of arginine-vasotocin (AVT), 1-deamino-arginine-vasotocin (1dAVT) or 1-deamino-1-mono-carba-arginine-vasotocin (1d1mcAVT) at a dose of  $5 \times 10^{-11}$  mole per 100 g body weight increase renal excretion of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, and Mg<sup>2+</sup>. Antagonist of V<sub>1</sub> receptors (OPC-21268) decreases the effect of 1dAVT nonapeptides on renal excretion of the studied ions. A model of V<sub>1b</sub>-receptor is constructed and a correlation is shown between the energy of interaction of the V<sub>1b</sub>-receptor and the natriuretic effect of the studied vasotocin analogs.