

ВЛИЯНИЕ ГЛЮКАГОНОПОДОБНЫХ ПЕПТИДОВ И ОКСИНТОМОДУЛИНА НА ЭКСКРЕЦИЮ ИОНОВ НАТРИЯ ПОЧКАМИ У КРЫС

© 2020 г. Е. В. Балботкина¹*, Т. А. Каравашкина¹, Т. В. Ковалева¹, А. В. Кутина¹

¹*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия*

**E-mail: Liravega@mail.ru*

Поступила в редакцию 10.03.2020 г.

После доработки 04.05.2020 г.

Принята к публикации 30.05.2020 г.

Поддержание баланса натрия обеспечивается четким соответствием поступления соли через желудочно-кишечный тракт и ее выведением, преимущественно, почками. Представляет интерес оценка функциональной связи пищеварительной системы и почек и ее вклад в поддержание постоянства концентрации натрия во внутренней среде организма. Цель исследования — оценить участие пептидов кишечника, производных проглюкагона, в регуляции выведения натрия почками. Исследовано диуретическое и натрийуретическое действие внутрибрюшинного введения оксинтомодулина, глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1) и глюкагоноподобного пептида-2 (ГПП-2) в дозе 1.5 нмоль/кг в обычных и стандартизированных (на фоне напаивания 0.9%-ным раствором NaCl в объеме 50 мл/кг) условиях водно-солевого баланса. Показано повышение мочеотделения и экскреции натрия при действии ГПП-1 и снижение диуреза и натрийуреза после инъекции ГПП-2. Эффект оксинтомодулина на функции почек не выявлен. Оценен секреторный ответ исследуемых пептидов на пероральную нагрузку 2.5%-ным раствором NaCl (18 мл/кг), вызывающую гипернатриемию: через 5 мин наблюдалось повышение концентрации ГПП-1 и снижение ГПП-2 в крови, уровень оксинтомодулина не изменился. Изучено влияние пептидов на выведение почками избытка натрия и хлоридов при гипернатриемии после перорального и внутрибрюшинного введения 2.5%-ного раствора NaCl. Инъекция ГПП-1 усилила диурез, экскрецию натрия и хлоридов почками на фоне внутрибрюшинной нагрузки NaCl и ускорила выведение ионов после пероральной нагрузки. Выявлены антидиуретический и антинатрийуретический эффекты ГПП-2 при введении гормона на фоне пероральной нагрузки NaCl. Таким образом, производные проглюкагона, ГПП-1 и ГПП-2, участвуют в регуляции баланса натрия. При избыточном поступлении NaCl через желудочно-кишечный тракт как изменение секреции этих регуляторных пептидов, так и их эффекты на экскрецию натрия почками противоположно направлены.

Ключевые слова: глюкагоноподобный пептид-1, глюкагоноподобный пептид-2, оксинтомодулин, нагрузочная проба, натрийурез, гипернатриемия, почка

DOI: 10.31857/S0869813920080026

Баланс натрия поддерживается благодаря сложной многокомпонентной системе регуляции процессов поступления и выведения катиона из организма и строго контролируется интегрированными нейроэндокринными и поведенческими механизмами [1]. Патогенез различных заболеваний сопровождается нарушениями ба-

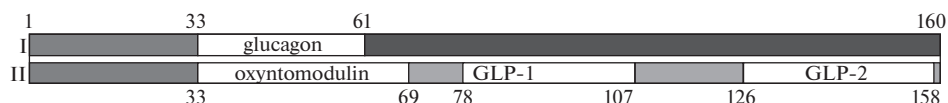


Рис. 1. Посттрансляционный процессинг проглюкагона: I – в α -клетках поджелудочной железы, II – в L-клетках кишечника. Белым цветом обозначены участки полипептида, соответствующие отдельным гормонам, номерами указаны позиции аминокислотных остатков в последовательности проглюкагона (1–160), соответствующие началу и концу каждого из пептидов. GLP-1 – глюкагоноподобный пептид-1, GLP-2 – глюкагоноподобный пептид-2.

Fig. 1. Post-translational processing of glucagon: I – in the pancreatic α -cells, II – in the intestinal L-cells. White areas indicate fragments of the polypeptide corresponding to individual hormones; the numbers indicate the amino acid positions in the proglucagon sequence (1–160), corresponding to the beginning and end of each of the peptides. GLP-1 – glucagon-like peptide-1, GLP-2 – glucagon-like peptide-2.

ланса натрия. Понимание системы его регуляции необходимо для правильного анализа механизмов соль-чувствительности, коррекции состояний, сопровождающихся задержкой натрия и жидкости в организме (при артериальной гипертензии, сердечной недостаточности, отеком синдроме различной этиологии и др.). При гиповолемии и гипонатриемии активируются центральные и периферические осмо- и натриевые рецепторы, вкусовые рецепторы, артериальные и сердечно-легочные барорецепторы и объемные рецепторы, ренин-ангиотензиновая система [2, 3]. При избыточном потреблении натрия снижается солевой аппетит [4], уменьшается реабсорбция натрия в почках и увеличивается его экскреция с мочой [5, 9]. Последнее является следствием не только снижения уровня ангиотензина II и альдостерона, но и действия различных натрийуретических факторов (предсердный натрийуретический пептид, нейрогипофизарные гормоны) [6–9]. При этом достаточно давно отмечено, что эффективность выведения избытка ионов натрия из организма зависит от пути их поступления. Натрийурез после пероральной солевой нагрузки в 2 раза выше, чем после внутривенной инфузии [10–12] или внутрибрюшинного введения гипертонического раствора NaCl [13]. В связи с этим представляла интерес оценка функциональной связи желудочно-кишечного тракта и почек, поиск биологически активных веществ, которые могут опосредовать описанные эффекты. В желудочно-кишечном тракте секретируется широкий спектр гормонов и регуляторных пептидов, среди которых особый интерес представляют инкретины – пептиды, стимулирующие глюкозозависимую секрецию инсулина поджелудочной железой в ответ на поступление пищи. Основной инсулинотропный эффект опосредован глюкагоноподобным пептидом-1 (ГПП-1), миметики которого используют в терапии пациентов с сахарным диабетом 2 типа. ГПП-1 является наиболее изученным продуктом ограниченного протеолиза проглюкагона. Посттрансляционный протеолиз проглюкагона тканеспецифичен (рис. 1). В α -клетках поджелудочной железы конвертаза 2 типа отщепляет от прогормона глюкагон; в энтероэндокринных клетках тонкой и толстой кишки при действии конвертаз 1–3 типов из прогормона образуется сразу несколько пептидов, родственных по аминокислотной последовательности, но имеющих различную биологическую активность: оксинтомодулин, ГПП-1, глюкагоноподобный пептид-2 (ГПП-2) и др. [14, 15].

Глюкозозависимая постпрандиальная секреция инсулина далеко не единственный эффект, который оказывает ГПП-1 [16]. Установлено, что рецепторы ГПП-1 кроме β -клеток поджелудочной железы также расположены в печени, сердце, головном мозге, почках. Выявлено натрийуретическое действие ГПП-1 и инкретиномиметиков [17, 18]. В нашей лаборатории было показано важное интегрирующее значение ГПП-1 в системе водно-солевого гомеостаза [13, 19]. Несмотря на то, что

оксинтомодулин и ГПП-2 секретируются совместно с ГПП-1, об их биологической активности *in vivo* известно гораздо меньше. Оксинтомодулин (27-аминокислотный пептид) регулирует секрецию соляной кислоты в желудке и транспорт гексоз в тонкой кишке. Его собственные рецепторы не выявлены [14], он рассматривается как агонист рецепторов ГПП-1 и глюкагона [20, 21]. По современным данным действие ГПП-2 (33-аминокислотный пептид) осуществляется в желудочно-кишечном тракте, в центральной нервной системе и в костной ткани. На многочисленных моделях повреждения кишки описано пролиферативное и антиапоптотическое действие ГПП-2, которое ведет к увеличению площади поверхности слизистой и повышению способности к абсорбции нутриентов. ГПП-2 оказывает свое действие через G-связанный рецептор в мембранах нейронов и энтероэндокринных клеток; он специфически распознает ГПП-2, но не другие родственные ему пептиды. Предполагают, что эффекты ГПП-2 преимущественно опосредованы изменением продукции других физиологически активных веществ [22]. ГПП-2 оказывает глюкагонотропное действие, но не влияет на секрецию инсулина β -клетками поджелудочной железы [14]. Влияние оксинтомодулина и ГПП-2 на функции почек не изучено.

Цель исследования – оценить участие регуляторных пептидов, производных проглюкагона, в регуляции выведения натрия почками. В задачи работы входила оценка диуретического и натрийуретического действия ГПП-1, ГПП-2 и оксинтомодулина, определение секреторного ответа производных проглюкагона на нагрузку NaCl и изучение влияния данных пептидов на скорость выведения избытка натрия и хлоридов почками в условиях положительного баланса NaCl.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на самках крыс линии Вистар массой 160–250 г. Крыс содержали в виварии в пластиковых клетках с древесно-стружечным наполнителем (5 особей в клетке) в комнате с контролируемой температурой. Животные получали стандартный гранулированный корм для грызунов (ПК-120, Лабораторкорм, Россия) и воду *ad libitum*. Вечером накануне эксперимента (в 17:00) у крыс забирали корм, сохраняя свободный доступ к воде. Исследование проводилось в соответствии с принципами Базельской декларации и рекомендациями этического комитета ИЭФБ РАН.

Кишечные регуляторные пептиды ГПП-1, ГПП-2 и оксинтомодулин (Bachem, Швейцария) в дозе 1.5 нмоль/кг массы тела или их растворитель (0.9%-ный раствор NaCl) инъецировали крысам внутрибрюшинно в объеме 1 мл/кг. В I серии экспериментов исследовали влияние экзогенных регуляторных пептидов на функции почек крыс в условиях обычного водно-солевого режима. Во II серии – в тех же условиях на фоне угнетения активности дипептидилпептидазы-4 внутрибрюшинным введением вилдаглиптина (Matrix Scientific, США) в дозе 1 мг/кг.

В III серии экспериментов проводили оценку диуретической и натрийуретической активности пептидов по методике Кау и соавт. [23] в модификации Lahlou и соавт. [24] с предварительным пероральным введением животным физиологического раствора в объеме 50 мл/кг (что соответствует 7.7 ммоль/кг натрия и хлоридов) через зонд в желудок для стандартизации водно-солевого баланса.

В IV серии опытов оценивали влияние регуляторных пептидов на функцию почек в условиях гипернатриемии, смоделированной пероральным введением того же количества натрия и хлоридов (7.7 ммоль/кг), что и в III серии, но в виде 2.5%-ного раствора NaCl в объеме 18 мл/кг. В V серии экспериментов использовали схожую с IV серией модель опыта, но раствор NaCl вводили внутрибрюшинно для исключения изменений секреции регуляторных пептидов. В III–V сериях эффект

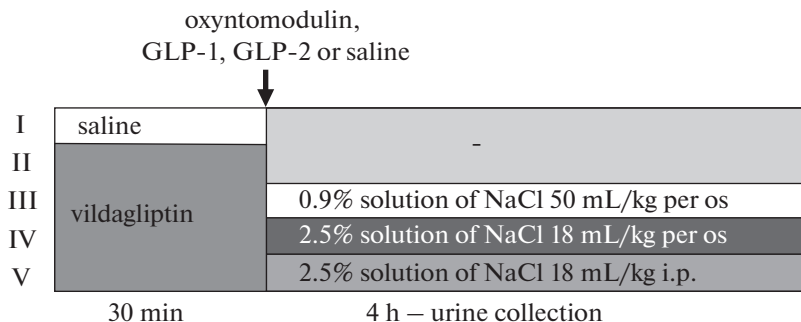


Рис. 2. Схема основных экспериментальных серий (I–V). Стрелка – введение оксинтомодулина, ГПП-1, ГПП-2 или их растворителя.

Fig. 2. Design of the main experimental series (I–V). Arrow – administration of oxyntomodulin, GLP-1, GLP-2 or saline.

пептидов оценивался на фоне предварительного введения вилдаглиптина. Схема I–V экспериментальных серий приведена на рис. 2. Каждая серия состояла из 3–4 опытных групп по 10 животных. После экспериментального воздействия животных помещали в индивидуальные клетки-пеналы с проволочным дном и мерной пробиркой для сбора проб мочи при спонтанных мочеиспусканиях в течение 4 ч, измеряли объем каждой пробы и фиксировали время ее накопления.

В VI серии (2 группы по 10 особей) определяли параметры сыворотки крови (осмоляльность, концентрация креатинина, общего белка, ионов натрия, калия и хлоридов) у крыс в контроле и через 30 мин после перорального введения 0.9%-ного раствора NaCl в объеме 50 мл/кг. В VII серии (3 группы по 10 особей) определяли гематокрит, в сыворотке крови – осмоляльность, концентрацию натрия, калия, хлоридов, общего белка и альбумина через 30 мин после перорального и внутривентриального введения 2.5%-ного раствора NaCl в объеме 18 мл/кг и в контроле. В VIII серии (2 группы по 10 особей) в плазме крови определяли концентрацию ГПП-1, ГПП-2 и оксинтомодулина через 5 мин после перорального введения 2.5%-ного раствора NaCl в объеме 18 мл/кг и в контроле. Контролем в каждой серии служила группа интактных животных из вивария. В VI–VIII сериях экспериментов кровь забирали из сосудов шеи под наркозом (Золетил, Virbac, 50 мг/кг или Телазол, Zoetis, 40 мг/кг, внутримышечно), после чего животных декапитировали. Пробы крови в чистых пластиковых пробирках центрифугировали при 8000 оборотах в течение 15 мин при комнатной температуре на центрифуге MIKRO 20 (Hettich, Германия) для получения сыворотки. Кровь для гематологического и иммуноферментного анализа собирали в охлажденные пробирки с КЗ-ЭДТА (Sarstedt, Германия). Для получения плазмы крови ее немедленно центрифугировали при 2000 оборотах и 4°C в течение 15 мин на центрифуге MIKRO 22R (Hettich, Германия), полученные пробы хранили при –20°C. Концентрацию пептидов в плазме крови определяли колориметрическим методом с помощью наборов для иммуноферментного анализа: ГПП-1 (GLP1 Total ELISA, Millipore, США), ГПП-2 (Rat GLP-2 EIA, Yanaihara, Япония), оксинтомодулин (Rat and Mouse Oxyntomodulin ELISA, Ansh Labs, США). Измерение оптической плотности и расчет концентрации пептидов проводили на микропланшетном ридере ELx808 (Bio-Tek Instruments, США).

Осмоляльность сыворотки крови и мочи определяли криоскопическим методом на микроосмометре 3300 (Advanced Instruments, США), концентрацию креатинина – кинетическим методом по реакции Яффе без депротенинизации на автоматическом

биохимическом анализаторе Erba XL-200 (Erba-Lachema, Чехия), концентрацию ионов натрия, калия и хлоридов в сыворотке крови – с помощью ионоселективного блока автоматического биохимического анализатора Erba XL-200, ионов натрия в моче – на пламенном фотометре Sherwood-420 (Sherwood Scientific, Великобритания). Концентрацию общего белка сыворотки измеряли при помощи биуретового реактива, а альбумина сыворотки – бромкрезолового зеленого на автоматическом биохимическом анализаторе Erba XL-200. Гематокрит определяли на ветеринарном автоматическом гематологическом анализаторе МЕК-6550К (Nihon Kohden, Япония).

Диурез (V), экскрецию осмотически активных веществ ($U_{Osm}V$), ионов натрия ($U_{Na}V$) и хлоридов ($U_{Cl}V$), клиренс креатинина (C_{Cr}) рассчитывали по стандартным формулам и нормализовали на кг массы тела. Полученные данные представлены как среднее значение \pm ошибка среднего ($M \pm m$). Сравнения между группами проводили с помощью критерия Стьюдента с учетом поправки Бонферрони на число сравнений, различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. При корреляционном анализе рассчитывали коэффициент корреляции Пирсона (r).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В обычных условиях водно-солевого режима (I серия) и функциональной активности дипептидилпептидазы-4 в крови исследуемые кишечные пептиды не оказали эффекта на диурез и экскрецию ионов натрия почками. Введение ГПП-1 на фоне предварительной блокады фермента вилдаглиптином (II серия) вызвало увеличение диуреза в 6.6 раз, экскреции ионов натрия – в 11.5 раз (табл. 1). Продолжительность натрийуретического эффекта ГПП-1 составила 30 мин с максимумом в первые 15 мин эксперимента (рис. 3). Вилдаглиптин сам по себе, а также оксинтомодулин и ГПП-2 в сочетании с вилдаглиптином не оказали эффекта на диуретическую и натрийуретическую функции почек крыс в обычных условиях водно-солевого баланса (табл. 1).

Для исследования веществ с предполагаемой диуретической и натрийуретической активностью принято использовать методики, исключающие влияние различного исходного состояния экспериментальных животных и позволяющие выявить возможные скрытые эффекты. Введение физиологического раствора для стандартизации водно-солевого баланса не повлияло на осмоляльность сыворотки крови, концентрацию ионов натрия и калия, наблюдался рост концентрации хлоридов (табл. 2). В стандартизованных условиях водно-солевого баланса при блокаде дипептидилпептидазы-4 вилдаглиптином (III серия) ГПП-1 вызвал значительный рост диуреза и экскреции натрия, оксинтомодулин не повлиял на функции почек, а ГПП-2 оказал антидиуретический и антинатрийуретический эффекты (табл. 1).

Представляло интерес оценить влияние производных проглюкагона на функции почек в измененных условиях водно-солевого баланса. Было смоделировано состояние гипернатриемии путем введения животным 2.5%-ного раствора NaCl. Как при внутрибрюшинном, так и при пероральном поступлении избытка NaCl в организм выявлен значительный рост концентрации ионов натрия и хлоридов в крови, гиперосмия (табл. 3). В данных экспериментальных условиях у животных не происходило существенного увеличения объема внеклеточной жидкости, о чем свидетельствовало отсутствие изменений гематокрита и содержания альбумина в сыворотке крови и лишь небольшое снижение концентрации общего белка в сыворотке крови после пероральной нагрузки (табл. 3). Изменение концентрации производных проглюкагона в крови оценивали в ответ на поступление 2.5%-ного раствора NaCl через желудочно-кишечный тракт. Выявлены разнонаправленные сдвиги уровня ГПП-1 (рост) и ГПП-2 (снижение) и стабильная концентрация оксинтомо-

Таблица 1. Влияние оксинтомодулина, ГПП-1 и ГПП-2 (1.5 нмоль/кг) на функции почек крыс в обычных и стандартизированных (введение *per os* 7.7 ммоль/кг NaCl в виде 0.9%-ного раствора в объеме 50 мл/кг) условиях

Table 1. The effect of oxynotomodulin, GLP-1 and GLP-2 (1.5 nmol/kg) on rat kidney function under normal and standardized conditions (oral administration of 7.7 mmol/kg NaCl as 0.9% solution in a volume of 50 ml/kg)

Экспериментальные группы Experimental groups	Диурез, мл Diuresis, ml	U_{NaV} , ммоль U_{NaV} , mmol	C_{Cr} , мл/мин C_{Cr} , ml/min
без 0.9%-ного раствора NaCl п.о. without 0.9% NaCl solution <i>per os</i>			
ГПП-1 + В GLP-1 + V	10.7 ± 1.6***	1.50 ± 0.20***	0.31 ± 0.02
ГПП-2 + В GLP-2 + V	0.9 ± 0.1	0.10 ± 0.01	0.27 ± 0.02
оксинтомодулин + В oxynotomodulin + V	1.3 ± 0.3	0.14 ± 0.03	0.30 ± 0.04
физиологический раствор + В saline + V	1.6 ± 0.4	0.13 ± 0.02	0.33 ± 0.01
0.9%-ный раствор NaCl п.о. 0.9% NaCl solution <i>per os</i>			
+ ГПП-1 + В + GLP-1 + V	21.8 ± 2.1*	3.27 ± 0.25**	0.31 ± 0.02
+ ГПП-2 + В + GLP-2 + V	7.1 ± 1.5*	1.16 ± 0.19*	0.36 ± 0.01
+ оксинтомодулин + В + oxynotomodulin + V	16.2 ± 2.1	2.20 ± 0.24	0.30 ± 0.01
+ физиологический раствор + В + saline + V	14.0 ± 2.0	1.93 ± 0.20	0.28 ± 0.02

Животные во всех экспериментальных группах за 30 мин до инъекции пептидов и нагрузочных проб получали вилдаглиптин (В) в дозе 1 мг/кг внутривентриально. Каждая экспериментальная группа включала 10 животных. Величины указаны в виде $M \pm m$ за 1 ч на кг массы тела. Значимое отличие при сравнении с соответствующей группой без введения пептидов (применена поправка Бонферрони на 3 сравнения): * – при $p < 0.05$, ** – при $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$.

Animals received vildagliptin (V) at a dose of 1 mg/kg intraperitoneally in all experimental groups 30 min before the injection of peptides and loading tests. Each experimental group included 10 animals. Values are presented as $M \pm m$ for 1 h per kg of body weight. Significant difference compared with the corresponding group without peptide administration (Bonferroni correction for 3 comparisons was applied): * – at $p < 0.05$, ** – at $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$.

Таблица 2. Осмоляльность и концентрация ионов в сыворотке крови крыс через 30 мин после напаивания 0.9%-ным раствором NaCl для стандартизации водно-солевого баланса

Table 2. Osmolality and ion concentration in rat blood serum 30 min following drink with 0.9% NaCl solution to standardize the water-salt balance

Параметр Parameter	Контрольная группа Control group	0.9%-ный раствор NaCl 0.9% NaCl solution
Осмоляльность, мОсмоль/кг H ₂ O Osmolality, mOsmol/kg H ₂ O	300 ± 1	300 ± 1
Натрий, ммоль/л Sodium, mmol/l	145.9 ± 0.2	146.8 ± 0.4
Хлориды, ммоль/л Chlorides, mmol/l	105.0 ± 0.4	108.8 ± 0.6***
Калий, ммоль/л Potassium, mmol/l	4.0 ± 0.1	4.0 ± 0.1

Каждая экспериментальная группа включала 10 животных. Величины указаны в виде $M \pm m$. *** – значимое отличие по сравнению с контрольной группой при $p < 0.001$.

Each experimental group included 10 animals. Values are presented as $M \pm m$. *** – a significant difference compared with the control group at $p < 0.001$.

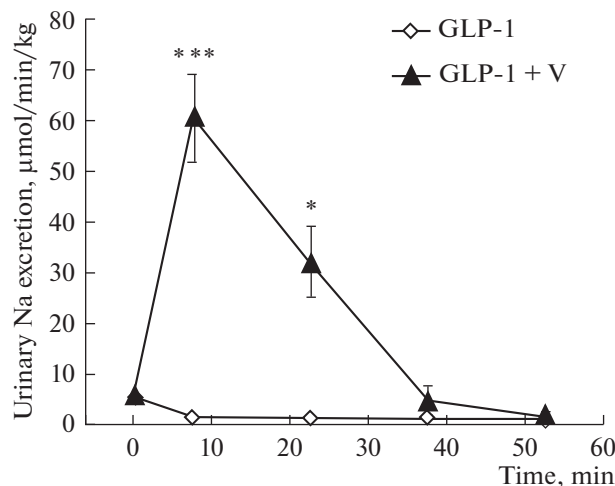


Рис. 3. Продолжительность натрийуретического эффекта ГПП-1, защищенного ингибитором дипептидилпептидазы-4. Каждая экспериментальная группа включала 10 животных. Данные представлены как $M \pm m$ на кг массы тела. Значимое отличие при сравнении с группой без введения вилдаглиптина (V) (применена поправка Бонферрони на 10 сравнений): * – при $p < 0.05$, *** – $p < 0.001$.

Fig. 3. Duration of the natriuretic effect of GLP-1 protected by a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor. Each experimental group included 10 animals. Data are presented as $M \pm m$ per kg of body weight. Significant difference compared with a group without vildagliptin (V) (Bonferroni correction for 10 comparisons was applied): * – at $p < 0.05$, *** – $p < 0.001$.

Таблица 3. Гематокрит и параметры сыворотки крови у крыс в контроле и через 30 мин после пероральной и внутривенной нагрузок 2.5%-ным раствором NaCl в объеме 18 мл/кг
Table 3. Hematocrit and blood serum parameters in rats in control group and 30 minutes after oral and intraperitoneal loads with 2.5% NaCl solution in a volume of 18 ml/kg

Параметр Parameter	Контроль Control	2.5%-ный раствор NaCl п.о. 2.5% NaCl solution <i>per os</i>	2.5%-ный раствор NaCl в/бр 2.5% solution of NaCl <i>i.p.</i>
Осмоляльность, мОсмоль/кг H ₂ O Osmolality, mOsmol/kg H ₂ O	302 ± 1	317 ± 1***	317 ± 1***
Натрий, ммоль/л Sodium, mmol/l	143.9 ± 0.3	151.0 ± 0.3***	151.9 ± 0.3***
Хлориды, ммоль/л Chlorides, mmol/l	102.9 ± 0.5	113.3 ± 0.5***	114.7 ± 0.4***
Калий, ммоль/л Potassium, mmol/l	4.1 ± 0.1	4.0 ± 0.1	4.4 ± 0.1*
Общий белок, г/л Total protein, g/l	63.4 ± 0.6	60.2 ± 0.6**	61.3 ± 0.8
Альбумин, г/л Albumin, g/l	29.5 ± 0.2	28.9 ± 0.3	29.2 ± 0.2
Гематокрит, % Hematocrit, %	42.7 ± 0.7	41.5 ± 0.4	41.3 ± 0.6

Каждая экспериментальная группа включала 10 животных. Величины указаны в виде $M \pm m$. Значимое отличие по сравнению с контрольной группой (применена поправка Бонферрони на 2 сравнения): * – при $p < 0.05$, ** – при $p < 0.01$, *** – при $p < 0.001$.

Each experimental group included 10 animals. Values are presented as $M \pm m$. Significant difference compared with the control group (Bonferroni correction for 2 comparisons was applied): * – at $p < 0.05$, ** – at $p < 0.01$, *** – at $p < 0.001$.

Таблица 4. Концентрация пептидов, производных проглюкагона, в плазме крови у крыс в контроле и через 5 мин после пероральной нагрузки 2.5%-ным раствором NaCl в объеме 18 мл/кг
Table 4. Concentration of proglucagon derived peptides in rat plasma in control group and 5 minutes after oral loading with 2.5% NaCl solution in a volume of 18 ml/kg

Параметр Parameter	Контроль Control	2.5%-ный раствор NaCl 2.5% NaCl solution
ГПП-1, пг/мл GLP-1, pg/ml	73 ± 4	108 ± 5***
ГПП-2, пг/мл GLP-2, pg/ml	520 ± 8	488 ± 10*
Оксинтомодулин, пг/мл Oxuntomodulin, pg/ml	161 ± 25	167 ± 40

Каждая экспериментальная группа включала 10 животных. Величины указаны в виде $M \pm m$. Значимое отличие по сравнению с контрольной группой: * – при $p < 0.05$, *** – при $p < 0.001$.
 Each experimental group included 10 animals. Values are presented as $M \pm m$. Significant difference compared with the control group: * – at $p < 0.05$, *** – at $p < 0.001$.

Таблица 5. Влияние ГПП-1 и ГПП-2 (1.5 нмоль/кг) на функции почек крыс при гипернатриемии, вызванной пероральной и внутрибрюшинной нагрузками 7.7 ммоль/кг NaCl (2.5%-ный раствор в объеме 18 мл/кг)
Table 5. The effect of GLP-1 and GLP-2 (1.5 nmol/kg) on the kidney function of rats with hypernatremia caused by oral and intraperitoneal loads of 7.7 mmol/kg NaCl (2.5% solution in a volume of 18 ml/kg)

Экспериментальные группы Experimental groups	Диурез, мл Diuresis, ml	U_{NaV} , ммоль U_{NaV} , mmol	U_{ClV} , ммоль U_{ClV} , mmol	C_{Cr} , мл/мин C_{Cr} , ml/min
2.5%-ный раствор NaCl п.о. 2.5% NaCl solution <i>per os</i>				
+ ГПП-1 + В + GLP-1 + V	13.2 ± 1.8	2.96 ± 0.36	2.09 ± 0.23	0.34 ± 0.03
+ ГПП-2 + В + GLP-2 + V	6.9 ± 0.6***	2.04 ± 0.14**	1.81 ± 0.12**	0.37 ± 0.01
+ физиологический раствор + В + saline + V	11.8 ± 0.9	3.26 ± 0.26	2.62 ± 0.20	0.37 ± 0.02
2.5%-ный раствор NaCl в/бр 2.5% solution of NaCl i.p.				
+ ГПП-1 + В + GLP-1 + V	11.1 ± 1.1**	3.25 ± 0.32*	2.46 ± 0.21*	0.35 ± 0.02
+ ГПП-2 + В + GLP-2 + V	4.7 ± 0.5	1.68 ± 0.16	1.54 ± 0.13	0.38 ± 0.02
+ физиологический раствор + В + saline + V	5.9 ± 0.4	2.07 ± 0.11	1.77 ± 0.11	0.37 ± 0.02

Животные во всех экспериментальных группах за 30 мин до инъекции пептидов и нагрузочных проб получали вилдаглиптин (В) в дозе 1 мг/кг внутрибрюшинно. Каждая экспериментальная группа включала 10 животных. Величины указаны в виде $M \pm m$ за 1 ч на кг массы тела. Значимость отличий от эффекта нагрузочной пробы без инъекции пептидов (применена поправка Бонферрони на 2 сравнения): * – при $p < 0.05$, ** – при $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$.

Animals received vildagliptin (V) at a dose of 1 mg/kg intraperitoneally in all experimental groups 30 minutes before the injection of peptides and loading tests. Each experimental group included 10 animals. Values are presented as $M \pm m$ for 1 h per kg of body weight. Significance of differences from the effect of a loading test without peptide injection (Bonferroni correction for 2 comparisons was applied): * – at $p < 0.05$, ** – at $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$.

дулина после пероальной нагрузочной пробы (табл. 4). Учитывая данные об изменении секреции ГПП-1 и ГПП-2 в ответ на пероральную нагрузку NaCl, эффекты этих регуляторных пептидов были изучены в условиях гипернатриемии.

При инъекции ГПП-1 на фоне гипернатриемии, развившейся вследствие перорального введения NaCl (IV серия), величина диуреза и экскреции натрия за 1 ч эксперимента не менялись (табл. 5), однако, ГПП-1 ускорил выведение нагрузки.

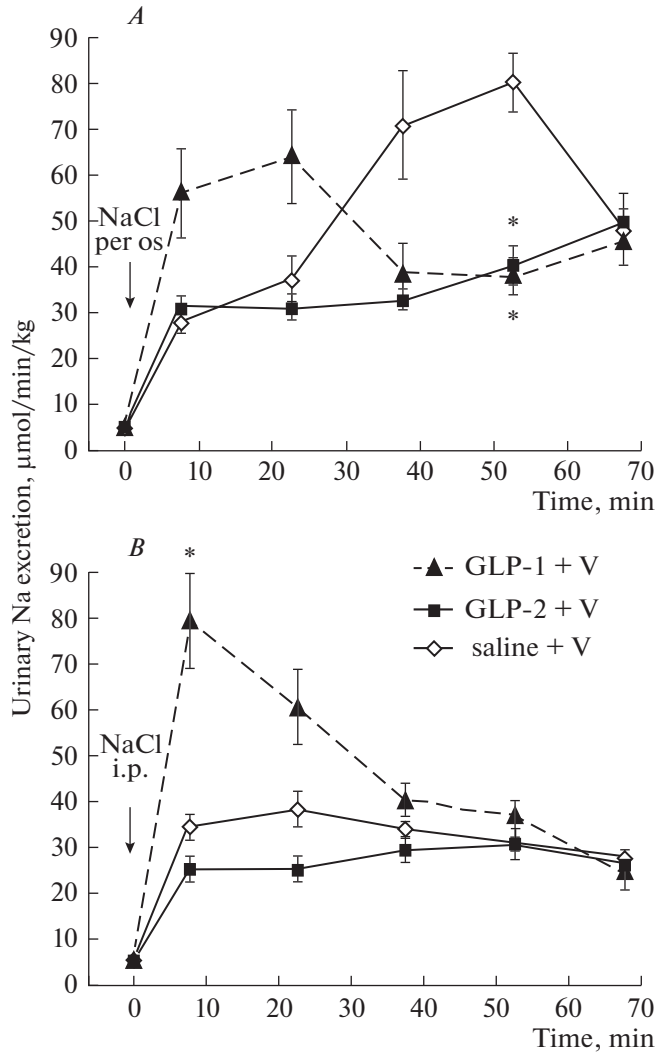


Рис. 4. Экскреция натрия почками после инъекции ГПП-1 и ГПП-2 (1.5 нмоль/кг) на фоне перорального (A) и внутривентриального (B) введения 2.5%-ного раствора NaCl.

Животные во всех экспериментальных группах за 30 мин до инъекции пептидов и нагрузочных проб получали вилдаглиптин (V) в дозе 1 мг/кг внутривентриально. Каждая экспериментальная группа включала 10 животных. Стрелка – момент введения пептида и нагрузки. Данные представлены как $M \pm m$ на кг массы тела. Значимое отличие при сравнении с группой без инъекции пептидов (применена поправка Бонферрони на 18 сравнений): * – при $p < 0.05$.

Fig. 4. Urinary sodium excretion after injection of GLP-1 and GLP-2 (1.5 nmol/kg) with oral (A) and intraperitoneal (B) administration of 2.5% NaCl solution.

Animals received vildagliptin (V) at a dose of 1 mg/kg intraperitoneal in all experimental groups 30 minutes before the injection of peptides and loading tests. Each experimental group included 10 animals. Arrow – the moment of peptide injection and loading tests. Data are presented as $M \pm m$ per kg of body weight. Significant difference compared with a group without peptide injection (Bonferroni correction for 18 comparisons was applied):

* – at $p < 0.05$.

Пик диуреза, экскреции натрия (рис. 4) и хлоридов наблюдался на 30 мин раньше. Введение ГПП-1 на фоне гипернатриемии, вызванной внутривенным введением NaCl (V серия) вызвало рост диуреза, экскреции натрия и хлоридов, значения показателей были сопоставимы с таковыми за 1 ч эксперимента при пероральном поступлении раствора хлорида натрия без введения пептида (табл. 5). Максимальный эффект наблюдался в течение 30 мин от момента инъекции препарата, пик выведения натрия отмечен в первые 15 мин эксперимента (рис. 4). ГПП-2 уменьшил рост диуреза, экскреции ионов натрия (табл. 5) и хлоридов с мочой в ответ на пероральное поступление NaCl, максимальный эффект наблюдался с 30-й по 60-ю мин от момента инъекции пептида (рис. 4). При внутривенном введении 2.5%-ного раствора NaCl ГПП-2 не вызвал изменений диуреза и выведения натрия (табл. 5). Скорость клубочковой фильтрации во всех экспериментальных сериях не менялась, а существенные изменения диуреза тесно коррелировали с величинами экскреции натрия и хлоридов ($r = 0.94-0.98$ для натрия, $r = 0.92-0.98$ для хлоридов). Полученные данные указывают на то, что во всех случаях изменения скорости мочеобразования являлись, главным образом, следствием различий в канальцевой реабсорбции электролитов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Поступление ионов натрия, а также их потеря с физиологическими жидкостями и при патологии могут приводить к серьезным нарушениям водно-солевого баланса, однако, незамедлительный ответ со стороны многих органов и систем способствует его нормализации. Предполагалось, что связь желудочно-кишечного тракта и почек вносит существенный вклад в поддержание постоянства концентрации натрия во внутренней среде организма, что является важным условием его оптимального функционирования. Пероральное поступление растворов солей является стимулом секреции регуляторных пептидов энтероэндокринными клетками при участии нервной и эндокринной системы. Это происходит еще до наступления изменений параметров водно-солевого баланса [25]. Почки, в свою очередь, в ответ на действие самих пептидов или других биологически активных веществ, секреторных под их влиянием, на клетки канальцев нефронов могут изменить процессы секреции и реабсорбции ионов. Нами экспериментально был оценен индивидуальный вклад каждого из ко-секретируемых L-клетками кишечника производных проглюкагона в изменение функций почек.

Установлено, что введение исследуемых пептидов животным, содержащимся в обычных условиях в виварии, не оказало влияния на экскрецию натрия почками. Это могло быть связано с быстрой деградацией кишечных пептидов дипептидилпептидазой-4 [26, 27]. Предварительная блокада дипептидилпептидазы-4 вилдаглиптином выявила диуретический и натрийуретический эффекты ГПП-1, но не ГПП-2 и оксинтодулина. В обычных условиях водно-солевого баланса выявить усиление обратного всасывания натрия в почках под влиянием биологически активных веществ затруднительно, так как практически весь профильтровавшийся натрий и так подвергается реабсорбции. Стандартизация водно-солевого баланса введением физиологического раствора позволила не только уменьшить влияние различий в исходном состоянии животных, но и оценить потенциальное антинатрийуретическое действие пептидов. Выявлено разнонаправленное влияние ко-секретирующихся продуктов проглюкагона. В отличие от ГПП-1, вызвавшего значительный рост диуреза и натрийуреза, оксинтодулин не повлиял на функции почек, а ГПП-2 оказал антидиуретическое и антинатрийуретическое действие.

Для понимания связи между изменением содержания регуляторных пептидов в плазме крови и их эффектами на выведение натрия и хлоридов почками смодели-

ровано состояние гипернатриемии. Введение ГПП-1 в условиях перорального поступления 2.5%-ного раствора NaCl не привело к какому-либо изменению в величине диуреза, экскреции ионов натрия и хлоридов. Полученные результаты можно считать закономерными, если предположить, что введение нагрузки в желудочно-кишечный тракт в необходимой степени стимулирует секрецию эндогенного пептида, а его дополнительное поступление извне не может усилить эффект на функции почек. Это подтверждается сопоставимыми величинами диуреза и экскреции ионов в ответ на пероральную нагрузку NaCl и при действии ГПП-1 на фоне внутрибрюшинной нагрузки, не вызывающей секрецию эндогенного пептида [28]. Небольшое ускорение выведения избытка хлорида натрия из организма при действии ГПП-1 на фоне пероральной нагрузки NaCl, вероятно, обусловлено отсутствием временной задержки, необходимой L-клеткам кишечника для секреции пептида в кровь, и защитой вилдаглиптином как эндогенного, так и инъецированного пептида от деградации дипептидилпептидазой-4.

ГПП-2 приводит к задержке выведения электролитов после пероральной нагрузки NaCl, снижая диурез и экскрецию натрия и хлоридов. То есть, он обладает противоположными с ГПП-1 регуляторными эффектами на функции почек в этих условиях. Ранее противоположные эффекты этих пептидов были описаны при изучении регуляции метаболизма хиломикрон в кишечнике [29]. В соответствии с данными литературы ГПП-1 и ГПП-2 взаимодействуют с разными рецепторами [14, 30], однако, отсутствуют свидетельства локализации рецепторов ГПП-2 в почке и способности пептида непосредственно влиять на секрецию ГПП-1. Можно предположить, что действие ГПП-2 реализуется опосредованно через секрецию других биологически активных веществ и гормонов или через изменение функционального состояния симпатической и парасимпатической нервной системы. Установлена локализация рецептора ГПП-2 на афферентных нейронах ганглиев блуждающего нерва [31], показан его гипотензивный эффект при периферическом и центральном введении [32]. Однако отсутствуют исследования, подтверждающие прямое или косвенное влияние ГПП-2 на нервную регуляцию функций почек. В работе Yusta и соавт. [14] описано глюкагонотропное действие ГПП-2, поэтому антинатрийуретический эффект ГПП-2 может быть следствием способности глюкагона усиливать реабсорбцию ионов натрия в восходящей части петли Генле [33, 34]. Дизайн проведенного нами исследования не позволяет исключить опосредованного влияния ГПП-2 на почечную гемодинамику. Однако результаты других исследований не выявляли эффектов ГПП-2 на кровотоки в почках при значимом NO-зависимом усилении эндогенным и инъецированным ГПП-2 кровотока в мезентериальных и каротидных сосудах [35]. Необходимо продолжить анализ механизмов действия ГПП-2 на функции почек для более точного понимания системы регуляции баланса натрия в физиологическом состоянии и, что более важно, при различных формах патологии, сопровождающихся задержкой натрия и жидкости в организме.

Таким образом, производные проглюкагона, ГПП-1 и ГПП-2, оказывают влияние на выведение натрия почками как при его обычном, так и при избыточном содержании в организме животных. Несмотря на образование из общего предшественника в L-клетках кишечника, при избыточном поступлении NaCl через желудочно-кишечный тракт как изменение секреции этих регуляторных пептидов, так и их эффекты на экскрецию натрия почками противоположно направлены.

Исследования выполнены с использованием оборудования ЦКП ИЭФБ РАН.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания (рег. № АААА-А18-118012290371-3) при частичной поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 18-315-00291 мол_а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Greenwood M. P., Greenwood M., Paton J. F., Murphy D. Salt appetite is reduced by a single experience of drinking hypertonic saline in the adult rat. *PLoS One*. 9(8): e104802. 2014.
2. Epstein A. N. Control of salt intake by steroids and cerebral peptides. *Pharmacol. Res.* 25: 113–124. 1992.
3. Vivas L., Godino A., Dalmaso C., Caeiro X.E., Macchione A.F., Cambiasso M.J. Neurochemical circuits subserving fluid balance and baroreflex: A role for serotonin, oxytocin, and gonadal steroids. In: De Luca L.A. Jr., Menani J.V., Johnson A.K. (Eds). *Neurobiology of body fluid homeostasis: Transduction and integration*. Boca Raton (FL). CRC Press/Taylor & Francis. 2014.
4. Godino A., De Luca L.A. Jr., Antunes-Rodrigues J., Vivas L. Oxytocinergic and serotonergic systems involvement in sodium intake regulation: Satiety or hypertonicity markers? *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293: R1027–R1036. 2007.
5. Bankir L., Perucca J., Norsk P., Bouby N., Damgaard M. Relationship between Sodium Intake and Water Intake: The False and the True. *Ann. Nutr. Metab.* 70(Suppl. 1): 51–61. 2017.
6. Balmert R.J., Brimble M.J., Forsling M.L., Musabayane C.T. Natriuretic response of the rat to plasma concentrations of arginine vasopressin within the physiological range. *J. Physiol.* 352: 517–526. 1984.
7. Park R.G., Congiu M., Denton D.A., McKinley M.J. Natriuresis induced by arginine vasopressin infusion in sheep. *Am. J. Physiol.* 249(6 Pt. 2): F799–F805. 1985.
8. Verbalis J.G., Mangione M.P., Stricker E.M. Oxytocin produces natriuresis in rats at physiological plasma concentrations. *Endocrinology*. 128(3): 1317–1322. 1991.
9. McCann S.M., Franci C.R., Favaretto A.L., Gutkowska J., Antunes-Rodrigues J. Neuroendocrine regulation of salt and water metabolism. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30(4): 427–441. 1997.
10. McKinley M.J., Lichardus B., McDougall J.G., Weisinger R.S. Periventricular lesions block natriuresis to hypertonic but not isotonic NaCl loads. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 262: F98–F107. 1992.
11. Singer D.R., Markandu N.D., Buckley M.G., Miller M.A., Sagnella G.A., MacGregor G.A. Contrasting endocrine responses to acute oral compared with intravenous sodium loading in normal humans. *Am. J. Physiol.* 274: F111–F119. 1998.
12. Andersen L.J., Andersen J.L., Pump B., Bie P. Natriuresis induced by mild hypernatremia in humans. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 282: R1754–R1761. 2002.
13. Kutina A.V., Golosova D.V., Marina A.S., Shakhmatova E.I., Natochin Y.V. Role of vasopressin in the regulation of renal sodium excretion: interaction with glucagon-like peptide-1. *J. Neuroendocrinol.* 28(4): 1–8. 2016.
14. Yusta B., Huang L., Munroe D., Wolff G., Fantaske R., Sharma S., Demchyshyn L., Asa S.L., Drucker D.J. Enteroendocrine localization of GLP-2 receptor expression in humans and rodents. *Gastroenterology*. 119(3): 744–755. 2000.
15. Holst J.J. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev.* 87(4): 1409–1439. 2007.
16. Nauck M.A., Meier J.J. Incretin hormones: Their role in health and disease. *Diabetes Obes. Metab.* 20(Suppl. 1): 5–21. 2018.
17. Crajoinas R.O., Oricchio F.T., Pessoa T.D., Pacheco B.P., Lessa L.M., Malnic G., Girardi A.C. Mechanisms mediating the diuretic and natriuretic actions of the incretin hormone glucagon-like peptide-1. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 301(2): F355–F363. 2011.
18. Thomson S.C., Kashkoui A., Singh P. Glucagon-like peptide-1 receptor stimulation increases GFR and suppresses proximal reabsorption in the rat. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 304(2): F137–F144. 2013.
19. Natochin Yu.V., Marina A.S., Kutina A.V. The role of incretin as an integrator of sodium and water balance regulation. *Dokl. Biol. Sci.* 458: 271–274. 2014.
20. Day J.W., Ottaway N., Patterson J.T., Gelfanov V., Smiley D., Gidda J., Findeisen H., Bruemmer D., Drucker D.J., Chaudhary N., Holland J., Hembree J., Ablanalp W., Grant E., Ruehl J., Wilson H., Kirchner H., Lockie S.H., Hofmann S., Woods S.C., Nogueiras R., Pfluger P.T., Perez-Tilve D., DiMarchi R., Tschop M. H. A new glucagon and GLP-1 co-agonist eliminates obesity in rodents. *Nat. Chem. Biol.* 5(10): 749–757. 2009.
21. Wynne K., Field B. C., Bloom S. R. The mechanism of action for oxyntomodulin in the regulation of obesity. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* 11(10): 1151–1157. 2010.
22. Shin E.D., Drucker D.J., Brubaker P.L. Glucagon-like peptide 2: an update. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes.* 12: 63–71. 2005.
23. Kau S.T., Keddie J.R., Andrews D. A method for screening diuretic agents in the rat. *J. Pharmacol. Methods.* 11(1): 67–75. 1984.
24. Lahlou S., Tahraoui A., Israili Z., Lyoussi B. Diuretic activity of the aqueous extracts of *Carum carvi* and *Tanacetum vulgare* in normal rats. *J. Ethnopharmacol.* 110(3): 458–463. 2007.
25. Muskiet M.H.A., Tonneijck L., Smits M.M., van Baar M. J.B., Kramer M.H.H., Hoorn E.J., Joles J.A., van Raalte D.H. GLP-1 and the kidney: from physiology to pharmacology and outcomes in diabetes. *Nat. Rev. Nephrol.* 13(10): 605–628. 2017.

26. Hansen L., Deacon C.F., Orskov C., Holst J.J. Glucagon-like peptide-1-(7–36)amide is transformed to glucagon-like peptide-1-(9–36)amide by dipeptidyl peptidase IV in the capillaries supplying the L cells of the porcine intestine. *Endocrinology*. 140(11): 5356–5363. 1999.
27. Mentlein R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26) – role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul. Pept.* 85(1): 9–24. 1999.
28. Marina A.S., Kutina A.V., Shakhmatova E.I., Natochin Yu.V. Involvement of glucagon-like peptide-1 in the regulation of selective excretion of sodium or chloride ions by the kidneys. *Bull. Exp. Biol. Med.* 162(4): 436–440. 2017.
29. Lutz T.A., Osto E. Glucagon-like peptide-1, glucagon-like peptide-2, and lipid metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* 27(3): 257–263. 2016.
30. Janssen P., Rotondo A., Mule F., Tack J. Review article: a comparison of glucagon-like peptides 1 and 2. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 37(1): 18–36. 2013.
31. Nelson D.W., Sharp J.W., Brownfield M.S., Raybould H.E., Ney D.M. Localization and activation of glucagon-like peptide-2 receptors on vagal afferents in the rat. *Endocrinology*. 148(5): 1954–1962. 2007.
32. Iwai T., Kaneko M., Sasaki-Hamada S., Oka J. Characterization of the hypotensive effects of glucagon-like peptide-2 in anesthetized rats. *Neurosci. Lett.* 550: 104–108. 2013.
33. Bailly C., Imbert-Teboul M., Chabardes D., Hus-Citharel A., Montegut M., Clique A., Morel F. The distal nephron of rat kidney: a target site for glucagon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 3422–3424. 1980.
34. Morel F. Sites of hormone action in the mammalian nephron. *Am. J. Physiol. Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 240: F159–F164. 1981.
35. Deniz M., Bozkurt A., Kurtel H. Mediators of glucagon-like peptide 2-induced blood flow: responses in different vascular sites. *Regul. Pept.* 142(1–2): 7–15. 2007.

Effect of Glucagon-Like Peptides and Oxyntomodulin on Urinary Sodium Excretion in Rats

E. V. Balbotkina^a, *, T. A. Karavashkina^a, T. V. Kovaleva^a, and A. V. Kutina^a

^a*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia*

**e-mail: Liravega@mail.ru*

Maintaining sodium balance is ensured by a clear correspondence of salt intake through the gastrointestinal tract and its excretion mainly by the kidneys. It is of interest to evaluate the functional relationship of the digestive system and the kidneys and its contribution to maintaining a constant sodium concentration in the internal environment of the body. The aim of the study was to evaluate the participation of gut peptides, proglucagon derivatives, in the regulation of urinary sodium excretion. The diuretic and natriuretic effects of the intraperitoneal administration of oxyntomodulin, glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and glucagon-like peptide-2 (GLP-2) at a dose of 1.5 nmol/kg were studied under normal and standardized (drink with 0.9% solution NaCl in a volume of 50 ml/kg) conditions of water-salt balance. An increase in urination and sodium excretion under the action of GLP-1 and a decrease in diuresis and natriuresis after injection of GLP-2 were shown. The effect of oxyntomodulin on kidney function has not been identified. The secretory response of the studied peptides to the load with oral administration of a 2.5% NaCl solution causing hypernatremia was evaluated: after 5 min an increase in GLP-1 concentration and a decrease in GLP-2 in the blood were observed, the level of oxyntomodulin did not change. The effect of peptides on the excretion of excess sodium and chloride by the kidneys during hypernatremia after oral and intraperitoneal administration of 2.5% NaCl solution (18 ml/kg) was studied. Injection of GLP-1 increased diuresis, excretion of sodium and chloride by the kidneys with an intraperitoneal NaCl load and accelerated the elimination of ions after oral loading. The anti-diuretic and anti-natriuretic effects of GLP-2 were revealed upon administration of the hormone with an oral NaCl load. Thus, derivatives of proglucagon, GLP-1 and GLP-2, are involved in the regulation of sodium balance. With an excessive intake of NaCl through the gastrointestinal tract, both the change of secretion of these regulatory peptides and their effects on urinary sodium excretion are oppositely directed.

Keywords: glucagon-like peptide-1, glucagon-like peptide-2, oxyntomodulin, loading test, natriuresis, hypernatremia, kidney

ЦИТИРОВАТЬ:

Балботкина Е.В., Каравашкина Т.А., Ковалева Т.В., Кутина А.В. Влияние глюкагоноподобных пептидов и оксинтомодулина на экскрецию ионов натрия почками у крыс. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(8): 1041–1054.

DOI: 10.31857/S0869813920080026

TO CITE THIS ARTICLE:

Balbotkina E.V., Karavashkina T.A., Kovaleva T.V., Kutina A.V. Effect of Glucagon-Like Peptides and Oxyntomodulin on Urinary Sodium Excretion in Rats. Russian Journal of Physiology. 106(8): 1041–1054.

DOI: 10.31857/S0869813920080026