

© В.М.Брюханов, И.В.Смирнов, А.А.Бондарев, Я.Ф.Зверев, 2010
УДК 616-003.261:665.122.6]-08.254-092

В.М. Брюханов¹, И.В. Смирнов¹, А.А. Бондарев², Я.Ф. Зверев¹

ПОДКИСЛЕНИЕ МОЧИ КАК ФАКТОР, ПОВЫШАЮЩИЙ ДИУРЕТИЧЕСКУЮ И САЛУРЕТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ФУРОСЕМИДА У КРЫС

V.M. Brykhanov, I.V. Smirnov, A.A. Bondarev, Ya.F. Zverev

ACIDIFYING OF URINE AS A FACTOR WHICH INCREASES DIURETIC AND SALURETIC FUROSEMIDE ACTIVITY IN RATS

Кафедры фармакологии¹ и общей химии² Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул, Россия

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Изучение диуретической и салуретической активности фуросемида у крыс при подкислении мочи с помощью аскорбиновой кислоты. **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.** Исследования проведено на крысах Wistar. Контрольной группе крыс, находившейся в условиях обычного питьевого режима, ежедневно на протяжении 7 дней внутривенно вводили 3 мл водопроводной воды, подопытным животным – такой же объем 5% раствора аскорбиновой кислоты. После определения pH мочи подкожно вводили фуросемид в дозе 2 мг/кг. Определяли суточный диурез, а также экскрецию ионов натрия и калия. Квантово-химические расчеты выполнялись методом DFT B3LYP/6-311G* с использованием программы GAMESS. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Исследование показало, что в контрольной группе животных pH мочи составил 7,2, а в группе, получавшей аскорбиновую кислоту, – 6,0. В этих условиях диуретическая и салуретическая активность фуросемида существенно различалась. Введение фуросемида в контрольной группе крыс вызвало увеличение суточного диуреза в 3,2 раза, экскреции натрия – в 6 раз, экскреции калия – в 1,9 раза. Введение диуретика на фоне предварительного применения аскорбиновой кислоты индуцировало значительно большие изменения: увеличение суточного диуреза – в 5,6 раза, выделения натрия с мочой более, чем в 11 раз, а калия – в 3,3 раза. Квантово-химический анализ показал, что эти различия обусловлены увеличением молекулярной и уменьшением ионной форм диуретика в просвете почечных канальцев при подкислении мочи. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** В экспериментах на крысах показано повышение диуретической и салуретической активности фуросемида в условиях сдвига pH первичной мочи в кислую сторону. Полученные результаты открывают возможность для варьирования терапевтической дозы препарата и регулирования некоторых его побочных эффектов. Кроме того, открываются определенные перспективы для модификации молекулы фуросемида с целью изменения изоэлектрической точки препарата, что, в свою очередь, должно привести к увеличению его диуретической активности.

Ключевые слова: активность фуросемида, аскорбиновая кислота, подкисление мочи.

ABSTRACT

THE AIM of the research is to study saluretic and diuretic activity of furosemide in rats with the acidification of urine with ascorbic acid. **MATERIALS AND METHODS.** Studies conducted on Wistar rats, Control group of rats, which was in conditions of normal drinking water treatment, daily for about 7 days-long intragastrically injected with 3 ml of tap water, the same amount of 5% aqueous solution of ascorbic acid. After determining the pH of urine were injected subcutaneously with furosemide at a dose of 2 mg / kg. We determined the daily urine output and excretion of sodium and potassium. Quantum-chemical calculations were performed using DFT B3LYP/6-311G * using the program GAMESS. **RESULTS.** The study showed that in the control group of animals urine pH was 7.2, while in the group receiving ascorbic acid – 6.0. In these conditions, and the diuretic furosemide saluretic activity varied significantly. Introduction of furosemide control group of rats caused an increase in daily urine output of 3.2 times, the excretion of sodium – in 6 times, the excretion of potassium – in 1.9 times. Introduction diuretic on the background of the prior application of ascorbic acid induced significantly greater changes: an increase in daily urine output of 5.6 times, and urinary sodium excretion of more than 11 times, and potassium – in 3.3 times. Quantum-chemical analysis showed that these differences are attributable to the increase of molecular and ionic forms of diuretic decrease in the lumen of renal tubules in acidification of urine. **CONCLUSION.** In experiments on rats showed increased diuretic and saluretic activity of furosemide in a shift of primary urine pH to the acid side. These results open the possibility for varying the therapeutic dose-tics and regulation of some of its side effects. In addition, offer some prospects for the modification of the molecule of furosemide in order to change the isoelectric point of the drug, which, in turn, should lead to an increase in its diuretic activity.

Key words: activity of furosemide, ascorbic acid, acidification of urine.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение влияния различных лекарственных веществ на фармакодинамику фуросемида является актуальным вследствие частого его применения в комбинации с препаратами других фармакологических групп для лечения гипертонической болезни, сердечной недостаточности, нефротического синдрома, цирроза печени и многих других заболеваний [1]. Ряд имеющихся теоретических предположений позволили нам предположить наличие возможного влияния изменений рН первичной мочи на диуретическую активность фуросемида, что может отразиться на эффективности этого диуретика [2]. Единичные данные, касающиеся этой проблемы, стали появляться в мировой печати [3]. Подтверждению этого предположения и посвящено данное исследование. Целью работы было изучение диуретической и салуретической активности фуросемида у крыс при подкислении мочи аскорбиновой кислотой.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперименты проведены в осенний период на крысах-самцах Wistar массой 220–250 г, которых содержали на стандартной диете и при свободном доступе к воде в естественном световом режиме. Животные находились в индивидуальных клетках, приспособленных для сбора мочи. Первая (контрольная) группа (n=12) в течение 7 дней с помощью зонда получала внутривенно 3 мл водопроводной воды. Животным второй группы (n=12) в течение того же периода времени вводили внутривенно 3 мл 5% раствора аскорбиновой кислоты. После определения показателей рН мочи всем животным подкожно вводили фуросемид в дозе 2 мг/кг в 1 мл физиологического раствора. Производили суточный сбор мочи, определяя величину диуреза и экскрецию ионов натрия и калия. Полученные цифры сравнивали с контрольными показателями после подкожного введения 1 мл 0,9% раствора хлорида натрия. Определение кислотности мочи проводили с помощью иономера И-130.

Ионы натрия и калия определяли методом пламенной фотометрии на фотометре ПАЖ-3. Исследования на животных проводили в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (приказ МЗ СССР №75 от 12.08.1987 г.) и Федеральным законом РФ «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997 г. Результаты обрабатывали методом вариационных рядов с определением критериев Стьюдента. Анализ данных выполнен с использованием программы Biostat для Windows.

Квантово-химические расчеты выполнялись неэмпирическим методом DFT B3LYP/6-311G* с обменным функционалом Беке В3 и корреляционным функционалом Ли, Янга и Пара (LYP). Геометрия молекулы фуросемида была полностью оптимизирована, отсутствие мнимых частот колебаний подтверждало их стационарный характер. Расчет был выполнен с помощью стандартного пакета программ GAMESS (General Atomic and Molecular Electronic Structure System) методом, разработанным группой М. Гордона, содержащим все основные вычислительные алгоритмы, необходимые для теоретического исследования химических систем [4]. В качестве вычислительного ядра для квантово-химических расчетов применялся 30-узловой вычислительный кластер на базе ЭВМ IBM PC на основе ОС ASPLinux 12.0.

Определение области перехода фуросемида в молекулярную форму было проведено с помощью титрования 1% раствора фуросемида 0,01N раствором соляной кислоты.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Эксперименты показали, что величина рН мочи в контрольной группе крыс составила $7,2 \pm 0,2$, в группе, получавшей 7 дней аскорбиновую кислоту, – $6,0 \pm 0,2$. В этих условиях диуретическая и салуретическая активность фуросемида, как это следует из таблицы, существенно различалась.

Из таблицы видно, что подкожное введение

Диуретическая и салуретическая активность фуросемида (2 мг/кг) у крыс на фоне применения аскорбиновой кислотой

Исследуемые группы	Показатели функции почек					
	Диурез, мл/сут		Экскреция ионов натрия, мкмоль/сут		Экскреция ионов калия, мкмоль/сут	
	Введение физ. раствора	Введение фуросемида	Введение физ. раствора	Введение фуросемида	Введение физ. раствора	Введение фуросемида
I группа (контрольная)	5,3±0,8	<u>9,44±1,37*</u>	94,42±25,52	<u>382,1±60,0*</u>	320±42,52	<u>623,62±89,0*</u>
II группа (получавшая аскорбиновую кислоту)	3,67±0,53	<u>17,8±3,9*</u>	17,8±3,95	<u>204±32,5*</u>	189±46,0	<u>662±26,2*</u>

Примечание. Все значения, полученные после введения фуросемида, достоверно отличаются от контрольных. Подчеркнуты достоверные различия между I и II группами (p<0,001).

фуросемида контрольной группе крыс вызвало увеличение суточного диуреза в 1,8 раза. Суточная экскреция натрия увеличилась в 4 раза, экскреция калия – в 1,9 раза. Введение фуросемида на фоне предварительного применения аскорбиновой кислоты индуцировало значительно большее увеличение суточного диуреза, превосходившее исходные показатели в 4,9 раза. Аналогичные различия были зафиксированы и со стороны экскреции электролитов. Так, выделение натрия с мочой возросло более чем в 11 раз, а калия – в 3,5 раза.

Результаты квантово-химических расчетов показали, что из всех функциональных групп, имеющих в структуре фуросемида, образовать водородные связи с белковыми молекулами способны сульфаниламидная и карбоксильная группы. Аминогруппа, как в молекулярной, так и в ионной форме, дезактивирована в результате стерических затруднений, обусловленных наличием фуранового цикла. Атом водорода аминогруппы задействован в образовании прочной внутримолекулярной связи и не может принимать участие в межмолекулярном взаимодействии. Сульфаниламидная группа, выполняя функцию гидрофильного ключевого сегмента, возможно, повышает селективность молекулы, но вряд ли способна увеличивать прочность образуемого комплекса. В ионной форме карбоксильная группа, так же как и сульфаниламидная, выполняет функцию гидрофильного ключевого сегмента, по всей вероятности, увеличивает селективность молекулы, но не способна участвовать в образовании прочного комплекса с полярными группами на белке-мишени. В молекулярной форме карбоксильная группа способна увеличить прочность комплекса на 31 кДж/моль, взаимодействуя с анионными остатками аспарагиновой и глутаминовой кислот белка-мишени. Максимально возможный аффинитет молекулярной формы фуросемида к белкам-мишеням в водной среде составляет ≈ 53 кДж/моль, а константа равновесия $K=8,61 \times 10^8$, ионной – только $K=5,1 \times 10^3$ при температуре 310К (37°C). Таким образом, биологической активностью теоретически в большей мере должна обладать молекулярная форма вещества, чем ионная.

Титрование раствора фуросемида показало, что изоэлектрическая точка фуросемида находится в области значений рН 5,7–5,6. Из этого следует, что в крови фуросемид находится в основном в ионной форме. А в моче, в зависимости от значения ее рН, доля молекулярной формы препарата меняется, и, следовательно, должна меняться и величина его активности.

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, на фоне применения аскорбиновой кислоты зафиксирован значительно более выраженный диуретический и салуретический эффект фуросемида. Рост диуретической активности препарата в группе крыс на фоне использования аскорбиновой кислоты, очевидно, связан с увеличением доли молекулярной формы препарата в почечном канальце. Как показали квантово-химические расчеты, молекулярная форма фуросемида имеет больший аффинитет к белку-мишени, чем ионная. Карбоксильный ион глутаминовой или аспарагиновой кислот в молекуле транспортера взаимодействует с карбоксильной группой фуросемида, и таким образом образует прочный комплекс лекарственного вещества с белком. При этом энергетический выигрыш наблюдается только при взаимодействии органических анионов с нейтральными молекулами [5]. По-видимому, при физиологических значениях рН среды в ионной форме находятся глутаминовая и аспарагиновая кислоты белковых транспортеров, а фуросемид выступает в виде нейтральной молекулы. В процессе комплексообразования происходит разрыв сольватационных оболочек белка и фуросемида с замещением молекул воды. В результате образуется прочная водородная связь между водородом карбоксильной группы препарата и кислородом карбоксильной группы глутаминовой или аспарагиновой кислот. Особо следует отметить образование прочных водородных связей в ароматических и сопряженных системах. Ионизированной форме молекулы фуросемида выгоднее образовывать межмолекулярный комплекс с молекулами воды, т.е. пребывать в состоянии специфической сольватации. Два карбоксильных иона в водной среде не могут образовывать прочную водородную связь. Разрыв их сольватационных оболочек энергетически невозможен. При значении рН 6,0 доля молекулярной формы резко повышается, что свидетельствует о ее значимой роли в обеспечении активности препарата.

Проведенное сравнительное исследование активности фуросемида на фоне применения аскорбиновой кислоты не только выявило ряд закономерностей фармакологической активности фуросемида, но и показало перспективу создания комбинированных препаратов этого препарата с веществами, способными подкислять мочу (это особенно важно у людей с щелочными значениями рН мочи) с целью модулирования активности фуросемида.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в экспериментах на крысах показано повышение диуретической и салуретической активности фуросемида в условиях сдвига рН первичной мочи в кислую сторону. Полученные результаты открывают возможность для варьирования терапевтической дозы препарата и регулирования некоторых его побочных эффектов. Кроме того, открываются определенные перспективы для модификации молекулы фуросемида с целью изменения изоэлектрической точки препарата, что, в свою очередь, должно привести к увеличению его диуретической активности.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Зверев ЯФ, Брюханов ВМ. *Фармакология и клиническое использование экстраренального действия диуретиков*. Медицинская книга, М., 2000; 10–22
2. Брюханов ВМ, Смирнов ИВ, Бондарев АА, и др. Экспериментальное и теоретическое изучение механизма диуретической активности фуросемида. *Психофармакология и биологическая наркология* 2007; (7): 1876
3. Lee MG, Chiou WL. Mechanism of ascorbic acid enhancement of the bioavailability and diuretic effect of furosemide. *Drug Metab Dispos* 1998; 26 (5): 401–407
4. Немухин АВ, Григоренко БЛ, Грановский АА. Молекулярное моделирование с программой PS GSMESS: от двухатомных молекул до ферментов. *Вестник Московского университета* 2004; (2): 75–102
5. Бондарев АА, Смирнов ИВ. Оценка энергии взаимодействия некоторых функциональных групп лекарственных веществ с белковыми молекулами в водной среде. *Известия ТПУ* 2006; 309 (4): 101–104

Поступила в редакцию 14.09.2009 г.
Принята в печать 02.03.2010 г.